การศึกษาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเร่วใหญ่โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer 1

Botanical Origin of Reoyai Based on the Internal Transcribed Spacer 1 Nucleotide Sequence Data of Nuclear DNA

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

ประสบอร รินทอง*, ภัทรพล เพียรชนะ และ วนิดา ไทรชมภู

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** prasoborn@gmail.com

วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2556;8(3):93-97

Prasob-orn Rinthong*, Pattharapol Pianchana and Wanida Caichompoo

Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai, Maha Sarakham 44150 Thailand

* **Corresponding author:** prasoborn@gmail.com

Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2013;8(3):93-97

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของสมุนไพรเร่วใหญ่โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างที่ใช้ศึกษากับพืชอ้างอิง **วิธีการศึกษา:** สกัดและเพิ่มจำนวนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างเร่วใหญ่จำนวน 10 ตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์ วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มจำนวนได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันของพืชอ้างอิง 4 ชนิด ได้แก่ *Amomum xanthioides*, *Amomum villosum, Alpinia mutica* และ *Alpinia nigra* (Zingiberaceae) ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank บันทึกผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน **ผลการศึกษา:** นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างเร่วใหญ่ที่เพิ่มจำนวนได้ทั้ง 10 ตัวอย่างมีความยาว 184 คู่เบส และมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *A. mutica* มากกว่าพืชชนิดอื่นที่ศึกษา โดยเร่วใหญ่ 4 ตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับพืชชนิด *A. mutica* ในทุกตำแหน่ง ส่วนเร่วใหญ่อีก 6 ตัวอย่างแสดงลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *A. mutica* ที่เกิดการผสมข้ามพันธุ์ **สรุป:** ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 บ่งชี้ว่าเร่วใหญ่ที่ใช้เป็นยาในปัจจุบันมีแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์จากพืชชนิด *A. mutica*

คำสำคัญ: เร่วใหญ่, แหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์, internal transcribed spacer1, ลำดับนิวคลีโอไทด์, การผสมข้ามพันธุ์

Abstract

Objective: To determine the botanical origin of Reoyai by using internal transcribed spacer1 (ITS1) nucleotide sequence of nuclear DNA of plant materials and authenticated plants. **Method:** Ten plant samples were collected. Total DNA and the ITS1 region of nuclear DNA was amplified by PCR. The obtained nucleotide sequences were aligned and were then compared with 4 authenticated plants as *Amomum xanthioides*, *Amomum villosum, Alpinia mutica* and *Alpinia nigra* (Zingiberaceae), retrieving from GenBank. Polymorphic sites were observed. **Results:** The ITS1 region of all samples was 184 base pairs in length. Their ITS1 nucleotide sequences were more similar to *A. mutica* than the other species. Nucleotide sequences of 4 samples were identical with *A. mutica* and sequences of the other 6 samples showed hybrids of *A. mutica*. **Conclusion:** The ITS1 nucleotide sequence of Reoyai samples indicated that their botanical origins were *A. mutica*.

Keywords: Reoyai, botanical origin, internal transcribed spacer1, nucleotide sequence, hybridization

บทนำ

ในประเทศไทยพืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิด เช่น เร่วใหญ่ เร่วน้อย เร่วแดง เร่วดง เร่วหอม เป็นต้น ถูกนำมาใช้เป็นอาหารและเครื่องเทศ นอกจากนี้องค์ความรู้ทางการแพทย์แผนไทยได้นำส่วนผลเร่วใหญ่และเร่วน้อยมาใช้ประโยชน์ทางยา อาจใช้ในรูปสมุนไพรเดี่ยวหรือใช้เร่วทั้งสองชนิดเป็นเครื่องยาพร้อมกันโดยเรียกว่า “เร่วทั้งสอง” มีสรรพคุณช่วยขับลม ขับน้ำนม แก้ปวดท้อง แก้คลื่นไส้อาเจียน ลดไขมันในเลือด ลดความเป็นพิษของสารที่มีพิษต่อตับ[1,2] และเร่วทั้งสองยังถูกจัดอยู่ในพิกัดทศกุลาผล ซึ่งมีสรรพคุณแก้ไข้เพื่อดีและเสมหะ ขับลมในลำไส้ บำรุงธาตุ บำรุงปอด แก้รัตตะปิตตะโรค แก้ลมอัมพฤกษ์ อัมพาต บำรุงกำลัง บำรุงดวงจิตให้แช่มชื่น[3] เครื่องยาเร่วใหญ่มีลักษณะเป็นผลทรงกลมจนถึงทรงรีคล้ายรูปไข่ ผลถูกแบ่งเป็น 3 พูด้วยเยื่อกั้นบาง ๆ เมล็ดเป็นแบบกลุ่ม สีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม แต่ละเมล็ดมีร่องรอยแตก ขณะที่เร่วน้อยมีลักษณะเป็นผลทรงกลมจนถึงทรงรี ผลถูกแบ่งเป็น 3 พู เมล็ดเป็นแบบกลุ่มและสีน้ำตาลเช่นเดียวกับเร่วใหญ่ แต่แตกต่างกันที่เร่วน้อยมักมีขนาดผลที่เล็กกว่าและเมล็ดไม่มีร่องรอยแตก

แม้ว่าในประเทศไทยจะมีประวัติการใช้ประโยชน์ทางยาจากเครื่องยาเร่วใหญ่และเร่วน้อยมาเป็นเวลานาน แต่การศึกษาเกี่ยวกับแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยาทั้งสองชนิดกลับพบไม่มากนัก ในปีพ.ศ. 2547 รุจิลักขณ์ รัตตรมณ์ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้จากเร่วน้อย และพบว่าเครื่องยาเร่วน้อยได้จากส่วนผลของพืชชนิด *Amomum uliginosum* K.D. Koenig[4] ส่วนเครื่องยาเร่วใหญ่นั้น ผลการทบทวนเอกสารงานวิจัยพบว่าการรายงานแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ยังระบุไม่ตรงกัน ข้อมูลบางแหล่งที่มาระบุว่าเครื่องยาเร่วใหญ่ได้จากส่วนผลของพืชชนิด *Amomum xanthioides* Wall.[2,3] (ซึ่งมีชื่อพ้องคือ *Amomum villosum* Lour. var. *xanthioides* (Aall.ex Baker) T.L. Wu&S.chen) บางแหล่งข้อมูลใช้คำเรียกโดยรวมว่า “เร่ว” และมีแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์จากพืชต่างชนิดกัน ได้แก่ *A. xanthioides*[1] และ *Amomum villosum*[5]

ในปีพ.ศ. 2551 สมศักดิ์ นวลแก้ว และคณะ ได้ศึกษาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเร่วใหญ่เพื่อจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานสมุนไพร โดยเก็บตัวอย่างเครื่องยาเร่วใหญ่จากร้านขายสมุนไพรในภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศ และเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรโดยการสอบถามถึงแหล่งผลิตจากพ่อค้าคนกลางที่นำสมุนไพรมาจำหน่ายให้ร้านขายสมุนไพรและติดตามเก็บตัวอย่างพืชจากแหล่งดังกล่าว ผลการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ลักษณะเนื้อเยื่อของผงยา รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเครื่องยาเร่วใหญ่และตัวอย่างพืชสมุนไพร พบว่าเครื่องยาเร่วใหญ่น่าจะได้จากส่วนผลของพืชชนิดใดชนิดหนึ่งระหว่าง *Alpinia mutica* Roxb. และ *Alpinia nigra* (Gaertn.) Burtt[6] อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดถึงชนิดพืชซึ่งเป็นแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยาเร่วใหญ่ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการกำหนดมาตรฐานสมุนไพรตลอดจนขั้นตอนการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์

โดยทั่วไปการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรและเครื่องยาชนิดต่าง ๆ สามารถอ้างอิงได้จากข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ องค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญรวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมพืช[7] ในกรณีที่พืชสมุนไพรหรือเครื่องยามีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกันมาก หรือองค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญมีความซับซ้อนและอาจได้รับผลกระทบจากปัจจัยสภาวะการเพาะปลูก กระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวและวิธีการเก็บรักษาสมุนไพร การศึกษาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์โดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสารสำคัญที่มีในพืชอาจให้ข้อสรุปที่คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ จึงมีการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมพืชโดยอาศัยเทคนิควิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งของยีนหรือดีเอ็นเอ (direct sequencing technique) เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร เช่น โสม (*Panax notoginseng*)[8] มาฮวง (พืชสกุล *Ephedra*) [9] หนาวหนอนร้อนหญ้า (ราสกุล *Cordyceps*)[10] เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้ตัวอย่างพืชปริมาณน้อยและมีความถูกต้อง แม่นยำสูง[11] ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer1 (ITS1) (รูปที่ 1) ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S และ 5.8S เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีรายงานการใช้พิสูจน์ความแตกต่างระหว่างเครื่องยาที่ได้จากพืชสกุล *Alpinia* และ *Amomum*[12]

รูปที่ 1 นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S และ 5.8S

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเร่วใหญ่ โดยวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของเร่วใหญ่ทั้งที่อยู่ในรูปเครื่องยาและพืชสมุนไพร เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันของพืชที่มีรายงานการเป็นแหล่งที่มาของเครื่องยาเร่วใหญ่จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *A. xanthioides*, *A. villosum, A. mutica* และ *A. nigra* เพื่อหาข้อสรุปถึงชนิดพืชที่เป็นแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของสมุนไพรเร่วใหญ่ที่มีการใช้ประโยชน์ทางยาในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างเครื่องยาเร่วใหญ่ที่ใช้ในการศึกษานี้เก็บตัวอย่างจากร้านขายยาสมุนไพรและจากแหล่งผลิตเครื่องยาในประเทศไทย จำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างพืชสมุนไพรเก็บตัวอย่างจากแหล่งเพาะปลูกจำนวน 6 ตัวอย่าง (ตารางที่1) ตัวอย่างที่ศึกษาถูกบรรจุในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทและทำให้แห้งโดยใช้ซิลิกาเจล เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะมีการใช้งาน เครื่องยาและตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่ใช้ในการศึกษานี้เก็บรักษาที่หน่วยวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ตารางที่ 1 ชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ที่	รหัส	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่มา	Herbarium voucher No.
1	RY01	เครื่องยา	ร้านขายสมุนไพรแห่งที่ 1 กทม	MSU.PH-Reoyai-R4
2	RY02		ร้านขายสมุนไพรแห่งที่ 2 กทม	MSU.PH-Reoyai-R5
3	RY03		ต.ป่าพะยอม อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง	MSU.PH-Reoyai-R8
4	RY04		ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พัทลุง	MSU.PH-Reoyai-R9
5	RY05*	พืชสมุนไพร	มลฑลยูนนาน ประเทศจีน	MSU.PH-ZIN-A4
6	RY06		ต.บุ่งคล้า อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร	MSU.PH-ZIN-A5
7	RY07		ต.บุ่งคล้า อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร	MSU.PH-ZIN-A6
8	RY08		ต.บุ่งคล้า อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร	MSU.PH-ZIN-A7
9	RY09		ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พัทลุง	MSU.PH-ZIN-A8
10	RY10		ต.ควนมะพร้าว อ.เมือง จ.พัทลุง	MSU.PH-ZIN-A3

* พิสูจน์เอกลักษณ์โดยอ้างอิงจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ว่าเป็นพืชชนิด *A. mutica* โดย Prof.Xia Yougmei จาก Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Menglun มลฑลยูนนาน ประเทศจีน

การสกัดและวิเคราะห์คุณภาพจีโนมิคดีเอ็นเอ

ทั้งตัวอย่างเครื่องยาและตัวอย่างพืชสมุนไพร ถูกบดเป็นผงให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวและโกร่งและลูกโกร่ง นำผงของแต่ละตัวอย่างพืชน้ำหนักประมาณ 50 กรัม มาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini kit (QiaGen®, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน) เก็บรักษาจีโนมิคดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะมีการใช้งาน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ไพรเมอร์

ไพรเมอร์คู่ที่ใช้เพิ่มจำนวนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 นั้น Forward primer ถูกออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับตำแหน่งขนาบข้างปลาย 3′ ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5′-GGA AGT AAA AGT CGT

AAC AAG G-3′ และ Reverse primer ถูกออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับตำแหน่งขนาบข้างปลาย 5′ ของ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 5.8S โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5′-GAC TCG ATG GTT CAC GGG ATT-3′

ส่วนประกอบสำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและสภาวะของเทคนิคพีซีอาร์

จีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้จะถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ประกอบด้วย 10× PCR buffer 3 ไมโครลิตร dNTP 0.15 มิลลิโมล สารละลายจีโนมิคดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง 2 ไมโครลิตร 0.20 มิลลิโมลของไพรเมอร์แต่ละชนิดและเอนไซม์พอลิเมอเรส 1 หน่วย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบภายใต้สภาวะดังนี้ pre-cycling 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, denaturation 95 องศาเซลเซียสนาน 50 วินาที, annealing 55 องศาเซลเซียสนาน 30 วินาที, elongation 72 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที และ final elongation 72 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตของเทคนิคพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส เก็บรักษาผลผลิตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของเทคนิคพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้

ผลผลิตของเทคนิคพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้ทั้งหมดจะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทวาร์ดเมดิก กรุงเทพมหานคร โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งผลผลิตในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับด้วยใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันกับที่ใช้ในขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกนำมาจัดเรียงด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Bioedit และกำหนดขอบเขตลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันของพืชในสกุล *Amomum* และ *Alpinia* ชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้จากฐานข้อมูล GenBank เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างที่ศึกษากับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันของพืชชนิด *A. xanthioides*, *A. villosum, A. mutica* และ *A. nigra* ได้จากฐานข้อมูล GenBank

ผลการศึกษา

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างเร่วใหญ่ที่ศึกษาจำนวนทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างมีความยาว 184 คู่เบส จากข้อมูลดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างเร่วใหญ่ได้เป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 2) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างรหัส RY01 RY02 RY04 และ RY05 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างรหัส RY03 RY06 RY09 และ RY10 ตัวอย่างเร่วใหญ่ในกลุ่มนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกลุ่มที่ 1 ทุกตำแหน่ง ยกเว้นนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 160 นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ยังแสดงลักษณะนิวคลีโอไทด์ 2 ชนิดในตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งเรียกว่า nucleotide additive[13] จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21 และ 45 พบนิวคลีโอไทด์ C และ T ซึ่งแทนด้วย Y ตามหลักการของ IUPAC code และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 87 พบนิวคลีโอไทด์ G และ T ซึ่งแทนด้วย K ส่วนกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่างรหัส RY07 และ RY08 มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากกลุ่มที่ 1 ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 21 45 และ 160 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างที่ศึกษากับพืชชนิด *A. vilosum, A. xantiodes, A. nigra* และ *A. mutica*

ตัวอย่างที่ศึกษา	กลุ่ม	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์																																				ขนาด (คู่เบส)
		1	2	3	9-10	12-14	18-19	21	27-28	31	35	43-45	48	52	54-56	71-72	74-76	78-80	82-84	87	90	100	141	145-146	149-150	156	158	160	164	167-168	172	174-175	178-179	181-184						
RY01 02 04 05	กลุ่มที่ 1	T	T	-	AG	ATT	CG	C	GC	T	T	CGC	C	C	CGC	CA	TTG	TTG	TCG	G	C	T	C	GC	--	G	C	G	*	GG	T	CC	-A	ATCA						184
RY06		*	*	-	**	***	**	*	**	*	*	**Y	*	*	***	**	***	***	***	*	*	*	*	*	--	*	*	A	*	*	*	**	**	****						184
RY03	กลุ่มที่ 2	*	*	-	**	***	**	Y	**	*	*	**Y	*	*	***	**	***	***	***	*	*	*	*	*	--	*	*	A	*	*	*	**	**	****						184
RY09 10		*	*	-	**	***	**	*	**	*	*	***	*	*	***	**	***	***	***	K	*	*	*	*	--	*	*	*	*	*	*	**	**	****						184
RY07 08	กลุ่มที่ 3	*	*	-	**	***	**	T	**	*	*	**T	*	*	***	**	***	***	***	*	*	*	*	*	--	*	*	A	*	*	*	**	**	****						184
A. vilosum		G	*	-	--	*C*	*A	T	AT	*	C	*AT	*	*	ACT	TG	CC*	C**	C*A	*	*	G	T	*C	--	C	*	C	G	A*	C	G-	GG	***G						183
A. xanthiodes		G	*	C	**	G**	*A	*	*T	*	*	T*T	*	*	*CT	*G	C**	C*T	C*C	*	G	G	G	T*	CT	C	T	T	*	A*	*	A-	GG	T*TG						188
A. nigra		*	C	-	**	**C	T*	T	AT	C	C	*CT	T	T	*CT	TG	GCA	T*G	***	*	*	G	*	AT	--	C	*	A	*	*A	*	**	AG	****						185
A. mutica		*	*	-	**	***	**	*	**	*	*	***	*	*	***	**	***	***	***	*	*	*	*	*	--	*	*	*	*	*	*	**	**	****						184

หมายเหตุ

กำหนดให้ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นนับจากตำแหน่งที่ 1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 แสดงนิวคลีโอไทด์โดยใช้สัญลักษณ์ตาม IUPAC code โดย Y แทน C และ T K แทน G และ T

* แทนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างรหัส RY01 RY02 RY04 RY05

\- แทนนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ปรากฏในตำแหน่งนั้น

ส่วนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของพืช 4 ชนิดที่มีรายงานการเป็นแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยาเร่วใหญ่ ได้แก่ *A. villosum* (accession number AF478724), *A. xanthioides* (FJ980311), *A. nigra* (AF192729) และ *A. mutica* (AY742365) พบว่ามีความยาวเท่ากับ 183 188 185 และ184 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชทั้ง 4 ชนิด พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันจำนวน 57 ตำแหน่ง ผลการเปรียบเทียบขนาดและลำดับ นิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างเร่วใหญ่กับพืชทั้ง 4 ชนิด พบว่าตัวอย่างเร่วใหญ่ในการศึกษานี้มีขนาดของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 เท่ากับ *A. mutica* และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับ *A. mutica* มากกว่าพืชชนิดอื่น โดยตัวอย่างกลุ่มที่ 1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *A. mutica* ทุกตำแหน่ง ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก *A. mutica* จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 21 45 87 และ 160 ตามลำดับ โดยนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 21 45 และ 87 เป็นตำแหน่งที่แสดงผลแบบ nucleotide additive

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างเร่วใหญ่ในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับพืชที่คาดว่าเป็นแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ บ่งชี้ว่าเครื่องยาเร่วใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาทั้งตัวอย่างที่อยู่ในรูปเครื่องยาและพืชสมุนไพรมีแหล่งที่มาจากส่วนผลของพืชชนิด *A. mutica* ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่รายงานว่าเครื่องยาเร่วใหญ่น่าจะได้จากพืชชนิดใดชนิดหนึ่งระหว่าง *A. mutica* และ *A. nigra*[6] เมื่อศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 เพิ่มเติม พบว่าจากตัวอย่างเร่วใหญ่ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา สามารถเพิ่มจำนวนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างรหัส RY05 RY06 RY07 RY08 RY09 และ RY10 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อยู่ในรูปพืชสมุนไพรเท่านั้น ตัวอย่างที่เป็นเครื่องยาไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากดีเอ็นเอของพืชถูกทำลายในระหว่างขั้นตอนการเก็บเกี่ยวหรือกระบวนการเก็บรักษาเครื่องยา ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ของพืชสมุนไพรทุกตัวอย่างแสดงผลไปในแนวทางเดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 กล่าวคือ พืชสมุนไพรเร่วใหญ่ในการศึกษานี้มีแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์จาก *A. mutica* และผลการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของเครื่องยาเร่วใหญ่ในการศึกษานี้ พบว่าเครื่องยาเร่วใหญ่ทุกตัวอย่างมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน คือ ผลเป็นทรงกลมถูกแบ่งเป็น 3 พู ด้วยเยื่อกั้นบาง ๆ และเมล็ดมีจำนวนมาก เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม แตกต่างกันเพียงขนาดของผล สอดคล้องกับผลการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ที่แสดงถึงแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยาที่มาจากส่วนผลของพืชชนิดเดียวกัน

นอกจากนี้ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ที่ได้จากการศึกษายังปรากฏผลแบบ nucleotide additive ซึ่งแสดงถึงสภาวะแนวโน้มการผสมข้ามพันธุ์ (hybridization)[14,15] ระหว่าง *A. mutica* กับพืชต่างชนิดอีกด้วย เนื่องจากข้อมูลพันธุกรรมของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอเป็นข้อมูลผลรวมของการถ่ายทอดพันธุกรรมของต้นพ่อและต้นแม่ ดังนั้นลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ nucleotide additive ในตัวอย่างเร่วใหญ่กลุ่มที่ 2 จึงเกิดจากข้อมูลพันธุกรรมที่เป็นผลรวมระหว่างพืชชนิด ก ซึ่งทำหน้าที่ต้นพ่อและพืชชนิด ข ซึ่งเป็นต้นแม่ ส่วนตัวอย่างเร่วใหญ่ในกลุ่มที่ 3 แม้ว่าไม่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ nucleotide additive แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกลุ่มนี้แสดงถึงข้อมูลพันธุกรรมของพืชชนิดอื่นที่ผสมพันธุ์กับ *A. mutica* เด่นชัดขึ้น เห็นได้จากนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 21 และ 45 ที่แสดงผลเป็น T ขณะที่นิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งเดียวกันของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 แสดงผลเป็น Y (นิวคลีโอไทด์ C และ T) จากผลการศึกษาตัวอย่างเร่วใหญ่จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งมีที่มาจากภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย พบว่าเครื่องยาเร่วใหญ่จำนวน 4 ตัวอย่าง (กลุ่มที่ 1) คือส่วนผลของพืชชนิด *A. mutica* ที่ไม่มีการผสมพันธุ์กับพืชชนิดอื่น ขณะที่เร่วใหญ่อีก 6 ตัวอย่าง (กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3) มีการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง *A. mutica* กับพืชชนิดอื่น ซึ่งอาจมีความแตกต่างจาก *A. mutica* ตั้งแต่ในระดับสายพันธุ์ (cultivars) จนถึงความแตกต่างระดับชนิด (species) ต้องอาศัยการศึกษาข้อมูลจากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอเพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม พบรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่แสดงผลแบบ nucleotide additive ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์เช่นเดียวกันนี้ในพืชวงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ พืชสกุล *Alpinia*[16] และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*)[17]

สรุปผลการศึกษา

การระบุแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างเร่วใหญ่ในการศึกษานี้ได้จากการเก็บตัวอย่างเครื่องยาที่มีการจำหน่ายในร้านขายยาแผนโบราณ ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และ ITS2 ของตัวอย่างเร่วใหญ่บ่งชี้ว่าแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยาเร่วใหญ่ที่ใช้เป็นยาในปัจจุบันได้จากส่วนผลของพืชชนิด *A. mutica* และจากผลการศึกษายังพบว่าการค้นหาแหล่งที่มาหรือพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรโดยอ้างอิงจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอเพื่อยังมีข้อเหนือกว่าการอ้างอิงโดยใช้ข้อมูลชนิดอื่น เช่น ลักษณะทางกายภาพของสมุนไพรหรือสารสำคัญที่มีในพืช กล่าวคือ สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรได้ทั้งตัวอย่างพืชที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์และตัวอย่างพืชที่มีการผสมข้ามพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

บางส่วนของงานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ปีงบประมาณ 2553 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และตัวอย่างรหัส RY05 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Yong-Mei Xia, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, มณฑลยูนนาน ประเทศจีน

เอกสารอ้างอิง

1. ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพมหานคร. เจริญการพิมพ์, 2551: น. 258–259.
2. วุฒิวุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพรรวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพมหานคร. โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์, 2540: น. 393.
3. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. เร่ว. (สืบค้นข้อมูลวันที่ 11 ธันวาคม 2554, ที่ http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=117)
4. รุจิลักขณ์ รัตตรมณ์. ลักษณะทางเภสัชเวทและองค์ประกอบทางเคมีของผลเร่ว. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพมหานคร. บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.
5. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. กรุงเทพมหานคร. สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, 2544: น. 30.
6. สมศักดิ์ นวลแก้ว และคณะ. โครงการจัดทำมาตรฐานสมุนไพรเร่วน้อยเร่วใหญ่เพื่อบรรจุในตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย (รายงานฉบับสมบูรณ์). มหาสารคาม. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 2551.
7. สุชาดา สุขหร่อง. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร. ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.
8. Zhang Y, Zhang JC, Huang MH, Yang MS, Cao H. Detection of genetic homogeneity of *Panax notoginseng* cultivars by sequencing nuclear 18S rRNA and plastid *mat*K gene. *Planta Med* 2007;72:860-862.
9. Kakiuchi N, Nakajima I, Kurita Y, Long C, Cai S, Mikage M. Studies on cultivated *Ephedra* plants in inner Mongolia autonomous region and Ningxia autonomous region. *Biol Pharm Bull* 2006;29: 746-749.
10. Yue-Qin C, Nung W, Hui Z, Liang-Hu Q. Differentiation of medicinal *Cordyceps* species by rDNA ITS sequence analysis. *Planta Med* 2002;68:635-639.
11. Shaw P, Wang J, But P. Authentication of Chinese medicinal materials by DNA technology. Hong Kong. World Scientific, 2002: pp.1-23.
12. Qiao CF, Han QB, Zhao ZL, Wang ZT, Xu LS, Xu HX. Sequence analysis based on ITS1 region of nuclear ribosomal DNA of *Amomum villosum* and ten species of *Alpinia*. *J Food Drug Anal* 2009;17: 142-145.
13. Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Documentation of reticulate evolution in peonies (Paeonia) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6813-6817.
14. Zhang JL, Zhang CQ, Gao LM, Yang JB, Li HT. Natural hybridization origin of *Rhododendron agastum* (Ericaceae) in Yunnan, China: inferred from morphological and molecular evidence. *J Plant Res* 2007;120:457-463.
15. Rinthong P, Zhu S, Komatsu K, Chanama S, De-Eknamkul W. Genetic variation of *Croton stellatopilosus* Ohba based on non-coding DNA sequences of ITS, *trn*K and *trn*L-F regions. *J Nat Med* 2011;65: 641-645.
16. Liu SC, Lu CT, Wang JC. Reticulate hybridization of *Alpinia* (Zingiberaceae) in Taiwan. *J Plant Res* 2009;122: 305-316.
17. Hayakawa H, Minaniya Y, Ito K, Yamamoto Y, Fukuda T. Difference of Curcumin Content in *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) Caused by Hybridization with Other Curcuma Species. *Am J Plant Sci* 2011;2: 111-119.

Editorial note
Manuscript received in original form on March 10, 2013;
accepted in final form on November 10, 2013