

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมัลเบอร์รี่ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน ITS และ matK

Genetic Relationships in the Mulberry (*Morus alba*) Inferred from the ITS and matK Sequences

ทัศนัย ปัญจันทรสิงห์¹ กิรติ ตันเรือน² วิโรจน์ ลิขิตตระกูลวงศ์³ ณัฐดนัย ลิขิตตระการ⁴ และ
พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ^{2*}

Tasanai Punjansing¹ Keerati Tanruean² Wirot Likittrakulwong³ Natdanai
Likhitrakarn⁴ and Pisit Poolprasert^{2*}

¹ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี จังหวัดอุดรธานี 41000

¹ Biology Program, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani, 41000

² สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

² Biology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000

³ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

³ Animal Science Program, Faculty of Food and Agricultural technology, PibulsongkramRajabhat University

⁴ สาขาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

⁴ Division of Plant Protection, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290

* Corresponding author: poolprasert_p@psru.ac.th

(Received: 26 January 2021, Revised: 5 April 2021, Accepted: 9 April 2021)

Abstract

Over the years, the mulberry is popular with people due to it is rich in phenolic compounds which possess the ability to inhibit oxidation. It is considered as alternative economic plant and can be exported. Nevertheless, the mulberry is a high genetic diversity and discrimination using morphological traits often require long and difficult to identify. This current research, therefore, aimed to identify cultivar and to analyze the genetic variation of mulberry (*Morus alba*) in Phitsanulok province inferred from ITS (805 bp) and matK (830 bp) sequences. Afterwards, the phylogenetic tree using Maximum Likelihood

(ML) method was constructed. It was found that ITS Sequence based phylogenetic relationship demonstrated as monophyly. Whereas phylogeny inferred from matK sequence obviously displayed as two main clades. In this regard, the nucleotide diversities among mulberry varieties from both nucleotide sequences were relatively low. However, these obtained results provide the information for parental line selection in the future breeding program.

Keywords: Mulberry, DNA barcoding, ITS, matK

บทคัดย่อ

ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา มัลเบอร์รี่ได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิกที่มีการศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ จึงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจทางเลือกใหม่ และสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศ อย่างไรก็ตาม มัลเบอร์รี่เป็นพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง อีกทั้งการจำแนกมัลเบอร์รี่โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยามักต้องใช้ระยะเวลา และมีความยุ่งยาก ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนกพันธุ์ และการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของมัลเบอร์รี่ในจังหวัดพิษณุโลก โดยอาศัยการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS และ matK ขนาด 805 และ 830 คู่เบส นำมาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) จากผลการศึกษาพบว่า การสร้างแผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS แสดงเป็นกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ matK สามารถแบ่งกลุ่มของมัลเบอร์รี่พันธุ์ต่าง ๆ ได้เป็นสองกลุ่มอย่างชัดเจน ทั้งนี้ความผันแปรนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์ จากทั้งยีนทั้งสองบริเวณมีค่าต่ำ อย่างไรก็ตาม การจัดกลุ่มนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ: มัลเบอร์รี่ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ยีน ITS ยีน matK

คำนำ

มัลเบอร์รี่ (mulberry) หรือหม่อนเป็นพืชในวงศ์ Moraceae มีหลายชนิด (species) เช่น ไวท์มัลเบอร์รี่ (white mulberry; *Morus alba*), แร็ดมัลเบอร์รี่ (red mulberry; *Morus rubra*) และแบล็คมัลเบอร์รี่ (black mulberry; *Morus nigra*) เป็นต้น ที่ผ่านมามีในประเทศไทยส่วนใหญ่พบมัลเบอร์รี่ 2 ชนิด คือ ไวท์มัลเบอร์รี่ที่ปลูกเพื่อนำใบไปเลี้ยงตัวไหม (silkworm) ซึ่งชนิดนี้มีใบขนาดใหญ่

และแบล็คมัลเบอร์รี่ที่ปลูกเพื่อรับประทานผล (ลือชัย, 2555) ขณะที่ในปัจจุบัน มัลเบอร์รี่กำลังได้รับความนิยมจากผู้ชื่นชอบในการดูแลสุขภาพเป็นอย่างมากเนื่องจากมัลเบอร์รี่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูง อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายทำงานผิดปกติ และส่งผลให้เกิดความแก่ชราเร็วขึ้น ทั้งยังเป็นสาเหตุของโรคอีกหลายชนิด

เช่น โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคหัวใจ และโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจ (Yuan and Walsh, 2006) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) และฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน (anti-melanogenesis) (ปัญญา และคณะ, 2556; Lee *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2011) โดยผลมัลเบอร์รี่สามารถรับประทานสดหรือนำไปแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่า และเป็นการยืดอายุการเก็บรักษา ซึ่งผลจากความนิยมต่อมัลเบอร์รี่ทำให้มีการปลูก และจำหน่ายกิ่งพันธุ์กันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะจังหวัดพิษณุโลกที่มีการปลูก และจำหน่ายกิ่งพันธุ์ของมัลเบอร์รี่ทั้งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ต่างถิ่นเพื่อประโยชน์ในการเลี้ยงไหม และการบริโภคเป็นจำนวนมาก โดยมีแนวโน้มว่าจะได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นอีกในอนาคต อย่างไรก็ตาม ข้อมูลทางความหลากหลายทางพันธุกรรมของมัลเบอร์รี่ในพื้นที่ยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะทำการจำแนกพันธุ์ (cultivar) ของมัลเบอร์รี่ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) และวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของมัลเบอร์รี่ เพื่อจัดทำฐานข้อมูลพันธุ์ของมัลเบอร์รี่ในจังหวัดพิษณุโลกเพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์ดั้งเดิม และส่งเสริมพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดีต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บและเตรียมตัวอย่างเพื่อจำแนกพันธุ์

เก็บตัวอย่างมัลเบอร์รี่พันธุ์ต่าง ๆ จากฟาร์มในเขตอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก แล้วนำมาจำแนกพันธุ์ โดยใช้ทั้งลักษณะสัณฐานวิทยา และข้อมูลดีเอ็นเอในการจำแนกพันธุ์ ซึ่งจะทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา โดยเปรียบเทียบ

ลักษณะของใบ และผลของมัลเบอร์รี่แต่ละพันธุ์เปรียบเทียบกับตัวอย่างมัลเบอร์รี่กับฐานข้อมูลพืชจากองค์การสวนพฤกษศาสตร์ (<http://www.qsbg.org>) ฐานข้อมูลออนไลน์ของ Plant of the World online (<http://www.plantsoftheworldonline.org/>) พร้อมทั้งใช้คู่มือการจำแนกของ Berg *et al.* (2011) และ Heuzé *et al.* (2019) จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับผลของพันธุ์ ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมัลเบอร์รี่

นำตัวอย่างใบอ่อนของมัลเบอร์รี่แต่ละพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงตามวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) โดยบดให้ละเอียดแล้วเติมสารละลาย CTAB เข้มข้น 2% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (μl) และสารละลาย Rnase A ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{ml}$) จากนั้นนำไป vortex และบ่มที่ อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 60 นาที โดยจะทำการพลิกกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง เมื่อครบเวลานำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่อยู่ด้านบนในหลอด microcentrifuge ใหม่แล้วเติมสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (อัตรา 25: 24: 1) (Research organics, USA) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนน้ำใสที่เก็บได้ นำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสด้านบนในหลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติมสารละลาย sodium acetate (NaOAc) เข้มข้น 3 โมลาร์ (Molarity, M) ที่แช่เย็นในปริมาณ 1/10 เท่าของปริมาณน้ำใส เติมสารละลาย isopropanol ที่แช่เย็น ในปริมาณ 1 เท่าของ

ปริมาณทั้งหมด แล้วพลิกกลับหลอดไปมาให้เข้ากันเบา ๆ นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนน้ำที่เติมสารละลาย ethanol เข้มข้น 70% ที่แช่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำที่ทิ้ง และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ Dnase และ Rnase ปริมาณ 20-50 ไมโครลิตร แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้

การตรวจสอบหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยเตรียมอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1% โดยผสมผงอะกาโรส 0.5 กรัม ในสารละลาย 1X TAE buffer ปริมาณ 50 มิลลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (micro wave) ที่ 360 นาน 3 นาที จนอะกาโรสเจลละลายหมด เทเจลใส่ลงถาดที่เตรียมไว้ มีหริ (comb) เสียบไว้เรียบร้อยแล้ว ทิ้งไว้ให้เจลเย็นและแข็งตัว ดึงหริออกจะได้เจลที่เป็นหลุม (well) นำเจลที่ได้ใส่ลงใน gel chamber ที่มีสารละลาย 1X TAE buffer อยู่ ผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยดสารละลายที่ผสมแล้วลงในหลุมเจล โดยหยดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลที่ได้มาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตสำหรับส่องเจล (UV-transilluminator)

(Gel DocTH XR+) พร้อมทั้งปรับภาพพื้นหลังให้มีความคมชัดของแถบดีเอ็นเอแบบกลับพื้นดำเป็นพื้นขาว (invert) ผ่านโปรแกรม Image Lab Software 5.0

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน matK และ ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน matK และ ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1xPCR buffer, 0.4 mM dNTP, 2.0 mM MgCl₂, 0.5 uM primer, 0.5 unit *Taq* polymerase (Vivantis) และดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม (ng) โดยคูไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ ITS: 18d (5'-CAC ACC GCC CGT CGC TCC TAC CGA-3') 28cc (5'-ACT CGC CGT TAC TAG GGG AA-3') (Sitthithaworn *et al.*, 2010) และ matK: matK-390f (CGATCTATTCATTCAATATTC) และ matK-1326r (TCTAGCACACGAAA GTCGAAGT) (Cuenoud *et al.*, 2002) แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction (PCR) machine) ซึ่งโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94 °C (5 นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 94 °C (1 นาที) annealing 50 °C (1 นาที) และ extension ที่ 72 °C (2 นาที) เป็นจำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 °C (10 นาที) 1 รอบ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) ด้วยชุดเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

โพริซีส โดยเปรียบเทียบกับ ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder marker) ใช้ความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 1% ใน สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TBE (Amresco) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำไปตรวจสอบแถบ ดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง กำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตสำหรับส่องเจล และ บันทึกภาพ

การทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการสกัดดีเอ็นเอออกจากผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยชุด GenUP PCR /Gel Cleanup Kit โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต (Biotech rabbit, Germany) โดยถ่ายโอนผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ลงในหลอด micro-centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ BINDING BP ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันจากนั้นทำการถ่ายสารที่ได้ลงใน Mini filter ที่ต่อกับ Collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ Mini filter ไปต่อกับหลอด Elution tube 1.5 มิลลิลิตร ทำการเติมบัฟเฟอร์ ELUTION ปริมาตร 10-15 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ Mini filter ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วดึงส่วน Mini filter ทิ้ง จากนั้นนำสารที่ได้ไปเก็บ 4 °C เพื่อนำส่งไปเข้าขั้นตอน การหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลของมัลเบอร์รี่ใน GenBank ([http://](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)

www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) ด้วยการ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จากนั้นทำการศึกษารูปแบบพันธุกรรมด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) แบบวิธี Maximum Likelihood (ML) โดยใช้โมเดล คำนวณ Kimura-2-parameter (K2P) ผ่านโปรแกรม MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) ทำการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) ของตัวอย่างมัลเบอร์รี่ที่สำรวจได้โดยคำนวณหาค่า mtDNA haplotypes (h) haplotype diversity (hd), nucleotide diversity (π), total number of mutations (m) mean และ number of pairwise nucleotide differences (k) โดยใช้โปรแกรม DnaSP version 5 (Librodo and Rozas, 2009)

ผลการวิจัย

การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างมัลเบอร์รี่พันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย 9 พันธุ์ โดยเป็นพันธุ์จากต่างประเทศ 7 พันธุ์ คือ ไวท์คิง สหรัฐอเมริกา มังกร สหรัฐอเมริกาชาวฝรั่งเศส ไต้หวัน เร็ดคิง และพันธุ์พื้นถิ่นที่ใช้เป็นพันธุ์อ้างอิง จำนวน 2 พันธุ์ คือ กำแพงแสน และบุรีรัมย์ ตามลำดับ จากนั้นนำมาจำแนกพันธุ์โดยใช้สัณฐานวิทยาและดีเอ็นเอทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา โดยเปรียบเทียบลักษณะของใบ และผลของมัลเบอร์รี่แต่ละพันธุ์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพืช และใช้เปรียบเทียบกับผลของพันธุ์ ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งโครงสร้างลักษณะโดยทั่วไปของใบในแต่ละพันธุ์ มีความแตกต่างกันออกไป (Figure 1)

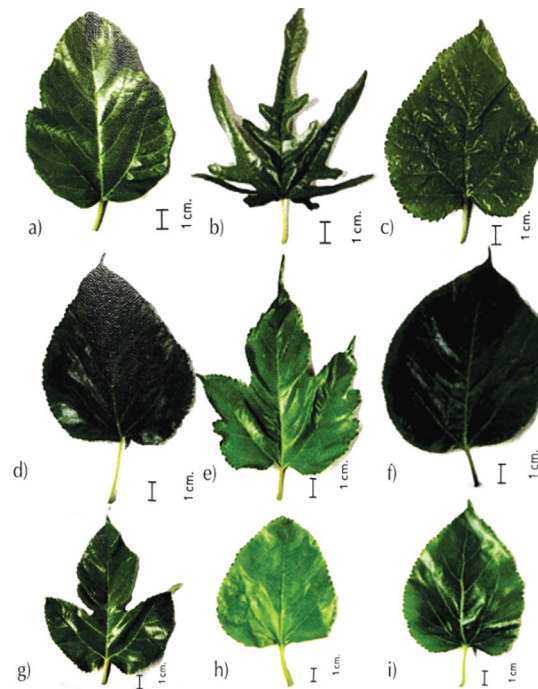


Figure 1 General external morphology of mulberry leaves in different varieties. **(a)** White king (AUSW) **(b)** United State of America (USA) **(c)** Mungkorn (MK) **(d)** White United State of America (USAW) **(e)** French **(f)** Taiwan **(g)** Red king (AUSR) **(h)** Kampaengsaeng (KPS) and **(i)** Buriram (BRR).

การศึกษาทางชีวโมเลกุล

หลังจากนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของยีน matK และ ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1xPCR buffer, 0.4 mM dNTP, 2.0 mM MgCl₂, 0.5 μM primer, 0.5 unit Taq polymerase (Vivantis) และดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม โดยคูไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ ITS: 18d (5'-CAC ACC GCC CGT CGC TCC TAC CGA- 3') 28cc (5'-ACT CGC CGT TAC TAG GGG AA-3') (Sitthithaworn *et al.*, 2010) และ matK: matK-390f (CGATCTATTCATT CAATATTTTC) และ matK-1326r (TCTAGCA

CACGAAAGTCGAAGT) (Cuenoud *et al.*, 2002) แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง PCR ซึ่งโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94 °C (5 นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 94 °C (1 นาที) annealing 50 °C (1 นาที) และ extension ที่ 72 °C (2 นาที) เป็นจำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 °C (10 นาที) 1 รอบ และทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ผลการศึกษาสามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ ในแต่ละพันธุ์ จากยีนทั้ง 2 บริเวณ โดยพบแถบ ขนาดประมาณ 850 คู่เบส (basepair, bp) (Figure 2)

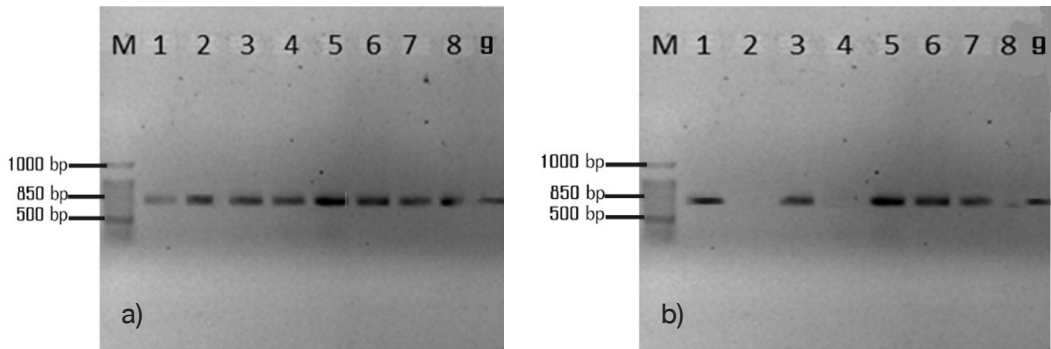


Figure 2 DNA bands of ITS (a) and matK (b) from different mulberry strains (Marker (M) = 1,000 bp ladder DNA) (1) White king (AUSW) (2) United State of America (USA) (3) Mungkorn (MK) (4) White United State of America (USAW) (5) French (6) Taiwan (7) Red king (AUSR) (8) Kampaengsaeng (KPS) (9) Buriram (BRR)).

จากผลการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีนบริเวณ ITS ของมัลเบอร์รี่สามารถสังเคราะห์ได้เกือบทุกพันธุ์ ยกเว้น พันธุ์ ฝรั่งเศส (FR) และมีขนาดประมาณ 805 คู่เบส ขณะที่ยีนบริเวณ matK สามารถสังเคราะห์ได้เพียงในพันธุ์ไต้หวันคิง (AUSW) พันธุ์สหรัฐอเมริกาขาว (USAW) พันธุ์ไต้หวัน (TW) พันธุ์มังกร (MK) และพันธุ์บุรีรัมย์ (BRR) โดยมีขนาดประมาณ 830 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ยีนทั้งสองบริเวณที่ได้ไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนในพืช จากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS และ matK ของมัลเบอร์รี่ทุกพันธุ์ที่วิเคราะห์ได้ลงในฐานข้อมูล NCBI และได้รับหมายเลขเฉพาะ (accession number) (Table 1)

Table 1 Accession numbers obtained from ITS and matK sequences of different mulberry varieties.

Mulberries	Accession numbers	
	ITS (805 bps)	matK (830 bps)
Red king (AUSR)	MH187214	-
White king (AUSW)	MH187215	MH187244
United State of America (USA)	MH187216	-
White United State of America (USAW)	MH187217	MH187245
French (FR)	-	-
Taiwan (TW)	MH187218	MH187246
Mungkorn (MK)	MH187219	MH187247
Kampaengsaen (KPS)	MH187220	-
Buriram (BRR)	MH187221	MH187248

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ามีเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide composition) ในมัลเบอร์รี่แต่ละพันธุ์ โดยในยีนบริเวณ ITS มีสัดส่วนของ Thymine (T = 20.4%) และ Adenine (A = 21.8%) ต่ำ และมีสัดส่วนของ Cytosine (C = 28.0%) และ Guanine (G = 29.8%) สูง ในขณะที่ยีนบริเวณ matK มีสัดส่วนของ Thymine (T = 36.9%) และ Adenine (A = 30.2%) สูง และมีสัดส่วนของ Cytosine (C = 16.8%) และ Guanine (G = 16.0%) ต่ำ และการกระจายความถี่

ของนิวคลีโอไทด์โดยรวมตำแหน่งโคดอนที่ 1, 2 และ 3 ของยีนบริเวณ ITS มีค่าเป็น A = 22.7%, 19.4% และ 23.2%; C = 28.5%, 30.9% และ 24.5%; G = 31.6%, 26.9% และ 30.9% และ T = 17.0%, 23.0% และ 21.0% ตามลำดับ ส่วนการกระจายความถี่ของนิวคลีโอไทด์โดยรวมตำแหน่งโคดอนที่ 1, 2 และ 3 ของยีนบริเวณ matK มีค่าเป็น A = 29.6%, 32.1% และ 29.0%; C = 19.9%, 16.6% และ 14.0%; G = 16.6%, 16.3% และ 15.2% และ T = 34.0%, 35.0% และ 42.0% ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Compositional properties of ORFs and nucleotide composition in each codon of ITS and matK genes of different mulberry varieties.

ITS	Mulberries															
	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
AUSR	20.4	28.1	21.9	29.7	17	28.6	22.7	31.6	23	31.0	19.4	26.9	21	24.6	23.5	30.6
AUSW	20.4	28.1	21.7	29.8	17	28.6	22.7	31.6	23	31.0	19.4	26.9	21	24.6	23.1	31.0
USA	20.6	27.8	21.9	29.7	17	28.3	22.7	31.6	23	30.6	19.4	26.9	21	24.6	23.5	30.6
USAW	20.7	27.7	21.9	29.7	17	28.3	23.0	31.2	23	31.0	19.4	26.9	22	23.9	23.1	31.0
TW	20.2	28.1	21.7	29.9	17	28.6	22.7	31.6	22	31.0	19.4	27.2	21	24.6	23.1	31.0
MK	20.4	28.1	21.7	29.8	17	28.6	22.7	31.6	23	31.0	19.4	26.9	21	24.6	23.1	31.0
KPS	20.4	28.1	21.7	29.8	17	28.6	22.7	31.6	23	31.0	19.4	26.9	21	24.6	23.1	31.0
BRR	20.4	28.1	21.7	29.8	17	28.6	22.7	31.6	23	31.0	19.4	26.9	21	24.6	23.1	31.0
Average	20.4	28.0	21.8	29.8	17	28.5	22.7	31.6	23	30.9	19.4	26.9	21	24.5	23.2	30.9
matK																
AUSW	37.0	16.7	30.2	16.0	34	19.9	29.6	16.6	35	16.6	32.1	16.2	42	13.8	29.0	15.2
USAW	36.9	16.9	30.1	16.1	34	19.9	29.6	16.6	35	16.6	31.8	16.6	42	14.1	29.0	15.2
TW	36.9	16.9	30.2	16.0	34	19.9	29.6	16.6	35	16.6	32.1	16.2	42	14.1	29.0	15.2
MK	37.0	16.7	30.2	16.0	34	19.9	29.6	16.6	35	16.6	32.1	16.2	42	13.8	29.0	15.2
BRR	36.9	16.9	30.2	16.0	34	19.9	29.6	16.6	35	16.6	32.1	16.2	42	14.1	29.0	15.2
Average	36.9	16.8	30.2	16.0	34	19.9	29.6	16.6	35	16.6	32.1	16.3	42	14.0	29.0	15.2

Note: AUSR (Red king), AUSW (White king), USA (United State of America), USAW (White United State of America) TW (Taiwan), MK (Mungkon), KPS (Kampaengsaeng) and BPP (Buriram).

ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ (point mutation) หรือการกลายพันธุ์ระดับยีน (Gene mutation) ของมัลเบอร์รี่พันธุ์ต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ทุก ๆ พันธุ์จากยีนบริเวณ ITS พบว่า มีลำดับการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ ตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphic site, S) ถึง 9 ตำแหน่ง โดยเกิดที่ตำแหน่งที่ 6 ของทุก ๆ พันธุ์ (A<->G) พันธุ์ไต้หวัน (TW) ตำแหน่งที่ 50 (T<->G) พันธุ์สหรัฐอเมริกา (USA) ตำแหน่งที่ 555 (T<->G) พันธุ์สหรัฐอเมริกาขาว (USAW) (G<->A) ตำแหน่งที่ 675 (C<->T) ตำแหน่งที่ 685 (C<->T) ตำแหน่งที่ 687 (C<->T) ตำแหน่งที่ 687 (G<->A) พันธุ์สหรัฐอเมริกา (USA) ตำแหน่งที่ 754 (C<->T) และตำแหน่งที่ 773 (C<->T) ตามลำดับ ขณะที่ยีนบริเวณ matK มีตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึมเกิดขึ้นเพียง 2 ตำแหน่ง คือ ในพันธุ์สหรัฐอเมริกาขาว (USAW) พันธุ์ไต้หวัน (TW) และพันธุ์บราซิล (BRR) ในตำแหน่งที่ 153 (T<->C) และพันธุ์สหรัฐอเมริกาขาว (USAW) ตำแหน่งที่ 827 (A<->G) ตามลำดับ ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นเป็นได้ทั้งลักษณะ transition (A<->G หรือ C<->T) และ transversion (A<->C, A<->T, G<->C และ G<->T)

นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของมัลเบอร์รี่ทุกพันธุ์ ในยีนบริเวณ ITS พบจำนวน haplotype (No.) เท่ากับ 5 รูปแบบ, number of polymorphic (segregating) sites (S) เท่ากับ 9 ตำแหน่ง,

haplotype diversity (hd) (\pm SD) เท่ากับ 0.786 (\pm 0.151), nucleotide diversity (π) (\pm SD) เท่ากับ 0.00280 (\pm 0.00144), total number of mutations (m) เท่ากับ 9 ตัว และ mean number of pairwise nucleotide differences (k) เท่ากับ 2.250 ตามลำดับ สำหรับในยีนบริเวณ matK จำนวน haplotype (No.) เท่ากับ 3 รูปแบบ, number of polymorphic (segregating) sites (S) เท่ากับ 2 ตำแหน่ง, haplotype diversity (hd) (\pm SD) เท่ากับ 0.800 (\pm 0.164), nucleotide diversity (π) (\pm SD) เท่ากับ 0.00120 (\pm 0.00082), total number of mutations (m) เท่ากับ 2 ตัว และ mean number of pairwise nucleotide differences (k) เท่ากับ 1.000 ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic relationship) ของมัลเบอร์รี่ระดับพันธุ์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA version 6.0 โดยพืชสกุล *Trophis* และ *Sorocea* เป็น outgroup สำหรับแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไม่สามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ ของมัลเบอร์รี่ออกจากกันได้ (Figure 3) ในขณะที่ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน matK พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม (clade) คือ clade A ประกอบด้วย พันธุ์ไต้หวัน (AUSW) และพันธุ์มังกร (MK) และ clade B ประกอบด้วย พันธุ์บราซิล (BRR) พันธุ์ไต้หวัน (TW) และพันธุ์สหรัฐอเมริกาขาว (USAW) (Figure 4)

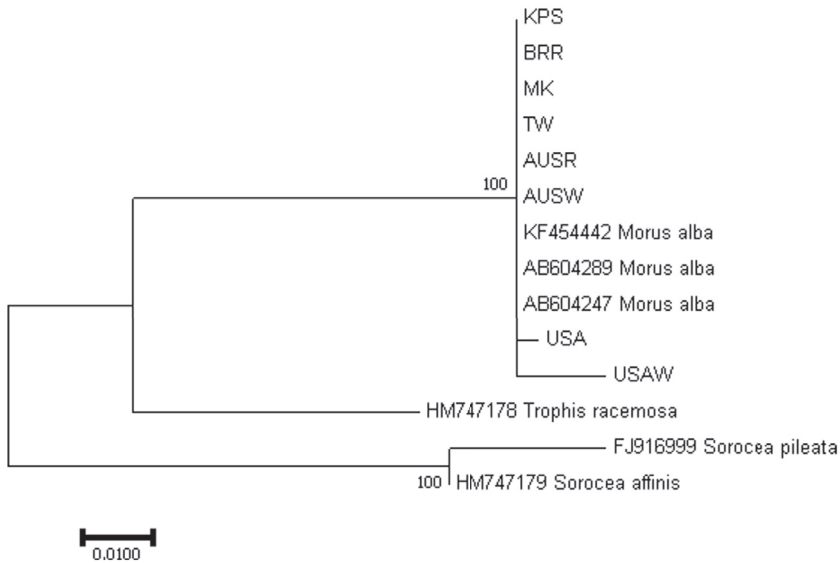


Figure 3 Phylogenetic tree based on ITS gene of the eight mulberry varieties using Maximum Likelihood (ML) method and confidence level was calculated with the bootstrap test (1,000 replicates). AUSR (Red king), AUSW (White king), USA (United State of America), USAW (White United State of America), TW (Taiwan), MK (Mungkon), KPS (Kampaengsaeng) and BPP (Buriram).

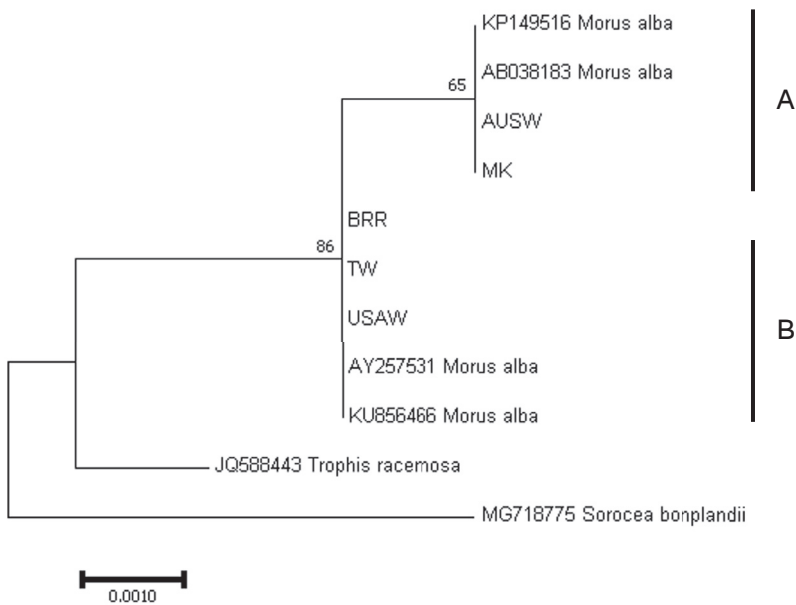


Figure 4 Phylogenetic tree based on ITS gene of the five mulberry varieties using Maximum Likelihood (ML) method and confidence level was calculated with the bootstrap test (1,000 replicates). AUSW (White king), USAW (White United State of America), TW (Taiwan), MK (Mungkon) and BPP (Buriram).

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาการจำแนกพันธุ์ และการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของมัลเบอร์รี่ 9 พันธุ์ โดยเป็นพันธุ์ ต่างประเทศ 7 พันธุ์ คือ ไวท์คิง สหรัฐอเมริกา มังกร สหรัฐอเมริกาชาวฝรั่งเศส ได้หวัน เร็ดคิง และพันธุ์พื้นถิ่นซึ่งใช้เป็นพันธุ์อ้างอิงจำนวน 2 พันธุ์ คือ กำแพงแสนและบุรีรัมย์ ตามลำดับ ในจังหวัดพิษณุโลก โดยอาศัยการวิเคราะห์จากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS และ matK โดยในผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากยีนบริเวณ ITS สามารถให้ขนาด คู่เบสได้ 805 คู่เบส ในขณะที่ ยีนบริเวณ matK สามารถให้ผลผลิต PCR ได้ประมาณ 830 คู่เบส แต่เมื่อสังเคราะห์ลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ พบว่า บริเวณยีน ITS ให้ผลการสังเคราะห์มัลเบอร์รี่ได้เพียง 8 พันธุ์ (ยกเว้น พันธุ์ฝรั่งเศส) ในทางตรงกันข้าม การสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์จากบริเวณยีน matK จากมัลเบอร์รี่ให้ผลได้เพียง 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ไวท์คิง (AUSW) พันธุ์สหรัฐอเมริกาชาว (USAW) พันธุ์ได้หวัน (TW) พันธุ์มังกร (MK) และ พันธุ์บุรีรัมย์ (BRR) อาจเป็นผลจากกระบวนการเตรียมตัวอย่าง หรือขั้นตอนกำหนดการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR ยังไม่มีความเหมาะสมสำหรับในบางพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถสังเคราะห์ (sequencing) ได้ เมื่อทำการเทียบความคล้ายคลึงทางชนิด (identity) จากฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank) พบว่าแต่ละพันธุ์ ถูกระบุเป็นมัลเบอร์รี่ชนิด *Morus alba* โดยมีความคล้ายคลึงหรือเหมือนกันในฐานข้อมูลตั้ง 99-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมือนการรายงานที่ผ่านการใช้อินทั้งสองบริเวณสำหรับการระบุชนิดนั้น ให้ผลได้ดี เช่นการใช้ ITS ในการระบุพันธุ์ มัลเบอร์รี่ 8 พันธุ์ (Zeng *et al.*, 2015) หรือแม้แต่หม่อน

ในสกุลเดียว (*Morus*) แต่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และลูกผสมพันธุ์ต่าง ๆ (Weiguo *et al.*, 2005) ได้เป็นผลสำเร็จ จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างมัลเบอร์รี่พันธุ์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ในบริเวณทั้งสองค่อนข้างต่ำ อาจเป็นไปได้ที่ลักษณะอัตราการกลายพันธุ์ (mutation) ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งอาจต้องใช้ปรับปรุงพันธุ์ให้มีความหลากหลายมากขึ้น และใช้ระยะเวลาในการให้เกิดการแปรผันมากขึ้นต่อไป ทั้งนี้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณยีน ITS นั้นไม่สามารถแยกกลุ่มของมัลเบอร์รี่พันธุ์ต่าง ๆ ออกจากกันได้ ในขณะที่การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณยีน matK นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มหลัก แม้ว่า ยีนบริเวณ ITS จะให้ผลผลิต PCR ที่ดีกว่า matK ก็ตาม ซึ่งจากการรายงานการศึกษาทางวิวัฒนาการในพืชที่ผ่านมา มีข้อเสนอแนะถึงการให้ matK เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานสำหรับการระบุชนิดและการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม (Hollingsworth *et al.*, 2009; วุฒิพงษ์, 2554) และยังคงใช้ยีนบริเวณนี้กับงานวิจัยของกลุ่มพืชในหลาย ๆ กลุ่มมาจวบจนปัจจุบัน (Chase *et al.*, 2007; Asahina *et al.*, 2010; มัทนา และคณะ, 2552; พรธชา และคณะ, 2556; นฤมล และคณะ, 2557ก, ข)

การศึกษาของ นฤมล และคณะ (2557ก) ที่ได้ทำการจำแนกพันธุ์ และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ โดยพบว่า การใช้ยีนบริเวณ matK สามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ออกจากกันได้ 11 พันธุ์ โดยไม่สามารถแยกเอื้องกุหลาบชมพูกระป๋องกับเอื้องกุหลาบนำนออก จากกัน แต่พบว่า บริเวณ ITS ไม่เหมาะสมที่จะนำ

มาใช้เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของกล้วยไม้ได้ครบทั้ง 13 พันธุ์ นอกจากนี้ยังได้มีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิ่งโตกลอกตาหมู่สิงโตโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ กลับพบว่า การใช้บริเวณ matK เพียงลำพั้งนั้นไม่สามารถแยกสิ่งโตก้ามปูใหญ่ และก้ามปูแดง สิ่งโตอาจารย์เต็มกับสิ่งโตงาม และสิ่งโตอีคอร์กับสิ่งโตสุคริรินออกจากกันได้ ซึ่งมีข้อเสนอแนะว่าให้ใช้ยีน matK ร่วมกับยีน rbcL เพื่อให้การจำแนกได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งเหมือนกับการรายงานในอดีตที่ผ่านมาเช่นกัน (Sugita *et al.*, 1985; นฤมล และคณะ, 2557ข) นอกจากนี้เพื่อความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดต่าง ๆ จึงได้มีการเสนอให้ใช้ร่วมกันเป็น 2-3 บริเวณ (Kress and Ericson, 2007; Newmaster *et al.*, 2008; Kress *et al.*, 2009) หรือ 3 บริเวณร่วมกัน (Chase *et al.*, 2007) และการเลือกใช้ผสมผสาน 3-4 บริเวณ (Fazekas *et al.*, 2008) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อการจำแนกชนิดของมัลเบอร์รี่พันธุ์ต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และครอบคลุม มีข้อเสนอแนะว่า ควรศึกษาในข้อมูลส่วนอื่นประกอบ อาทิ การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งสายพันธุ์ไวท์มัลเบอร์รี่ (white mulberry; *Morus alba*), แร็ดมัลเบอร์รี่ (red mulberry; *Morus rubra*) และแบล็คมัลเบอร์รี่ (black mulberry; *Morus nigra*) การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ รวมทั้งการวิเคราะห์ด้วยยีนร่วมหลายบริเวณร่วมกัน เช่น rbcL, rpoB, rpoC1, trnH และ psbA เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถระบุสายพันธุ์มัลเบอร์รี่ที่ได้ จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของอนุชีววิทยา ซึ่งการศึกษาการจำแนกพันธุ์ในครั้งนี้อาศัยการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS และ matK พบว่า แผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS มีพัฒนาการเชิงเดี่ยว ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ matK สามารถจัดกลุ่มของมัลเบอร์รี่พันธุ์ต่าง ๆ ได้เป็นสองกลุ่มอย่างชัดเจน ทั้งนี้ความผันแปรนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์จากทั้งยีนทั้งสองบริเวณมีค่าค่อนข้างต่ำ จึงมีข้อเสนอแนะให้วิเคราะห์ด้วยยีนหลายบริเวณร่วมกัน เพื่อให้เกิดความมีประสิทธิภาพของการจัดกลุ่มตามวงศ์วานวิวัฒนาการต่อไป อีกทั้งต้องทำการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์มัลเบอร์รี่ในเขตพื้นที่ต่อไปอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณแหล่งทุนจากการสนับสนุนการวิจัยโครงการวิจัยสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ. สธ., 2562) ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2562 ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัยในครั้งนี้ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือ และห้องอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- นฤมล ชนานันต์ วริศรา แทนสง่า และธีระชัย
ชนานันต์. 2557ก. การจำแนกพันธุ์และการ
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของ
กล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์
ของตำแหน่งจำเพาะ. วารสารวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยี 21(5): 664-673.
- นฤมล ชนานันต์ วริศรา แทนสง่า และธีระชัย
ชนานันต์. 2557ข. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์
ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา
หมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
ยีนจำเพาะ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
22(4): 523-530.
- ปัญญา ปัญญาทิพย์ ปิยะสุดา โทสวนจิตร สุราสินี
ทัฬหสารพงศ์ ปราโมทย์ มหคุณากร เพลินทิพย์
ภูทองกิ่ง และบรรลือ สังข์ทอง. 2556. การ
วิเคราะห์ปริมาณเมลานินและการศึกษา
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากใบหม่อน.
วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 9(1): 58-59.
- พรรษา มนต์แข็ง อรุณรัตน์ ฉวีราช ธวัชชัย ฐาน
และรุ่งลาวัลย์ สุตมุล. 2556. ดีเอ็นเอบาร์โค้ด
เพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลซีไต้เหล็ก
(*Senna*). วารสารวิจัย มข. (บศ.) 13(2): 18-
30.
- มีทนา จงกา ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข.
2552. ดีเอ็นเอบริเวณยีน matK สำหรับใช้
เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดพืชสกุล
Alpinia Roxb. น. 1403-1412. ใน
การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัย
ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12 (สาขา
วิทยาศาสตร์ชีวภาพ), ขอนแก่น.
- ลือชัย บุตคุป. 2555. การศึกษาเปรียบเทียบ
ปริมาณฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้าน
ออกซิเดชันในผลหม่อนพันธุ์ต่าง ๆ. รายงาน
วิจัยฉบับสมบูรณ์, สำนักงานกองทุนสนับสนุน
การวิจัย (สกว.).
- วุฒิพงศ์ มหาคำ. 2554. DNA barcodes ของพืช:
หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้และข้อจำกัด.
วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 3(1): 1-30.
- Asahina, H., J. Shinozaki, K. Masuda, Y.
Morimitsu, and M. Satake. 2010.
Identification of medicinal *Dendrobium*
species by phylogenetic analyses using
matK and rbcL sequences. *Journal of*
Natural Medicines 64: 133-138.
- Berg, C.C., N. Pattharahirantricin, and B.
Chantarasuwan. 2011. *Moraceae*. pp.
475- 675. In: T. Santisuk, and K. Larsen
(eds.). *Flora of Thailand* vol. 10 part 4.
The Forest Herbarium, Department of
National Parks, Wildlife and Plant
Conservation, Bangkok.
- Chang, L.W., L.J. Juang, B.S. Wang, M.Y.
Wang, H.M. Ta, W.J. Hung, Y.J. Chen,
and M.H. Huang. 2011. Antioxidant and
antityrosinase activity of mulberry
(*Morus alba* L.) twigs and root bark.
Food and Chemical Toxicology 49:
785-790.
- Chase, M.W., R.S. Cowan, P.M. Hollingsworth,
C. van den Berg, S. Madriñán, G.
Petersen, O. Seberg, T. Jørgensen, K.M.
Cameron, M. Carine, N. Pedersen, T.A.J.
Hedderson, F. Conrad, G.A. Salazar, J.E.
Richardson, M.L. Hollingsworth, T.G.
Barracough, L.Kelly, and M. Wilkinson.

2007. A Proposal for a Standardized Protocol to Barcode All Land Plants. *Taxon* 56(2): 295-299.
- Cuenoud, P., V. Savolainen, L.W. Chatrou, M. Powell, R.J. Grayer, and M.W. Chase. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany* 89: 132-144.
- Fazekas, A.J., K.S. Burgess, P.R. Kesanakurti, S.W. Graham, S.G. Newmaster, B.C. Husband, D.M. Percy, M. Hajibabaei, and S.C.H. Barrett. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3(7): e2802.
- Heuzé, V., G. Tran, D. Bastianelli and F. Lebas. 2019. White mulberry (*Morus alba*). Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/123> Last updated on November 13: 17-47.
- Hollingsworth, P.M., L.L. Forrest, J.L. Spouge, M. Hajibabaei, S. Ratnasingham, M. van der Bank, M.W. Chase, R.S. Cowan, D.L. Erickson, A.J. Fazekas, S.W. Graham, K.E. James, K. Kim, W.J. Kress, H. Schneider, J. van AlphenStahl, S.C.H. Barrett, C. van den Berg, D. Bogarin, K.S. Burgess, K.M. Cameron, M. Carine, J. Chacón, A. Clark, J.J. Clarkson, F. Conrad, D.S. Devey, C.S. Ford, T.A.J. Hedderson, M.L. Hollingsworth, B.C. Husband, L.J. Kelly, P.R. Kesanakurti, J.S. Kim, Y. Kim, R. Lahaye, H. Lee, D.G. Long, S. Madriñán, O. Maurin, I. Meusnier, S. G. Newmaster, C. Park, D.M. Percy, G. Petersen, J.E. Richardson, G.A. Salazar, V. Savolainen, O. Seberg, M.J. Wilkinson, D. Yi, and D.P. Little. 2009. A DNA barcode for land plants. *PNAS* 106(31): 12794-12797.
- Kress, W.J. and D.L. Erickson. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the NonCoding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508.
- Kress, W.J., D.L. Erickson, F.A. Jones, N.G. Swenson, R. Perez, O. Sanjur, and E. Bermingham. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 18621-18626.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7; Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1873.
- Lee, S.H., S.Y. Choi, H. Kim, J.S. Hwang, B.G. Lee, and J.J. Gao. 2002. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus*

- alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25: 1045-1048.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Newmaster, S.G., A.J. Fazekas, R.A.D Steeves, and J. Janovec. 2008. Testing candidates plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources* 8: 480-490.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd eds. Cold spring Harbour Laboratory Press, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sitthithaworn, W., J. Wungsintaweekul, T. Sirisuntipong, T. Charoonratana, Y. Ebizuka, and W. De-Eknamkul. 2010. Cloning and expression of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase cDNA from *Croton stellatopilosus* and expression of 2C-methyl-d-erythritol 4-phosphate synthase and geranylgeranyl diphosphate synthase, key enzymes of plaunotol biosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 167(4): 292-300.
- Sugita, M., K. Shinozaki, and M. Sugiura. 1985. Tobacco chloroplast tRNA Lys (UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: An open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 3557-3561.
- Weiguo, Z., P. Yile, Z.Z.J. Zhifang, M. Xuexia, and H. Yongping. 2005. Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and *trnL-F* sequences. *African Journal of Biotechnology* 4: 563-569.
- Yuan Y.V. and N.A. Walsh. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology* 4: 1,144-1,150.
- Zeng, Q., H. Chen, C. Zhang, M. Han, T. Li, X. Qi, Z. Xiang, and N. He. 2015. Definition of Eight Mulberry Species in the Genus *Morus* by Internal Transcribed Spacer-Based Phylogeny. *PLOS ONE* 10(8): e0135411.