

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลซีเหล็ก (*Senna*) DNA Barcode for Identification of Processed Medicinal *Senna* Species

พรรษา มนต์แข็ง (Pansa Monkheang)^{1*} ดร.อรุณรัตน์ ฉวีราช (Dr.Arunrat Chaveerach)^{**}
ดร.ธวัชชัย ธาณี (Dr.Tawatchai Tanee)^{***} ดร.รุ่งลวลัย สุธมม (Dr.Runglawan Sudmoon)^{****}

บทคัดย่อ

เพื่อสร้างและศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดโดยใช้บริเวณในคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ ได้แก่ *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* intergenic spacer ในพืชสกุลซีเหล็ก และทดสอบระบุชนิดตัวอย่างพืชในสกุลนี้ที่ถูกแปรรูปเป็นยาสมุนไพรรูปแบบต่างๆ จึงได้เก็บตัวอย่างพืชระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา พบทั้งหมด 14 ชนิด เมื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดประจำชนิดพืชพบว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer และ *rbcL* สามารถระบุชนิดของพืชได้ดีโดยมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.029-0.647 และ 0.010-0.062 ตามลำดับ เก็บพืชสมุนไพรที่แปรรูปแล้วจำนวน 11 ตัวอย่าง มาศึกษาสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer และ *rbcL* ได้ 7 ตัวอย่าง นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างพืชสด พบว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ใช้ระบุชนิดของสมุนไพรแปรรูปได้ดีที่สุด โดยระบุชนิดได้ 71.43% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณมาตรฐานในพืชแต่ละชนิดนี้เก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank

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 barcodes were constructed from three chloroplast regions. *trnH-psbA* intergenic spacer and *rbcL* regions show efficient identification with nucleotide variation values of 0.029-0.647 and 0.010-0.062, respectively. However, *matK* region cannot be used for species identification because intra-species nucleotide variation value is higher than inter-species value. Eleven processed medicinal samples were collected and seven samples were successfully DNA extracted and nucleotides sequenced. The resulted sequences were aligned with the known species sequences for identifying species. Of the seven samples, *trnH-psbA* intergenic spacer region shows the highest species identification efficiency. These tag sequences were deposited in GenBank for availability for scientist worldwide.

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอในพลาสติด เครื่องหมายดีเอ็นเอ พืชสกุลซีเหล็ก

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

¹Corresponding author: pan_sa_a@hotmail.com

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

**** นักวิจัยห้องปฏิบัติการ Plant Systematics ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

พืชสกุล *Senna* หรือสกุลชี่เหล็ก เป็นพืชกลุ่มหนึ่งที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์หลายอย่าง เช่น ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ โฝงแฝง (*Senna hirsuta*) และ ชี่เหล็กเลือด (*S. timoriensis*) ใช้ประกอบอาหาร เช่น ชี่เหล็ก (*S. siamea*) ผักหวานบ้าน (*S. sophora*) และชุมเห็ดเทศ (*S. alata*) ใช้เป็นเครื่องดื่ม เช่น ชุมเห็ดไทย (*S. tora*) และ มะขามแขก (*S. alexandrina*) นอกจากนี้ยังนำมาเป็นไม้ประดับตกแต่งบ้านและสวน และสร้างที่อยู่อาศัยได้ เป็นต้น ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยาที่แปรรูปมาจากพืชสกุลดังกล่าวได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ซึ่งผู้ผลิตจะต้องทราบชนิดของพืชที่ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่ต้อง เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นต่อผู้บริโภคและสรรพคุณในการใช้ที่ถูกต้องตามวัตถุประสงค์เพราะหากผู้ผลิตนำพืชคนละชนิดมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตก็อาจก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นการหาวิธีการในการระบุชนิดของพืชให้ถูกต้องจึงมีความจำเป็น โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์สมุนไพรแปรรูปที่อาจมีการปลอมปนได้

นักวิทยาศาสตร์จึงได้พัฒนาเทคโนโลยีทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อช่วยในการระบุชนิดและบอกความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต เช่น การใช้ข้อมูลโปรตีน และข้อมูลดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะข้อมูลระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นหลักฐานแสดงถึงสายวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันได้ [1] การระบุชนิดชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcode) นักวิทยาศาสตร์ได้แนวคิดมาจากการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่างๆ แล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิตเพื่อลดความผิดพลาดที่มีความรวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยอาศัยหลักการว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ แตกต่างไปจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นและ

สามารถจำแนกได้ทุกระยะของพัฒนาการชีวิต [2] นักวิทยาศาสตร์จึงได้เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ของดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูง แต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในการจำแนกสิ่งมีชีวิต

ปัจจุบันองค์กร The Consortium for the Barcode of Life (CBOL), Canadian Centre for DNA Barcoding, Global Biodiversity Information Facility (GBIF) กำลังจัดทำมาตรฐานและคู่มือในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด มาตรฐานที่จัดทำขึ้นใช้ส่วนของยีน cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรียเป็นบาร์โค้ดสำหรับสัตว์และค่อนข้างประสบความสำเร็จมาก [3] สำหรับกลุ่มพืชนั้นอยู่ในขั้นตอนของการทดลองหาบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพลาสมิดเนื่องจากเชื่อถือน่าจะมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการเพียงพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วยให้จำแนกพืชคนละชนิดออกจากกันได้ คือบริเวณ *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*, *accD*, *ndhA*, *ndhJ*, *ndhK*, *YCF5*, *YCF9* และ *rbcL* ต่อมาได้มีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนและบริเวณที่ไม่ถอดรหัสของพืช 3 บริเวณต่อพืช 1 ชนิด โดยเสนอทางเลือกเป็น 2 แนวทาง คือ *rpoC1*, *matK* และ *trnH-psbA* intergenic spacer หรือ *matK*, *rpoB* และ *rpoC1* [4] และล่าสุดได้มีการเสนอบริเวณมาตรฐาน 2 บริเวณ คือ *rbcL* และ *matK* เป็น core barcode regions [5]

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจพืชสกุล *Senna* ในประเทศไทย พร้อมกับระบุชนิดของพืชโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา
2. เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุล *Senna*

3. เพื่อทดสอบการระบุชนิดพืชสมุนไพรสกุล *Senna* ที่แปรรูปแล้วด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

วิธีการวิจัย

1. การเก็บ ระบุชนิด และเตรียมตัวอย่างพืช

สำรวจ เก็บตัวอย่างพืชสกุล *Senna* ในประเทศไทยจากสถานที่ต่างๆ ระบุชนิดพืชด้วยลักษณะฐานวิทยาโดยใช้เอกสารอ้างอิง ได้แก่ วารสาร *Flora of China* เล่ม 10 [6] และ *Flora of Thailand* เล่ม 4 [7] รวมทั้งศึกษาพรรณไม้แห้งที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) เมื่อระบุชนิดของพืชได้แล้วนำยอดอ่อนที่เหลืมาสกัดดีเอ็นเอที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. การสกัดและตรวจสอบดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชดัดแปลงจากวิธีของ Porebski *et al.* (1997) [8] โดยตัดใบพืชสดขนาด 0.5 cm.2 ลงในโกร่ง เติม extraction buffer (50 mM Tris-HCL, 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) ปริมาตร 600 µl บดจนชิ้นตัวอย่างละเอียดแล้วย้ายใส่ 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 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส ขึ้นบนใส microtubes อันใหม่ เติม 2-propanol ปริมาตร 600 µl ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน แล้วปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งให้หมด ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง รอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ที่อุณหภูมิ

อุณหภูมิ 65°C ปริมาตร 80 µl ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis และเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

3. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA intergenic spacer*

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ปริมาตร 30 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1.5 µl, 2xGo Taq® Green Master Mix (Promega) 15 µl, 50 µM Primer ด้าน forward และด้าน reverse อย่างละ 0.6 µl และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 12.3 µl โดยใช้คูไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *matK* คือ 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3' และ 5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTG-GTT C-3' บริเวณ *rbcL* คือ 5'-ATGTCAC-CACAAACAGAG ACTAAAGC-3' และ 5'-GTAAAATCAAGTCCACC RCG-3' บริเวณ *trnH-psbA intergenic spacer* คือ 5'-G TTAT-GCATGAACGTAATGCTC-3' และ 5'-CGCG-CATGGTGGATT CACAATCC-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. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 [9] เพื่อดำเนินการหาความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์แล้วส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชทั้งหมดไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank เพื่อให้ผู้สนใจศึกษาจากทั่วโลกสามารถเข้าถึงได้ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

5. การทดสอบการระบุชนิดของพืชสมุนไพรแปรรูปที่มีส่วนผสมของพืชสกุล *Senna* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

เมื่อได้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมแล้วจึงตรวจสอบการนำไปใช้ระบุชนิดโดยนำตัวอย่างพืชที่ถูกแปรรูปในรูปแบบต่างๆ จำนวน 11 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ด้วยบริเวณมาตรฐานเดียวกันกับตัวอย่างที่ทราบชนิดแล้ว แล้วนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ทราบชนิดแล้วเพื่อระบุว่าเป็นพืชที่นำมา แปรรูปนั้นคือพืชชนิดใด

ผลการวิจัย

1. พืชสกุล *Senna* ที่พบในประเทศไทย

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Senna* ในประเทศไทยพร้อมทั้งระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบทั้งหมด 14 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐาน

ได้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดสำหรับพืชที่สำรวจพบและระบุชนิดได้ถูกต้องแล้วเพื่อใช้เป็นมาตรฐาน ลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank และได้รับ GenBank accession number ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer และ *rbcL* สามารถระบุชนิดของพืชได้ดีโดยมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดอยู่ที่ 0.022 และ 0.007 ซึ่งต่ำกว่าระหว่างชนิด ที่อยู่ในช่วง 0.029-0.647 และ 0.010-0.062 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ 4) ส่วนบริเวณ *matK* พบว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกันคือ *S. spectabilis* 1 กับ *S. spectabilis* 2 มีค่า 0.354 ซึ่งอยู่ในช่วงของความผันแปรระหว่างชนิด คือ 0.035-0.370 (ตารางที่ 5)

3. ผลการทดสอบการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูป

ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มาแล้วนั้น พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและคุณภาพไม่ดีเพราะมีการแตกหักมากแต่ยังคงมีปริมาณมากพอที่จะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสบริเวณ *rbcL* และ *trnH-psbA* intergenic spacer ได้ 7 ตัวอย่างจากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง (ตารางที่ 6 และภาพที่ 1)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปบริเวณ *rbcL* เปรียบเทียบกับพืชที่ทราบชนิดแล้วพบว่า ค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระบุชนิดของสมุนไพรแปรรูป 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 5 และ *Senna* sp. 7 เป็น *S. alexandrina* ซึ่งมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 0.003 ส่วน *Senna* sp. 1 และ *Senna* sp. 6 เป็น *S. siamea* สำหรับ *Senna* sp. 3 และ *Senna* sp. 4 พบว่าตัวอย่างทั้งสองเป็นชนิดเดียวกัน แต่มีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากตัวอย่างที่ทราบชนิดแล้วจึงไม่สามารถระบุชนิดไม่ได้ (ตารางที่ 7)

เมื่อวิเคราะห์จากบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer พบว่าระบุชนิดสมุนไพรแปรรูป 5 ตัวอย่าง ได้แก่ *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4, *Senna* sp. 5 และ *Senna* sp. 7 เป็นชนิดเดียวกับ *S. alexandrina* ซึ่งมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 0.000 ส่วน *Senna* sp. 1 และ *Senna* sp. 6 พบว่ามีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกับตัวอย่างที่ทราบชนิดแล้วจึงไม่สามารถระบุชนิดได้ (ตารางที่ 8)

เมื่อนำทั้งสองบริเวณมาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่า ระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปได้ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4, *Senna* sp. 5 และ *Senna* sp. 7 เป็นชนิดเดียวกับ *S. alexandrina* มีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ 0.003, 0.008, 0.008, 0.003 และ 0.003 ตามลำดับ ส่วน *Senna* sp. 1 และ *Senna* sp. 6

พบว่าเป็นชนิดเดียวกับ *S. siamea* มีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ 0.010 และ 0.008 ตามลำดับ (ตารางที่ 9 และ 10)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการสำรวจพืชสกุล *Senna* ในประเทศไทยพบ 14 ชนิด โดยไม่พบ 3 ชนิด ได้แก่ ทรงกลด (*S. bicapsularis*) ชีเหล็กอเมริกา (*S. floribunda*) และทองนพคุณ (*S. singucana*) ซึ่งมีรายงานพบในประเทศไทยโดย Larsen *et al.* (1984) [7] คาดว่าเนื่องจากพืชทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นพืชนำเข้ามาปลูก เมื่อไม่ได้รับความนิยมนปลูกจึงค่อยๆ สูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย หรืออาจเหลือน้อยจึงสำรวจไม่พบ ได้ทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดประจำชนิดพืชโดยใช้บริเวณมาตรฐาน 3 บริเวณ ได้แก่ *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* intergenic spacer พบว่าบริเวณมาตรฐานทั้ง 3 บริเวณนี้เมื่อนำมาสร้างเดนโดรแกรมแล้วให้ผลที่แตกต่างกัน เนื่องจากแต่ละบริเวณที่ศึกษามีจำนวนและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด อีกทั้งแต่ละบริเวณที่ใช้ศึกษานั้นเป็นเพียงบางส่วนของจีโนมและจีนเท่านั้น โดยบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer และ *rbcL* มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดได้ ไม่ว่าจะเป็นการใช้เพียงบริเวณเดียวหรือทั้งสองบริเวณร่วมกัน แต่อย่างไรก็ตามการใช้เพียงบริเวณเดียวมีประสิทธิภาพมากกว่าการนำสองบริเวณมารวมกัน โดยเฉพาะบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer พบว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุด สอดคล้องกับศึกษาจากฝักกับโฮสต์ [10] การศึกษาพืชสกุล *Cymbidium* [11] การศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน และเครื่องหมายโมเลกุลประจำชนิดของพืชบางชนิดในสกุล *Piper* [12] และการศึกษากล้วยไม้สกุล *Vanda* [13] ช่วยสนับสนุนว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าบริเวณ *rpoB*, *rpoC1* และ *matK* แม้จะมีการเสนอว่า

บริเวณที่เป็น core barcode แต่ก็มียารงานไว้ด้วยว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer เป็นอีกบริเวณหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้ บริเวณมาตรฐานในพืชแต่ละชนิดที่สร้างขึ้นนี้ถูกนำไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank ตาม accession numbers ที่ได้กล่าวแล้วสำหรับการระบุชนิดในการศึกษาต่อไป

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ทราบชนิดแล้วทั้งบริเวณเดียว และสองบริเวณร่วมกัน เพื่อทดสอบการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูป ได้แก่ ตัวอย่างที่ระบุว่ามี *S. alata* เป็นส่วนประกอบ (*Senna* sp. 1 และ *Senna* sp. 6) มี *S. alexandrina* เป็นส่วนประกอบ (*Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4 และ *Senna* sp. 7) และมี *S. tora* เป็นส่วนประกอบ (*Senna* sp. 5) แต่ผลจากการวิเคราะห์ด้วยบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer เพียงบริเวณเดียวพบว่าสมุนไพรแปรรูป 5 ตัวอย่าง ได้แก่ *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4, *Senna* sp. 5 และ *Senna* sp. 7 เป็นชนิดเดียวกับ *S. alexandrina* ทั้งขนาดของแถบดีเอ็นเอและค่าความผันแปรทางพันธุกรรม ส่วน *Senna* sp. 1 และ *Senna* sp. 6 ระบุชนิดไม่ได้ เนื่องจากมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากชนิดอื่น

ส่วนผลจากการวิเคราะห์ด้วยบริเวณ *rbcL* พบว่า *Senna* sp. 1, *Senna* sp. 6 เป็นชนิดเดียวกับ *S. siamea* และ *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 5 และ *Senna* sp. 7 เป็นชนิดเดียวกับ *S. alexandrina* สำหรับ *Senna* sp. 3 และ *Senna* sp. 4 ระบุชนิดไม่ได้ ซึ่งมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากชนิดอื่น เมื่อนำบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มาวิเคราะห์ร่วมกับบริเวณ *rbcL* พบว่า *Senna* sp. 2, *Senna* sp. 3, *Senna* sp. 4, *Senna* sp. 5 และ *Senna* sp. 7 เป็นชนิดเดียวกับ *S. alexandrina* ส่วน *Senna* sp. 1 กับ *Senna* sp. 6 เป็นชนิดเดียวกับ *S. siamea* ซึ่งเมื่อพิจารณา

จากชิ้นตัวอย่างที่เป็นใบแห้งและค่อนข้างสมบูรณ์ของ *Senna* sp. 7 แล้วพบว่าน่าจะเป็น *S. alexandrina* และจากค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งบริเวณเดียว และ สองบริเวณร่วมกันให้ผลตรงกับที่ผู้ขายระบุว่าเป็น *S. alexandrina* เมื่อพิจารณาจากชิ้นตัวอย่างใบแห้งของ *Senna* sp.6 พบว่าไม่ใช่ *S. siamea* อย่างแน่นอนและค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นแตกต่างจาก *S. alata* ที่ผู้ขายระบุไว้มากสำหรับ *Senna* sp. 5 จากทุกบริเวณระบุได้เป็นชนิดเดียวกัน คือ *S. alexandrina* และค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นแตกต่างจาก *S. tora* ที่ผู้ขายระบุไว้มากเช่นกัน

จึงสรุปได้ว่าบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดสมุนไพรได้ คิดเป็น 71.43% ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่ระบุชนิดได้ต้องเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีพืชเพียงชนิดเดียวเป็นส่วนประกอบ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ระบุชนิดไม่ได้อาจเป็นเพราะตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปไม่ใช่พืชในสกุล *Senna* แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปทุกตัวอย่างที่ได้มาก็ไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีพืชสกุล *Senna* เป็นส่วนประกอบตรงตามที่ผู้ขายระบุชนิดไว้หรือไม่ซึ่งจากผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Krishnamurthy และ Francis (2012) กล่าวว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดสามารถระบุชนิดได้แต่ควรใช้ข้อมูลอื่นๆ ประกอบด้วย เช่น ข้อมูลระดับโมเลกุลอย่างอื่น ลักษณะสัณฐานวิทยา พฤติกรรมสิ่งแวดล้อม และภูมิศาสตร์ เพื่อให้ผลการวิจัยเกิดความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น [6]

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

1. Chaveerach A. Plant molecular systematics. Faculty of Science Khon Kaen University: Khon Kaen; 2009.
2. Kositrattana W. DNABarcode. AG-BIO. 2009; 1(3): 14-15. Thai.
3. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences. 2003; 270: 313-321.
4. Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, Van den Berg C, Madrinan S, Petersen G. *et al.* New trends in plant systematics: a proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. Taxon. 2007; 56(2): 295-299.
5. Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M. *et al.* A DNA barcode for land plants. PNAS. 2009; 106(31): 12794-12797.
6. Xu L, Chen D, Zhu X, Huang P, Wei Z, Sa R. *et al.* Fabaceae. Flora of China. 2010; 10: 28-33.
7. Larsen K, Larsen SS, Vidal JE. Leguminosae-Caesalpinioideae. Flora of Thailand. 1984; 4(1): 102-123.
8. Porebski S, Bailey LG, Baum BR. Modification of a CTAB extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. Plant Molecular Biology Reporter. 1997; 15: 8-15.

9. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28: 2731-2739.
10. Kwanda N, Noikotr K, Sudmoon R, Tanee T, Chaveerach A. Medicinal parasitic plants on diverse hosts with their usages and barcodes. *Natural Medicines*. 2012; DOI: 10.1007/s11418-012-0695-2.
11. Siripiyasing P, Kaenratana K, Mookamul P, Tanee T, Sudmoon R, Chaveerach A. DNA barcoding of the Cymbidium species (Orchidaceae) in Thailand. *Agricultural Research*. 2012; 7(3): 393-404.
12. Sudmoon R, Tanee T, Wongpanich V, Bletter N, Chaveerach A. Ethnobotany and species specific molecular markers of some medicinal sakhan (*Piper*, Piperaceae). *Medicinal Plants Research*. 2012; 6(7): 1168-1175.
13. Tanee T, Chadmuk P, Sudmoon R, Chaveerach A, Noikotr K. Genetic analysis for identification, genomic template stability in hybrids, and barcodes of the *Vanda* species (Orchidaceae) of Thailand. *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11(55): 11772-11781.
14. Krishnamurthy PK, Francis RA. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodivers Conserv*. 2012; DOI: 10.1007/s10531-012-0306-2.

ตารางที่ 1 ชนิดพืชตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่างพืช

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.) Irwin and Barneby	ขี้เหล็กยะวา	จ. เชียงใหม่
<i>S. garrettiana</i> (Craib) Irwin and Barneby	แสมสาร	จ. ขอนแก่น
<i>S. hirsuta</i> (L.) Irwin and Barneby	โพงผาง	จ. ร้อยเอ็ด
<i>S. occidentalis</i> (L.) Link	ชุมเห็ดเล็ก	จ. ขอนแก่น
<i>S. pallida</i> (Vahl) Irwin and Barneby	เหลืองออสเตรเลีย	จ. สระบุรี
<i>S. siamea</i> (Lam.) Irwin and Barneby	ขี้เหล็ก	จ. ขอนแก่น
<i>S. sophora</i> (L.) Roxb.	ผักหวานบ้าน	จ. ขอนแก่น
<i>S. spectabilis</i> (DC.) Irwin and Barneby	ขี้เหล็กอเมริกัน	จ. ขอนแก่น
<i>S. sulfurea</i> (DC. ex Colla) Irwin and Barneby	ตรึงบาดาล	จ. ขอนแก่น
<i>S. surattensis</i> (Burm.f.) Irwin and Barneby	ทรงบาดาล	จ. ขอนแก่น
<i>S. timoriensis</i> (DC.) Irwin and Barneby	ขี้เหล็กเลือด	จ. เลย
<i>S. tora</i> (L.) Roxb.	ชุมเห็ดไทย	จ. ขอนแก่น

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. sophora</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 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Senna* จากบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05

	<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 1</i>	<i>S. spectabilis 2</i>	<i>S. sulfurea</i>	<i>S. surattensis</i>	<i>S. timoriensis</i>	<i>S. tora</i>
<i>Senna alata</i>	0.000														
<i>S. alexandrina</i>	0.561	0.000													
<i>S. fruticosa</i>	0.590	0.144	0.000												
<i>S. garrettiana</i>	0.590	0.201	0.230	0.000											
<i>S. hirsuta</i>	0.597	0.216	0.252	0.137	0.000										
<i>S. occidentalis</i>	0.360	0.511	0.518	0.504	0.518	0.000									
<i>S. pallida</i>	0.568	0.201	0.209	0.122	0.072	0.489	0.000								
<i>S. siamea</i>	0.590	0.194	0.216	0.072	0.094	0.496	0.065	0.000							
<i>S. sophora</i>	0.568	0.201	0.237	0.137	0.065	0.489	0.079	0.094	0.000						
<i>S. spectabilis 1</i>	0.576	0.115	0.108	0.180	0.209	0.511	0.187	0.173	0.209	0.000					
<i>S. spectabilis 2</i>	0.568	0.101	0.094	0.187	0.216	0.518	0.194	0.180	0.209	0.022	0.000				
<i>S. sulfurea</i>	0.576	0.086	0.094	0.209	0.223	0.518	0.201	0.201	0.216	0.079	0.065	0.000			
<i>S. surattensis</i>	0.576	0.101	0.072	0.180	0.194	0.504	0.173	0.173	0.187	0.043	0.029	0.036	0.000		
<i>S. timoriensis</i>	0.647	0.281	0.266	0.137	0.216	0.568	0.201	0.187	0.201	0.230	0.245	0.252	0.223	0.000	
<i>S. tora</i>	0.583	0.194	0.230	0.115	0.065	0.504	0.065	0.072	0.065	0.187	0.194	0.201	0.173	0.201	0.000

ตารางที่ 4 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Senna* จากบริเวณ *rbcL* สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05

	<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 1</i>	<i>S. spectabilis 2</i>	<i>S. sulfurea</i>	<i>S. surattensis</i>	<i>S. timoriensis</i>	<i>S. tora</i>
<i>Senna alata</i>	0.000														
<i>S. alexandrina</i>	0.016	0.000													
<i>S. fruticosa</i>	0.026	0.016	0.000												
<i>S. garrettiana</i>	0.033	0.023	0.026	0.000											
<i>S. hirsuta</i>	0.020	0.023	0.030	0.039	0.000										
<i>S. occidentalis</i>	0.033	0.023	0.030	0.039	0.033	0.000									
<i>S. pallida</i>	0.020	0.010	0.016	0.026	0.020	0.020	0.000								
<i>S. siamea</i>	0.023	0.013	0.020	0.030	0.023	0.016	0.010	0.000							
<i>S. sophora</i>	0.010	0.013	0.023	0.023	0.016	0.030	0.016	0.020	0.000						
<i>S. spectabilis 1</i>	0.030	0.013	0.023	0.036	0.036	0.036	0.023	0.026	0.026	0.000					
<i>S. spectabilis 2</i>	0.030	0.020	0.023	0.036	0.036	0.036	0.023	0.026	0.026	0.007	0.000				
<i>S. sulfurea</i>	0.030	0.020	0.020	0.016	0.030	0.030	0.016	0.020	0.026	0.033	0.033	0.000			
<i>S. surattensis</i>	0.016	0.020	0.030	0.036	0.013	0.036	0.023	0.026	0.013	0.033	0.033	0.033	0.000		
<i>S. timoriensis</i>	0.039	0.030	0.033	0.046	0.039	0.033	0.026	0.030	0.036	0.039	0.039	0.036	0.043	0.000	
<i>S. tora</i>	0.056	0.046	0.052	0.062	0.056	0.052	0.043	0.046	0.052	0.059	0.059	0.052	0.059	0.062	0.000

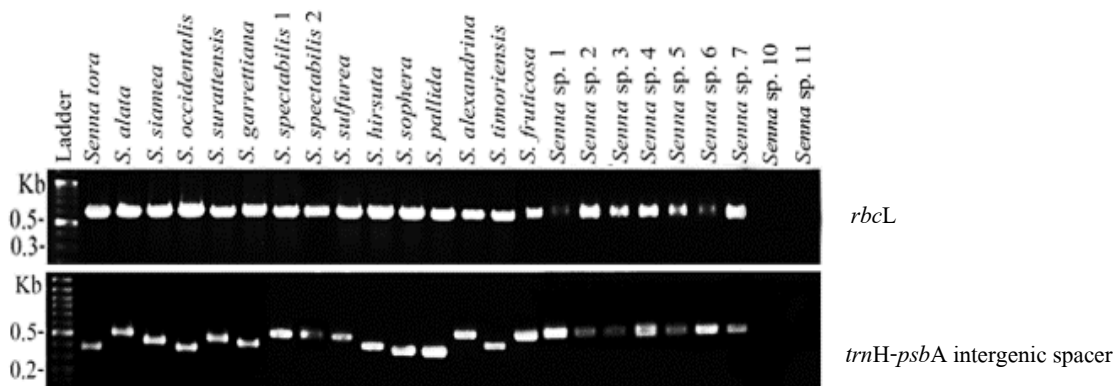
ตารางที่ 5 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Senna* จากบริเวณ *matK* สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05

	<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 alata</i>	0.000														
<i>S. alexandrina</i>	0.112	0.000													
<i>S. fruticosa</i>	0.119	0.145	0.000												
<i>S. garrettiana</i>	0.071	0.128	0.134	0.000											
<i>S. hirsuta</i>	0.121	0.144	0.129	0.132	0.000										
<i>S. occidentalis</i>	0.081	0.144	0.150	0.095	0.104	0.000									
<i>S. pallida</i>	0.129	0.158	0.163	0.137	0.158	0.144	0.000								
<i>S. siamea</i>	0.086	0.145	0.150	0.047	0.150	0.111	0.147	0.000							
<i>S. sophora</i>	0.105	0.129	0.137	0.118	0.083	0.078	0.142	0.135	0.000						
<i>S. spectabilis</i> 1	0.151	0.180	0.155	0.167	0.160	0.164	0.188	0.184	0.168	0.000					
<i>S. spectabilis</i> 2	0.332	0.341	0.351	0.354	0.360	0.360	0.348	0.370	0.357	0.354	0.000				
<i>S. sulfurea</i>	0.088	0.129	0.111	0.098	0.134	0.111	0.145	0.118	0.122	0.153	0.353	0.000			
<i>S. surattensis</i>	0.076	0.128	0.131	0.065	0.135	0.094	0.145	0.088	0.119	0.171	0.354	0.085	0.000		
<i>S. timoriensis</i>	0.128	0.155	0.153	0.135	0.145	0.150	0.174	0.153	0.142	0.164	0.354	0.119	0.142	0.000	
<i>S. tora</i>	0.069	0.134	0.137	0.088	0.096	0.035	0.140	0.105	0.072	0.155	0.355	0.101	0.085	0.142	0.000

ตารางที่ 6 ตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปที่มีพืชสกุล *Senna* เป็นส่วนผสม

ตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปที่มีส่วนผสมของพืชสกุล <i>Senna</i>	กำหนดเป็น	ผลการทำ PCR จากบริเวณมาตรฐาน	
		<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>
		intergenic spacer	
1. ชาขงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของชุมเห็ดเทศ	<i>Senna</i> sp. 1	/	/
2. ยาอัดเม็ดที่มีส่วนผสมของมะขามแขก	<i>Senna</i> sp. 2	/	/
3. ชาขงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของมะขามแขก	<i>Senna</i> sp. 3	/	/
4. ยาเม็ดแคปซูลที่มีส่วนผสมของมะขามแขก	<i>Senna</i> sp. 4	/	/
5. ชาขงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของชุมเห็ดไทย	<i>Senna</i> sp. 5	/	/
6. ใบชุมเห็ดเทศแห้งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาสมุนไพร	<i>Senna</i> sp. 6	/	/
7. ใบมะขามแขกแห้งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาสมุนไพร	<i>Senna</i> sp. 7	/	/
8. ชาขงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของขี้เหล็ก	<i>Senna</i> sp. 8	x	x
9. ยาน้ำที่มีส่วนผสมของขี้เหล็ก	<i>Senna</i> sp. 9	x	x
10. ยาเม็ดแคปซูลที่มีส่วนผสมของแสมสาร	<i>Senna</i> sp. 10	x	x
11. ยาเม็ดแคปซูลที่มีส่วนผสมของขี้เหล็ก	<i>Senna</i> sp. 11	x	x

/: เพิ่มปริมาณโดย PCR ได้สำเร็จ x : เพิ่มปริมาณโดย PCR ไม่สำเร็จ



ภาพที่ 1 แลตติเอ็นเอบริเวน *trnH-psbA* intergenic spacer และ *rbcL* พืชสกุล *Senna* และตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปที่มีพืชสกุล *Senna* เป็นส่วนผสม

ตารางที่ 7 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Senna* และตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปจากบริเวณ *rbcL* สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05

	<i>Senna 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 1</i>	<i>S. spectabilis 2</i>	<i>S. sulfurea</i>	<i>S. surattensis</i>	<i>S. timoriensis</i>	<i>S. tora</i>
<i>Senna</i> sp. 1	0.023	0.013	0.020	0.030	0.023	0.023	0.010	0.007	0.020	0.023	0.023	0.020	0.026	0.030	0.046
<i>Senna</i> sp. 2	0.013	0.003	0.013	0.020	0.020	0.020	0.007	0.010	0.010	0.013	0.013	0.017	0.017	0.026	0.043
<i>Senna</i> sp. 3	0.020	0.010	0.020	0.026	0.026	0.026	0.013	0.017	0.017	0.020	0.020	0.023	0.023	0.033	0.050
<i>Senna</i> sp. 4	0.020	0.010	0.020	0.026	0.026	0.026	0.013	0.017	0.017	0.020	0.020	0.023	0.023	0.033	0.050
<i>Senna</i> sp. 5	0.013	0.003	0.013	0.020	0.020	0.020	0.007	0.010	0.010	0.013	0.013	0.017	0.017	0.026	0.043
<i>Senna</i> sp. 6	0.020	0.010	0.017	0.026	0.020	0.020	0.007	0.003	0.017	0.020	0.020	0.017	0.023	0.026	0.043
<i>Senna</i> sp. 7	0.013	0.003	0.013	0.020	0.020	0.020	0.007	0.010	0.010	0.013	0.013	0.017	0.017	0.026	0.043

ตารางที่ 8 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Senna* และตัวอย่างสมุนไพรรูปจากบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05

	<i>Senna 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 1</i>	<i>S. spectabilis 2</i>	<i>S. sulfurea</i>	<i>S. surattensis</i>	<i>S. timoriensis</i>	<i>S. tora</i>
<i>Senna</i> sp. 1	0.517	0.021	0.090	0.186	0.200	0.462	0.200	0.076	0.179	0.090	0.083	0.034	0.048	0.179	0.193
<i>Senna</i> sp. 2	0.503	0.000	0.090	0.186	0.193	0.448	0.193	0.069	0.179	0.076	0.069	0.041	0.055	0.193	0.186
<i>Senna</i> sp. 3	0.503	0.000	0.090	0.186	0.193	0.448	0.193	0.069	0.179	0.076	0.069	0.041	0.055	0.193	0.186
<i>Senna</i> sp. 4	0.503	0.000	0.090	0.186	0.193	0.448	0.193	0.069	0.179	0.076	0.069	0.041	0.055	0.193	0.186
<i>Senna</i> sp. 5	0.503	0.000	0.090	0.186	0.193	0.448	0.193	0.069	0.179	0.076	0.069	0.041	0.055	0.193	0.186
<i>Senna</i> sp. 6	0.510	0.014	0.083	0.186	0.193	0.455	0.193	0.069	0.179	0.090	0.083	0.028	0.041	0.179	0.186
<i>Senna</i> sp. 7	0.503	0.000	0.090	0.186	0.193	0.448	0.193	0.069	0.179	0.076	0.069	0.041	0.055	0.193	0.186

ตารางที่ 9 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Senna* และตัวอย่างสมุนไพรรูปจากบริเวณ *trnH-psbA* intergenic spacer ร่วมกับ *rbcL* สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05

	<i>Senna 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 1</i>	<i>S. spectabilis 2</i>	<i>S. sulfurea</i>	<i>S. surattensis</i>	<i>S. timoriensis</i>	<i>S. tora</i>
<i>Sennasp.1</i>	0.168	0.023	0.033	0.096	0.099	0.165	0.091	0.010	0.091	0.038	0.033	0.036	0.048	0.099	0.109
<i>Sennasp.2</i>	0.150	0.003	0.028	0.086	0.094	0.152	0.086	0.015	0.084	0.030	0.025	0.036	0.043	0.099	0.104
<i>Sennasp.3</i>	0.155	0.008	0.033	0.091	0.099	0.157	0.091	0.020	0.089	0.036	0.030	0.041	0.048	0.104	0.109
<i>Sennasp.4</i>	0.155	0.008	0.033	0.091	0.099	0.157	0.091	0.020	0.089	0.036	0.030	0.041	0.048	0.104	0.109
<i>Sennasp.5</i>	0.150	0.003	0.028	0.086	0.094	0.152	0.086	0.015	0.084	0.030	0.025	0.036	0.043	0.099	0.104
<i>Sennasp.6</i>	0.160	0.015	0.025	0.094	0.091	0.157	0.084	0.008	0.086	0.033	0.028	0.028	0.041	0.096	0.102
<i>Sennasp.7</i>	0.150	0.003	0.028	0.086	0.094	0.152	0.086	0.015	0.084	0.030	0.025	0.036	0.043	0.099	0.104

ตารางที่ 10 ผลการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปที่มีพืชสกุล *Senna* เป็นส่วนผสม

ตัวอย่างสมุนไพรแปรรูปที่มีพืชสกุล <i>Senna</i> เป็นส่วนผสม	ชนิดที่ระบุได้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากบริเวณมาตรฐาน		
	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i> intergenic spacer	<i>rbcL+trnH-psbA</i> intergenic spacer
<i>Senna</i> sp. 1 ที่ระบุว่ามี <i>Senna alata</i>	<i>S. siamea</i>	Unknown	<i>S. siamea</i>
<i>Senna</i> sp. 2 ที่ระบุว่ามี <i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>
<i>Senna</i> sp. 3 ที่ระบุว่ามี <i>S. alexandrina</i>	Unknown	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>
<i>Senna</i> sp. 4 ที่ระบุว่ามี <i>S. alexandrina</i>	Unknown	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>
<i>Senna</i> sp. 5 ที่ระบุว่ามี <i>S. tora</i>	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>
<i>Senna</i> sp. 6 ที่ระบุว่ามี <i>S. alata</i>	<i>S. siamea</i>	Unknown	<i>S. siamea</i>
<i>Senna</i> sp. 7 ที่ระบุว่ามี <i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>	<i>S. alexandrina</i>