



# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

ของลิเวอร์เวิร์ตสกุลมาสติโกลีจูเนีย

(Molecular phylogeny of liverwort genus *Mastigolejeunea*)

ผศ.ดร.เพียงพัทธ์ร์ สุขรัชช์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

รหัสโครงการ 2559A10802096

สัญญาเลขที่ 95/2559

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

ของลิเวอร์เวิร์ตสกุลมาสติโกลีจูเนีย

(Molecular phylogeny of liverwort genus *Mastigolejeunea*)

ผศ.ดร.เพียงพัทธ์ สุขรักษ์

มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Prof. Dr. Frank H. Hellwig จาก The Institute of Systematic Botany of Friedrich Schiller University เมืองเยนา ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ที่อนุญาตให้ดำเนินการสกัด ดีเอ็นเอ, พีซีอาร์ และวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ห้องปฏิบัติการของ The Institute of Systematic Botany of Friedrich Schiller University เมืองเยนา ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

ขอขอบคุณ Dr. Jörn Hentschel จาก Herbarium Haussknecht, Friedrich Schiller University เมืองเยนา ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ที่ประสานงานและอำนวยความสะดวกตลอดการดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ, พีซีอาร์ และวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ห้องปฏิบัติการของ The Institute of Systematic Botany of Friedrich Schiller University เมืองเยนา ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

ขอขอบคุณ ภัณฑารักษ์ พิพิธภัณฑ์พืช Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany (JE), The Herbarium Göttingen (GOET), Royal Botanical Garden Edinburgh, UK (E), Eszterhazy Karoly University of Applied Sciences, Hungary (EGR), Hattori Botanical Laboratory, Japan (NICH), Muséum National d'Histoire Naturelle, France (PC) ที่อนุญาตให้ใช้ตัวอย่างลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชดังกล่าว มาศึกษาในระดับโมเลกุลได้ และขอขอบคุณ Dr. Frank Müller จาก Institute of Botany, Technische Universität Dresden ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี สำหรับตัวอย่างสดลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea*

ขอขอบคุณ Dr. Marc Appelhans จาก The Herbarium Göttingen (GOET) ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภู กุตะนันท์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ อาจารย์ ดร.เอกพันธ์ ไกรจักร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 95/2559

## บทคัดย่อ

สกุล *Mastigolejeunea* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับสกุล *Thysananthus* และการแยกกันของทั้งสองสกุลเป็นที่ถกเถียงมาโดยตลอด ความสัมพันธ์ระหว่างสกุล *Mastigolejeunea* และสกุล *Thysananthus* ได้รับการประเมินโดยวิธีการวิเคราะห์แบบ Bayesian inference และ maximum likelihood ของเครื่องหมายทางดีเอ็นเอ *psbA-trnH*, *trnG* และ *trnL-F* ในคลอโรพลาสต์และ ITS ในนิวเคลียส สกุล *Mastigolejeunea* มีความสัมพันธ์เป็นพี่น้องกับสกุล *Thysananthus* ด้วยค่าสนับสนุนระดับกลาง แต่ *M. calcarata* อยู่ภายในเคลดของ *Thysananthus* หมู่อย่อย *Anguiformes* และ *M. florea* อยู่ภายในเคลดของสกุล *Spruceanthus* ดังนั้น *M. florea* จึงถูกย้ายไปเป็นสมาชิกของสกุล *Spruceanthus* และเนื่องจากไม่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถแยกสกุล *Mastigolejeunea* ออกจากสกุล *Thysananthus* ได้ สกุล *Mastigolejeunea* จึงถูกลดระดับให้เป็นสกุลย่อยของสกุล *Thysananthus* ทำให้สกุล *Thysananthus* เป็นสกุลที่มีจำนวนสมาชิกมากเป็นอันดับสองของวงศ์ Lejeuneaceae วงศ์ย่อย Ptychanthoideae โดยมีสมาชิกทั้งหมด 30 ชนิด และเป็นหนึ่งในสกุลที่มีจำนวนสมาชิกจำนวนมากที่ได้รับการศึกษาทบทวนในระดับโลก

**คำสำคัญ:** การจัดจำแนก, ลิเวอร์เวิร์ต, ลักษณะทางสัณฐานวิทยา, ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล, *Mastigolejeunea calcarata*, *Mastigolejeunea florea*, Ptychanthoideae, *Thysananthus* สกุลย่อย *Mastigolejeunea*

## Abstract

*Mastigolejeunea* is morphologically close to *Thysananthus* and the separation of these two genera has long been controversial. The relationship between *Mastigolejeunea* and *Thysananthus* is assessed based on Bayesian inference and maximum likelihood analyses of plastid *psbA-trnH*, *trnG* and *trnL-F*, and nuclear ITS. *Mastigolejeunea* was resolved as sister to *Thysananthus* with moderate support, but *M. calcarata* was nested in *Thysananthus* subsect. *Anguiformes* and *M. florea* was resolved in *Spruceanthus*. Therefore, *M. florea* is transferred to be a member of *Spruceanthus* and because diagnostic morphological features separating *Mastigolejeunea* from *Thysananthus* are lacking, *Mastigolejeunea* is treated as a subgenus of *Thysananthus*. The latter group becomes the second largest genus of Lejeuneaceae subfam. Ptychanthoideae with 30 species, and is one of the largest genera of liverworts that has been monographed worldwide.

**Keywords:** classification; liverworts; *Mastigolejeunea calcarata*; *Mastigolejeunea florea*; morphology; molecular phylogeny; Ptychanthoideae; *Thysananthus* subg. *Mastigolejeunea*

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ผลการวิจัย.....	5
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	7
ผลผลิต.....	16
รายงานการเงิน.....	20
บรรณานุกรม.....	22
ประวัติผู้วิจัย.....	25

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 <i>Mastigolejeunea repleta</i> (Taylor) A.Evans ในภาคสนาม.....	3
2 Majority consensus tree จากวิธีการวิเคราะห์แบบ Bayesian inference analysis.....	6
3 บรรยายพิเศษในฐานะวิทยากรรับเชิญ ในการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9”..	18
4 นำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์อิเล็กทรอนิกส์ (e-poster) ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “XIX International Botanical Congress 2017”.....	18
5 แบบตอบรับการนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 17 <sup>th</sup> Flora of Thailand Conference” .....	19

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของลิเวอร์เวิร์ตสกุลมาสทิกอัสเจเนีย  
(Molecular phylogeny of liverwort genus *Mastigolejeunea*)

บทนำ

ไบรโอไฟต์ (Bryophytes) เป็นกลุ่มพืชที่ไม่มีเนื้อเยื่อลำเลียงและไม่มีดอก มีไรซอยด์ (rhizoid) ทำหน้าที่ยึดเกาะกับพื้นผิว ไบรโอไฟต์มีวัฏจักรชีวิตแบบสลับ (alternation of generation) ประกอบด้วย

1. ระยะเวลาแกมีโตไฟต์ (gametophyte) เป็นระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) เป็นระยะเด่นพบเห็นได้ทั่วไป

2. ระยะเวลาสปอร์โรไฟต์ (sporophyte) เป็นระยะที่มีการสร้างสปอร์ (spore) ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่

1. อับสปอร์ (capsule)
2. ก้านชูอับสปอร์ (seta)
3. พุต (foot) ทำหน้าที่ยึดเกาะระยะแกมีโตไฟต์

ไบรโอไฟต์ ประกอบด้วยพืช 3 กลุ่ม คือ มอสส์ (mosses) ลิเวอร์เวิร์ต (liverworts) และฮอร์นเวิร์ต (hornworts) ทั่วโลกมีไบรโอไฟต์ประมาณ 17,900 ชนิด โดยเป็นมอสส์ประมาณ 2,500 ชนิด ลิเวอร์เวิร์ตประมาณ 5,250 ชนิด และฮอร์นเวิร์ตประมาณ 100-500 ชนิด (Frey & Stech, 2009) สำหรับประเทศไทยพบไบรโอไฟต์ 1,101 ชนิด (มอสส์ 708 ชนิด ลิเวอร์เวิร์ต 380 ชนิด ฮอร์นเวิร์ต 13 ชนิด) (Lai et al., 2008; He, Internet resource; Sukkharak & Chantanaorrapint, 2014)

ระยะเวลาแกมีโตไฟต์ของฮอร์นเวิร์ต มีลักษณะเป็นแผ่นแบน ทอดนอนขนานกับพื้นผิว ระยะเวลาสปอร์โรไฟต์ประกอบด้วย พุต และอับสปอร์ซึ่งมีลักษณะเรียวยาว แตกแบบ 2 แฉก โดยแตกจากบนลงล่าง มีอีเลเตอร์ (elater) ช่วยในการกระจายสปอร์ ไม่มีก้านชูอับสปอร์

ระยะเวลาแกมีโตไฟต์ของมอสส์ ประกอบด้วยลำต้นและใบ โดยใบเรียงแบบเวียน (spiral) รอบลำต้น ระยะเวลาสปอร์โรไฟต์ประกอบด้วย พุต ก้านชู และอับสปอร์ซึ่งมีรูปร่างคล้ายผอบ มีโอเพอคูลัม (operculum) ซึ่งมีลักษณะคล้ายฝาปิด ปกคลุมอับสปอร์อยู่ มีเพอริสโตม (peristome) ช่วยในการกระจายสปอร์

สำหรับลิเวอร์เวิร์ต หากพิจารณาลักษณะระยะแกมีโตไฟต์ แบ่งลิเวอร์เวิร์ตเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. ลีฟี่ ลิเวอร์เวิร์ต (leafy liverwort) ระยะเวลาแกมีโตไฟต์ ประกอบด้วยลำต้นและใบ โดยใบเรียงออกจากลำต้น 3 ทิศทาง คือ ใบที่อยู่ด้านข้าง (lateral leaf) เรียง 2 ทิศทาง และใบที่อยู่ด้านล่าง (underleaf) เรียง 1 ทิศทาง นอกจากนี้ ใบที่อยู่ด้านข้างของสมาชิกวงศ์ Frullaniaceae, Lejeuneaceae และ Pleuroziaceae แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีลักษณะเป็นแผ่นแบนใหญ่ เรียกว่า โลบ (lobe) และส่วนที่มีขนาดเล็ก มีลักษณะคล้ายถุง เรียกว่า โลบูล (lobule) พบหยดน้ำมันในเซลล์ของใบที่อยู่ด้านข้างและใบที่อยู่ด้านล่าง ระยะเวลาสปอร์โรไฟต์ประกอบด้วย พุต ก้านชู และอับสปอร์ซึ่งมีลักษณะกลม แตกแบบ 4 แฉก มีอีเลเตอร์ (elater) ช่วยในการกระจายสปอร์

2. ทัลดอย ลิเวอร์เวิร์ต (thalloid liverwort) ระยะแกมีโตไฟต์มีลักษณะเป็นแผ่นแบน ทอดนอน ขนานกับพื้นผิว ระยะสปอโรไฟต์เช่นเดียวกับลิฟฟี ลิเวอร์เวิร์ต

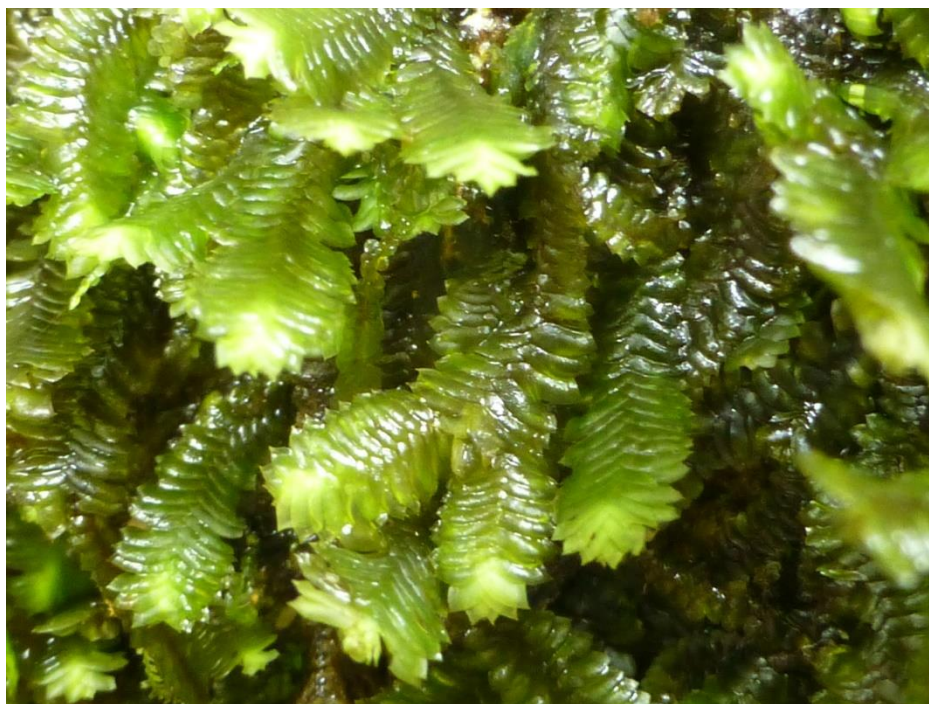
ลิเวอร์เวิร์ตสกุลมาสทิกอเลจูนีเย (*Mastigolejeunea* (Spruce) Steph.) เป็นลิฟฟี ลิเวอร์เวิร์ตที่มีสมาชิกทั้งหมด 18 ชนิด ประกอบด้วยชนิดที่พบได้ในปัจจุบัน 16 ชนิด และฟอสซิล 2 ชนิด (Sukkharak & Gradstein, 2014) ลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกับลิเวอร์เวิร์ตสกุลไทซานานthus (*Thysananthus* Lindenb.) และความแตกต่างระหว่างสองสกุลนี้เป็นที่ถกเถียงมาโดยตลอด

สกุล *Mastigolejeunea* และสกุล *Mastigolejeunea* เป็นลิเวอร์เวิร์ตที่พบทั่วไปในเขตร้อนทั่วโลก เป็นสมาชิกของวงศ์ Lejeuneaceae ซึ่งเป็นวงศ์ที่มีสมาชิกมากที่สุดของลิเวอร์เวิร์ต โดยมีสมาชิกจำนวน 74 สกุล (Gradstein, 2013; Shi et al., 2015; Bechteler et al., 2016; Gradstein et al., 2016; Wang et al., 2016) สกุล *Mastigolejeunea* ถูกตั้งชื่อขึ้นครั้งแรกโดย Spruce (1884) โดยเป็นสกุลย่อยของสกุล *Lejeunea* Lib. และได้รับการยกระดับให้เป็นสกุลโดย Stephani (1891) สกุล *Mastigolejeunea* มีลักษณะดังนี้: (1) *Lejeunea*-type branches, flagelliform branches often present at stem bases; (2) dorsal epidermal cells larger and thinner-walled than the medullary and ventral epidermal cells (not enlarged in *M. florea* (Mitt.) Paris and *M. gradsteinii* Sukkharak); (3) ventral merophyte 5–11 cell rows wide; (4) leaves when dry suberect-convolute and often laterally appressed to the stem, when moist obliquely to widely spreading, convex, entire-margined; (5) absence of vitta; (6) lobules with 0–4 teeth; (7) elongate leaf cells with cordate and coalesced trigones, intermediate thickenings 0–1 between two adjacent trigones; (8) segmented oil bodies; (9) absence of ocelli; (10) undivided underleaves with entire margins and free underleaf bases; (11) hypostatic or epistatic androecial bracts with two antheridia per bract; (12) gynoecia with 1–2 lejeuneoid innovations, gynoecial bracts and bracteoles with entire margins; (13) perianths 3-keeled, sometimes becoming 5–11-plicate by supplementary folds, keels and folds smooth; (14) sporophyte foot of 5–8 transverse rings of cells; (15) elongated seta not articulate; (16) 72–82 elaters per capsule (18–22 per valve); (17) absence of specialized devices for asexual reproduction (Sukkharak & Gradstein, 2014) โดยลักษณะดังกล่าวส่วนใหญ่สามารถพบได้ในสกุล *Thysananthus* ซึ่งถูกตั้งชื่อขึ้นครั้งแรกในปี 1844 มีสมาชิกจำนวน 15 ชนิด (Sukkharak, 2015) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการแยกแยะระหว่างสองสกุลนี้มีปัญหามาอย่างยาวนาน (Sukkharak & Gradstein, 2014).

เดิมสกุล *Thysananthus* แยกกับสกุล *Mastigolejeunea* โดย toothed female involucre และ not-enlarged epidermal cells นอกจากนี้ Sukkharak & Gradstein (2010) พบว่า underleaf bases ของสกุล *Thysananthus* เป็นแบบ adnate underleaves คือ เชื่อมต่อกับ leaves ในขณะที่ underleaf bases ของสกุล *Mastigolejeunea* เป็นแบบ free underleaves คือ เป็นอิสระ ไม่เชื่อมต่อกับ leaves

อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างดังกล่าวไม่เสถียรและพบ taxa ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ก้ำกึ่งกันระหว่างสองสกุล เช่น enlarged dorsal epidermal cells พบใน *T. anguiformis* (Hook.f & Taylor) Gottsche, Lindenb. & Nees, *T. ciliaris* (Sande Lac.) Sukkharak และ *T. pancheri* (Steph.) Hürle. ในขณะที่ undifferentiated epidermal cells พบใน *M. florea* และ *M. gradsteinii* นอกจากนี้ entire female involucre พบใน *T. anguiformis* และ *T. pancheri* ในขณะที่ adnate underleaves พบใน *M. calcarata* (Steph.) Verd. และ untoothed perianths พบใน *T. montanus* Gradst., Xiao L.He & Piippo (Sukkharak & Gradstein, 2014; Sukkharak, 2015).

แม้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ก้ำกึ่งกัน แต่จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล พบว่า ทั้งสองสกุลมีบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic) และมีความสัมพันธ์เป็นพี่น้องกัน (sister) ด้วยค่าสนับสนุนระดับดี (Wilson et al., 2007; Sukkharak et al., 2011) อย่างไรก็ตาม ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลที่ผ่านมา ประกอบด้วยสมาชิกทั้งหมดของสกุล *Thysananthus* แต่สมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* มีเพียง 25% ของจำนวนสมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* ทั้งหมดเท่านั้น จึงเกิดการศึกษานี้ขึ้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของสมาชิกสกุล *Mastigolejeunea* ที่ครบถ้วนที่สุดเป็นครั้งแรกโดยใช้เครื่องหมายทางดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของสมาชิกในสกุล *Mastigolejeunea* ตลอดจนความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลระหว่างสกุล *Mastigolejeunea* และสกุล *Thysananthus*



ภาพที่ 1 *Mastigolejeunea repleta* (Taylor) A.Evans ในภาคสนาม

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของสมาชิกสกุล *Mastigolejeunea*
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลระหว่างสกุล *Mastigolejeunea* และสกุล *Thysananthus* เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจสถานะของสกุล *Mastigolejeunea*

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. ศึกษาเอกสาร สํารวจและเก็บตัวอย่าง และคัดเลือกตัวอย่างลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea*

1.1. ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของวงศ์ Lejeuneaceae, วงศ์ย่อย Ptychanthoideae และสกุล *Thysananthus*

1.2. สํารวจและเก็บตัวอย่างลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ใน 2 พื้นที่ ได้แก่

1. เส้นทางศึกษาธรรมชาติบริเวณแคมป์บ้านกร่าง แก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี
2. น้ำตกห้วยยาง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

1.3. คัดเลือกตัวอย่างลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ที่จะนำมาศึกษาจากตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้งที่มีอายุไม่เกิน 10 ปีที่เก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชต่าง ได้แก่ Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany (JE), The Herbarium Göttingen (GOET), Royal Botanical Garden Edinburgh, UK (E), Eszterhazy Karoly University of Applied Sciences, Hungary (EGR), Hattori Botanical Laboratory, Japan (NICH), Muséum National d'Histoire Naturelle, France (PC) โดยเลือก 2-3 กลุ่มประชากรต่อลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* 1 ชนิด เพื่อให้ครอบคลุมความแปรผันทางพันธุกรรมของแต่ละชนิดให้มากที่สุด

1.4. ตรวจสอบความถูกต้องของการระบุชนิด (identification) ของตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากเอกสารการศึกษาทบพบนลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ระดับโลกโดย Sukkharak & Gradstein (2014)

### 2. สกัดดีเอ็นเอ (DNA), พีซีอาร์ (PCR) และวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (Sequencing)

เนื่องจากห้องปฏิบัติการและเครื่องมือสำหรับสกัดดีเอ็นเอและพีซีอาร์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีไม่เพียงพอ ผู้วิจัยจึงได้ติดต่อ Prof. Dr. Frank H. Hellwig จาก The Institute of Systematic Botany of Friedrich Schiller University เมืองเยนา ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี และ Dr. Jörn Henschel จาก Herbarium Haussknecht, Friedrich Schiller University เมืองเยนา ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี เพื่อดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ, พีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* และได้รับการตอบรับให้ดำเนินการได้ ผู้วิจัยจึงจะดำเนินการวิจัยในขั้นตอนดังกล่าว ณ The Institute of Systematic Botany of the Friedrich Schiller University เมืองเยนา ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ระหว่างวันที่ 25 เมษายน พ.ศ. 2559 ถึงวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2559

ส่วนยอดของลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ที่ไม่มีสาหร่าย เชื้อรา ไลเคน หรือสิ่งมีชีวิตอื่นปะปนอยู่ ถูกเลือกใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant Kit (Qiagen, Hilden, Germany) วิธีการสกัดดีเอ็นเออ้างอิงจาก Sukkharak et al. (2011) การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอดำเนินการโดย GATC Biotech AG (Sanger Sequencing, Köln, Germany)

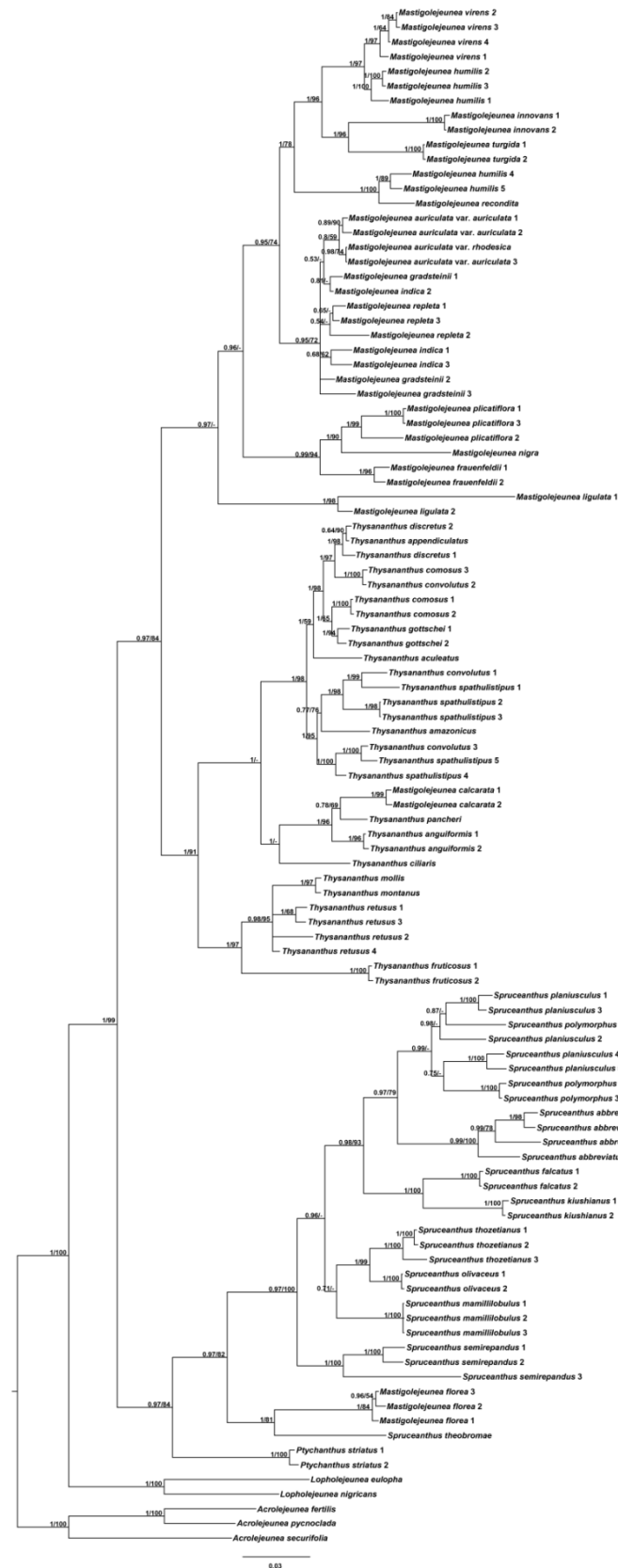
ในการศึกษานี้ ใช้ดีเอ็นเอของลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* จำนวน 15 species (40 ตัวอย่าง โดยมีดีเอ็นเอที่สกัดใหม่จากการศึกษานี้ จำนวน 35 ตัวอย่าง) ลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Thysananthus* จำนวน 15 species (30 ตัวอย่าง) และสมาชิกบางชนิดของสกุล *Acrolejeunea* (Spruce) Schiffn., *Lopholejeunea* (Spruce) Steph., *Ptychanthus* Nees, *Spruceanthus* Verd. ซึ่งเป็นสมาชิกของวงศ์ย่อย Ptychanthoideae เช่นเดียวกับสกุล *Mastigolejeunea* และสกุล *Thysananthus* (Gradstein, 2013) ทั้งนี้ ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอจาก *M. truncata* Mizut. ได้ เนื่องจากไม่มีตัวอย่างสดเพียงพอ โดยกำหนดให้สกุล *Acrolejeunea* เป็น outgroup โดยอ้างอิงจากผลการศึกษาของ Wilson et al. (2007) และ Sukkharak et al. (2011) ตัวอย่างลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* ที่ถูกสกัดดีเอ็นเอใหม่จากการศึกษานี้ เก็บรักษาไว้ ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

### 3. การสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogeny)

เรียงลำดับเบสโดยโปรแกรม BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) และวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Bayesian inference โดยใช้โปรแกรม MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) และวิธีการวิเคราะห์แบบ maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม GARLI version 2.01 (Zwickl, 2006)

### **ผลการวิจัย**

สำหรับการศึกษานี้ ได้ลำดับเบสใหม่บริเวณ *psbA-trnH* จำนวน 35 ลำดับ, *trnG* จำนวน 24 ลำดับ, *trnL-F* จำนวน 31 ลำดับ และ ITS จำนวน 32 ลำดับ เมื่อรวบรวมลำดับเบสในคลอโรพลาสต์มีจำนวนทั้งสิ้น 2816 ตำแหน่ง ประกอบด้วย *psbA-trnH* 231 ตำแหน่ง, *trnG* 722 ตำแหน่ง, *trnL-F* 453 ตำแหน่ง และ ITS 1410 ตำแหน่ง ผลจากวิธีการวิเคราะห์แบบ Bayesian inference และวิธีการวิเคราะห์แบบ maximum likelihood ได้ topologies เหมือนกัน ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 Majority consensus tree จากวิธีการวิเคราะห์แบบ Bayesian inference analysis โดยค่าสนับสนุน Bayesian posterior probability values (PP) และ maximum likelihood bootstrap support values (BS) แสดงบนกิ่ง ตามลำดับ

## อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

### สถานะของสกุล *Mastigolejeunea*

Topology ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ (ภาพที่ 2) สอดคล้องเป็นอย่างดีกับผลของ Sukkharak et al. (2011) ผลที่ได้จากการศึกษานี้ยืนยันว่า สกุล *Mastigolejeunea* มีความสัมพันธ์เป็นพี่น้องกับสกุล *Thysananthus* โดยมีค่าสนับสนุนระดับกลาง และพบว่าสมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* ไม่มีบรรพบุรุษร่วมกัน โดยมี 2 ชนิด คือ *M. calcarata* และ *M. florea* ที่ไม่ได้เป็นสมาชิกของเคลดสกุล *Mastigolejeunea* แต่อยู่ภายในเคลดของสกุล *Thysananthus* และสกุล *Spruceanthus* ตามลำดับ

ตำแหน่งของ *Mastigolejeunea calcarata* อยู่ในเคลดของสกุล *Thysananthus* โดยมีความสัมพันธ์เป็นพี่น้องกับ *T. pancheri* และ *T. anguiformis* (*T. หมู่ย่อย Anguiformes* Sukkharak) ซึ่งเคยถูกนำเสนอมาก่อนโดย Sukkharak & Gradstein (2014) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีร่วมกันระหว่าง *M. calcarata* และสมาชิกของ *T. หมู่ย่อย Anguiformes* คือ adnate underleaves ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในสมาชิกส่วนใหญ่ของสกุล *Thysananthus* แต่ไม่พบในสมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* ตลอดจน enlarged dorsal epidermal cells และ entire female involucre ซึ่งเป็นลักษณะของสมาชิกสกุล *Mastigolejeunea* ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้ยืนยันว่า enlarged dorsal epidermal cells และ entire female involucre ไม่ใช่ลักษณะที่พบเฉพาะในสมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* ดังที่รายงานไว้โดย Sukkharak & Gradstein (2014) จากข้อมูลด้านชีวภูมิศาสตร์ สมาชิกของ *T. หมู่ย่อย Anguiformes* พบเฉพาะในประเทศนิวซีแลนด์และประเทศนิวแคลิโดเนีย ในขณะที่สมาชิกของสกุล *Thysananthus* มีการกระจายพันธุ์ส่วนใหญ่อยู่ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกา (Sukkharak, 2015) ที่น่าสนใจ คือ วิธีการวิเคราะห์แบบ Bayesian inference analysis แสดงให้เห็นว่า *T. ciliaris* ซึ่งเป็นชนิดที่หายากและมีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย เป็นสมาชิกของ *T. หมู่ย่อย Anguiformes* นี้ (ภาพที่ 2) การที่ *T. ciliaris* มี enlarged dorsal epidermis (Sukkharak, 2015) เป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สนับสนุนความสัมพันธ์นี้ และทำให้เห็นว่ากายวิภาคศาสตร์ของลำต้นมีความสำคัญต่อวิวัฒนาการและอนุกรมวิธานของสกุล *Thysananthus* และสกุล *Mastigolejeunea* การย้าย *M. calcarata* ให้เป็นสมาชิกของสกุล *Thysananthus* เป็นอุปสรรคต่อการระบุขอบเขตทางสัณฐานวิทยา ระหว่างสกุล *Mastigolejeunea* และสกุล *Thysananthus* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sukkharak & Gradstein (2014) และ Sukkharak (2015)

### ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการภายในสกุล *Mastigolejeunea*

Schuster (1980) ได้จำแนกสกุล *Mastigolejeunea* เป็น 3 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Antholejeunea* R.M.Schust., สกุลย่อย *Mastigolejeunea* และสกุลย่อย *Trigonolejeunea* R.M.Schust. โดยสกุลย่อย *Antholejeunea* มีลักษณะเด่น คือ lobules with three teeth และมีสมาชิกเพียงชนิดเดียว คือ *M. integrifolia* (Steph.) Verd. (= *M. indica*); สกุลย่อย *Trigonolejeunea* ถูกตั้งขึ้นสำหรับ *M. paradoxa* Verd. (= *Spruceanthus planiusculus* (Mitt.) Shi, Zhu & Gradst.) มีลักษณะ

เด่น คือ reduced female bract-lobule และ broadly rounded ventral perianth keel; และสกุลย่อย *Mastigolejeunea* ประกอบด้วยสมาชิกที่เหลือทั้งหมดของสกุล *Mastigolejeunea* มีลักษณะเด่น คือ well-developed female bract-lobule และ narrow ventral perianth keel โดยสกุลย่อย *Mastigolejeunea* ได้ถูกจำแนกเป็น 2 หมู่ คือ หมู่ *Mastigolejeunea* ประกอบด้วยสมาชิกที่มี triplicate perianths และหมู่ *Nigrae* R.M.Schust. ประกอบด้วยสมาชิกที่มี pluriplicate perianths ต่อมาได้มีการตั้ง หมู่ *Brachiolejeuneoides* (Verd.) Gradst. ขึ้นมาใหม่ สำหรับ *M. recondita* ซึ่งเป็นชนิดที่พบในทวีปเอเชีย มีลักษณะเด่น คือ มี orbicular leaves, pluriplicate perianths และ hyalodermis

ปัจจุบัน *Mastigolejeunea* สกุลย่อย *Trigonolejeunea* ถูกย้ายไปเป็นสมาชิกของสกุล *Spruceanthus* ในขณะที่สมาชิกของสกุลย่อย *Antholejeunea* และสกุลย่อย *Mastigolejeunea* ยังคงเป็นสมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* ดังเช่นรายงานไว้โดย Sukkharak & Gradstein (2014) การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า สมาชิกของหมู่ *Nigrae* มีบรรพบุรุษร่วมกัน ประกอบด้วย 3 ชนิด คือ *M. frauenfeldii*, *M. nigra* และ *M. plicatiflora* โดยมีลักษณะเด่น คือ elongate leaves, epistatic male bracts (ยกเว้น *M. plicatiflora*) และ pluriplicate perianths ส่วนอีก 2 taxa ที่เป็นสมาชิกของหมู่ *Nigrae* คือ *M. auriculata* var. *rhodesica* (Vanden Berghen) Sukkharak & Gradstein และ *M. recondita* (ตัวอย่างต้นแบบของ *M. หมู่ Brachiolejeuneoides*) ซึ่งมี pluriplicate perianths การศึกษาในครั้งนี้ พบว่าไม่เป็นของสมาชิกของเคลดนี้ โดย *Mastigolejeunea recondita* เป็นสมาชิกของเคลด *M. humilis-M. innovans-M.recondita-M. turgida-M. virens* ในขณะที่ *M. auriculata* var. *rhodesica* เป็นสมาชิกของเคลด *M. auriculata-M. gradsteinii-M. indica-M.repleta* และมีความสัมพันธ์เป็นพี่น้องของ *M. auriculata* var. *auriculata* โดยทั้งสองเคลดเป็นสมาชิกของหมู่ *Mastigolejeunea* ซึ่งมีลักษณะเด่น คือ leaves not conspicuously elongate และ male bracts hypostatic ซึ่งทั้งสองลักษณะนี้พบได้ใน *M. auriculata* var. *rhodesica* และ *M. recondita* และไม่พบในสมาชิกของเคลดหมู่ *Nigrae* ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า pluriplicate perianths ไม่เพียงแต่พบในหมู่ *Nigrae* เท่านั้น แต่ยังพบในหมู่ *Mastigolejeunea* ด้วย

ตำแหน่งของ *M. ligulata* ซึ่งอยู่บริเวณฐานของเคลดสกุล *Mastigolejeunea* สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ การมี conspicuously elongate leaves, epistatic male bracts และ sharply 3-plicate perianths โดยลักษณะ conspicuously elongate leaves และ epistatic male bracts สามารถพบได้ในเคลดของหมู่ *Nigrae* ในขณะที่ sharply 3-plicate พบได้ในเคลดของหมู่ *Mastigolejeunea* ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีร่วมกันระหว่างสองหมู่และตำแหน่งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่แยกจากสมาชิกอื่น ๆ ของสกุล *Mastigolejeunea* การศึกษานี้จึงเสนอให้มีการตั้งหมู่ใหม่ขึ้น คือ หมู่ *Ligulatae* โดยมีสมาชิกเพียง 1 ชนิด คือ *M. ligulata*

Topology แสดงให้เห็นว่า pluriplicate perianths ซึ่งเป็นลักษณะของหมู่ *Nigrae* มีวิวัฒนาการอย่างอิสระอย่างน้อย 3 ครั้งในสกุล *Mastigolejeunea* นอกจากนี้ยังยืนยันว่า สมาชิกแต่ละชนิดและพันธุ์ของสกุลนี้ซึ่งรายงานไว้โดย Sukkharak & Gradstein (2014) มีบรรพบุรุษร่วมกัน ยกเว้น *M. humilis*, *M. gradsteinii* และ *M. indica*

*Mastigolejeunea humilis* ตัวอย่างที่ 1–3 เป็นตัวอย่างที่เก็บมาจากทวีปเอเชีย อยู่ในเคลดที่แยกกันกับ *M. humilis* ตัวอย่างที่ 4–5 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บมาจากทวีปแอฟริกา อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยไม่พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถนำมาใช้ในการแยก *M. humilis* ที่เก็บมาจากทวีปเอเชีย ออกจาก *M. humilis* ที่เก็บมาจากทวีปแอฟริกาได้ นอกจากนี้ ยังไม่พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สนับสนุนว่า *M. gradsteinii* และ *M. indica* ไม่มีบรรพบุรุษร่วมกัน การเกิด morphologically cryptic speciation ดังเช่นที่พบในสมาชิก 3 ชนิดของสกุล *Mastigolejeunea* (*M. gradsteinii*, *M. humilis*, *M. indica*) พบได้ในไบรโอไฟต์และสมาชิกหลายสกุลของวงศ์ Lejeuneaceae เช่น สกุล *Diplasiolejeunea* (Spruce) Schiffn. (Dong et al., 2012), สกุล *Cololejeunea* (Spruce) Steph. (Yu et al., 2013), สกุล *Lejeunea* (Heinrichs et al., 2013), สกุล *Marchesinia* Gray (Heinrichs et al., 2009), สกุล *Microlejeunea* (Spruce) Steph. (Dong et al., 2013), สกุล *Spruceanthus* (Shi et al., 2015) และสกุล *Thysananthus* (Sukkharak et al., 2011) หากเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาที่ครอบคลุมเขตการกระจายพันธุ์ของแต่ละชนิด จะช่วยให้ตัดสินสถานะของ cryptic speciation ได้ (Shi et al., 2015)

ผลการศึกษานี้ยืนยันว่า *M. auriculata* และ *M. humilis* ต่างชนิดกัน ซึ่งสอดคล้องกับที่รายงานไว้โดย Wilson et al. (2007) และ Sukkharak et al. (2011) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า *M. turgida* ต่างชนิดกันกับ *M. auriculata* อย่างชัดเจน โดยก่อนหน้านี้ Sukkharak & Gradstein (2014) เสนอว่า *M. turgida* อาจเป็นพินโทไพบ์ของ *M. auriculata*

### ตำแหน่งของ *Mastigolejeunea florea*

การศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า *Mastigolejeunea florea* ไม่เป็นสมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* แต่เป็นสมาชิกของสกุล *Spruceanthus* โดยมีความสัมพันธ์เป็นพี่น้องกับ *S. theobromae* ซึ่งมีการกระจายพันธุ์เฉพาะในประเทศเอกวาดอร์ *Mastigolejeunea florea* เป็นลิเวอร์เวิร์ดที่พบในทวีปแอฟริกา โดยมีเขตการกระจายพันธุ์ในเขตแอฟริกาตะวันตกและแอฟริกากลางไปจนถึงประเทศแทนซาเนีย มีลักษณะเด่น คือ robust stems without enlarged epidermis, an acute-apiculate leaf apex, cells with rather broad, truncate ends และ with small trigones which are mostly simple-triangular และ not clearly cordate, the frequent presence of 2 intermediate thickenings on longer cell walls, frequently reduced lobules, distant underleaves, และ bifid female bracteoles โดยลักษณะดังกล่าวไม่พบในสมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* อื่น ๆ แต่พบในสมาชิกของสกุล *Spruceanthus* ซึ่งมีสมาชิกจำนวน 15 ชนิด โดยมี 14 ชนิดที่มีเขตการกระจายพันธุ์ในทวีปเอเชียและทวีปแอฟริกา และมี 1 ชนิด คือ *S. theobromae* ที่มีการกระจายพันธุ์เฉพาะในประเทศเอกวาดอร์ (Shi et al., 2015) และมีลักษณะเด่น คือ robust stems without or with weakly enlarged epidermis, leaf apex rounded or acute-apiculate, isodiametric to elongate leaf cells with simple-triangular to radiate trigones, homogeneous oil bodies, underleaves distant or imbricate, female bracteole entire or bifid, และ perianths with 5–12 keels (Shi et

al., 2015; Wang et al., 2016) *Mastigolejeunea florea* มีลักษณะที่สอดคล้องกับสมาชิกของสกุล *Spruceanthus* เป็นอย่างดี แต่แตกต่าง คือ มี 3-keeled perianth นอกจากนี้ หยตน้ำมันซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสกุล *Spruceanthus* แตกต่างจากสกุลอื่น ๆ (Shi et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานลักษณะของหยตน้ำมันใน *M. florea* ดังนั้น ตัวอย่างสดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้ได้ข้อมูลหยตน้ำมันต่อไป นอกจากนี้ ความสัมพันธ์เป็นพี่น้องของ *M. florea* และ *S. theobromae* สนับสนุนโดยการมี elongate leaf cells ในทั้งสองชนิด โดยลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะที่พบได้ยากในสมาชิกของ *Spruceanthus* โดยมีรายงานเพียงใน *S. mamillilobulus* (Herzog) Verd. จากประเทศจีน (Wang et al., 2016).

### การเปลี่ยนแปลงทางอนุกรมวิธาน

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาที่ใช้ข้อมูลจากการศึกษาทบทวนลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Mastigolejeunea* และสกุล *Thysananthus* ในระดับโลก และการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลที่มีจำนวนชนิดของสมาชิกทั้งสองสกุลมากกว่า 95% แสดงให้เห็นถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่กำกวมและไม่พบลักษณะที่สามารถนำมาใช้ในการแยกทั้งสองสกุลออกจากกันได้ ทั้งสองสกุลมีลักษณะร่วมกัน ได้แก่ rigid, thick stems without hyalodermis, absence of *Frullania*-type branches, convolute leaves (when dry), elongate, prosenchymatic leaf cells with cordate to coalesced trigones, segmented oil bodies, broadly obovate to spatulate, undivided underleaves, gynoecea with 1–2 lejeunoid innovations, 3-keeled perianths, a non-articulate seta, absence of specialized means of asexual reproduction แม้แต่ perianths ที่เดิมเคยใช้ในการแยกทั้งสองสกุลนี้ โดยแบบ entire พบใน *Mastigolejeunea* และแบบ entire หรือ toothed พบใน *Thysananthus* แต่การศึกษานี้พบว่าไม่สามารถใช้ลักษณะดังกล่าวในการแยกทั้งสองสกุลได้

เนื่องจากความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันและไม่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถนำมาใช้ในการแยกทั้งสองสกุลออกจากกันได้ ผู้วิจัยจึงเสนอให้ รวมสกุล *Mastigolejeunea* กับสกุล *Thysananthus* โดยลดระดับสกุล *Mastigolejeunea* ให้เป็นสกุลย่อยของสกุล *Thysananthus* และย้ายสมาชิกของสกุล *Mastigolejeunea* ไปเป็นสมาชิกของสกุล *Thysananthus* ยกเว้น *M. florea* ซึ่งถูกย้ายเป็นสมาชิกของสกุล *Spruceanthus* ดังนั้น สกุล *Thysananthus* จึงเป็นสกุล เป็นสกุลที่มีจำนวนสมาชิกมากเป็นอันดับสองของวงศ์ Lejeuneaceae วงศ์ย่อย Ptychanthoideae (รองจากสกุล *Lopholejeunea*) โดยมีสมาชิกทั้งหมด 30 ชนิด และเป็นหนึ่งในสกุลที่มีจำนวนสมาชิกจำนวนมากที่ได้รับการศึกษาทบทวนในระดับโลก

คำบรรยายลักษณะของสกุล *Thysananthus* มีดังนี้

*Thysananthus* Lindenb. in Lehmann, Nov. Stirp. Pug. 8: 24, 1844.

*Type.* *Thysananthus comosus* Lindenb.

*Description.* **Plants** with projecting growth, irregularly pinnate (dendroid and regularly pinnate in *T. fruticosus*), ascending to erect or pendent, glossy green or dull green, becoming brownish-green, dark brown to blackish in older portions, when dry pale yellow, yellowish brown to dark brown. **Branches** *Lejeunea*-type; flagella present on the older portions of stems. **Stems** rigid, without hyalodermis (exceptionally with hyalodermis), ventral merophyte 5–18 cell rows wide; in cross section orbicular to elliptic, epidermal cells as large as medullary cells or dorsal epidermal cells larger and somewhat thinner-walled than medullary and ventral epidermal cells, walls brownish-pigmented or hyaline. **Leaves** usually imbricate, when dry usually suberect and appressed or convolute (rarely spreading and flat), when moist weakly convex with apical part plane and not recurved, to strongly convex with apical part turned to ventral side and recurved, to subsquarrose; leaf lobe symmetrical or asymmetrical, ovate to ligulate, apex rounded, obtuse, acute or apiculate, dorsal base cordate or auriculate, dorsal margin entire or toothed, plane or incurved; cells elongate-hexagonal, rarely subisodiametric (*T. retusus* (Reinw., Blume & Nees) B.M.Thiers & Gradst.), vitta absent or present, trigones cordate, often large and coalesced, intermediate thickenings 0–2(–3) per cell (walls  $\pm$  evenly thickened and trigones obscure in *T. retusus*); cuticle smooth; oil bodies coarsely segmented, *Calypogeia*-type, 2–6(–8) per cell. **Lobules** ovate to oblong-rectangular,  $1/10$ – $1/2$   $\times$  lobe length, inflated; keel smooth, curved; lobule apex oblique or truncate, free margin with 1–4 triangular teeth or without teeth; hyaline papilla pyriform-oblong, positioned on the inner side of the lobule near the proximal base of the first tooth. **Underleaves** distant to imbricate, usually slightly squarrose, broadly orbicular to spatulate, apex rounded to truncate, entire or toothed, plane, recurved or incurved, margins entire, recurved, bases cuneate or auriculate, underleaf bases free or adnate with leaves on one side; rhizoids pale brown; secondary rhizoid discs absent. **Dioicous or monoicous.** **Androecia** terminal to intercalary on *Lejeunea*-type branches, bracts and bracteoles in 2–19(–24) pairs, bracts epistatic or hypostatic, bracteoles similar to underleaves; antheridia 1–2 per bract. **Gynoecia** terminal on elongate branches, with 1–2 lejeuneoid innovations, innovations repeatedly fertile, forming a monochasial or dichasial

pattern, or both, bracts and bracteole in 1(-3) series; bract margins entire or toothed, lobules  $1/3-1/2 \times$  lobe length, apex apiculate to bifid; bracteoles spatulate, apex rounded to short-bifid, margins entire or toothed, plane or recurved. **Perianths** obovate to cylindrical, 3-keeled, in some taxa becoming 5-11-plicate ("pluriplicate") by the development of supplementary folds, keels toothed in the upper  $1/3$  or entire; beak (0-)3-5(-11) cells in length. **Calyptra** 1-2-stratose. **Sporophyte** exerted up to 2.5 mm above the perianth; foot of 5-8 transversal cell rings; seta 17-25 cells long, non-articulate when elongate, made up of 16 outer rows of cells and 4 inner rows; capsule globose, dark-brown to blackish, dehiscent from the apex downward into 4 valves to  $3/4$  of their length, with a rectangular-shaped hinge, inner valve surfaces covered by a yellow-brown, monofenestrate or plurifenestrate layer of thickening; elaters with one brown spiral band, 66-82 per capsule, elateroids present or absent; spores subspherical to oblong, surface with numerous bluntish papillae, 1-4 rosettes per facet, rosettes with 5-9 sharp, smooth papillae. **Sporelings** *Lopholejeunea*-type. **Vegetative reproduction** by regeneration from dorsal or ventral leaf surfaces; specialized asexual reproductive devices absent.

*Distribution.* Widespread in the Tropics extending northwards to Japan and southwards to New Zealand; in lowland rain forests and montane forests, savannas, mangrove forests, logging areas, along roadsides, in cultivated areas (plantations, gardens, etc.), from the sea level up to 3100 m.

การจัดจำแนกของสกุล *Thysananthus* มีดังนี้

### 1. *Thysananthus* subg. *Thysananthus*

Perianth keels toothed, rarely entire. Dorsal epidermis not enlarged, occasionally enlarged.

#### 1.1. sect. *Thysananthus*

Leaf lobe without vitta. Dorsal epidermis enlarged or not enlarged

##### 1.1.1. subsect. *Thysananthus*

Dorsal epidermis not enlarged. *T. aculeatus* Herzog, *T. amazonicus* (Spruce) Schiffn., *T. appendiculatus* Steph., *T. comosus* (type), *T. convolutus* Lindenb., *T. discretus* Sukkharak & Gradstein, *T. gottschei* (Jack & Steph.) Steph., *T. spathulistipus* (Reinw., Blume & Nees) Lindenb.

##### 1.1.2. subsect. *Anguiformes*

Dorsal epidermis enlarged. *T. anguiformis* (type), *T. calcaratus*, *T. ciliaris*, *T. pancheri*

1.2. **sect. *Vittati*** Verd.

Leaf lobe with a vitta. Dorsal epidermis not enlarged.

1.2.1. **subsect. *Vittati*** (Verd.) Sukkharak

Plants dendroid, leafy stems arising from a creeping stoloniform shoot, regularly pinnate. *T. fruticosus*.

1.2.2. **subsect. *Sandeanthus*** (B.M.Thiers & Gradst.) Sukkharak

Plants not dendroid, leafy stems not arising from a creeping stoloniform shoot, irregularly pinnate. *T. mollis* Steph., *T. montanus*, *T. retusus* (type)

2. ***Thysananthus* subg. *Mastigolejeunea*** (Spruce) *comb. nov.*

Perianth keels entire. Dorsal epidermis enlarged, rarely not enlarged.

2.1 **sect. *Mastigolejeunea***

Leaves not conspicuously elongate. Male bracts hypostatic. Perianths 3–10-plicate. *T. auriculatus* (type), *T. gradsteinii* (Sukkharak) *comb. nov.*, *T. humilis* (Gottsche) *comb. nov.*, *T. indicus* (Steph.) *comb. nov.*, *T. innovans* (Spruce) *comb. nov.*, *T. reconditus*, *T. repletus* (Taylor) *comb. nov.*, *T. truncatus* (Mizut.) *comb. nov.*, *T. turgidus* (Steph.) *comb. nov.*, *T. virens* (Ångstr.) *comb. nov.*

2.2. **sect. *Ligulati*** *sect. nov.*

Leaves conspicuously elongate. Male bracts epistatic. Perianths 3-plicate. *T. ligulatus* (Lehm. & Lindenb.) *comb. nov.*

2.3. **sect. *Nigri*** (R.M.Schust.) *comb. nov.*

Leaves conspicuously elongate. Male bracts epistatic, rarely hypostatic. Perianths 5–11-plicate. *T. frauenfeldii* (Reichardt) *comb. nov.*, *T. nigrus* (Steph.) *comb. nov.* (type), *T. plicatiflorus* (Spruce) *comb. nov.*

**New names and new combinations**

For full synonymy and type citations see Sukkharak & Gradstein (2014).

***Spruceanthus floreus*** (Mitt.) Sukkharak & Gradst. *comb. nov.*

*Phragmicoma florea* Mitt., J. Linn. Soc., Bot. 22: 323. 1886; *Mastigolejeunea florea* (Mitt.)

Paris

*Thysananthus* subg. *Mastigolejeunea* (Spruce) Sukkharak & Gradst. **stat. nov.**

*Lejeunea* subg. *Mastigolejeunea* Spruce, Trans. & Proc. Bot. Soc. Edinburgh 15: 100. 1884;  
*Mastigolejeunea* (Spruce) Steph.

*Thysananthus* sect. *Nigri* (R.M.Schust.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Mastigolejeunea* sect. *Nigrae* R.M.Schust., Bryologist 64: 167. 1961.

*Thysananthus* sect. *Ligulati* Sukkharak & Gradst. **sect. nov.**

Leaves conspicuously elongate. Male bracts epistatic. Perianths sharply 3-keeled.

Type. *Thysananthus ligulata* (Lehm. & Lindenb.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Jungermannia ligulata* Lehm. & Lindenb., in Lehmann, Nov. Stirp. Pug. 6: 39. 1834;

*Mastigolejeunea ligulata* (Lehm. & Lindenb.) Schiffn.

*Thysananthus auriculatus* (Wilson & Hook.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Jungermannia auriculata* Wilson & Hook., in Wilson, Musci Amer. Exsicc. (Southern States) n. 170. 1841; *Mastigolejeunea auriculata* (Wilson & Hook.) Steph.

*Thysananthus auriculatus* var. *rhodesicus* (Vanden Berghen) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Brachiolejeunea rhodesica* Vanden Berghen, Bull. Jard. Bot. Brux. 21: 94. 1951;

*Mastigolejeunea auriculata* var. *rhodesica* (Vanden Berghen) Sukkharak & Gradst.

*Thysananthus calcaratus* (Steph.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Archilejeunea calcarata* Steph., Sp. Hepat. 4: 724. 1911; *Mastigolejeuneacalcarata* (Steph.) Verd.

*Thysananthus gradsteinii* (Sukkharak) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.** *Mastigolejeunea gradsteinii* Sukkharak, J. Bryol. 36(1): 56. 2014.

*Thysananthus humilis* (Gottsche) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Phragmicoma humilis* Gottsche, in Gottsche, Lindenb. & Nees, Syn. Hepat. 299. 1845;

*Mastigolejeunea humilis* (Gottsche) Schiffn.

*Thysananthus indicus* (Steph.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Mastigolejeunea indica* Steph., Sp. Hepat. 4: 776. 1912.

*Thysananthus innovans* (Spruce) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Lejeunea innovans* Spruce, Trans. & Proc. Bot. Soc. Edinburgh 15: 103. 1884;

*Mastigolejeunea innovans* (Spruce) Steph.

*Thysananthus nigrus* (Steph.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Mastigolejeunea nigra* Steph., Hedwigia 30: 206. 1891.

*Thysananthus plicatiflorus* (Spruce) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Lejeunea plicatiflora* Spruce, Trans & Proc. Bot. Soc. Edinburgh 15: 104. 1884;

*Mastigolejeunea plicatiflora* (Spruce) Steph.

*Thysananthus reconditus* (Steph.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Ptycholejeunea recondita* Steph., Hedwigia 35: 122. 1896;

*Mastigolejeunea recondita* (Steph.) Mizut.

*Thysananthus repletus* (Taylor) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Lejeunea repleta* Taylor, London J. Bot. 5: 392. 1846; *Mastigolejeunea repleta* (Taylor)

A.Evans

*Thysananthus truncatus* (Mizut.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Mastigolejeunea truncata* Mizut., J. Hattori Bot. Lab. 61: 292. 1986.

*Thysananthus turgidus* (Steph.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**

*Mastigolejeunea turgida* Steph., Hedwigia 31: 170. 1892.

*Thysananthus virens* Ångstr., Öfvers. Förh. Kongl. Svenska. Vetensk.-Akad. 5: 131. 1873.

*Mastigolejeunea virens* (Ångstr.) Steph., Sp. Hepat. 4: 776. 1912.

## Fossils

*Thysananthus bidentulus* (Gradst.) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.** *Mastigolejeunea bidentula* Gradst. Nova Hedwigia 57: 365. 1993.

*Thysananthus contortus* (Göpp. & Berendt) Sukkharak & Gradst. **comb. nov.**  
*Jungermannites contortus* Göpp. & Berendt in Berendt, Die im Bernstein befindlichen organischen Reste der Vorwelt 1(1): 114. 1845; *Mastigolejeunea contorta* (Göpp. & Berendt) Gradst. & Grolle.

### ผลผลิต (Output)

#### 1. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ได้รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ จำนวน 1 ฉบับ

#### 2. บทความวิจัย (ภาคผนวก)

ได้บทความวิจัยที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 1 ฉบับ คือ

Sukkharak, P, Gradstein, SR. accepted. Phylogenetic study of *Mastigolejeunea* (Marchantiophyta: Lejeuneaceae) and an amended circumscription of the genus *Thysananthus*. Phytotaxa.

โดยวารสาร Phytotaxa อยู่ในฐานข้อมูล Thomson Reuters (ISSN: 1179-3155, E-ISSN: 1179-3163, New Zealand, Magnolia press) และฐานข้อมูล SJR (SCImago Journal Rank) มีค่า Impact Factor ปี 2015/2016 เท่ากับ 1.087 ค่าควอไทล์ที่ 2 สาขาวิชา Plant Science

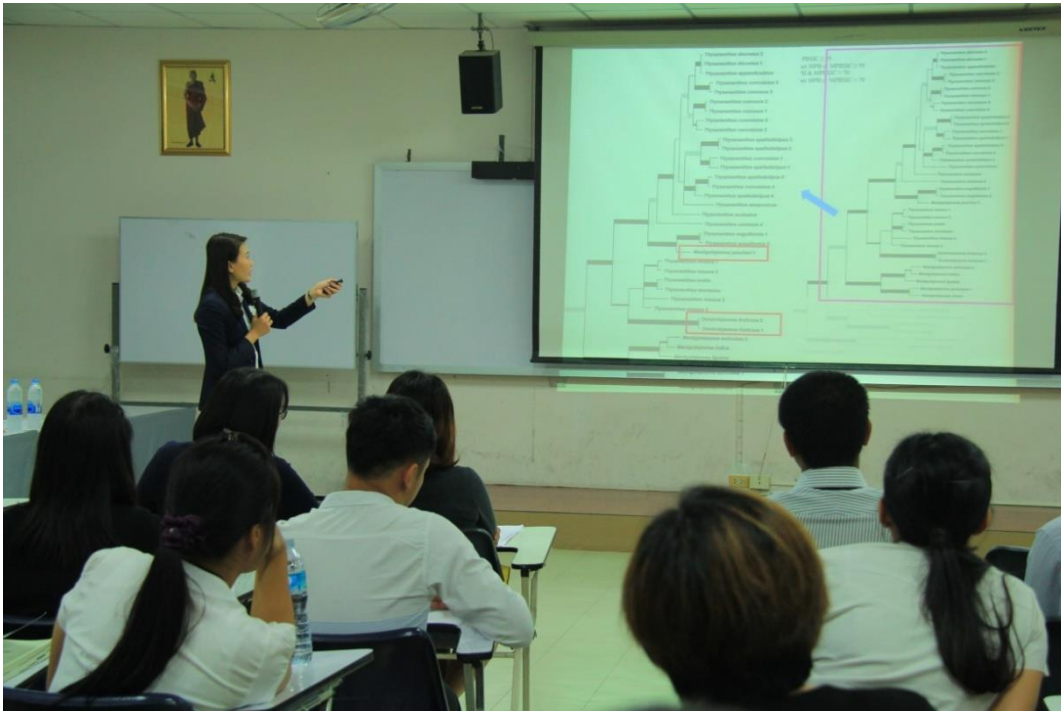
#### 3. การเผยแพร่ผลงานโดยการนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ

เป็นส่วนหนึ่งในการบรรยายพิเศษในฐานะวิทยากรรับเชิญ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ ชีววิทยาศึกษา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการศึกษา การจัดการศึกษา ในการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9” ในหัวข้อ “สองรวมเป็นหนึ่ง: บทสรุปของการศึกษาทบทวนลิเวอร์เวิร์ตสกุล *Thysananthus* และ *Mastigolejeunea* ในระดับโลก” ในวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ภาพที่ 3)

นำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์อิเล็กทรอนิกส์ (e-poster) หัวข้อ “A phylogeny of *Mastigolejeunea* (Marchantiophyta: Lejeuneaceae) – Evidence for reduction of *Mastigolejeunea* to subgeneric rank in *Thysananthus* and transferring *M. florea* to *Spruceanthus*” ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “XIX International Botanical Congress 2017” ณ the Shenzhen Convention and Exhibition Center เมืองเซินเจิ้น ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ระหว่างวันที่ 23-29 กรกฎาคม พ.ศ. 2560 (ภาพที่ 4)

ได้รับการตอบรับให้นำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย หัวข้อ “Phylogenetic Study of the Liverwort Genus *Mastigolejeunea* And an Amended Circumscription of the Genus

*Thysananthus*” ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 17<sup>th</sup> Flora of Thailand Conference”  
ระหว่างวันที่ 21-25 สิงหาคม พ.ศ. 2560 ณ โรงแรมดิวาน่า พลาซ่า กระบี่ อ่าวนาง จังหวัดกระบี่ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 บรรยายพิเศษในฐานะวิทยากรรับเชิญ ในการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9”



ภาพที่ 5 นำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์อิเล็กทรอนิกส์ (e-poster) ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “XIX International Botanical Congress 2017”



The Forest Herbarium,  
 Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation  
 61 Phahonyothin Road, Ladyao  
 Chatuchak, Bangkok 10900 Thailand  
 Phone/Fax. +662 2579 6666 ext. 1472

4 July 2017

**Assistant Professor Dr. Phiangphak Sukkharak**  
**Department of Biology, Faculty of Science,**  
**Burapha University 169, Long-Hard Bangsaen Road,**  
**Mueang, Chonburi, Thailand.**

Dear Dr. Phiangphak Sukkharak,

On behalf of the Organizing Committee, I have a great pleasure of inviting you to participate and present an oral presentation on the 17<sup>th</sup> Flora of Thailand Conference which will be held during 21-25 August 2017 at Deevana Plaza Krabi Aonang Hotel, Krabi, Thailand. The conference is an important forum for exchange of taxonomic ideas and new research findings on Thai Flora. The conference has now become a large international gathering of botanists and botanical researchers working on the systematics, ecology, biogeography, evolution and conservation of plants within Thailand and surrounding countries. Apart from free registration we are unable to support any fund to your visit.

Your submission “Phylogenetic Study of the Liverwort Genus *Mastigolejeunea* And an Amended Circumscription of the Genus *Thysananthus*”.

I look forward to seeing you in Krabi.

Sincerely yours,

Phongsak Phonsena, Ph.D.  
 Director  
 The Forest Herbarium

ภาพที่ 7 แบบตอบรับการนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 17<sup>th</sup> Flora of Thailand Conference”

### บรรณานุกรม

- Bechteler J, Lee GE, Schäfer-Verwimp A, Pócs T, Peralta DF, Renner MAM, Schneider H, Heinrichs J. 2016. Towards a monophyletic classification of Lejeuneaceae IV: reinstatement of *Allorgella*, transfer of *Microlejeunea aphanella* to *Vitalianthus* and refinements of the subtribal classification. *Plant Systematics and Evolution* 302 (2): 187–201.
- Dong SS, Schäfer-Verwimp A, Meinecke P, Feldberg K, Bombosch A, Pócs T, Schmidt AR, Reitner J, Schneider H, Heinrichs J. 2012. Tramps, narrow endemics and morphologically cryptic species in the epiphyllous liverwort *Diplasiolejeunea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 582–594. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.07.009>
- Dong S, Schäfer-Verwimp A, Pócs T, Feldberg K, Dzumaj A, Schmidt AR, Schneider H, Heinrichs J. 2013. Size doesn't matter - recircumscription of *Microlejeunea* (Lejeuneaceae, Porellales) based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* 85: 41–55. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.85.2.2>
- Frey W, Stech M. 2009 Marchantiophyta, Bryophyta, Anthocerotophyta. In: Frey W ed., *Syllabus of plant families – A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*, 13th ed., part 3, *Bryophytes and seedless vascular plants*. Stuttgart: Schweizerbart. 13–263.
- Gradstein SR. 2013. A classification of Lejeuneaceae (Marchantiophyta) based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* 100 (1): 6–20. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.100.1.2>
- Gradstein SR, Pócs T., Zhu R.-L. 2016. Lejeuneaceae. In: Söderström L, Hagborg A, von Konrat M eds. World checklist of hornworts and liverworts. *PhytoKeys* 59: 406–408. <http://dx.doi.org/10.3897/phytokeys.59.6261>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *NucleicAcids Symposium Series* 41: 95–98.
- He S. Internet resource. An annotated checklist and atlas of the mosses of Thailand. <http://www.mobot.org/MOBOT/moss/Thailand/>. The moss flora of Thailand Home Page. Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Heinrichs J, Klugmann F, Hentschel J, Schneider H. 2009. DNA taxonomy, cryptic speciation and diversification of the Neotropical-African liverwort, *Marchesinia brachiata* (Lejeuneaceae, Porellales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53(1): 113–121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.05.032>.

- Heinrichs J, Dong SS, Schäfer-Verwimp A, Pócs T, Feldberg K, Czumaj A, Schmidt AR, Reitner J, Renner MAM, Hentschel J, Vanderp M., Schneider H. 2013. Molecular phylogeny of the leafy liverwort *Lejeunea* (Porellales): Evidence for a neotropical origin, uneven distribution of sexual systems and insufficient taxonomy. *PLoS ONE* 8: e82547. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082547>
- Lai M-J, Zhu R-L, Chantanaorrapint S. 2008. Liverworts and hornworts of Thailand: an updated checklist and bryofloristic accounts. *Annales Botanici Fennici* 45: 321–341.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539–542. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Schuster RM. 1980. The Hepaticae and Anthocerotae of North America, vol. IV, Columbia University Press, New York. 854 pp.
- Shi X-Q, Gradstein SR, Zhu R-L. 2015. Phylogeny and taxonomy of *Archilejeunea* (Marchantiophyta: Lejeuneaceae) based on molecular markers and morphology. *Taxon* 64 (5): 881–892. <http://dx.doi.org/10.12705/645.1>
- Spruce R. 1884. Hepaticae of the Amazon and of the Andes of Peru and Ecuador. III *Lejeunea* Libert. *Transactions and Proceedings of the Botanical Society of Edinburgh* 15: 63–305.
- Stephani F. 1891 Hepaticae africanae. *Hedwigia* 30 (5): 201–217.
- Sukkharak P. 2015. A systematic monograph of the genus *Thysananthus* (Lejeuneaceae, Marchantiophyta). *Phytotaxa* 193(1): 1–81. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.193.1.1>
- Sukkharak P, Gradstein SR. 2010. On the occurrence of adnate underleaves and appendages in *Thysananthus* (Lejeuneaceae). Studies on the genus *Thysananthus* 2. *Journal of Bryology* 32: 308–310. <http://dx.doi.org/10.1179/jbr.2010.32.4.308>
- Sukkharak P, Gradstein SR, Stech M. 2011. Phylogeny, taxon circumscriptions and character evolution in the core Ptychanthoideae (Lejeuneaceae, Marchantiophyta). *Taxon* 60 (6): 1607–1622.
- Sukkharak P, Gradstein SR. 2014. A taxonomic revision of the genus *Mastigolejeunea* (Marchantiophyta: Lejeuneaceae). *Nova Hedwigia* 99 (3–4): 279–345. <http://dx.doi.org/10.1127/0029-5035/2014/0206>.
- Sukkharak P, Chantanaorrapint S. 2014. Bryophyte studies in Thailand: past, present, and future. *Cryptogamie, Bryologie* 35: 5–17.

- Wang J, Zhu R-L, Gradstein SR. 2016. Taxonomic revision of Lejeuneaceae subfamily Ptychanthoideae (Marchantiophyta) in China. *Bryophytorum Bibliotheca* 65: 1–141.
- Wilson R, Gradstein SR, Schneider H, Heinrichs J. 2007. Unravelling the phylogeny of Lejeuneaceae (Jungermanniopsida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 270–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.017>
- Yu Y, Heinrichs J, Zhu R-L, Schneider H. 2013. Empirical evidence supporting frequent cryptic speciation in epiphyllous liverworts: A case study of the *Cololejeunea lanciloba* complex. *PLoS ONE* 8: e84124. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084124>
- Zwickl DJ. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin. GARLI version 2.01. Available from: <http://garli.googlecode.com> (accessed: 13 July 2016).