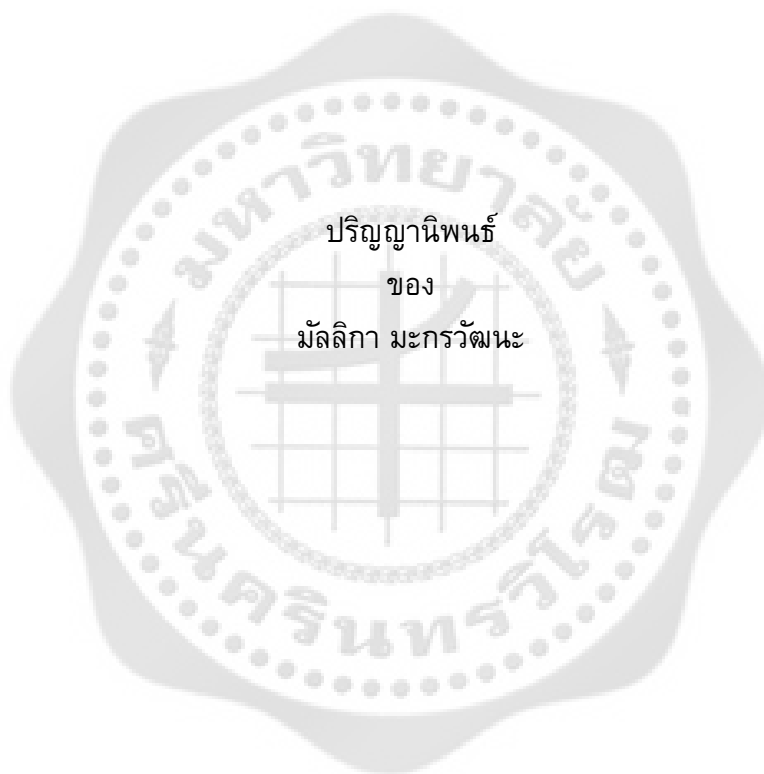


การระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ซับซ้อนในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวโดยใช้  
ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
เมษายน 2557

การระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ซับซ้อนในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวโดยใช้  
ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

เมษายน 2557

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ

มัลลิกา มะกรวัฒน์. (2557). การระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ซับซ้อนในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวโดยใช้อัตลักษณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์. ปรินทิพนิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปรินทิพนิพนธ์: อาจารย์ ดร.ณัฐริกา สวรรณาครัย, อาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี.

*Annulohyphoxylon* เป็นราในวงศ์ Xylariaceae ไฟลัม Ascomycota ในประเทศไทย มีรายงานพบอย่างน้อย 14 สปีชีส์ (จาก 42 สปีชีส์ ทั่วโลก) ในจำนวนนี้มีรายงานบางชนิดยังไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจนเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายซึ่งยากต่อการระบุชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บรวบรวมตัวอย่าง ราสกุล *Annulohyphoxylon* ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ ได้ทั้งสิ้น 168 ตัวอย่าง เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ได้ 10 สปีชีส์ พบว่ามีจำนวน 27 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน สามารถจัดกลุ่มได้ 8 ชนิด (*Annulohyphoxylon* species A-H) คิดเป็นร้อยละ 18 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดพบว่ามี 83 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 49.5 ที่สามารถเพาะเลี้ยงราบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยง 3 ชนิด (potato dextrose agar, oat meal agar และ malt extract agar) ได้ พบว่ามีเพียง *Annulohyphoxylon* species C ที่สามารถพัฒนาโครงสร้างของสปอร์สืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศ (anamorph) แบบ *Nodulisporium*-like บนอาหาร PDA ได้ จากนั้นคัดเลือกตัวแทนจำนวน 15 ตัวอย่าง (15 ชนิด) มาศึกษาลักษณะทางเคมีด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) โดยวิเคราะห์จากสารสกัดของ สปอร์มา พบว่าทุกตัวอย่าง มีรูปแบบของสารที่แสดงออกแตกต่างกันโดยเฉพาะตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 8 ชนิด นอกจากนี้ได้ทำการศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรมโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 4 บริเวณ ได้แก่ internal transcribed spacers (ITS) ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) ของตัวแทนจำนวน 29 ตัวอย่าง (ระบุชนิดได้ 10 ชนิด และระบุชนิดไม่ได้ 8 ชนิด) ผลการเทียบเคียงร้อยละความเหมือน (% similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic trees) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ใช้บ่งบอกความแตกต่างของชนิด ราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้ทุกชนิด รวมทั้งชนิดที่ไม่สามารถระบุได้ ด้วยค่า bootstrap ที่สูงถึง 99 – 100 ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน alpha-actin และยีน beta-tubulin เหมาะสมสำหรับใช้จัดกลุ่มของราในระดับสกุล (genus) มากกว่าระดับสปีชีส์ (species) และวาไรตี้ (variety) เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EF1- $\alpha$  ซึ่งเป็นการศึกษาครั้งแรกใน ราสกุล *Annulohyphoxylon* และพบว่าได้ผลดีกว่าในการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เพื่อศึกษาร่วมกับบริเวณ ITS ได้ เนื่องจากค่าร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สูงกว่าการศึกษาของยีน beta-tubulin ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ราสกุล *Annulohyphoxylon* มีความหลากหลายทางชีวภาพ และมีความแปรผันทาง พันธุกรรมสูง และจากตัวอย่าง ราที่ศึกษาทั้งหมด คาดว่าน่าจะพบราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่เป็นชนิดใหม่อย่างน้อย 1 ชนิด

FUNGAL IDENTIFICATION OF *ANNULOHYPXYLON* SPECIES COMPLEX FOUND IN  
PHU KHIEO WILDLIFE SANCTUARY USING NUCLEOTIDE SEQUENCE DATA



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Master of Science Degree in Biotechnology  
at Srinakharinwirot University

April 2014

Manlika Makornwattana. (2014). *Fungal identification of Annulohypoxyton species complex found in Phu Khieo Wildlife Sanctuary using nucleotide sequence data*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate school, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Nuttika Suwannasai, Dr. Cherdchai Phosri.

*Annulohypoxyton* Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh is a fungus genus in family Xylariaceae (Phylum Ascomycota) containing more than 42 known species worldwide. In Thailand, at least 14 species have been reported. In this study, many samples are being noted as unidentified and/or are complex species. One hundred and sixty eight samples of *Annulohypoxyton* collected from PhuKheio Wildlife Sanctuary, Chaiyaphum Province were observed. They were indentified into 10 known species and 8 undescribed species noted as *Annulohypoxyton* species A to H based on their morphological characteristics. Among of these samples, there were eighty-three isolates obtained and observed for anamorph development on 3 different types of media (potato dextrose agar, oat meal agar and malt extract agar). The result showed only one *Nodulisporium*-like anamorph of *Annulohypoxyton* species C developed on PDA. Fifteen selected samples of *Annulohypoxyton* were analysed for their chemical profiles by using high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) from the fungal stromatal extracts. The results revealed that all samples examined have different in chemical profiles including all undescribed species. Twenty-nine representative samples from each species were analysed on nucleotide sequences of four loci i.e. internal transcribed spacers (ITS) regions, alpha-actin gene, beta-tubulin gene and elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) gene. The phylogenetic trees were constructed, and revealed clear separation of all undescribed species from other known species with high bootstrap support. The phylogenetic trees constructed by using ITS1-5.8S-ITS2 sequences were the best region for *Annulohypoxyton* identification into species and variety, while alpha-actin and beta-tubulin sequences were limited or were suitable for genus identification rather than species and/or variety identification. In addition, the present study was the first study which employed EF1- $\alpha$  sequences in *Annulohypoxyton* species identification. It also indicates the higher percentages of PCR and nucleotide sequencing success than using beta-tubulin gene for the study. Therefore, EF1- $\alpha$  region may be another DNA marker which can be used together with ITS regions for *Annulohypoxyton* identification in further study. All results obtained indicate that *Annulohypoxyton* specimens examined exhibit high variation not only for morphological characteristics but also in genetic characteristics. There is at least one new species described from this study.

ปริญญาโท  
เรื่อง  
การระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ซับซ้อนในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวโดยใช้  
ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์  
ของ  
มัลลิกา มะกรวัชณะ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)  
วันที่ .....เดือน เมษายน พ.ศ. 2557

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท .....คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษาหลัก .....ประธาน  
(อาจารย์ ดร.ณัฐฉิภา สุวรรณาศรัย) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

.....ที่ปรึกษาร่วม .....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ณัฐฉิภา สุวรรณาศรัย)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี)

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่ง จาก อาจารย์ ดร.ณัฐวิภา สุวรรณาศรัย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท และอาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโทร่วม ผู้อนุเคราะห์ความช่วยเหลืออย่างเต็มที่ และเสียสละเวลาอันมีค่า เพื่อชี้แนะทางที่ดีต่อการดำเนินงานวิจัยที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจาก International Foundation for Science (ประเทศสวีเดน ภายใต้การดูแลของอาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี) และ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร ชัยวิสุทธิทางกูร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ขจีนาฏ โพธิ์เวชกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ ดร.ประวีติ อังประภาพรชัย และคณาจารย์ทุกท่านที่บ่มสอนวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย และขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อสถานที่และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการศึกษาทดลอง

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ อาจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและอนุเคราะห์เครื่องมือทางเคมีที่จำเป็นต่อการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ Professor Anthony J.S. Whalley (School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, UK) ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ Professor Marc Stadler (Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland, Germany) ที่อนุเคราะห์สารมาตรฐานในการดำเนินงานวิจัยที่สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ หัวหน้าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรรมการสอบปริญญาโท และช่วยแก้ไขปริญญาโทฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่มอบเงินอุดหนุนการไปเข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานของนิสิตบัณฑิตศึกษา (ทุนรหัส GRAD S-3-56) ในต่างประเทศ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ท้ายที่สุด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา และมารดา ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจ ข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญาโทจนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับมิตรภาพและความช่วยเหลือ รวมถึงผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ที่มีส่วนทำให้ปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

มัลลิกา มะกรวัฒน์

# สารบัญ

บทที่	หน้า
<b>1 บทนำ</b> .....	1
ภูมิหลังและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
<b>2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	4
ราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	4
การจำแนกชนิดของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> โดยอาศัยลักษณะทาง สัณฐานวิทยา.....	8
ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Teleomorph).....	8
ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Anamorph).....	12
บทบาทที่สำคัญของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	16
ราย่อยสลายไม้ในธรรมชาติ (Wood decay fungi).....	16
ราโรคพืช (Phytopathogen).....	17
ราเอนโดไฟท์ (Endophytic fungi).....	19
การศึกษาสารเมแทบอลิต์ของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> และสกุลใกล้เคียง.....	20
การศึกษาสีของสโตรมา (Stromatal pigment).....	21
การศึกษาสารเมแทบอลิต์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC).....	23
การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> และสกุลใกล้เคียง	28
ความหลากหลายของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> ในประเทศไทย และปัญหาในการจัดจำแนกชนิด.....	34
<b>3 วิธีดำเนินงานวิจัย</b> .....	38
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	38
การเก็บตัวอย่างราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	40
การจัดจำแนกชนิดของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> โดยอาศัยลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา.....	41



## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
<b>3 (ต่อ)</b> .....	41
การศึกษาตัวอย่างของราในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Teleomorph stage).....	41
การศึกษาตัวอย่างของราในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Anamorph stage).....	42
การศึกษาลักษณะของสารเคมีที่สกัดได้จากราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC).....	44
การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	46
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	46
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (polymerase chain reaction, PCR).....	46
การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis).....	51
การโคลนดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ (DNA cloning vector).....	52
การทำซันดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	54
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic trees).....	54
<b>4 ผลการทดลอง</b> .....	56
การเก็บรวบรวมตัวอย่าง และจัดจำแนกชนิดของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	56
<i>Annulohyphoxylon</i> species A.....	78
<i>Annulohyphoxylon</i> species B.....	80
<i>Annulohyphoxylon</i> species C.....	82
<i>Annulohyphoxylon</i> species D.....	84
<i>Annulohyphoxylon</i> species E.....	86
<i>Annulohyphoxylon</i> species F.....	88
<i>Annulohyphoxylon</i> species G.....	90
<i>Annulohyphoxylon</i> species H.....	92

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ).....	94
ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Anamorph) ของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	94
การศึกษาลักษณะของสารเคมีที่ได้จากราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC).....	105
สารมาตรฐาน.....	105
สารสกัดจากตัวอย่างราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	107
การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> โดยการหา ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	115
บริเวณ internal transcribed spacers (ITS).....	115
ยีน alpha – actin.....	115
ยีน beta – tubulin.....	117
ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ).....	118
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (Phylogenetic trees).....	120
บริเวณ internal transcribed spacers (ITS).....	129
ยีน alpha – actin.....	135
ยีน beta – tubulin.....	137
ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ).....	140
บริเวณ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ).....	142
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	144
บรรณานุกรม.....	152
ภาคผนวก.....	162

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก (ต่อ)	
ภาคผนวก ก.....	163
ภาคผนวก ข.....	166
ภาคผนวก ค.....	170
ภาคผนวก ง.....	174
ภาคผนวก จ.....	179
ภาคผนวก ฉ.....	194
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	196



## บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> และ <i>Hypoxyylon</i> .....	5
2 ชนิดของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	6
3 ความสัมพันธ์ของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> กับชนิดของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ.....	14
4 ตัวอย่างของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> และสกุลใกล้เคียงที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์กับชนิดพืชอาศัย.....	18
5 ตัวอย่างของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> และสกุลใกล้เคียงที่มีรายงานว่าเป็นเอนโดไฟท์.....	19
6 ชนิดของสารสีที่พบในราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ซึ่งได้จากบริเวณสโตรมาของเชื้อเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10%.....	22
7 ชนิดของสารที่ตรวจพบจากราในกลุ่ม Hypoxyloideae ที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC).....	23
8 ตัวอย่างสารเมแทบอไลต์ของราบางชนิดในสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC.....	25
9 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	38
10 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	39
11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	46
12 ส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับ KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit.....	47
13 ส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับ Phire® plant direct PCR kit.....	48
14 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณ ITS.....	48
15 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน alpha-actin ด้วย KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit.....	49
16 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน beta-tubulin ด้วย KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit.....	50
17 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน beta-tubulin ด้วย Phire® plant direct PCR kit.....	50
18 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน EF1- $\alpha$ .....	51

## บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
19 ส่วนผสมที่ใช้ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (DNA ligation).....	53
20 การจัดจำแนกชนิดและจำนวนราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่ได้จากการศึกษา ครั้งนี้.....	56
21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่สามารถจัดจำแนก ชนิดได้.....	58
22 ลักษณะของเส้นใยราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่เจริญบน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ชนิด.....	96
23 การเทียบเคียงรูปแบบของสารสกัดที่ค่าความยาวคลื่น (OD) 210 นาโนเมตร ภายในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา.....	113
24 การเทียบเคียงรูปแบบของสารสกัดที่ค่าความยาวคลื่น (OD) 254 นาโนเมตร ภายในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา.....	114
25 ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS, ยีน alpha-actin, ยีน beta-tubulin และยีน elongation factor 1-alpha ของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	120
26 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และยีน alpha-actin ของรา สกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank.....	123
27 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin และ elongation factor 1-alpha ของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูล GenBank.....	125

## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	5
2 ลักษณะของแผ่นจานที่พบในราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	10
3 โครงสร้างต่างๆ ที่ใช้จำแนกชนิดราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	11
4 ลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบต่างๆ ที่พบในราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	12
5 โครงสร้างของสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากสโตรมาของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> .....	24
6 โครงสร้างของสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากรา <i>Annulohyphoxylon cohaerens</i> .....	26
7 โครงสร้างทางเคมีของสาร <i>annulohyphoxyboverin</i> ที่สกัดได้จากรา <i>Annulohyphoxylon bovei</i> var. <i>microspora</i> (BCRC 34012).....	27
8 โครงสร้างทางเคมีของสาร <i>annulosquamulin</i> ที่สกัดได้จากรา <i>Annulohyphoxylon squamulosum</i> (BCRC 34022).....	27
9 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ rDNA และ ITS.....	29
10 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>beta-tubulin</i> .....	30
11 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>elongation</i> <i>factor 1-alpha</i> (EF1- $\alpha$ ).....	32
12 วิธีการศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ด้วยเทคนิคสไลด์คัลเจอร์.....	43
13 <i>Annulohyphoxylon annulatum</i> isolate PK121022.....	60
14 <i>Annulohyphoxylon atroroseum</i> isolate PK121048.....	61
15 <i>Annulohyphoxylon bovei</i> var. <i>microspora</i> isolate PK1210112.....	64
16 <i>Annulohyphoxylon moriforme</i> isolate PK121067.....	65
17 <i>Annulohyphoxylon moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> isolate PK07012.....	68
18 <i>Annulohyphoxylon multiforme</i> isolate PK121042.....	69
19 <i>Annulohyphoxylon nitens</i> isolate PK121044.....	72
20 <i>Annulohyphoxylon purpureonitens</i> isolate PK10006.....	73
21 <i>Annulohyphoxylon stygium</i> isolate PK121007.....	76
22 <i>Annulohyphoxylon stygium</i> var. <i>annulatum</i> isolate PK121058.....	77
23 <i>Annulohyphoxylon</i> species A isolate PK121027.....	79
24 <i>Annulohyphoxylon</i> species B isolate PK121012.....	81
25 <i>Annulohyphoxylon</i> species C isolate PK10007.....	83

## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
26 <i>Annulohyphoxylon</i> species D isolate PK121081.....	85
27 <i>Annulohyphoxylon</i> species E isolate PK07019.....	87
28 <i>Annulohyphoxylon</i> species F isolate H130.....	89
29 <i>Annulohyphoxylon</i> species G isolate H255.....	91
30 <i>Annulohyphoxylon</i> species H isolate PK09004.....	93
31 กราฟวงกลมแสดงร้อยละของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่สามารถเพาะเลี้ยง.....	94
32 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของรา <i>Annulohyphoxylon</i> species C แบบ <i>Nodulisporium</i> -like.....	95
33 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ 3 ชนิด ของราสกุล <i>A. annulatum</i> , <i>A. atroroseum</i> , <i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> และ <i>A. moriforme</i> .....	101
34 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ 3 ชนิด ของราสกุล <i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> , <i>A. multiforme</i> , <i>A. nitens</i> และ <i>A. purpureonitens</i> .....	102
35 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ 3 ชนิด ของราสกุล <i>A. stygium</i> , <i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> , <i>Annulohyphoxylon</i> species A และ <i>Annulohyphoxylon</i> species B.....	103
36 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ 3 ชนิด ของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> species C, <i>Annulohyphoxylon</i> species D, <i>Annulohyphoxylon</i> species E และ <i>Annulohyphoxylon</i> species H.....	104
37 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) cohaerin A, (B) binaphthalene และ (C) mitorubinol.....	106
38 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) <i>A. annulatum</i> , (B) <i>A. atroroseum</i> และ (C) <i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> .....	108
39 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) <i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> , (B) <i>A. nitens</i> และ (C) <i>A. purpureonitens</i> .....	109
40 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) <i>A. stygium</i> , (B) <i>Annulohyphoxylon</i> species A และ (C) <i>Annulohyphoxylon</i> species B.....	110

## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
41 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) <i>Annulohypoxyton</i> species C, (B) <i>Annulohypoxyton</i> species D และ (C) <i>Annulohypoxyton</i> species E.....	111
42 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) <i>Annulohypoxyton</i> species F, (B) <i>Annulohypoxyton</i> species G และ (C) <i>Annulohypoxyton</i> species H.....	112
43 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	116
44 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน alpha-actin ของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	117
45 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน beta-tubulin ของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	118
46 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) ของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	119
47 กราฟแสดงผลเปรียบเทียบร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (% PCR success) บริเวณ ITS ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ EF1- $\alpha$ ของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	120
48 กราฟแสดงผลเปรียบเทียบร้อยละความสำเร็จในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (% sequencing success) บริเวณ ITS ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ EF1- $\alpha$ ของราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> .....	127
49 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีขนาดน้อยกว่า 700 คู่เบส ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA.....	130
50 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีขนาดมากกว่า 700 คู่เบส ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA.....	132
51 แผนภูมิ วิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล <i>Annulohypoxyton</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S และ ITS2 ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA.....	134



## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
52 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน alpha-actin ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA.....	136
53 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA.....	138
54 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน elongation factor 1-alpha ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA.....	140
55 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันของบริเวณ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin ยีน elongation factor 1-alpha ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA.....	142

# บทที่ 1

## บทนำ

### ภูมิหลังและความสำคัญของปัญหา

ราสกุล *Annulohypoxyton* Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh เป็นราในวงศ์ Xylariaceae (ไฟลัม Ascomycota) พบได้บนต้นไม้ ท่อนไม้ กิ่งไม้ และต้นไม้ล้มในธรรมชาติ มีรายงานทั้งในเขตร้อน และเขตอบอุ่น ซึ่งราสกุล *Annulohypoxyton* นี้ได้แยกออกมาจากราสกุล *Hypoxyton* ในปี ค.ศ. 2005 (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) โดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูล การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน alpha-actin และ beta-tubulin ในปัจจุบันมีรายงานว่าพบราสกุลนี้จำนวนมากกว่า 42 สปีชีส์ ทั่วโลก บทบาทที่สำคัญของราในกลุ่มนี้คือเป็นผู้ย่อยสลายเศษซากพืช ทำให้เกิดความสมดุล เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างของเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของพืชได้ จึงทำให้มีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาถึง คุณสมบัติของ เอนไซม์ ชนิดต่างๆ ในกลุ่ม cellulolytic enzymes และ ligninolytic enzymes จากรากลุ่มนี้เพื่อนำ มาใช้ในการฟอกสีกระดาษ และบำบัดน้ำทิ้ง จากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น ทั้งนี้พบว่าบางชนิดสามารถเจริญอยู่ภายในเซลล์ของพืชโดยไม่ก่อโรคให้กับพืชเรียกว่า เอนโดไฟท์ (endophyte) เช่น รา *Annulohypoxyton cohaerens* และ *A. minutellum* ซึ่งบางชนิดสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ในขณะที่บางชนิดพบว่าเป็นราโรคพืช เช่น โรคแคงเกอร์ (canker) ที่เกิดจากรา *Annulohypoxyton truncatum* ในไม้โอ๊ก (*Quercus variabilis*) และรา *Annulohypoxyton thouarsianum* var. *thouarsianum* ในไม้เนื้อแข็งหลายชนิด ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก (Whalley. 1996: 897-922; Cha; et al. 2012: 79-81) และบางชนิดพบว่าสามารถผลิตสารชนิดใหม่ได้ เช่น การศึกษาราเอนโดไฟท์ของ *Annulohypoxyton bovei* var. *microspora* (BCRC 34012) ที่แยกได้จากต้นข้าว (*Oryza sativa*) สามารถสร้างสารชนิดใหม่คือ annulohypoxyboverin (Cheng; et al. 2011: 1108-1114) และรา *Annulohypoxyton cohaerens* ที่สามารถสร้างสารชนิดใหม่ในกลุ่ม azaphilones ได้ถึง 4 ชนิด คือ cohaerins C-F (Quang; et al. 2006: 6349-6354) เป็นต้น

ในประเทศไทยพบว่ามีการศึกษาของราสกุล *Annulohypoxyton* มาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 จนถึงปัจจุบัน (Thienhirun. 1997: 1-355; Suwannasai; et al. 2005: 303-324; Phosri; et al. 2008: 1-8; Fournier; et al. 2010: 23-36; Suwannasai; et al. 2013: 1-8) มีรายงานพบทั้งหมดจำนวน 14 สปีชีส์ ซึ่งในจำนวนนี้รวมถึงราชนิดใหม่ได้แก่ *Annulohypoxyton bahnphadengense* J. Fournier & M. Stadler และ *Annulohypoxyton maeteangense* J. Fournier & M. Stadler (Fournier; et al. 2010: 23-36) นอกจากนี้มีรายงานว่าราสกุล *Annulohypoxyton* บางชนิดยังไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน หรือยากต่อการระบุชนิด ทั้งนี้เนื่อง จากความหลากหลายทางชีวภาพของราในประเทศไทย รวมทั้งฐานข้อมูลของ รากลุ่มนี้ในประเทศไทยที่ยังมีอยู่ น้อย และที่

สำคัญราในกลุ่มนี้บางชนิด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันสูง เช่น รา *Annulohyphoxylon nitens*, *A. moriforme* และ *A. bovei* var. *microspora* เป็นต้น ซึ่งมีลักษณะของ สโตรมา (stroma) สี ขนาด และรูปร่างของสปอร์ที่ใกล้เคียงกันมาก และบางชนิดพบว่าสามารถจำแนกชนิดออกจากกัน ได้ โดยอาศัยลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) ที่สร้างโคนิเดียเจริญบนอาหาร เลี้ยงเชื้อเท่านั้น ดังนั้นในบางตัวอย่างของราที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้จึงไม่สามารถจำ แนกชนิดได้ ในปัจจุบันเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้นำมาใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพดี สามารถใช้ช่วยในการจัด กลุ่มและจำแนกชนิดราที่ยากต่อการระบุชนิด หรือ ชนิดที่ซับซ้อนได้ดี เช่น การศึกษากำหนดขอบเขตชนิด ของรา *Xylaria hypoxylon* ซึ่งมีลักษณะ ทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย และพบการแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลก โดยการใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) (Pelaez; et al. 2008: 114-124; Peršoh; et al. 2009: 256-268) หรือการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดของ ราที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ *A. truncatum* ที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับไม้เนื้อแข็งในประเทศจีน (Cha; et al. 2012: 79-81) รวมทั้งการศึกษาเพื่อ พิสูจน์และยืนยันการค้นพบ ราชนิดใหม่ในหลายๆ งานวิจัย เป็นต้น (Ju; Rogers; & Hsieh. 2004: 154-161; Fournier; et al. 2010: 23-36; Pereira; Rogers; & Berzerra. 2010: 248-252) ซึ่งตำแหน่งของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นิยมใช้ ในการศึกษาเพื่อการระบุชนิด ของรา เช่น บริเวณ ribosomal DNA และ internal transcribed spacers (ITS) รวมทั้งยีนที่ควบคุมการ ผลิตโปรตีนที่สำคัญในเซลล์บางชนิด เช่น ยีน alpha-actin, beta-tubulin, RNA polymerase I และ II (RPB1 & RPB2) และ elongation factor I-alpha (EF1- $\alpha$ ) เป็นต้น (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865; Rehner; & Buckley. 2005: 84-98; Suwannasai; et al. 2005: 303-324; Triebel; et al. 2005: 25-43; Tang; Jeewon; & Hyde. 2007: 392-402; Spribille; Klug; & Mayrhofer. 2011: 603-614; Hansen; et al. 2013: 311-335) และเมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการรายงานพบราชนิดที่เป็นสปิซีส ซ่อนเร้น (cryptic species) ของ *A. nitens* ในประเทศไทย จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS อีกด้วย (Suwannasai; et al. 2013: 1-8)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษา ราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่พบในเขตรักษา พันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว ประเทศไทย โดยเฉพาะชนิดที่ซับซ้อนและยากต่อการจัดจำ แนกในระดับสปิซีส โดยการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล คือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ร่วมกับลักษณะทางสัณฐาน วิทยา และ ลักษณะ ทางเคมี รวมทั้งศึกษา ความสัมพันธ์ของรา ดังกล่าวโดยการสร้าง แผนภูมิ วิวัฒนาการต้นไม้ เพื่อการระบุชนิดที่ถูกต้อง

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ให้ความสนใจกับราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ โดยเฉพาะชนิดที่ซับซ้อนและยากต่อการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ

1. เพื่อคัดแยกและเพาะเลี้ยงราบริสุทธิ์สกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดต่างๆ ที่เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ
2. เพื่อจัดจำแนกชนิดของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่เก็บรวบรวมได้ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเทียบกับข้อมูลอ้างอิงในฐานข้อมูล GenBank
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของราสกุล *Annulohyphoxylon* โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic trees)

## ขอบเขตของการวิจัย

ตัวอย่างของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่รวบรวมได้จากพื้นที่ป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ ประเทศไทย ได้นำมาคัดแยกและเพาะเลี้ยง ราบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งลักษณะของการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการจัดจำแนกชนิดเบื้องต้น จากนั้นศึกษาลักษณะทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 บริเวณ คือ internal transcribed spacers (ITS) ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) โดยการเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมของ ราในฐานข้อมูลสากล และศึกษาลักษณะทางเคมีของ ราตัวอย่างด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) จากนั้นสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ ต้นไม้ (phylogenetic trees) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ รวมทั้งระบุสปีชีส์ที่ถูกต้องของราสกุล *Annulohyphoxylon* ทั้งหมด

## ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

จากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* ซึ่งสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์โดยเฉพาะชนิดที่เป็นปัญหา และยากต่อการจัดจำแนกได้อย่างถูกต้อง รวมทั้งเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของ ราแต่ละชนิดมากยิ่งขึ้น โดยอาศัยแผนภูมิวิวัฒนาการ ต้นไม้ ร่วมกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางเคมี ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารชนิดใหม่ๆ ต่อไป

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

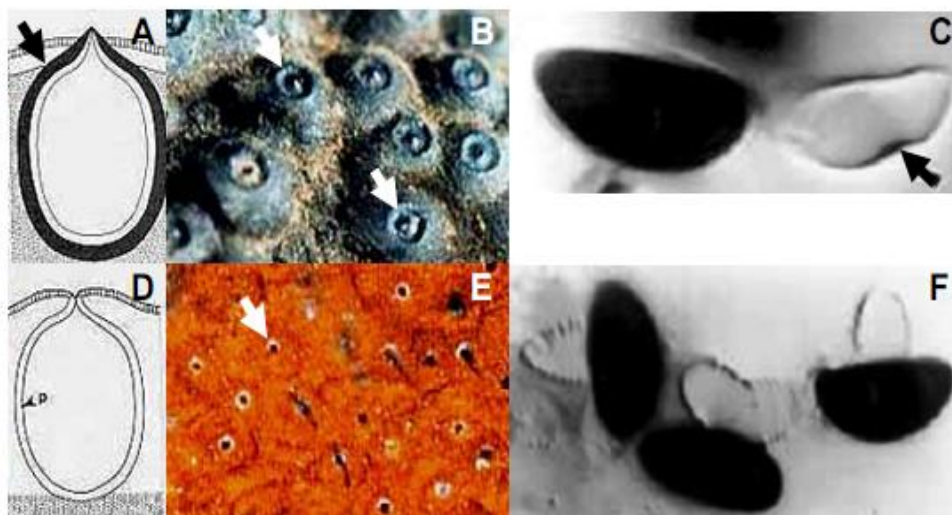
#### 1. ราสกุล *Annulohypoxyton*

ราสกุล *Annulohypoxyton* จัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธาน (Lumbsch; & Huhndorf. 2007: 1-58) ได้ดังนี้

Kingdom : Fungi  
Phylum : Ascomycota  
Class : Ascomycetes  
Order : Xylariales  
Family : Xylariaceae  
Subfamily : Hypoxyloideae  
Genus : *Annulohypoxyton*

ราสกุลนี้พบกระจายอย่างกว้างขวางทั่วโลกทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Ju; & Rogers. 1996: 1-365; Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) ส่วนมากพบการเจริญบนซากไม้ที่ตายแล้ว เช่น กิ่งไม้ ท่อนไม้ ตอไม้ และต้นไม้ล้ม ราสกุลนี้มีบทบาทสำคัญในการเป็นผู้ย่อยสลายในธรรมชาติ ก่อให้เกิดความสมดุลในระบบ นิเวศ (Whalley. 1996: 897-922) นอกจากนี้ยังพบว่าราสกุลนี้บางชนิดสามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ที่น่าสนใจ เช่น สาร cytochalasins และ สาร azaphilones ชนิดต่างๆ ที่มีองค์ประกอบของสาร nematicide ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายปรสิตของพืช และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียบางชนิดได้ (Stadler; & Fournier. 2006: 160-170) ราสกุล *Annulohypoxyton* จัดเป็นกลุ่มย่อย (section) ในเชื้อราสกุล *Hypoxyton* Bull. (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ *Hypoxyton* section *Hypoxyton* และ *Hypoxyton* section *Annulata* และในปี ค.ศ. 2005 เฮช จู และ โรเจอร์ส(Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) ได้แยกกลุ่มของราสกุล *Hypoxyton* section *Annulata* นี้ออกมาเป็นสกุลใหม่คือ *Annulohypoxyton* Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณยีน alpha-actin และ beta-tubulin ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ซึ่งลักษณะของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่แตกต่างจาก *Hypoxyton* มีดังนี้ (1) เนื้อเยื่อ carbonaceous ของสโตรมาในระยะที่เจริญเต็มที่จะมีสีเข้มถึงสีดำ (2) ออสติโอล (ostioles) มีลักษณะปลายแหลม (papillate) คือ อยู่ในระดับที่สูงกว่าสโตรมาและถูกล้อมรอบด้วยแผ่นจาน (ostiole discs) (3) เพอริสปอร์ (perispores) ที่หุ้มแอสโคสปอร์ (ascospores) พบส่วนของผนังที่หนาซึ่งอยู่ด้านเดียวกับจิร์มสลิต (germ slit) แสดงดังภาพประกอบ 1 รายละเอียดการเปรียบเทียบ ราสกุล *Annulohypoxyton* และ *Hypoxyton* แสดงดังตาราง 1 ปัจจุบันมีรายงานจำนวนชนิดของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่พบมากกว่า 42 สปีชีส์ ทั่วโลก (แสดงดังตาราง 2) ซึ่งในจำนวนนี้เป็นราชนิดใหม่ที่รายงานจากประเทศไทยจำนวน 2 สปีชีส์ คือ

*Annulohypoxyton bahnphadengense* J. Fournier & M. Stadler และ *Annulohypoxyton maeteangense* J. Fournier & M. Stadler (Fournier; et al. 2010: 23-36)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญของ ราสกุล *Annulohypoxyton* (A-C) และ *Hypoxyton* (D-F) คือ (A) เนื้อเยื่อ carbonaceous หนาสีดำ (ลูกศร) (B) แผ่นจานล้อมรอบออสติโอล (ostiole discs) (C) เพอริสปอร์ที่พบส่วนชั้นผนังหนา (thickening) (ลูกศร) (D) เนื้อเยื่อ carbonaceous บาง (E) ออสติโอลแบบ umbilicate และ (F) เพอริสปอร์ไม่พบส่วนผนังหนา

ที่มา: <http://mycology.sinica.edu.tw/Xylariaceae/generalinfo.asp?>

ตาราง 1 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราสกุล *Annulohypoxyton* และ *Hypoxyton*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>Annulohypoxyton</i>	<i>Hypoxyton</i>
1. เนื้อเยื่อ carbonaceous	มีเนื้อเยื่อ carbonaceous เป็นชั้นหนาชัดเจน ล้อมรอบเพอริทีเซีย (perithecia) ในระยะที่ ราเจริญเต็มที่ (mature stage) (ภาพประกอบ 1A)	เนื้อเยื่อ carbonaceous มีลักษณะเป็นชั้นบางๆ (ภาพประกอบ 1D)

## ตาราง 1 (ต่อ)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>Annulohypoxyton</i>	<i>Hypoxyton</i>
2. ออสติโอล (ostioles)	มีลักษณะปลายแหลม (papillate) อยู่ในระดับที่สูงกว่าสโตรมาและ ถูกล้อมรอบด้วยแผ่นจาน (ostiolear discs) (ภาพประกอบ 1B)	บางชนิดมีลักษณะปลายแหลม (papillate) อยู่ในระดับที่สูงกว่าสโตรมา บางชนิดอยู่ในระดับเดียวกับสโตรมา บางชนิดอยู่ต่ำกว่าระดับของสโตรมา (umbilicate) (ภาพประกอบ 1E) แต่ไม่พบแผ่นจาน (ostiolear discs)
3. เพอริสปอร์ (perispores) เมื่อทดสอบกับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10%	มีลักษณะเรียบและส่วนของผนังที่หนาพบอยู่ด้านเดียวกับจิร์มสลิต (germ slit) (ภาพประกอบ 1C)	บางชนิดมีลักษณะเรียบ (smooth) บางชนิดมีลายเป็นขี้ผึ้งตามขวาง (coil-like) (ภาพประกอบ 1F)

ที่มา: Ju; & Rogers. (1996). A Revision of the Genus *Hypoxyton*. *Mycologia Memoir*. 20: pp. 1-365.

ตาราง 2 ชนิดของราสกุล *Annulohypoxyton*

ชนิด	เอกสารอ้างอิง
<i>Annulohypoxyton annulatum</i> (Schwein.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton apiahynum</i> (Speg.) Hladki & A.I. Romero	Hladki; & Romero. 2009: 733-744
<i>Annulohypoxyton archeri</i> (Berk.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton atroroseum</i> ( J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton austrobahiense</i> Jad. Pereira, J.D. Rogers & J.L. Bezerra	Pereira; Rogers: & Bezerra. 2010: 248-252
<i>Annulohypoxyton bahnphadengense</i> J. Fourn. & M. Stadler	Fournier; et al. 2010: 23-36
<i>Annulohypoxyton bovei</i> (Speg.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton bovei</i> var. <i>microspora</i> (J.H. Miller) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton cohaerens</i> (Pers.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton discophorum</i> (Penz. & Sacc.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865

## ตาราง 2 (ต่อ)

ชนิด	เอกสารอ้างอิง
<i>Annulohypoxyton elevatidiscus</i> (Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh)	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton gombakense</i> (M.A. Whalley, Y.-M. Ju, J.D. Rogers & A.J.S. Whalley) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton hemicarpum</i> Jad. Pereira, J.D. Rogers & J.L. Bezerra	Pereira; Rogers; & Bezerra. 2010: 248-252
<i>Annulohypoxyton hians</i> (Berk. & Cooke) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton ilanense</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton leptascum</i> (Speg.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton leptascum</i> var. <i>macrosporum</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton leucadendri</i> Marinc., M.J. Wingf. & Crous	Marinc; et al. 2008: 1-166
<i>Annulohypoxyton macrodiscum</i> Jad. Pereira, J.D. Rogers & J.L. Bezerra	Pereira; Rogers; & Bezerra. 2010: 248-252
<i>Annulohypoxyton maeteangense</i> J. Fourn. & M. Stadler	Fournier; et al. 2010: 23-36
<i>Annulohypoxyton michelianum</i> (Ces. & De Not.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton microcarpum</i> (Penz. & Sacc.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton minutellum</i> (Syd. & P. Syd.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton moriforme</i> (Henn.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton multiforme</i> (Fr.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton multiforme</i> var. <i>alaskense</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton nitens</i> (Ces.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton nothofagi</i> (Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh)	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton pouceanum</i> (Berk. & Cooke) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton pseudostipitatum</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton purpureonitens</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865



## ตาราง 2 (ต่อ)

ชนิด	เอกสารอ้างอิง
<i>Annulohypoxyton purpureopigmentum</i> Jad. Pereira, J.D. Rogers & J.L. Bezerra	Pereira; Rogers; & Bezerra. 2010: 248-252
<i>Annulohypoxyton pyriforme</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton squamulosum</i> (Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh)	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton stygium</i> (Lév.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton stygium</i> var. <i>annulatum</i> (Rehm) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton subeffusum</i> (Speg.) Hladki & A.I. Romero	Hladki; & Romero. 2009: 733-744
<i>Annulohypoxyton thouarsianum</i> (Lév.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton thouarsianum</i> var. <i>macrosporum</i> (San Martín, Y.-M. Ju, & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton truncatum</i> (Schwein.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton urceolatum</i> (Rehm) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865

## 2. การจำแนกชนิดของราสกุล *Annulohypoxyton* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจำแนกชนิดของ ราสกุล *Annulohypoxyton* อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก โดยศึกษาลักษณะ รูปร่าง สี และขนาดของโครงสร้างเชื้อราภายนอกด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งในบางชนิดอาจต้องศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ร่วมด้วย เช่น การศึกษาลวดลายของผิวสปอร์ และลักษณะของเจอร์มสลิต (germ slit) เป็นต้น ระยะเวลาเจริญของราที่ศึกษาประกอบด้วย 2 ระยะ คือ ระยะเวลาสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph stage) และระยะเวลาสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph stage) (Miller. 1961: 1-158; Ju; & Rogers. 1996: 1-365)

### 2.1 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Teleomorph)

ระยะเวลาสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นระยะที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของรา โดยทั่วไป รวมทั้ง ราสกุล *Annulohypoxyton* ซึ่งสามารถศึกษาได้ด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยมีลักษณะที่สำคัญดังนี้

### 2.1.1 สโตรมา (Stroma)

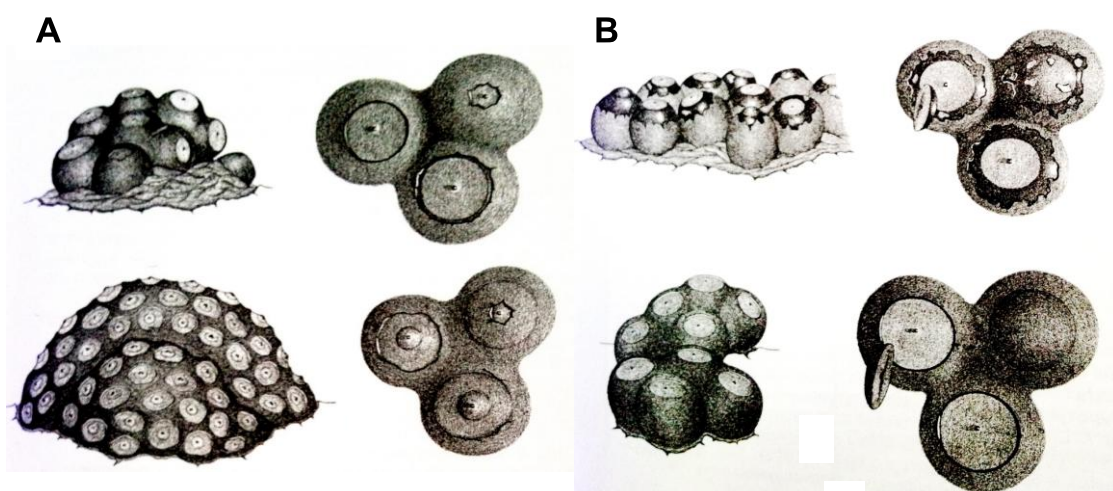
ส่วนของสโตรมาหรือ fruiting body ของราสกุล *Annulohyphoxylon* จะมีลักษณะแข็งเมื่อเจริญเต็มที่ รูปร่างมีลักษณะเป็นปื้นอยู่บนเนื้อไม้ หรือเปลือกไม้ อาจมีลักษณะนูนเป็นก้อน (glomerate) หรือเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) หรือเรียบเป็นแผ่นแบน (pulvinate) ส่วนสีของผิวสโตรมาส่วนใหญ่มีสีดำ (black) ม่วงอมน้ำตาล (brown vinaceous) ดำอมม่วง (violaceous black) หรือดำเขียว (olivaceous black) เป็นต้น โดยเทียบเคียงกับแผ่นสีมาตรฐานของ Rayner (1970) ในบางชนิดอาจมีลักษณะมันเงา (shiny) หรือด้าน (dull) ทั้งนี้สีของแกรนูลที่พบล้อมรอบเพอริทีเซีย (perithecia) ก็ใช้ในการจำแนกชนิดเช่นกัน นอกจากนี้อาจจำแนกชนิดของรากกลุ่มนี้โดยใช้การทดสอบการเกิดสีของผิวสโตรมากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10% ซึ่งราสกุล *Annulohyphoxylon* ส่วนใหญ่มีสีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90)) สีเขียวหม่น (dull green (70)) สีเขียวเข้ม (dark green (21)) สีม่วงแดง (vinaceous purple (101)) และสีน้ำผึ้ง (honey (64)) เป็นต้น เมื่อทดสอบกับสารละลายด่างกลาว (Ju; & Rogers. 1996: 1-365; Rayner. 1970: 1-34)

### 2.1.2 เพอริทีเซีย (Perithecia)

เพอริทีเซียเป็นชนิดของแอสโคคาร์ป (ascocarp) ที่พบในราสกุล *Annulohyphoxylon* ซึ่งจะถูกกล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อ carbonaceous มีลักษณะได้หลายแบบ เช่น แบบรี (obovoid) แบบทรงกลม (spherical) และ แบบทรงกระบอก (tubular) ซึ่งขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางรวมทั้งความกว้างและความยาวจะใช้เป็นข้อมูลประกอบในการระบุชนิดของราได้ (Ju; & Rogers. 1996: 1-365)

### 2.1.3 ออสติโอล (Ostiole)

ลักษณะของออสติโอล ซึ่งเป็นบริเวณส่วนปลายของเพอริทีเซียของราสกุล *Annulohyphoxylon* จะมีลักษณะปลายแหลม (papillate) อยู่ในระดับที่สูงกว่าผิวของสโตรมา และถูกกล้อมรอบด้วยแผ่นจานขนาดเล็ก (ostiole discs) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ตั้งแต่ 0.1 - 0.8 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับชนิด ซึ่งลักษณะของแผ่นจานที่ใช้ในการจำแนกชนิด แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ (1) แบบ *truncatum*-type ตัวอย่างที่พบเช่น *Annulohyphoxylon stygium* และ *A. truncatum* และ (2) แบบ *bovei*-type ตัวอย่างที่พบ เช่น *Annulohyphoxylon nitens* และ *A. bovei* เป็นต้น (แสดงดังภาพประกอบ 2) (Ju; & Rogers. 1996: 1-365)



ภาพประกอบ 2 ลักษณะของแผ่นจานที่พบในราสกุล *Annulohypoxyton* (A) แบบ *truncatum*-type และ (B) แบบ *bovei*-type

ที่มา: Ju; & Rogers. (1996). A Revision of the Genus *Hypoxyton*. *Mycologia Memoir*.

20: p. 23

#### 2.1.4 แอสคัส (Ascus) และแอสโคสปอร์ (Ascospores)

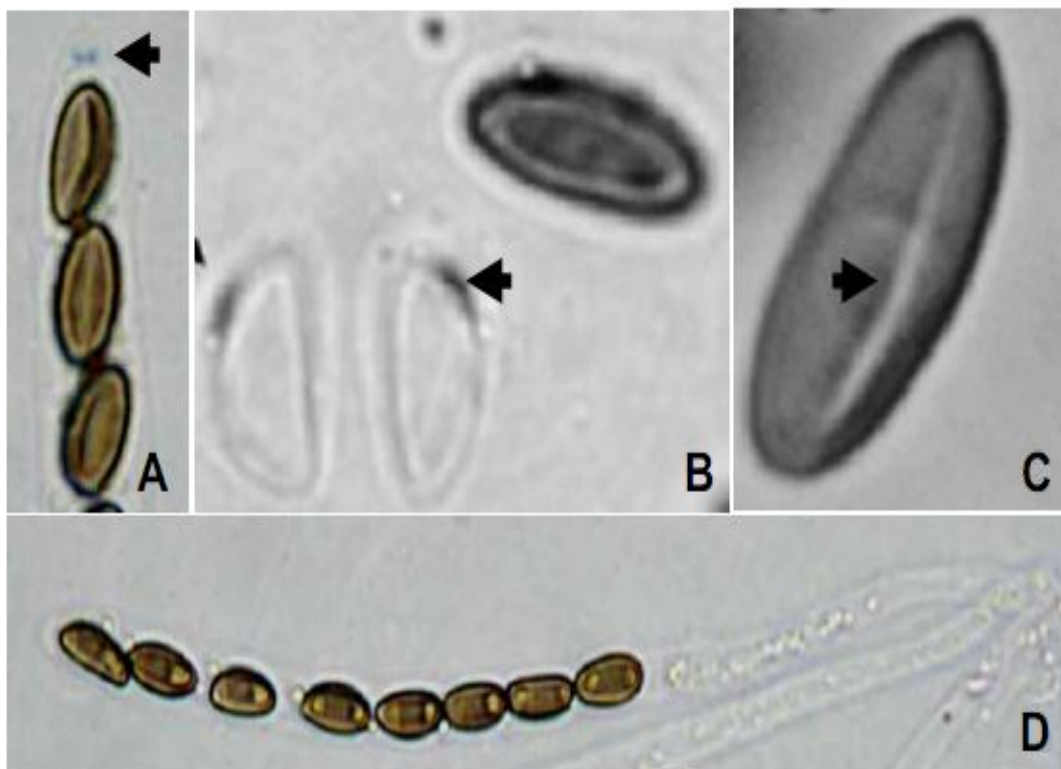
แอสคัสของราสกุลนี้มีลักษณะคล้ายกระบอง ตรงปลายพบโครงสร้างที่เรียกว่า เอพิคัล แอปพาราทัส (apical apparatus) ซึ่งบางชนิดติดสีน้ำเงินเมื่อย้อมด้วยสารละลาย melzer's reagent (แสดงดังภาพประกอบ 3A) (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) ในหนึ่งแอสคัสจะบรรจุด้วย 8 แอสโคสปอร์ (แสดงดังภาพประกอบ 3D) รูปร่าง สี และ ขนาด ของแอสโคสปอร์ สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดของราได้ ซึ่งสีของแอสโคสปอร์ที่พบส่วนมากมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ผันของแอสโคสปอร์มีลักษณะเรียบ และรูปร่างที่พบอาจจะมีลักษณะรีคล้ายรูปไข่ (ellipsoid) ด้านทั้งสองของสปอร์มีความสมมาตรกัน (equilateral) หรือไม่สมมาตรกัน (inequilateral) หรือเกือบสมมาตรกัน (slightly inequilateral) ปลายของสปอร์มีลักษณะแคบ (narrowly round ends) หรือกว้าง (broadly round ends) (Ju; & Rogers. 1996: 1-365; Suwannasai; et al. 2012: 125-133)

#### 2.1.5 เจิร์มสลิต (Germ slit) และเพอริสปอร์ (Perispore)

เจิร์มสลิตเป็นโครงสร้างที่พบบนผิวของแอสโคสปอร์ เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการงอกของสปอร์ ซึ่งในรากลุ่มนี้มีหลายรูปแบบ ได้แก่ ลักษณะเป็นเส้นตรง และมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ (straight full length) หรือเป็นเส้นตรงแต่มีความยาวน้อยกว่าความยาวของสปอร์

(straight nearly full length) พบว่าปรากฏอยู่บนด้านโค้งของสปอร์ (convex side) มากกว่าด้านเรียบของสปอร์ (flattened side) (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) (แสดงดังภาพประกอบ 3C)

ส่วนเพอริสปอร์ของราสกุล *Annulohypoxyton* มีลักษณะเฉพาะคือเรียบ (smooth) และมีส่วนของผนังที่หนาซึ่งพบอยู่ด้านเดียวกับเจอร์มสลิท เมื่อทดสอบกับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10% (แสดงดังภาพประกอบ 3B)

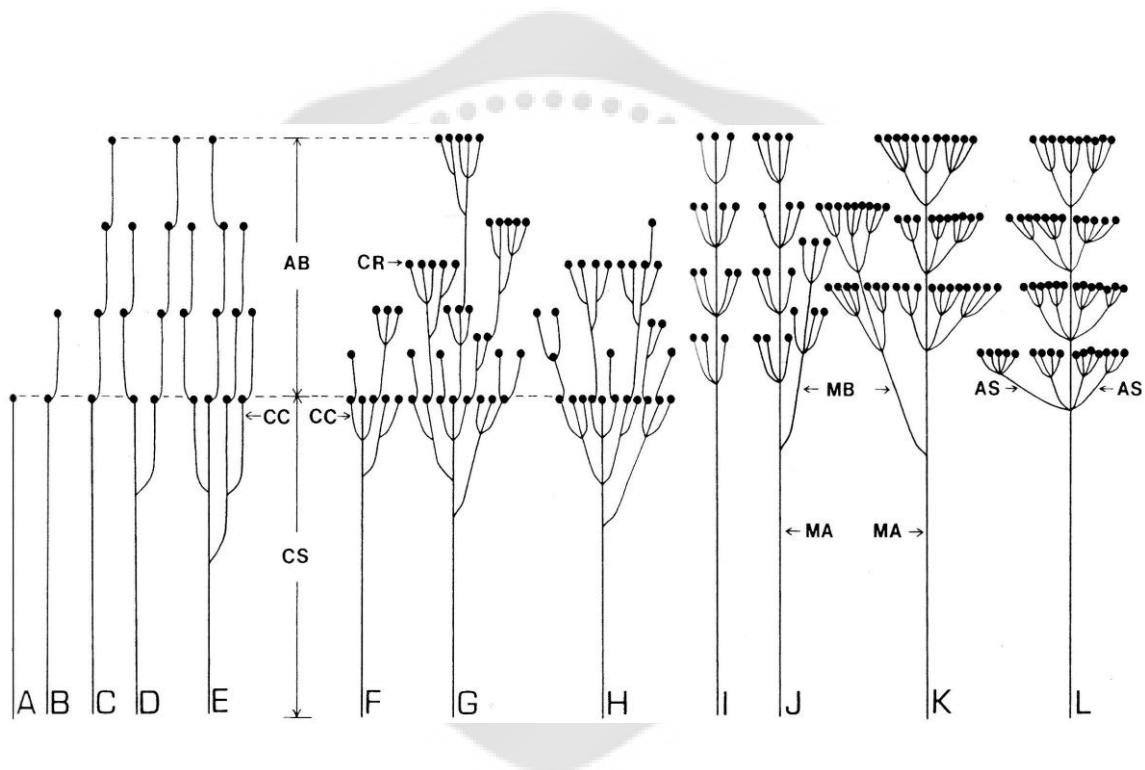


ภาพประกอบ 3 โครงสร้างต่างๆ ที่ใช้จำแนกชนิดของราสกุล *Annulohypoxyton* (A) เอพิคัล แอปพาราทัส ติดสีน้ำเงิน (ลูกศร) (B) เพอริสปอร์ที่มีส่วนของผนังหนา (ลูกศร) (C) เจิร์มสลิทที่ลักษณะเป็นเส้นตรงบนผิวของสปอร์ (ลูกศร) และ (D) แอสคัสมีลักษณะเป็นรูปกระบอก ภายในบรรจุแอสโคสปอร์จำนวน 8 แอสโคสปอร์

ที่มา: Pereira; Rogers; & Bezerra. (2010). New *Annulohypoxyton* Species from Brazil. *Mycologia*. 102(1): p. 249. และ Fournier; et al. (2010). The New Genus *Rostrohyoxyton* and Two New *Annulohypoxyton* Species from Northern Thailand. *Fungal Diversity*. 40: p. 31.

## 2.2 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Anamorph)

ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นระยะที่อาจพบได้เมื่อเลี้ยงรบนอาหารที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคสไลด์คัลเจอร์ (slide culture) ซึ่งในราสกุล *Annulohyphoxylon* มีรายงานว่าพบลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 3 แบบ คือ *Virgariella*-like, *Nodulisporium*-like และ *Periconiella*-like ในขณะที่ราสกุล *Hypoxyylon* มีรายงานว่าพบลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 4 แบบ คือ มีลักษณะของ *Sporothrix*-like เพิ่มเข้ามา (แสดงดังภาพประกอบ 4) การศึกษา ลักษณะ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จะสังเกตลักษณะของการแตกกิ่งก้านของ โคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) และการเกิดโคนิเดีย (conidia) นอกจากนี้รูปร่าง สี และขนาดของโคนิเดีย ก็มีความสำคัญในการจัดจำแนกชนิด (Ju; & Rogers. 1996: 1-365)



ภาพประกอบ 4 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบต่างๆ ที่พบในราสกุล *Annulohyphoxylon* (A-B) *Sporothrix*-like (C-E) *Virgariella*-like (F-H) *Nodulisporium*-like และ (I-L) *Periconiella*-like; (AB = additional branch(es); AS = additional subordinate branch(es); CC = conidiogenous cell(s); CR = conidiogenous region(s); CS = conidiogenous structure(s); MA = main axis; MB = major branch(es))

ที่มา: Ju; & Rogers. (1996). A Revision of the Genus *Hypoxyylon*. *Mycologia Memoir*.

ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบต่างๆ ที่พบในราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้แก่

### 2.2.1 *Virgariella*-like

ลักษณะของการแตกกิ่งก้านของ โคนิดีโอฟอร์ เป็นแบบไม่มีก้าน หรือแตกออกที่ ละ 2 กิ่ง (dichotomously branched) ซึ่งบางครั้งอาจแตกได้มากกว่า เนื่องจากการแตกกิ่งก้านแบบ *Virgariella*-like นี้ไม่จำเป็นที่จะต้องแตกมาจาก main axis แต่มีการแตกกิ่งเพิ่มมาจาก main branch ทำให้มีการต่อปลายจาก conidiogenous region(s) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยแต่ละปลายจะมี เซลล์โคนิดีโอจีเนส 1 หรือ 2 เซลล์ (conidiogenous cells) ลักษณะนี้พบได้ในรา *Annulohyphoxylon cohaerens*, *A. minutellum* และ *A. multiforme* นอกจากนี้ยังพบได้ใน ราสกุล *Hyphoxylon* ได้แก่ *Hyphoxylon fuscum*, *H. macrocarpum*, *H. monticulosum*, *H. notatum*, *H. perforatum*, *H. rutilum*, *H. submonticulosum* และ *H. rugodes*

### 2.2.2 *Nodulisporium*-like

ลักษณะของการแตกกิ่งก้านของ โคนิดีโอฟอร์ คล้ายกับแบบ *Virgariella*-like แต่ จะมีความซับซ้อนมากกว่า โดยมีลักษณะคล้ายพุ่มไม้ (bushy structure) โดยแต่ละปลายจะมีเซลล์ โคนิดีโอจีเนส จำนวน 2 – 3 เซลล์ หรือมากกว่า ลักษณะนี้พบได้ใน รา *Annulohyphoxylon annulatum*, *A. atroroseum*, *A. bahnphadengense*, *A. bovei* var. *microspore* และ *A. truncatum* นอกจากนี้ยังพบได้ใน ราสกุล *Hyphoxylon* ได้แก่ *Hyphoxylon fendleri*, *H. fragiforme*, *H. rickii*, *H. rubiginosum* และ *H. subrutilum*

### 2.2.3 *Periconiella*-like

การแตกกิ่งก้านของ โคนิดีโอฟอร์ แบบนี้ ประกอบด้วย main axis และ major branch อย่างน้อย 1 กิ่ง ในแต่ละกิ่งบริเวณปลายจะมีเซลล์โคนิดีโอจีเนส จำนวน 3 – 4 เซลล์ นอกจากนี้ยังมีการแตกกิ่งย่อย (additional subordinate branches) เพิ่มเติมจากบริเวณ major branch ทำให้มีกิ่งก้านและมี conidiogenous region(s) มากกว่าแบบอื่น ลักษณะนี้พบได้ใน รา *Annulohyphoxylon leptascum*, *A. stygium* และ *A. stygium* var. *annulatum* นอกจากนี้ยังพบได้ใน ราสกุล *Hyphoxylon* ได้แก่ *Hyphoxylon investiens*, *H. jecorinum* และ *H. haematostroma*

ซึ่งความสัมพันธ์ของชนิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่พบในราสกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดต่างๆ ที่มีรายงาน (Ju; & Rogers. 1996: 1-365; Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865; Fournier; et al. 2010: 23-36) แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 ความสัมพันธ์ของราสกุล *Annulohypoxyton* กับชนิดของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ชนิด	การสืบพันธุ์แบบ ไม่อาศัยเพศ
<i>Annulohypoxyton annulatum</i> (Schwein.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyton apiahynum</i> (Speg.) Hladki & A.I. Romero	-
<i>Annulohypoxyton archeri</i> (Berk.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton atrorseum</i> (J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyton austrobahiense</i> Jad. Pereira, J.D. Rogers & J.L. Bezerra	-
<i>Annulohypoxyton bahnphadengense</i> J. Fourn. & M. Stadler	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyton bovei</i> (Speg.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton bovei</i> var. <i>microspora</i> (J.H. Miller) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyton cohaerens</i> (Pers.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Virgariella</i> -like
<i>Annulohypoxyton discophorum</i> (Penz. & Sacc.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton elevatidiscus</i> (Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh)	-
<i>Annulohypoxyton gombakense</i> (M.A. Whalley, Y.-M. Ju, J.D. Rogers & A.J.S. Whalley) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton hemicarpum</i> Jad. Pereira, J.D. Rogers & J.L. Bezerra	-
<i>Annulohypoxyton hians</i> (Berk. & Cooke) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton ilanense</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton leptascum</i> (Speg.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Periconiella</i> -like
<i>Annulohypoxyton leptascum</i> var. <i>macrosporum</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton leucadendri</i> Marinc., M.J. Wingf. & Crous	-
<i>Annulohypoxyton macrodiscum</i> Jad. Pereira, J.D. Rogers & J.L. Bezerra	-
<i>Annulohypoxyton maeteangense</i> J. Fourn. & M. Stadler	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyton michelianum</i> (Ces. & De Not.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton microcarpum</i> (Penz. & Sacc.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton minutellum</i> (Syd. & P. Syd.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyton moriforme</i> (Henn.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyton moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyton multiforme</i> (Fr.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Virgariella</i> -like
<i>Annulohypoxyton multiforme</i> var. <i>alaskense</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-

หมายเหตุ: - หมายถึง ยังไม่มีการรายงาน

## ตาราง 3 (ต่อ)

ชนิด	การสืบพันธุ์แบบ ไม่อาศัยเพศ
<i>Annulohypoxyylon nitens</i> (Ces.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyylon nothofagi</i> (Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh)	-
<i>Annulohypoxyylon pouceanum</i> (Berk. & Cooke) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyylon pseudostipitatum</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyylon purpureonitens</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyylon purpureopigmentum</i> Jad. Pereira, J.D. Rogers & J.L. Bezerra	-
<i>Annulohypoxyylon pyriforme</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyylon squamulosum</i> (Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh)	-
<i>Annulohypoxyylon stygium</i> (Le'v.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Periconiella</i> -like
<i>Annulohypoxyylon stygium</i> var. <i>annulatum</i> (Rehm) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Periconiella</i> -like
<i>Annulohypoxyylon subeffusum</i> (Speg.) Hladki & A.I. Romero	-
<i>Annulohypoxyylon thouarsianum</i> (Lév.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyylon thouarsianum</i> var. <i>macrosporum</i> (San Martín, Y.-M. Ju, & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-
<i>Annulohypoxyylon truncatum</i> (Schwein.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Nodulisporium</i> -like
<i>Annulohypoxyylon urceolatum</i> (Rehm) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	-

หมายเหตุ: - หมายถึง ยังไม่มีการรายงาน

ที่มา: Ju; & Rogers. (1996). A Revision of the Genus *Hypoxyylon*. *Mycologia Memoir*. 20: pp. 1-365; Hsieh; Ju; & Rogers. (2005). Molecular Phylogeny of *Hypoxyylon* and Closely Related Genera. *Mycologia*. 97(4): pp. 844-865 และ Fournier; et al. (2010). The New Genus *Rostroxyylon* and Two New *Annulohypoxyylon* Species from Northern Thailand. *Fungal Diversity*. 40: pp. 23-36.



### 3. บทบาทที่สำคัญของราสกุล *Annulohyphoxylon*

บทบาทหลักของราสกุลนี้คือเป็นผู้ย่อยสลายเศษซากพืชในธรรมชาติ ซึ่งก่อให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศ บางชนิดพบว่าสามารถเจริญอยู่ภายในเซลล์ของพืชได้โดยไม่ก่อโรคให้กับพืช เรียกว่า เอนโดไฟท์ บางชนิดผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ในขณะที่บางชนิดอาศัยอยู่กับพืชและก่อโรคให้กับพืชเรียกว่า ราโรคพืช ซึ่งในแต่ละบทบาทที่กล่าวมานั้นมีลักษณะดังนี้ (Whalley. 1996: 897-922; Rogers. 2000: 1412-1420)

#### 3.1 ราย่อยสลายไม้ในธรรมชาติ (Wood decay fungi)

ราสกุลนี้จะอาศัยอยู่ในเนื้อไม้หรือตามส่วนต่างๆ ของต้นไม้ที่ตายแล้ว โดยปรากฏอยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีความสำคัญคือ สามารถผลิตเอนไซม์ ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของพืชได้ (Sutherland; & Crawford. 1981: 335-337) ในปี ค.ศ. 1989 แอบบี่ (Abe. 1989: 169-181) ได้ศึกษาการย่อยสลายไม้ของราบางชนิดในวงศ์ Xylariaceae และวงศ์ Diatrypaceae และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อย พบว่ารา *Hypoxyylon howeianum* Peck. สามารถย่อยสลายลิกนินในไม้ โอ๊กได้ร้อยละ 27 – 37 และทำให้ น้ำหนักของไม้หายไปร้อยละ 35 – 51 ภายใน 6 เดือน จากผลการศึกษาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าราในวงศ์ Xylariaceae เช่น *Xylaria* และ *Hypoxyylon* เป็นราย่อยสลายไม้ (wood decay fungi) ความสามารถในการย่อยสลายขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของไม้ ความชื้น และชนิดของรา เป็นต้น

เหวย์ และคนอื่นๆ (Wei; et al. 1992: 141-146) ได้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของราสกุล *Hypoxyylon* และ *Xylaria* บางชนิด พบว่า *H. stygium* (synonym ของ *Annulohyphoxylon stygium*) สามารถผลิตเอนไซม์ เบต้ากลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) ได้ดีที่สุด ในขณะที่ *X. anisopleura* และ *X. regalis* สามารถผลิตเอนไซม์ เอนโดเซลลูเลส (endocellulase (CMCase)) และ เอกโซเซลลูเลส (exocellulase (avicelase)) ได้ดีที่สุด

ศรีกิติกุลชัย (Srikitikulchai. 1999: 1-102) ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส โดย ราในวงศ์ Xylariaceae ได้แก่ *Daldinia*, *Hypoxyylon*, *Kretzschmaria* และ *Xylaria* จำนวน 12 สายพันธุ์ โดยการตรวจสอบเบื้องต้นบนอาหารแข็งที่มีเซลลูโลสและไซแลนเป็นสับสเตรท พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนได้ ส่วนเอนไซม์ที่่อยสลายลิกนินนั้นทำการศึกษาใน 2 สับสเตรท คือ กรดแทนนิก (tannic acid) และ สี Poly R-478 พบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถย่อยสลายกรดแทนนิกได้ ส่วนสี Poly R-478 พบว่ามีเพียง *Xylaria* sp. 830 เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายได้ เมื่อนำไปหาประสิทธิภาพของราในการผลิตเอนไซม์ พบว่า ทั้ง 12 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และไซแลนเนส (xylanase) ได้ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาวามสามารถในการย่อยสลายไม้ของรา โดยทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการกับไม้ในสกุลลำพู (*Sonneratia* sp.) และไม้รังกะแท้ (*Kandelia candel*) พบว่าราสามารถย่อยสลายไม้ ลำพูได้ร้อยละ 7.4-27.7 ในระยะเวลา 2 เดือน ส่วนไม้รังกะแท้ ถูกย่อยได้

ร้อยละ 6.2-30.2 ในระยะเวลา 3 เดือน และในสภาวะที่ไม่มีมีความชื้นสูงจะถูกย่อยสลายได้ดีกว่า ส่วนความสามารถในการย่อยสลายไม้ใน สภาวะธรรมชาติ ได้ทำการศึกษาที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ โดยการเลี้ยงรา 2 สายพันธุ์ คือ *Xylaria* sp. 870 และ 830 บนเมล็ดและท่อนไม้ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำไปเลี้ยง ต่อที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่เป็นเวลา 2, 4 และ 6 เดือน พบว่า *Xylaria* sp. 870 สามารถย่อยสลายเมล็ดได้ ร้อยละ 9, 15 และ 21 และสามารถย่อยสลายท่อนไม้ได้ร้อยละ 16, 27 และ 28 ตามลำดับ ส่วน *Xylaria* sp. 830 สามารถย่อยสลายเมล็ดได้ ร้อยละ 15, 22 และ 28 และสามารถย่อยสลายท่อนไม้ได้ร้อยละ 19, 30 และ 33 ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2003 พ้อยท์ดิงท์, ปารันกัว และไฮด์ (Pointing; Parungao; & Hyde. 2003: 231-235) ศึกษาเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้โดย คัดเลือกรวมบางชนิดในวงศ์ Xylariaceae มาทดสอบพบว่า ราในสกุล *Biscogniauxia*, *Hypoxylon* และ *Xylaria* มีประสิทธิภาพดี ในการย่อยสลายลิกนิน ตัวอย่างเชื้อเช่น *H. bovei* var. *microspora* และ *H. nitens* (synonym ของ *Annulohypoxylon bovei* var. *microspora* และ *A. nitens* ตามลำดับ) เป็นต้น ซึ่งทำให้น้ำหนักของ ไม้ลดลงเฉลี่ยประมาณ ร้อยละ 20 ทั้งนี้ชนิดของเอนไซม์ที่ เชื้อผลิตได้คือ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase), เซลลูเลส และ ไซเลนเนส

และในปี ค.ศ. 2007 ชัวแมชเชอร์ และคนอื่นๆ (Schumacher; et al. 2007: 179-186) ได้ศึกษาการย่อยสลายไม้ต้นบีช (*Fagus sylvatica* L.) ของรา *Annulohypoxylon cohaerens* โดยทดสอบกับส่วนกระพี้ (sapwood) และแก่นไม้ (heartwood) พบว่า หลังจาก 50 วัน สามารถลด น้ำหนักของส่วนกระพี้ และแก่นไม้ ได้ร้อยละ 2.6 และ 2.1 ตามลำดับ เมื่อครบ 100 วันพบว่า สามารถลดน้ำหนักได้มากขึ้นเท่ากับร้อยละ 4.2 และ 3.3 ตามลำดับ

### 3.2 ราโรคพืช (Phytopathogen)

ราในวงศ์ Xylariaceae บางชนิดมีรายงานว่า เป็นราโรคพืช ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก ตัวอย่าง เช่น โรคแคงเกอร์ (canker disease) ที่เกิดจากรา *Hypoxylon mammatum* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคโดยเฉพาะกับพืชในกลุ่ม aspen ในอเมริกาเหนือ และยุโรป โดยพบว่ารามีส่วนทำให้ต้น aspen ตายเฉลี่ยร้อยละ 1-2 ต่อปี สูญเสียมูลค่าทาง เศรษฐกิจประมาณ 4.4 ล้านดอลลาร์ (Povah. 1942: 140-145; Marty. 1972: 21-26; Manion; & Griffin. 1986: 803-808) นอกจากนี้ยังพบว่า *H. mammatum* สามารถผลิตสารพิษในพืช (phytotoxin) ที่มีส่วนในการทำให้พืชตาย โดยในปี ค.ศ. 1964 ฮับเบส (Hubbes. 1964: 1489-1494) ศึกษาสารพิษที่แยกได้จาก *H. mammatum* พบว่า สารพิษที่ได้คือ mammatoxin ต่อมา โบโดและคนอื่นๆ (Bodo; et al. 1987: 2355-2358) ได้ทำการศึกษาจากการเพาะเลี้ยง รา *H. mammatum* ในอาหารเหลว เพื่อตรวจสอบสารพิษและหาโครงสร้างทางเคมี พบว่า สารพิษที่ได้คือ สารในกลุ่ม diterpene (hymatotoxin) ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ momilactones ซึ่งแยกได้จากข้าว (*Oryza sativa* cv. Koshihikan) มีส่วนในการยับยั้งการเจริญของรากข้าวและเมล็ดผักกาดหอม

(Kato; et al. 1973: 3861-3864; Kato; et al. 1977: 45-48) ตัวอย่างของราสกุล *Annulohypoxyton* และสกุลใกล้เคียงอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์กับชนิดพืชอาศัยแสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 ตัวอย่างของราสกุล *Annulohypoxyton* และสกุลใกล้เคียงอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์กับชนิดพืชอาศัย

ชนิดของรา	ชนิดของพืช
<i>Annulohypoxyton thouarsianum</i> (Lév.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Quercus</i>
<i>A. truncatum</i> (Schwein.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Quercus</i>
<i>Biscogniauxia atropunctata</i> (Schwein.) Pouzar	<i>Quercus</i>
<i>B. mediterranea</i> (De Not.) Kuntze	<i>Quercus</i>
<i>B. nummularia</i> (Bull.: Fr.) Kuntze	<i>Fagus</i>
<i>Camillea punctulata</i> (Berk. & Rav.) Læssøe, J. D. Rogers & Whalley	<i>Quercus</i>
<i>C. tinctor</i> (Berk.) Læssøe, J. D. Rogers & Whalley	<i>Acer</i> และ <i>Platanus</i>
<i>Hypoxyton mammatum</i> (Wahlenb.) J. H. Mill.	<i>Populus</i>
<i>H. rubiginosum</i> (Pers.: Fr.) Fr.	<i>Camellea</i>
<i>Xylaria arbuscula</i> Sacc.	<i>Macadamia</i>

ที่มา: Whalley. (1996). The Xylariaceous Way of Life. *Mycological Research*. 100(8): p. 908.

นอกจากนี้ยังพบว่ารา *Annulohypoxyton truncatum* และ *A. thouarsianum* var. *thouarsianum* เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคแคงเกอร์ ในไม้โอ๊ก (*Quercus variabilis*) (Whalley. 1996: 897-922; Cha; et al. 2012: 79-81) ในปี ค.ศ. 1983 กรมป่าไม้ในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานเกี่ยวกับการก่อโรคในไม้เนื้อแข็ง และพืชตระกูล โอ๊ก (*Quercus* spp.) ของรากกลุ่ม *Hypoxyton* โดยพบว่าสปีชีส์ที่ก่อโรคมากที่สุดคือ *Hypoxyton atropunctatum* และ *H. truncatum* (synonym ของ *Annulohypoxyton truncatum*) มีการเจริญอยู่บริเวณเปลือกไม้ที่ลำต้นของพืช ซึ่งมีลักษณะสโตรมาของ ราแตกต่างกัน เช่น สีเทา สีน้ำตาล หรือสีดำ ขึ้นอยู่กับระยะเวลา และชนิดของพืชอาศัย ขนาดและการแพร่กระจายพบว่า รา มีการกระจายจากจุดเล็กๆ ที่มีความยาวเพียงเซนติเมตรไปเป็นหน่วยเมตรได้ในเวลาไม่นาน (Barnard; & Dixon. 1983: 1-102)

แมคเฟอร์สัน และคนอื่นๆ (McPherson; et al. 2005: 71-89) ได้ศึกษาการตายของต้นโอ๊ก และต้นแทน โอ๊ก ในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า ลักษณะของต้น โอ๊ก (*Quercus agrifolia*) ที่แสดงอาการของ โรคจะสร้างสโตรมาของรา *Hypoxyton thouarsianum* (synonym ของ *Annulohypoxyton thouarsianum*) และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ถึง ค.ศ. 2003 สูงถึงร้อยละ 5.8–17.4

ชา และคนอื่นๆ (Cha; et al. 2012: 79-81) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีววิทยาโมเลกุล โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรากอโรคแคงเกอร์ ที่พบบริเวณเปลือกไม้ ต้นไม้ และกิ่งไม้ของต้นโอ๊ก (*Quercus variabilis* และ *Q. acutissima*) ที่เป็นโรคในประเทศเกาหลี จำนวน 31 ต้น ซึ่งมีรอยโรคขนาดต่างๆ ที่เฉลี่ยแล้ว ประมาณ  $48.5 \times 15.2$  ตารางเซนติเมตรจากผลการศึกษาพบว่าเป็นรา *Annulohypoxyton truncatum*

### 3.3 ราเอนโดไฟท์ (Endophytic fungi)

ราในกลุ่มนี้บางชนิดสามารถเจริญ อยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) ของลำต้น ก้านใบ ใบ และรากของพืชที่มีความสมบูรณ์ โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใดๆ กับพืชอาศัย (Petriani. 1991: 179-197) จากการศึกษากว่า 20 ปีที่ผ่านมา พบว่า มีจำนวนของราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชทั่วไปอย่างกว้างขวาง ซึ่งเนื้อเยื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟท์ยังสามารถทำงานได้อย่างปกติ เนื่องจากราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่กับพืชในภาวะเกื้อกูล (mutuality) (Petriani; & Petriani. 1985: 216-234; Whalley. 1993: 103-119) การศึกษาในปี ค.ศ. 1988 ชาเปร์ล่าและบ็อดดี้ (Chapela; & Boddy. 1988: 47-57) และปี ค.ศ. 1989 ชาเปร์ล่า (Chapela. 1989: 65-75) ได้มีการรายงาน พบ ราในวงศ์ Xylariaceae ที่แยกได้จากพืช *Fagus grandifolia* Ehrh. และ *Populus tremuloides* มากถึงร้อยละ 32 และ 41 ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของรา ที่อาศัยอยู่กับพืช ในธรรมชาติ พบว่า ราที่พบอาศัยอยู่ในพืช *F. grandifolia* คือ *Hypoxyton fragiforme* ส่วนในพืช *P. tremuloides* คือ *H. mammatum* นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างของราเอนโดไฟท์ในสกุล *Annulohypoxyton* และสกุลใกล้เคียงอื่นๆ แสดงดังตาราง 5

ตาราง 5 ตัวอย่างของราสกุล *Annulohypoxyton* และสกุลใกล้เคียงอื่นๆ ที่มีรายงานว่าเป็นเอนโดไฟท์

ชนิดของรา	ชนิดของพืช	เอกสารอ้างอิง
<i>Annulohypoxyton cohaerens</i> (Pers.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Fagus</i>	Whalley. 1996: 913
<i>A. minutellum</i> (Syd. & P. Syd.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	<i>Quercus</i>	Whalley. 1996: 913
<i>Hypoxyton</i> sp.	<i>Persia</i>	Tomcheck; et al. 2010: 903-914
<i>H. fragiforme</i> (Pers.: Fr.) J. Kickx	<i>Fagus</i>	Chapela. 1989: 65-75
<i>H. frarinophilum</i> Pouzar	<i>Fraxinus</i>	Whalley. 1996: 913
<i>H. mammatum</i> (Wahlenb.) J.H. Mill	<i>Populus</i>	Chapela. 1989: 65-75
<i>H. rutilum</i> Tul. & C.Tul.	<i>Fagus</i>	Whalley. 1996: 913
<i>H. vogesiacum</i> var. <i>macrospora</i> J. H. Mill.	<i>Salix</i>	Whalley. 1996: 913

ในปี ค.ศ. 2010 ทอมเช็ค และคนอื่นๆ (Tomcheck; et al. 2010: 903-914) ได้ศึกษาราเอนโดไฟท์ของพืช *Persia indica* โดยอาศัยการจัดจำแนกทางลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราด (SEM) และการวิเคราะห์ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA เทียบกับลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ พบว่า ราเชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม *Hypoxyton* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าราสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds, VOCs) ที่น่าสนใจคือ 1,8-cineole, 1-methyl-1,4-cyclohexadiene และสารที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อีกจำนวนมาก

ต่อมาเชน และคนอื่นๆ (Chen; et al. 2011: 495-503) ได้ศึกษาราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากลำต้น ใบ และรากของพืชสมุนไพร *Huperzia serrata* ในประเทศจีน โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ของราทั้งหมด 52 ไอโซเลท รวมทั้งสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ จากผลการวิเคราะห์พบว่าสามารถจำแนกรได้ในระดับสกุลได้ดังนี้ *Glomerella* (*Collectotrichum*), *Hypocrea* (*Trichoderma*), *Pleurostoma*, *Chaetomium*, *Coniochaeta* (*Lecythophora*), *Daldinia*, *Xylaria*, *Hypoxyton*, *Nodulisporium*, *Cazia* และ *Phellinus* ซึ่งสกุลที่พบมากที่สุดคือ *Glomerella* (*Collectotrichum*) พบ 21 ไอโซเลท คิดเป็น ร้อยละ 42.3 จากราที่แยกได้ทั้งหมด รองลงมาคือ *Hypoxyton* พบ 10 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 19.2 ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2013 ไลท์ และคนอื่นๆ (Leite; et al. 2013: 56-69) ได้ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ ในใบกล้วย 2 สายพันธุ์ (Monsoy และ Conquista) โดยทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ของราทั้งหมด 62 ชนิด จากผลการศึกษา พบราในไฟลัม Ascomycota เป็นราเด่นในสายพันธุ์ Monsoy และ Conquista มากถึงร้อยละ 99 และ 95.2 ตามลำดับ ในขณะที่ราในไฟลัม Basidiomycota เพียงร้อยละ 1 และ 4.8 ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้ได้พบ ราเอนโดไฟท์ หลายชนิดในกล้วยเป็นครั้งแรก ดังนี้ *Ampelomyces*, *Annulohypoxyton*, *Guignardia*, *Leptospora*, *Magnaporthe*, *Ophiognomonina*, *Paraconiothyrium*, *Phaeosphaeriopsis*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* และ *Xylaria* ซึ่งราในสกุล *Annulohypoxyton* ที่พบได้แก่ *A. stygium* เป็นต้น

#### 4. การศึกษาสารเมแทบอลิต์ของราสกุล *Annulohypoxyton* และสกุลใกล้เคียง

การศึกษาสารเมแทบอลิต์ ในราสกุลต่างๆ ของวงศ์ Xylariaceae รวมทั้งในสกุล *Annulohypoxyton* นั้น มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นรา ชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ ประกอบกับสโตรมาของ รากบางชนิดมีสีซึ่งง่ายต่อการสกัด อีกทั้งที่พบในแต่ละชนิดของรานั้นมีความแตกต่างกัน การศึกษาสารเมแทบอลิต์ของรากลุ่มนี้พบว่า มีการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1961 (Miller. 1961: 1-158) ซึ่งมีรายงานมากกว่า 100 ชนิด จากราววงศ์ Xylariaceae สารบางชนิดเหล่านี้สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิด ของราได้ ในขณะที่สารบางชนิดเป็นสารออกฤทธิ์

ทางชีวภาพ และบางชนิดเป็นสารชนิดใหม่ (Stadler; et al. 2001: 1191-1205; Stadler; Ju; & Rogers. 2004: 239-256)

#### 4.1 การศึกษาสีของสโตรมา (Stromatal pigments)

เม็ดสีของสโตรมาในระยะที่ ราเจริญเต็มที่ หรือแกรนูลที่ผิวของสโตรมา สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10% เกิดสีได้หลายสี ซึ่งนำมาใช้ในการจำแนกรายางชนิดได้ เช่น *Annulohyphoxylon nitens* กับ *A. purpureonitens* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก ได้แก่ ลักษณะของสโตรมา และ ขนาด สี รูปร่างของแอสโคสปอร์ แต่การเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย KOH 10% ให้สีที่แตกต่างกัน คือ สีเขียวมะกอก (olivaceous) และสีม่วง (vinaceous purple) ตามลำดับ (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) ในปี ค.ศ. 1970 กรีนฮอลล์ และวัลเลย์ (Greenhalgh; & Whalley. 1970: 89-96) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของสารสีบริเวณสโตรมาของรา *Hypoxylon* ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) โดยสกัดสารสีจากบริเวณสโตรมาของราด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จากการศึกษาพบว่า สารสกัดที่แยกได้จาก ราแต่ละชนิดนั้น ให้แถบแบนบนแผ่น TLC ที่แตกต่างกันออกไป อีกทั้งยังพบว่าชนิดของซับสเตรตที่ราอาศัยอยู่นั้น ส่งผลให้สีของแถบที่ได้ นั้นมีความเข้มแตกต่างกันอีกด้วย อาจเป็นเพราะสาร เคมีที่มีอยู่ตามธรรมชาติของซับสเตรตแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ต่อมา สเตงลิช คาร์ และเฟอร์ทเนอร์ (Steglich; Klarr; & Furtner. 1974: 2874-2875) ศึกษาสารประกอบชนิดแรก ที่สกัดได้จากสโตรมาของ *H. fragiforme* คือ mitorubins ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาสารสกัดจากสโตรมาของราสกุล *Hypoxylon* และสกุลอื่นๆ ในวงศ์ Xylariaceae เพิ่มมากขึ้น

ในงานวิจัยของ แอนโทนี่ วัลเลย์ และมาร์กเรต วัลเลย์ (Whalley; & Whalley. 1977: 99-103) ได้สกัดสีจากสโตรมาของราสกุล *Hypoxylon* ด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตท และศึกษาการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบว่า สามารถจัดกลุ่มราสกุล *Hypoxylon* ได้หลายชนิด แต่ในกลุ่มสปิซีส์ที่ซับซ้อน เช่น *H. rubiginosum* ที่พบในยุโรปไม่สามารถจำแนกได้ นอกจากนี้รา *H. stygium* (synonym ของ *Annulohyphoxylon stygium*) และ *H. michelianum* พบว่าไม่เกิดสี ซึ่งอาจเกิดจากระยะการเจริญสโตรมาของตัวอย่างที่ศึกษา ทั้งนี้จากการศึกษาของ เอ็ดเวิร์ด และคนอื่นๆ (Edward; et al. 1991: 1009-1010) พบสารสีเขียว (green pigments) ในเส้นใยของรา *H. fragiforme* และ *H. howeianum* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร แข็ง malt extract เมื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าวโดยให้ชื่อสารชนิดนี้ ว่า hypoxyxylone เป็นต้น นอกจากนี้ จู และโรเจอร์ส (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) ยังพบว่า เมื่อทำการตัดบริเวณสโตรมาของราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* แล้วทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% ราแต่ละชนิดจะให้สารสีที่แตกต่างกันแสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 ชนิดของสารสีที่พบในราสกุล *Annulohyphoxylon* ซึ่งได้จากบริเวณสโตรมาเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10%

สีที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ KOH 10%	ชนิดของรา	เอกสารอ้างอิง
greenish olivaceous (90)	<i>A. annulatum</i> , <i>A. archeri</i> , <i>A. atroseum</i> , <i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> , <i>A. cohaerens</i> , <i>A. discophorum</i> , <i>A. leptascum</i> , <i>A. leptascum</i> var. <i>macrosporum</i> , <i>A. moriforme</i> , <i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> , <i>A. multiforme</i> , <i>A. multiforme</i> var. <i>alaskense</i> , <i>A. nitens</i> , <i>A. nothofagi</i> , <i>A. pouceanum</i> , <i>A. stygium</i> , <i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> , <i>A. truncatum</i>	Ju; & Rogers. 1996: 203-232; Thienhirun. 1997: 124-204
olivaceous (48)	<i>A. multiforme</i> , <i>A. multiforme</i> var. <i>alaskense</i> , <i>A. pouceanum</i>	Ju; & Rogers. 1996: 203-232
dull green (70)	<i>A. macrodiscum</i> , <i>A. maeteangense</i> , <i>A. microcarpum</i> , <i>A. pyriforme</i> , <i>A. thoursianum</i> , <i>A. thoursianum</i> var. <i>macrosporum</i>	Ju; & Rogers. 1996: 215, 224, 227; Fournier; et al. 2010: 32; Pereira; et al. 2010: 250
vinaceous purple (101)	<i>A. purpureonitens</i> , <i>A. purpureopigmentum</i> , <i>A. urceolatum</i>	Ju; & Rogers. 1996: 224, 232; Pereira; et al. 2010: 250
red orange (7)	<i>A. gombakense</i> , <i>A. ilanense</i>	Hsieh; et al. 2005: 844-865
dilute isabelline (65)	<i>A. bahnphadengense</i> , <i>A. cohaerens</i>	Fournier; et al. 2010: 30; Ju; & Rogers. 1996: 209
livid red (56) และ vinaceous (57)	<i>A. minutellum</i>	Ju; & Rogers. 1996: 211
vinaceous gray (116)	<i>A. hemicarpum</i>	Pereira; et al. 2010: 250
citrine green (67)	<i>A. michelianum</i>	Ju; & Rogers. 1996: 214
ไม่มีสี	<i>A. austrobahiense</i> , <i>A. bovei</i> , <i>A. hians</i> , <i>A. pseudostipitatum</i>	Ju; & Rogers. 1996: 203-232; Pereira; et al. 2010: 248

หมายเหตุ: ในวงเล็บคือ หมายเลขสีเมื่อเทียบกับแผ่น สีมาตรฐาน ของ Rayner. (1970). (ภาคผนวก จ)

## 4.2 การศึกษาสารเมแทบอลิต์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

วัลเลย์ และเอ็ดเวิร์ด (Whalley; & Edwards. 1995: S802-810) ได้ศึกษาสารเมแทบอลิต์ของราสกุลต่างๆ ในวงศ์ Xylariaceae และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของ รากับชนิดของสารเคมี ซึ่งสารเคมีส่วนใหญ่ของ ราในกลุ่ม Hypoxyloideae (*Annulohyphoxylon*, *Hypoxyton* และสกุลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง หรือมี การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แบบ *Nodulisporium*-like พบว่าเป็นสารในกลุ่มพอลิคีไทด์ (polyketides) ซึ่งสังเคราะห์มาจากเอนไซม์ในกลุ่มพอลิคีไทด์ซินเทส (polyketide syntases) งานวิจัยของ สเตดเลอร์ และฟัวร์เนียร์ (Stadler; & Fournier. 2006: 160-170) พบรูปแบบทางเคมี (chemotype) ของการตรวจพบสาร และไม่พบสารบางชนิดในส่ว วนสโตรมาของราอีกด้วย (แสดงดัง ตาราง 7) ซึ่งสนับสนุนความสัมพันธ์ ซึ่งเคมีระหว่างสกุลต่างๆ ของ ราในกลุ่ม Hypoxyloideae

ตาราง 7 ชนิดของสารที่ตรวจพบจาก ราในกลุ่ม Hypoxyloideae ที่ได้จากการศึกษาด้วย เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

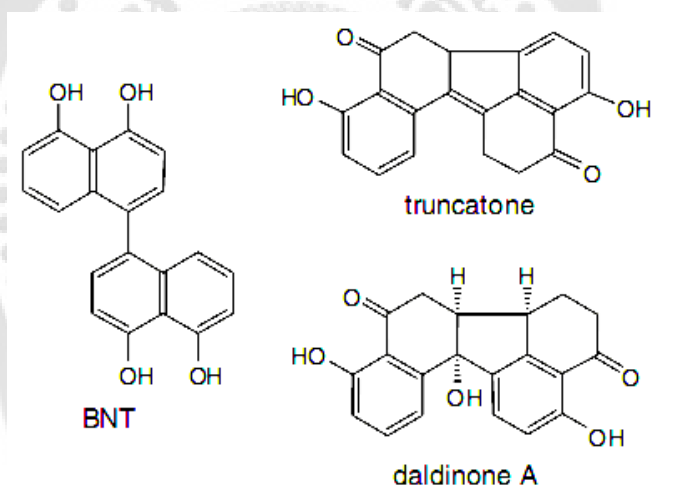
รูปแบบทางเคมี (Chemotype)	ชนิดของสารทุติยภูมิหลัก (Typical major secondary metabolites)	สกุลและสปีชีส์ของรา (Genera, species)
A	Azaphilones of the mitoburin family: mitoburin, mitorubrinol, hypomiltin, rubiginosin C, rutilin และ orsellic acid	<i>Hypoxyton</i> ( <i>H. rubiginosum</i> , <i>H. fragiforme</i> , <i>H. perforatum</i> ), <i>Entonaema</i> , <i>Pyrenomyxa</i>
B	Azaphilones of the daldinin family: daldinin C, daldinin E & F และ daldinin A	<i>Hypoxyton</i> ( <i>H. fuscum</i> , <i>H.</i> <i>anthochroum</i> , <i>H. macrosporom</i> ), <i>Daldinia</i> , <i>Phylacia</i>
C	Naphthalenes: binaphthalene (BNT) และ daldinone A	<i>Hypoxyton</i> ( <i>H. monticulosum</i> , <i>H. invesnitens</i> ), <i>Annulohyphoxylon</i> , <i>Daldinia</i>

ที่มา: Stadler; & Fournier. (2006). Pigment Chemistry, Taxonomy and Phylogeny of the Hypoxyloideae (Xylariaceae). *Revista Iberoamericana de Micologia*. 23: pp. 160-170.



ควาง และคนอื่นๆ (Quang; et al. 2005: 797-809) ได้ค้นพบสารเมแทบอลิต์ที่สำคัญจากรา *Annulohypoxyton cohaerens* โดยทำการสกัด สารจากบริเวณไฮดรอกซิลด้วย สารละลาย เมทานอล (methanol) และเปรียบเทียบกับราชชนิดอื่นๆ ในสกุล *Annulohypoxyton* ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ารา *A. cohaerens* สามารถผลิตสารชนิดใหม่ในกลุ่ม azaphilones มีชื่อว่า cohaerins A และ cohaerins B ส่วนสารเมแทบอลิต์ที่พบมากที่สุดในการสกัดจากราสกุล *Annulohypoxyton* คือ binaphthalene (BNT) ซึ่งสามารถพบได้ในทุกชนิดตัวอย่าง ทั้งนี้ชนิดของสารที่พบในราสกุล *Annulohypoxyton* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จากการทดลองแสดงดังตาราง 8

จากตาราง 8 จะแสดงให้เห็นว่าสารเมแทบอลิต์ของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่สกัดได้จากไฮดรอกซิล เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบสารสำคัญ 3 ชนิด คือ binaphthalene (BNT), truncatone และ daldinone A ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของฟอร์เนียร์ และคนอื่นๆ (Fournier; et al. 2010: 23-36) แสดงดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของสารเมแทบอลิต์ที่สกัดจากไฮดรอกซิลของราสกุล *Annulohypoxyton*

ที่มา: Fournier; et al. (2010). The New Genus *Rostrohyoxyton* and Two New *Annulohypoxyton* Species from Northern Thailand. *Fungal Diversity*. 40: p. 28.

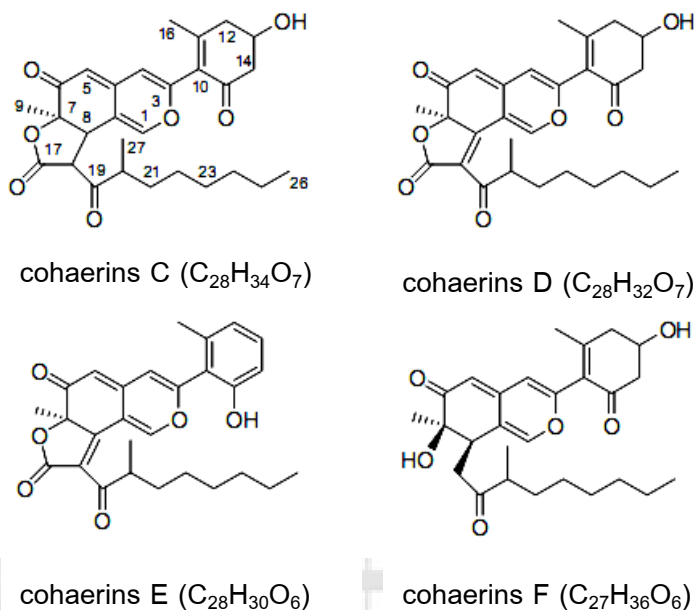
ตาราง 8 ตัวอย่าง สารเมแทบอลิต์ ของรา บางชนิด ในสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ชนิดของรา	สารเมแทบอลิต์			
	binaphthalene	cohaerins	daldinone A	truncatone
<i>Annulohyphoxylon annulatum</i>	+ / ++	-	-	++
<i>A. archeri</i>	+	-	-	-
<i>A. atroseum</i>	(+)	-	-	-
<i>A. bovei</i>	+	-	++	-
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i>	++	-	+	++
<i>A. cohaerens</i>	++	++	-	-
<i>A. gombakense</i>	(+)	-	-	-
<i>A. hians</i>	(+)	-	-	-
<i>A. ilanense</i>	++	-	-	-
<i>A. leptascum</i> var. <i>macrosporum</i>	++	-	-	-
<i>A. michelianum</i>	(+)	-	-	-
<i>A. minutellum</i>	+ / (+)	-	-	-
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	++	-	-	-
<i>A. multiforme</i>	++	-	-	-
<i>A. multiforme</i> var. <i>alaskense</i>	++	-	-	-
<i>A. nitens</i>	++	-	-	++
<i>A. nothofagi</i>	++	-	-	-
<i>A. pyriforme</i>	(+)	-	++	-
<i>A. purpureonitens</i>	++	-	-	-
<i>A. stygium</i>	(+) / +	-	+ / ++	(+) / ++
<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i>	+	-	++	(+)
<i>A. thoursianum</i>	++	-	-	++
<i>A. thoursianum</i> var. <i>macrosporum</i>	++	-	-	++
<i>A. truncatum</i> (BPI specimens)	+ / (+)	-	- / +	- / +
<i>A. cf truncatum</i> (La Reunion)	++	-	-	-
<i>A. urceolatum</i>	(+)	-	-	-

หมายเหตุ: กำหนดเครื่องหมายแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาร สกัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ดังนี้ (+) หมายถึงมีค่าน้อยกว่า 2%, เครื่องหมาย + หมายถึง มีค่า 5-10%, เครื่องหมาย ++ หมายถึง มีค่ามากกว่า 10% และเครื่องหมาย - หมายถึงไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้

ที่มา: Quang; et al. (2005). Cohaerins A and B, Azaphilones from the Fungus *Hypoxylon cohaerens*, and Comparison of HPLC-Based Metabolite Profiles in *Hypoxylon* sect. *Annulata*. *Phytochemistry*. 65: p. 801.

ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 ควาง และคนอื่นๆ (Quang; et al. 2006: 6349-6354) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากรา *A. cohaerens* อีกครั้ง ซึ่งในครั้งนี้นับว่าเราสามารถผลิตสารชนิดใหม่ในกลุ่ม azaphilones เพิ่มอีก 4 ชนิด คือ cohaerins C, D, E และ F (ภาพประกอบ 6) รวมทั้งสาร 4,5,4',5'- tetrahydroxy-1 และ 1'- binaphthyl

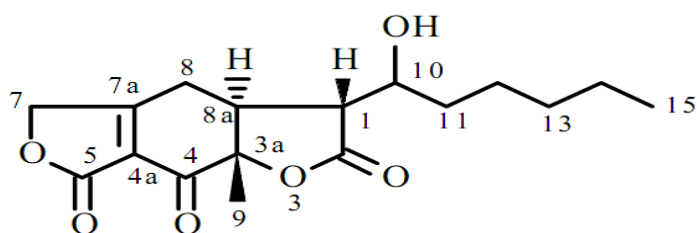


ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากรา *Annulohyphoxylon cohaerens*

ที่มา: Quang; et al. (2006). Cohaerins C-F, Four Azaphilones from the Xylariaceous Fungus *Annulohyphoxylon cohaerens*. *Tetrahedron*. 62: p. 6351.

ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลชีพ (antimicrobial activity) ของสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากสโตรมาของราเทียบกับสาร cohaerins A (Quang; et al. 2005: 797-809) และสาร multiformin B (Quang; et al. 2005: 1058-1062) ซึ่งได้จากการศึกษา ก่อนหน้านี้ โดยเทียบกับยาปฏิชีวนะ (penicillin G และ actinomycin D) ด้วยวิธี agar diffusion assay ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* และ เชื้อ *Yarrowia lipolytica* พบว่าสารเมแทบอลิต์ cohaerins C-F ซึ่งได้จากรา *A. cohaerens* STMA 05296 มีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพได้ดีกว่าสาร cohaerins A และ multiformin B ที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ และยังมีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพแบบไม่จำเพาะ (non-selective) ซึ่งต่างจากยาปฏิชีวนะมาตรฐาน ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดได้สูง แต่คุณสมบัติในการต้านจุลชีพจะมีความจำเพาะต่อเชื้อ ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

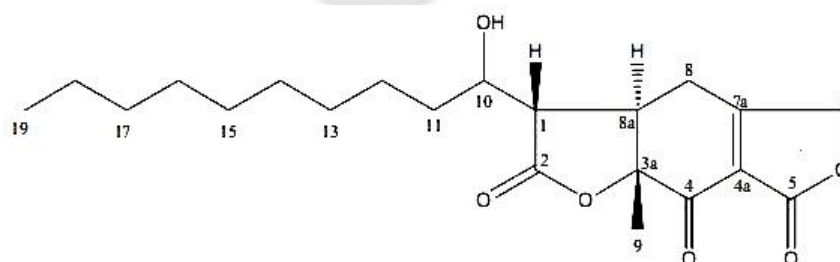
ปี ค.ศ. 2011 Cheng และคนอื่นๆ (Cheng; et al. 2011: 536-540) ได้ทำการศึกษาสารเมแทบอลิต์จากราเอนโดไฟท์ *Annulohyphoxylon bovei* var. *microspora* (BCRC 34012) ที่แยกได้จากข้าว (*Oryza sativa*) โดยการสกัดด้วย สารละลายเอทานอล (ethanol) เข้มข้น 95% และวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC พบว่าได้สารชนิดใหม่ ในกลุ่ม azaphilone ชื่อว่า annulohyphoxyboverin (แสดงดังภาพประกอบ 7) พร้อมด้วยสารอื่นๆ อีก 12 ชนิด



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างทางเคมีของสาร annulohyphoxyboverin ที่สกัดได้จากรา *Annulohyphoxylon bovei* var. *microspora* (BCRC 34012)

ที่มา: Cheng; et al. (2011). Secondary Metabolite from the Endophytic Fungus *Annulohyphoxylon bovei* var. *microspora* BCRC 34012. *Chemistry of Natural Compounds*. 47(4): p. 537.

ต่อมา Cheng และคนอื่นๆ (Cheng; et al. 2012: 219-223) ได้ทำการศึกษาสารเมแทบอลิต์จากราเอนโดไฟท์ *Annulohyphoxylon squamulosum* (BCRC 34022) ที่แยกได้จากเปลือกลำต้นของพืชสมุนไพร *Cinnamomum* sp. ทำการสกัดด้วย สารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% และวิเคราะห์ด้วยวิธีTLC เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้าพบว่าได้สารอนุพันธ์dihydrobenzofuran-2,4-dione ชนิดใหม่ ชื่อว่า annulosquamulin (ภาพประกอบ 8) พร้อมด้วยสารอื่นๆ อีก 10 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าสารเมแทบอลิต์บางชนิดที่ได้จากรานี้ มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอีกด้วย



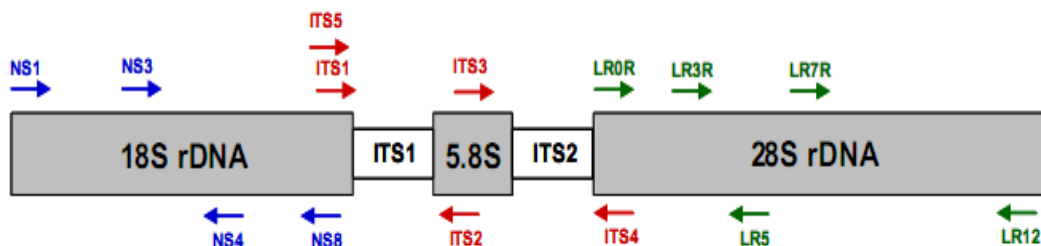
ภาพประกอบ 8 โครงสร้างทางเคมีของสาร annulosquamulin ที่สกัดได้จากรา *Annulohyphoxylon squamulosum* (BCRC 34022)

ที่มา: Cheng; et al. (2012). Secondary Metabolites and Cytotoxic Activities from the Endophytic Fungus *Annulohyphoxylon squamulosum*. *Phytochemistry Letters*. 5: p. 220.

## 5. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของราสกุล *Annulohyphoxylon* และสกุลใกล้เคียง

เนื่องจากการจัดจำแนกชนิดของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ตัวอย่างราที่ศึกษาต้องเป็นระยะที่เจริญเต็มที่ และเป็นตัวอย่างที่สมบูรณ์จึงจะสามารถศึกษาลักษณะต่างๆ ได้ครบถ้วน รวมทั้งตัวอย่างที่ศึกษาควรเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาระยะการสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งมีความสำคัญในการจำแนกชนิดที่มีความใกล้เคียงกันสูงออกจากกันได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีความหลากหลายของราสูง จึงยากต่อการจัดจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ ซึ่งในปัจจุบันเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้นำมาใช้อย่างกว้างขวาง และพบว่ามีประสิทธิภาพที่ดี สามารถใช้ช่วยในการจัดจำแนกชนิดราที่ยากต่อการระบุชนิด หรือชนิดที่ซับซ้อนได้ดี ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อการระบุชนิด เช่น บริเวณ ribosomal DNA (rDNA) และ internal transcribed spacers (ITS) รวมทั้งยีนของ alpha-actin, beta-tubulin, RNA polymerase I (RPB1) และ II (RPB2) และ elongation factor I (EF1) เป็นต้น (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865; Rehner; & Buckley. 2005: 84-98; Suwannasai; et al. 2005: 303-324; Triebel; et al. 2005: 25-43; Tang; Jeewon; & Hyde. 2007: 392-402; Spribille; Klug; & Mayrhofer. 2011: 603-614; Hansen; et al. 2013: 311-335)

บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกชนิดของรา และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เนื่องจากสามารถพบได้ในราทุกชนิด ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่ (แสดงดังภาพประกอบ 9) จะอยู่บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และมีขนาดแตกต่างกันในราแต่ละชนิดอยู่ในช่วงประมาณ 500 - 900 คู่เบส ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่ทราบถึงบทบาทหน้าที่ของบริเวณ ITS ที่มีต่อราแต่พบว่าเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรผันทางพันธุกรรม สูง เหมาะสำหรับการจัดจำแนกความแตกต่างของราในระดับสปีชีส์ (White; et al. 1990: 315-322; Baldwin; et al. 1995: 247-277) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณ ITS มีจำนวนซ้ำ (copy number) ของชุด ribosomal DNA สูง ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ โดยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จากตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย (Carbone; & Kohn. 1999: 553-556)



ภาพประกอบ 9 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ rDNA และ ITS

ที่มา: <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.html> (online)

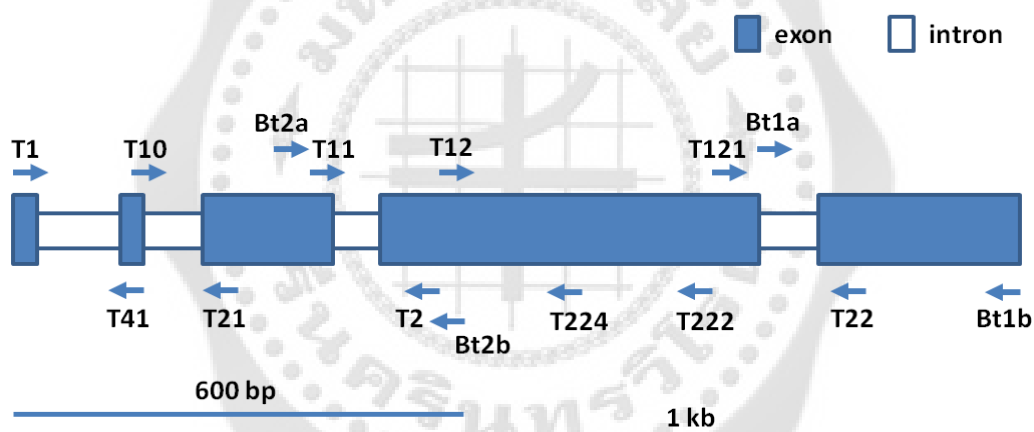
การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของราสกุล *Hypoxylon* เริ่มในปี ค.ศ. 2000 โดย ซานเชส และคนอื่นๆ (Sánchez-Ballesteros; et al. 2000: 964-977) ได้ศึกษาบริเวณ ITS ของราบางชนิดในสกุล *Biscogniauxia*, *Camillea*, *Creosphaeria*, *Hypoxylon*, *Kretzschmaria*, *Nemania* และ *Whalleya* ซึ่งเป็นราในวงศ์ Xylariaceae พบว่า ราชนิดต่างๆ ในสกุล *Hypoxylon* มีความสัมพันธ์กันแบบ monophyletic แต่พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ไม่สามารถแยกกลุ่มของราทั้งสอง sections ของ *Hypoxylon* (*Hypoxylon* sect. *Annulata* (*Annulohypoxylon*) และ *Hypoxylon* sect. *Hypoxylon*) ออกจากกันได้ แต่จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถแยกออกได้อย่างน้อย 2 กลุ่มใหญ่ที่มีลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศต่างกัน คือ (1) กลุ่มที่สร้างลักษณะการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบ *Nodulisporium* หรือ *Nodulisporium*-like anamorph และ (2) กลุ่มที่สร้างลักษณะการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบ *Geniculosporium* หรือ *Geniculosporium*-like anamorph

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ได้นำมาใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ของราอันดับ Xylariales โดย ทรีเบลและคนอื่นๆ (Triebel; et al. 2005: 25-43) พบว่า แผนภูมิเชิงวิวัฒนาการที่สร้างจาก บริเวณ ITS สามารถแบ่งกลุ่มของราอันดับ Xylariales ได้ตามวงศ์ต่างๆ ได้แก่ Amphisphaeriaceae, Apiosporaceae, Diatrypaceae, Hyponectriaceae และ Xylariaceae ซึ่งในวงศ์ Xylariaceae สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักตามลักษณะของ ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ (1) *Geniculosporium*-like anamorph ได้แก่ ราในสกุล *Entoleuca*, *Kretzschmaria*, *Nemania*, *Rosellinia* และ *Xylaria* (2) *Nodulisporium*-like anamorph ได้แก่ ราในสกุล *Biscogniauxia* และ *Camillea* และกลุ่ม (3) *Nodulisporium*-like anamorph ที่ประกอบด้วยราในสกุล *Daldinia*, *Entonaema* และ *Hypoxylon* (sect. *Hypoxylon* และ sect. *Annulata*)

ต่อมา สุวรรณาศรัย และคนอื่นๆ (Suwannasai; et al. 2005: 303-324) ศึกษา ราสกุล *Hypoxylon* และสายพันธุ์ใกล้เคียงในประเทศไทย โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา พบว่า สามารถระบุชนิดของ ราใหม่ ได้จำนวน 3 สปีชีส์ (*Hypoxylon*

*kanchanapisakii*, *H. suranarii* และ *H. sublenormandii*) ทั้งนี้ข้อมูล ITS ไม่สนับสนุนการแบ่ง section ของราสกุล *Hypoxylon* sect. *Annulata* ออกจาก *Hypoxylon* sect. *Hypoxylon* เช่นเดียวกับการศึกษาของซานเชสและคนอื่นๆ (Sánchez; et al. 2000: 964-977)

ในปีเดียวกัน เฮซ จู และโรเจอร์ส (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) ได้ทำการศึกษารานในวงศ์ Xylariaceae โดยเน้นราสกุล *Hypoxylon* ทั้ง 2 sections และกลุ่มราที่มีการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบ *Nodulisporium*-like โดยศึกษายีน alpha-actin และ beta-tubulin (แสดงดังภาพประกอบ 10) และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic trees) พบว่าสามารถแยกกลุ่มของราออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นราในสกุล *Hypoxylon* sect. *Annulata* กลุ่มที่ 2 เป็นราในสกุล *Biscogniauxia* และ กลุ่มที่ 3 เป็นราในสกุล *Hypoxylon* sect. *Hypoxylon* และ *Daldinia* จากผลการศึกษาทำให้แยกราสกุล *Hypoxylon* sect. *Annulata* ออกจาก *Hypoxylon* sect. *Hypoxylon* ได้เป็นสกุลใหม่ คือ *Annulohypoxylon* ดังนั้นราสกุล *Hypoxylon* จึงประกอบด้วยรา *Hypoxylon* sect. *Hypoxylon* เท่านั้น



ภาพประกอบ 10 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน beta-tubulin

ที่มา: <http://www.lutzonilab.net/primers/page246.shtml> (online)

ตั้ง จีวอน และไฮด์ (Tang; Jeewon; & Hyde. 2007: 392-402) ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสกุล *Nemania* และสกุลใกล้เคียงอื่นๆ ในวงศ์ Xylariaceae ที่พบระหว่างการสำรวจราในประเทศไทย โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ RNA polymerase II (RPB2) พบว่า สามารถจำแนกราสกุล *Nemania* ชนิดใหม่ได้คือ *Nemania plumbea* A.M.C. Tang, R. Jeewon & K.D. Hyde โดยพบว่าการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบ *Geniculosporium*-like และเมื่อทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ ต้นไม้ พบว่ารา *N. plumbea* มีความใกล้เคียงกับรา *N. aenea* จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการศึกษาลำดับ

นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ RPB2 สามารถใช้จัดกลุ่มหรือจัด จำแนกราชชนิดใหม่ในวงศ์ Xylariaceae ได้

เปเลซ และคนอื่นๆ (Peláez; et al. 2008: 111-134) ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราในวงศ์ Xylariaceae บริเวณ 5.8S rDNA และ ITS ของราจำนวน 15 สกุล 62 ชนิด โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์ด้วยวิธี 4 วิธี (maximum parsimony, neighbor-joining, maximum likelihood และ bayesian) พบว่า ให้ผลสอดคล้องกันคือ ราในสกุล *Hypoxyton* และสกุลใกล้เคียง ได้แก่ *Annulohypoxyton*, *Biscogniauxia*, *Camillea*, *Creosphaeria*, *Daldinia* และ *Whalleya* รวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันซึ่งสนับสนุนลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน

ในการศึกษาของ ตัง จีวอน และไฮด์ (Tang; Jeewon; & Hyde. 2009: 127-155) ถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ ราในวงศ์ Xylariaceae โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณต่างๆ ได้แก่ 5.8S rDNA-ITS, LSU rDNA, RPB2 และ beta-tubulin วิเคราะห์แต่ละบริเวณแยกกันและรวมกัน พบว่าให้ผลสอดคล้องกันคือ สามารถจัดกลุ่มของราในวงศ์ Xylariaceae ได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มของ Hypoxyloideae และ Xylarioideae ผลการศึกษาในครั้งนี้สนับสนุนข้อมูลทางเคมีและลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของทั้ง 2 กลุ่ม คือ *Nodulisporium-like* และ *Geniculosporium-like* anamorphs ตามลำดับ

เปอร์โซ และคนอื่นๆ (Peršoh; et al. 2009: 256-268) ได้ให้ความสนใจในการศึกษาราสกุล *Xylaria hypoxyton* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐาน วิทยาที่หลากหลาย และพบการกระจายในหลายประเทศทั่วโลก โดยเลือกศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S rDNA และ ITS พบว่าสามารถใช้ในการกำหนดขอบเขตและระบุชนิดของรา *X. hypoxyton* ได้

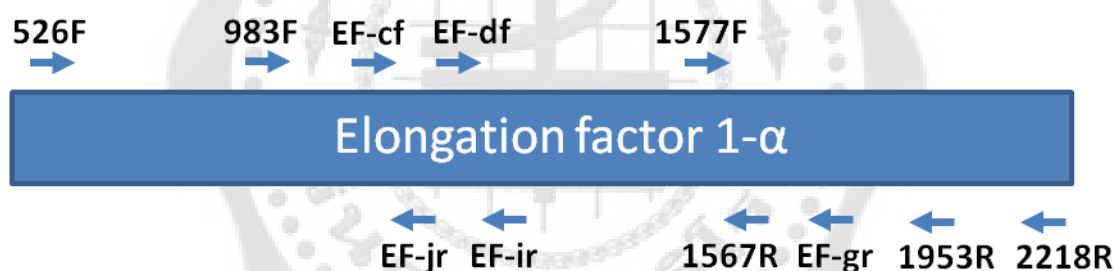
เฮซ และคนอื่นๆ (Hsieh; et al. 2010: 957-969) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสกุล *Xylaria* จำนวน 114 สปีชีส์ และสกุลใกล้เคียงอื่นๆ โดยเลือกศึกษาบริเวณยีน alpha-actin, beta-tubulin และ RPB2 พบว่า สามารถจัดกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นราในสกุล *Xylaria* subgenus *Pseudoxylaria* กลุ่มที่ 2 เป็นราในสกุล *Podosordaria* และ *Poronia* และกลุ่มที่ 3 เป็นราในสกุล *Astrocystis*, *Amphirosellinia*, *Discoxylaria*, *Kretzschmaria* และ *Stilbohypoxyton* ตามลำดับ

สุวรรณาศรัย และคนอื่นๆ (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ที่ปัจจุบันนิยมใช้ในการ จัดจำแนกชนิดรา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ราสกุล *Annulohypoxyton* และ *Hypoxyton* เป็นโมเดล ศึกษาจากตัวอย่าง ราจำนวน 552 ตัวอย่างที่พบในประเทศไทย และ 265 ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า การใช้บริเวณ ITS ศึกษา เพื่อ การจัดจำแนกในระดับสปีชีส์นั้น ควรเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ pairwise alignment ร่วมกับ multiple alignment และอาจศึกษาบริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้บริเวณ ITS สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดของราทั้งสองสกุลได้ จากความสัมพันธ์ของแผน ภูมิเชิงวิวัฒนาการสามารถแยกราที่เป็นสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species) ของ *A. nitens* ที่พบในประเทศไทยได้อีกด้วย



นอกจากการศึกษาบริเวณ 5.8S nrDNA-ITS ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ RPB2 แล้ว ยังมียีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) ที่นิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ บางชนิด รวมไปถึงการจัดจำแนกชนิดที่ซับซ้อน ซึ่งยีนบริเวณนี้ทำหน้าที่ในการควบคุมการผลิต โปรตีน EF1-  $\alpha$  ที่มีลำดับอนุรักษ์สูง (highly conserved) และมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยว (single copy gene) พบกระจายอยู่ทั่วไปในกระบวนการแปลรหัส (translation) ของยูแคริโอต (eukaryotes) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase ในขั้นตอนการต่อสายของ พอลิเปปไทด์ (polypeptide) มีบทบาทสำคัญในการนำ aminoacyl tRNA เข้ามายังตำแหน่ง A site ของไรโบโซม เพื่อให้กรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วย พันธะเปปไทด์ (peptide bond) (Cho; et al. 1995: 650-656; Roger; et al. 1999: 218-233; Helgason; Watson; & Young. 2003: 127-132)

ในปี ค.ศ. 1998 โอดอนเนล และคนอื่นๆ (O' Donnell; et al. 1998: 2044-2049) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ยีน EF1-  $\alpha$  ในการศึกษาจากกลุ่ม Pyrenomycetes (Ascomycota) ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 2001 จึงได้ออกแบบไพรเมอร์เพิ่มเติมสำหรับ การศึกษาจากกลุ่ม Zygomycetes (Zygomycota) (O' Donnell; et al. 2001: 286-296) (แสดงดังภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ยีน elongation factor 1-alpha (EF1-  $\alpha$ )

ที่มา: Rehner. (2001). Primers for Elongation Factor 1-  $\alpha$  (EF1-  $\alpha$ ): p. 2.

ในปี ค.ศ. 1999 โรเจอร์ และคนอื่นๆ (Roger; et al. 1999: 218-233) ศึกษาประสิทธิภาพของยีน EF1-  $\alpha$  ในการเป็นตัวเลือกของการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสำหรับ ยูแคริโอต โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees) วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ EF1-  $\alpha$  และ SSUnrDNA ของเซลล์ยูแคริโอต (eukaryotic cell) และ Archaeobacterial จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นทดสอบความสอดคล้องของแผนภูมิที่ได้ พบว่า มีความสอดคล้องกันในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ ของยูแคริโอต โดยแยก Eukaryota ออกจาก Archabacteria ได้

ชัดเจน รวมไปถึงการแยกสายวิวัฒนาการของ สิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Metazoa, Fungi, Magnoliophyta และ Euglenozoa ได้อีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2003 เฮลกาสัน วัตสัน และยัง (Helgason; Watson; & Young. 2003: 127-132) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ ราในกลุ่มอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal (AM) fungi) โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 บริเวณคือ SSUnrDNA, ยีน alpha-actin และ ยีน EF1-  $\alpha$  จากสปอร์เดี่ยว (single spore) ของรา *Acaulospora laevis*, *Glomus caledonium*, *Gigaspora margarita* และ *Scutellospora dipurpurescens* พบว่า มีความแปรผันของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสปอร์ตัวอย่างต่ำ ยกเว้น ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ SSUnrDNA ในรา *S. dipurpurescens* และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน alpha-actin มีความเหมือน สูงกว่ายีน EF1-  $\alpha$  และเมื่อทำการสร้าง แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ จากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสามร่วมกัน พบว่า ราในกลุ่ม Zygomycete (อันดับ Mortierellales) ถูกจัดให้มีความสัมพันธ์เป็นกลุ่ม ย่อย (sister group) กับราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดอื่นๆ ที่ศึกษา

ต่อมาการศึกษาบริเวณยีน EF1-  $\alpha$  ได้ขยายวงกว้างมากขึ้น จนในปี ค .ศ. 2005 เรห์เนอร์ และ บัคเลย์ (Rehner; & Buckley. 2005: 84-98) ได้ทำการศึกษาราสกุล *Beauveria* ซึ่งจัดอยู่ใน ไฟลัม Ascomycota (อันดับ Hypocreales) และเป็นราอีกสกุลที่มีปัญหาเรื่องความซับซ้อนในการ จำแนกชนิด โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และยีน EF1-  $\alpha$  ของรา *Beauveria* ในหลาย สปีชีส์ร่วมกับราในสกุล *Cordyceps* รวมทั้งสิ้น 86 ไอโซเลท แล้วสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) และ bayesian likelihood พบว่า แผนภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้งสองบริเวณ สามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้อง กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของราแต่ละชนิดในระบะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และ ไม่อาศัยเพศ ตามที่มีรายงานก่อนหน้านี้ และแสดง ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ราสกุล *Beauveria* กับ *Cordyceps* ที่มีความใกล้ชิดกันมาก และยากต่อการจัดจำแนกชนิดได้

สปิริบิลล์ คลัก และเมย์โรเฟอร์ (Spribille; Klug; & Mayrhofer. 2011: 603-614) ได้ใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ยีน EF1-  $\alpha$  และ mini-chromosome maintenance complex 7 (Mcm7) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ รา *Mycoblastus sanguinarius* (Mycoblastaceae, lichenized Ascomycota) ที่มีความซับซ้อน พบว่า จากแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ ของทั้ง 3 บริเวณ สามารถ จำแนกรา *M. sanguinarius* ออกจาก *M. affinis* ด้วยค่า bootstrap ที่สูง และแสดงความสัมพันธ์ของ ชนิดที่ซับซ้อนภายในสปีชีส์ระหว่าง *M. sanguinarius* s. str., *M. sanguinarius* และ *M. sanguinarioides* ที่พบคนละทวีปออกจากกันได้ แม้ว่า การแตกกิ่งความสัมพันธ์ ของแต่ละ สปีชีส์จะ แยกออกจากกันด้วยค่า bootstrap ที่ไม่สูงนัก แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาลักษณะทางเคมีด้วย วิธี thin layer chromatography (TLC) แสดงให้เห็นว่า *M. sanguinarius* ในแต่ละทวีปมีลักษณะ ของกรดไขมัน (fatty acid profile) ที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการแตกกิ่งความสัมพันธ์ใน แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

และลักษณะทางเคมี ร่วมกัน จึงแสดงให้เห็นว่ารา *M. sanguinarius* อาจกำลังเกิดกระบวนการเกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ก็เป็นไปได้

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน EF1- $\alpha$  ในราววงศ์ Xylariaceae ซึ่งรวมถึงราสกุล *Annulohypoxyton* มาก่อน

## 6. ความหลากหลายของ ราสกุล *Annulohypoxyton* ในประเทศไทย และ ปัญหาในการจัดจำแนกชนิด

แม้ว่าในประเทศไทยจะมีการศึกษาราสกุล *Annulohypoxyton* มาอย่างต่อเนื่อง แต่พบว่ามีจำนวนน้อย นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 (Thienhirun. 1997: 1-355; Suwannasai: et al. 2005: 303-324; Phosri; Suwannasai; & Whalley. 2008: 1-8; Fournier: et al. 2010: 23-36; Suwannasai: et al. 2013: 1-8) ซึ่งมีรายงานแล้ว 14 สปีชีส์ ได้แก่ *A. annulatum*, *A. archeri*, *A. atroseum*, *A. bahnpadengense*, *A. bovei* var. *microspora*, *A. maeteangense*, *A. moriforme*, *A. moriforme* var. *microdiscus*, *A. nitens*, *A. pouceanum*, *A. purpureonitens*, *A. stygium*, *A. stygium* var. *annulatum* และ *A. urceolatum* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าบางชนิด ไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน หรือยากต่อการระบุชนิด

ในการศึกษาของเชียรหิรัญ (Thienhirun. 1997: 1-355) ได้สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างของราววงศ์ Xylariaceae ในประเทศไทย ได้มากกว่า 1,500 ตัวอย่าง พบราทั้งหมด 17 สกุล จัดเป็นเป็นราสกุล *Hypoxyton* 28 สปีชีส์ จากทั้ง 17 สกุล นี้คาดว่าน่าจะพบราชนิดใหม่มากกว่า 45 สปีชีส์ แบ่งเป็นราสกุล *Hypoxyton* อย่างน้อย 15 สปีชีส์ และราสกุล *Xylaria* อย่างน้อย 30 สปีชีส์ ส่วนราสกุล *Hypoxyton* sect. *Annulata* (หรือ *Annulohypoxyton*) พบว่า สามารถจัดจำแนกชนิดได้เพียง 9 สปีชีส์ จาก 42 สปีชีส์ทั่วโลก และจากการรายงานความหลากหลายของ ราในประเทศไทย ของ สุรางค์ เชียรหิรัญ (สุรางค์ เชียรหิรัญ. 2545: 13-22) มีรายงานว่า พบราววงศ์ Xylariaceae ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ รวมทั้งหมด 7 สกุล 45 สปีชีส์ ซึ่งเป็นราสกุล *Hypoxyton* จำนวน 2 สปีชีส์ คือ *Hypoxyton monticulosum* และ *H. fendleri* และเป็น ราสกุล *Annulohypoxyton* จำนวน 4 สปีชีส์ คือ *Annulohypoxyton archeri*, *A. bovei* var. *microspora*, *A. moriforme* และ *A. stygium* ต่อมาเชียรหิรัญ และวัลเลย์ (Thienhirun; & Whalley. 2004: 71-77) ได้รายงานจำนวนราววงศ์ Xylariaceae ที่พบในประเทศไทยจำนวน 20 สกุล มากกว่า 126 สปีชีส์ ซึ่งเป็นราในสกุล *Hypoxyton* และ *Annulohypoxyton* อย่างน้อย 30 สปีชีส์

โพธิ์ศรี สุวรรณาศรัย และวัลเลย์ (Phosri; Suwannasai; & Whalley. 2008: 1-8) ได้ศึกษาการกระจายของ ราสกุล *Annulohypoxyton* และ *Hypoxyton* จากพื้นที่ต่างๆ ทางภาคเหนือของประเทศไทย พบว่า ราที่มีการกระจายสูงสุดในทุกพื้นที่ที่สำรวจ ได้แก่ *Annulohypoxyton nitens*,

*A. moriforme* และ *Hypoxylon monticulosum* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า มีราบางชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาสูง โดยเฉพาะสีของสโตรมาและขนาดของแอสโคสปอร์ เป็นต้น

โฟรีเนียร์ และคนอื่นๆ (Fournier; et al. 2010: 23-36) ได้ศึกษาราววงศ์ Xylariaceae ในภาคเหนือของประเทศไทย โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการศึกษาสารเมแทบอไลต์ ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง mass spectrophotometer (MS) โดยใช้เมทานอลเป็นสารสกัดจากบริเวณสโตรมาของ ราสกุล *Annulohypoxylon* ชนิดต่างๆ ผลการศึกษา พบราสกุลใหม่ ซึ่งมีเพียงชนิดเดียว คือ ราสกุล *Rostrohypoxylon* และพบ ราชนิดใหม่ ในสกุล *Annulohypoxylon* จำนวน 2 สปีชีส์ คือ *A. bahnpfadengense* พบบริเวณบ้านผาแดง และ *A. maeteangense* พบบริเวณแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่

ในการศึกษาค้นคว้านี้ให้ความสนใจในการศึกษา ราในพื้นที่เขต รักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง เป็นแหล่งต้นน้ำที่สำคัญ และมีความหลากหลายของพืชพรรณ เหมาะสำหรับการเจริญของเห็ดรา ซึ่งรวมทั้ง ราสกุล *Annulohypoxylon* เมื่อเร็วๆ นี้ ในปี ค.ศ. 2011 สุวรรณาศรัย และคนอื่นๆ (Suwannasai; et al. 2011: 1-6) ได้รายงานผลการสำรวจราในวงศ์ Xylariaceae จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราทั้งหมด 270 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมได้ในปี ค.ศ. 2009 พบว่า สามารถจัด จำแนกราได้ 9 สกุล อย่างน้อย 61 ชนิด ได้แก่ *Annulohypoxylon*, *Biscogniauxia*, *Daldinia*, *Hypoxylon*, *Kretzschmaria*, *Nemania*, *Rosellinia*, *Rhopalostroma* และ *Xylaria* โดยราสกุลที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ *Xylaria* (ร้อยละ 48), *Hypoxylon* (ร้อยละ 28) และ *Annulohypoxylon* (ร้อยละ 14) ตามลำดับ ในขณะที่ราสกุลที่พบน้อยที่สุดคือ *Kretzschmaria* และ *Rhopalostroma* นอกจากนี้พบมากกว่า 50 ตัวอย่าง ที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ ซึ่งเป็นราสกุล *Hypoxylon* อย่างน้อย 5 ตัวอย่าง และ *Annulohypoxylon* อย่างน้อย 3 ตัวอย่าง เนื่องจากมีความหลากหลายทางชีวภาพ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันสูง นอกจากนี้บางตัวอย่างไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้

### ปัญหาในการจัดจำแนกชนิดของราสกุล *Annulohypoxylon*

ในการศึกษาราสกุล *Annulohypoxylon* ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 จนถึงปัจจุบัน พบว่า มีราบางชนิดไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน หรือยากต่อการระบุชนิด (Thienhirun. 1997: 1-355; Suwannasai; et al. 2005: 303-324; Phosri; Suwannasai; & Whalley. 2008: 1-8; Suwannasai; et al. 2011: 1-6) เนื่องจากราในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันสูง ลักษณะของสโตรมา สี ขนาด และรูปร่างของแอสโคสปอร์ที่ใกล้เคียงกันมาก รวมทั้งฐานข้อมูลของ รากลุ่มนี้ใน

ประเทศไทยที่ยังมีอยู่จำกัด และบางชนิดพบว่า สามารถที่จะจำแนกชนิดออกจากกันได้ โดยอาศัยลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จากการสร้างโคนเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ทำให้เป็นปัญหาที่ยากต่อการจัดจำแนกชนิดของราที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

จู และโรเจอร์ส (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) ได้ศึกษาและสร้างคีย์ (key) ที่ช่วยในการจัดจำแนกรานในกลุ่ม *Hypoxylo* ประกอบด้วย *Hypoxylo* sect. *Hypoxylo* และ *Hypoxylo* sect. *Annulata* (หรือ *Annulohypoxylo*) ซึ่งการจัดจำแนกระหว่าง 2 ชนิดนี้ ในปัจจุบันอาจศึกษาได้ง่าย จากออสติโอลที่อยู่บนสโตรมาเป็นหลัก แต่สำหรับการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์นั้น พบว่า การจัดจำแนกราสกุล *Annulohypoxylo* จะต้องมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียด เนื่องจาก ลักษณะเพียงอย่างเดียว ยวไม่สามารถที่จะระบุชนิดได้ เช่น ลักษณะของแผ่นจาน แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ *truncatum*-type และ *bovei*-type พบว่า เมื่อสังเกตลักษณะดังกล่าวด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป ไม่สามารถระบุว่าราตัวอย่างที่ศึกษามีแผ่นจานแบบใดถ้าตัวอย่างนั้นไม่สมบูรณ์ หรือมีอายุที่อ่อนหรือแก่เกินไป ซึ่งต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ของผู้ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่า มีหลายสปีชีส์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมาก เช่น *A. annulatum* และ *A. truncatum* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก คือ ลักษณะของแผ่นจาน เป็นแบบ *truncatum*-type เหมือนกัน ขนาดของแอสโคสปอร์ใกล้เคียงกัน คือ  $7.5-10.5(-11) \times 3.5-5(-6)$  และ  $8-10.5 \times 4-5$  ไมโครเมตร ตามลำดับ แตกต่างกันเพียงลักษณะของสโตรมาของ *A. annulatum* เป็นแบบ hemispherical ถึง spherical ส่วนของ *A. truncatum* เป็นแบบ pulvinate ถึง effused-pulvinate หรือตัวอย่างของ *A. atroseum* กับ *A. stygium* ซึ่งต่างกันเพียงลักษณะของ ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ *Nodulisporium*-like และ *Periconiella*-like anamorphs ตามลำดับ ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ดังนั้นถ้าไม่สามารถเพาะเลี้ยงราทั้งสองชนิดได้ ก็ไม่สามารถจำแนกชนิดที่ถูกต้องได้เช่นกัน

นอกจากนี้ราในกลุ่มของ *A. bovei* var. *microspora* และ *A. nitens* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกันมาก แตกต่างกันเพียง *A. nitens* เมื่อเจริญเต็มทีลักษณะของสโตรมาจะดำมัน (shiny black) ในขณะที่ *A. bovei* var. *microspora* จะมีสีดำ (black) เป็นต้น ความแตกต่างของ *A. moriforme* และ *A. nitens* เป็นอีกตัวอย่างที่มีความใกล้เคียงกันสูง ต่างกันแค่ลักษณะของ แผ่นจาน คือ *A. moriforme* เป็นแบบ *truncatum*-type (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.2-0.4 มิลลิเมตร) ในขณะที่ *A. nitens* เป็นแบบ *bovei*-type (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.3-0.7 มิลลิเมตร) เป็นต้น (Ju; & Rogers. 1996: 1-365)

ด้วยเหตุนี้ในการศึกษา ราสกุล *Annulohypoxylo* จึงต้องอาศัยกระบวนการ และปัจจัยหลายอย่างประกอบกับความรู้ความสามารถของผู้เชี่ยวชาญ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของรา ในสกุลนี้ได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากในปัจจุบัน ราสกุล *Annulohypoxylo* ได้มีความหลากหลายมากขึ้น อาจเนื่องมาจาก กระบวนการเกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ที่มีการเปลี่ยนแปลงจากสปีชีส์หนึ่งโดยการแตกแขนงออกเป็นสปีชีส์ใหม่ จนกลายเป็นสปีชีส์ซ่อนเร้น หรือก่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนสปีชีส์

มากขึ้น ดังนั้นการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางเคมี เพื่อจัดจำแนกราสกุลนี้ จะทำให้สามารถจำแนกชนิดของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่พบในประเทศไทยได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น



### บทที่ 3

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### อุปกรณ์และสารเคมี

#### 1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 9 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
กระดาษกรอง (cellulose acetate filter)	Filtrex	USA
กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	Olympus	Japan
กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereomicroscope)	Olympus	Japan
เข็มฉีดยาพลาสติก (syringe)	Terumo	Japan
เข็มฉีดยาสาร (syringe inject HPLC)	Hamilton	USA
คอลัมน์สำหรับ HPLC (Inertsil ODS-3 column C18; 150 × 4.6 มิลลิเมตร, ขนาด 5 ไมโครเมตร)	Inertsil Fisher Scientific	USA UK
เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer)	Innova	USA
เครื่องเขย่าสาร (incubator shaker)	Sartorius	Germany
เครื่องชั่งสาร	IKA	Malaysia
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Sorvall	USA
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge)		
เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA Thermocycler)	Hangzhou Bioer Technology	China
เครื่องล้างความถี่สูง (cavivator ultrasonic cleaner)	Mettler electronics	California
เครื่องวัด pH (pH meter)	Fisher Scientific	UK
เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometry)	Jenway	UK
เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis apparatus)	Hangzhou Bioer Technology	China
เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) – diode array detector (DAD)	Shimadzu	Japan

ตาราง 9 (ต่อ)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
ชุดเครื่องแก้วสำหรับกรองสารละลาย	Pyrex	USA
ชุดถ่ายภาพเจล (UV-transilluminator)	Viber Lourmat	Germany
เตาไมโครเวฟ (microwave)	Imarflex	Thailand
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	Sanyo	Japan
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส	Jouan	Germany
ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)	Shel-lab	Germany
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	Nitech	Thailand
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air sterilization oven)	Fisher Scientific	UK
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Meditop.Co.,Ltd	Thailand
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Heto	USA

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

ตาราง 10 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Agar	Marine chemicals	India
Miller Luria-Bertani broth (LB)	Titan Biotech	India
Malt extract agar (MEA)	Difco	USA
Oat meal agar (OMA)	Difco	USA
Potato dextrose agar (PDA)	Difco	USA
Tryptone type I	HiMedia	India
Yeast extract powder	HiMedia	India
Acetonitrile (ACN)	Merck	Germany
Agarose gel	Amresco/Vivantis	USA
Ampicillin	องค์การเภสัชกรรม	Thailand
Calcium chloride (CaCl <sub>2</sub> )	Univar	Australia
Choral hydrate	Carlo Erba	Italy
DNA 6X loading buffer	RBC Bioscience	Taiwan
DNA marker (100-1500 bp)	GeneDirex	USA



## ตาราง 10 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Ethanol absolute	Merck	Germany
Ethidium Bromide	Biorad	USA
FavorPrep <sup>TM</sup> Plant Genomic DNA extraction kit	Favorgen	Taiwan
FavorPrep <sup>TM</sup> GEL/PCR purification mini kit	Favorgen	Taiwan
Glucose (D-anhydrous)	Fisher Scientific	UK
Iodine	Resublimed	France
Isopropylthiogalactoside (IPTG)	Bio basic	Canada
Magnesium chloride (MgCl <sub>2</sub> )	Univar	Australia
Methanol (MeOH)	Merck	Germany
Methylene blue	Unilab	Australia
Phosphoric acid (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck	Germany
Potassium hydroxide (KOH)	Merck	Germany
RBC TA cloning vector kit	RBC Bioscience	Taiwan
Taq DNA polymerase (KAPA 2X)	(KAPA Biosystems)	USA
Taq DNA polymerase (TopTaq 2X master mix kit)	Qiagen	USA
Taq DNA polymerase (Phire® plant direct PCR kit)	Finnzymes	USA
Tris Borate EDTA buffer power (TBE)	Amresco	USA
Water HPLC grade	Merck	Germany
Water sterile DNase/RNase-free	Amresco	USA
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)	Amresco	USA

## วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon*

สำรวจและเก็บตัวอย่างรายย่อยสลายไม้มังคี่ Xylariaceae และราสกุล *Annulohyphoxylon* โดยเก็บจากส่วนต่างๆ ของพืชที่มีลักษณะการเจริญของ ราในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จากพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 บริเวณบึงแปน และเส้นทางสำรวจธรรมชาติ บรรจูลงในถุงซิปล็อค แล้วจดบันทึกชนิดพืชที่พบตัวอย่าง พื้นที่ป่า

และวัน เดือน ปีที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำมาเก็บรักษาที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อกำจัดแมลง หรือไข่ของแมลง ที่อาจปนเปื้อนมา กับตัวอย่าง แล้วนำมาผึ่งให้แห้ง ก่อนนำมาจำแนกชนิด โดยบันทึกรูปและหมายเลขตัวอย่าง เพื่อเก็บรักษาเป็นตัวอย่างแห้ง (fungal herbarium) ต่อไป

## 2. การจัดทำ แยกชนิดของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* โดยอาศัยลักษณะทาง สัณฐานวิทยา

นำตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่มีลักษณะสมบูรณ์ จากกลุ่มตัวอย่างที่เก็บได้ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 และในช่วงปี พ.ศ. 2550-2554 บริเวณศาลาพรหม และบึงมน จาก การสำรวจของ ดร. เชิดชัย โพธิ์ศรี และคณะ (เชิดชัย โพธิ์ศรี และคนอื่นๆ. 2554) นำมาศึกษาเพื่อ การจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเคมี และ ลักษณะทางพันธุกรรม ด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จะศึกษาจากลักษณะที่สามารถ มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และลักษณะที่ต้องศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีดังนี้

### 2.1 การศึกษาตัวอย่างของราในระยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Teleomorph stage)

#### 2.1.1 ศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอก(Macroscopic characteristics)

นำตัวอย่างราที่เจริญอยู่บนส่วนต่างๆ ของพืชที่เก็บ รวบรวมได้ มาตรวจดู โครงสร้างภายใต้กล้อง สเตอริโอไมโครสโคป ที่กำลังขยายต่างๆ โดยศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด และสีของสโตรมา เพอริทีเซีย ออสติโอล และลักษณะอื่นๆ ทำการบันทึกข้อมูลและถ่ายภาพ เพื่อ เป็นข้อมูล ในการจัดทำแยกชนิดของรา ตลอดจนการ เกิดปฏิกิริยาของสโตรมากับสารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10% (ภาคผนวก ข) โดยใช้ใบมีดที่สะอาดตัดหรือปาด บริเวณผิวของสโตรมา วางลงบนแผ่นสไลด์แล้วหยดสารละลาย KOH 10% สังเกตสีที่เกิดขึ้นบริเวณ รอบๆ สโตรมา (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) จากนั้นนำมาเทียบสีโดยใช้แผ่นเทียบสีของ Rayner Mycological Colour Chart (Rayner. 1970: 1-34) ซึ่งต้องทำการเทียบสีหลังจากทำปฏิกิริยาภายใน 1 นาที

#### 2.1.2 ศึกษาลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characteristics)

ทำการศึกษา โครงสร้างขนาดเล็ก ที่ไม่สามารถมองเห็นรายละเอียดได้ด้วย ตาเปล่า โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ ศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด และสีของ แอสซาย และแอสโคสปอร์ โดยทำ wet mount กับสารละลาย 3 ชนิด คือ (1) น้ำกลั่น เพื่อศึกษาสีของ

แอสโคสปอร์ (2) melzer's reagent หรือ iodine reagent เข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข) เพื่อศึกษา การติดสีของเอพิคัล แอปพาราทัส และ รูปร่างของเจิร์มสลิท (3) สารละลาย KOH เข้มข้น 10% เพื่อ ศึกษาเพอริสปอร์ ถ้าเพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์เรียกว่าเกิด dehiscent ถ้าเพอริสปอร์ไม่หลุดออก จากสปอร์เรียกว่า indehiscent แล้วบันทึกลักษณะของเพอริสปอร์ จากนั้นวัดขนาดของแอสโคสปอร์ ประมาณ 20-30 สปอร์ต่อตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ย และทำการถ่ายภาพลักษณะ ต่างๆ เพื่อเป็น ข้อมูลประกอบในการจัดจำแนกชนิดของรา

## 2.2 การศึกษาตัวอย่างของราในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Anamorph stage)

### 2.2.1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงราบริสุทธิ์

ตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่เก็บรวบรวมได้ นำมาแยกแอสโคสปอร์ ภายใต้อ่างสเตอริโอไมโครสโคป ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) โดยใช้ใบมีดที่ ปราศจากเชื้อ ตัดบริเวณสโตรมาของตัวอย่าง ที่ผ่านการกำจัดแมลง แล้ว ใช้เข็มเย็บขนาดเล็กปลอด เชื้อเขี่ยแอสโคสปอร์ ซึ่งอยู่ภายในเพอริทีเซียออกมาเลี้ยง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) แล้วบ่มไว้ในตู้บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 – 3 วัน จนปรากฏการงอกของสปอร์ จากนั้นใช้เข็มเย็บบริเวณปลายเส้นใย เพื่อย้ายออกมาเลี้ยง ในอาหารใหม่จนได้ราบริสุทธิ์ แล้วนำราบริสุทธิ์ที่ได้เก็บรักษาใน หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เอียงที่ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเส้นใย ทุกๆ 4 เดือน เพื่อเก็บเป็นคลังราบริสุทธิ์ และ ใช้ใน การศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### 2.2.2 การศึกษา ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ ราด้วยเทคนิค สไลด์คัลเจอร์

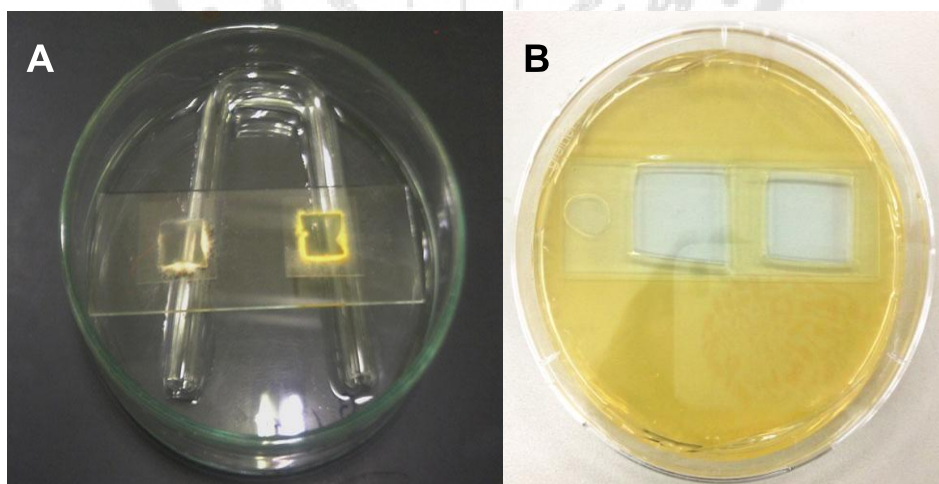
นำตัวอย่างราบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ชนิดคือ PDA, oat meal agar (OA) และ malt extract agar (MEA) (ภาคผนวก ก) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เช่นเดียวกับวิธีข้อ 2.2.1 เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย และความสามารถในการชักนำให้ เกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ รวมถึงการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละชนิด ทำการตรวจ การงอกของสปอร์จากเส้นใยทุก 2 สัปดาห์ และใช้เทคนิคสไลด์คัลเจอร์ 2 วิธี เพื่อชักนำให้เกิดการ สร้างลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนี้

**วิธีที่ 1** เตรียมชุดการเลี้ยงราบนแผ่นสไลด์ ซึ่งประกอบด้วยแผ่นสไลด์ 1 แผ่น วางบนแท่งแก้วรูปตัววี พร้อม cover slip ในจานแก้ว นำชุดนี้ไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีหนึ่งผาเชื้อใน หม้อน้ำความดันไอน้ำ จากนั้นตัดชิ้นอาหาร PDA ให้มีขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวาง

ลงบนแผ่นสไลด์ที่อยู่ในจานแก้ว ใช้เข็มเขี่ยที่ปราศจากเชื้อเขี่ยบริเวณปลายเส้นใยย้ายออกมาวางลงบนทั้งสี่ด้านของชิ้นวุ้น เสร็จแล้วปิดทับด้วย cover slip และเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในจานแก้วเพื่อรักษาความชื้น (ระวังอย่าให้สไลด์เปียก) ปิดฝาจาน (แสดงดังภาพประกอบ 12A) แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการตรวจการงอกของสปอร์ทุก 2 สัปดาห์

วิธีที่ 2 เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก นูเก็นท์ และคนอื่นๆ (Nugent; et al. 2006: 111-114) โดยการเตรียมอาหาร PDA และแผ่นสไลด์ ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีหนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อหนึ่ง ความดันไอ จากนั้นใช้เข็มปราศจากเชื้อคีบแผ่น สไลด์ไปวางลงในจานพลาสติก แล้วเทอาหาร PDA ร่อนอาหารแข็งตัวจึงใช้มีดปราศจากเชื้อตัดชิ้นอาหารให้มีขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร ใช้เข็มเขี่ยที่ปราศจากเชื้อเขี่ยเอาอาหารส่วนที่ตัดออกแล้ว เขี่ยบริเวณปลายเส้นใยย้ายมาวาง ลงบนทั้งสี่ด้านของวุ้นบริเวณที่ติดกับแผ่นสไลด์ (แสดงดังภาพประกอบ 12B) นำไปเก็บไว้ในตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการตรวจการงอกของสปอร์ทุก 2 สัปดาห์

วิธีการตรวจการงอกของสปอร์คือ เมื่อต้องการเตรียมสไลด์ให้ใช้คีบ ปราศจากเชื้อคีบแผ่น cover slip จากวิธีที่ 1 และแผ่นสไลด์ จากวิธีที่ 2 ออกจากชุดการทดลองแล้วทำการย้อมสไลด์ด้วยสีย้อม methylene blue (ภาคผนวก ข) เพื่อศึกษาลักษณะของโคนิเดียและโคนิดีโอฟอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สำหรับประกอบการจัดทำแผนชนิดต่อไป



ภาพประกอบ 12 วิธีการศึกษาลักษณะ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ด้วยเทคนิคสไลด์คัลเจอร์

จากข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งระยะ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ที่ได้ นำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของ ราสกุล *Annulohypoxyton* เบื้องต้นตามเอกสารอ้างอิง (Miller. 1961:1-158; Rayner. 1970; Ju; & Rogers. 1996: 1-365; Thienhirun. 1997: 1-355; Hsieh; Ju; & Rogers. et al. 2005: 844-865; Suwannasai; et al. 2005: 303-324; Marincowitz; et al. 2008: 1-166; Fournier; et al. 2010: 23-36; Pereira; Rogers; & Bezerra. 2010: 248-252; Vasilyeva; et al. 2012: 65-76)

### 3. การศึกษา ลักษณะ ของสารเคมีที่สกัดได้จาก ราสกุล *Annulohypoxyton* ด้วย เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

ในการศึกษาลักษณะทาง เคมีของราสกุล *Annulohypoxyton* ได้เลือกสกัดสารจาก ส่วนของสปอร์มาตามวิธีของ สเตดเลอร์และคนอื่นๆ (Stadler; et al. 2001: 1190-1208) โดยการใช้ไบมีดสะอาด ตัดบริเวณสปอร์มาของ ราตัวอย่าง เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จากนั้นทำการสกัดด้วย สารละลาย เมทานอล ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร โดยแช่ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้สารตัวชะ (mobile phase) คือ กรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ ) เข้มข้น 0.1% (ภาคผนวก ข) และ สารอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, ACN) คอลัมน์ (column) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ คอลัมน์ Inertsill ODS-3 ขนาดกว้าง 4.6 มิลลิเมตร และยาว 150 มิลลิเมตร บรรจุด้วย silica based (C18) ขนาด 5 ไมโครเมตร ก่อนการวิเคราะห์ HPLC ทุกครั้งจะต้องมีการเตรียมสารตัวชะและสารสกัดตัวอย่างให้เหมาะสมกับคอลัมน์ที่ใช้ ดังนี้

#### 3.1 การเตรียมสารตัวชะ (Mobile phase) และสารสกัดตัวอย่าง

สารทั้งหมดที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ HPLC นั้นจะต้องมีการกรองก่อนใช้ทุกครั้ง เพื่อป้องกันเศษฝุ่นผงหรือตะกอนที่ตกค้างในสารละลายไปทำให้คอลัมน์เกิดการอุดตัน ซึ่งจะทำให้คอลัมน์เสียได้ง่าย และทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ดีเท่าที่ควร ในการทดลองนี้สารที่ใช้ทั้งหมด ประกอบด้วย น้ำ (HPLC grade) กรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ ) เข้มข้น 0.1% และสารอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, ACN) แต่เนื่องจากน้ำและสารอะซิโตไนไตรล์ที่ใช้เป็นสารคุณภาพสำหรับวิเคราะห์ HPLC อยู่แล้วจึงไม่ต้องทำการกรองก่อน ในการเปิดขวดครั้งแรก ดังนั้นจึงทำการกรองกรด  $H_3PO_4$  เข้มข้น 0.1 % ด้วยกระดาษกรอง (cellulose acetate filter) ขนาด 0.45 ไมครอน กรองผ่านชุดกรองสารละลาย นำสารละลายที่ได้เก็บใส่ขวดแก้วใหม่แล้วปิดฝาให้แน่นเพื่อไม่ให้อากาศเข้า จากนั้นนำสารตัวชะทั้ง 2 ชนิดไปทำการขจัดแก๊ส (degas) ด้วยการใช้คลื่นความถี่สูง (sonication) ในเครื่องล้างความถี่สูง (cavitator ultrasonic cleaner) เป็นเวลา 15 นาที หรือนานพอที่จะกำจัดฟองอากาศออกให้หมด

สำหรับสารสกัดจากตัวอย่างทั้งหมด ให้ทำการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน 2-3 รอบ แล้วเก็บสารที่ได้ใส่หลอด เช่นตริฟิวจ์ใหม่ ปิดฝาให้แน่นเพื่อป้องกันอากาศเข้า และสำหรับสารมาตรฐานที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Marc Stadler (Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland, Germany) ประกอบด้วย binaphthalene (BNT), cohaerins A และ mitorubinol ให้ทำการละลายด้วยสารละลาย เมทานอลที่ทำให้เจือจาง 50% (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปผ่านการกรองเช่นเดียวกับสารสกัดจากตัวอย่าง

### 3.2 การตั้งค่าระบบสำหรับวิเคราะห์ HPLC

การวิเคราะห์ HPLC ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu) ที่ต่อด้วยเครื่องตรวจวัดโครมาโทแกรม (chromatogram) แบบ diode array (DAD, SPD-M20A) โดยระบุให้ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 (OD<sub>210</sub>) และ 254 (OD<sub>254</sub>) นาโนเมตร กำหนดให้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดย กำหนดระบบ gradient ให้สารตัวชะกรด H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> เข้มข้น 0.1% เริ่มจาก 100% ลดลงเหลือ 0% ในขณะที่ สารตัวชะ ACN เริ่มจาก 0% จนถึง 100% ในระยะเวลา 10 นาที จากนั้นจึงปล่อยให้สารตัวชะ ACN 100% ไหลเข้าระบบต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งในการฉีดสารเข้าระบบ แต่ละครั้งจะใช้สารสกัดตัวอย่างปริมาณ 40 ไมโครลิตร และเมื่อเสร็จระบบหนึ่งรอบก่อนจะฉีดสารตัวใหม่ควรเว้นระยะเวลาประมาณ 5 นาที (pre-inject) เพื่อให้ baseline และความดันในระบบคงที่ ดังนั้นรวมเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อสารหนึ่งตัวอย่างใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 20 นาที

ผลที่ได้จากการศึกษา ลักษณะทางเคมี ด้วยวิธี HPLC นำไปเปรียบเทียบกับตัวอย่าง ราชสกุล *Annulohypoxylon* อ้างอิง (Stadler; et al. 2001: 1190-1208; Stadler; Ju; & Rogers. 2004: 239-256; Stadler; & Fournier. 2006: 160-170; Quang; et al. 2005: 797-809; Quang; et al. 2006: 6349-6354) เพื่อวิเคราะห์ลักษณะของโครมาโทแกรมที่เกิดขึ้นของตัวอย่าง ราชสกุล *Annulohypoxylon* แต่ละชนิด เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดต่อไป

#### 4. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของราสกุล *Annulohyphoxylon*

จากข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของ ราเบื้องต้นในข้อ 2 ได้คัดเลือกตัวแทนของราทั้งชนิดที่สามารถระบุชนิดได้ และชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

##### 4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างของราสกุล *Annulohyphoxylon*

นำเส้นใยราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.2.1 มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด DNA extraction kit (FavorPrep™ Plant Genomic DNA extraction mini kit) ตามวิธีในคู่มือผู้ผลิต (ภาคผนวก ค) ซึ่งสารละลายดีเอ็นเอที่ได้นำมาวัดความเข้มข้นที่ ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD<sub>260</sub>) โดย 1 OD<sub>260</sub> มีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง spectrophotometry และวัดความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ โดยคำนวณหา อัตราส่วนของค่า OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ซึ่งควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-1.9 จากนั้นเก็บรักษาสารละลาย ดีเอ็นเอ ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

##### 4.2 การเพิ่ม จำนวน ดีเอ็นเอด้วยวิธี ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้เลือก ศึกษาดีเอ็นเอ ทั้งหมด 4 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และยีน elongation factor 1-alpha (EF1-α) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงดัง ตาราง 11 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ Taq DNA polymerase จำนวน 2 ชุด ตามความเหมาะสม ได้แก่ KAPA (Biosystems) หรือ TopTaq (Qiagen) 2X master mix kit แสดงดังตาราง 12 และ Phire® plant direct PCR kit (Finnzyme) แสดงดังตาราง 13

ตาราง 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

บริเวณ ที่ศึกษา	ไพรเมอร์		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	ที่มา
ITS	ITS1	forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White; et al. 1990: 315-322
	ITS1F	forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes; & Bruns. 1993: 113-118
	ITS5	forward	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White; et al. 1990: 315-322
	ITS4	reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White; et al. 1990: 315-322
alpha-actin	ACT512F	forward	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone; & Kohn. 1999: 553-556
	ACT783R	reverse	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Carbone; & Kohn. 1999: 553-556

## ตาราง 11 (ต่อ)

บริเวณที่ศึกษา	ไพรเมอร์		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	ที่มา
beta-tubulin	T1	forward	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell; & Cigelnik. 1997:
	T2	reverse	TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG	103-116
	T22	reverse	TCTGGATGTTGTTGGGAATCC	O'Donnell; & Cigelnik. 1997:
	Bt2a	forward	GGTAACCAAATCGGTGCTTTTC	103-116
	Bt2b	reverse	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	O'Donnell; & Cigelnik. 1997: 103-116 Glass; & Donalson. 1995: 1323-1330 Glass; & Donalson. 1995: 1323-1330
EF1- $\alpha$	EF1a-983F	forward	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	Rehner; & Buckley. 2005: 84-98
	EF1a-2218R	reverse	ATGACACCRACRGCRACRGTYTG	Rehner; & Buckley. 2005: 84-98

## ตาราง 12 ส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับ KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
forward primer (10 $\mu$ M)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
reverse primer (10 $\mu$ M)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit	12.5	1.25 ยูนิตต่อ 25 ไมโครลิตร
water sterile DNase/RNase-free	5.5	-

หมายเหตุ: ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร



ตาราง 13 ส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับ Phire® plant direct PCR kit

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
forward primer (10 µM)	1	0.5 ไมโครโมลาร์
reverse primer (10 µM)	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
Phire® plant direct PCR kit	0.4	1.5 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร
1x Phire ® PCR buffer	10	-
water sterile DNase/ RNase-free	2.6	-

หมายเหตุ: ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

#### 4.2.1 บริเวณ internal transcribed spacers (ITS regions)

ในการเพิ่ม จำนวน ดีเอ็นเอ ตัวอย่าง บริเวณ ITS จะเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 (White; et al. 1990: 315-322) เป็นอันดับแรกในทุกตัวอย่างศึกษา ซึ่งขนาดของชิ้น ดีเอ็นเอของราที่ได้จะมีขนาดอยู่ในช่วง 500-900 คู่เบส ทั้งนี้อาจใช้คู่ไพรเมอร์อื่นๆ ในการศึกษา เช่น ITS1/ITS4 หรือ ITS1F/ITS4 เมื่อไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 ใน ครั้งแรกได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของราตัวอย่างที่ศึกษา จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Taq DNA polymerase KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit หรือ Phire® plant direct PCR kit แสดง ดังตาราง 14

ตาราง 14 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณ ITS

ปฏิกิริยา PCR	KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit		Phire® plant direct PCR kit	
initial denaturation	95 °C	5 นาที	98 °C	5 นาที
denaturation	95 °C	1 นาที	98 °C	5 วินาที
annealing	50-55 °C*	1 นาที	58-60 °C*	5 วินาที
extension	72 °C	1.30 นาที	72 °C	20 วินาที
final extension	72 °C	10 นาที	72 °C	1 นาที
จำนวนรอบจาก ขั้นตอนที่ 2 - 4	35 รอบ		40 รอบ	

หมายเหตุ: \* หมายถึง ช่วงอุณหภูมิที่อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของรา

#### 4.2.2 ยีน alpha - actin

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ตัวอย่าง บริเวณยีน alpha-actin เป็นการเลือกทำ เฉพาะบางส่วนของยีน (partial gene sequence) ตามการทดลองของ เฮช จู และ โรเจอร์ส (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) ซึ่งขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 200-300 คู่เบส เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด สั้นจึงทำให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ACT512F/ACT783R กับทุกตัวอย่างที่ศึกษา และใช้เพียง Taq DNA polymerase KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit ในการเพิ่มจำนวนเท่านั้น ซึ่งเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR แสดงดังตาราง 15

ตาราง 15 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน alpha-actin ด้วย KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit

ปฏิกิริยา PCR	KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit	
initial denaturation	95 °C	5 นาที
denaturation	95 °C	1 นาที
annealing	48-50 °C*	1 นาที
extension	72 °C	1 นาที
final extension	72 °C	10 นาที
จำนวนรอบจากขั้นตอนที่ 2 - 4	35 รอบ	

หมายเหตุ: \* หมายถึง ช่วงอุณหภูมิที่อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของรา

#### 4.2.3 ยีน beta - tubulin

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ตัวอย่าง บริเวณยีน beta-tubulin เป็นการเลือกทำ เฉพาะบางส่วนของยีน (partial gene sequence) ตามการทดลองของ เฮช จู และ โรเจอร์ส (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) ซึ่งขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 1,200-1,500 คู่เบส ทั้งนี้เนื่องจากยีน beta-tubulin มีขนาดค่อนข้างยาวจึงทำให้เพิ่มจำนวนได้ยาก ซึ่งในการเพิ่มจำนวนครั้งแรกตลอดทั้งเส้นจะใช้คู่ไพรเมอร์ T1/T22 จากนั้นถ้าไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ จะทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทีละส่วน คือ ส่วนแรก ทางด้านปลาย 5' ใช้คู่ไพรเมอร์ T1/Bt2b หรือ T1/T2 (Glass; & Donalson. 1995: 1323-1330) (ขึ้นอยู่กับชนิดของราตัวอย่างที่ศึกษา) มีขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส และส่วนที่สอง ทางด้านปลาย 3' ใช้คู่ไพรเมอร์ Bt2a/T22 (Glass; & Donalson. 1995: 1323-1330; O'Donnell; & Cigelnik. 1997: 103-116) มีขนาดประมาณ 800-900 คู่เบส

(ขึ้นอยู่กับชนิดของรากลักษณะที่ศึกษา) ปฏิบัติ PCR ใช้ *Taq* DNA polymerase KAPA หรือ Top*Taq* 2X master mix kit แสดงดังตาราง 16 หรือ Phire® plant direct PCR kit แสดงดังตาราง 17

ตาราง 16 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน *beta-tubulin* ด้วย KAPA หรือ Top*Taq* 2X master mix kit

ปฏิกิริยา PCR	KAPA หรือ Top <i>Taq</i> 2X master mix kit					
	T1/T22		T1/Bt2b, T1/T2		Bt2a/T22	
initial denaturation	95 °C	5 นาที	95 °C	5 นาที	95 °C	5 นาที
denaturation	95 °C	1 นาที	95 °C	1 นาที	95 °C	1 นาที
annealing	45-48 °C*	1.30 นาที	48-50 °C*	1 นาที	50-52 °C*	1 นาที
extension	72 °C	2 นาที	72 °C	1.30 นาที	72 °C	1.30 นาที
final extension	72 °C	10 นาที	72 °C	10 นาที	72 °C	10 นาที
จำนวนรอบจาก ขั้นตอนที่ 2 - 4	35 รอบ		35 รอบ		35 รอบ	

หมายเหตุ: \* หมายถึง ช่วงอุณหภูมิที่อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของรา

ตาราง 17 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน *beta-tubulin* ด้วย Phire® plant direct PCR kit

ปฏิกิริยา PCR	Phire® plant direct PCR kit					
	T1/T22		T1/Bt2b, T1/T2		Bt2a/T22	
initial denaturation	98 °C	5 นาที	98 °C	5 นาที	98 °C	5 นาที
denaturation	98 °C	5 วินาที	98 °C	5 นาที	98 °C	5 วินาที
annealing	52-55 °C*	5 วินาที	56-58 °C*	5 วินาที	58-60 °C*	5 วินาที
extension	72 °C	20 วินาที	72 °C	20 วินาที	72 °C	20 วินาที
final extension	72 °C	1 นาที	72 °C	1 นาที	72 °C	1 นาที
จำนวนรอบจาก ขั้นตอนที่ 2 - 4	40 รอบ		40 รอบ		40 รอบ	

หมายเหตุ: \* หมายถึง ช่วงอุณหภูมิที่อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของรา

#### 4.2.4 ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ )

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน EF1- $\alpha$  นั้น เป็นการเลือกทำบางส่วนของ ยีนจากบริเวณทั้งหมดที่มีขนาดมากกว่า 1,300 คู่เบส (O' Donnell; et al. 1998: 2044-2049) ทั้งนี้ เนื่องจากการศึกษายีน EF1- $\alpha$  ในราววงศ์ Xylariaceae รวมทั้งราสกุล *Annulohyphoxylon* เป็นการศึกษา ครั้งแรก ซึ่งเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR แสดงดังตาราง 18

ในการทดลองนี้ได้ เลือกใช้ คู่มือ EF1a-983F/EF1a-2218R ตามการ ทดลองของ เรห์เนอร์ และ บัคเลย์ (Rehner; & Buckley. 2005: 84-98) สำหรับการศึกษาราสกุล *Beauveria* (Ascomycota) ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัมเดียวกันกับราสกุล *Annulohyphoxylon* จึงสันนิษฐานว่า น่าจะมีความใกล้เคียงกัน และ สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้ ซึ่งขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส

ตาราง 18 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน EF1- $\alpha$

ปฏิกิริยา PCR	KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit		Phire® plant direct PCR kit	
initial denaturation	95 °C	5 นาที	98 °C	5 นาที
denaturation	95 °C	1 นาที	98 °C	5 วินาที
annealing	54-56 °C*	1 นาที	58-60 °C*	5 วินาที
extension	72 °C	1.30 นาที	72 °C	20 วินาที
final extension	72 °C	10 นาที	72 °C	1 นาที
จำนวนรอบจาก ขั้นตอนที่ 2 - 4	35 รอบ		40 รอบ	

หมายเหตุ: \* หมายถึง ช่วงอุณหภูมิที่อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของรา

#### 4.3 การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

นำผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ มาตรวจสอบขนาดด้วย วิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยชุดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส MiniRun รุ่น GE-100 (China) โดยใช้ DNA marker เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน เตรียม เจลอะกาโรส (agarose gel) เข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข) ในสารละลาย 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ข) หลอมละลายด้วยเครื่องไมโครเวฟ จนเข้ากันดีแล้วนำมาเทลงในกล่องเจล รอจนอะกาโรสแข็งตัวจึงทำการผสมชิ้นดีเอ็นเอที่ สามารถ

เพิ่มจำนวนได้กับสีย้อม (DNA 6X loading buffer) แล้วหยอดลงในช่องเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 30 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide solution) (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วนำไปส่องภายใต้ชุดถ่ายภาพเจล (UV transilluminator) และบันทึกภาพ สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ถูกต้อง และมีความเข้มของแบนมากกว่าพอ จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification mini kit (Favorgen) (ภาคผนวก ค) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ต่อไป แต่สำหรับผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องแต่ ความเข้มของแบนไม่มากพอจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ก่อน แล้วนำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ (DNA cloning vector) เพื่อเพิ่มจำนวนผลผลิตของดีเอ็นเอก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

#### 4.4 การโคลนดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ (DNA cloning vector)

นำผลผลิตของดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน ซึ่งได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Taq DNA polymerase KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit เท่านั้น เนื่องจากปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป็น ปลายเหนียว (sticky ends) ในขณะที่ผลผลิตที่เพิ่มจำนวนด้วย Phire® plant direct PCR kit นั้นเป็นปลายทู่ (blunt ends) จึงต้องทำการต่อปลายทั้งสองด้านให้เป็นปลายเหนียวก่อนจึงจะนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้ เวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลนเป็น TA cloning vector นำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียผู้รับ (host cell) *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ TOP10 วิธีการดังนี้

##### 4.4.1 การเชื่อมต่อ (Ligation) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

นำผลผลิตของดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมต่อกับ TA cloning vector (RBC TA cloning vector kit, Taiwan) ซึ่งแผนภาพแสดงในภาคผนวก ค โดยเติมส่วนผสม ดังตาราง 19 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้รีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอ (recombinant DNA)

##### 4.4.2 การนำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ เข้าสู่เซลล์ผู้รับ (Host cell) หรือเรียกว่า

##### การ Transformation

เริ่มจากการเตรียมรีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในคอมพิเทนท์ เซลล์ (competent cells) (ภาคผนวก ค) ซึ่งเป็นเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 ที่ถูกปรับสภาพให้เหมาะสมที่จะรับพลาสมิดโดยการแช่เซลล์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อช่วยเพิ่มการ transformation ได้ดีขึ้น จากนั้นใช้ pipette ให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และนำไปจุ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนนำกลับไปบ่มในน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเติม soc medium (ภาคผนวก ก) ลงไปปริมาตร 250 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มภายใต้เครื่องเขย่าสาร (incubator shaker) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตาราง 19 ส่วนผสมที่ใช้ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (DNA ligation)

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ (ไมโครลิตร)
Ligation buffer A	0.5
Ligation buffer B	0.5
RBC TA cloning vector	1.0
PCR product	2.0 - 2.5
T <sub>4</sub> DNA ligase	0.5
water sterile DNase/ RNase-free	0.0 - 0.5

หมายเหตุ: ปริมาณสุดท้ายเท่ากับ 5 ไมโครลิตร

ก่อนครบเวลา 1 ชั่วโมง ให้ทำการเตรียมอาหารสำหรับคัดเลือกโคโลนี โดยนำอาหารแข็ง Miller Luria-Bertani (LBA) (ภาคผนวก ก) มา spread ด้วยอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แอมพิซิลลิน (ampicillin) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) Isopropylthiogalactoside (IPTG) เข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) และ X-gal เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) หลังจากนั้นนำคอมพลีเทนท์เซลล์ที่เขย่าครบ 1 ชั่วโมงมา spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่เตรียมไว้ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหนึ่งเพลท แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-15 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ทำการตรวจสอบโคโลนีที่เกิดขึ้นเพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ต้องการ โดยสังเกตจากโคโลนีที่เกิดขึ้นแล้วมีสีขาวจะเป็นโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างยีน *lacZ* ในเวกเตอร์ ทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase) ที่สามารถย่อยซับสเตรต X-gal ให้เกิดสารสีฟ้าได้ ในขณะที่โคโลนีสีฟ้า เป็นโคโลนีที่มีเวกเตอร์ที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ จึงทำให้สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส และย่อย ซับสเตรต X-gal เกิดสารสีฟ้าได้ จากนั้นจึงทำการเลือกเชื้อโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้นเก็บไว้ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร 1 โคโลนีต่อ 1 หลอด จำนวน 3 - 5 โคโลนีต่อตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอต่อไปด้วยวิธี PCR

#### 4.4.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากโคลนนิ่งที่ได้จากการโคลนนิ่ง (colony PCR)

นำโคลนนิ่งสีขาวจากการทดลองข้อ 4.4.2 มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ เวลา และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมของแต่ละ บริเวณที่ศึกษา ถ้าโคลนนิ่งที่ ทดสอบ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ แทรกอยู่จริง จะทำให้ได้ผล ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้อง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ตามที่อธิบายไว้ในข้อ 4.3 ข้างต้น ถ้าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนนิ่งมีขนาดที่ถูกต้องและมีความเข้มข้นของแบนมากจะนำไปทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ต่อไป

### 5. การทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอ ทั้ง 4 บริเวณ ที่เพิ่มจำนวนได้และมีขนาดถูกต้องมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification mini kit (Favorgen) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือผู้ผลิต (ภาคผนวก ค) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ มาตรวจสอบขนาดอีกครั้งด้วยวิธี อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ตามที่อธิบายไว้ในข้อ 4.3 และเก็บรักษา ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1<sup>st</sup> BASE (Malaysia) ผ่านบริษัท Ward Medic, Ltd. ประเทศไทย โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะของแต่ละบริเวณที่ศึกษาทั้งด้าน ปลาย 5' (forward) และด้านปลาย 3' (reverse)

ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ นำมาตรวจวิเคราะห์ ความถูกต้องด้วยโปรแกรม Chromas 1.56 (Technelysium Pty. Ltd) และต่อสายนิวคลีโอไทด์ที่อ่านทางด้าน ปลาย 5' (forward) และด้านปลาย 3' (reverse) ผ่านโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999: 95-98) จากนั้นนำไปเทียบเคียงร้อยละความเหมือน (% similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

### 6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้

#### (Phylogenetic trees)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการทดลอง และจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่าง มาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) โดยแยกตามชนิดของยีนที่ศึกษา ด้วยโปรแกรม Clustal W (Thompson; et al. 1994: 4673-4680) และตรวจสอบผลที่ได้อีกครั้งด้วยโปรแกรม BioEdit (North Carolina State University, U.S.A.; Hall, 1999: 95-98)

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยการ สร้าง แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ทั้งหมด 3 วิธี ได้แก่ neighbor joining (NJ), maximum likelihood (ML) และ maximum parsimony (MP) ด้วย โปรแกรม MEGA (Tamura; et al. 2011: 2731-2739) ซึ่งในแต่ละวิธีจะมีการกำหนดค่า ความ เชื่อมั่น (bootstrap analysis) ให้มีค่าเท่ากับ 1000 หมายถึง กำหนดให้โปรแกรมมีการสร้างแผนภูมิ วิวัฒนาการต้นไม้ซ้ำกันทั้งหมด 1000 ครั้ง เพื่อให้ได้แผนภูมิ วิวัฒนาการต้นไม้ที่มีความเป็นไปได้ มากที่สุด และพิสูจน์ว่าเป็นแผนภูมิที่ดีที่สุด และมีความถูกต้องมากที่สุด จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้ไป วิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ ลักษณะ ทางเคมี เพื่อ ใช้ในการจัด จำแนกชนิดของราสกุล *Annulohypoxylon* ต่อไป





## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การเก็บรวบรวม ตัวอย่าง และจัดจำแนกชนิดของ ราสกุล *Annulohypoxyton* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง ร่ายย่อยสลายไม้ในวงศ์ Xylariaceae จากส่วนต่างๆ ของพืชใน ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph stage) จากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ บริเวณบึงแปน และเส้นทางสำรวจธรรมชาติ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 จำนวน 117 ตัวอย่าง สามารถจัดจำแนกตามสกุลได้ 9 สกุล (genus) คือ *Annulohypoxyton* (69 ตัวอย่าง) *Biscogniauxia* (10 ตัวอย่าง) *Kretzschmaria* (2 ตัวอย่าง) *Hypoxyton* (31 ตัวอย่าง) *Nemania* (1 ตัวอย่าง) *Rosellinia* (1 ตัวอย่าง) *Stilbohypoxyton* (1 ตัวอย่าง) *Whalleya* (1 ตัวอย่าง) และ *Xylaria* (1 ตัวอย่าง) นอกจากนี้ยังได้นำตัวอย่าง ราสกุล *Annulohypoxyton* จำนวน 97 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรวบรวมได้จาก พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว บริเวณศาลาพรหม และบึงมน ในช่วงปี พ.ศ. 2550 – 2554 (เชิดชัย โพธิ์ศรี และคนอื่นๆ . 2554) และ 2 ตัวอย่าง (H130 และ H255) จากพื้นที่น้ำตกเขากระยาง จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งมีรายงานว่า เป็นเชื้อ *Annulohypoxyton* ชนิดที่ซับซ้อน (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) มาศึกษาาร่วมด้วย

ดังนั้นจำนวนตัวอย่างราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ศึกษาทั้งสิ้นเท่ากับ 168 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องสเตอริโอ ไมโครสโคป และกล้องจุลทรรศน์ มีตัวอย่างที่สมบูรณ์ 141 ตัวอย่าง สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 10 ชนิด (species) แสดงดังตาราง 20 ทั้งนี้พบว่า มีจำนวน 27 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน คิดเป็นร้อยละ 18 ของตัวอย่างราสกุล *Annulohypoxyton* ทั้งหมดที่ศึกษา

ตาราง 20 การจัดจำแนกชนิดและจำนวนราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

ชนิด	พื้นที่สำรวจ	จำนวน (ตัวอย่าง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Annulohypoxyton annulatum</i> (Schwein.: Fr.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	บึงแปน บึงมนและ เส้นทางสำรวจ ธรรมชาติ	8	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton atroroseum</i> (J.D.Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	บึงแปน ศาลาพรหม และเส้นทางสำรวจ ธรรมชาติ	15	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865

## ตาราง 20 (ต่อ)

ชนิด	พื้นที่สำรวจ	จำนวน (ตัวอย่าง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Annulohypoxyton bovei</i> var. <i>microspora</i> (J.H. Miller) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	บึงแปน บึงมนและ เส้นทางสำรวจ ธรรมชาติ	11	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton moriforme</i> (Henn.) Y.- M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	บึงแปน บึงมนและ เส้นทางสำรวจ ธรรมชาติ	15	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	บึงแปน และศาลา พรหม	6	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton multiforme</i> (Fr.: Fr.) Y.- M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	บึงแปน และเส้นทาง สำรวจธรรมชาติ	3	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton nitens</i> (Ces.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	บึงแปน บึงมน ศาลา พรหม และเส้นทาง สำรวจธรรมชาติ	30	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton purpureonitens</i> (Y.-M. Ju & J.D. Rogers) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	เส้นทางสำรวจ ธรรมชาติ	1	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton stygium</i> (Lév.) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh	บึงแปน บึงมน ศาลา พรหม และเส้นทาง สำรวจธรรมชาติ	29	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton stygium</i> var. <i>annulatum</i> (Rehm) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.- M. Hsieh	บึงแปน	4	Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865
<i>Annulohypoxyton</i> species A	บึงแปน	1	พบในการศึกษาครั้งนี้
<i>Annulohypoxyton</i> species B	บึงแปน	2	พบในการศึกษาครั้งนี้
<i>Annulohypoxyton</i> species C	บึงแปน และบึงมน	3	พบในการศึกษาครั้งนี้
<i>Annulohypoxyton</i> species D	บึงแปน	1	พบในการศึกษาครั้งนี้
<i>Annulohypoxyton</i> species E	ศาลาพรหม	1	พบในการศึกษาครั้งนี้
<i>Annulohypoxyton</i> species F	น้ำตกเขากระยาง จ.พิษณุโลก	1	Suwannasai; et al. 2013: 1-8
<i>Annulohypoxyton</i> species G	น้ำตกเขากระยาง จ.พิษณุโลก	1	Suwannasai; et al. 2013: 1-8
<i>Annulohypoxyton</i> species H	บึงแปน บึงมน ศาลา พรหม และเส้นทาง ธรรมชาติ	17	Suwannasai; et al. 2013: 1-8 และ พบในการศึกษาครั้งนี้

ราสกุล *Annulohypoxyton* ทั้ง 10 ชนิด สามารถจัดจำแนกได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นหลัก โดยเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง (Miller. 1961: 1-158; Rayner. 1970: 1-34; Ju; & Rogers. 1996: 1-365; Thienhirun. 1997: 1-355; Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865; Suwannasai; et al. 2005: 303-324; Hladki; & Romero. 2009: 733-744; Fournier; et al. 2010: 23-36; Pereira; Rogers: & Bezerra. 2010: 248-252; Suwannasai; et al. 2013: 1-8) รายละเอียดแสดงดังตาราง 21 สำหรับราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน เนื่องจากมีลักษณะบางอย่างของตัวอ่อนที่ต่างจากเอกสารอ้างอิง ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้จำนวน 8 ชนิด

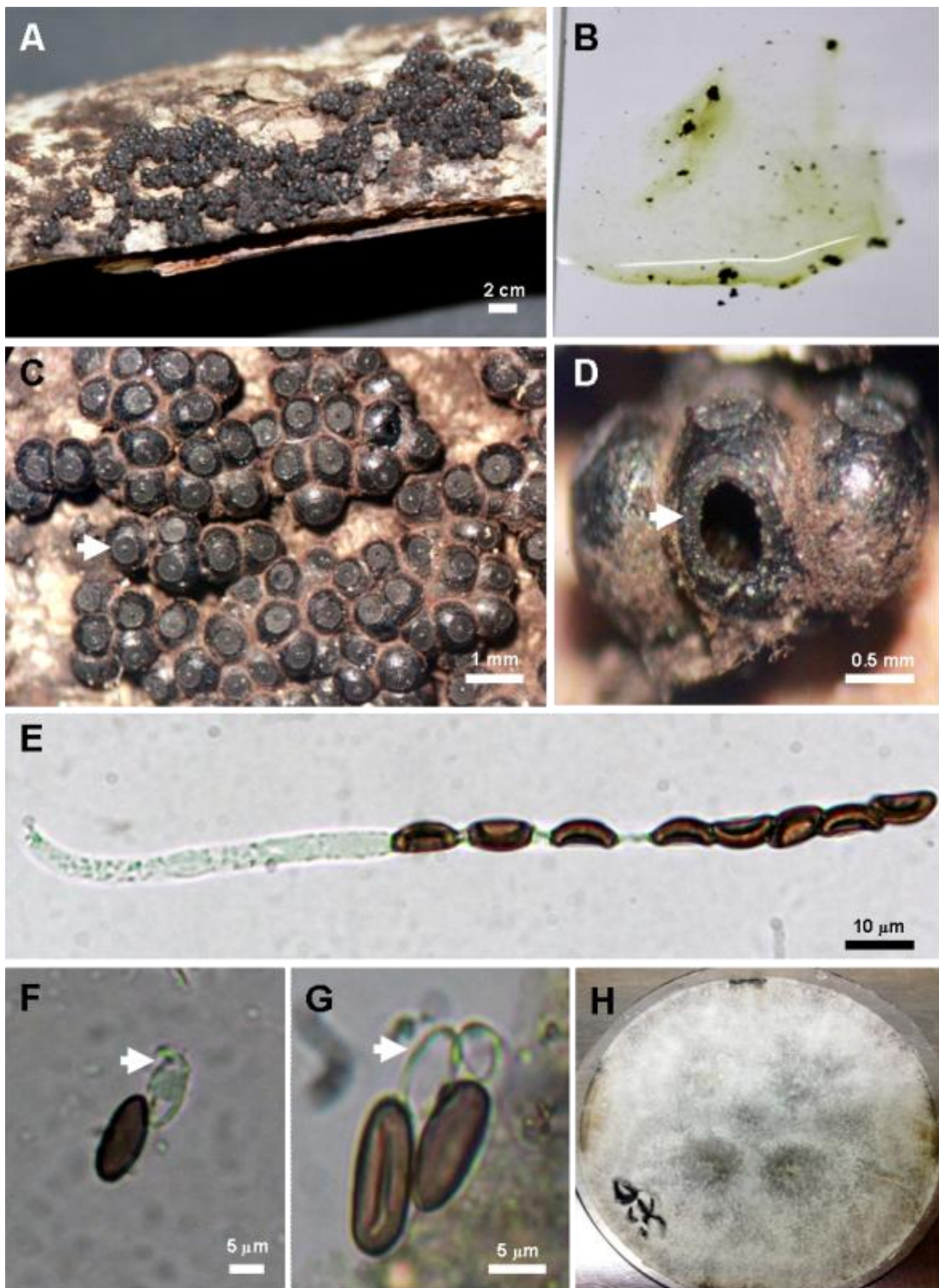
ตาราง 21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่สามารถจัดจำแนกชนิดได้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. annulatum</i>	<i>A. atroroseum</i>
สโตรมาตา (stromata)		
รูปร่าง (shape)	ลักษณะครึ่งทรงกลม (hemispherical) พบทั้งแบบนูนเป็นก้อน (glomerate) และเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate)	ลักษณะเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate)
สี (color)	เมื่ออายุน้อยจะมีสีน้ำตาล (olivaceous brown) และมีสีเข้มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น เป็นสีน้ำตาลเข้ม (blackish brown) จนถึงดำ (blackish)	สีเทาอมม่วง (vinaceous gray (116))
KOH-pigments	สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90)) หรือสีเขียวหม่น (dull green (70))	สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90)) หรือสีเขียวหม่น (dull green (70))
เพอริทีเซีย (perithecia)		
รูปร่าง (shape)	ทรงกลม (spherical) จนถึงรี (obovoid)	แบบรี (obovoid)
ขนาด (size diameter)	0.3 – 0.5 มิลลิเมตร	0.2-0.3 × 0.3-0.6 มิลลิเมตร
ออสติโอล (ostioles)	ทรงกรวยปลายแหลม (coarsely conical-papillate)	ลักษณะปลายแหลม (papillate)
แผ่นจาน (ostiolar discs)		
ชนิด (type)	<i>truncatum</i> -type	<i>truncatum</i> -type
ขนาด (disc diameter)	0.2 – 0.5 มิลลิเมตร	0.1 – 0.2 มิลลิเมตร

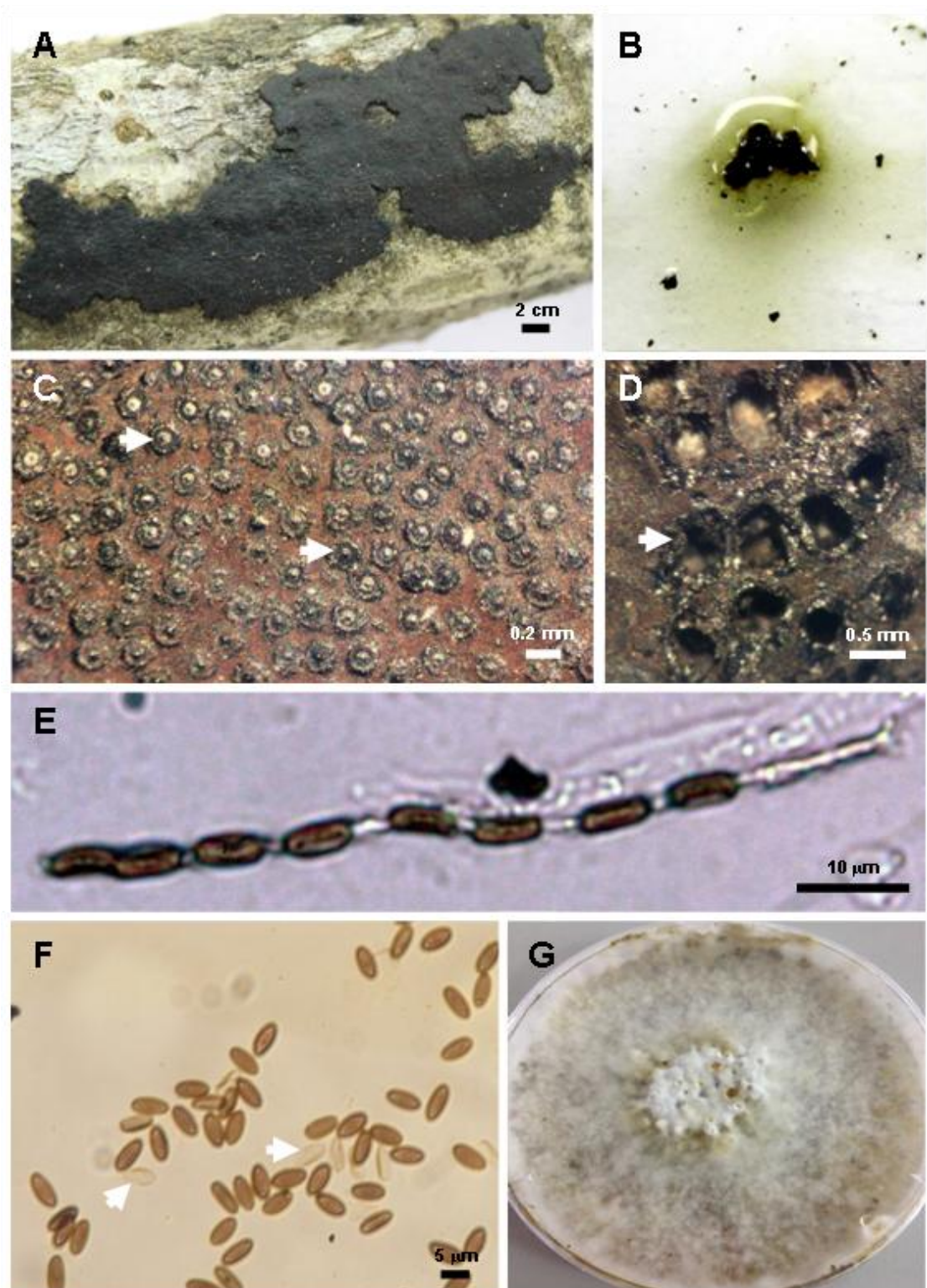
## ตาราง 21 (ต่อ)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. annulatum</i>	<i>A. atroroseum</i>
แอสโคสปอร์ (ascospores)		
สี (color)	น้ำตาล (brown) ถึงน้ำตาลเข้ม (dark brown)	น้ำตาลอ่อน (light brown)
รูปร่าง (shape)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)
ขนาด (size)	7.0-10.8 × 3.6-5.5 ไมโครเมตร	5.6-7.3 × 2.4-3.2 ไมโครเมตร
เจิร์มสลิต (germ slit)	เส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านโค้งของสปอร์ (convex side)	เส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านเรียบของสปอร์ (flattened side)
เพอริสปอร์ (perispore)	dehiscent, เรียบ (smooth)	dehiscent, เรียบ (smooth)
บริเวณที่พบ (habitat)	กิ่งไม้ และท่อนไม้	กิ่งไม้ และท่อนไม้
ตัวอย่างที่ศึกษา	PK09013, PK09014, PK10008 <sup>a</sup> *, PK121019, PK121022 <sup>a</sup> *, PK121091, PK121095 และ PK1210102	PK07001 <sup>a</sup> *, PK09019, PK09028, PK11014, PK121024 <sup>a</sup> , PK121026, PK121028 <sup>a</sup> , PK121030 <sup>a</sup> , PK121046, PK121048 <sup>a</sup> *, PK121055, PK121060, PK121098, PK1210110 และ PK1210117
ข้อสังเกต	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับ รา <i>Annulohypoxyton annulatum</i> Schwein.: Fr. (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) (ภาพประกอบ 13)	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับรา <i>Annulohypoxyton atroroseum</i> J.D. Rogers (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) (ภาพประกอบ 14)

หมายเหตุ: <sup>a</sup> คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์, \* คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษา ลักษณะทางเคมี



ภาพประกอบ 13 *Annulohypoxyton annulatum* isolate PK121022 (A และ C) สโตรมา (B) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (D) แผ่นจาน (ลูกศร) (E) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) แอสคัสที่มี 8 แอสโคสปอร์ (F) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (G) เพอริสปอร์ (ลูกศร) และเจอร์มสลิท (H) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



ภาพประกอบ 14 *Annulohypoxyton atroroseum* isolate PK121048 (A และ C) สโตรมา (B) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (C) แผ่นจาน (ลูกศร) (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) แอสคัสที่มี 8 แอสโคสปอร์ (F) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (G) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

## ตาราง 21 (ต่อ)

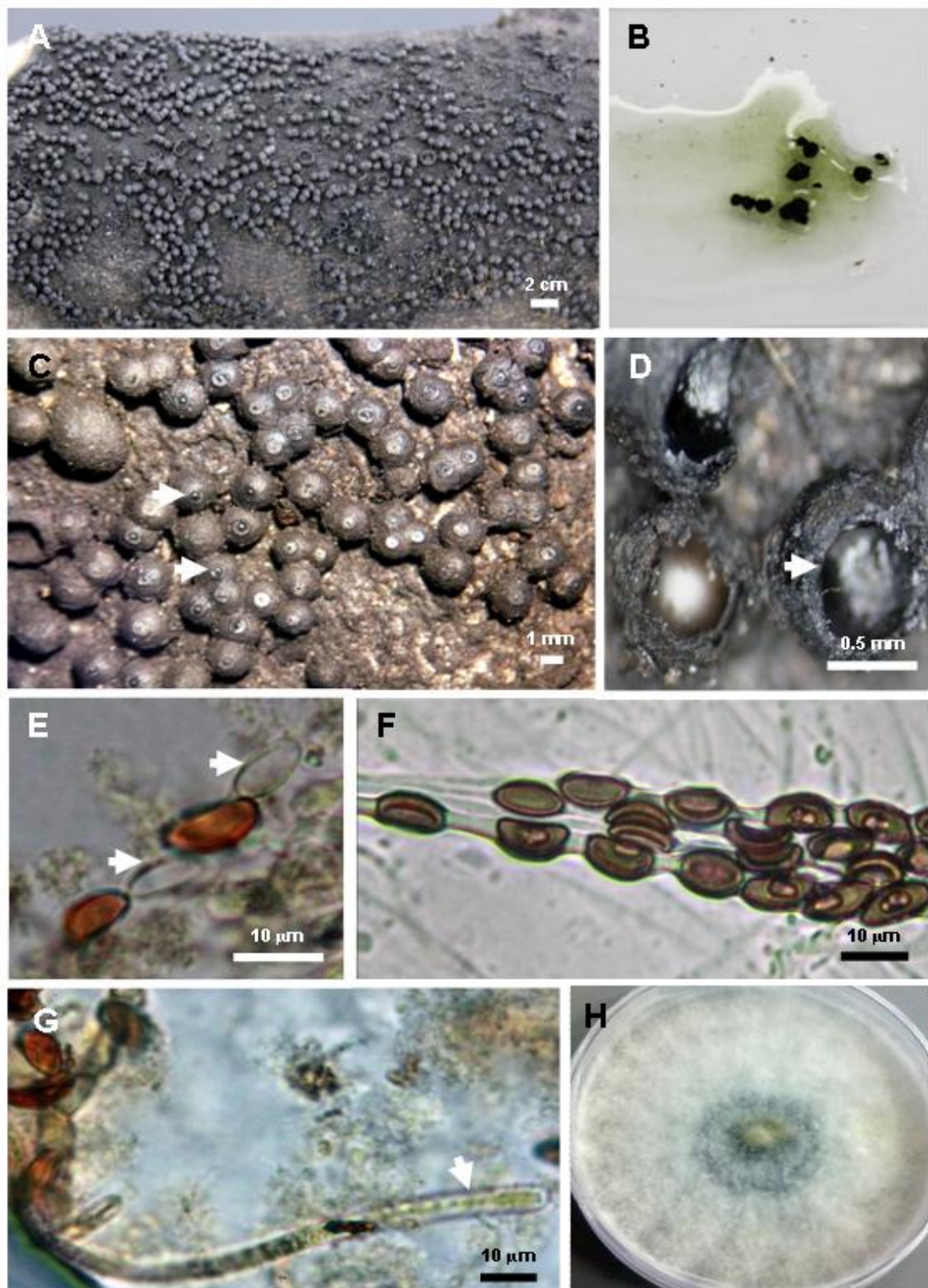
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i>	<i>A. moriforme</i>
สโตรมาตา (stromata)		
รูปร่าง (shape)	ลักษณะครึ่งทรงกลม (hemispherical) แบบเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate)	พบทั้งลักษณะนูนเป็นก้อน (glomerate), เรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) และเรียบเป็นแผ่นแบน (pulvinate)
สี (color)	สีดำ (blackish)	สีน้ำตาล (brown) และสีดำ (blackish)
KOH-pigments	สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90))	สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90)) หรือสีเขียวหม่น (dull green (70))
เพอริทีเซีย (perithecia)		
รูปร่าง (shape)	ทรงกลม (spherical)	ทรงกลม (spherical)
ขนาด (size diameter)	0.5 – 1.0 มิลลิเมตร	0.4 – 0.8 มิลลิเมตร
ออสติโอล (ostioles)		
แผ่นจาน (ostiole discs)	ลักษณะปลายแหลม (papillate)	ลักษณะปลายแหลม (papillate)
ชนิด (disc type)	<i>bovei</i> -type	<i>truncatum</i> -type
ขนาด (disc diameter)	0.3 – 0.7 มิลลิเมตร	0.2 – 0.4 มิลลิเมตร
แอสโคสปอร์ (ascospores)		
สี (color)	น้ำตาล (brown) ถึงน้ำตาลเข้ม (dark brown)	น้ำตาล (brown) ถึงน้ำตาลเข้ม (dark brown)
รูปร่าง (shape)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)
ขนาด (size)	8.0-10.2 × 3.6-4.8 ไมโครเมตร	7.0-9.0 × 2.3-4.0 ไมโครเมตร
เจอร์มสลิต (germ slit)		
	เส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านโค้งของสปอร์ (convex side)	เส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านโค้งของสปอร์ (convex side)
เพอริสปอร์ (perispore)		
	dehiscent, เรียบ (smooth)	dehiscent, เรียบ (smooth)

## ตาราง 21 (ต่อ)

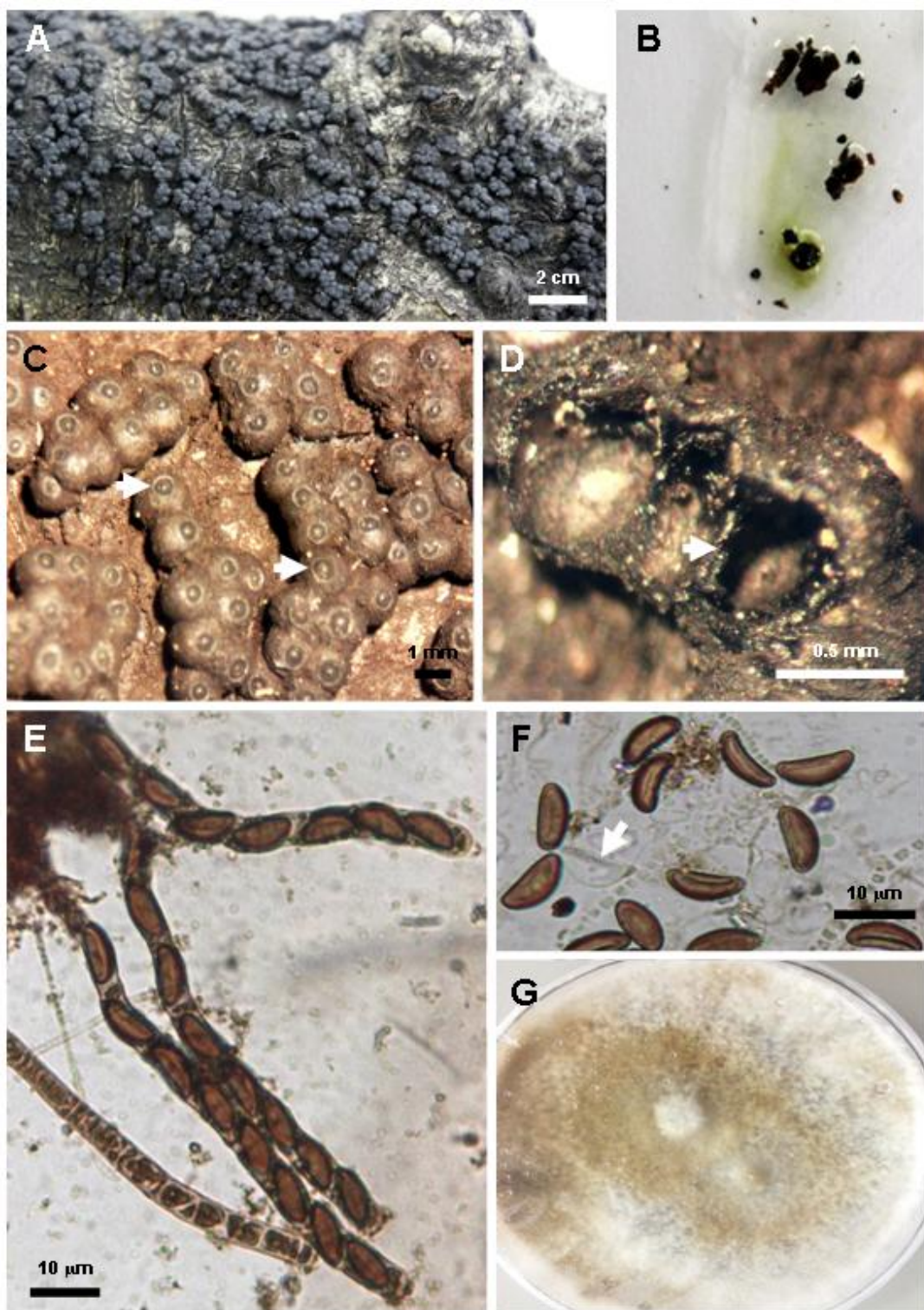
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i>	<i>A. moriforme</i>
บริเวณที่พบ (habitat)	กิ่งไม้ และท่อนไม้	กิ่งไม้ และท่อนไม้
ตัวอย่างที่ศึกษา	PK09054, PK10001, PK10002, PK10003, PK10010, PK121003 <sup>a</sup> , PK121011, PK121036, PK121069, PK121071 และ PK1210112 <sup>a*</sup>	PK09018, PK09038, PK09040, PK09050, PK09062, PK11019, PK121004, PK121016, PK121020, PK121043, PK121052, PK121065 <sup>a</sup> และ PK121067 <sup>a</sup> และ PK121090
ข้อสังเกต	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับรา <i>Annulohyphoxylon bovei</i> var. <i>microspora</i> J.H. Miller (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) (ภาพประกอบ 15)	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับรา <i>Annulohyphoxylon moriforme</i> Henn. (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) มากที่สุด นอกจากนี้ยังมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ <i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> และ <i>A. nitens</i> มาก แต่มีลักษณะของแผ่นจานแตกต่างกัน คือ เชื้อ <i>A. moriforme</i> จะมีแผ่นจานแบบ <i>truncatum</i> -type ในขณะที่ <i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> และ <i>A. nitens</i> จะมีแผ่นจานแบบ <i>bovei</i> -type (ภาพประกอบ 16)

หมายเหตุ: <sup>a</sup> คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์, \* คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษา ลักษณะทางเคมี





ภาพประกอบ 15 *Annulohypoxyton bovei* var. *microspora* isolate PK1210112 (A และ C) สโตรมา (B) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (C) แผ่นจาน (ลูกศร) (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (F) แอสโคสปอร์ (G) พาราไฟซิส (paraphysis) (ลูกศร) (H) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



ภาพประกอบ 16 *Annulohypoxyton moriforme* isolate PK121067 (A และ C) สไตรมา (B) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (C) แผ่นจาน (ลูกศร) (E) เพอริทีเซีย(ลูกศร) (E) แอสไซที่มี 8 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส (F) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (G) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

## ตาราง 21 (ต่อ)

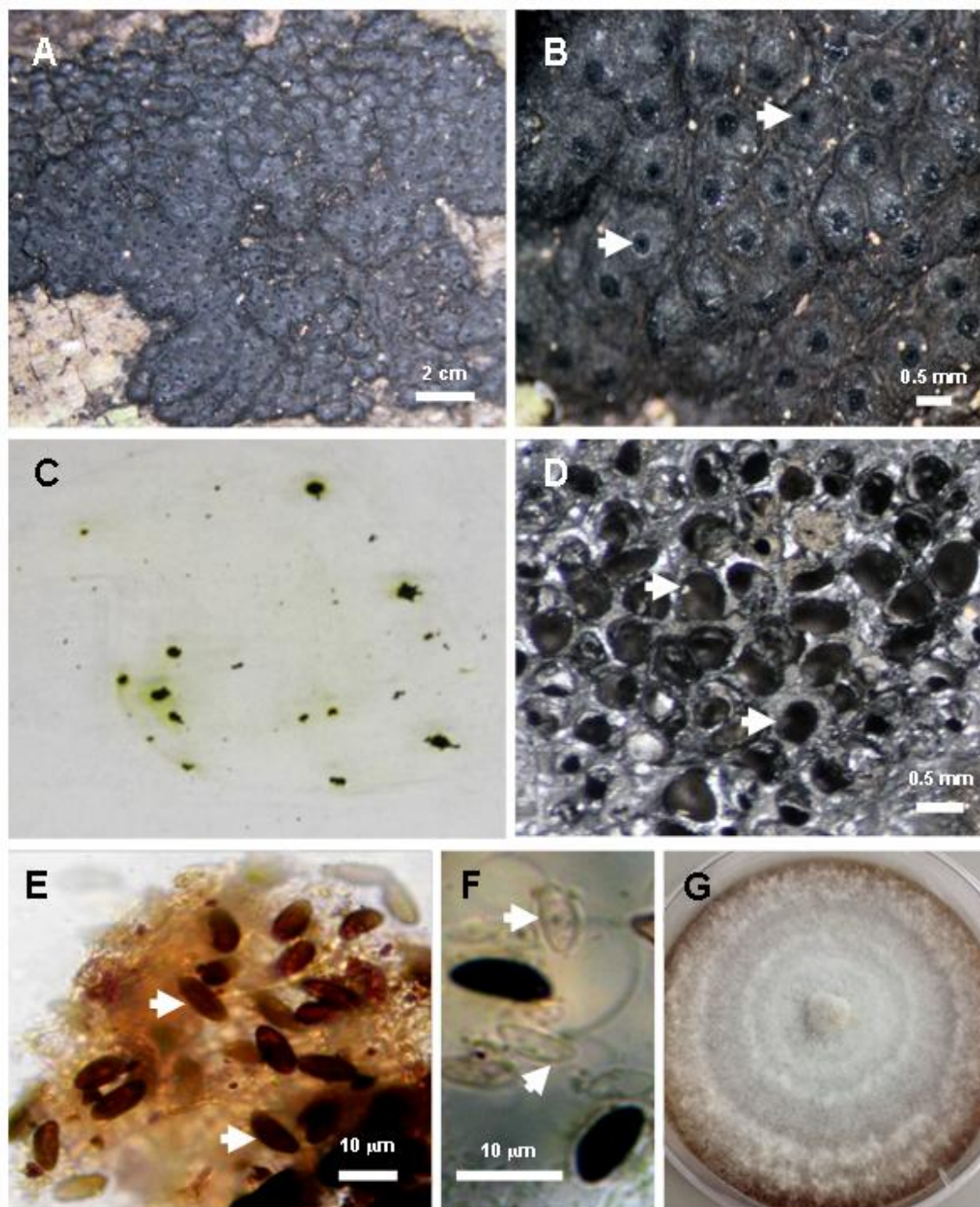
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	<i>A. multiforme</i>
สโตรมาตา (stromata)		
รูปร่าง (shape)	พบทั้ง ลักษณะนูนเป็นก้อน (glomerate), เรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) และเรียบเป็นแผ่นแบน (pulvinate)	ลักษณะครึ่งทรงกลม (hemispherical) แบบรูปกลมคล้ายโล่ (peltate) หรือรูปกรวยกลับหัว (obconical)
สี (color)	สีดำ (blackish)	สีน้ำตาลเข้ม (dark brown) จนถึงสีดำ (blackish)
KOH-pigments	สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90))	สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90)) หรือ สีเขียว (olivaceous (48))
เพอริทีเซีย (perithecia)		
รูปร่าง (shape)	ทรงกลม (spherical)	แบบรี (obovoid)
ขนาด (size diameter)	0.3 – 0.5 มิลลิเมตร	0.4-0.6 × 0.5-0.7 มิลลิเมตร
ออสติโอล (ostioles)	ลักษณะปลายแหลม (papillate)	ทรงกรวยปลายแหลม (conical-papillate)
แผ่นจาน (ostiole discs)		
ชนิด (disc type)	<i>truncatum</i> -type	<i>truncatum</i> -type
ขนาด (disc diameter)	0.2 – 0.3 มิลลิเมตร	0.2 – 0.4 มิลลิเมตร
แอสโคสปอร์ (ascospores)		
สี (color)	น้ำตาล (brown) ถึงน้ำตาลเข้ม (dark brown)	น้ำตาลอ่อน (light brown) ถึงน้ำตาล (brown)
รูปร่าง (shape)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)
ขนาด (size)	10.0-12.5 × 3.8-5.0 ไมโครเมตร	8.0-11.5 × 3.3-5.5 ไมโครเมตร
เจอร์มสลิต (germ slit)	เส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านโค้งของสปอร์ (convex side)	เส้นตรงมีความยาวน้อยกว่าความยาวของสปอร์ (straight nearly full length)
เพอริสปอร์ (perispore)	dehiscent, เรียบ (smooth)	dehiscent, เรียบ (smooth)
บริเวณที่พบ (habitat)	กิ่งไม้ และท่อนไม้	กิ่งไม้ และท่อนไม้
ตัวอย่างที่ศึกษา	PK07008 <sup>a</sup> *, PK07012 <sup>a</sup> *, PK07013 <sup>a</sup> *, PK09006, PK10004 และ PK121094	PK121041, PK121042 <sup>a</sup> และ PK121047

## ตาราง 21 (ต่อ)

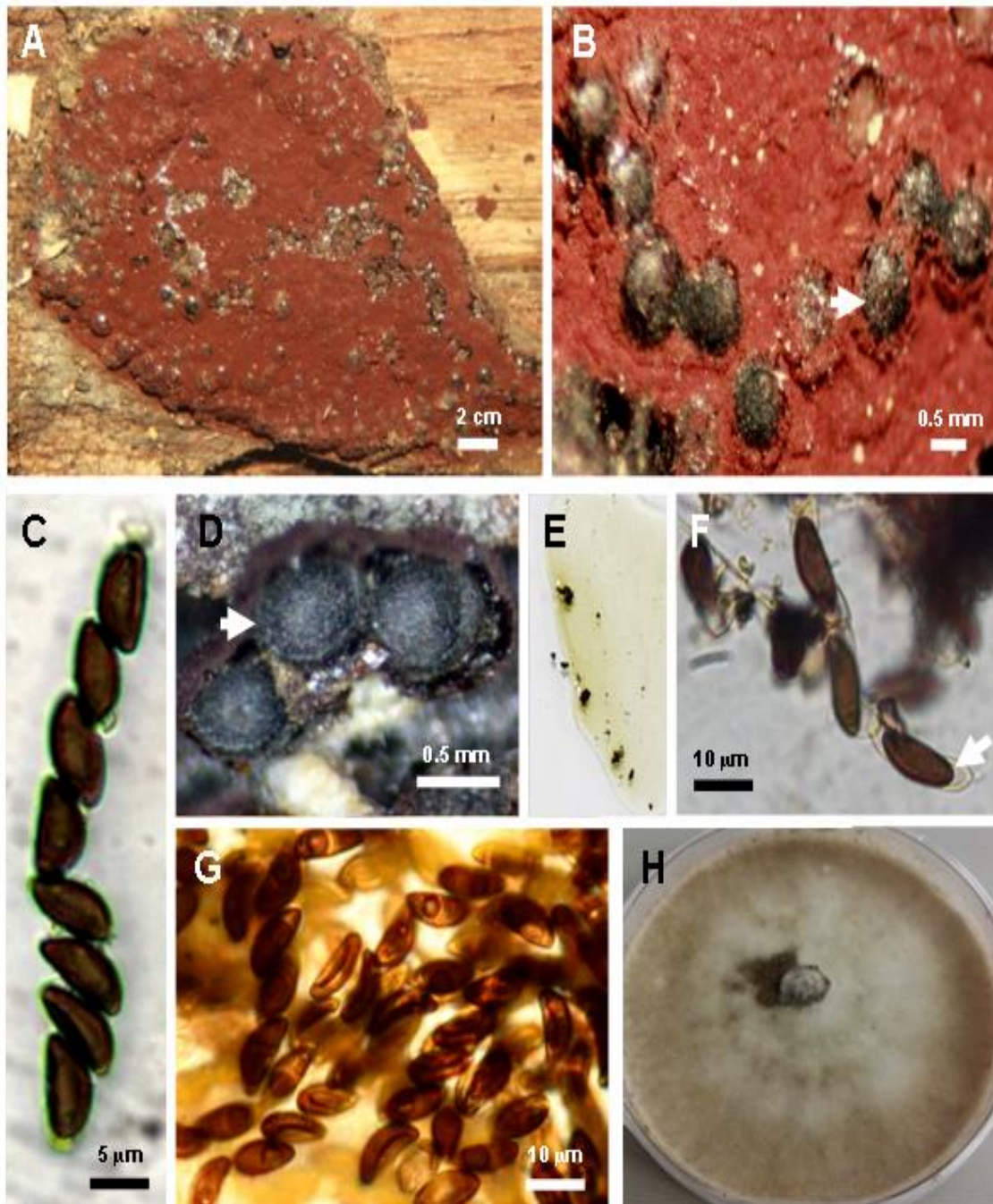
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	<i>A. multiforme</i>
ข้อสังเกต	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับ รา <i>Annulohypoxyton moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> Y.-M. Ju & J.D. Rogers (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) (ภาพประกอบ 17)	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับ รา <i>Annulohypoxyton multiforme</i> Fr.: Fr. (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) (ภาพประกอบ 18)

หมายเหตุ: <sup>a</sup> คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์, \* คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษา ลักษณะทางเคมี





ภาพประกอบ 17 *Annulohypoxyton moriforme* var. *microdiscus* isolate PK07012 (A-B) สโตรมา และ แผ่นจาน (ลูกศร) (C) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) แอสโคสปอร์ (ลูกศร) (F) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (G) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



ภาพประกอบ 18 *Annulohypoxyton multifforme* isolate PK121042 (A - B) สไตรมา และ แผ่นจาน (ลูกศร) (C) แอสโคสปอร์ที่มี 8 แอสโคสปอร์ (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (F) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (G) แอสโคสปอร์ (H) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

## ตาราง 21 (ต่อ)

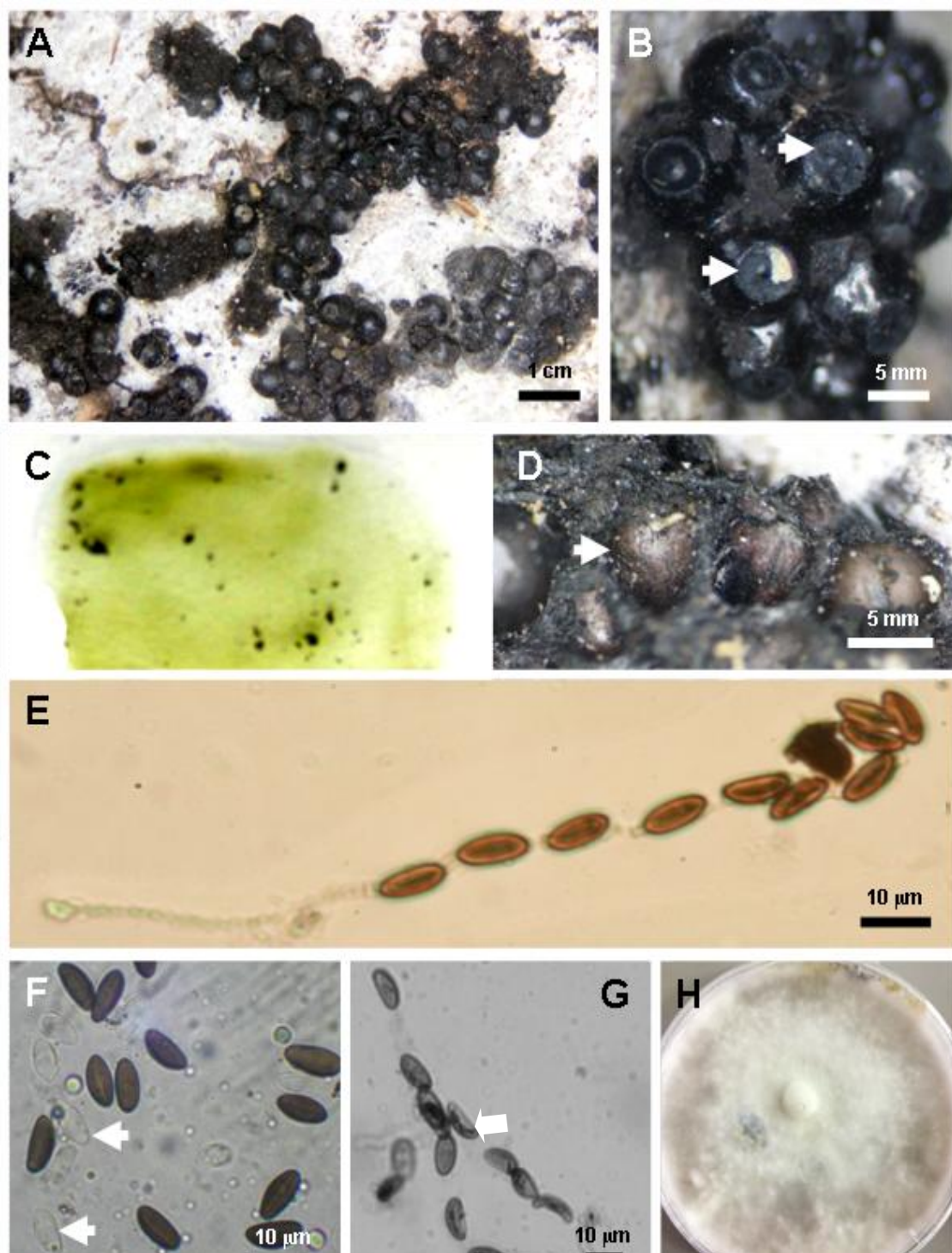
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. nitens</i>	<i>A. purpureonitens</i>
สโตรมาตา (stromata)		
รูปร่าง (shape)	ลักษณะครึ่งทรงกลม (hemispherical) พบทั้งแบบ หนูนเป็นก้อน (glomerate) และเรียบกึ่งหนูน (effused-pulvinate)	ลักษณะครึ่งทรงกลม (hemispherical) พบทั้งแบบ หนูนเป็นก้อน (glomerate) และเรียบกึ่งหนูน (effused-pulvinate)
สี (color)	เมื่ออายุน้อยจะมีสีน้ำตาล เข้ม (dark brown vinaceous (84)) และเปลี่ยนเป็นสีดำ (blackish) เมื่ออายุมากขึ้น จนโตเต็มที่ เป็นสีดำมันเงา (shiny black)	สีดำ (blackish) หรือดำอมน้ำตาล (blackish with reddish brown tone)
KOH-pigments	สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90))	สีม่วงแดง (vinaceous purple (101))
เพอริทีเซีย (perithecia)		
รูปร่าง (shape)	ทรงกลม (spherical)	ทรงกลม (spherical)
ขนาด (size diameter)	0.4 – 0.8 มิลลิเมตร	0.4 – 0.8 มิลลิเมตร
ออสติโอล (ostioles)	ทรงกรวยปลายแหลม (conical-papillate)	ทรงกรวยปลายแหลม (conical-papillate)
แผ่นจาน (ostiolar discs)		
ชนิด (disc type)	bovei-type	bovei-type
ขนาด (disc diameter)	0.2 – 0.5 มิลลิเมตร	0.2 - 0.3 มิลลิเมตร
แอสโคสปอร์ (ascospores)		
สี (color)	น้ำตาลอ่อน (light brown) ถึงน้ำตาล (brown)	น้ำตาล (brown)
รูปร่าง (shape)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)
ขนาด (size)	6.2-10.5 × 3.5-4.8 ไมโครเมตร	7.5-9.6 × 3.3-4.8 ไมโครเมตร
เจอร์มสลิต (germ slit)	เส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านโค้งของสปอร์ (convex side)	เส้นตรง ความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านโค้งของสปอร์ (convex side)
เพอริสปอร์ (perispore)	dehiscent, เรียบ (smooth)	dehiscent, เรียบ (smooth)
บริเวณที่พบ (habitat)	กิ่งไม้ และท่อนไม้	กิ่งไม้ และท่อนไม้

## ตาราง 21 (ต่อ)

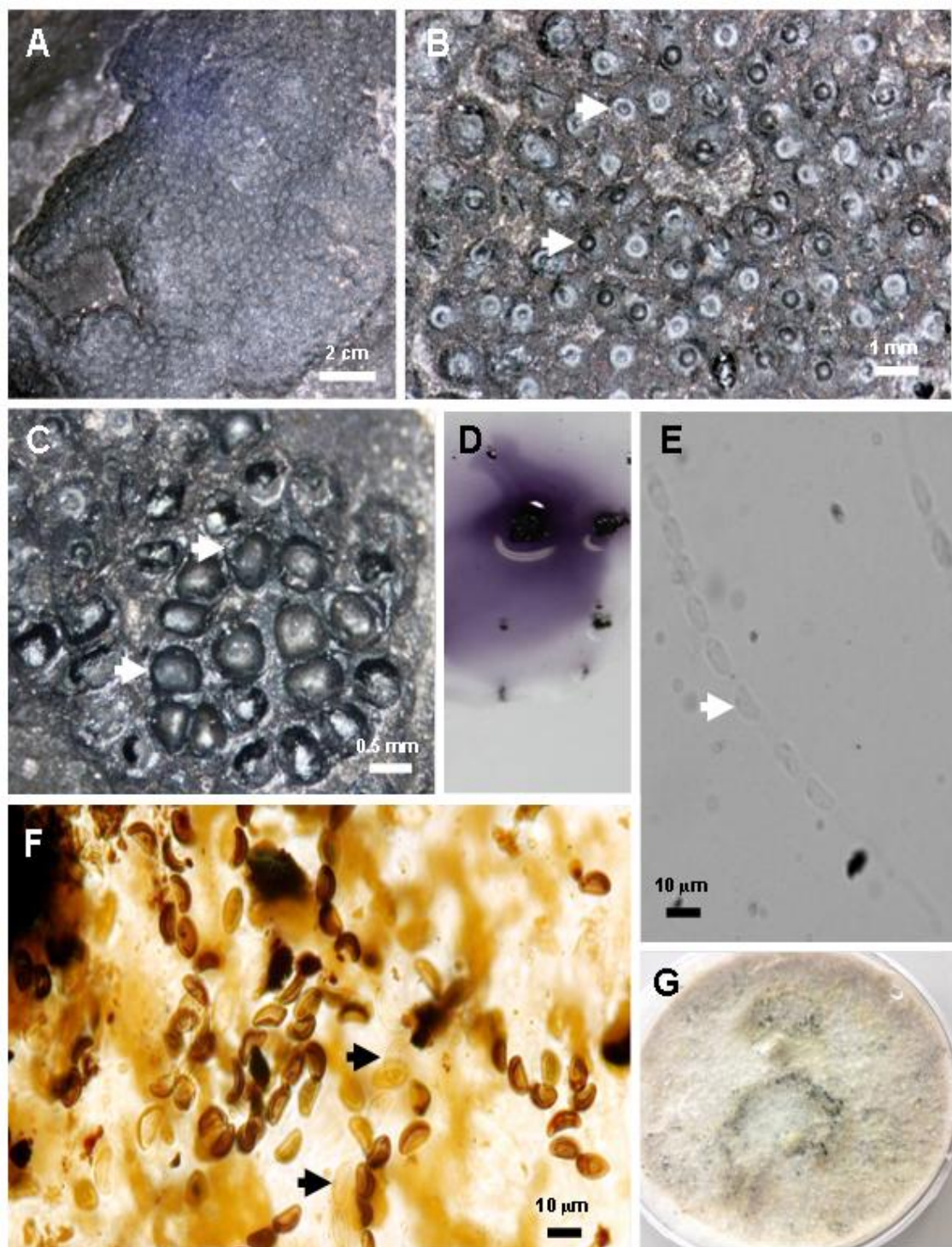
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. nitens</i>	<i>A. purpureonitens</i>
ตัวอย่างที่ศึกษา	H154 <sup>a</sup> , H157 <sup>a</sup> , H189 <sup>a</sup> , H197 <sup>a</sup> , PK07011, PK07014, PK07018, PK09010, PK09011, PK09012, PK09016, PK09042, PK09044, PK09051, PK11002, PK11009, PK11017, PK121006, PK121009, PK121015, PK121044 <sup>a*</sup> , PK121051, PK121057, PK121063 <sup>a</sup> , PK121071, PK121074 <sup>a</sup> , PK121075 <sup>a</sup> , PK121077, PK121080 <sup>a</sup> และ PK121086 <sup>a*</sup>	PK10006 <sup>a*</sup>
ข้อสังเกต	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับ รา <i>Annulohypoxyloa nitens</i> Ces.(Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) แม้ว่ารา ชนิดนี้จะมีควมคล้ายคลึงกับ <i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> และ <i>A. moriforme</i> แต่ลักษณะสำคัญของรา ชนิดนี้คือ สี สโตรมา ของรา เมื่ออายุน้อยจะมีสีน้ำตาลเข้ม (dark brown(84)) และเมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีดำ (blackish) จนโตเต็มทีกลายเป็นสีดำมันเงา (shiny black) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่ใช้ช่วยในการจัดจำแนกได้ (ภาพประกอบ 19)	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับ รา <i>Annulohypoxyloa purpureonitens</i> Y.-M. Ju & J.D. Rogers (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) ราชนิดนี้จะมีควมคล้ายคลึงกับ <i>A. nitens</i> มาก แตกต่างกันเพียงสีของ สโตรมา เมื่อทำปฏิกิริยาสารละลาย KOH เข้มข้น 10% รา <i>A. purpureonitens</i> จะเกิดสีม่วงแดง (vinaceous purple (101)) ในขณะที่ <i>A. nitens</i> จะเกิดสีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90)) (ภาพ ประกอบ 20)

หมายเหตุ: <sup>a</sup> คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์, \* คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษา ลักษณะทางเคมี





ภาพประกอบ 19 *Annulohyphoxylon nitens* isolate PK121044 (A-B) สโตรมา และแผ่นจาน (ลูกศร) (C) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) แอสตัส และแอสโคสปอร์ (F) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (G) แอสโคสปอร์ และเจอร์มิสลิท (ลูกศร) (H) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



ภาพประกอบ 20 *Annulohyphoxylon purpureonitens* isolate PK10006 (A-B) สโตรมา และแผ่นจาน (ลูกศร) (C) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (D) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (E) แอสคัส ที่มี 8 แอสโคสปอร์ (ลูกศร) (F) แอสโคสปอร์ และเพอริสปอร์ หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (G) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

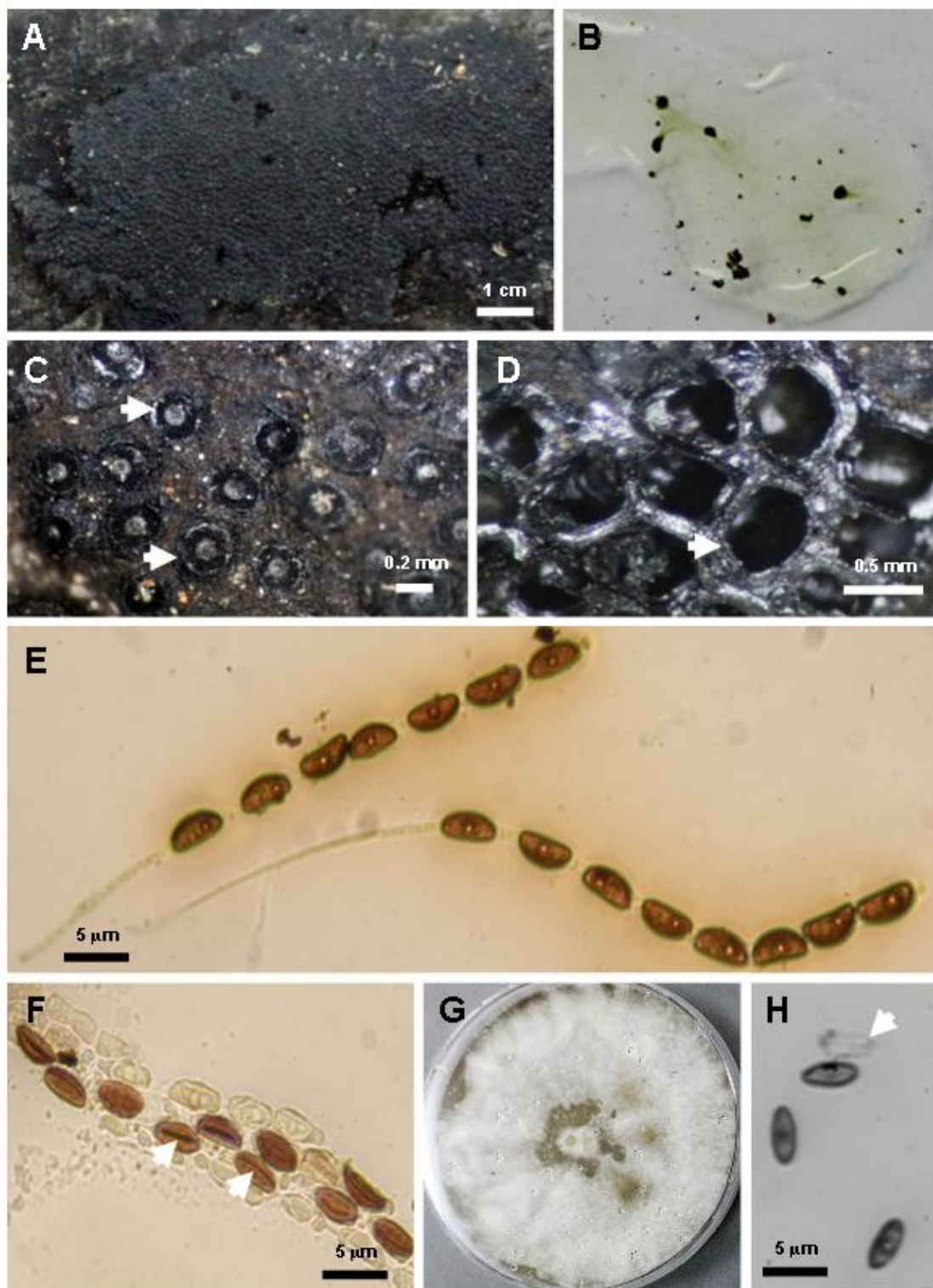
ตาราง 21 (ต่อ)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. stygium</i>	<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i>
สโตรมาตา (stromata)		
รูปร่าง (shape)	ลักษณะเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) และเรียบเป็นแผ่นแบน (pulvinate)	ลักษณะครึ่งทรงกลม (hemispherical) แบบเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate)
สี (color)	สีดำ (blackish) หรือดำอมน้ำตาล (blackish with reddish brown tone)	สีน้ำตาลดำ (blackish brown) จนถึงสีดำ (blackish)
KOH-pigments	สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous (90)) หรือสีเขียวหม่น (dull green (70))	สีเขียวหม่น (dull green (70))
เพอริทีเซีย (perithecia)		
รูปร่าง (shape)	แบบรี (obovoid) จนถึงทรงกระบอก (tubular)	แบบรี (obovoid)
ขนาด (size diameter)	0.2-0.3 × 0.3-0.5 มิลลิเมตร	0.3-0.4 × 0.5-0.7 มิลลิเมตร
ออสติโอล (ostioles)	ลักษณะปลายแหลม (papillate)	ลักษณะปลายแหลม (papillate)
แผ่นจาน (ostiolar discs)		
ชนิด (disc type)	<i>truncatum</i> -type	<i>truncatum</i> -type
ขนาด (disc diameter)	0.1 – 0.2 มิลลิเมตร	0.3 – 0.4 มิลลิเมตร
แอสโคสปอร์ (ascospores)		
สี (color)	น้ำตาลอ่อน (light brown)	น้ำตาลอ่อน (light brown) ถึงน้ำตาล (brown)
รูปร่าง (shape)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)	รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends)
ขนาด (size)	5.6-7.5 × 2.4-3.3 ไมโครเมตร	5.0-7.4 × 2.2-3.7 ไมโครเมตร
เจอร์มสลิต (germ slit)	เส้นตรงความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านเรียบของสปอร์ (flattened side)	เส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ (straight full length) พบบนด้านเรียบของสปอร์ (flattened side)
เพอริสปอร์ (perispore)	dehiscent, เรียบ (smooth)	dehiscent, เรียบ (smooth)
บริเวณที่พบ (habitat)	กิ่งไม้ และท่อนไม้	กิ่งไม้ และท่อนไม้

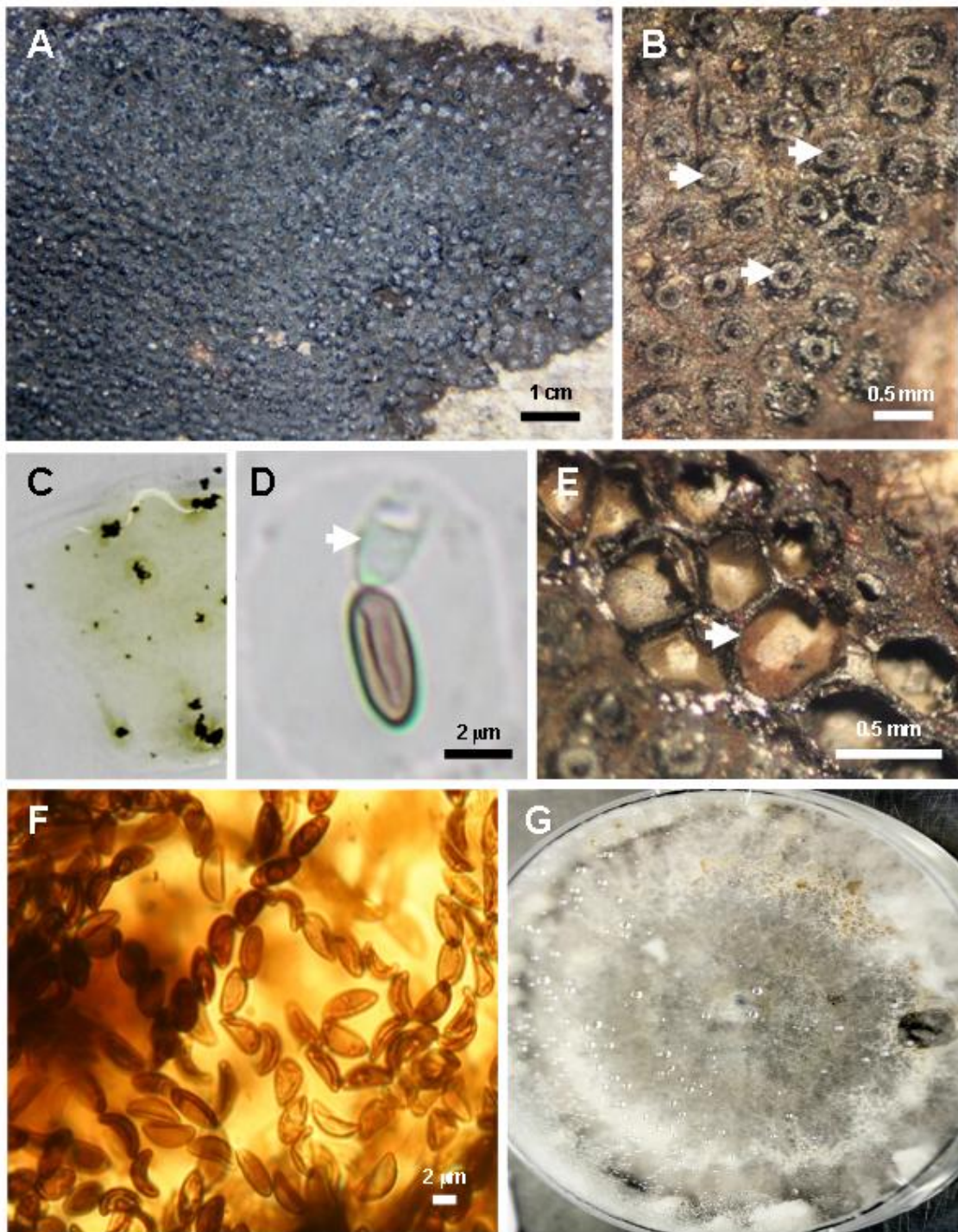
## ตาราง 21 (ต่อ)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	<i>A. stygium</i>	<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i>
ตัวอย่างที่ศึกษา	PK07005, PK07009, PK09002, PK09009, PK09030 <sup>a</sup> , PK09033, PK09037, PK09039, PK09041, PK09046, PK09061, PK11006, PK11007, PK11013 <sup>a</sup> , PK11018, PK11020, PK121007 <sup>a*</sup> , PK121010 <sup>a</sup> , PK121014, PK121045, PK121064, PK121072 <sup>a</sup> , PK121084, PK121092, PK121093, PK1210107 และ PK1210109 <sup>a</sup>	PK121034, PK121058, PK121073 และ PK1210114
ข้อสังเกต	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทาง สัณฐานวิทยา ตรงกับ รา <i>Annulohyphoxylon stygium</i> Lév. (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) (ภาพประกอบ 21)	ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรงกับ รา <i>Annulohyphoxylon stygium</i> var. <i>annulatum</i> Rehm. (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005) นอกจากนี้ยังมี ความใกล้เคียงกับรา <i>A. stygium</i> มาก แต่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นจานของ <i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> จะมีขนาดใหญ่กว่า คือ มีขนาด 0.3-0.4 มิลลิเมตร ในขณะที่ <i>A. stygium</i> มีขนาดเล็กเพียง 0.1-0.2 มิลลิเมตร (ภาพประกอบ 22)

หมายเหตุ: <sup>a</sup> คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์, \* คือตัวอย่างที่เลือกมาศึกษา ลักษณะทางเคมี



ภาพประกอบ 21 *Annulohyphoxylon stygium* isolate PK121007 (A และ C) สโตรมา และแผ่นจาน (ลูกศร) (B) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) แอสไซที่มี 8 แอสโคสปอร์ ต่อแอสคัส (F) เจิร์มสลิท (ลูกศร) (G) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (H) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร)



ภาพประกอบ 22 *Annulohypoxyton stygium* var. *annulatum* isolate PK121058 (A-B) สโตรมา และแผ่นจาน (ลูกศร) (C) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (D) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (E) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (F) แอสโคสปอร์ (G) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

สำหรับตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 27 ตัวอย่าง ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกับรา ชนิดอื่นมากกว่า 1 ชนิด หรือมีลักษณะที่แตกต่างจากราที่ระบุชนิดแล้วบางประการ ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้ 8 ชนิด ดังนี้

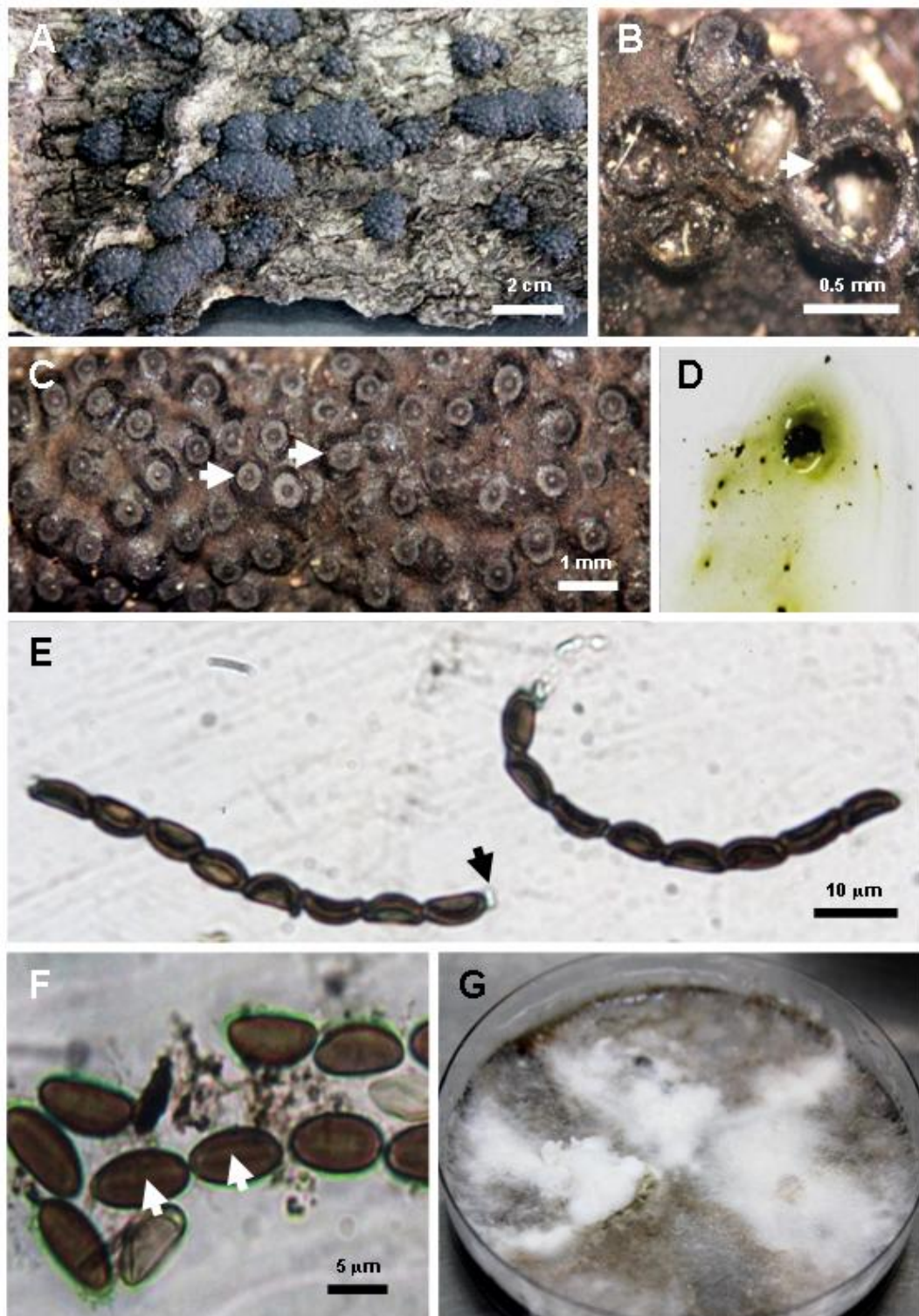
### ***Annulohyphoxylon* species A**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PK121027 (ภาพประกอบ 23)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา: สโตรมาเป็นแบบครึ่งทรงกลม (hemispherical) เรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) มีสีดำ ขนาดกว้าง × ยาว × หนา เท่ากับ 0.3-0.9 × 0.7-2.0 × 0.1-0.2 เซนติเมตร และเมื่อทดสอบการเกิดสีของผิวสโตรมากับสารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10% พบว่ามีสีเขียวมะกอก (90) เพอริทีเซียเป็นแบบทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.6 มิลลิเมตร ออสดีโอลมีลักษณะปลายแหลม ล้อมรอบด้วยแผ่นจานแบบ *bovei*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3-0.5 มิลลิเมตร

แอสไซมีรูปร่างคล้ายกระบอง มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 3-5 × 65-80 ไมโครเมตร (วัดขนาดจาก 8 แอสไซ) ใน 1 แอสคัส มี 8 แอสโคสปอร์ ที่ปลายแอสไซพบเอพิคอล แอปพาราทัสที่ไม่ติดสีน้ำเงินของสารละลาย Melzer's มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 0.2-0.5 × 0.3-0.6 ไมโครเมตร แอสโคสปอร์สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล ลักษณะรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบขนาด 4.2-7.4 × 2.1-3.5 ไมโครเมตร พบเจอร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์บนด้านเรียบของสปอร์ เมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% จะพบเพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์มีลักษณะเรียบ

ข้อสังเกต : ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาข้างต้นมีความคล้ายคลึงกับ รา *Annulohyphoxylon moriforme* Henn. Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) แต่แอสโคสปอร์ของราชนิดนี้มีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าคือเท่ากับ 6.0-9.0 × 2.5-4.0 ไมโครเมตร และมีลักษณะแผ่นจานเป็นแบบ *truncatum*-type ในขณะที่ราตัวอย่าง PK121027 มีลักษณะแผ่นจานแบบ *bovei*-type คล้ายกับ *A. nitens* แต่ราตัวอย่างต่างจาก *A. nitens* คือลักษณะของสโตรมาไม่ดำมันซึ่งเป็นลักษณะเด่น ของรา *A. nitens* และมีขนาดของแอสโคสปอร์ค่อนข้างใหญ่กว่าเล็กน้อยคือ 6.5-10(-11) × 3-4.5 ไมโครเมตร นอกจากนี้พบว่าขนาดของแอสไซของ *A. nitens* ยาวกว่าคือมีขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 4-5 × 110-140 ไมโครเมตร ด้วยเหตุนี้จึงยังไม่สามารถระบุชนิดของราตัวอย่าง PK121027 ได้



ภาพประกอบ 23 *Annulohypoxyylon* species A isolate PK121027 (A และ C) สโตรมา และแผ่นจาน (ลูกศร) (B) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (D) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (E) แอสไซและเอพิคอล แอพพาราทัส (ลูกศร) (F) แอสโคสปอร์ และเจิร์มสลิท (ลูกศร) (G) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



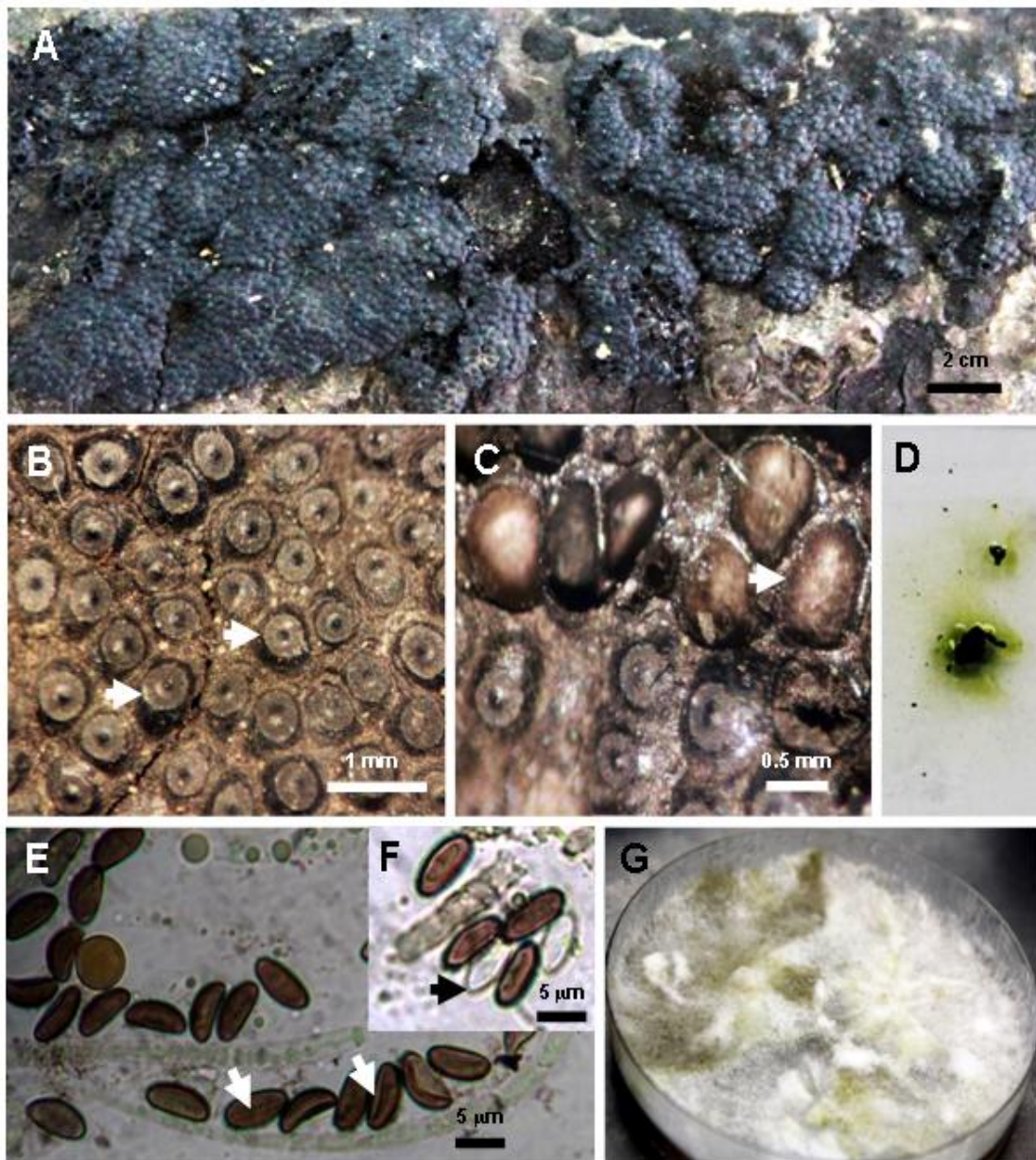
### ***Annulohyphoxylon species B***

ตัวอย่างที่ศึกษา: PK121012 และ PK121050 (ภาพประกอบ 24)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา: สโตรมาเป็นแบบเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) และแบบนูนเป็นก้อน (glomerate) มีสีดำ ขนาดกว้าง × ยาว × หนา เท่ากับ 0.20-2.50 × 0.30-3.00 × 0.10-0.15 เซนติเมตร และเมื่อทดสอบ การเกิดสีของผิวสโตรมากับ สารละลาย โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% พบว่า มีสีเขียวมะกอก (90) เพอริทีเซียเป็นแบบทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.4(-0.7) มิลลิเมตร ออสติโอ ลมีลักษณะปลายแหลม ล้อมรอบด้วยแผ่นจานแบบ *bovei*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3-0.5 มิลลิเมตร

แอสไซมีรูปร่างแบบกระบอง มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 3.5-4.8 × 78-110 ยาว ไมโครเมตร (วัดขนาดจาก 7 แอสไซ) ใน 1 แอสคัส มี 8 แอสโคสปอร์ ที่ปลายแอสไซพบเอพิคอล แอปพาราตัสที่ไม่ติดสีน้ำเงินของสารละลาย Melzer's มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 0.8-1.2 × 1.3-1.5 ไมโครเมตร แอสโคสปอร์สีน้ำตาลลักษณะรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ ขนาด 3.9-6.7 × 1.6-2.7(-3.4) ไมโครเมตร พบเจอร์มสลิท เป็นเส้นตรงมีความยาว เท่ากับความยาวสปอร์บนด้านเรียบของสปอร์ เมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% จะพบ เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์มีลักษณะเรียบ

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่กล่าว มาข้างต้นมีความคล้ายคลึงกับรา *Annulohyphoxylon bovei* var. *microspora* J.H. Miller Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) แต่แอสโคสปอร์ของรา ชนิดนี้จะมีขนาดใหญ่กว่า คือ 8.5-10.5 × 4.0-5.0 ไมโครเมตร และพบเจอร์มสลิทบนด้านโค้งของสปอร์ และเมื่อเปรียบเทียบ รา ตัวอย่าง PK121012 และ PK121050 กับ *A. nitens* พบว่ามีลักษณะสโตรมาที่ไม่ ดำมัน และขนาด แอสโคสปอร์ของ *A. nitens* ใหญ่กว่าคือมีค่าเท่ากับ 6.5-10 × 3-4.5 ไมโครเมตร



ภาพประกอบ 24 *Annulohypoxyton* species B isolate PK121012 (A-B) สโตรมา และแผ่นจาน (ลูกศร) (C) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (D) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (E) แอสโคสปอร์ และเจอร์มสลิท (ลูกศร) (F) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (G) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

### ***Annulohypoxyton species C***

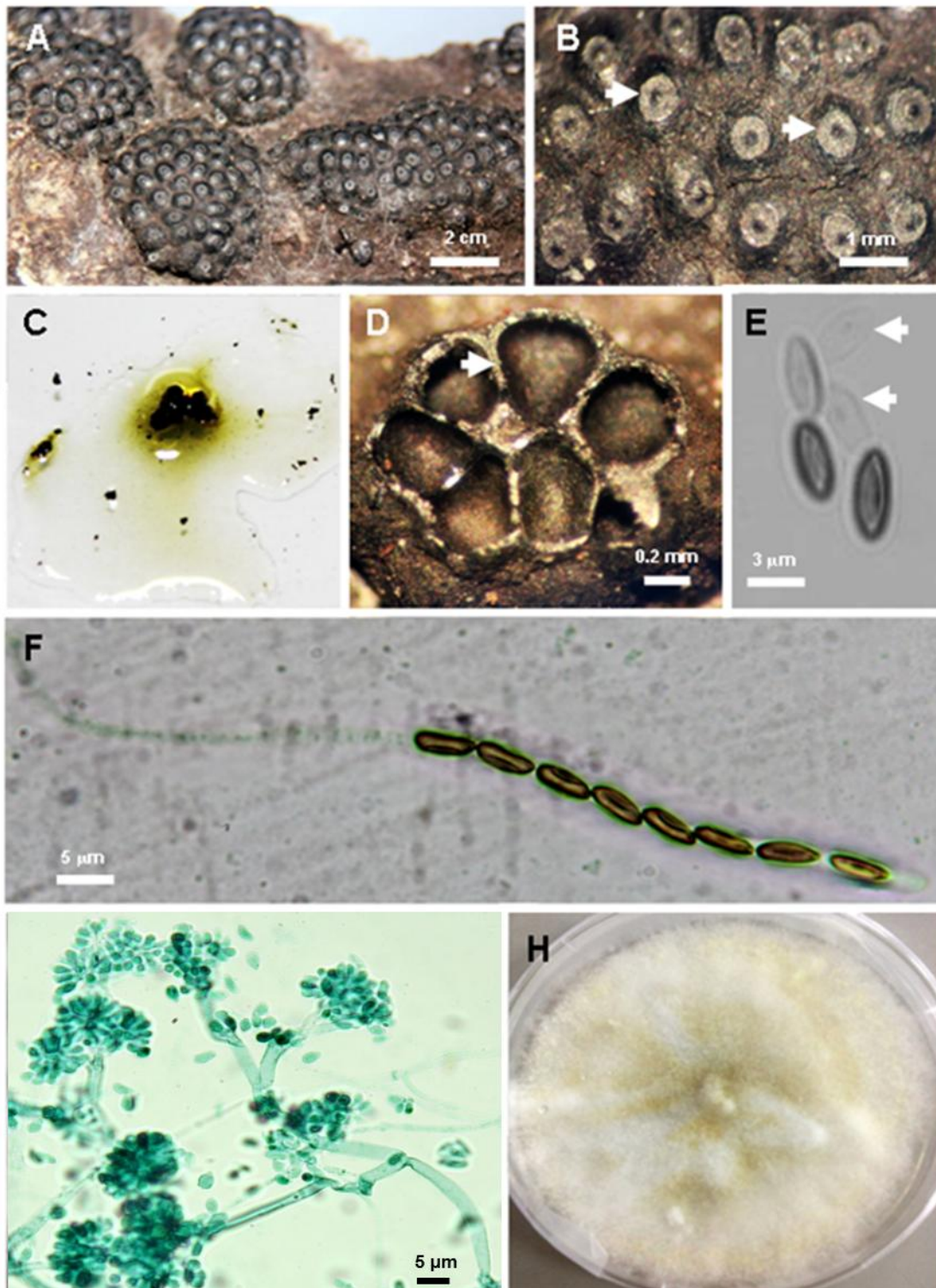
ตัวอย่างที่ศึกษา: PK10007, PK121008 และ PK1210103 (ภาพประกอบ 25)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา: สโตรมาเป็นแบบครึ่งทรงกลม (hemispherical) เรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) และแบบนูนเป็นก้อน (glomerate) มีสีดำ ขนาดกว้าง × ยาว × หนา เท่ากับ (0.3) 0.6-3.7 × 0.8-5.5 × 0.1-0.2 เซนติเมตร และเมื่อทดสอบการเกิดสีของผิวสโตรมากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% พบว่า มีสีเขียวมะกอก (90) เพอร์ที่เขียวเป็นแบบทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.4 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะปลายแหลม ล้อมรอบด้วยแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.4 มิลลิเมตร

แอสไซมีรูปร่างแบบกระบอก มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 2-3 × 54-78 ไมโครเมตร (วัดขนาดจาก 12 แอสไซ) ใน 1 แอสคัส มี 8 แอสโคสปอร์ ที่ปลายแอสไซพบเอพิคอล แอปพาราทัสที่ไม่ติดสีน้ำเงินของสารละลาย Melzer's มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 0.2-0.3 × 1.2-1.7 ไมโครเมตร แอสโคสปอร์สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล ลักษณะรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ ขนาด (3.7)4.1-6.8 × 2.5-3.7 ไมโครเมตร พบเจิร์มสลิท เป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวสปอร์ บนด้านโค้งของสปอร์ เมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% จะพบเพอร์สปอร์หลุดออกจากสปอร์มีลักษณะเรียบ

ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ : พบการสร้างโคนิเดีย และโคนิดิโอฟอร์ มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 1.71-2.74 × 3.01-4.37 ไมโครเมตร แบบ *Nodulisporium*-like บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง

ข้อสังเกต : ลักษณะทางสัณฐาน วิทยาที่กล่าวมาข้างต้นมีความคล้ายคลึงกับ รา *Annulohypoxyton stygium* Lév. Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นจานมีขนาดเล็กกว่า คือมีค่าเท่ากับ 0.1-0.2 มิลลิเมตร และแอสโคสปอร์ของ *A. stygium* จะพบเจิร์มสลิทบนด้านเรียบของสปอร์ ในขณะที่ราตัวอย่างพบบนด้านโค้งของสปอร์ นอกจากนี้ยังมีความใกล้เคียงกับ *A. atroroseum* แต่มีสีของสโตรมาที่แตกต่างกันคือ *A. atroroseum* มีสีเทาอมม่วง (vinaceous gray (116)) หรือโทนมชมพู (rosy tone) ในขณะที่ *A. stygium* และตัวอย่างมีสีดำ ส่วนเจิร์มสลิทของ *A. atroroseum* พบบนด้านเรียบของสปอร์เช่นเดียวกับ *A. stygium* นอกจากนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างของราทั้งสองชนิดได้ด้วยการศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ *A. atroroseum* พบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบ *Nodulisporium*-like ส่วน *A. stygium* พบแบบ *Periconiella*-like ในขณะที่ตัวอย่างพบการสร้างลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบ *Nodulisporium*-like เช่นเดียวกับ *A. atroroseum* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกับราทั้ง 2 ชนิดนั้น จึงทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้



ภาพประกอบ 25 *Annulohypoxyton* species C isolate PK10007 (A-B) สโตรมา และแผ่นจาน (ลูกศร) (C) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) เพอริสปอร์ หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (F) แอสคัส ที่มี 8 แอสโคสปอร์ (G) ลักษณะการสืบพันธุ์แบบ ไม้อาศัยเพศแบบ *Nodulisporium*-like (H) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

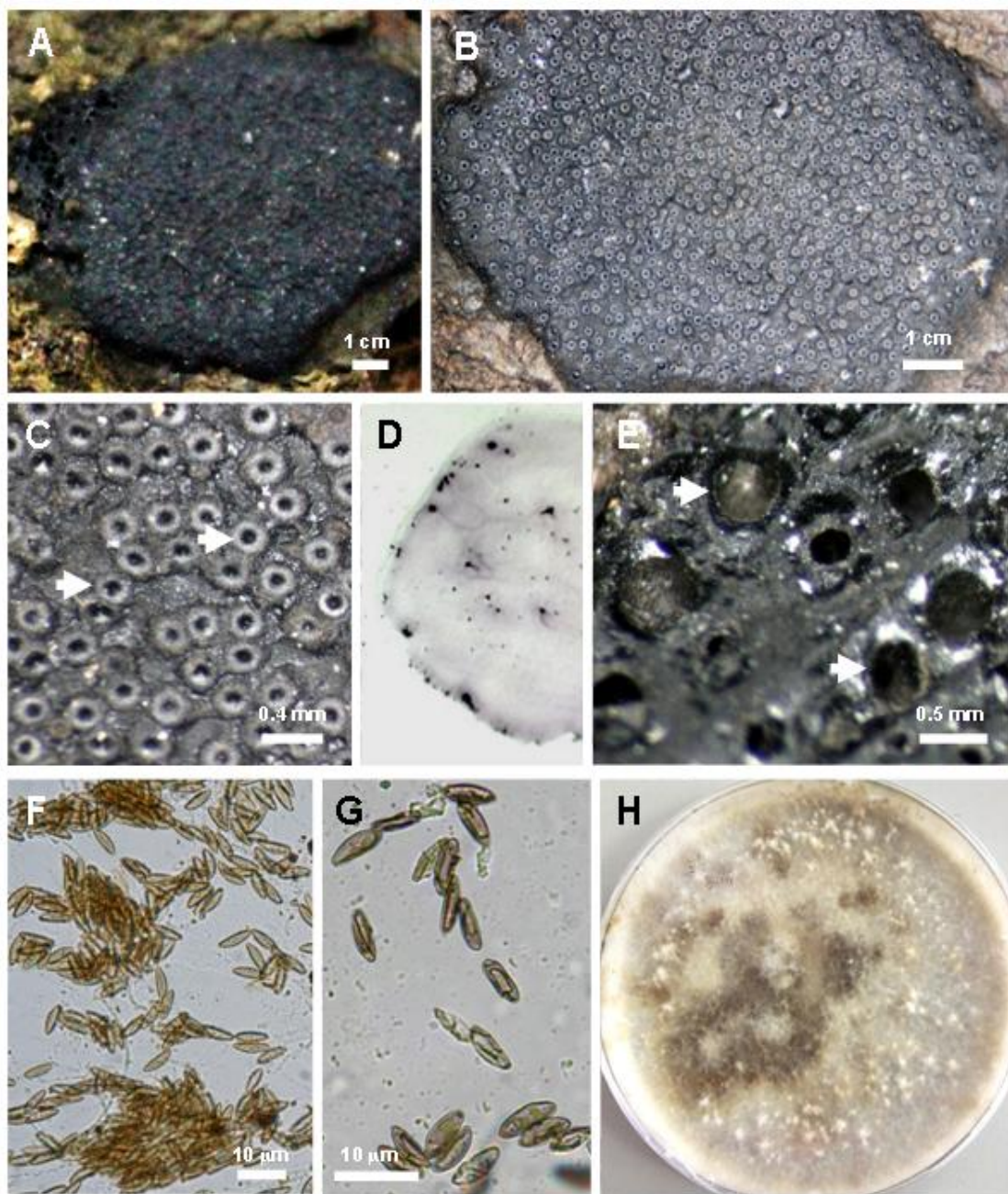
### ***Annulohypoxyton species D***

**ตัวอย่างที่ศึกษา:** PK121081 (ภาพประกอบ 26)

**ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:** สโตรมาเป็นแบบเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) มีสีดำ ขนาดกว้าง × ยาว × หนา เท่ากับ  $1.36 \times 1.55 \times 0.10$  เซนติเมตร และเมื่อทดสอบการเกิดสีของผิว สโตรมากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% พบว่า มีสีม่วงแดง (101) หรือสีเทาอมม่วง (116) เพอริทีเซียเป็นแบบรี จนถึงทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง กว้าง × ยาว เท่ากับ  $0.2-0.4 \times 0.4-0.9$  มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะทรงกรวยปลายแหลม ล้อมรอบด้วยแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.3 มิลลิเมตร

ไม่พบลักษณะของแอสไซ และ เอพิคอล แอปพาราทัส พบแอสโคสปอร์สีน้ำตาล จาง ลักษณะรีคล้ายรูปไข่ จนถึงคล้ายกระสวย ด้านทั้งสองของสปอร์เกือบสมมาตร หรือไม่สมมาตรกัน ปลายสปอร์แคบ ขนาด  $6.0-8.7 \times 2.0-2.5$  ไมโครเมตร พบเจอร์มสลิท เป็นเส้นตรงมีความยาวน้อยกว่าความยาวสปอร์บนด้านโค้งของสปอร์ เมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% เพอริสปอร์ไม่หลุดออกจากสปอร์ (indehiscent)

**ข้อสังเกต:** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราตัวอย่าง PK121081 พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับรา *Annulohypoxyton urceolatum* Rehm. Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) คือมีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ที่ฝังลงไปในสโตรมา หรืออยู่ในระดับที่ต่ำกว่าสโตรมา และเมื่อทดสอบ การเกิดสีของผิวสโตรมากับ สารละลาย KOH เข้มข้น 10% พบว่า เกิดสีม่วงแดง (101) หรือสีเทาอมม่วง (116) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของราชนิดนี้ เนื่องจากมี ราสกุล *Annulohypoxyton* เพียงไม่กี่ชนิดที่ให้โทนสีม่วงกับสาร ละลายดังกล่าว แต่ ตัวอย่าง PK121081 มีขนาดของแอสโคสปอร์ที่เล็กกว่า *A. urceolatum* ประมาณ 1 เท่า คือมีขนาด เท่ากับ  $9.0-14(-17) \times 3.5-4.5$  ไมโครเมตร



ภาพประกอบ 26 *Annulohypoxyylon* species D isolate PK121081 (A-B) สโตรมา (C) แผ่นจาน (ลูกศร) (D) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (E) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (F-G) แอสโคสปอร์ (H) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

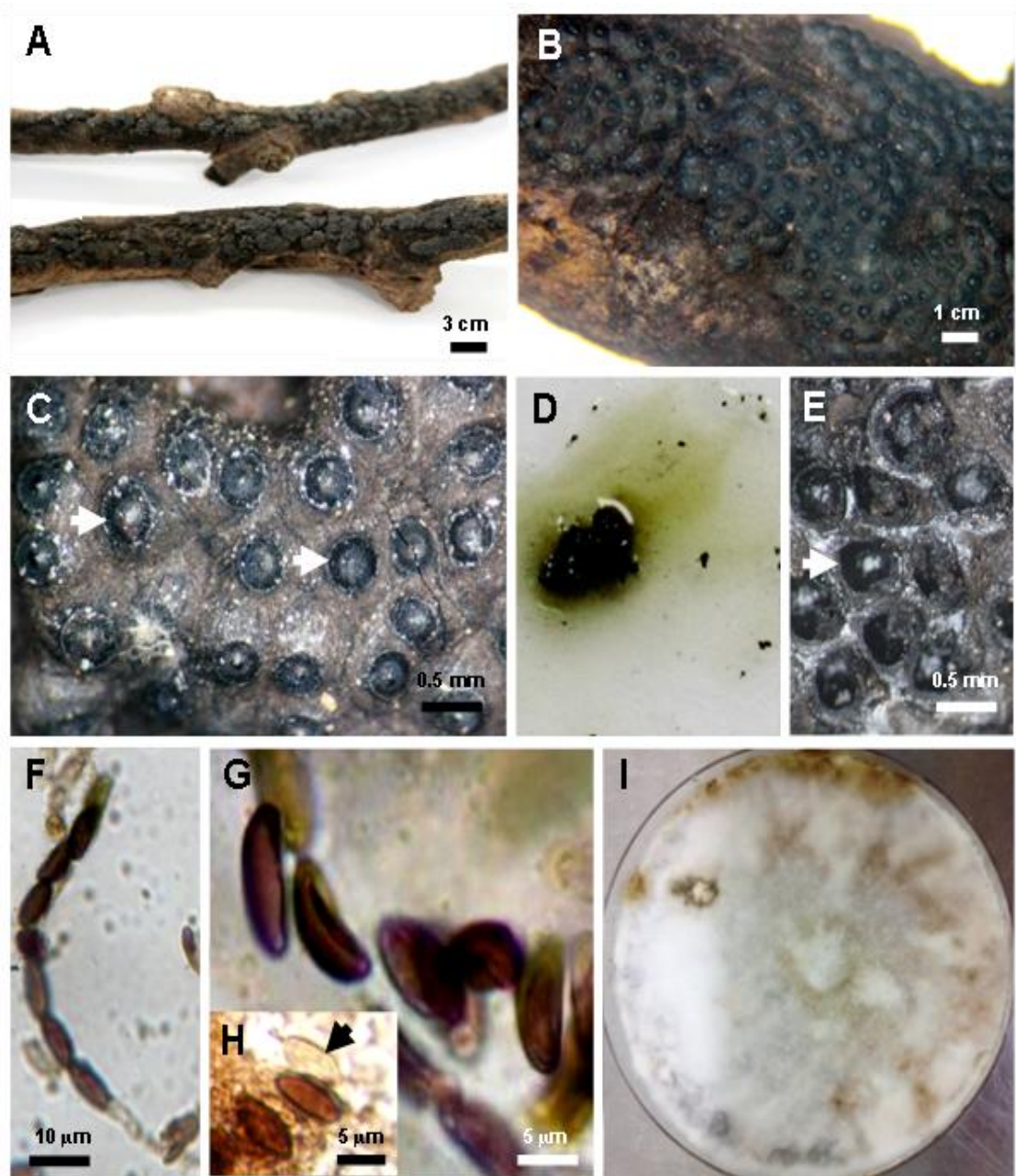
### ***Annulohypoxyton species E***

ตัวอย่างที่ศึกษา: PK07019 (ภาพประกอบ 27)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา: สโตรมาเป็นแบบครึ่ง ทรงกลม (hemispherical) แบบเรียบกิ่งนูน (effused-pulvinate) และนูนเป็นก้อน (glomerate) มีสีดำกึ่งมันเงา ขนาดกว้าง × ยาว × หนาเท่ากับ 0.20-1.00 × (0.30) 0.60-3.40 × 0.10-0.15 เซนติเมตร และเมื่อทดสอบการเกิดสีของผิวสโตรมากับสารละลายโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10% พบว่า มีสีเขียวมะกอก (90) เพอริที่เชื่อมเป็นแบบทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.3 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะปลายแหลมล้อมรอบด้วยแผ่นจานแบบ *bovei*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.4 มิลลิเมตร

แอสไซมีรูปร่างแบบกระบอก มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 3-5 × 78-85 ไมโครเมตร (วัดขนาดจาก 4 แอสไซ) ใน 1 แอสคัส มี 8 แอสโคสปอร์ ที่ปลายแอสไซพบเอพิคอล แอพพาราทัสที่ไม่ติดสีน้ำเงินของสารละลาย Melzer's มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 1-1.4 × 2.9-3.2 ไมโครเมตร แอสโคสปอร์สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล ลักษณะรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบขนาด 6.9-10.5 × 2.4-4.3 ไมโครเมตร พบเจิร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวสปอร์ (straight full length) บนด้านเรียบ (flattened side) ของสปอร์ เมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% จะพบเพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์มีลักษณะเรียบ

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราตัวอย่าง PK07019 มีความคล้ายคลึงกับ รา *Annulohypoxyton bovei* var. *microspora* J.H. Miller Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง แผ่นจานของราชนิดนี้มีขนาดใหญ่กว่าคือมีค่าเท่ากับ 0.3-0.7 มิลลิเมตร และขนาดแอสไซยาวกว่าคือ มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 4-5 × 115-175 ไมโครเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. nitens* พบว่ามีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นขนาดแอสไซของ *A. nitens* มีขนาดยาวกว่าคือมีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 4-5 × 110-140 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังไม่พบข้อมูลของตำแหน่งเจิร์มสลิทบนผิวสปอร์ของรา *A. bovei* var. *microspora* และ *A. nitens* จึงไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลนี้ได้



ภาพประกอบ 27 *Annulohypoxyton* species E isolate PK07019 (A-C) สโตรมา และแผ่นจาน (ลูกศร) (D) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (E) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (F) แอสคัส ที่มี 8 แอสโคสปอร์ (G) แอสโคสปอร์ (H) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์ (ลูกศร) (I) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



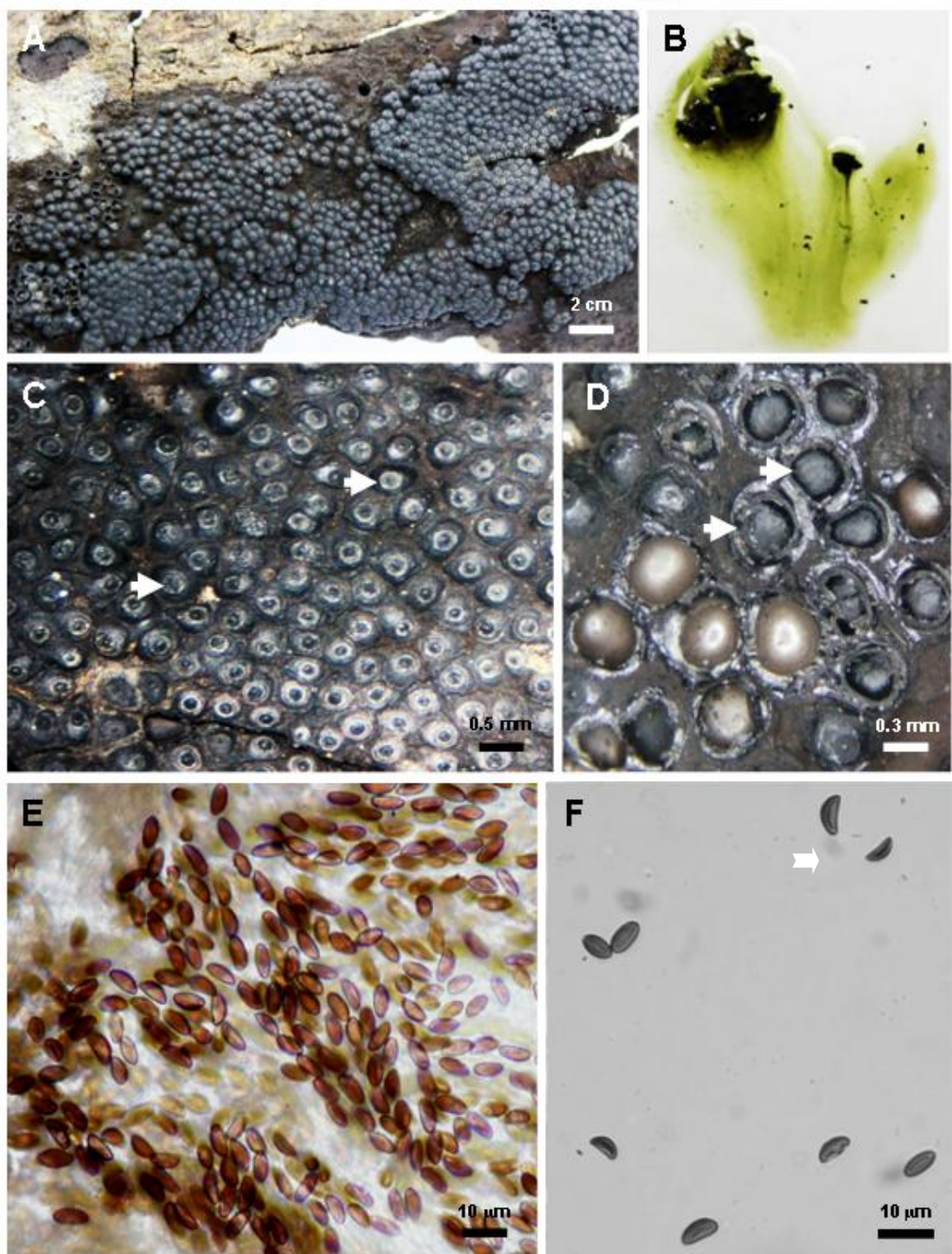
### ***Annulohypoxyton species F***

ตัวอย่างที่ศึกษา: H130 (ภาพประกอบ 28)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา: สโตรมาเป็นแบบเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) และนูน เป็นก้อน (glomerate) มีสีดำ ขนาดกว้าง × ยาว × หนาเท่ากับ 0.60-1.50 × 1.20-2.80 × 0.15-0.20 เซนติเมตรและเมื่อทดสอบการเกิดสีของผิวสโตรมากับ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% พบว่า มีสีเขียวมะกอก (90) เพอริทีเซียเป็นแบบทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.4 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะ ปลายแหลม ล้อมรอบด้วยแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.5 มิลลิเมตร

ไม่พบลักษณะของแอสไซ และเอพิคอล แอปพาราทัส แอสโคสปอร์สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลลักษณะรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ มีขนาด 5.8-8.7 (-9.7) × 2.0-2.9 ไมโครเมตร พบเจอร์มสลิท เป็นเส้นตรงมีความยาวน้อยกว่าความยาวสปอร์ บนด้านโค้งของสปอร์เมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% จะพบเพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์มีลักษณะเรียบ

ข้อสังเกต: ตัวอย่างนี้ได้มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ของ สุวรรณชาติ และคนอื่นๆ (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ที่ระบุว่ายังไม่สามารถระบุชนิดได้ เก็บรวบรวมได้จากบริเวณ พื้นที่น้ำตกเขากระยาง จังหวัดพิษณุโลก จึงได้เลือกมาศึกษาอย่างละเอียดอีกครั้งในการศึกษาครั้งนี้ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาข้างต้น พบว่าราตัวอย่าง H130 มีความคล้ายคลึงกับรา *Annulohypoxyton nitens* Ces. Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) ยกเว้นแอสโคสปอร์ของ *A. nitens* มีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าคือ 6.5-10 × 3-4.5 ไมโครเมตร มีลักษณะแผ่นจานแบบ *bovei*-type และ เจิร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ และเนื่องจากไม่พบลักษณะแอสไซ และ เอพิคอล แอปพาราทัส ของตัวอย่าง จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลนี้ได้



ภาพประกอบ 28 *Annulohypoxyton* species F isolate H130 (A และ C) สโตรมา (B) การเกิด  
 สีสักสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (C) แผ่นจาน (ลูกศร) (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E-F)  
 แอสโคสปอร์ (F) เจริ่มสลิต (ลูกศร)

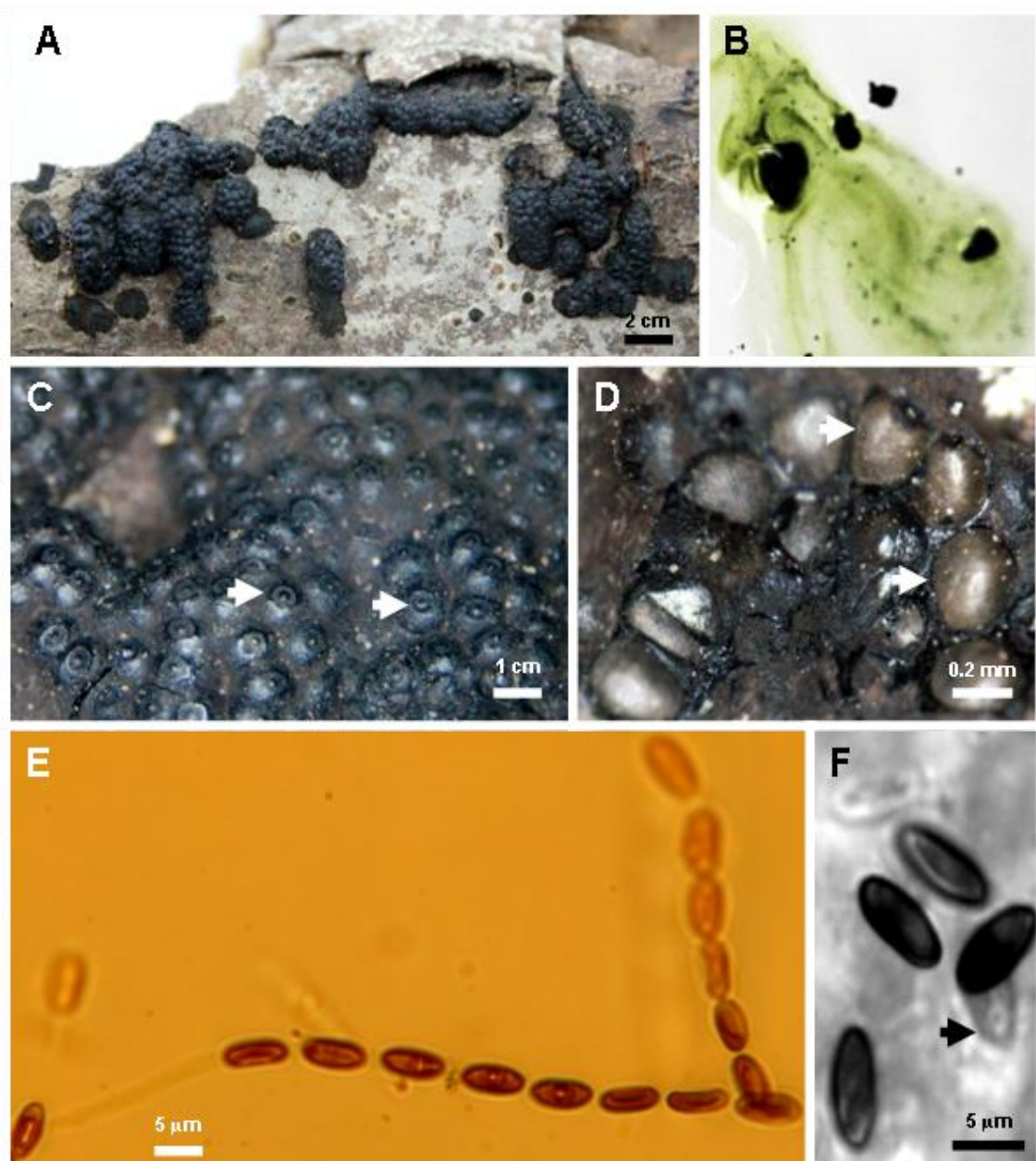
### ***Annulohyphoxylon species G***

ตัวอย่างที่ศึกษา: H255 (ภาพประกอบ 29)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา: สโตรมาเป็นแบบครึ่งทรงกลม (hemispherical) เรียบ กึ่งนูน (effused-pulvinate) มีสีดำ ขนาดกว้าง × ยาว × หนาเท่ากับ 0.2-0.6 × (0.3) 0.8-2.0 × 0.2 เซนติเมตร และเมื่อทดสอบการเกิดสีของผิวสโตรมากับ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% พบว่า มีสีเขียวมะกอก (90) เพอริทีเซียเป็นแบบทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.4 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะปลายแหลมล้อมรอบด้วยแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3-0.5 มิลลิเมตร

แอสไซมีรูปร่างแบบ กระบอง มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 2.5-3.1 × 65-88 ไมโครเมตร (วัดขนาดจาก 4 แอสไซ) ใน 1 แอสคัส มี 8 แอสโคสปอร์ ที่ปลายแอสไซพบ เอฟิดอล แอปพาราทัส ที่ไม่ติดสีน้ำเงินของสารละลาย Melzer's มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 0.9-1.2 × 2.2-2.9 ไมโครเมตร แอสโคสปอร์สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล ลักษณะรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ ขนาด 5.5-7.0 × 2.4-3.7 ไมโครเมตร พบเจอร์มสลิท เป็นเส้นตรง มีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ บนด้านเรียบของสปอร์ เมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% จะพบเพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์มีลักษณะเรียบ

ข้อสังเกต: ตัวอย่างนี้ได้มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ของ สุวรรณาศรัย และคนอื่นๆ (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ที่ระบุว่ายังไม่สามารถระบุชนิดได้ เก็บรวบรวมได้จากบริเวณ พื้นที่น้ำตกเขากระยาง จังหวัดพิษณุโลก จึงได้เลือกมาศึกษาอย่างละเอียดอีกครั้งในการศึกษารั้งนี้ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่าง H255 มีความคล้ายคลึงกับรา *Annulohyphoxylon nitens* Ces. Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) แต่ต่างกันในลักษณะแผ่นจานของ *A. nitens* เป็นแบบ *bovei*-type ในขณะที่ราตัวอย่าง H255 เป็นแบบ *truncatum*-type นอกจากนี้ขนาดของแอสโคสปอร์ *A. nitens* มีขนาดใหญ่กว่าคือ 6.5-10 × 3-4.5 ไมโครเมตร และมีขนาดของแอสไซยาวกว่าคือ มีขนาด กว้าง × ยาว เท่ากับ 4-5 × 110-140 ไมโครเมตร



ภาพประกอบ 29 *Annulohypoxyton* species G isolate H255 (A และ C) สโตรมา (B) การเกิด  
 สีสับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (C) แผ่นจาน (ลูกศร) (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) แอสต์ส  
 ที่มี 8 แอสโคสปอร์ (F) เพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์(ลูกศร)

### ***Annulohypoxyton species H***

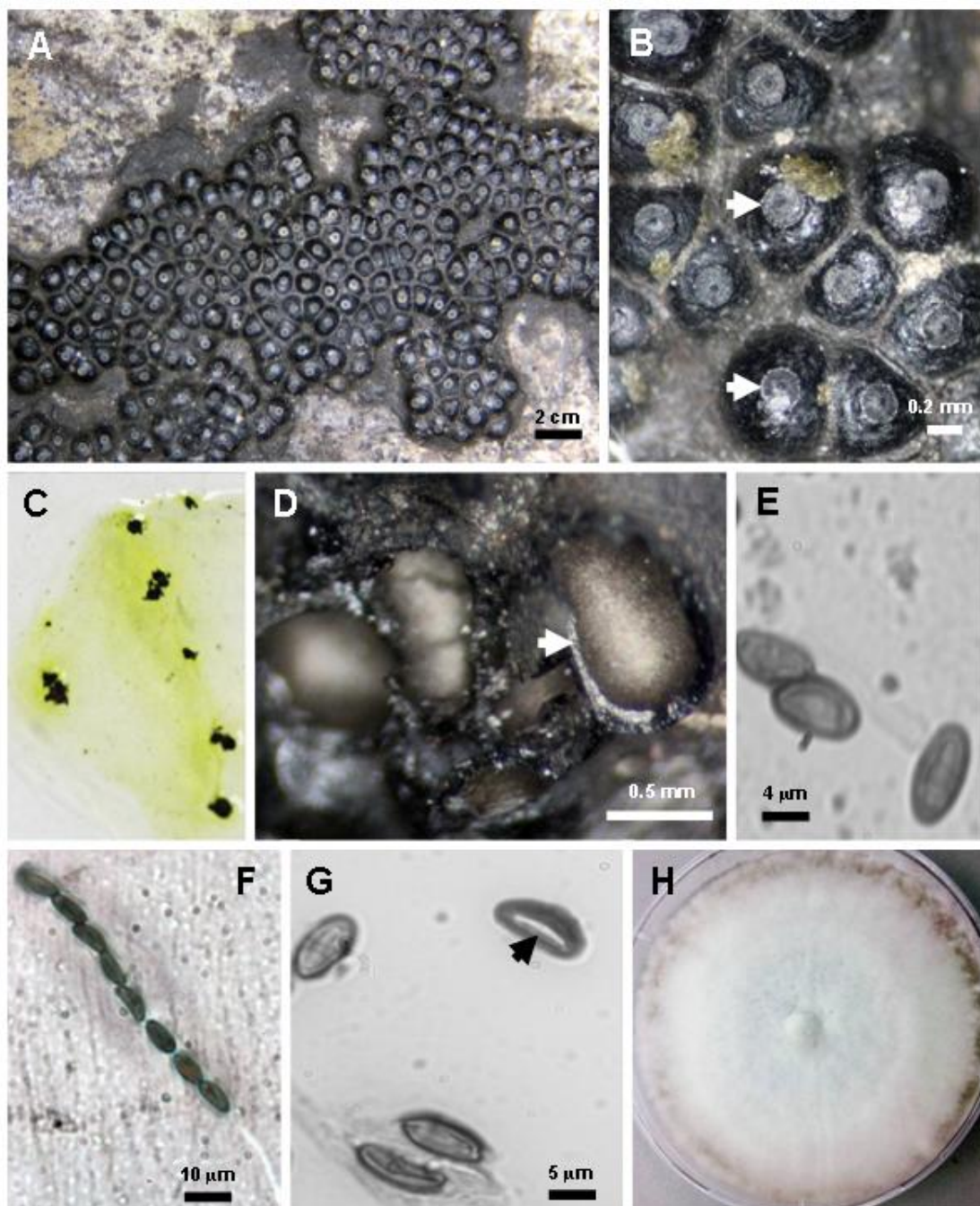
ตัวอย่างที่ศึกษา: H087\*, H099\*, H203\*, H215\*, PK09004, PK09005, PK09007, PK09025, PK09026, PK09027, PK09029, PK09031, PK09032, PK09036, PK11003, PK07004 และ PK121076 (ภาพประกอบ 30)

(หมายเหตุ: \* คือ ตัวอย่างเชื้อราสกุล *Annulohypoxyton* ที่พบในพื้นที่น้ำตกเขากระยาง จังหวัด พิษณุโลก)

**ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:** สโตรมาเป็นแบบครึ่งทรงกลม (hemispherical) แบบ เรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) และแบบนูนเป็นก้อน (glomerate) มีสีดำและสีดำนั่งเงา (shiny black) ขนาดกว้าง × ยาว × หนาเท่ากับ 0.2-1.5 × (0.4) 0.8-3.5 × 0.1-0.2 เซนติเมตร และเมื่อ ทดสอบการเกิดสีของผิวสโตรมากับ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% พบว่า มีสี เขียวมะกอก (90) เพอริทีเซียเป็นแบบทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.7 มิลลิเมตร ออสติโอ ลมีลักษณะทรงกรวยปลายแหลม ล้อมรอบด้วยแผ่นจาน แบบ *bovei*-type ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.2-0.5 มิลลิเมตร

แอสไซมีรูป ร้างแบบ กระบอง มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 3.6-4.8 × 90-120 ไมโครเมตร (วัดขนาดจาก 10 แอสไซ) ใน 1 แอสคัส มี 8 แอสโคสปอร์ ที่ปลายแอสไซพบเอพิคอล แอปพาราทัส ที่ไม่ติดสีน้ำเงินของสารละลาย Melzer's มีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 0.3-0.4 × 1-1.2 ไมโครเมตร แอสโคสปอร์สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล ลักษณะรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่ สมมาตร ปลายสปอร์แคบ ขนาด 4.9-9.2(-10.7) × (2.6)3.2-4.9 ไมโครเมตร พบเจอร์มสลิท เป็น เส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวสปอร์ บนด้านโค้งของสปอร์ เมื่อทดสอบกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% จะพบเพอริสปอร์หลุดออกจากสปอร์มีลักษณะเรียบ

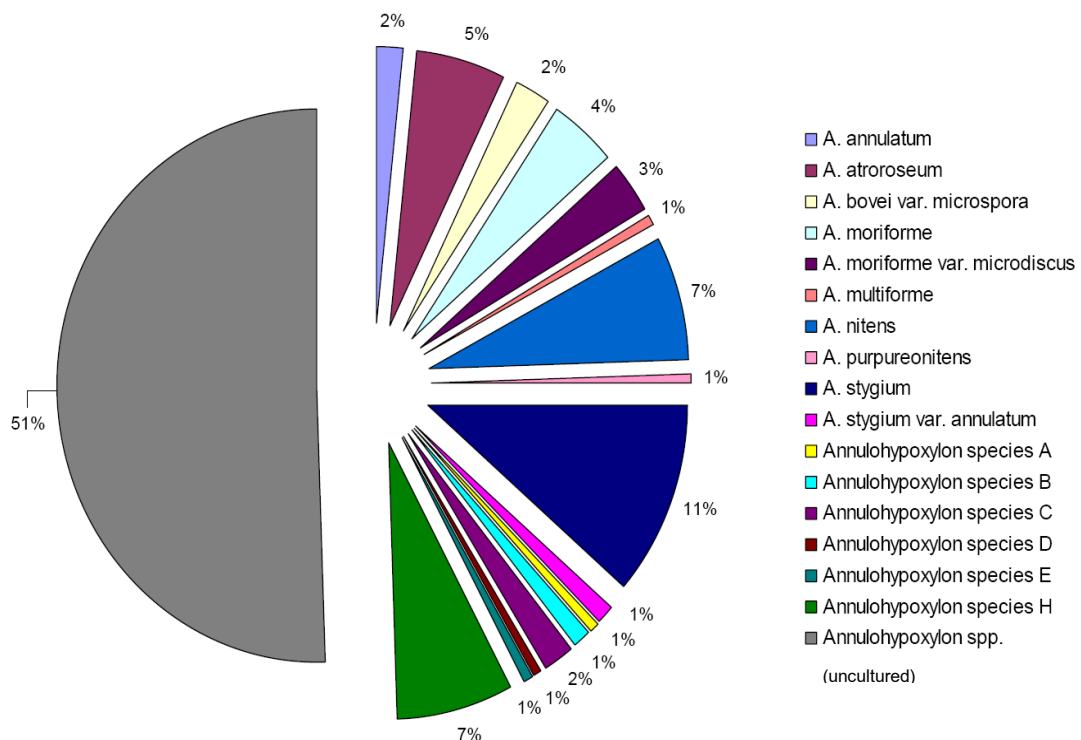
**ข้อสังเกต:** จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาข้างต้นพบว่ารา ตัวอย่างในกลุ่มนี้ มีความคล้ายคลึง สูงสุดกับรา *Annulohypoxyton nitens* Ces. Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) ในทุกลักษณะที่ศึกษาแต่เนื่องจากข้อมูลของลำดับ นิวคลีโอไทด์ต่างกันจึงจัดเป็น "cryptic species" ภายใต้ชื่อชั่วคราวว่า "*A. nitensa*" (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ได้พบรากลุ่มนี้อีกจำนวนมาก จึงได้นำมาศึกษาเพิ่มเติมใน ลักษณะอื่นๆ เช่น การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ ลักษณะทางเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ อื่นๆ



ภาพประกอบ 30 *Annulohypoxyylon* species H isolate PK09004 (A-B) สโตรมา และแผ่นจาน (ostiolar discs) (ลูกศร) (C) การเกิดสีกับสารละลาย KOH เข้มข้น 10% (D) เพอริทีเซีย (ลูกศร) (E) แอสโคสปอร์ (F) แอสคัส ที่มี 8 แอสโคสปอร์ (G) แอสโคสปอร์ และเจอร์มสลิท (ลูกศร) (H) ลักษณะทางเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

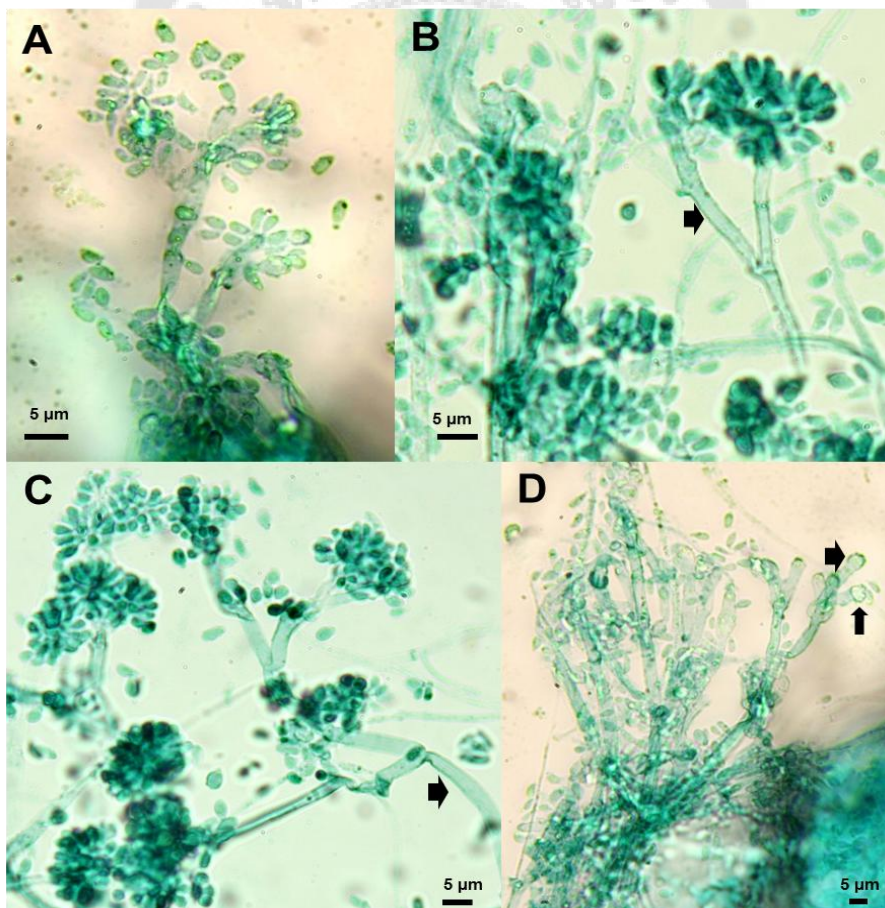
## 2. ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ(Anamorph) ของราสกุล *Annulohypoxyton*

จากตัวอย่าง ราสกุล *Annulohypoxyton* จำนวน 168 ตัวอย่าง สามารถแยกเพาะเลี้ยงราบริสุทธิ์ได้ 83 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 49.5 ของจำนวนทั้งหมด (แสดงดังภาพประกอบ 31) ในจำนวนนี้เป็นราที่สามารถระบุชนิดได้ 10 ชนิด (63 ไอโซเลท) ได้แก่ *A. annulatum* (3 ไอโซเลท), *A. atroroseum* (9 ไอโซเลท), *A. bovei* var. *microspora* (4 ไอโซเลท), *A. moriforme* (7 ไอโซเลท), *A. moriforme* var. *microdiscus* (5 ไอโซเลท), *A. multiforme* (1 ไอโซเลท), *A. nitens* (12 ไอโซเลท), *A. purpureonitens* (1 ไอโซเลท), *A. stygium* (19 ไอโซเลท) และ *A. stygium* var. *annulatum* (2 ไอโซเลท) และเป็น ราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 6 ชนิด (20 ไอโซเลท) ได้แก่ *Annulohypoxyton* species A (1 ไอโซเลท), *Annulohypoxyton* species B (2 ไอโซเลท), *Annulohypoxyton* species C (3 ไอโซเลท), *Annulohypoxyton* species D (1 ไอโซเลท), *Annulohypoxyton* species E (1 ไอโซเลท) และ *Annulohypoxyton* species H (12 ไอโซเลท) สำหรับ ราที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้คือ *Annulohypoxyton* species F (1 ไอโซเลท) และ *Annulohypoxyton* species G (1 ไอโซเลท) เนื่องจากเป็นตัวอย่างเก่า



ภาพประกอบ 31 กราฟวงกลมแสดงร้อยละของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้

จากผลการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ potato dextrose agar (PDA), oat meal agar (OA) และ malt extract agar (MEA) ทั้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ราสกุล *Annulohypoxyton* ที่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 10 ชนิด และที่ไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 6 ชนิด รวมทั้งหมด 83 ไอโซเลท นั้น พบการสร้างลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงชนิดเดียว คือ *Annulohypoxyton* species C (PK10007, PK121008 และ PK1210103) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง และมีลักษณะการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบ *Nodulisporium*-like (แสดงดังภาพประกอบ 32) ในขณะที่ราตัวอย่างอื่นพบเพียงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเส้นใยที่มีการเปลี่ยนสีเมื่อเลี้ยง เป็นระยะเวลาสั้น ซึ่งบางชนิดสามารถสร้างเม็ดสืบพันธุ์ได้ รวมทั้งเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งนี้รา แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ชนิด ซึ่งอาหารที่ราส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สุดคือ PDA รองลงมาคือ MEA และ OA ตามลำดับ (แสดงดังตาราง 22; ภาพประกอบ 33, 34, 35 และ 36)



ภาพประกอบ 32 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของรา *Annulohypoxyton* species C isolate PK1210103 แบบ *Nodulisporium*-like; (A) โคนิดเดี่ยว และลักษณะการแตกกิ่งของโคนิดิโอฟอร์ (B) major branch (ลูกศร) (C) main axis (ลูกศร) (D) conidiogenous regions (ลูกศร)



ตาราง 22 ลักษณะเส้นใยของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ชนิด

ชนิด	ตัวอย่างที่ ศึกษา	Potato Dextrose Agar (PDA)	Oat Meal Agar (OA)	Malt Extract Agar (MEA)
<i>A. annulatum</i>	PK10008	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เส้นใยเจริญในวงแคบ
	PK121019	ประมาณ 1-2 สัปดาห์	ประมาณ 2-3 สัปดาห์	ไม่เต็มหน้าอาหาร เส้น
	PK121022	เส้นใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64)) จนเกิดเป็นสะเก็ด สีดำ เป็นจุดๆ เมื่อครบ 4 สัปดาห์	เส้นใยมีสีขาว ฟู จน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64)) ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	ใยมีสีขาว ฟู ไม่พบ การเปลี่ยนสีของเส้นใย และอาหารใน ระยะเวลา 4 สัปดาห์
<i>A. atroseum</i>	PK07001	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร
	PK121024	ประมาณ 1-2 สัปดาห์	ประมาณ 2-3 สัปดาห์	ประมาณ 2-3 สัปดาห์
	PK121026	เส้นใยมีสีขาวฟู จน	เส้นใยมีสีขาวฟูเล็กน้อย	เส้นใยมีสีขาว ฟู
	PK121030	เปลี่ยนเป็นสีเขียว	จนเริ่มเปลี่ยนเป็นสี	เล็กน้อย ไม่พบการ
	PK121048	(olivaceous buff (89)) เปลี่ยนสีอาหารเป็นสี ดำ และมี สะเก็ดเป็น จุดๆ ใน 4 สัปดาห์	เขียว (olivaceous buff (89)) จนเริ่มมีสะเก็ดสี ดำ ใน 4 สัปดาห์	เปลี่ยนสีของเส้นใยและ อาหาร ใน 4 สัปดาห์
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i>	PK121069	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เส้นใยเจริญไม่เต็มหน้า
	PK121071	ประมาณ 1 สัปดาห์ เส้น	ประมาณ 2 สัปดาห์	อาหาร ลักษณะเส้น ใย
	PK1210112	ใยมีสีขาวจนเปลี่ยนเป็น สีเขียว (olivaceous green (90)) หรือสี น้ำตาลอ่อน และ เปลี่ยน สีอาหารเป็นสี น้ำตาล	เส้นใยมีสีขาวจน เปลี่ยนเป็นสีเขียว (olivaceous green (90)) ใน 4 สัปดาห์	มีสีขาว และไม่พบการ เปลี่ยนสีของเส้นใยและ อาหาร ใน 4 สัปดาห์
<i>A. moriforme</i>	PK121020	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญ เต็มหน้าอาหาร	เส้นใยเจริญไม่เต็มหน้า
	PK121065	ประมาณ 1 สัปดาห์ เส้น	ประมาณ 2 สัปดาห์	อาหาร ลักษณะเส้นใย
	PK121067	ใยมีสีขาวจนเปลี่ยนเป็น สีน้ำตาลเหลือง (honey (64), hazel (88)) และ เปลี่ยน สีอาหารเป็นสี น้ำตาลเหลืองเล็กน้อย	เส้นใยมีสีขาวจน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64), hazel (88)) และเปลี่ยนสี อาหารเป็นสีน้ำตาลอ่อน	มีสีขาว และไม่พบการ เปลี่ยนสีของเส้นใยและ อาหาร ใน 4 สัปดาห์

## ตาราง 22 (ต่อ)

ชนิด	ตัวอย่างที่ ศึกษา	Potato Dextrose Agar (PDA)	Oat Meal Agar (OA)	Malt Extract Agar (MEA)
<i>A. moriforme</i> <i>var. microdiscus</i>	PK07008	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร
	PK07012	ประมาณ 1 สัปดาห์	ประมาณ 2 สัปดาห์	ประมาณ 2 สัปดาห์
	PK07013	เส้นใยมีสีขาวฟูและ	เส้นใยมีสีขาวฟูและเริ่ม	เส้นใยมีสีขาวฟูและเริ่ม
	PK09006	เริ่มเปลี่ยนเป็นสี น้ำตาลเหลือง (honey (64), hazel (88)) และ เปลี่ยนสีอาหารเป็นสี น้ำตาล (hazel (88))	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64), hazel (88)) และเปลี่ยน สีอาหารเป็นสีน้ำตาล	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เล็กน้อย ภายใน 4 สัปดาห์
<i>A. multiforme</i>	PK121042	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เส้นใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64)) และทำให้สีของอาหาร เข้มขึ้นเล็กน้อย	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ 2-3 สัปดาห์ เส้นใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64)) แต่ไม่เปลี่ยนสีของ อาหาร	เส้นใยเจริญไม่เต็มหน้า อาหาร ลักษณะเส้นใย มีสีขาว และไม่พบการ เปลี่ยนสีของเส้นใยและ อาหารใน 4 สัปดาห์
<i>A. nitens</i>	PK121044	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร
	PK121063	ประมาณ 1 สัปดาห์ เส้น	ประมาณ 2 สัปดาห์ เส้น	ประมาณ 2 สัปดาห์
	PK121086	ใยมีสีขาวฟูจน เปลี่ยนเป็นสี น้ำ ตาลเหลือง (honey (64), hazel (88)) พบการ สร้าง pigment สีม่วง (vinaceous purple (101)) ในอาหารก่อนเป็นสีดำ	ใยมีสีขาวฟูจน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64), hazel (88)) เกิดสะเก็ดสี ดำเป็นจุดๆ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ และ เปลี่ยนสี อาหารเป็นสีน้ำตาล	เส้นใยมีสีขาวฟู พบ การสร้าง pigment สี ม่วง (vinaceous purple (101)) ในอาหาร ก่อน จะเปลี่ยนเป็นสีดำ
<i>A. purpureonitens</i>	PK10006	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ 1 สัปดาห์ เส้น ใยมีสีขาวฟูจนเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลเหลือง (honey (64) มีสะเก็ด เป็นจุดๆ ใน 4 สัปดาห์ และเปลี่ยนสีอาหารให้ เข้มขึ้นเล็กน้อย	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ 2 สัปดาห์ เส้น ใยมีสีขาวฟู แต่ไม่พบ การเปลี่ยนสีของเส้นใย และอาหาร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	เส้นใยเจริญไม่เต็มหน้า อาหาร ลักษณะเส้นใย มีสีขาว และไม่พบการ เปลี่ยนสีของเส้นใยและ อาหาร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 22 (ต่อ)

ชนิด	ตัวอย่างที่ ศึกษา	Potato Dextrose Agar (PDA)	Oat Meal Agar (OA)	Malt Extract Agar (MEA)
<i>A. stygium</i>	PK121007	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร
	PK121010	ประมาณ 1 สัปดาห์	ประมาณ 2 สัปดาห์	ประมาณ 2 สัปดาห์
	PK121013	เส้นใยมีสีขาวฟูและ	เส้นใยมีสีขาว ฟูไม่	เส้นใยมีสีขาวฟูและเริ่ม
	PK1210109	เริ่มเปลี่ยนเป็นสี น้ำตาล (hazel (88)) และเปลี่ยนสีอาหารเป็น สีน้ำตาล (hazel (88)) เกิดสะเก็ดเป็นจุดๆ ใน 4 สัปดาห์	พบการเปลี่ยนสีของ เส้นใยและอาหาร ใน 4 สัปดาห์	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (hazel (88)) และ เปลี่ยน สีอาหารเป็นสี น้ำตาล เกิดสะเก็ดเป็น จุดๆ ใน 4 สัปดาห์
<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i>	PK121034	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เส้นใยเจริญไม่เต็ม	เจริญเต็มหน้าอาหาร
	PK121058	ประมาณ1สัปดาห์ เส้น ใยมีสีขาว เปลี่ยนเป็นสี น้ำตาลเหลือง (honey (64)) และเปลี่ยนสีของ อาหารเป็นสีน้ำตาล จนถึงดำ เกิดสะเก็ดเป็น จุดใน 4 สัปดาห์	หน้าอาหาร ลักษณะ เส้นใยมีสีขาว และไม่ พบการเปลี่ยนสีของ เส้นใยและอาหาร ใน สัปดาห์	ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เส้นใยมีสีขาว และทำให้ สีของอาหารเปลี่ยนเป็นสี น้ำตาลจนถึงดำ เกิด สะเก็ดเป็นจุดๆ ใน 4 สัปดาห์
<i>Annulohyphoxylon</i> <i>species A</i>	PK121027	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ1 สัปดาห์ เส้น ใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64), hazel (88)) จนถึงดำและ เปลี่ยน สีอาหารเป็นสี น้ำตาลเหลืองจนถึงดำ ใน 4 สัปดาห์	เส้นใยเจริญไม่เต็ม หน้าอาหาร ลักษณะ เส้นใยมีสีขาว และไม่ พบการเปลี่ยนสีของ เส้นใย แต่เปลี่ยนสีของ อาหารเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64)) เล็กน้อยใน 4 สัปดาห์	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ1 สัปดาห์ เส้น ใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (honey (64)) จนถึงดำ และเปลี่ยน สี อาหารเป็นสีน้ำตาล เหลืองจนถึงดำใน 4 สัปดาห์
<i>Annulohyphoxylon</i> <i>species B</i>	PK121012	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เส้นใยเจริญไม่เต็ม	เจริญเต็มหน้าอาหาร
PK121050	ประมาณ1 สัปดาห์ เส้น ใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยนเป็นสีเขียว (dull green (70)) จนถึงดำใน 4 สัปดาห์	หน้าอาหาร ลักษณะ เส้นใยมีสีขาว และไม่ พบการเปลี่ยนสีของ เส้นใยและอาหาร	ประมาณ1 สัปดาห์ เส้น ใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยนเป็นสีเขียว (dull green (70)) จนถึงดำใน 4 สัปดาห์	

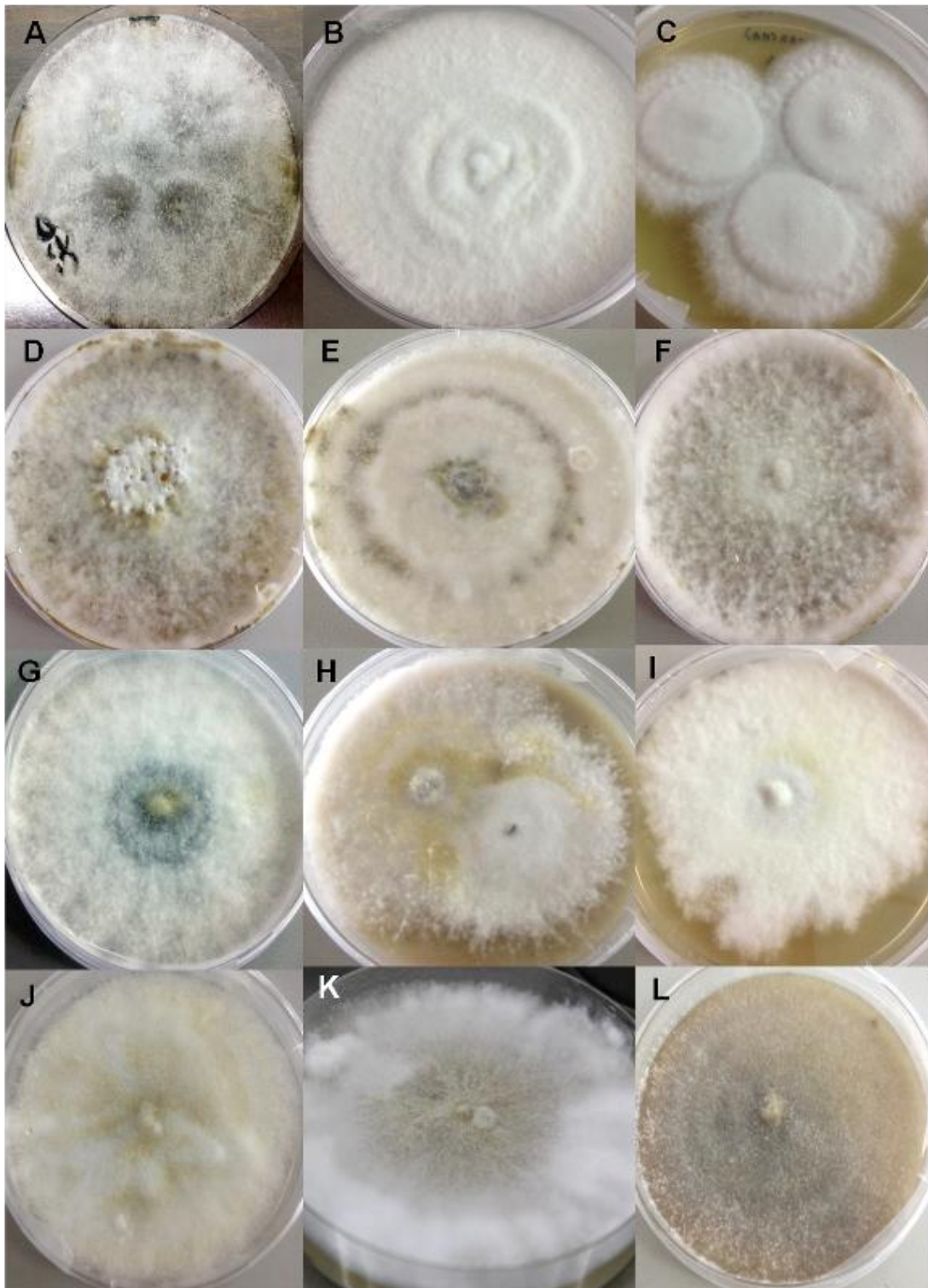
## ตาราง 22 (ต่อ)

ชนิด	ตัวอย่างที่ ศึกษา	Potato Dextrose Agar (PDA)	Oat Meal Agar (OA)	Malt Extract Agar (MEA)
<i>Annulohypoxyton</i> species C	PK10007	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เจริญเต็ม หน้าอาหาร	เจริญเต็มหน้าอาหาร
	PK121008	ประมาณ 1 สัปดาห์	ประมาณ 2 สัปดาห์	ประมาณ 2 สัปดาห์
	PK1210103	เส้นใยมีสีขาวฟูและ เริ่มเปลี่ยนเป็นสี น้ำตาลเหลือง (honey (64)) และเปลี่ยน สี อาหารเป็นสีน้ำตาล (hazel (88)) จนดำ เกิดสะเก็ดเป็นจุดๆ ใน 4 สัปดาห์	เส้นใยมีสีขาว ฟูไม่ พบการเปลี่ยนสีของ เส้นใยและอาหาร ใน 4 สัปดาห์	เส้นใยมีสีขาวฟูและเริ่ม เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (hazel (88)) และ เปลี่ยน สีอาหารเป็นสี น้ำตาล เกิดสะเก็ดเป็น จุดๆ ใน 4 สัปดาห์
<i>Annulohypoxyton</i> species D	PK121081	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เส้นใยมีสีขาว จน เปลี่ยนเป็นสีเขียว (dull green (70)) และ เปลี่ยนสีอาหารเป็นสี น้ำตาลจนถึงดำ เกิด สะเก็ดเป็นจุดๆ ใน 4 สัปดาห์	เส้นใยเจริญไม่เต็ม หน้าอาหาร ลักษณะ เส้นใยมีสีขาว และไม่ พบการเปลี่ยนสี ของ เส้นใยและอาหาร ใน 4 สัปดาห์	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ 2 สัปดาห์ เส้นใยมีสีขาว และทำ ให้สีของอาหาร เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จนถึงดำ เกิด สะเก็ด เป็นจุดๆ ใน 4 สัปดาห์
<i>Annulohypoxyton</i> species E	PK07019	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ 1 สัปดาห์ เส้นใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยน เป็นสีน้ำตาล เหลือง (hazel (88)) จนถึงดำ และเปลี่ยน อาหารเป็นสีน้ำตาล จนถึงดำใน 4 สัปดาห์	เส้นใยเจริญไม่เต็ม หน้าอาหาร ลักษณะ เส้นใยมีสีขาว และไม่ พบการเปลี่ยนสีของ เส้นใยและอาหารใน 4 สัปดาห์	เจริญเต็มหน้าอาหาร ประมาณ 1 สัปดาห์ เส้นใยมีสีขาวฟู จน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหลือง (hazel (88)) จนถึงดำ และเปลี่ยน สี อาหารเป็นสีน้ำตาลใน 4 สัปดาห์

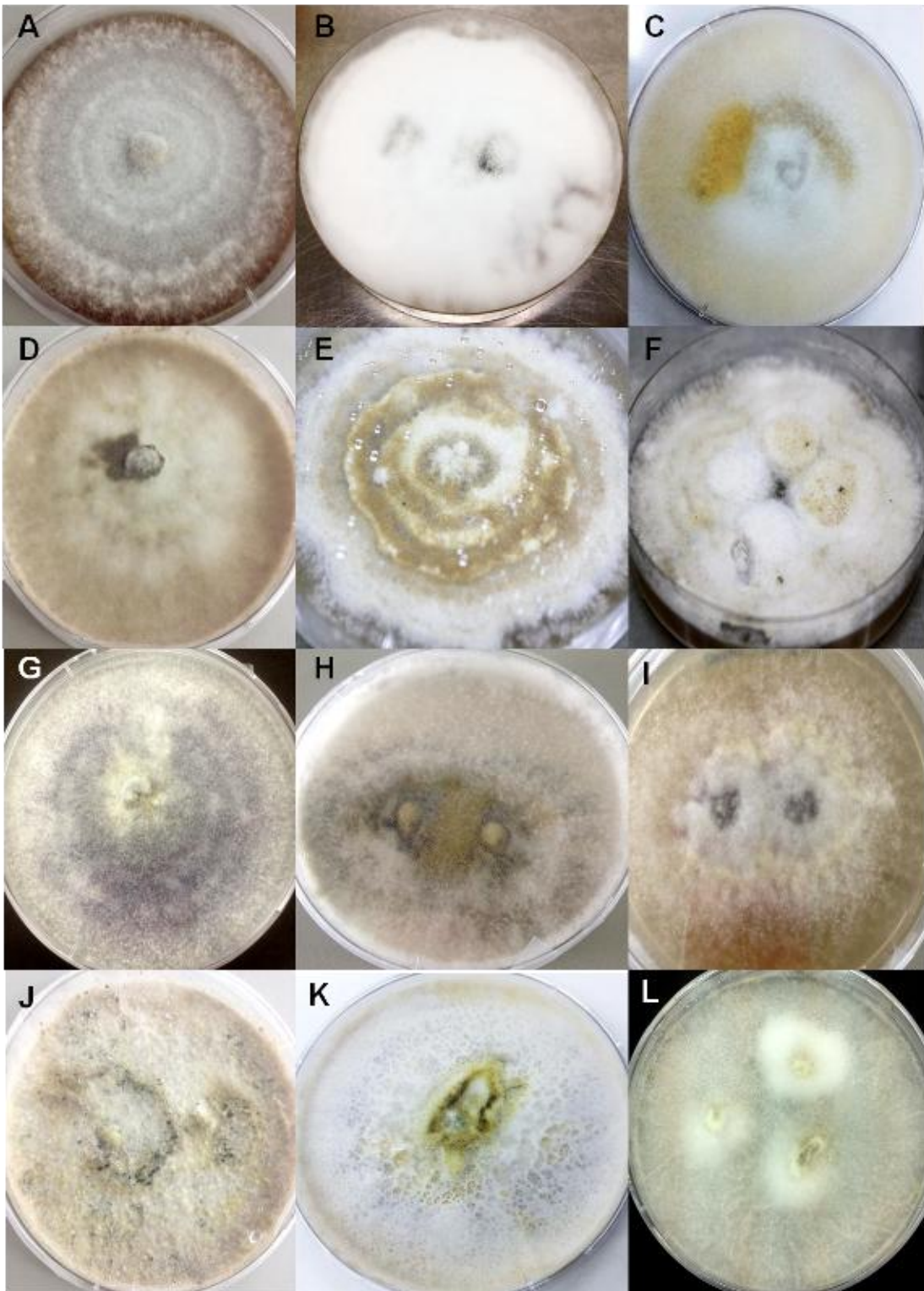
## ตาราง 22 (ต่อ)

ชนิด	ตัวอย่างที่ ศึกษา	Potato Dextrose Agar (PDA)	Oat Meal Agar (OA)	Malt Extract Agar (MEA)
<i>Annulohyphoxylon</i> species H	PK09004	เจริญเต็มหน้าอาหาร	เส้นใยเจริญไม่เต็ม	เจริญเต็มหน้าอาหาร
	PK09005	ประมาณ 1 สัปดาห์	หน้าอาหาร ลักษณะ	ประมาณ 1 สัปดาห์
	PK09007	เส้นใยมีสีขาวฟูจน	เส้นใยมีสีขาว และไม่	เส้นใยมีสีขาวฟูจน
	PK09026	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	พบการเปลี่ยนสีของ	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
	PK09027	เหลือง (honey (64))	เส้นใย แต่เปลี่ยนสี	เหลือง (honey (64))
	PK09029	และเปลี่ยนสีอาหาร เป็นสีน้ำตาล	อาหารให้เข้มข้น เล็กน้อย	และเปลี่ยนสีอาหาร เป็นสีน้ำตาล

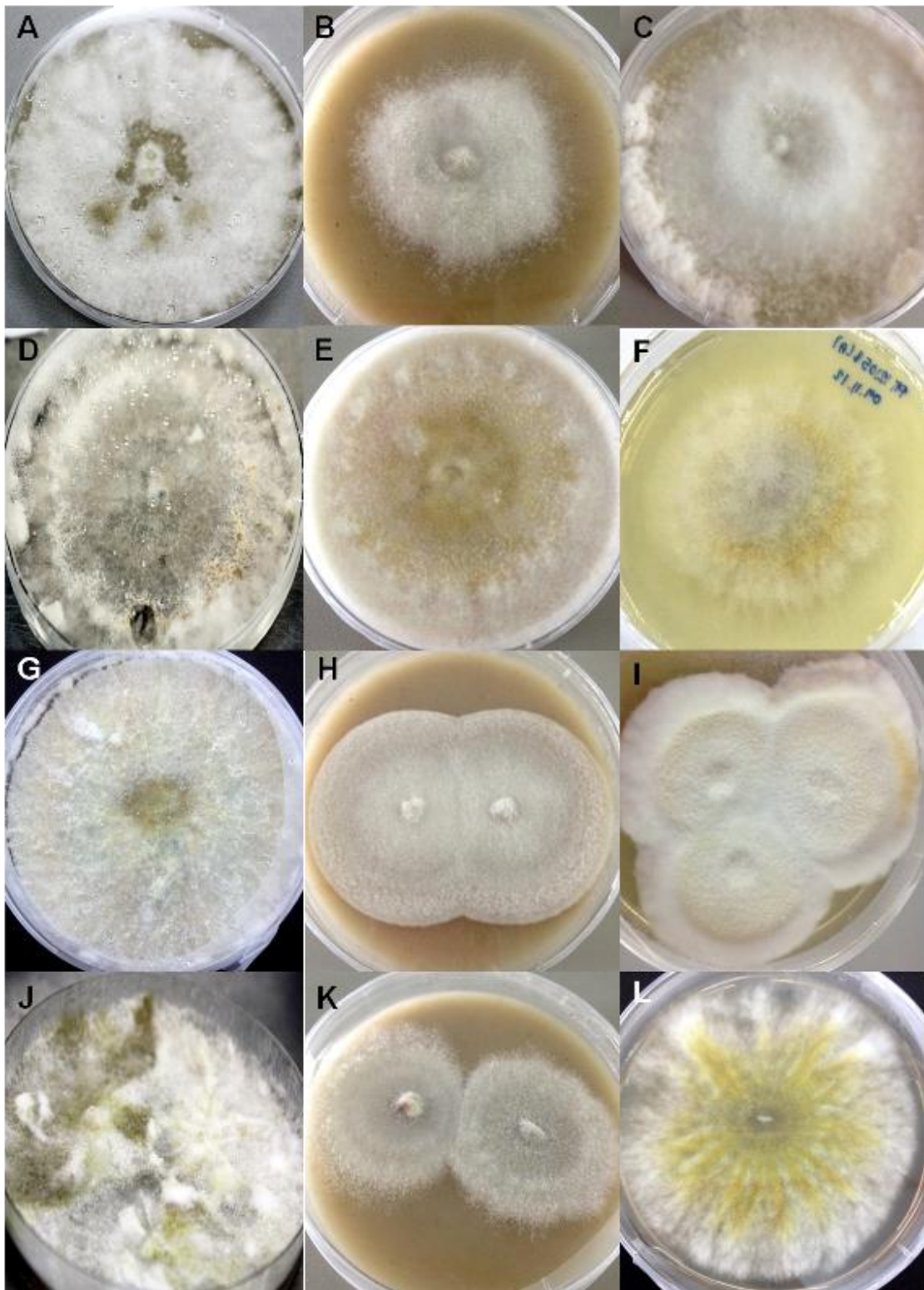




ภาพ ประกอบ 33 ลักษณะการเจริญบน อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ 3 ชนิด (PDA, OA และ MEA ตามลำดับ ) ของ ราสกุล *Annulohyphomyces*; (A-C) *A. annulatum* (PK121022), (D-F) *A. atroroseum* (PK121048), (G-I) *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112) และ (J-L) *A. moriforme* (PK121020)

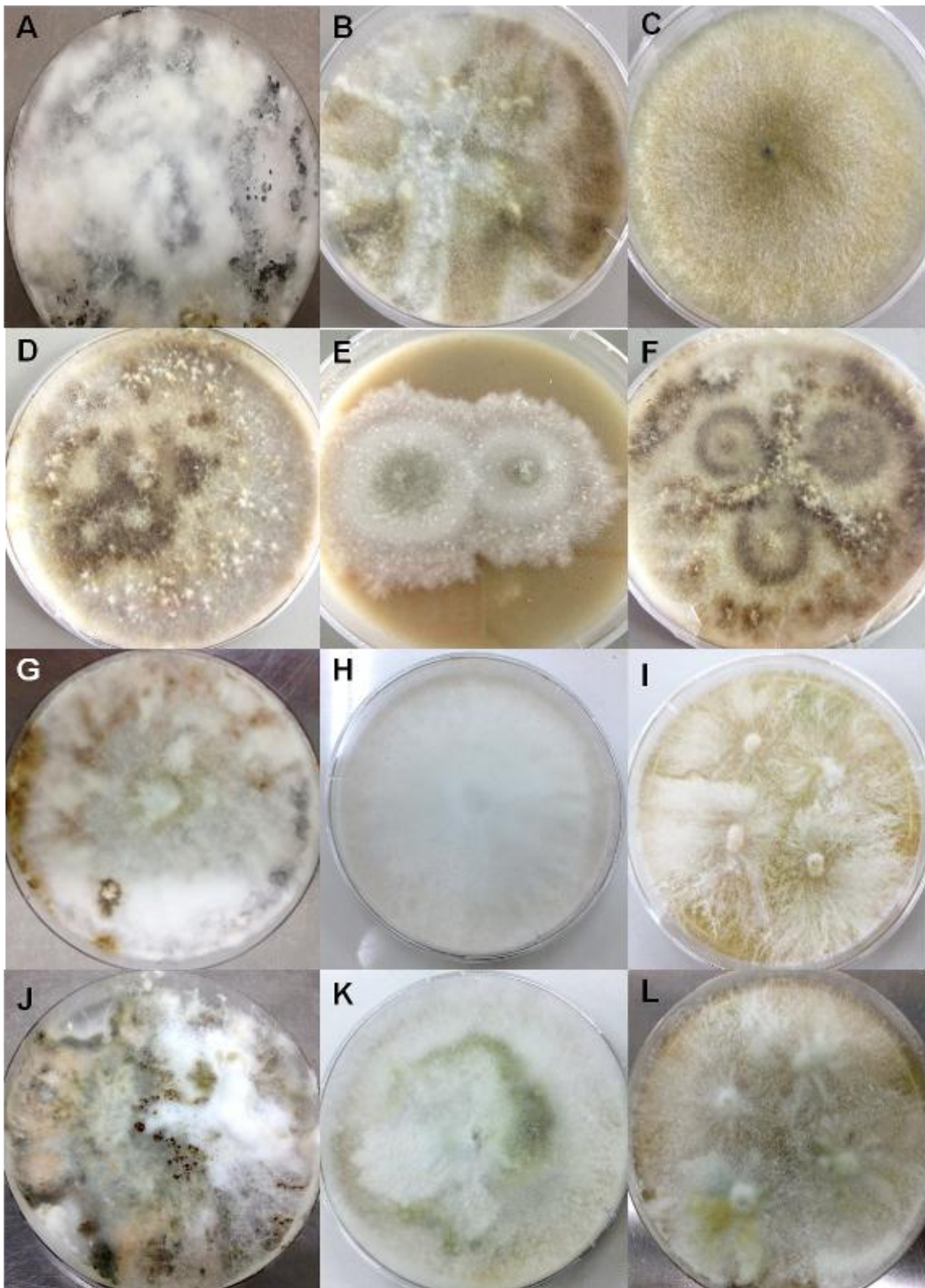


ภาพประกอบ 34 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทดสอบ 3 ชนิด (PDA, OA และ MEA ตามลำดับ) ของ ราสกุล *Annulohyphomyces*; (A-C) *A. moriforme* var. *microdiscus* (PK07013), (D-F) *A. multiforme* (PK121042), (G-I) *A. nitens* (PK121063) และ (J-L) *A. purpureonitens* (PK10006)



ภาพประกอบ 35 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทดสอบ 3 ชนิด (PDA, OA และ MEA ตามลำดับ) ของ ราสกุล *Annulohyphoxylon*; (A-C) *A. stygium* (PK121007), (D-F) *A. stygium* var. *annulatum* (PK121058), (G-I) *Annulohyphoxylon* species A (PK121027) และ (J-L) *Annulohyphoxylon* species B (PK121012)





ภาพประกอบ 36 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทดสอบ 3 ชนิด (PDA, OA และ MEA ตามลำดับ) ของราสกุล *Annulohypoxylon*; (A-C) *Annulohypoxylon* species C (PK121008), (D-F) *Annulohypoxylon* species D (PK121081), (G-I) *Annulohypoxylon* species E (PK07019) และ (J-L) *Annulohypoxylon* species H (PK07004)

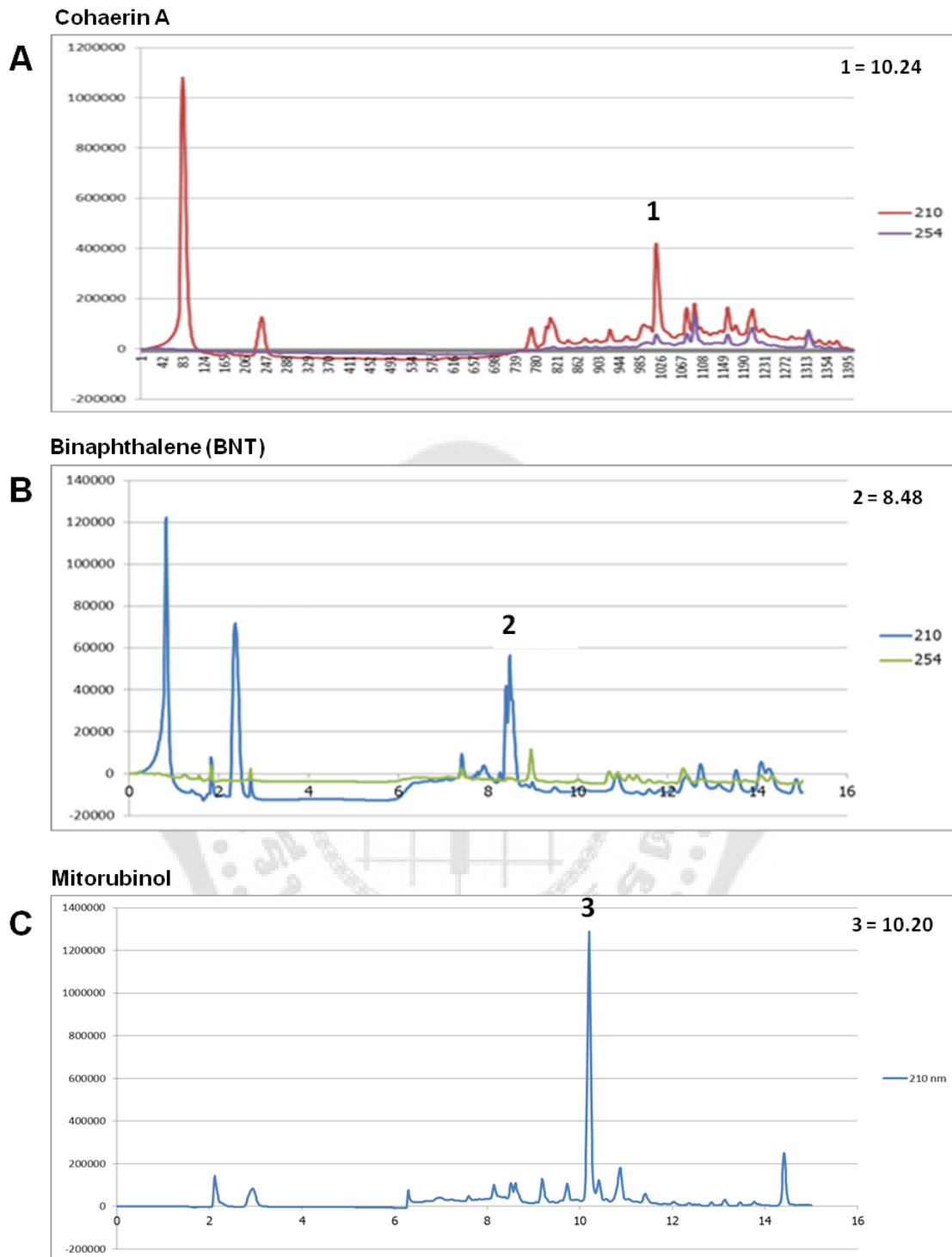
### 3. การศึกษา ลักษณะ ของสารเคมีที่สกัดได้จาก ราสกุล *Annulohyphoxylon* ด้วย เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

ผลการสกัดสารบริเวณสโตรมาของตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 15 ตัวอย่าง (15 ชนิด) ตามวิธีของ สเตดเลอร์ และคนอื่นๆ (Stadler; et al. 2001: 1190-1208) ด้วยสารละลาย เมทานอล (MeOH) แล้ววิเคราะห์ด้วย เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น (OD) 210 และ 254 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารตัวอย่างมาตรฐาน (standard) 3 ชนิด รายละเอียดอธิบายในวิธีการทดลอง ข้อ 3 ผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับราตัวอย่างที่ศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการแยกความแตกต่างของ ราแต่ละชนิด

#### 3.1 สารมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ (1) cohaerins A จากรา *Annulohyphoxylon cohaerens* (2) binaphthalene (BNT) และ (3) mitorubinol จากรา *Hyphoxylon fragiforme* (Stadler; & Fournier. 2006: 160-170) ผลแสดงดังภาพประกอบ 37

พบว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด มีการแสดงออกของพีคหลักที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างกัน คือ (1) cohaerins A แสดงออกที่เวลา 10.24 นาที (2) binaphthalene (BNT) แสดงออกที่เวลา 8.48 นาที และ (3) mitorubinol แสดงออกที่เวลา 10.20 นาที ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้นี้ (Stadler; et al. 2001: 1190-1208, Quang; et al. 2005: 797-809, Stadler; et al. 2008: 73-125) พบว่าระยะเวลาที่พีคแสดงออกจะใช้เวลามากกว่าที่มีรายงานไว้เล็กน้อยคือ (1) cohaerins A แสดงออกที่เวลา 9.92 นาที (2) binaphthalene (BNT) แสดงออกที่เวลา 7.75–8.01 นาที และ (3) mitorubinol แสดงออกที่เวลา 6.80 นาที ซึ่งเหตุผลที่สารมาตรฐาน มีการแสดงออกที่ระยะเวลานานกว่านั้น อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย โดยเฉพาะความยาวของ HPLC column ที่ใช้ในการทดลองนี้ที่มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ  $4.6 \times 150$  มิลลิเมตร ในขณะที่รายงานก่อนหน้านี้นี้มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ  $4 \times 125$  มิลลิเมตร แต่อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ของสารมาตรฐานที่ได้นั้นมีการแสดงออกของพีคหลักเพียง 1 พีคเท่านั้น ยกเว้นสาร BNT ที่มีการแสดงออกของพีคที่เวลา 2.46 นาที ด้วย ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสาร BNT ละลายยากใน เมทานอล จึงทำให้ได้สารที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จึงต้องกำหนด baseline ต่ำ ทำให้พบสารปนเปื้อนอื่นๆ ร่วมด้วย



ภาพประกอบ 37 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) cohaerins A, (B) binaphthalene และ (C) mitorubinol

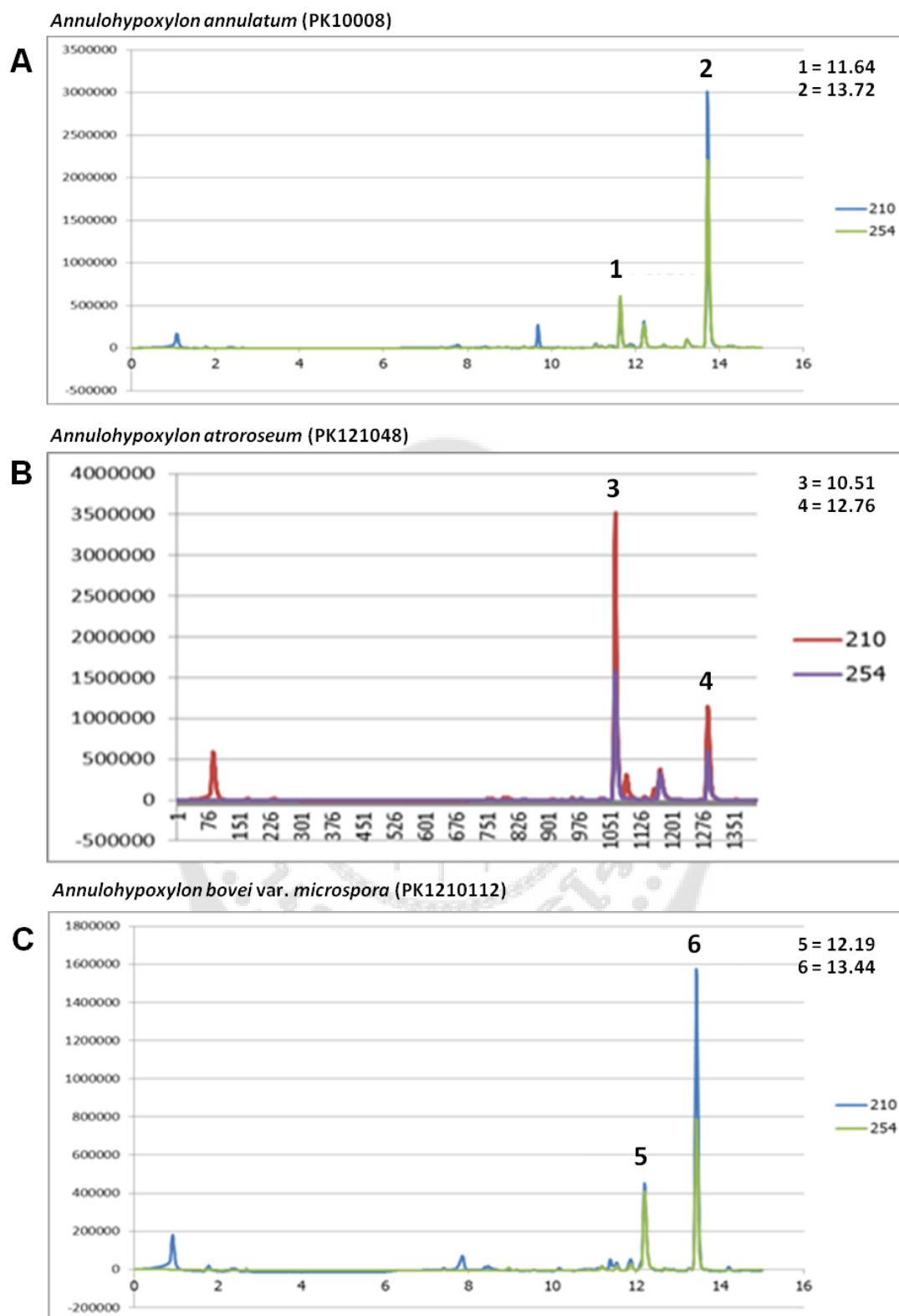
### 3.2 สารสกัดจากตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon*

ผลการวิเคราะห์สารสกัดจาก ตัวแทนราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 15 ตัวอย่าง (15 ชนิด) ได้แก่ *A. annulatum* (PK10008), *A. atroroseum* (PK121048), *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112), *A. moriforme* var. *microdiscus* (PK07008), *A. nitens* (PK121044), *A. purpureonitens* (PK10006), *A. stygium* (PK121007), *Annulohyphoxylon* species A (PK121027), *Annulohyphoxylon* species B (PK121012), *Annulohyphoxylon* species C (PK10007), *Annulohyphoxylon* species D (PK121081), *Annulohyphoxylon* species E (PK07019), *Annulohyphoxylon* species F (H130), *Annulohyphoxylon* species G (H255) และ *Annulohyphoxylon* species H (PK09005) (แสดงดังภาพประกอบ 38 – 42) ซึ่งพบว่าแต่ละตัวอย่างที่ศึกษามีรูปแบบของสารที่แสดงออกแตกต่างกันทั้งจำนวนและช่วงเวลา ที่ความยาวคลื่น (OD) 210 และ 254 นาโนเมตร โดยเฉพาะตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดทั้ง 8 ชนิด

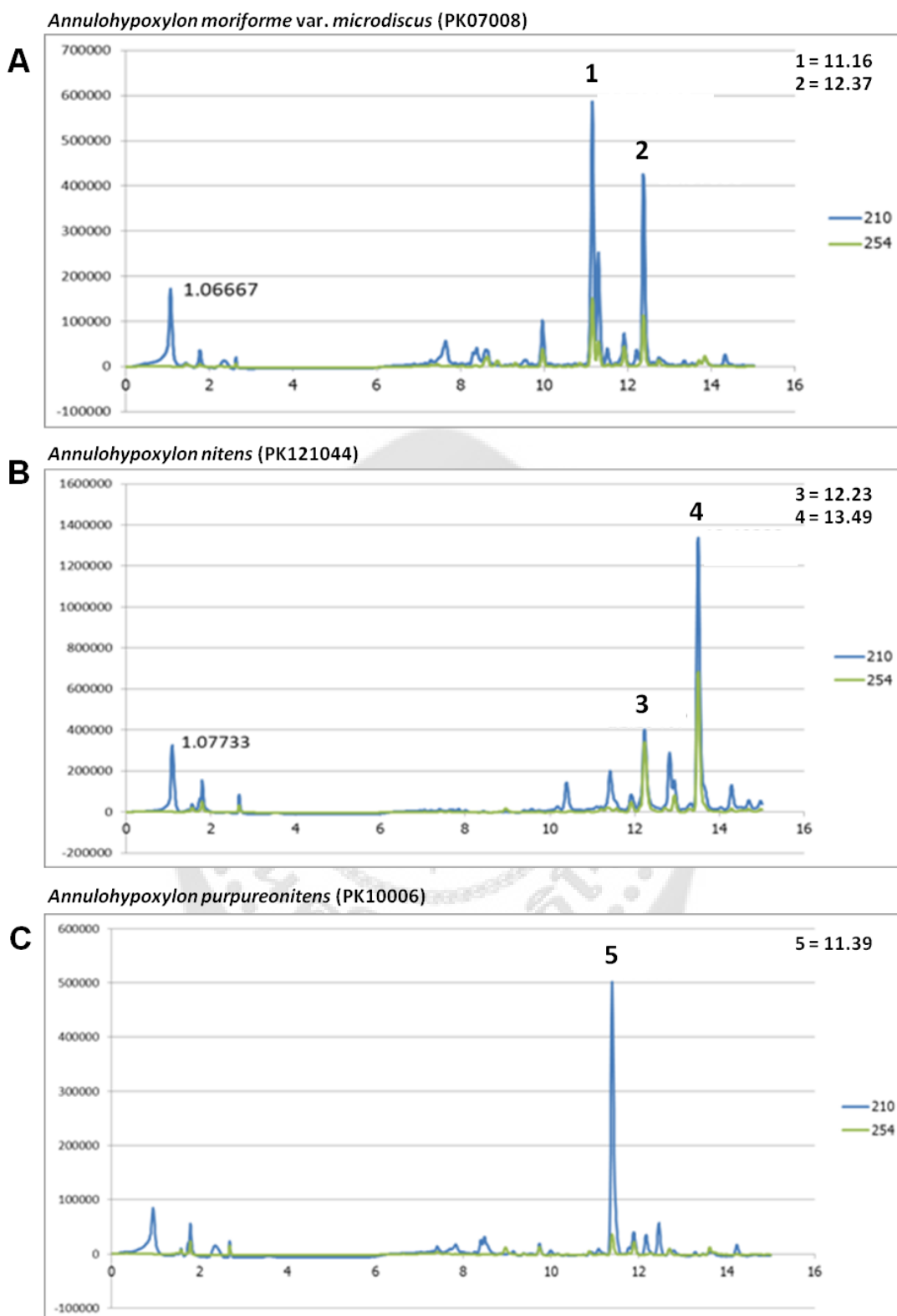
ผลการเทียบเคียงรูปแบบของสารสกัดที่ค่าความยาวคลื่น (OD) 210 นาโนเมตร ภายในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาแสดงใน ตาราง 23 พบว่า กลุ่มรา ที่สามารถระบุชนิดได้ เช่น *A. atroroseum* และ *A. stygium* มีการแสดงออกของพีคที่เวลาเดียวกันจำนวน 1 พีค (10.51/10.51 นาที) เช่นเดียวกับ *A. bovei* var. *microspora* และ *A. nitens* ที่มีการแสดงออกของพีคที่เวลาเดียวกันจำนวน 1 พีค (13.44/13.49 นาที) เช่นกัน ซึ่งรา ทั้งคู่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันสูง ส่วนกลุ่มราที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เช่น *Annulohyphoxylon* species A (PK121027) มีการแสดงออกของพีคจำนวน 2 พีค ที่เวลาเดียวกับ *A. moriforme* var. *microspora* (11.14/11.16 นาที) และ *A. atroroseum* กับ *Annulohyphoxylon* species H (PK09005) (12.78/12.76/12.78 นาที) ส่วน *Annulohyphoxylon* species C (PK10007) มีการแสดงออกของพีคจำนวน 1 พีค ที่เวลาเดียวกับ *A. atroroseum* และ *A. stygium* (10.57/10.51/10.51 นาที) ในขณะที่ *Annulohyphoxylon* species D (PK121081) และ *Annulohyphoxylon* species F (H130) พบการแสดงออกของพีคที่เวลาเดียวกับ *A. bovei* var. *microspora* และ *A. nitens* ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า บางชนิดสามารถสร้างสารบางอย่างที่คล้ายกัน

ส่วนผลการเทียบเคียงรูปแบบของสารสกัดที่ค่าความยาวคลื่น (OD) 254 นาโนเมตร (ตาราง 24) มีการแสดงออกของพีคใกล้เคียงค่าความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ยกเว้น *A. purpureonitens* ที่ไม่พบการแสดงออกของพีคใด เลย ในทางขณะที่ *Annulohyphoxylon* species G (H255) มีการแสดงออกของพีคที่เวลาเดียวกับ *A. annulatum* (13.76/13.72 นาที) ซึ่งตรวจไม่พบที่ค่าความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เป็นต้น

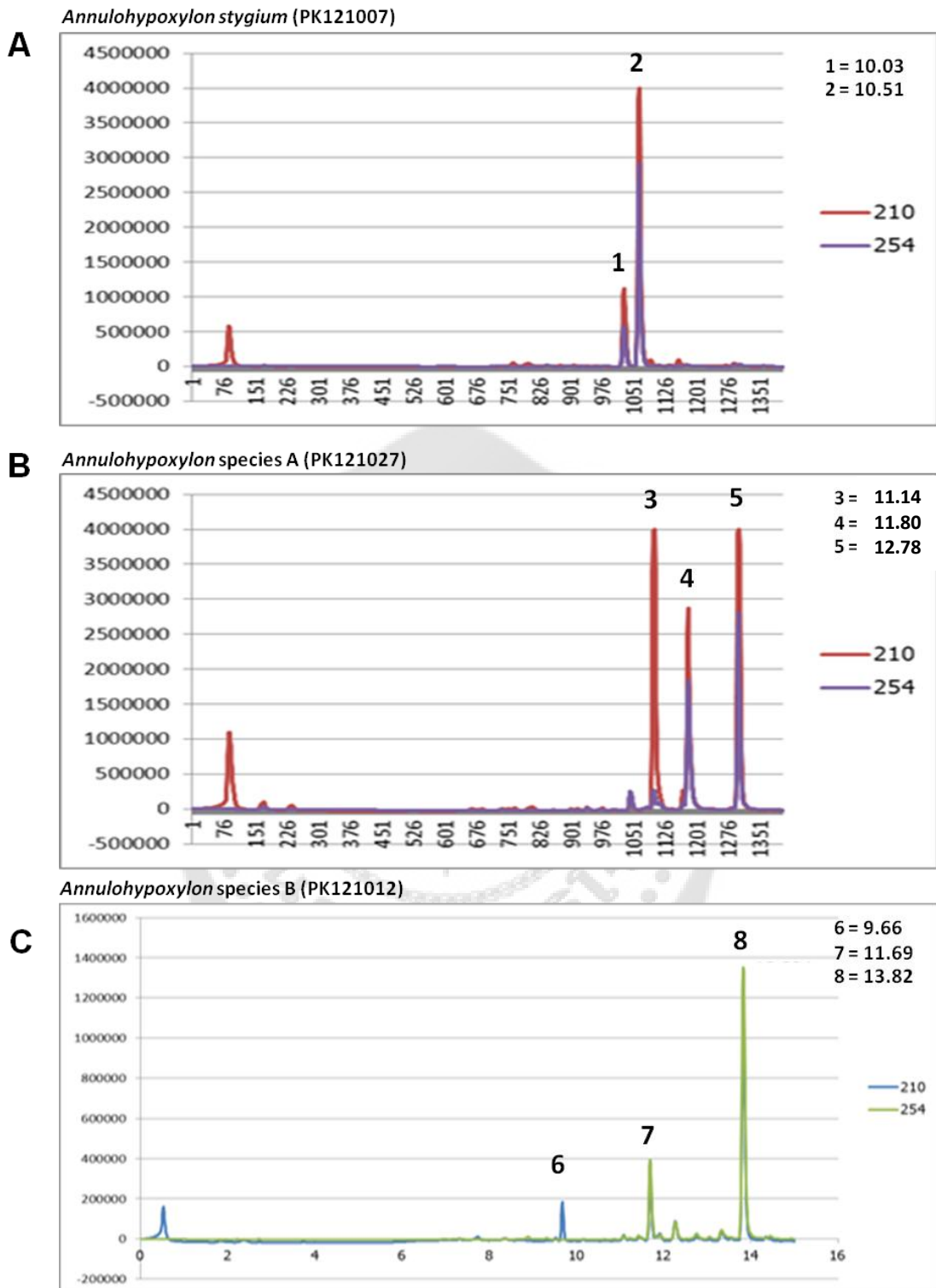
จากผลการวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่ารูปแบบของสารสกัดจาก ราสกุล *Annulohyphoxylon* สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการระบุชนิด ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และ ลักษณะทางพันธุกรรม ของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ และยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารแต่ละชนิดต่อไปได้อีกด้วย



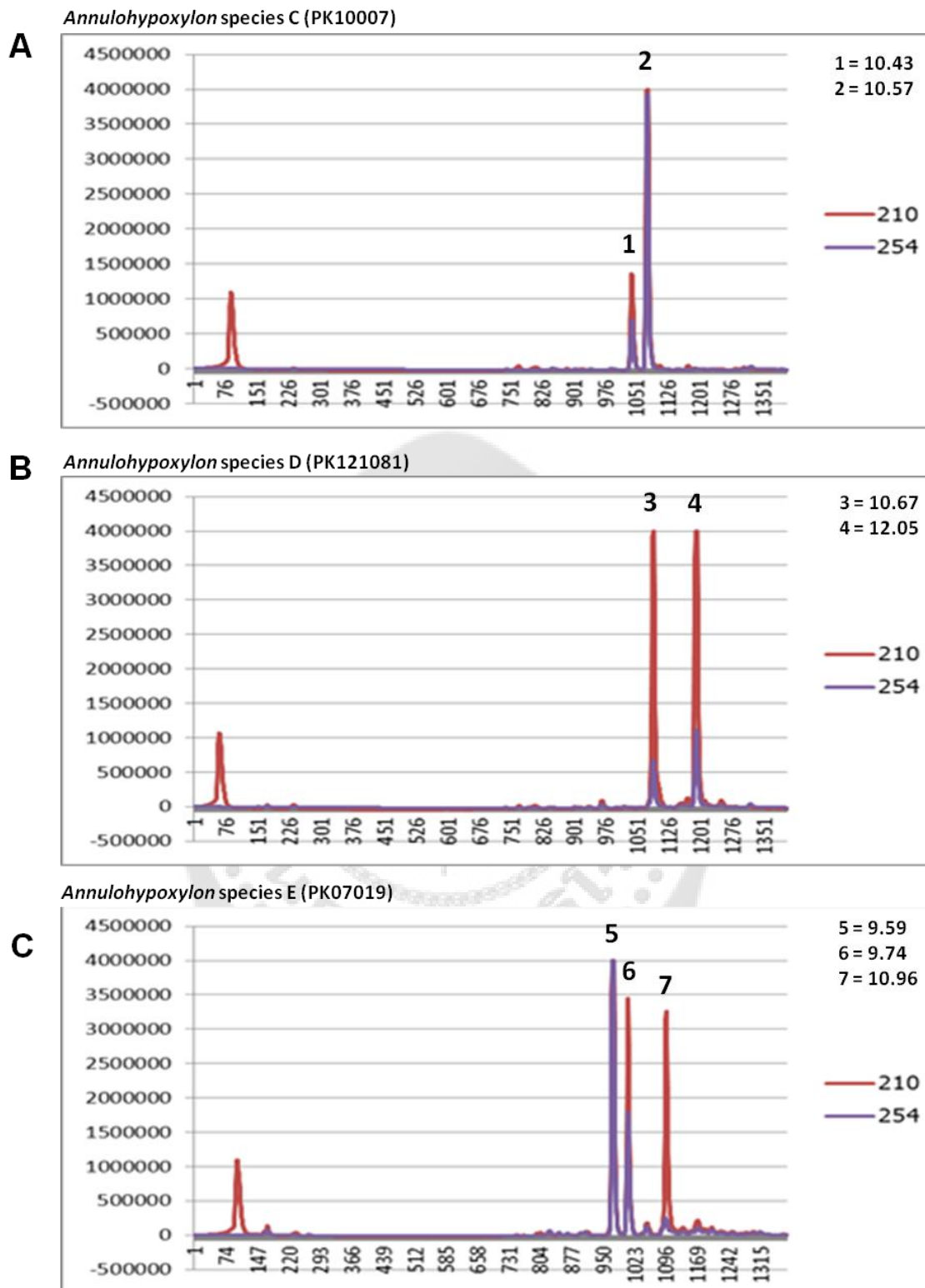
ภาพประกอบ 38 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) *A. annulatum* (PK10008), (B) *A. atroroseum* (PK121048) และ (C) *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112)



ภาพประกอบ 39 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) *A. moriforme* var. *microdiscus* (PK107008), (B) *A. nitens* (PK121044) และ (C) *A. purpureonitens* (PK10006)

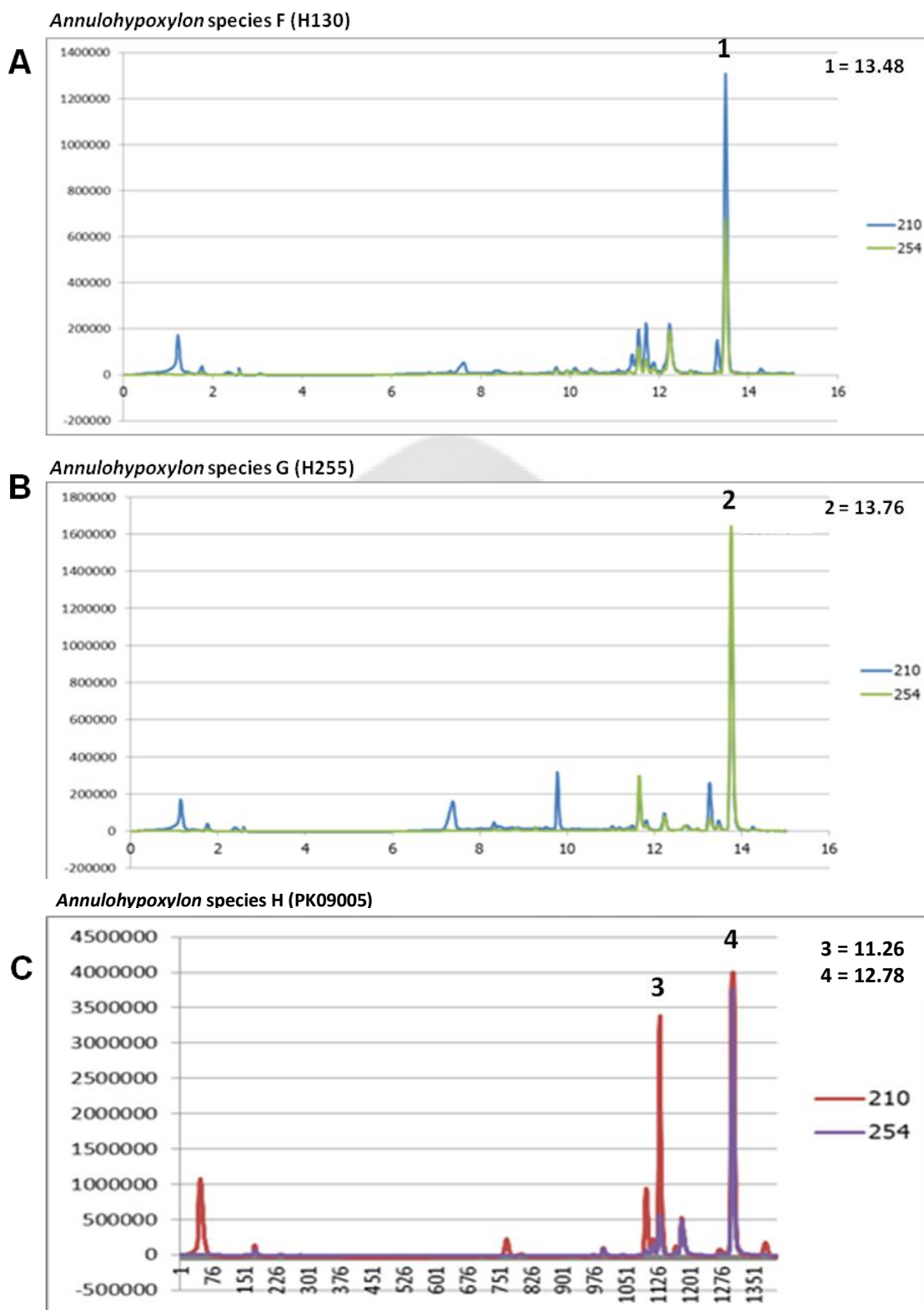


ภาพประกอบ 40 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) *A. stygium* (PK121007), (B) *Annulohypoxyton* species A (PK121027) และ (C) *Annulohypoxyton* species B (PK121012)



ภาพประกอบ 41 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) *Annulohypoxyton* species C (PK10007), (B) *Annulohypoxyton* species D (PK121081) และ (C) *Annulohypoxyton* species E (PK07019)





ภาพประกอบ 42 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร (A) *Annulohypoxyton* species F (H130), (B) *Annulohypoxyton* species G (H255) และ (C) *Annulohypoxyton* species H (PK09005)

ตาราง 23 การเทียบเคียงรูปแบบของสารสกัดที่ค่าความยาวคลื่น (OD) 210 นาโนเมตร ภายในกลุ่มราตัวอย่างที่ศึกษา

ชนิดของรา	เวลาแสดงออกของสารที่ความยาวคลื่น OD210 (nm)																			
<i>A. annulatum</i> (PK10008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.64	-	-	-	-	-
<i>A. atroroseum</i> (PK121048)	-	-	-	-	-	-	-	-	10.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.76	-
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> (PK1210112)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.19	-	-	-	13.44
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> (PK07008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.16	-	-	-	-	-	-	12.37	-	-
<i>A. nitens</i> (PK121044)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.23	-	-	-	13.49
<i>A. purpureonitens</i> (PK10006)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.39	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. stygium</i> (PK121007)	-	-	-	-	10.03	-	-	-	10.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species A (PK121027)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.14	-	-	11.80	-	-	-	-	12.78	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species B (PK121012)	-	-	9.66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species C (PK10007)	-	-	-	-	-	-	-	10.43	10.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species D (PK121081)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.67	-	-	-	-	12.05	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species E (PK07019)	-	9.59	-	9.74	-	-	-	-	-	-	10.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species F (H130)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.48
<i>Annulohyphoxylon</i> species G (H255)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species H (PK009005)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.26	-	-	-	-	-	12.78	-
Cohaerins A BNT	8.48	-	-	-	-	-	10.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mitorubinol	-	-	-	-	-	-	10.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 24 การเทียบเคียงรูปแบบของสารสกัดที่ค่าความยาวคลื่น (OD) 254 นาโนเมตร ภายในกลุ่มราตัวอย่างที่ศึกษา

ชนิดของรา	เวลาแสดงออกของสารที่ความยาวคลื่น OD254 (nm)																
<i>A. annulatum</i> (PK10008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.64	-	13.72
<i>A. atroroseum</i> (PK121048)	-	-	-	-	10.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.76
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> (PK1210112)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.19	-	13.44
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> (PK07008)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.16	12.37
<i>A. nitens</i> (PK121044)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.23	-	13.49
<i>A. purpureonitens</i> (PK10006)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. stygium</i> (PK121007)	-	-	10.03	-	10.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species A (PK121027)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.80	12.78
<i>Annulohyphoxylon</i> species B (PK121012)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.69	-	13.82
<i>Annulohyphoxylon</i> species C (PK10007)	-	-	-	10.43	10.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species D (PK121081)	-	-	-	-	-	-	10.67	-	-	-	-	-	-	-	12.05	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species E (PK07019)	9.59	9.74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon</i> species F (H130)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.48
<i>Annulohyphoxylon</i> species G (H255)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.76
<i>Annulohyphoxylon</i> species H (PK09005)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.78	-
Cohaerins A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BNT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mitorubinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

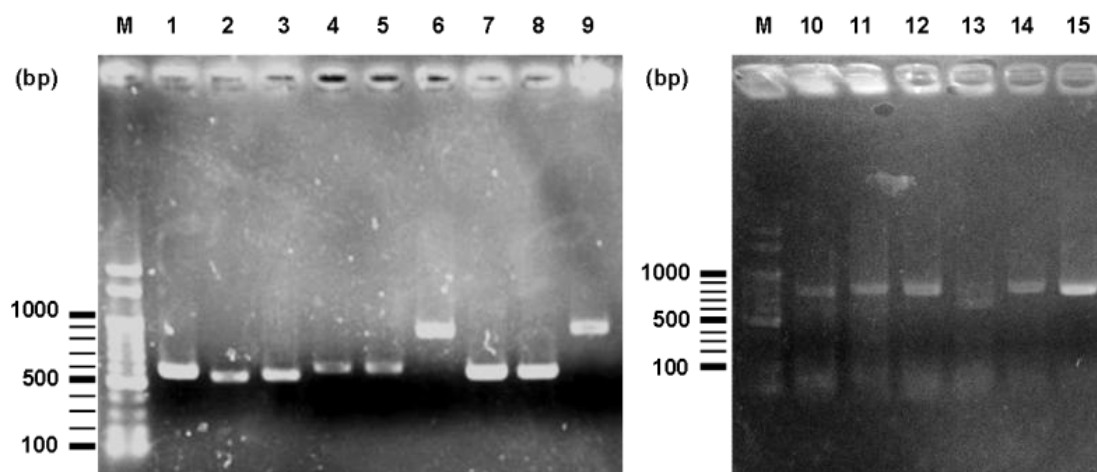
จากตัวแทน ราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่สามารถ เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ได้ จำนวน 83 ไอโซเลท เป็นราที่สามารถระบุชนิดได้ 10 ชนิด (63 ไอโซเลท) และเป็นรายังไม่สามารถ ระบุชนิดได้จำนวน 8 ชนิด (20 ไอโซเลท) ซึ่งราในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการที่แตกต่างจากราที่สามารถระบุชนิดได้ ประกอบกับขาดข้อมูลของลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นจึงนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากตัวแทนราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้จำนวน 29 ไอโซเลท มาช่วยในการระบุชนิด โดยนำเส้นใยราบริสุทธิ์มาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 บริเวณ ได้แก่ internal transcribed spacers (ITS) ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมตามวิธีที่อธิบายในวิธีการทดลองข้อ 4.2 ผลผลิตของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ นำมาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ก่อนส่งไปวิเคราะห์ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองในแต่ละบริเวณที่ศึกษาได้ดังนี้

##### 4.1 บริเวณ internal transcribed spacers (ITS)

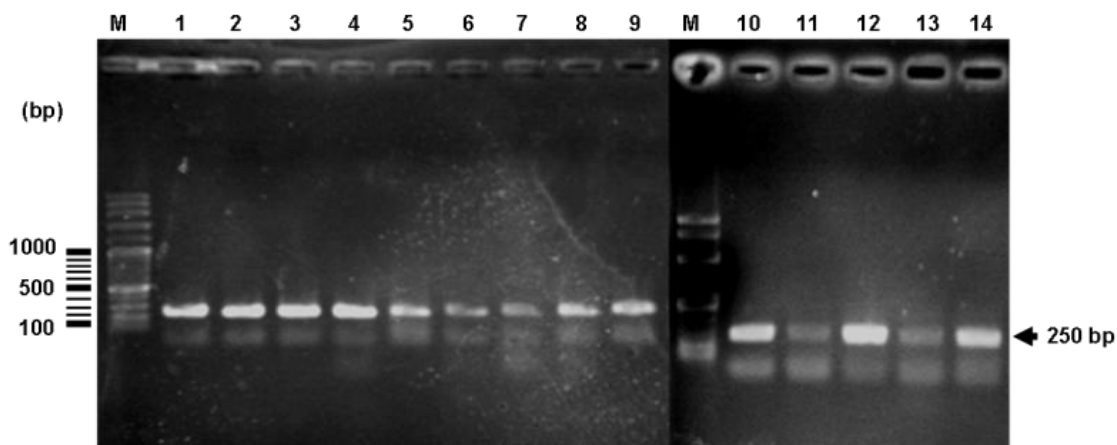
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 หรือ ITS1/ITS4 หรือ ITS1F/ITS4 (White; et al. 1990: 315-322) พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้ 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละความสำเร็จเท่ากับ 100 ซึ่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ ชิ้นที่มีขนาดน้อยกว่า 700 คู่เบส และชิ้นที่มีขนาดมากกว่า 700 คู่เบส ตัวอย่าง แสดงดังภาพประกอบ 43

##### 4.2 ยีน alpha - actin

เหตุผลที่เลือกศึกษาดีเอ็นเอบริเวณนี้เนื่องจากการต้องการเปรียบเทียบกับรา อ้างอิงในฐานข้อมูล GenBank โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน alpha-actin ใช้คู่ไพรเมอร์ ACT512F/ACT783R (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้ครบทั้ง 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละความสำเร็จเท่ากับ 100 ซึ่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ มีขนาดประมาณ 250 คู่เบส ตัวอย่างแสดงดังภาพประกอบ 44



ภาพประกอบ 43 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของราสกุล *Annulohypoxylopora* (M) 100 bp DNA ladder (1) *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112), (2) *A. annulatum* (PK121022), (3) *A. moriforme* var. *microdiscus* (PK07013), (4) *A. nitens* (PK121044), (5) *A. purpureonitens* (PK10006), (6) *A. atroroseum* (PK07001), (7) *Annulohypoxylopora* species A, (8) *Annulohypoxylopora* species B (PK121012), (9) *A. atroroseum* (PK121028), (10) *A. stygium* (PK121007), (11) *Annulohypoxylopora* species C (PK121008), (12) *Annulohypoxylopora* species C (PK1210103), (13) *Annulohypoxylopora* species D (PK121081), (14) *Annulohypoxylopora* species E (PK07019) และ (15) *Annulohypoxylopora* species H (PK09004)

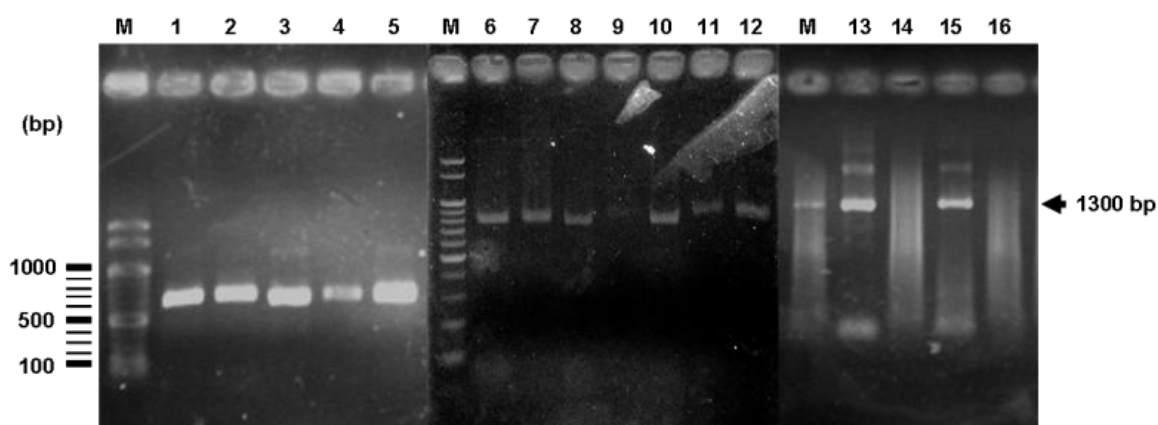


ภาพประกอบ 44 ตัวอย่างผล อะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ยีน alpha-actin ของราสกุล *Annulohyphoxylon* (M) 100 bp DNA ladder (1) *A. annulatum* (PK121022), (2) *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112), (3) *A. atroroseum* (PK07001), (4) *A. moriforme* var. *microdiscus* (PK07013), (5) *A. nitens* (PK121044), (6) *A. purpureonitens* (PK10006), (7) *A. stygium* (PK121007), (8) *Annulohyphoxylon* species B (PK121012), (9) *Annulohyphoxylon* species A (PK121027), (10) *Annulohyphoxylon* species C (PK1210103), (11) *Annulohyphoxylon* species D (PK121081), (12) *Annulohyphoxylon* species E (PK07019), (13) *Annulohyphoxylon* species F (H130) และ (14) *Annulohyphoxylon* species G (H255)

#### 4.3 ยีน beta – tubulin

เนื่องจากยีน beta-tubulin เป็นอีกยีนหนึ่งที่มีข้อมูลของลำดับเบสในสกุล *Annulohyphoxylon* จึงเป็นเหตุผลที่เลือกศึกษาดีเอ็นเอบริเวณนี้เช่นเดียวกับยีน alpha-actin ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ บริเวณยีน beta-tubulin เลือกใช้คู่ไพรเมอร์ T1/T22 (Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) ซึ่งในการเพิ่มจำนวนครั้งแรกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 1,200 – 1,300 คู่เบส ซึ่งพบว่ามีเพียง 5 ตัวอย่างเท่านั้น ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ทั้งนี้ตัวอย่างที่เหลือพบว่า ไม่สามารถเพิ่มจำนวน ได้ด้วยคู่ไพรเมอร์ดังกล่าว ดังนั้นจึงได้แบ่งการเพิ่มจำนวนออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอด้านปลาย 5' โดยใช้คู่ไพรเมอร์ T1/Bt2b หรือ T1/T2 (Glass; & Donalson. 1995: 1323-1330) มีขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส และส่วนที่สอง ด้านปลาย 3' โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Bt2a/T22 (Glass; & Donalson. 1995: 1323-1330; O'Donnell; & Cigelnik. 1997: 103-116) มีขนาด ประมาณ 800-900 คู่เบส แสดงดังภาพประกอบ 45 ซึ่งจากจำนวนตัวอย่างที่เหลือนำมาศึกษาพบว่า

สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแบบแบ่งส่วนได้ 17 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้นที่สามารถเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอ บริเวณ beta-tubulin ได้เท่ากับ 22 ตัวอย่าง (จาก 29 ตัวอย่าง) คิดเป็นร้อยละความสำเร็จเท่ากับ 75.86

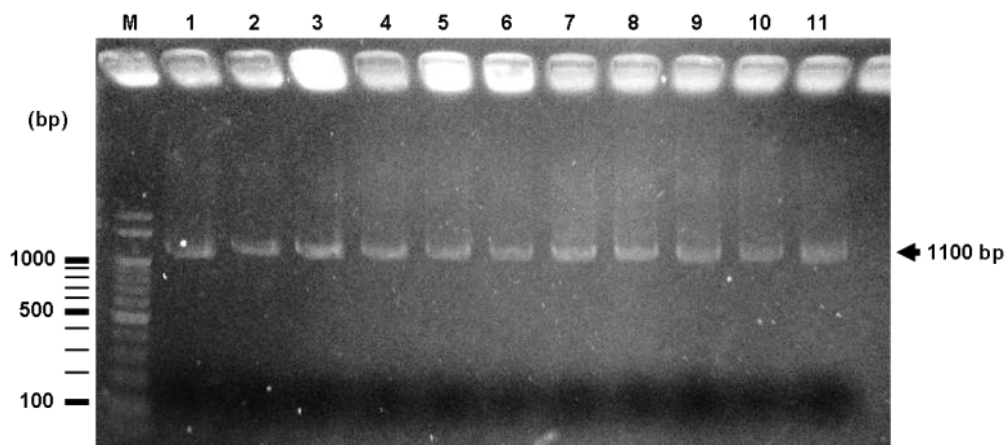


ภาพประกอบ 45 ตัวอย่างผล อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ยีน beta-tubulin ของราสกุล *Annulohyphoxylon* (M) 100 bp DNA ladder (1-5) ใช้ไพรเมอร์ T1/Bt2b, (6-12) ใช้ไพรเมอร์ Bt2a/T22, (13-16) ใช้ไพรเมอร์ T1/T22 (1) *A. annulatum* (PK121022), (2) *A. nitens* (PK121063), (3) *Annulohyphoxylon* species D (PK121081), (4) *Annulohyphoxylon* species B (PK121050), (5) *Annulohyphoxylon* species C (PK1210103), (6) *A. annulatum* (PK10008), (7) *A. atroroseum* (PK121030), (8) *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112), (9) *A. atroroseum* (PK121024), (10) *Annulohyphoxylon* species E (PK07019), (11) *Annulohyphoxylon* species F (H130), (12) *Annulohyphoxylon* species G (H255), (13) *A. nitens* (PK121044), (14) *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112), (15) *A. atroroseum* (PK121048), (16) *A. moriforme* var. *microdiscus* (PK07008) และ (17) *Annulohyphoxylon* species E (PK07019)

#### 4.4 ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ )

เนื่องจากผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน beta-tubulin ในข้อ 4.3 นั้นไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ครบสมบูรณ์ทุกตัวอย่าง ที่ศึกษา จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมในบริเวณยีน EF1- $\alpha$  ซึ่งเป็นการศึกษาครั้งแรกในราววงศ์ Xylariaceae รวมถึงราสกุล *Annulohyphoxylon* ผลจากการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอบริเวณยีน EF1- $\alpha$  โดยใช้คู่ไพรเมอร์ EF1-a983F/EF1-a2218R (Rehner; & Buckley.

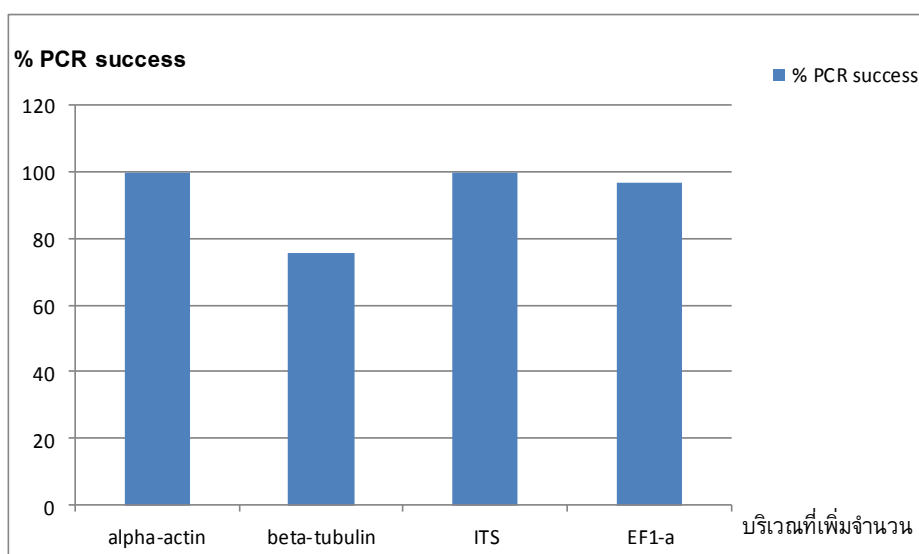
2005: 84-98) พบว่าได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 1,000-1,100 คู่เบส แสดงดังภาพประกอบ 46 และจากจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้ 28 ตัวอย่าง (จาก 29 ตัวอย่าง) คิดเป็นร้อยละความสำเร็จเท่ากับ 96.55



ภาพประกอบ 46 ตัวอย่างผล อะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟริซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) ของราสกุล *Annulohyphoxylon* (M) 100 bp DNA ladder (1) *A. annulatum* (PK10008), (2) *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112), (3) *A. atroroseum* (PK07001), (4) *A. moriforme* var. *microdiscus* (PK07012), (5) *A. nitens* (PK121086), (6) *Annulohyphoxylon* species B (PK121012), (7) *Annulohyphoxylon* species C (PK121008), (8) *Annulohyphoxylon* species D (PK121081), (9) *Annulohyphoxylon* species F (H130), (10) *Annulohyphoxylon* species G (H255) และ (11) *Annulohyphoxylon* species H (PK09007)

ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้ง 4 บริเวณ ได้แก่ ITS ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ ยีน elongation factor 1-alpha จากตัวแทนราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละความสำเร็จได้เท่ากับ 100, 100, 75.86 และ 96.55 ตามลำดับ (แสดงดังภาพประกอบ 47)





ภาพประกอบ 47 กราฟแสดงผลเปรียบเทียบร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (% PCR success) บริเวณ ITS ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ EF1- $\alpha$  ของราสกุล *Annulohyphoxylon*

## 5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic trees)

จากผลผลิตของดีเอ็นเอ ที่เพิ่มจำนวนได้ทั้ง 4 บริเวณ และมีขนาดถูกต้องตามที่กำหนด นำมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่อธิบายไว้ในวิธีการทดลองข้อ 5 ก่อนส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ แสดงดังตาราง 25 จากนั้นนำไปเทียบเคียงร้อยละความเหมือน (% similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ผลแสดงดังตาราง 26 และตาราง 27

ตาราง 25 ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS, ยีน alpha-actin, ยีน beta-tubulin และ ยีน elongation factor 1-alpha ของราสกุล *Annulohyphoxylon*

ชนิด	รหัส	ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)			
		ITS	alpha-actin	beta-tubulin	EF1- $\alpha$
<i>A. annulatum</i>	PK10008	603	244	704 <sup>T1*</sup>	911
<i>A. annulatum</i>	PK121022	600	233	892 <sup>T1*</sup>	1017
<i>A. atroseum</i>	PK07001	897	215	1151	1010

ตาราง 25 (ต่อ)

ชนิด	รหัส	ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)			
		ITS	alpha-actin	beta-tubulin	EF1- $\alpha$
<i>A. atroroseum</i>	PK121024	954	211	-	1042
<i>A. atroroseum</i>	PK121028	890	219	-	962
<i>A. atroroseum</i>	PK121030	884	213	1300	982
<i>A. atroroseum</i>	PK121048	850	224	1201	975
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i>	PK1210112	699	220	1530	1008
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07008	646	211	1393	974
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07012	633	215	1315	1025
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07013	631	214	1191	1003
<i>A. nitens</i>	PK121044	599	210	1387	1012
<i>A. nitens</i>	PK121063	635	220	754 <sup>T1*</sup>	868
<i>A. nitens</i>	PK121086	610	223	711 <sup>T1*</sup>	1000
<i>A. purpureonitens</i>	PK10006	606	216	1347	717*
<i>A. stygium</i>	PK121007	862	196	1427	911
<i>Annulohypoxyton</i> species A	PK121027	666	187	1139	618
<i>Annulohypoxyton</i> species B	PK121012	565	220	1195	1007
<i>Annulohypoxyton</i> species B	PK121050	550	219	1159	1008
<i>Annulohypoxyton</i> species C	PK10007	946	221	1084	1012

หมายเหตุ: \* คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ไม่สมบูรณ์, <sup>T1</sup> คือ ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้เฉพาะด้านปลาย 5' ด้วยไพรเมอร์ T1, <sup>T22</sup> คือ ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้เฉพาะด้านปลาย 3' ด้วยไพรเมอร์ T22

ตาราง 25 (ต่อ)

ชนิด	รหัส	ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)			
		ITS	alpha-actin	beta-tubulin	EF1- $\alpha$
<i>Annulohypoxyton</i> species C	PK121008	843	220	1347	1014
<i>Annulohypoxyton</i> species C	PK1210103	898	229	1497	1024
<i>Annulohypoxyton</i> species D	PK121081	906	222	1380	1004
<i>Annulohypoxyton</i> species E	PK07019	582	216	751 <sup>T22*</sup>	-
<i>Annulohypoxyton</i> species F	H130	857	221	1023 <sup>T22*</sup>	1037
<i>Annulohypoxyton</i> species G	H255	477	227	1012 <sup>T22*</sup>	604*
<i>Annulohypoxyton</i> species H	PK09004	871	208	1361	832
<i>Annulohypoxyton</i> species H	PK09005	932	214	1397	913
<i>Annulohypoxyton</i> species H	PK09007	860	212	-	1048

หมายเหตุ: \* คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ไม่สมบูรณ์, <sup>T1</sup> คือ ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้เฉพาะด้านปลาย 5' ด้วยไพรเมอร์ T1, <sup>T22</sup> คือ ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้เฉพาะด้านปลาย 3' ด้วยไพรเมอร์ T22

ตาราง 26 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และยีน alpha-actin ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

ชนิด	รหัส	ITS			Alpha-actin		
		ชนิด	Accession No.	% similarity	ชนิด	Accession No.	% similarity
<i>A. annulatum</i>	PK10008	<i>Annulohyphoxylon annulatum</i> isolate C4	FJ481150	97	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	93
<i>A. annulatum</i>	PK121022	<i>A. annulatum</i> isolate C4	FJ481150	97	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	93
<i>A. atroroseum</i>	PK07001	<i>A. atroroseum</i> isolate H178	FN252415	99	<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951776	93
<i>A. atroroseum</i>	PK121024	<i>A. atroroseum</i> isolate H178	FN252415	99	<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951776	92
<i>A. atroroseum</i>	PK121028	<i>A. atroroseum</i> isolate H178	FN252415	98	<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951776	93
<i>A. atroroseum</i>	PK121030	<i>A. atroroseum</i> isolate H178	FN252415	98	<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951776	93
<i>A. atroroseum</i>	PK121048	<i>A. atroroseum</i> isolate F11	JN002173	99	<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951776	93
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i>	PK1210112	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	EF026141	99	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	100
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07008	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	EF026137	99	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951769	99
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07012	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	EF026137	99	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951769	99
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07013	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	EF026137	99	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951769	99
<i>A. nitens</i>	PK121044	<i>A. nitens</i> isolate 91022108	EF026138	100	<i>A. nitens</i> voucher YMJ 293	AY951773	95

ตาราง 26 (ต่อ)

ชนิด	รหัส	ITS			Alpha-actin		
		ชนิด	Accession No.	% similarity	ชนิด	Accession No.	% similarity
<i>A. nitens</i>	PK121063	<i>A. nitens</i>	EU714403	97	<i>A. nitens</i> voucher YMJ 293	AY951773	95
<i>A. nitens</i>	PK121086	<i>A. nitens</i>	EU714403	100	<i>A. nitens</i> YMJ 91022108	AY951772	95
<i>A. purpureonitens</i>	PK10006	<i>A. purpureonitens</i> isolate H147	FM209452	99	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	90
<i>A. stygium</i>	PK121007	<i>A. stygium</i> isolate 105F	FJ008986	99	<i>A. stygium</i> YMJ 90081906	AY951775	98
<i>Annulohyphoxylon</i> species A	PK121027	<i>Annulohyphoxylon</i> sp. SUT220	DQ322129	97	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	95
<i>Annulohyphoxylon</i> species B	PK121012	<i>Annulohyphoxylon</i> sp. SUT025	DQ322096	99	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	95
<i>Annulohyphoxylon</i> species B	PK121050	<i>Annulohyphoxylon</i> sp. SUT025	DQ322096	99	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	96
<i>Annulohyphoxylon</i> species C	PK10007	<i>A. stygium</i> XH16	FJ848865	92	<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951776	91
<i>Annulohyphoxylon</i> species C	PK12008	<i>A. stygium</i> CSIRO(M) E7100	AJ537403	97	<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> 91042205	AY951778	88
<i>Annulohyphoxylon</i> species C	PK1210103	<i>A. stygium</i> CSIRO(M) E7100	AJ537403	99	<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> 91042205	AY951778	88
<i>Annulohyphoxylon</i> species D	PK121081	<i>A. urceolatum</i> SUT098	DQ322103	98	<i>A. urceolatum</i> YMJ 92090413	AY951782	100
<i>Annulohyphoxylon</i> species E	PK07019	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	EF026141	89	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	93
<i>Annulohyphoxylon</i> species F	H130	<i>A. multiforme</i> strain-F160	AY909003	92	<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> YMJ91042205	AY951778	89
<i>Annulohyphoxylon</i> species G	H255	<i>A. multiforme</i> isolate olrim319	AY354245	88	<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> YMJ91042205	AY951778	92
<i>Annulohyphoxylon</i> species H	PK09004	" <i>A. nitensa</i> " isolate H215	FN252422	99	<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H254	FR875160	88
<i>Annulohyphoxylon</i> species H	PK09005	" <i>A. nitensa</i> " isolate H215	FN252422	99	<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H254	FR875160	96
<i>Annulohyphoxylon</i> species H	PK09007	" <i>A. nitensa</i> " isolate H215	FN252422	99	<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H254	FR875160	96

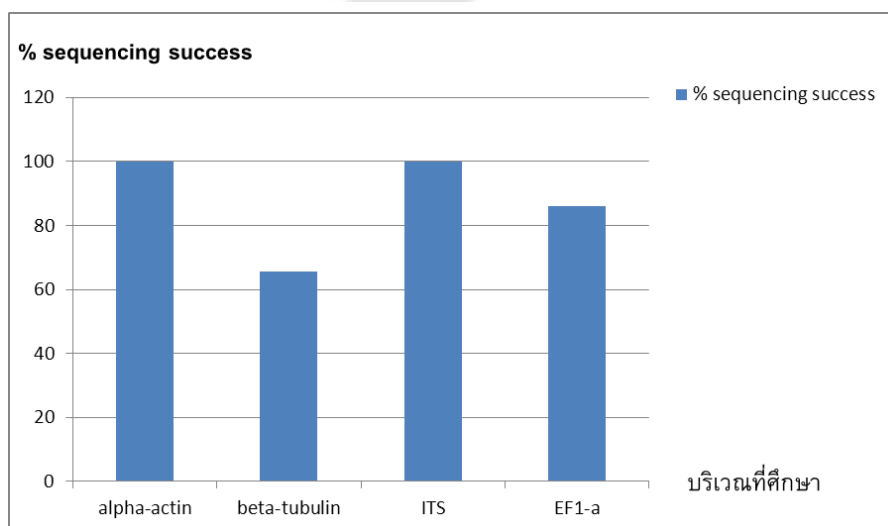
ตาราง 27 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin และ elongation factor 1-alpha ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการศึกษา กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

ชนิด	รหัส	Beta-tubulin			Elongation factor 1-alpha		
		ชนิด	Accession No.	% similarity	ชนิด	Accession No.	% similarity
<i>A. annulatum</i>	PK10008	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951660	93	<i>Graphostroma platystoma</i> isolate AFTOL-ID 1249	DQ836915	87
<i>A. annulatum</i>	PK121022	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951654	88	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>A. atroroseum</i>	PK07001	<i>A. squamulosum</i> YMJ 90081905	AY951665	87	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>A. atroroseum</i>	PK121024	-	-	-	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	87
<i>A. atroroseum</i>	PK121028	-	-	-	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	84
<i>A. atroroseum</i>	PK121030	<i>A. stygium</i> isolate RSG03	KF612315	97	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>A. atroroseum</i>	PK121048	<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951666	98	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i>	PK1210112	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951654	96	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	90
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07008	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951660	92	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	90
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07012	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951660	94	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	91
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i>	PK07013	<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951660	97	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	90
<i>A. nitens</i>	PK121044	<i>A. nitens</i> voucher YMJ 293	AY951664	99	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89

ตาราง 27 (ต่อ)

ชนิด	รหัส	Beta-tubulin			Elongation factor 1-alpha		
		ชนิด	Accession No.	% similarity	ชนิด	Accession No.	% similarity
<i>A. nitens</i>	PK121063	<i>A. nitens</i> YMJ 91022108	AY951663	86	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>A. nitens</i>	PK121086	<i>A. nitens</i> voucher YMJ 293	AY951664	92	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>A. purpureonitens</i>	PK10006	<i>A. squamulosum</i> YMJ 90081905	AY951665	87	-	-	-
<i>A. stygium</i>	PK121007	<i>A. stygium</i> YMJ 90081906	AY951667	96	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	90
<i>Annulohypoxyton</i> species A	PK121027	<i>A. stygium</i> YMJ 90081906	AY951667	94	-	-	-
<i>Annulohypoxyton</i> species B	PK121012	<i>A. stygium</i> isolate RSG03	KF612315	89	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	88
<i>Annulohypoxyton</i> species B	PK121050	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951654	95	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>Annulohypoxyton</i> species C	PK10007	<i>A. squamulosum</i> YMJ 90081905	AY951665	86	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>Annulohypoxyton</i> species C	PK121008	<i>A. stygium</i> YMJ 90081906	AY951667	95	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>Annulohypoxyton</i> species C	PK1210103	<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951666	91	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>Annulohypoxyton</i> species D	PK121081	<i>A. urceolatum</i> YMJ 92090413	AY951670	99	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	87
<i>Annulohypoxyton</i> species E	PK07019	<i>A. stygium</i> YMJ 90081906	AY951667	81	-	-	-
<i>Annulohypoxyton</i> species F	H130	<i>Annulohypoxyton</i> sp. H203	FR875165	93	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	89
<i>Annulohypoxyton</i> species G	H255	<i>A. stygium</i> isolate RSG03	KF612315	95	-	-	-
<i>Annulohypoxyton</i> species H	PK09004	<i>Annulohypoxyton</i> sp. H203	FR875165	95	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	86
<i>Annulohypoxyton</i> species H	PK09005	<i>Annulohypoxyton</i> sp. H203	FR875165	96	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	87
<i>Annulohypoxyton</i> species H	PK09007	-	-	-	<i>G. platystoma</i> AFTOL-ID 1249	DQ836915	87

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทน ราแต่ละชนิด ทั้งระบุชนิดได้ และไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 29 ตัวอย่าง มี 15 ตัวอย่างที่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ครบทั้ง 4 บริเวณ ดังแสดงในตาราง 25 และเมื่อวิเคราะห์ร้อยละความสำเร็จในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ (% sequencing success) พบว่า จาก 29 ตัวอย่าง บริเวณ ITS และยีน alpha-actin สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สมบูรณ์ในทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 รองลงมาคือยีน EF1- $\alpha$  สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สมบูรณ์ 25 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 86 และยีน beta-tubulin สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สมบูรณ์เพียง 19 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 65.52 (แสดงดังภาพประกอบ 48)



ภาพประกอบ 48 กราฟแสดงผลเปรียบเทียบร้อยละความสำเร็จในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (% sequencing success) บริเวณ ITS ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ EF1- $\alpha$  ของราสกุล *Annulohyphoxylon*

ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 16 ตัวอย่าง บริเวณยีน alpha-actin และยีน beta-tubulin ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ ราอ้างอิงชนิดเดียวกัน ยกเว้นบางชนิดที่ขาดข้อมูลของยีนดังกล่าว ได้แก่ *A. annulatum*, *A. atroseum* และ *A. purpleonitens* อย่างไรก็ตามผลการเทียบเคียงของบริเวณ ITS แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุดคือ ร้อยละ 97 - 100 กับราชนิดนั้นๆ ซึ่งผลการเทียบเคียงดังกล่าว สามารถช่วยยืนยันชนิดของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 7 ชนิด สนับสนุนข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษา



สำหรับตัวอย่าง ราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ *Annulohypoxyton* species A – H จำนวน 13 ตัวอย่าง ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน alpha-actin และ beta-tubulin ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีร้อยละความเหมือนค่อนข้างต่ำคือ ร้อยละ 88 ถึง ร้อยละ 96 กับราสกุล *Annulohypoxyton* อ้างอิงที่สามารถระบุชนิดได้ ยกเว้น รา *Annulohypoxyton* species D (PK121081) ที่มีร้อยละความเหมือนสูงสุด ของยีน alpha-actin และยีน beta-tubulin กับรา *A. urceolatum* (AY951782) เท่ากับร้อยละ 100 และร้อยละ 99 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการเทียบเคียงบริเวณ ITS แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุดกับรา *A. urceolatum* (DQ322103) เช่นเดียวกัน และมีร้อยละความเหมือนเท่ากับร้อยละ 98 ที่เกิดจากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาเทียบเคียงด้วยโปรแกรม pairwise พบว่ามีร้อยละความเหมือนเพียงร้อยละ 87 เท่านั้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่า *Annulohypoxyton* species D (PK121081) ไม่ใช่รา *A. urceolatum* แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Annulohypoxyton* species D (PK121081) มีความคล้ายคลึงกับ *A. urceolatum* (Rehm) Y.-M. Ju, J.D. Rogers & H.-M. Hsieh (Ju; & Rogers. 1996: 1-365; Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865) มากที่สุด เว้นแต่ขนาดของแอสโคสปอร์ที่มีขนาดเล็กกว่า จากผลการวิเคราะห์นี้ยังช่วยสนับสนุนว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน alpha-actin และ beta-tubulin เหมาะสำหรับการใช้จัดกลุ่มในระดับสกุล (genus) มากกว่าระดับ สปีชีส์ (species) และวาไรตี้ (variety) ในขณะที่บริเวณ ITS สามารถบ่งบอกความแตกต่างของ ชนิดราที่มีความใกล้เคียงกันสูงได้ในระดับสปีชีส์และวาไรตี้

ส่วนผลการเทียบเคียงบริเวณ ITS ของราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้อื่นๆ ได้แก่ *Annulohypoxyton* species E (PK07019), *Annulohypoxyton* species F (H130) และ *Annulohypoxyton* species G (H255) พบว่ามีร้อยละความเหมือนสูงสุดกับราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ระบุชนิดได้ด้วยค่าร้อยละความเหมือนที่ต่ำเท่ากับร้อยละ 89, 92 และ 88 ตามลำดับ ในขณะที่ ราบางตัวอย่าง ได้แก่ *Annulohypoxyton* species A (PK121027) และ *Annulohypoxyton* species B (PK121012 และ PK121050) มีค่าร้อยละเท่ากับร้อยละ 99 กับราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ และ *Annulohypoxyton* species H (PK09004, PK09005 และ PK09007) มีค่าร้อยละความเหมือนสูงเท่ากับร้อยละ 99 กับรา “*A. nitensa*” (FN252422) ซึ่งมีรายงานว่าเป็น “cryptics species” ของรา *A. nitens* (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ส่วน *Annulohypoxyton* species C (PK10007, PK121008 และ PK1210103) แม้ว่าผลร้อยละความเหมือนจะมีค่าสูงสุดกับรา เอนโดไฟท์ *A. stygium* (AJ537403) เท่ากับร้อยละ 92, 97 และ 99 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถนำมาช่วยในการระบุชนิดได้ เนื่องจากราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ไม่สร้างการสืบพันธุ์ แบบอาศัยเพศ บนอาหารเลี้ยงเชื้อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จึงน่าเชื่อถือน้อยกว่า ดังนั้นจึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา *A. stygium* (AJ390409 และ DQ223761) ที่ได้จากระยะ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จากฐานข้อมูล GenBank มาวิเคราะห์เทียบเคียงกับราตัวอย่างด้วยโปรแกรม pairwise พบว่า มีร้อยละความเหมือนเพียงร้อยละ 92 จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า *Annulohypoxyton* species C ไม่ใช่รา *A. stygium* ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่ได้แสดงให้เห็นว่า สามารถใช้บ่งบอกความแตกต่างของ ราสกุล

*Annulohypoxyton* ชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ หรือชนิดที่ซับซ้อนซึ่งยากต่อการระบุชนิดออกจากรันได้

นอกจากนี้ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมบริเวณยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) ของตัวแทนราทั้ง 28 ตัวอย่าง พบว่า สามารถบ่งบอกความแตกต่างของชนิด ราที่ศึกษาได้ โดยเฉพาะรา ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ จากผลการวิเคราะห์ยีนบริเวณดังกล่าวนอกจากจะใช้สนับสนุนข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS, ยีน alpha-actin และ ยีน beta-tubulin ในการระบุชนิดแล้ว ยังเป็นข้อมูลใหม่ในการศึกษาราสกุล *Annulohypoxyton* อีกด้วย

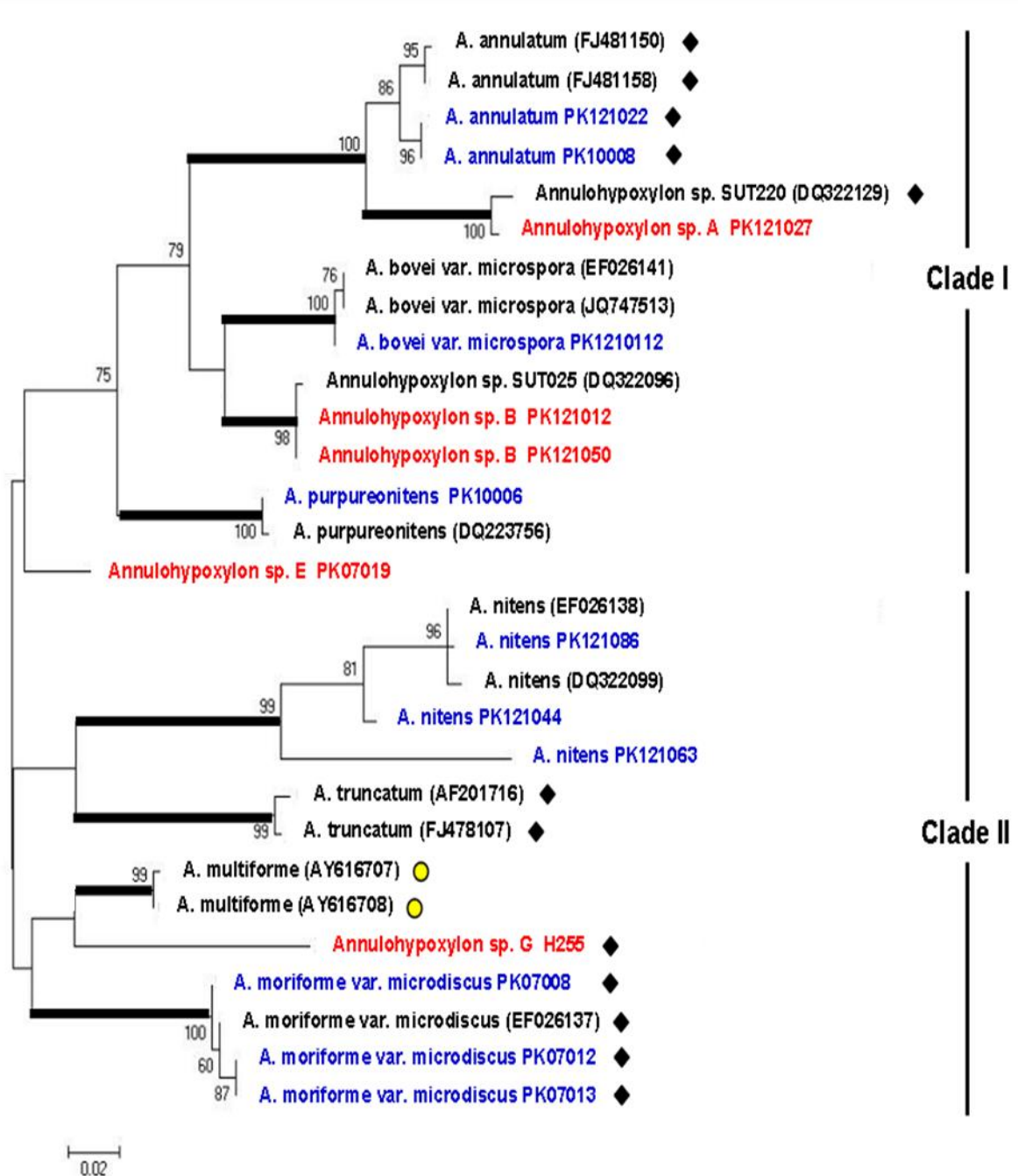
จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษาในแต่ละบริเวณ มาวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่าง โดยนำมาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) แยกตามชนิดของแต่ละยีนที่ศึกษาด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson; et al. 1994: 4673-4680) และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ตามวิธีการทดลองในข้อ 6 สามารถสรุปผลการทดลองในแต่ละบริเวณที่ศึกษาได้ดังนี้

### 5.1 บริเวณ internal transcribed spacers (ITS)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวแทนราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ศึกษาจำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่า มีขนาดที่แตกต่างกันมาก คือ 477–954 คู่เบส (แสดงดังตาราง 25) จึงยากต่อการจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ให้ถูกต้อง ทั้งนี้พบว่าบริเวณที่มีความแปรผันสูงคือ ITS1 ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 155-585 คู่เบส ในขณะที่บริเวณ 5.8S-ITS2 มีขนาด 295-327 คู่เบส ดังนั้นในการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ จึงได้แบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 3 กลุ่ม เพื่อให้ได้แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ที่ถูกต้อง คือ กลุ่ม ที่ 1 คือราที่มีขนาด ITS1-5.8S-ITS2 ยาวน้อยกว่า 700 คู่เบส กลุ่มที่ 2 คือราที่มีขนาด ITS1-5.8S-ITS2 ยาวมากกว่า 700 คู่เบส และกลุ่มที่ 3 คือการวิเคราะห์รวมทั้งหมด 29 ตัวอย่าง โดยเลือกเฉพาะบริเวณ 5.8S-ITS2 ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank แสดงผลการวิเคราะห์ที่ได้ดังนี้

#### 5.1.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ที่มีความยาวน้อยกว่า 700 คู่เบส

ตัวแทนราสกุล *Annulohypoxyton* ที่มีขนาด ITS1-5.8S-ITS2 ยาวน้อยกว่า 700 คู่เบส ซึ่งมีจำนวน 15 ตัวอย่าง (9 ชนิด) นำมาวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ที่เป็นราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ทราบชนิดทั้งหมดจำนวน 14 ตัวอย่าง (9 ชนิด) (ภาคผนวก ง) โดยทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ 3 วิธี ด้วยโปรแกรม 2 โปรแกรม พบว่าให้ผลคล้ายคลึงกันในการจัดกลุ่มของราแต่ละชนิด ซึ่งมีค่า bootstrap แตกต่างกันอย่างเล็กน้อย จึงเลือกแสดงผลเพียงแผนภูมิเดียวจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA (Tamura; et al. 2011: 2731-2739) แสดงดังภาพประกอบ 49 (ภาคผนวก จ)



ภาพประกอบ 49 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีความยาวน้อยกว่า 700 คู่เบส ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ● คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

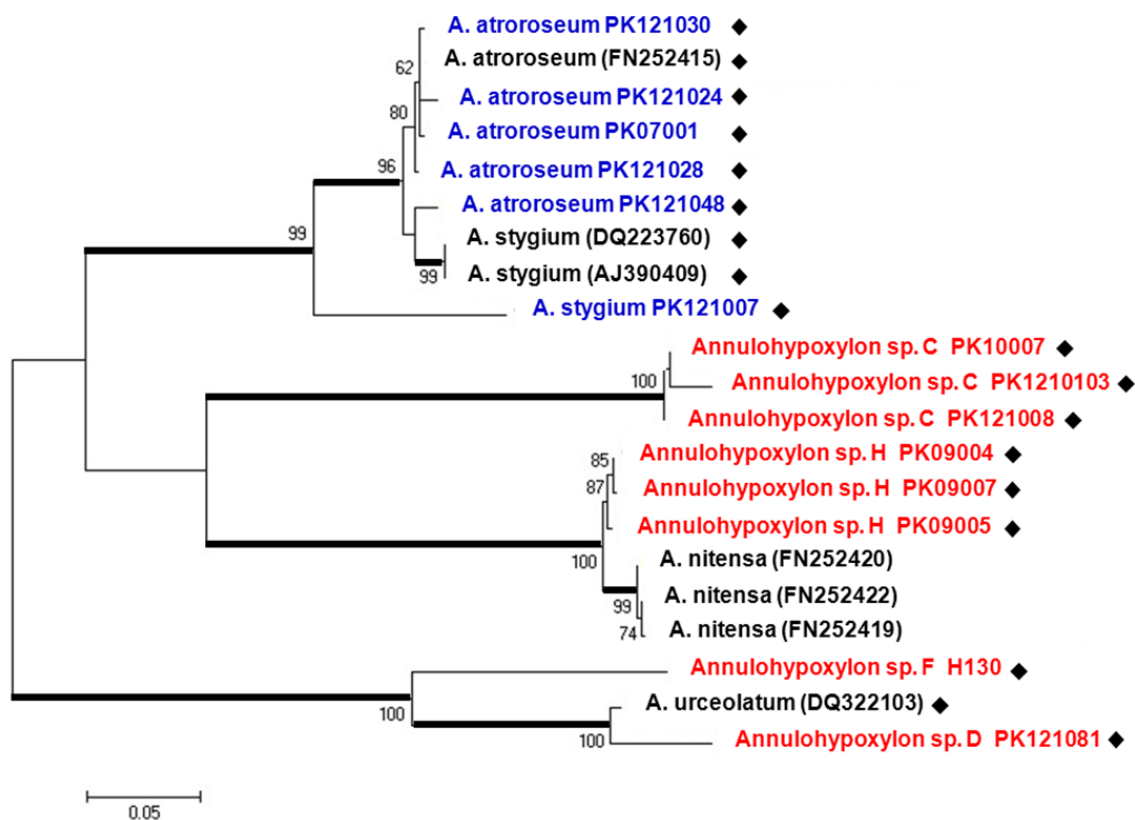
จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีความยาวน้อยกว่า 700 คู่เบส สามารถจัดกลุ่มราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ

**กลุ่มที่ 1 (clade 1)** ประกอบด้วยราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Annulohyphoxylon annulatum*, *A. bovei* var. *microspora*, *Annulohyphoxylon* sp. SUT220, *A. purpureonitens*, *Annulohyphoxylon* sp. SUT025 และ *Annulohyphoxylon* species E (PK07019) จะเห็นว่าราที่สามารถระบุชนิดได้ เช่น *A. annulatum* (PK10008 และ PK121022), *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112) และ *A. purpureonitens* (PK10006) จัดกลุ่มอยู่กับราสกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดเดียวกัน ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยค่า bootstrap ที่สูง สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST (ตาราง 26) ในขณะที่รา *Annulohyphoxylon* species A (PK121027) จัดอยู่กับรา *Annulohyphoxylon* sp. SUT220 (DQ322129) ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 100 ส่วนรา *Annulohyphoxylon* species B (PK121012 และ PK121050) อยู่ร่วมกับรา *Annulohyphoxylon* sp. SUT025 (DQ322096) ซึ่งเป็นราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 98 และ *Annulohyphoxylon* species E (PK07019) พบว่า แยกถึงความสัมพันธ์ออกจากราที่สามารถระบุชนิดได้อื่นๆ

**กลุ่มที่ 2 (clade 2)** ประกอบด้วยราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Annulohyphoxylon moriforme* var. *microdiscus*, *A. multiforme*, *A. nitens*, *A. truncatum* และ *Annulohyphoxylon* species G (H255) โดยพบว่าราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ ถูกจัดความสัมพันธ์อยู่ในกิ่งเดียวกันกับราสกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดที่สามารถระบุชนิดได้ จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยค่า bootstrap ที่สูง ในขณะที่รา *Annulohyphoxylon* species G (H255) ไม่ถูกจัดกลุ่มอยู่กับราชนิดใด แต่แสดงความสัมพันธ์กับรา *A. multiforme* (AY616707 และ AY616708) จากฐานข้อมูล GenBank จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ในกลุ่มนี้จำนวน 4 ชนิด พบว่า สามารถแยกออกจากราสกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดอื่นได้อย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap ที่สูง

### 5.1.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ที่มีความยาวมากกว่า 700 คู่เบส

ตัวแทนราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่มีขนาด ITS1-5.8S-ITS2 ยาวมากกว่า 700 คู่เบส ที่ศึกษามีจำนวน 14 ตัวอย่าง (7 ชนิด) ร่วมกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ที่เป็นราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่สามารถระบุ ชนิดได้ทั้งหมดจำนวน 8 ตัวอย่าง (4 ชนิด) (ภาคผนวก ง) ผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ แสดงดังภาพประกอบ 50 (ภาคผนวก จ)



ภาพประกอบ 50 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohypoxylopora* ที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีความยาวมากกว่า 700 คู่เบส ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือ ราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

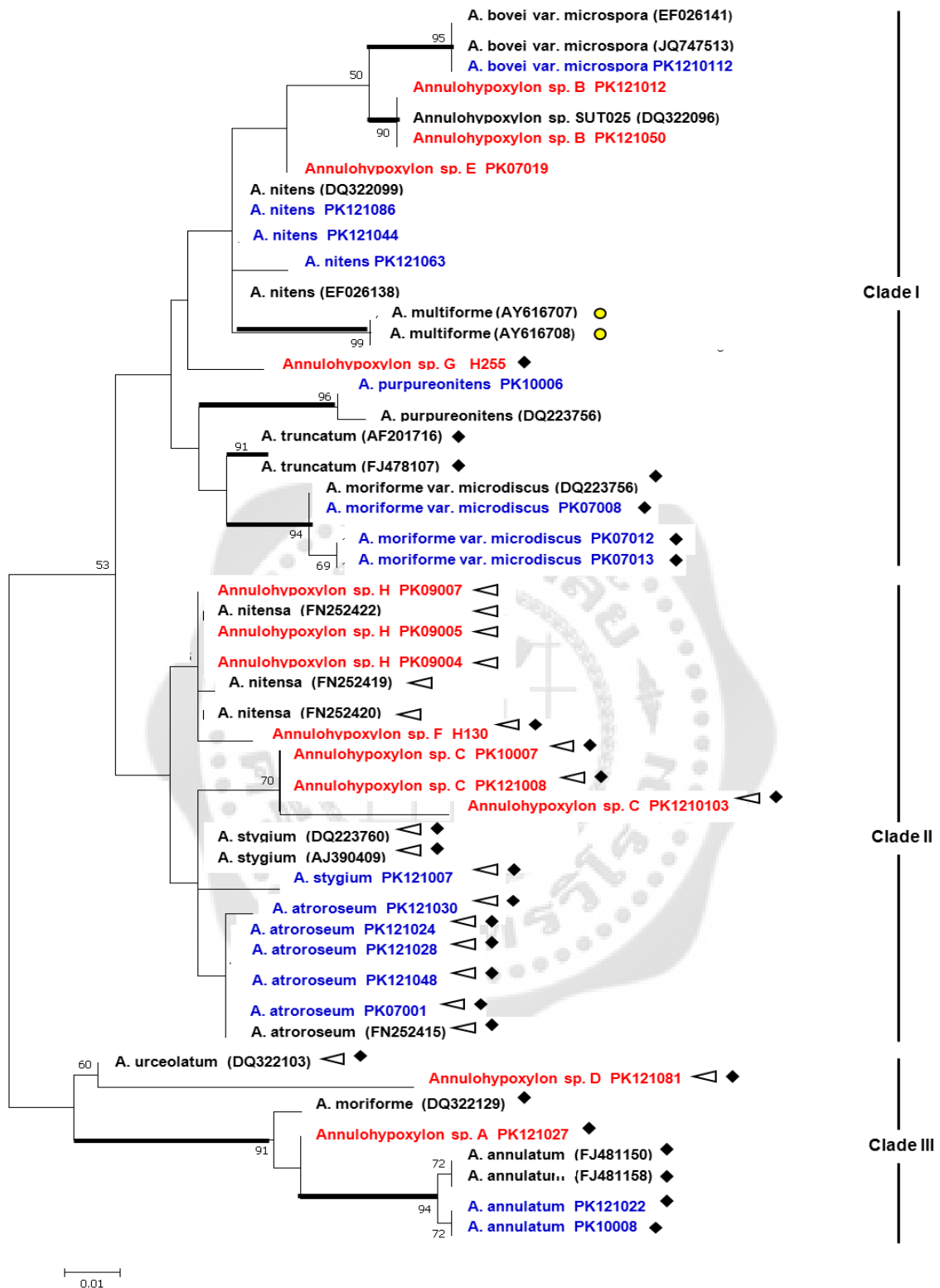
จากผลการวิเคราะห์ แผนภูมิวิวัฒนาการ ต้นไม้บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีความยาวมากกว่า 700 คู่เบส พบว่า สามารถจัดกลุ่มราสกุล *Annulohypoxylopora* ชนิดที่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *A. atroseum*, *A. stygium* และ *A. urceolatum* ทั้งจากตัวอย่าง ที่ศึกษา และจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 100 รวมทั้งชนิดที่เป็น “cryptic species” หรือ “*A. nitensa*” (FN252419, FN252420 และ FN252422) (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Annulohypoxylopora* species H (PK09004, PK09005 และ PK09007) ส่วนตัวอย่าง ราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ในกลุ่มนี้มี 3 ชนิด ได้แก่ *Annulohypoxylopora* species C (PK10007, PK121008 และ PK1210103), *Annulohypoxylopora* species D (PK121081) และ *Annulohypoxylopora* species F (H130) ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า *Annulohypoxylopora* species C (PK10007,

PK121008 และ PK1210103) แยกออกจากราชนิดอื่นๆ ที่สามารถระบุชนิดได้ด้วยค่า bootstrap ที่สูงเท่ากับ 100 ส่วนรา *Annulohyphoxylon species D* (PK121081) แสดงความสัมพันธ์กับรา *A. urceolatum* (DQ322103) สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ที่มีความใกล้เคียงกัน ยกเว้นขนาดของแอสโคสปอร์ของรา *Annulohyphoxylon species D* (PK121081) ที่มีขนาดเล็กกว่าเท่าตัว นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองตัวอย่างด้วยโปรแกรม pairwise พบว่ามีร้อยละความ เหมือนเพียง 87 เท่านั้น ส่วนรา *Annulohyphoxylon species F* (H130) แสดงการแยกกิ่งออกจากราชนิดอื่นที่สามารถระบุชนิดได้ และยังสังเกตพบว่า รา กลุ่มที่มีขนาด ITS ยาวมากกว่า 700 คู่เบส มีลักษณะของ แผ่นจานเป็นแบบ *truncatum*-type ยกเว้น “*A. nitensa*” ที่เป็นแบบ *bovei*-type

### 5.1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S-ITS2

เนื่องจากขนาด ITS1 ของตัวแทนราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ศึกษาทั้ง 29 ตัวอย่าง มีขนาดที่แตกต่างกันมากถึง 155-585 คู่เบส ทำให้การจัดเรียงแนวความสัมพันธ์เกิดการผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะส่วน 5.8S-ITS2 ของตัวอย่าง ทั้งหมดมาศึกษาความสัมพันธ์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ที่ทราบชนิดจำนวน 23 ตัวอย่าง (13 ชนิด) ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพประกอบ 51 (ภาคผนวก จ)

จากผลการวิเคราะห์พบว่าตัวแทนราทั้ง 29 ตัวอย่าง ในแต่ละกิ่งย่อยจัดอยู่เป็นกลุ่มเช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ในข้อ 5.1.1 และ 5.1.2 แต่มีค่า bootstrap ที่ต่ำกว่า อาจเนื่องจากบริเวณ ITS1 มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สูงกว่าบริเวณ 5.8S-ITS2 จึงทำให้เห็นความต่างของแต่ละชนิดมากกว่า อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ที่ได้ สามารถแบ่งกลุ่มราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้ 3 กลุ่ม โดยราที่มีขนาด ITS ยาวมากกว่า 700 คู่เบส ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 (clade 2) ยกเว้น *A. urceolatum* (DQ322103) และ *Annulohyphoxylon species D* (PK121081) ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 (clade 3) นอกจากนี้ยังพบว่า ราสกุล *Annulohyphoxylon* ส่วนใหญ่ในกลุ่มที่ 1 (clade 1) มีลักษณะแผ่นจานแบบ *bovei*-type ในขณะที่ราในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีลักษณะแผ่นจานแบบ *truncatum*-type



ภาพประกอบ 51 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 5.8S-ITS2 ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000 หัวลูกศรแสดงราสกุล *Annulohypoxyton* ชนิดที่มีขนาด ITS ยาวมากกว่า 700 คู่เบส

หมายเหตุ: ♦ คือราที่มีแผ่นแบบ *truncatum*-type ○ คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมาย คือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่ครอบคลุมของ ITS1-5.8S-ITS2 สามารถช่วยจัดจำแนกตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน หรือตัวอย่างที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันสูง ซึ่งยากต่อการระบุชนิดได้แก่ *Annulohyphoxylon* species A ถึง H ได้ด้วยค่า bootstrap ที่สูงถึง 99 – 100 ซึ่งแสดงถึงความน่าเชื่อถือในการแยกกิ่งของราแต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้

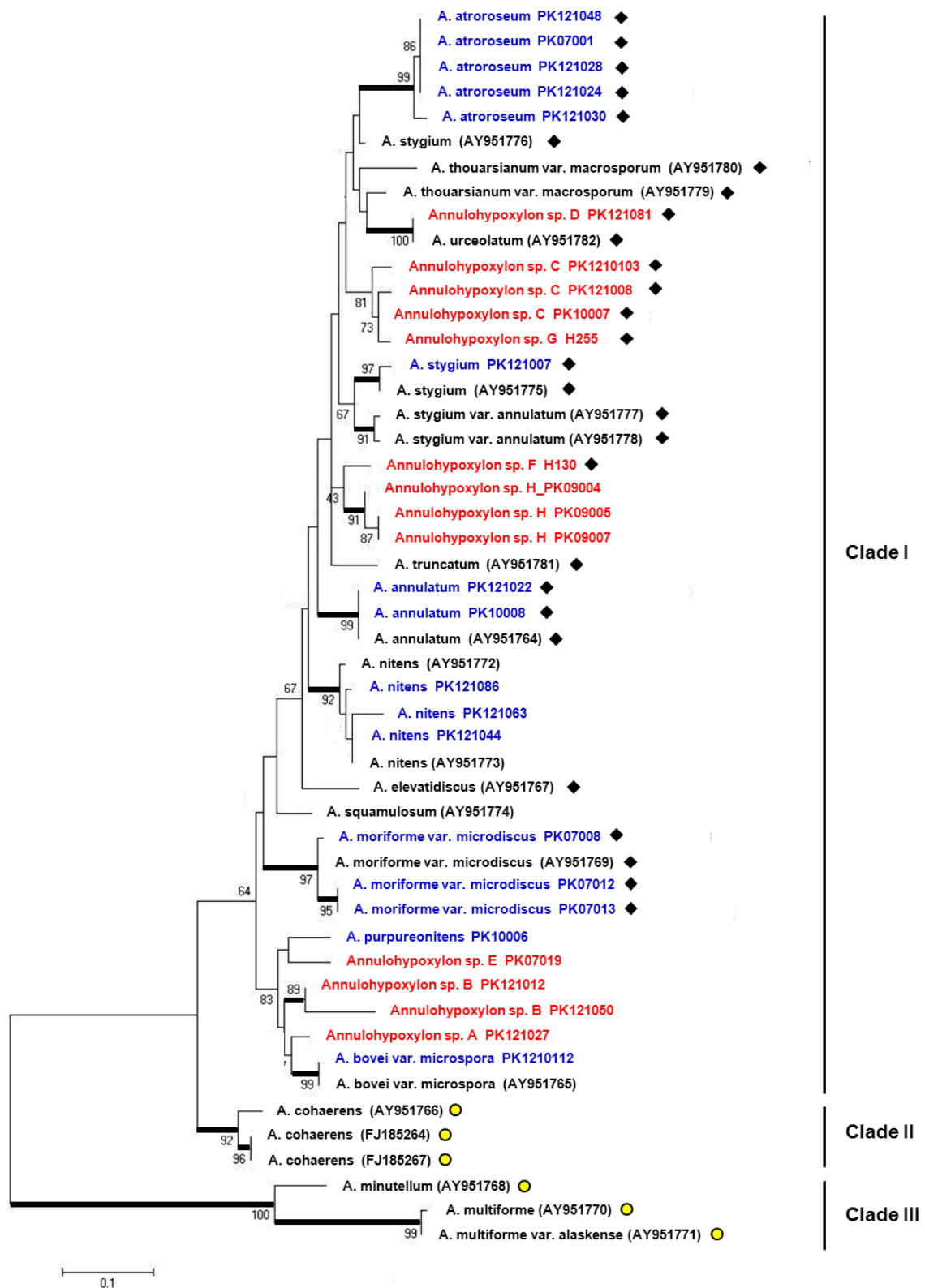
## 5.2 ยีน alpha – actin

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ ยีน alpha-actin ของตัวอย่าง ราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ศึกษาจำนวน 29 ตัวอย่าง ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ทราบชนิดแล้วจำนวน 21 ตัวอย่าง (16 ชนิด) (ภาคผนวก ง) ด้วยวิธีการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ แสดงดังภาพประกอบ 52 (ภาคผนวก จ)

จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของยีน alpha-actin พบว่า สามารถจัดกลุ่มราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ

**กลุ่มที่ 1 (clade 1)** ประกอบด้วยราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 21 ชนิด ได้แก่ *A. annulatum*, *A. atroroseum*, *A. bovei* var. *microspora*, *A. elevatidiscus*, *A. moriforme* var. *microdiscus*, *A. nitens*, *A. purpureonitens*, *A. squamulosum*, *A. stygium*, *A. stygium* var. *annulatum*, *A. thouarsianum* var. *macrosporum*, *A. truncatum* และ *A. urceolatum* รวมทั้งราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ *Annulohyphoxylon* species A - H ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า ตัวแทนราที่สามารถระบุชนิดได้ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ ราที่ทราบชนิดจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยค่า bootstrap ที่สูง เช่น *A. annulatum* (bootstrap เท่ากับ 99), *A. bovei* var. *microspora* (bootstrap เท่ากับ 99), *A. moriforme* var. *microdiscus* (bootstrap เท่ากับ 97), *A. nitens* (bootstrap เท่ากับ 92) และ *A. stygium* (bootstrap เท่ากับ 97) สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกัน





ภาพประกอบ 52 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน alpha-actin ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

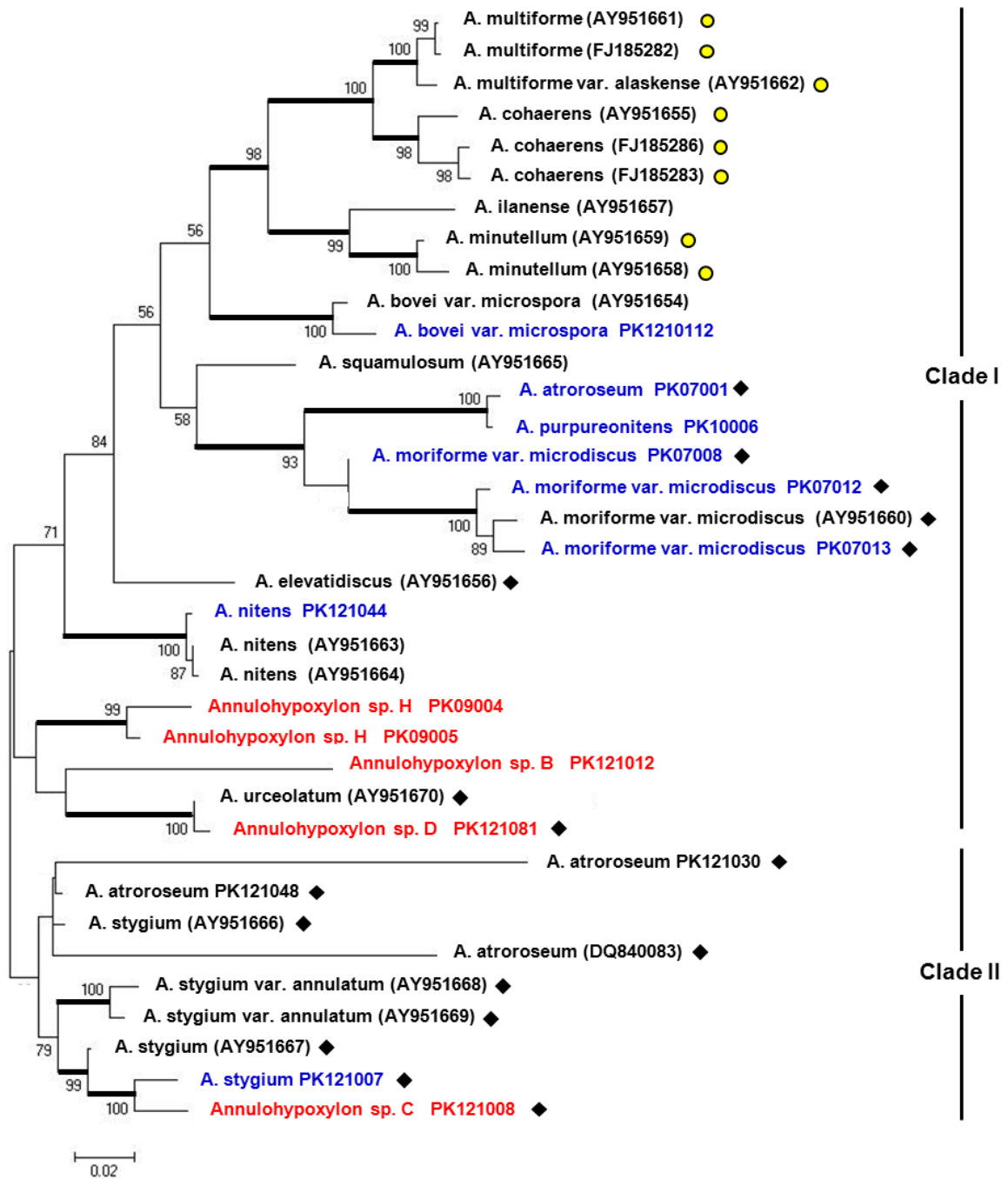
หมายเหตุ: ♦ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ● คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

ส่วนรา *Annulohypoxylo*n species A - H พบว่า แยกกิ่งออกจาก ราชนิดอื่นๆ ที่สามารถระบุชนิดได้ ด้วยค่า bootstrap ที่สูง และบางชนิดแสดงความสัมพันธ์กับรา ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันอีกด้วย เช่น *Annulohypoxylo*n species A (PK121027) ที่อยู่ในกิ่งเดียวกับรา *A. bovei* var. *microspora* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคลายคลึงกัน เป็นต้น ส่วน รา *Annulohypoxylo*n species E แม้ว่าจะจับกลุ่มอยู่กับ รา *A. purpureonitens* (PK10006) แต่ความยาวของกิ่งต่างกัน และค่าร้อยละความเหมือนของราทั้งสองต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากไม่มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน alpha-actin ของรา *A. purpureonitens* ในฐานข้อมูล GenBank แต่อย่างไรก็ตามพบข้อสังเกตว่า รา *Annulohypoxylo*n species C (PK10007, PK121008 และ PK1210103) จัดอยู่ในกิ่งเดียวกับรา *Annulohypoxylo*n species G (H255) ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 73 แต่ราทั้งสองชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกัน และค่าร้อยละความเหมือนของ ราทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 78 ส่วนรา *Annulohypoxylo*n species D (PK121081) พบว่าอยู่ในกลุ่มเดียวกับ รา *A. urceolatum* (AY951779) จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 100 นอกจากนี้ยังมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 ถึงแม้ว่าทั้งสองจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก แต่มีขนาดของแอสโคสปอร์ที่แตกต่างกันชัดเจน จากผลการวิเคราะห์นี้แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน alpha-actin ไม่สามารถ แยกความแตกต่างของตัวอย่าง รา *Annulohypoxylo*n species D ออกจากรา *A. urceolatum* ได้

**กลุ่มที่ 2 (clade 2)** ประกอบด้วยราสกุล *Annulohypoxylo*n จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *A. cohaerens* (AY951766, FJ185264 และ FJ185267) และ **กลุ่มที่ 3 (clade 3)** ประกอบด้วยราสกุล *Annulohypoxylo*n 3 ชนิด ได้แก่ *A. minutellum* (AY951768), *A. multiforme* (AY951770) และ *A. multiforme* var. *alaskense* (AY951771) ซึ่งราทั้งสองกลุ่มนี้เป็น ราที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank และที่สำคัญเป็นราสกุล *Annulohypoxylo*n ชนิดที่ไม่พบแผ่นจาน

### 5.3 ยีน beta – tubulin

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ ยีน beta-tubulin ของตัวอย่าง ราสกุล *Annulohypoxylo*n ที่ศึกษาจำนวน 19 ตัวอย่าง ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นราสกุล *Annulohypoxylo*n ที่ทราบชนิดแล้วทั้งหมดจำนวน 21 ตัวอย่าง (16 ชนิด) (ภาคผนวก ง) ด้วยวิธีการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ ผลแสดงดังภาพประกอบ 53 (ภาคผนวก จ)



ภาพประกอบ 53 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ● คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของยีน beta-tubulin พบว่า สามารถจัดกลุ่มราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ

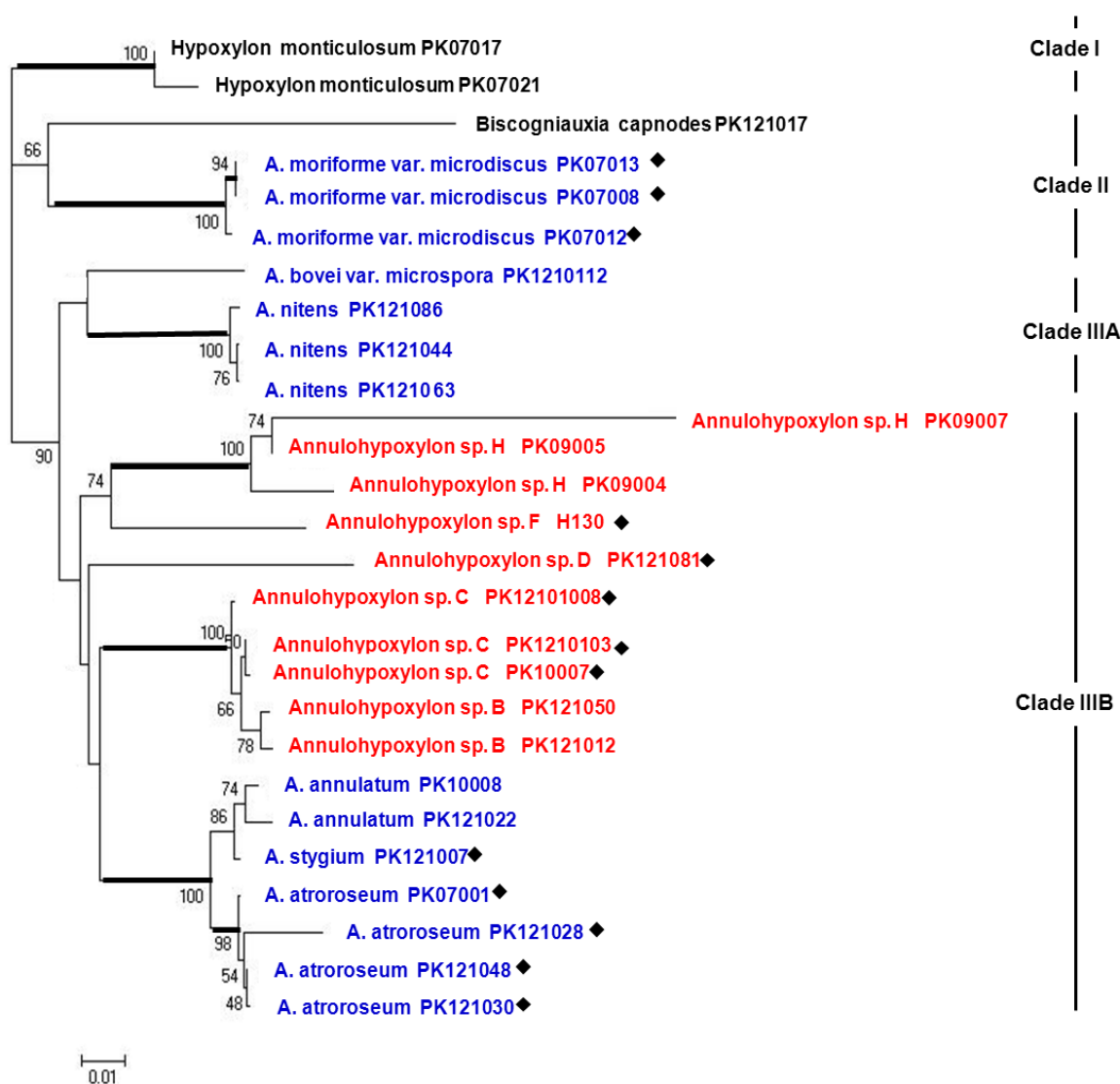
**กลุ่มที่ 1 (clade 1)** ประกอบด้วยรา *A. atroseum*, *A. bovei* var. *microspora*, *A. cohaerens*, *A. elevatidiscus*, *A. ilanense*, *A. minutellum*, *A. moriforme* var. *microdiscus*, *A. multiforme*, *A. multiforme* var. *alaskense*, *A. nitens*, *A. purpureonitens*, *A. squamulosum*, *A. urceolatum*, *Annulohyphoxylon* species B, *Annulohyphoxylon* species D และ *Annulohyphoxylon* species H ซึ่งราที่ศึกษาส่วนใหญ่จัดกลุ่มรวมอยู่กับราชนิดเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank ด้วยค่า bootstrap ที่สูงเท่ากับ 100 ได้แก่ *A. bovei* var. *microspora* (PK1210112), *A. moriforme* var. *microdiscus* (PK07012 และ PK07013) และ *A. nitens* (PK121044) ส่วนราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ *Annulohyphoxylon* species B (PK121012) และ *Annulohyphoxylon* species H (PK09004 และ PK09005) พบว่าแยกกิ่งออกจาก ราชนิดอื่นๆ ยกเว้น *Annulohyphoxylon* species D (PK121081) ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *A. urceolatum* (AY951670) จากฐานข้อมูล GenBank นอกจากนี้ผลการเทียบเคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งสองยังมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99 เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ของยีน alpha-actin แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน alpha-actin และ ยีน beta-tubulin ไม่สามารถแยกความแตกต่าง หรือ มีข้อจำกัดในการแยกความแตกต่างของราสกุล *Annulohyphoxylon* บางชนิดออกจากกัน

**กลุ่มที่ 2 (clade 2)** ประกอบด้วย ราส่วนใหญ่จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ *A. atroseum*, *A. stygium*, *A. stygium* var. *annulatum* และ *Annulohyphoxylon* species C ซึ่งในจำนวนนี้มีราเพียง 2 ชนิด ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ คือ *A. stygium* (PK121007) และ *Annulohyphoxylon* species C (PK1210103) ซึ่งพบว่าจับกลุ่มอยู่ด้วยกันด้วยค่า bootstrap ที่สูงเท่ากับ 100 แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ของทั้งสองมาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม pairwise พบว่า มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 84 ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันดังที่ได้กล่าวไว้ในผลการทดลองข้อ 1 จึงเป็นข้อมูลยืนยันได้ว่าราทั้งสองชนิดนี้ต่างชนิดกัน

ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin และการศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ เพื่อใช้ในการระบุชนิดของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ศึกษาพบว่าสามารถช่วยจัดกลุ่มความสัมพันธ์และแยกความแตกต่างของราตัวอย่างในระดับสปีชีส์ได้บางตัวอย่างเท่านั้น อีกทั้งการเพิ่มจำนวน และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างยาก เนื่องจากเป็นยีนเดี่ยว (single copy gene) มีจำนวนซ้ำน้อย และมีขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีนบริเวณอื่น จึงให้ผลไม่ตีเท่าที่ควร และได้จำนวนราที่ศึกษาไม่ครบสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Annulohyphoxylon* species B, *Annulohyphoxylon* species C และ *Annulohyphoxylon* species H สามารถแยกออกจากราชนิดอื่นๆ จากฐานข้อมูลได้

**5.4 ยีน elongation factor 1-alpha (EF1-α)**

เนื่องจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณยีน elongation factor 1-alpha นี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในราสกุล *Annulohyphoxylon* จึงไม่มีข้อมูลเปรียบเทียบของรากลุ่มนี้ในฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นจึงได้ศึกษา ราสกุล *Biscogniauxia* และ *Hypoxyton* ซึ่งเป็นราในวงศ์เดียวกันร่วมด้วย ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 24 ตัวอย่าง (6 ชนิด) *Biscogniauxia* 1 ตัวอย่าง (1 ชนิด) และ *Hypoxyton* 2 ตัวอย่าง (1 ชนิด) ด้วยวิธีการสร้างแผนภูมิ วิวัฒนาการ ต้นไม้ ผลแสดงดังภาพประกอบ 54 (ภาคผนวก จ)



ภาพประกอบ 54 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้อิงยีนของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน elongation factor 1-alpha ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ♦ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนที่ไม่มีเครื่องหมายคือ ราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

จากผลการวิเคราะห์ แผนภูมิวิวัฒนาการ ต้นไม้ สามารถจัดกลุ่ม ฆราสกุล *Annulohypoxyton* ได้เป็น 3 กลุ่ม (clade) ดังนี้

**กลุ่มที่ 1 (clade 1)** ประกอบด้วย ฆราสกุล *Hypoxyton* เพียงชนิดเดียว ส่วน **กลุ่มที่ 2 (clade 2)** ประกอบด้วย ฆราสกุล *Biscogniauxia* และ *Annulohypoxyton moriforme* var. *microdiscus*

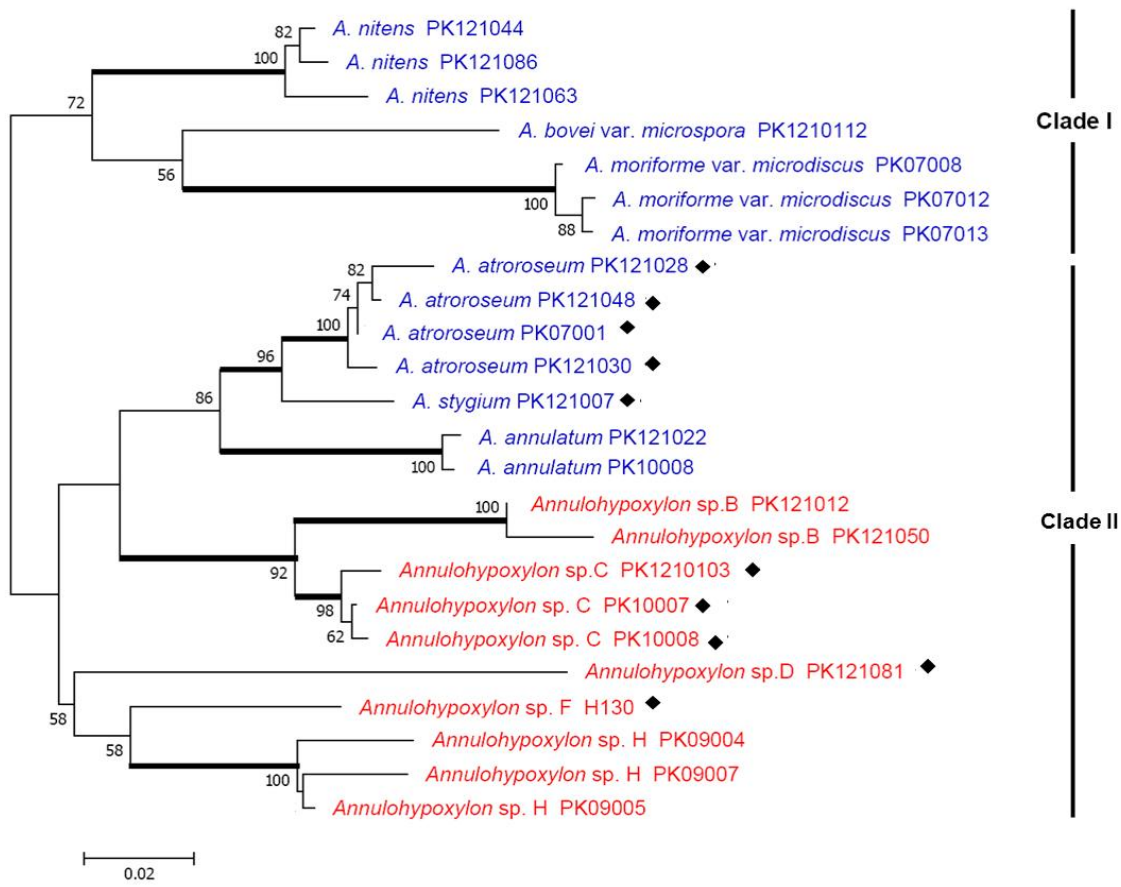
**กลุ่มที่ 3 (clade 3)** แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ **กลุ่มที่ 3A (clade 3A)** และ **กลุ่มที่ 3B (clade 3B)** ซึ่งกลุ่มที่ 3A ประกอบด้วยรา 2 ชนิด คือ *A. bovei* var. *microspora* และ *A. nitens* ซึ่งเป็นตัวแทนของ ราที่สามารถระบุชนิดได้ทั้งหมด พบว่าแยกกิ่งออกจาก กิ่งกันอย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap ที่สูงเท่ากับ 100

กลุ่มที่ 3B ประกอบด้วยรา จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *A. annulatum*, *A. atroroseum*, “*A. nitensa*”, *A. stygium*, *Annulohypoxyton* species B, *Annulohypoxyton* species C, *Annulohypoxyton* species D และ *Annulohypoxyton* species F ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ยกเว้น *Annulohypoxyton* species B และ “*A. nitensa*” ที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type จากผลการวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างรา ทั้ง 8 ชนิด แยกกิ่งความสัมพันธ์ออกจากกัน ชัดเจนด้วยค่า bootstrap ที่สูงเท่ากับ 98-100 ในแต่ละกิ่งย่อย ยกเว้นรา *Annulohypoxyton* species B ที่แยกกิ่งออกจาก *Annulohypoxyton* species C ด้วยค่า bootstrap ที่ต่ำเท่ากับ 66 นอกจากนี้ยังสนับสนุนผลการวิเคราะห์ก่อนหน้านี้ว่า รา “*A. nitensa*” เป็น cryptic species ของรา *A. nitens* (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ซึ่งแยกกิ่งออกจาก *Annulohypoxyton* species F อย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 100

ผลการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน elongation factor 1-alpha และแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ในการจำแนกและระบุชนิดของ ฆราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ศึกษาทั้ง 24 ตัวอย่าง รวมทั้งราต่างสกุลคือ *Biscogniauxia capnodes* (1 ตัวอย่าง) และ *Hypoxyton monticulosum* (2 ตัวอย่าง) พบว่าสามารถแยกความแตกต่าง และช่วยในการจัดจำแนกชนิดรา ในระดับ สกุล (genus) และสปีชีส์ (species) ได้

**5.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 3 บริเวณ คือ บริเวณ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และ elongation factor 1-alpha (EF1-  $\alpha$ )**

ผลการ ศึกษา ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตัวแทนราสกุล *Annulohypoxyton* จำนวน 29 ตัวอย่าง ร่วมกับราที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 บริเวณ คือ บริเวณ ITS ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และยีน EF1-  $\alpha$  พบว่าแผนภูมิทั้ง 4 บริเวณ สามารถแยกถึงความสัมพันธ์ของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 10 ชนิด และราที่ไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 8 ชนิด ออกจากกันได้ด้วยค่า bootstrap ที่สูงเท่ากับ 90-100 และเพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องใน การระบุชนิดที่ซับซ้อน รวมถึง ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราตัวอย่างที่ศึกษา จึงได้ทำการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 3 บริเวณ ได้แก่ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และยีน EF1-  $\alpha$  จาก 4 บริเวณ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนbeta-tubulin ที่ได้ไม่สมบูรณ์จึงไม่นำมาวิเคราะห์ อีกทั้งบริเวณ ITS ซึ่งมีขนาดของ ITS1 ที่แตกต่างกันมากถึง 155-585 คู่เบส จึงเลือกเฉพาะบริเวณ 5.8S-ITS2 มาใช้ในการวิเคราะห์ ดังนั้นจำนวนตัวอย่างของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่นำมาศึกษามีจำนวน 24 ตัวอย่าง (11 ชนิด) ด้วยวิธีการ สร้างแผนภูมิ วิวัฒนาการต้นไม้ แสดงดังภาพประกอบ 55 (ภาคผนวก จ)



ภาพประกอบ 55 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันของบริเวณ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และยีน elongation factor 1-alpha ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ♦ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนที่ไม่มีเครื่องหมายคือ ราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

จากผลการวิเคราะห์ แผนภูมิวิวัฒนาการ ต้นไม้ สามารถจัดกลุ่ม ราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้เป็น 2 กลุ่ม (clade) ดังนี้

**กลุ่มที่ 1 (clade 1)** ประกอบด้วยราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่สามารถระบุชนิดได้ ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *A. bovei* var. *microspora*, *A. moriforme* var. *microdiscus* และ *A. nitens* พบว่าแยกกิ่งออกจากกันอย่างชัดเจน

**กลุ่มที่ 2 (clade 2)** ประกอบด้วยราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่สามารถระบุชนิดได้ 3 ชนิด ได้แก่ *A. annulatum*, *A. atroroseum* และ *A. stygium* ซึ่งแยกกิ่งออกจากกันด้วยค่า bootstrap ที่สูง และแยกกลุ่มความสัมพันธ์ออกจากราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ 5 ชนิด ได้แก่ *Annulohyphoxylon* species B, *Annulohyphoxylon* species C, *Annulohyphoxylon* species D, *Annulohyphoxylon* species F และ *Annulohyphoxylon* species H ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ยกเว้น *Annulohyphoxylon* species B และ *Annulohyphoxylon* species H ที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type จากผลการวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างราที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 5 ชนิด แยกกิ่งความสัมพันธ์ออกจากกันชัดเจนด้วยค่า bootstrap ที่สูงเท่ากับ 92-100 ในแต่ละกิ่งย่อย นอกจากนี้ยังสนับสนุนผลการวิเคราะห์ก่อนหน้านี้ว่ารา “*A. nitensa*” ซึ่งเป็น cryptic species ของรา *A. nitens* (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ที่แยกกิ่งออกจาก *Annulohyphoxylon* species F อย่างชัดเจน

ผลการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันของ บริเวณ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และยีน EF1- $\alpha$  และศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้เพื่อใช้ การจำแนกและระบุชนิดของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ศึกษาทั้ง 24 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกความแตกต่าง และช่วยในการจัดจำแนกชนิด ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ในแต่ละชนิดที่ศึกษาได้ อีกทั้งให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EF1- $\alpha$  และยังสามารถแยกรา *Annulohyphoxylon* species B ออกจาก *Annulohyphoxylon* species C ได้ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 92



## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 168 ตัวอย่าง ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ บริเวณบึงแปน บึงมน ศาลาพรหม และเส้นทางสำรวจธรรมชาติ สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 10 ชนิด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ *Annulohyphoxylon annulatum* (8 ตัวอย่าง), *A. atroroseum* (15 ตัวอย่าง), *A. bovei* var. *microspora* (11 ตัวอย่าง), *A. moriforme* (15 ตัวอย่าง), *A. moriforme* var. *microdiscus* (6 ตัวอย่าง), *A. multiforme* (3 ตัวอย่าง), *A. nitens* (30 ตัวอย่าง), *A. purpureonitens* (1 ตัวอย่าง), *A. stygium* (29 ตัวอย่าง) และ *A. stygium* var. *annulatum* (4 ตัวอย่าง) ทั้งนี้พบว่ามีราจำนวน 27 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน คิดเป็นร้อยละ 18 ของตัวอย่างทั้งหมด เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย เช่น บางตัวอย่างมีลักษณะคล้ายคลึงกับรา มากกว่าหนึ่งชนิด บางตัวอย่างมีลักษณะแตกต่างจากราที่ทราบชนิดแล้ว และบางตัวอย่างขาดข้อมูลของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งสามารถใช้แยกชนิดราที่มีความใกล้เคียงกันสูงได้ (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) เป็นต้น จึงทำให้ไม่สามารถระบุชนิดของ ราได้ ข้อมูลดังกล่าว สอดคล้องกับ ผลการศึกษา ราสกุล *Annulohyphoxylon* (หรือ เดิมคือ *Hypoxyylon* sect. *Annulata*) ในประเทศไทยก่อนหน้านี้ (Thienhirun. 1997: 1-355; Suwannasai; et al. 2005: 303-324; Fournier; et al. 2010: 23-36; Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ซึ่งตัวอย่างรา สกุล *Annulohyphoxylon* ทั้ง 27 ตัวอย่าง สามารถจัดกลุ่มได้ 8 ชนิด ดังนี้ *Annulohyphoxylon* species A (PK121027), *Annulohyphoxylon* species B (PK121012 และ PK121050), *Annulohyphoxylon* species C (PK10007, PK121008 และ PK1210103), *Annulohyphoxylon* species D (PK121081), *Annulohyphoxylon* species E (PK07019), *Annulohyphoxylon* species F (H130), *Annulohyphoxylon* species G (H255) และ *Annulohyphoxylon* species H (H087, H099, H203, H215, PK09004, PK09005, PK09007, PK09025, PK09026, PK09027, PK09029, PK09031, PK09032, PK09036, PK11003, PK07004 และ PK121076)

เมื่อทำการคัดแยก แอสโคสปอร์เพื่อ เพาะเลี้ยง ราบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงได้จำนวน 83 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 49.5 จากตัวอย่างราทั้งหมด จากนั้นศึกษาการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (cultural characteristics) และ ลักษณะ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัย เพศ โดยใช้อาหารแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ PDA, malt extract agar (MEA) และ oat meal agar (OA) พบว่า ราส่วนใหญ่เจริญบนอาหาร PDA ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ MEA และ OA นอกจากนี้ราทั้ง 83 ตัวอย่าง มีลักษณะการเจริญ บนอาหารที่แตกต่างกันตาม แต่ละชนิด โดยส่วนใหญ่มีการเจริญเริ่มต้นด้วยเส้นใยสีขาว จากนั้นอาจเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีเขียว สี

น้ำตาล และสีดำ เป็นต้น บางชนิดมีการสร้างเม็ดสีบนเส้นใย รวมทั้งเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งราส่วนใหญ่สามารถเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ภายใน 1-2 อาทิตย์ และยังพบว่า ราชนิดเดียวกันเมื่อเลี้ยงบนอาหารต่างชนิดกันจะมีลักษณะการเจริญของเส้นใยต่างกันอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษารั้งนี้ พบการสร้างลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของราเพียงชนิดเดียว คือ *Annulohyphoxylon* species C (PK10007, PK121008 และ PK1210103) ที่สร้างลักษณะการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบ *Nodulisporium*-like บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่ราตัวอย่างชนิดอื่นพบเพียงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเส้นใยที่มีการเปลี่ยนสีเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลาานาน อาจเนื่องจากธรรมชาติของ ราบางชนิดที่ไม่พบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หรือบางชนิดอาจต้องการสภาวะที่ จำเพาะ หรือ ความเหมาะสมแตกต่างกัน ซึ่งข้อมูล ของ การศึกษา ราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 42 สปีชีส์ ทั่วโลก มีรายงานว่าพบลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เพียง 14 สปีชีส์ เท่านั้น และส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศ แบบ *Nodulisporium*-like (Ju; & Rogers. 1996: 17-20; Hsieh; Ju; & Rogers. 2005: 844-865; Fournier; et al. 2010: 23-36) จากผลการทดลองนี้จึงทำให้ขาดข้อมูล ในการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกชนิดของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* โดยเฉพาะชนิดที่มีความใกล้เคียงกันสูงออกจากกัน เช่น รา *A. atroroseum* และ *A. stygium* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก ต่างกันเพียงสีของสปอร์ และลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น (Ju; & Rogers. 1996: 1-365) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกตัวแทนราแต่ละชนิดมาศึกษาลักษณะทางเคมี และลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำข้อมูลมาใช้ประกอบในการจัดจำแนกชนิดร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะตัวอย่างราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 8 ชนิด

ผลการศึกษาลักษณะทางเคมีของตัวแทน ราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 15 ตัวอย่าง (เป็นชนิดที่สามารถระบุได้ 7 ชนิด และระบุไม่ได้ 8 ชนิด) จากสารสกัดของสปอร์มาด้วยตัวทำละลายเมทานอล แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD ตรวจวัดที่ค่าความยาวคลื่น (OD) 210 และ 254 นาโนเมตร (Stadler; et al. 2001: 1190-1208) เทียบกับสารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ (1) cohaerins A (2) binaphthalene (BNT) และ (3) mitorubinol (Stadler; et al. 2001: 1190-1208, Quang; et al. 2005: 797-809, Stadler; et al. 2008: 73-125) พบว่าระยะเวลาที่พีคแสดงออกจะใช้เวลามากกว่าที่มีรายงานไว้เล็กน้อย ซึ่งอาจ เนื่องจากหลายปัจจัย โดยเฉพาะความยาวของ HPLC column ที่ใช้ในการทดลองนี้ที่มีขนาดที่ยาวกว่างานวิจัยดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ของสารมาตรฐานที่ได้ก็มีการแสดงออกของพีคหลักเพียงพีคเดียวเท่านั้น ยกเว้นสาร BNT ที่พบมากกว่า 1 พีค ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสาร BNT ละลายยากใน เมทานอล จึงทำให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD จึงต้องกำหนด baseline ต่ำ ทำให้พบสารปนเปื้อนดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามช่วง ระยะเวลาที่ปรากฏของพีค BNT นั้นใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Stadler; et al. 2001: 1190-1208) ส่วนผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้ง 15 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างแต่ละชนิดที่ศึกษามีรูปแบบของสารที่แสดงออกแตกต่างกันทั้งจำนวนพีคและช่วงระยะเวลา

ที่ปรากฏของฟีด ทั้งที่ความยาวคลื่น (OD) 210 และ 254 นาโนเมตร โดยเฉพาะตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิด ได้ทั้ง 8 ชนิด ทั้งนี้ยังพบ ความสัมพันธ์ของ ราบางชนิด คือ สามารถสร้างสารที่คล้ายคลึงกันได้อีกด้วย เช่น *Annulohyphoxylon species A* (PK121027) มีการแสดงออกของฟีดที่ความยาวคลื่น (OD) 210 นาโนเมตร จำนวน 2 ฟีด ซึ่งตรงกับรา *A. moriforme var. microspora* (11.14/11.16 นาที) และ *A. atroroseum* (12.78/12.76 นาที) ส่วนรา *Annulohyphoxylon species C* (PK10007) มีการแสดงออกของฟีดจำนวน 1 ฟีด ที่ตรงกับรา *A. atroroseum* และ *A. stygium* (10.57/10.51/10.51 นาที) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าราบางชนิดอาจตรวจวัดสารได้ที่ค่าความยาวคลื่นใดความยาวคลื่นหนึ่ง และ อาจตรวจไม่พบในอีกความยาวคลื่น หนึ่ง ก็เป็นไปได้ เช่น *A. purpureonitens* ที่ตรวจพบสารที่ความยาวคลื่น (OD) 254 เท่านั้น และ *Annulohyphoxylon species G* (H255) ตรวจพบสารที่ความยาวคลื่น (OD) 210 เท่านั้น เป็นต้น ถึงแม้ว่าผลการทดลองที่ได้จะไม่พบว่ามีตัวอย่างราชนิดใดเลยที่มีการแสดงของฟีดตรงกับสารมาตรฐาน BNT ซึ่งมีรายงานว่าพบจากรา *Annulohyphoxylon* ส่วนใหญ่ รวมทั้งรา *A. annulatum*, *A. atroroseum*, *A. bovei var. microspora*, *A. moriforme var. microdiscus* และ *A. stygium* (Quang; et al. 2005: 797-809) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารสกัดที่นำมาวิเคราะห์ ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสาร BNT ละลายได้ยาก จึงเป็นเหตุที่ได้สารสกัด BNT ที่ความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับสารชนิดอื่นที่ละลายได้ดีในเมทานอล ดังนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-DAD จึงเห็นการแสดงออกของฟีดของสารที่ละลายได้ดี ในเมทานอล สูงกว่าฟีด BNT อย่างไรก็ตาม รูปแบบของสารสกัดจากราสกุล *Annulohyphoxylon* ทั้ง 15 ชนิด ที่ศึกษามีรูปแบบที่แตกต่างกันเมื่อตรวจวัดที่ค่าความยาวคลื่นทั้งสอง จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการระบุ ชนิด ร่วมกับข้อมูลอื่นๆ ได้ และยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารแต่ละชนิดต่อไปอีกด้วย

ส่วนการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมได้คัดเลือกตัวแทนรา สกุล *Annulohyphoxylon* แต่ละชนิดจำนวน 29 ตัวอย่าง (เป็นชนิดที่สามารถระบุได้ 10 ชนิด และระบุไม่ได้ 8 ชนิด) โดยเฉพาะตัวอย่างราที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 8 ชนิด ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ หรือมีลักษณะคล้ายคลึงกับ ราชนิดอื่นมากกว่าหนึ่งชนิด ที่สำคัญตัวอย่าง ส่วนใหญ่ขาดข้อมูลของลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ยกเว้น *Annulohyphoxylon species C* ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน แม้ว่าผลการวิเคราะห์รูปแบบของสารสกัดจากสโตรมาของราแต่ละชนิดด้วยเทคนิค HPLC-DAD จะแตกต่างกันก็ตาม แต่ยังไม่เพียงพอในการระบุชนิดของรา ชนิดนั้นๆ ดังนั้นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ ร่วมกับราสกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank นั้นคาดว่าจะนำมาใช้ช่วยในการระบุชนิดของรากลุ่มดังกล่าวได้ดี ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 4 บริเวณ ได้แก่ internal transcribed spacers (ITS) ยีน alpha-actin ยีน beta-tubulin และ ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) โดย

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ซึ่งผลการวิเคราะห์ร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้ง 4 บริเวณ มีค่าเท่ากับ 100, 100, 75.86 และ 96.55 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าบริเวณยีน beta-tubulin เพิ่มจำนวนได้ยากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณอื่น และเป็นยีนเดี่ยว (single copy gene) ที่มีจำนวนซ้ำน้อย (Schmitt; et al. 2009: 35-40) ประกอบกับตำแหน่งของ ยีน beta-tubulin ที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ T1/T22 หรือ T1/Bt2b หรือ T1/T2 หรือ Bt2a/T22 นั้นมีส่วนของ intron แทรกอยู่ด้วย (ภาพประกอบ 10) จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวยาก กว่าบริเวณอื่น จากนั้นเมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และคำนวณหาค่าร้อยละความสำเร็จในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์จากตัวอย่างทั้ง 29 ตัวอย่าง พบว่าบริเวณ ITS และยีน alpha-actin มีค่าเท่ากับร้อยละ 100 รองลงมาคือยีน EF1- $\alpha$  มีค่าเท่ากับร้อยละ 86 ส่วนยีน beta-tubulin มีค่าต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 65.52 เนื่องจากเป็นยีนที่เพิ่มจำนวนได้ยาก และมีขนาดใหญ่ ทำให้อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ได้ และได้จำนวนราที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์น้อย

จากผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 บริเวณ ของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* ทั้ง 29 ตัวอย่าง พบว่าบริเวณ ITS มีขนาดเท่ากับ 477-954 คู่เบส ยีน alpha-actin มีขนาดเท่ากับ 187-244 คู่เบส ยีน beta-tubulin มีขนาดเท่ากับ 1084-1530 คู่เบส ยีน EF1- $\alpha$  มีขนาดเท่ากับ 868-1042 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบเคียงความเหมือนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ราที่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 10 ชนิด มีค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ สูงสุดกับราสกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดนั้นๆ ตรงกับที่จำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ คือ บริเวณ ITS มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 97-100 ซึ่งยอมรับได้ว่าเป็นราชนิดเดียวกัน ส่วนยีน alpha-actin มีค่าเท่ากับร้อยละ 90-100 ทั้งนี้เนื่องจาก ขาดข้อมูลของราบางชนิดในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ *A. annulatum*, *A. atroseum* และ *A. purpureonitens* จึงทำให้ได้ค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ ราต่างชนิดกัน ส่วน ยีน beta-tubulin มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดเท่ากับ 86-96 มีเหตุผลเดียวกับยีน alpha-actin คือราสกุล *Annulohyphoxylon* ทั้ง 3 ชนิดข้างต้นขาดข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล ในขณะที่ผลการเทียบเคียงร้อยละความเหมือนของยีน EF1- $\alpha$  ในทุกตัวอย่างมีค่าสูงสุดกับราในสกุล *Graphostroma* (ตาราง 26 และตาราง 27) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Graphostromataceae อันดับ Xylariales (Zhang; et al. 2006: 1076-1087) ซึ่งเป็นอันดับเดียวกับวงศ์ Xylariaceae ทั้งนี้เนื่องจาก การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ EF1- $\alpha$  เป็นการศึกษารั้งแรกของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* และวงศ์ Xylariaceae จึงทำให้ผลการเทียบเคียงสูงสุดที่ได้ไม่ใช่ราสกุล *Annulohyphoxylon*

สำหรับผลการเทียบเคียงของตัวอย่างราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ทั้ง 8 ชนิด คือ *Annulohyphoxylon* species A – H จำนวน 13 ตัวอย่าง ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 บริเวณ พบว่า

บริเวณ ITS มีบางตัวอย่างที่แสดงค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดเท่ากับ 88-92 กับราที่ทราบชนิดแล้ว ในฐานข้อมูล ซึ่งค่าดังกล่าวต่ำกว่าร้อยละ 97 ที่ยอมรับได้ว่าเป็น ราชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงเป็นการ ยืนยันได้ว่า ราดังกล่าว เป็นคนละชนิดกัน ในขณะที่บางตัวอย่าง มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุด มากกว่า 97 กับราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ไม่ทราบชนิดในฐานข้อมูล ส่วนผลการเทียบเคียงของ ยีน alpha-actin และยีน beta-tubulin พบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 88-96 กับราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่สามารถระบุชนิดได้ ในฐานข้อมูล ยกเว้นรา *Annulohyphoxylon* species D (PK121081) ที่มีร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ รา *A. urceolatum* (AY951782) เท่ากับ ร้อยละ 100 ทั้ง 2 ยีน ซึ่งราทั้งสองชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันสูงมาก ยกเว้น ขนาดของแอสโคสปอร์ของ *Annulohyphoxylon* species D (PK121081) มีขนาดเล็กกว่า *A. urceolatum* เท่าตัว นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ของบริเวณ ITS ยังช่วยยืนยันว่าราทั้งสองนี้ต่างชนิด กัน ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้ยัง สนับสนุนว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน alpha-actin และยีน beta-tubulin เหมาะสำหรับการใช้จัดกลุ่มของราในระดับสกุล (genus) มากกว่าระดับสปีชีส์ (species) และ วาไรตี้ (variety) ในขณะที่บริเวณ ITS สามารถบ่งบอกความแตกต่าง ชนิดของราที่มีความใกล้เคียง กันสูงได้ในระดับสปีชีส์ (species) และวาไรตี้ (variety)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ของตัวแทนราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 29 ตัวอย่าง ร่วมกับ ราที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank (ภาคผนวก ง) โดยแบ่งการวิเคราะห์ตาม บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาทั้ง 4 บริเวณ คือ บริเวณ ITS, ยีน alpha-actin, ยีน beta-tubulin และยีน EF1- $\alpha$  ด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ พบว่าแผนภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์ ทั้ง 4 บริเวณ สามารถแยกกิ่งความสัมพันธ์ของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* ชนิดที่สามารถระบุได้ จำนวน 10 ชนิด และชนิดที่ไม่สามารถระบุได้จำนวน 8 ชนิด ออกจากกันได้ชัดเจนด้วยค่า bootstrap ที่สูงเท่ากับ 90-100 ยกเว้นรา *Annulohyphoxylon* species D (PK121081) ที่ไม่สามารถแยกออก จากรา *A. urceolatum* (ภาพประกอบ 52 และ 53) เมื่อศึกษาด้วยยีน alpha-actin และ beta-tubulin ทั้งนี้เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณนี้มีความผันแปรน้อยกว่าบริเวณ ITS จึงทำให้ การวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้จากบริเวณ ITS สามารถแยกความแตกต่างของ ราทั้งสอง ชนิดนี้ออกจากกันได้ (ภาพประกอบ 50 และ 51) และด้วยเหตุที่บริเวณ ITS พบการผันแปรของ ลำดับนิวคลีโอไทด์สูงโดยเฉพาะบริเวณ ITS1 ซึ่งพบขนาดที่แตกต่างกันมากตั้งแต่ 155-585 คู่เบส จึงทำให้ยากต่อการจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ถูกต้องได้ยาก ดังนั้นจึงต้องแบ่งการวิเคราะห์บริเวณ ITS ของตัวอย่างราสกุล *Annulohyphoxylon* ออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่มีขนาด ITS ความยาว น้อย กว่า 700 คู่เบส (ภาพประกอบ 49) และกลุ่มที่มีขนาด ITS ความยาว มากกว่า 700 คู่เบส (ภาพประกอบ 50) เพื่อความถูกต้องในการ จัดเรียง แนวความสัมพันธ์และการสร้างแผนภูมิ วิวัฒนาการต้นไม้ ส่วนการวิเคราะห์บริเวณยีน EF1- $\alpha$  นั้นสามารถสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ได้ จากเฉพาะภายในกลุ่มของรา สกุล *Annulohyphoxylon* ที่ศึกษาทั้ง 24 ตัวอย่าง ร่วมกับราสกุล ใกล้เคียงได้แก่ *Biscogniauxia capnodes* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Hypoxylon monticulosum*

จำนวน 2 ตัวอย่าง เท่านั้น (ภาพประกอบ 54) เนื่องจากไม่มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ในฐานะข้อมูล ผลการศึกษาพบว่าราสกุล *Annulohyphoxylon* ทุกชนิดที่ศึกษาสามารถแยกออกจากกันได้ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EF1- $\alpha$  ยังสามารถบ่งบอกความแตกต่างของราที่เป็น “cryptic species” ได้แก่ *Annulohyphoxylon* species H ซึ่งถูกอธิบายว่าเป็น “cryptic species” ภายใต้ชื่อชั่วคราวว่า “*A. nitensa*” กับรา *A. nitens* ออกจากกันได้ เช่นเดียวกับบริเวณ ITS, ยีน alpha-actin และยีน beta-tubulin (Suwannasai; et al. 2013: 1-8) ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อช่วยในการจัดจำแนก ชนิดหรือบ่งบอกเอกลักษณ์ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่น รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางเคมีได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน EF1- $\alpha$  ของราสกุล *Annulohyphoxylon* และวงศ์ Xylariaceae นี้เป็นข้อมูลใหม่ แต่มีแนวโน้มที่ดีกว่าการศึกษาบริเวณของยีน beta-tubulin ในแง่ของร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอและการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่สูงกว่า ดังนั้นยีน EF1- $\alpha$  จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมาย ดีเอ็นเอ (DNA marker) อีกบริเวณหนึ่ง ในการศึกษาาร่วมกับบริเวณ ITS ต่อไปได้

นอกจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์แยกในแต่ละ บริเวณแล้ว ยังได้ทำการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 บริเวณร่วมกัน เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องใน การจัดจำแนกชนิดที่ซับซ้อน และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราตัวอย่าง แต่เนื่องจาก บริเวณ ITS มีขนาดของ ITS1 ที่แตกต่างกันมากถึง 155-585 คู่เบส ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะบริเวณ 5.8S-ITS2 มาใช้ในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin ที่ได้ผลไม่ สมบูรณ์ ทำให้จำนวนราตัวอย่างที่อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สมบูรณ์มีน้อย ดังนั้นจึงได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 3 บริเวณ ได้แก่ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และยีน EF1- $\alpha$  ของตัวแทนราสกุล *Annulohyphoxylon* จำนวน 24 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ 55) พบว่าสามารถแยกความแตกต่าง และช่วยในการจัดจำแนกชนิดของราสกุล *Annulohyphoxylon* ในแต่ละชนิดที่ศึกษาได้ ซึ่งจัดกลุ่มความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EF1- $\alpha$  เป็นการยืนยันว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรมสามารถช่วยในการจัดจำแนกชนิดของราสกุล *Annulohyphoxylon* ตัวอย่างที่ศึกษาได้

ดังนั้นจากข้อมูล ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเคมี และลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 บริเวณ พบว่า สามารถระบุความแตกต่างของราสกุล *Annulohyphoxylon* แต่ละชนิดออกจากกันได้ โดยเฉพาะชนิดที่ไม่สามารถระบุได้หรือชนิดที่ซับซ้อนซึ่งยากต่อการระบุชนิดทั้ง 8 ชนิด ออกจากกันได้ ซึ่งอาจเกิดจาก การปรับเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมของรา หรือกระบวนการเกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ที่มีการเปลี่ยนแปลงจากสปีชีส์

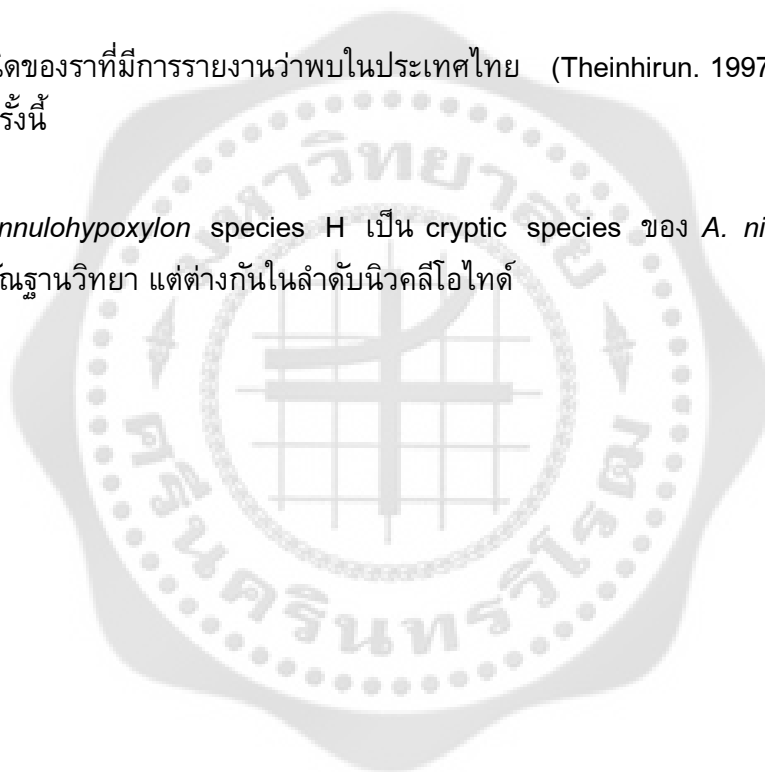
หนึ่งโดยการแตกแขนงออกเป็นสปีชีส์ใหม่ จากผลการศึกษาค้นคว้านี้ จึงคาดว่าน่า จะพบรา สกุล *Annulohypoxyton* ชนิดใหม่อย่างน้อย 1 ชนิด ที่เป็นรายงานการค้นพบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย อีกด้วย ทั้งนี้ได้เสนอการจัดจำแนกชนิดของราที่ไม่สามารถระบุได้ทั้ง 8 ชนิด โดยการปรับปรุงจาก คีย์ของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่พบในประเทศไทยของ เขียวหรือญ ในปี ค.ศ. 1997 (Theinhirun. 1997: 1-355) ดังนี้

1	Spore pale brown, with germ slit originating from one end, with KOH-extractable pigments vinaceous purple or vinaceous grey	2
1	Combination of characters role as above .....	3
2	Ascospores 9.0-14(-17) x 3.5-4.5 $\mu$ m .....	<i>A. urceolatum</i> *
2	Ascospores 6.0-8.7 x 2.0-2.5 $\mu$ m .....	<b><i>Annulohypoxyton</i> species D</b>
3	Ascospores laterally compressed and with indehiscent perispores	<i>A. pouceanum</i> *
3	Ascospores 5-7 x 2-3 $\mu$ m, with germ slit on the flattened side .....	4
4	Perithecia obovoid to tubular, 0.4-0.6 mm high x 0.2-0.3 mm diam; ostioles with disk 0.1-0.2 mm diam .....	<i>A. stygium</i>
4	Ostioles with disk 0.3-0.4 mm diam .....	5
5	Perithecia obovoid, 0.6-0.7 mm high x 0.4 mm diam .....	<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i>
5	Perithecia spherical, 0.3-0.5 mm diam .....	6
6	Ostiolar disks not exceeding 0.2 mm diam; ascospores 9-11.3 x 3.8-5 $\mu$ m .....	<i>A. archeri</i> *
6	Ostiolar disks exceeding 0.2 mm diam .....	7
7	Ostiolar disks 0.3-0.7 mm; stromata with KOH-extractable pigments greenish olivaceous .....	8
7	Ostiolar disks not exceeding 0.5 mm diam .....	9
8	Ascospores 4.2-7.5 x 2.5-3.5 $\mu$ m .....	<b><i>Annulohypoxyton</i> species A</b>
8	Ascospores 8.2-10.5 x 4.4-5 $\mu$ m .....	<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i>
9	Ostiolar disks 0.2-0.3 mm; stromata with KOH-extractable pigments pale vinaceous grey; ascospores 8.8-10 x 3.8-4.4 $\mu$ m	<b><i>Annulohypoxyton</i> taxonomic species 15*</b>
9	Ostiolar disc 0.2-0.5 mm diam .....	10
10	Mature stromata shiny black .....	11
10	Mature stroma dull brownish; blackish; or with olive tones .....	12
11	Stromata with greenish olivaceous KOH-extractable pigments; ascospores 6.5-10 x 3.8-4 $\mu$ m .....	<i>A. nitens</i>
11	Stromata with vinaceous purple or vinaceous grey extractable pigments; ascospores 6.9-8.2 x 2.5-3.2 $\mu$ m .....	<i>A. purpureonitens</i>
12	Ascospores exceeding 6 $\mu$ m length .....	13

12	Ascospores less than 6 $\mu\text{m}$ length .....	15
13	Ascospores 6-10.5 x 2.5-4 $\mu\text{m}$ ; ostiolar discs <i>bovei</i> -type .....	<b>Annulohypoxyton species E</b>
13	Ostiolar discs <i>truncatum</i> -type .....	14
14	Ascospores 5.5-7.0 x 2.4-3.7 $\mu\text{m}$ .....	<b>Annulohypoxyton species G</b>
14	Ascospores 6-9 x 2.5-4 $\mu\text{m}$ ; ostiolar discs <i>truncatum</i> -type .....	<b>A. moriforme</b>
15	Germ slit straight nearly full length; on flattened side; ascospores 3.9-6.7 x 2-2.7(-3.5) $\mu\text{m}$ .....	<b>Annulohypoxyton species B</b>
15	Germ slit straight nearly full length; on convex side .....	16
16	Ascospores (3.7)4-6.8 x 2.5-3.7 $\mu\text{m}$ .....	<b>Annulohypoxyton species C</b>
16	Ascospores 5.8-8.7(9.7) x 2-3 $\mu\text{m}$ .....	<b>Annulohypoxyton species F</b>

\* หมายถึง ชนิดของราที่มีการรายงานว่าพบในประเทศไทย (Theinhirun. 1997: 1-355) แต่ไม่พบในการศึกษาครั้งนี้

หมายเหตุ: *Annulohypoxyton* species H เป็น cryptic species ของ *A. nitens* จึงไม่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา แต่ต่างกันในระดับนิวคลีโอไทด์







## บรรณานุกรม

- เชิดชัย โพธิ์ศรี; ญัฐฎิภา สุวรรณาศรัย; และศิริรัตน์ สดงาม. (2554). ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดราขนาดใหญ่ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว และการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ. รายงานฉบับสมบูรณ์. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- สุรงค์ เขียรศิริ. (2545). ความหลากหลายของเห็ดราวงศ์ *Xylariaceae* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์. รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ ประจำปี 2545: 13-22.
- Abe, Y. (1989). Effect of Moisture on Decay of Wood by Xylariaceous and Diatrypaceous Fungi and Quantitative Changes in the Chemical Components of Decayed Woods. *Transactions of the Mycological Society of Japan*. 30: 169-181.
- Baldin, Bruce G.; Sanderson, Michael J.; Porter, J. Marker; Wojciechowski, Martin F.; Campbell, Christopher S.; & Donoghue, Michael J. (1995). The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82(2): 247-277.
- Barnard, Edward L.; & Dixon, Wayne N. (1983). Diseases of...Hardwood Stem : *Hypoxyylon canker* . *Florida Forest Service Bulletin*. No. 196-A: 1-102. สืบค้นเมื่อ 10 มีนาคม 2556, จาก [http://www.floridaforestservice.com/publications/Insects\\_and\\_Diseases/td\\_hs\\_hypoxyylon\\_cankers.html](http://www.floridaforestservice.com/publications/Insects_and_Diseases/td_hs_hypoxyylon_cankers.html)
- Bodo, Bernard; Davoust, Daniel; Lecommandeur, Didier; Rebuffat, Sylvie; Genetet, I.; & Pinon, Jean-Claude. (1987). Hymatoxin A, a Diterpene Sulfate Phytotoxin of *Hypoxyylon mammatum*, Parasite of Aspen. *Tetrahedron Letters*. 28(21): 2355–2358.
- Carbone, Ignazio; & Kohn, Linda M. (1999). A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*. 91(3): 553-556.
- Cha, Jaeyul; Heo, Bitna; Ahn, Soo Jeong; Gang, Guenhye; Park, Chun Gyoo; & Kwak Youn-Sig. (2012). Morphological and Molecular Characteristics of the Oak Tree Canker Pathogen, *Annulohypoxyylon truncatum*. *Mycobiology*. 40(1): 79-81.
- Chapela, Ignacio H. (1989). Fungi in Healthy Stems and Branches of American Beech and Aspen: A Comparative Study. *New Phytologist*. 113: 65-75.
- Chapela, Ignacio H.; & Boddy, Lynne. (1988). Fungal Colonization of Attached Beech Branches II. Spatial and Temporal Organization of Communities Arising from Latent Invaders in Bark and Functional Sapwood, Under Different Moisture Regimes. *New Phytologist*. 110: 47-57.

- Chen, Xu Yu; Qi, Yao Dong; Wei, Jian He; Zheng, Zhang; Wang, De Li; Feng, Jin Dong; & Gan, Bing Chun. (2011). Molecular Identification of Endophytic Fungi from Medicinal Plant *Huperzia serrata* Based on rDNA ITS Analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(3): 495-503.
- Cheng, Ming-Jen; Wu, Ming-Der; Hsieh, Sung-Yuan; Su, Yung-Shun; Chen, Ih-Sheng; & Yuan, Gwo-Fang. (2011). Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Annulohyphoxylon bovei* var. *microspora* BCRC 34012. *Chemistry of Natural Compounds*. 47(4): 536-540.
- Cheng, Ming-Jen; Wu, Ming-Der; Yuan, Gwo-Fang; Chen, Yen-Lin; Su, Yung-Shun; Hsieh, Ming-Tsuen; & Chen, Ih-Sheng. (2012). Secondary Metabolites and Cytotoxic Activities from the Endophytic Fungus *Annulohyphoxylon squamulosum*. *Phytochemistry Letters*. 5: 219–223.
- Cho, Soowon; Mitchell, Andrew; Regier, Jerome C.; Mitter, Charles; Poole, Robert W.; Friedlander, Timothy P.; & Zhao, Suwei. (1995). A Highly Conserved Nuclear Gene for Low-Level Phylogenetics: Elongation Factor-1 $\alpha$  Recovers Morphology-based Tree for Heliothine Moths. *Molecular Biology and Evolution*. 12(4): 650-656.
- Edwards, Raymond L.; Fawcett, Victor; Maitland, Derek J.; Nettleton, Roger; Shields, Leonard; & Whalley, Anthony J.S. (1991). Hypoxyxylone. A Novel Green Pigment from the Fungus *Hypoxyylon fragiforme* (Pers.: Fries) Kickx. *Journal of the Chemical Society, Chemical Community*. 15: 1009-1010.
- Fournier, Jacques; Stadler, Marc; Hyde, Kevin D.; & Duong, Minh Lam. (2010). The New Genus *Rostrohyphoxylon* and Two New *Annulohyphoxylon* Species from Northern Thailand. *Fungal Diversity*. 40: 23-36.
- Gardes, Monique; & Bruns, Thomas D. (1993). ITS Primer with Enhanced Specificity for Basidiomycetes- Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113-118.
- Glass, N. Louise; & Donaldson, Gary C. (1995). Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(4): 1323-1330.
- Greenhalgh, G.N.; & Whalley, Anthony J.S. (1970). Stromatal Pigments of Some Species of *Hypoxyylon*. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: 89-96.
- Hall, Thomas A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.

- Hansen, Karen; Perry, Brian A.; Dranginis, Andrew W.; & Pfister, Donald H. (2013). A Phylogeny of the Highly Diverse Cup-Fungus Family Pyronemataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) Clarifies Relationship and Evolution of Selected Life History Traits. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67: 311-335.
- Helgason, Thorunn; Watson, Irene J.; & Young W., Peter J. (2003). Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from Actin and Elongation Factor 1-alpha Sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 229: 127-132.
- Hladki, Adriana I.; & Romero, Andrea I. (2009). Taxonomic and Nomenclatural Aspects of *Hypoxylon* Taxa from Southern South America Proposed by Spegazzini. *Mycologia*. 101(5): 733–744.
- Hsieh, Huei-Mei; Ju, Yu-Ming; & Rogers, Jack D. (2005). Molecular Phylogeny of *Hypoxylon* and Closely Related Genera. *Mycologia*. 97(4): 844–865.
- Hsieh, Huei-Mei; Lin, Chun-Ru; Fang, Mei-Jane; Rogers, Jack D.; Fournier, Jacques; Lechat, Christian; & Ju, Yu-Ming. (2010). Phylogenetic Status of *Xylaria* Subgenus *Pseudoxylaria* Among Taxa of the Subfamily Xylarioideae (Xylariaceae) and Phylogeny of Taxa Involved in the Subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54: 957-969.
- Hubbes, Martin. (1964). New Facts on Host-Parasite Relationships in the *Hypoxylon* canker of Aspen. *Canadian Journal of Botany*. 42: 1489-1494.
- Ju, Yu-Ming; & Rogers, Jack D. (1996). A Revision of the Genus *Hypoxylon*. APS Press, St. Paul, Minnesota. *Mycologia Memoir*. 20: 1-365.
- Ju, Yu-Ming; Rogers, Jack D.; & Hsieh, Huei-Mei. (2004). New *Hypoxylon* Species and Notes on Some Names Associated with or Related to *Hypoxylon*. *Mycologia* 96: 154–161.
- Kato, Tadahiro; Kabuto, C.; Sasaki, Nobuki; Tsunakawa, Mitsuaki; Aizawa, Hiroyasu; Fujita, Kenichi; Kato, Y.; & Kitahara, Yoshio. (1973). Momilactones, Growth Inhibitors from Rice, *Oryza Sativa* L. *Tetrahedron Letters*. 14 (39): 3861–3864.
- Kato, Tadahiro; Tsunakawa, Mitsuaki; Sasaki, Nobuki; Aizawa, Hiroyasu; Fujita, Kenichi; Kitahara, Yoshio; Takahashi, Norindo. (1977). Growth and Germination Inhibitors in Rice Husks. *Phytochemistry*. 16: 45-48.
- Leite, Tiago de Souza; Andréia, Cnossen-Fassoni; Pereira, Olinto L.; Mitzabuti, Eduardo S.G.; Araújo, Elza F.; & Queiroz, Marisa V. (2013). Novel and Highly Diverse Fungal Endophytes in Soybean Revealed by the Consortium of Two Different Techniques. *Journal of Microbiology*. 51(1): 56-69.

- Lumbsch, Thorsten H.; & Huhndorf, Sabine M. (2007). Outline of Ascomycota – 2007. *Myconet*. 13: 1-58.
- Manion, P.D.; & Griffin, David H. (1986). Sixty-Five Years of Research on *Hypoxyton canker* Of aspen. *Plant Disease*. 70: 803-808.
- Marincowitz, Seonju; Crous, Pedro W.; Groenewald, Johannes Z.; & Wingfield, Michael J. (2008). Microfungi Occurring on Proteaceae in the Fynbos. *CBS Biodiversity Series*. 7: 1-166.
- Marty, Robert. (1972). The Economic Impact of *Hypoxyton canker* on the Lake States Resource. In: *Aspen Symposium Proceedings USDA Forest Service: General Technical Report*. NC-1: 21-26.
- McPherson, Brice A.; Mori, Sylvia R.; Wood, David L.; Storer, Andrew J.; Svihra, Pavel; Kelly, Maggi N.; & Standiford, Richard B. (2005). Sudden Oak Death in California: Disease Progression in Oaks and Tanoaks. *Forest Ecology and Management*. 213 (1–3): 71–89.
- Miller, Julian H.; (1961). A Monograph of the World Species of *Hypoxyton*. *University of Georgia Press*. Athens: 1-158.
- Nugent, Lianne K.; Sangvichen, Ek; Sihanonth, Prakitsin; Ruchikachorn, Nutthaporn; & Whalley, Anthony J. S. (2006). A Revised Method for the Observation of Conidiogenous Structures in Fungi. *Mycologist*. 20: 111-114.
- O'Donnell, Kerry; & Clgelnik, Elizabeth. (1997). Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 7(1): 103-116.
- O'Donnell, Kerry; Kistler, HC.; Clgelnik, Elizabeth; & Ploetz, RC. (1998). Multiple Evolutionary Origins of the Fungus Causing Panama Disease of Banana: Concordant Evidence from Nuclear and Mitochondrial Gene Genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 2044-2049.
- O'Donnell, Kerry; Lutzoni, FM.; Ward, TJ.; & Benny, GL. (2001). Evolutionary Relationships Among Mucoralean Fungi (Zygomycota): Evidence for Family Polyploidy on A Large Scale. *Mycologia*. 93: 286-296.
- Peláez, Fernando; Gonzalez, Vicente; Platas, Gonzalo; Sanchez-Ballesteros, Javier; & Rubio, Victor. (2008). Molecular Phylogenetic Studies within the Family Xylariaceae Based on Ribosomal DNA Sequences. *Fungal Diversity*. 31: 111–134.
- Pereira, Jadergudson; Rogers, Jack D.; & Bezerra, José L. (2010). New *Annulohypoxyton* Species from Brazil. *Mycologia*. 102(1): 248–252.

- Peršoh, Derek; Melcher, Martina; Graf, Katrin; Fournier, Jacques; Stadler, Marc; & Rambold, Gerhard. (2009). Molecular and Morphological Evidence for the Delimitation of *Xylaria hypoxylon*. *Mycologia*. 101(2): 256–268.
- Petrini, Orlando. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. *Microbial Ecology of Leaves*.: 179-197.
- Petrini, Liliane E.; & Petrini, Orlando. (1985). Xylariaceous Fungi as Endophytes. *Sydowia*. 38: 216-234.
- Phosri, Cherdchai; Suwannasai, Nuttika; & Whalley, Anthony J.S. (2008). The Fungal Distribution of *Annulohypoxylon* and *Hypoxylon* Taxa Found in the North of Thailand. *Proceedings In: 34<sup>th</sup> Congress of Science and Technology of Thailand*.: 1-8.
- Pointing, Stephen B.; Parungao, Marilen M.; & Hyde, Kevin D. (2003). Production of Wood-decay Enzymes, Mass Loss and Lignin Solubilization in Wood by Tropical Xylariaceae. *Mycological Research*. 107(2): 231-235.
- Povah, Alfred. (1942). *Hypoxylon* Poplar Canker. *Phytopathology*. 14: 140-145.
- Quang, Dang Ngoc; Hashimoto, Toshihiro; Stadler, Marc; Radulovic, N.; Asakawa, Yoshinori. (2005). Antimicrobial Azaphilones from the Fungus *Hypoxylon multiforme*. *Planta Medica*. 71: 1058–1072.
- Quang, Dang Ngoc; Hashimoto, Toshihiro; Nomura, Yoko; Wollweber, Hartmund; Hellwig, Veronika; Fournier, Jacques; Stadler, Marc; & Asakawa, Yoshinori. (2005). Cohaerins A and B, Azaphilones from the Fungus *Hypoxylon cohaerens*, and Comparison of HPLC-Based Metabolite Profiles in *Hypoxylon* sect. *Annulata*. *Phytochemistry*. 65: 797–809.
- Quang, Dang Ngoc; Stadler, Marc; Fournier, Jacques; Tomita, Ayumi; & Hashimoto, Toshihiro. (2006). Cohaerins C-F, Four Azaphilones from the Xylariaceous Fungus *Annulohypoxylon cohaerens*. *Tetrahedron*. 62: 6349–6354.
- Rayner, R.W. (1970). A Mycological Colour Chart. *Commonwealth Mycological Institute, Kew and British Mycological Society*.: 1-34.
- Rehner, Stephen A. (2001). Primers for Elongation Factor 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ). สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2556, จาก <http://ocid.NACSE.ORG/research/deephyphae/EF1primer.pdf>
- Rehner, Stephen A.; & Buckley, Ellen. (2005). A *Beauveria* Phylogeny Inferred from Nuclear ITS and EF1- $\alpha$  Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to *Cordyceps* Teleomorphs. *Mycologia*. 97(1): 84-98.

- Roger, Andrew J.; Sandblom, Olof; Doolittle, Ford W.; & Pkilippe, Hervé. (1999). An Evaluation of Elongation Factor 1 $\alpha$  as A Phylogenetic Marker for Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. 16(2): 218-233.
- Rogers, Jack D. (2000). Thoughts and Musing on Tropical Xylariaceae. *Mycological Research*. 104: 1412-1420.
- Sánchez-Ballesteros, Javier; González, Vicente; Salazar, Oscar; Acero, Javier; Portal, Maria A.; Julián, Mariá; & Rubio, Víctor. (2000). Phylogenetic Study of *Hypoxylon* and Related Genera Based on Ribosomal ITS Sequences. *Mycologia*. 92: 964-977.
- Schumacher, Jörg; Leonhard, Sindy; Wulf, Alfred; & Heydeck, Paul. (2007). Noteworthy Decline and Wood Decay on *Fagus sylvatica* L. by the Ascomycete *Annulohypoxylon cohaerens* (Fr.:Fr) Y.M. Ju, J. D. Rogers & H.-M. Hsieh. *Acta Silvatica & Lingaria Hungarica: Special Edition*: 179-186.
- Schmitt, I.; Crespo, A.; Divakar, P.K.; Fankhauser, J.D.; Herman-Sackett, E.; Kalb, K.; Nelsen, M.P.; Nelson, N.A.; Rivas-Plata, E.; Shimp, A.D.; Widhelm, T.; & Lumbsch, H.T. (2009). New Primers for Promising Single-Copy Genes in Fungal Phylogenetics and Systematics. *Persoonia*. 23: 35-40.
- Spribile, Toby; Klug, Barbara; & Mayrhofer, Helmut. (2011). A Phylogenetic Analysis of the Boreal Lichen *Mycoblastus sanguinarius* (Mycoblastaceae, Lichenized Ascomycota) Reveals Cryptic Clades Correlated with Fatty Acid Profiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 59: 603-614.
- Srikitikulchai, Prasert. (1999). *Qualitative and Quantitative Estimation of Lignocellulose Breakdown by Xylariaceae*. Master of Science. (Biotechnology). School of Bioresources and Technology. King Monkut's University of Technology Thonburi. Photocopied. pp. 1-102.
- Stadler, Marc; Wollweber, Hartmund; Mühlbauer, Andrea; Asakawa, Yoshinori; Hashimoto, Toshihiro; Rogers, Jack D.; Ju, Yu-Ming; Wetzstein, Heinz-Georg; & Tichy, Hans-Volker. (2001). Molecular Chemotaxonomy of *Daldinia* and Other Xylariaceae. *Mycological Research*. 105(10): 1190-1208.
- Stadler, Marc; Ju, Yu-Ming; & Rogers, Jack D. (2004). Chemotaxonomy of *Entonaema*, *Rhopalostroma*, and Other Xylariaceae. *Mycological Research*. 108(3): 239–256.
- Stadler, Marc; & Fournier, Jacques. (2006). Pigment Chemistry, Taxonomy and Phylogeny of the Hypoxyloideae (Xylariaceae). *Revista Iberoamericana de Micología*. 23: 160–170.

- Stadler, Marc; Fournier, Jacques; Granmo, Alfred; & Beltrán-Tejera, Esperanza. (2008). The “red Hypoxylons” of the Temperate and Subtropical Northern Hemisphere. *North America Fungi*. 3(7): 73-125.
- Steglich, W.; Klaar, M.; & Furtner, W. (1974). (+)-Mitorubrin Derivatives from *Hypoxylon fragiforme*. *Phytochemistry*. 13: 2874-2875.
- Sutherland, John B.; & Crawford, Douglas L. (1981). Lignin and Glucan Degradation by Species of the Xylariaceae. *Transactions of the British Mycological Society*. 76: 335-337.
- Suwannasai, Nuttika; Rodtong, Sureelak; Thienhirun, Surang; & Whalley, Anthony J.S. (2005). New Species and Phylogenetic Relationships of *Hypoxylon* Species Found in Thailand Inferred from the Internal Transcribed Spacer Regions of Ribosomal DNA sequences. *Mycotaxon*. 94: 303–324.
- Suwannasai, Nuttika; Phosri, Cherdchai; Khangrang, Rungpetch; Pringsulaka, Onanong; & Whalley, Anthony J.S. (2011). Biodiversity of Xylariaceous Fungi from Dry Evergreen Forest in Phu Khiao Wildlife Sanctuary. *Proceedings In: 37<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand*.: 1-6.
- Suwannasai, Nuttika; Whalley, Margaret A.; Whalley, Anthony J.S.; Thienhirun, Surang; & Sihanonth, Prakitsin. (2012). Ascus Apical Apparatus and Ascospore Characters in Xylariaceae. *IMA Fungus*. 3(2): 125-133.
- Suwannasai, Nuttika; Martín, María P.; Phosri, Cherdchai; Sihanonth, Prakitsin; Whalley, Anthony J.S.; & Spouge, John L. (2013). Fungi in Thailand: A Case Study of the Efficacy of an ITS Barcode for Automatically Identifying Species within the *Annulohypoxylon* and *Hypoxylon* Genera. *PLoS ONE*. 8(2): e54529. 1-8.
- Tamura, Koichiro; Peterson, Daniel; Peterson, Nicholas; Stecher, Glen; Nei, Masatoshi; & Kumar, Sudhir. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Tang, Alvin M.C.; Jeewon, Rajesh; & Hyde, Kevin D. (2007). Phylogenetic Relationships of *Nemania plumbea* sp. nov. and Related Taxa Based on Ribosomal ITS and RPB2 Sequences. *Mycological Research*. 111: 392-402.
- Tang, Alvin M.C.; Jeewon, Rajesh; & Hyde, Kevin D. (2009). A Re-Evaluation of the Evolutionary Relationships within the Xylariaceae Based on Ribosomal and Protein-Coding Gene Sequences. *Fungal Diversity*. 34: 127-155.



- Thienhirun, Surang. (1997). *A Preliminary Account of the Xylariaceae of Thailand*. Ph.D. Thesis. Liverpool John Moores University. United Kingdom. Photocopied. pp. 1-355.
- Thienhirun, Surang; & Whalley, Anthony J.S. (2004). Xylariaceae. In: Thai Fungal Diversity (eds. E.B.G. Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde). BIOTEC. Thailand: 71-77.
- Thompson, Julie D.; Higgins, Desmond G.; & Gibson, Toby J. (1994). CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22): 4673-4680.
- Tomcheck, Angela R.; Strobel, Gary A.; Booth, Eric; Geary, Brad; Spakowicz, Dan; Knighton, Berk; Floerchinger, Cody; Sears, Joe; Liarzi, Orna; & Ezra, David. (2010). *Hypoxyton* sp., an Endophyte of *Persea indica*, Producing 1,8-Cinole and Other Bioactive Volatiles with Fuel Potential. *Microbial Ecology*. 60: 903-914.
- Triebel, Dagmar; Peršoh, Derek; Wollweber, Hartmund; & Stadler, Marc. (2005). Phylogenetic Relationships Among *Daldinia*, *Entonaema*, and *Hypoxyton* as Inferred from ITS nrDNA Analyses of Xylariales. *Nova Hedwigia*. 80(1-2): 25-43.
- Vasileya, Ljubov N.; Stephenson, Steven L.; Hyde, Kevin D.; & Bahkali, Ali H. (2012). Some Stromatic Pyrenomycetous Fungi from Northern Thailand – 1, *Biscogniauxia*, *Camillea* and *Hypoxyton* (Xylariaceae). *Fungal Diversity*. 55: 65-76.
- Wei, D.L.; Chang, Y.-H.; Lin, Y.-W.; Chuang, C.-L.; & Jong, S.-C. (1992). Production of Cellulolytic Enzymes from the *Xylaria* and *Hypoxyton* Species of Xylariaceae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8: 141-146.
- Whalley, Anthony J.S. (1993). Tropical Xylariaceae: Their Distribution and Ecological Characteristics. In: *Aspects of Tropical Mycology* (ed. S. Isaac, J.C. Frankland, R. Watling & A.J.S. Whalley). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom: 103-119.
- Whalley, Anthony J.S. (1996). The Xylariaceous Way of Life. *Mycological Research*. 100(8): 897-922.
- Whalley, Anthony J.S.; & Whalley, Margaret A. (1977). Stromatal Pigments and Taxonomy of *Hypoxyton*. *Mycopathologia*. 61: 99-103.
- Whalley, Anthony J.S.; & Edwards, Richard L. (1995). Secondary Metabolites and Systematic Arrangement within the Xylariaceae. *Canadian Journal of Botany*. 73: S802–810.

- White, Taylor J.; Bruns, T.; Lee, S.; & Taylor, John W. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press, New York, United State of America: 315-322.
- Zhang, Ning; Castlebury, Lisa A.; Miller, Andrew N.; Huhndorf, Sabine M.; Schoch, Conrad L.; Seifert, Keith A.; Rossman, Amy Y.; Rogers, Jack D.; Kohlmeyer, Jan; Volkmann-Kohlmeyer, Brigitte; & Sung, Gi-Ho. (2006). An Overview of the Systematics of the Sordariomacetes. *Mycologia*. 98(6): 1076-1087.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก  
สูตรอาหารและวิธีการเตรียม

## ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์

### 1. Potato dextrose agar (PDA)

PDA	39.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อหุงความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 2. Oat meal agar (OA)

OA	72.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อหุงความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 3. Malt extract agar (MEA)

MEA	35.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อหุงความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 4. Miller Luria-Bertani agar (LBA)

Miller Luria-Bertani (LB)	25.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อหุงความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 5. Miller Luria-Bertani (LB) broth

Miller Luria-Bertani (LB)	25.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 6. SOC medium

Tryptone	20.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
1 M Glucose	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร
ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเติม		
250 mM KCl	10.0	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม

2 M MgCl <sub>2</sub> ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	1000	มิลลิลิตร



ภาคผนวก ข  
บัพเพอร์และวิธีการเตรียมสาร

## ภาคผนวก ข

## บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้

## 1. 0.5X TBE

TBE	18.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำมาผสมกัน คนจน TBE ละลายจนหมด

## 2. 1% Agarose

Agarose	1.0	กรัม
0.5X TBE	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจากนั้นนำไปต้มให้ agarose ละลายจนหมด

## 3. 1% Iodine Reagent

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

นำมาละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) จากนั้นบรรจุใส่ขวดสีชา

## 4. 10% KOH

Potassium Hydroxide (KOH)	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกัน คนจน KOH ละลายจนหมด จากนั้นบรรจุใส่ขวดสีชา

## 5. Methylene Blue

สี Methylene Blue	0.3	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกัน จากนั้นบรรจุใส่ขวดสีชา



### 6. Melzer's Reagent

Iodine	1.5	กรัม
Potassium-Iodide	5.0	กรัม
Chloral Hydrate	100	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดไปอุ่น โดยให้ความร้อนที่พอเหมาะแต่ห้ามเดือด แล้วบรรจุใส่ขวดสีชา

### 7. Ethidium Bromide Solution

Ethidium Bromide	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นเวลาเตรียมควรสวมถุงมือ และห่อขวดด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 8. Ampicillin Solution

Ampicillin	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

เขย่าให้สารละลายเข้ากันจากนั้นจึงนำไปกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เก็บสารที่ได้ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 9. Isopropylthiogalactoside (IPTG) Solution

IPTG	2	กรัม
น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เก็บสารที่ได้ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 10. X-Gal Solution

X-Gal	20	มิลลิกรัม
Dimethylformamide	1	มิลลิลิตร

เขย่าให้สารละลายเข้ากัน โดยสารละลายที่ได้ต้องใสไม่มีสีเหลือง ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นห่อหลอดที่เก็บสารด้วยฟรอย เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 11. 1M Glucose

Glucose	18	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 12. 2 M MgCl<sub>2</sub>

MgCl <sub>2</sub>	19	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บสารที่ไตใส่ขวดแก้วแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 13. 50 mM CaCl<sub>2</sub>

CaCl <sub>2</sub>	7.4	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 14. 0.1% กรดฟอสฟอริก (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1	มิลลิลิตร
น้ำ HPLC grade	1000	มิลลิลิตร

กรองสารละลายที่ได้ด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารใส่ขวดที่มีฝาปิดสนิท

#### 15. 50% Methanol Solution

Methanol	500	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร



**ภาคผนวก ค**  
**วิธีการทดลองชุดสำเร็จ (kit) และการเตรียมเซลล์**

## ภาคผนวก ค

### วิธีการทดลองชุดสำเร็จ (kit) และการเตรียมเซลล์

#### 1. FavorPrep™ Plant Genomic DNA extraction mini kit (Favorgen)

ทำการบดเส้นใยราบริสุทรีให้ละเอียดเบาๆ จากนั้นเติม extraction buffer (FAPG1) ลงไป 400 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ RNase A ปริมาณ 4 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำมาเติม FAPG2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลาย (supernatant) ที่ได้ใส่ใน filter column นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายที่ได้ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติม FAPG3 1.5 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ได้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้น-ลงด้วย pipette ดูดส่วนผสมที่ได้ใส่ FAPG column นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วเติม W1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้ง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 50 – 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายที่ได้เป็น 1<sup>st</sup> DNA แล้วทำการชะคอลัมน์ซ้ำอีกครั้งด้วย elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายที่ได้เป็น 2<sup>nd</sup> DNA นำ DNA ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

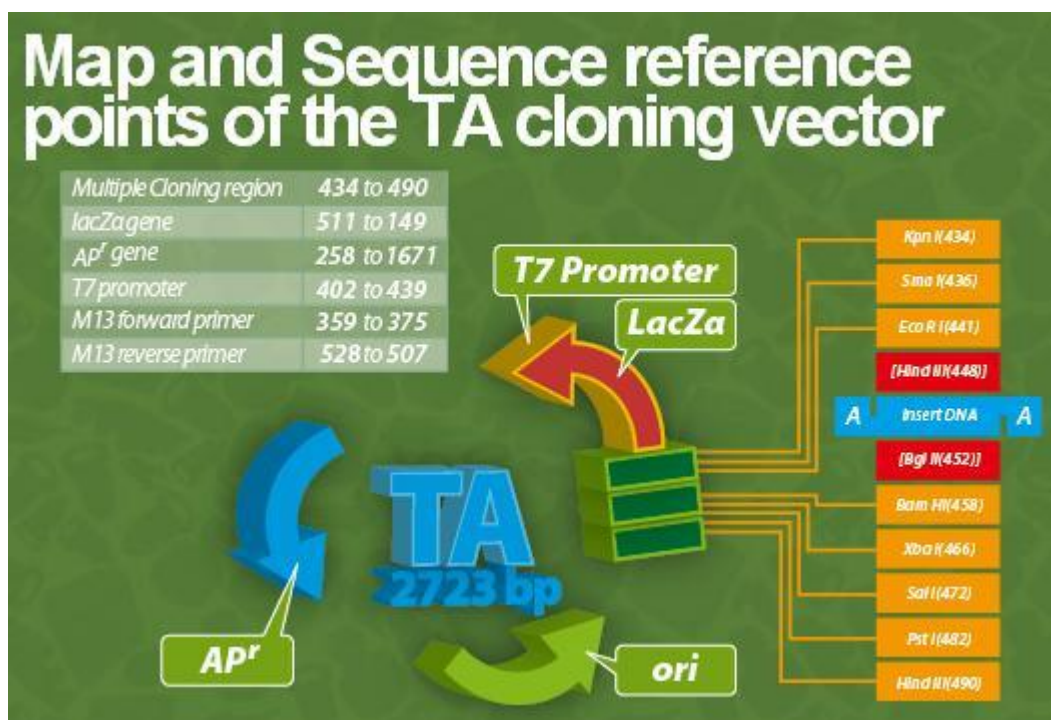
#### 2. FavorPrep™ GEL/PCR Purification mini kit (Favorgen)

เติม FADF buffer ปริมาตรเท่าตัวของ PCR product และดูดไปใส่ใน หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ดูดสารผสมที่ได้ใส่ใน FADF column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 1 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที ย้าย FADF column ไปยังหลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 40 - 50 ไมโครลิตร หยด ลงบริเวณตรงกลางแผ่นเมมเบรนของ FADF column ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายที่ได้เป็น DNA บริสุทรีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3. RBC TA cloning vector kit

Ligation buffer A	0.5	ไมโครลิตร
Ligation buffer B	0.5	ไมโครลิตร
RBC TA cloning vector	1.0	ไมโครลิตร
PCR purify product	2.0-2.5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	0.0-0.5	ไมโครลิตร

บ่มส่วนผสมที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



แผนภาพบริเวณและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ TA cloning vector ด้วยชุดสำเร็จ (RBC TA cloning vector kit, Taiwan)

ที่มา: <http://www.rbcbioscience.com/products/rbc-cloning-system/ta-cloning-vector/rbc-ta-cloning-vector-kit>

#### 4. การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ TOP10 เป็น competent cells

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) โดยบ่มในตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 – 24 ชั่วโมง (overnight) เก็บเชื้อ *E. coli* โคโลนีเดี่ยวที่ได้ใส่ในอาหารเหลว LB 1 โคโลนีต่อปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อผสมที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 – 2.30 ชั่วโมง (ข้อสำคัญ: ระหว่างช่วงเวลาที่บ่มให้ทำการวัดค่าความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) ค่าที่ได้ต้องเท่ากับ 0.3 ไม่ควรเกิน เพราะจะทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อรับพลาสมิดได้ไม่ดี) เมื่อได้เชื้อที่มีค่า OD ตามต้องการแล้วจึงแบ่งเชื้อที่ได้ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้เป็นต้นไปหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เก็บเชื้อแล้วจะต้องแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลาที่ทำการทดลอง) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วค่อยๆ เทส่วนสารละลายทิ้ง เติม 50 mM  $CaCl_2$  ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนสารละลายทิ้ง เติม 50 mM  $CaCl_2$  ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กับกลีเซอรอล (glycerol) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลง เบาๆ จากนั้นแบ่งส่วนผสมของเชื้อคอมพีเทนต์ (competent cells) ที่ได้ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บเซลล์ที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ง  
ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์



## ภาคผนวก ง

## ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) จากฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชนิดของรา	Accession No.	ขนาด (คู่เบส)	ที่มา
<i>Annulohyphoxylon annulatum</i> isolate C4	FJ481150	633	Zhang, C.-L.; Peng, W.-H.; Wen, W.-T.; Zhou, J.; Liang, Q.; Mao, J.-Y.; & Yang, Z.-R. 2008.
<i>A. annulatum</i> isolate Y24	FJ481158	635	Zhang, C.-L.; Peng, W.-H.; Wen, W.-T.; Zhou, J.; Liang, Q.; Mao, J.-Y.; & Yang, Z.-R. 2008.
<i>A. atroroseum</i> isolate H178	FN252415	918	Phosri, C.; Suwannasai, N.; Sihanonth, P.; Martin, M.P.; & Whalley, A.J.S. 2009.
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> isolate 90081914	EF026141	635	Ju, Y.-M.; Hsieh, H.-M.; Ho, M.-C.; Szu, D.-H.; & Fang, M.-J. 2006.
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> isolate TRP06	JQ747513	660	Mu, Y.H.; Peng, W.H.; & Jia, D.H. 2012.
<i>A. moriforme</i> isolate SUT220	DQ322129	550	Suwannasai, N.; Rodtong, S.; Thienhirun, S.; & Whalley, A.J.S. 2005.
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> isolate 90080807	EF026137	615	Ju, Y.-M.; Hsieh, H.-M.; Ho, M.-C.; Szu, D.-H.; & Fang, M.-J. 2006.
<i>A. multiforme</i> isolate agtS192	AY616707	493	Triebel, D.; Persoh, D.; Wollweber, H.; & Stadler, M. 2004.
<i>A. multiforme</i> isolate agtS371	AY616708	492	Triebel, D.; Persoh, D.; Wollweber, H.; & Stadler, M. 2004.
<i>A. nitens</i> isolate 91022108	EF026138	569	Ju, Y.-M.; Hsieh, H.-M.; Ho, M.-C.; Szu, D.-H.; & Fang, M.-J. 2006.
<i>A. nitens</i> isolate ST2436	DQ322099	479	Suwannasai, N.; Rodtong, S.; Thienhirun, S.; & Whalley, A.J.S. 2005.
<i>A. purpureonitens</i> isolate ST2448	DQ223756	549	Suwannasai, N.; Rodtong, S.; Thienhirun, S.; & Whalley, A.J.S. 2005.
<i>A. stygium</i> isolate SUT058	DQ223760	796	Suwannasai, N.; Rodtong, S.; Thienhirun, S.; & Whalley, A.J.S. 2005.
<i>A. stygium</i> isolate H22R	AJ390409	816	Sanchez-Ballesteros, J. 1999.



## ตาราง (ต่อ)

ชนิดของรา	Accession No.	ขนาด (คู่เบส)	ที่มา
<i>Annulohyphoxylon truncatum</i>	AF201716	584	Pinto-Sherer, T.J.; & Chapela, I.H. 2000.
<i>A. truncatum</i> isolate xsd 08029	FJ478107	613	Jiang, J.; Cao, X.; Zhao, G.; Sun, Y.; Ju, X.; Yin, T.; Miao, Q.; & Li, C. 2008.
<i>A. urceolatum</i> isolate SUT098	DQ322103	737	Suwannasai, N.; Rodtong, S.; Thienhirun, S.; & Whalley, A.J.S. 2005.
<i>Annulohyphoxylon</i> sp. SUT025	DQ322096	527	Suwannasai, N.; Rodtong, S.; Thienhirun, S.; & Whalley, A.J.S. 2005.
<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H099	FN252419	879	Suwannasai, N. 2009.
<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H181	FN252420	879	Suwannasai, N. 2009.
<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H215	FN252422	879	Suwannasai, N. 2009.
<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H130	FN252424	857	Suwannasai, N. 2009.
<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H255	FN252427	477	Suwannasai, N. 2009.

## ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน alpha-actin จากฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชนิดของรา	Accession No.	ขนาด (คู่เบส)	ที่มา
<i>Annulohyphoxylon annulatum</i> YMJ 19720801	AY951764	261	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951765	264	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. cohaerens</i> YMJ 310	AY951766	267	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. cohaerens</i> strain F160842	FJ185264	267	Platas, G.; Collado, J.; & Pelaez, F. 2008.
<i>A. cohaerens</i> strain F119894	FJ185267	267	Platas, G.; Collado, J.; & Pelaez, F. 2008.
<i>A. elevatidiscus</i> YMJ 90080706	AY951767	264	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. minutellum</i> YMJ 316	AY951768	262	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951769	263	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. multiforme</i> YMJ 317	AY951770	260	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.

## ตาราง (ต่อ)

ชนิดของรา	Accession No.	ขนาด (คู่เบส)	ที่มา
<i>Annulohyphoxylon multiforme</i> var. <i>alaskense</i> YMJ 91010201	AY951771	260	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. nitens</i> YMJ 91022108	AY951772	264	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. nitens</i> YMJ 293	AY951773	263	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. squamulosum</i> YMJ 90081905	AY951774	264	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. stygium</i> YMJ 90081906	AY951775	263	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951776	263	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> YMJ 3	AY951777	264	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> YMJ 91042205	AY951778	264	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. thouarsuanum</i> var. <i>macrosporum</i> YMJ 48	AY951779	263	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. thouarsuanum</i> var. <i>macrosporum</i> YMJ 389	AY951780	264	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. truncatum</i> YMJ 19760605	AY951781	263	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. urceolatum</i> YMJ 92090413	AY951782	262	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.

ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin จากฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชนิดของรา	Accession No.	ขนาด (คู่เบส)	ที่มา
<i>Annulohyphoxylon atroroseum</i> YMJ 19720801	DQ840083	1285	Tang, A.M.C.; Jeewon, R.; & Hyde, K.D. 2006.
<i>A. bovei</i> var. <i>microspora</i> YMJ 90081914	AY951654	1596	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. cohaerens</i> YMJ 310	AY951655	1571	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. cohaerens</i> strain F160842	FJ185283	1566	Platas, G.; Collado, J.; & Pelaez, F. 2008.
<i>A. cohaerens</i> strain F119894	FJ185286	1561	Platas, G.; Collado, J.; & Pelaez, F. 2008.

## ตาราง (ต่อ)

ชนิดของรา	Accession No.	ขนาด (คู่เบส)	ที่มา
<i>Annulohyphoxylon elevatidiscus</i> YMJ90080706	AY951656	1534	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. ilanense</i> YMJ 37	AY951657	1537	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. minutellum</i> YMJ 316	AY951658	1546	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. minutellum</i> YMJ 91092302	AY951659	1550	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. moriforme</i> var. <i>microdiscus</i> YMJ 90080807	AY951660	1527	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. multiforme</i> YMJ 317	AY951661	1600	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. multiforme</i> strain F160843	FJ185282	1578	Platas, G.; Collado, J.; & Pelaez, F. 2008.
<i>A. multiforme</i> var. <i>alaskense</i> YMJ 91010201	AY951662	1610	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. nitens</i> YMJ 91022108	AY951663	1593	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. nitens</i> YMJ 293	AY951664	1589	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. squamulosum</i> YMJ 90081905	AY951665		Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. stygium</i> YMJ 90081906	AY951666	1533	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. stygium</i> YMJ 90041409	AY951667	1550	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> YMJ 91042205	AY951668	1554	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. stygium</i> var. <i>annulatum</i> YMJ 3	AY951669	1560	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.
<i>A. urceolatum</i> YMJ 92090413	AY951670	1545	Hsieh, H.-M.; Ju, Y.-M.; & Rogers, J.-D. 2005.



ภาคผนวก จ

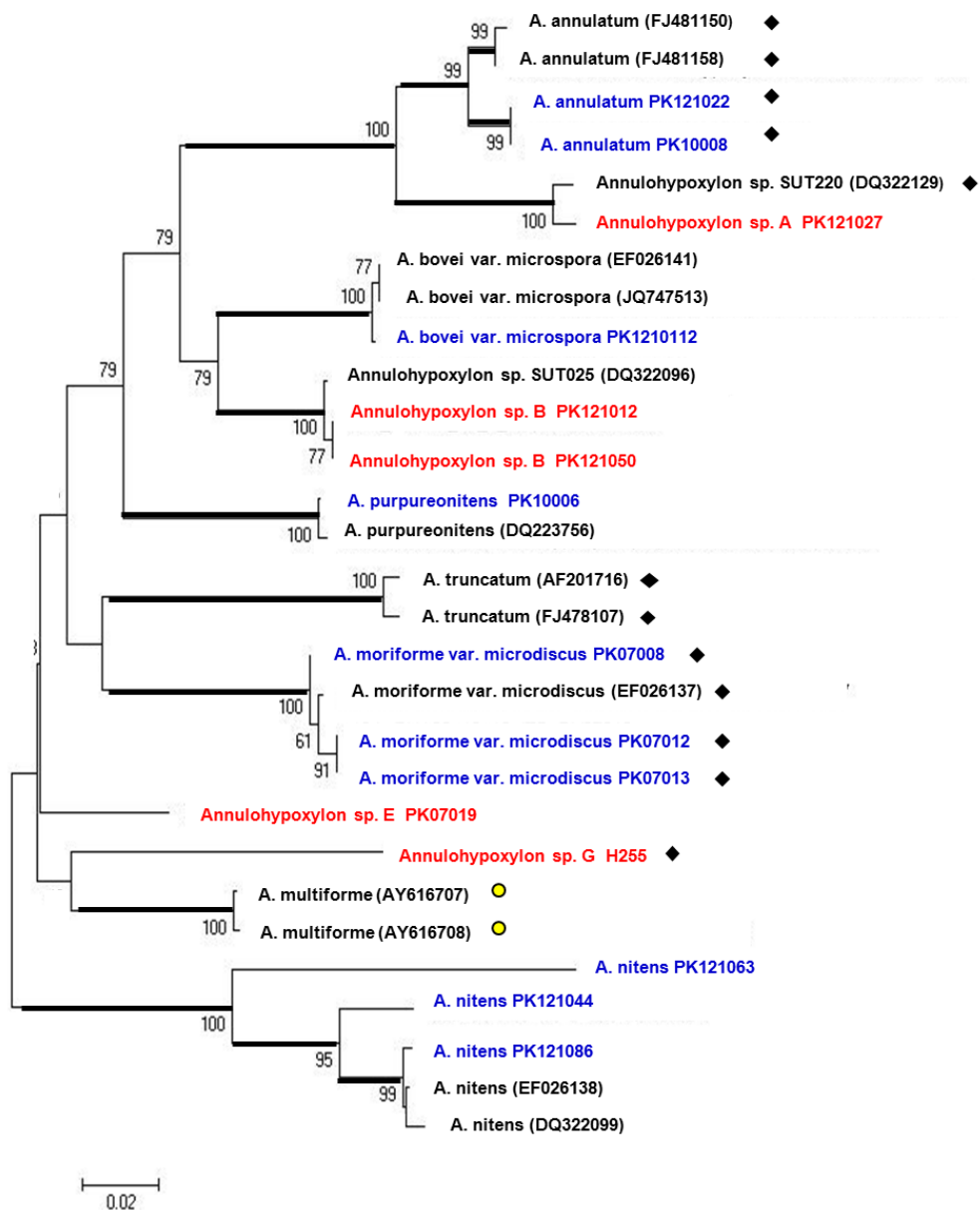
แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์

## ภาคผนวก จ

แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์

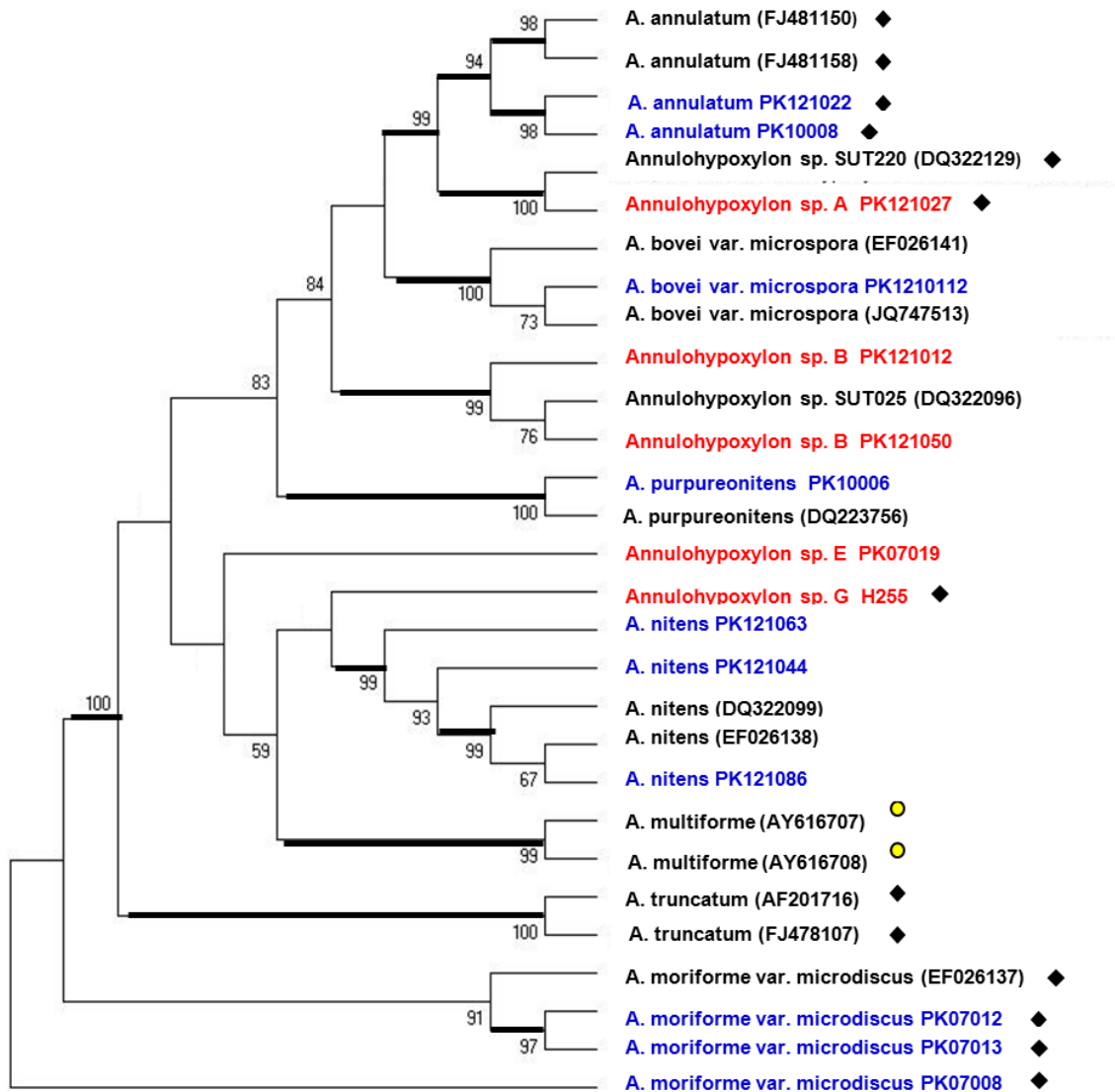
## 1. บริเวณ internal transcribed spacers (ITS)

## 1.1 บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ที่มีความยาวน้อยกว่า 700 คู่เบส



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีขนาด น้อยกว่า 700 คู่เบส ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

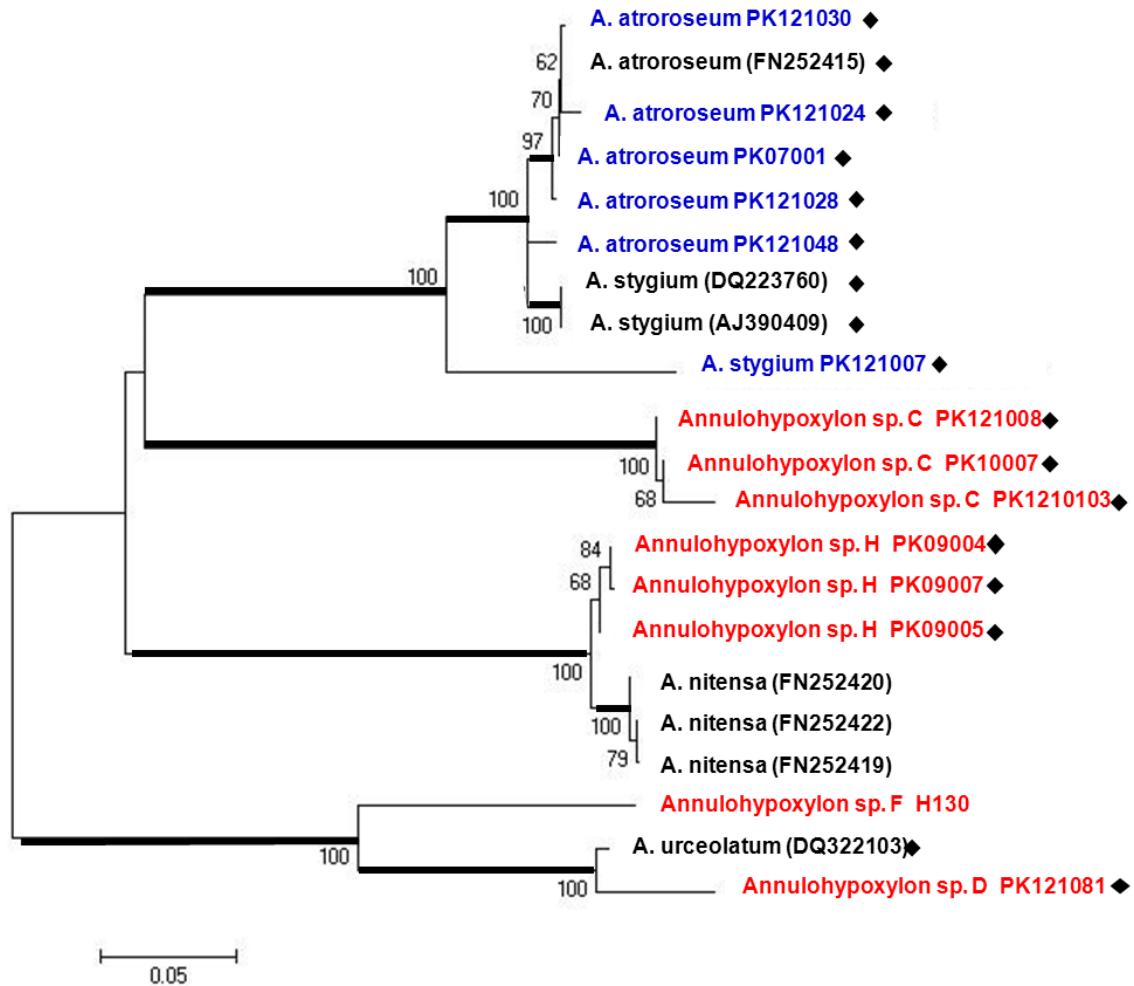
หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ○ คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีขนาด น้อยกว่า 700 คู่เบส ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

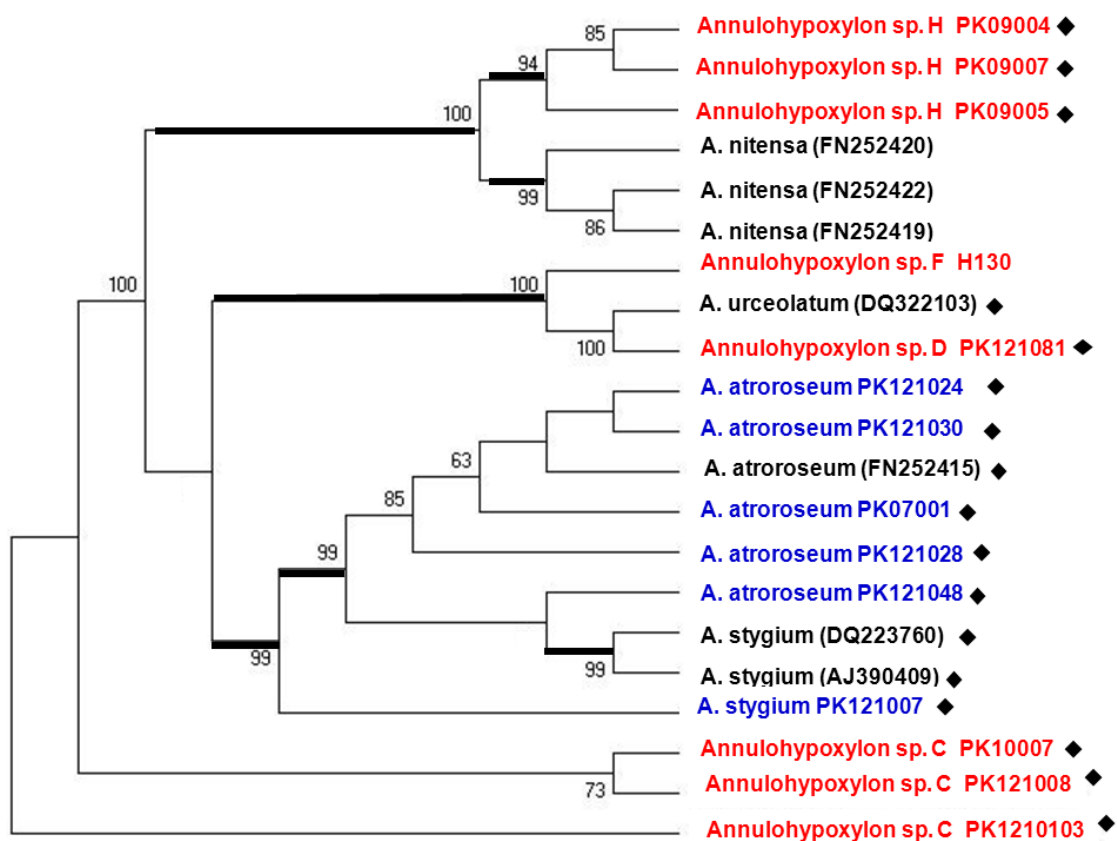
หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ○ คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

1.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ที่มีความยาวมากกว่า 700 คู่เบส



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของรา สกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีขนาดมากกว่า 700 คู่เบส ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือรา ที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

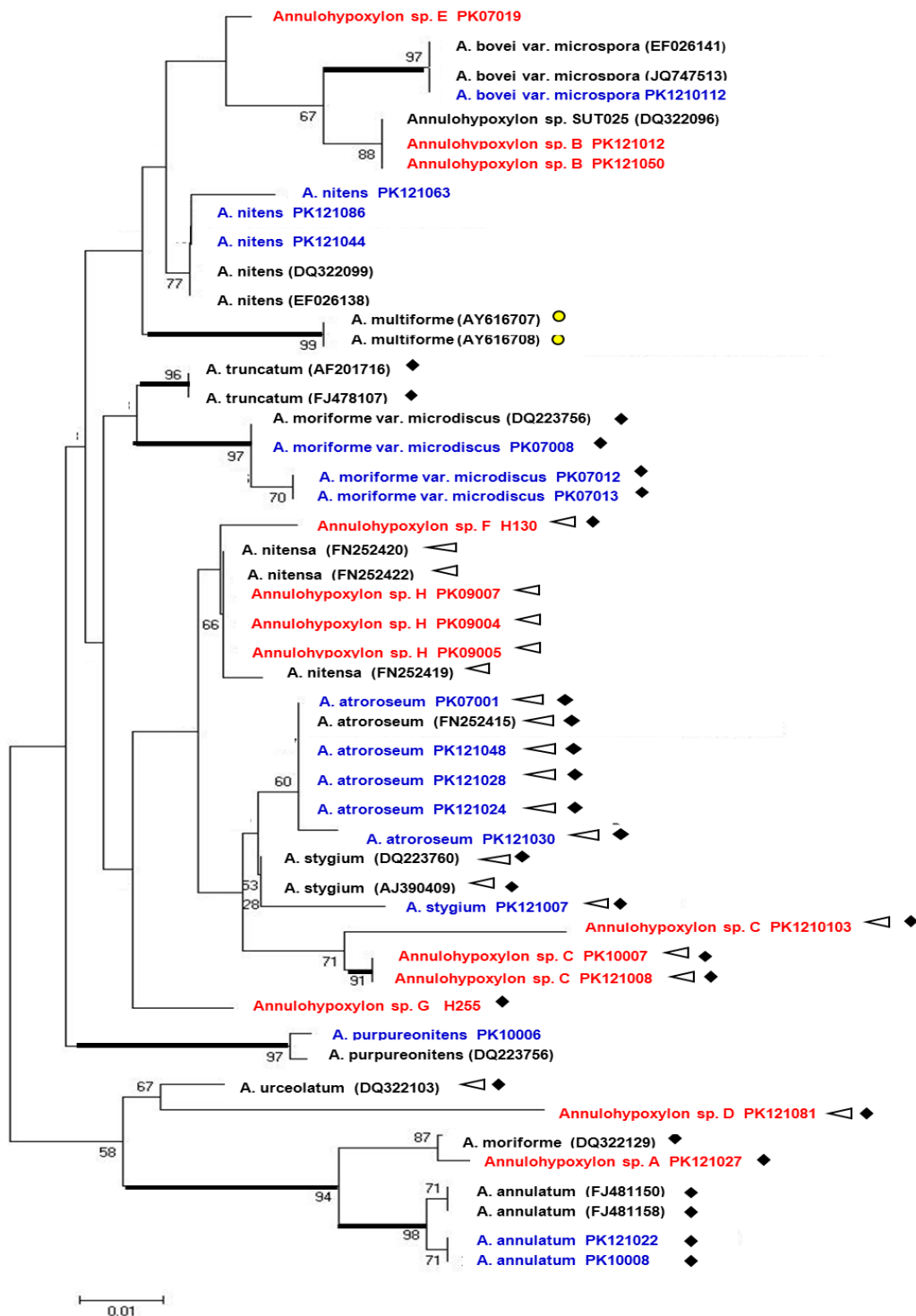


แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของรา สกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของตัวอย่างที่มีขนาดมากกว่า 700 คู่เบส ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือรา ที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

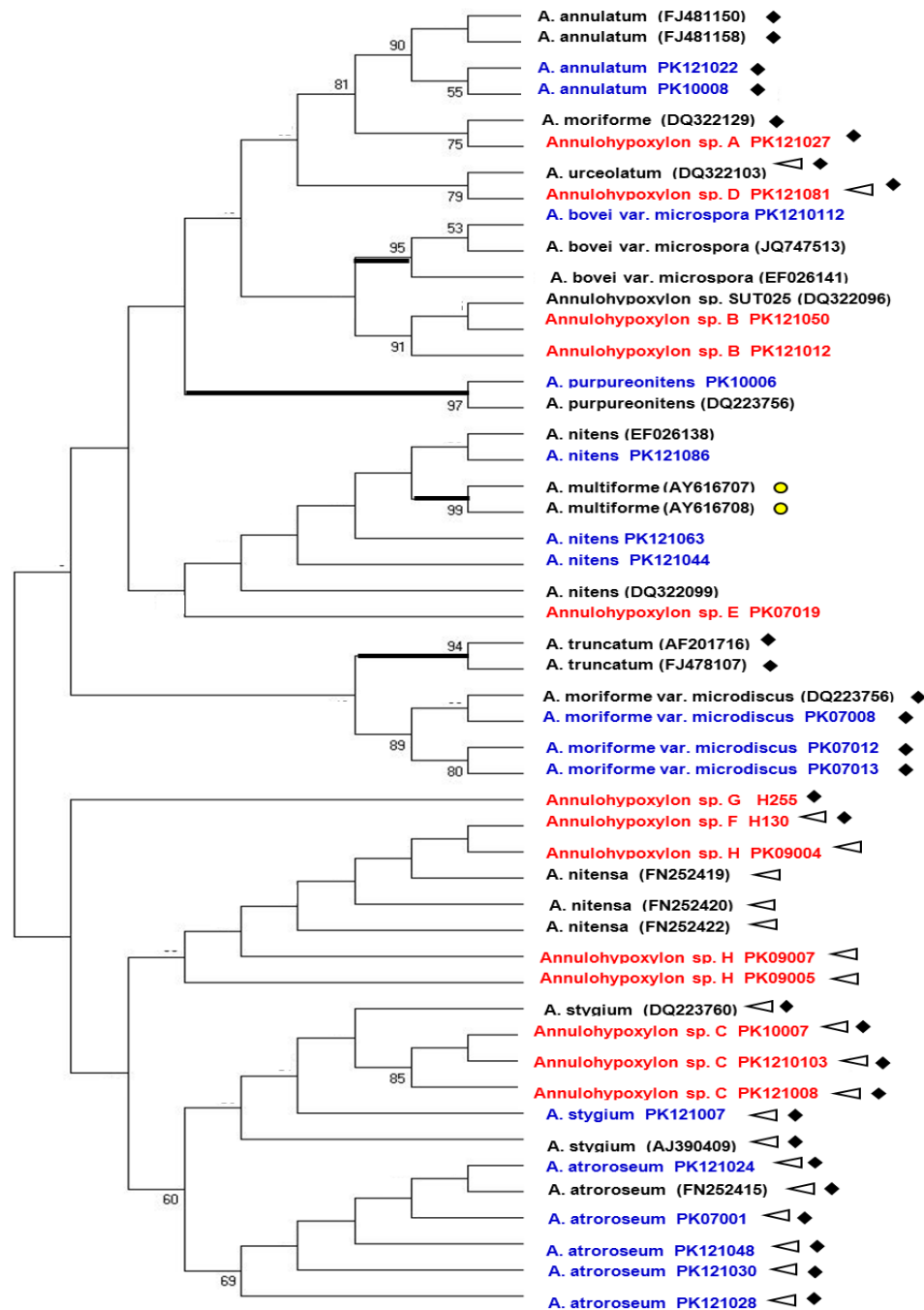


### 1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S-ITS2



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 5.8S และ ITS2 ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000 หัวลูกศรแสดงราที่มีขนาด ITS มากกว่า 700 คู่เบส

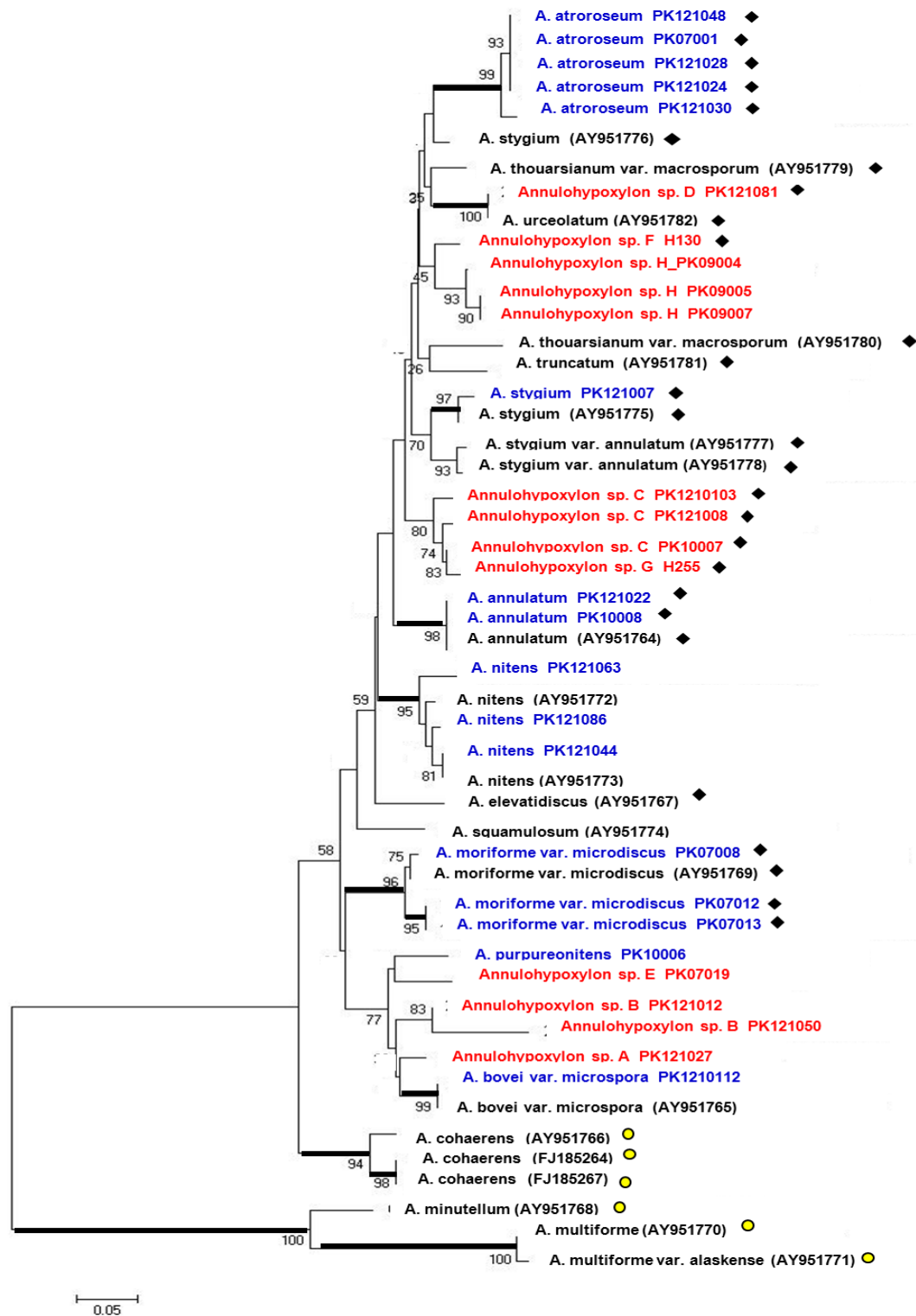
หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ○ คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 5.8S และ ITS2 ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000 หัวลูกศรแสดงราที่มีขนาด ITS มากกว่า 700 คู่เบส

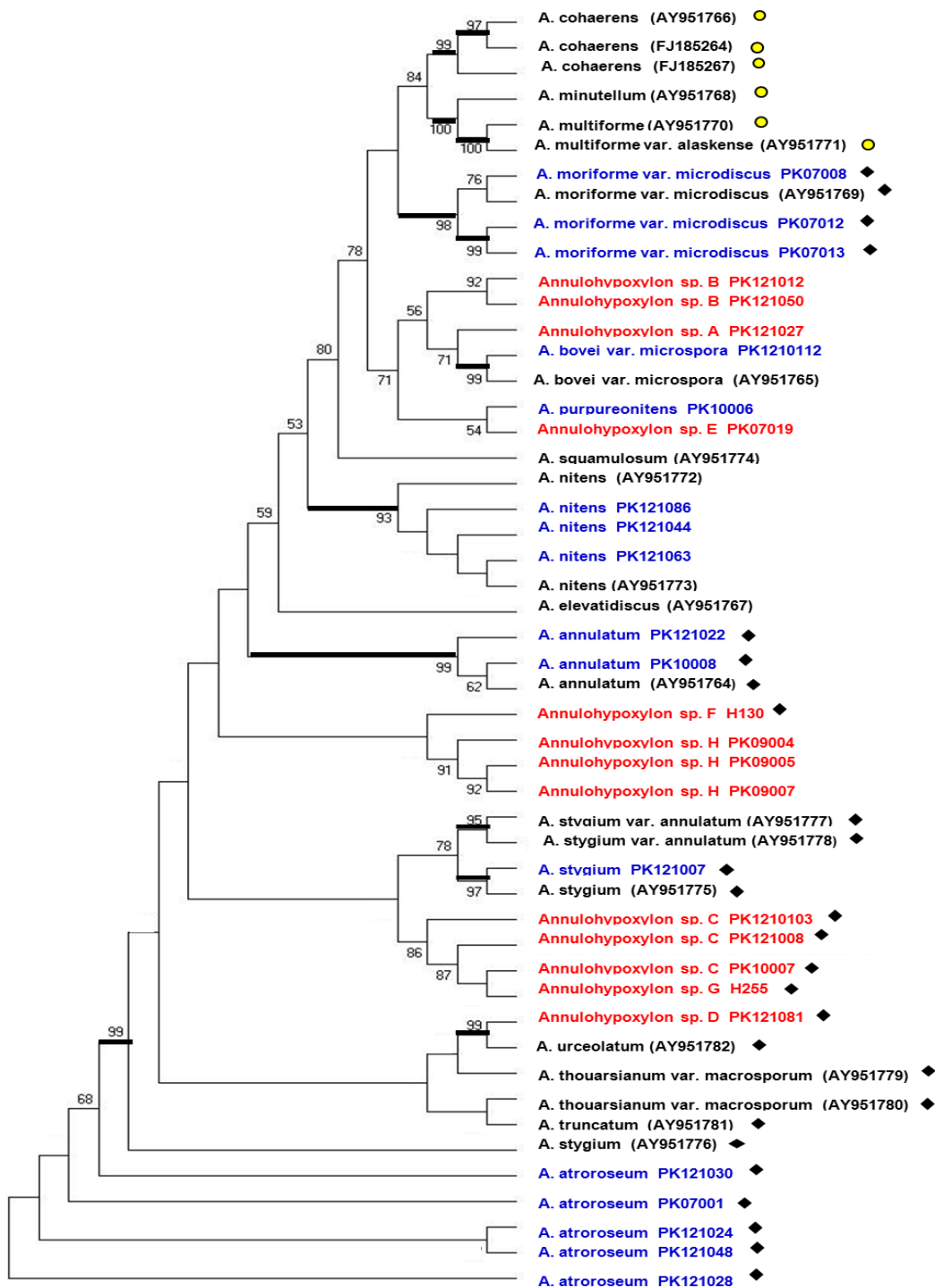
หมายเหตุ: ♦ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ○ คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

## 2. ยีน alpha – actin



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิ วจลีโอไทด์ของยีน alpha-actin ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

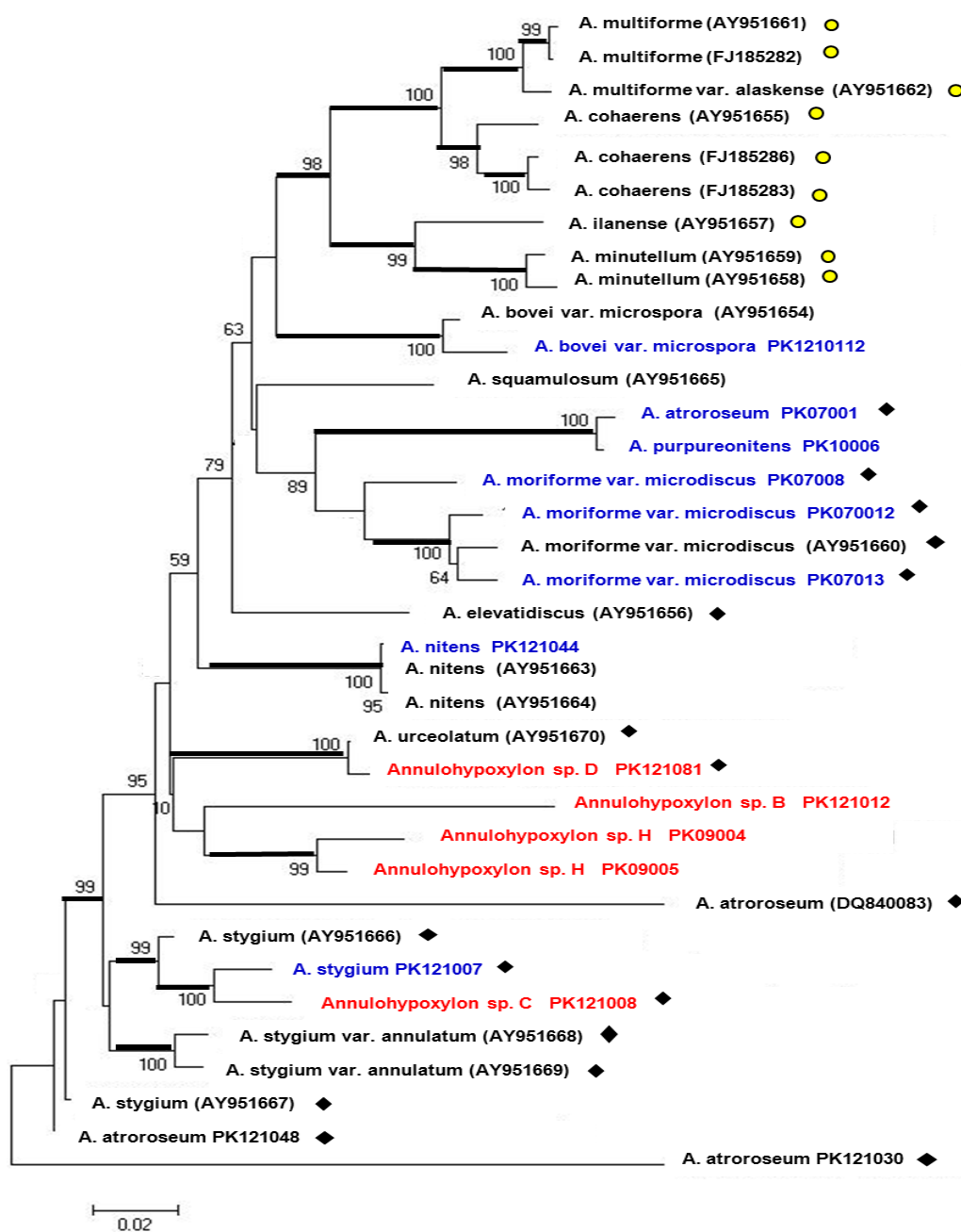
หมายเหตุ: ♦ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ● คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน alpha-actin ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

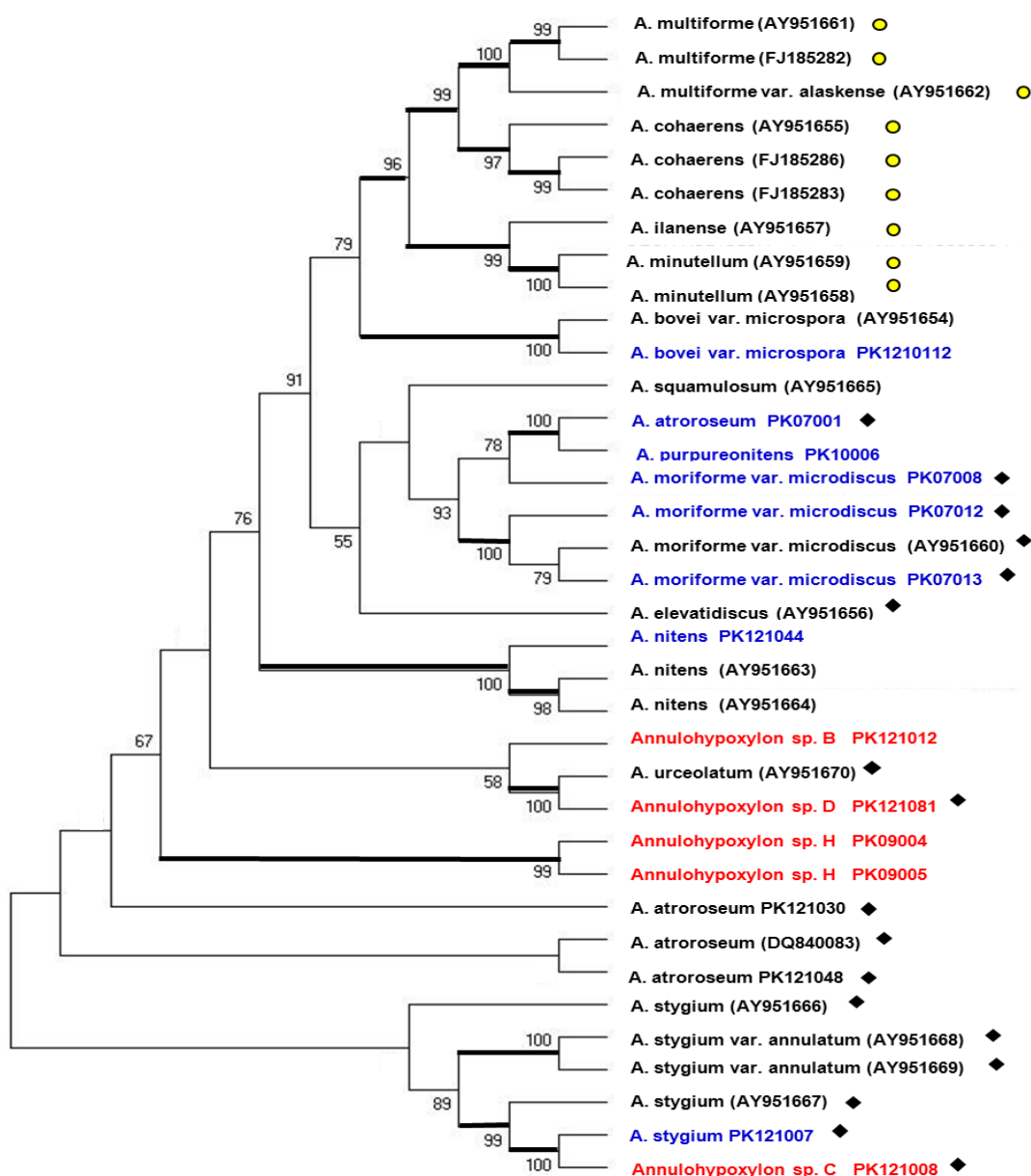
หมายเหตุ: ♦ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ● คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

### 3. ยีน beta – tubulin



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของ ราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

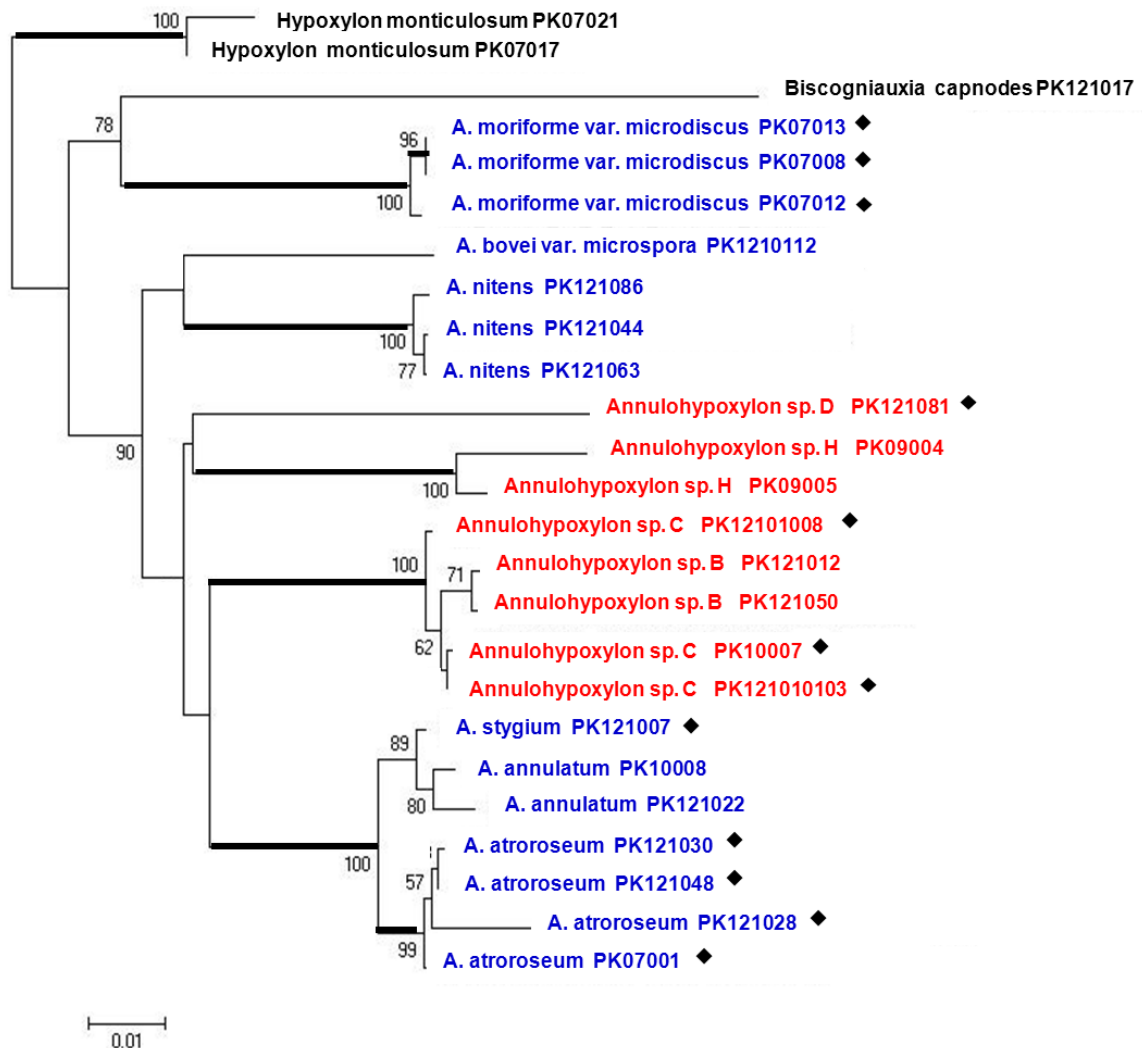
หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ○ คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้



แผนภูมิ วิวัฒนาการต้นไม้ของรา สกุล *Annulohyphoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

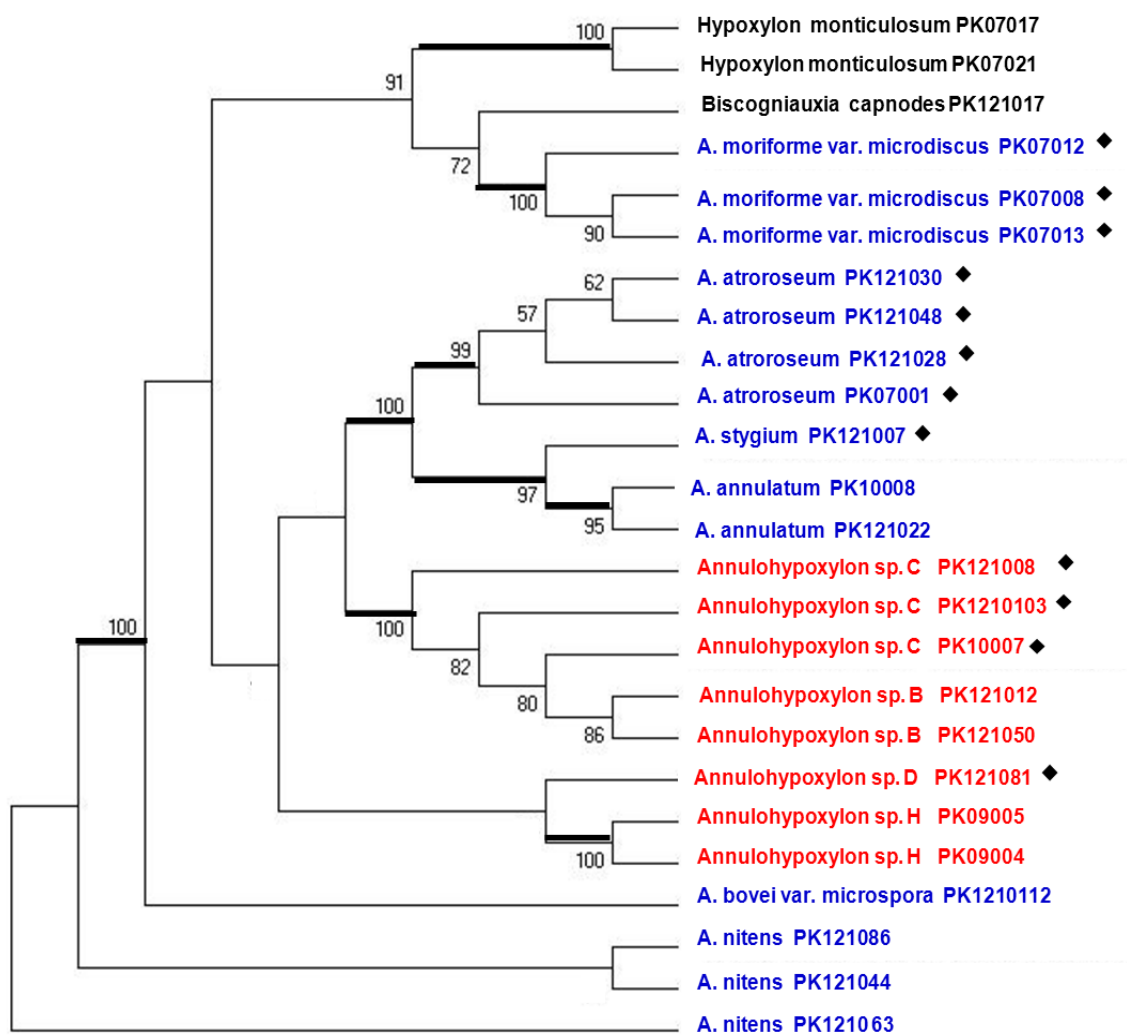
หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ○ คือราที่ไม่มีแผ่นจาน ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

#### 4. ยีน elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ )



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของรา สกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน elongation factor 1-alpha ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือ ราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

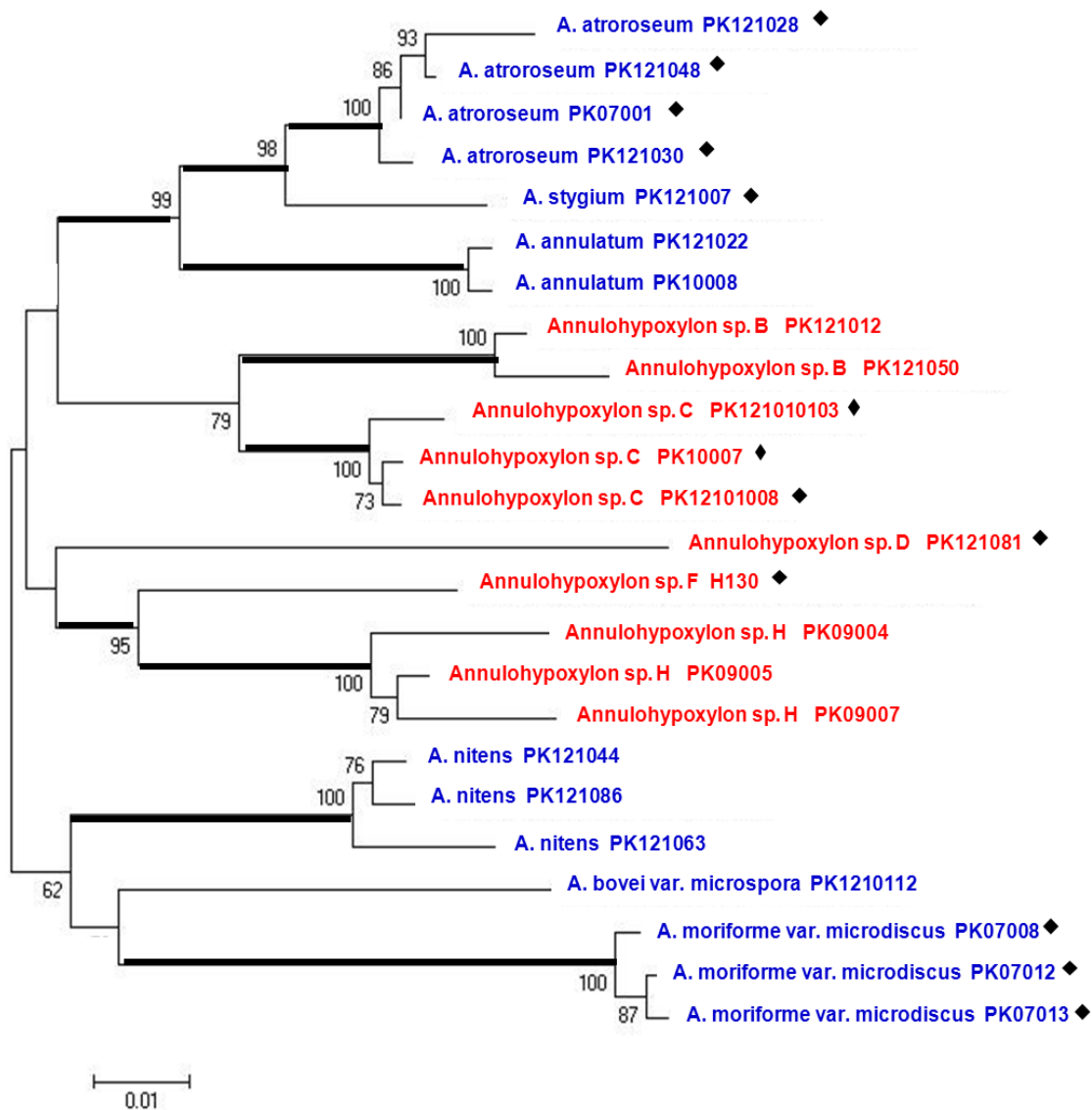


แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของรา สกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน elongation factor 1-alpha ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนราที่ไม่มีเครื่องหมายคือ ราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

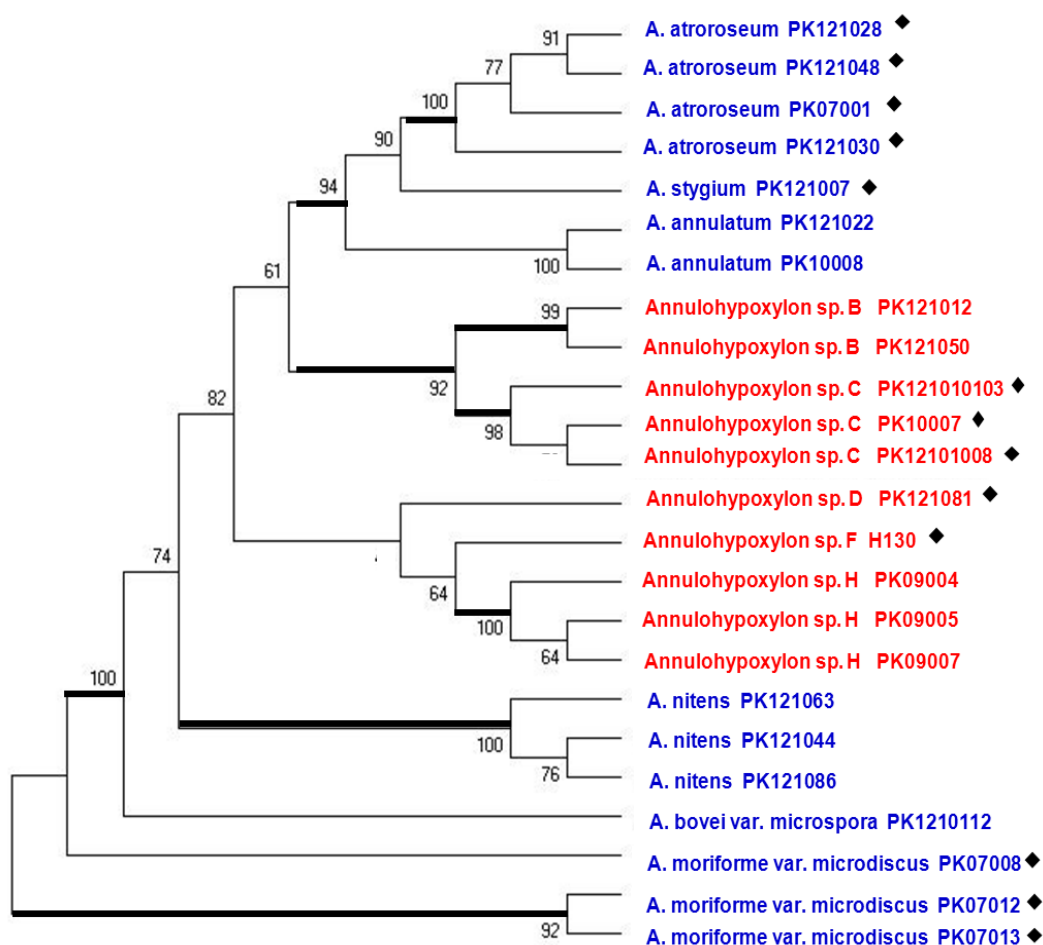


5. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 3 บริเวณ คือ บริเวณ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และ elongation factor 1-alpha (EF1-  $\alpha$ )



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิว คลีโอไทด์ ร่วมกันของบริเวณ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และยีน elongation factor 1-alpha ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนที่ไม่มีเครื่องหมายคือ ราที่มีแผ่นจาน แบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้



แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ร่วมกันของบริเวณ 5.8S-ITS2 ยีน alpha-actin และยีน elongation factor 1-alpha ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ◆ คือราที่มีแผ่นจานแบบ *truncatum*-type ส่วนที่ไม่มีเครื่องหมายคือ ราที่มีแผ่นจานแบบ *bovei*-type; ตัวอักษรสีน้ำเงิน คือ ราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และสีแดง คือ ราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

ภาคผนวก จ  
หมายเลขที่ใช้ในการเทียบเคียงจากแผ่นสีมาตรฐานของ Rayner. 1970



## ภาคผนวก จ

หมายเลขสีที่ใช้ในการเทียบเคียงจากแผ่นสีมาตรฐานของ Rayner. 1970

ตารางแสดงหมายเลขสีที่ใช้ในการเทียบเคียงจากแผ่นสีมาตรฐานของ Rayner. 1970

หมายเลข	สี
7	แดงส้ม (red orange)
21	เขียวเข้ม (dark green)
48	มะกอก (olivaceous)
56	แดงซีด (livid red)
57	แดงเหล้าองุ่น (vinaceous)
64	เหลืองน้ำผึ้ง (honey)
65	น้ำตาลแกมเหลืองซีด (dilute isabelline)
67	เขียวมะนาว (citrine green)
70	เขียวหม่น (dull green)
84	น้ำตาลแดงเข้ม (dark brown vinaceous)
88	น้ำตาลเหลือง (hazel)
89	น้ำตาลแกมเหลืองมะกอก (olivaceous buff)
90	เขียวมะกอก (greenish olivaceous)
101	ม่วงแดง (vinaceous purple)
116	เทาอมม่วง (vinaceous gray)



ประวัตย่อผู้วิจัย

## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ - ชื่อสกุล	นางสาวมลลิกา มะกรวัฒน์นะ
วันเดือนปี เกิด	7 กันยายน 2532
สถานที่เกิด	นครปฐม
สถานที่อยู่	บ้านเลขที่ 13 (59/45) ซอยรามอินทรา 5 แยก 3 ถนนรามอินทรา แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน จังหวัดกรุงเทพฯ 10220
ตำแหน่งหน้าที่ การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงาน	<p>Manlika Makornwattana, Cherdchai Phosri, Anthony J.S. Whalley, Onanong Pringsulaka and Nuttika Suwannasai. (2012). ITS and alpha-actin sequence analysis of some complex species in <i>Annulohypoxyton</i> from Thailand. Proceedings In: International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. 4-6 October 2012. At Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. (poster presentation)</p> <p>Manlika Makornwattana, Cherdchai Phosri, Nutthaporn Ruchikachorns, Anthony J.S. Whalley and Nuttika Suwannasai. (2013). <i>Annulohypoxyton</i> species complex in northeast Thailand. Asian Mycological Congress 2013 &amp; the 13<sup>th</sup> International Marine and Freshwater Mycology Symposia (AMC2013). 19-24 August 2013. At China National Convention Center (CNCC), Beijing, China. (poster presentation)</p> <p>Manlika Makornwattana, Nuttika Suwannasai, Cherdchai Phosri and Anthony J.S. Whalley. (2013). Problem species in the Genus <i>Annulohypoxyton</i> (Xylariaceae).</p>

ผลงาน (ต่อ)	Proceedings In: International Graduate Research Conference 2013 (IGRC2013). 20 December 2013. At The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. (oral presentation)
ทุนและรางวัลที่ได้รับ ระหว่างการศึกษา	ทุนบัณฑิตวิทยาลัย เงินอุดหนุนการไปเข้าร่วมประชุมและ เสนอผลงานของนิสิตบัณฑิตศึกษา (ทุนรหัส GRAD S-3- 56) ในต่างประเทศ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556  รางวัล An Excellent Oral Presentation สาขา Science and Technology งาน International Graduate Research Conference 2013 (IGRC2013)
ประวัติการศึกษา	<p data-bbox="347 996 478 1037">พ.ศ. 2549</p> <p data-bbox="719 996 1406 1167">ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนมัธยมสาธิตวัดพระศรีมหาธาตุ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร จังหวัดกรุงเทพฯ</p> <p data-bbox="347 1182 478 1223">พ.ศ. 2553</p> <p data-bbox="719 1182 1406 1285">วท.บ. (จุลชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ</p> <p data-bbox="347 1301 478 1341">พ.ศ. 2556</p> <p data-bbox="719 1301 1406 1404">วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ</p>