

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุล *Senna*

DNA Barcode for Identification of Processed medicinal *Senna* species

พรรษา มนต์แข็ง (Pansa Monkheang)* ดร.อรุณรัตน์ ฌีวราช (Dr.Arunrat Chaveerach)**

ดร.ทวัชชัย ธานี (Dr.Tawatchai Tanee)*** ดร.รุ่งลาวัลย์ สูดมุล (Dr.Runglawan Sudmoon)****

บทคัดย่อ

เพื่อสร้างและศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดโดยใช้บริเวณในคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ ได้แก่ *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* intergenic spacer ในพืชสกุล *Senna* และทดสอบระบุชนิดตัวอย่างพืชในสกุลนี้ที่ถูกแปรรูปเป็นยาสมุนไพรรูปแบบต่างๆ จึงได้เก็บตัวอย่างพืช ระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา พบทั้งหมด 14 ชนิด ทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดประจำชนิดพืช แล้วนำตัวอย่างพืชสมุนไพรที่แปรรูปแล้ว 11 ตัวอย่าง มาสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer สามารถระบุชนิดของพืชสกุล *Senna* ได้ดีที่สุดโดยมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ อยู่ที่ 0.04-0.60 ส่วนบริเวณ *matK* และ *rbcL* มีค่า 0.02-0.33 และ 0.04-0.25 ตามลำดับ

ABSTRACT

To construct and comparison study on barcode nucleotide sequences using three chloroplast DNA regions namely *matK*, *rbcL* and *trnH-psbA* intergenic spacer in the genus *Senna*, the plant samples were collected and identified. The result indicated that there are 14 species of the genus *Senna* in Thailand. DNA barcoding of a species were constructed. The 11 processed medicinal samples were also collected and DNA barcoding constructed for sequence testing with the plant samples. The *trnH-psbA* intergenic spacer region show the highest efficiency for identification *Senna* species with nucleotide variation values 0.04-0.60. For the *matK* and *rbcL* regions, they show the values 0.02-0.33 and 0.04-0.25, respectively.

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอในพลาสติด เครื่องหมายดีเอ็นเอ พืชสกุลซีเหล็ก

Key Words: chloroplast DNA, DNA barcode, *Senna*

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

****นักวิจัยห้องปฏิบัติการ Plant Systematics ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ชนิดของสิ่งมีชีวิตมีมาช้านาน ซึ่งในอดีตจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคศาสตร์ แต่การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตก็อาจเกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันมีความแปรผันของลักษณะแตกต่างกันหรือสิ่งมีชีวิตคนละชนิดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันก็อาจจะระบุให้เป็นชนิดเดียวกันได้ ต่อมานักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเทคโนโลยีทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อช่วยในการระบุชนิดและบอกความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต เช่น การใช้ข้อมูลโปรตีน และข้อมูลดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะข้อมูลระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นหลักฐานแสดงถึงสายวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันได้ (อรุณรัตน์, 2552) การระบุชนิดชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcode) นักวิทยาศาสตร์ได้แนวคิดมาจากการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่างๆ แล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิตเพื่อลดความผิดพลาด มีความรวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยอาศัยหลักการว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ แตกต่างไปจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นและสามารถจำแนกได้ทุกระยะของพัฒนาการชีวิต (วิชัย, 2552) นักวิทยาศาสตร์จึงได้เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ของดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูงแต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันองค์กร The Consortium for the Barcode of Life (CBOL), Canadian Centre for DNA Barcoding, Global Biodiversity Information Facility (GBIF) กำลังจัดทำมาตรฐาน และคู่มือในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด รวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลกลาง ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่แสดงความสัมพันธ์ของลำดับดีเอ็นเอในบาร์โค้ดกับชนิดต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต มาตรฐานที่จัดทำขึ้นใช้ส่วนของยีน cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรียเป็นบาร์โค้ดสำหรับสัตว์และค่อนข้างประสบ-

ความสำเร็จมาก (Hebert et al., 2003) สำหรับกลุ่มพืชนั้นอยู่ในขั้นตอนของการทดลองหาบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพลาสต์ เนื่องจากเชื่อถือน่าจะมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการเพียงพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วยให้ง่ายแก่การเปรียบเทียบชนิดออกจากกันได้ คือ *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*, *accD*, *ndhA*, *ndhJ*, *ndhK*, *YCF5*, *YCF9* และ *rbcL* ในปี ค.ศ. 2007 Chase et al. ได้เสนอให้มีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนและบริเวณที่ไม่ถอดรหัสของพืช 3 บริเวณต่อพืช 1 ชนิด โดยเสนอทางเลือกเป็น 2 แนวทาง คือ *rpoC1*, *matK* และ *trnH-psbA* intergenic spacer หรือ *matK*, *rpoB* และ *rpoC1* ถ้าสุด Hollingsworth et al. (2009) ได้เสนอบริเวณมาตรฐาน 2 บริเวณ คือ *rbcL* และ *matK* เป็น core barcode regions

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนและบริเวณที่ไม่ถอดรหัสของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ ได้แก่ *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* intergenic spacer เพื่อทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด สำหรับระบุพืชสกุล *Senna* เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการระบุชนิดของพืชสกุลนี้ได้ อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และทดสอบระบุตัวอย่างพืชที่ถูกแปรรูปในรูปของยาสมุนไพร ยามืดแคปซูล และชาขงเนื่องจากพืชสกุลนี้เป็นพืชกลุ่มหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีชีวิตคนไทยมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และมีการนำพืชสกุลนี้มาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันหลายอย่าง อาทิเช่น ใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ โฝงแฝง (*Senna hirsuta*) ขี้เหล็กเลือด (*S. timoriensis*) ใช้ประกอบอาหาร เช่น ขี้เหล็ก (*S. siamea*) ผักหวานบ้าน (*S. sophora*) ชุมเห็ดเทศ (*S. alata*) ใช้เป็นเครื่องดื่มและอาหารว่าง เช่น ชุมเห็ดไทย (*S. tora*) ขี้เหล็ก มะขามแขก (*S. alexandrina*) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องสำอาง เป็นไม้ประดับตกแต่งบ้านและสวน และยังสามารถนำมาใช้ในการสร้างที่อยู่อาศัยได้ เป็นต้น ดังนั้นการสร้าง

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุล *Senna* จะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นสากล มีประโยชน์ทางด้านวิชาการในการระบุชนิดของพืชได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วในกรณีที่เกิดความสับสนได้หรือกรณีที่ไม่มีข้อมูลทางฐานข้อมูลในการระบุชนิด

วิธีการวิจัย

1. การเก็บ ระบุชนิด และเตรียมตัวอย่างพืช

สำรวจ เก็บตัวอย่างพืชสกุล *Senna* ในประเทศไทยจากสถานที่ต่างๆ ระบุชนิดพืชด้วยลักษณะฐานข้อมูลโดยใช้เอกสารอ้างอิง ได้แก่ Xu et al. (2010) และ Larsen et al. (1984) รวมทั้งศึกษาพรรณไม้แห่งที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) เมื่อระบุชนิดของพืชได้แล้วนำยอดอ่อนที่เหลืมาสกัดดีเอ็นเอที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่วนชนิดของพืชและสถานที่เก็บตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 1

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชดัดแปลงจากวิธีของ Porebski et al. (1997) โดยตัดใบพืชสดมาขนาด 0.5 cm.² ลงในโกร่ง เติม extraction buffer (50 mM Tris-HCL, 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) ปริมาตร 600 µl ใส่บดจนละเอียดแล้วย้ายใส่ Microtubes ขนาด 1.5 ml เติม 10 mg/ml RNase A ปริมาตร 5 µl แล้วบ่มที่ 65°C 30 นาที กลับหลอดไป-มาทุก 5 นาที แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสขึ้นบนใส่ microtubes อันใหม่ เติม 2-propanol ปริมาตร 600 µl ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน แล้วปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งให้หมด ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง รอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65°C ปริมาตร 80 µl แล้วนำไปเก็บที่ -20°C

ตารางที่ 1 ชนิดของพืชตัวอย่างและสถานที่ที่เก็บตัวอย่างพืช

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อท้องถิ่น	สถานที่เก็บตัวอย่าง
<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	ชุมเห็ดเทศ	จ.ขอนแก่น
<i>S. alexandrina</i> Mill.	มะขามแขก	จ.สระบุรี
<i>S. fruticosa</i> (Mill.)	ขี้เหล็กยว	จ.เชียงใหม่
Irwin and Barneby		
<i>S. garrettiana</i> (Craib)	แสมสาร	จ.ขอนแก่น
Irwin and Barneby		
<i>S. hirsuta</i> (L.) Irwin and Barneby	โพงผอง	จ.ร้อยเอ็ด
<i>S. occidentalis</i> (L.) Link	ชุมเห็ดเล็ก	จ.ขอนแก่น
<i>S. pallida</i> (Vahl)	เหลือง	จ.สระบุรี
Irwin and Barneby	ออสเตรเลีย	
<i>S. siamea</i> (Lam.)	ขี้เหล็ก	จ.ขอนแก่น
Irwin and Barneby		
<i>S. sophora</i> (L.) Roxb.	ผักหวานบ้าน	จ.ขอนแก่น
<i>S. spectabilis</i> (DC.)	ขี้เหล็ก	จ.ขอนแก่น
Irwin and Barneby	อเมริกัน	
<i>S. sulfurea</i> (DC. ex Colla)	ตรึงบาดาล	จ.ขอนแก่น
Irwin and Barneby		
<i>S. surattensis</i> (Burm.f.)	ทรงบาดาล	จ.ขอนแก่น
Irwin and Barneby		
<i>S. timoriensis</i> (DC.)	ขี้เหล็กเลือด	จ.เลย
Irwin and Barneby		
<i>S. tora</i> (L.) Roxb.	ชุมเห็ดไทย	จ.ขอนแก่น

3. สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *matK*,

rbcL และ *trnH-psbA* intergenic spacer

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดด้วยเทคนิค polymerase chain reaction

(PCR) ปริมาตร 30 μ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1.5 μ l, 2xGo Taq[®] Green Master Mix (Promega) 15 μ l, 50 μ M Primer ด้าน forward และด้าน reverse อย่างละ 0.6 μ l และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 12.3 μ l โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *matK* คือ 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3' และ 5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3' บริเวณ *rbcL* คือ 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' และ 5'-GTAAATCAAGTCCACRCG-3' บริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer คือ 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' และ 5'-CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3' โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94°C (1 นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 94°C (30 วินาที) annealing 50°C (20 วินาที) และ extension ที่ 72°C (50 วินาที) เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72°C (5 นาที) 1 รอบ

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิต PCR ที่ได้ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น นิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกส่งกลับมารูปแบบ Scf file ที่ใช้เปิดในโปรแกรม FinchTV จะสามารถแก้ไขเบสที่ peak ได้จากนั้นจึง export ข้อมูลเป็น text file แล้วนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ทุกตัวอย่างมาจัดให้อยู่ในไฟล์เดียวกันด้วยโปรแกรม notepad จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011)

สำหรับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมด จะนำไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank เพื่อให้ผู้สนใจศึกษาจากทั่วโลกสามารถเข้าถึงได้และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

5. ตรวจสอบและระบุชนิดของพืชสมุนไพรแปรรูป

ที่มีส่วนผสมของพืชสกุล *Senna* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

เมื่อได้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมแล้วจึงตรวจสอบการนำไปใช้ระบุชนิดโดยนำตัวอย่าง

พืชที่ถูกแปรรูปในรูปแบบต่างๆ จำนวน 11 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ด้วยบริเวณมาตรฐานทั้ง 3 บริเวณ แล้วนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ทราบชนิดแล้วเพื่อระบุว่าเป็นพืชที่นำมาแปรรูปนั้นคือพืชชนิดใด

ผลการวิจัย

1. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐาน

ได้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานในตัวอย่างพืชที่ระบุชนิดได้ จากบริเวณ *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* intergenic spacer และลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้รับ GenBank accession number เรียบร้อยแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 2

2. การสกัดดีเอ็นเอจากพืชสมุนไพรแปรรูปที่มีส่วนผสมของพืชสกุล *Senna*

ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มาแล้วนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบด้วย 0.8% Agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณน้อยและคุณภาพต่ำ มีการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *rbcL* และ *trnH-psbA* intergenic spacer ได้เพียง 7 ตัวอย่าง ส่วนบริเวณ *matK* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียง 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 1

3. การตรวจสอบดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุล *Senna*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 พบว่าเดนโดรแกรมที่ได้จากบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer, *matK* และ *rbcL* สามารถระบุชนิดพืชได้ มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุล *Senna* อยู่ในช่วง 0.04-0.60, 0.02-0.33 และ 0.04-0.25 ตามลำดับ (ภาพที่ 2-4)

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ของพืชสกุล *Senna* แล้วนำมาสร้างเดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 ดังภาพที่ 2 พบว่ามีค่าความผันแปรระหว่างชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 0.04-0.60 และมีค่าความผันแปรภายในชนิดเดียวกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *S. spectabilis* 1 กับ *S. spectabilis* 2 อยู่ที่ 0.01 (ตารางที่ 4)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสมุนไพรบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ทราบชนิดแล้วเพื่อระบุชนิดพบว่า พืชสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *Senna* sp. 1, *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4, *Senna* sp. 5, *Senna* sp. 6 และ *Senna* sp. 7 เป็นชนิดเดียวกัน คือ *S. alexandrina* ซึ่งมีค่าความผันแปรระหว่างชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.02, 0.00, 0.00, 0.00, 0.00,

0.01 และ 0.00 (ตารางที่ 4) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์ว่า *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4 และ *Senna* sp. 7 มีส่วนผสมของ *S. alexandrina* ส่วน *Senna* sp. 1 และ *Senna* sp. 6 นั้นระบุไว้ว่ามีส่วนผสมของ *S. alata* พบว่ามีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.52 และ 0.51 ตามลำดับ และ *Senna* sp. 5 ระบุไว้ว่ามีส่วนผสมของ *S. tora* นั้นพบว่ามีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.19

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *matK* ของพืชสกุล *Senna* แล้วนำมาสร้างเดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 ดังภาพที่ 3 พบว่า ค่าความผันแปรระหว่างชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 0.02-0.33 และมีค่าความผันแปรภายในชนิดเดียวกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *S. spectabilis* 1 กับ *S. spectabilis* 2 อยู่ที่ 0.26

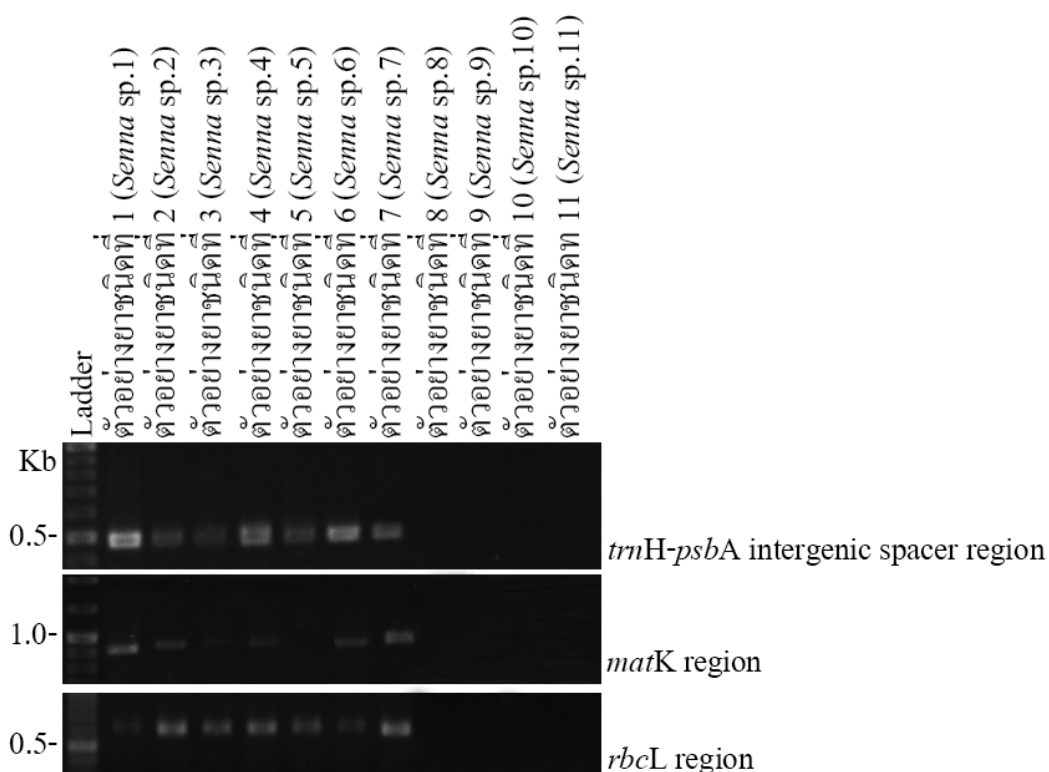
ตารางที่ 2 GenBank accession number ของพืชสกุล *Senna* จากบริเวณมาตรฐานทั้ง 3 บริเวณ

ชนิดพืช	หมายเลขจำเพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ และจำนวนนิวคลีโอไทด์ (bp)		
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i> intergenic spacer
<i>Senna alata</i>	GU942495 (854)	JF975364 (580)	GU969278 (402)
<i>S. alexandrina</i>	JF975383 (803)	JF975375 (545)	JF838365 (401)
<i>S. fruticosa</i>	JF975385 (797)	JF975377 (567)	JF838367 (426)
<i>S. garrettiana</i>	GU942494 (844)	JF975368 (583)	GU969282 (404)
<i>S. hirsuta</i>	JF975380 (805)	JF975372 (590)	JF838362 (308)
<i>S. occidentalis</i>	GU942492 (845)	JF975366 (581)	GU969280 (278)
<i>S. pallida</i>	JF975382 (809)	JF975374 (566)	JF838364 (259)
<i>S. siamea</i>	GU942496 (835)	JF975365 (581)	GU969279 (352)
<i>S. sophera</i>	JF975381 (804)	JF975373 (566)	JF838363 (321)
<i>S. spectabilis</i>	JF975378 (849)	JF975370 (599)	JF838360 (329)
<i>S. sulfurea</i>	JF975379 (796)	JF975371 (589)	JF838361 (369)
<i>S. surattensis</i>	GU942493 (854)	JF975367 (533)	GU969281 (373)
<i>S. timoriensis</i>	JF975384 (806)	JF975376 (437)	JF838366 (301)
<i>S. tora</i>	GU942491 (860)	JF975369 (583)	GU969277 (308)

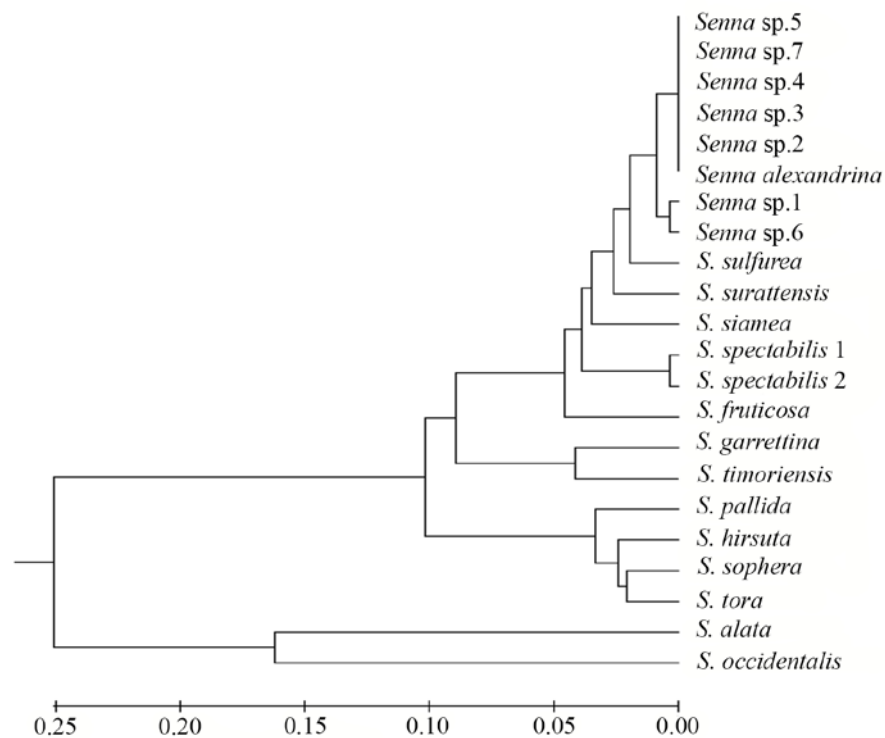
ตารางที่ 3 ตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปที่มีส่วนผสมของพืชสกุล *Senna*

ตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปที่มีส่วนผสมของพืชสกุล <i>Senna</i>	กำหนดเป็น	ผลการทำ PCR จากบริเวณมาตรฐาน		
		<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i> intergenic spacer
1. ชาชงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของชุมเห็ดเทศ	<i>Senna</i> sp. 1	/	/	/
2. ชาอัดเม็ดที่มีส่วนผสมของมะขามแขก	<i>Senna</i> sp. 2	/	/	/
3. ชาชงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของมะขามแขก	<i>Senna</i> sp. 3	/	/	/
4. ชาเม็ดแคปซูลที่มีส่วนผสมของมะขามแขก	<i>Senna</i> sp. 4	/	/	/
5. ชาชงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของชุมเห็ดไทย	<i>Senna</i> sp. 5	x	/	/
6. ใบชุมเห็ดเทศแห้งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตชาสมุนไพร	<i>Senna</i> sp. 6	/	/	/
7. ใบมะขามแขกแห้งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตชาสมุนไพร	<i>Senna</i> sp. 7	/	/	/
8. ชาชงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของขี้เหล็ก	<i>Senna</i> sp. 8	x	x	x
9. ชาน้ำที่มีส่วนผสมของขี้เหล็ก	<i>Senna</i> sp. 9	x	x	x
10. ชาเม็ดแคปซูลที่มีส่วนผสมของแสมสาร	<i>Senna</i> sp. 10	x	x	x
11. ชาเม็ดแคปซูลที่มีส่วนผสมของขี้เหล็ก	<i>Senna</i> sp. 11	x	x	x

/ : เพิ่มปริมาณโดย PCR ได้สำเร็จ x : เพิ่มปริมาณโดย PCR ไม่สำเร็จ

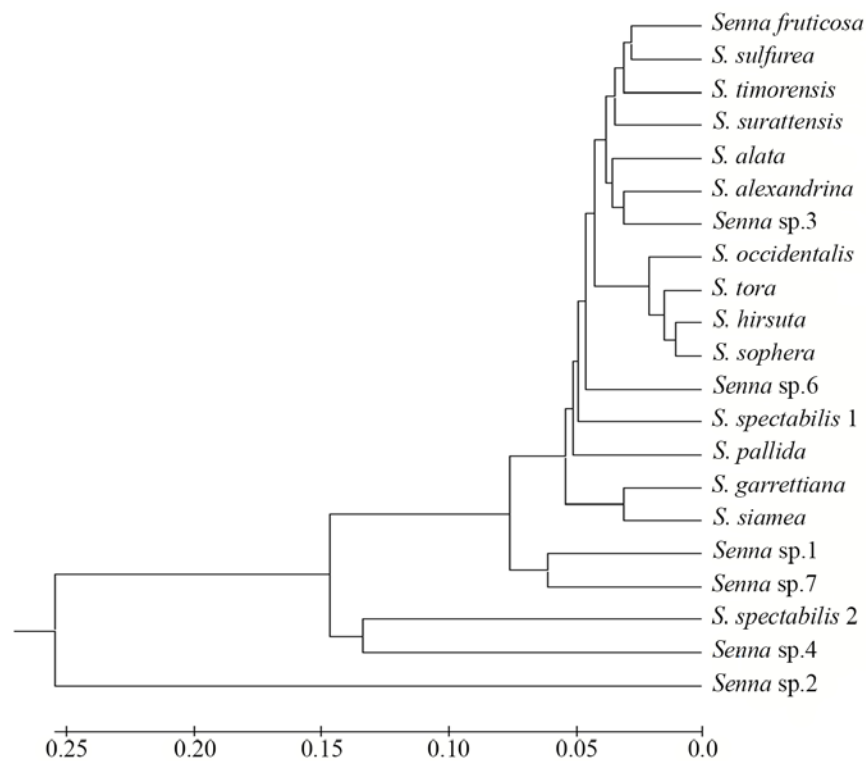


ภาพที่ 1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer, *matK* และ *rbcL* ของตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปที่มีพืชสกุล *Senna* เป็นส่วนผสม



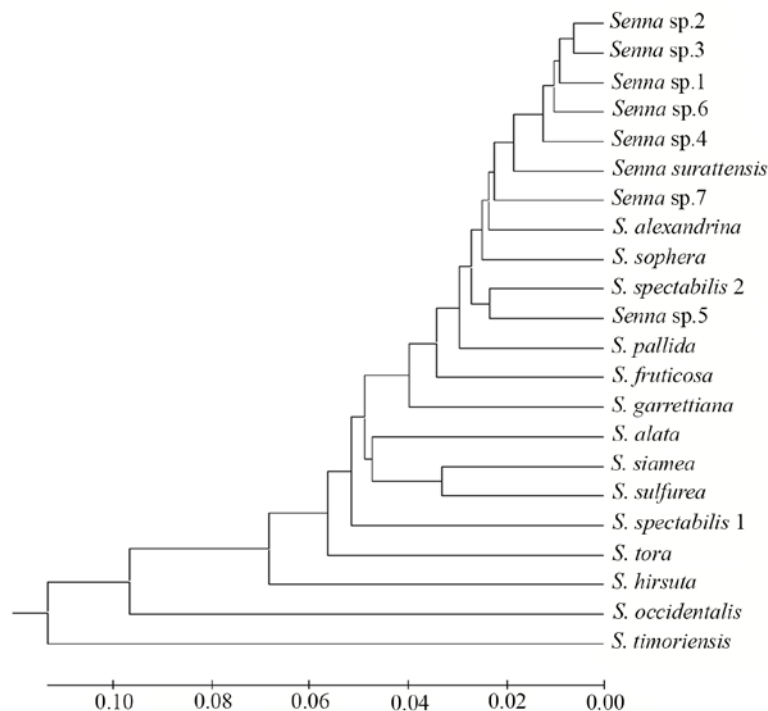
ภาพที่ 2 เคน โครแกรมของพืชสกุล *Senna* และตัวอย่างสมุนไพรรูปที่มีส่วนของพืชสกุล *Senna* สร้างด้วย

โปรแกรม MEGA 5.05 จากข้อมูลค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer



ภาพที่ 3 เคน โครแกรมของพืชสกุล *Senna* และตัวอย่างสมุนไพรรูปที่มีส่วนของพืชสกุล *Senna* สร้างด้วย

โปรแกรม MEGA 5.05 จากข้อมูลค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของบริเวณ *matK*



ภาพที่ 4 เคนโดแกรมของพืชสกุล *Senna* และตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปที่มีส่วนของพืชสกุล *Senna* สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 จากข้อมูลค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของบริเวณ *rbcL*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสมุนไพรบริเวณ *matK* มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ทราบชนิดแล้วเพื่อระบุชนิดพบว่า *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4, *Senna* sp. 5 และ *Senna* sp. 7 ที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์มีส่วนผสมของ *S. alexandrina* มีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.51, 0.06, 0.30 และ 0.13 ตามลำดับ *Senna* sp. 1 และ *Senna* sp. 6 ที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์มีส่วนผสมของ *S. alata* พบว่ามีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.15 และ 0.09 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rbcL* ของพืชสกุล *Senna* แล้วนำมาสร้างเคนโดแกรมด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 ดังภาพที่ 5 พบว่า ค่าความผันแปรระหว่างชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 0.04-0.25 และมีค่าความผันแปรภายในชนิดเดียวกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *S. spectabilis* 1 กับ *S. spectabilis* 2 อยู่ที่ 0.09

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสมุนไพรบริเวณ *rbcL* มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ทราบชนิดแล้วเพื่อระบุชนิดพบว่า พืชสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *Senna* sp. 1, *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4, *Senna* sp. 5, *Senna* sp. 6 และ *Senna* sp. 7 เป็นชนิดเดียวกัน คือ *S. surattensis* ซึ่งมีค่าความผันแปรระหว่างชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.04, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.04 และ 0.04 ตามลำดับ ซึ่งไม่สอดคล้องกับที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์ว่า *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4 และ *Senna* sp. 7 มีส่วนผสมของ *S. alexandrina* และมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 ตามลำดับ ส่วน *Senna* sp. 1 และ *Senna* sp. 6 นั้นระบุไว้ว่ามีส่วนผสมของ *S. alata* พบว่ามีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.10 และ 0.11 ตามลำดับ และ *Senna* sp. 5 ระบุไว้ว่ามีส่วนผสมของ *S. tora* นั้นพบว่ามีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.23

BMP8-9

ตารางที่ 4 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Senna* และตัวอย่างสมุนไพรรูปที่มีส่วนของพืชสกุล *Senna* จากบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer

	<i>S. alata</i>	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. fruticosa</i>	<i>S. garrettiana</i>	<i>S. hirsuta</i>	<i>S. occidentalis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. siamea</i>	<i>S. sophora</i>	<i>S. spectabilis</i> 1	<i>S. spectabilis</i> 2	<i>S. sulfurea</i>	<i>S. surattensis</i>	<i>S. timoriensis</i>	<i>S. tora</i>	<i>Senna</i> sp. 1	<i>Senna</i> sp. 2	<i>Senna</i> sp. 3	<i>Senna</i> sp. 4	<i>Senna</i> sp. 5	<i>Senna</i> sp. 6	<i>Senna</i> sp. 7
<i>Senna alata</i>	0.00																					
<i>S. alexandrina</i>	0.50	0.00																				
<i>S. fruticosa</i>	0.52	0.09	0.00																			
<i>S. garrettiana</i>	0.60	0.19	0.20	0.00																		
<i>S. hirsuta</i>	0.57	0.19	0.22	0.30	0.00																	
<i>S. occidentalis</i>	0.32	0.45	0.48	0.52	0.50	0.00																
<i>S. pallida</i>	0.55	0.19	0.21	0.28	0.08	0.49	0.00															
<i>S. siamea</i>	0.53	0.07	0.11	0.15	0.22	0.46	0.22	0.00														
<i>S. sophora</i>	0.55	0.18	0.21	0.27	0.04	0.48	0.06	0.21	0.00													
<i>S. spectabilis</i> 1	0.52	0.08	0.11	0.16	0.21	0.48	0.20	0.10	0.19	0.00												
<i>S. spectabilis</i> 2	0.52	0.07	0.10	0.17	0.21	0.48	0.21	0.09	0.18	0.01	0.00											
<i>S. sulfurea</i>	0.52	0.04	0.08	0.17	0.21	0.48	0.21	0.08	0.19	0.10	0.09	0.00										
<i>S. surattensis</i>	0.52	0.06	0.07	0.17	0.19	0.46	0.19	0.06	0.17	0.06	0.06	0.05	0.00									
<i>S. timoriensis</i>	0.59	0.19	0.19	0.08	0.26	0.52	0.25	0.16	0.23	0.16	0.17	0.16	0.15	0.00								
<i>S. tora</i>	0.56	0.19	0.21	0.29	0.06	0.50	0.06	0.21	0.04	0.21	0.20	0.20	0.18	0.26	0.00							
<i>Senna</i> sp. 1	0.52	0.02	0.09	0.19	0.20	0.46	0.20	0.08	0.18	0.09	0.08	0.03	0.05	0.18	0.19	0.00						
<i>Senna</i> sp. 2	0.50	0.00	0.09	0.19	0.19	0.45	0.19	0.07	0.18	0.08	0.07	0.04	0.06	0.19	0.19	0.02	0.00					
<i>Senna</i> sp. 3	0.50	0.00	0.09	0.19	0.19	0.45	0.19	0.07	0.18	0.08	0.07	0.04	0.06	0.19	0.19	0.02	0.00	0.00				
<i>Senna</i> sp. 4	0.50	0.00	0.09	0.19	0.19	0.45	0.19	0.07	0.18	0.08	0.07	0.04	0.06	0.19	0.19	0.02	0.00	0.00	0.00			
<i>Senna</i> sp. 5	0.50	0.00	0.09	0.19	0.19	0.45	0.19	0.07	0.18	0.08	0.07	0.04	0.06	0.19	0.19	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00		
<i>Senna</i> sp. 6	0.51	0.01	0.08	0.19	0.19	0.46	0.19	0.07	0.18	0.09	0.08	0.03	0.04	0.18	0.19	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	
<i>Senna</i> sp. 7	0.50	0.00	0.09	0.19	0.19	0.45	0.19	0.07	0.18	0.08	0.07	0.04	0.06	0.19	0.19	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการสำรวจพืชสกุล *Senna* ในประเทศไทยพบ 14 ชนิด โดยไม่พบ 3 ชนิด ได้แก่ ทรงกลด (*S. bicapsularis*) ซึ่งเหลืออเมริกา (*S. floribunda*) และทองนพคุณ (*S. singucana*) ซึ่งมีรายงานพบในประเทศไทย โดย Larsen et al. (1984) คาดว่าเนื่องจากพืชทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นพืชนำเข้ามาปลูก เมื่อไม่ได้รับความนิยมนปลูกจึงค่อยๆ สูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย หรืออาจเหลือน้อยจึงสำรวจไม่พบ ได้ทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดประจำชนิดพืชโดยใช้บริเวณมาตรฐาน 3 บริเวณ ได้แก่ *trnH-psbA* intergenic spacer, *matK* และ *rbcL* พบว่าบริเวณมาตรฐานทั้ง 3 บริเวณนี้เมื่อนำมาสร้างเดนโดรแกรมแล้วให้ผลที่แตกต่างกันเนื่องจากแต่ละบริเวณที่ศึกษามีจำนวนและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด อีกทั้งแต่ละบริเวณที่ใช้ศึกษานั้นเป็นเพียงบางส่วนของจีโนมและจีโนมเท่านั้น

ในการศึกษาค้นพบว่าบริเวณที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดพืชสกุล *Senna* ได้ดีที่สุดคือ บริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer เนื่องจากเป็นบริเวณที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และยังมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0.04-0.60 ซึ่งสูงกว่าบริเวณ *matK* และ *rbcL* โดยสองบริเวณหลังนี้มีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวและระหว่างชนิดไม่เป็นค่ามาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกันระหว่าง *S. spectabilis* 1 กับ *S. spectabilis* 2 อยู่ที่ 0.01 ช่วยสนับสนุนว่าบริเวณนี้มีประสิทธิภาพที่สามารถใช้ระบุชนิดพืชสกุล *Senna* ได้ดีกว่า บริเวณ *matK* และ *rbcL* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kress et al. (2005) ที่กล่าวว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer นั้นแม้จะมีลำดับเบสสั้นเพียงประมาณ 450 คู่เบส แต่ก็ยังเป็นบริเวณที่มีความผันแปรสูงมากในพืชดอกและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้ง่ายในพืชที่เจริญบนพื้นดิน

ทั่วๆ ไป จากการศึกษาพืชทั้งหมด 99 ชนิด 80 สกุล ใน 53 วงศ์ และใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Newmaster et al. (2008) ที่พบว่า บริเวณ *matK* และ *trnH-psbA* intergenic spacer สามารถใช้ในการจำแนกพืชทุกชนิดในสกุล *Compsoneura* ได้

นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาของ Chaveerach et al. (2011) ที่สนับสนุนว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มีความเหมาะสมมากกว่าบริเวณ *rpoC1* และ *matK* ในการศึกษาพืชสกุล *Smilax* และ *Cissus* และการศึกษาพืชสกุล *Cymbidium* ของ Siripiyasing et al. (2012) ที่พบว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าบริเวณ *rpoB*, *rpoC1* และ *matK*

ถึงแม้ว่า Hollingsworth et al. (2009) ได้เสนอบริเวณมาตรฐาน 2 บริเวณ คือ *rbcL* และ *matK* เป็น core barcode regions แต่อย่างไรก็ตาม เขากล่าวถึงบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ว่ามีประสิทธิภาพมากพอที่จะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายบาร์โค้ดได้

สำหรับลำดับเบสของบริเวณมาตรฐานในพืชแต่ละชนิดนี้เก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อให้ผู้สนใจศึกษาจากทั่วโลกสามารถเข้าถึงได้ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ ประจำปี พ.ศ. 2555 รหัสทุน 55131112 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

วิชัย ไชยรัตน์. 2552. แท่งรหัสดีเอ็นเอ (DNA Barcode): รหัสจำแนกสิ่งมีชีวิต. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร AG-BIO 1(3): 14-15.

- อรุณรัตน์ จีวีราช. 2552. อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของพืช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Van den Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L. and Willkinson, M. 2007. New trends in plant systematics: a proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56 (2): 295-299.
- Chaveerach, A., Kritpetcharat, O., Khemtonglang, N., Kritpetcharat, P., Daduang, J., Daduang, S., Suwanrungruang, K., Bletter N. and Sudmoon, R. 2011 Using DNA markers and barcoding to solve the common problem of identifying dried medicinal plants with the examples of Smilax and Cissus in Thailand. *Medicinal Plants Research* 5(15): 3480-3487.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and De Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 270: 313-321.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M.W., Cowan, R.S., Erickson, D.L., Fazekas, A.J., Graham, S.W., James, K.E., Kim, K.J., Kress, W.J., Schneider, H., van Alphen Stahl, J., Barrett, S.C., van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K.S., Cameron, K.M., Carine, M., Chacón, J., Clark, A., Clarkson, J.J., Conrad, F., Devey, D.S., Ford, C.S., Hedderson, T.A., Hollingsworth, M.L., Husband, B.C., Kelly, L.J., Kesanakurti, P.R., Kim, J.S., Kim, Y.D., Lahaye, R., Lee, H.L., Long, D.G., Madriñán, S., Maurin, O., Meusnier, I., Newmaster, S.G., Park, C.W., Percy, D.M., Petersen, G., Richardson, J.E., Salazar, G.A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M.J., Yi, D.K. and Little, D.P. 2009. A DNA barcode for land plants. *PNAS* 106(31): 12794-12797.
- Kress, W.J., Wurdack, K. J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 102(23): 8369-8374.
- Larsen, K., Larsen, S.S. and Vidal, J.E. 1984. Leguminosae–Caesalpinioidae. *Flora of Thailand* 4(1): 102-123.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, A.J. and Janovec, J. 2008. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Mol. Ecol. Resou* 8: 480-490.
- Porebski, S., Bailey, L.G. and Baum B.R. 1997. Modification of a CTAB extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 8-15.
- Siripiyasing, P., Kaenratana, K., Mookamul, P., Tanee, T., Sudmoon, R. and Chaveerach, A. 2012. DNA barcoding of the Cymbidium species (Orchidaceae) in Thailand. *Agricultural Research* 7(3): 393-404.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol* 28: 2731-2739.

Xu, L., Chen, D., Zhu, X., Huang, P., Wei, Z., Sa, R.,
Zhang, D., Bao, B., Wu, D., Sun, H., Gao, X.,
Liu, Y., Chang, Z., Li, J., , Zhang, M., Podlech,
D., Ohashi, H., Larsen, K., Welsh, S.L., Vincent,
M.A., Gilbert, M.G., Pedley, L., Schrire, B.D.,
Yakovlev, G.P., Thulin, M., Nielsen, I.C., Choi,
B., Turland, N.J., Polhill, R.M., Larsen, S.S.,
Hou, D., Iokawa, Y., Wilmot-Dear, C.M. ,
Kenicer, G., Nemoto, T., Michael Lock, J.,
Salinas, A.D., Kramina, T.E., Brach, A.R.,
Bartholomew, B. and Sokoloff, D.D. 2010.
Fabaceae. Flora of China 10: 28-33.