โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae*
Genetic diversity of the photobionts in lichen *Trypethelium eluteriae*

ชื่อนิสิต นายสิทธิเดช ซื่อสัตย์ศักดิ์ **เลขประจำตัว** 5832150923

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae*

นายสิทธิเดช ซื่อสัตย์ศักดิ์

โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

Genetic diversity of algal photobionts in lichen *Trypethelium eluteriae*

Mr.Sittidach Suesatsak

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For The Degree of Bachelor of Science in Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2018

ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae*
ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์	Genetic diversity of the photobionts in lichen *Trypethelium eluteriae*
ชื่อนิสิต	นายสิทธิเดช ซื่อสัตย์ศักดิ์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอก แสงวิเชียร
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอก แสงวิเชียร)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์)

ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae*
ชื่อนิสิต	นายสิทธิเดช ซื่อสัตย์ศักดิ์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอก แสงวิเชียร
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

ไลเคนเป็นความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกันระหว่างรากับสาหร่ายและเป็นดัชนีบ่งบอกถึงความสมดุลของสภาพแวดล้อม โดยความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคนเป็นเรื่องสำคัญทำให้ทราบถึงบทบาทของสาหร่ายที่อยู่ร่วมกับราเป็นไลเคนในระบบนิเวศ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่พบในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา โดยเก็บตัวอย่างไลเคนจากในภูมิภาคต่างๆ 4 จังหวัด จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ น่าน ระยอง หนองบัวลำภู และกระบี่ จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคนจากทุกตัวอย่างที่บริเวณยีน 18S rDNA และ *rcb*L พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณยีน 18S rDNA ได้ทั้ง 11 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 11 ตัวอย่างเป็นสาหร่ายชนิด *Trentepohlia* cf. *annulate* โดยค่าดัชนีความเหมือน 100% แสดงให้เห็นถึงความไม่หลากหลายของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rcb*L ได้ 8 ตัวอย่างจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 8 ตัวอย่างเป็นชนิดของต้นไม้ที่ไลเคนอาศัยอยู่ แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งยีน *rbc*L ไม่จำเพาะต่อชนิดของสาหร่ายเท่านั้น

คำสำคัญ: Trypethelium eluteriae, สาหร่าย, อนุกรมวิธานเชิงโมเลกุล, 18S rDNA

Senior Project Title	Genetic diversity of algal photobionts in lichen *Trypethelium eluteriae*
Student name	Mr.Sittidach Suesatsak
Senior Project Advisor	Assistant Professor Dr. Jittra Piapukiew
Senior Project Co-Advisor	Assistant Professor Dr. Ek Sangvichien
Department	Botany
Major	Genetics
Academic Year	2018

Abstract

Lichens are symbiotic associations of fungi and green algae or cyanobacteria. They are widely used as environmental indicators and genetic diversity of algae in lichen is important for their roles in ecosystem. The objective of this research was to study the genetic diversity of green algae in lichen *Trypethelium eluteriae*. Eleven lichen samples were collected from various locations, Nan, Rayong, Nongbualumphu and Krabi provinces. Genetic diversity of all collected samples were studies based on 18S rDNA and *rbc*L gene fragments. The results showed that 18S rDNA amplification of all collected samples were successful. Based on 18S rDNA sequence analysis, all photobionts in lichen *T. eluteriae* were identified as *Trentepohlia* cf. *annulate* with the highest similarity 100 %. The phylogenetic analysis revealed no genetic diversity of photobionts in lichen *T. eluteriae* based on 18S rDNA . The *rbc*L gene of all photobionts was successful to amplify in 8 samples. According to *rbc*L sequence analysis, all samples were identified as host of *T. eluteriae*. As a result, it showed that *rbc*L was not specify for photobiont.

Keywords: Trypethelium eluteriae, photobiont, molecular phylogeny, 18S rDNA

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอก แสงวิเชียร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม ที่คอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์ กรรมการสอบ ที่ให้การอนุเคราะห์ไพรเมอร์บริเวณ *rbc*L และให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไขโครงงานฉบับนี้

กราบขอบพระคุณนางสาวสุชาดา โพธิสิงห์ พี่เลี้ยงผู้ดูแลโครงงานวิทยาศาสตร์นี้ที่คอยสอนงานและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อโครงงานวิทยาศาสตร์นี้

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการราวิทยา และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่สนับสนุนในทุกๆ ด้าน

ขอขอบคุณเพื่อนภาคพฤกษศาสตร์ทุกคนที่คอยกำลังใจเสมอมา และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณตัวเองที่ก้าวข้ามความเป็นตัวเองมาได้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ	7
บทที่ 4 ผลการศึกษา	14
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	19
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา	22
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก ก	27
ภาคผนวก ข	37
ประวัติผู้เขียน	39

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ภาพตัดตามขวางแทลลัสของไลเคน 4

2 ลักษณะของแทลลัสและสปอร์ของ *Trypethelium eluteriae* 5

3 Phylogenetic tree ของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA โดยใช้รูปแบบ Kimura 2-parameter model +G +I และใช้ค่า bootstrap value เป็น 1000 pseudoreplicates 17

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ตัวอย่างไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และได้รับมาจากหน่วยวิจัยไลเคนมหาวิทยาลัยรามคำแหงจำนวน 18 ตัวอย่าง 9

2 ลำดับเบสและอุณหภูมิในการเข้าจับกับสายดีเอ็นเอ (T_m) ของไพรเมอร์ 11

3 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรส 12

4 ตัวอย่างสาหร่ายที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *rbc*L และ 18S rDNA ได้

5 ชนิดของสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างสาหร่าย ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA 15

6 ชนิดของต้นไม้จากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่าง ที่ตำแหน่งยีน *rbc*L 16

บทนำ

ไลเคน (lichen) เป็นความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ระหว่างรา (lichen-forming fungi หรือ mycobiont) กับสาหร่ายหรือไซยาโนแบคทีเรีย (photobiont) (Ahmadjian, 1993; Purvis, Jones and Mace, 2000) โดยรามีบทบาทในการเก็บความชื้นและป้องกันอันตรายให้กับสาหร่าย (photobiont) ส่วนสาหร่ายมีบทบาทในการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างคาร์โบไฮเดรตซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ เพื่อส่งให้ราใช้เป็นอาหาร (Honegger, 1991; Hawksworth & Honegger, 1994) โดยราที่ก่อให้เกิดไลเคนมีรายงานพบว่ามีประมาณ 13,500 ชนิด จัดอยู่ใน 525 สกุล (Honegger, 2008) ส่วนสาหร่ายที่มีความสัมพันธ์กับราที่ก่อให้เกิดไลเคนเป็นกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyte algae) ซึ่งมีประมาณ 100 ชนิด จัดอยู่ใน 40 สกุล (Tschermak-Woess, 1998; Peršoh, Beck and Rambold, 2004) โดยในเอกสารการจัดจำแนก (classification) ไลเคนโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาล่าสุด ระบุว่าทั่วโลกมีไลเคนทั้งหมด 19,409 ชนิด 1,002 สกุล 119 วงศ์ 40 อันดับ และ 8 ชั้น (Lucking, Hodkinson and Leavitt, 2017)

Trypethelium eluteriae เป็นไลเคนชนิดครัสโตสที่มีลักษณะแทลลัสสีน้ำตาลอมเขียวถึงเหลือง จัดอยู่ในวงศ์ Trypetheliaceae (Kirk et al., 2008; Aptroot et al., 2008) ไลเคนในชนิดนี้ส่วนใหญ่เจริญอยู่บนเปลือกไม้ของต้นไม้ที่ขึ้นในป่าฝนเขตร้อน ป่าดิบแล้ง และป่าชายเลน สาหร่ายที่พบในไลเคนวงศ์ Trypetheliaceae เป็นสาหร่ายในสกุล *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Phycopeltisc* และ *Cephaleuros* (Sanders, 2001) ซึ่งจะเห็นได้ว่าจากการศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายที่มีความสัมพันธ์แบบไลเคนจะมีน้อยกว่าความหลากหลายของราที่ก่อให้เกิดไลเคน แต่การศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของสาหร่ายเป็นเรื่องที่สำคัญที่จะทำให้ทราบถึงบทบาทของสาหร่ายที่อยู่ร่วมกับราที่ก่อให้เกิดไลเคนในระบบนิเวศ รวมถึงความสัมพันธ์ของสาหร่ายดังกล่าวในเชิงวิวัฒนาการ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวในไลเคนยังมีการศึกษาน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากการแยกสาหร่ายในไลเคนออกจากราและการเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการทำได้ยากมาก และไม่ค่อยประสบผลสำเร็จ เพราะในแต่ละขั้นตอนต้องใช้เวลาและความชำนาญเป็นอย่างมาก (Ahmadijian, 1958, 1967; Tschermak-Woess, 1988) อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความใกล้เคียงกันมากจึงยากที่จะระบุความแตกต่างในระดับสปีชีส์ได้ ปัจจุบันเทคนิคทางอณูวิทยา (molecular techniques) เข้ามามีบทบาททำให้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคนได้ง่ายขึ้น โดยใช้เครื่องหมายทางดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่จำเพาะต่อกลุ่มสาหร่าย (Kroken and Taylor, 2000; Helms et al., 2001; Guzow-Krzeminska, 2006; Oliveira, Timsina and Piercey-Normore, 2012) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ถึงระดับสปีชีส์และต่ำกว่าระดับสปีชีส์ ดังนั้นโครงงานวิทยาศาสตร์นี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวที่อยู่ร่วมกันในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่พบเจริญอยู่

ทั่วไปในป่าตามภูมิภาคของไทยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาชนิดและความสัมพันธ์ของสาหร่ายสีเขียวที่อาศัยอยู่ในไลเคน *Trypethelium eluteriae*

วัตถุประสงค์

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่พบในประเทศไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

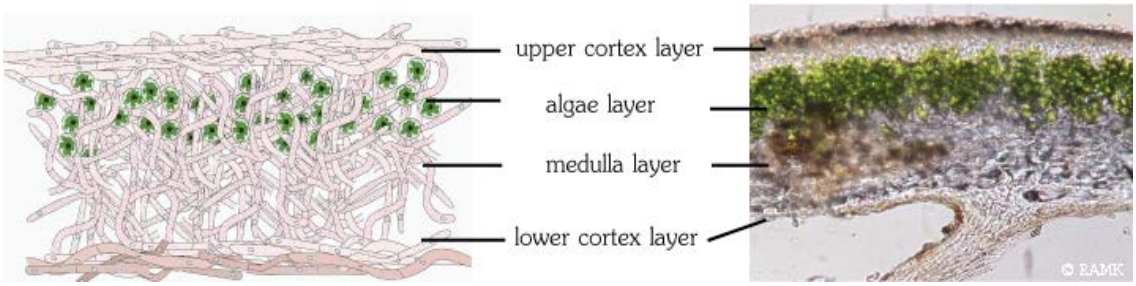
ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่พบในประเทศไทย

ตรวจเอกสาร

2.1 ไลเคน

ไลเคน (lichen) เป็นความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ระหว่างรา (lichen-forming fungi หรือ mycobiont) กับสาหร่ายหรือไซยาโนแบคทีเรีย (photobiont) (Ahmadjian, 1993; Purvis, Jones and Mace, 2000) โดยรามีบทบาทในการเก็บความชื้นและป้องกันอันตรายให้กับสาหร่ายหรือไซยาโนแบคทีเรีย (photobiont) ส่วนสาหร่ายหรือไซยาโนแบคทีเรียมีบทบาทในการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างคาร์โบไฮเดรตซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ เพื่อส่งให้ราใช้เป็นอาหาร (Honegger, 1991; Hawksworth & Honegger, 1994) โครงสร้างของไลเคนจะเรียกว่า แทลลัส (thallus) โดยแทลลัสมีสัดส่วนเป็นเส้นใยรา 90-93% ส่วนสาหร่ายมีเพียง 1-10% (Collin and Farrar, 1978; Ahmadjian, 1993; Sundberg et al., 1999) โดยโครงสร้างภายในของไลเคนประกอบด้วย 4 ชั้น (ภาพที่ 1) ได้แก่

1. ชั้นคอร์เท็กซ์บน (upper cortex layer) เป็นชั้นที่อยู่ด้านบนสุดของแทลลัส ชั้นคอร์เท็กซ์นี้มีหน้าที่สำคัญคือป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยเฉพาะความเข้มแสงสูง และการกัดกินของสัตว์จำพวกแมลง
2. ชั้นสาหร่าย (algae layer) เป็นชั้นที่อยู่ด้านล่างของชั้นคอร์เท็กซ์บน มีหน้าที่สำคัญคือสร้างอาหารโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง สาหร่ายในชั้นนี้เรียกว่า photobiont ไลเคนส่วนใหญ่ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ มีสาหร่ายสีเขียวเป็นองค์ประกอบของชั้นนี้, ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน, ประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ มีทั้งไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว (cephalodiate lichens และ photosymbiodemes) เป็นสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) (Sanders et al., 2004; Friedl and Budel, 2008)
3. ชั้นเมดัลลา (medulla layer) ชั้นนี้เป็นชั้นของรา อยู่ถัดจากชั้นสาหร่ายลงมา ราในไลเคน เรียกว่า mycobiont ส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม Ascomycota (ca. 98%) (Honegger, 2008) ชั้นนี้มีหน้าที่สำคัญคือกักเก็บความชื้นและสร้างสารที่จำเป็นต่อการเติบโตและการอยู่รอดของไลเคน
4. ชั้นคอร์เท็กล่าง (lower cortex layer) เป็นชั้นที่อยู่ล่างสุดของแทลลัส มีหน้าที่หลักคือยึดเกาะกับพื้นที่ยึดเกาะอาศัย (substrate) ไลเคนบางชนิดมีชั้นนี้ แต่บางชนิดไม่มี โดยเฉพาะไลเคนในกลุ่มคลัสโตส

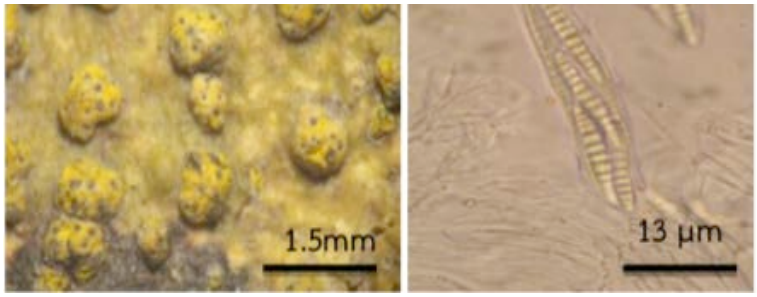


ภาพที่ 1 ภาพตัดตามขวางแทลลัสของไลเคน (มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2558: ออนไลน์)

จากการศึกษาความหลากหลายของไลเคนโดยมีรายงานการจัดจำแนกไลเคนล่าสุด ระบุว่าทั่วโลกมีไลเคนทั้งหมด 19,409 ชนิด (species) 1,002 สกุล (genera) 119 วงศ์ (families) 40 อันดับ (orders) และ 8 ชั้น (classes) (Lucking, Hodkinson and Leavitt, 2017) โดยพบได้ตั้งแต่พื้นที่ที่หนาวจัดอย่างเขตขั้วโลกถึงพื้นที่ที่ร้อนจัดอย่างทะเลทราย และที่ทุกระดับความสูงตั้งแต่ทะเลถึงยอดเขาสูง (Larson, 1987; Seaward, 2008)

2.2 **ไลเคน** *Trypethelium eluteriae*

เป็นไลเคนที่จัดอยู่ในวงศ์ Trypetheliaceae และอยู่ในสกุล *Trypethelium* (Kirk et al., 2008; Aptroot et al., 2008) แทลลัสครัสโตส ผิวเรียบถึงขรุขระ เป็นเงามัน สีเทาถึงสีเขียวมะกอก พบชั้นคอร์เทกซ์แอสโคมาตาแบบเพอริทริเซียสีดำ พบผงผลึกสีเหลืองกระจายทั่วแอสโคมาตา (ภาพที่ 2) ทรงกลมอยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่เป็นกลุ่มเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อซูโดโสตรมาตา (ภาพที่ 2) (pseudostromata) สร้างสปอร์แบบมีผนังกั้นตามขวาง 3-14 ผนัง ทรงรี ยาวทรงกระสวย สีใส ลักษณะเซลล์ภายในเป็นแบบทรงกระบอกถึงทรงเหลี่ยม (ภาพที่ 2) (Phokaeo et al., 2013) พบ 8 สปอร์ในแอสคัสพบและไม่พบหยดน้ำมันในชั้นไฮเมเนียม ไลเคนในชนิดนี้ส่วนใหญ่เจริญอยู่บนเปลือกไม้ของต้นไม้ที่ขึ้นในป่าฝนเขตร้อน ป่าดิบแล้ง และป่าชายเลน (Kirk et al., 2008)



ภาพที่ 2 ลักษณะของแทลลัสและสปอร์ของ *Trypethelium eluteriae* (Phokaeo et al., 2013)

2.3 **สาหร่ายในไลเคน** *Trypethelium eluteriae*

สาหร่ายที่พบในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Trypetheliaceae เป็นสาหร่ายสีเขียวในสกุล *Trentepohlia* (Wil-wolf et al, 2004) สาหร่ายสีเขียวในสกุล *Trentepohlia* เมื่ออยู่แบบอิสระจะมีโครงสร้างเป็นเส้นใยเกาะอยู่บนหินปริมาณมาก เปลือกไม้และใบไม้ โดยเซลล์จะประกอบด้วยสารแคโรทีนอยด์ที่มีเบต้าแคโรทีนและเฮมาโตโครม ทำให้มองเห็นเป็นโครงสร้างสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาลแดง โดยรงควัตถุสีส้มจะบดบังรงควัตถุสีเขียว (chlorophyll) ไว้ชั้นในของเซลล์ ทำให้ไม่สามารถมองเห็นเป็นสีเขียวได้ (Friedl and Budel, 1996)

2.4 **ความสำคัญของสาหร่ายในไลเคน**

สาหร่ายที่พบในไลเคนทั่วไปคือ สาหร่ายในสกุล *Trebuoxia Trentepohlia* และ *Nostoc* โดยสาหร่ายในสกุล *Trebuoxia* และ *Irentepohlia* ซึ่งคิดเป็น 85% ของสาหร่ายที่ก่อให้เกิดไลเคน ส่วนสาหร่ายในสกุล *Nostoc* เป็นพวกโปรคาริโอตและเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เรียกว่า cyanobiont (Rankovic and Kosanic , 2015) ราและสาหร่ายในไลเคนมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยราจะทำหน้าที่ปกป้องสาหร่ายจากความเข้มแสงและความชื้นที่มากเกินไป นอกจากนั้นยังดูดซึมสารอาหารจากสาหร่ายอีกส่วนหนึ่งจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยการที่ราปกป้องสาหร่ายจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีกว่าการอยู่อย่างอิสระ ส่วนสาหร่ายทำหน้าที่สังเคราะห์สารอินทรีย์จากคาร์บอนไดออกไซด์ ในกรณีที่เป็น cyanobiont จะสังเคราะห์แอมโมเนียมจากแก๊สไนโตรเจนโดยกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Hale, 1983; Nash, 1996)

2.5 **การศึกษาสาหร่ายในไลเคน**

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวในไลเคนยังมีการศึกษาน้อยมาก รวมถึงการศึกษาชนิดของสาหร่ายยังมีจำกัด เนื่องจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาไม่สามารถแยกชนิดของสาหร่ายได้ เพราะสาหร่ายที่อยู่ในสกุลเดียวกันมีความคล้ายคลึงกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากการแยกสาหร่ายในไลเคนออกจากราและการเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการทำได้ยากมาก และไม่ค่อยประสบผลสำเร็จเพราะในแต่ละขั้นตอนต้องใช้เวลาและความชำนาญเป็นอย่างมาก (Ahmadijian, 1958, 1967; Tschermak-Woess, 1988) อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความใกล้เคียงกันมากจึงยากที่จะระบุความแตกต่างในระดับสปีชีส์ได้ และอีกประการหนึ่งคือการแยกสาหร่ายออกจากราทำได้ยากเพราะสาหร่ายมีขนาดเล็กมาก (Grube and Muggia, 2010) ต่อมามีการนำเทคนิคทางอณูวิทยาเข้ามาใช้ศึกษาสาหร่ายในไลเคนมากขึ้น ทำให้ทราบชนิดของสาหร่ายแม้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะเหมือนกัน โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาหร่ายสีเขียวนิยมทำในยีน *rbc*L (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) ซึ่งเป็นยีนที่จะแปลรหัสเป็นเอนไซม์ RubisCo ที่มีอยู่ในสาหร่ายสีเขียวแต่ไม่มีใน

ราและเป็นตำแหน่งยีนที่มีการอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในยีนอื่น ควบคู่ไปด้วยเพื่อความแม่นยำในการระบุชนิดของสาหร่าย เช่น ยีน 18S rDNA เป็นต้น งานวิจัยที่มีการใช้ เทคนิคทางอณูวิทยาศึกษาสาหร่ายในไลเคนส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างไลเคนในเขตอบอุ่น เช่น งานวิจัยของ Yahr และคณะในปี 2015 ที่ศึกษาสาหร่ายในไลเคนสกุล *Micarea* ซึ่งใช้ตัวอย่างไลเคนที่พบใน ทวีปยุโรปและศึกษาโดยใช้ยีน *rbc*L และ nuclear ribosomal (nucSSU)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1) เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง และกรวยแก้ว เป็นต้น

2) ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

5) คีมคีบ

6) มีดโกน

7) กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope)

8) เครื่องชั่งละเอียด รุ่น Adventurer

9) ไมโครเวฟ (Microwave)

10) พาราฟิล์ม

11) เครื่องบด (Blender) Mixer MM 400

12) หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (Micro centrifuge tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร

13) เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex Mixer)

14) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณน้อย (Micro centrifuge)

15) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

16) ไมโครปิเปตต์ (Automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 ไมโครลิตร), P10 (0.5-10 ไมโครลิตร), P20 (5-20 ไมโครลิตร), P200 (50-200 ไมโครลิตร) และ P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร)

17) ปิเปตต์ทิป (Pipette tip)

18) หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร

19) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler)

20) เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Digital Dry Bath)

21) ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอสนามไฟฟ้า (Electrophoresis chamber set)

22) เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (Power Supply)

23) เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator

24) กล้องถ่ายรูปเจล (Gel Documentation)

3.2 สารเคมี

1) Tris-HCl

2) Polyvinylpyrrolidone (PVP)

3) Chloroform

4) Isoamyl alcohol

5) Isopropanol

6) Ethanol

7) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

8) NaCl

9) Cetryitrimethylammoniumbromide (CTAB)

10) Boric acid

11) Tris (hydroxymethyl) amino methane

12) 1.25 U Pfu DNA polymerase

13) Gelstar® Nucleic Acid Gel Stain

14) Agarose

3.3 วิธีการดำเนินการ

1. เก็บรวบรวมและบันทึกข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญของตัวอย่างไลเคน *Trypethelium eluteriae*

ตัวอย่างไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่นำมาศึกษาสุ่มเก็บตัวอย่างไลเคน *Trypethelium eluteriae* จากจังหวัดต่างๆ ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยจำนวน 11 ตัวอย่าง และได้รับความอนุเคราะห์มาจากหน่วยวิจัยไลเคน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง จำนวน 7 ตัวอย่าง รวม 18 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และได้รับมาจากหน่วยวิจัยไลเคนมหาวิทยาลัยรามคำแหงจำนวน 18 ตัวอย่าง

สกุล	ชื่อวิทยาศาสตร์	รหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บ
Trypethelium	*Trypethelium eluteriae*	NANA0	จังหวัดน่าน
	Trypethelium eluteriae	NANA1	จังหวัดน่าน
	Trypethelium eluteriae	NANA2	จังหวัดน่าน
	Trypethelium eluteriae	BR01	บึงจำรุง จังหวัดระยอง
	Trypethelium eluteriae	BR02	บึงจำรุง จังหวัดระยอง
	Trypethelium eluteriae	BR03	บึงจำรุง จังหวัดระยอง
	Trypethelium eluteriae	BR04	บึงจำรุง จังหวัดระยอง
	Trypethelium eluteriae	BR05	บึงจำรุง จังหวัดระยอง
	Trypethelium eluteriae	NBP1	จังหวัดหนองบัวลำภู
	Trypethelium eluteriae	KB	จังหวัดกระบี่
	Trypethelium eluteriae	KB2	จังหวัดกระบี่
	Trypethelium eluteriae	RAT50	จังหวัดนครราชสีมา
	Trypethelium eluteriae	PAR49	จังหวัดแพร่
	Trypethelium eluteriae	NAN59	จังหวัดน่าน
	Trypethelium eluteriae	NAN90	จังหวัดน่าน
	Trypethelium eluteriae	TLN3	จังหวัดปราจีนบุรี
	Trypethelium eluteriae	TAK49	จังหวัดตาก
	Trypethelium eluteriae	PL35	จังหวัดพิษณุโลก

2. การสกัดดีเอ็นเอของสาหร่ายจากไลเคน

สกัดดีเอ็นเอของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ทั้ง 18 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Cubero and Crespo (2002) โดยเริ่มจากการนำตัวอย่างไลเคนส่องใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope) จากนั้นใช้มีดโกนขูดบริเวณที่เป็นสีเขียวและหลีกเลี่ยงบริเวณที่เป็นจุดสีดำ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตรให้ได้ประมาณหนึ่ง แล้วใช้คีมคีบเม็ดบีท 10 เม็ดใส่ในหลอด เติม 2x CTAB extraction buffer 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดไปใส่ในเครื่องบด โดยตั้งค่าเครื่องให้ความถี่เป็น 30 ครั้งต่อวินาที เป็นเวลา 2 นาที หากตัวอย่างยังเป็นชิ้นใหญ่อยู่ ให้นำเข้าเครื่องบดอีก 1 ครั้ง หลังจากบดเสร็จนำมาเติม 2X CTAB extraction buffer เพิ่มอีก 350 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย PVPP (Washing buffer) 100 ไมโครลิตร เขย่าสารและนำไป Vortex ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หลังจากบ่มนำมาเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 :1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดสารละลายชั้นบนไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 :1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ซ้ำแบบเดิม แล้วดูดสารละลายชั้นบนไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรโดยบันทึกปริมาตรของสารละลายชั้นบนด้วย หลังจากนั้นเติม isopropanol โดยใส่ในปริมาตรเป็น 0.6 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ในหลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสในหลอดออกให้หมด เติม 70% ethanol 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจากนั้นเทสารละลายในหลอดออกให้ได้มากที่สุดโดยให้ตะกอนยังติดอยู่ในหลอดแล้ว นำไปตากให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วจึงเติม TE buffer 50 ไมโครลิตร แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA **และ** *rbc*L

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2 มาทำการเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA และ *rbc*L ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ตำแหน่งยีน 2 ตำแหน่งดังตารางที่ 2 และเตรียมสารละลายพีซีอาร์ปริมาตร 30 ไมโครลิตรด้วยอัตราส่วนดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ลำดับเบสและอุณหภูมิในการเข้าจับกับสายดีเอ็นเอ (T_m) ของไพรเมอร์

ยีน	**ไพรเมอร์**	**ลำดับนิวคลีโอไทด์** (5'->3')	T_m (°C)	**ที่มา**
18S rDNA	Tre18S_ N2.for	TAGGGTAGTGGCCTACCG	56	Hametner, Stocker-Wörgötter and Grube, 2014.
	18H	GCCCTTCCGTCAATTCCTTT AAGTTTCAGG		Hamby et al., 1988; Aburai et al., 2013.
*rbc*L	rbcL203F	GAATCWTCWACWGG ACT TGG ACWAC	51	Nelsen et al., 2011.
	rbcL901R	CCTTCTARTTTACCWACAAC		Nelsen et al., 2011.

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สาร	**ความเข้มข้นสุดท้าย**	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**
EmeraldAmp® GT PCR Master Mix	-	15
Forward Primer	20 μM	0.3
Reverse Primer	20 μM	0.3
DNA template	-	3
dH_2O	-	11.4
	Total	30

จากนั้นนำสารละลายที่พีซีอาร์ไปใส่เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) โดยตั้งค่า สภาวะของปฏิกิริยาดังนี้ ปฏิกิริยา Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ปฏิกิริยา Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ ปฏิกิริยา Annealing อุณหภูมิ T_m องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์) นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ ปฏิกิริยา Extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที่ จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยา Final extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ

ทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วย 1.5% Agarose gel ที่ผสม Gelstar® Nucleic Acid Gel Stain 1 ไมโครลิตร ในสารละลาย 0.5X TBE buffer โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร โดยตั้งค่าชุดตรวจสอบดีเอ็นเอสนามไฟฟ้า (Electrophoresis chamber set) ให้มีความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 100

โวลต์ นาน 30 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp+1500 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) แล้วบันทึกภาพ จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือ 30 ไมโครลิตรมาทำ ส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท Bioneer ประเทศเกาหลี

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank และจัดทำ Phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อ 3 ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ใน NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อหาชนิดของสาหร่ายที่มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายตัวอย่างโดยเลือกชนิดสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีค่า E value และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่มากที่สุด 20 อันดับแรก จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้างต้น มา alignment และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน X (https://www.megasoftware.net/) คำนวณแบบจำลอง สร้าง Phylogenetic tree และแสดงผล Phylogenetic tree

ผลการศึกษา

4.1 การศึกษาสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา

จากการศึกษาสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* โดยใช้ตัวอย่างไลเคนทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ Tre18S_N2.for และ 18H มี target size ยาว 700-800 bp พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสาหร่ายได้ 11 ตัวอย่างได้แก่ น่าน 3 ตัวอย่าง ระยอง 3 ตัวอย่าง หนองบัวลำภู 1 ตัวอย่าง และ กระบี่ 2 ตัวอย่าง โดยได้กำหนดรหัสสาหร่ายที่ได้จากตัวอย่างไลเคนแต่ละตัวอย่างดังตารางที่ 4 และในตำแหน่งยีน *rbc*L ซึ่งใช้ไพรเมอร์ rbcL203F และ rbcL901R มี target size ยาว 800-900 bp พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสาหร่ายได้ 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ระยอง 3 ตัวอย่าง หนองบัวลำภู 1 ตัวอย่าง และ กระบี่ 2 ตัวอย่าง

จากตารางที่ 4 ตัวอย่างสาหร่ายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน 18S rDNA ได้มีทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ได้แก่ BR01, BR02, BR03, BR04, BR05, NANA0, NANA1, NANA2, NBP1, KB และ KB2 และตัวอย่างสาหร่ายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *rbc*L ได้มีทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ BR01, BR02, BR03, BR04, BR05, NBP1 KB และ KB2 ซึ่งสาหร่ายที่เพิ่มปริมานดีเอ็นได้ทั้ง 2 ตำแหน่งยีนได้แก่ BR01, BR02, BR03, BR04, BR05, NANA0, NANA1, NANA2, KB และ KB2

ตารางที่ 4 ตัวอย่างสาหร่ายที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *rbc*L และ 18S rDNA ได้

ตัวอย่างไลเคน	รหัสสาหร่าย	*rbc*L	18S rDNA
Trypethelium eluteriae	BR01	-	✓
Trypethelium eluteriae	BR02	-	✓
Trypethelium eluteriae	BR03	-	✓
Trypethelium eluteriae	BR04	✓	✓
Trypethelium eluteriae	BR05	✓	✓
Trypethelium eluteriae	NANA0	✓	✓
Trypethelium eluteriae	NANA1	✓	✓
Trypethelium eluteriae	NANA2	✓	✓
Trypethelium eluteriae	NBP1	✓	✓
Trypethelium eluteriae	KB	✓	✓
Trypethelium eluteriae	KB2	✓	✓

ตัวอย่างไลเคน	รหัสสาหร่าย	*rbc*L	18S rDNA
Trypethelium eluteriae	RAT50	-	-
Trypethelium eluteriae	PAR49	-	-
Trypethelium eluteriae	NAN59	-	-
Trypethelium eluteriae	NAN90	-	-
Trypethelium eluteriae	TLN3	-	-
Trypethelium eluteriae	TAK49	-	-
Trypethelium eluteriae	PL35	-	-

4.2 การคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากการทำ DNA sequencing ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA ดังตารางที่ ก1 (ภาคผนวก ก) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากการทำ DNA sequencing ที่ตำแหน่งยีน *rbc*L ดังตารางที่ ก2 (ภาคผนวก ข) นำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบเพื่อหาชนิดของสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างสาหร่ายที่โครงงานวิทยาศาสตร์นี้ทำการศึกษามากที่สุด โดยใช้โปรแกรม nucleotide BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) โดยจะแสดงผลเป็นชื่อสาหร่ายและ %similarity ที่มีค่ามากที่สุดอันดับแรก ดังตารางที่ 7 และจะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายในฐานข้อมูลใน 20 อันดับแรกมาพิจารณาในการจัดทำ Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA เวอร์ชัน X

ตารางที่ 5 ชนิดของสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA

ไลเคน	**รหัสสาหร่าย**	**ยีน** 18S rDNA		
		ชนิดสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank (Accession no.)	%Similarity	E value
Trypethelium eluteriae	NANA0	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	NANA1	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	NANA2	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	BR01	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	BR02	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	BR03	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	BR04	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	BR05	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	NBP1	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	KB	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0
	KB2	*Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1)	100%	0.0

จากตารางที่ 5 ในตำแหน่งยีน 18s rDNA สาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ในตัวอย่าง **11** ตัวอย่างได้แก่ BR01, BR02, BR03, BR04, BR05, NANA0, NANA1, NANA2, NBP1, KB และ KB2 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank คือ *Trentepohlia* cf. *annulata* มากที่สุดโดยมีค่าความเหมือน 100%

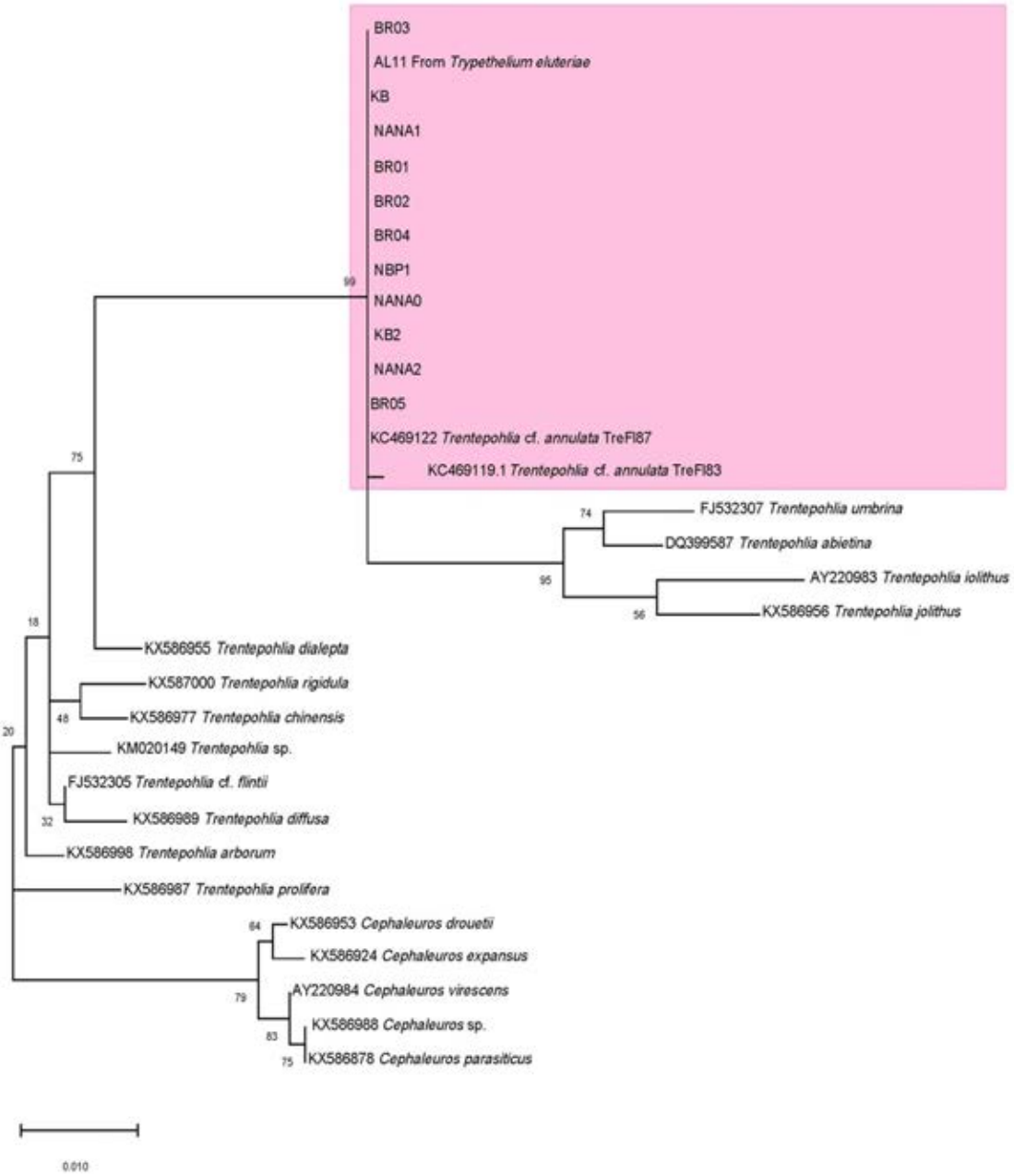
ส่วนในตำแหน่งยีน *rbc*L ตัวอย่างสาหร่าย BR01, BR02, BR03, BR04, BR05, NBP1, KB และ KB2 ไม่พบความคล้ายคลึงกับสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank แต่พบว่ามีความคล้ายคลึงกับชนิดของต้นไม้ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ชนิดของต้นไม้จากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ตำแหน่งยีน *rbc*L

ไลเคน	**รหัสสาหร่าย**	**ยีน *rbc*L**		
		ชนิดสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank (Accession no.)	%Similarity	E value
Trypethelium eluteriae	NANA0	-	-	-
	NANA1	-	-	-
	NANA2	-	-	-
	BR01	*Intsia bijuga*	100%	0.0
	BR02	*Intsia bijuga*	99.63%	0.0
	BR03	*Intsia bijuga*	100%	0.0
	BR04	*Intsia bijuga*	99.82%	0.0
	BR05	*Intsia bijuga*	99.84%	0.0
	NBP1	*Mangifera indica*	100%	0.0
	KB	*Litsea morrisonensis*	99.87%	0.0
	KB2	*Laurus* sp.	99.70%	0.0
	RAT50	-	-	-
	PAR49	-	-	-
	NAN59	-	-	-
	NAN90	-	-	-
	TLN3	-	-	-
	TAK49	-	-	-

4.3 **การวิเคราะห์โดย** Phylogenetic tree

ตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมดที่ได้จากการ BLAST นำมาจัดทำ phylogenetic analysis แสดงผลเป็น phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) โดยรูปแบบที่เหมาะสมที่สุดที่จากการคำนวณโปรแกรม MEGA เวอร์ชั่น X คือ Kimura 2-parameter model +G +I และใช้ค่า bootstrap value เป็น 1000 pseudoreplicates



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA โดยใช้รูปแบบ Kimura 2-parameter model +G +I และใช้ค่า bootstrap value เป็น 1000 pseudoreplicates

จากภาพที่ 3 เป็น phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ยีน 18S rDNA ของสาหร่าย BR01, BR02, BR03, BR04, BR05, NANA0, NANA1, NANA2, NBP1, KB และ KB2 รวมถึงเปรียบเทียบกับตัวอย่าง AL11 ซึ่งเป็นตัวอย่างสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* (Potising, 2017) จากผลการศึกษาพบว่า

Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ยีน 18S rDNA ของสาหร่าย BR01, BR02, BR03, BR04, BR05, NANA0, NANA1, NANA2, NBP1, KB, KB2 และ AL11 ซึ่งพบว่าสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* มีความเหมือนกับ *Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI83 โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 99 (กล่องสีชมพู)

อภิปรายผลการศึกษา

โครงงานวิทยาศาสตร์นี้ได้ทำการศึกษาสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา (molecular technique) เพื่อหาความสัมพันธ์วงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลเปรียบเทียบกับสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน 18S rDNA และ *rbc*L โดยตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากไลเคนที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีทั้งหมด 18 ตัวอย่าง

อดีตมีการศึกษาสาหร่ายอยู่ในไลเคนวงศ์ Trypetheliaceae ในประเทศไทย โดยตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากไลเคนที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีทั้งหมด 4 สกุล คือ *Trypethelium, Astrothelium, Nigrovothelium* และ *Viridothelium* โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยาพบว่ามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่ายทั้งหมด 12 สกุล ได้แก่ สาหร่ายในสกุล *Chlamydomonas, Halosarcinochlamys, Dunaliella, Hamakko, Trebouxia, Trentepohlia, Coccomyxa, Symbiochloris, Dictyochloris, Cephaleuros, Ulva* และ *Printzina* (Potising, 2017) ซึ่งพบความหลากหลายของสาหร่ายในระดับวงศ์

ในระดับสกุลจากรายงานการศึกษาสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน ITS rDNA ในไลเคนสกุล *Cladonia* ซึ่งมีสปีชีส์ *Cladonia crinite, Cladonia fissidens, Cladonia perforate* และ *Cladonia verticillaris* (Cordeiro et al., 2005) พบว่าเป็นสาหร่ายชนิดเดียวกันคือ *Asterochloris sp.* รวมถึงจากรายงานการศึกษาสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน SSU, ITS และ *rbc*L ในสาหร่ายสกุล *Roccella* ที่เก็บจากเขตร้อนและเมดิเตอร์เรเนียน (Hametner and Grube, 2014) พบว่าเป็นชนิด *Trentepohlia* sp. ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายในไลเคนสกุลเดียวกันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำมาก

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาความสัมพันธ์วงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA พบว่าเป็นชนิด *Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 ทั้งหมดทุกตัวอย่าง โดยมีค่าความเหมือน 100% และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI83 ซึ่งสาหร่าย *Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 มีรายงานพบว่าเป็นสาหร่าย (photobiont) ที่อยู่ร่วมกับรา (mycobiont) แล้วอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยเป็นไลเคน ซึ่งในการศึกษาพบว่าสาหร่ายสีเขียวพวกนี้เมื่อมีการกระจายสปอร์จะสามารถทำให้เกิดปรากฏการณ์ฝนสีเลือดหรือฝนสีแดงได้ ซึ่งเคยเกิดในประเทศอินเดีย จากตำแหน่งยีน 18SrDNA พบว่าสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ทุกตัวอย่างเป็นสาหร่ายชนิดเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาสาหร่ายในไลเคน *Graphis scripta* ได้ตัวอย่างจากประเทศออสเตรียและอิตาลี จากการศึกษาชนิดของสาหร่ายด้วยตำแหน่งยีน 18S rRNA, ITS, *rbc*L พบว่าเป็นสาหร่ายชนิดเดียวกันคือ *Printzina lagenifera*

(Hametner and Grube, 2014) รวมถึงผลการศึกษาสาหร่ายในไลเคน *Ramalina peruviana* ที่เก็บจากสถานที่ต่างกันในบราซิล จากการศึกษาชนิดของสาหร่ายด้วยตำแหน่งยีน ITS rDNA พบว่า เป็นสาหร่ายชนิดเดียวกันคือ *Trebouxia* sp. (Cordeiro et al., 2005) ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าในสาหร่ายที่อยู่ใน ไลเคนชนิดเดียวกันแม้จะเก็บจากต่างที่กัน แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่อยู่ในไลเคนชนิดเดียวกันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาความสัมพันธ์วงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่ตำแหน่งยีน *rbc*L พบว่าลำดับของ นิวคลีโอไทด์เป็นชนิดของต้นไม้ ซึ่งชนิดของต้นไม้ก็แตกต่างกันตามแหล่งที่เก็บ แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งยีน *rbc*L ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญในการดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่มีคลอโรพลาส (Freeman, 2008) เนื่องจากเป็นยีนสำคัญในกระบวนการที่สร้าง ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และมีปริมาณมากที่สุดในโลก (Geilly, Taberlet, 1994) ดังนั้นจึงเป็นยีนถูกใช้ในการหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีคลอโรพลาสทุกชนิด ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่าย และพืช แสดงให้เห็นว่ายีน *rbc*L ไม่จำเพาะต่อชนิดของสาหร่ายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งตัวอย่างไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่โครงงานวิทยาศาสตร์นี้ใช้เป็นไลเคนที่อาศัยอยู่บนเปลือกไม้ ส่งผลให้เกิดการปะปนดีเอ็นเอของพืช ดังนั้นผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *rbc*L ของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ซึ่งเป็นชนิดของต้นไม้ในทุกตัวอย่างที่เก็บมา ได้แก่ ตัวอย่างจากบึงจำรุง 4 ตัวอย่างเป็น *Intsia bijuga* หรือหลุมพอทะเล ตัวอย่างจากหนองบัวลำภู 1 ตัวอย่างเป็น *Mangifera indica* หรือมะม่วง ตัวอย่างจากกระบี่ 2 ตัวอย่างเป็น *Litsea morrisonensis* และ *Laurus* sp. หรือ หมีเหม็น และกระวาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในการศึกษาครั้งต่อไป หากจะใช้ตำแหน่งยีน *rbc*L ควรใช้ไลเคนจากบริเวณอื่น เช่น โขดหิน พื้นดิน เป็นต้น เพื่อที่จะไม่ให้มีดีเอ็นเอของต้นไม้ปะปนมา หรือหากไลเคนนั้นมีที่อยู่แค่บนเปลือกไม้ ควรแยกสาหร่ายออกจากไลเคนก่อนจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้สาหร่ายบริสุทธิ์ จะทำให้การหาชนิดของสาหร่ายในไลเคนไม่มีดีเอ็นเอของต้นไม้ที่ไลเคนอาศัยอยู่ปะปนมาด้วย แต่ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยการนำไลเคนมาแยกสาหร่ายออกจากราและทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยการปรับอุณหภูมิ แสง และปัจจัยอื่นๆให้มีความใกล้เคียงกับสภาพถิ่นที่อยู่ของไลเคนที่เก็บมา แต่ยังไม่สำเร็จเพราะการแยกสาหร่ายออกจากราทำได้ยาก (Grube and Muggia, 2010) รวมถึงขั้นตอนในการแยกสาหร่ายออกราในไลเคนมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ดังนั้นใช้ตำแหน่งยีนอื่นๆ อาจจะเป็นอีกหนึ่งวิธีที่เหมาะสม ทั้งนี้มีรายงานว่าสามารถหาชนิดของสาหร่ายในไลเคนโดยใช้ตำแหน่งยีน ITS โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะ ITS5 และ ITS 4 ซึ่งพบว่าตำแหน่งยีน ITS เป็นตำแหน่งที่เหมาะสมในการหาชนิดของสาหร่ายในไลเคน (Hametner and Grube, 2014) ทั้งนี้ในยืนยันชนิดของสาหร่ายในไลเคน ในการศึกษาครั้งต่อไปควรใช้ตำแหน่งยีนอย่างน้อย 2 ตำแหน่งเพื่อยืนยันชนิดของสาหร่ายได้ชัดเจนมากขึ้น

จากผลการศึกษาจะเห็นว่าตัวอย่างสาหร่ายทุกตัวอย่างเป็นชนิดเดียวกัน จึงสามารถบอกได้ว่าสาหร่ายที่อยู่ในไลเคนสปีชีส์เดียวกันเป็นสาหร่ายชนิดเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าไม่มีความหลากหลายของสาหร่ายในไลเคนชนิดเดียวกัน รวมทั้งมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่ายที่พบในไลเคนชนิดใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของสาหร่ายชนิดนี้ที่จะอยู่ร่วมกับราแบบพึ่งพาอาศัยแล้วเกิดเป็นไลเคน ซึ่งสามารถเชื่อถือได้เพราะมีค่า bootstrap value ค่อนข้างสูงถึง 99 แต่ทั้งนี้หากต้องการเห็นความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* อาจจะต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นหรือใช้ตำแหน่งยีนมากกว่า 1 ตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาจากโครงงานนี้ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการทำงานวิจัยในโอกาสต่อไปได้เพราะเป็นโครงงานแรกที่ศึกษาสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ในประเทศ

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา (molecular technique) ซึ่งพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *rbc*L และ 18S rDNA โดยตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากไลเคนที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 18 ตัวอย่าง

วิเคราะห์ความหลากหลายของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA พบว่าสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ในทุกตัวอย่างรวม 11 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ได้แก่ ตัวอย่างจากบึงจำรุง จังหวัดระยอง 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากจังหวัดน่าน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากจังหวัดหนองบัวลำภู 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากจังหวัดกระบี่ 2 ตัวอย่าง เป็นชนิดเดียวกันทั้งหมด คือ *Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI87 (KC469122.1) แสดงให้เห็นว่า ไม่มีความหลากหลายของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae*

วิเคราะห์ความหลากหลายของสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่ตำแหน่งยีน *rbc*L พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้ได้แต่ไม่พบสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่พบดีเอ็นเอของพืชที่ไลเคน *Trypethelium eluteriae* อาศัยอยู่แทน ได้แก่ ตัวอย่างจากบึงจำรุง 4 ตัวอย่างเป็น *Intsia bijuga* หรือหลุมพอทะเล ตัวอย่างจากหนองบัวลำพู 1 ตัวอย่างเป็น *Mangifera indica* หรือมะม่วง ตัวอย่างจากกระบี่ 2 ตัวอย่างเป็น *Litsea morrisonensis* และ *Laurus* sp. หรือ หมีเหม็น และ กระวาน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความไม่จำเพาะของยีน *rbc*L ต่อสาหร่ายในไลเคน *Trypethelium eluteriae*

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลจาก Phylogenetic tree ของสาหร่ายที่ได้จากยีน 18S rDNA มี 11 ตัวอย่าง คือสาหร่ายที่พบในไลเคน *Trypethelium eluteriae* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trentepohlia* cf. *annulata* TreFI83 ซึ่งเป็นสาหร่ายในไลเคนเช่นเดียวกัน

การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ในประเทศไทย ทำให้ทราบว่าในระดับสปีชีย์ไม่มีความหลากหลายของสาหร่ายในไลเคน และทำให้มีข้อมูลที่เฉพาะเจาะจงมากขึ้นในการเลือกใช้ตำแหน่งยีนเพื่อระบุชนิดของสาหร่ายในระดับสปีชีส์ได้เหมาะสมมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

มหาวิทยาลัยรามคำแหง. *ไลเคนคืออะไร.* [ออนไลน์]. 2558. แหล่งที่มา http://www.lichen.ru.ac.th/images/lichen/cross-section.png [13 ตุลาคม 2561]

Aburai, N., Ohkubo, S., Miyashita, H. and Abe, K. 2013. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. *Algal Research* 2(3) :237-243.

Ahmadjian, V. 1958. A guide for the identification of algae occurring as lichen symbionts. *BotaniskaNotiser* 111 : 632–644.

Ahmadjian, V. 1967. A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia* 6 : 127–160.

Ahmadjian, V. 1993. *The Lichen Symbiosis*. New York: John Willey and Sons, Inc.

Aptroot, A., Lücking, R., Sipman, H.J.M., Umaña, L. and Chaves, J.L. 2008. Pyrenocarpous lichens with bitunicate asci: a first assessment of the lichen biodiversity inventory of Costa Rica. *Bibliotheca Lichenologica* 97 : 1-162.

Collin, C.R. and Farrar, J.F. 1978. Structural resistances to mass transfer in the lichen *Xanthroria parietina*. *New Phytologist* 81 : 71-83.

Cubero, O. F. and Crespo, A. 2002. Isolation of nucleic acids from lichens. *In Protocols in Lichenology Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring* (I. Kranner,R. P. Beckett & A. K. Varma, eds) : 381-392. Berlin : Springer.

Freeman, D. 2008. Studying and Treating Schizophrenia Using Virtual Reality: A New Paradigm. *Schizophrenia Bulletin* 34(4) : 605-610.

Friedl, T. and Büdel, B. 1996. Photobionts. In T.H. Nash (ed.), *Lichen Biology*, pp.8-23. Cambridge : Cambridge University Press.

Gargas, A. and DePriest, P.T. 1996. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from Intron–containing SSU rDNA. *Mycologia* 88 : 745–8.

Gielly, L. and Taberlet, P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbc*L sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11(5) : 769-777.

Grube, M. and Muggia, L. 2010. Identifying algal symbionts in lichen symbioses. In Nimis, PL. and Vignes Lebbe, R. (eds.), *Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems,* pp.295-299. Paris : Proceedings of the International Congress.

Guzow-Krzeminska, B. 2006. Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. *Lichenologist* 38 : 469–476.

Hale, M.E. 1983. *The biology of lichens.* London : Edward Arnold.

Hamby, K., Sims, L., Issel, L. and Zimmer, A.E. 1988. Direct ribosomal RNA sequencing: Optimization of extraction and sequencing methods for work with higher plant. *Plant Molecular Biology Reporter* 6(3):175-192.

Hametner, C., Stocker-Wörgötter, E., Rindi, F. and Grube, M. 2014. Phylogenetic position and morphology of lichenized *Trentepohliales* (Ulvophyceae, Chlorophyta) from selected species of Graphidaceae. *Phycological Research* 63 : 170-186.

Hawksworth, DL. and Honegger, R. 1994. The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gall producers. *The Systematics Association Special Volume.* Williams MAJ (ed.), pp.77–98. Clarendon Press : Oxford.

Helms, G., Friedl, T., Rambold, G. and Mayrhofer, H. 2001. Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *Lichenologist* 33 : 73–86.

Honegger, R. 1991. Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Review of Plant Biology* 42 : 553–578.

Honegger, R. 2008. Morphogenesis. In T.H. Nash (ed.), *Lichen biology*, pp.69-93. Cambridge : Cambridge University Press.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. and Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*, pp.244-250, 707. Wallingford : CAB International.

Kroken, S. and Taylor, J.W. 2000. Phylogenetic species, reproductive mode and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* 103 : 645–660.

Larson, D.W. 1987. Biolith. *Lichen* 25 : 351-360.

Lucimara, M.C.C., Rodrigo, A.R., Leonardo, M.C., Elfriede, S.W., Martin, G., and Marcello, I. 2005. Molecular studies of photobionts of selected lichens from the coastal vegetation of Brazil. *FEMS Microbiology Ecology* 54 : 381-390

Lücking, R., Hodkinson, B., and Leavitt, SD. 2017. The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota–Approaching one thousand genera. *The Bryologist* 119 : 361-416.

Nash, A. 1996. Population geography. *Progress in Human Geography* 20(2) : 203-214.

Nielsen, M.W., Sternberg, C., Molin, S. and Regenberg, B. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *Journal of Visualized Experiments* 15(47) : 2383.

Oliveira, P.M.F., Timsina, B. and Piercey-Normore, M.D. 2012. Diversity of *Ramalina sinensis* and its photobiont in local populations. *Lichenologist* 44 : 649–660.

Peršoh, D., Beck, A. and Rambold, G. 2004. The distribution of ascus types and photobiontal selection in *Lecanoromycetes* (Ascomycota) against the background of a revised SSU nrDNA phylogeny. *Mycological Progress* 3 : 103–121.

Phokaeo, S., et al. 2013. Pyrenolichens producing hyaline ascospore from the preliminary study the island of Thailand. *Thai Journal of Botany* 5 : 63-73.

Purvis, A., Jones, K.E. and Mace, G.M. 2000. Extinction. *Bio essay* 22 : 1123-1133.

Rankovic, B. and Kosanic, M. 2015. Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. In Rankovic, B. (ed.), *Lichen Secondary Metabolites,* pp.1-26. USA : Springer.

Sanders, W.E. 2001. Preliminary light microscopic observations of fungal and algal colonization and lichen thallus initiation on glass slides placed near foliicolous lichen communities within a lowland tropical forest. *Symbiosis* 31 : 85-94.

Seaward, M.R.D. 1997. Intl. *Biodet Biodeg* 40 : 269-273.

Suchada Potising. Molecular phylogeny of algal photobiont in lichen family Trypetheliaceae in Thailand. Thesis, Department of botany, Faculty of science, Chulalongkorn University, 2017.

Sundberg, B. 1999. *Physiological ecology of lichen growth*. PhD thesis, Department of plant Physiology, Umea, Sweden.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6 : Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 : 275-279

Tschermak-Woess, E. 1988. The algal partner. In M. Galun (ed.), *Handbook of Lichenology*, pp.39–92. Florida : CRC Press.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing for fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T. J. White (ed.), *PCR Protocols : a Guide to Methods and Applications*, pp.315–322. SanDiego : Academic Press.

Will-wolf, S., Howksworth, D.L., Mccune, B., Rosentreter, R. and Sipman, H.J.R. 2004. Lichenized fungi. In Bills, G.F. and Foster, M.S. (eds.), *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, pp. 177. China : Elsevier Academic Press.

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่ตำแหน่ง 18S rDNA

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
BR01	5' GCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAA TCCCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGTA ATCGGAATGAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGT GCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAA AAGCTCGTAGTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGTA GGCGCCACCTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGAG TCGGCGACGTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATACA CTAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAGT AATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTT GGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAA GAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAAC GATGCCGACTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGCACCTTACGAGA AATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAAT TGAC 3'	808
BR02	5' TGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGA AACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAATCCCAACTC GGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGTAATCGGAAT GAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG CCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAAAAGCTCGTA GTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGTAGGCGCCAC CTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGAGTCGGCGAC GTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATACACTAGCATG GGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAGTAATGATTAA GAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTACG GAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAAGAACGAAA GTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAACGATGCCGA CTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGT TTCTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCT 3'	781

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
BR03	5' GTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAG AAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAATCCCAACT CGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGTAATCGGAAT GAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG CCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAAAAGCTCGTA GTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGTAGGCGCCAC CTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGAGTCGGCGAC GTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATACACTAGCATG GGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAGTAATGATTAA GAGGGACAGTCGGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTACG GAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAAGAACGAAA GTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAACGATGCCGA CTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGT TTCTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAA 3'	792
BR04	5' GCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAA ATCCCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGT AATCGGAATGAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAA AAAGCTCGTAGTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGT AGGCGCCACCTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGA GTCGGCGACGTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATAC ACTAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAG TAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTT GGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAA GAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAAC GATGCCGACTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGCACCTTACGAGA AATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAGACTTAAAGGAA TTGACGGAAGGGCAGA 3'	819

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
BR05	5’ GAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAATC CCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGTAAT CGGAATGAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAAAA GCTCGTAGTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGTAG GCGCCACCTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGAGT CGGCGACGTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATACAC TAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAGTA ATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTTG GATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAAG AACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAACG ATGCCGACTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGCACCTTACGAG 3’	686
NANA0	5’ GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAC GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAATCCCAACTCGG GGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGTAATCGGAATGAG GACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTC GGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGTAGGCGCCACCTTT CTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGAGTCGGCGACGTCA CTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATACACTAGCATGGGAT GACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAGTAATGATTAAGAG GGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTACGGAA GACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTC GGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAACGATGCCGACTA GGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTC TGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTG 3’	778

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์**	**ความยาว (bp)**
NANA1	5’ CCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAA TCCCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGTA ATCGGAATGAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGT GCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAA AAGCTCGTAGTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGTA GGCGCCACCTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGAG TCGGCGACGTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATACA CTAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAGT AATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTT GGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAA GAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAAC GATGCCGACTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGCACCTTACGAGA AATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAAT TGAC 3’	807
NANA2	5’ CCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAA TCCCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGTA ATCGGAATGAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGT GCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAA AAGCTCGTAGTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGTA GGCGCCACCTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGAG TCGGCGACGTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATACA CTAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAGT AATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTT GGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAA GAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAAC GATGCCGACTAGGGATCGGAGGT 3’	711

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
NBP1	5' GCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAAA TCCCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCATCGGTCGGGTA ATCGGAATGAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGT GCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAA AAGCTCGTAGTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGTGTACTGGTA GGCGCCACCTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGGCCCGGAG TCGGCGACGTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTATGCTCTGAATACA CTAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCTGTAGATCGGAGT AATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTCTT GGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAA GAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAAC GATGCCGACTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGCACCTTACGAGA AATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAAT TG 3'	806
KB	5' TTAGGGTAGTTGCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTC CGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCA AATTACCCAAATCCCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCA TCGGTCGGGTAATCGGAATGAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGG GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTG CTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGT GTGTACTGGTAGGCGCCACCTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTG GGGCCCGGAGTCGGCGACGTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTAT GCTCTGAATACACTAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCT GTAGATCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGA GGTGAAATTCTTGGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTT TTCATTGATCAAGAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCT CGACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGC ACCTTACGAGAAATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAA ACTTAAAGGAATTGA 3'	818

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์**	**ความยาว (bp)**
KB2	5' TTAGGGTAGTTGCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTC CGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCA AATTACCCAAATCCCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCA TCGGTCGGGTAATCGGAATGAGGACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGG GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTG CTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTCGGATTTCGGGTGGTGCCTACCGGTCCGCCTTTGGT GTGTACTGGTAGGCGCCACCTTTCTGCCGAGGACGGGTTCCTGGGCTTAACTGTCTG GGGCCCGGAGTCGGCGACGTCACTTTGAGTAAATTAGGGTGTTTAAAGCAGGCTTAT GCTCTGTATACACTAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTCTATCTTGTCGGTCT GTAGATCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCGTAGTCAGA GGTGAAATTCTTGGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTT TTCATTGATCAAGAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCT CGACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGAGGTGGTTTTACGATGACCTCTCCGGC ACCTTACGAGAAATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAA ACTTAAAGGAATTGACGGAA 3'	823

ตารางที่ ก2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไลเคน *Trypethelium eluteriae* ที่ตำแหน่ง *rbc*L

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์**	**ความยาว (bp)**
BR01	5’ CCGACGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCC GTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAA GAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTCTTTGGGTTCAAGGCC CTGCGCGCTCTACGTCTGGAAGATTTGCGAATCCCTACTGCTTATATTAAAACTTTCCA GGGTCCGCCTCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCC CCTATTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATTACGGTAGAG CGGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAAT TCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCGGAAGCAATTTATAAA GCACAGGCCGAAACGGGTGAAATTAAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCGGGTACA TGTGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGCGAGAGAATTAGGAGTTCCTATCGTAAT GCATGACTACTTAACAGGGGGATTCACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGG GATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAA GAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATC ATATTCACGCTGGT 3’	776
BR02	5’ GTACTTGGACTACTGTGTGGACCGACGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGA CGATGCTACCACATCGAGCCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAG CTTACCCCTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGG GTAATGTCTTTGGGTTCAAGGCCCTGCGCGCTCTACGTCTGGAAGATTTGCGAATCCC TACTGCTTATATTAAAACTTTCCAGGGTCCGCCTCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATA AATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTA TCCGCTAAGAATTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTAC CAAAGATGATGAGAACGTGAATTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTAT TTTGTGCGGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAACGGGTGAAATTAAAGGGCATTA CTTGAATGCTACTGCGGGTACATGTGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGCGAGA GAATTAGGAGTTCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTCACCGCAAATA CTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATG CATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGC GTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTTGTAGGT 3’	809

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
BR03	5’ AGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTTGCTGGAGAAGA AAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACT AACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTCTTTGGGTTCAAGGCCCTGCGCGCTCTACG TCTGGAAGATTTGCGAATCCCTACTGCTTATATTAAAACTTTCCAGGGTCCGCCTCACG GTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTAC TATTAAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTC TTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAATTCCCAACCATTTATG CGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCGGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAA CGGGTGAAATTAAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCGGGTACATGTGAAGAAATGAT AAAAAGAGCTGTATTTGCGAGAGAATTAGGAGTTCCTATCGTAATGCATGACTACTTAA CAGGGGGATTCACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACTT CTTCACATCCATCGTGCAATGC 3’	667
BR04	5’ GCCTTGATCGTTACAGAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTTGCTGGAGAAGAA AATCAATATATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTA ACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTCTTTGGGTTCAAGGCCCTGCGCGCTCTACGT CTGGAAGATTTGCGAATCCCTACTGCTTATATTAAAACTTTCCAGGGTCCGCCTCACGG TATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTA TTAAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTT CGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAATTCCCAACCATTTATGC GTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCGGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAAC GGGTGAAATTAAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCGGGTACATGTGAAGAAATGATA AAAAGAGCTGTATTTGCGAGAGAATTAGGAGTTCC 3’	596

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
BR05	5’ CTGTGTGGACCGACGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAGAGGACGATGCTACCAC ATCGAGCCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGA CCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTCTTTGG GTTCAAGGCCCTGCGCGCTCTACGTCTGGAAGATTTGCGAATCCCTACTGCTTATATTA AAACTTTCCAGGGTCCGCCTCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTA TGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATT ACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGA GAACGTGAATTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCGGAAG CAATTTATAAAGCACAGGCCGAAACGGGTGAAATTAAAGGGCATTACTTGAATGCTAC TGCGGGTACATGTGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGCGAGAGAATTAGGAGTT CCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTCACCGCAAATACTA 3’	633
NBP1	5’ AATAAATAACAATACCGGGCTCTTCGAGCTTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAT CCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA GCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTTGGGT TGGGTCGACCGGTCCGCCTCGCGGTGTGCACCGGTCGGCTCGTCCCTTCTGTCGGC GATGCGCTCCTGGCCTTAACTGGCCGGGTCGTGCCTCCGGCGCTGTTACTTTGAAGA AATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGTATACATTAGCATGGGATAACATCATA GGATTTCGGTCCCTATTCTGTTGGCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAACAGGGACAG TCGGGGGCATTCGTATTTCATAGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAAC AACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCT CGAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCA GCGGATGTTGCTTTTAGGACTCCGCTGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTC CGGGGGGAGTATGGTCGC 3’	655

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
KB	5’ GTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCG AGCCCGTTGCTGGGGAGGAAAGTCAATTTATTGCCTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTT TTTGAAGAAGGTTCTGTTACGAACATGTTTACTTCTATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTC AAAGCTCTACGAGCTCTACGTCTGGAGGATCTGCGAATTCCTCCTGCTTATTCCAAAAC TTTCCAAGGCCCGCCCCATGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGT CGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGGTTATCCGCCAAGAACTACG GTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATTTTACCAAGGATGATGAGAA CGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCGTATTTTGTGCCGAAGCA ATTTATAAAGCGCAGGCCGAAACAGGCGAAATCAAAGGACATTACTTGAATGCTACTG CAGGTACATGCGAAGAAATGATCAAAAGGGCCGTATTTGCCAGAGAATTGGGAGTTC CTATCGTAATGCATGACTATTTAACGGGGGGATTCACTGCAAATACTAGCTTGGCTCAT TATTGCCGGGACAACGGCCTACTTCTTCACATCCATCGCGCAATGCATGCAGTTATTG ATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTTCGCGTACTGGCTAAAGCGTTACGTATGTCT GGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACCGTTG 3’	821
KB2	5’ AGCCAAGCTAGTATTTGCAGTGAATCCCCCCGTTAAATAGTCATGCATTACGATAGG AACTCCCAATTCTCTGGCAAATACGGCCCTTTTGATCATTTCTTCGCATGTACCTGCAG TAGCATTCAAGTAATGTCCTTTGATTTCGCCTGTTTCGGCCTGCGCTTTATAAATTGCTT CGGCACAAAATACGAAACGGTCTCTCCAACGCATAAATGGTTGGGAGTTCACGTTCTC ATCATCCTTGGTAAAATCAAGTCCACCACGGAGACATTCATAAACCGCTCTACCGTAGT TCTTGGCGGATAACCCCAATTTTGGTTTAATAGTACATCCCAATAGGGGACGACCATAC TTGTTCAATTTATCTCTCTCAACTTGGATGCCATGGGGCGGGCCTTGGAAAGTTTTGGA ATAAGCAGGAGGAATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGCTCGTAGAGCTTTGAACCC AAATACATTACCCACAATAGAAGTAAACATGTTCGTAACAGAACCTTCTTCAAAAAGGT CTAAAGGGTAAGCTACATAGGCAATAAATTGACTTTCCTCCCCAGCAACGGGCTCGAT GTGGTAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGGCTGGTAAGTCCATCGGTCCACACAGTA GTCCAAGTACCAG 3’	656

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 1 M Tris buffer pH 8.0

Tris base	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 0.5 M EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)

EDTA	186.10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 2X CTAB extraction buffer

1 M Tris buffer pH 8.0	20	มิลลิลิตร
NaCl	16.4	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	18	มิลลิลิตร
2% (w/v) CTAB	4	กรัม
1% (w/v) PVP-40	2	กรัม
0.2% (v/v) ß-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันจากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.4 สารละลาย PVP

1% (w/v) PVP-40	2.24	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

1.5 Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)

Chloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

1.6 TE buffer

1 M Tris buffer pH 8.0	10	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. สารเคมีในการทำพีซีอาร์ และอิเลคโตรโฟรีซิส

2.1 10X TBE (10X Tris-boric acid EDTA)

Tris (hydroxymethyl) amino methane	54	กรัม
EDTA	4.65	กรัม
กรดบอริก (boric acid)	27.50	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ

2.2 1.5% Agarose gel (w/w)

Agarose	1.5	กรัม
1X TBE	100	มิลลิลิตร

ละลาย agarose ลงใน 1X TBE แล้วให้ความร้อนระดับปานกลางด้วยไมโครเวฟให้ผง agarose ละลายจนหมด

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล: สิทธิเดช ซื่อสัตย์ศักดิ์

วันเกิด: 5 เมษายน พ.ศ. 2539

ที่อยู่ปัจจุบัน: 106/114 หมู่บ้านพฤกษาทาวน์ ถนนราชพฤกษ์ ต.บางกร่าง อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000

ประวัติการศึกษา

ชั้นประถมศึกษา: โรงเรียนปรียาโชติ

ชั้นมัธยมศึกษา: โรงเรียนตาคลีประชาสรรค์

ปริญญาตรี: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย