รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การศึกษาทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Strychnos*
Genetic Studies in the Genus *Strychnos*

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การศึกษาทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Strychnos*

Genetic Studies in the Genus *Strychnos*

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* มีประวัติการใช้มานานทั้งในซีกโลกตะวันตกและตะวันออกซึ่งรวมถึงประเทศไทย โดย *Strychnos* แต่ละชนิดมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต่อร่างกายในรูปแบบและความแรงที่แตกต่างกัน ทั้งนี้มีรายงานถึงการใช้สับสนกัน เนื่องจากพืชในสกุล *Strychnos* มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายกันและมีชื่อพ้องเดียวกัน การพิสูจน์เอกลักษณ์จึงมีความจำเป็นเพื่อแยกพืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* ให้ถูกต้องกับการใช้ประโยชน์ ทั้งนี้การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่ง วิธีการนี้มีความถูกต้องของกระบวนการพิสูจน์เอกลักษณ์สูง เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิตซึ่งถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษและไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากปัจจัยต่างๆ เช่น ฤดูกาล ความชื้น แหล่งที่อยู่ นอกจากนี้จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* โดยอาศัยดีเอ็นเอมาก่อน

ในการศึกษานี้ทำการเก็บตัวอย่างพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบได้ในประเทศไทยจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Strychnos axillaris* Colebr., *S. ignatii* Berg, *S. minor* Dennst., *S. lucida* R.Br., *S. nux-vomica* Linn. และ *S. nux-blanda* A.W.Hill เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มความยาวยีนแมทเค พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมทเคของพืชในสกุล *Strychnos* มีความยาวทั้งสิ้น 1,536 นิวคลีโอไทด์เท่ากันในทุกตัวอย่างที่ศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง พบตำแหน่งพอลิมอฟิซึมที่สามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* ต่อไป

คำสำคัญ: *Strychnos*, ยีนแมทเค, สตริกนีน, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, การพิสูจน์เอกลักษณ์

Abstract

The legend of medicinal herbs derived from *Strychnos* species are well known to both western and eastern parts of the world including Thailand. Each *Strychnos* species consists of bioactive chemicals in the variety of compounds and potency. There were cases of unintentional substitution of medicinal herbs from *Strychnos* species since they possess similar morphology and sharing the same vernacular homonym. Therefore, accurate identification of medicinal plants in the genus *Strychnos* is needed to ensure for uses. Molecular biology technique by DNA fingerprinting has been proved to be the powerful method to discriminate species with high accuracy. DNA characteristic is the heredity of each organism and is not affected by any environments such as season, climate and habitat. From literature reviews, identification of *Strychnos* plants by DNA fingerprinting has not been done.

Five *Strychnos* species, *Strychnos axillaris* Colebr., *S. ignatii* Berg, *S. minor* Dennst., *S. lucida* R.Br., *S. nux-vomica* Linn. and *S. nux-blanda* A.W.Hill, existing in Thailand were collected in this study. The sequencing of the full length maturase K (*mat*K) genes have been determined. It was found that *mat*K gene possess 1,536 bp in all studied species. Polymorhisms among the five species have been found. Appropriate molecular marker can be developed for authentication of the *Strychnos* species.

Keywords: *Strychnos*, *mat*K gene, strychnine. DNA fingerprint, Identification

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	4
ผลการศึกษา	7
- การ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K	7
- Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทยและลงทะเบียนฝากข้อมูลไว้ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank	9
สรุปและวิจารณ์ผล	9
เอกสารอ้างอิง	10
ประวัติผู้วิจัย	11

เลขหมู่
เลขทะเบียน 015910
วัน, เดือน, ปี 17 พ.ค. 56

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อพ้องของพืชสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทย	1
ตารางที่ 2	ตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่ใช้ในการวิจัย	3
ตารางที่ 3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์	4
ตารางที่ 4	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส	5
ตารางที่ 5	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส	5
ตารางที่ 6	Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่ใช้ในการวิจัย	8

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ชื่อพ้องของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทย	1
ภาพที่ 2	โครงสร้างยีน *mat*K และตำแหน่งไพร์เมอร์.....	4
ภาพที่ 3	Sequence alignment ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos*. Luc: *S. lucida*; Bla: *S. nux-blanda*; Ign: *S. ignatii*; Nux: S. *nux-vomica*; Axi: *S. axillaris*; Min: *S. minor*	7

การศึกษาทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Strychnos*

GENETIC STUDIES IN THE GENUS *STRYCHNOS*

สุชาดา สุขหร่อง

Suchada Sukrong

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

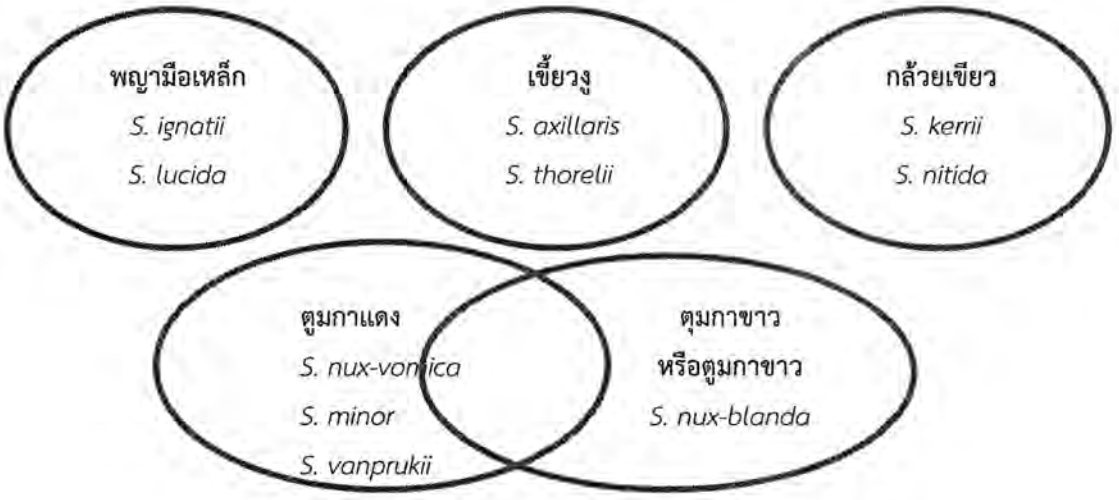
พืชในสกุล *Strychnos* เป็นพืชที่มีการกระจายอยู่ทั่วโลกทั้งในทวีปอเมริกาใต้ อเมริกากลาง แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย (Bavovada, 2000) ที่พบได้ในประเทศไทยมีรายงานทั้งสิ้น 11 ชนิด **(ตารางที่ 1)** (เต็ม สมิตินันทน์, 2544) พืชในสกุล *Strychnos* มีประวัติการใช้มานานทั้งในซีกโลกตะวันตกและตะวันออกรวมทั้งประเทศไทย พบใช้เป็นยาหรือใช้เป็นสารพิษ แอลคาลอยด์หลักที่พบในพืชสกุลนี้คือ strychnine (Han, 2008) ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นประสาทส่วนกลาง (analeptic drugs) โดยการแย่งที่กับ glycine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลางโดยเฉพาะอย่างยิ่งไขสันหลัง (spinal cord) ถ้าใช้ในขนาดที่เหมาะสมจะมีสรรพคุณในการบำรุงหัวใจให้เต้นแรง กระตุ้นจิตประสาท (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2541; นันทวัน บุณยะประภัศร, 2543) และบำรุงเพศบุรุษ แต่ถ้าใช้ในขนาดที่ก่อให้เกิดพิษ ทำให้เกิดการชักของไขสันหลัง (spinal convulsion), rhabdomyolysis, การหายใจล้มเหลว และถึงกับเสียชีวิตได้ (Nayar, 1954; Zhang, 1988)

เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกันมากและบางชนิดมีชื่อพ้องเดียวกันในท้องถิ่นต่างๆ **(ภาพที่ 1)** ทำให้เกิดการสับสนในการใช้จนถึงขั้นทำให้เสียชีวิต (Bavovada, 2000; Nayar, 1954; Zhang, 1988) ประกอบกับพืชในสกุล *Strychnos* นั้น ส่วนใหญ่เน้นศึกษาในเรื่องของพฤกษเคมี ยังไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบในส่วนข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อการตรวจพิสูจน์และจำแนกพืชในสกุลนี้มาก่อน ดังนั้นการศึกษาพันธุกรรมของพืชในสกุล *Strychnos* เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ จึงเป็นที่น่าสนใจเพื่อแยกสมุนไพรในสกุลนี้ให้ถูกต้องและเหมาะสมกับการใช้ประโยชน์ เพื่อให้เกิดประสิทธิผลที่ต้องการและเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของสายพันธุ์ที่มีในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงจะทำการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งได้แก่ดีเอ็นเอซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิต (Kress, 2008) เพื่อใช้ช่วยจำแนกและพิสูจน์

เอกลักษณ์ของชนิดหรือสายพันธุ์ดังกล่าว โดยจะทำศึกษาการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีนแมทเค (*mat*K gene) ซึ่งเป็นยีนในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) มีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส แทรกตัวอยู่ในยีน *trn*K เมื่อถูกถอดรหัสและแปลรหัสจะได้เอนไซม์ maturase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ซึ่งยีน *mat*K เป็นยีนที่นิยมใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ในระดับสกุล (genus) และระดับชนิด (specie) ของพืชอีกหลายชนิด

ตารางที่ 1 ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อพ้องของพืชสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพ้อง (vernacular name)
Strychnos axillaris Colebr.	**ขวากไก่**, หนามเข็ม (ชัยภูมิ); ขอเบ็ด (หนองคาย); ขี้แรด (ปราจีนบุรี); เขี้ยวงู (ชุมพร); ตึ่งเครือดำตัวแม่ (ลำปาง); เบน, เบนขอ (ภาคอีสาน); เล็บครุฑ (จันทบุรี); เล็บรอก (พัทลุง); หมากตาไก้ (เลย)
S. ignatii Berg	**พญามือเหล็ก** (กระบี่); St. Ignatius's bean
S. kerrii A.W.Hill	**กล้วยเขียว** (นครราชสีมา)
S. lucida R.Br.	พญามือเหล็ก, **พญามูลเหล็ก** (ภาคกลาง); ยามือเหล็ก (กระบี่); เสี้ยว-ดูก (ภาคเหนือ)
S. minor Dennst.	ตุมกาขาว, **ตุมกาแดง** (ลำปาง); เถากวางดูถูก (สุราษฎร์ธานี); เถา-ปลอง (ระนอง); ตูมกาแดง, พญาปล้องทอง
S. nitida G.Don	**สานดีลอก** (เชียงใหม่); กล้วยเขียว
S. nux-blanda A.W.Hill	กล้อวูแซ, กล้ออึ, กล้ออึ๊ (แม่ฮ่องสอน); ขี้กา (ภาคอีสาน); **ตูมกาขาว** (ภาคกลาง); ปลูเวียต (Khmer); มะติ่ง, มะติ่งต้น, มะติ่งหมาก (ภาคเหนือ)
S. nux-vomica Linn.	โกฐกะกลิ้ง (ภาคกลาง); กระจี้, กะกลิ้ง, ตูมกาแดง, **แสลงใจ** (ภาคกลาง); แสลงทม, แสลงเบื่อ (นครราชสีมา); แสงเบือ (อุบลราชธานี); โฮงบ้วยจี้ (จีน); Snakewood
S. rupicola Pierre ex Dop.	**ขี้กาเครือ** (ปราจีนบุรี)
S. thorelii Pierre ex Dop	เขี้ยวงู, ลุ่มนก (ชุมพร); จองละอา, ชองระอา (จันทบุรี); เถาสะเอม, **สะเอ้ง** (ตราด)
S. vanprukii Craib	**เถาช้าง** (ภาคเหนือ); ตูมกาแดง



ภาพที่ 1 ชื่อพ้องของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทย

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาพันธุกรรมชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในส่วนคลอโรพลาสต์ยีน หรือนิวเคลียร์ยีนของพืชในสกุล *Strychnos* เพื่อแยกความแตกต่างของพืชแต่ละชนิด และใช้เป็นข้อมูลในการพิสูจน์เอกลักษณ์เครื่องยาสมุนไพร เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางยา โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมยาแผนโบราณที่ใช้พืชในสกุล *Strychnos* เป็นเครื่องยา อันเป็นการป้องกันการใช้ *Strychnos* แต่ละชนิดแทนที่กันโดยไม่ได้ตั้งใจที่มาจากความสับสนและโดยตั้งใจ เช่น การปลอมปน จากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจก่อผลต่อผู้ใช้เครื่องยา ทำให้เป็นพิษหรือไม่ได้รับประโยชน์การรักษาจากเครื่องยา เนื่องด้วยในแต่ละชนิดมีสารสำคัญที่ให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ร่วมกับพื้นที่อื่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลดีเอ็นเอชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมุนไพรสกุล *Strychnos* เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของสายพันธุ์ที่มีในประเทศไทยและเพื่อจำแนกความแตกต่างของสมุนไพรสกุล *Strychnos* ในประเทศไทย ซึ่งจะถูกนำไปพัฒนาต่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marekr) ที่ง่ายและเหมาะสมต่อการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในสกุล *Strychnos* ในตำรับยา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบได้ในประเทศไทย ปัจจุบันสามารถเก็บตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ได้ 6 ชนิด **(ตารางที่ 2)**

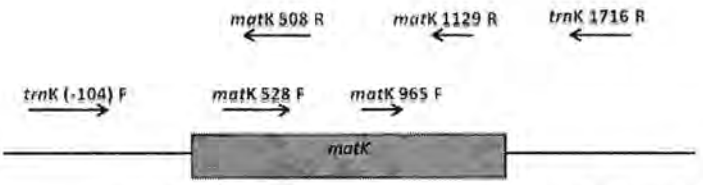
ตารางที่ 2 ตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	สถานที่เก็บ
S. oxillaris Colebr.	ขวากไก่, เขี้ยวงู	เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี
S. ignatii Berg	พญามือเหล็ก	อ่าวลึก จ.กระบี่
S. minor Dennst.	ตูมกาแดง	เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี
S. lucida R.Br.	พญามูลเหล็ก, พญามือเหล็ก	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ
S. nux-vomica Linn.	แสลงใจ, ตูมกาแดง	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ
S. nux-blanda A.W.Hill	ตูมกาขาว	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี

2. จัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (Herbarium specimen) ของตัวอย่างพืชพร้อมนำไปเทียบกับหอพรรณไม้เพื่อตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์
3. สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากส่วนใบของตัวอย่างพืชทั้งหมด โดยใช้ชุดสกัดของ DNeasy® Plant Minikit (Qiagen) นำสารสะลายดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
4. ออกแบบไพร์เมอร์สำหรับใช้ในการปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสหรือพีซีอาร์ (PCR)

โดยทำการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานมาก่อนจาก GenBank® เพื่อนำมาใช้ในการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อใช้กับพืชในสกุล *Strychnos* อันประกอบด้วย *S. lucida mat*K gene, partial cds [DQ660545]; *S. minor mat*K gene, partial cds [DQ660546]; *S. nux-vomica mat*K gene [Z70193] และ *Buddleja alternifolia trn*K gene [AF531772]

จากการออกแบบไพร์เมอร์โดยอาศัยโปรแกรม DNA Star® Lasergene 8.0 และโปรแกรม Primer Select สามารถออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็น amplifying primers และ/หรือ sequencing primers **(ภาพที่ 2 และตารางที่ 2)**



ภาพที่ 2 โครงสร้างยีน *mat*K และตำแหน่งไพร์เมอร์

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์
*trn*K (-104) F	5' CTG TTG ATA AGT TTA CCT GCC TCC G 3'
*mat*K 528 F	5' CTT CGC TAT TGG GTA AAA GAT GCC 3'
*mat*K 965 F	5' TTG ACC TGT GGT TTC ACT CGG G 3'
*mat*K 508 R	5' GAG GCA TCT TTT ACC CAA TAG CG 3'
*mat*K 1129 R	5' CGC TTT AAC CAA TGA TCC AAC CAG 3'
*trn*K 1716 R	5' ATT GCA CAC GGC TTT CCC TAT G 3'

5. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีน *mat*K ของตัวอย่างพืชโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยเตรียมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสดัง**ตารางที่ 4** โดยกำหนดสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสดัง**ตารางที่ 5**

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา (1X)
ddH_2O			35.3 µL
PCR buffer	10X	1X	5 µL
$MgCl_2$	50 mM	2.5 mM	2.5 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1.0 µL
Forward primer	10 µM	0.5 µM	2.5 µL
Reverse primer	10 µM	0.5 µM	2.5 µL
Taq DNA pol	5 U/µL	1 U	0.20 µL
Genomic DNA			1 µL
		รวม	50 µL

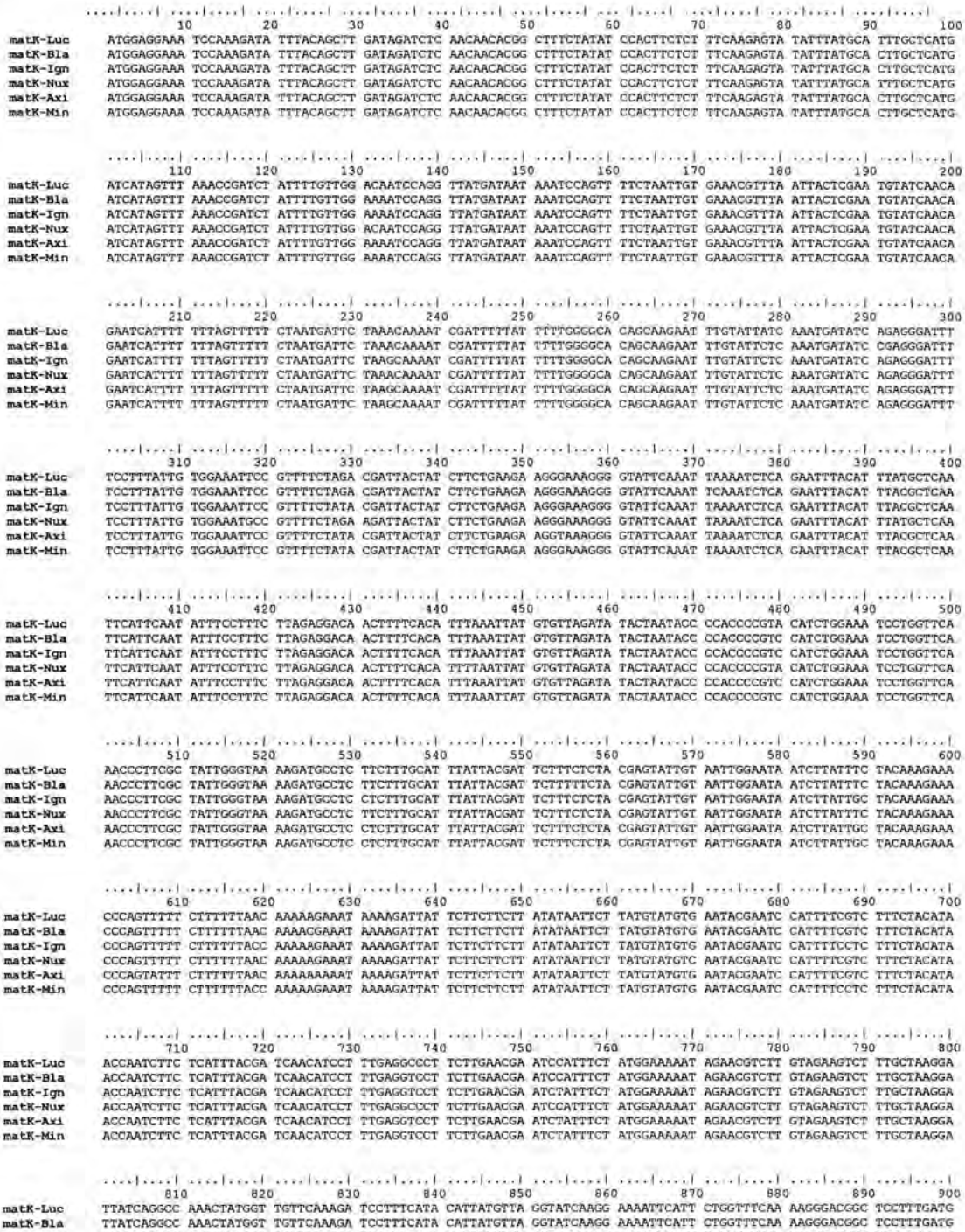
ตารางที่ 5 สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

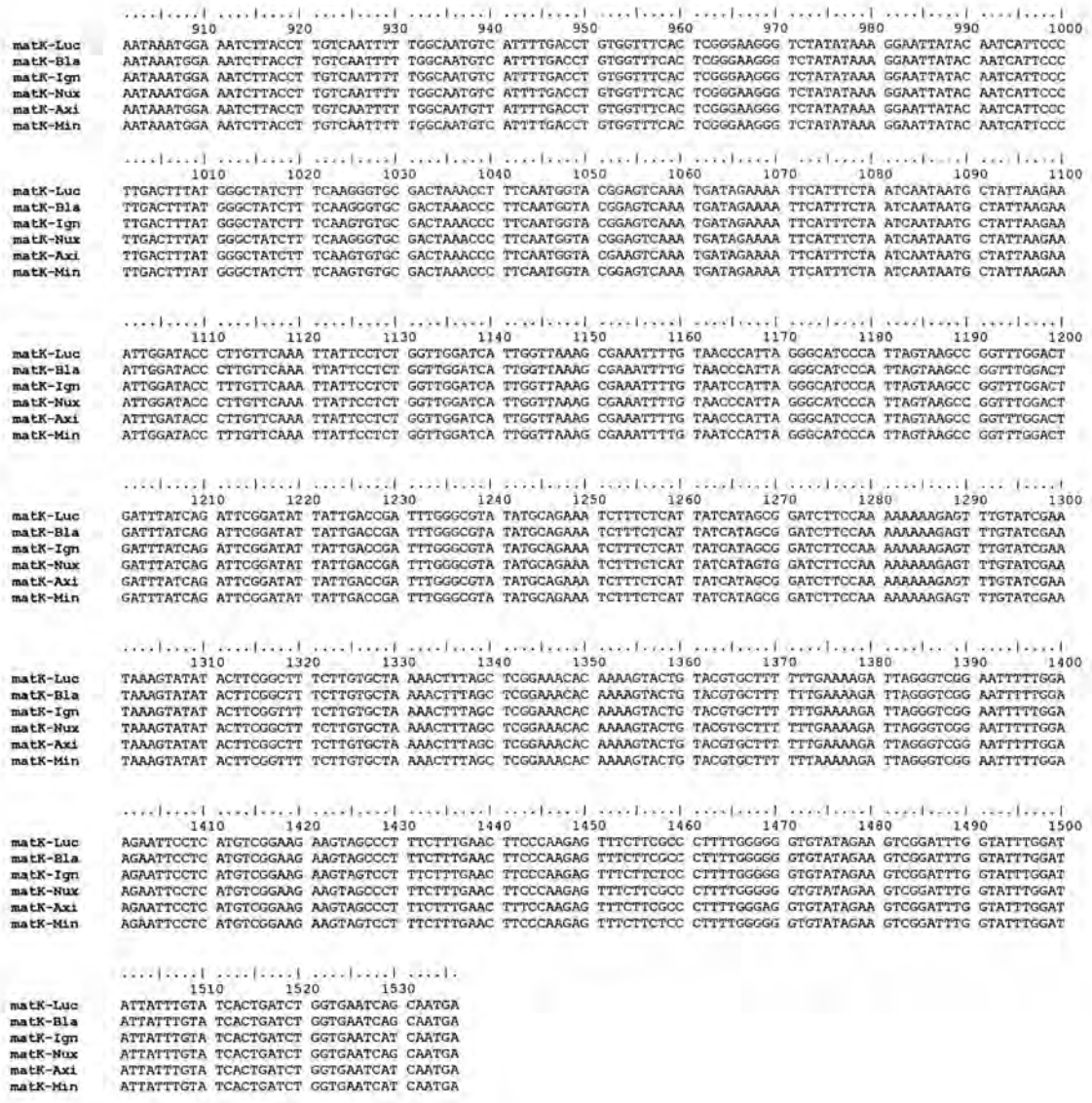
กระบวนการ	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้	
Predenaturation	94	3 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	*รวมทั้งสิ้น*
Annealing	52	45 วินาที	*30 รอบ*
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	
Hold	4	∞	

6. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* และลงทะเบียนฝากข้อมูลชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทยไว้ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank
7. เปรียบเทียบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชในสกุล *Strychnos* เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos*

ผลการศึกษา

การ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K จากการทำ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K พบว่ามี polymorphism ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่าง (ภาพที่ 3)





ภาพที่ 3 Sequence alignment ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos*. Luc: *S. lucida*; Bla: *S. nux-blanda*; Ign: *S. ignatii*; Nux: S. *nux-vomica*; Axi: *S. axillaris*; Min: *S. minor*

Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทยและลงทะเบียนฝากข้อมูลไว้ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank

ตารางที่ 6 Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	แหล่งเก็บ	Accession number
S. axillaris Colebr.	ขวากไก่, เขี้ยวงู	เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี	AB636276
S. ignatii Berg	พญามือเหล็ก	อ่าวลึก จ.กระบี่	AB636277
S. minor Dennst.	ตูมกาแดง	เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี	AB636278
S. lucida R.Br.	พญามูลเหล็ก, พญามือเหล็ก	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ	AB636279
S. nux-vomica Linn.	แสลงใจ, ตูมกาแดง	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ	AB636280
S. nux-blanda A.W.Hill	ตูมกาขาว	อ.ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี	AB636281

สรุปและวิจารณ์ผล

พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของพืชในสกุล *Strychnos* มีความยาวทั้งสิ้น 1,536 นิวคลีโอไทด์เท่ากันในทุกตัวอย่างที่ศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง โดยอาศัยโปรแกรม Bioedit, Seq Scanner และ Multalin พบตำแหน่ง polymorphism ระหว่างตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* นอกจากนี้ยังได้ลงทะเบียนข้อมูลชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทยไว้ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank อีกด้วย

งานวิจัยที่จะดำเนินการในขั้นต่อไป ได้แก่ การเก็บตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ให้เพิ่มขึ้นจากหลายแหล่ง และพัฒนาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ที่ได้ ให้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่เหมาะสมต่อการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์พืชในสกุล *Strychnos* ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. นันทวัน บุณยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร, บรรณาธิการ. 2541. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 2. กรุงเทพฯ : บริษัทประชาชน จำกัด. หน้า 119-120.
2. นันทวัน บุณยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร, บรรณาธิการ. 2543. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 3. กรุงเทพฯ : บริษัทประชาชน จำกัด. หน้า 231-233.
3. เต็ม สมิตินันทน์. 2544. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. กรุงเทพฯ : บริษัทประชาชน จำกัด. 2544. หน้า 502-503.
4. Bavovada R, Chavalittumrong P, Pingsuthiwong C, Sotanaphun U, Sukhakul T, Thongphasuk P. 2000. Chemical and ethnobotanical investigation of Thai *Strychnos* species. The fifth joint seminar natural medicine: 32-35.
5. Han Q-B, Li S-L, Qiao C-F, Song J-Z, Cai Z-W, But PP. 2008. A simple method to identify the unprocessed *Strychnos* seeds used in herbal medicinal products. Planta Med. 74: 458-463.
6. Kress WJ, Erickson DL. 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. Proc Natl Acad Sci USA. 105(8): 2761-2762.
7. Zhang YG, Huang GZ. 1988. Poisoning by toxic plants in China. Report of 19 autopsy cases. Am J Forensic Med Pathol. 9(4): 313-319.
8. Nayar SL. 1954. Poisonous seeds of India. Part II. J Bombay Nat Hist Soc. 52(2/3): 1-18.

รองศาสตราจารย์ ภญ. ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
หัวหน้าโครงการ
5 ตุลาคม 2555

ประวัติผู้วิจัย

ร.ต.อ.หญิง สุชาดา สุขหร่อง

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ร.ต.อ.หญิง สุชาดา สุขหร่อง
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Police Captain Suchada Sukrong
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1206 00099 48 6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail
   หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330
   โทรศัพท์ : 02-218-8364 081-8196742, โทรสาร : 02-218-8357
   Email : suchada.su@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2533
ภ.ม.	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
Ph.D.	PlantPhysiology/ Biochemistry/ Molecular Biology	University of Kentucky, U.S.A.	2547

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   Bioactivity of natural products, Plant tissue culture

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*
   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย -
   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
      1. ศักยภาพการใช้สารสกัดจากเชลล์ต้นกำเนิดในการใช้ประโยชน์ทางยา, มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ, สกอ, ปี 2554-2556

2. การศึกษาพืชสมุนไพรไทยที่สร้างอัลคาลอยด์ต้านมะเร็ง: แคมโททีซิน, ทุนวิจัยทุนวิจัยเซเรบอส Cerebos Award (Thailand) 2008, ปี 2551
3. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I โดยการใช้ยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอน, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2551
4. การชักนำให้เกิดรากขนของผักหลอดดอกขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการย้ายปลูก, โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2551
5. การพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุดิบสมุนไพรโดยใช้ลักษณะทางมหทรรศน์และจุลทรรศน์โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง และการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2551
6. การศึกษาความเสถียรของสีธรรมชาติเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง, โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2550
7. การศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพจากพืชต่อความทนทานภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นในข้าว, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2549-2551

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

1. Wiriyakarun S, Yodpetch W, Komatsu K, Zhu S, Ruangrungsi N, Sukrong S. **2012.** The discrimination of the rejuvenating herbs *Pueraria candollei* (White Kwao Khruea), *Butea superba* (Red Kwao Khruea), and *Mucuna collettii* (Black Kwao Khruea) using PCR-RFLP. J Nat Med. (in press)
2. Sukrong S, Yun KY, Stadler P, Kumar C, Facciuolo T, Moffatt BA, Falcone DL. **2012.** Improved growth and stress tolerance in the *Arabidopsis oxt*1 mutant triggered by altered adenine metabolism. Mol Plant. (in press)

3. Sangmalee S , Laorpaksa A, Sukrong S. **2012.** A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. Journal of Ethnopharmacology. 142(2):432-437.
4. Boonsom T, Waranuch N, Ingkaninan K , Denduangboripant J, Sukrong S. **2012.** Molecular analysis of the genus *Asparagus* based on *mat*K sequences and its application to identify *A. racemosus*, a medicinally phytoestrogenic species. Fitotherapia. 83(5):947-953.
5. Suwanchaikasem P, Chaichantipyut C, Amnuoypol S, Sukrong S. **2012.** Random amplified polymorphic DNA analysis of *Thunbergia laurifolia* Lindl. and its related species. J Med Plant Res. 6(15):2955-2961.
6. Kantha T, Chaiyasut C, Kantachote D, Sukrong S, Muangprom A. **2012.** Synergistic growth of lactic acid bacteria and photosynthetic bacteria for possible use as a bio-fertilizer. African J Microbiol Res. 6(3):504-511.
7. Ya-ut P, Chareonsap P, Sukrong S. **2011.** Micropropagation and hairy root culture of *Ophiorrhiza alata* Craib for camptothecin production. Biotech Letters 33(12):2519-2526.
8. Viraporn V, Yamazaki M, Saito M, Denduangboripant J, Chuanasa T, Sukrong S. **2011.** Correlation of camptothecin-producing ability and phylogenetic relationship in the genus *Ophiorrhiza* (Rubiaceae). Planta Med. 77(7):759-764.
9. Thitikornpong W, Phadungcharoen T, Sukrong S. **2011.** Pharmacognostic evaluations of *Lagerstroemia speciosa* leaves. J of Med Plant Res. 5(8):1330-1337.
10. Kantha T, Chaiyasut C, Kantachote D, Sukrong S, Muangprom A. **2010.** Selection of photosynthetic bacteria producing 5-aminolevulinic acid from soil of organic saline paddy fields from the

Northeast region of Thailand. African J of Microbiol Res. 4(17): 1848-1855.

11. Manissorn, J, Sukrong, S, Ruangrungsi, N, and Mizukami, H. **2010**. Molecular phylogenetic analysis of *Phyllanthus* species in Thailand and the application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for *Phyllanthus amarus* identification. Biol Pharm Bull. 33(10): 1723-1727.
12. Manissorn, J, Ruangrungsi, N, Phadungcharoen, T, and Sukrong, S. **2010**. DNA fingerprinting of selected Thai *Phyllanthus* species by RAPD analysis. J Health Res. 24(2): 73-79.
13. Vongsak B, Kengtong S, Vajrodaya S, Sukrong S. **2008**. Sequencing analysis of the medicinal plant *Stemona tuberosa* and five related species existing in Thailand based on *trn*H-*psb*A chloroplast DNA. Planta Med; 74(14):1764-1766.
14. Nuchuchua O, Chaipompokin W, Maktrirat R, Phummiratch D, Pongsamart S, Sukrong S. **2008**. Characterization of *Durio zibethinus* by molecular marker and soluble polysaccharide in fruit rinds. Acta Horticulturae 786: 107-114.
15. Picheansoonthon C, Chaiyoot A, Sukrong S. **2008**. Jirawongsea, a new genus of the family Zingiberacea. Folia malaysiana. 91(1): 1-16.
16. Nuchuchua O, Pongsamart S, Sukrong S. **2008**. Characterization of *Durio zibethinus* by molecular marker and soluble polysaccharide in fruit rinds. Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants 107-111.
17. Sukrong S, Zhu S, Ruangrungsi N, Phadungcharoen T, Palanuvej C, Komatsu K. **2007**. Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species *Mitragyna speciosa*. Biol Pharm Bull 30(7): 1284-1288.

18. Picheansoonthon C, Lim CK, Sukrong S, Chaiyoot A. **2007**. A new species of Caulokaempferia (Zingiberaceae) from Southern Thailand. Folia Malaysiana 8(2): 53-61.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

1. ศักยภาพการใช้สารสกัดจากเซลล์ต้นกำเนิดในการใช้ประโยชน์ทางยา, มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ, สกอ, ปี 2554-2556 การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 40
2. การพิสูจน์เอกลักษณ์เครื่องยา "รางจืด" โดยใช้ลักษณะทางเภสัชเวทร่วมกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window I) ปี 2552 การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 95
3. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II โดยการใช้ยีสต์, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2552 การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 95