

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และยีน *JcCS* ในเมล็ดสับดูดำ
ที่อายุต่าง ๆ ในพันธุ์ที่มีปริมาณสารฟอรบอเลสเทอร์สูงและพันธุ์ที่มีปริมาณสารต่ำ
**Comparison of *JcGGPPS* and *JcCS* Gene Expression in Various Seed Ages of High
and Low Phorbol Esters Content Cultivars**

สกุลรัตน์ สุวรรณโณ,¹ พรศิริ เลี้ยงสกุล² และ สนธิชัย จันทร์เปรม^{2,3*}
Sakulrat Suwanno,¹ Pornsiri Liangsakul² and Sontichai Chanprame^{2,3*}

Received 1 August 2019, Accepted 17 December 2019

ABSTRACT

Jatropha curcas is a high potential oil crop that fulfils many of the requirements for bio-diesel production. The seed kernels have an oil content of 40-60 percent. However, they also contain various toxins; phorbol esters (PEs) are the main toxins in *jatropha* seed and oil. The objective of this study, was aimed to compare geranylgeranyl diphosphate synthase (*GGPPS*) and casbene synthase (*CS*) gene expression in various seedstages of high and low PEs content using real-time PCR technique. Partial cloning of *GGPPS* and *CS* showed the 592 and 1,092 bp of DNA fragments, called *JcGGPPS* and *JcCS*, respectively. The gene expression levels were studied by using real-time PCR. It was found that the expression of *JcGGPPS* in the seeds of Korat and Mexican cultivar had the highest expression at 20 days after pollination (DAP) while the expression of *JcCS* reached the highest level at 40 DAP. When comparing to the gene expression levels at various seed stages between the two cultivars it was found that the *JcGGPPS* and *JcCS* gene expressions in Korat cultivar were about 6-36 and 1.5-2,600 folds higher than those of Mexican cultivar, respectively. If there is correlation between the expression levels of the genes and seed PEs content, the expression levels of the genes could be used as the simple indicator for selection of low seed PEs content.

Keywords: *Jatropha curcas*, *JcGGPPS*, *JcCS*, Phorbol esters, Gene expression

¹ ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,
Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Central for Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author: Tel 0-3435-1887 ต่อ 118, Fax 0-3435-2812, E-mail address: agrstc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเพื่อใช้เป็นน้ำมันไบโอดีเซลเมล็ดของสบู่ดำมีน้ำมันเป็นองค์ประกอบร้อยละ 40-60 อย่างไรก็ตามน้ำมันสบู่ดำที่บีบจากเมล็ดจะมีสารพิษคือสารฟอรับอลเอสเทอร์ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์ คือ geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) และ casbene synthase (CS) ในเมล็ดสบู่ดำที่อายุต่างๆ ในพันธุ์ที่มีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์สูงและพันธุ์ที่มีปริมาณสารต่ำ โดยใช้เทคนิค real-time PCR ผลการโคลนบางส่วนของยีน GGPPS และยีน CS พบแถบดีเอ็นเอขนาด 592 คู่เบส และ 1,092 คู่เบส เรียกชื่อยีนนี้ว่า *JcGGPPS* และ *JcCS* ตามลำดับ จากนั้นศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* ในเมล็ดสบู่ดำพันธุ์โคราชและพันธุ์เม็กชิโกมีระดับสูงสุดที่อายุ 20 วันหลังการผสมเกสร ส่วนยีน *JcCS* มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เมล็ดอายุ 40 วันหลังการผสมเกสร และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนทั้งสองในเมล็ดที่อายุต่างๆ ระหว่างสองพันธุ์ พบว่า พันธุ์โคราชมีระดับการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* มากกว่าพันธุ์เม็กชิโก 6-36 เท่า และ 1.5-2,600 เท่า ตามลำดับ ถ้าระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ในเมล็ดจริง ก็จะสามารถใช้เป็นดัชนีอย่างง่ายที่ใช้คัดเลือกสบู่ดำที่มีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ในเมล็ดต่ำได้

คำสำคัญ: สบู่ดำ *JcGGPPS* *JcCS* ฟอรับอลเอสเทอร์ การแสดงออกของยีน

คำนำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. มีชื่อสามัญ คือ barbadose nut, physic nut และ purging nut (พรชัย, 2549) สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่แห้งแล้งและทนทานต่อโรคพืช สบู่ดำเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยเฉพาะการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน (Heller, 1996) โดยการนำเมล็ดมาสกัดน้ำมันเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลเพื่อทดแทนเชื้อเพลิงที่มาจากฟอสซิล (fossil fuel) (Devappa *et al.*, 2010a) เมล็ดสบู่ดำมีน้ำมันร้อยละ 40-60 นอกจากนี้ในส่วนของกากเมล็ด (cake) ที่เหลือจากการบีบน้ำมันจะมีโปรตีนประกอบอยู่ร้อยละ 22-28 ซึ่งสูงกว่ากากถั่วเหลือง ดังนั้นจึงอาจนำมาใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ได้แต่การนำน้ำมันและกากเมล็ดสบู่ดำมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่านั้นยังมีข้อจำกัดอยู่มากเนื่องจากสบู่ดำมีสารพิษอยู่หลายชนิด เช่น สารเคอร์ซิน (curcin) ทริปซินอินฮิบิเตอร์

(trypsin inhibitors) แลคติน (lectins) ซาโปนิน (saponins) ไฟเตต (phytate) และสารฟอรับอลเอสเทอร์ (phorbol esters, PEs) (Devappa *et al.*, 2010 b; Yunping *et al.*, 2012) เป็นต้น สารฟอรับอลเอสเทอร์เป็นสารพิษที่พบมากที่สุดที่ในเมล็ด (สุภา และคณะ, 2013) มีฤทธิ์ส่งเสริมให้เกิดเนื้องอก (tumor promoting activity) โดยจะไปกระตุ้น protein kinase C ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ การสังเคราะห์โปรตีนรวมถึงดีเอ็นเอผิดปกติไป (Ahmed & Salimon, 2009) ปัจจุบันมีการแบ่งสบู่ดำออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มสายพันธุ์เอเชีย กลุ่มนี้ประกอบด้วยสายพันธุ์จากไทย เมียนมาร์ อินเดีย เวียดนาม และมาเลเซีย พันธุ์สบู่ดำในกลุ่มนี้มีปริมาณน้ำมันในเมล็ดต่ำถึงปานกลาง (ร้อยละ 18-25) มีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์สูง (1-5 มก.) 2. กลุ่มสายพันธุ์เม็กชิโก สบู่ดำในกลุ่มนี้มีปริมาณน้ำมันในเมล็ดปานกลางถึงสูง (ร้อยละ 25-35) มีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ต่ำมาก (ต่ำกว่า 0.1 มก.) และ 3. สายพันธุ์ลูกผสม เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างกลุ่มพันธุ์

เอเชียกับกลุ่มพันธุ์เม็กซิโก (พีระศักดิ์ และคณะ, มปป.) อย่างไรก็ตาม Makkar *et al.* (1998) และวิทยา และคณะ (2550) รายงานว่าสบู่ดำพันธุ์ที่ไม่มีพิษ (จากประเทศเม็กซิโก) มีสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในเนื้อเมล็ดปริมาณ 0.11 มก. ส่วนพันธุ์ที่มีพิษจะมีสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในเนื้อเมล็ดมากกว่า 0.11 มก.

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยที่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนถึงกระบวนการสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์แต่เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าสารฟอร์บอลเอสเทอร์เป็นอนุพันธ์ของสารประเภทสารพิษทิกเลนซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่มไดเทอร์เพนส์ (diterpenes) และอยู่ในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) (Devappa *et al.*, 2011) ดังนั้นความเข้าใจในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์อาจนำมาใช้ในการอธิบายและทำนายยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์ได้ซึ่งยีนที่คาดว่าจะมีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์คือ geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) และ ยีน casbene synthase (CS) ซึ่ง Nakano *et al.* (2012) ได้ศึกษาลักษณะและหน้าที่ของยีน *JcCSH* ที่แยกได้จากใบสบู่ดำ พบว่า สัมพันธ์กับวิถีชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มไดเทอร์เพนส์และชีวสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์ โดยยีนนี้ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่มีชื่อว่า *Jatropha curcas* casbene synthase homolog (*JcCSH*) จากการโคลนยีนด้วยเทคนิค RACE พบว่า มีความยาวของ cDNA ทั้งหมด 2,016 คู่เบส ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR พบการแสดงออกของยีนนี้ในระยะต้นกล้า ใบแก่ และระยะพัฒนาการของผลสด Lin *et al.* (2010) ได้ศึกษาลักษณะและหน้าที่ของยีน GGPPS โดยยีนจะสร้างเอนไซม์ที่มีชื่อว่า geranylgeranyldiphosphate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ โดยมี geranyl diphosphate (GPP) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสาร geranylgeranyl diphosphate (GGPP)

จากการโคลนยีนดังกล่าวจากเมล็ดสบู่ดำด้วยเทคนิค RACE พบว่า ยีนมีความยาวของ cDNA ทั้งหมด 1,414 คู่เบส และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* พบว่า ยีน *Jc-GGPPS* ทำให้มีการสะสมของเบตาแคโรทีน (β -carotene) โดยสังเกตได้จากสีโคโลนี (colony) ของแบคทีเรียที่เปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีเหลือง ดังนั้นจึงคาดว่า GGPPS จะเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการชีวสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และยีน *JcCS* ในเมล็ดสบู่ดำอายุต่างๆ ระหว่างพันธุ์ที่มีปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์สูงและพันธุ์ที่มีปริมาณสารต่ำด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อจะเป็นข้อมูลพื้นฐานและดัชนีอย่างง่ายสำหรับการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์น้อยลงในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) พันธุ์ที่มีปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในเมล็ดสูง (พันธุ์โคราช) และพันธุ์ที่มีปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในเมล็ดต่ำ (พันธุ์เม็กซิโก) ในแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนจังหวัดนครปฐม ทำการผสมตัวเอง และเก็บตัวอย่างเมล็ดที่อายุ 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 วันหลังการผสมเกสร มาสกัด total RNA

2. การสกัด total RNA และการสังเคราะห์ first strand cDNA

สกัด total RNA จากเมล็ดสบู่ดำที่มีอายุ 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 วันหลังการผสมเกสรตามวิธีการของ Laksana & Chanprame (2015) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer 8000 (Eppendorf) ที่ความยาวคลื่น 230/260 และ 280 น.ม. จากนั้นสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA

โดยการทำให้ reverse transcription (RT) ด้วยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่เป็น Oligo (dT)₂₀ primer เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์โดยใช้ชุดสังเคราะห์ first strand cDNA และวิธีการของบริษัท Thermo Fisher Scientific (USA)

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS)* และ *casbene synthase (CS)*

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์บางส่วนของยีน *GGPPS* และ *CS* จากฐานข้อมูล GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยยีน *GGPPS* ใช้ข้อมูล accession number: GU585938 และยีน *CS* ใช้ข้อมูล accession number: AB687998 ด้วยโปรแกรมออนไลน์ OligoAnalyzer

3.1 (<http://eu.idtdna.com>) แล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1st base Laboratory (ประเทศมาเลเซีย)

4. การโคลนบางส่วนของยีน *geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS)* และ *casbene synthase (CS)*

สังเคราะห์บางส่วนของยีน *GGPPS* และ *CS* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ first-strand cDNA ของสบูดำ 500 นาโนกรัมเป็นต้นแบบร่วมกับ 10x PCR buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย dNTP mix ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร first strand cDNA template ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อเป็น 10 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยนำส่วนผสมต่างๆ ใส่เครื่อง Thermo cycler (Biometra®, Germany) กำหนดปฏิกิริยาดังนี้ pre-denature อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา

3 นาที denature อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 52-62°C เป็นเวลา 30 วินาที extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำโปรแกรม denature ถึง extension จำนวน 30 รอบ final extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอออกจากชิ้นเจลแล้วสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท SolGent ประเทศเกาหลี เปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับดีเอ็นเอหรือโปรตีนที่สนใจจากฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/>

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* ด้วยเทคนิค real-time PCR

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จากข้อ 4 และยีน *Actin* ด้วยโปรแกรมออนไลน์ primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) (Table1) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเมล็ดที่มีอายุ 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 วันหลังการผสมเกสร ของสบู่ดำพันธุ์โคราชและเม็กซีโกโดยใช้ยีน *Actin* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) เตรียมส่วนผสมของ ปฏิกิริยา ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer ความเข้มข้นชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 0.8 ไมโครลิตร first strand cDNA ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water ปริมาตร 7.4 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Mastercycler® eprealplex ของบริษัท Eppendorf ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ denature อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที annealing อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 วินาที และ extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา

20 วินาที จำนวน 45 รอบ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาการแสดงออกของยีนโดยปรับค่า (normalization) กับค่าการแสดงออกของยีน *Actin*

โดยแต่ละอายุของเมล็ดใช้ first strand cDNA 3 ตัวอย่าง (biological replication) แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ (technical replication)

Table 1 Primers used for amplifying of partial *GGPPS*, *CS* and *Actin* (reference gene) for PCR and real-time PCR

Primer	Nucleotide sequence	Amplicon size (bp)
GGPPS_F	5'- TCCCTTAGCCTACTTTCCTCCTAC-3'	592
GGPPS_R	5'- CTCACTAGCTCTTGATACGCTTCC-3'	
CS_F	5'- CCGTCCTGAACTCCCATTTA-3'	1,092
CS_R	5'- AGCCGATCCAAGCTCAGTTA-3'	
Actin_F	5'- TCGTGCTGGATTCTGGTGAT-3'	590
Actin_R	5'- GGAACCACCACTGAGCACAA-3'	
GGPPS_F_realtime	5'- GCAGTACCCTTGAACCATCC-3'	115
GGPPS_R_realtime	5'- CGCCTACTAACTCACAGGCA-3'	
CS_F_realtime	5'- ATATCCACCTTTTCGATTGC -3'	126
CS_R_realtime	5'- TGCAAAGGCTAGAATGATCG -3'	
Actin_F_realtime	5'- ATGACATGGAGAAGATCTGGCATCA-3'	150
Actin_R_realtime	5'- CTCACTAGCTCTTGATACGCTTCC-3'	

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวนการทำซ้ำ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม R (version 3.4.3) ร่วมกับวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's multiple range test) $P \leq 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนบางส่วนของยีน *GGPPS* และ *CS* และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ในการสกัด total RNA จากสับดูพบว่า extraction buffer ที่ใช้สามารถทำลายผนังเซลล์ได้ เพราะมีส่วนผสมของ β -mercaptoethanol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น reducing agent ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonucleases)

และป้องกันการออกซิไดซ์ (oxidized) สารในกลุ่มฟีนอลิก กำจัดอนุภาคมูลอิสระที่เข้าไปจับกับสารฟีนอลิก และกลุ่มนิวคลีอิกเนื่องจากการจับกันระหว่างฟีนอลิกกับกรดนิวคลีอิกในสภาพออกซิไดซ์ทำให้คุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไป (ปัทมา, 2546) ส่วนปริมาณ total RNA ที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 500-2,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพ พบว่า total RNA ที่แยกได้มีคุณภาพดีพบแถบของ large และ small ribosomal RNA (Figure 1b และ 1d) จากนั้นนำ total RNA ที่สกัดได้มาสังเคราะห์เป็น first strand cDNA ในการศึกษาใช้ first strand cDNA พันธุ์โคราชเป็นแม่แบบสำหรับโคลนบางส่วนของยีน *GGPPS* และ *CS* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนทั้งสองเพราะ

คาดว่าพันธุ์นี้มีการแสดงออกของยีนสูงกว่าพันธุ์เม็กซิโก ซึ่งในช่วง annealing ได้ทดลองใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 52-62°C พบว่า อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม คือ 60°C เกิดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน *GGPPS* ขนาด 592 คู่เบส (Figure2a) ยีน *CS* ขนาด 1,092 คู่เบส (Figure2b) และยีน *Actin* ขนาด 590 คู่เบส (Figure2c) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ที่ website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/> พบแถบดีเอ็นเอขนาด 592 คู่เบส มีความเหมือนกับ ยีน *GGPPS* ของสนุ่นดำ (accession number: NM_001308786.1) ร้อยละ 99.75 ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*, accession: GQ911584.1) ร้อยละ 76.67 *Populus trichocarpa* (accession: XM_006383272.2) ร้อยละ 76.40 และ *Gossypium arboreum* accession: XM_017782669.1) ร้อยละ 78.35 จึงเรียกว่ายีน *JcGGPPS* ส่วนแถบดีเอ็นเอขนาด 1,092 คู่เบส มีความเหมือนกับยีน *casbene synthase (CS)* ของสนุ่นดำ (*J. curcas*, accession

number: XM_012211452.2) ร้อยละ 99.30 ละหุ่ง (*Ricinus communis*, accession number: L32134.1) ร้อยละ 75.73 และ *Euphorbia pekinensis* (accession number: MF034928.1) ร้อยละ 74.58 จึงเรียกว่ายีน *JcCS*

สาเหตุที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* ที่โคลนได้ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองยีนของสนุ่นดำที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ร้อยละ 100 เนื่องจากสายพันธุ์สนุ่นดำที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นคนละสายพันธุ์กับที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank และเกิดจากปรากฏการณ์ที่เรียกว่า single nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งพบได้เสมอในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ทำให้ในพืชชนิด (species) เดียวกันแต่ต่างพันธุ์ (variety) กันมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งต่างกัน ทำให้สามารถใช้ SNP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการบ่งชี้พันธุ์พืชได้ (Dong *et al.* 2010; Li *et al.* 2010; Korir *et al.* 2012)

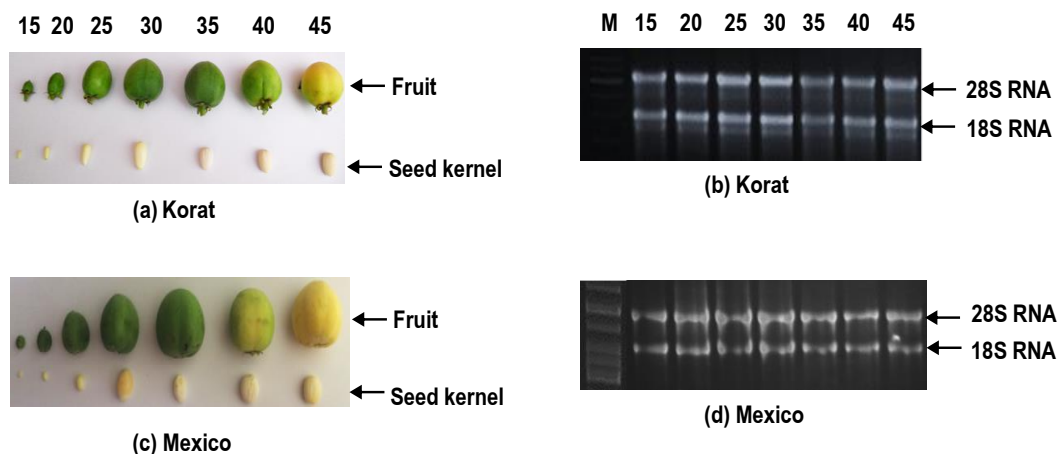


Figure1 Fruit and seeds of jatropha at various developmental stages (15-45 DAP) of jatropha cv. Korat (a) cv. Mexican (c) and total RNA extracted from fruit and seeds of jatropha cv. Korat (b), cv. Mexico (d); lane M: Marker, 1kb DNA ladder (Fermentus), lane 2-7 total RNA from seeds at the age of 15-45 DAP

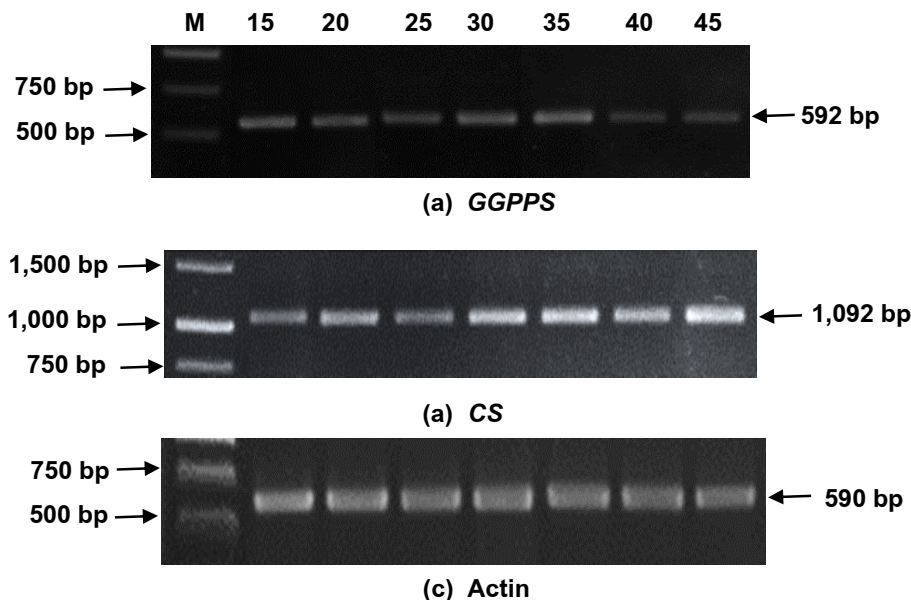


Figure2 Partial cloning of *GGPPS*, *CS* and *Actin* gene from various developmental stages of jatropha seeds cv. Korat; lane M: GeneRular™ 1 Kb DNA ladder (Fermentas), lane 2-8: cDNA derived from jatropha seeds at 15-45 DAP; 592 bp of *GGPPS* gene (a) 1,092 bp of *CS* gene (b) and 590 bp of *Actin* gene (c)

2. การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* ในเมล็ดด้วยเทคนิค real-time PCR

สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* จาก cDNA ของเมล็ดสุบุดำ ทั้ง 7 ระยะ ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยนำค่า Cq ของยีนแต่ละชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ต่อตัวอย่าง ด้วยเครื่อง real-time PCR มาคำนวณค่าการแสดงออกปรับค่าการแสดงออกของยีน (normalization) ด้วยค่าการแสดงออกของยีน *Actin* ที่ใช้เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) พบว่าการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* ในพันธุ์โคราชระยะแรกๆ หลังการผสมเกสรจะแสดงออกในระดับต่ำแล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อระยะพัฒนาของผลเพิ่มขึ้นและสูงสุดที่ระยะ 40 วันหลังการผสมเกสร (DAP) หลังจากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองยีนในเมล็ดสุบุดำพันธุ์โคราชที่อายุ 15-35 และ 45 วันหลังการผสมเกสร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ แต่จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมล็ดที่อายุ 40 วันหลังการผสมเกสร (Figure3) ส่วนการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* ของพันธุ์เม็กซิโกซึ่งมีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ในเมล็ดต่ำที่อายุการพัฒนาของเมล็ดระยะต่างๆ หลังการผสมเกสร มีรูปแบบของการแสดงออกของยีนทั้งสองคล้ายคลึงกันคือ การแสดงออกของยีนทั้งสองยีนในระยะช่วง 15-20 วันหลังการผสมเกสร จะมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 20 หลังการผสมเกสร โดยระดับการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนในเมล็ดที่อายุอื่นๆ หลังการผสมเกสร และการแสดงออกของยีนจะลดลงอย่างมากในวันที่ 25 หลังการผสมเกสร แล้วจะเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในช่วง 40-45 วันหลังการผสมเกสรทั้งนี้ในยีน *GGPPS* นั้นระดับการแสดงออกในช่วงวันที่ 25 ถึง 40 วันหลังผสมเกสรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการแสดงออกของยีนในวันที่ 45 หลังผสมเกสร ส่วนยีน *CS* นั้นพบว่าระดับ

การแสดงออกของยีนในช่วงวันที่ 25 ถึง 45 วันหลังผสมเกสรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Figure3) การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Nakano *et al.* (2012) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *JcCSH* ในส่วนต่างๆ ของสับดูดา พบว่าในเมล็ดสับดูดาอายุประมาณ 30-40 วันหลังการผสมเกสร มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดโดยในการทดลองนี้ที่พบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์ในสับดูดาพันธุ์โคราชที่มีปริมาณสารดังกล่าวสูงจะมีการแสดงออกของยีนทั้งสองยีนสูงสุดในวันที่ 40 หลังการผสมเกสร ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารพิษในสับดูดาน่าจะมีอัตราการสะสมในเมล็ดสูงที่สุดด้วยในขณะที่ในพันธุ์เม็กซิโกที่มีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ต่ำ มีการแสดงออกของยีนทั้งสองยีนในวันที่ 40 หลังการผสมเกสร ต่ำกว่ามากซึ่งสับดูดาพันธุ์เม็กซิโกนี้จัดเป็นพันธุ์ที่ไม่มีพิษและใช้บริโภคได้เป็นแหล่งโปรตีนและน้ำมันสำหรับชนพื้นเมืองในประเทศเม็กซิโกมาเป็นเวลานาน (Senger *et al.*, 2017) ในขณะที่สารฟอรับอลเอสเทอร์เป็นสารพิษที่พบได้ในเมล็ดและน้ำยางของพืชวงศ์ Euphorbiaceae และ Thymelaeceae ซึ่งในสับดูดาจะพบสารฟอรับอลเอสเทอร์ได้ในดอก เมล็ด ลำต้น เปลือกลำต้น ใบ และราก แต่จะไม่พบในน้ำยาง โดยในพันธุ์ที่มีพิษเมล็ดจะเป็นส่วนที่มีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์สูงที่สุด (Ahmed & Salimon, 2009) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมล็ดของพันธุ์โคราชที่อายุ 40 วันหลังการผสมเกสรเป็นช่วงที่เมล็ดมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ทำให้กระบวนการสร้างสารต่างๆ ทำงานอย่างเต็มที่และมีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ในการปกป้องตัวเองจากแมลงและสิ่งแวดลอม (สุภา, 2554)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* ระหว่างพันธุ์โคราชกับพันธุ์เม็กซิโก พบว่าการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* ที่ระยะการพัฒนาเดียวกันของเมล็ดในพันธุ์โคราชมีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าพันธุ์เม็กซิโก (ยกเว้นในวันที่ 15 และ 20 หลังผสมเกสรที่พันธุ์เม็กซิโกมีระดับการแสดงออกสูงกว่าพันธุ์โคราช) โดยพันธุ์โคราชมีระดับการแสดงออกของยีนนี้มากกว่าพันธุ์เม็กซิโกตั้งแต่ประมาณ 6-36 เท่า (Table 2) โดยความแตกต่างของระดับการแสดงออกจะมากขึ้นเมื่อเมล็ดมีอายุมากขึ้น ส่วนการแสดงออกของยีน *JcCS* ในพันธุ์ทั้งสองก็มีลักษณะคล้ายๆ กับยีน *JcGGPPS* นั่นคือระดับการแสดงออกของยีนนี้ในพันธุ์โคราชจะสูงกว่าพันธุ์เม็กซิโกเมื่ออายุของเมล็ดมากขึ้น (ยกเว้นในวันที่ 15 และ 20 หลังผสมเกสรที่พันธุ์เม็กซิโกมีระดับการแสดงออกสูงกว่าพันธุ์โคราช) ระหว่าง 1.5-2,600 เท่า (Table 2) ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่อยู่ในวิถีชีวสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์สะท้อนถึงการสังเคราะห์และการสะสมสารฟอรับอลเอสเทอร์ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Makkar *et al.* (1997) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารต่างๆ ในสับดูดาพันธุ์ที่มีพิษและพันธุ์ที่ไม่มีพิษ พบว่าปริมาณ trypsin inhibitor, lectin และ phytate มีความแตกต่างกันเล็กน้อย ส่วนปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน คือในสายพันธุ์ที่มีพิษมีปริมาณสาร 3.45 มก. ในขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่มีพิษมีปริมาณสารเพียง 0.11 มก.

Table 2 The comparison of the average relative expressions of *JcGGPPS* or *JcCS* gene in seeds at 15-45 DAP of the jatropha cv. Korat and Mexican

Gene	Verities	Day after of pollination (DAP)						
		15	20	25	30	35	40	45
<i>JcGGPPS</i>	Korat	0.00277	0.00352	0.00551	0.00584	0.02939	0.29215	0.03599
	Mexican	0.02267	0.19078	0.00096	0.00016	0.00217	0.01868	0.06188
<i>JcCS</i>	Korat	0.04863	0.00903	0.00841	0.01464	0.04919	0.55947	0.04539
	Mexican	0.03213	0.05901	0.00204	0.00002	0.00005	0.00021	0.00613
T-test		*	*	*	*	*	*	*

Note: * Means are significantly different at $p \leq 0.05$

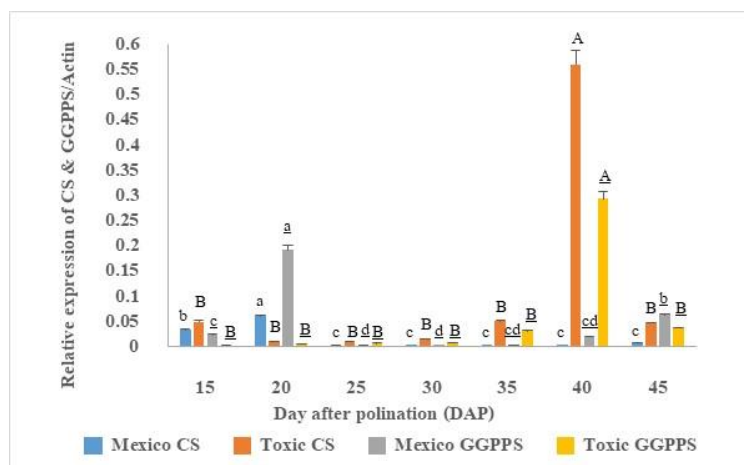


Figure 3 Relative expression of CS and GGPPS gene from jatropha seeds cv. Korat and Mexican cultivar at 15-45 DAP analyzed by using real-time PCR

เมื่อพิจารณาการแสดงผลการออกของยีนทั้ง 2 ยีน ในภาพรวมของสปีดทั้งสองพันธุ์ พบว่ามีระดับการแสดงผลการออกเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อยีน *JcGGPPS* มีการแสดงผลการออกมาก ยีน *JcCS* ก็จะมีแสดงผลการออกมากด้วย ในทางตรงกันข้ามถ้ายีน *JcGGPPS* มีการแสดงผลการออกน้อย ยีน *JcCS* ก็จะมีแสดงผลการออกน้อยด้วย (Figure 3) โดยเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับกระบวนการสังเคราะห์สารฟอรบอเลสเทอร์ จะเริ่มจากยีน *GGPPS* ยีนนี้จะสร้างเอนไซม์ geranylgeranyl diphosphate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์

โดยมี geranyl diphosphate (GPP) เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง geranylgeranyl diphosphate (GGPP) จากนั้น GGPP จะเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสาร casbene โดยเอนไซม์ casbene synthase จนในขั้นสุดท้ายจะเกิดเป็นสารฟอรบอเลสเทอร์ (Huang *et al.* 1998; Okada *et al.* 2000) ระดับการแสดงผลการออกของยีนทั้งสองยีนจึงมีผลโดยตรงต่อปริมาณสารฟอรบอเลสเทอร์ในเมล็ดที่ระยะการพัฒนาต่างๆ ซึ่งปริมาณสารฟอรบอเลสเทอร์นี้จะเป็นดัชนีชี้วัดที่สำคัญถึงความเป็นพิษของสปีดในแต่ละสายพันธุ์ได้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารฟอรับอลเอสเทอร์คือยีน *geranylgeranyl diphosphate synthase (JcGGPPS)* และยีน *casbene synthase (JcCS)* จากเมล็ดสบู่ดำที่อายุต่างๆ พบว่า พันธุ์โคราชที่อายุ 40 วันหลังการผสมเกสร มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด ส่วนพันธุ์เม็กซิโกเมล็ดที่อายุ 20 วันหลังการผสมเกสร มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างพันธุ์สบู่ดำ พบว่า พันธุ์เม็กซิโกมีระดับการแสดงของยีน *JcGGPPS* และ *JcCS* น้อยกว่าพันธุ์โคราชในเกือบทุกระยะการพัฒนาของเมล็ด และในสบู่ดำทั้งสองพันธุ์ถ้าการแสดงออกของยีน *JcGGPPS* เพิ่มขึ้น การแสดงออกของยีน *JcCS* ก็จะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ถึงแม้ว่าเมล็ดสบู่ดำจะมีปริมาณโปรตีนสูงแต่ก็มีสารพิษฟอรับอลเอสเทอร์สูงด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะในบางพันธุ์ เช่นพันธุ์โคราช เป็นต้น การนำน้ำมันและกากเมล็ดสบู่ดำมาใช้ประโยชน์จะต้องมีการกำจัดสารพิษออกก่อน ซึ่งต้องใช้กระบวนการทางเคมีเท่านั้น ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีการสร้างสารฟอรับอลเอสเทอร์น้อยลงหรือไม่มีเลยได้โดยอาจใช้การแสดงออกของยีนใดยีนหนึ่งหรือทั้งสองยีนที่ได้จากการศึกษานี้เป็นดัชนีสำหรับคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ในเมล็ดต่ำได้ แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องหาความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างระดับการแสดงออกของยีนกับปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ให้ได้ก่อน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนา มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร

กำแพงแสนที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย และขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ปัทมา ศรีน้ำเงิน. (2546). การถ่ายยีนบางส่วนของ *antisense invertase* เข้าสู่แคลลัสของอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พรชัย เหลืองอากาศ. (2549). สบู่ดำเพื่อไบโอดีเซล. กรุงเทพฯ มติชน.
- พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, พัชรินทร์ ตัญญา, นราธิษณ์ หมวกรอง, และ ชานาญร์ เพ็ชรรัตน์. (มปป.). *สบู่ดำ*. สืบค้นเมื่อวันที่ 9 กรกฎาคม 2019 จาก http://kanchanapisek.or.th/kp6/Ebook/BOOK39/pdf-password/book39_5.pdf.
- วิทยา บันสุวรรณ, รยากร นกแก้ว, พิลาณี ไวยถนอมสัตย์, และกมลชัย ตรวงวานิชนาม. (2550). การศึกษาฟอรับอลเอสเทอร์ในส่วนต่างๆ ของสบู่ดำและการหาตัวดูดซับฟอรับอลเอสเทอร์ในน้ำมันสบู่ดำ. ใน *สัมมนาวิชาการ เรื่องการประชุมวิชาการ สบู่ดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1*, 29-30 พฤษภาคม 2550. (น. 252-257). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุภา แก้วสุริวงษ์, จันทร์สมิ์ โคมเวียน, สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, และวรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกุล. (2556). เทคนิคโปรตีโอมิกส์สำหรับการวิเคราะห์วิถีชีวสังเคราะห์สารพิษในสบู่ดำ. *Thai J. Genet*, 6, 115-127.
- สุภา แก้วสุริวงษ์. (2554). การระบุยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์จากผลสบู่ดำ *Jatropha curcas L.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

- Ahmed, W. A., & Salimon, J. (2009). Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil. *Eur. J. Sci. Res*, 31(3), 429-436.
- Devappa, R. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *biomass and bioenergy*, 34(8), 1125-1133.
- Devappa, R. K., Makkar, H. P., & Becker, K. (2010). *Jatropha* toxicity—a review. *Journal of toxicology and environmental health, Part B*, 13(6), 476-507.
- Devappa, R. K., Makkar, H. P., & Becker, K. (2011). *Jatropha* diterpenes: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 301-322.
- Dong, Q. H., Cao, X., Yang, G., Yu, H. P., Nicholas, K. K., Wang, C., & Fang, J. G. (2010). Discovery and characterization of SNPs in *Vitis vinifera* and genetic assessment of some grapevine cultivars. *Scientia horticulturae*, 125(3), 233-238.
- Heller, J. 1996. *Physic nut- Jatropha curcas L. - promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. (Doctoral Thesis). Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany & International Plant Genetic Resource Institute, Rome, Italy.
- Huang, Q., Huang, K., & Scott, A. I. (1998). Enzymatic Syntheses of ¹³C-enriched geranylgeranyl diphosphate and casbene from ¹³C-labeled isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron letters*, 39(15), 2033-2036.
- Korir, N. K., Han, J., Shangguan, L., Wang, C., Kayesh, E., Zhang, Y., & Fang, J. (2013). Plant variety and cultivar identification: advances and prospects. *Critical reviews in biotechnology*, 33(2), 111-125.
- Laksana, C., & Chanprame, S. (2015). A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaves of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *ISSAAS*, 21, 96-106.
- Li, X., Wang, B., Wang, C., Wang, C., Shangguan, L., Huang, Z., & Fang, J. (2010). Genetic relationships between fruiting and flowering mei (*Prunus mume*) cultivars using SNP markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(4), 329-334.
- Lin, J., Jin, Y., Zhou, X., & Wang, J. (2010). Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Jatropha curcas*. *African Journal of Biotechnology*, 9(23), 3342-3351.
- Makkar, H. P. S., Aderibigbe, A. O., & Becker, K. (1998). Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food chemistry*, 62(2), 207-215.
- Makkar, H. P. S., Becker, K., Sporer, F., & Wink, M. (1997). Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3152-3157.

- Nakano, Y., Ohtani, M., Polsri, W., Usami, T., Sambongi, K., & Demura, T. (2012). Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Plant Biotechnology*, 12-0418.
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., & Kamiya, Y. (2000). Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 122(4), 1045-1056.
- Senger, E., Bohlinger, B., Esgaib, S., Hernández-Cubero, L. C., Montes, J. M., & Becker, K. (2017). Chuta (edible *Jatropha curcas* L.), the newcomer among underutilized crops: a rich source of vegetable oil and protein for human consumption. *European Food Research and Technology*, 243(6), 987-997.
- Yunping, B., Ha, B. T. N., Eunice, Y., Chueng, L. L., & Yan, H. (2012). Light induced degradation of phorbol esters. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 268-273.