

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Ilex* L. (Aquifoliaceae)
ในประเทศไทยด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ

Study on Phylogenetic Relationships of Thai *Ilex* L. (Aquifoliaceae)
Based on DNA Data

กาญจนา พฤษพันธ์^{1/*} อัญชลี แก้วดวง^{2/} วีรวุฒิ วงศ์วรัตน์^{3/}
Kanchana Pruesapan^{1/*} Anchalee Kaewdoug^{2/} Theerawut Wongwarat^{3/}

Received 01 July 2021/Revised 26 July 2021/Accepted 03 Aug 2021

ABSTRACT

Species boundaries among *Ilex* L. (Aquifoliaceae) are often not clear-cut due to the morphological overlap of related species. Genetic differentiation is thus needed to clarify their relationship. In the present study, we aimed to investigate the phylogenetic relationships of Thai *Ilex* species using DNA barcode technique. The DNA barcodes of *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* and ITS were examined and analyzed using Maximum Parsimony method. A total of 54 DNA sequence data obtained from this study representing 14 species of Thai *Ilex*. The phylogenetic trees resulted in five congruent main clades with morphological classification. Subgenus *Aquifolium* Section *Aquifolium* comprised *I. odorata* and *I. pubifructa* whereas the sectional placement for *I. depressifructu* was still unclear. Subgenus *Byronia* Section *Byronia* comprised *I. cymosa*, *I. wallichii*, *Ilex* sp. (1) and *Ilex* sp. (2); Section *Lioprinus* comprised *I. phanganensis* and *I. umbellulata*; Section *Paltoria* comprised only *I. triflora*. Subgenus *Prinos* Section *Micrococca* comprised only *I. micrococca*. The results confirmed species identification based on morphology. The placements in the phylogenetic trees supported grouping classification for *I. depressifructu*, *I. phanganensis* and *I. pubifructa* which were recently described as new species for Thailand and could be used as guideline for identifying the two unknown species. More representative species of *Ilex* and variable DNA barcodes should be added to resolve the indefinable information from the present study and to complete research on diversity of Aquifoliaceae in Thailand.

^{1/} สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถ. พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Varieties Protection Office, Department of Agriculture, 50 Phahonyothin Road, Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

^{2/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, ถ. รังสิต-นครนายก คลอง 6 อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

^{2/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit-Nakhon Nayok Road, Khlong Hok, Thanyaburi, Pathum Thani 12110

^{3/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร ถ. มิตรภาพ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

^{3/} Khon Kaen Field Crops Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture, Mittraphap Road, Mueang, Khon Kaen 40000

*Corresponding author: kpruesapan@gmail.com

Keywords: Aquifoliaceae, DNA barcode, Thai *Ilex*, morphological classification, phylogenetic relationships

บทคัดย่อ

พืชสกุล *Ilex* L. ในวงศ์คัสติลา (Aquifoliaceae) มีความผันแปรทางสัณฐานที่คาบเกี่ยวกันระหว่างชนิดสูง ทำให้ยากในการจำแนกชนิดที่ใกล้ชิดออกจากกัน จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมมาช่วยในการอธิบายความใกล้ชิดของชนิดพืช งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คัสติลาในประเทศไทยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Maximum Parsimony ผลการศึกษาได้ข้อมูลดีเอ็นเอ 54 ข้อมูล จัดเป็นข้อมูลความหลากหลายของสกุล *Ilex* ในประเทศไทย 14 ชนิด ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสามารถจำแนกพืชออกเป็น 5 กลุ่ม (clade) ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน ดังนี้ สมาชิกใน Subgenus *Aquifolium* Section *Aquifolium* ได้แก่ *I. odorata* และ *I. pubifructa* ส่วน *I. depressifructu* ยังแสดงตำแหน่งของ section ได้ไม่ชัดเจนภายใต้ Subgenus นี้ สำหรับสมาชิกใน Subgenus *Byronia* Section *Byronia* ได้แก่ *I. cymosa*, *I. wallichii*, *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2); Section *Lioprinus* ได้แก่ *I. phanganensis* และ *I. umbellulata*; Section *Paltoria* ได้แก่ *I. triflora* และสมาชิกใน Subgenus *Prinos* Section *Micrococca* ได้แก่ *I. micrococca* ซึ่งผลการศึกษาสามารถยืนยันการระบุชื่อที่ถูกต้องของพืช และใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการจำแนกกลุ่มของ *I. depressifructu*, *I. phanganensis* และ *I. pubifructa* ที่เพิ่งมีการค้นพบในประเทศไทย เป็นพืชชนิดใหม่ของโลก และใช้เป็นแนวทางในการระบุชนิดของ unknown species ได้ และเพื่อ

ให้การศึกษาทบทุนพืชวงศ์คัสติลาในประเทศไทยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ควรศึกษาเพิ่มเติมตัวแทนพืชและดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มีความผันแปรสูงขึ้นไป สำหรับใช้ยืนยันการจัดกลุ่มของชนิดพืชที่ยังมีความสับสน

คำสำคัญ: พืชวงศ์คัสติลา, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, สกุล *Ilex* ในประเทศไทย, การจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน, ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

บทนำ

พืชสกุล *Ilex* L. เป็นพืชสกุลเดียวในวงศ์คัสติลา (Aquifoliaceae) จัดเป็นกลุ่มพืชที่มีศักยภาพสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งทางการแพทย์ สมุนไพร อาหาร ไม้ประดับ หรือเชื้อเพลิง (Chen and Feng, 1999; Gorzalczany *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 2013; Sosef *et al.*, 1998) มีการกระจายพันธุ์อยู่ในวงจำกัด ทั่วโลกพบมากกว่า 600 ชนิด (Loizeau *et al.*, 2016) ขณะที่ประเทศไทยมีรายงานพบเพียง 5 ชนิด เท่านั้น (Craib, 1931) และยังไม่ได้มีการบรรยายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชนิดพืชเหล่านั้น

การศึกษาวิจัยความหลากหลายและอนุกรมวิธานของชนิดพืชวงศ์คัสติลาในประเทศไทยได้เริ่มขึ้นอย่างจริงจังในปี พ.ศ. 2557 โดย Pruesapan *et al.* (2014) ศึกษาในเบื้องต้นพบพืชวงศ์คัสติลา 15 ชนิด และต่อมาได้รายงานเป็นพืชชนิดใหม่ของโลก 3 ชนิด ได้แก่ *Ilex pubifructa* Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson (Pruesapan *et al.*, 2017), *I. depressifructu* Pruesapan & Welzen และ *I. phanganensis* Pruesapan & Welzen (Pruesapan and Welzen, 2021) แต่การระบุชื่อ (Identification) ชนิดพืชสกุล *Ilex* ด้วยลักษณะทางสัณฐานยังมีความคลุมเครือ เนื่องจากเป็นพืชแยกเพศอยู่ต่างต้น (dioecious) อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานมีความผันแปรสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาไม่มีส่วนสืบพันธุ์ที่ครบสมบูรณ์

ทั้งดอกเพศผู้ ดอกเพศเมีย ผล และเมล็ด จะทำให้นักพฤกษอนุกรมวิธานระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้ยาก และมักพบความผิดพลาดในการระบุชื่อถ้าใช้เฉพาะข้อมูลทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวที่ปรากฏอยู่บนชิ้นตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชต่าง ๆ นักวิจัยจึงได้นำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) มาช่วยในการยืนยันชนิดและแสดงความใกล้เคียงของพืชวงศ์คลาออย่างแพร่หลาย โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอทั้งบริเวณของคลอโรพลาสต์และนิวเคลียสร่วมกัน เช่น *rbcL*, *matK*, *trnL-F*, *psbA-trnH*, ITS, ETS, *gapC* และ *nepGS* (Hao et al., 2013; Setoguchi and Watanabe, 2000; Shi et al., 2016; Yang et al., 2018) มีการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอเหล่านี้ในการพิสูจน์ความสับสนในการระบุชื่อพืชที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกันมากสำเร็จ เช่น *I. formosana* Maxim. และ *I. tetramera* (Rehder) H.Y. Zou (Yang et al., 2018) รวมถึงการใช้ตรวจสอบลูกผสมที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ เช่น พบว่า *I. dabieshanensis* K. Yao & M.B. Yeng เป็นลูกผสมระหว่าง *I. cornuta* Lindl. & Paxton กับ *I. latifolia* Thunb. (Shi et al., 2016) เป็นต้น ซึ่งการได้ทราบต้นกำเนิดของชนิดพืชที่ผสมข้ามเหล่านี้ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานด้านพฤกษอนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ และการอนุรักษ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คลาในประเทศไทยด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และเปรียบเทียบความใกล้เคียงของชนิดพืชที่จำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐาน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการระบุยืนยันชนิดพืชในวงศ์คลา

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืชที่ศึกษา

1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอ

รวบรวมตัวอย่างพืชวงศ์คลา จาก 2 แหล่ง คือ 1) เก็บตัวอย่างจากภาคสนาม โดยเก็บรักษา

สภาพชิ้นส่วนใบไว้ในซิลิกาเจล พร้อมจัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิงของตัวอย่างเหล่านั้น และลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพมหานคร (Bangkok Herbarium, BK) และ 2) ใช้ตัวอย่างชิ้นใบจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่เก็บรักษาไว้ในหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (The Forest Herbarium, BKF) รวมทั้งสิ้น 19 taxa (Table 1)

1.2 ตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์เป็น Ingroup taxa ประกอบด้วย พืชสกุล *Ilex* L. ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ จำนวน 19 taxa (Table 1) และตัวอย่างดีเอ็นเอที่เก็บบันทึกไว้บนเว็บไซต์ของ GenBank, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ประกอบด้วย ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์ จำนวน 14 taxa โดยคัดเลือกจากชนิดพืชที่มีจีโนมสมบูรณ์ แล้วตัดเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 3 บริเวณ คือ *matK*, *rpl32-trnL* และ *trnL-trnF* มาศึกษา และตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนิวเคลียส ITS จำนวน 22 taxa (Table 1) โดยพืชวงศ์คลาที่คัดเลือกมาเป็น Ingroup taxa เป็นตัวแทนชนิดพืชที่ได้จำแนกกลุ่มไว้ด้วยข้อมูลทางสัณฐาน โดย Galle (1997) ส่วนตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์เป็น Outgroup taxa ใช้ตัวแทนชนิดพืชวงศ์ Helwingiaceae, Cardiopteridaceae และ Phyllonomaceae (Table 1) ซึ่งเป็นพืชที่มีความใกล้เคียงกับวงศ์ Aquifoliaceae และจัดอยู่ในอันดับ Aquifolales เหมือนกัน

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนใบของพืชมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามกรรมวิธีของ

บริษัท แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ใน agarose gel 1% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 15 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ.

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชทั้ง 19 ตัวอย่างเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) โดยแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ปริมาตร 1 – 1.25 ไมโครลิตร (μL) ใช้ไพรเมอร์ (Table 2) 1 คู่ต่อปฏิกิริยา ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล (μM) ช่างละ 2.5 ไมโครลิตร ชุดน้ำยา 2X Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่ 98 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน 3 ขั้นตอน จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย ขั้นตอน denaturation ที่ 98 °ซ. เป็นเวลา 10 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 54 °ซ. เป็นเวลา 10 วินาที และขั้นตอน extension ที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 20 วินาที ตามด้วยขั้นตอน extension รอบสุดท้าย ที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ใน agarose gel 1.5% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 15 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Gel Documentation System

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2 ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied

Biosystems, USA) โดยใช้ ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี แล้วตรวจสอบความปนเปื้อนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม BlastN บนฐานข้อมูลของ NCBI จากนั้น ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit 7 (Hall, 1999) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ไปเรียงเทียบ (alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนร่วมกับ ingroup taxa และ outgroup taxa ที่ดาวน์โหลดจากฐานข้อมูลของ GenBank (Table 1) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (Thompson et al., 1994) ด้วยวิธี multiple alignment และตรวจสอบความถูกต้องของการเรียงเทียบด้วยตาเปล่าอีกครั้ง

4. การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ

นำเมตริกซ์ที่ได้จากการเรียงเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม 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 ถูกเก็บไว้ประเมินค่า Bootstrap Percentages ที่ 85 – 100% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับสูง ที่ 75 – 84% เป็นระดับปานกลาง ที่ 50 – 74% เป็นระดับต่ำ และ <50% เป็นค่าที่ไม่สนับสนุนความเชื่อมั่น โดยไม่นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์กับบริเวณนิวเคลียสมาวិเคราะห์ร่วมในเมตริกซ์เดียวกัน เนื่องจาก ตัวแทนชนิดพืชที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์แตกต่างกัน ทั้งนี้ เพื่อ

เป็นการเปรียบเทียบการสนับสนุนหรือชี้ให้เห็นความแตกต่างของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างพืชวงศ์คิลลาที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากทั้งสองบริเวณ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์คิลลาที่ศึกษาได้ใหม่ในงานวิจัยนี้ได้เก็บบันทึกไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank, NCBI รวมทั้งสิ้น 54 ข้อมูล ประกอบด้วย GenBank accession number MT114079 – MT114132 (Table 1)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของชนิดพืชในวงศ์คิลลา

พืชวงศ์คิลลา จำนวน 19 taxa ที่ศึกษาี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ได้ จำนวน 14, 15, 10 และ 15 ตัวอย่างตามลำดับ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* และ ITS มีประสิทธิภาพสูงสุด คิดเป็น 78.9% (15 จาก 19 ตัวอย่าง) รองลงมา คือ *matK* คิดเป็น 73.7% (14 จาก 19 ตัวอย่าง) และ *trnL-trnF* มีประสิทธิภาพต่ำสุด คิดเป็น 52.6% (10 จาก 19 ตัวอย่าง) อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบสภาพตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่า ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้นั้น ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่ตัดชิ้นส่วนใบมาจากตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่เก็บรักษา ไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ได้แก่ *I. depressifructu*, *I. embelioides*, *I. ficoidea*, *I. glomerata*, *I. odorata* และ *I. umbellulata* (1) ซึ่งดีเอ็นเอของตัวอย่างเหล่านี้อาจมีปริมาณน้อยมากหรือมีสภาพถูกทำลาย หรือมีตัวยับยั้งการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากกระบวนการอบแห้งและการรักษาสภาพตัวอย่างด้วยน้ำยารักษาสภาพพรรณไม้ (Drbkov, 2014) ดังนั้น คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จึงไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการได้ หรือได้ไม่สมบูรณ์ ส่วนตัวอย่างที่เก็บรักษาสภาพใบสดในซิลิกาเจล มีดีเอ็นเอที่ยังคงสภาพสมบูรณ์ แต่ก็มิบางตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnL-trnF* คือ *Ilex* sp. (1) และ *I. umbellulata* (2) ซึ่งอาจเกิดจากสารตั้งต้นหรือสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไม่เหมาะสมเพียงพอ

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ พบว่า *rpl32-trnL* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวที่สุด และมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 928 – 945 คู่เบส พบ *I. triflora* มีขนาดนิวคลีโอไทด์ยาวที่สุด คือ 945 คู่เบส ส่วน *I. umbellulata* (2), *I. wallichii* (1) และ (2) มีขนาดนิวคลีโอไทด์สั้นที่สุด คือ 929 คู่เบส ยกเว้น *I. embelioides* ที่สามารถตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียงบางส่วน มีขนาดยาวเพียง 602 คู่เบส เนื่องจากดีเอ็นเอที่เสียหาย และ *Ilex* sp. (1) ที่ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 770 คู่เบส ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ผลโครมาโตแกรมช่วงปลายที่ไม่สามารถอ่านผลได้ชัดเจน ส่วน *trnL-trnF* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดยาวรองลงมาจาก *rpl32-trnL* โดยมีขนาดตั้งแต่ 929 – 936 คู่เบส พบว่า *I. micrococca* (1) และ (2) มีขนาดยาวที่สุด คือ 936 คู่เบส และ *I. pubifructa* มีขนาดสั้นที่สุด คือ 929 คู่เบส ส่วนตัวอย่างอื่น ๆ มีขนาดนิวคลีโอไทด์เท่ากัน คือ 930 คู่เบส สำหรับ *matK* ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวเป็นลำดับที่สาม คือ มีขนาด 855 คู่เบส และลำดับสุดท้าย คือ ITS ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดตั้งแต่ 714 – 737 คู่เบส โดย *Ilex* sp. (1) มีขนาดยาวที่สุด คือ 737 คู่เบส และ *I. pubifructa* มีขนาดสั้นที่สุด คือ 714 คู่เบส

2. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คิลลาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส

2.1 คุณสมบัติของข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส

ผลการวิเคราะห์ตัวแทนพืชวงศ์คิลลาของแต่ละบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่นำมาใช้ร่วมเป็น

Inggroups taxa ทั้งหมด พบว่า มีตัวแทนพืชสกุล *Ilex* ของ *matK* จำนวน 23 taxa, *rpl32-trnL* จำนวน 24 taxa, *trnL-trnF* จำนวน 20 taxa และ ITS จำนวน 28 taxa (Table 1 และ Table 3) ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเรียงเทียบในแต่ละเมตริกซ์ พบว่า การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 5 เมตริกซ์ คือ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*, combined chloroplast และ ITS มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียงเทียบยาว 855, 1,104, 1,038, 2,997 และ 791 คู่เบส ตามลำดับ (Table 3) มีตำแหน่งผันแปร (variable characters) ของนิวคลีโอไทด์ 113, 275, 132, 520 และ 398 ตำแหน่ง ตามลำดับ แต่เป็นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ (potential informative sites) เพียง 28, 106, 35, 169 และ 182 ตำแหน่ง ตามลำดับ เท่านั้น และพบว่า ITS มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ที่สูงสุด รองลงมาตามลำดับ คือ combined chloroplast, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ *matK* ซึ่งตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์นี้ ส่งผลแสดงความสัมพันธ์ของ *Ilex* ในแต่ละแผนภูมิ โดยให้ค่า tree length ที่แปรผันสอดคล้องกันตามลำดับ คือ 764, 589, 316, 149 และ 120 steps แสดงให้เห็นว่า มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของชนิด *Ilex* เกิดขึ้นในตำแหน่งจำเพาะ ITS มากที่สุด และรองลงมา คือ combined chloroplast แต่กลับพบการเกิด homoplasy สูงสุดใน ITS โดยมีค่า Consistency Index (CI) = 0.566 และมีค่า Retention Index (RI) = 0.755 ในขณะที่ในตำแหน่งจำเพาะต่าง ๆ บริเวณคลอโรพลาสต์ มีการเกิด homoplasy ต่ำ (CI = 0.889 – 0.908, RI = 0.919 – 0.947)

2.2 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คิลลา ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คิลลาด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ *matK*, *rpl32-trnL* และ *trnL-trnF* ไม่พบความสัมพันธ์ที่ขัดแย้งกันของชนิด *Ilex* บนแผนภูมิแยกของแต่ละบริเวณ จึงได้นำมาวิเคราะห์ร่วมกันเป็นข้อมูลรวมบริเวณคลอโรพลาสต์ (combined chloroplast *matK+rpl32-trnL+trnL-trnF*) ซึ่งให้ผลความสัมพันธ์ของชนิด *Ilex* บนแผนภูมิที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์แยกกัน แต่ประสิทธิภาพในการแยกกลุ่มมีความชัดเจนมากกว่า จึงใช้เฉพาะแผนภูมิของข้อมูลดีเอ็นเอรวมบริเวณคลอโรพลาสต์ (Figure 1) ในการอภิปรายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชนิดพืชในวงศ์คิลลาเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์ของชนิดพืชบนแผนภูมิดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียส ITS (Figure 2) ผลการเปรียบเทียบพบว่า การจับกลุ่มของชนิด *Ilex* บนแผนภูมิของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์และนิวเคลียสมีความสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ โดยสามารถจำแนกตัวอย่างพืชออกเป็น 5 กลุ่ม (clade) หลัก ๆ ดังนี้

Clade 1 ประกอบด้วย สมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ยกเว้น *I. dumosa* ที่ถูกจำแนกไว้ต่างกลุ่ม คือ Subgen. *Byronia* Sect. *Paltoria* โดยพบว่า *I. odorata* และ *I. pubifruca* ที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ แสดงความใกล้เคียงอย่างชัดเจนกับสมาชิกใน Sect. *Aquifolium* โดยสมาชิกทั้งหมดจับกลุ่มกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น (Bootstrap Support, BS) ต่ำที่ 58% และสูงที่ 97% บนแผนภูมิดีเอ็นเอรวมบริเวณคลอโรพลาสต์ และบริเวณนิวเคลียส ตามลำดับ

Table 1 Morphological classification of *Ilex* L. based on Galle in 1997, voucher information and GenBank accessions for DNA sequences used in this study

Ingroups : **Subgenus *Aquifolium* Gray.** Section *Aquifolium* Gray [AA]. *Ilex corallina* Franch. var. *aberrans* Hand.-Mazz.: –, KF255675; *I. cornuta* Lindl. & Paxton: MK335536, –; *I. delavayi* Franch.: KX426470, –; *I. embelioides* Hook.f. [Takahashi & Tamura T-63342 (BKF)]: –, MT114091, –, –; *I. ficoidea* Hemsl. [Fukuoka T-63801 (BKF)]: –, –, –, MT114123; *I. ficoidea* Hemsl.: –, KF255665; *I. ficoidea* Hemsl.: –, KY417935; *I. glomerata* King [Gardner & Tippayasri ST1769 (BKF)]: –, –, –, MT114123; *I. integra* Thunb.: MK335537, KY417948; *I. kaushue* S.Y.Hu: –, KY417941; *I. latifolia* Thunb.: KX426465, KY417933; *I. odorata* Buch-Ham. ex D.Don [Pooma 1532 (BKF)]: –, MT114094, –, –; *I. paraguariensis* A.St.-Hil.: KP016928, –. Section *Lauroilex* S.Y.Hu [AL]. *I. venulosa* Hook.f.: –, KY417939. Section *Pseudoaquifolium* S.Y.Hu [AP]. *I. lihuaensis* T.R.Dudley: –, KF255674; *I. longicaudata* H.F.Comber: –, KY417934; *I. pubescens* Hook. & Arn.: KX426467, KF255672; *I. wilsonii* Loes.: KX426471, FJ39472

Subgenus *Byronia* (Endl.) Loes. Section *Paltoria* (Ruiz & Pavon) Maxim. [BP]. *I. dumosa* Reissek: KP016927, –; *I. szechwanensis* Loes.: KX426466, –; *I. triflora* Blume [Suddee 5316 (BKF)]: MT114110, MT114096, MT114084, MT114127; *I. triflora* Blume: –, KY417932; *I. viridis* Champ. ex Benth.: MN830250, KY417946. Section *Byronia* Loes. [BB]. *I. cymosa* Blume (1) [Rueangruea SR 82 (BKF)]: MT114104, MT114089, MT114079, MT114118; *I. cymosa* Blume (2) [Pruesapan KP2018-1 (BK)]: MT114105, MT114090, MT114080, MT114119; *I. cymosa* Blume (3) [Pruesapan KP2018-27 (BK)]: –, –, –, MT114120; *I. wallichii* Hook.f. (1) [Pruesapan KP2018-13 (BK)]: MT114113, MT114099, MT114085, –; *I. wallichii* Hook.f. (2) [Pruesapan KP2018-16 (BK)]: MT114114, MT114100, MT114086, MT114130; *I. wallichii* Hook.f.: –, FJ394720. Section *Lioprinus* Loes. [BL]. *I. hirsuta* C.J.Tseng ex S.K.Chen & Y.X.Feng: –, KF255668; *I. kwangtungensis* Merr.: –, KY417943; *I. rotunda* Thunb.: –, KY417951; *I. suaveolens* (H.Lv.) Loes.: MN830249, –; *I. umbellulata* (Wall.) Loes. (1) [Pruesapan 2015-1 (BK)]: MT114111, MT114097, –, MT114128; *I. umbellulata* (Wall.) Loes. (2) [Kertsawang 4621 (BK)]: MT114112, MT114098, –, MT114129. 'Opposite-leaved species' [BO]. *I. zygophylla* Merr.: –, FJ394728.

Subgenus *Prinos* (L.) Loes. Section *Micrococca* (Loes.) S.Y.Hu [PM]. *I. micrococca* Maxim. (1) [Meewasana *et al.* KP2018-24 (BK)]: MT114107, MT114092, MT114081, MT114124; *I. micrococca* Maxim. (2) [Meewasana *et al.* KP2018-25 (BK)]: MT114108, MT114093, MT114082, MT114125; *I. micrococca* Maxim.: MN830251, AH007160; *I. polyneura* (Hand.-Mazz.) S.Y.Hu: KX426468, KY417937. Section *Prinoides* (De Candolle) Gray [PP]. *I. asprella* (Hook. & Arn.) Champ. ex Benth.: MK834323, –; *I. macrocarpa* Oliv.: –, KF255671; *I. tsoii* Merr. & Chun: –, FJ394718.

Unclassified species. *I. depressifructu* Pruesapan & Welzen [Suddee *et al.* 4392 (BKF)]: MT114106, –, –, MT114122; *I. phanganensis* Pruesapan & Welzen [Khiriwong & Pruesapan KP2018-32 (BK)]: MT114117, MT114103, MT114088, MT114132; *I. pubifructa* Pruesapan, S.Andrews & D.A.Simpson [Pruesapan KP2017-1 (BK)]: MT114109, MT114095, MT114083, MT114126; *Ilex sp. (1)* [KaeoKoon *et al.* KP2018-30 (BK)]: MT114115, MT114101, –, MT114131; *Ilex sp. (2)* [KaeoKoon *et al.* KP2018-31 (BK)]: MT114116, MT114102, MT114087, –.

Outgroups : *Helwingia chinensis* Batalin: –, AF200594; *H. himalaica* Hook.f. & Thomson ex C.B.Clarke: KX434807, –; *Gonocaryum lobbianum* (Miers) Kurz: MK390345, –; *Phyllonoma ruscifolia* Willd. ex Roem. & Schult.: –, AJ492650.

Remarks: DNA sequences generated new in this study indicated with collector number and herbarium code followed by GenBank accession numbers of *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* and ITS for each taxon. DNA sequences taken from NCBI database indicated with GenBank accession numbers of chloroplast genome and ITS for each taxon. Missing data indicated with “–”.

Table 2 Primers for polymerase chain reaction (PCR) amplification

Barcode	Primer name	Sequence (5'-3')	Reference
<i>matK</i>	3F_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGA	Ki-Joong Kim, unpublished
	1R_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	Ki-Joong Kim, unpublished
<i>rpl32-trnL</i>	rpl32-F	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	Shaw <i>et al.</i> , 2007
	trnL	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	Shaw <i>et al.</i> , 2007
<i>trnL-trnF</i>	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

Table 3 Parsimony analyses and data properties for five DNA datasets

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
No. of potential informative sites (%)	28 (3.3)	106 (9.6)	35 (3.4)	169 (5.6)	182 (23)
Length of trees (step)	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

Clade 2 ประกอบด้วย สมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* และ Sect. *Pseudoaquifolium* รวมทั้ง *I. depressifructu* ซึ่งเป็นชนิดพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ปรากฏอยู่ร่วมกัน แต่บนแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ ปรากฏสมาชิกใน Subgen. *Prinos* รวมอยู่ด้วย โดยสมาชิกทั้งหมดแสดงความใกล้เคียงกันด้วยค่า BS สูงที่ 86% และปานกลางที่ 82% บนแผนภูมิ

ตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ และบริเวณ นิวเคลียส ตามลำดับ

Clade 3 ประกอบด้วย ชนิดพืชที่ถูกจำแนกไว้ใน Subgen. *Byronia* ยกเว้น *I. pubescens* KF255672 ที่ถูกจำแนกไว้ใน Subgen. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* จับกลุ่มอยู่ร่วม Clade บนแผนภูมิตีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียสด้วย โดยสมาชิกทั้งหมดแสดงความใกล้เคียงกันด้วยค่า BS สูงถึง 94%

และ 100% บนแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ และบริเวณนิวเคลียส ตามลำดับ

Clade 4 ของแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ แสดงความใกล้ชิดกันด้วยค่า BS สูงถึง 99% ประกอบด้วย สมาชิกใน Subgen. *Prinos* Sect. *Micrococca* เป็นหลัก ซึ่งสอดคล้องกับสมาชิกส่วนใหญ่ของ Subclade 4.1 บนแผนภูมิตีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียส ซึ่งมีค่า BS สูงที่ 94% แต่ต่างกับที่ *I. pubescens* KX426467 ซึ่งเป็นสมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* ปรากฏอยู่บนแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ ในขณะที่ *I. ficoidea* ซึ่งเป็นสมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ปรากฏอยู่บนแผนภูมิตีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียส ส่วน Subclade 4.2 ที่ปรากฏเฉพาะบนแผนภูมิตีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียส พบการรวมกลุ่มกันของสมาชิกใน Subgen. *Prinos* Sect. *Prinoides* และ *I. ficoidea* KF255665 สมาชิกของ Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* ด้วยค่า BS สูงถึง 99%

Clade 5 แสดงความใกล้ชิดกันด้วยค่า BS สูงถึง 95% และต่ำที่ 74% บนแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ และบริเวณนิวเคลียส ตามลำดับ ประกอบด้วย สมาชิกของ Subgen. *Byronia* เป็นหลัก และแยกกลุ่มแสดงความสัมพันธ์อย่างชัดเจนออกไปเป็น 3 Subclade โดย Subclade 5.1 แสดงความใกล้ชิดกันด้วยค่า BS สูงที่ 89% และ 99% บนแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ และบริเวณนิวเคลียส ตามลำดับ ประกอบด้วยสมาชิกใน Sect. *Byronia* ยกเว้น *I. glomerata* ที่ถูกจำแนกไว้ภายใต้ Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* บนแผนภูมิตีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียส โดยสมาชิกใน Sect. *Byronia* เหล่านี้จับกลุ่มร่วมกับ *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2) ซึ่งยังไม่ได้จำแนกกลุ่ม แต่บนแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ *Ilex* sp. (1) แยกตัวเป็น sister clade กับ Subclade 5.1+ Subclade 5.2 ส่วน Subclade 5.2 บนแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ และบริเวณ

นิวเคลียส ประกอบด้วย สมาชิกใน Sect. *Lioprinus* จับกลุ่มอยู่ร่วมกับ *I. phanganensis* ซึ่งยังไม่ได้จำแนกกลุ่ม ด้วยค่า BS สูงที่ 88% และ 99% ตามลำดับ แต่พบการจับกลุ่มโดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของ *I. embelioides* ซึ่งเป็นสมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* บนแผนภูมิตีเอ็นเอร่วมบริเวณคลอโรพลาสต์ สำหรับ Subclade 5.3 พบเฉพาะบนแผนภูมิตีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียส ถูกจัดไว้ใน Subgen. *Byronia* กลุ่ม 'Opposite-leaved species' จับกลุ่มกับ Subclade 5.1 โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น นอกจากนี้ พบว่า บนแผนภูมิตีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียส มีสมาชิกของ Subgen. *Byronia* Sect. *Lioprinus* แยกกลุ่มอยู่ใกล้ชิดกันโดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น โดยแสดงตำแหน่งอยู่ระหว่าง Clade 2–Clade 4–Clade 5 และ Clade 1– Clade 3

3. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ตีนเป็ดด้วยข้อมูลตีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับความใกล้ชิดของชนิดพืชที่ถูกจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน

3.1 ความสัมพันธ์ของชนิดพืชภายใน Subgenus *Aquifolium* Gray

การวิเคราะห์ด้วยข้อมูลตีเอ็นเอ พบว่า ชนิดพืชในวงศ์ตีนเป็ดที่พบการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย รวมกลุ่มอยู่กับชนิดพืชที่จำแนกไว้ภายใต้ Subgen. *Aquifolium* จำนวน 3 ชนิด คือ *I. odorata* และ *I. pubifructa* (Figures 1–2: Clade 1) และ *I. depressifructu* (Figures 1–2: Clade 2) ซึ่งเป็นพืชที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ โดย *I. odorata* ยืนยันตำแหน่งการจำแนกด้วยข้อมูลตีเอ็นเอ และข้อมูลทางสัณฐานสอดคล้องกันอยู่ภายใต้ Sect. *Aquifolium* สำหรับ *I. pubifructa* แสดงความใกล้ชิดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *I. odorata* และสมาชิกส่วนใหญ่ของ Sect. *Aquifolium* ด้วยเช่นกัน เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานของพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่า มีลักษณะเด่นร่วมกันกับชนิดอื่น ๆ คือ พืชทั้งกลุ่มมีขอบใบแบบจักฟันเลื่อย

มีวงกลีบ 4 กลีบ ผลมีเมล็ดแข็ง (pyrene) 4 เมล็ด และพิวด้านข้างเมล็ดมีลักษณะเหี่ยวยุบ มีริ้วเป็นหลุมเว้า เป็นร่องยาว และพิวด้านหลังนูนออกมา อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลักษณะของเมล็ดแข็งอย่างละเอียด พบว่า มีลักษณะแตกต่างกัน (Figure 3D, F) ซึ่งการจำแนกโดย Galle (1997) นั้น *I. odorata* (Figure 3C–D) ถูกจัดแยกกลุ่มย่อยไว้ใน Series *Repandae* (Loes.) S.Y. Hu แต่ลักษณะทางสัณฐานส่วนใหญ่ของ *I. pubifruca* (Figure 3E–F) นั้น มีความคล้ายคลึงกับ *I. denticulata* Wall. มากกว่า (Pruesapan et al., 2017) ต่างกันแค่เพียง *I. pubifruca* มีขนสั้นนุ่มปกคลุมส่วนต่างๆ ในขณะที่ *I. denticulata* ไม่มีขนปกคลุมส่วนต่างๆ ของพืช ดังนั้น ตำแหน่งการจัดกลุ่มของ *I. pubifruca* จึงเหมาะสมอยู่ใน Sect. *Aquifolium* และสามารถจำแนกไว้ภายใต้ Series *Denticulatae* S.Y. Hu เช่นเดียวกับ *I. denticulata*

สำหรับ *I. depressifruca* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ซิลิสิกซ์ชนิดที่ยังไม่ถูกจำแนกกลุ่ม เนื่องจากเพิ่งมีการรายงานเป็นพืชชนิดใหม่ของโลก (Pruesapan and Welzen, 2021) จากผลการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ พบว่า *I. depressifruca* แสดงตำแหน่งบนแผนภูมิของข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์และบริเวณนิวเคลียสคาบเกี่ยวกับบนแผนภูมิของข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ *I. depressifruca* จับกลุ่มกับ *I. asprella* MK834323, *I. micrococca* MN830251 ซึ่งเป็นสมาชิกใน Subgen. *Prinos* Sect. *Prinoides* และ Sect. *Micrococca* ตามลำดับ และ *I. wilsonii* KX426471 ซึ่งเป็นสมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* Sect. *Pseudoaquifolium* (Figure 2: Clade 2) ส่วนบนแผนภูมิของข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียส *I. depressifruca* จับกลุ่มกับสมาชิกของ Subgen. *Aquifolium* ทั้งหมดประกอบด้วย สมาชิกของ Sect. *Aquifolium* และ Sect. *Lauroilex* กลุ่มละ 1 ชนิด และสมาชิกของ

Sect. *Pseudoaquifolium* 3 ชนิด ซึ่งมี *I. wilsonii* FJ394722 อยู่ด้วย Pruesapan and Welzen (2021) ได้ระบุว่า *I. depressifruca* มีความคล้ายคลึงกับ *I. englishii* Lace ซึ่ง Galle (1997) ได้จำแนกกลุ่มไว้ใน Sect. *Pseudoaquifolium* Series *Sideroxyloides* (Loes.) S.Y. Hu โดยพบว่า มีลักษณะเด่นร่วมกันกับชนิดอื่น ๆ คือ พืชทั้งกลุ่มมีขอบใบเรียบ มีวงกลีบ 5 กลีบ ผลมีเมล็ดแข็ง 5 เมล็ด และพิวด้านหลังเมล็ดมีลักษณะเป็นร่องตามยาว 5 ร่อง และมีริ้ว 6 ริ้ว (Figure 3A–B) ดังนั้น จากข้อมูลที่ปรากฏในเบื้องต้น สามารถจำแนกการจัดกลุ่มของ *I. depressifruca* ได้ใน Subgen. *Aquifolium* และสามารถทำนายตำแหน่งว่าจะใกล้เคียงกับสมาชิกใน Sect. *Pseudoaquifolium* แต่ในงานวิจัยนี้ ยังไม่อาจระบุตำแหน่ง section ของพืชชนิดนี้ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากต้องเพิ่มจำนวนตัวแทนของแต่ละ section มาใช้ในการวิเคราะห์ที่เหมาะสมมากกว่านี้

3.2 ความสัมพันธ์ของชนิดพืชภายใน Subgenus *Prinos* (L.) Loes.

Subgenus *Prinos* (L.) Loes. มีลักษณะทางสัณฐานที่โดดเด่น คือ บนกิ่งย่อยจะปรากฏ lenticel ที่เห็นได้ชัดเจน ส่วนใหญ่มีขอบใบเป็นจักฟันเลื่อย หรือหยักมนถี่ และช่อดอกเพศเมียเป็นช่อเดี่ยว มีการจำแนกกลุ่มย่อยเป็น 4 section โดยใช้ลักษณะเด่นของผลที่มีจำนวนเมล็ดแข็งและลวดลายบนเมล็ดที่แตกต่างกัน (Galle, 1997) จากผลการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลโมเลกุล พบว่า ชนิดพืชในวงศ์ซิลิสิกซ์ที่พบการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย รวมกลุ่มอยู่กับชนิดพืชที่จำแนกไว้ภายใต้ Subgen. *Prinos* มีจำนวน 1 ชนิด คือ *I. micrococca* จำนวน 2 taxa คือ *I. micrococca* (1) และ (2) ซึ่งทั้ง 2 taxa ยืนยันการระบุชื่อชนิดที่ถูกต้อง และจับกลุ่มอยู่ด้วยกันกับสมาชิกใน Sect. *Micrococca* อีก 2 taxa คือ *I. micrococca* AH007160 และ *I. polyneura* KY417937 (Figure 1-2:

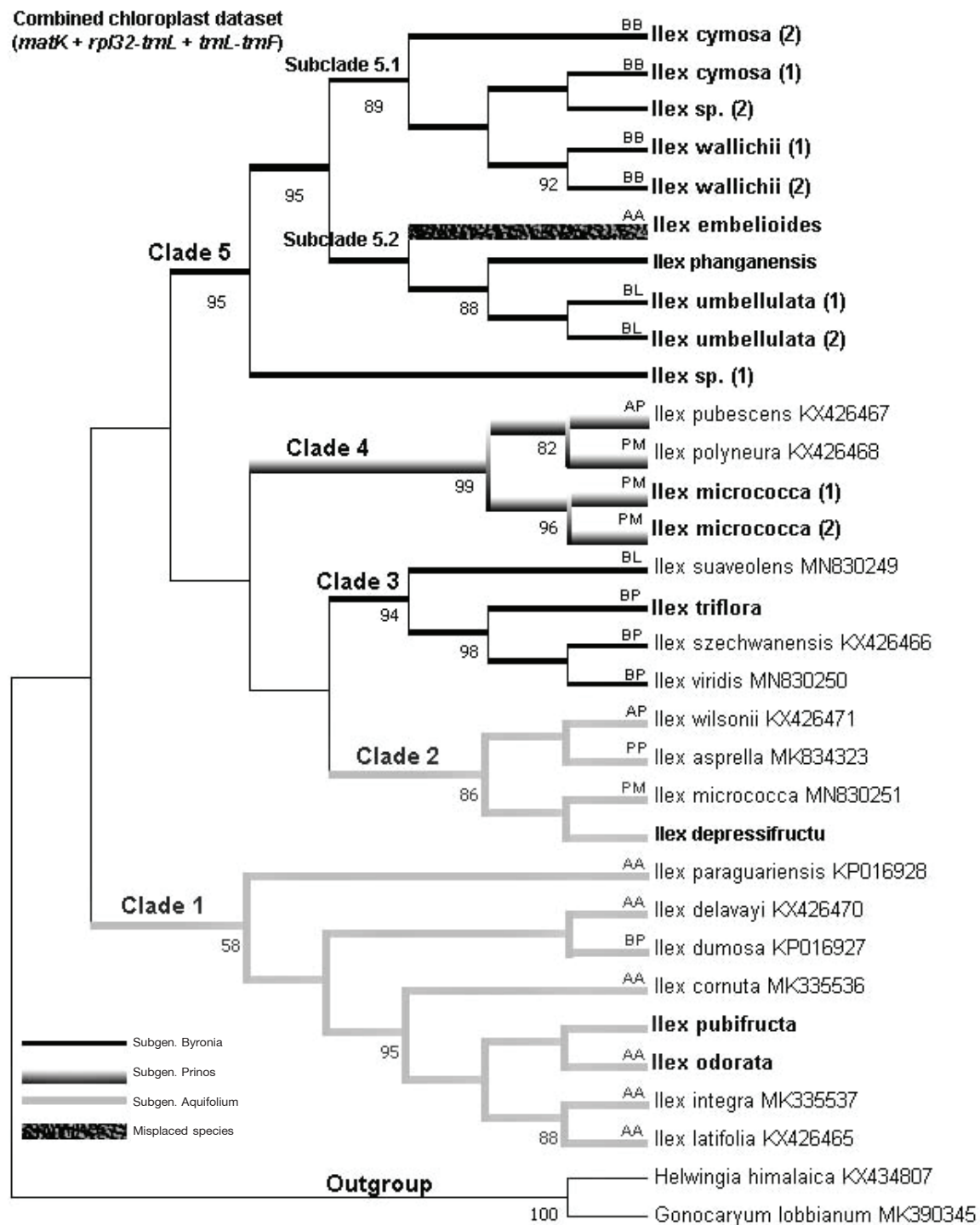


Figure 1 The Maximum Parsimony tree inferred from the combined DNA dataset (*matK+rpl32-trnL+trnL-trnF*). *Ilex* taxa generated new in this study are shown in bold and taken from GenBank are shown in regular. The bootstrap percentages greater than 50 are shown below branches. Capital letters on branches referred to subgenera and sections abbreviations of *Ilex*. Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* = AA, Sect. *Lauroilex* = AL, Sect. *Pseudoaquifolium* = AP; Subgen. *Byrionia* Sect. *Paltoria* = BP, Sect. *Byrionia* = BB, Sect. *Liopri-nus* = BL; Subgen. *Prinos* Sect. *Micrococca* = PM, Sect. *Prinoides* = PP

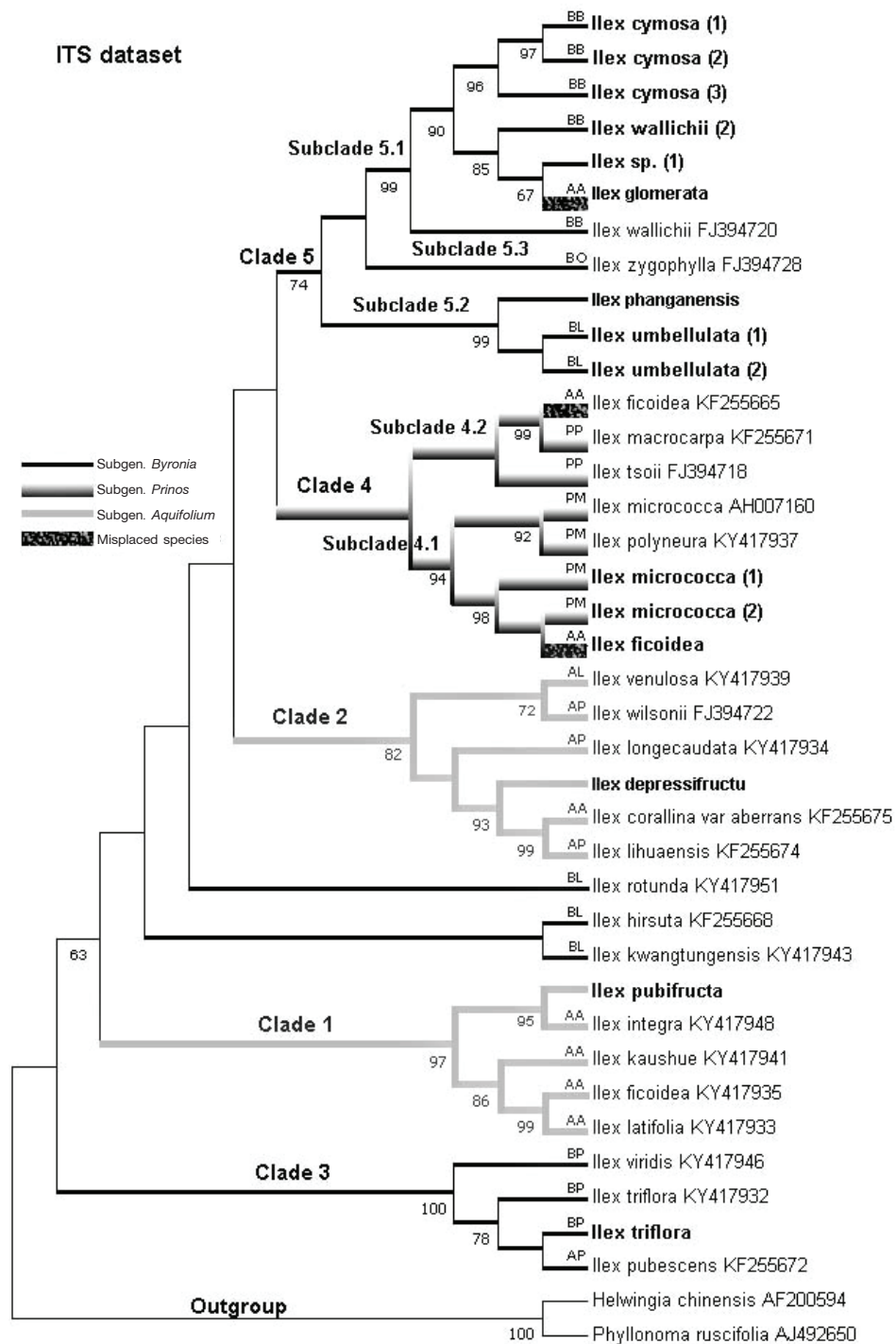


Figure 2 The Maximum Parsimony tree inferred from the ITS DNA dataset. *Ilex* taxa generated new in this study are shown in bold and taken from GenBank are shown in regular. The bootstrap percentages greater than 50 are shown below branches. Capital letters on branches referred to subgenera and sections abbreviations of *Ilex*. Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* = AA, Sect. *Lauroilex* =AL, Sect. *Pseudoaquifolium* = AP; Subgen. *Byronia* Sect. *Paltoria* = BP, Sect. *Byronia* =BB, Sect. *Lioprinos* = BL, 'Opposite-leaved species' = BO; Subgen. *Prinos* Sect. *Micrococca* = PM, Sect. *Prinoides* = PP

Clade 4) การจับกลุ่มนี้ ยังช่วยยืนยันการยุบชื่อ *I. polyneura* เป็นชื่อพ้อง (synonym) ของ *I. micrococca* โดย Hong (2015) ซึ่งพืชชนิดนี้ ลักษณะเด่นที่กิ่งอ่อนเป็นสีแดง มี lenticel หนาแน่น ขอบใบจักฟันเลื่อย ปลายใบยาว วงกลีบดอก 6 – 11 กลีบ มีเมล็ดแข็ง 6 – 8 เมล็ด ผิวเมล็ดด้านข้างเรียบ ส่วนผิวด้านหลังเรียบเป็นร่องเล็กตามยาว 1 ร่อง (Figure 3G–H)

3.3 ความสัมพันธ์ของชนิดพืชภายใน Subgenus *Byronia* (Endl.) Loes.

Subgenus *Byronia* (Endl.) Loes. มีลักษณะเด่นทางสัณฐาน คือ ใบมีความหนาอ่อนไปทางเหนียวเมื่อแก่เต็มที่ ส่วนใหญ่มีขอบใบเรียบ มีช่อดอกเดี่ยว และผลมีเมล็ดแข็ง 5 – 6 (– 22) เมล็ด จากผลการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลโมเลกุล พบว่า ชนิดพืชวงศ์คิลาของไทยที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ จับกลุ่มอยู่ภายใต้ Subgen. *Byronia* จำนวน 7 taxa แยกออกเป็น 3 clade สอดคล้องกับการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน คือ *I. cymosa* 2 taxa และ *I. wallichii* 2 taxa ยืนยันการจัดจำแนกไว้ใน Sect. *Byronia* (Figures 1–2: Subclade 5.1) ด้วยลักษณะสัณฐานร่วม คือ ใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4 – 6 กลีบ ผลมีเมล็ดแข็ง 5 – 10 เมล็ด ผิวเมล็ดด้านข้างเรียบ ผิวด้านหลังเป็นร่องกว้างตามยาว 1 ร่อง (Figure 4A–B) จับกลุ่มอยู่ด้วยกันกับ unknown species 2 taxa คือ *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2) ซึ่งมีลักษณะของส่วนกิ่งใบคล้ายคลึงกับสมาชิกชนิดอื่น แต่เป็นตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาในระยะที่ไม่มีส่วนสืบพันธุ์ ทำให้ยากต่อการระบุชื่อ ถึงแม้ว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณคลอโรพลาสต์ (Figure 1: Clade 5) แสดงตำแหน่งของ *Ilex* sp. (1) อยู่ที่ฐานของ clade ซึ่งอาจเกิดจากความไม่สมบูรณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ แต่แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณนิวเคลียส (Figure 2: Subclade 5.1) แสดงให้เห็นความใกล้ชิดของ *Ilex* sp. (1) กับ

I. wallichii (2) อย่างชัดเจน ส่วน *Ilex* sp. (2) แสดงความใกล้ชิดกับ *I. cymosa* (Figures 1–2: Subclade 5.1) ซึ่งความใกล้ชิดนี้ จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาระบุชื่อพืชในอนาคต ดังนั้น ตำแหน่งการจัดกลุ่มของ *Ilex* sp. (1) และ *Ilex* sp. (2) จึงเหมาะสมที่จะจำแนกไว้ภายใต้ Subgen. *Byronia* Sect. *Byronia*

ส่วน *I. umbellulata* 2 taxa ยืนยันการจัดจำแนกไว้ใน Sect. *Lioprinus* ซึ่งจับกลุ่มอยู่ด้วยกันกับ *I. phanganensis* (Figures 1 – 2: Subclade 5.2) พืชชนิดใหม่ของโลกที่เพิ่งมีการตีพิมพ์เผยแพร่ในปี พ.ศ. 2564 โดย Pruesapan and Welzen (2021) อีกทั้ง ยังยืนยันการอธิบายพืชได้ว่าพืชชนิดใหม่นี้มีลักษณะใกล้เคียงกับ *I. umbellulata* คือ ใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4 – 5 กลีบ ผลมีเมล็ดแข็ง (5 –) 6 – 9 เมล็ด ผิวเมล็ดด้านข้างเรียบ ผิวด้านหลังเป็นร่องตามยาว 2 ร่อง (Figure 4C–F) แต่มีความแตกต่างกันที่ช่อดอกของ *I. umbellulata* เป็นแบบ umbellate cyme ในขณะที่ *I. phanganensis* มีช่อดอกแบบ diplothyrsoid ดังนั้น ตำแหน่งการจัดกลุ่มของ *I. phanganensis* จึงเหมาะสมที่จะจำแนกไว้ภายใต้ Subgen. *Byronia* Sect. *Lioprinus*

สำหรับกลุ่มสุดท้าย คือ *I. triflora* ยืนยันการจัดจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลโมเลกุล สอดคล้องกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานกับสมาชิกพืชใน Sect. *Paltoria* (Figures 1–2: Clade 3) โดยมีลักษณะสัณฐานร่วม คือ ใบมีขอบหยัก วงกลีบดอกมี 4 กลีบ ผลมีเมล็ดแข็ง 4 เมล็ด ผิวเมล็ดด้านข้างเรียบ ด้านหลังเป็นริ้ว แต่ไม่เป็นร่องตามยาว (Figure 4G–H)

3.4 ชนิดพืชที่แสดงตำแหน่งการจำแนกด้วยข้อมูลดีเอ็นเอไม่สอดคล้องกับการจำแนกด้วยข้อมูลทางสัณฐาน

พืชวงศ์คิลาที่ศึกษาใหม่ในงานวิจัยนี้ 3 ชนิด แสดงตำแหน่งความใกล้ชิดบนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ยังสรุปผลได้ไม่ชัดเจน คือ *I. embelioides* (Figure 1: Subclade 5.2),

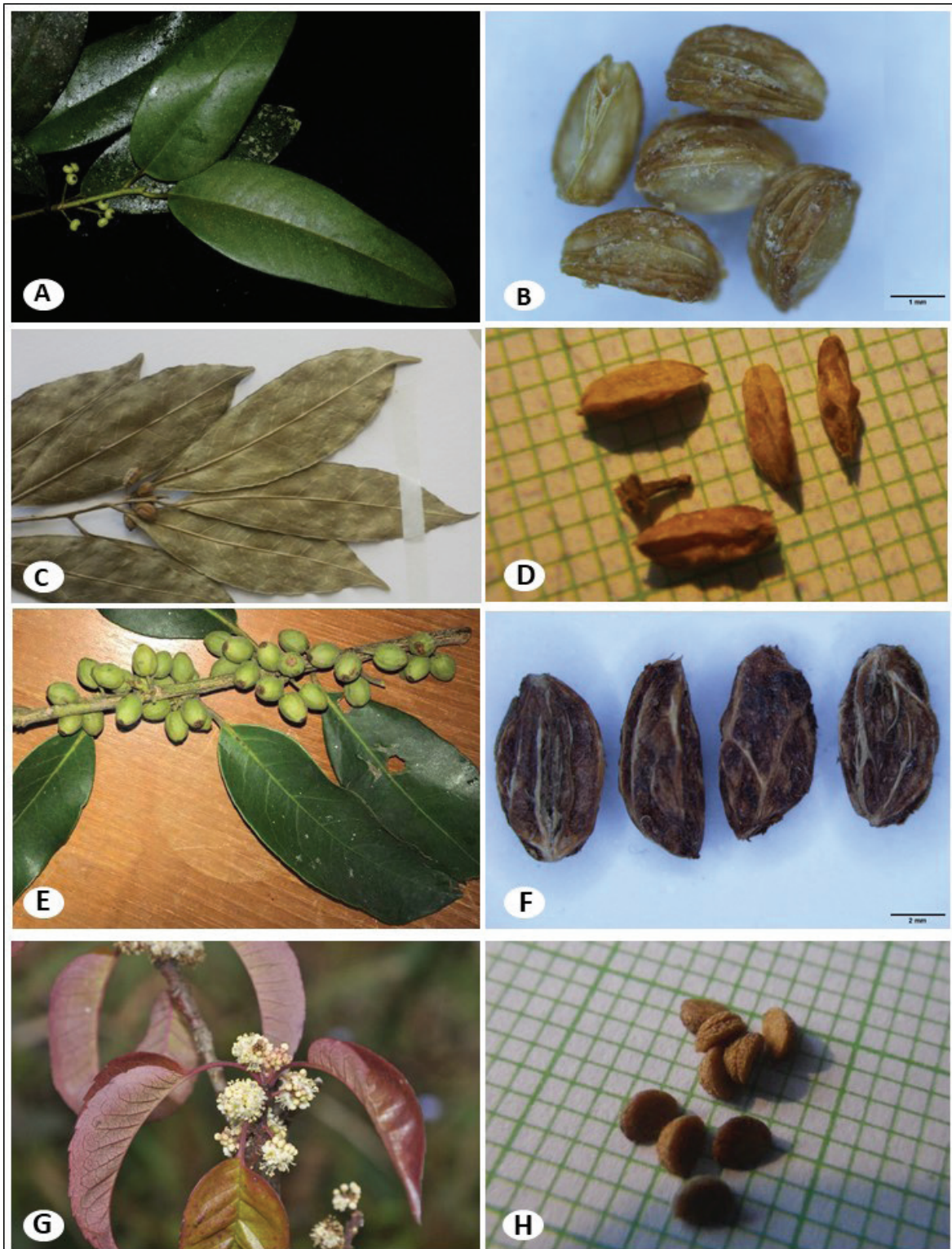


Figure 3 *Ilex* species classified in Subgen. *Aquifolium* Gray: *Ilex depressifructa* Pruesapan & Welzen (A–B), *I. odorata* Buch-Ham. ex D. Don (C–D) and *I. pubifructa* Pruesapan, S. Andrews & D.A. Simpson (E–F); Subgen. *Prinos* (L.) Loes.: *I. micrococca* Maxim. (G–H). Photos by Sukid Rueangruea (A), Kanchana Pruesapan (B–F, H) and Tan Yunhong (G)

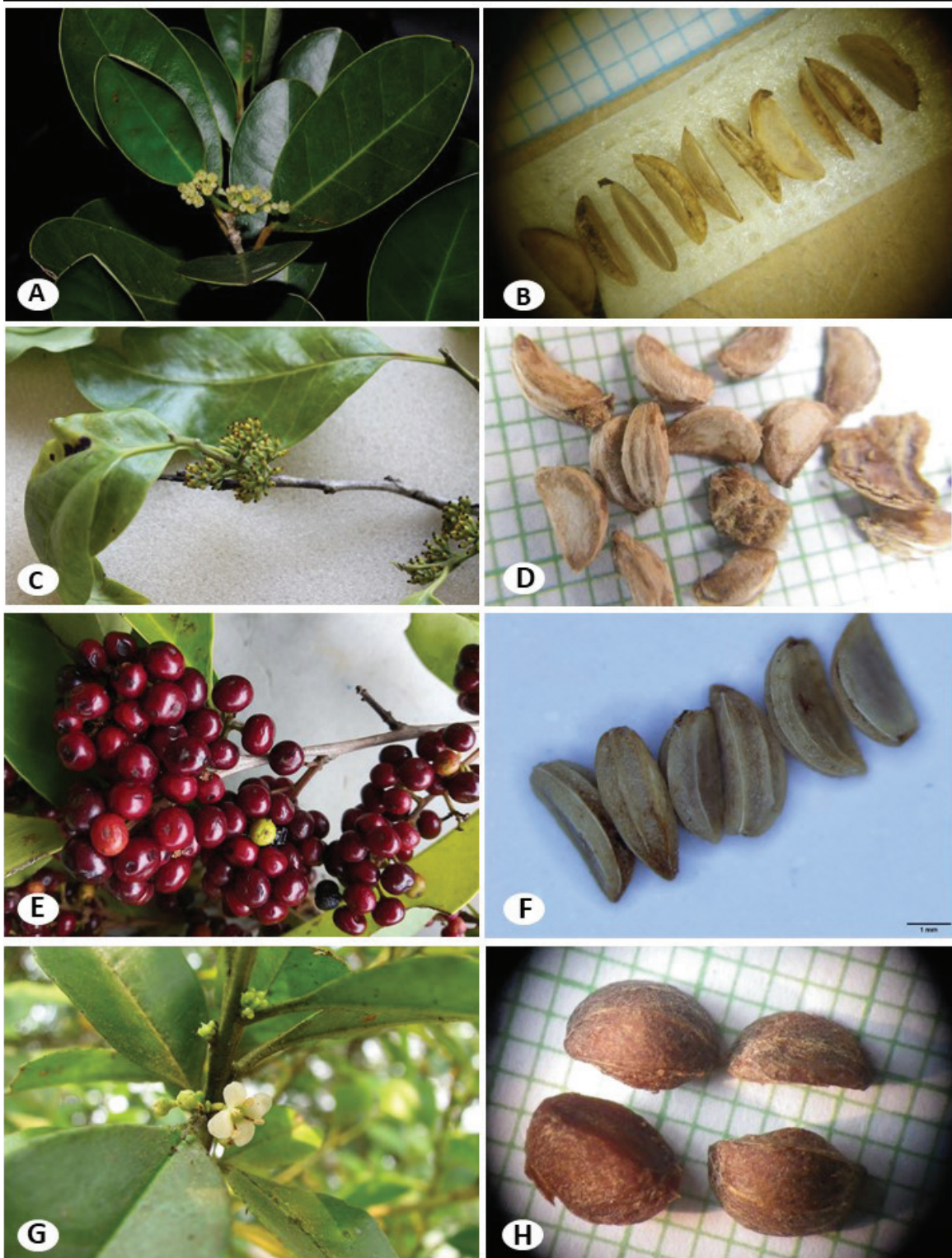


Figure 4 *Ilex* species classified in Subgen. *Byronia* (Endl.) Loes. Section *Byronia*: *Ilex wallichii* Hook.f. (A–B); Section *Lioprinus*: *I. umbellulata* (Wall.) Loes. (C–D), *I. phanganensis* Priesapan & Welzen (E–F); Section *Paltoria*: *I. triflora* Blume (G–H). Photos by Sukid Rueangruea (A, G), Kanchana Priesapan (B–D, F, H) and Prompiriyah Khiriwong (E)

I. ficoidea (Figure 2: Subclade 4.1) และ *I. glomerata* (Figure 2: Subclade 5.1) ซึ่งพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ ถูกจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานไว้ด้วยกันภายใต้ Subgen. *Aquifolium* Sect. *Aquifolium* แต่ในงานวิจัยนี้ พบการแสดงตำแหน่งความใกล้เคียงแตกต่างจากกัน

I. ficoidea รวมกลุ่มอยู่กับชนิดพืชใน Subgen. *Prinos* Sect. *Micrococca* (Figure 2: Subclade 4.1) เมื่อพิจารณาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข Fukuoka T-63801 (BKF) (Table 1) ของ *I. ficoidea* ที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่า มีลักษณะทางสัณฐานของใบและเมล็ดซึ่งคล้ายคลึงกับสมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* แต่ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง แสดงเฉพาะระยะติดผล และมีข้อผลหลุดร่วงออกจากกิ่งซึ่งลักษณะใบของ Subgen. *Prinos* และ Subgen. *Aquifolium* มีความคล้ายคลึงกันที่ขอบใบหยักหรือจักซี่ฟัน และปลายใบยาว แต่ลักษณะของผลและเมล็ดซึ่ง แสดงลักษณะเด่นของสมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* ดังนั้น อาจสรุปสาเหตุของการแสดงตำแหน่งอยู่ผิดกลุ่มของ *I. ficoidea* ได้ 2 ประการ คือ 1) การระบุชื่อวิทยาศาสตร์ผิดพลาดเนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐาน 2) การผสมข้ามในธรรมชาติ (natural hybridization) ซึ่งกรณีเช่นนี้มีการศึกษาพบมากขึ้นในพืชสกุล *Ilex* (Shi *et al.*, 2016; Son *et al.*, 2009) แต่ในงานวิจัยนี้พบข้อมูลดีเอ็นเอปรากฏเฉพาะบริเวณ ITS เพียงข้อมูลเดียว (Table 1) จึงยังไม่สามารถยืนยันสถานะตัวอย่างได้อย่างชัดเจน

สำหรับ *I. glomerata* พบว่า รวมกลุ่มอยู่กับสมาชิกของ Subgen. *Byronia* Sect. *Byronia* (Figure 2: Subclade 5.1) เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานกลับมีความแตกต่างจากสมาชิกของ Subgen. *Byronia* อย่างสิ้นเชิง ในทางกลับกัน *I. glomerata* มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึง *I. pubifruca* (Figure 3E–F) มาก ดังนั้น กรณีการแสดงตำแหน่งผิดกลุ่มเช่นนี้ มีข้อสันนิษฐาน

คล้ายคลึงกับกรณีของ *I. ficoidea* ที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการศึกษาคู่ข้อมูลดีเอ็นเอของ *I. glomerata* เพิ่มเติมในอนาคตเพื่อยืนยันตำแหน่งการจัดกลุ่มที่ถูกต้อง

ส่วน *I. embelioides* พบปรากฏรวมอยู่กับชนิดพืชใน Subgen. *Byronia* Sect. *Lioprinus* (Figure 1: Subclade 5.2) เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานของพืช คือ ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงหมายเลข Takahashi & Tamura T-63342 (BKF) (Table 1) พบว่า *I. embelioides* มีลักษณะทางสัณฐานคาบเกี่ยวระหว่าง Subgen. *Aquifolium* กับ Subgen. *Byronia* เช่น ใบมีขอบเรียบ วงกลีบดอก 4 – 5 กลีบ ผลมีเมล็ดแข็ง 4 เมล็ด ผิวเมล็ดด้านข้างเรียบ ผิวด้านหลังเป็นสันตามยาวไม่สม่ำเสมอ 3 – 4 สัน แต่ความเป็นไปได้ที่สำคัญ คือ การแยกกลุ่มที่ไม่ชัดเจนในครั้งนี้ อาจผิดพลาดเนื่องมาจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด *rpl32-trnL* เพียงบริเวณเดียว (Table 1) และดีเอ็นเอที่ได้มาไม่ครบสมบูรณ์ เป็นเพียงบางส่วนของ sequence (602 คู่เบส จาก 928 – 945 คู่เบส) เท่านั้น ดังนั้น จึงยังไม่สามารถสรุปตำแหน่งการจัดกลุ่มของ *I. embelioides* ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้อย่างชัดเจน ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

ความไม่สอดคล้องกันของการจำแนกกลุ่มของพืชวงศ์ศิวะด้วยข้อมูลดีเอ็นเอกับข้อมูลทางสัณฐานที่พบในงานวิจัยนี้ สนับสนุนรายงานของ Manen *et al.* (2010) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชวงศ์ศิวะ 105 ชนิด ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดจำนวน 5 บริเวณ พบการแสดงตำแหน่งของสมาชิกใน Subgen. *Aquifolium* บนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็น Polyphyletic ซึ่งกรณีนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงลักษณะความผันแปรของพืชสกุล *Ilex* ที่ยังจำเป็นต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อยืนยันสถานะของชนิดพืชที่ยังมีความสับสนในการจำแนกกลุ่มความใกล้เคียงของพืช

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์คิลลา (Aquifoliaceae) ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *matK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* และ ITS ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอของพืชวงศ์คิลลาที่มีการศึกษาเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ผลการศึกษาที่ได้ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่จำแนกด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ สอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานของพืชเป็นส่วนใหญ่ ข้อมูลความใกล้ชิดของพืชที่จำแนกได้ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอสามารถใช้เป็นแนวทางในการจำแนกกลุ่มพืชด้วยข้อมูลทางสัณฐานสำหรับชนิดพืชที่ยังไม่ได้มีการจัดกลุ่มมาก่อน และใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์พืชวงศ์คิลลาที่ยังไม่สามารถระบุชื่อชนิดได้ สำหรับพืชวงศ์คิลลาที่มีการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลดีเอ็นเอแล้วให้ผลไม่สอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลทางสัณฐานในงานวิจัยนี้ สมควรดำเนินการวิจัยเพิ่มเติม เพื่อยืนยันสถานะการจำแนกกลุ่มให้ถูกต้อง นอกจากนี้ การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชวงศ์คิลลาช่วยยืนยันความถูกต้องในการระบุชื่อพืชที่นำมาศึกษาและเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางอนุกรมวิธานที่จะดำเนินการวิจัยต่อไปในอนาคต ซึ่งมีความสำคัญในการจัดทำบัญชีรายชื่อพรรณพฤกษชาติของพืชวงศ์คิลลาของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวางแผนการอนุรักษ์ความหลากหลายของพืช และการนำไปใช้ประโยชน์เชิงเศรษฐกิจของประเทศต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. สมราน สุดดี ดร. วรลลิต์ แจ่มจำรัส นายวิโรจน์ ตันธนาภินันท์ นายมีศักดิ์ แก้วกุล นางสาวจิราภรณ์ มีวาสนา นางสาวนันทน์ภัส ภัทรศิริภูไตรสิน นายสุคิด เรืองเรือ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ดร. สราวุธ บุญยะเวทชีวิน

หัวหน้าโครงการวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ระยะยาว และเจ้าหน้าที่ในโครงการฯ นายพรหมพิริยะ ศิริวงศ์ และผู้ช่วยประสานงานทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ ข้อมูลตัวอย่างพืชวงศ์คิลลาและให้ความช่วยเหลือในภาคสนาม และนางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม กรมวิชาการ เกษตร สำหรับคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Chen, S.K. and Y.X. Feng. 1999. Aquifoliaceae. pp. 105 – 110. In: Chen, S.-K. (ed.), *Fl.Reipubl. Popularis Sin.*, vol. 45. Science Press, Beijing.
- Craib, W.G. 1931. Illicaceae. pp. 277 – 278. In: *Florae Siamensis Enumeratio: a list of the plants known from Siam, with records of their occurrence*, vol. 1. Siam Society, Bangkok.
- Drbkov, L.Z. 2014. DNA extraction from herbarium specimens. pp. 69 – 84. In: P. Besse (ed.), *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, vol. 1115. Humana Press, New Jersey.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4): 783 – 791.
- Galle, F.C. 1997. *Hollies: the genus Ilex*. Timber Press, Portland. 573 p.
- Gorzalczany, S., R. Filip, M.D.R. Alonso, J. Mio, G.E. Ferraro and C. Acevedo. 2001. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J. Ethnopharmacol.* 75: 291 – 294.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95 – 98.
- Hao, D., X. Gu, P. Xiao, Z. Liang, L. Xu and Y. Peng. 2013. Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. *Acta Pharm. Sin. B.* 3(1): 8 – 19.

- Hong, D.Y. 2015. A taxonomical revision of *Ilex* (Aquifoliaceae) in the Pan-Himalaya and unraveling its distribution patterns. *Phytotaxa*. 230(2): 151 – 171.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870 – 1874.
- Loizeau, P.A., V. Savolainen, S. Andrews, G. Barriera and R. Spichiger. 2016. Aquifoliaceae. pp. 31 – 36. In: J. Kadereit and V. Bittrich (eds.), *Flowering Plants. Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants 14*. Springer, Cham.
- 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57(3): 961 – 977.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333 p.
- Pruesapan, K. and P.C. van Welzen. 2021. Two new species of *Ilex* (Aquifoliaceae) from Thailand. *Thai For. Bull. (Bot.)* 49(1): 66 – 72.
- Pruesapan, K., S. Andrews and D.A. Simpson. 2014. An outline of Aquifoliaceae for the Flora of Thailand. *Thai For. Bull. (Bot.)* 42: 125.
- Pruesapan, K., S. Andrews and D.A. Simpson. 2017. *Ilex pubifructa* (Aquifoliaceae), a new species from northern Thailand. *Kew Bull.* 72(21): 1 – 4.
- Setoguchi, H. and I. Watanabe. 2000. International gene flow between insular endemics of *Ilex* (Aquifoliaceae) on the Bonin Islands and the Ryukyu Islands. *Am. J. Bot.* 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.
- 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. 1998. *Timber trees: Lesser-known timbers. Plant Resources of South-East Asia No. 5(3)*. Backhuys Publishers, Leiden. 859 p.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105 – 1109.
- 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: 4673 – 4680.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315 – 322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 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.