

บทคัดย่อ

พืชในวงศ์ Acanthaceae จัดเป็นไม้ล้มลุกพบมากในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ประกอบด้วยสมาชิกกว่า 3,450 สปีชีส์ ในกว่า 300 สกุล จากจำนวนดังกล่าว หลายสปีชีส์ได้ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรในประเทศไทยซึ่งมักมีการจำหน่ายในรูปแบบที่แปรรูปแล้วซึ่งยากต่อการระบุชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา งานวิจัยชิ้นนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค Barcode DNA High Resolution Melting (Bar-HRM) ในการระบุชนิดพืชสมุนไพรไทยที่เป็นที่นิยมของคนไทย โดยเน้นพืชในวงศ์ Acanthaceae ซึ่งไม่ต้องอาศัยความชำนาญเชิงอนุกรมวิธานและรวดเร็ว แม่นยำ การทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก ส่วนแรกคือการวิเคราะห์หาตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการระบุชนิดพืชสมุนไพรทั่วไป และ ตัวอย่างเฉพาะพืชในวงศ์ Acanthaceae โดยเลือกตำแหน่งบนคลอโรพลาสต์จีโนมมา 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *matK* *rbcL* *rpoC* *trnL* และเลือกตำแหน่งบนนิวเคลียร์จีโนมมา 1 ตำแหน่ง คือ ITS2 ผลการศึกษาพบว่า จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เป็นที่นิยมใช้จากตำแหน่งบนคลอโรพลาสต์จีโนม 4 ตำแหน่งพบว่า *rpoC1* มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากทั้ง 4 ตำแหน่ง ในขณะที่ *matK* ได้ผลแย่ที่สุดในการระบุชนิดพืชสมุนไพรไทย โดยคิดเป็นอัตราความสำเร็จ 58% สำหรับ *rpoC1* และ 15% สำหรับ *matK* และเมื่อลองใช้หลายตำแหน่งร่วมกัน (2-4 ตำแหน่ง) ในการระบุชนิด พบอัตราความสำเร็จอยู่ในช่วง 81–99% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่นำมาใช้ร่วมกัน ส่วนจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of ITS2 นั้นผลพบว่าอาจมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับเทคนิค Bar-HRM เพื่อใช้แยกชนิดพืชในวงศ์ Acanthaceae เนื่องจากมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุด (88.12%) และมีสัดส่วนเบส GC สูงสุด (66.79%) ส่วนที่สองคือ การทดลองใช้เทคนิค Bar-HRM ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการสุ่มตรวจสมุนไพรในท้องตลาด โดยเป็นผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรไทยในวงศ์ Acanthaceae เช่น ฟ้าทะลายโจร ทองพันชั่ง และเหงือกปลาหมอ ซึ่งได้ผลสำเร็จเป็นที่น่าพอใจในการนำเทคนิค Bar-HRM ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการสุ่มตรวจสมุนไพรในท้องตลาด จากการสุ่มตรวจผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรไทยในวงศ์ Acanthaceae ที่วางขายโดยพบว่าผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลาย (*Andrographis paniculata*) ที่นำมาตรวจ 10 ตัวอย่าง เป็นฟ้าทะลายโจรตามที่ฉลากระบุจริง แต่ในการสุ่มตรวจสมุนไพรมา 3 ชนิดที่นิยมใช้ซึ่งอยู่ในวงศ์ Acanthaceae โดยไม่ได้มีบรรจุการห่อที่วางขายอยู่ตามท้องตลาด จำนวน 15 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน 3 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาสามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้

Key words: Bar-HRM; DNA barcoding; Herbal pharmacovigilance; High Resolution Melting; Medicinal plants

ABSTRACT

Acanthaceae is a family of herbaceous plant existing throughout tropical and subtropical areas consisting of about 3,450 species in 300 genera. Among these, many are recognized in traditional Thai medicine records and commercialized in various processed forms posing problem in authenticity. Here, we evaluate the feasibility of technique Barcode DNA High Resolution Melting Analysis (Bar-HRM) in species identification of medicinal plants which is rapid, sensitive, and requires no taxonomical expertise. In doing so, two main parts of experiment were set up. First popular barcoding regions; ITS2 (from nuclear genome), *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL* and *trnL* (from chloroplast genome) of medicinal plants were downloaded from GenBank and sequence profiles were then compared in order to address the most suitable marker for Bar-HRM analysis. Our results show that, in single locus analysis the *rpoC1* primer set gave the highest discrimination (58%), and in multi locus analysis this could be increased from 87 – 99% depending on the total number of regions included. Different combinations proved to be more or less effective at discrimination, depending on the genus or family examined. In addition, *in silico* analysis suggested that internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibiting the highest nucleotide variability (88.12%) and richest GC content (66.79%), is thus likely to be the most suitable marker for Bar-HRM in discrimination of plant species in Acanthaceae. Second part of the experiment is to use the developed Bar-HRM method in authenticating commercial herbal products sold on markets. Ten “Fah Talai Jone” (*Andrographis paniculata*) products were included in the test and the analysed results indicated that all tested products contain “Fah Talai Jone” as promise on the product labels. However, the test of local products without proper packaging of three commonly used Acanthaceae species found that of all fifteen test samples, there are three of tested products did not contain the indicated species. Thus, the developed technique (Bar-HRM) was proved useful in species identification which demonstrates the robustness of this technique for application in herbal authentication.

Keywords: Bar-HRM; DNA barcoding; Herbal pharmacovigilance; High Resolution Melting; Medicinal plants