

# รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

## 1. แผนงานวิจัย

แผนบูรณาการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม

## 2. โครงการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ  
กิจกรรม ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชท้องถิ่น

## 3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์คิลา (Aquifoliaceae) ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Diversity and DNA Barcodes of Aquifoliaceae

## 4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวกาญจนา พฤษพันธ์<sup>1</sup>

ผู้ร่วมงาน นางอัญชลี แก้วดวง<sup>2</sup> นายธีรวิทย์ วงศ์วิรัตน์<sup>3</sup>

## 5. บทคัดย่อ

การศึกษาทางอนุกรมวิธานของพืชวงศ์คิลา (Aquifoliaceae) ในประเทศไทยยังมีความคลุมเครือ ข้อมูลทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอในการระบุชื่อหรือจำแนกชนิดพืชออกเป็นกลุ่มเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลความหลากหลายของพืชวงศ์คิลาได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คิลาในประเทศไทย โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ผลการศึกษาได้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอในการระบุยืนยันความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์คิลาในประเทศไทยทั้งสิ้น 54 ข้อมูล ประกอบด้วย GenBank accession หมายเลข MT114079–MT114117 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอของพืชวงศ์คิลาที่มีการศึกษาเป็นครั้งแรกในประเทศไทยจำนวน 14 ชนิด ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชด้วยข้อมูลดีเอ็นเอช่วยยืนยันความถูกต้องในการระบุชื่อพืชและจำแนกพืชออกเป็นกลุ่มสอดคล้องกับการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน 3 Subgenus (Subg) และ 5 Section (Sect.) คือ 1) Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ประกอบด้วย *Ilex odorata* และ *I. pubifruca*; 2) Subg. *Byronia* มี 3 Sect. คือ Sect. *Byronia* ประกอบด้วย *I. cymosa*, *I. wallichii*, *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2), Sect. *Lioprinus* ประกอบด้วย *I. umbellulata* และ *Ilex* sp. (3) และ Sect. *Paltoria* ประกอบด้วย *I. triflora*; และ 3) Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* ประกอบด้วย *I. micrococca* นอกจากนี้ พบการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอไม่สอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐาน ประกอบด้วย *I. denticulata* และ *I. embelioides* ที่ให้ผลการแยกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอใกล้ชิดกับชนิดพืชใน Subg. *Byronia* แต่การจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานจัดพืชทั้งสองชนิดอยู่ภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ส่วน *I. ficoidea* ที่ถูกจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานกลุ่มเดียวกับพืชทั้งสองชนิดดังกล่าวมาข้างต้น กลับให้ผลการแยกกลุ่มด้วยข้อมูลดี

<sup>1</sup> สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

<sup>2</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

<sup>3</sup> ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

เอ็นเอใกล้ชิดกับพืชใน Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* และพบ *Ilex* sp. (4) จับกลุ่มใกล้ชิดกับชนิดพืชใน Subg. *Aquifolium* ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียร์ แต่กลับแสดงความใกล้ชิดกับชนิดพืชทั้งใน Subg. *Aquifolium* และ Subg. *Prinos* ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ จึงควรศึกษาทบทวนข้อมูลดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชที่ยังไม่มีความชัดเจนในการจำแนกกลุ่มจากงานวิจัยนี้เพิ่มเติมอีกครั้ง เพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์ลีลามีความสมบูรณ์มากขึ้น

## ABSTRACT

Taxonomic study on Aquifoliaceae in Thailand is still unclear. Morphological information alone is not sufficient for identification or classification of the family diversity. This study aimed to use DNA barcode technique to clarify the species diversity and phylogenetic relationships of Aquifoliaceae in Thailand. The DNA barcodes of *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* and ITS were examined to investigate the placement of Thai species. The study resulted of 54 GenBank accession numbers of MT114079–MT114117 representing 14 species of Aquifoliaceae. The phylogenetic analysis based on DNA data has shown the congruence of species identification and classification based on morphology. Ten *Ilex* species are divided into 3 Subgenera (Subg.) and 5 Sections (Sect): 1) Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* comprises *I. odorata* and *I. pubifrutta*; 2) Subg. *Byronia* Sect. *Byronia* comprises *I. cymosa*, *I. wallichii*, *Ilex* sp. (1) and *Ilex* sp. (2), Sect. *Lioprinus* comprises *I. umbellulata* and *Ilex* sp. (3), Sect. *Paltoria* comprises only *I. triflora*; 3) Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* comprises only *I. micrococca*. However, the DNA classification misplaced *I. denticulata* and *I. embelioides* with the member of Subg. *Byronia* and *I. ficoidea* with the member of Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* whereas morphological classification placed them under Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium*. The DNA classification also suggested indistinct placement for *Ilex* sp. (4). The species placed with members of Subg. *Aquifolium* based on nuclear data but placed with both members of Subg. *Aquifolium* and Subg. *Prinos* based on chloroplast data. The indefinable information from the present study should be further revised for a complete research on diversity of Aquifoliaceae in Thailand.

## 6. คำนำ

พืชวงศ์คิลลา (Aquifoliaceae) จัดเป็นกลุ่มพืชที่มีศักยภาพสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งทางการแพทย์อาหาร สมุนไพร ไม้ประดับ หรือเชื้อเพลิง (Sosef *et al.*, 1998; Chen & Feng, 1999; Gorzalczy *et al.*, 2001; Rodd & Bryant, 2007; Gu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2013) มีการกระจายพันธุ์อยู่ในวงจำกัด และมีสมาชิกทั่วโลกมากกว่า 500 ชนิด (Galle, 1997) ในขณะที่ในประเทศไทยกลับมีรายงานพบเพียง 5 ชนิด (Craib, 1931) และไม่ได้มีการบรรยายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชนิดพืชเหล่านั้น การศึกษาวิจัยความหลากหลายและอนุกรมวิธานของชนิดพืชในวงศ์คิลลาได้เริ่มขึ้นอย่างจริงจังโดย Pruesapan *et al.* (2014) พบจำนวนชนิดของพืชวงศ์คิลลามากถึง 15 ชนิด หลังจากนั้นได้ตีพิมพ์เผยแพร่ *Ilex pubifructa* Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson เป็นพืชชนิดใหม่ของโลก (Pruesapan *et al.*, 2017) อย่างไรก็ตาม การระบุชนิดพืชสกุล *Ilex* L ในประเทศไทยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความคลุมเครือ เนื่องจากพืชสกุล *Ilex* เป็นพืชแยกเพศอยู่ต่างต้น อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความผันแปรสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาไม่มีส่วนสืบพันธุ์ที่ครบสมบูรณ์ทั้งดอกเพศผู้ ดอกเพศเมีย พร้อมทั้งผลและเมล็ดแล้ว ทำให้ยากต่อการระบุชื่อพืชของนักอนุกรมวิธาน ลักษณะทั่วไปของพืชในวงศ์นี้มีความใกล้เคียงกันมาก และมักพบความผิดพลาดในการระบุชื่อปรากฏอยู่บนชิ้นตัวอย่างพรรณไม้อ่างอิงที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาและเทียบเคียงพรรณไม้เสมอจากการจำแนกและระบุชื่อพืชโดยใช้เฉพาะข้อมูลสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ภายหลังจึงมีการนำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) มาช่วยในการยืนยันชนิดและแสดงความใกล้เคียงของพืชวงศ์คิลลาอย่างแพร่หลาย โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอทั้งบริเวณของคลอโรพลาสต์และนิวเคลียร์ร่วมกัน เช่น *rbcl*, *matK*, *trnL-F*, *psbA-trnH*, ITS, ETS, *gapC* และ *nepGS* (Hao *et al.*, 2013; Setoguchi & Watanabe, 2000; Shi *et al.*, 2016; Yang *et al.* 2018) อีกทั้งยังใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดเหล่านี้ในการพิสูจน์ความสับสนในการระบุชื่อพืชที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกันมากสำเร็จ เช่น *I. formosana* และ *I. tetramera* (Yang *et al.*, 2018) รวมถึงการใช้ตรวจสอบลูกผสมที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ เช่นพบว่า *I. dabieshanensis* เป็นลูกผสมระหว่าง *I. cornuta* กับ *I. latifolia* (Shi *et al.*, 2016) เป็นต้น ซึ่งการได้ทราบต้นกำเนิดของชนิดพืชที่ผสมข้ามเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานด้านอนุกรมวิธานพืช วิวัฒนาการ และการอนุรักษ์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์คิลลาในประเทศไทย และเก็บเป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอในการระบุยืนยันชนิดของพืช และ 2) ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คิลลา (Aquifoliaceae) ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ และเปรียบเทียบความใกล้เคียงของชนิดพืชที่ถูกแบ่งด้วยข้อมูลทางสัณฐาน ซึ่งข้อมูลดีเอ็นเอของชนิดพืชวงศ์คิลลาที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็ประโยชน์สำคัญในการจัดทำบัญชีรายชื่อของพรรณพืชที่ทำการศึกษาจำแนกแล้ว เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการวางแผนการอนุรักษ์ความหลากหลายของพืชและการนำไปใช้ประโยชน์เชิงเศรษฐกิจของประเทศ

## 7. วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

#### 1. ตัวอย่างพืชที่ศึกษา

<sup>1</sup> สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

<sup>2</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

<sup>3</sup> ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

ตัวอย่างพืชวงศ์คลิลา (Aquifoliaceae) สกุล *Ilex* L. ที่ใช้วิเคราะห์เป็น Ingroup taxa ประกอบด้วย พืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ จำนวน 19 ตัวอย่าง (taxa) (ตารางที่ 1) และตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการเก็บบันทึกไว้บนเว็บไซต์ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์ จำนวน 14 taxa โดยคัดเลือกจากชนิดพืชที่มีจีโนมสมบูรณ์ และคัดเลือกศึกษาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 3 บริเวณ *matK*, *rpl32-trnL* และ *trnL-trnF* และตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนิวเคลียร์ จำนวน 22 taxa (ตารางที่ 2) โดยพืชวงศ์คลิลาที่คัดเลือกมาเป็น Ingroup taxa เป็นตัวแทนชนิดพืชที่จัดจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดย Galle (1997) ส่วนตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์เป็น Outgroup taxa ของบริเวณคลอโรพลาสต์ ประกอบด้วย *Helwingia himalaica* (Helwingiaceae) และ *Gonocaryum lobbianum* (Cardiopteridaceae) ส่วน Outgroup taxa ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนิวเคลียร์ คือ *Helwingia chinensis* (Helwingiaceae) และ *Phyllonoma ruscifolia* (Phyllonomaceae) ซึ่งเป็นพืชที่มีความใกล้ชิดกับวงศ์ Aquifoliaceae และจัดอยู่ใน Order Aquifolales เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 2)

## 2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล

2.1 วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล เช่น Micropipette ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร; Pipet Tips ขนาด 0.5-10, 1-200 และ 1,000 ไมโครลิตร; หลอดไมโครเซนติพีทส์ ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร, เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง, เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ, เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก, เครื่อง Incubator, เครื่องเขย่า, ชุดเตรียมเจลอกาโรส, เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis), เครื่องเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ Thermal cycler, เครื่องตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ Gel documentation System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), ชุดโกรังบด ฯลฯ

2.2. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), ไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen), แอลกอฮอล์บริสุทธิ์

2.3. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ได้แก่ ไพรเมอร์บริเวณคลอโรพลาสต์ 3 คู่ คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และไพรเมอร์บริเวณนิวเคลียร์ คือ ITS รายละเอียดของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ แสดงไว้ในตารางที่ 3, ชุดน้ำยาปฏิกิริยา Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) และน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Life Technologies, USA)

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอและผลผลิตดีเอ็นเอ ได้แก่ ผงอะกาโรส (Agarose powder) เป็นตัวกลางในการแยกสารด้วยประจุไฟฟ้า, 10x TBE Electrophoresis buffer, DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอตัวอย่าง, ชุดสีฟลูออเรสเซนต์สำหรับย้อมดีเอ็นเอ

## 3. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย เช่น กรรไกรตัดกิ่ง กระจาดขย หนังสือกัมพู แผงอัดพรรณไม้และเชือกมัด กระจาดลูกฟูก ฟองน้ำ ถุงพลาสติก ป้ายชื่อ สมุดบันทึก ดินสอดำ 2B ตู้อบแห้งพรรณไม้อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส กระจาดตีผืนกพรรณไม้แห้ง เข็ม-ด้ายเย็บพรรณไม้ กระจาด ฉลากรายละเอียดพรรณไม้ Hand-lens/กล้อง stereo microscope

3.2. สารเคมีในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง ได้แก่ น้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ ประกอบด้วย แอลกอฮอล์ 70%, สารเมอร์คิวรีคลอไรด์ (Mercuric Chloride), ฟีนอล (Phenol)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงและดีเอ็นเออ้างอิงของพืชวงศ์ตีนเป็ด (Aquifoliaceae) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้

No.	Species	Specimen Voucher	Location (Province)	GenBank Accession number			
				<i>matK</i>	<i>rpL32-trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	nrITS
1	<i>Ilex cymosa</i> Blume (1)	Rueangruea SR 82 (BKF)	Trang	MT114104	MT114089	MT114079	MT114118
2	<i>Ilex cymosa</i> Blume (2)	Pruesapan KP2018-1 (BK)	Chumphon	MT114105	MT114090	MT114080	MT114119
3	<i>Ilex cymosa</i> Blume (3)	Pruesapan KP2018-27 (BK)	Trang	NA	NA	NA	MT114120
4	<i>Ilex denticulata</i> Wall. ex. Wight	Gardner & Tippayasri ST 1769 (BKF)	Krabi	NA	NA	NA	MT114121
5	<i>Ilex embelioides</i> Hook.f.	Takahashi & Tamura T- 63342 (BKF)	Loei	NA	MT114091	NA	NA
6	<i>Ilex ficoidea</i> Hemsl.	Fukuoka T-63801 (BKF)	Loei	NA	NA	NA	MT114123
7	<i>Ilex micrococca</i> Maxim. (1)	Meewasana <i>et al.</i> KP2018- 24 (BK)	Chiang Mai	MT114107	MT114092	MT114081	MT114124
8	<i>Ilex micrococca</i> Maxim. (2)	Meewasana <i>et al.</i> KP2018- 25 (BK)	Chiang Mai	MT114108	MT114093	MT114082	MT114125
9	<i>Ilex odorata</i> Buch-Ham. ex D. Don	Pooma 1532 (BKF)	Chaiyaphum	NA	MT114094	NA	NA
10	<i>Ilex pubifruca</i> Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson	Pruesapan KP2017-1 (BK)	Chiang Mai	MT114109	MT114095	MT114083	MT114126

No.	Species	Specimen Voucher	Location (Province)	GenBank Accession number			
				<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	nrITS
11	<i>Ilex</i> sp. (1)	KaeoKoon <i>et al.</i> KP2018-30 (BK)	Trang	MT114115	MT114101	NA	MT114131
12	<i>Ilex</i> sp. (2)	KaeoKoon <i>et al.</i> KP2018-31 (BK)	Trang	MT114116	MT114102	MT114087	NA
13	<i>Ilex</i> sp. (3)	Khiriwong & Pruesapan KP2018-32 (BK)	Surat Thani	MT114117	MT114103	MT114088	MT114132
14	<i>Ilex</i> sp. (4)	Suddee <i>et al.</i> 4392 (BKF)	Tak	MT114106	NA	NA	MT114122
15	<i>Ilex triflora</i> Blume	Suddee 5316 (BKF)	Loei	MT114110	MT114096	MT114084	MT114127
16	<i>Ilex umbellulata</i> (Wall.) Loes. (1)	Pruesapan 2015-1 (BK)	Nakhon Ratchasima	MT114111	MT114097	NA	MT114128
17	<i>Ilex umbellulata</i> (Wall.) Loes. (2)	Kertsawang 4621 (BK)	Chiang Mai	MT114112	MT114098	NA	MT114129
18	<i>Ilex wallichii</i> Hook.f. (1)	Pruesapan KP2018-13 (BK)	Trat	MT114113	MT114099	MT114085	NA
19	<i>Ilex wallichii</i> Hook.f. (2)	Pruesapan KP2018-16 (BK)	Trat	MT114114	MT114100	MT114086	MT114130

ตารางที่ 2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI ของยีนบริเวณคลอโรพลาสต์ (*matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*) และบริเวณนิวเคลียร์ (ITS) สำหรับวิเคราะห์ความใกล้เคียงของพืชวงศ์ศिला

No.	Species	Chloroplast ( <i>matK</i> , <i>rpl32-trnL</i> , <i>trnL-trnF</i> )	Nuclear (ITS)
-----	---------	--	---------------

		GenBank Accession number	Source	GenBank Accession number	Source
1	<i>Ilex asprella</i> (Hook. & Arn.) Champ. ex Benth.	MK834323	Chen <i>et al.</i> , 2019	-	-
2	<i>Ilex corallina</i> Franch. var. <i>aberrans</i> Hand.-Mazz.	-	-	KF255675	Yi <i>et al.</i> , 2017
3	<i>Ilex cornuta</i> Lindl. & Paxton	MK335536	Park <i>et al.</i> , 2019(a)	-	-
4	<i>Ilex delavayi</i> Franch.	KX426470	Yao <i>et al.</i> , 2016	-	-
5	<i>Ilex dumosa</i> Reissek	KP016927	Cascales <i>et al.</i> , 2017	-	-
6	<i>Ilex ficoidea</i> Hemsl.	-	-	KF255665	Yi <i>et al.</i> , 2017
7	<i>Ilex ficoidea</i> Hemsl.	-	-	KY417935	Jiang <i>et al.</i> , 2017
8	<i>Ilex hirsuta</i> C.J. Tseng ex S.K. Chen & Y.X. Feng	-	-	KF255668	Yi <i>et al.</i> , 2017
9	<i>Ilex integra</i> Thunb.	MK335537	Park <i>et al.</i> , 2019(b)	KY417948	Jiang <i>et al.</i> , 2017
10	<i>Ilex latifolia</i> Thunb.	KX426465	Yao <i>et al.</i> , 2016	-	-
11	<i>Ilex kaushue</i> S.Y. Hu	-	-	KY417941	Jiang <i>et al.</i> , 2017
12	<i>Ilex kwangtungensis</i> Merr.	-	-	KY417943	Jiang <i>et al.</i> , 2017
13	<i>Ilex latifolia</i> Thunb.	-	-	KY417933	Jiang <i>et al.</i> , 2017
14	<i>Ilex lihuaensis</i> T.R. Dudley	-	-	KF255674	Yi <i>et al.</i> , 2017



No.	Species	Chloroplast ( <i>matK</i> , <i>rpl32-trnL</i> , <i>trnL-trnF</i> )		Nuclear (ITS)	
		GenBank Accession number	Source	GenBank Accession number	Source
15	<i>Ilex longicaudata</i> H.F. Comber	-	-	KY417934	Jiang <i>et al.</i> , 2017
16	<i>Ilex macrocarpa</i> Oliv.	-	-	KF255671	Yi <i>et al.</i> , 2017
17	<i>Ilex micrococca</i> Maxim.	MN830251	Han, 2019(a)	AH007160	Setoguchi, 1997
18	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	KP016928	Cascales <i>et al.</i> , 2017	-	-
19	<i>Ilex polyneura</i> (Hand.-Mazz.) S.Y. Hu	KX426468	Yao <i>et al.</i> , 2016	KY417937	Jiang <i>et al.</i> , 2017
20	<i>Ilex pubescens</i> Hook. & Arn.	KX426467	Yao <i>et al.</i> , 2016	KF255672	Yi <i>et al.</i> , 2017
21	<i>Ilex rotunda</i> Thunb.	-	-	KY417951	Jiang <i>et al.</i> , 2017
22	<i>Ilex suaveolens</i> (H. Lév.) Loes.	MN830249	Han, 2019(b)	-	-
23	<i>Ilex szechwanensis</i> Loes.	KX426466	Yao <i>et al.</i> , 2016	-	-
24	<i>Ilex triflora</i> Blume	-	-	KY417932	Jiang <i>et al.</i> , 2017
25	<i>Ilex tsoii</i> Merr. & Chun	-	-	FJ394718	Manen <i>et al.</i> , 2010
26	<i>Ilex venulosa</i> Hook. f.	-	-	KY417939	Jiang <i>et al.</i> , 2017
27	<i>Ilex viridis</i> Champ. ex Benth.	MN830250	Han, 2019(c)	KY417946	Jiang <i>et al.</i> , 2017

No.	Species	Chloroplast ( <i>matK</i> , <i>rpl32-trnL</i> , <i>trnL-trnF</i> )		Nuclear (ITS)	
		GenBank Accession number	Source	GenBank Accession number	Source
28	<i>Ilex wallichii</i> Hook.f.	-	-	FJ394720	Manen <i>et al.</i> , 2010
29	<i>Ilex wilsonii</i> Loes.	KX426471	Yao <i>et al.</i> , 2016(a)	FJ394722	Manen <i>et al.</i> , 2010
30	<i>Ilex zygophylla</i> Merr.	-	-	FJ394728	Manen <i>et al.</i> , 2010
31	<i>Helwingia chinensis</i> Batalin	-	-	AF200594	Landherr & Higgins, Unpublished
32	<i>Helwingia himalaica</i> Hook. f. & Thomson ex C.B. Clarke	KX434807	Yao <i>et al.</i> , 2016(b)	-	-
33	<i>Gonocaryum lobbianum</i> (Miers) Kurz	MK390345	Jo <i>et al.</i> , 2019	-	-
34	<i>Phyllonoma ruscifolia</i> Willd. ex Roem. & Schult.	-	-	AJ492650	Manen <i>et al.</i> , 2002

## วิธีการ

### 1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชและการเก็บรักษา

#### 1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอ

เก็บรวบรวมชิ้นส่วนของใบพืชวงศ์ตีนเป็ดเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอจาก 2 แหล่ง คือ 1) เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชในภาคสนามจากพื้นที่หลายจังหวัดในประเทศไทย ได้ตัวอย่างพืช 13 taxa (ตารางที่ 1) ชิ้นส่วนใบของแต่ละตัวอย่างเก็บแยกไว้ในถุงพลาสติกแบบเปิดปิดได้และใส่ซิลิกาเจล (Silica gel) ไว้เพื่อช่วยดูดซับความชื้นและรักษาสภาพตัวอย่าง และ 2) ตัดชิ้นใบจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่เก็บรักษาเป็นพรรณไม้อ้างอิงไว้ในหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (The Forest Herbarium, BKF) โดยให้มีขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร จำนวน 6 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

#### 1.2 การเก็บรักษาตัวอย่างเพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงงานวิจัย

นำพืชวงศ์ตีนเป็ดที่เก็บรวบรวมได้จากภาคสนามทั้ง 13 ตัวอย่าง จัดทำเป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (Herbarium specimen) ตามหลักการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัย ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บรวบรวม ชิ้นตัวอย่างหมอน ติดป้ายหมายเลขพันธุ์ บันทึกข้อมูลพืช อัตราและอบแห้ง ออบน้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ ติดฉลากพรรณไม้ ติดฉลากรายละเอียดพืช จนถึงขั้นตอนลงทะเบียนเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืช ได้ดำเนินการตามกรรมวิธีตามหนังสือคู่มือ The Herbarium Handbook (Bridson & Forman, 1998) และลงทะเบียนเก็บรักษาไว้เป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงงานวิจัยในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK)

### 2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนใบของพืชวงศ์ตีนเป็ดมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink Plant Total DNA Purification Kit ตามกรรมวิธีของบริษัท แล้วตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอของพืชวงศ์ตีนเป็ดที่สกัดได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน Agarose gel 0.5% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Gel documentation System และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชวงศ์ตีนเป็ดทั้ง 19 ตัวอย่าง เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 ng แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS โดยใช้ชุดน้ำยาปฏิกิริยา Phire Plant Direct PCR Master Mix ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 µl เติมสารเคมีในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ดังแสดงในตารางที่ 4 และนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 5 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis ใน Agarose gel 1.5% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Gel documentation System

### 4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ไปวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี แล้วนำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความปนเปื้อนด้วยโปรแกรม BlastN บนฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) แล้วตรวจสอบความถูกต้องของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit 7 (Hall, 1999) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์สิดาที่ศึกษาได้ใหม่ ในงานวิจัยนี้ไปจัดเรียง (Alignment) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ พืชวงศ์สิดาซึ่งเป็น Ingroup taxa และ Outgroup taxa (ตารางที่ 2) ที่ดาวน์โหลดจากฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) ด้วยวิธี Multiple alignment และตรวจสอบความถูกต้อง ของการจัดเรียงด้วยตาเปล่าอีกครั้ง

#### 5. การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งจำเพาะบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ในเมตริกซ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วย โปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) ด้วยวิธี Maximum Parsimony (MP) โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates (Felsenstein, 1985), Tree-Bisection-Regrafting (TBR) ของแต่ละซ้ำประกอบด้วย 10 replicates random addition of sequences (Nei and Kumar, 2000) และไม่เกิน 10 trees/replicate ถูกเก็บไว้ ประเมินค่า Bootstrap Percentages (BPs) ที่ 85-100% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับสูง, 75-84% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับกลาง, 50-74% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับต่ำ และ <50% เป็น ค่าที่ไม่สนับสนุนความเชื่อมั่น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์และบริเวณนิวเคลียร์ไม่นำมาวิเคราะห์ ร่วมในเมตริกซ์เดียวกันเพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เนื่องจากใช้ตัวแทนชนิดพืชจากกลุ่มที่มีการ จำแนกไว้แตกต่างกัน เพื่อเป็นการเปรียบเทียบในยืนยันหรือสนับสนุนหรือชี้ให้เห็นความแตกต่างของความสัมพันธ์ ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างพืชวงศ์สิดาที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากทั้งสองบริเวณ โดยการอภิปรายความสัมพันธ์ ได้พิจารณาเฉพาะจากกลุ่มที่มีตัวแทนพืชวงศ์สิดาที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ปรากฏอยู่เป็นหลัก แล้วนำลำดับนิวคลี โอไทด์ของพืชวงศ์สิดาที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้เก็บบันทึกไว้ในระบบฐานข้อมูลของ NCBI ได้จำนวน 54 หมายเลข คือ GenBank accession numbers MT114079 – MT114117 (ตารางที่ 1)

#### เวลาและสถานที่

-เริ่มต้น 1 ตุลาคม 2560-สิ้นสุด 30 กันยายน 2562 รวม 2 ปี

-สถานที่ทำการทดลอง คือ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการ

เกษตร

#### ตารางที่ 3 ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิบัติการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Barcode	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
<i>matK</i>	3F_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGA	Ki-Joong Kim, unpublished

Barcode	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
	1R_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	Ki-Joong Kim, unpublished
rpl32-trnL	rpl32-F	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	Shaw <i>et al.</i> , 2007
	trnL	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	Shaw <i>et al.</i> , 2007
trnL-trnF	c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
	f	ATITGAACTGGTGACACGAG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
ITS	ITS5	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Component	50 $\mu$ l rxn	Final concentration
2X Phire Plant Direct PCR Master Mix	25 $\mu$ l	1X
10 $\mu$ M Forward Primer	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
10 $\mu$ M Reverse Primer	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
DNA dilution	1-1.25 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	18.75 $\mu$ l	

ตารางที่ 5 สภาวะเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Cycle Step	Temperature	Time	Cycle(s)
Initial Denaturation	98°C	5 minutes	1
Denaturation	98°C	10 seconds	35
Annealing	54°C	10 seconds	
Extension	72°C	20 seconds	
Final extension	72°C	1 minutes	1
Hold	4°C	$\infty$	

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและฐานข้อมูลดีเอ็นเอในการระบุยืนยันชนิดพืชวงศ์คิลลา (Aquifoliaceae) ในประเทศไทย

#### 1.1) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดชนิดพืชวงศ์คิลลา

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของพืชวงศ์คิลลาด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 19 ตัวอย่าง พบว่า *matK* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 14 ตัวอย่าง *rpl32-trnL* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 15 ตัวอย่าง *trnL-trnF* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียง 10 ตัวอย่าง และ

ITS สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 15 ตัวอย่าง ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* และ ITS มีประสิทธิภาพสูงสุด คิดเป็น 78.9% (15 จาก 19 ตัวอย่าง) รองลงมาคือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* คิดเป็น 73.7% (14 จาก 19 ตัวอย่าง) และดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* มีประสิทธิภาพต่ำสุด คิดเป็น 52.6% (10 จาก 19 ตัวอย่าง) อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบสภาพตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่ตัดขึ้นส่วนใบมาจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ได้แก่ *I. denticulata*, *I. embelioides*, *I. ficoidea*, *I. odorata*, *I. umbellulata* (1) และ *Ilex* sp. (4) ซึ่งดีเอ็นเอของตัวอย่างเหล่านี้อาจมีสภาพถูกทำลายหรือมีตัวยับยั้งการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากกระบวนการอบแห้งตัวอย่างและการรักษาสภาพตัวอย่างด้วยน้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ และเมื่อพิจารณาความยาวของแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอบาร์โค้ดทั้ง 4 บริเวณ พบว่ามีความยาวมาก ดังนั้นดีเอ็นเอที่มีสภาพถูกทำลายจึงไม่อาจทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการได้หรือได้ไม่สมบูรณ์ ส่วนตัวอย่างที่เก็บรักษาสภาพใบสดไว้ในสารดูดความชื้นซิลิกาเจล มีดีเอ็นเอที่ยังคงสภาพสมบูรณ์ แต่ก็มีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* คือ *I. umbellulata* (2) และ *Ilex* sp. (1), ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะเริ่มต้นของปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่ไม่เหมาะสม

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะของดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวที่สุด และมีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่ 928-945 คู่เบส ซึ่งพืชวงศ์ศัลลาที่มีขนาดนิวคลีโอไทด์ยาวที่สุด คือ *I. triflora* มีขนาด 945 คู่เบส และพืชวงศ์ศัลลาที่มีขนาดนิวคลีโอไทด์สั้นที่สุด คือ *I. umbellulata* (2), *I. wallichii* (1) และ *I. wallichii* (2) มีขนาด 929 คู่เบส ยกเว้น *I. embelioides* ที่สามารถตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียงบางส่วน มีขนาด 602 คู่เบส เนื่องจากสภาพดีเอ็นเอที่เสียหาย และ *Ilex* sp. (1) ที่ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 770 คู่เบส เนื่องจากผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ผลโครมาโตแกรมช่วงปลายที่ไม่สามารถอ่านผลกราฟได้; ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดยาวรองลงมาจากดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* โดยมีขนาดตั้งแต่ 929-936 คู่เบส โดย *I. micrococca* (1) และ *I. micrococca* (2) มีขนาดยาวที่สุดคือ 936 คู่เบส และ *I. pubifruca* มีขนาดสั้นที่สุดคือ 929 คู่เบส ส่วนตัวอย่างอื่นๆ ที่เหลือมีขนาดนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 930 คู่เบส; ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวเป็นลำดับที่สามคือ ที่มีขนาด 855 คู่เบส; และดีเอ็นเอบาร์โค้ด ITS ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดตั้งแต่ 714-737 คู่เบส โดย *Ilex* sp. (1) มีขนาดยาวที่สุดคือ 737 คู่เบส และ *I. pubifruca* มีขนาดสั้นที่สุดคือ 714 คู่เบส

เมื่อวิเคราะห์ตัวแทนพืชวงศ์ศัลลาของแต่ละบริเวณดีเอ็นเอที่นำมาใช้ร่วมเป็น Ingroups taxa ทั้งหมด พบตัวแทนของ *matK* จำนวน 23 taxa, *rpl32-trnL* จำนวน 24 taxa, *trnL-trnF* จำนวน 20 taxa และ ITS จำนวน 28 taxa (ตารางที่ 6)

## 1.2 ฐานข้อมูลดีเอ็นเอในการระบุยืนยันชนิดพืชวงศ์ศัลลา (Aquifoliaceae) ในประเทศไทย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์ศัลลาในประเทศไทยที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ จากตัวอย่างทั้งหมด 19 taxa ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และบริเวณนิวเคลียร์ ITS ได้เก็บบันทึกและลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนระบบออนไลน์ของ NCBI รวมทั้งสิ้น 54 หมายเลข GenBank accession ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* จำนวน 14 accession ได้แก่ GenBank

accession number MT114104–MT114117 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* จำนวน 15 accession ได้แก่ GenBank accession number MT114089–MT114103 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* จำนวน 10 accession ได้แก่ GenBank accession number MT114079–MT114088 และลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด ITS จำนวน 15 accession ได้แก่ GenBank accession number MT114118–MT114132 ซึ่งฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ตีนเป็ดที่ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ทั้งหมดจากงานวิจัยนี้ จัดเป็นชุดข้อมูลดีเอ็นเอของพืชวงศ์ตีนเป็ดที่มีการศึกษาเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งถือเป็นส่วนหนึ่งของพืชวงศ์ตีนเป็ดที่กระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทย (Pruesapan *et al.*, 2014) เมื่อเปรียบเทียบกับความหลากหลายของชนิดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีมากถึง 120 ชนิด (Andrews, 2002) นั้นแสดงว่าความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์ตีนเป็ดในประเทศไทยยังตกสำรวจอยู่อีกมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศในภูมิภาค Indo-China ที่มีรายงานมากถึง 37 ชนิด (Tardieu-Blot, 1948) แถบ Sabah และ Salawak มี 30 ชนิด (Andrews, 1998; 2002) แถบ Malay Peninsula 17 ชนิด (Ridley, 1922) เป็นต้น

## 2) ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ตีนเป็ดทั้ง 5 เมตริกซ์ คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*, ITS และ Combined Chloroplast (*matK+rpl32-trnL+trnL-trnF*) พบมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดเรียง 855, 1104, 1038, 791 และ 2997 คู่เบส ตามลำดับ แสดงคุณสมบัติของการจัดเรียงในแต่ละเมตริกซ์ พร้อมแสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลที่แยกวิเคราะห์ของบริเวณคลอโรพลาสต์และบริเวณนิวเคลียร์ และข้อมูลร่วมวิเคราะห์ของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์แบบ Maximum Parsimony ดังรายละเอียดในตารางที่ 6 ให้ผลความสัมพันธ์ของชนิดพืชวงศ์ตีนเป็ด 5 Cladogram (ภาพที่ 1 – 5) แสดงโครงสร้าง (Topology) การแยกกลุ่มของชนิดพืชวงศ์ตีนเป็ดสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ ผลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ Cladogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกันของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 4) และ Cladogram ข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียร์ (ภาพที่ 5) นำมาใช้ในการอภิปรายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชนิดพืชภายในวงศ์ตีนเป็ด และค่า BPs (%BS) นำมาใช้สนับสนุนความเชื่อมั่นของความสัมพันธ์ภายในกลุ่มพืช โดยการอภิปรายความสัมพันธ์ของชนิดพืชยึดถือตามการจำแนกกลุ่มของพืชวงศ์ตีนเป็ดตามหลักการจัดจำแนกของ Galle (1997) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 แสดงคุณสมบัติของข้อมูลการจัดเรียงนิวคลีโอไทด์และผลการวิเคราะห์แบบ Maximum Parsimony

Sequence characteristics	<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	Combined Chloroplast	ITS
No. of accessions (ingroups)	30 (28)	31 (29)	26 (24)	32 (30)	39 (37)
No. of species (ingroups)	25 (23)	26 (24)	22 (20)	27 (25)	31 (28)
Length of sequences (bp)	855	928-945	929-936	Not determined	714-737
Length of alignment (bp)	855	1104	1038	2997	791
No. of variable characters	113	275	132	520	398

Sequence characteristics	<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	Combined Chloroplast	ITS
No. of potential informative sites (%)	28 (3.3)	106 (9.6)	35 (3.4)	169 (5.6)	182 (23)
Length of trees	120	316	149	589	764
Consistency Index (CI), for parsimony informative sites	0.903	0.908	0.907	0.889	0.566
Consistency Index (CI), for all sites	0.975	0.962	0.973	0.961	0.713
Retention Index (RI)	0.947	0.919	0.934	0.940	0.755

## 2.1. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* (ภาพที่ 1), *rpl32-trnL* (ภาพที่ 2) และ *trnL-trnF* (ภาพที่ 3) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Parsimony แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของชนิดพืชที่ศึกษาที่มีความสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ โดยผลการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ *rpl32-trnL* แสดงผลการแยกกลุ่มชนิดพืชได้ชัดเจนกว่า *matK* และ *trnL-trnF* ซึ่งสอดคล้องกับค่า Parsimony informative (ตารางที่ 6) ของ *rpl32-trnL* (9.6%) ที่มีจำนวนสูงกว่า *matK* (3.3%) และ *trnL-trnF* (3.4%) อย่างไรก็ตาม ผลการแยกกลุ่มชนิดพืชของ *matK* กลับให้ผลชัดเจนกว่า *trnL-trnF* แม้จะมีค่า Parsimony informative สูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจำนวนชนิดของพืชวงศ์ศิลา (Ingroups) ที่ใช้เป็นตัวแทนการวิเคราะห์ของ *matK* (23 species) มีมากกว่าตัวแทน Ingroups ของ *trnL-trnF* (20 species) ซึ่งผลการวิเคราะห์พบตัวอย่างพืชวงศ์ศิลาที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ปรากฏบน Cladogram ที่มีค่าความเชื่อมั่นสนับสนุนการแยกกลุ่มของ *matK* ปรากฏอยู่ใน 5 Clade (ภาพที่ 1) ส่วน *rpl32-trnL* ปรากฏอยู่ใน 4 Clade และ 2 Subclade (ภาพที่ 2) และ *trnL-trnF* ปรากฏอยู่ใน 2 Clade (ภาพที่ 3) โดยพบว่าการจับกลุ่มของชนิดพืชใน Cladogram ของ *matK*, *rpl32-trnL* และ *trnL-trnF* ไม่มีความขัดแย้งกัน จึงได้นำมาวิเคราะห์ร่วมกันเป็นข้อมูลร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ (*matK+rpl32-trnL+trnL-trnF*) ให้ผล Cladogram ที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์แยกของแต่ละดีเอ็นเอบาร์โค้ด แต่การแยกกลุ่มมีความชัดเจนมากกว่า (ภาพที่ 4)

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ศิลาด้วยข้อมูลร่วมกันของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ (*matK+rpl32-trnL+trnL-trnF*) พบการจับกลุ่มของตัวอย่างพืชแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มหลักๆ ดังนี้: Clade 1 จับกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำที่ 58 %BS ประกอบด้วยสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ยกเว้น *I. dumosa* ที่ถูกจำแนกไว้ต่างกลุ่ม คือ Subg. *Byronia* Sect. *Paltoria* โดยพบว่า *I. odorata* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ ยืนยันการรวมกลุ่มตามที่ถูกจัดจำแนกไว้ และ *I. pubifructa* ที่ยังไม่ได้ถูกจำแนกกลุ่มก็แสดงความใกล้ชิดอย่างชัดเจนกับสมาชิกใน Sect. *Aquifolium* (*I. cornuta* MK335536, *I. integra* MK335537 และ *I. latifolia* KX426465) ด้วยค่าความเชื่อมั่นสูงถึง 95 %BS; Clade 2 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 86 %BS ประกอบด้วยสมาชิกใน Subg. *Prinos* Sect. *Prinoides* (*I. asprella* MK834323) และ Sect. *Micrococca* (*I. micrococca* MN830251), Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* (*I.*

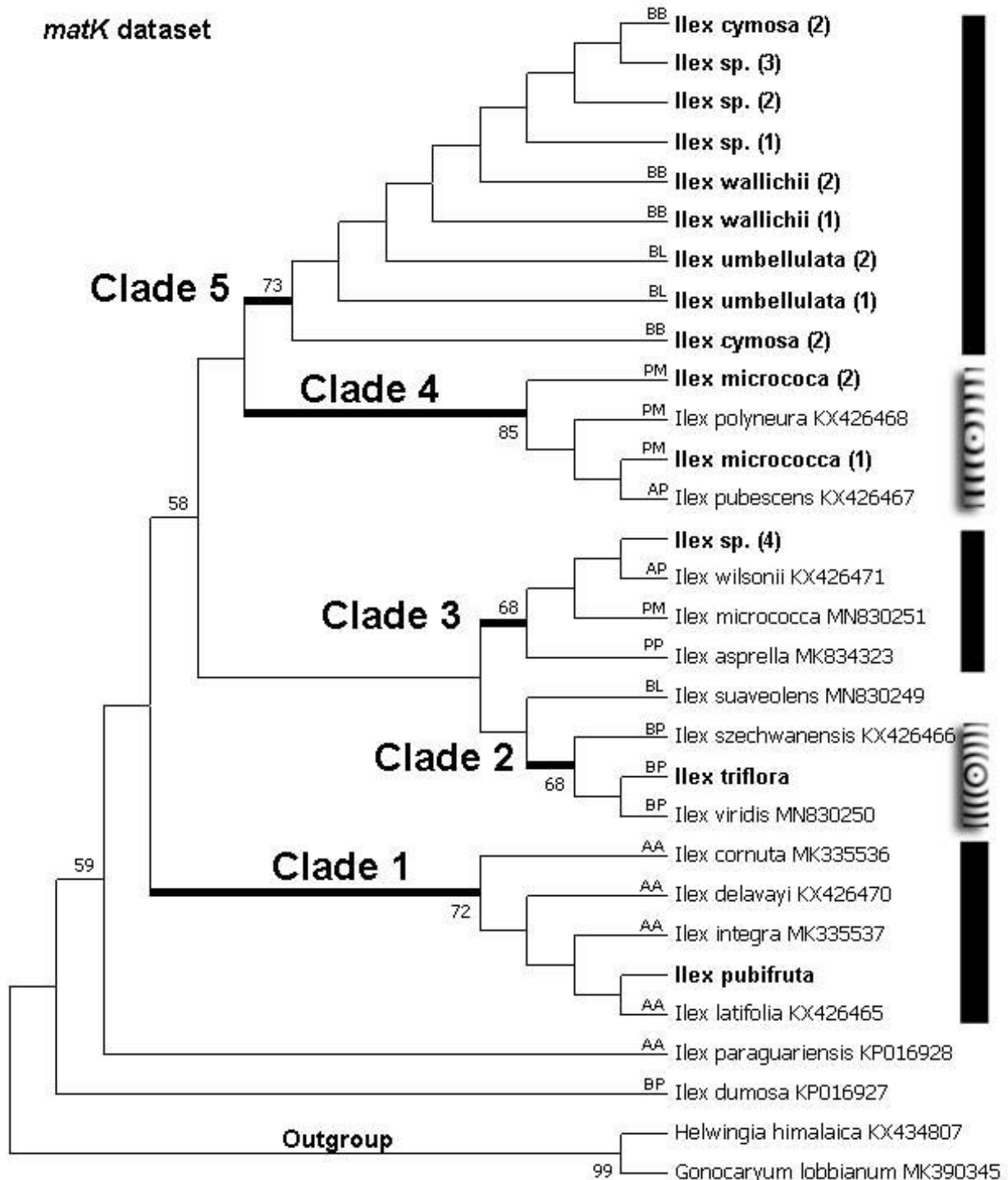


*wilsonii* KX426471) และ *Ilex* sp. (4) ซึ่งเป็นชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้และยังไม่ถูกจัดกลุ่ม; Clade 3 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 94 %BS ประกอบด้วยชนิดพืชที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Byronia* ทั้งหมด โดย *I. triflora* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ยืนยันการการเป็นสมาชิกภายใน Sect. *Paltoria* เช่นเดียวกับสมาชิกตัวอื่นๆ (*I. szechwanensis* KX426466 และ *I. viridis* MN830250) ด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 98 %BS และยืนยันความสัมพันธ์กับสมาชิกใน Sect. *Lioprinus* (*I. suaveolens* MN830249 ) ด้วยความเชื่อมั่นที่สูงเช่นกันถึง 94 %BS; Clade 4 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 99 %BS ประกอบด้วย *Ilex micrococca* (1) และ *Ilex micrococca* (2) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ และ *I. polyneura* KX426465 โดยยืนยันการจำแนกไว้ด้วยกันใน Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* และยังพบว่าสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* (*I. pubescens* KX426467) จับกลุ่มกับ *I. polyneura* KX426465 ด้วยความเชื่อมั่นปานกลางที่ 82 %BS; Clade 5 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 95 %BS ประกอบด้วยชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ทั้งหมด ซึ่งมีสมาชิกที่มีการจำแนกกลุ่มแล้วส่วนใหญ่จัดอยู่ใน Subg. *Byronia* และแยกกลุ่มชัดเจนออกไปใน Subclade 5.1 ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกใน Sect. *Byronia* คือ *I. cymosa* (1), *I. cymosa* (2), *I. wallichii* (1) และ *I. wallichii* (2) จับกลุ่มอยู่รวมกันกับ *Ilex* sp. (2) ซึ่งยังไม่ได้จำแนกกลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 89 %BS และใน Subclade 5.2 ประกอบด้วยสมาชิกใน Sect. *Lioprinus* คือ *I. umbellulata* (1) และ *I. umbellulata* (2) จับกลุ่มอยู่รวมกันกับ *Ilex* sp. (3) ซึ่งยังไม่ได้จำแนกกลุ่ม ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 88 %BS และสมาชิกของทั้ง 2 Section แสดงความใกล้ชิดกับ *Ilex* sp. (1) ซึ่งยังไม่ได้จำแนกด้วยเช่นกัน ด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 95 %BS นอกจากนี้ พบการรวมกลุ่มที่ไม่สอดคล้องกับกลุ่มที่ถูกจำแนกไว้ของ *I. embelioides* ซึ่งตัวอย่างนี้แยกออกมาจากสมาชิกตัวอื่นใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* อย่างไรก็ดี แม้จะจับกลุ่มอยู่ใน Clade นี้ แต่ไม่มีค่าความเชื่อมั่นที่จะสนับสนุนความใกล้ชิดกับพืชวงศ์คลาซันไดอย่างชัดเจน

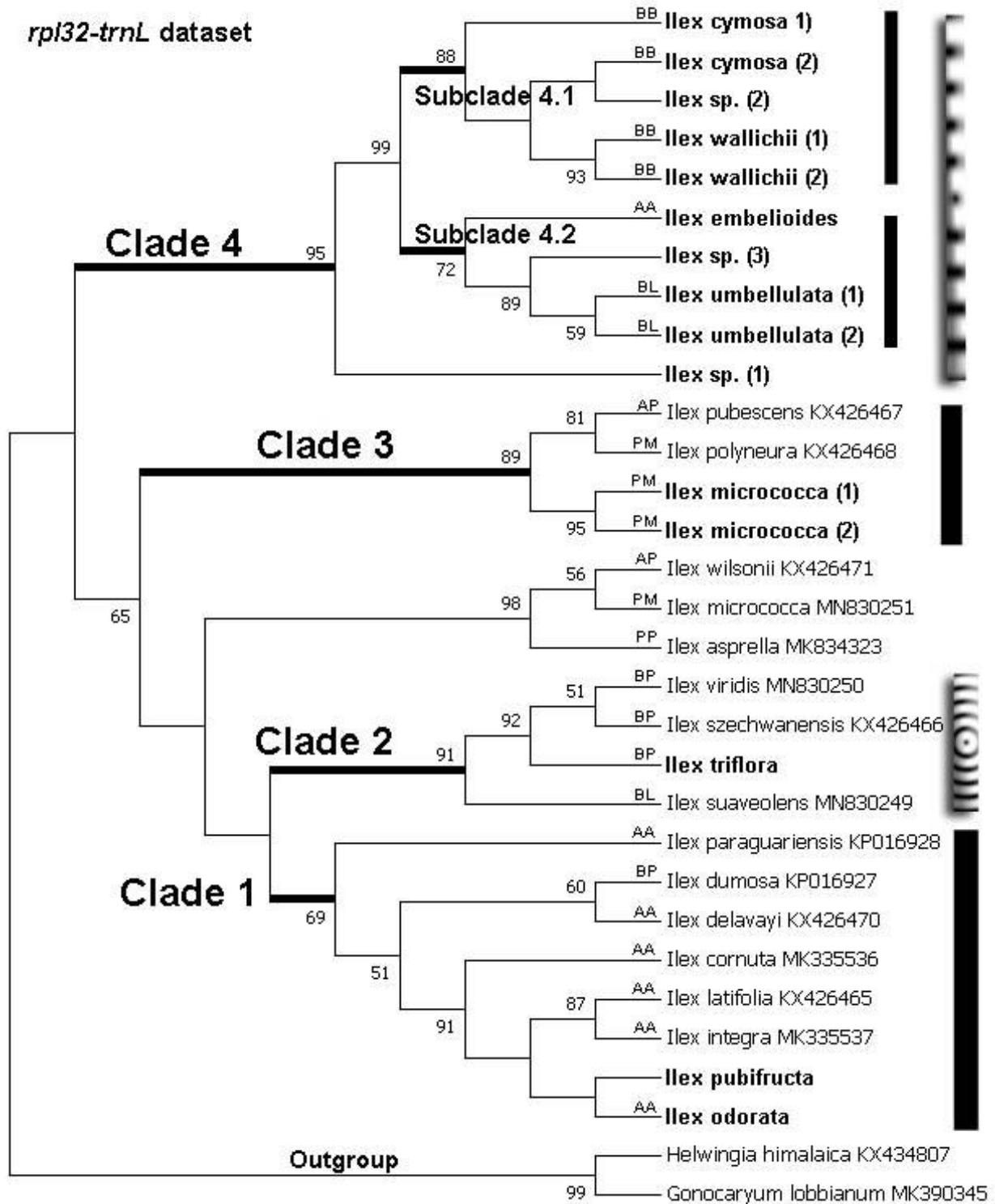
## 2.2. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คลาซันไดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียร์

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คลาซันไดด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ITS ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Parsimony แสดงไว้ใน ภาพที่ 5 พบการจับกลุ่มของตัวอย่างพืชแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มหลักๆ คือ Clade 1 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 100 %BS ประกอบด้วยสมาชิกใน Subg. *Byronia* Sect. *Paltoria* (*I. viridis* KY417946, *I. triflora* KY417932) และพบว่า *I. triflora* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ยืนยันการจำแนกกลุ่มที่สอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐาน ยกเว้น *I. pubescens* KF255672 ที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* จับกลุ่มอยู่ใน Clade นี้ด้วย; Clade 2 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 97 %BS ประกอบด้วยสมาชิก 4 ชนิดที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* โดย *I. pubifruca* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้และยังไม่ได้ถูกจำแนกจับกลุ่มอยู่ด้วย และแสดงความใกล้ชิดกับ *I. integra* KY417948 ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 95 %BS; Clade 3 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นปานกลางที่ 82%BS ประกอบด้วยสมาชิกที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Aquifolium* โดยมีตัวแทนใน Sect. *Aquifolium* (*I. corallina* var. *aberrans* KF255675), Sect. *Lauroilex* (*I. venulosa* KY417939) และ Sect. *Pseudoaquifolium* (*I. lihuaensis* KF255674, *I. longecaudata* KY417943 และ *I. wilsonii* FJ394722) และพบว่า *Ilex* sp. (4) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้เป็นสมาชิกใน Clade 3 ด้วย โดยแสดงความใกล้ชิดกับ *I. corallina* var. *aberrans* KF255675 และ *I.*

*lihuaensis* KF255674 ด้วยความเชื่อมั่นสูงถึง 93 %BS; Clade 4 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 94 %BS ประกอบด้วยสมาชิกตัวแทนที่ถูกจำแนกไว้ภายใต้ Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* (*I. micrococca* AH007160 และ *I. polyneura* KY417937) 2 ชนิด และพบว่า *I. micrococca* (1) และ *I. micrococca* (2) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ยืนยันความถูกต้องในการจัดกลุ่มตามข้อมูลลักษณะทางสัณฐาน แต่ *I. ficoidea* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จับกลุ่มอยู่ภายใน Clade 4 นี้ด้วย ทั้งๆ ที่ถูกจำแนกไว้ใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium*; Clade 5 จับกลุ่มกันด้วยค่าความเชื่อมั่นต่ำที่ 74 %BS โดยมีสมาชิกส่วนใหญ่เป็นตัวแทนของ Subg. *Byronia* ยกเว้น *I. denticulata* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้และถูกจำแนกไว้ภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ซึ่งภายใน Clade 5 นี้ ยังพบการแยกกลุ่มออกไปอีกเป็น Subclade 5.1 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ศึกษาใหม่ทั้งหมดในงานวิจัยนี้ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 90 %BS เป็นสมาชิกใน Sect. *Byronia* (ยกเว้น *I. denticulata* ตามที่กล่าวมาข้างต้น) โดย *I. cymosa* (1), *I. cymosa* (2) และ *I. cymosa* (3) ยืนยันความถูกต้องในการระบุชื่อด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 96 %BS ส่วน *I. wallichii* (2) แสดงความใกล้ชิดกับ *Ilex* sp. (1) และ *I. denticulata* ด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 85 %BS โดยพบ *Ilex* sp. (1) และ *I. denticulata* แสดงความใกล้ชิดกันด้วยความเชื่อมั่นต่ำที่ 67 %BS ส่วนตัวแทนที่ถูกจัดไว้ในกลุ่ม 'Opposite-leaved species' (*I. zygophylla* FJ394728) จับกลุ่มอยู่ที่ฐานของ Subclade 5.1 โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น ส่วน Subclade 5.2 จับกลุ่มกันด้วยความเชื่อมั่นสูงที่ 99 %BS ประกอบด้วยสมาชิกใน Sect. *Lioprinus* คือ *I. umbellulata* (1) และ *I. umbellulata* (2) และยังพบว่า *Ilex* sp. (3) ที่ยังไม่ได้จัดกลุ่มมีความใกล้ชิดกับสมาชิกใน Subclade 5.2 นี้

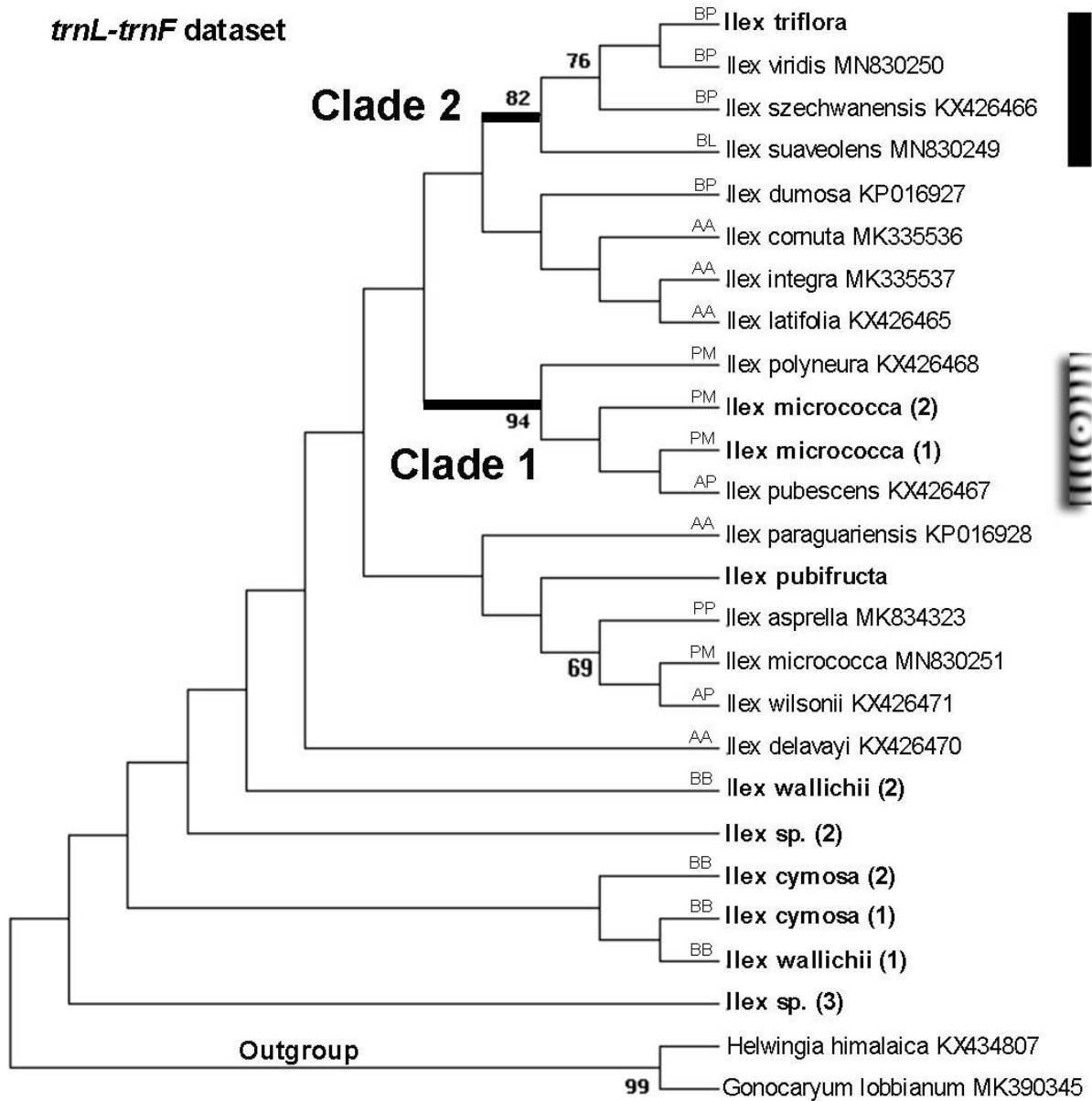


ภาพที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนตุ๊กแกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *matK* ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 7

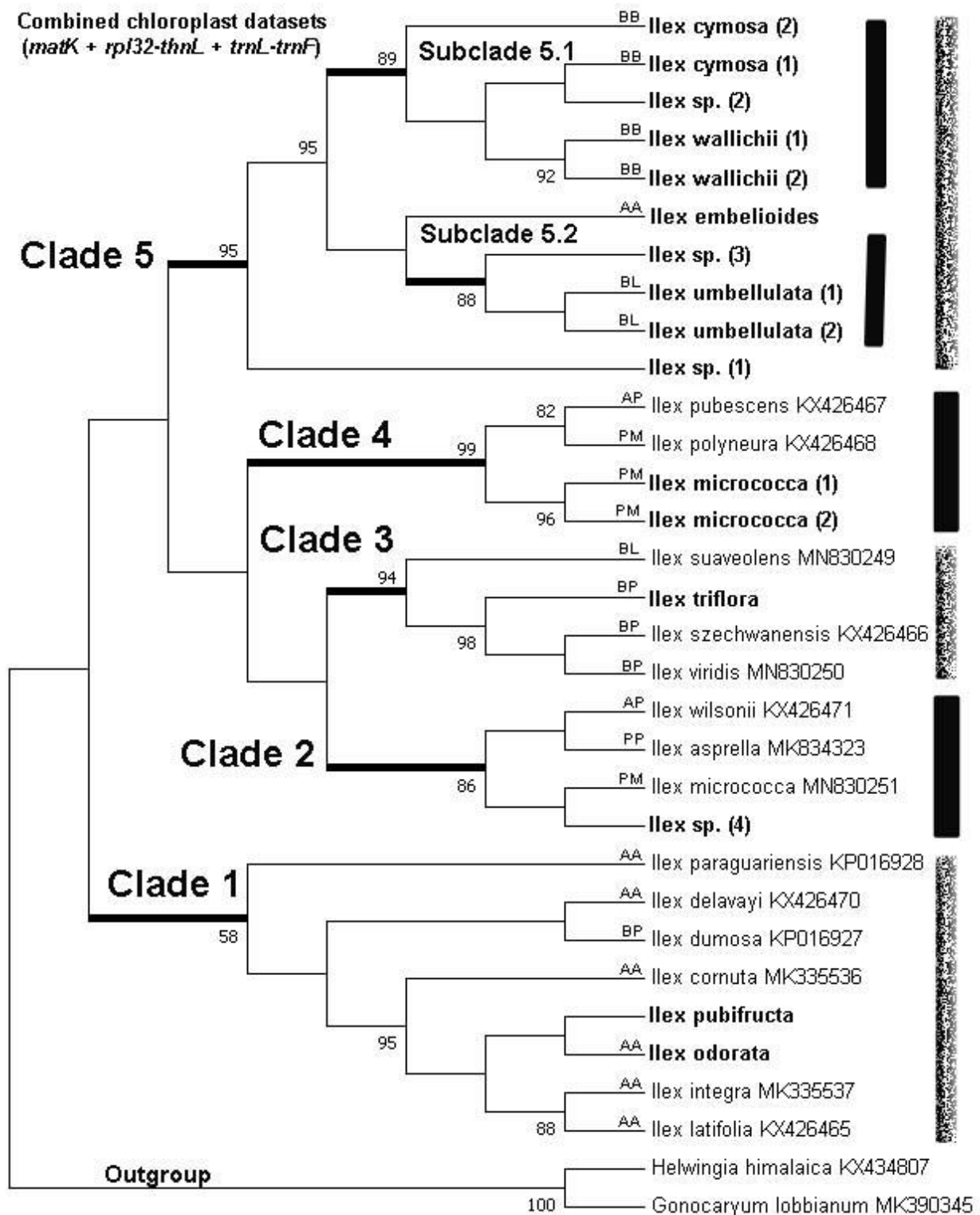


ภาพที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนตุ๊กแกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 7

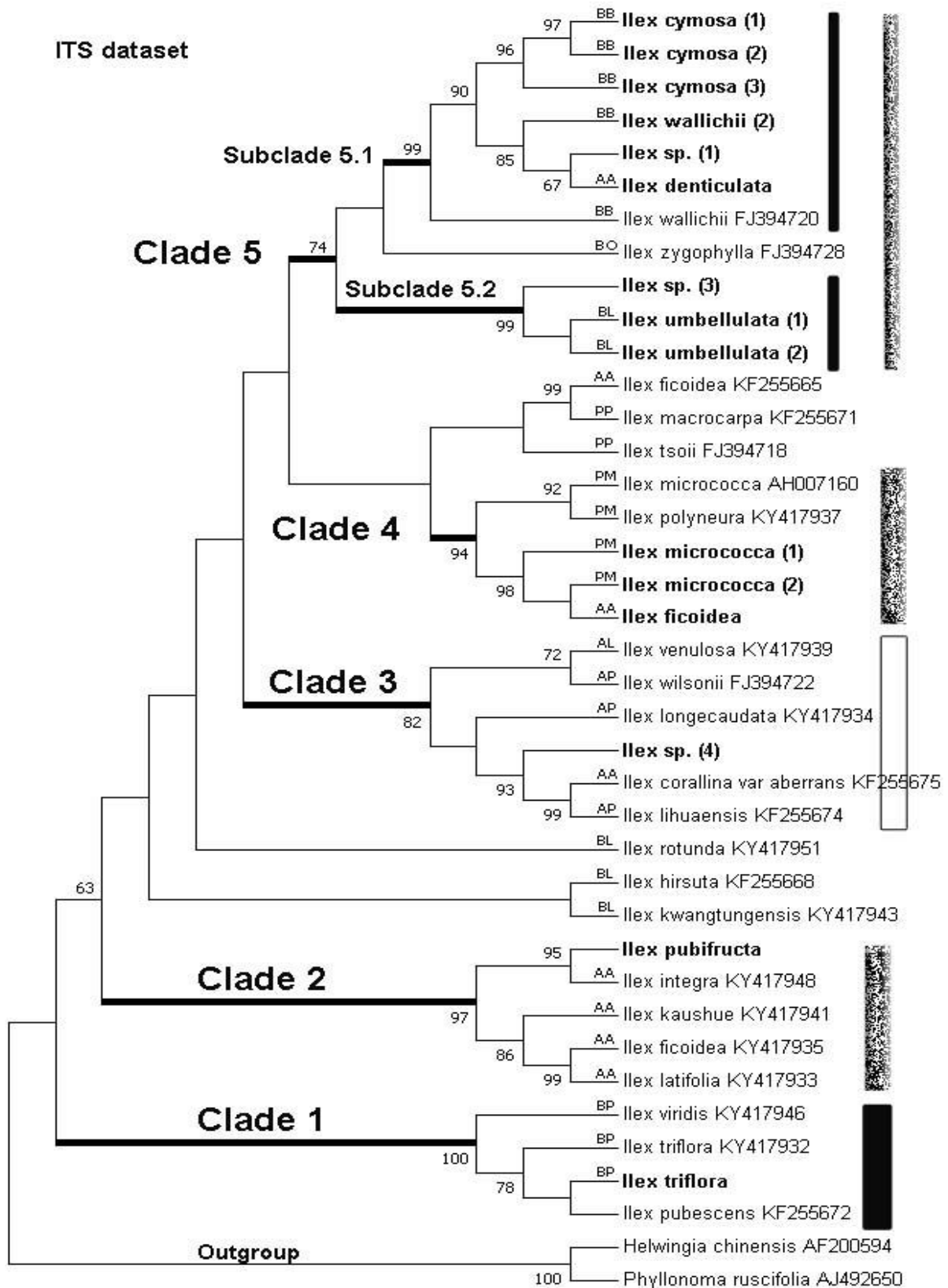
*trnL-trnF* dataset



ภาพที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 7



ภาพที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดร่วมกันของบริเวณคลอโรพลาสต์ (*matK* + *rpl32-trnL* + *trnL-trnF*) ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 7



ภาพที่ 5 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียร์ ITS ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Maximum Parsimony พร้อมค่า Bootstrap Percentages (%BS) อักษรบน Clade ของแต่ละ taxa แสดงกลุ่มพืชที่จัดจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดยเทียบเคียงชื่อได้จากตารางที่ 7

3) ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คลาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับความใกล้ชิดของชนิดพืชที่ถูกแบ่งด้วยข้อมูลทางสัณฐานของพืช

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชนิดพืชวงศ์คลาที่ศึกษาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของบริเวณคลอโรพลาสต์และบริเวณนิวเคลียร์ดังที่กล่าวมาข้างต้น แสดงผลสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการจัดจำแนกด้วยข้อมูลดีเอ็นเอจากงานวิจัยนี้กับการจัดจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดย Galle (1997) พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่เช่นกัน เมื่อพิจารณาการจัดจำแนกพืชวงศ์คลาด้วยข้อมูลทางสัณฐานพบว่า มีการแยกสกุลพืช *Ilex* ออกได้เป็น 3 Subgenera (Subg.) ประกอบด้วย Subg. *Prinos*, Subg. *Byronia* และ Subg. *Aquifolium* (ตารางที่ 7) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกตัวแทนชนิดพืชของบาง Section ที่จัดจำแนกไว้ภายใต้ 3 Subgenera ที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งคาดการณ์จากลักษณะทางสัณฐานไว้ว่ามีแนวโน้มจะมีความใกล้ชิดกับชนิดพืชในกลุ่มเหล่านั้น เพื่อเป็นการพิสูจน์ยืนยันหรือเป็นแนวทางในตรวจสอบการระบุชื่อพืชสำหรับตัวอย่างที่ยังเป็น Unknown species

**ตารางที่ 7** แสดงตัวแทนชนิดพืชวงศ์คลาที่จัดจำแนกของด้วยข้อมูลทางสัณฐานโดย Galle (1997) เปรียบเทียบการจัดจำแนกด้วยข้อมูลดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้ โดยพิจารณาเฉพาะตัวอย่างที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้เป็นหลัก

Species	Morphological classification (Galle, 1997)	DNA classification (Present study)
<i>Ilex micrococca</i> , <i>Ilex polyneura</i>	Subg. <i>Prinos</i> Sect. <i>Micrococca</i> (PM)	-
<i>Ilex asprella</i> , <i>Ilex macrocarpa</i> , <i>Ilex tsoii</i>	Subg. <i>Prinos</i> Sect. <i>Prinoides</i> (PP)	-
<i>Ilex cymosa</i> , <i>Ilex wallichii</i>	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Byronia</i> (BB)	-
<i>Ilex hirsuta</i> , <i>Ilex kwangtungensis</i> , <i>Ilex rotunda</i> , <i>Ilex suaveolens</i> , <i>Ilex umbellulata</i>	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Lioprinus</i> (BL)	-
<i>Ilex dumosa</i> , <i>Ilex</i> <i>szechwanensis</i> , <i>Ilex triflora</i> , <i>Ilex viridis</i>	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Paltoria</i> (BP)	-
<i>Ilex zygophylla</i>	Subg. <i>Byronia</i> 'Opposite-leaved Species' (BO)	-
<i>Ilex corallina</i> . var. <i>aberrans</i> , <i>Ilex cornuta</i> , <i>Ilex delavayi</i> , <i>Ilex</i> <i>denticulate</i> , <i>Ilex embelioides</i> <i>Ilex ficoidea</i> , <i>Ilex integra</i> , <i>Ilex kaushue</i> , <i>Ilex latifolia</i> ,	Subg. <i>Aquifolium</i> Sect. <i>Aquifolium</i> (AA)	1) <i>Ilex denticulata</i> and 2) <i>Ilex embelioides</i> placed with Subg. <i>Byronia</i> . 3) <i>Ilex ficoidea</i> placed with Subg. <i>Prinos</i> Sect. <i>Micrococca</i>



Species	Morphological classification (Galle, 1997)	DNA classification (Present study)
<i>Ilex odorata</i> , <i>Ilex paraguariensis</i>		
<i>Ilex venulosa</i>	Subg. <i>Aquifolium</i> Sect. <i>Lauroilex</i> (AL)	-
<i>Ilex lihuaensis</i> , <i>Ilex longecaudata</i> , <i>Ilex pubescens</i> , <i>Ilex wilsonii</i>	Subg. <i>Aquifolium</i> Sect. <i>Pseudoaquifolium</i> (AP)	-
<i>Ilex pubifructa</i>	Unclassified	Subg. <i>Aquifolium</i> Sect. <i>Aquifolium</i>
<i>Ilex</i> sp. (1)	Unclassified	Subg. <i>Byronia</i>
<i>Ilex</i> sp. (2)	Unclassified	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Byronia</i>
<i>Ilex</i> sp. (3)	Unclassified	Subg. <i>Byronia</i> Sect. <i>Lioprinus</i>
<i>Ilex</i> sp. (4)	Unclassified	Subg. <i>Aquifolium</i> / Subg. <i>Prinos</i>

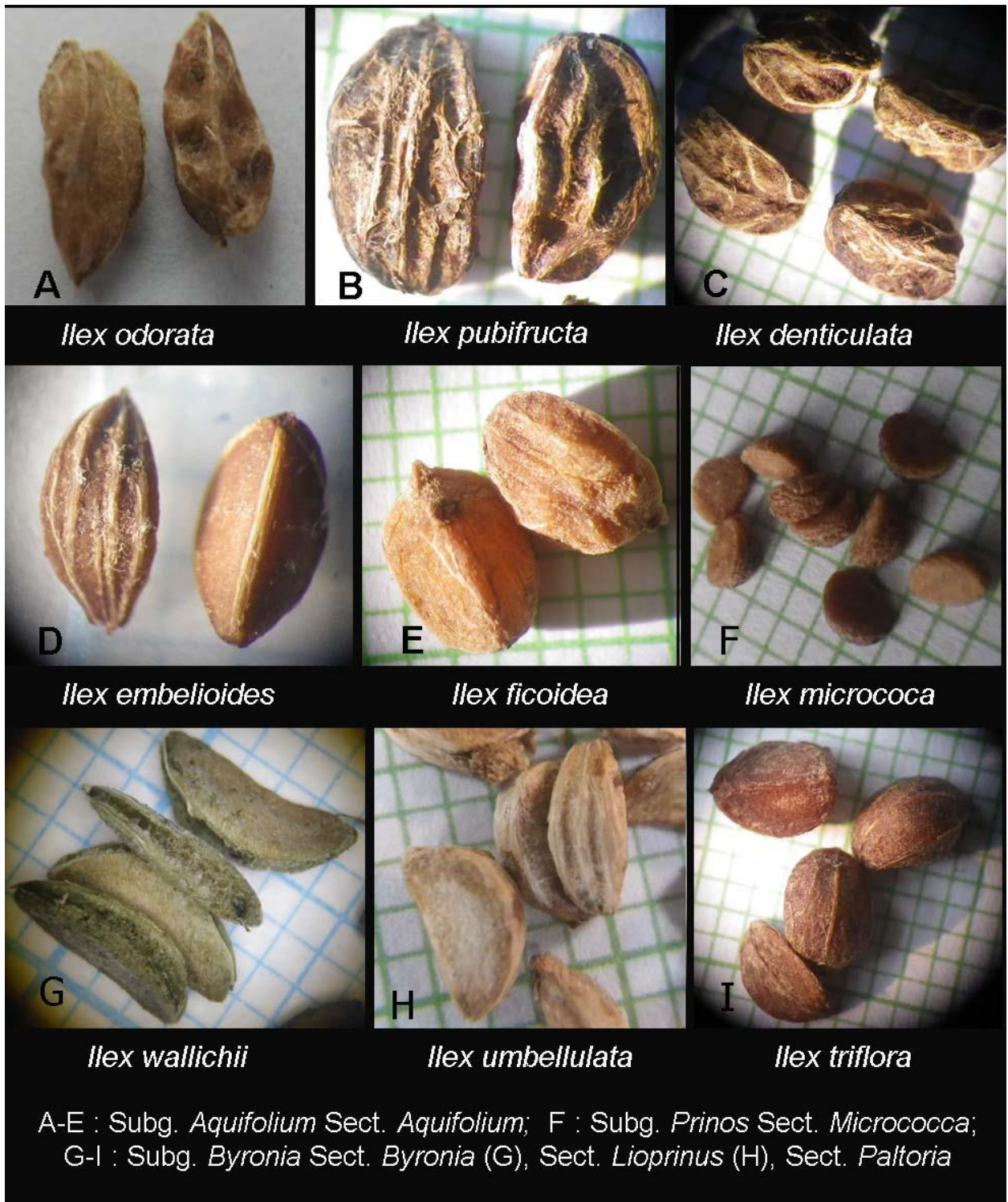
ผลการวิเคราะห์พบการจำแนกชนิดพืชวงศ์ตีนเป็ดภายใต้ Subg. *Aquifolium* โดยมีตัวแทนชนิดพืชที่ศึกษาของ 3 section คือ Sect. *Aquifolium*, Sect. *Lauroilex* และ Sect. *Pseudoaquifolium* ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ คือ *I. odorata* และ *I. pubifructa* ปรากฏรวมอยู่กับชนิดพืชที่จัดจำแนกไว้ใน Sect. *Aquifolium* (Clade 1 ภาพที่ 4 และ Clade 2 ภาพที่ 5) หากพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานของการจัดจำแนก (Galle, 1997) พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะเด่นร่วมกันกับชนิดอื่นๆ ในนี้ คือ พืชทั้งกลุ่มมีวงกลีบดอก 4 กลีบ และมีเมล็ดแข็ง (pyrene) 4 เมล็ด ซึ่งผิวเมล็ดมีลักษณะเหี่ยวย่น หรือเป็นริ้ว หรือเป็นหลุม หรือเป็นร่องเล็กๆ หรือเป็นช่องแคบ และผิวด้านหลังนูนออกมา (ภาพที่ 6A-B) นอกจากนี้ ยังพบ *Ilex* sp. (4) ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จับกลุ่มอยู่กับชนิดพืชใน Subg. *Aquifolium* อีกด้วย (Clade 3 ภาพที่ 5) โดยปรากฏชนิดพืชทั้ง Sect. *Aquifolium* และ Sect. *Pseudoaquifolium* อยู่ร่วมกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้สามารถใช้ทำนายตำแหน่งการจัดกลุ่มของ *Ilex* sp. (4) ได้ว่ามีความใกล้ชิดกับชนิดพืชใน Subg. *Aquifolium* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานของพืชที่ศึกษาได้จากตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข Suddee *et al.* 4392 (BKF) (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ Manen *et al.* (2010) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชวงศ์ตีนเป็ดถึง 150 ชนิดด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด 5 บริเวณ พบการจำแนกชนิดพืชเป็น Section ต่างๆ ภายใต้ Subg. *Aquifolium* นั้นยังเป็น Polyphyletic

ผลการวิเคราะห์พบการจำแนกชนิดพืชวงศ์ตีนเป็ดที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จับกลุ่มอยู่ภายใต้ Subg. *Byronia* จำนวน 7 taxa คือ *I. cymosa* 2 taxa, *I. umbellulata* 2 taxa, *I. wallichii* 2 taxa และ *I. triflora* โดยตัวอย่างทั้ง 7 taxa นี้ยืนยันการจัดจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอสอดคล้องกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐาน และ

ตัวอย่างอีก 3 taxa คือ *Ilex* sp. (1), *Ilex* sp. (2) และ *Ilex* sp. (3) แสดงความใกล้ชิดกับชนิดพืชในกลุ่มนี้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาระบุชื่อพืชในอนาคต โดยตัวอย่างเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานเด่นๆ ที่เหมือนกันกับชนิดพืชใน Subg. *Byronia* คือ ใบมีขอบหยัก วงกลีบดอกมี 4 กลีบ ผลมีเมล็ดแข็ง 4 เมล็ด ผิวเมล็ดเรียบหรือผิวด้านหลังเป็นริ้วแต่ไม่เป็นร่องตามยาว ซึ่ง *I. triflora* ยืนยันการรวมกลุ่มกับสมาชิกพืชใน Sect. *Paltoria* (Clade 3 ภาพที่ 4; Clade 1 ภาพที่ 5) ด้วยลักษณะร่วมที่กว่ามาข้างต้น (ภาพที่ 6I) ส่วน *I. cymosa* (1), *I. cymosa* (2), *I. wallichii* (1) และ *I. wallichii* (2) ยืนยันการรวมกลุ่มด้วยกันภายใต้ Sect. *Byronia* (Subclade 5.1, ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) ด้วยลักษณะเด่นของใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4-6 กลีบ ผลมี 7-10 เมล็ด เมล็ดมีผิวเรียบ ผิวด้านหลังเป็นร่องกว้างตามยาว 1 ร่อง (ภาพที่ 6G) โดยภายใน Clade ของ Sect. *Byronia* นี้ ปรากฏ *Ilex* sp. (1) (Subclade 5.1 ภาพที่ 5) และ *Ilex* sp. (2) (Subclade 5.1 ภาพที่ 4) รวมกลุ่มอยู่ด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข KaeoKoon *et al.* KP2018-30 (BK) และ KaeoKoon *et al.* KP2018-31 (BK) ของพืชทั้ง 2 taxa ตามลำดับ (ตารางที่ 1) พบว่าเป็นชิ้นตัวอย่างที่ไม่มีส่วนสืบพันธุ์ (Sterile specimen) แต่มีลักษณะของส่วนกิ่งใบคล้ายคลึงกับสมาชิกชนิดอื่น จึงทำนายตำแหน่งของการจัดกลุ่มของ *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2) ว่าเป็นสมาชิกใน Subg. *Byronia* Sect. *Byronia* อย่างไรก็ดี พบการจับกลุ่มของ *I. dentiulata* ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ และถูกจำแนกไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐานภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ปรากฏอยู่กับสมาชิกของ Sect. *Byronia* ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นที่สูง (Subclade 5.1 ภาพที่ 5) แต่ลักษณะทางสัณฐานกลับแตกต่างจากสมาชิกของ Sect. *Byronia* อย่างสิ้นเชิง ในทางกลับกัน *I. dentiulata* (ภาพที่ 6C) มีลักษณะทางสัณฐานคล้าย *I. pubifructa* (ภาพที่ 6B) มาก ต่างกันที่พืชชนิดหลังมีขนสั้นปกคลุมส่วนต่างๆ ของพืช จึงจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอของ *I. dentiulata* ซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันตำแหน่งการจัดกลุ่มที่ถูกต้อง นอกจากนี้ ยังพบชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้อีก คือ *I. umbellulata* (1) และ *I. umbellulata* (2) ที่ยืนยันการระบุชื่อเป็นชนิดเดียวกันได้อย่างถูกต้องภายใต้ Sect. *Lioprinus* (Subclade 5.2 ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) มีลักษณะเด่นของใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4-5 กลีบ ผลมี 7-9 เมล็ด ผิวเมล็ดเรียบ ผิวด้านหลังเป็นร่องตามยาว 2 ร่อง (ภาพที่ 6H) อย่างไรก็ดี พบว่าตัวแทนสมาชิกของ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* คือ *I. embelioides* ซึ่งเป็นชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ปรากฏรวมอยู่กับชนิดพืชใน Subg. *Byronia* (Clade 5 ภาพที่ 4) ด้วย แต่หากพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานของพืช คือ ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข Takahashi & Tamura T-63342 (BKF) (ตารางที่ 1) พบว่า *I. embelioides* มีลักษณะทางสัณฐานคาบเกี่ยวระหว่าง Subg. *Aquifolium* กับ Subg. *Byronia* เช่น ใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4-5 กลีบ ผลมี 4 เมล็ด ผิวเมล็ดเรียบ ผิวด้านหลังเป็นสันตามยาว 3-4 สัน (ภาพที่ 6D) อย่างไรก็ดี การแยกกลุ่มที่ไม่ชัดเจนครั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ของ *I. embelioides* ไม่มีความสมบูรณ์เพียงพอ เพราะสามารถเพิ่มดีเอ็นเอได้ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* เพียงบริเวณเดียวและดีเอ็นเอที่ได้มาก็เป็นเพียงบางส่วนของ sequence เท่านั้น ดังนั้น จึงยังไม่สามารถสรุปตำแหน่งการจัดกลุ่มของ *I. embelioides* ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้ชัดเจน

ผลการวิเคราะห์พบการจำแนกชนิดพืชวงศ์ตีนเป็ดที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้จับกลุ่มอยู่ภายใต้ Subg. *Prinos* จำนวน 2 taxa คือ *I. micrococca* (1) และ *I. micrococca* (2) จับกลุ่มอยู่ด้วยกันกับสมาชิกใน Sect. *Micrococca* (Clade 4 ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) ยืนยันความถูกต้องตามการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานของพืช

โดยสมาชิกในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นที่กิ่งอ่อนเป็นสีแดง มี lenticel หนาแน่น ขอบใบจักฟันเลื่อย ปลายใบยาว วงกลีบดอก 6-11 กลีบ เมล็ดแข็ง 6-8 เมล็ด ผิวด้านข้างเรียบ ส่วนผิวด้านหลังเรียบเป็นร่องเล็กตามยาว 1 ร่อง (ภาพที่ 6F) อย่างไรก็ตาม ภายใต้อาณัติของ Clade ของ Subg. *Prinos* พบการรวมกลุ่มของ *I. ficoidea* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้รวมอยู่ด้วยเช่นกัน (Clade 4 ภาพที่ 5) แต่พืชชนิดนี้ถูกจำแนกไว้ภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* และมี *I. ficoidea* KF255665 ที่รวมกลุ่มกับชนิดพืชใน Sect. *Prinoides* จับกลุ่มเป็น sister clade กับ Clade 4 (ภาพที่ 5) นี้ด้วยโดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น แต่ *I. ficoidea* KY417935 กลับรวมกลุ่มอย่างชัดเจนกับสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* (Clade 2 ภาพที่ 5) ตามที่มีการจำแนกกลุ่มไว้ด้วยลักษณะทางสัณฐานของพืช เมื่อตรวจสอบรายงานของ Yi *et al.* (2017) พบว่าสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ โดยพบ *I. ficoidea* KF255665 จับกลุ่มเป็น sister clade กับ *I. macrocarpa* KF255671 สมาชิกใน Sect. *Prinoides* ด้วยค่าความเชื่อมั่นสูง (99 %BS ในงานวิจัยนี้; 100% BS ใน Yi *et al.*, 2017) และจับกลุ่มเป็น sister group กับสมาชิกอื่นใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ด้วยค่าความเชื่อมั่นที่สูงเช่นกัน แต่เมื่อตรวจสอบในรายงานของ Jiang *et al.* (2017) กลับพบว่า *I. ficoidea* KY417935 ไม่จับกลุ่มกับ *I. macrocarpa* AJ492689 แต่จับกลุ่มกับสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* อย่างถูกต้อง อีกทั้ง *I. macrocarpa* AJ492689 ก็จับกลุ่มถูกต้องกับสมาชิกใน Subg. *Prinos* Sect. *Prinoides* ดังนั้น กรณีนี้จึงสรุปได้ว่า *I. ficoidea* KF255665 ที่ศึกษาโดย Yi *et al.* (2017) อาจถูกระบุชื่อผิดพลาดแต่ไม่อาจสรุปได้ชัดเจนเนื่องจากไม่ได้เห็นตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงของตัวอย่างนั้น ส่วน *I. ficoidea* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ พบตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข Fukuoka T-63801 (BKF) (ตารางที่ 1) มีลักษณะทางสัณฐานตามลักษณะพืชใน Sect. *Aquifolium* อย่างชัดเจน (ภาพที่ 6E) ดังนั้น อาจสรุปสาเหตุของการจับผิดกลุ่มของ *I. ficoidea* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ได้ 2 ประการ คือ ประการแรก มีการปนเปื้อนในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่ได้มีการทำซ้ำตัวอย่าง จึงไม่สามารถยืนยันสถานะตัวอย่างได้ และประการที่ 2 คือการผสมข้ามในธรรมชาติ (Natural hybridization) ซึ่งกรณีเช่นนี้ได้ศึกษาพบมากขึ้นในพืชสกุล *Ilex* (Son *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2016) นอกจากนี้ ยังพบการรวมกลุ่มของ *I. pubescens* KX426467 ซึ่งเป็นสมาชิกใน Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* รวมตัวอยู่กับสมาชิกของ Sect. *Micrococca* (Clade 4 ภาพที่ 4) ด้วย เมื่อตรวจสอบรายงานของ Yao *et al.* (2016) ซึ่งพบตัวอย่างนี้จับอยู่กับ *I. polyneura* KX426468 ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูง (100 %BS) กรณีนี้ อาจเกิดจากการระบุชื่อพืชผิดพลาด เพราะลักษณะทางสัณฐานของ *I. pubescens* ปรากฏเหมือนสมาชิกอื่นใน Subg. *Aquifolium* อย่างชัดเจน นอกจากนี้ พบการปรากฏของ *Ilex* sp. (4) จับกลุ่มร่วมกับสมาชิกของ Subg. *Prinos* ทั้งสอง Section และมีสมาชิกของ Subg. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* รวมกลุ่มอยู่ด้วย (Clade 2 ภาพที่ 4) ดังนั้น การแยกกลุ่มของ *Ilex* sp. (4) จึงยังไม่ชัดเจนว่าควรจำแนกไว้ใน Subgenus ใดได้ในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 6 ภาพแสดงลักษณะของเมล็ดของพืชวงศ์คัสติลา (Aquifoliaceae) ตามการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน

### 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาความหลากหลายของพืชวงศ์คัสติลา (Aquifoliaceae) ในประเทศไทยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด บริเวณคลอโรพลาสต์ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และบริเวณนิวเคลียร์ ITS ได้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอที่ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้บนระบบออนไลน์ของ National Center for Biotechnology Information เพื่อใช้ในการระบุยีน

ชนิดของพืชวงศ์ชิวคิลารวมทั้งสิ้น 54 ข้อมูล ประกอบด้วย GenBank accession หมายเลข MT114079–MT114117 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอของพืชวงศ์ชิวคิล่าที่มีการศึกษาเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นตัวแทนความหลากหลายของพรรณพืชวงศ์ชิวคิล่าจำนวน 14 ชนิด โดยศึกษาพบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชที่ระบุการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอสอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานของพืชอย่างชัดเจน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก และ 5 กลุ่มย่อย ดังนี้ กลุ่มที่หนึ่ง คือ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ประกอบด้วย *Ilex odorata* และ *I. pubifruca* กลุ่มที่สอง คือ Subg. *Byronia* แยกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ Sect. *Byronia* ประกอบด้วย *I. cymosa*, *I. wallichii*, *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2); Sect. *Lioprinus* ประกอบด้วย *I. umbellulata* และ *Ilex* sp. (3) และ Sect. *Paltoria* ประกอบด้วย *I. triflora* และกลุ่มที่สาม คือ Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* ประกอบด้วย *I. micrococca* นอกจากนี้พบการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอที่ให้ข้อมูลไม่สอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐาน ประกอบด้วย *I. denticulata* และ *I. embelioides* ที่ให้ผลการแยกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอใกล้เคียงกับชนิดพืชใน Subg. *Byronia* แต่การจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานจัดพืชทั้งสองชนิดอยู่ภายใต้ Subg. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ส่วน *I. ficoidea* ที่ถูกจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐานกลุ่มเดียวกับพืชทั้งสองชนิดดังกล่าวมาข้างต้น กลับให้ผลการแยกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอใกล้เคียงกับพืชใน Subg. *Prinos* Sect. *Micrococca* และพบ *Ilex* sp. (4) จับกลุ่มใกล้เคียงกับชนิดพืชใน Subg. *Aquifolium* ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียร์ แต่กลับแสดงความใกล้เคียงกับชนิดพืชทั้งใน Subg. *Aquifolium* และ Subg. *Prinos* ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์

การศึกษาความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์ชิวคิล่าในงานวิจัยนี้ ช่วยยืนยันความถูกต้องในการระบุชื่อตัวอย่างพืชรวมถึงการจัดจำแนกพืชออกเป็นกลุ่มๆ ด้วยข้อมูลทางสัณฐาน อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ในการจำแนกกลุ่มของพืชวงศ์ชิวคิล่าที่ยังเป็น Unknown species และเป็นแนวทางในการศึกษาทางอนุกรมวิธานและการระบุชื่อชนิดพืชที่จะดำเนินการวิจัยต่อไปในอนาคต รวมทั้งควรศึกษาทบทวนข้อมูลดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชที่ยังไม่มีความชัดเจนในการจำแนกกลุ่มจากงานวิจัยนี้เพิ่มเติมอีกครั้ง เพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์ชิวคิล่ามีความสมบูรณ์มากขึ้น และควรมีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชวงศ์ชิวคิล่าที่กระจายพันธุ์อยู่ทั่วประเทศเพิ่มเติม เนื่องจากความหลากหลายของชนิดพืชวงศ์ชิวคิล่าในประเทศไทยยังคงสำรวจอยู่

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสาร เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการแก่นักวิจัย และบุคคลทั่วไป
2. ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและดำเนินงานเกี่ยวกับความหลากหลายและอนุกรมวิธานของพืชวงศ์ชิวคิล่า (Aquifoliaceae) ของประเทศไทย โดยจัดทำเผยแพร่ในหนังสือ Flora of Thailand

## 11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. สมราน สุดดี, ดร. วรลลต์ แจ่มจำรูญ, นายวิโรจน์ ตันธนาภินันท์, นายมีศักดิ์ แก้วกุล, นางสาวจิราภรณ์ มีวาสนา, นางสาวนันท์นภัส ภัทรศิริฤฎ์ไตรสิน, นายสุคิด เรืองเรือ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกรม

อุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ดร. สรายุทธ บุญยะเวชชีวิน หัวหน้าโครงการวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ระยะยาว, นายพรหมพิริยะ คีรีวงศ์ และผู้ช่วยประสานงานทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลพืชวงศ์ตีนเป็ด และขอขอบคุณ นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม กรมวิชาการเกษตร ที่ให้คำปรึกษา ข้อมูลวิจัยจนงานสำเร็จลุล่วง

## 12. เอกสารอ้างอิง

- Andrews, S. 1998. Taxonomic notes on the Aquifoliaceae of Sabah and Sarawak. *Sandakania* 11: 1-33.
- Andrews, S. 2002. Aquifoliaceae. In: E. Soepadmo, L.G. Saw and R.C.K. Chung (eds), *Tree Fl. Sabah & Sarawak* Vol. 4 pp. 1-27. Ampang Press Sdn. Bhd., Kaula Lumpur.
- Bridson, D. and L. Forman. 1998. *The Herbarium Handbook*. Royal Botanic Gardens, Kew. 346 pp.
- Cascales, J.; M. Bracco; M.J. Garberoglio; L. Poggio and A.M. Gottlieb. 2017. Integral Phylogenomic Approach over *Ilex* L. Species from Southern South America. *Life (Basel)* 7(4): 47 DOI: 10.3390/life7040047.
- Chen, Y.; H.-X. Chen; H.-L. Li; X.-L. Cheng and L.-Y. Wang. 2019. Complete plastome sequence of *Ilex asprella* (Hooker and Arnott) Champion ex Bentham (Aquifoliaceae), a Chinese folk herbal medicine. *Mitochondrial DNA Part B* 4 (2): 2341-2342 DOI: 10.1080/23802359.2019.1629347.
- Chen, S.K. and Y.X. Feng. 1999. Aquifoliaceae. *Flora reipublicae popularis sinicae*, 45: 105–110. Beijing: Science Press.
- Craib, W. G. (1931). *Florae Siamensis Enumeratio: a list of the plants known from Siam, with records of their occurrence* 1: 277–278. Siam Society, Bangkok.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Galle, F. C. 1997. *Hollies: the genus Ilex*. Timber Press, Portland. 573 pp.
- Gorzalczany, S.; R. Filip; M.D.R. Alonso; J. Miño; G.E. Ferraro and C. Acevedo. 2001. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *Journal of Ethnopharmacology* 75:291–4.
- Gu, J.; L.J. Xu; Y. Peng; W. Xiao; Z.D. Chen and P.G. Xiao. 2011. Investigation of original plants of Kuding tea products and the character identification. *Journal of Chinese Medical Materials* 34:196–199.
- Han, M. 2019(a). *Ilex micrococca*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN830251>
- Han, M. 2019(b). *Ilex suaveolens*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN830249>

- Han, M. 2019(c). *Ilex viridis*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN830250>
- Hao, D.C.; X.J. Gu; P.G. Xiao; Z.G. Liang; L.J. Xu and Y. Peng. 2013. Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3(1): 8-19.
- Jo, S.; Y.-K. Kim; S.-H. Cheon and K.-J. Kim. 2019. The first complete plastome sequence from the family Cardiopteridaceae, *Gonocaryum lobbianum* (Miers) Kurz, *Mitochondrial DNA Part B* 4(1): 1025-1026 DOI: 10.1080/23802359.2019.1584064.
- Kumar, S.; G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Landherr, L.L. and W.E. Higgins. Unpublished. A reevaluation of *Nemopanthus* (Aquifoliaceae) based on nrDNA ITS sequences.
- Li, L.; L.J. Xu; Y. Peng; R. Shi and P. Xiao. 2011. Comparison of greentea and four other kind of teas. *Journal of Chinese Medical Materials* 36:5-10.
- Manen, J.F.; G. Barriera; P.A. Loizeau and Y. Naciri. 2010. The history of extant *Ilex* species (Aquifoliaceae): evidence of hybridization within a Miocene radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 961-977.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Park, J.; Y. Kim; S. Nam; W. Kwon and H. Xi. 2019(a). The complete chloroplast genome of horned holly, *Ilex cornuta* Lindl. & Paxton (Aquifoliaceae). *Mitochondrial DNA Part B* 4(1): 1275-1276 DOI: 10.1080/23802359.2019.1591212.
- Park, J.; Y. Kim; W. Kwon; S. Nam and H. Xi. 2019(b). The complete chloroplast genome of Nepal Holly, *Ilex integra* Thunb. (Aquifoliaceae). *Mitochondrial DNA Part B* 4(1): 1257-1258 DOI: 10.1080/23802359.2019.1591235.
- Pruesapan, K.; S. Andrews and D.A. Simpson. 2014. An outline of Aquifoliaceae for the Flora of Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)* 42: 125.
- Pruesapan, K.; S. Andrews and D.A. Simpson. 2017. *Ilex pubifructa* (Aquifoliaceae), a new species from northern Thailand. *Kew Bulletin* 72:21 DOI 10.1007/S12225-017-9692-7.
- Ridley, H.N. (1922). Order XXXVIII. Ilicineae. *The Flora of Malay Peninsula* 1: 437-442. Reeve & Co., Ltd. London.
- Rodd, T. and G. Bryant. 2007. The Plant Finder: the right plants for every garden. Firefly Books, NSW. 992 pp.

- Setoguchi, H. and I. Watanabe. 2000. International gene flow between insular endemics of *Ilex* (Aquifoliaceae) on the Bonin Islands and the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany* 87(6): 793-810.
- Shaw, J.; E.B. Lickey; E.E. Schilling and R.L. Small. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.*, 94(3): 275-288.
- Shi, L.; N. Li; S. Wang; Y. Zhou; W. Huang; Y. Yang; Y. Ma and R. Zhou. 2016. Molecular Evidence for the Hybrid Origin of *Ilex dabieshanensis* (Aquifoliaceae). *PLoS ONE* 11(1): e0147825. DOI: 10.1371/journal.pone.0147825.
- Son, S.-W.; J.-H. Kim; K.-J. Kim and S.-J. Park. 2009. Molecular evidence for the hybridity of *Ilex x wandoensis* and the phylogenetic study of Korean *Ilex* based on ITS sequence data. *Genes and Genomics* 31(1): 53-63.
- Sosef, M.S.M; L.T. Hong and S. Prawirohatmodjo (Editors). 1998. Timber trees: Lesser-known timbers. *Plant Resources of South-East Asia* No. 5(3). Backhuys Publishers, Leiden. 859 pp.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tardieu-Blot, M.L. (1948). Aquifoliacées. In: H. Humbert & F. Gagnepain (eds). *Supplement a la Flore Générale de L'Indo-Chine* 6: 759-764, 7: 765-781.
- Thomson, J.D.; D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-80.
- White, T.J.; T. Bruns; S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White [eds.], *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315-322. Academic Press, Inc., New York.
- Yang, Y.; L. Chen and H. Peng. 2018. Clarification of the taxonomic confusion between *Ilex formosana* and *I. tetramera* (Aquifoliaceae), with the description of a new species *I. shukunii*. *Phytotaxa* 382(2): 182-192.
- Yao, X.; Y.-H. Tan; Y.-Y. Liu; Y. Song; J.-B. Yang and R.T. Corlett. 2016. Chloroplast genome structure in *Ilex* (Aquifoliaceae). *Scientific Reports* 6: 28559 DOI: 10.1038/srep28559.
- Yao, X.; Y.-Y. Liu; Y.-H. Tan; Y. Song and R.T. Corlett. 2016. The complete chloroplast genome sequence of *Helwingia himalaica* (Helwingiaceae, Aquifoliales) and a chloroplast phylogenomic analysis of the Campanulidae. *Peer J.* 4: e2734 DOI: 10.7717/peerj.2734.



Yi, F.; L. Sun; D.-C. Hao; Y. Peng; F.-M. Han and P.-G. Xiao. 2017. Complex phylogenetic placement of *Ilex* species (Aquifoliaceae): a case study of molecular phylogeny. *Pak. J. Bot.* 49(1): 215-225.

### 13. ภาคผนวก