**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การสำรวจ การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์สลอดที่มีสารพิษต่ำและการอนุรักษ์และขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

# Survey, Cloning of Toxic Producing Related Genes for Selection of Low Toxic Substance Purging Croton (*Croton tiglium*) Line and Conservation and Propagation by Tissue Culture Technique

**นางสาวชนากานต์ ลักษณะ**

**โครงการวิจัยประเภทงบปะมาณเงินรายได้**
**จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)**
**ประจำปีงบประมาณพ.ศ. ๒๕๖๑**
**มหาวิทยาลัยบูรพา**

**รหัสโครงการ ๖๖๗๕๕๒**
**สัญญาเลขที่ ๑๑๙/๒๕๖๑**

**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การสำรวจ การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์สลอดที่มีสารพิษต่ำและการอนุรักษ์และขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

# Survey, Cloning of Toxic Producing Related Genes for Selection of Low Toxic Substance Purging Croton (Croton tiglium) Line and Conservation and Propagation by Tissue Culture Technique

**นางสาวชนากานต์ ลักษณะ**
**คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา**
**วิทยาเขตสระแก้ว**

**ได้รับงบประมาณ เดือนตุลาคม พ.ศ. ๒๕๖๐ – กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๑**

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 119/2561

**บทคัดย่อ**

สลอดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ใกล้สูญพันธุ์ การสำรวจและเก็บรวบรวมทั้งศึกษากระบวนการสร้างสารพิษจึงมีความสำคัญดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ เพื่อรวบรวมต้นสลอดในประเทศไทยและคัดเลือกต้นที่มีการแสดงออกของยีน *Geranylgeranyl diphosphate synthase* (*GGPPS*) และ *Casbene synthase* (*CS*) ต่ำ หรือมีสารพิษ phorbol esters น้อย พบว่า การสำรวจต้นสลอดสามารถรวบรวมได้ 9 ตัวอย่าง จากพื้นที่ต่างๆดังนี้ จ.ระยอง จำนวน 1 ตัวอย่าง จ.สมุทรสงคราม จำนวน 1 ตัวอย่าง จ.พัทลุง จำนวน 2 ตัวอย่าง จ.สงขลา จำนวน 2 ตัวอย่าง จ.สุราษฎร์ธานี จำนวน 2 ตัวอย่าง และ จ.ตรัง จำนวน 1 ตัวอย่าง เมื่อสังเคราะห์ยีน *GGPPS* และ *CS* ในสลอดพบว่าสามารถสังเคราะห์ยีน *GGPPS* ได้ขนาด1,100 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยส่วน start codon และ stop codon ส่วนยีน CS สังเคราะห์ได้ยีนขนาด 254 นิวคลีโอไทด์ ส่วนระดับการแสดงออกของยีน *GGPPS* และ *CS* ในใบ ดอก และเมล็ดสลอด ที่สำรวจได้จากสวนสมุนไพร จ.ระยอง พบว่าในดอกของสลอดนั้นมีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 สูงสุด ส่วนในใบและเมล็ดมีการแสดงออกของยีนต่ำ และการแสดงออกของของยีนทั้ง 2 ในใบของสลอดจากทั้ง 9 ตัวอย่างพบว่าการแสดงออกของต้นจาก จ.สงขลามีการแสดงออกน้อยที่สุด

**Abstract**

The *Croton tiglium* L. is extinction in near future. Survey and collection for study the toxic synthesis are important. The objective of this research is collect *Croton tiglium* L. in Thailand and select the plant that low expression of *Geranylgeranyl diphosphate synthase* (*GGPPS*) and *Casbene synthase* (*CS*) gene. The result show that 9 plants were collected from Rayong 1 sample, Samut Songkhram 1 sample, Phattalung 2 samples, Songkhla 2 sample, Suratthani 2 samples and Trang 1 sample. Cloning *GGPPS* and *CS* from *Croton tiglium* revealed 1,100 and 254 nucleotide, respectively. The expression levels of the gene were compare from leaves flower and seed from Rayong. It was found that the expression in flower was higest and while leaves and seed were low. The expression level of *Croton tiglium* leave from 9 samples, leaves from Songkhla revealed the lowest expression.

**สารบัญเรื่อง**


| **เรื่อง** | **หน้า** |
|---|---|
| บทนำ | 1 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 9 |
| ผลการวิจัย | 13 |
| วิจารณ์ผลการวิจัย | 23 |
| สรุปผลการวิจัย | 25 |
| ผลผลิต | 26 |
| รายงานการเงิน | 27 |
| เอกสารอ้างอิง | 28 |
| ประวัตินักวิจัยและคณะ | 32 |

**สารบัญตาราง**


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ first strand cDNA ที่ได้จากใบสลอดโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อล NCBI | 16 |
| 2 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ first strand cDNA ที่ได้จากใบสลอดโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อล NCBI | 18 |
| 3 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ของยีน *CS* ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ first strand cDNA ที่ได้จากใบสลอด โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อล NCBI | 20 |

**สารบัญภาพ**


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แผนภูมิแสดงขอบเขตและความเชื่อมโยงของขั้นตอนในของการวิจัย | 3 |
| 2 | กระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่ม phobal ester | 5 |
| 3 | ต้นสลอดที่พบในสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อ.เมืองระยอง จ.ระยอง | 13 |
| 4 | Total RNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของต้นสลอดที่ได้จากการสำรวจที่สวนสมุนไพร จ.ระยอง | 14 |
| 5 | ผลผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากใบสลอดเป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS* ตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis | 15 |
| 6 | ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากใบสลอดเป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS* ตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis | 17 |
| 7 | ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากใบสลอดเป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CS* ตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis | 19 |
| 8 | การแสดงออกของยีน CS ในใบ ราก และเมล็ด ของต้นสลอดที่ได้จากพื้นที่ จ.ระยอง | 21 |
| 9 | การแสดงออกของยีน *GGPPS* ในใบ ราก และเมล็ด ของต้นสลอดที่ได้จากพื้นที่สวนสมุนไพร จ.ระยอง | 21 |
| 10 | การแสดงออกของยีน *CS* ในใบ ของต้นสลอดที่ได้จากแต่ละพื้นที่ที่สำรวจได้ | 22 |
| 11 | การแสดงออกของยีน GGPPS ในใบของต้นสลอดที่ได้จากแต่ละพื้นที่ที่สำรวจได้ | 22 |

# บทนำ

**1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย**

สมุนไพรหลายชนิดที่มีความเป็นพิษ หรือมีฤทธิ์แรง การนำสมุนไพรเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ทางยาจึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ประกาศให้สมุนไพรหลายชนิดเป็นยาสมุนไพรอันตราย (มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์แผนไทยเดิมฯ, 2541; 2548) ลูกสลอดเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ถูกประกาศให้เป็นยาอันตราย ไม่อนุญาตให้ใช้เมล็ดสลอดหรือน้ำมันสลอดในยาแผนโบราณซึ่งมีอยู่หลายตำรับที่มีลูกสลอดเป็นส่วนประกอบ โดยในทางการแพทย์แผนไทยจะใช้ลูกสลอดเป็นยาถ่ายอย่างแรง แก้ลม แก้หืดไอ แก้เสมหะ แก้พยาธิ ถ่ายน้ำเหลืองเสีย ถ่ายโลหิต เป็นต้น (วุฒิ, 2540) สาเหตุที่ลูกสลอดนั้นถูกควบคุมเพราะกำหนดขนาดยายากและมีฤทธิ์แรงเกินไป

เมล็ดสลอดมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น กรดไขมัน ตัวอย่างเช่น oleic acid และ linoleic acid ส่วนที่เป็นพิษคือสารในกลุ่ม phorbol และกลุ่ม phorbol esters หลายชนิด ซึ่งสารกลุ่ม phorbol มีฤทธิ์ระคายเคืองผิวหนังอย่างรุนแรง มีฤทธิ์เป็น tumor promoter และ เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ก่อให้เกิดเนื้องอก และมะเร็ง (Duuren *et al*., 1966; Duuren and Sivak, 1968; Baird and Boutwell, 1971; Raick *et al*., 1972; Goel *et al*., 2007) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Shahid *et al*., 2008) และฤทธิ์อื่น ๆ (Duuren *et al*., 1966; Duuren and Sivak, 1968; Baird and Boutwell, 1971; Raick *et al*., 1972; Goel *et al*., 2007)

สลอดเป็นยาที่มีพิษแต่ในขณะเดียวกันกลับให้คุณมากมาย ในต่างประเทศได้นำสลอดไปวิจัยและพบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชว่าสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งและเนื้องอกได้ (Duuren *et al*.,1966 ; Baird and Boutwell ,1971; Raick *et al*., 1972 ; Goel *et al*., 2007 ) แต่เป็นที่น่าเสียดายที่เราไม่สามารถหาซื้อสลอดได้ตามร้านขายยาแผนโบราณเหมือนสมัยก่อน เนื่องจากประชาชนรับรู้เพียงว่าสลอดนั้นมีโทษ แต่ไม่ทราบถึงประโยชน์ จึงทำให้ปัจจุบันนี้สลอดกลายเป็นพืชหายากจนเกือบสูญพันธุ์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการสำรวจและเก็บรวบรวมต้นสลอดในบริเวณป่าชุมชนของ จ.สระแก้ว ทางการแพทย์แผนไทยไม่ได้นำสลอดมาใช้รักษาโรคโดยตรง แต่ต้องนำมาผ่านกรรมวิธีการแปรสภาพเพื่อให้สาร phorbol esters ลดลง แต่พบว่าเมื่อมีการแปรสภาพจะทำให้สารสำคัญชนิดอื่นที่มีประโยชน์ลดลงไปด้วย ซึ่งถ้ามีสายพันธุ์สลอดที่มี สาร phorbol esters น้อยลงหรือมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยให้สาร phorbol esters มีฤทธิ์เจือจางลง จะทำให้มีการนำสลอดมาเป็นส่วนผสมในตำรับยาที่แพร่หลายมากขึ้นด้วย โดยยีนที่ควบคุมการสร้างสารที่เป็นพิษในสลอดในคือยีน *Geranylgeranyl diphosphate synthase* (*GGPPS*) และ *Casbene synthase* (*CS*) ดังนั้นจึงจะรวบรวมสลอดในหลายๆ พื้นที่และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* และ ยีน *CS* ร่วมกับการวิเคราะห์หาปริมาณสาร phorbol esters เพื่อคัดเลือกต้นที่มีการแสดงออกของยีนต่ำ ที่สัมพันธ์กับการสะสมสาร phorbol esters ต่ำ เนื่องจากสลอดในแต่ละพื้นที่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมทำให้การทำงานของยีนใดยีนหนึ่งหรือทั้ง 2 ยีนนี้ลดลงได้ และนำต้นที่มีการแสดงออกของทั้ง 2 ยีนต่ำ หรือมีสาร phorbol esters น้อยมาทำการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส การชักนำต้นจากแคลลัส และการเพิ่มปริมาณต้นสลอดผ่านการชักนำยอดจำนวนมาก (multiple shoot) นอกจากนี้ยังจะมีการประยุกต์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของสลอดด้วยเช่นกัน เนื่องจากปัจจุบันจำนวนต้นสลอดนั้น

ลดลง เพราะประชาชนรู้เพียงว่าต้นสลอดนั้นมีพิษ จึงไม่เป็นที่นิยมปลูกกัน เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมสลอดอันเป็นการสนองพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี ตามโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ ในการนำพันธุกรรมพืชที่มีอยู่ในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดอีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อจึงเป็นอีกวิธีที่ช่วยในการอนุรักษ์พันธุกรรมของสลอดไว้ โดยการขยายพันธุ์ต้นที่คัดเลือกไว้แล้วนำไปปลูกป่าชุมชน สวนสมุนไพรต่างๆ และสวนพฤกษศาสตร์ ในภาคตะวันออก

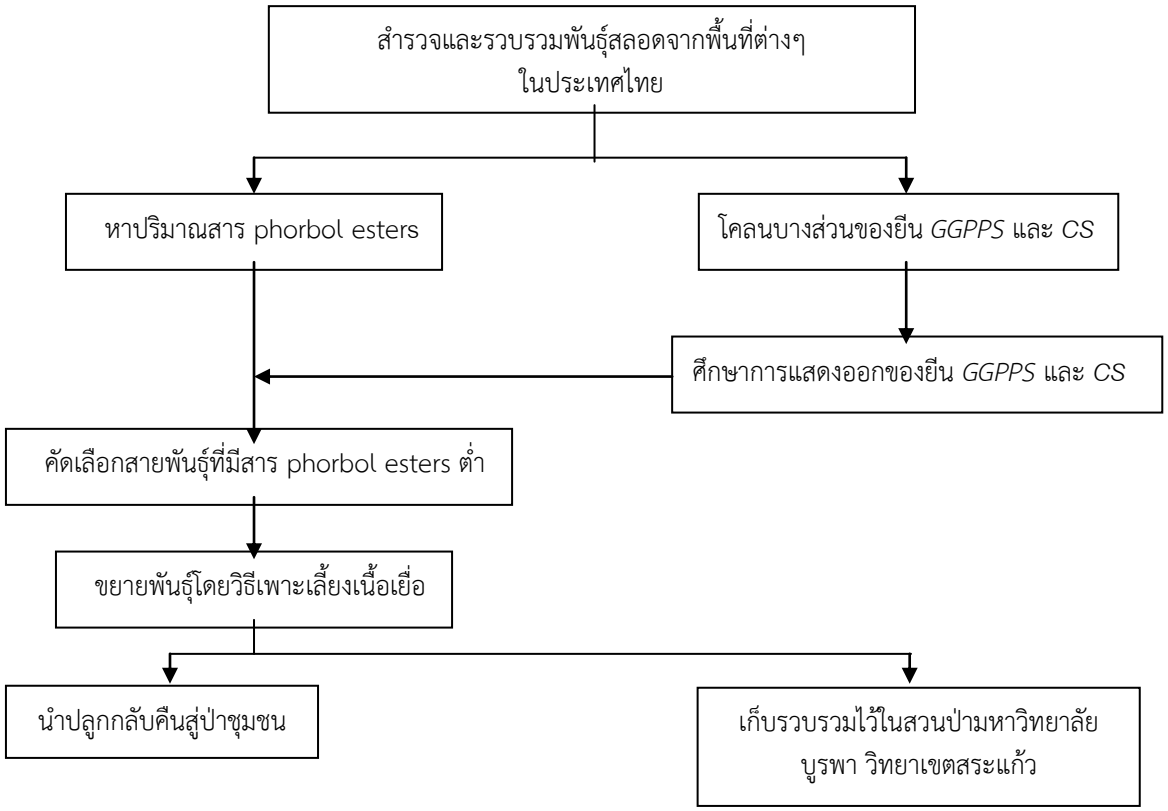
**2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

2.1 เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

2.2 เพื่อรวบรวมต้นสลอดในประเทศไทยและคัดเลือกต้นที่มีการแสดงออกของยีน *Geranylgeranyl diphosphate synthase* (*GGPPS*) และ *Casbene synthase* (*CS*) ต่ำ หรือมีสารพิษ phorbol esters น้อย

**3. ขอบเขตของโครงการวิจัย**

การศึกษานี้จะทำการสำรวจต้นสลอดจากพื้นที่อุทยานและสวนสมุนไพรต่างๆ ในภาคตะวันออกแล้วคัดเลือกต้นที่มีการแสดงออกของยีน *Geranylgeranyl diphosphate synthase* (*GGPPS*) และ *Casbene synthase* (*CS*) ต่ำ เนื่องจากเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างสาร phorbol esters ซึ่งเป็นสารพิษ โดยจะมีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร phorbol esters เพื่อเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของยีนทั้งสอง หลังจากนั้นนำต้นที่มีการแสดงออกของยีนใดยีนหนึ่งหรือทั้งสองยีนในระดับต่ำ และมีสารปริมาณ phorbol esters ต่ำมาขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยศึกษาหาประเภทของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เพื่อเป็นการผลิตแคลลัสและต้นสลอด ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการปลูกอนุรักษ์ หรือใช้ประโยชน์ต่อไป




**ภาพที่ 1** แผนภูมิแสดงขอบเขตและความเชื่อมโยงของขั้นตอนในของการวิจัย

**4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย**

สมมุติฐานของการวิจัยนี้คือ สลอดเป็นพืชที่มีประโยชน์ทางยาเป็นอย่างมาก แต่พบว่ามีสารพิษจึงทำให้ไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยาอย่างจริงจัง แต่กลับถูกตัดทำลายจนสลอดเป็นพืชที่ใกล้จะสูญพันธุ์ ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะทำการสำรวจสลอดในพื้นที่ป่าชุมชนของจังหวัดสระแก้ว เพื่อนำมาคัดเลือกต้นที่มีปริมาณสารพิษ phorbol esters ต่ำ เนื่องจากสลอดในแต่ละพื้นที่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมทำให้ยีนที่ควบคุมการผลิตสารพิษนี้ผลิตสารพิษได้ลดลง และนำต้นที่มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการบวนการสร้างสาร phorbol esters ต่ำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยการหาประเภทของเนื้อเยื่อและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนำไปปลูกกลับคืนสู่ป่าชุมชน สวนสมุนไพร และสวนพฤษศาสตร์ของโรงเรียนของจังหวัดสระแก้วต่อไป

**5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง**

ชื่อวิทยาศาสตร์ของสลอดคือ *Croton tiglium* Linn. มีชื่อพ้องว่า *Croton birmanicus* Müll.Arg, *Croton himalaicus* D.G. Long อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่ออื่น ๆ ได้แก่ Purging Croton, Croton Oil Plant, สลอด, มะข่าง, มะคัง (เชียงใหม่), มะตอด, ลูกผลาญศัตรู (เหนือ), สลอดต้น, หมากทาง, หมากหลอด (กลาง), หมากยอง (แม่ฮ่องสอน), หัสคืน (เหนือ), บะกั้ง (แพร่) (วุฒิ, 2540; National Herbarium Nederland, 2012)

**สรรพคุณทางยา (**วุฒิ, 2540**; นันทวัน และอรนุช,** 2543**)**

ใบ รสฝาดเมา แก้ตะมอย แก้ไส้ด้วน ไส้ลาม แก้พยาธิไส้เดือน แก้ลมอัมพฤกษ์ แก้กลากเกลื้อน คุดทะราด ดับเตโชธาตุมิให้เจริญ ทำให้ผิวงาม

ดอก รสฝาดเมาเย็น ฆ่าเชื้อโรคกลากเกลื้อน แก้คุดทะราด แก้ลมอัมพฤกษ์ ดับเตโชธาตุมิให้เจริญ ถ่ายอย่างแรง ถ่ายพิษต่าง ๆ

เมล็ด รสร้อนเผ็ดมัน เป็นยาถ่ายอย่างแรง ถ่ายร้อนคอ ปวดมวน แก้ลม แก้หืดไอ แก้เสมหะ แก้พยาธิ ถ่ายน้ำเหลืองเสีย ถ่ายลม ถ่ายเสมหะ ถ่ายโลหิต ถ่ายพยาธิ

เปลือกต้น รสเฝื่อน แก้เสมหะอันคั่งค้างอยู่ในอกและลำคอ เป็นยาถ่ายอย่างแรง

ราก ไส้ รสเมาร้อน แก้โรคเรื้อน แก้ริดสีดวงผอมเหลือง รักษาริดสีดวง คุมกำเนิด

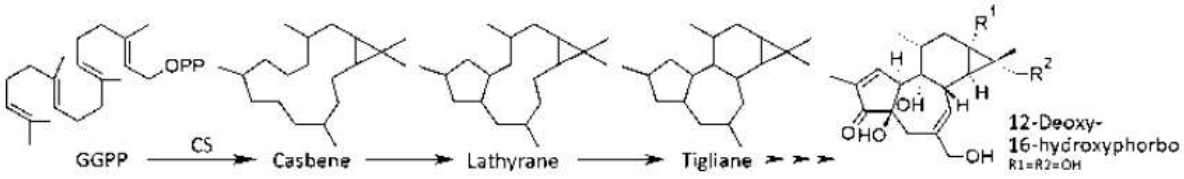
**องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดสลอด**

เมล็ดสลอดมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 30-56 น้ำร้อยละ 6.29 ปริมาณเถ้าร้อยละ 3.6 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 11.98 เส้นใยร้อยละ 8.25 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 16.15 และประกอบด้วย isoguanosine; berberine (Liebich *et al*., 1998) purine nucleoside isoguanosine, alkaloid berberine; tigliane; crotin (Stirpe *et al*., 1976); crotin 1 (Sperti *et al*., 1976; นันทวัน และอรนุช **,** 2543) crotin 2 (Ferreras *et al*., 1995; นันทวัน และคณะ**,** 2543) crotin 3 (Ferreras *et al*., 1995); angelic; *crotin tiglium* lectin; *Croton tiglium* lectin; crotonoside (นันทวัน และคณะ**,** 2543) croton globulin และ croton albumin, arginine และ lysine, alkaloid ricinine (toxic), lipase, invertase, amylase, raffinase, proteolytic enzyme, crotone resin, tiglic acid, croton oleic acid, linoleic acid, stearic, palmitic, myristic acid, lauric, oenanthrallic, capronic valerianic, butyric, isobutyric, acetic, formic acids และ tannin โดยมี oleic acid และ linoleic acid เป็นกรดไขมันที่พบเป็นปริมาณมากที่สุด (Saputera, 2006; Stuartxchange, 2011; Ahmadi, n.d.) นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม diterpene ester เช่น Phorbol (Baird and Boutwell, 1971; นันทวันและคณะ, 2543; Matsuya *et al*., 2005; Goel *et al*., 2007); phorbol esters (Duuren and Sivak, 1968; Sivak *et al*, 1969; Blumberg, 1988; Nelson and Alkon, 2009)

สาร Phorbol esters เป็นสารพิษที่พบได้ในเมล็ดและน้ำยางของพืชวงศ์ Euphorbiaceae และ Thymelaeceae (Ahmed and Salimon, 2009) ซึ่งในสลอดจะพบสาร phorbol esters มากในเมล็ด phorbol esters จัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มทิกเลน (tigliane) หรือเตตราไซคลิกไดเทอร์พีนส์ (tetracyclic diterpene) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแบบ tigliane skeletal ประกอบด้วยวงคล้ายคลึงกันกับโครงสร้าง

ของสารในกลุ่มทิกเลนโดยโครงสร้างพื้นฐานของสารในกลุ่มทิกเลนประกอบด้วยวงแหวน 4 วง และมีแอลกอฮอล์เป็นส่วนหนึ่งภายในโครงสร้าง ขณะที่โครงสร้างพื้นฐานของสาร phorbol esters ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งจะเข้าจับกับโครงสร้างด้วยพันธะเอสเทอร์ในตำแหน่งต่างกัน ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของชนิดสาร phorbol esters

เมื่อได้รับพิษจากสาร phorbol esters จะส่งผลโดยตรงกับคนและสัตว์ โดยสาร phorbol esters นี้สามารถส่งเสริมให้เกิดเนื้องอก (tumor promoting activity) โดยจะไปกระตุ้น protein kinase C ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์การสังเคราะห์โปรตีนรวมถึงดีเอ็นเอผิดปกติไป นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และชักนำให้เกิดลิ่มเลือดได้ (Ahm and Salimon, 2009) ดังนั้นผลสลอดจึงเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ถูกประกาศให้เป็นยาอันตราย ไม่อนุญาตให้ใช้เมล็ดสลอดหรือน้ำมันสลอดในยาแผนโบราณ เพราะควบคุมขนาดยายากและมีฤทธิ์แรงเกินไป




**ภาพที่ 2** กระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่ม phobal ester (Nakano et al., 2012)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยที่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนถึงวิถีชีวสังเคราะห์สาร phorbol esters (Devappa *et al.*, 2011) แต่เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าสารphorbol estersเป็นอนุพันธ์ของสารประเภทสารพิษในกลุ่มทิกเลนซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (diterpenes) และไดเทอร์หนึ่งที่อยู่ในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ดังนั้นความเข้าใจในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์อาจนำมาใช้ในการอธิบายและทำนายยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์สาร phorbol esters ได้จากข้อมูลการแสดงออกของโปรตีนในสลอดที่เป็นผลมาจากการทำงานของยีนต่างๆจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนมาใช้หาความสัมพันธ์กับยีนที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สาร phorbol esters โดยยีนที่พบในสลอดได้คือยีน *Geranylgeranyl diphosphate synthase* (*GGPPS*) และ*Casbene synthase* (*CS*)

Lin *et al.* (2010) ได้ศึกษาลักษณะและหน้าที่ของยีน *GGPPS* โดยยีนจะสร้างเอนไซม์ที่มีชื่อว่า geranylgeranyldiphosphate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์โดยมี geranyl diphosphate (GPP) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสาร geranylgeranyl diphosphate (GGPP) จากการโคลนยีนดังกล่าวจากเมล็ดสบู่ดำด้วยเทคนิค RACE พบว่ายีนมีความยาวของ cDNA ทั้งหมด 1414 คู่เบสและจากการศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* พบว่ายีน *Jc-GGPPS* จะทำให้มีการสะสมของเบตาแคโรทีนโดยสังเกตได้จากสีโคโลนีของแบคทีเรียที่เปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีเหลืองดังนั้นจึงคาดว่าGGPPS จะเป็นเอนไซม์ที่มีความสาคัญในการชีวสังเคราะห์สาร phorbol esters

Nakano *et al.* (2012) ได้ศึกษาลักษณะและหน้าที่ของยีน *casbene synthase* ที่แยกได้จากใบสบู่ดำพบว่าสัมพันธ์กับวิถีชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มไดเทอพีนส์รวมถึงการชีวสังเคราะห์สาร phorbol

esters โดยยีนสร้างเอนไซม์ที่มีชื่อว่า *Jatropha curcas* casbene synthase homolog *(Jc*CSH*)* จากการโคลนยีนด้วยเทคนิค RACE พบว่ามีความยาวของ cDNA ทั้งหมด 2016 คู่เบสผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR พบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างต้นกล้า ใบแก่ และระยะพัฒนาการของผลสด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการสำรวจสลอดและทำการคัดเลือกต้นที่มีปริมาณสารพิษ phorbol esters ต่ำ ร่วมกับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องโดยเทคนิค real time PCR แล้วนำมาขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป จากการค้นคว้าเอกสารงานวิจัยยังไม่พบผลงานตีพิมพ์ที่เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสลอด แต่ก็พบว่ามีการทำในพืชหลายชนิดที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับสลอด

นันท์นภัส และคณะ (2549) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ โดยใช้ชิ้นส่วนก้านใบ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.44-17.76 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.049-9.80 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารควบคุมการเติบโตที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดจากก้านใบคือ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ โดยแคลลัสจากก้านใบข้อที่ 2 มีการพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุดคือ 70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือก้านใบของข้อที่ 3 และ 4 มีการพัฒนาเป็นยอด 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สุนทรียา และสมปอง (2557) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับสลอดคือวงศ์ Euphorbiaceae โดยใช้คัพภะที่สุกแก่ ที่มีเอ็นโดสเปิร์มมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น1 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ/หรือ IAA ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพให้แสง เป็นเวลา 14 ชั่วโมง หรือมืด เป็นระยะเวลา 13 วัน พบว่าอาหารเติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพให้แสงให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดที่ 93.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในมืดให้แสงให้เปอร์เซ็นต์การงอก 46.67 เปอร์เซ็นต์ สาหรับการชักนำยอดทำโดยนำชิ้นส่วนยอดและส่วนข้อใต้ใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA (1 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ/หรือ IBA (1 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 40 วัน พบว่าชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด คือ 4.67 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้การวางเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารที่ไม่เติมผงถ่านแบบแนวนอน ช่วยเพิ่มจำนวนยอด (2.3 ยอดต่อชิ้นส่วน) ความยาวยอด (0.26 ซม.) และจำนวนใบ (5.33 ใบต่อชิ้นส่วน)

ปี 2011 Salamma and Prasad RAO ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเอมบริโอของ *Croton scabiosus* ในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP IAA 2-ip และ NAA ความเข้มข้น 0.5 1 1.75 2.5 และ 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากที่สุด และ Salamma and Prasad RAO (2013) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น *Croton scabiosus* เนื่องจากมีการรายงานว่าพืชชนิดนี้มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดได้ยาก เนื่องจากอัตราการงอกต่ำ ผู้ทดลองจึงนำชิ้นส่วนของพืชชนิดนี้คือใบอ่อน ก้านใบ และ ปล้อง (internode) มาฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 5-T, NAA และ dicamba

พบว่าทุกฮอร์โมนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ยกเว้น NAA และอาหารที่เติม dicamba 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้แคลลัสมากที่สุด

Ashish และ Sharma (2011)ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Croton bonplandinum* BAIL.เป็นพืชที่พบได้ในแถบประเทศอินเดีย บังคลาเทศ และเอเชียใต้ ซึ่งมีคุณสมบัติทางยาคือสามารถรักษาโรคมะเร็ง โรคผิวหนัง ต้านทานแบคทีเรีย จึงทำให้มีความต้องการสูง แต่พบว่าพืชชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าไม่เพียงพอต่อความต้องการจึงใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของใบ ข้อ และปล้อง พบว่าส่วนของข้อสามารถสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Rajore and Batra (2005) ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นของสบู่ดำโดยใช้ส่วนปลายยอด (shoot tip)เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่มี BA, Kinetin และ indole-3-aceticacid (IAA) ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำปลายยอดให้เกิดยอดคือ อาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดให้เกิดรากคือ อาหารแข็งครึ่งสูตรของ MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำต้นที่ได้มาปลูกในแปลงทดลองพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์

Sujatha *et al*. (2005) ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นสบู่ดำในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนตาข้าง (axillary bud) และใบของสบู่ดำพันธุ์ไม่มีพิษ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ร่วมกับ BA kinetin และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้นตั้งแต่ 4.4-8.9 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเมื่อไม่คำนึงถึงความเข้มข้นของ BA ที่ใช้ พบว่า อัตราการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่เหมาะสม (เฉลี่ย 10-12.30 ยอด) พบในการเพาะเลี้ยงบนอาหารเริ่มต้นที่มี TDZ ความเข้มข้น 2.3-4.5 ไมโครโมลาร์ และประสิทธิภาพของการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนใบ พบในการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 8.9-44.4 ไมโครโมลาร์

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความสำเร็จของการเกิดแคลลัสและต้นได้ในพืช วงศ์ Euphorbiaceae อีกมากมาย ดังนั้นผลงานการวิจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้นจึงอาจนำมาประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสลอดได้

Mathew และ Krishnapriya (2012) ได้เพาะเลี้ยงใบอ่อนของ *Codiaeum Variegatum* หรือ Croton พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม KIN และ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นได้และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA เป็น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ได้ multiple shoot และสามารถชักนำให้เกิดรากด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Kongduang และคณะ (2014) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนเปล้าน้อย (*Croton stellatopilosus*) ซึ่งมีสาร plaunotol ที่มีฤทธิ์สมานแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้ โดยพบว่าใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 1% สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีสีเขียวและเซลล์แขวนลอยได้ และเมื่อนำแคลลัสและเซลล์แขวนลอยไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *DXS MEPS* และ *GGPPS* ซึ่งยีน 3 ชนิดนี้จะควบคุม

การผลิตสาร plaunotol พบว่าแคลลัสที่มีสีเขียวจะมีการแสดงออกของยีนทั้ง 3 นี้มากขึ้น แต่เซลล์แขวนลอยไม่มีการแสดงออกของยีนทั้ง 3 นี้

**6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

6.1 ประโยชน์ในแง่วิชาการได้แก่ นำเสนอผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ อย่างน้อย 1 เรื่อง

6.2 ประโยชน์ในแง่การประยุกต์ สามารถนำสลอดมาผสมในตำรับยาไทยได้

6.3 หน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้ได้ เช่น มหาวิทยาลัยและสถานการศึกษาที่มี การศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์ เภสัช พฤกษศาสตร์เคมี เภสัชพฤกษศาสตร์ และหน่วยงานที่มีหน้าที่ในการให้การศึกษาด้านแพทย์แผนไทย

# วิธีการดำเนินการวิจัย

## อุปกรณ์

1. ต้นสลอดที่ใช้ศึกษาประกอบด้วยอ้อย 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์การค้า KPS 94-13 อ้อยป่า (*Saccharum sapontaneum*) และอ้อยลูกผสมระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่า (พันธุ์ไบโอเทค 2)

2. อุปกรณ์สำหรับการค้นหายีน และการแสดงออกของยีน *CS* และ *GGPPS*
   - 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระบอกตวง
   - 2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
   - 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
   - 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH - meter)
   - 2.5 เครื่องชั่งสาร (balance)
   - 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave)
   - 2.7 โกร่งบดตัวอย่าง
   - 2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องกวนตะกอน (vortex®)
   - 2.9 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
   - 2.10 ชุดเครื่องมือ gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล
   - 2.11 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
   - 2.12 เครื่อง real time Biorad CFX96®.
   - 2.13 เครื่อง NanoDrop รุ่น 8000
   - 2.14 เครื่องเขย่า (shaker)
   - 2.15 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)
3. สารเคมีสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอและ สังเคราะห์ first stranded cDNA จากพืช
4. สารเคมีตามสูตร Hoagland สำหรับการปลูกอ้อยในสารละลายแบบ hydroponic
5. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารสูตร LB สำหรับโคลนยีน *MIPS*
6. ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน และตรวจสอบการแสดงออกของยีน

   ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน full length GGPPS

   CT-GGPPS2 F ATGAGTTCTGTGAATTTAG

   CT-GGPPS2 R TTAGTTTTGCCTGTATGC

   ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน

   Mip RT (inositol) F 5’CCCCAAGTCCGTCAAGTACA

   Mip RT (inositol) R 5’CTTGGTCGCCCATGAGATCC

## วิธีการ

### 1. สำรวจต้นสลอด

สำรวจต้นสลอดในเขตป่าชุมชนของอำเภอในจังหวัดสระแก้วและในบริเวณมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว โดยคณะสำรวจจะประกอบไปด้วย อาจารย์และนิสิตจากคณะ

เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ตัวแทนจากองค์การบริหารส่วนตำบล (อบต) ในแต่ละพื้นที่ที่ทำการสำรวจ และครูและนักเรียนจากโรงเรียนในพื้นที่ที่ทำการสำรวจ สำหรับพื้นที่ป่าชุมชนเป้าหมายจะประกอบไปด้วยพื้นที่ป่าชุมชนดังต่อไปนี้

13.2.1 อำเภอตาพระยา ได้แก่ ป่าชุมชนบ้านไทยสามัคคี และป่าชุมชนบ้านทับทิมสยาม
13.2.2 อำเภอเมืองสระแก้ว ได้แก่ ป่าชุมชนบ้านท่าระพา ป่าชุมชนบ้านใหญ่ และป่าชุมชน
บ้านคลองสำอางค์ ป่าชุมชนบ้านหนองผูกเต่าพัฒนา
13.2.3 อำเภอวัฒนานคร ได้แก่ ป่าชุมชนบ้านนางาม ป่าชุมชนบ้านพร้าว และป่าชุมชนบ้านโนน
13.2.4 อำเภอโคกสูง ได้แก่ ป่าชุมชนบ้านอ่างศิลา
13.2.5 อำเภอวังน้ำเย็น ได้แก่ ป่าชุมชนบ้านคลองตะขบ และป่าชุมชนบ้านทัพหลวง
13.2.6 อำเภออรัญญประเทศ ได้แก่ โครงการพัฒนาป่า ชุมชนบ้านสลองคอง
13.2.7 อำเภอคลองหาด ได้แก่โครงการพัฒนาป่า ชุมชนบ้านคลองวังจิก
13.2.8 อำเภอกิ่งวังสมบูรณ์ ได้แก่ โครงการพัฒนาป่า ชุมชนบ้านวังน้ำฝน
13.2.9 พื้นที่ในมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

**2. การโคลนยีน *GGPPS*และ *CS***

2.1 การสกัด total RNA โดยสกัด total RNA จากส่วนใบอ่อน ดอก และเมล็ดของสลอด ตามวิธีการของ Laksana and Sontichai (2015) ดังนี้ นำใบอ่อน ดอก และเมล็ดสลอดมาบดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ย้ายตัวอย่างที่บดแล้วลงหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer ที่ประกอบด้วย 2% CTAB, 2% PVP, 2M NaCl, 25mM EDTA และ 100 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วเติม $\beta$-mercaptonethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย Vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรงๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใส ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าแรงๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาทีแล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ที่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนประมาณ 10 นาที และละลายตะกอนด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase (DEPC-d$H_2O$) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำ total RNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นโดยการทำเจลอีเล็กโทรโพรีซีสด้วย 1.5% อะกาโรสใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

การกำจัดจีโนมิคดีเอ็นเอออกจากตัวอย่าง total RNA ทำโดยนำ total RNA ที่สกัดได้ 1 ไมโครกรัม เติม 10X DNase I reaction buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DNaseI ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DEPC-d$H_2O$ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 0.5 M EDTA 1 ไมโครลิตร แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ DNase I แล้วทำการตรวจสอบผลการกำจัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยการทำเจลอีเล็กโทรโพรีซีสโดยใช้ 0.8% อะกาโรสใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 40 นาที

2.2 การสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA นำ total RNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ผสมกับ 100 µM oligo $(dT)_{20}$ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DEPC-d$H_2O$ จนครบปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และบ่มต่อที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 5x reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร RiboLock RNase inhibitor ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Revert Aid M-MuL VRT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง

2.3 การออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *GGPPS* และ *CS* ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์สารพิษ phobal ester โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลสาธารณะ เช่น Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) และโปรแกรมที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบไพรเมอร์เช่น Primer3 จาก web site http://simgene.com/Primer3 เพื่อใช้โคลนยีนดังกล่าวจากอ้อยที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็ม จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ออกแบบไว้เพื่อสร้าง cDNA บางส่วนของยีนเป้าหมาย

2.4 clone cDNA บางส่วนของยีนเป้าหมายเข้าสู่ cloning vector pGem-T easy จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* แล้วสุ่มเลือก colony เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลสาธารณะเพื่อบ่งชี้ยีนโดยการใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

2.5 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* และ *CS* จากนั้นจึงตรวจสอบลำดับนิวคลีไทด์และเทียบกับฐานข้อมูลอีกครั้ง เพื่อความถูกต้อง และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่ง DNA คู่สมผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st BASE (First BASE Laboratories, Selangor DarulEhsan, Malaysia) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* *CS* และ *Eaf1a* ที่มีการรายงานในฐานข้อมูลสากลด้วยโปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi และ ทำ phylogenic tree โดยใช้โปรแกรม clustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)และ Phylodendron (http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html) การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และ bioinfinformatics นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full-length ของยีน *MIPS* ที่ได้ เปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม MEGA6 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Protein BLAST ในฐานข้อมูล GenBank (www.blast .ncbi.nlm.nih.gov) และ

ClustalW2 (www.ebi.ac.uk) สร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 (bootstrap value 1,000 replicate)

2.6 ส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเก็บบนฐานข้อมูล GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Madison, USA.)

3. **ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* และ *CS***

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS* และ *CS* ด้วยโปรแกรม primer 3 (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/ primer3plus.cgi/) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เป็น full length ที่หาได้ โดยกำหนดให้ DNA ที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยามีขนาด 150-200 คู่เบส จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา real-time PCR กับ cDNA ของใบและรากที่สังเคราะห์จาก RNA ของอ้อยที่ได้รับสภาพเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน โดยใช้ยีน *GADPH* (Accession number : CA254672) เป็นยีนอ้างอิง ทำปฏิกริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex บริษัท Eppendorf ( Thailand ) ใช้น้ำยาชุด SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit บริษัท BIOLIN โดยการเติม 2X SensiFAST SYBR No-ROX Mix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วเติม forward primer และ reverse primer ความเข้มข้นชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 0.4 ไมโครลิตร เติม first stranded cDNA ความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเติม DEPC - treated water ปริมาตร 3.2 ไมโครลิตร

## ผลการวิจัย

จากการสำรวจต้นสลอดในภาคตะวันออกสามารถพบได้ที่สวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อ.เมือง จ.ระยอง ส่วนพื้นที่อื่นๆที่ได้ทำการสำรวจในทุกอำเภอของจังหวัดสระแก้วและจ.จันทบุรีรวมทั้งจากอุทยานแห่งชาติและจากการสอบถามจากหมอชาวบ้านไม่พบต้นสลอด โดยได้ให้ข้อมูลว่าในอดีตนั้นพบมีต้นสลอด แต่จากที่ทราบกันดีว่าต้นสลอดมีสารพิษถ้ากินแล้วมีอันตรายชาวบ้านจึงทำลายต้นสลอดจนสูญพันธุ์ ดังนั้นจากการเก็บตัวอย่างสามารถเก็บจากภาคตะวันออกได้เพียง 1 ตัวอย่าง ผู้ทดลองจึงขยายพื้นที่สำรวจทั่วประเทศทั้งจากการสำรวจเอง สอบถามจากหมอพื้นบ้าน และเจ้าหน้าที่อุทยานแห่งชาติ และขณะนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้จากทั่วประเทศจำนวน 9 ตัวอย่าง และจะนำมาทำการปลูกเพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและหาปริมาณสารที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ (phorbal ester) ในสลอดต่อไป

**ภาพที่ 3** ต้นสลอดที่พบในสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อ.เมืองระยอง จ.ระยอง

ต้นสลอดได้มาจากพื้นที่

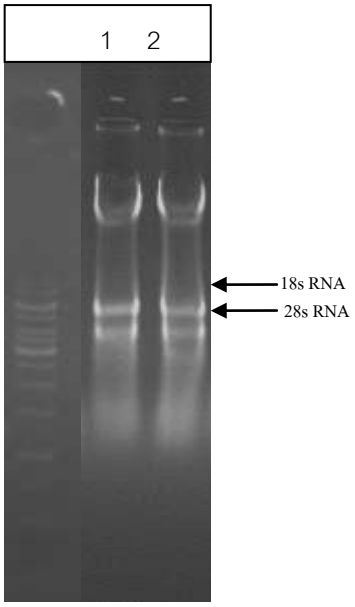
- จ.ระยอง จำนวน 1 ตัวอย่าง
- จ.สมุทรสงคราม จำนวน 1 ตัวอย่าง
- จ.พัทลุง จำนวน 2 ตัวอย่าง
- จ.สงขลา จำนวน 2 ตัวอย่าง
- จ.สุราษฎร์ธานี จำนวน 2 ตัวอย่าง
- ตรัง จำนวน 1 ตัวอย่าง

ลักษณะทางสัณฐานของต้นสลอดในแต่ละพื้นที่นั้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในส่วนของดอกและผลนั้นจะต้องศึกษาต่อไป

**การโคลนบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร phorbal ester**

**การสกัด total RNA**

นำใบอ่อนของสลอดมาสกัด total RNA พบว่า สามารถสกัด total RNA ที่มีคุณภาพดีได้เพียงพอต่อการนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป แต่พบว่ามีการปนเปื้อนของ DNA ดังนั้นจึงต้องกำจัด DNA ออกด้วยเอมไซม์ DNaseI

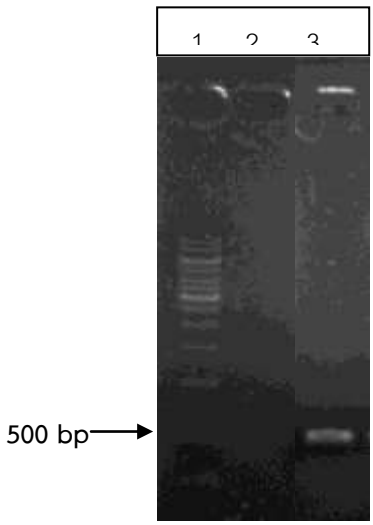



**ภาพที่ 4** total RNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของต้นสลอดที่ได้จากการสำรวจที่สวนสมุนไพร จ.ระยอง (lane 1) และ จากจ.พัทลุง (lane 2)

หลังจากกำจัดดีเอ็นเอออกแล้วก็ทำการสังเคราะห์ first strand cDNA โดยใช้ SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen) จึงค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร phorbal ester ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามี 2 ยีนที่เกี่ยวข้องคือ ยีน *GGPPS* และยีน *CS*

**การค้นหายีน *GGPPS* (*Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase*) โดยใช้เทคนิค PCR**

ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* จากพืชชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank ออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ได้ดังนี้ CT-GGPPS1 Forward 5'TGYATGGAYAACGAYGAT CT-GGPPS1 Reverse 5'ATATCATCCACYACYTGAAA ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาขนาดประมาณ 300 bp ใช้โปรแกรมการทำ PCR ดังนี้ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นทำ 30 รอบตั้งแต่ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ รอบสุดท้ายเป็น final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยใช้ first strand cDNA เป็นแม่แบบ ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาเป็น DNA ขนาดประมาณ 300 bp (ภาพที่ 3)




**ภาพที่ 5** ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากใบสลอดเป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS* ตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis (0.8% agarose ใน 0.5xTBE buffer ที่ 100 volt นาน 40 นาที) 1= 1 kb marker 2= negative control 3= ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS*

จากนั้นสกัดแถบดีเอ็นเอจากเจลแล้วนำ DNA ที่สกัดจากเจลไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีไทด์โดยบริษัท 1st BASE (ประเทศมาเลเซีย) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* ในฐานข้อมูลสาธารณะโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อล NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์จาก

ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณอนุรักษ์ของยีน *GGPPS* ในพืชหลายชนิดนั้นมีความเหมือนกับยีน *GGPPS* ในพืชชนิดต่าง ๆ ในเปอร์เซนต์ที่สูงตั้งแต่ 83-99 % (ตารางที่ 1)

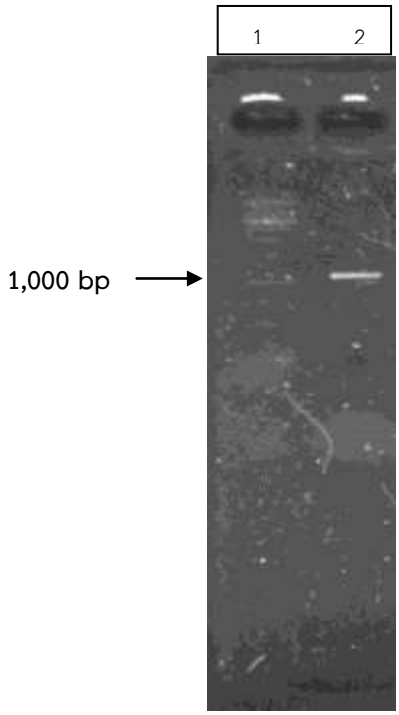
**ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *GGPPS***

TGTGGCGGTTCTTGCAGGTGATGCGCTTCTTGCTTTTGCTTTTGAACATATTGCTGTTTCTACTTTA
AATGTTTCTCCTGCCAGAATTGTTCGGGCGGTAGGTGAATTGGCTAAGGCGATTGGTGCTGAAGGA
TTGGTTGCTGGACAGGTTGTTGATATCGGTTCTGAAGGTTTATCTGAAGTAGATTTAGAAAAGCTTG
AATTTATTCATATTCATAAGACAGCAAAATTGCTGGAAGGAGCGGTGGTGTTAGGGGCAATTATGG
GCGGAGGAACCGATGAGGAGGTGGAAAAAT

**ตารางที่ 1** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ first strand cDNA ที่ได้จากใบสลอดโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อล NCBI

| Description | Max score | Total score | Query cover | E-value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Croton sublyratus* | 517 | 517 | 100% | 1e-142 | 99% | AB034249.1 |
| *Jatropha curcas* | 401 | 401 | 99% | 5e-108 | 90% | XM_012223700.2 |
| *Manihot esculenta* | 307 | 307 | 99% | 9e-80 | 83% | XM_021791278.1 |
| *Hevea brasiliensis* | 307 | 307 | 99% | 9e-80 | 83% | KT447237.1 |

หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาบางส่วนไป blast กับฐาข้อมูล NCBI เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับยีน GGPPS ในพืชชนิดอื่นมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อหา full length ของยีน *GGPPS* จากการทดลองนี้ได้ออกแบบจากพืชหลายชนิดทั้ง *Croton sublyratus* (AB034249.1) *Jatropha curcas* (XM_012223700.2) Hevea brasiliensis (KT447237.1) และ Ricinus communis (XM_002525050.2) ซึ่งได้ลำดับไพรเมอร์ดังนี้ CT-GGPPS2 Forward 5’ ATGAGTTCTGTGAATTTAG CT-GGPPS2 reverse 5’ TTAGTTTTGCCTGTATGC พบว่าได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาขนาดประมาณ 1,100 bp โดยใช้ปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับการหาบางส่วนของยีน *GGPPS* (ภาพที่ 4)




**ภาพที่ 6** ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากใบสลอดเป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS* ตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ใน 0.8% agarose ใช้ 0.5xTBE buffer ที่ 100 volt นาน 25 นาที) 1= 1 kb marker 2= ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS*

หลังจากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าได้จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,110 bp และได้ทั้งส่วน start และ stop codon และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป Blast ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความเหมือนกับพืชหลายชนิด ดังตารางที่ 2

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ full length ของยีน *GGPPS***

ATGAGTTCTGTGAATTTAGGGTTCATGGGTTCATACTTTCCTCTGTTATAAGTCAAGCTACCAGATC
CAGATCCAAATCCAAATCCTTATCGTTTTTCTCCTGTTTCGATTCCTCTGTTTTACAGAAACTCAAA
ACGCAGCGTTTCGTATGTTTCAGCGATCGTGACTAAGGATGAGGAGACGATTCAGGAAGAACAGAA
TAAGAATTCAAGTTCTTCTCCTGGTTTTGATTTCAAATCTTATATGGTTCAAAAGGCTAGTGCTATT
AATCAAGCTTTGGAAGCTGCTGTTTCGCTTCGCGAGCCTCTTAAAATTCATGAATCTATGCGGTACT
CACTTTTGGCCGGCGGTAAGCGGGTCCGGCCGGCTTTATGTCTTGCTGCGTGTGAACTTGTTGGCG
GAGATGAATCTATGGCGATGCCTGCTGCTTGTGCTGTTGAAATGATACATACTATGTCGCTTATACA
TGATGATCTTCCTTGCATGGATAACGACGATCTCCGTCGTGGTAAGCCGACGAATCATATTGTGTTT
GGTGAAAATGTGGCGGTTCTTGCAGGTGATGCGCTTCTTGCTTTTGCTTTTGAACATATTGCTGTTT

CTACTTTAAATGTTTCTCCTGCCAGAATTGTTCGGGCGGTAGGTGAATTGGCTAAGGCGATTGGTGC
TGAAGGATTGGTTGCTGGACAGGTTGTTGATATCGGTTCTGAAGGTTTATCTGAAGTAGATTTAGAA
AAGCTTGAATTTATTCATATTCATAAGACAGCAAAATTGCTGGAAGGAGCGGTGGTGTTAGGGGCA
ATTATGGGCGGAGGAACCGATGAGGAGG**T**GGAAAAATTGAGGAAATATGCGAGGGATATTGGGTTG
TTGTTTCAGGTATGGATGATATTCTTGATGTGACCAAATCGTCTCAAGAATTGGGGAAAACTGCAGG
AAAGGATTTGGTGGCGGATAAGGTTACTTATCCTAAGTTAATGGGGATTGAGAAATCAAGGGAATTT
GCTGAGAAGTTGAATAAAGAAGCTCAGGATCAATTGGCTGGTTTCGATCCTGAGAAGGCGGCTCCA
TTGATTGCTTTAGCTAATTATATTGCATACAGGCAAAACTAA

**ตารางที่ 2** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ของยีน *GGPPS* ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ first strand cDNA ที่ได้จากใบสลอดโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อล NCBI

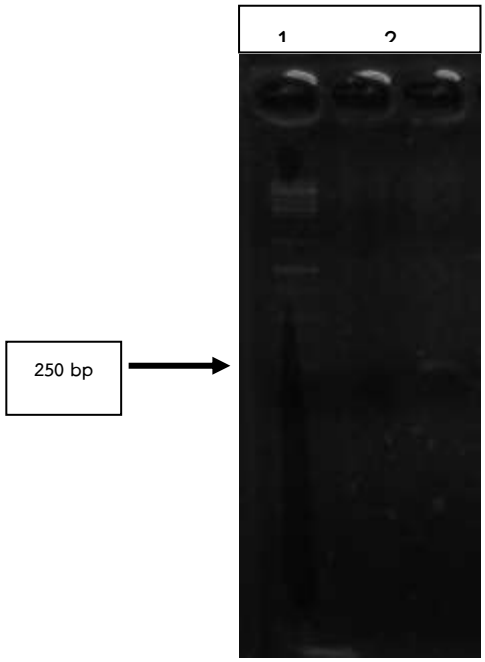
| Description | Max score | Total score | Query cover | E-value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Croton sublyratus* | 1898 | 1898 | 100% | 0 | 98% | AB034249.1 |
| *Jatropha curcas* | 1223 | 1223 | 100% | 0 | 84% | XM_012223700.2 |
| *Manihot esculenta* | 1027 | 1027 | 100% | 0 | 81% | XM_021791278.1 |
| *Hevea brasiliensis* | 1021 | 1021 | 100% | 0 | 80% | KT447237.1 |
| Ricinus communis | 1009 | 1009 | 100% | 0 | 80% | XM_002525050.2 |

**การค้นหายีน *CS* (*Casbene Synthase*)**

ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CS* จากพืชชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank ออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ได้ดังนี้

CT-CS14 Forward 5’ CTBAGCCTTTWTGAAGC
CT-CS7 Reverse 5’ RTCCAACTTKGCAARCTC

ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาขนาดประมาณ 300 bp ใช้โปรแกรมการทำ PCR ดังนี้ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นทำ 30 รอบตั้งแต่ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่ 54 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ รอบสุดท้ายเป็น final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยใช้ first strand cDNA เป็นแม่แบบ ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาเป็น DNA ขนาดประมาณ 250 bp (ภาพที่ 5)




**ภาพที่ 7** ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากใบสลอดเป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CS* ตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ใน 0.8% agarose ใช้ 0.5xTBE buffer ที่ 100 volt นาน 25 นาที) 1= 1kb marker 2= negative control 3=ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CS*

หลังจากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าได้จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 254 และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป Blast ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความเหมือนกับพืชหลายชนิด ดังตารางที่ 3

**ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *CS***

CTGAGCCTTTTTGAAGCTACACATGTGAGCATGCCCAATGAAGACATTTTAGAAGAGGCCT
TAGCTTTCACCAAGGCTTTCTTGGAAAGCTCTAAGGCTCTGGAGTCTTTCCCAAATTTTGCAAAGAA
CATAAGCGATGCCTTGGAGCAGCCCGTACACAAAGGCATACCTAGGCTTGAGGCAAGAAAGTTCAT
CGATTTGTATGAAGCTGATGAAGGTCGAAATGAGATTCTACTTGAGCTTGCCAAGTTGGA

**ตารางที่ 3** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ของยีน *CS* ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ first strand cDNA ที่ได้จากใบสลอดโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อล NCBI

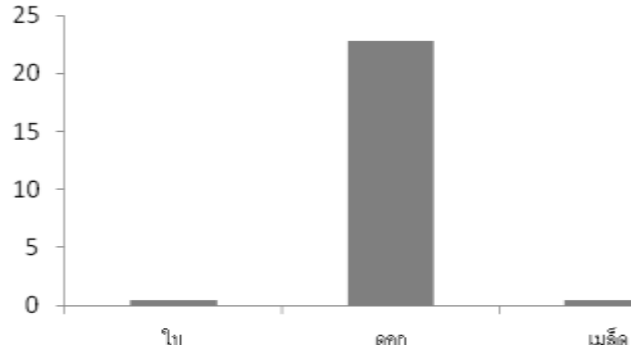
| Description | Max score | Total score | Query cover | E-value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Jatropha curcas* | 271 | 271 | 100% | 6e-69 | 84% | XM_012211452.2 |
| *Ricinus communis* | 141 | 141 | 100% | 7e-30 | 72% | XM_002513288.2 |
| *Triadica sebifera* | 122 | 122 | 99% | 6e-24 | 71% | GU332590.1 |
| *Homalanthus nutans* | 116 | 116 | 100% | 3e-22 | 71% | GU332592.1 |
| *Euphorbia lathyris* | 113 | 113 | 100% | 3e-21 | 71% | KR350667.1 |

3. **3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* และ *CS***

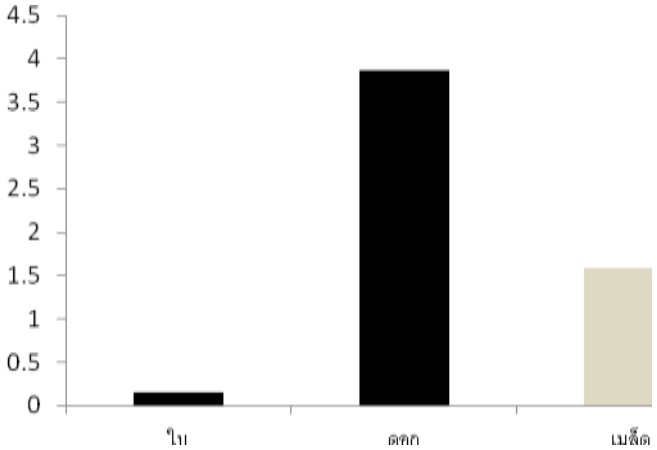
ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS* และ *CS* ด้วยโปรแกรม primer 3 (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/ primer3plus.cgi/) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เป็น full length ที่หาได้ โดยกำหนดให้ DNA ที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยามีขนาด 150-200 คู่เบส จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา real-time PCR กับ cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของใบของสลอดที่เก็บมาจากสถานที่ต่างๆ รวมทั้งผล และเมล็ดของต้นที่เก็บได้จากสวนสมุนไพร จ.ระยอง โดยใช้ยีน e*Ef1a1* (Elongation factor 1-alpha 1 ) เป็นยีนอ้างอิง ที่ออกแบบมาจากยีน ของพืชต่างๆคือ *Jatropha curcus* (Accession number : XM_012226913.2) *Hevea brasiliensis* (Accession number : XM_021785551.1) *Populus trichocarpa* (Accession number : XM_006381425.2)

และ *Ziziphus jujube* (Accession number : NM_001323857.1) แล้วทำปฏิกริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex บริษัท Eppendorf ( Thailand ) ใช้น้ำยาชุด SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit บริษัท BIOLIN โดยการเติม 2X SensiFAST SYBR No-ROX Mix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วเติม forward primer และ reverse primer ความเข้มข้นชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 0.4 ไมโครลิตร เติม first stranded cDNA ความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเติม DEPC - treated water ปริมาตร 3.2 ไมโครลิตร

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน CS และ GGPPS พบว่าทั้ง 2 ยีนมีการแสดงออกของยีนสูงสุดในดอก ส่วนในใบ และดอกมีการแสดงออกของยีนน้อยที่สุด ดังภาพที่ 8 และ 9

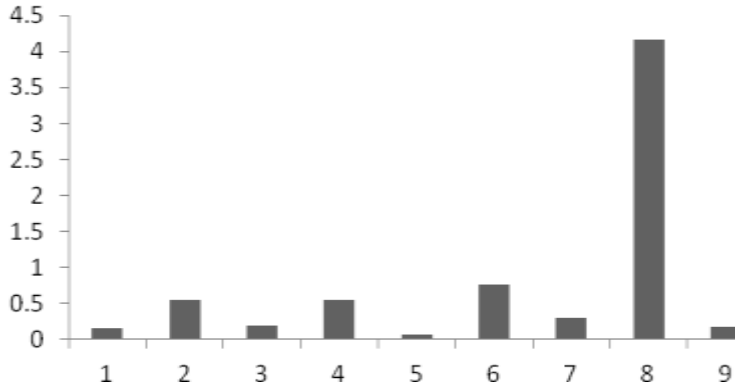



**ภาพที่ 8** การแสดงออกของยีน CS ในใบ ราก และเมล็ด ของต้นสลอดที่ได้จากพื้นที่สวนสมุนไพร จ. ระยอง

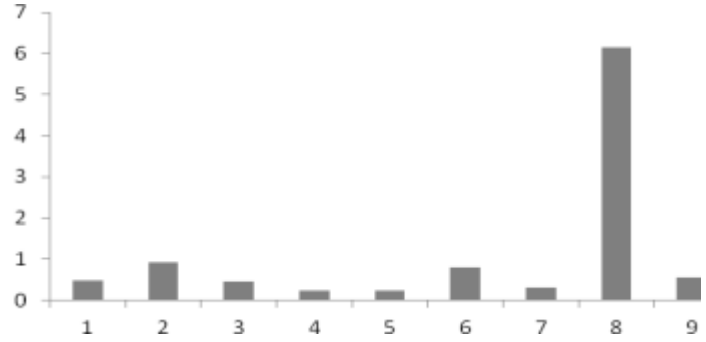



**ภาพที่ 9** การแสดงออกของยีน *GGPPS* ในใบ ราก และเมล็ด ของต้นสลอดที่ได้จากพื้นที่สวนสมุนไพร จ.ระยอง

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CS* และ *GGPPS* ในใบของสลอดที่ได้จากการสำรวจทั้งหมด พบว่าใบของต้นที่ได้จากการสำรวจใน จ. สุราษฎร์ธานี มีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 มากที่สุด และใบจากต้นสลอดที่สำรวจได้ใน จ.สงขลา มีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ยีนน้อยที่สุด จากข้อมูลนี้เบื้องต้นนี้จะนำไปสู่การทดลองต่อไปจะนำส่วนอื่นๆทั้งดอก ลำต้น และเมล็ด มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนเพื่อคัดเลือกต้นที่ให้การแสดงออกของยีน *CS* และ *GGPPS* และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป




**ภาพที่** 10 การแสดงออกของยีน *CS* ในใบ ของต้นสลอดที่ได้จากแต่ละพื้นที่ที่สำรวจได้ 1= ใบสลอดจาก จ.ระยอง 2= ใบสลอดจาก จ.สมุทรสงคราม 3 และ 4 ใบสลอดจาก จ.พัทลุง 5 และ 6 = ใบสลอดจาก จ.สงขลา 7 และ 8 = ใบสลอดจาก จ.สุราษฎร์ธานี 9 = ใบสลอดจากจ. ตรัง




**ภาพที่ 11** การแสดงออกของยีน GGPPS ในใบของต้นสลอดที่ได้จากแต่ละพื้นที่ที่สำรวจได้ 1= ใบสลอดจาก จ.ระยอง 2= ใบสลอดจาก จ.สมุทรสงคราม 3 และ 4 ใบสลอดจาก จ.พัทลุง 5 และ 6 4 ใบสลอดจาก จ.สงขลา 7 และ 8 4 ใบสลอดจาก จ.สุราษฎร์ธานี 9 = ใบสลอดจากจ. ตรัง

# วิจารณ์ผลการวิจัย

ลูกสลอดเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ถูกประกาศให้เป็นยาอันตราย ไม่อนุญาตให้ใช้เมล็ดสลอดหรือน้ำมันสลอดในยาแผนโบราณ เพราะควบคุมขนาดยายากและมีฤทธิ์แรงเกินไป เนื่องจากมีสารกลุ่ม phorbol มีฤทธิ์ระคายเคืองผิวหนังอย่างรุนแรง มีฤทธิ์เป็น tumor promoter และ เป็นตัวก่อมะเร็ง (carcinogen) ก่อให้เกิดเนื้องอก และมะเร็ง มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 นอกจากนี้ลูกสลอดยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Shahid *et al*., 2008) และฤทธิ์อื่น ๆ

การนำสลอดมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แผนไทยไม่สามารถนำลูกสลอดมาใช้รักษาโรคโดยตรง แต่ต้องนำมาผ่านกรรมวิธีการแปรสภาพให้มีความเหมาะสมก่อนที่จะนำมาใช้เป็นยารักษาโรค วิธีการแปรสภาพสมุนไพรให้เหมาะต่อการผลิตยาทางการแพทย์แผนไทย โดยมีวิธีการแปรสภาพสลอดให้มีพิษน้อยลง หรือมีฤทธิ์เหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตยา การลดสารพิษในลูกสลอดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น เอาลูกสลอดใส่รวมกับข้าวเปลือก ใส่เกลือพอควร นำไปใส่หม้อดิน ต้ม จนข้าวเปลือกบานทั่วกัน จึงเอาลูกสลอดมาล้างน้ำให้สะอาด ตากแดดให้แห้ง แล้วจึงนำไปใช้ปรุงยา หรือให้เอาลูกสลอดต้มกับใบมะขาม 1 กำมือใบส้มป่อย 1 กำมือ เมื่อสุกดีแล้วจึงแกะเอาเนื้อในมาใช้ทำยา หรือให้ปลอกเปลือกลูกสลอดเอาไส้ในออกแช่น้ำปลาร้าปากไหไว้ 1 คืน แล้วเอายัดใส่ในผลมะกรูด ใส่หม้อดินปิดฝา สุมด้วยไฟแกลบ เมื่อสุกดีแล้ว จึงนำไปใช้ปรุงยา พร้อมทั้งผลมะกรูด ซึ่งวิธีการดังกล่าวนั้นอาจไม่สามารถลดปริมาณสารพิษได้เพียงพอ

การทำให้สลอดผลิตสารพิษลดน้อยลงโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลเป็นอีกทางนึงในการแก้ปัญหานี้ การสร้างสารพิษในสลอดนั้นถูกควบคุมด้วยยีน *Geranylgeranyl diphosphate synthase* (*GGPPS*) และ *Casbene synthase* (*CS*) ดังนั้นจึงจะรวบรวมสลอดในหลายๆ พื้นที่และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* และ ยีน *CS* ร่วมกับการวิเคราะห์หาปริมาณสาร phorbol esters เพื่อคัดเลือกต้นที่มีการแสดงออกของยีนต่ำ ที่สัมพันธ์กับการสะสมสาร phorbol esters ต่ำ เนื่องจากสลอดในแต่ละพื้นที่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมทำให้การทำงานของยีนใดยีนหนึ่งหรือทั้ง 2 ยีนนี้ลดลงได้ และนำต้นที่มีการแสดงออกของทั้ง 2 ยีนต่ำ หรือมีสาร phorbol esters น้อยมาทำการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป จากการสำรวจสลอดในพื้นที่ จ.สระแก้วและภาคตะวันออกนั้น สามารถพบสลอดได้แค่เพียงสวนสุมนไพร ในจ. ระยองเท่านั้น ซึ่งจากการสอบถามจากประชาชนหรือเจ้าหน้าที่ในพื้นที่ที่ไปทำการสำรวจทั้งจากป่าชุมชน บ้านชาวบ้าน และอุทยานแห่งชาติได้ให้ข้อมูลว่าเคยพบเห็นในอดีตแต่เมื่อทราบว่ามีพิษก็ได้มีการทำลายไปหมดจึงสามารถพบสลอดได้แค่ในพื้นที่สวนสมุนไพรเท่านั้น ซึ่งจะทำให้สลอดนั้นสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ดังนั้นจึงทำการสำรวจในพื้นที่ทั่วประเทศไทย ทั้งสำรวจโดยการลงในพื้นที่ที่ทราบว่ามีสลอด หรือหาข้อมูลจากอินเทอร์เนทสามารถพบสลอดได้จาก 9 พื้นที่ ซึ่งสถานที่สำรวจเจอนั้นทั้งจากหน่วยงานราชการ ป่าชุมชน และจากร้านที่ขายสมุนไพร หลังจากนั้นนำต้นสลอดทั้งจาก 9 แหล่งมาปลูกในแปลงรวบรวมสลอดเพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษในสลอด โดยสารพิษนั้นเป็นสาร phobal ester จัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มทิกเลน (tigliane) หรือเตตราไซคลิกไดเทอร์พีนส์ (tetracyclic diterpene) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแบบ tigliane skeletalประกอบด้วยวงคล้ายคลึงกันกับโครงสร้างของสารในกลุ่มทิกเลนโดยโครงสร้างพื้นฐานของสารในกลุ่มทิกเลนประกอบด้วยวงแหวน 4 วงและมีแอลกอฮอล์เป็นส่วนหนึ่งภายในโครงสร้าง ขณะที่โครงสร้างพื้นฐานของสาร phorbol esters ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งจะเข้าจับกับโครงสร้างด้วยพันธะเอสเทอร์ใน

ตำแหน่งต่างกันส่งผลให้เกิดความหลากหลายของชนิดสาร phorbol esters มีรายงานว่าสาร phorbol esters ที่แยกได้จากน้ำมันสบู่ดำมีอยู่ทั้งหมด 6 แบบ (Goel et al., 2007; Ahmed and Salimon, 2009)

สาร phorbol esters เป็นอนุพันธ์ของสารประเภทสารพิษในกลุ่มทิกเลนซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (diterpenes) และไดเทอร์หนึ่งที่อยู่ในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ดังนั้นความเข้าใจในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์อาจนำมาใช้ในการอธิบายและทำนายยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์สารphorbol estersได้ ซึ่งยีนที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารphorbol estersในสบู่ดำได้คือยีน Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) และCasbene synthase (CS) Lin et al.(2010) จากการทดลองสามารถสังเคราะห์ยีน CS และ GGPPS ได้ โดยสังเคราะห์ยีน GGPPS ได้ขนาด1,100 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยส่วน start codon และ stop codon ส่วนยีน CS สังเคราะห์ได้ยีนขนาด 254 นิวคลีโอไทด์ จากข้อมูลนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวสามารถนำไปออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งสองในสลอดได้ โดยได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* และ *CS* ในใบ ดอกและเมล็ดสลอดที่สำรวจได้จากสวนสมุนไพร จ.ระยอง ซึ่งพบว่าในดอกของสลอดนั้นมีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 สูงสุด ส่วนในใบและเมล็ดมีการแสดงออกของยีนต่ำ จากการปลูกสลอดในขณะนี้มีเพียงต้นสลอดที่สำรวจได้จากสวนสมุนไพร จ.ระยองเท่านั้น เนื่องจากเป็นต้นเดียวที่มีดอกและผล ในอนาคตถ้าทุกต้นมีดอกและผลจะทำการหาการแสดงออกของยีนต่อไป ในขณะนี้จึงหาการแสดงออกของยีนทั้ง 2 จากใบสลอด โดยจะนำข้อมูลที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับดอกและผลสลอดของทุกต้นที่สำรวจได้จากที่ต่างๆต่อไป

## สรุปผลการทดลอง

1. การสำรวจต้นสลอดสามารถเก็บได้ 9 ตัวอย่าง จากพื้นที่ต่างๆดังนี้

- จ.ระยอง จำนวน 1 ตัวอย่าง
- จ.สมุทรสงคราม จำนวน 1 ตัวอย่าง
- จ.พัทลุง จำนวน 2 ตัวอย่าง
- จ.สงขลา จำนวน 2 ตัวอย่าง
- จ.สุราษฎร์ธานี จำนวน 2 ตัวอย่าง
- จ.ตรัง จำนวน 1 ตัวอย่าง

2. สามารถสังเคราะห์ยีน *GGPPS* และ *CS* ในสลอดได้ โดยสังเคราะห์ยีน GGPPS ได้ขนาด 1,100 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยส่วน start codon และ stop codon ส่วนยีน CS สังเคราะห์ได้ยีนขนาด 254 นิวคลีโอไทด์

3. ระดับการแสดงออกของยีน *GGPPS* และ *CS* ในใบ ดอก และเมล็ดสลอด ที่สำรวจได้จากสวนสมุนไพร จ.ระยอง พบว่าในดอกของสลอดนั้นมีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 สูงสุด ส่วนในใบและเมล็ดมีการแสดงออกของยีนต่ำ และการแสดงออกของของยีนทั้ง 2 ในใบของสลอดจากทั้ง 9 ตัวอย่าง พบว่าการแสดงออกของต้นจาก จ.สงขลามีการแสดงออกน้อยที่สุด

**ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป**

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโน รวมทั้งผลการแสดงออกของยีนในสลอดแต่ละต้นไปคัดเลือกสลอดที่ให้ปริมาณสารในกลุ่ม phobal ester ต่ำ

## ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ อยู่ระหว่างการเขียน เรื่อง Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding g eranylgeranyl diphosphate synthase and casbene synthase from *Croton tiglium*
2. การจดสิทธิบัตร -
3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนาเสนอไปผลิต/ ขาย/ ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนาไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป -
4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น) -

# รายงานการเงิน

**โครงการ สัญญาเลขที่** 119/2561 **โครงการวิจัยประเภท** งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) **ประจำปีงบประมาณ** พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา
**ชื่อโครงการ** การสำรวจ การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์สลอดที่มีสารพิษต่ำและการอนุรักษ์และขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
**ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน** อ.ชนากานต์ ลักษณะ
**รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่** 1 ต.ค. 60 **ถึงวันที่** 30 ก.ย. 61
**ระยะเวลาดำเนินการ** 1 ต.ค. 60 **ถึงวันที่** 30 ก.ย. 61
**รายรับ**
**จำนวนเงินที่ได้รับ**
**งวดที่ 1 (50%)** 134,400 บาท **เมื่อ** วันที่ 22 ธ.ค. 2560
**งวดที่ 2 (40%)** 107,520 บาท **เมื่อ** วันที่ 13 มี.ค. 2560
**งวดที่ 3 (10%)** 26,880 บาท ยังไม่ได้รับ
**รวม** 268,800 บาท

| รายจ่าย รายการ | งบประมาณที่ตั้งไว้ | งบประมาณที่ใช้จริง | จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน |
|---|---|---|---|
| **1. ค่าตอบแทน** | 26,880 | 26,880 | - |
| **2. ค่าจ้าง** | - | - | - |
| **3. ค่าวัสดุ** | 116,320 | 116,320 | - |
| **4. ค่าใช้สอย** | 98,800 | 98,800 | - |
| **5. ค่าครุภัณฑ์** | - | - | - |
| **6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ค่าธรรมเนียมอุดหนุน สถาบัน (10%)** | 26,880 | 26,880 | - |
| **รวม** | 268,800 | 268,800 | - |

(นางสาวชนากานต์ ลักษณะ)
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัย
ผู้รับทุน

# เอกสารอ้างอิง


นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2543. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล.

นันท์นภัส เทพสำราญ, โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และ อารีย์ ทองภักดี. 2549. การชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดจากชิ้นส่วนก้านใบของสบู่ดำ (Jatropha curcas L.). ใน การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 6. 7-10 พฤศจิกายน ณ โรงแรมโลตัส ปางสวนแก้ว เชียงใหม่

มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์แผนไทยเดิมฯ. 2541. ตำราเภสัชกรรมไทย ตอนที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์วิญญาณ.

_____. 2548. ตำราเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: บริษัทพิฆเณศ พริ้นท์ติ้งเซ็นเตอร์ จำกัด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

สุนทรียา กาละวงศ์ และ สมปอง เตชะโต. 2557. การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราเพื่อ เตรียมการปลูกถ่ายยีน. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1 (3): 02-01.

Ahmadi, N.R., D. Mangunwidjaja, O. Suparno, D.I. Pradono. (n.d.). Extraction process
optimization of Kamandrah (*Croton tiglium* L.) seed with expression and identification of active ingredient as botanical larvacide of dengue fever. J. Teknologi Indust. Pertanian 21(3): 154-162.

Ahmed, A.A. and J. Salimon. 2009. Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha Curcas* seed oil. European J. Sci. Res. 31(3):
429-436.

Ashish, S. and R.A. Sharma. 2011. Micropropogation of *Croton bonplandinum* BAIL. Inter. Res. J. Pharma.. 2(10): 82-86.

Baird, W.M. and R.K. Boutwell. 1971. Tumor-promoting activity of phorbol and four
diesters of phorbol in mouse skin. Cancer Res. 31: 1074-1079.

Blumberg, P.M. 1988. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor
promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer Res. 48: 1-8.

Devappa R.K., H.P.S. Makkar and K. Becker. 2011. Localization of antinutrients and qualitative identification of toxic components in Jatropha curcus seed. Journal of the Science of Food and Agriculture. 92 : 1519-1525.

Duuren, B.L.V., L. Langseth,A. Sivak and L. Orris. 1966. The Tumor-enhancing principles of *Croton Tiglium* L. II. AcComparative study. Cancer Res. 26: 1729-1733.

Duuren, B.L.V. and A. Sivak. 1968. Tumor-promoting agents from *Croton Ttiglium* L. and their mode of action. Cancer Res. 28: 2349-2356.

Ferreras,J.M., R.Iglesias,L. Barbieri,C. AlegreA. BolognesiM.A. RojoM.L. Carbaja lesC. Escarmisand T. Girbes. 1995. Effects and molecular zction of ribosome-inactivating proteins on ribosomes from Streptomyces lividans. Biochimica et Biophysica acta 1243, 85-93.

Goel, G., H.P.S. Makkar,G. Francis and K. Becker. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. Inter. J. Toxicol. 26: 279–288.

Kongduang, D., W. De-Eknamkul, W. Sitthithaworn and J. Wungsintaweekul. 2014. Terpenoid content and transcription profile analysis in callus and suspension cultures of Croton stellatopilosus. J. Plant Biochem. Biotechnol.. 23: 61-68.

Liebich, H.M., R. Lehmann,C.D. Stefano,H.U. Haring,J.H. Kim, And K.R. Kim. 1998. Analysis of traditional chinese anticancer drugs by capillary electrophoresis. J. Chromatograp. A 795: 388-393.

Lin, J., Jin, Y.J., Zhou, X. and Wang, J.Y. 2010. Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from Jatropha curcas. Afr. J. Biotechnol. 9, 3342–3351.

Matsuya, Y., Z. Yu,N. Yamamoto,M. Mori,H. Saito,M. Takeuchi,M. Ito, M. and H. Nemoto. 2005. Synthesis of new phorbol derivatives having ethereal side chain and evaluation of their anti-HIV activity. Bioorganic & Medicinal Chemis. 13: 4383-4388.

Mathew, S.S.S. and R.S. Krishnapriya. 2012. Organogenesis and somatic embryogenesis in various cultivars of *Codiaeum variegatum* (L.). Global Adv. Res. J. Biotechnol.. 3: 40-47.

Nakano Y, Ohtani M, Polsri W, TUsami T, Sambongi K, Demura T. 2012. Characterization of the casbene synthase homolog from Jatropha (*Jatropha curcas* L.) Plant Biotechnol 29:185–189

National Herbarium Nederland. 2012. Flora of Thailand Euphorbiaceae. [Online]. Available from: http://www.nationaalherbarium.nl/thaieuph/ThCspecies/ [accessed 21 July 2012].

Nelson, T.J. and D.L. Alkon. 2009. Neuroprotective versus tumorigenic protein kinase
activators. Trends in Biochem.l Sci. 34(3): 136-145.

Raick, A.N., K. Thumm, and B.R. Chivers. 1972. Early effects of 12-O-tetradecanoyl-

Phorbol-13-acetate on the incorporation of tritiated precursor into DNA and the thickness of the interfollicular epidermis, and their relation to tumor promotion in mouse skin. Cancer Res. 32: 1562-1568.

Rajore, S and A. Batra. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha*
*curcas* L. J. Plant Biochem. Biotech. 14: 73-75.

Saputera, Mangunwidjaja, D., Raharja, S., L.B. Kardono and D. Iswantini. 2006. Gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry analysis of Indonesian *Croton Tiglium* seeds. J. Applied Sci. 6(7): 1576-1580.

Shahid, M., M. Tayyab,F. Naz, A. Jamil,M. Ashraf, and A.H. Gilani. 2008. Activity-guided isolation of a novel protein from *Croton Tiglium* with antifungal and antibacterial activities. Phytotherapy Res. 22(12): 1646-1649.

Sivak, A., F. Ray, and B.L.V. Duuren. 1969. Phorbol ester tumor-promoting agents and membrane stability. Cancer Res. 29: 624-630.

Sperti, S., L. Montanaro,A. Matholi,G. Testoni and F. Stirpe. 1976. Inhibition of protein synthesis *in vitro* by crotins and ricin. Biochem.l J. 156: 7-13.

Stirpe, F., A.P. Brizzi,E. Lorenzoni,P. StrocchiL. Montanaro and S. Sperti. 1976. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. Biochem. J. 156: 1-6.

Stuartxchange. 2011. Tuba. [Online]. Available from: http://stuartxchange.com/Tuba.html [accessed 14 July 2012].

Salamma, S. and B.R. Prasad Rao. 2011. *In vitro* embryo culture of *Croton scabiosus* Bedd. (Euphorbiaceae), an endemic plant of Southern Andhra Pradesh. 5(2): 108-114.

Salamma, S. and B.R. Prasad Rao. 2013. *In vitro* callogenesis from the mature explants of *Croton scabiosus* Bedd. (Euphorbiaceae). Inter. J. Curr. Res. 5(2): 37-41.

Sujatha, M., H.P.S. Makkar and K. Becker. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. J. Plant Growth Regul. 47: 83–90.

# ภาคผนวก

# ประวัติคณะผู้วิจัย

**ประวัติหัวหน้าวิจัย**

1. **ชื่อ - นามสกุล** นางสาวชนากานต์ ลักษณะ
   **ชื่อ - นามสกุล** Miss Chanakan Laksana
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3930100166063
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์
4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**
   คณะ เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขต สระแก้ว จ.สระแก้ว 27160
   โทรศัพท์ 089-4905-896 E-mail : chanakanl@buu.ac.th
5. **ประวัติการศึกษาต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา**

5.1 ปริญญาตรี สาขาทรัพยากรเกษตรชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ 2544
5.2 ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ 2548
5.3 ปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ 2557

6. **สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ**
   เทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืช การเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์
   การสกัดสารทุติยภูมิจากพืชและการวิเคราะห์สารโดยใช้ HPLC และ ICP-MS
   การถ่ายยีนในพืช โดยการใช้อโกรแบคทีเรียม และการใช้เครื่องยิงอนุภาค
7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**
   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -
   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : -
   7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว


1. **Laksana, C.,** P. Chaochalad, N. Rassameejanphen and S. Chanprame. 2014. Cloning of *BOR1* (boron transporter) partial length cDNA from oil palm, sugarcane and physic nut. **ISSAAS Journal**. 21(2): 1-10.
2. **Laksana, C**. and S. Chanprame. 2015. Simple and rapid RNA extraction from young and mature leave of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **ISSAAS Journal**. 22(1) 95-105.
3. Priti. N.I., **Laksana, C**. and S. Chanprame. 2016. Transformation and expression of bt gene in sugarcane. J. ISSAAS 22: ( 1) 84-95.
4. **Laksana, C.,** T. Fujiwara and S. Chanprame. 2015. Cloning of boron transporter gene in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). (Manuscript preparation)

5. **Laksana**, C. and S. Chanprame. 2015. Expression of *BADH* and *MIPS* gene in 2 species of sugarcane under mimic sodic and soil saline soil. (Manuscript preparation)
6. **Laksana**, C. and S. Chanprame. 2015. Study of suitable concentration of agar for replacing agarose in electrophoresis. (Manuscript preparation)
7. **ชนากานต์ ลักษณะ** และ สนธิชัย จันทร์เปรม. 2557. การแสดงออกของยีน *BOR1* และการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุโบรอนในปาล์มน้ำมันที่ได้รับโบรอนระดับต่างๆ**.** ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 45(2): 153-162**.**
8. **ชนากานต์ ลักษณะ**, ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, สนธิชัย จันทร์เปรม และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. ลักษณะทางสัณฐานและปริมาณสาร plumbagin ที่เปลี่ยนแปลงไปของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่เกิดจาก hairy root. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 40(1): 15-23.
9. ชนากานต์ ลักษณะ และ สนธิชัย จันทร์เปรม. 2560. การแสดงออกของยีน *BADH* ในอ้อยป่าและอ้อยการค้าภายใต้สภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก, หน้า 133-140. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
10. อัญชนา รอดรังนก, **ชนากานต์ ลักษณะ**, และสนธิชัย จันทร์เปรม. (2560). การโคลนและศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน NIP5;1 ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 48(2) : 160-173.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ:

| ชื่อโครงการ | สถานภาพ | ปี |
|---|---|---|
| การสำรวจ การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์สลอดที่มีสารพิษต่ำและการอนุรักษ์และขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ปีที่ 1) | หัวหน้าโครงการ | 2561 |
| การบ่งชี้และแยกยีน $Ca^{2+}/H^{+}$ *antipoter* (*CAX*) ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็ม | หัวหน้าโครงการ | 2561 |

**ประวัติผู้ร่วมวิจัย**

1.ชื่อ (ภาษาไทย) นายสนธิชัย จันทร์เปรม
(ภาษาอังกฤษ) MR. SONTICHAI CHANPRAME
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3120300191344
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่สังกัด/ที่อยู่/โทรศัพท์
ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
โทรศัพท์ (034) 351-887 ต่อ 118 โทรสาร (034) 352-812
e-mail : agrstc@ku.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

| ปีที่จบ | ปริญญา | วิชาเอก | สถาบัน | ประเทศ |
|---|---|---|---|---|
| 2525 | ว.ท.บ.(เกษตรศาสตร์) | พืชไร่ | ม.เกษตรศาสตร์ | ไทย |
| 2528 | ว.ท.ม.(เกษตรศาสตร์) | พืชไร่ | ม.เกษตรศาสตร์ | ไทย |
| 2541 | Ph.D. (Agronomy) | Plant Biotechnology | U. of Illinois | USA. |

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ
- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- การถ่ายยีนในพืช
- เทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล

**7.ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก**

**7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย**

| ชื่อโครงการ | สถานภาพ | ปี |
|---|---|---|
| การเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาพืชวงศ์ขิงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและใช้สภาวะเย็นยิ่งยวด | หัวหน้าโครงการ | 2546 |
| การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับลักษณะทนแล้งในอ้อย | หัวหน้าโครงการ | 2546 |
| การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้แก่เจตมูลเพลิงแดง | หัวหน้าโครงการ | 2548 |
| การปรับปรุงพันธุ์ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสารทุติยภูมิสำหรับใช้ในทางการเกษตรโดยการเพิ่มชุดโครโมโซมและการก่อกลายพันธุ์ | หัวหน้าโครงการ | 2550 |
| การปรับปรุงพันธุ์ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสารทุติยภูมิสำหรับใช้ในทางการเกษตรโดยการเพิ่มชุดโครโมโซมและการก่อกลายพันธุ์ | หัวหน้าโครงการ | 2550 |
| ศูนย์ความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีชีวภาพของปาล์มน้ำมันเพื่อพลังงานทดแทน | ผู้ร่วมโครงการ | 2550 |
| การศึกษารูปแบบของการแสดงออกของยีน invertase กับการสะสม | หัวหน้าโครงการ | 2553 |

| | | |
|---|---|---|
| น้ำตาลซูโครสในอ้อย | | |

**7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)**


1. ประกาย มานำ, ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, **สนธิชัย จันทร์เปรม** และเสริมศิริ จันทร์เปรม 2553.การสกัดโปรตีนที่สะสมในเมล็ดเพื่อนำมาใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวโพดหวานด้วยเทคนิค Ultrathin-layer Isoelectic Focusing. วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 121-127.
2. ลลิตา อาจสูงเนิน, **สนธิชัย จันทร์เปรม** และ บุบผา คงสมัย. 2553. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล % AFLP . วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 175-182.
3. Srinives, P., R. Kitsanachande, T. Chalee, W. Sommanas and **S. Chanprame**. 2010. Inheritance of resistance to iron deficiency and identification of AFLP markers associated with the resistance in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek. Plant Soil. 335: 423-437.
4. ฐิติพร สายมณี, เสริมศิริ จันทร์เปรม และ**สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2553. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus camaldulensis*โดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์. วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 407-414.
5. ปิยนารถ ศรชัย, ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, **สนธิชัย จันทร์เปรม** และเสริมศิริ จันทร์เปรม. 2553. การแยกเซลล์ไร้ผนัง และการพัฒนาเป็นเซลล์ใหม่ของสาหร่ายเกลียวทอง. วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 415-422.
6. Rungnoi, O., **S. Chanprame**, T. Toojinda, I. Godwin, C. Lambrides and P. Srinives. 2010. Characterization, inheritance, and molecular study of opaque leaf mutant in mungbean (*Vigna tadiata* (L.) Wilczek). J. Crop Sci. Biotech. 13: 219-226.
7. ปิยนันท์ พวงจันทร์ บุบผา คงสมัย และ**สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2553. การชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม (Helianthus annuus) โดยการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, หน้า 191-198. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7. 7-8 ธันวาคม 2553.
8. กุลชาต นาคจันทึก บุบผา คงสมัย และ**สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2553. การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทเข้าสู่มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.)โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม, หน้า 199-206. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7. 7-8 ธันวาคม 2553.
9. กุสุมา รอดแผ้วพาล นงลักษณ์ เทียนเสรี และ**สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2553. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมของแคลลัสอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13, หน้า 207-215. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7. 7-7-8 ธันวาคม 2553.
10. อัญชิสาปานแก้ว,นงลักษณ์เทียนเสรีและ**สนธิชัยจันทร์เปรม.** 2555. การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากก้านช่อดอกอ่อนและก้านใบอ่อนของสบู่ดำพันธุ์โคราช, หน้า 2174-2181. *ใน* การ

ประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสนครั้งที่ 9. 6-7 ธันวาคม 2555.

11. บุศรินอิ่มอินทร์, นงลักษณ์เทียนเสรี และ**สนธิชัยจันทร์เปรม.** 2555. การบ่งชี้ยีนที่ควบคุมการสร้าง betaine aldehyde dehydrogenase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ, หน้า 2166-2173. *ใน* การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสนครั้งที่ 9. 6-7 ธันวาคม 2555.
12. สุลักษณ์แจ่มจำรัส,**สนธิชัยจันทร์เปรม**,รงรองหอมหวล,มณฑาวงศ์มณีโรจน์และรัตนาเอการัมย์. 2555. การใช้สารไคโตซานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมมะลิ 105, หน้า 2189-2197. *ใน* การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสนครั้งที่ 9. 6-7 ธันวาคม 2555.
13. Chaisan, T., P. Somta, P. Srinives, **S. Chanprame**, R. Kaveeta, and S. Dumrongkittikule. 2013. Development of tetraploid plants from and interspecific hybrid between mungbean (*Vigna radiata*) and rice bean (*Vigna umbellata*). J. Crop Sci. Biotech. 16(1): 45-51. DOI No. 10.1007/s12892-012-0078-y.
14. วิชา สิงห์ลอ, อัญชิสา ปานแก้ว, นงลักษณ์ เทียนเสรี, เสริมศิริ จันทร์เปรม และ **สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2556. การชักนำให้เกิดยอดจากก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนของสบู่ดำพันธุ์โคราชและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่สบู่ดำโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ. วิทยาศาสตร์เกษตร 44 (1): 17-29.
15. กำไล เรียนหัตกรรม, ปิยรัษฎ์ เจริญทรัพย์, ภาณี ทองพำนัก, ศิริกุล เกษา, พรชัย จุฑามาศ และ **สนธิชชัย จันทร์เปรม.** 2556. เทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวด. วิทยาศาสตร์เกษตร 44 (1): 53-62.
16. วนัญญา รู้ทวีผล, **สนธิชัย จันทร์เปรม** และ นงลักษณ์ เทียนเสรี. 2556. การแสดงออกอย่างจำเพาะของยีน pyruvate decarboxylase (PDC) ในสบู่ดำภายใต้สภาพน้ำท่วม, หน้า 2133-2141. ใน การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 10 7-8 ธันวาคม 2556.
17. ชนากานต์ ลักษณะ และ**สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2557. การแสดงออกของยีน *BOR1* และการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุโบรอน ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับโบรอนระดับต่างๆ. วิทยาศาสตร์เกษตร 45(2): 153-162.
18. Chanakan Laksana, Parisa chaochalad, Noppon Rassameejanphen, Duangkamon Sasiwattanapond and **Sontichai Chanprame.** 2014. Cloning of BOR1 (Boron transporter) partial length cDNA from oil palm, sugarcane and pyhsic nut. ISSAAS J. 20 (2): 1-10.
19. ปัทมา ศรีน้ำเงิน, นงลักษณ์ เทียนเสรี และ **สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2557. การโคลนบางส่วนของยีน *APETALA1 (AP1)* ในอ้อยและการทำนายเชิงหน้าที่ของยีน โดยวิธี *in siligo.* วิทยาศาสตร์เกษตร 45 (3): 249-257.
20. ปัทมา ศรีน้ำเงิน และ **สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2557. การศึกษาการเกิด DNA methylation ของอ้อยปลูก อ้อยป่า และลูกผสมอ้อยข้ามชนิดชั่วที่ 1. วิทยาศาสตร์เกษตร45 (3): 259-268.

21. รงรอง หอมหวล, สุลักษณ์ แจ่มจำรัส, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, รัตนา เอการัมย์, พีรพงษ์ แสงวนางค์กูล, ชูศักดิ์ คุณุไทย และ **สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2558. ผลของไคโตซานและไธไดอะซูรอนในการเพาะเลี้ยงข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อสร้างสารสำคัญทางโภชนาการ. วิทยาศาสตร์เกษตร46 (1): 7-18.

22. Chanakan Laksana and Sontichai Chanprame**.** 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaves of oil palm (Elaeis guineensis Jacq. ISSAAS J. 21 (1): 96-106.

23. เยาวพรรณ สนธิกุล, **สนธิชัย จันทร์เปรม**, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และเสริมศิริ จันทร์เปรม. 2558. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสักและการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเนื้อเยื่อสักเพื่อการถ่ายยีน. วิทยาศาสตร์เกษตร46 (2): 101-113.

24. ชมภูนุช ลิ้มประสาท, **สนธิชัย จันทร์เปรม**, พรศิริ เลี้ยงสกุล และเสริมศิริ จันทร์เปรม. 2558. การประเมินอัลลิโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวายโซเนีย บอม 17 ดัดแปลงพันธุกรรม. วิทยาศาสตร์เกษตร46 (2): 115-125.

25. ชนากานต์ ลักษณะ และ สนธิชัย จันทร์เปรม. 2560. การแสดงออกของยีน *BADH* ในอ้อยป่าและอ้อยการค้าภายใต้สภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก, หน้า 133-140. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

26. อัญชนา รอดรังนก, **ชนากานต์ ลักษณะ**, และสนธิชัย จันทร์เปรม. (2560). การโคลนและศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน NIP5;1ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 48(2) : 160-173.

**7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด**

-

**7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อโครงการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย (ผู้บริหารโครงการ หัวหน้าโครงการ และ/หรือผู้ร่วมวิจัย) ระบุเดือน และปีที่เริ่มต้นและสิ้นสุด**

| ชื่อโครงการ | สถานภาพ | ปี |
|---|---|---|
| การบ่งชี้ยีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพแล้ง | ผู้ร่วมโครงการ | 2556 |
| การบ่งชี้ยีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็มน้อยถึงปานกลาง | หัวหน้าโครงการ | 2557 |
| โครงการการพัฒนา gene targeted marker เพื่อใช้คัดเลือกอ้อยทนดินเค็ม | หัวหน้าโครงการ | 2559 |