รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมพืช ในการตรวจระบุเอกลักษณ์ของสมุนไพรสกุล *Strychnos* ที่ปนในตำรับยา

THE USE OF GENETICS FOR IDENTIFICATION OF *STRYCHNOS* PLANTS IN HERBAL FORMULATIONS

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร้อยตำรวจเอกหญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมพืช ในการตรวจระบุเอกลักษณ์ของสมุนไพรสกุล *Strychnos* ที่ปนในตำรับยา

THE USE OF GENETICS FOR IDENTIFICATION OF *STRYCHNOS* PLANTS IN HERBAL FORMULATIONS

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

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีและหน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

เลขหมู่
เลขทะเบียน 016482
วัน, เดือน, ปี 24 มี.ค. 58

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* มีประวัติการใช้มานานทั้งในซีกโลกตะวันตกและตะวันออกซึ่งรวมถึงประเทศไทย โดย *Strychnos* แต่ละชนิดมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต่อร่างกายในรูปแบบและความแรงที่แตกต่างกัน ทั้งนี้มีรายงานถึงการใช้สับสนเนื่องจากพืชในสกุล *Strychnos* มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายกันและมีชื่อพ้องเดียวกัน การพิสูจน์เอกลักษณ์จึงมีความจำเป็นเพื่อแยกพืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* ให้ถูกต้องกับการใช้ประโยชน์ ทั้งนี้การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิตซึ่งถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษและไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยต่างๆ เช่น ฤดูกาล ความชื้น แหล่งเพาะปลูก จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* โดยอาศัยดีเอ็นเอมาก่อน ในการศึกษานี้ทำการเก็บตัวอย่างพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบได้ในประเทศไทยจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ขวากไก่ (*Strychnos axillaris* Colebr.), พญามือเหล็ก (*S. ignatii* Berg), ตูมกาแดง (*S. minor* Dennst.), พญามูลเหล็ก (*S. lucida* R.Br.), แสลงใจ (*S. nux-vomica* Linn.) และตูมกาขาว (*S. nux-blanda* A.W.Hill) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมทเค (*matK*) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมทเคของพืชสกุล *Strychnos* มีความยาวทั้งสิ้น 1,536 คู่เบสเท่ากันในทุกตัวอย่างที่ศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบตำแหน่งพอลิมอฟิซึมที่สามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรในสกุลนี้ นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจระบุชนิดของสมุนไพร *Strychnos* ที่อยู่ในรูปสมุนไพรสูตรผสมจำลอง

คำสำคัญ: *Strychnos*, ยีนแมทเค, สตริกนีน, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี, 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. Six *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 has been determined. It was found that *mat*K gene possess 1,536 bp in all studied species. Polymorphisms among the six species have been found. Appropriate molecular marker, PCR-RFLP, can be developed for authentication of the *Strychnos* species. Moreover, authentication of *Strychnos* plants in artificially herbal mixtures by PCR-RFLP was done.

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

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วัตถุประสงค์	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
วิธีดำเนินการวิจัย	4
ผลการวิจัย	5
สรุปและวิจารณ์ผล	14
เอกสารอ้างอิง	15
ประวัติผู้วิจัย	16

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อพ้องของพืชสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทย	2
ตารางที่ 2	ตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่ใช้ในการวิจัย	5
ตารางที่ 3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์	5
ตารางที่ 4	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส	6
ตารางที่ 5	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส	6
ตารางที่ 6	Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่ใช้ในการวิจัย	7

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ชื่อพ้องของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทย	3
ภาพที่ 2	โครงสร้างยีน *mat*K และตำแหน่งไพร์เมอร์	5
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*	8
ภาพที่ 4	ตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I, *Hae*III และ *Dra*I บนลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *mat*K ขนาด 1,536 คู่เบสของพืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* แต่ละชนิด	10
ภาพที่ 5	ผลการบ่ม PCR product A ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยไพรเมอร์ *mat*K 239 F กับ *mat*K 972 R ใส่เอนไซม์ *Xba*I และไม่ใส่เอนไซม์ *Xba*I	12
ภาพที่ 6	ผลการบ่ม PCR product A ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยไพรเมอร์ *mat*K 239 F กับ *mat*K 972 R ใส่เอนไซม์ *Hae*III และไม่ใส่เอนไซม์ *Hae*III	12
ภาพที่ 7	ผลการบ่ม PCR product B ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยไพรเมอร์ *mat*K mat-str 27 F กับ mat-str 1535 R ใส่เอนไซม์ *Dra*I และไม่ใส่เอนไซม์ *Dra*I	13
ภาพที่ 8	ผลการตรวจระบุชนิดของสมุนไพรในรูปสูตรผสมจำลองระหว่าง *S. lucida* กับ *S. ignatii* ในสัดส่วน 1:1	14

การใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมพืช ในการตรวจระบุเอกลักษณ์ของสมุนไพรสกุล Strychnos ที่ปนในตำรับยา

THE USE OF GENETICS FOR IDENTIFICATION OF STRYCHNOS PLANTS IN HERBAL FORMULATIONS

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

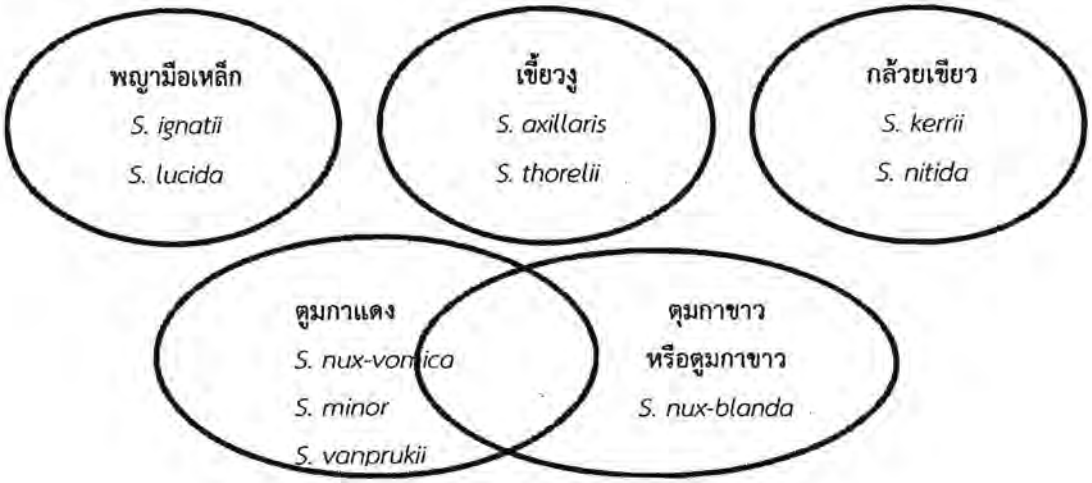
พืชในสกุล *Strychnos* เป็นพืชที่มีการกระจายอยู่ทั่วโลกทั้งในทวีปอเมริกาใต้ อเมริกากลาง แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย (Bavovada, 2000) ที่พบได้ในประเทศไทยมีรายงานทั้งสิ้น 11 ชนิด **(ตารางที่ 1)** (เต็ม สมิตินันทน์, 2544) พืชในสกุล *Strychnos* มีประวัติการใช้มานานทั้งในซีกโลกตะวันตกและตะวันออกรวมทั้งประเทศไทย 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* เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์จึงเป็นที่น่าสนใจเพื่อ

แยกสมุนไพรในสกุลนี้ให้ถูกต้องและเหมาะสมกับการใช้ประโยชน์ เพื่อให้เกิดประสิทธิผลที่ต้องการและเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของสายพันธุ์ที่มีในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงจะทำการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งได้แก่ดีเอ็นเอซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิต (Kress, 2008) เพื่อใช้ช่วยจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของชนิดหรือสายพันธุ์ดังกล่าว โดยจะทำศึกษาการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีนแมทเค (*mat*K gene) ซึ่งเป็นยีนในคลอโรพลาสต์ 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); 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); เสี้ยว-ดูก (ภาคเหนือ)
S. minor Dennst.	ตุมกาขาว, **ตุมกาแดง** (ลำปาง); เถากวางดูถูก (สุราษฎร์ธานี); เถาปลอง (ระนอง); ตูมกาแดง, พญาปล้องทอง
S. nitida G.Don	**สานดีลอก** (เชียงใหม่); กล้วยเขียว
S. nux-blanda A.W.Hill	กล้อวูแซ, กล้ออี, กล้ออี๊ (แม่ฮ่องสอน); ขี้กา (ภาคอีสาน); **ตูมกาขาว** (ภาคกลาง); ปลูเวียต (Khmer); มะติ่งหมาก (ภาคเหนือ)
S. nux-vomica Linn.	โกฐกะกลิ้ง (ภาคกลาง); กระจี้, กะกลิ้ง, ตูมกาแดง, **แสลงใจ** (ภาคกลาง); แสลงทม, แสลงเบื่อ (นครราชสีมา); แสงเบือ (อุบลราชธานี); Snakewood
S. rupicola Pierre ex Dop.	**ขี้กาเครือ** (ปราจีนบุรี)
S. thorelii Pierre ex Dop	เขี้ยวงู (ชุมพร); จองละอา, ชองระอา (จันทบุรี); สะเอ้ง (ตราด)
S. vanprukii Craib	**เถาช้าง** (ภาคเหนือ); ตูมกาแดง



ภาพที่ 1 ชื่อพ้องของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทย

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาพันธุกรรมชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในส่วนคลอโรพลาสต์ของพืชในสกุล *Strychnos* และใช้ประโยชน์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรว่าเป็น *strychnos* ชนิดใดรวมทั้งตรวจพิสูจน์สมุนไพรดังกล่าวที่ผสมในตำรับยาที่จำลองขึ้น อันเป็นการป้องกันการใช้ *Strychnos* แต่ละชนิดแทนที่กันโดยไม่ได้ตั้งใจที่มาจากความสับสนและโดยตั้งใจ จากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจก่อผลต่อผู้ใช้เครื่องยา ทำให้เป็นพิษหรือไม่ได้รับประโยชน์การรักษาจากเครื่องยา เนื่องด้วยในแต่ละชนิดมีสารสำคัญที่ให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ร่วมกับพื้นที่อื่น และใช้ประโยชน์ในการตรวจระบุชนิดของพืชในสกุล *strychnos* และในตำรับยาสูตรผสมจำลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลดีเอ็นเอชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมุนไพรสกุล *Strychnos* เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของสายพันธุ์ที่มีในประเทศไทยและอาจใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริฯ ร่วมกับพื้นที่อื่น นำมาจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งของตัวอย่างพืชและนำตัวอย่างไปเทียบกับตัวอย่างที่หอพรรณไม้เพื่อตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ ระบุชนิดของพืชโดยรองศาสตราจารย์ ดร.รพีพล ภโววาสและรองศาสตราจารย์ธาตรี ผดุงเจริญ
2. สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากส่วนใบของตัวอย่างพืช โดยใช้ชุดสกัด DNeasy® Plant Minikit (Qiagen, Germany) เก็บสารสะลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีน *matK*_ทำการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของพืชในสกุล *Strychnos* ที่เคยมีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank ได้แก่ partial cds *matK* gene ของ *S. lucida* [DQ660545], *S. minor* [DQ660546], *S. nux-vomica* [Z70193] และ *Buddleja alternifolia* [AF531772] เพื่อนำมาใช้ในการออกแบบไพร์เมอร์ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสหรือพีซีอาร์ (PCR) โดยอาศัยโปรแกรม DNA Star® Lasergene 8.0
4. เตรียมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสปริมาตรรวมและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal Cycler (Biorad) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสดังนี้ 1) เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (initial denaturation) 95 องศาเซลเซียส 3 นาที 2) แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation) 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) ไพรเมอร์จับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) 56 องศาเซลเซียส 45 วินาที 4) สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 5) สังเคราะห์สายดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ทำปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 30 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้น
5. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และลงทะเบียนฝากข้อมูลชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชในสกุล *Strychnos* ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank
6. เปรียบเทียบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละชนิดของพืชในสกุล *Strychnos*
7. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ วิเคราะห์จุดตัดด้วยเอนไซม์เพื่อนำมาพัฒนาเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด PCR-RFLP เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรในสกุลนี้
8. ประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-RFLP ในการตรวจระบุชนิดของสมุนไพร Strychnos ที่อยู่ในรูปสมุนไพรสูตรผสมจำลอง

ผลการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชในสกุล Strychnos ที่ใช้ในงานวิจัย

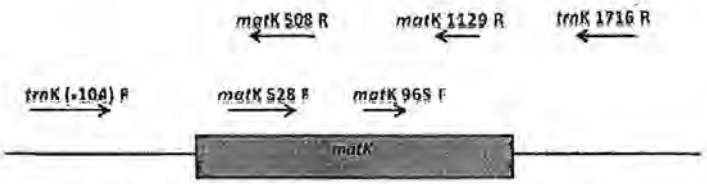
สามารถเก็บตัวอย่างพืชได้ 6 ชนิดจากพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์และพื้นที่อื่น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	สถานที่เก็บ
S. axillaris 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. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีน *matK*

จากการออกแบบไพร์เมอร์โดยอาศัยโปรแกรม DNA Star® Lasergene 8.0 และโปรแกรม Primer Select สามารถออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็น amplifying primers และ/หรือ sequencing primers **(ภาพที่ 2 และตารางที่ 3)**



ภาพที่ 2 โครงสร้างยีน *matK* 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'

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีน *mat*K ของตัวอย่างพืชโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยเตรียมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสดังตารางที่ 4 โดยกำหนดสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสดังตารางที่ 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	*รวม ทั้งสิ้น 30 รอบ*
Annealing	52	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	
Hold	4	∞	

3. ข้อมูลชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของตัวอย่างพืชในสกุล *Strychnos*

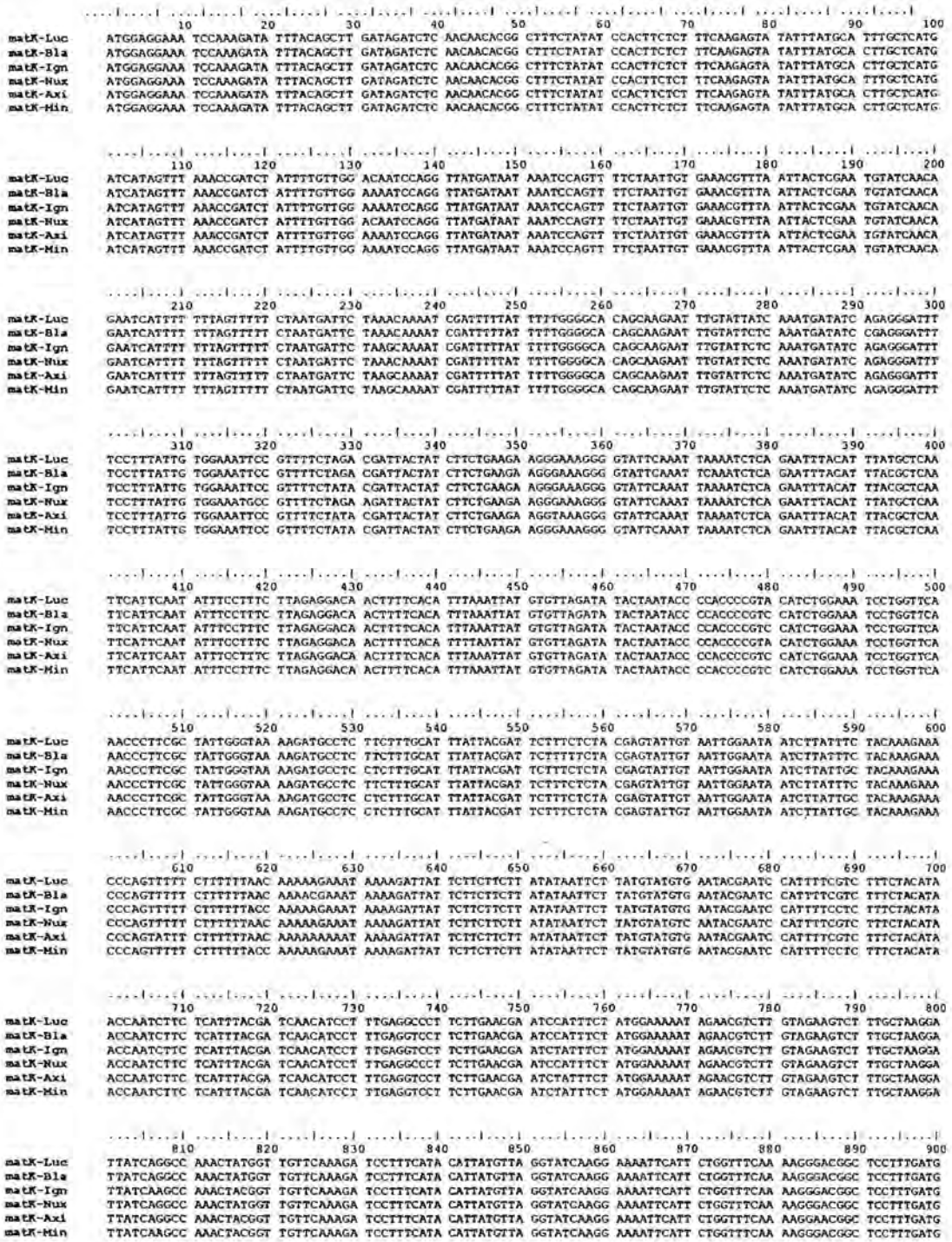
เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *mat*K ของทุกตัวอย่างมีความยาวทั้งสิ้น 1,536 คู่เบสเท่ากัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ alignment ของยีนดังกล่าวพบว่ามี polymorphism ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่าง **(ภาพที่ 3)** ซึ่งเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-RFLP

4. ลงทะเบียนฝากข้อมูลชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทยไว้ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank

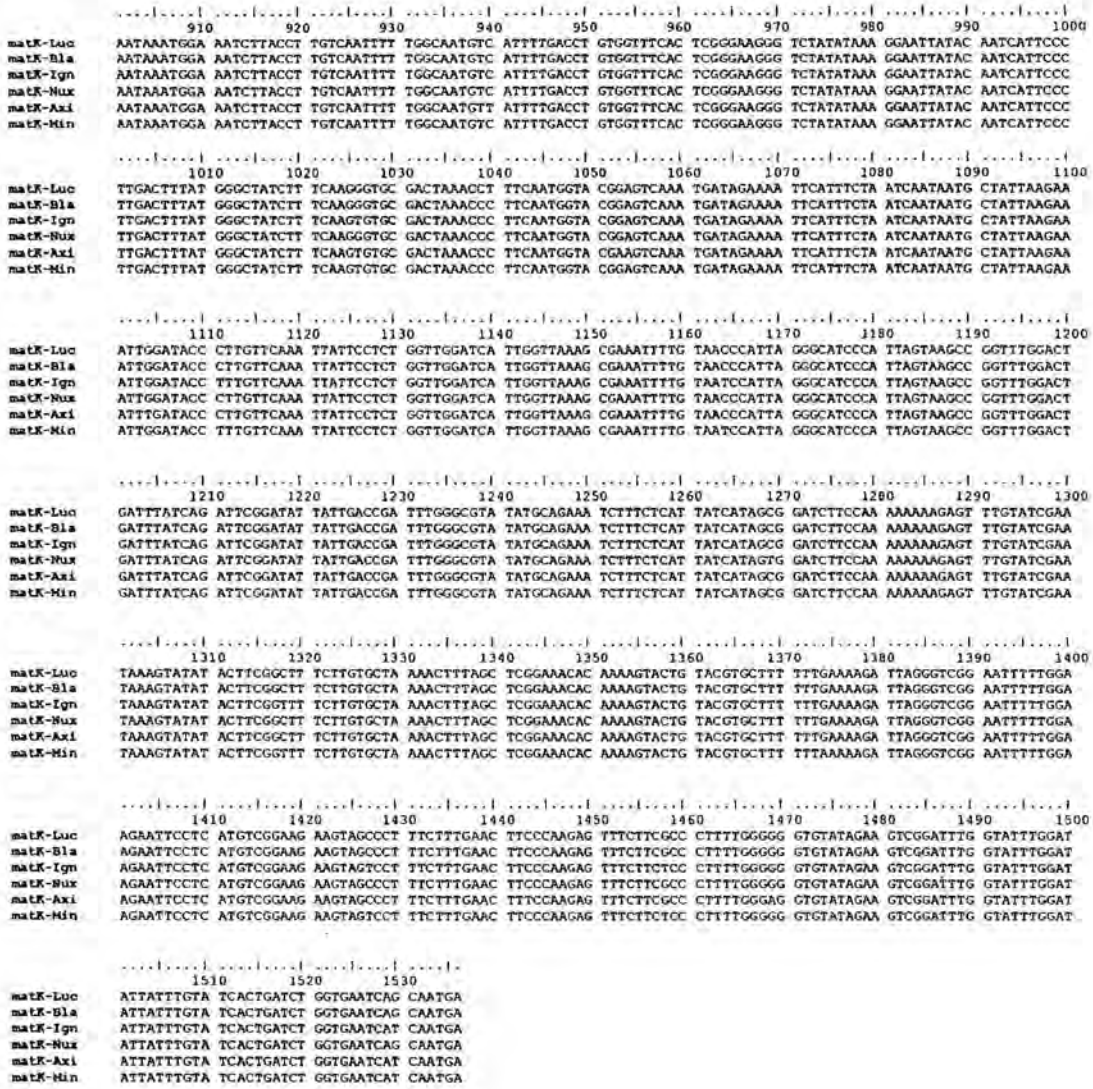
สามารถลงทะเบียนและได้รับ Accession number **(ตารางที่ 6)** ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทยจากฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank

ตารางที่ 6 Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K 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



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*

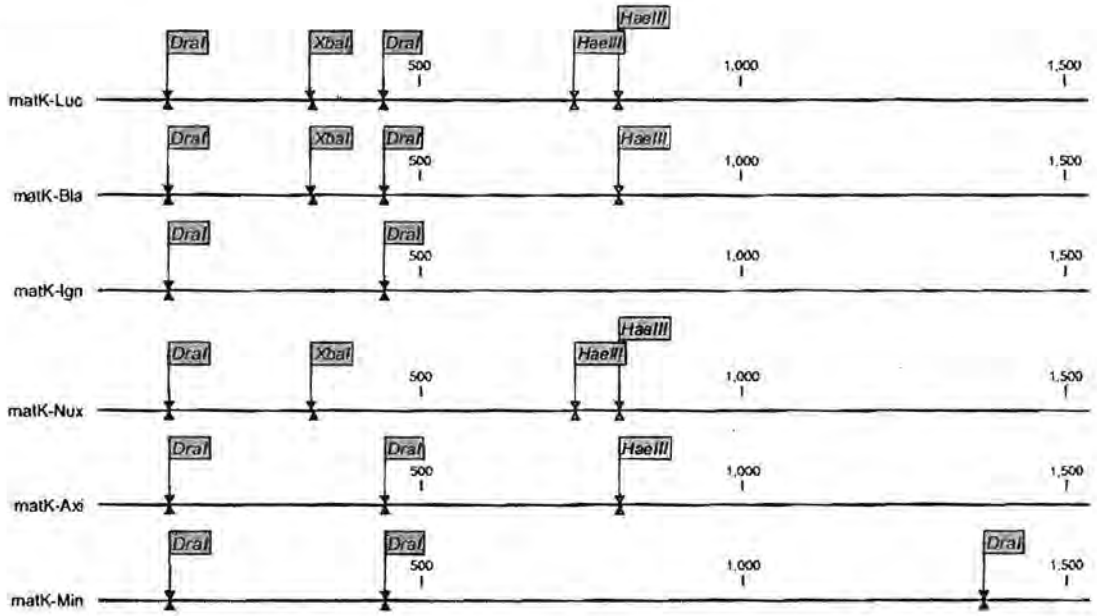


ภาพที่ 3 (ต่อ) Sequence alignment ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos*. Luc: *S. lucida*; Bla: *S. nux-blanda*; Ign: *S. ignatii*; Nux: *S. nux-vomica*; Axi: *S. axillaris*; Min: *S. minor*

5. พัฒนาเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด PCR-RFLP เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรในสกุลนี้

พิจารณาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของพืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ทำให้เกิดจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน ซึ่งนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างพืชแต่ละชนิดในสกุล *Strychnos* ได้

การหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดใช้โปรแกรม CLC DNA Workbench 5.6 และสามารถสร้างแผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดบนยีน *mat*K **(ภาพที่ 4)** ได้ จากการวิจัยพบว่าต้องใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ *Xba*I, *Hae*III และ *Dra*I ในการตัดดีเอ็นเอส่วนยีน *mat*K ให้เกิดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกัน เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างพืชแต่ละชนิดในสกุล *Strychnos*



ภาพที่ 4 ตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I, *Hae*III และ *Dra*I บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ขนาด 1,536 คู่เบสของพืชสมุนไพรในสกุล *Strychnos* แต่ละชนิด, Luc: *Strychnos lucida*; Bla: *S. nux-blanda*; Ign: *S. ignatii*; Nux: *S. nux-vomica*; Axi: *S. axillaris*; Min: *S. minor*, ธงแสดงจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

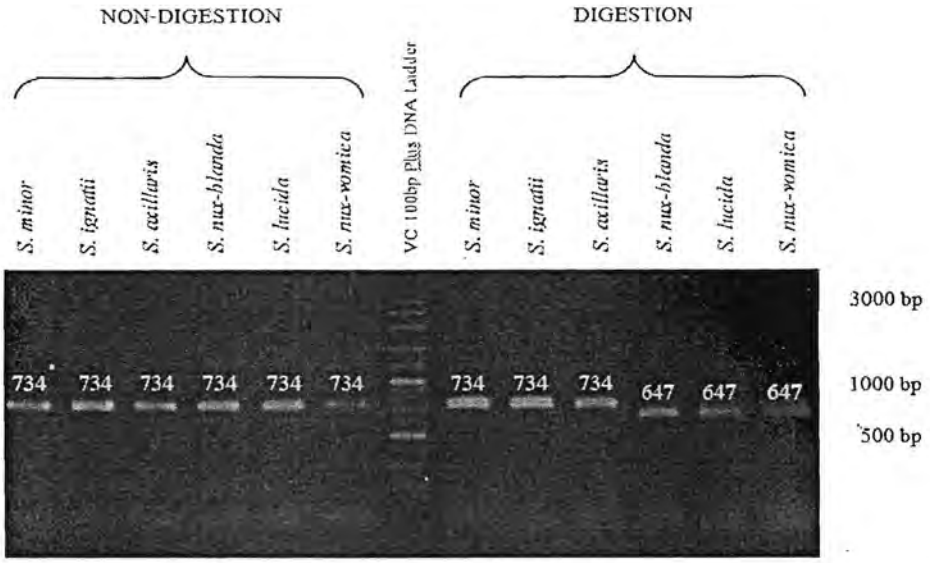
ในการแยกสมุนไพรในสกุล *Strychnos* 6 ชนิดออกจากกันนั้นไม่สามารถจะใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวในการตัดชิ้นดีเอ็นเอ พบว่าต้องใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ *Xba*I, *Hae*III และ *Dra*I **(ภาพที่ 5-7)** โดยจะเริ่มจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ PCR product A และ product B ซึ่งมีขนาดต่างกันให้ได้ก่อน แล้วจึงนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าว

Product A ขนาด 734 bp โดย Product A เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ไพรเมอร์ *mat*K 239 F (5' ATC GAT TTT TAT TTT TGG GGC ACA G 3') กับ *mat*K 972 R (5' GAC CCT TCC CGA GTG AAA CCA C 3')

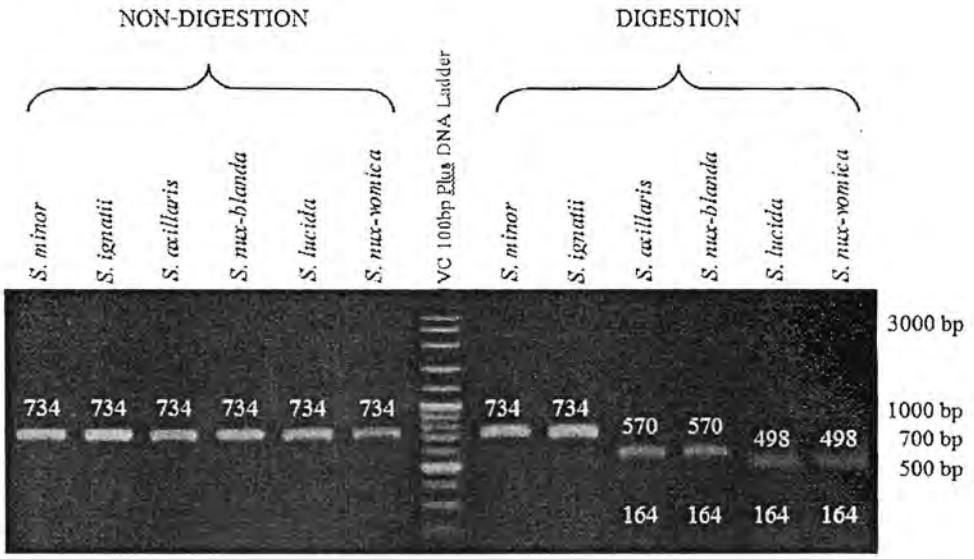
- เมื่อนำ PCR product A มาทำการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I แล้วนำผลที่ได้มาตรวจสอบด้วย gel electrophoresis พบว่าสามารถแบ่ง *strychnos* ทั้ง 6 ชนิด ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ *S. minor*, *S. ignatii* และ *S. axillaris* มีขนาด fragment 734 bp ส่วน กลุ่มที่สองคือ *S. nux-blanda*, *S. lucida* และ *S. nux-vomica* มี 2 fragment คือขนาด 647 bp และ 84 bp **(ภาพที่ 5)**
- เมื่อนำ PCR product A มาทำการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III สามารถจำแนกความแตกต่างภายในกลุ่มได้ โดยกลุ่มแรกสามารถจำแนก *S. axillaris* ออกจาก *S. minor* และ *S. ignatii* โดย *S. axillaris* มี 2 fragment ขนาด 570 และ 167 bp ส่วน *S. minor* และ *S. ignatii* มี 1 fragment คือขนาด 734 bp (ดีเอ็นเอไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III) กลุ่มที่สองสามารถจำแนก *S. nux-blanda* ออกจาก *S. lucida* และ *S. nux-vomica* โดย *S. nux-blanda* มี 2 fragment ขนาด 570 และ 167 bp ส่วน *S. lucida* และ *S. nux-vomica* มี 3 fragment คือขนาด 498, 164 และ 72 bp **(ภาพที่ 6)**

Product B ขนาด 1509 bp โดย Product B เกิดจากเกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ไพรเมอร์ mat-str 27 F (5' GCT TGA TAG ATC TCA ACA ACA CGG 3') กับ mat-str 1535 R (5' CAT TGA TGA TTC ACC AGA TCA GTG 3')

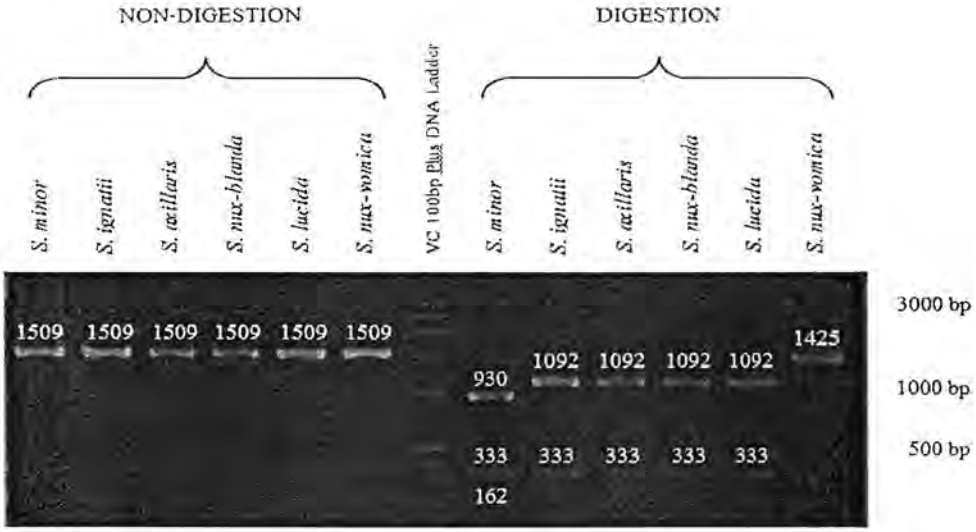
- เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra*I พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างดังนี้ กลุ่มแรกสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง *S. minor* กับ *S. ignatii* โดย *S. minor* มี 4 fragment คือขนาด 930 bp, 333 bp, 162 bp และ 84 bp ส่วน *S. ignatii* มี 3 fragment คือขนาด 1092 bp, 333 bp และ 84 bp กลุ่มที่สองสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง *S. lucida* กับ *S. nux-vomica* โดย *S. lucida* มี 3 fragment คือขนาด 1092 bp, 333 bp และ 84 bp ส่วน *S. nux-vomica* มี 2 fragment คือ ขนาด 1425 bp และ 84 bp (ชิ้นดีเอ็นเอ 84 bp มักมองไม่เห็น) **(ภาพที่ 7)**



ภาพที่ 5 ผลการบ่ม PCR product A ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยไพรเมอร์ *mat*K 239 F กับ *mat*K 972 R ใส่เอนไซม์ *Xba*I และไม่ใส่เอนไซม์ *Xba*I (จากการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.5% ใน 1X TAE buffer ความต่างศักย์ 60 โวลต์



ภาพที่ 6 ผลการบ่ม PCR product A ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยไพรเมอร์ *mat*K 239 F กับ *mat*K 972 R ใส่เอนไซม์ *Hae*III และไม่ใส่เอนไซม์ *Hae*III (จากการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.5% ใน 1X TAE buffer ความต่างศักย์ 60 โวลต์)

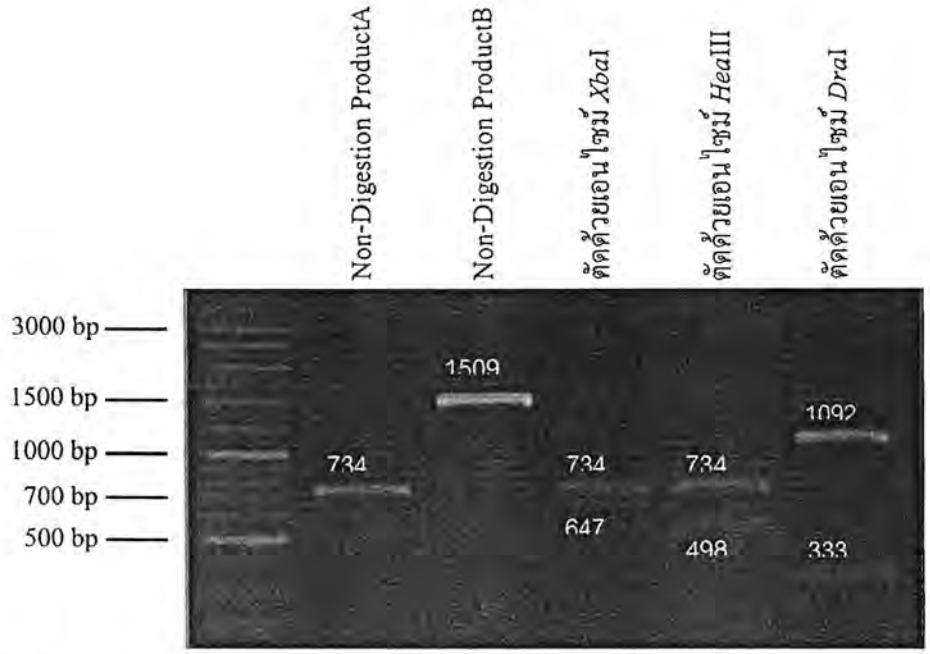


ภาพที่ 7 ผลการบ่ม PCR product B ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยไพรเมอร์ *mat*K mat-str 27 F กับ mat-str 1535 R ใส่เอนไซม์ *Dra*I และไม่ใส่เอนไซม์ *Dra*I (จากการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.5% ใน 1X TAE buffer ความต่างศักย์ 60 โวลต์)

6. ประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-RFLP ในการตรวจระบุชนิดของสมุนไพร *Strychnos* ที่อยู่ในรูปสมุนไพรสูตรผสมจำลอง

มีรายงานถึงการใช้พืชในสกุล *Strychnos* สับสนกัน เช่น *S. lucida* กับ *S. ignatii* แล้วทำให้ผู้ใช้เสียชีวิตเนื่องจากทั้งสองชนิดมีชื่อพ้องเดียวกันคือพญามือเหล็ก จึงได้ทดลองเตรียมสมุนไพรสูตรผสมจำลองขึ้นแล้วนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี มาใช้ในการตรวจระบุชนิดของสมุนไพรสูตรผสมจำลองซึ่งผสมระหว่าง *S. lucida* กับ *S. ignatii* ในสัดส่วน 1:1

จากผลการตรวจระบุชนิดด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี พบว่าสามารถบอกได้ว่าเป็นการผสมกันระหว่างพืชในสกุล Strychnos ชนิดใด โดยวิเคราะห์จากขนาด fragment ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ XbaI ซึ่งมีขนาด 734 และ 647 bp แสดงว่าเป็นการผสมของพืชตัวใดตัวหนึ่งจาก S. minor, S. ignatii และ S. axillaris กับ พืชตัวใดตัวหนึ่งจาก S. nux-blanda, S. lucida และ S. nux-vomica เมื่อพิจารณาขนาด fragment ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ HaeIII มีขนาด 734 และ 498 bp แสดงว่าเป็นการผสมของพืชตัวใดตัวหนึ่งจาก S. minor และ S. ignatii กับพืชตัวใดตัวหนึ่งจาก S. lucida และ S. nux-vomica สุดท้ายพิจารณาร่วมกับขนาด fragment ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ DraI มีขนาด 1092 และ 333 bp จึงสรุปได้ว่าเป็นการผสมกันระหว่าง S. lucida กับ S. ignatii **(ภาพที่ 8)**



ภาพที่ 8 ผลการตรวจระบุชนิดของสมุนไพรในรูปสูตรผสมจำลองระหว่าง *S. lucida* กับ *S. ignatii* ในสัดส่วน 1:1 (ตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.5% ใน 1X TAE buffer ความต่างศักย์ 60โวลต์

สรุปและวิจารณ์ผล

พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* มีความยาวทั้งสิ้น 1,536 นิวคลีโอไทด์เท่ากันในทุกตัวอย่างที่ศึกษาและได้ลงทะเบียนข้อมูลชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชในสกุล *Strychnos* ที่พบในประเทศไทยไว้ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างโดยอาศัยโปรแกรม Bioedit, Seq Scanner และ Multalin พบตำแหน่ง polymorphism ระหว่างตัวอย่างของพืชในสกุล *Strychnos* ซึ่งนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-RFLP เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรในสกุล *Strychnos* แต่ละชนิดได้

จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมพืชในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรและสามารถใช้ตรวจพิสูจน์ในกรณีที่เป็นสมุนไพรผสมของพืชในสกุล *Strychnos* ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

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
18 ตุลาคม 2556

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 รองศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail
   หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330
   โทรศัพท์ : 02-218-8349, 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. ศักยภาพการใช้สารสกัดจากเซลล์ต้นกำเนิดในการใช้ประโยชน์ทางยา, 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

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : *(ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 3 ปี)*

1. Vimolmangkang S, Somkhanngoen C, **Sukrong S. 2013.** Potential pharmaceutical uses of silkworm excreta. Chiang Mai J Sci. (In press)
2. Suwanchaikasem P, Chaichantipyuth C, **Sukrong S. 2013.** Antioxidant-guided isolation of rosmarinic acid, a major constituent from *Thunbergia laurifolia*, and its use as a bioactive marker for standardization. Chiang Mai J Sci. (In press)
3. Suwanchaikasem P, Phadungcharoen T, **Sukrong S. 2013.** Authentication of the Thai medicinal plants known as 'Rang Chuet': *Thunbergia laurifolia, Crotalaria spectabilis*, and *Curcuma* aff. *amada* by combined techniques of TLC, PCR-RFLP fingerprints and antioxidant activities. ScienceAsia. 39(2):124-133.
4. Wiriyakarun S, Yodpetch W, Komatsu K, Zhu S, Ruangrungsi N, **Sukrong S. 2013.** 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. 67(3):562-570.
5. Phoolcharoen W, **Sukrong S. 2013.** Molecular analysis of *Vitex* species using candidate DNA barcoding and PCR-RFLP of the *mat*K gene for authentication of *Vitex glabrata*. Nat Prod Commun. 8(1):125=128.

6. **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. 5(6): 1310-1332.
7. Sangmalee S, Laorpaksa A, **Sukrong S. 2012.** A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. J Ethnopharmacol. 142(2):432-437.
8. Boonsom T, Waranuch N, Ingkaninan K , Denduangboripant J, **Sukrong S. 2012.** Molecular analysis of the genus *Asparagus* based on matK sequences and its application to identify *A. racemosus*, a medicinally phytoestrogenic species. Fitotherapia. 83(5):947-953.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Thitikornpong W, Phadungcharoen T, **Sukrong S. 2011.** Pharmacognostic evaluations of *Lagerstroemia speciosa* leaves. J Med Plant Res. 5(8):1330-1337.

14. 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 Microbiol Res. 4(17): 1848-1855.

15. 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.

16. 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.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยสุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

1. ศักยภาพการใช้สารสกัดจากเซลล์ต้นกำเนิดในการใช้ประโยชน์ทางยา โดยเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยย่อย แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 255-2557 ได้ทำการวิจัยสุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 20