

ผลของสารพาโคลบิวทราโซลต่อการแสดงออกของยีน
ที่เกี่ยวข้องในการสร้างดอกเพศเมียในตาดอกของต้นสบู่ดำ

Effects of Paclobutrazol on the Expression of Genes Involved
in Female Flower Formation in *Jatropha curcas* L. flower buds.

อนุภาพ สีสัญญ ทิตตินาด โภควัฒนา ประภัสสร ดำรงกุล อึ้งฉนิชพันธ์ จันทราภักษ์ ไตรวรรณท์
และสยาม ภพลือชัย*

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100

*Email: siam@mfu.ac.th

บทคัดย่อ

สบู่ดำเป็นพืชพลังงานทางเลือกใหม่ชนิดหนึ่งที่สามารถนำเมล็ดมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ อย่างไรก็ตามสบู่ดำมีจำนวนดอกเพศเมียน้อยกว่าดอกเพศผู้ ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตของเมล็ดต่ำลงไปด้วย ซึ่งการประยุกต์ใช้สารชะลอการเจริญเติบโตของพืชเช่นสารพาโคลบิวทราโซล (PCB) ส่งผลให้มีการเพิ่มผลผลิตที่สูงขึ้นในพืชหลายชนิด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือศึกษาผลของสาร PCB ต่อรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างโครงสร้างต่างๆ ของดอก (ABCE model) และยีนกำหนดเพศ ในตาดอกของต้นสบู่ดำ เพื่อค้นหายีนที่น่าจะควบคุมการสร้างดอกเพศเมีย จากการทดลองพบว่าสาร PCB ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนดอกเพศเมียที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่จำนวนดอกเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันกับชุดควบคุม และเมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้แล้ว พบว่าสาร PCB ส่งผลให้อัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และผลของสาร PCB ต่อรูปแบบการแสดงออกของยีน ABCE model และยีนกำหนดเพศในตาดอกที่ชั่วโมงที่ 0 4 และ 24 พบว่าสาร PCB เร่งการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ABCE model ให้มีการแสดงออกที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในตาดอกชั่วโมงที่ 4 ($p \leq 0.05$) และลดลงอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 24 ($p \leq 0.05$) แต่ยีนในกลุ่มดังกล่าวมีรูปแบบการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกัน จึงสันนิษฐานว่ายีนในกลุ่ม ABCE model อาจไม่สามารถนำมาใช้ในการอธิบายกลไกการกำหนดเพศของดอกสบู่ดำได้ ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *TASSELSEED2* (*JcTS2*) ต่อความสัมพันธ์กับจำนวนดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย พบว่ายีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์เชิงลบกับจำนวนดอกเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ ($r = -0.999$; $p \leq 0.05$) กล่าวคือเมื่อลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวจะส่งผลให้จำนวนดอกเพศเมียเพิ่มมากขึ้นในตาดอกสบู่ดำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้คาดว่ายีน *JcTS2* น่าจะมีความเกี่ยวข้องต่อการกำหนดเพศของดอกสบู่ดำ และยีนดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลทางชีวภาพในการปรับปรุงสายพันธุ์ของสบู่ดำและพืชอื่นๆ ในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ : สบู่ดำ สารพาโคลบิวทราโซล ดอกเพศเมีย กลุ่มยีน ABCE model *TASSELSEED2*

Abstract

Jatropha curcas L. (*Jatropha*) is a potential plant whose seeds could be used for biofuel production from their seeds. However, *Jatropha* plants have less number of female flowers than number of male flowers which affects to lower seed yield. The application of plant growth retardant such as Paclobutrazol (PCB) can be used for increasing plant production in many plant species. This study was aimed to find out the potential genes controlling female flower formation in *Jatropha* by investigating the expression pattern of floral organ identity genes (ABCE model) and sex determination genes in *Jatropha* flower buds after PCB treatment. It was found that PCB was

significantly increased the number of female flowers ($p \leq 0.05$) but, the number of male flowers was not different from that of the control group. As a result, the ratio of female to male flowers in PCB treatment was significantly ($p \leq 0.05$) higher than the control group. The effect of PCB on ABCE model genes and sex determination genes in *Jatropha* flower buds at 0, 4, and 24 hours after PCB treatment showed that ABCE model genes were significantly up-regulated at 4h ($p \leq 0.05$) and significantly down-regulated at 24h ($p \leq 0.05$). However, the expression pattern of genes in ABCE model were not different. We, therefore, hypothesized that genes involved in ABCE model could not be used to explain the mechanisms sexual determination of *Jatropha* flowers. The statistical analysis of the expression of *TASSELSEED2* (*JcTS2*) genes to the number of male and female flowers showed that *JcTS2* genes was negatively associated ($r = -0.999$; $p \leq 0.05$) with the number of female flowers. Therefore, *JcTS2* might be a potential gene that controls female flower formation in *Jatropha* and might be used as a database for further improving *Jatropha* and other plants' seed yield.

Keywords: *Jatropha curcas* L.; Paclobutrazol; Female flowers; ABCE model; *TASSELSEED2*

บทนำ

ในปัจจุบันทั่วโลกตระหนักถึงวิกฤตการณ์ การขาดแคลนพลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจของโลกอย่างต่อเนื่อง ในขณะเดียวกันการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล น้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ เริ่มมีความจำกัดในเชิง ปริมาณ และไม่เพียงพอต่อความต้องการที่มากขึ้นใน อนาคต [1] อีกทั้งกระบวนการแปรรูปหรือก๊าซที่ถูก ปลดปล่อยจากการใช้งานพลังงานเหล่านี้ยังส่งผล กระทบต่อสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก ดังนั้นพลังงาน ทดแทนจากชีวภาพที่สร้างจากชีวมวลจึงได้รับความ สนใจเพิ่มมากขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเป็น ไบโอดีเซล ซึ่งพืชหลายชนิดมีคุณสมบัติที่สามารถนำมา ผลิตเป็นไบโอดีเซลได้ เช่น ปาล์ม น้ำมัน ถั่วเหลือง มะพร้าว และทานตะวัน เป็นต้น อย่างไรก็ตามพืชกลุ่ม ดังกล่าวจัดเป็นพืชที่ใช้ในการบริโภคเป็นอาหาร มากกว่านำมาใช้เป็นพลังงาน [2] ดังนั้นเมล็ดสบู่ดำซึ่งมี คุณสมบัติในการนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล และ ไม่สามารถรับประทานได้ จึงได้รับความสนใจอย่าง แพร่หลาย [3]

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นพืชใน วงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับ ละคร่าง ยางพารา มันสำปะหลัง ฯลฯ มีถิ่นกำเนิดบริเวณ

อเมริกากลาง [4] และได้รับความนิยมแพร่หลายมายัง ฝั่งเอเชียรวมถึงประเทศไทย สบู่ดำเป็นไม้ยืนต้น มีลักษณะเป็นทรงพุ่มสูงประมาณ 5-7 เมตร สามารถ เก็บเกี่ยวผลผลิตและมีอายุได้ประมาณ 50-80 ปี ดอก ของสบู่ดำเป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศโดยมีดอกเพศผู้และ เพศเมียอยู่ในต้นเดียวกัน (Monoecious) ผลสุกมีสี เหลืองนวลเมื่อสุก โดย 1 ผลจะมี 3 พู พูละ 1 เมล็ด ซึ่ง เมล็ดสบู่ดำมีปริมาณน้ำมันรวมประมาณร้อยละ 40 คือ มีกรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 21 และ กรดไขมันไม่อิ่มตัว ร้อยละ 79 (ประกอบด้วยกรดไขมัน Plamitic Stearic Oleic Linoleic และอื่นๆ) ซึ่งปริมาณน้ำมันดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการนำเมล็ดสบู่ดำไปใช้ เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ [5] อย่างไรก็ตาม ปัญหาหลักของต้นสบู่ดำคือมีผลผลิตที่ค่อนข้างต่ำ ไม่เพียงพอต่อความต้องการของอุตสาหกรรม สกัดน้ำมัน [6] สาเหตุดังกล่าวเป็นผลมาจากช่อดอก ของสบู่ดำมีปริมาณดอกเพศเมียที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับ จำนวนของดอกเพศผู้ ประมาณ 0-10 ดอก ของดอก เพศเมีย และ 25-215 ดอก ของดอกเพศผู้ ส่งผลให้มี การติดผลประมาณ 5-10 ผลต่อช่อเท่านั้น [7] ในการศึกษาของ Ghosh และคณะ [8] ได้ทำการ ทดสอบโดยการใช้สารยับยั้งการสร้างฮอร์โมน

จิบเบอเรลลิน หรือสารพาคโคลบิวทราโซล (PCB) ที่ความเข้มข้นต่างๆประกอบด้วย 0 750 1,000 1,250 และ 1,500 ppm แก่ต้นสับดูต้าสายพันธุ์มีพิช อายุ 2 ปี โดยวิธีการรดลงดินใต้ต้นสับดูต้า ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มจำนวนของดอกเพศเมีย จำนวนช่อดอก และเพิ่มผลผลิตของเมล็ดสูงถึงร้อยละ 1,127 สูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ทั้งนี้ในประเทศไทยมีเพียงผลการศึกษาผลกระทบของสาร PCB ต่อความสูงและยีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในต้นสับดูต้าเท่านั้น [9], [10], [11] ยังไม่มีการศึกษาผลของการใช้สาร PCB ต่อรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างดอกและการกำหนดเพศดอกของต้นสับดูต้า

ในการออกดอกนั้น พืชจะเปลี่ยนแปลงระยะการเจริญเติบโตทางด้านกิ่งก้านสาขา (Vegetative phase) สู่ระยะเจริญทางด้านการสืบพันธุ์ (Reproductive phase) ซึ่งได้รับอิทธิพลจากหลายองค์ประกอบทั้งภายนอกและภายใน เช่น ช่วงแสง อุณหภูมิ ฮอร์โมน และการแสดงออกของยีน ซึ่งยีนในกลุ่ม ABCE model เป็น Transcription factor กลุ่มหนึ่งที่ควบคุมการสร้างและพัฒนาอวัยวะต่างๆของดอกพืช อาศัยการทำงานร่วมกันของยีนสี่กลุ่ม คือกลุ่ม A ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างกลีบเลี้ยงและกลีบดอก [12] ประกอบด้วยยีน *APETALA1* และ *2* (*AP1* และ *AP2*) กลุ่ม B ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างอวัยวะเพศผู้และกลีบดอกเป็นหลัก [13] ประกอบด้วยยีน *APETALA3* (*AP3*) และ *PISTILLATA* (*PI*) กลุ่ม C ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างและพัฒนาโครงสร้างของอวัยวะเพศผู้และเพศเมีย [13] คือยีน *AGAMOUS* และกลุ่ม E ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโครงสร้างของอวัยวะเพศเมีย [14] คือยีน *SEPALLATA 1 2 3* และ *4* (*SEP1-SEP4*) นอกจากนี้ยังมียีน *TASSELSEED2* (*TS2*) และ *SUPERMAN* (*SUP*) ซึ่งถูกรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการสร้างอวัยวะบ่งชี้เพศของดอกอีกด้วย [15], [16] ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลกระทบของสาร PCB ต่อการกำหนดเพศของดอกในต้นสับดูต้า และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน ABCE model และยีนกำหนดเพศ ในตาดอกของต้นสับดูต้าช่วงเวลา 0 4 และ 24 ชั่วโมงหลังได้รับสารเคมี

เพื่อค้นหายีนที่ควบคุมการสร้างดอกเพศเมียและเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์และวิธีการวิจัย

ขั้นที่ 1 การฉีดพ่นสารเคมี และการเก็บตัวอย่างพืช

การทดลองอยู่ในช่วงเดือนตุลาคม 2557 ถึง กุมภาพันธ์ 2558 ณ แปลงทดลองสับดูต้าสายพันธุ์มีพิชของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอแม่ลาว จังหวัดเชียงราย (19°46'43.5"N 99°41'24.9"E) โดยคัดเลือกตาดอกสับดูต้าขนาด 0.5±0.2 เซนติเมตร จำนวน 300 ตาดอกจากต้นสับดูต้าอายุประมาณ 6 ปี จากนั้นได้ทำการฉีดพ่นสารละลายพาคโคลบิวทราโซล (PCB) ที่ความเข้มข้น 1,250 ppm โดยตรงที่ตาดอกจำนวนหนึ่งครั้งด้วยกระบอกสเปรย์ ส่วนชุดควบคุมจะฉีดพ่นด้วยน้ำ โดยในแต่ละชุดการทดลองใช้ตาดอกจำนวน 150 ตาดอกต่อชุดการทดลอง จากนั้นทำการสุ่มเก็บตัวอย่างตาดอกสับดูต้า ณ ชั่วโมงที่ 0 4 และ 24 หลังจากได้รับสารเคมี จำนวน 25 ตาดอกต่อชุดการทดลอง เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างและพัฒนาโครงสร้างของดอกด้วยเทคนิค qRT-PCR และตาดอกสับดูต้าที่ได้รับสารเคมีอีกส่วนหนึ่งจะถูกปล่อยให้เจริญเติบโต เพื่อทำการเก็บข้อมูลของจำนวนดอกเพศผู้และดอกเพศเมียต่อไป

ขั้นที่ 2 การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA สายแรก

นำตัวอย่างตาดอกสับดูต้าชั่วโมงที่ 0 4 และ 24 จากขั้นที่ 1 มาสกัด RNA โดยใช้ขั้นตอนการสกัดจาก Seesangboon และคณะ [17] จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop spectro-photometer (Synergy HTX Multi-Mode reader, Biotek, USA) ที่อัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/280 นาโนเมตร และ RNA จำนวน 1 ไมโครกรัม มาสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยใช้ชุดสังเคราะห์ และวิธีของ Tetro cDNA synthesis kit (Bioline, USA)

ขั้นที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

นำคู่ไพรเมอร์ของกลุ่มยีน ABCE model และยีนกำหนดเพศจำนวน 6 คู่ ดังแสดงใน Table 1 มาศึกษาการแสดงออกของยีนในตาดอกสบู่ดำที่ช่วงวัยต่างๆ ด้วยเทคนิค qRT-PCR ภายใต้การทำงานของเครื่อง CFX96 Touch™ Real-Time PCR detection system (Biorad, USA) ปฏิกริยา qRT-PCR ทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X SensiFAST™ SYBR No-ROX mix (Bioline, USA) จำนวน 5 ไมโครลิตร 10µM ของคู่ไพรเมอร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร cDNA ที่สังเคราะห์ในขั้นที่ 2 จำนวน 1 ไมโครลิตร และน้ำ (Nuclease free-water) จำนวน 3 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ บ่มที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 40 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที และ อุณหภูมิ Ta ของแต่ละไพรเมอร์เป็นเวลา 30 วินาที สุดท้ายระบบทำการวิเคราะห์ Melting curve โดยเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 0.5 องศาเซลเซียส ในทุกๆ 3 วินาทีตั้งแต่อุณหภูมิ 65 ถึง 95 องศาเซลเซียส จากนั้นนำค่า Ct มาคำนวณค่าการแสดงออกของยีนแต่ละตัว โดยนำมาเทียบกับค่าการแสดงออกของยีน *JcActin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิง (Reference gene) โดยใช้สูตรสำหรับคำนวณด้วยวิธีของ Pfaffl [18] ดังแสดงในสมการที่ 1 และนำค่าการแสดงออกของยีนที่คำนวณได้มาแสดงผลเป็นกราฟเส้นและกราฟแท่ง

สมการที่ 1

$$\text{Expression ratio} = \frac{(E_{\text{Target}})^{\Delta C_{\text{ttarget}} (\text{control-sample})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta C_{\text{tref}} (\text{control-sample})}}$$

- E คือ ค่าประสิทธิภาพในการจับสายแม่แบบของไพรเมอร์
 Target คือ ยีนที่สนใจ
 Ref คือ ยีนอ้างอิง
 Control คือ ชุดทดลองควบคุม
 Sample คือ ชุดทดลองที่สนใจ

ขั้นที่ 4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

เปรียบเทียบจำนวนดอกเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับและไม่ได้รับสาร PCB ด้วยวิธี Paired sample t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.95 และวิเคราะห์ค่าการแสดงออกของยีนที่ได้จากขั้นที่ 3 ด้วยวิธี Paired sample t-test และ One-way ANOVA; Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.95 จากนั้นนำจำนวนดอกเพศผู้ เพศเมีย และค่าการแสดงออกของยีนแต่ละตัว มาวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson's correlation) ทั้งสามวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว ใช้โปรแกรม SPSS statistic เวอร์ชัน 21.0 (Purchase order: 10-58878) สุดท้ายนำค่าการแสดงออกของยีน มาวิเคราะห์องค์ประกอบ (Principle Component Analysis) เพื่อจัดกลุ่มการแสดงออกของยีน และหาความสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังได้รับสาร PCB โดยใช้วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ด้วยโปรแกรม PAST3 เวอร์ชัน 3.12 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) [19]

ผลการวิจัย

ผลของสารพาทโคลบิวทราโซล (PCB) ต่อจำนวนดอกเพศเมียและจำนวนดอกเพศผู้ของสบู่ดำ

หลังจากฉีดพ่นสาร PCB ที่ความเข้มข้น 1,250 ppm ที่ตาดอกสบู่ดำแล้ว 20 วัน และทำการเก็บข้อมูลจำนวนของดอกเพศเมียและดอกเพศผู้ พบว่าสาร PCB ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของดอกเพศเมียที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ถึง 1.9 เท่า แต่จำนวนดอกเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันทั้งในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสาร PCB และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ พบว่าตาดอกสบู่ดำที่ได้รับสาร PCB มีอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงใน Table 2

Table 1 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้

Gene name	Sequence (5'→3')		Ta (°C)	E	size Product (pb)	Reference
	Forward primer	Reverse primer				
<i>(JcActin) Actin</i>	GAGCAGAGAGATTCCGATGC	GCAATGCCAGGGAACATAGT	56.0	1.93	178	[20]
<i>(JcAP2) APETALA2</i>	GGGGAAAGAGATTACACCA	ACTCGTCGCGATGAAAGACT	61.5	1.71	195	[21]
<i>(JcPI) PISTILLATA</i>	GTTCCGGAAAGATGCATGAG	GTCCATTTTCAAGGGCTTCC	61.5	1.81	246	[21]
<i>(JcAG1) AGAMOUS1</i>	CTAACTGGAGGGCCATTTGA	TGATGCCAGGAGGAGTAAC	61.5	1.73	129	[21]
<i>(JcSEP3) SEPALLATA3</i>	GCCCTGCAACGATCCAAA	TGGGTCGCGTTGATCTGA	56.0	1.81	125	[17]
<i>(JcTS2) TASSELSEED2</i>	CGCAGCTCGAGTTATGATAC	CAAGCATAGAAGTAGCCACC	56.0	1.97	209	This study
<i>(JcSUP) SUPERMAN</i>	GGCTACTCTCTCTTTCCG	CGATTGCTAACGAGACCGAT	61.5	1.99	238	[21]

Table 2 ผลของสารพาคโคลบิวทราโซลต่อจำนวนดอกเพศเมีย เพศผู้และอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ของ สบู่ดำหลังได้รับสารเคมีจำนวน 20-35 วัน

ชุดการทดลอง	จำนวนดอกเพศเมีย	จำนวนดอกเพศผู้	อัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้
ชุดควบคุม	1.3 ± 2.43	14.7 ± 60.60	1:25
PCB 1,250 ppm	1.5 ± 4.63	9.8 ± 62.87	1:14
<i>p</i> value	<0.01	0.535	<0.01

ผลของสารพาคโคลบิวทราโซลต่อรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างโครงสร้างของดอก (ABCE model) และยีนกำหนดเพศในตาดอกสบู่ดำ

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ABCE model และยีนกำหนดเพศในตาดอกของต้นสบู่ดำในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสาร PCB เป็นเวลา 0 4 และ 24 ชั่วโมง (Figure 1) พบว่าในชุดควบคุมยีน *APETALA2 (JcAP2)* และ *PISTILLATA (JcPI)* มีการแสดงออกลดลงในชั่วโมงที่ 4 และมีการแสดงออกสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 24 ส่วนยีน *AGAMOUS1 (JcAG1)* และ *SEPALLATA3 (JcSEP3)* มีการแสดงออกที่สูงขึ้นทั้งในชั่วโมงที่ 4 และ 24 ในทางกลับกันยีน *TASSELSEED2 (JcTS2)* และ *SUPERMAN (JcSUP)* ในชุดควบคุมมีการแสดงออกของยีนทั้งสองเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 4 และลดการแสดงออกลงในชั่วโมงที่ 24 ส่วนตาดอกสบู่ดำที่ได้รับสาร PCB ในเวลาต่างๆ พบว่าสาร PCB ส่งผลให้ยีนทั้งหมดในกลุ่ม ABCE model เพิ่มการแสดงออกขึ้นในชั่วโมงที่ 4 โดยเฉพาะยีน *JcAP2* และ *JcAG1* มีการแสดงออกสูงขึ้นและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

กับชุดควบคุม และลดการแสดงออกลงในชั่วโมงที่ 24 โดยเฉพาะยีน *JcAP2* มีการลดการแสดงออกลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในส่วนของยีน *JcTS2* นั้น สาร PCB ส่งผลให้มีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายคลึงกับชุดควบคุม โดยการกระตุ้นให้ *JcTS2* มีการแสดงออกที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 4 และลดการแสดงออกลงอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 24 และในการแสดงออกของยีน *JcSUP* หลังได้รับสาร PCB พบว่ามีรูปแบบการแสดงออกที่ลดลงช้าๆ อย่างต่อเนื่องตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 4 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 โดยมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในชั่วโมงที่ 4

เมื่อพิจารณารูปแบบการแสดงออกของยีนต่างๆ ในตาดอกที่ได้รับสาร PCB ที่แต่ละช่วงเวลาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมดังแสดงใน Figure 2 จะพบว่าสาร PCB ส่งผลให้ยีน *JcAP2* *JcPI* และ *JcAG1* มีรูปแบบการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 4 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญในชั่วโมงที่ 24 แต่ยีน *JcSEP3* ไม่ได้รับผลกระทบจากสาร PCB จึงมีการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนการแสดงออกของยีน *JcTS2* เมื่อได้รับสาร PCB

มีการแสดงออกที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงที่ 4 และมีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงที่ 24 ในทางกลับกันสาร PCB ส่งผลให้ *JcSUP* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงที่ 4 และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงที่ 24

อภิปรายผลการวิจัย

สาร PCB เป็น สารเคมีที่ชะลอการเจริญเติบโตของพืชโดยยับยั้งการสร้างฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน ซึ่งส่งผลให้มีการลดการยึดตัวของข้อปล้อง และเพิ่มปริมาณดอกในพืชหลายชนิด เช่น มะม่วง[22] มะเขือเทศ[23] พริกไทย[24] เป็นต้น การศึกษาของ Gosh และคณะ [8] ได้ทดลองให้สาร PCB ที่ความเข้มข้นต่างๆ แก่ต้นสบูดำ พบว่าสารดังกล่าวเพิ่มปริมาณผลผลิตได้ถึงร้อยละ 1,127 ในปีที่ 2 ในส่วนการทดลองนี้พบว่าสาร PCB ส่งผลให้มีจำนวนดอกเพศเมียที่สูงขึ้นทั้งยังทำให้อัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gosh และคณะ [8] ซึ่งรายงานอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ของสบูดำที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญถึง 1:5 เมื่อได้รับสาร PCB แต่ความแตกต่างของภูมิภาค อุณหภูมิ และปริมาณการให้น้ำเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ผลการทดลองนี้มีความแตกต่างกับการศึกษาของ Gosh และคณะ [8], [25], [26] ดังนั้นจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสาร PCB สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนดอกเพศเมียของต้นสบูดำได้

การศึกษาของ Popluechai และคณะ [25] และ Kohli และคณะ [27] ระบุว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบูดำในประเทศไทยและทั่วโลกมีความแปรปรวนที่ต่ำมาก หากต้องการปรับปรุงสายพันธุ์ให้ได้ลักษณะที่ต้องการ จะต้องปรับปรุงโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเท่านั้น โดยในการศึกษาของ Sujintawong และคณะ [21] ได้รายงานว่รูปแบบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ABCE model ในดอกสบูดำเพศเมียและเพศผู้ที่โตเต็มที่แล้วไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากศึกษาในดอกสบูดำที่โตเต็มที่แล้วซึ่งเป็นระยะที่มีการพัฒนาเพศของดอกไปเรียบร้อยแล้ว ดังนั้นในงานวิจัยนี้เพื่อค้นหายีนที่น่าจะเกี่ยวข้องหรือควบคุม

การสร้างดอกเพศเมีย ได้วิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ABCE model และยีนกำหนดเพศ ในตาดอกของต้นสบูดำเมื่อได้รับสารเคมีที่ 0 4 และ 24 ชั่วโมง โดยตาดอกสบูดำในเวลาดังกล่าวจะเป็นระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาอวัยวะสืบเพศของดอก ดังนั้นในการศึกษานี้จะเห็นรูปแบบการแสดงออกของยีนเพื่อควบคุมการสร้างเพศของดอกสบูดำได้ จากผลวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนทั้งสองรูปแบบจะเห็นว่ายีน *JcAP2* *JcPI* *JcAG1* และ *JcSEP3* โดยปกติแล้วจะมีรูปแบบหรือแนวโน้มของการแสดงออกที่สูงขึ้นเรื่อยๆ แต่เมื่อได้รับสาร PCB จะกระตุ้นให้ยีนในกลุ่มเหล่านี้มีการแสดงออกที่มากกว่าและเร็วกว่าปกติตั้งแต่ช่วงที่ 4 และมีการแสดงออกน้อยกว่าชุดควบคุมในช่วงที่ 24 แสดงให้เห็นว่ายีนในกลุ่ม ABCE ตอบสนองต่อสาร PCB โดยกระตุ้นให้มีการสร้างโครงสร้างของดอกสบูดำที่เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามยีนในกลุ่มดังกล่าวไม่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อระบุยีนที่ควบคุมการสร้างดอกเพศเมียในสบูดำได้ เนื่องจากมีทิศทางการแสดงออกที่เหมือนกันทั้งหมด [28], [21] นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์ในการควบคุมการสร้างเพศของดอกในพืชชนิดอื่นๆ ด้วยเช่นกัน ได้แก่ยีน *TS2* ซึ่งเป็นยีนที่เมื่อถูกถอดรหัสจะสร้างเอ็นไซม์ Short chain alcohol dehydrogenase ที่ควบคุมการสร้างอวัยวะเพศผู้ในดอกของข้าวโพด [15] ในการทดลองนี้เมื่อตาดอกได้รับสาร PCB ยีน *JcTS2* มีรูปแบบการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกันกับชุดควบคุม คือมีการแสดงออกที่สูงขึ้นในช่วงที่ 4 และลดการแสดงออกลงในช่วงที่ 24 และสาร PCB กระตุ้นให้ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และลดการแสดงออกลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงที่ 4 และ 24 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสาร PCB มีผลต่อการแสดงออกของยีน *JcTS2* โดยส่งผลให้ต้นสบูดำมีการสร้างดอกเพศผู้อย่างคงที่ ซึ่งผลดังกล่าวยังสอดคล้องไปยังการศึกษาของ Chen และคณะ [29] พบว่า *JcTS2* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญในตาดอกสบูดำ อีกทั้งยังส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของดอกเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ

แต่จำนวนดอกเพศผู้คงที่เท่ากับชุดควบคุมหลังจาก
ได้รับสาร 6-benzyladenine ที่ความเข้มข้น 0.5 mM

และในส่วนของยีน *JcSUP* ซึ่งเป็นกลุ่ม

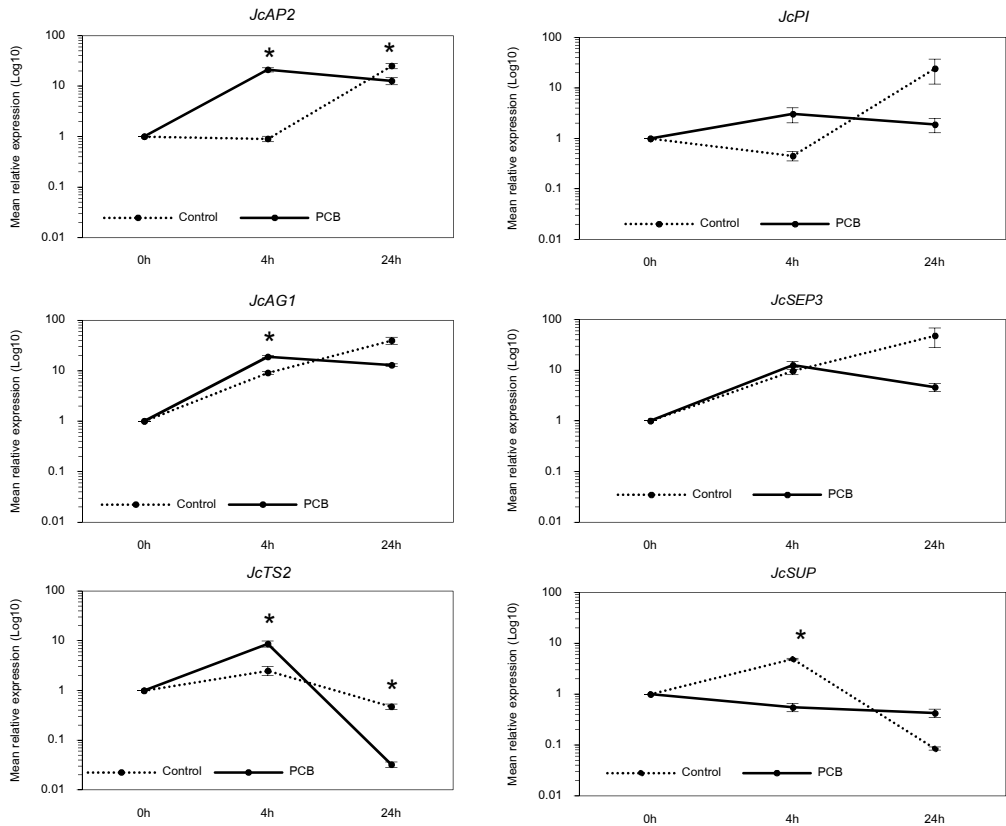


Figure 1 รูปแบบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างโครงสร้างดอกและยีนกำหนดเพศในตาดอกสผู้ตัว
ของชุดควบคุม และชุดที่ได้รับสารพาโคลบิวทราโซลที่เวลาต่างๆ ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนคำนวณ
ในรูป $\text{Log}_{10} \pm$ ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Standard error of mean) ($n=3$) สัญลักษณ์ดอกจัน (*)
บนกราฟเส้นแสดงความแตกต่างทางสถิติที่มีความเชื่อมั่น 0.95 ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง

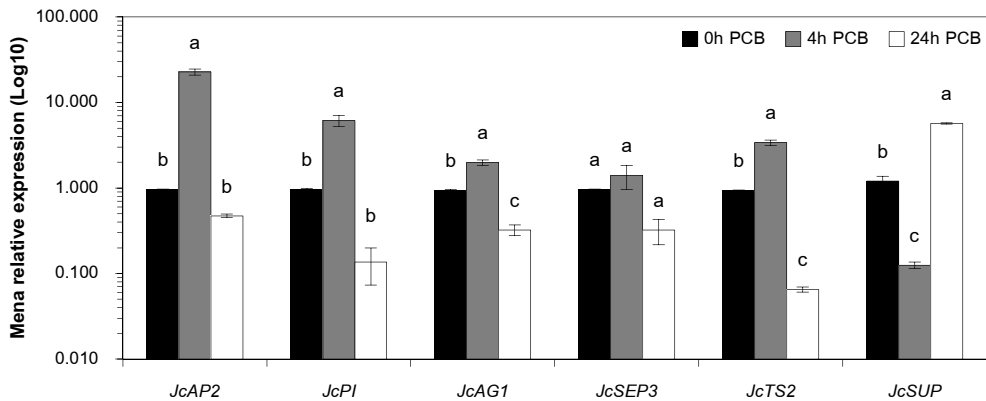


Figure 2 รูปแบบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างโครงสร้างดอกและยีนกำหนดเพศในตาดอกสับดูดำที่ได้รับสารพาทาโคลบิวทราโซลที่เวลาต่างๆ โดยเทียบ (Normalized) กับชุดควบคุม ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนคำนวณในรูป $\text{Log}_{10} \pm$ ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Standard error of mean) ($n=3$) ตัวอักษร a b และ c บนกราฟแท่งแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.95

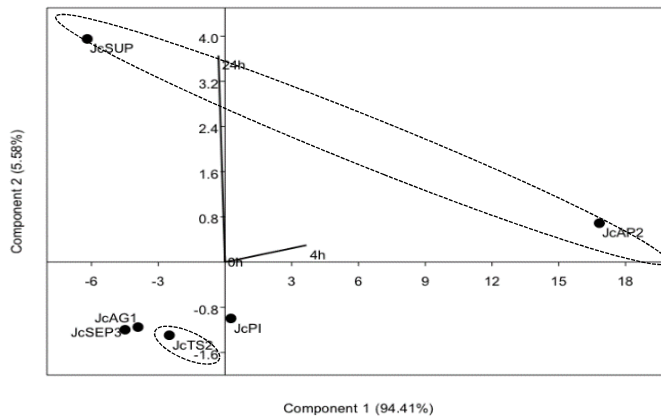


Figure 3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของยีนที่ควบคุมการสร้างและพัฒนาโครงสร้างของดอกสับดูดำต่อตาดอกที่เวลาต่างๆ หลังได้รับสารพาทาโคลบิวทราโซล

Table 3 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างยีนที่ควบคุมการสร้างโครงสร้างของดอกต่อจำนวนดอกเพศผู้

เวลา	JcAP2	JcPI	JcAG1	JcSEP3	JcTS2	JcSUP
ชั่วโมงที่ 0	0.991	0.994	0.954	0.998*	-0.326	0.317
ชั่วโมงที่ 4	-0.938	-0.826	-0.987	-0.770	0.103	-0.904
ชั่วโมงที่ 24	0.276	0.960	0.843	0.968	-0.967	0.093

*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

Table 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างยีนที่ควบคุมการสร้างโครงสร้างของดอกต่อจำนวนดอกเพศเมีย

เวลา	<i>JcAP2</i>	<i>JcPI</i>	<i>JcAG1</i>	<i>JcSEP3</i>	<i>JcTS2</i>	<i>JcSUP</i>
ชั่วโมงที่ 0	0.997	0.994	0.868	0.961	-0.117	0.107
ชั่วโมงที่ 4	-0.843	-0.687	-0.882	-0.889	-0.112	-0.791
ชั่วโมงที่ 24	0.475	0.877	0.708	0.891	-0.999*	0.304

*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

Transcription factor gene ที่สร้างโปรตีน C2H2 type zinc finger และเป็นยีนกำหนดเพศที่ควบคุมการสร้างดอกเพศเมียใน *Silene latifolia* [16] และสบูดำ [30] ในชุดควบคุมมีรูปแบบการแสดงออกที่สูงขึ้นในชั่วโมงที่ 4 และลดการแสดงออกลงในชั่วโมงที่ 24 อย่างไรก็ตามสาร PCB สามารถลดการแสดงออกของยีน *JcSUP* และยังคงรักษาระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในชั่วโมงที่ 24 ให้คงที่อีกด้วย

ในส่วนของ การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนที่มีต่อตาดอกสบูดำในช่วงเวลาต่างๆ จาก Figure 2 พบว่า PCA สามารถแยกได้เป็นสององค์ประกอบหลักที่มีค่าความแปรปรวนของข้อมูลรวมถึงร้อยละ 99.99 โดยในองค์ประกอบที่ 1 สามารถอธิบายค่าความแปรปรวนของข้อมูลได้ถึงร้อยละ 94.41 ซึ่งมีความสัมพันธ์ไปยังตาดอกสบูดำชั่วโมงที่ 4 มีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงที่สุดกับยีน *JcAP2* และมีความสัมพันธ์เชิงลบต่ำที่สุดกับยีน *JcSUP* และในองค์ประกอบที่ 2 สามารถอธิบายค่าความแปรปรวนของข้อมูลได้ถึงร้อยละ 5.58 โดยมีความสัมพันธ์ไปยังตาดอกสบูดำชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงที่สุดกับยีน *JcSUP* และมีความสัมพันธ์เชิงลบต่ำสุดกับยีน *JcTS2* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในตาดอกชั่วโมงที่ 4 น่าจะเป็นช่วงที่ตาดอกสบูดำมีการพัฒนาโครงสร้างของดอกต่างๆ ไปเป็นหลัก ซึ่งเห็นได้จากมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงที่สุดกับยีน *JcAP2* ที่มีหน้าที่หลักในการควบคุมการสร้างกลีบเลี้ยงและกลีบดอก และชั่วโมงที่ 24 น่าจะเป็นช่วงที่มีความเกี่ยวข้องในการสร้างเพศของดอกสบูดำ เนื่องจากผล PCA ในองค์ประกอบที่ 2 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของยีนบ่งชี้เพศระหว่างยีน *JcTS2* และ *JcSUP* ที่ส่งผลต่อความแปรปรวนของข้อมูลในตาดอกสบูดำชั่วโมงที่ 24 มากที่สุด

การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พบว่า (Table 3) ยีน *JcSEP3* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อจำนวนดอกเพศผู้ของสบูดำอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม หากพิจารณารูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีนดังกล่าวไม่สามารถนำมาอธิบายความสัมพันธ์ต่อดอกเพศผู้ของต้นสบูดำได้ เนื่องจากยีนดังกล่าวมีรูปแบบการแสดงออกที่ไม่แตกต่างระหว่างชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับสาร PCB มากไปกว่านั้นยังมีรูปแบบการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันกับยีน ABCE model ตัวอื่นๆอีกด้วย ผลสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตาดอกชั่วโมงที่ 24 (Table 4) พบว่ายีน *JcTS2* มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับจำนวนดอกเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ ($r=-0.999$; $p<0.05$) แสดงให้เห็นว่าเมื่อยีนดังกล่าวลดการแสดงออกลงจะส่งผลให้มีการเพิ่มปริมาณการสร้างดอกเพศเมียมากขึ้น ดังนั้นยีน *JcTS2* จึงเป็นยีนที่น่าสนใจและมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการควบคุมการสร้างดอกเพศผู้โดยส่งผลกระทบต่ออายุอัตราส่วนของดอกเพศเมียต่อดอกเพศผู้ในต้นสบูดำ [29] อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วยวิธีการอื่นๆ เช่น การ overexpression หรือ gene silencing ในสบูดำหรือพืชต้นแบบชนิดอื่นๆ เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันความสามารถและความสำคัญในการควบคุมการสร้างดอกเพศเมียต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การประยุกต์ใช้สารพาโคลบิวทราโซล ที่ความเข้มข้น 1,250 ppm สามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มจำนวนดอกเพศเมียในต้นสบูดำอย่างมีนัยสำคัญ โดยสารดังกล่าวมีผลกระทบต่อรูปแบบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างและพัฒนาโครงสร้างดอก (ABCE model) และยีนกำหนดเพศที่แตกต่างกันออกไป โดยพบว่าสาร PCB ส่งผลให้ยีนในกลุ่ม

ABCE model มีรูปแบบการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งยีนกลุ่มดังกล่าวสามารถใช้อธิบายกลไกการสร้างและพัฒนาโครงสร้างของดอกสบู่ดำได้ แต่ไม่สามารถนำมาอธิบายการควบคุมการกำหนดเพศของดอกสบู่ดำได้ในส่วนของยีนกำหนดเพศประกอบด้วยยีน *JcTS2* และ *JcSUP* มีการตอบสนองต่อสาร PCB โดยการแสดงออกของยีนทั้งสองส่งผลให้มีการสร้างดอกเพศผู้ที่ลดลง และส่งเสริมการสร้างดอกเพศเมียให้มากขึ้นตามลำดับที่สำคัญยีน *JcTS2* เป็นยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการสร้างดอกเพศผู้ในสบู่ดำ ซึ่งการลดการแสดงออกของยีน *JcTS2* น่าจะส่งผลให้มีการลดการสร้างดอกเพศผู้และส่งเสริมการสร้างดอกเพศเมียให้มากขึ้นในต้นสบู่ดำ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (หมายเลขโครงการ 58201010005) สำนักวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงที่สนับสนุนอุปกรณ์วิจัยและพื้นที่สำหรับงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

[1] Shafiee, S. and Topal, E. 2009. "When will fossil fuel reserves be diminished?". *Energy Policy*. Elsevier. 37:181–9.

[2] Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., and Dalai, A.K. 2010. "Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier. 14: 578–597.

[3] Fairless, D. 2007. "Biofuel: the little shrub that could-maybe" *Nature*. 449: 652–655.

[4] Janick, J. and Paull, R.E. 2008. *The encyclopedia of fruit and nuts*. CABI Press.

[5] Akbar, E., Yaakob, Z., Kamarudin, S.K., Ismail, M., and Salimon, J. 2009. "Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock feedstock". *European journal of scientific research*. 29: 396–403.

[6] Sanderson, K. 2009. "Wonder weed plans fail to flourish". *Nature*. 461: 328–329.

[7] Alam, N.C.N., Abdullah, T.L., and Nur, A.P.A. 2011. "Flowering and fruit set under Malaysian climate of *Jatropha curcas* L." *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 6: 142–147.

[8] Ghosh, A., Chikara, J., Chaudhary, D.R., Prakash, A., Boricha, G., and Zala, A. 2010. "Paclobutrazol arrests vegetative growth and unveils unexpressed yield potential of *Jatropha curcas*". *Journal of Plant Growth Regulation*. 29: 307–315.

[9] Sangsuriyaroj, A., and Popluechai, S. 2012. *Effect of paclobutrazol on mRNA accumulation of gibberellins biosynthesis genes in *Jatropha curcas**. In Proceedings of the 1st International Conference "Challenges Toward ASEAN Integration", 29-30 November and 1 December. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

- [10] Kanghae, A., Phukhae, S., Sangsuriyaroj, A., Thongbai, P., and Popluechai, S. 2012 **Effect of paclobutrazol on mRNA accumulation of *ent-kaurene oxidase* and *GA20-oxidase* genes and plant height of *Jatropha curcas* L.** In Proceedings of the 1st International Conference "Challenges Toward ASEAN Integration", 29-30 November and 1 December. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.
- [11] Thongbai, P., and Hadiwijaya, B., 2009. **Effect of gibberellin inhibitor and growth of *Jatropha curcas* L.** In Proceedings of the international conference of Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environment, 22-25 September. BITEC, Bangkok, Thailand.
- [12] Jofuku, K.D., Den-Boer, B.G., Van Montagu, M., Okamoto, J.K., 1994. "Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*". **The Plant Cell**. 6: 1211–1225.
- [13] Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M. 1989. "Genes directing flower development in *Arabidopsis*". **The Plant Cell**. 1: 37–52.
- [14] Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M.F., Kater, M.M., and Colombo, L. 2003. "MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*". **The Plant Cell**. 15: 2603–2611.
- [15] DeLong, A., Calderon-Urrea, A., and Dellaporta, S.L. 1993. "Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion". **Cell**. 74: 757–768.
- [16] Kazama, Y., Fujiwara, M.T., Koizumi, A., Nishihara, K., Nishiyama, R., Kifune, E., Abe, T. and Kawano, S. 2009. "A *SUPERMAN*-like gene is exclusively expressed in female flowers of the dioecious plant *Silene latifolia*". **Plant and Cell Physiology**, 50: 1127-1141.
- [17] Seesangboon, A., Grunec, L., Eungwanichayapant, P.D., Tovanonont, J., and Popluechai S. 2014. **Evaluation of floral transcription factor genes involved in *Jatropha curcas* L. flower formation.** In Proceedings of the 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, 26-29 November. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand
- [18] Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In **AZ Quantitative PCR**. edited by SA Bustin 1:89–113.
- [19] Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P.D. 2001. "Paleontological Statistics Software: Package for Education and Data Analysis". **Palaeontologia Electronica**

- [20] Sangsuriyaroj, A., Popluechai, S., and Thongbai, P. 2012. **Effect of Paclobutrazol on mRNA accumulation of some Gibberellins biosynthesis Gene in Physic Nut (*Jatropha curcas*)**. In Proceedings of the 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference on Green Biotechnology: Renewable Energy and Global Care, 29-30 November. Ubon Ratchathani, Thailand.
- [21] Sujintawong, A., Sansri, W., Eungwanichayapant, P.D., Thongbai, P., and Popluechai, S. 2012. **Expression of floral organ identity gene in male and female flower of *Jatropha curcas* L.** In Proceedings of the 1st International Conference "Challenges Toward ASEAN Integration", 29-30 November and 1 December. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.
- [22] Kulkarni, V., Hamilton, D., and McMahon, G. 2006. "Flowering and fruiting in mangoes in the top end with paclobutrazol". **Crops, Forestry and Horticulture, Darwin, Northern Territory Govt.** 1–3.
- [23] Berova, M., and Zlatev, Z. 2000. "Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.)". **Plant Growth Regulation.** 30: 117–123.
- [24] Grossi, J.A.S., de Moraes, P.J., de Araújo Tinoco, S., Barbosa, J.G., Finger, F.L. and Cecon, P.R., 2005. "Effects of Paclobutrazol on growth and fruiting characteristics of 'Pitanga' ornamental pepper". **Acta Horticulturae.** 683: 333-336.
- [25] Popluechai, S., Breviario, D., Mulpuri, S., Makkar, H., Raorane, M., Reddy A.R., Palchetti, E., Gatehouse, A.M.R., Syers, J.K. and O'Donnell, A.G. 2009. "Narrow genetic and apparent phenetic diversity in *Jatropha curcas*: initial success with generating low phorbol ester interspecific hybrids". **Nature proceeding.**
- [26] Luo, C., He, X.H., Chen, H., Ou, S.J., Gao, M.P., Brown, J.S., Tondo, C.T. and Schnell, R.J. 2011. "Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers". **Biochemical Systematics and Ecology** 39: 676-684.
- [27] Kohli, A., Raorane, M., Popluechai, S., Kannan, U., Syers, J.K., O'Donnell, AG, 2009. "Biofuels: *Jatropha curcas* as a novel, non-edible oilseed plant for biodiesel". **Environ Impact Genetic Modified Crops.** 296-324.
- [28] Kamput, K., and Samipak, S. 2014. "Comparison of gene expression in early male and female flower in *Jatropha curcas* L. using cDNA-AFLP technique". **Thai Journal of Genetic** 7: 149–157.

- [29] Chen, M.S., Pan, B.Z., Wang, G.J., Ni, J., Niu, L., and Xu, Z.F. 2014. "Analysis of the transcriptional responses in inflorescence buds of *Jatropha curcas* exposed to cytokinin treatment". *BMC Plant Biology*. 14: 318.
- [30] Gangwar, M., Sood, H., and Chauhan, R.S. 2016. "Genomics and relative expression analysis identifies key genes associated with high female to male flower ratio in *Jatropha curcas* L.". *Molecular Biology Reports*.1-18.