

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *rbcl* ของสมุนไพรจันทน์เทศ (*Myristica fragans* Houtt.) Partial Nucleotide Sequencing of *rbcl* Gene of Nutmeg Herb (*Myristica fragans* Houtt.)

ชวัลรัตน์ สมนึก^{1*} และพิสุทธิ การบุญ²
Chawanrat Somnuek^{1*} and Phisut Kanboon²

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี 22000

² คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี 22000

¹Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000. Thailand

²Faculty of Humanities and Social Science, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000. Thailand

* Corresponding author, e-mail: chawanrat.s@rbru.ac.th

(Received: Jan 16, 2020; Revised: Mar 10, 2020; Accepted: Jun 5, 2020)

บทคัดย่อ

จันทน์เทศ (*Myristica fragans* Houtt.) เป็นสมุนไพรที่เจริญได้ดีในพื้นที่เขตร้อนชื้น โดยเฉพาะภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ต้นจันทน์เทศเกือบทุกส่วนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ไม่แต่ใช้ในครัวเรือน เช่น เป็นเครื่องเทศ (spice) สารปรุงแต่งกลิ่นรส แต่ยังใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อีกด้วย แต่การศึกษาเกี่ยวกับจันทน์เทศยังมีข้อมูลทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำตัวอย่างจันทน์เทศมาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่วิเคราะห์ได้จำนวน 932 คู่เบส มีความคล้ายคลึงกับพืชใบเลี้ยงคู่ในวงศ์จันทน์เทศ (Myristicaceae) โดยมีจำนวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับต้นเลื้อยควาย (*Knema* sp.) (Accession number AB586432.1 และ AB586431.1) และต้นจันทน์เทศ (*Myristica fragans*) (Accession number AY298839.1) สูงที่สุด แสดงให้เห็นว่ายีน *rbcl* สามารถใช้เป็นตำแหน่งในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจันทน์เทศได้

คำสำคัญ : ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยีน *rbcl* สมุนไพร จันทน์เทศ

Abstract

Nutmeg (*Myristica fragans* Houtt.) is an herb, which is widely grown in tropical rain forests, especially in the eastern and the southern parts of Thailand. Almost every part of nutmeg could be utilized not only in the household as a culinary spice, flavoring agent but medical benefits as well. However, the study of nutmeg genetic information has been insufficient. Therefore, the nutmeg samples were used to investigate the nucleotide sequence of the *rbcl* gene in this research. The results revealed that the 932 bp of the amplified *rbcl* gene showed similarity with the dicotyledons in the nutmeg family (Myristicaceae). The nucleotide sequences showed the highest identity with *Knema* sp. (Accession number AB586432.1 and AB586431.1) and *Myristica fragans* (Accession number AY298839.1). It could be inferred from this study that the locus of *rbcl* gene can be used for amplification and plant genetic relationships study.

Keywords: Nucleotide sequences, *rbcl* gene, Herb, Nutmeg

บทนำ

จันทน์เทศ (*Myristica fragans* Houtt.) เป็นสมุนไพรในวงศ์ Myristicaceae เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ไม่ผลัดใบ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในหมู่เกาะโมลุกกะ ทางตะวันออกของประเทศอินโดนีเซีย เจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกชนิด แต่

เติบโตได้ดีที่สุดในดินร่วนปนทรายที่มีอินทรีย์วัตถุสูงและมีฝนตกชุก อีกทั้งยังเจริญได้ดีในพื้นที่เขตร้อนชื้น โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย (Keereekoch *et al.*, 2018, p.34) ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด ความสูงของต้นประมาณ 5-13 เมตร แต่อาจสูงได้ถึง 20 เมตร เปลือกลำต้นเรียบเป็นสีเทาอมดำ เนื้อไม้สีน้ำตาลมีกลิ่นหอมเพราะมีน้ำมันหอมระเหย ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับ ผิวใบด้านบนเป็นมันวาว ดอกจันทน์เทศเป็นดอกเพศเดียว แต่บางครั้งพบดอกตัวผู้และตัวเมียในต้นเดียวกันได้ ดอกออกเป็นช่อสีเหลืองอ่อน ลักษณะของผลเป็นรูปทรงค่อนข้างกลม รูปร่างคล้ายกับลูกสาเก ภายในผลมีเมล็ดลักษณะกลมสีน้ำตาล โดยทั่วไปแล้วจะเรียกเมล็ดว่า “ลูกจันทน์” (Nutmeg) และเมล็ดจะมีเยื่อหุ้มหรือรูกหุ้มเมล็ดสีแดงส้ม มีกลิ่นหอม เรียกกรกหุ้มเมล็ดว่า “ดอกจันทน์” (mace) โดยมีลักษณะเป็นริ้วสีแดงจัด รูปร่างคล้ายร่างแห หุ้มเมล็ดเอาไว้ ใน 1 ผล มี 1 เมล็ด (ภาพที่ 1) (Jaiswal *et al.*, 2009, p. 22; Honey *et al.*, 2016, p. 36; Honestdocs, 2019, Online)

เมล็ดจันทน์เทศมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ ส่วนของเปลือก รก และเนื้อ ตามลำดับ โดยเปลือกจันทน์เทศมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 114.47 mg GAE/g DW, 2.86 mg RE/g DW และ 2.86 mg/100 g ตามลำดับ (Tan *et al.*, 2013, p. 1051) ส่วนเมล็ดของต้นจันทน์เทศมีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย (Essential oil) ประมาณ 10% (Maya *et al.*, 2004, p. 137) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ประกอบด้วย Terpene hydrocarbon (α -pinenes, camphene, p-cymene, sabinene, β -phellandrene, γ -terpinene, limonene, myrcene) ประมาณ 60-90% , terpene derivatives (linalool, geraniol, terpinol) ประมาณ 5% – 15% และ phenylpropanes (Myristicin, Elemicin, Safrole) ประมาณ 2 – 20% ซึ่งปัจจุบันพบว่าสาร myristicin และ elemicin ในเมล็ดของจันทน์เทศสามารถนำไปใช้ขับสารพิษได้ (Sonavane *et al.* 2001, pp. 417-418) ต้นจันทน์เทศเกือบทุกส่วนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งใช้ในครัวเรือนและประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ลูกจันทน์และดอกจันทน์นำไปปรุงอาหารทั้งของคาวของหวานเพื่อช่วยดับกลิ่นเนื้อสัตว์ สามารถนำไปผสมในเครื่องดื่มเพื่อเพิ่มรสชาติ ซึ่งลูกจันทน์จะมีความฉุนและหวานกว่าดอกจันทน์ ส่วนเมล็ดลูกจันทน์ทุบให้แตก คั่วไฟให้หอม แล้วจึงปั่นเป็นผง ใช้เป็นเครื่องเทศ (Spice) และเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส จันทน์เทศถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์แผนโบราณในตะวันออกกลางและเอเชีย เช่น รกของจันทน์เทศมีรสเผ็ดร้อน ใช้บำรุงร่างกาย ขับลม แก้ท้องร่วง ส่วนผลแก่ใช้เป็นยาลดไข้ เป็นต้น ส่วนพื้นที่ทางตะวันตกใช้ลูกจันทน์เป็นยาแก้โรคกระเพาะอาหาร ขับลม ลดอาการจุกเสียด ปวดหัว อาเจียน กระตุ้นการเจริญอาหาร และใช้เป็นยาต้านการอักเสบได้ (Orwa, 2009, online)

นอกจากนี้บัญชียาจากสมุนไพรไทยมีการใช้ตามองค์ความรู้ดั้งเดิมตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติในบัญชียาหลักแห่งชาติ ปรากฏว่าดอกจันทน์ใช้ในยารักษาอาการโรคในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ ตำรับยาหอมเทพจิตร และตำรับยาหอมนวโกฐ มีสรรพคุณในการแก้ลมวิงเวียน แก้อาการหน้ามืด ตาลาย ใจสั่น คลื่นเหียน อาเจียน แก้ลมจุกแน่นในท้อง ตำรับยาธาตุบรรจบ มีสรรพคุณ บรรเทาอาการท้องอืดเฟ้อ ตำรับยาแก้ลมอัมพฤกษ์ มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดตามเส้นเอ็น กล้ามเนื้อ มือ เท้า ตึงหรือชา เป็นต้น (Herbal Medicines Database, Faculty of Pharmacy, Ubon Ratchathani University, n.d., Online) ส่วนเมล็ดจันทน์เทศเป็นส่วนประกอบในยาสามัญประจำบ้านแผนโบราณ 13 ตำรับ จากทั้งหมด 24 ตำรับ ได้แก่ ยาวิสมัทยาใหญ่ ยาประสะกานพลู ยาแสงหมึก ยามันทธาตุ ยาประสะเจตพังคี ยามหาจักรใหญ่ ยาธรณีสันตะมาต ยาธาตุบรรจบ ยาหอมเทพจิตร ยาหอมทิพโอสถ ยาหอมอินทจักร ยาหอมนวโกฐ และยาประสะเปราะใหญ่ (Traditional Home Remedies, 2013, p. 34)



ภาพที่ 1 ลักษณะของผลจันทน์เทศ (A - B) ดอกจันทน์ (C) และเมล็ดจันทน์เทศ (D) (Jangid *et al.*, 2014, p. 591)

จันทน์เทศเป็นพืชที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในครัวเรือนและการแพทย์ แต่ยังมีข้อมูลการศึกษาทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำตัวอย่างจันทน์เทศมาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) ซึ่งยีน *rbcl* ในพืชมีหลากหลายขนาด เช่น 1,428, 1,431 หรือ 1,434 คู่เบส เป็นยีนที่ไม่มีอินตรอน (Intron) สอดแทรกอยู่ภายใน เมื่อถอดรหัส (Transcription) และแปลรหัสจะได้หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit) ของเอนไซม์รูบิสโก (Rubisco) หรือ ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide fixation) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) (Plunkett *et al.*, 1997, p. 566) ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีนที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชค่อนข้างมาก โดยอาจใช้ตำแหน่งจำเพาะบริเวณเดียวหรือหลายบริเวณร่วมกัน เช่น การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*, *rbcl*, *rpoB*, *rpoC1* (Thanananta *et al.*, 2014a, p. 523) การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcl* (Bussadee *et al.*, 2015) และการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยใช้ยีน internal transcribed spacer 2 (ITS2), *matK* และ *rbcl* ในมะเขือ (*Solanum* L.) (Prommanee, 2017, p. 26) เป็นต้น แต่ตำแหน่งของยีนต่าง ๆ ข้างต้นให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันไปเมื่อนำไปใช้กับพืชต่างชนิดกัน ซึ่งในการวิจัยนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จะถูกนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกสายพันธุ์และระบุชนิดของสมุนไพรในกลุ่มพิกัดจันทน์ทั้ง 5 (จันทน์ชะมด จันทน์เทศ จันทน์นา จันทน์แดง และจันทน์ขาว) ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcl* ของสมุนไพรจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอของพืชและออกแบบไพรเมอร์

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของต้นจันทน์เทศมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (GenUP™ Plant DNA Kit) ละลายดีเอ็นเอที่ได้ใน TE buffer แล้วกำจัดอาร์เอ็นเอออกด้วยเอนไซม์ RNase เพื่อป้องกันการตัดและต่อของดีเอ็นเอที่ผิดพลาด ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจล จากนั้นศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของจันทน์เทศจากฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI ในบริเวณส่วนของยีน *rbcl* ของพืชในตระกูล (Family) ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000, pp. 365-384) ได้คู่ไพรเมอร์ดังนี้

Rb1-L	CCA AAG ATC TCG GTC AGA GC
Rb2-R	GAC AAC TGT GTG GAC CGA TG

2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันในสารละลายมาสเตอร์มิกซ์ (master mix) สำหรับทำพีซีอาร์ที่ประกอบด้วย 10X *Taq* buffer, 100 μ M forward primer, 100 μ M reverse primer, *Taq* DNA polymerase, 2 mM dNTPs, 25 mM $MgCl_2$ และดีเอ็นเอของตัวอย่างที่สกัดได้นำมาผสมให้เข้ากัน จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย thermal cycler โดยตั้งค่าอุณหภูมิแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3. การหาลำดับเบสและการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank)

นำสารละลายพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ (PCR purification) ด้วยชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอ (GenUPTM PCR/Gel Cleanup Kit) แล้วส่งตัวอย่างวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท FirstBase (ประเทศมาเลเซีย) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้นด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่ปรากฏในฐานข้อมูลออนไลน์ของ NCBI ด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อเปรียบเทียบ (Alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีนที่ศึกษา

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่วิเคราะห์ได้จำนวน 932 คู่เบส (ภาพที่ 2) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่ปรากฏในฐานข้อมูลออนไลน์ของ NCBI ด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจันทน์เทศมีความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในพืชใบเลี้ยงคู่ในวงศ์จันทน์เทศ Myristicaceae โดยมีจำนวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับต้นเลื้อยควาย (*Knema* sp.) (Accession number AB586432.1 และ AB586431.1) และต้นจันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) (Accession number AY298839.1) สูงที่สุด และมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันถึงร้อยละ 99 (927/928) (ตารางที่ 1)

```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
AAGCCACGGG GCAGAACACC TGGCAAGAG ACCCAATCTT GAGTGAAATA AATACCGGGA CTCGGCTCTT TTCATATAA ATCATCACCT AATAAATCAA

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
CGAAACCTAA AGTGATCTCC CGTTCCTCTT CCAGTTTACC TACTACGGTA CCAGCGTGAA TATGATCTCC ACCAGACATA CGTAAACGCT TAGCTAGTAC

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
ACGAAAGTGC ATACCATGAT TCTTCTGTCT ATCAATAACT GCATGCATTG CGCGATGGAT GTGAAGAAGT AGGCGGTTGT CTCGGCAATA ATGAGCCAAG

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
CTAGTATTGG CAGTGAATCC CCCCCTTAAG TAGTCGTGCA TTACGATAGG AACTCCCAAT TCCCTGGCAA ATACGGCCCT TTTGATCATT TCTTCGCTG

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
TACCCGCGAT AGCATTCAG TAATGTCCTT TGATTTCCTT TGTTCGGCC TGTGCTTAA AAAGAGCTTC GGCACAAAAT ACGAAACGCT CTCTCCAACG

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
CATAAATGGT TGGGAGTCA CGTTCCTATC ATCCTTGGTA AAATCAAGTC CACCGCGGAG ACATTCATAA ACCGCCCTAC CGTAGTCTCT AGCGGATAAC

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
CCCAATTTTG GTTAAATAGT ACATCCCAAT AGGGGACGAC CGTACTGTGT CAATTATCT CTCTCAACTT GGATGCCATG GGGCGGGCTT TGGAAAGTTT

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
TGATATAAGA AGTGGGAATT CGCAGATCTT CCAGACGTAG AGCTCGTAGG GCTTGAACC CAAATACATT ACCCACAAAT GAAGTAAACA TGTAGTAAAC

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
AGAACCTTCT TCAAAAAGGT CTAAGGGTA AGCTACATAA GCAATATATT GATTTCTCTC CCCAGCAACG GGCTCGATGT GTAGCATCG TCCTTTGTAA

910 920 930
CGATCAAGGC TGGTAAGTCC ATCGGTCCCC CC

```

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcl* ของจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcl* ของจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Knema</i> sp. SH-2010 chloroplast gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds, isolate: T362	1666	1666	99%	0.0	99.89%	AB586432.1
<i>Knema</i> sp. SH-2010 chloroplast gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds, isolate: A327	1666	1666	99%	0.0	99.89%	AB586431.1
<i>Myristica fragrans</i> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, partial cds; chloroplast	1666	1666	99%	0.0	99.89%	AY298839.1
<i>Knema latericia</i> ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, partial cds; chloroplast gene for chloroplast product	1666	1666	99%	0.0	99.89%	L12653.2
<i>Myristica fragrans</i> ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (<i>rbcl</i>) gene, partial cds; chloroplast gene for chloroplast product	1666	1666	99%	0.0	99.89%	AF206798.1

จากการศึกษาของ Plunkett *et al.* (1997, p. 566) รายงานว่าการใช้ยีน *matK* ร่วมกับ *rbcl* เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด จะทำให้การจัดกลุ่มและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชชัดเจนขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Thanananta *et al.* (2014b, p. 680) พบว่ายีน *rbcl* มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดีกว่ายีน *rpoC1* ในข้าวมีสี 10 สายพันธุ์

แต่พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชระดับชนิด (Species) ยังทำได้ยาก เนื่องจากมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมสูง จึงเหมาะกับการวิเคราะห์ในระดับสกุล (Genus) เท่านั้น แต่การศึกษาของ Prommanee (2017, p. 26) พบว่า การใช้ตำแหน่งของ ITS2 สามารถจัดจำแนกพืชสกุลมะเขือได้ดีกว่าตำแหน่ง *matK* และ *rbcl* ส่วนการศึกษาของ Bussadee *et al.* (2015, p. 989) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rbcl* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 18 สายพันธุ์ แต่สามารถแยกแยะได้เพียงแค่ 3 พันธุ์เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้บริเวณของยีนที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์และจำแนกพืชชนิดต่าง ๆ มีความจำเพาะเจาะจงที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ตำแหน่งของยีน *matK*, ITS2 และ *rbcl* แต่ปรากฏว่ามีเฉพาะยีน *rbcl* ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของจำหนัสดำเนินการได้เท่านั้น

สรุปผลการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* สามารถนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของจำหนัสดำเนินการ (Myristica fragrans Houtt.) ได้ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จำนวน 932 คู่เบส มีความคล้ายคลึงกับพืชใกล้เคียงอยู่ในวงศ์ Myristicaceae โดยมีจำนวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับต้นเลียดควาย (Knema sp.) (Accession number AB586432.1 และ AB586431.1) และต้นจำหนัสดำเนินการ (Myristica fragrans) (Accession number AY298839.1) สูงที่สุด แสดงให้เห็นว่า การใช้เทคนิคทางพันธุกรรมมาใช้ระบุตัวอย่างของต้นจำหนัสดำเนินการที่นำมาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ผลที่ชัดเจนกว่าการวิเคราะห์ทางพฤกษศาสตร์แต่เพียงอย่างเดียว รวมถึงในการเลือกใช้ยีนในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออาจต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดด้วย ซึ่งในการวิจัยนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จะถูกนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกสายพันธุ์และระบุชนิดของสมุนไพรในกลุ่มพืักัดจำหนัสดำเนินการทั้ง 5 ชนิด (จำหนัสดำเนินการ จำหนัสดำเนินการ จำหนัสดำเนินการ จำหนัสดำเนินการ จำหนัสดำเนินการ) ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เอกสารอ้างอิง

- Bussadee, P., Thanananta, T. & Thanananta, N. (2015). Identification of Mangoes Cultivars in Thailand using DNA Sequences of *rpoC1* and *rbcl* Genes. *Thai Science and Technology Journal*, 23(6) (Special Issue), 983-993. (in Thai)
- Herbal Medicines Database, Faculty of Pharmacy, Ubon Ratchathani University. (n.d.) *Dok Chan*. [online] Retrieved December 6, 2019, from: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=55> (in Thai)
- Honestdocs. (2019). *Nutmeg benefits, eating ideas and using nutmeg for health and caution*. [online] Retrieved December 6, 2019, from: <https://www.honestdocs.co/the-benefits-of-nutmeg> (in Thai)
- Honey J., Araya K.R., Sindhu T.U., Syamjith P., Vinood K.R. & Sandhya, S. (2016). A Descriptive Review on *Myristica fragrans* Houtt. *Hygeia: Journal of Drugs and Medicines*, 8(1), 35 – 43.
- Jaiswal, P., Kumar, P., Singh, V.K. & Singh, D.K. (2009). “Biological Effects of *Myristica fragrans*”, *ARBS Annual Review of Biomedical Sciences*, 11, 21-29.
- Jangid, K., Jayakumar, N.D. & Varghese, S.S. (2014). Achievable Therapeutic Effects of *Myristica fragrans* (Nutmeg) on Periodontitis a Short Review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 591 – 594.
- Keereekoch, T., Srisuwan, T. & Sangkaew, N. (2018). Quality Comparison of Nutmeg from Thailand and Indonesia. *Thaksin University Journal*, 21(2), 33 – 42. (in Thai)
- Maya, K.M., Zachariah, T.J., Krishnamoorthy, B. (2004). Chemical composition of essential oil of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) accessions. *Journal of spice and aromatic crops*, 13, 135-139.

- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. & Simons, A. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya. [online] Retrieved December 9, 2019, from: <https://www.worldagroforestry.org/resources/databases/agroforestry>.
- Plunkett, G.M., Soltis, D.E. and Soltis, P.S. (1997). Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *matK* and *rbcl* sequence data. *American Journal of Botany*, 84, 565-580.
- Prommanee, W. (2017). *DNA Barcoding of Plants in the Genus Solanum L. in Thailand*. Thesis of Master of Science (Pharmaceutical Sciences) Graduate School, Silpakorn University. (in Thai)
- Rozen, S & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers, In Krawetz, S. and Misener, S. (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 365-386.
- Sonavane, G.S., Palekar R.C., Kasture V.S. & Kasture, S.B. (2001). Behavioral actions of *Myristica fragrans* seeds. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 417 – 424.
- Tan, K.P., Khoo, H.E. & Azrina, A. 2013. Comparison of antioxidant components and antioxidant capacity in different parts of nutmeg (*Myristica fragrans*). *Food Research International*, 20, 1049-1052.
- Thanananta, N., Saetai, K. & Thanananta, T. (2014a). Genetic Relationship Analysis of *Bulbophyllum* Section *Sestochilus* using Nucleotide Sequences of Specific Genes. *Thai Science and Technology Journal*, 22(4), 523-530. (in Thai)
- Thanananta, N., Sumrith, J. & Thanananta, T. (2014b). Analysis of Genetic Relationship of Colored Rice Cultivars Using DNA Sequences of *rbcl* and *rpoC1* Genes. *Thai Science and Technology Journal*, 22(5)(Special Issue), 674 – 682. (in Thai)
- Traditional Home Remedies 2013. (2013, 14 February). *Government Gazette*. Chapter 130 Special Issue 21, 30-49.