โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงงาน ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale

Genetic diversity of the photobionts in lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale

ชื่อนิสิต นางสาววรีพัฒน์ จิวัฒนาสุข **เลขประจำตัวนิสิต** 6032146023

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale

นางสาวรวีพัฒน์ จิวัฒนาสุข
6032146023

โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

Genetic diversity of the photobionts in lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale

Miss Raveepat Jiwatanasuk

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
For the Degree of Bachelor of Science in Botany
Genetics program, Department of Botany
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2020

ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์ (ภาษาไทย)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale
ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์ (ภาษาอังกฤษ)	Genetic diversity of the photobionts in lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale
ชื่อนิสิต	นางสาวรวีพัฒน์ จิวัฒนาสุข
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอก แสงวิเชียร
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

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

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์)

ชื่อโครงงานวิทยาศาสตร์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale
ชื่อนิสิต	นางสาวรวีพัฒน์ จิวัฒนาสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอก แสงวิเชียร
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

ไลเคนเป็นความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกันระหว่างรากับสาหร่าย สามารถเป็นดัชนีวัดมลพิษทางอากาศบ่งบอกถึงความสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบนิเวศ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่ายในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่พบในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา โดยเก็บตัวอย่างไลเคนจาก 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน และนครราชสีมา จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในตำแหน่งยีน *rbcL* และ 18S rDNA พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีน *rbcL* ได้ 12 ตัวอย่าง เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสาหร่ายสีเขียวในไลเคน *P. tinctorum* โดยมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียว *Trebouxia gelatinosa, Trebouxia anticipate*, *Trebouxia flava*, *Trebouxia corticola, Trebouxia* sp. Kirika 9651 และ *Trebouxia* sp. Kirika 9721

คำสำคัญ: ความสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ, *Parmotrema tinctorum*, สาหร่ายสีเขียว, *rbcL*

Senior Project Tittle	Genetic diversity of algae in lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale
Student name	Miss Raveepat Jiwatanasuk
Advisor	Assist. Prof. Dr. Jittra Piapukiew
Co-Advisor	Assist. Prof. Dr. Ek Sangvichien
Department	Botany
Major	Genetics
Academic Year	2020

Abstract

Lichens are symbiotic associations of fungi and green algae or cyanobacteria. They play important ecological roles in the ecosystem and are widely used as environmental bio-indicators. The aims of this research were to study the genetic diversity and to clarify phylogenetic relationship in lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale. Twenty lichen samples were collected from various locations, Chiang Rai, Chiang Mai, Lumphun and Nakhon Ratchasima, Thailand. Genetic diversity of all collected samples were studies based on *rbcL* and 18S rDNA gene fragments. The results showed that 12 samples were successfully amplified. The phylogenetic analysis revealed that diversity of photobionts was high. The photobionts obtained from this study were high similarity to *Trebouxia* species*, T. gelatinosa, T. anticipate*, *T. flava*, *T. corticola*, *T.* sp. Kirika 9651 and *T.* sp. Kirika 9721.

Keywords: Phylogenetic relationship, *Parmotrema tinctorum*, green algae, *rbcL*

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้การช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์ ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ นางสาวปวรายุ์ ปาจิตร์ ที่ช่วยให้คำแนะนำตลอดการทำโครงงานวิทยาศาสตร์และกรุณาช่วยเหลือในทุกด้านเป็นอย่างดี

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการราวิทยา และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณ โครงการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนเงินทุนในการงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยให้กำลังใจและสนันสนุนในทุก ๆ ด้านมาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนภาคพฤกษศาสตร์ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจเสมอมา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ	9
บทที่ 4 ผลการศึกษา	15
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	28
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ก	36
ภาคผนวก ข	39
ภาคผนวก ค	49
ประวัติผู้เขียน	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.1 ภาพไลเคนในแต่ละกลุ่ม	3
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างภายนอกของไลเคน	4
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ	4
ภาพที่ 2.4 ภาพตัดตามขวางแทลลัสของไลเคน	5
ภาพที่ 2.5 ภาพตัดตามขวางของไลเคน *Parmotrema tinctorum*	6
ภาพที่ 2.6 ลักษณะแทลลัสของ *Parmotrema tinctorum*	7
ภาพที่ 2.7 ลักษณะแทลลัสของ *Parmotrema tinctorum* ที่เจริญเกาะบนกิ่งไม้	8
ภาพที่ 4.1 ลักษณะตัวอย่างไลเคน *P. Tinctorum* ทั้ง 20 ตัวอย่าง	17
ภาพที่ 4.2 ภาพตัดตามขวางของไลเคน *Parmotrema tinctorum*	18
ภาพที่ 4.3 ลักษณะของเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ	19
ภาพที่ 4.4 Phylogenetic tree สาหร่ายในไลเคน *P.tinctorum* ที่ตำแหน่งยีน *rbcL* โดยใช้รูปแบบ Tamura 3 parameter model +I และใช้ค่า bootstrap bootstrap value เท่ากับ 100	20

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสและอุณหภูมิในการเข้าจับกับสายดีเอ็นเอ (Tm) ของไพรเมอร์ 13

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 13

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย 15

ตารางที่ 4.2 ตัวอย่างสาหร่ายด้วยวิธีการขูดสาหร่ายจากแทลัสของไลเคนที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *rcbL* และ 18S rDNA 21

ตารางที่ 4.3 ชนิดของสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน *rbcL* ด้วยวิธีการขูดสาหร่ายจากแทลลัสของไลเคน 23

ตารางที่ 4.4 ชนิดของสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA ด้วยวิธีการขูดสาหร่ายจากแทลลัสของไลเคน 25

ตารางที่ ข1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่ตำแหน่ง *rbcL* 39

ตารางที่ ข2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่ตำแหน่ง 18S rDNA 44

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ไลเคน (lichen) เป็นความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ระหว่างรา (lichen-forming fungi หรือ mycobiont) กับสาหร่ายหรือไซยาโนแบคทีเรีย (photobiont) (Kagami et al., 2007; Hoffman et al., 2008; Takano et al., 2008) โดยราจะมีบทบาทในการเก็บรักษาความชื้นและช่วยป้องกันอันตรายให้กับสาหร่าย หรือไซยาโนแบคทีเรีย (photobiont) ส่วนสาหร่ายจะมีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ เพื่อส่งให้ราที่อยู่ร่วมกันใช้เป็นอาหาร (Smith 1980; Tapper 1981) โดยสาหร่ายที่มีความสัมพันธ์กับราที่ก่อให้เกิดเป็นไลเคนส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (green algae) ซึ่งมีประมาณ 100 ชนิด 40 สกุล (Tschermak-Woess, 1988; Peršoh, Beck and Rambold, 2004) และราที่ก่อให้เกิดเป็นไลเคนมีทั้งหมด 19,409 ชนิด 1,009 สกุล (Feuerer & Hawksworth, 2007; Lücking et al., 2017) ในประเทศไทยมีการค้นพบไลเคนแล้ว 1,700 ชนิด (Buaruang et al., 2017) โดยในจำนวนนี้จัดเป็นไลเคนวงศ์ Parmeliaceae จำนวน 85 ชนิด ซึ่งเป็นสมาชิกของ 14 สกุล (Pooprang, 2001; Noicharoen, 2002)

Parmotrema tinctorum (Despr. ex Nylander) Hale เป็นไลเคนชนิดโฟลิโอส (foliose) ที่มีลักษณะแทลลัสเป็น สีเขียวอมเทา จัดอยู่ใน วงศ์ Parmeliaceae (Ohmura et al., 2009) ซึ่งไลเคนชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเจริญอยู่บนเปลือกไม้ของต้นไม้ที่พบในป่าพุ่ม ป่าดิบชื้น ป่าดิบเขา และป่าสน สาหร่ายที่พบในไลเคนวงศ์ Parmeliaceae เป็นสาหร่ายสกุล *Trebouxia* เพียงสกุลเดียว (Friedl 1989; Dahlkild 2001; Helms 2003; Piercey-Normore 2006) ถึงแม้จะเห็นได้ว่าการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายที่มีความสัมพันธ์แบบไลเคนจะมีน้อยกว่าความหลากหลายของราที่ก่อให้เกิดไลเคน แต่การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายเป็นเรื่องสำคัญตามกรณีศึกษาของ Toby Spirille เพราะจะทำให้ทราบถึงบทบาทของสาหร่ายที่อยู่ร่วมกับรา ซึ่งก่อให้เกิดเป็นไลเคนขึ้นในระบบนิเวศ รวมถึงทราบความสัมพันธ์ของสาหร่ายดังกล่าวในเชิงวิวัฒนาการ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวในไลเคนยังมีน้อยมาก เนื่องจากการแยกสาหร่ายในไลเคนออกจากราและการเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการนั้น ทำได้ยาก เพราะในแต่ละขั้นตอนต้องใช้เวลานานและความชำนาญเป็นอย่างมาก (Grube and Muggia, 2010) จึงจะสามารถแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ได้ เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายในแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก โดยในปัจจุบันเทคนิคทางอณูวิทยา (molecular techniques) ได้เข้ามามีบทบาทในการช่วยศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคนได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น โดยใช้เครื่องหมายทางดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มสาหร่าย (Kroken and Taylor, 2000; Helms et al.,2001; Guzow-krzeminska, 2006; Oliveira, Timsina and Piercey-Normore 2012) ดังนั้นโครงงานนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวที่อาศัย

อยู่ในไลเคน *P. tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่พบในประเทศไทย ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบถึงความหลากหลายของสาหร่ายอื่นที่แอยู่ในแทลลัสไลเคน และจะเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาหาชนิดและความสัมพันธ์ของสาหร่ายสีเขียวที่อาศัยอยู่ในไลเคน *P. tinctorum* อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และการเลี้ยงไลเคนเพื่อนำกลับเข้าสู่ในระบบนิเวศ

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่พบในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

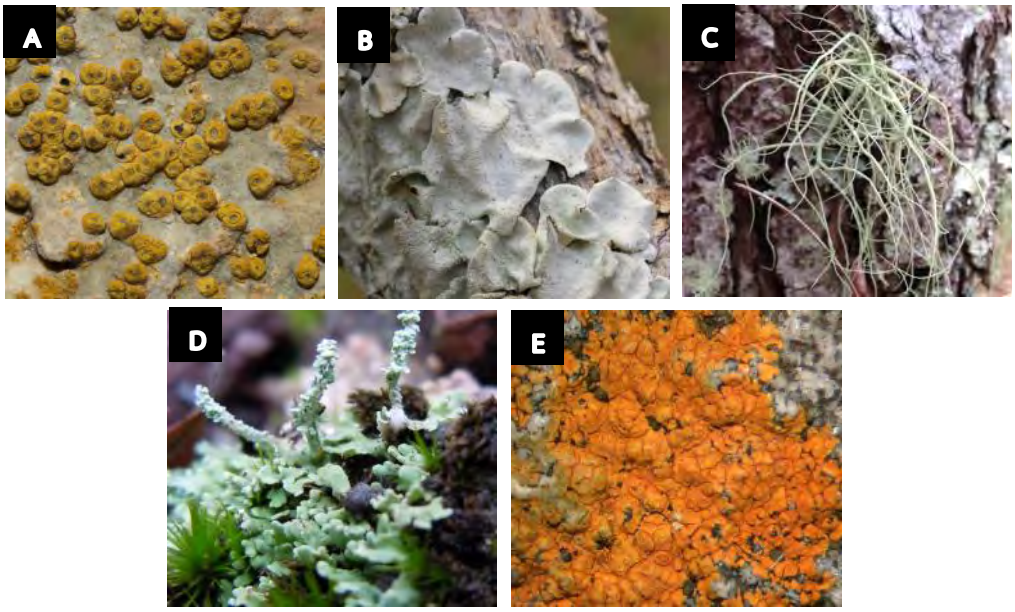
ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในไลเคนวงค์ *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่พบในประเทศไทย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ไลเคน

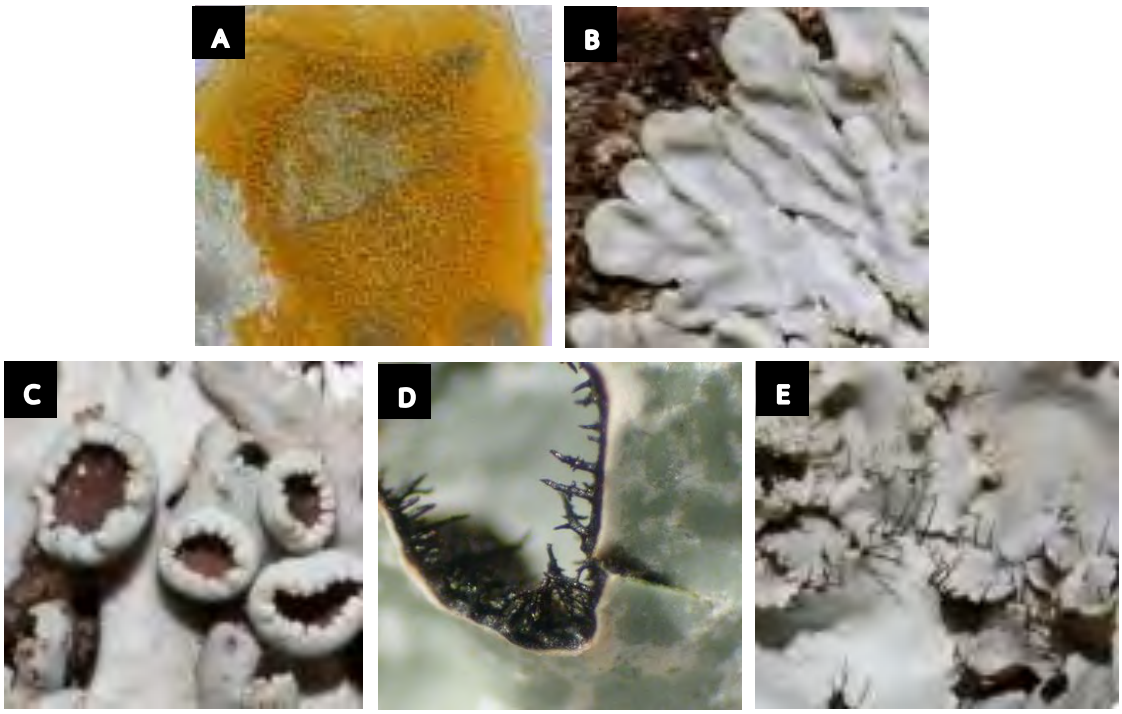
ไลเคน (lichen) เป็นความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ระหว่างรา (lichen-forming fungi หรือ mycobiont) กับสาหร่ายหรือไซยาโนแบคทีเรีย (photobiont) (Kagami et al., 2007; Hoffman et al., 2008; Takano et al., 2008) โดยราจะมีบทบาทในการเก็บรักษาความชื้นและช่วยป้องกันอันตรายให้กับสาหร่าย หรือไซยาโนแบคทีเรีย (photobiont) ส่วนสาหร่ายจะมีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ เพื่อส่งให้ราที่อยู่ร่วมกันใช้เป็นอาหาร (Smith 1980; Tapper 1981) โดยทั่วไปไลเคนแบ่งรูปแบบการเติบโตออกเป็น 5 กลุ่ม หลัก ๆ คือ กลุ่มฝุ่นผง (crustose) กลุ่มแผ่นใบ (foliose) กลุ่มเส้นสาย (fruticose) กลุ่มต้นไม้เล็ก (Squamulose) และกลุ่มพลาคอยด์ (Placoid) ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ภาพไลเคนในแต่ละกลุ่ม **A** กลุ่มฝุ่นผง (crustose); **B** กลุ่มแผ่นใบ (foliose); **C** กลุ่มเส้นสาย (fruticose); **D** กลุ่มต้นไม้เล็ก (Squamulose) และ **E** กลุ่มพลาคอยด์ (Placoid)
(ที่มา: สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2558: ออนไลน์)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของไลเคนสามารถสังเกตได้จาก แทลลัส (thallus), โลบ (lobe) แอสโคคาร์ป (ascocarp) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบอาศัยเพศ จะพบไรซีน (rhizine) หรือ holdfast ที่เป็นลักษณะคล้ายรากอยู่ด้านล่างของแทลลัสพวกโฟลิโอส และขนเซลล์ (cilia) ดังรูปที่ 2.2 ไลเคนเกิดขึ้นเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราและสาหร่าย สิ่งมีชีวิตทั้งสองจึงต้องพึ่งพาอาศัยกันเพื่อความอยู่รอด โดยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ไลเคนจะสร้างสปอร์ภายในแอสคัส และถูกพัดพาออกไปเมื่อ

อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมแล้วจะเจริญเป็นเส้นใยราจับคู่กับสาหร่ายจนเจริญเป็นแทลลัสต่อไป ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ไลเคนจะสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ ลักษณะคล้ายแท่งหรือ เป็นตุ่มนูนกลม พบบนแทลลัสกลุ่มแผ่นใบไอซิเดีย (Isidia) ฟิลลิเดีย (Phyllidia) และ ซอรีเดีย (Soredia) เมื่อหลุดออกจากแทลลัสแล้ว สามารถเจริญเป็นแทลลัสใหม่ได้ ดังรูปที่ 2.3



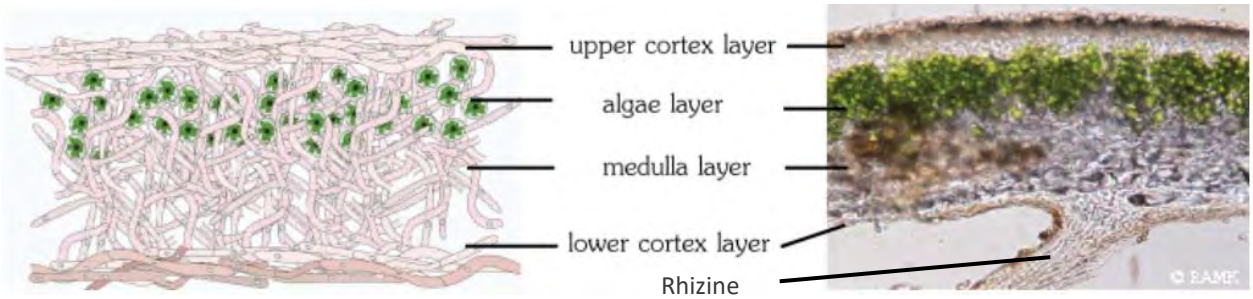
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างภายนอกของไลเคน **A** แทลลัส (thallus); **B** โลบ (lobe); **C** แอสโคคาร์ป (ascocarp); **D** ไรซีน (rhizine) และ **E** ขนเซลล์ (cilia) (ที่มา: สำนักงานความหลากหลายทางชีวภาพ,2558: ออนไลน์)

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ **A** ไอซิเดีย (Isidia); **B** ฟิลลิเดีย (Phyllidia) และ **C** ซอรีเดีย (Soredia) (ที่มา: สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2558: ออนไลน์)

โครงสร้างของไลเคนจะเรียกว่า แทลลัส (thallus) โดยแทลลัสมีสัดส่วนเป็นเส้นใยรา (mycobiont) ประมาณ 90-93% และมีสัดส่วนของสาหร่าย (photobiont) เพียง 7-10% (Collins and Farrar, 1978; Ahmadjian, 1993; Sundberg et al., 1999)

โครงสร้างภายในของไลเคนแบ่งออกได้เป็น 4 ชั้น ดังภาพที่ 2.4 ดังนี้

1. ชั้นคอร์เท็กซ์บน (upper cortex layer) เป็นชั้นที่อยู่ด้านบนสุดของแทลลัส มีหน้าที่คือป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยเฉพาะความเข้มแสงสูง และการกัดกินของสัตว์จำพวกแมลง
2. ชั้นสาหร่าย (algae layer) เป็นชั้นที่อยู่ด้านล่างของชั้นคอร์เท็กซ์ มีหน้าที่สร้างอาหารโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง สาหร่ายในชั้นนี้เรียกว่า photobiont (เรียก phycobiont สำหรับสาหร่าย และเรียก cyanobiont สำหรับ cyanobacteria/blue green algae) ไลเคนส่วนใหญ่ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ มีสาหร่ายสีเขียว (green algae) เป็นองค์ประกอบของชั้นนี้, ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobateria หรือ blue-green algae), ประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ มีทั้งไซยาแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว (cephalodiate lichens และ photosymbiodemes) และอีกน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาหร่ายสีน้ำตาล (*Petroderma* และ *Heterococcus*) (Sanders et al., 2004; Friedl & Büdel, 2008)
3. ชั้นเมดัลลา (medulla layer) เป็นชั้นของราที่อยู่ถัดจากชั้นสาหร่ายลงมา ราในไลเคนเรียกว่า mycobiont มีหน้าที่กักเก็บความชื้นและสร้างสารที่จำเป็นต่อการเติบโตและการอยู่รอดของไลเคน
4. ชั้นคอร์เท็กซ์ล่าง (lower cortex layer) เป็นชั้นที่อยู่ล่างสุดของแทลลัส มีหน้าที่ยึดเกาะกับพื้นที่ยึดเกาะอาศัย (substrate) ไลเคนบางชนิดมีชั้นนี้ แต่บางชนิดไม่มี โดยเฉพาะไลเคนในกลุ่มครัสโตส

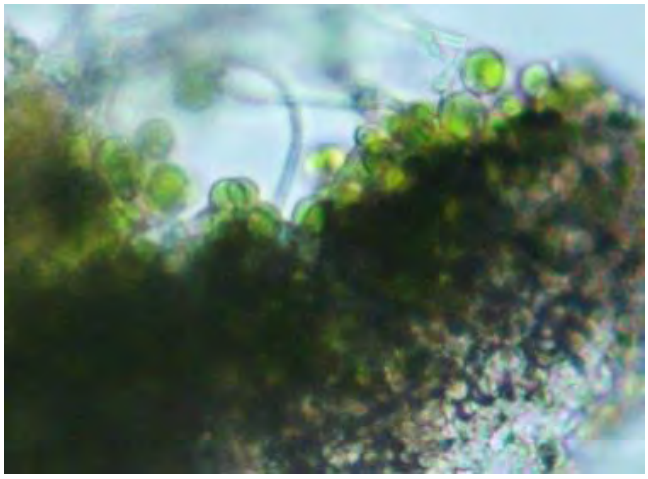


ภาพที่ 2.4 ภาพตัดตามขวางแทลลัสของไลเคนแสดงโครงสร้างภายในไลเคนแบบ heteromerous 1) ชั้นคอร์เท็กซ์บน 2) ชั้นสาหร่าย 3) ชั้นเมดัลลาและ 4) ชั้นคอร์เท็กซ์ล่าง (ที่มา: มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2558:ออนไลน์)

จากการศึกษาความหลากหลายของไลเคนโดยมีการรายงานการจัดจำแนกไลเคนล่าสุด ระบุว่าทั่วโลกมีไลเคนมีทั้งหมด 19,409 ชนิด (species) 1,009 สกุล (genera) 119 วงศ์ (families) 40 อันดับ (orders) และ 8 ชั้น (classes) (Lucking et al., 2017) ในประเทศไทยมีการค้นพบไลเคนแล้ว 1,700 ชนิด (Buaruang et al., 2017) โดยในจำนวนนี้จัดเป็นไลเคนวงศ์ Parmeliaceae จำนวน 85 ชนิด 14 สกุล (Pooprang, 2001; Noicharoen, 2002)

2.2 ความสำคัญของสาหร่ายในไลเคน

สาหร่ายที่พบในไลเคนทั่วไปคือ สาหร่ายในสกุล *Trebouxia, Trentepohlia* และ *Nostoc* โดยสาหร่ายในสกุล *Trebouxia* และ *Trentepohlia* ซึ่งคิดเป็น 85% ของสาหร่ายที่ก่อให้เกิดไลเคน ส่วนสาหร่ายในสกุล *Nostoc* เป็นพวกโปรคาริโอตและเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เรียกว่า cyanobiont (Rankovic and Kosanic, 2015) ราและสาหร่ายในไลเคนมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยราจะทำหน้าที่ปกป้องสาหร่ายจากความเข้มแสงและความชื้นที่มากเกินไป นอกจากนั้นยังดูดซึมสารอาหารจากสาหร่ายอีกส่วนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก และสาหร่ายทำหน้าที่สังเคราะห์สารอินทรีย์จากคาร์บอนไดออกไซด์ ในกรณีที่เป็น cyanobiont จะสังเคราะห์แอมโมเนียจากแก๊สไนโตรเจนโดยกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Hale, 1983; Nash, 1996) สำหรับการที่ไลเคนเจริญเติบโตได้ช้าเนื่องจากสาหร่ายที่ก่อให้เกิดไลเคนมีสัดส่วน น้อยกว่าราคือสาหร่ายผลิตอาหารเมื่อมีน้อยก็จะไม่ค่อยมีการเจริญเติบโต (Ahmadjian, 1993)



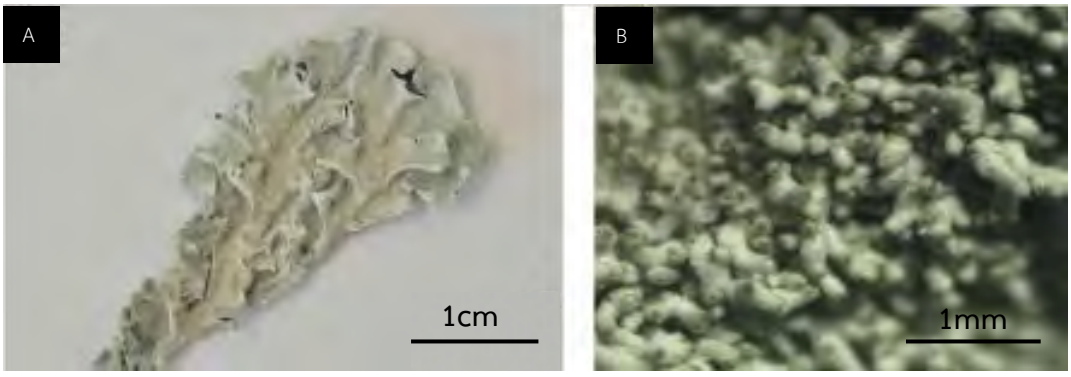
ภาพที่ 2.5 ภาพตัดตามขวางของไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale แสดงเซลล์ของสาหร่ายและเส้นใยของรา

2.3 สาหร่ายสกุล *Trebouxia*

Trebouxia เป็นสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม Chlorophyta จัดอยู่ในวงศ์ Trebouxiaceae อันดับ Trebouxiales ชั้น Trebouxiophyceae มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยว มีขนาดเล็ก พบได้ในที่อยู่อาศัยทั้งในบริเวณขั้วโลกเขตร้อนและเขตอบอุ่นในระบบนิเวศบนบก โดยสาหร่ายสกุล *Trebouxia* เป็น photobiont ที่สำคัญของไลเคนทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง สามารถผลิตและสะสมออกซิเจนในชั้นบรรยากาศ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางพัฒนาสารสกัดทางชีวภาพ การที่สาหร่ายอยู่อย่างอิสระทางธรรมชาติทำให้คงไว้ซึ่งวิวัฒนาการ สามารถรอดจากการเกษตรกรรมของมนุษย์ และสามารถฟื้นฟูวัฏจักรทางธรรมชาติ พบว่าระดับความสามารถของการอยู่รอดของ *Trebouxia* เพราะทำให้สปอร์ราซึ่งอยู่ใกล้เคียงสามารถงอกและเข้าคู่กันได้

2.4 ไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale

Parmotrema tinctorum (Despr. ex Nylander) Hale เป็นไลเคนที่จัดอยู่ในวงศ์ Parmeliaceae (Ohmura et al., 2009) มีแทลลัสชนิดโฟลิโอส (foliose) ที่มีลักษณะสีเขียวอมเทา เรียบจนถึงยับย่น ไม่เป็นเงามัน มีการเจริญแผ่เป็นแนวรัศมีเกาะกับแหล่งอาศัยแบบหลวมๆ โคโลนีโลบขอบซ้อนกัน แผ่กว้างตอนปลาย ดังภาพที่ 2.6A และมีไอซิเดีย (Isidia) เป็นทรงกระบอกสูงพบหนาแน่นตอนกลางแทลลัส ดังภาพที่ 2.6B ผิวล่างแทลลัสสีน้ำตาลอ่อนถึงสีดำ ไรซีน (rhizine) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายราก มีสีดำเป็นเส้นเดี่ยว ช่วยให้แทลลัสยึดกับแหล่งอาศัย ไลเคนชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเจริญอยู่บนเปลือกไม้ของต้นไม้ที่พบในป่าพุ่ม ป่าดิบชื้น ป่าดิบเขา และป่าสน ซึ่งเป็นพื้นที่โล่งมีแสงส่องถึงเล็กน้อยและมีความชื้นปานกลาง



ภาพที่ 2.6 ลักษณะแทลลัสของ *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale MAF-18195 A: ลักษณะแทลลัสที่มีสีเขียวอมเทา เรียบจนถึงยับย่น; B: ลักษณะของไอซิเดีย (Isidia) ที่อยู่บนแทลลัส (ที่มา: Roca-Valiente et al., 2013)

สาหร่ายที่พบในไลเคน *P. tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale เป็นสาหร่ายสีเขียวสกุล *Trebouxia* เพียงสกุลเดียว (Friedl 1989; Dahlkild 2001; Helms 2003; Piercey-Normore 2006)

เนื่องจากซึ่งเป็นสาหร่ายที่พบเฉพาะในไลเคนเท่านั้นและไม่พบอยู่อย่างอิสระตามธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างกับสาหร่ายสีเขียวในสกุลอื่น เช่น *Gleocapsa, Nostoc, Scytonema* และ *Trentepohlia* ที่สามารถดำรงชีวิตได้ทั้งในไลเคนนอกจากนี้ยังเคยมีรายงานการวิจัยว่าสามารถระบุได้เพียงแค่สกุลของสาหร่ายได้เพียงเท่านั้น เพราะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมาก โดยพบว่าสาหร่ายสกุล *Trebouxia* มีลักษณะการเรียงตัวเป็นกลุ่มตามแนวยาว ชั้นเมดัลลา (medulla layer) เป็นเส้นใยรา สีขาวสานตัวกันแน่นแบบแอนติคลินอล (anticlinal) ผิวล่างของแทลลัสเป็นสีน้ำตาลอ่อนถึงสีดำเรียบ มีไรซีน (rhizine) เป็นสีดำ เป็นเส้นเดี่ยวช่วยให้แทลลัสยึดกับแหล่งอาศัยบนกิ่งไม้ ดังภาพที่ 2.7

ภาพที่ 2.7 ลักษณะแทลลัสของ *Parmotrema tinctorum* ที่เจริญเกาะบนกิ่งไม้

2.5 การศึกษาสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวในไลเคนยังมีน้อยมาก เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายในแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกันมากจึงไม่สามารถแยกชนิดของสาหร่ายได้ ทั้งนี้เนื่องจากการแยกสาหร่ายในไลเคนออกจากราและการเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการทำได้ยากมากเพราะในแต่ละขั้นตอนต้องใช้เวลาและความชำนาญเป็นอย่างมาก (Grube and Muggia, 2010) จึงจะสามารถแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ได้ โดยในปัจจุบันใช้เทคนิคทางอณูวิทยา (molecular techniques) ในการศึกษาสาหร่ายในไลเคนมากขึ้น ทำให้สามารถทราบชนิดของสาหร่ายถึงแม้จะมีลักษณธทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาหร่ายสีเขียวนิยมทำในยีน 18S rDNA และยีน *rbcL* (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) ซึ่งเป็นยีนที่จะแปลรหัสเป็นเอนไซม์ RubisCo ที่มีอยู่ในสาหร่ายสีเขียวแต่ไม่มีในราและเป็นตำแหน่งยีนที่มีการอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในยีนอื่นควบคู่ไปด้วยเพื่อความแม่นยำ เช่น ตำแหน่ง ITS ซึ่งมีไพรเมอร์ที่จำเพาะและพบว่า ITS เป็นตำแหน่งที่เหมาะสมในการหาชนิดของสาหร่ายในไลเคน (Grube and Muggia,2010) งานวิจัยที่มีการใช้เทคนิคทางอณูวิทยาศึกษาสาหร่ายในไลเคนส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างไลเคนในเขตอบอุ่น เช่น งานวิจัยของ Yahr และคณะในปี 2015 ที่ศึกษาสาหร่ายในไลเคนสกุล *Micarea* ซึ่งใช้ตัวอย่างไลเคนที่พบในทวีปยุโรปและศึกษาโดยใช้ยีน *rcbL* และ nuclear ribosomal RNA (nucSSU rRNA)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง และขวดแก้วรูปชมพู่ เป็นต้น
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น Adventurer
- มีดโกนและคีมคีบ
- เครื่องตัดหรือหั่นชิ้นเนื้อและตัวอย่าง (Microtome)
- ไมโครเวฟ (Microwave)
- พาราฟิล์ม
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิแห้ง (Digital Dry Bath)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex Mixer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณร้อย (Micro centrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- เครื่องบด (Blender) Mixer MM 400
- หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (Micro centrifuge tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตต์ (Automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 ไมโครลิตร), P10 (0.5-10 ไมโครลิตร), P20 (5-20 ไมโครลิตร), P200 (50-200 มิลลิลิตร) และ P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร)
- ปิเปตต์ทิป (Pipette tip)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope)
- ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอสนามไฟฟ้า (Electrophoresis chamber set)
- เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (Power supply)
- เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator)
- กล้องถ่ายรูปเจล (Gel Documentation)

3.2 สารเคมี

- Tris-HCl (บริษัทแปซิฟิคไซเอ็นซ์จำกัด, ประเทศไทย)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) (HIMEDIA, India)
- Chloroform (RCl Labscan, Thailand)
- Isoamyl alcohol (Univar, New Zealand)
- Isopropanol (Univar, New Zealand)
- Ethanol (Merck, Germany)
- Ethyenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Scharlav, Spain)
- NaCl (Univar, New Zealand)
- Cetryitrimethylammoniumbromide (CTAB) (บริษัทแปซิฟิคไซเอ็นซ์จำกัด, ประเทศไทย)
- Boric acid (Merck, Germany)
- Tris (hydroxymethyl) amino methane (บริษัทแปซิฟิคไซเอ็นซ์จำกัด, ประเทศไทย)
- 1.25 U Pfu DNA polymerase (TakaRa, Japan)
- Gelstar® Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, USA)
- Agarose (1^{st} BASE, Singapore)

3.3 วิธีการดำเนินงาน

3.3.1. การเก็บรวบรวมและบันทึกข้อมูลที่สำคัญเบื้องต้นจากตัวอย่างไลเคน *P. tinctorum*

ตัวอย่างไลเคน *P. tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์มาจากหน่วยวิจัยไลเคน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย-รามคำแหงและเก็บมาจากป่าประเภทต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยเป็นตัวอย่างแห้งหรือตัวอย่างสดจำนวนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

3.3.2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum*

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคนชนิดนี้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำตัวอย่างส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสตอริโอ (Stereo Microscope) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของ thallus จากนั้นนำไปตัด cross section เพื่อหาชั้นของสาหร่ายในไลเคน โดยใช้เครื่องตัดหรือหั่นชิ้นเนื้อและตัวอย่าง (Microtome) และนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) และตรวจสอบชนิดของสาหร่าย

3.3.3. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและสังเกตรูปแบบการเจริญเติบโต

ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่แยกจากตัวอย่างไลเคนที่เก็บได้ โดยแยกสาหร่ายออกจากชั้นของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จากการหันตัวอย่างไลเคนเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ขวดแก้วขนาดเล็กด้วยอาหารเลี้ยงสูตร bold's basal medium (BBM) ในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 3 เดือน จากนั้นนำส่วนที่เป็นเฉพาะโคโลนีสีเขียวแยกออกมา 2 ไมโครลิตรไปเลี้ยงต่อในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 ml ในอาหารเลี้ยง สูตร BBM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณของสาหร่ายเป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นศึกษาลักษณะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.4. การสกัดดีเอ็นเอของสาหร่ายจากแทลลัสของไลเคน *P. tinctorum*

สกัดดีเอ็นเอของสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum* Hale ทั้ง 12 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมได้จากข้อ 3.3.2. โดยใช้วิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Grube et al. (1995) โดยเริ่มจากการขูดตัวอย่างไลเคนส่วนที่เป็นสีเขียวและหลีกเลี้ยงบริเวณที่เป็นจุดดำด้วยใบมีดโกน ส่องภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วใช้คีมคีบเม็ดบีท 10 เม็ดใส่

ในหลอด เติม 2X CTAB extraction buffer 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดไปใส่ในเครื่องบด โดยตั้งค่าเครื่องให้ความถี่เป็น 30 ครั้งต่อวินาที เป็นเวลา 2 นาที (ทำครั้งละ 1 นาที ทั้งหมด 2 ครั้ง) หากตัวอย่างยังเป็นชิ้นใหญ่อยู่ ให้นำเข้าเครื่องบดอีก 1 ครั้ง หลังจากบดเสร็จนำมาเติม 2X CTAB extraction buffer เพิ่มอีก 400 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย PVP (Washing buffer) 100 ไมโครลิตร เขย่าสารและนำไป Vortex ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หลังจากบ่มเสร็จนำมาเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 :1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 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 เป็น เวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องอีกครั้ง แล้วดูดสารละลายชั้นบนไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม isopropanol โดยใส่ในปริมาตรเป็น 0.6 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ในหลอด จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสในหลอดออกให้หมด เติม 70% ethanol 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อณุหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจากนั้น เทสารละลายในหลอดออกให้ได้มากที่สุด โดยให้ตะกอนยังติดอยู่ในหลอดแล้วนำไปทำให้แห้ง จากนั้นเติม TE buffer 50 ไมโครลิตรแล้วเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA และ ยีน *rbcL*

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.3.3 และ 3.3.4 มาทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA และ ยีน *rbcL* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะจำนวน 2 คู่ โดยที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA จะใช้ไพรเมอร์ Tre18S_N2.for (Hametner, Stocker-Worgotter and Grube, 2014) และ 18H (Hamby and Zimmer, 1988; Aburai et al. 2013) และที่ตำแหน่งยีน *rbcL* จะใช้ไพรเมอร์ rbcL203F (Nelsen et al., 2011) และ rbcL901R (Nelsen et al., 2011) ตามลำดับ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสและอุณหภูมิในการเข้าจับกับสายดีเอ็นเอ (T_m) ของไพรเมอร์

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'->3')	Tm (°C)
18S rDNA	Tre18S_ N2.for	TAGGGTAGTGGCCTACCG	55
	18H	GCCCTTCCGTCAATTCCRTTAAGTTTCAGC	
rbcL	rcbL203F	GAATCWTCWTCWACWGGWACTTGGACWAC	51
	rcbL991R	CCTTCTARTTTACCWACAAC	

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
EmeraldAmp® GT PCR Master Mix	-	15
Forward Primer	20	0.3
Reverse Primer	20	0.3
DNA template	-	3
d H_2O	-	11.4
	Total	30

จากนั้นนำสารละลายที่พีซีอาร์ไปใส่เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) โดยตั้งค่า สภาวะของปฏิกิริยาดังนี้ ปฏิกิริยา Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ปฏิกริยา Annealing อุณหภูมิ T_m องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์) นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ ปฏิกิริยา Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และปฏิกริยา Final Extension 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 โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 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 ไมโครลิตรมาทำส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท U2Bio Sequencing Service ที่ประเทศเกาหลี

3.3.6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank และจัดทำ Phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากข้อ 3.3.5 ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ใน NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อหาชนิดของสาหร่ายที่มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายตัวอย่างทั้ง 20 ตัวอย่าง โดยเลือกชนิดสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีค่า E value และเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Percent Identity) ที่มากสุด 20 อันดับแรก จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้างต้นมาจัดเรียง (alignment) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชั่น X (https://www.megasoftware.net/) โดยคำนวณแบบจำลองสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Likelihood รูปแบบ Tamura 3 parameter model + 1 โดยใช้ค่า bootstrap value เท่ากับ 100 และแสดงผล Phylogenetic tree

บทที่ 4

ผลการดำเนินการศึกษา

4.1 การเก็บรวบรวมและบันทึกข้อมูลที่สำคัญเบื้องต้นจากตัวอย่างไลเคน

จากตัวอย่างไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างไลเคนจากจังหวัดต่าง ๆ ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน และนครราชศรีมา จำนวนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย และได้รับมาจากหน่วยวิจัยไลเคนมหาวิทยาลัยรามคำแหง จำนวน 20 ตัวอย่าง

ชื่อวิทยาศาสตร์ตัวอย่างไลเคน	รหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
Parmotrema tinctorum	PT01	ป่าดิบเขา อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย ตำแหน่ง GPS: 19° 48’38.1”N 99° 33’42.5”E
	PT02	ป่าดิบเขา อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย ตำแหน่ง GPS: 19° 48’38.1”N 99° 33’42.5”E
	PT03	ป่าดิบเขา อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย ตำแหน่ง GPS: 19° 48’37.8”N 99° 33’42.5”E
	PT04	ป่าดิบเขา อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย ตำแหน่ง GPS: 20° 18’37.2”N 99° 38’43.0”E
	PT05	ป่าเต็งรัง อำเภอลี้ จังหวัดลำพูน ตำแหน่ง GPS: 17° 48’36.1”N 98° 33’38.5”E
	PT06	ป่าเบญจพรรณ อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ ตำแหน่ง GPS: 19° 48’38.1”N 99° 33’42.5”E
	PT07	ป่าเบญจพรรณ อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ ตำแหน่ง GPS: 19° 48’38.1”N 99° 33’42.5”E
	PT08	ป่าเบญจพรรณ อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ ตำแหน่ง GPS: 19° 48’38.1”N 99° 33’42.5”E

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย และได้รับมาจากหน่วยวิจัยไลเคนมหาวิทยาลัยรามคำแหง จำนวน 20 ตัวอย่าง (ต่อ)

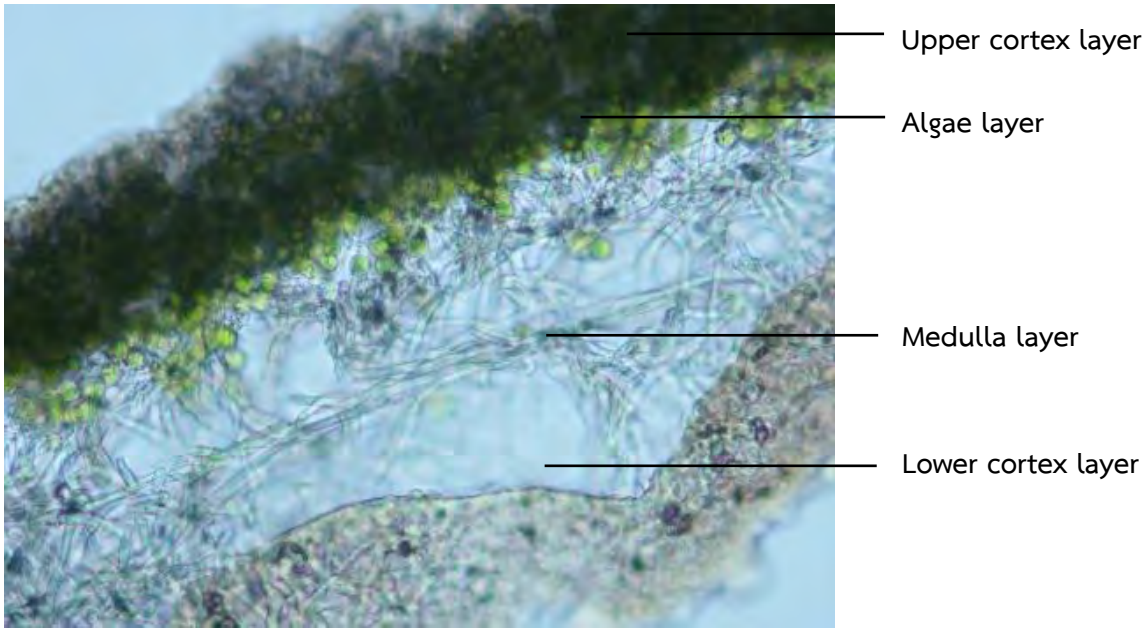
ชื่อวิทยาศาสตร์ตัวอย่างไลเคน	รหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
Parmotrema tinctorum	PT09	ป่าเต็งรัง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ตำแหน่ง GPS: 18°34’8”N 98°29’5”E
	PT10	ป่าเต็งรัง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ตำแหน่ง GPS: 18°32’51”N 98°29’4”E
	PT11	ป่าเต็งรัง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ตำแหน่ง GPS: 18°34’8”N 98°29’5”E
	PT12	ป่าเต็งรัง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ตำแหน่ง GPS: 19° 48’37.8”N 99° 33’42.5”E
	PT13	ป่าดิบเขา อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา ตำแหน่ง GPS: 14° 43’87.2”N 101° 37’23.8”E
	PT14	ป่าดิบเขา อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา ตำแหน่ง GPS: 14° 43’85.3”N 101° 37’23.4”E
	PT15	ป่าดิบเขา อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา ตำแหน่ง GPS: 14° 43’86.7”N 101° 37’23.8”E
	PT16	ป่าดิบเขา อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา ตำแหน่ง GPS: 14° 43’87.9”N 101° 37’23.8”E
	PT17	ป่าดิบเขา อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา ตำแหน่ง GPS: 14° 43’84.2”N 101° 37’23.8”E
	PT18	ป่าดิบเขา อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา ตำแหน่ง GPS: 14° 43’87.1”N 101° 37’23.8”E
	PT19	ป่าดิบเขา อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา ตำแหน่ง GPS: 14° 43’87.3”N 101° 37’23.8”E
	PT20	ป่าดิบเขา อำเภอปากช่อง จ.นครราชสีมา ตำแหน่ง GPS: 14° 43’86.7”N 101° 37’23.8”E

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างไลเคน (morphology)

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอกของตัวอย่างไลเคน แล้วพบว่ามีลักษณะเป็นแบบโฟลิโอส (foliose) ที่มีลักษณะเป็นแผ่นใบ มีปลายขอบเป็นแผ่นบาน อาจยกตัวขึ้นเหนือวัสดุหรือราบกับวัตถุยึดเกาะ แทลลัส แบบโฟลิโอส สีเขียวถึงสีเขียวอมเทา โลบ ผิวเรียบจนถึงยับย่น เจริญแผ่เป็นแนว รัศมีโลบแผ่กว้างตอนปลาย โลบขนาด 0.5-1.5 เซนติเมตร ไอซิเดียทรงกระบอก จำนวนมาก ไรซีน สีดำ เป็นเส้นเดี่ยว มีการแตกเป็นแขนงย่อย มีชั้นคอร์เท็กซ์ทั้งบนและล่างยึดเกาะ กับพื้นที่อาศัยโดยใช้เส้นใยของรา และจากการระบุชนิดพบว่าตัวอย่างที่ได้ 20 ตัวอย่าง เป็นไลเคนชนิด *P. tinctorum* จากนำไปจำแนกชนิดโดยทางสัณฐานวิทยา ด้วยการ key character (ภาคผนวก ก)

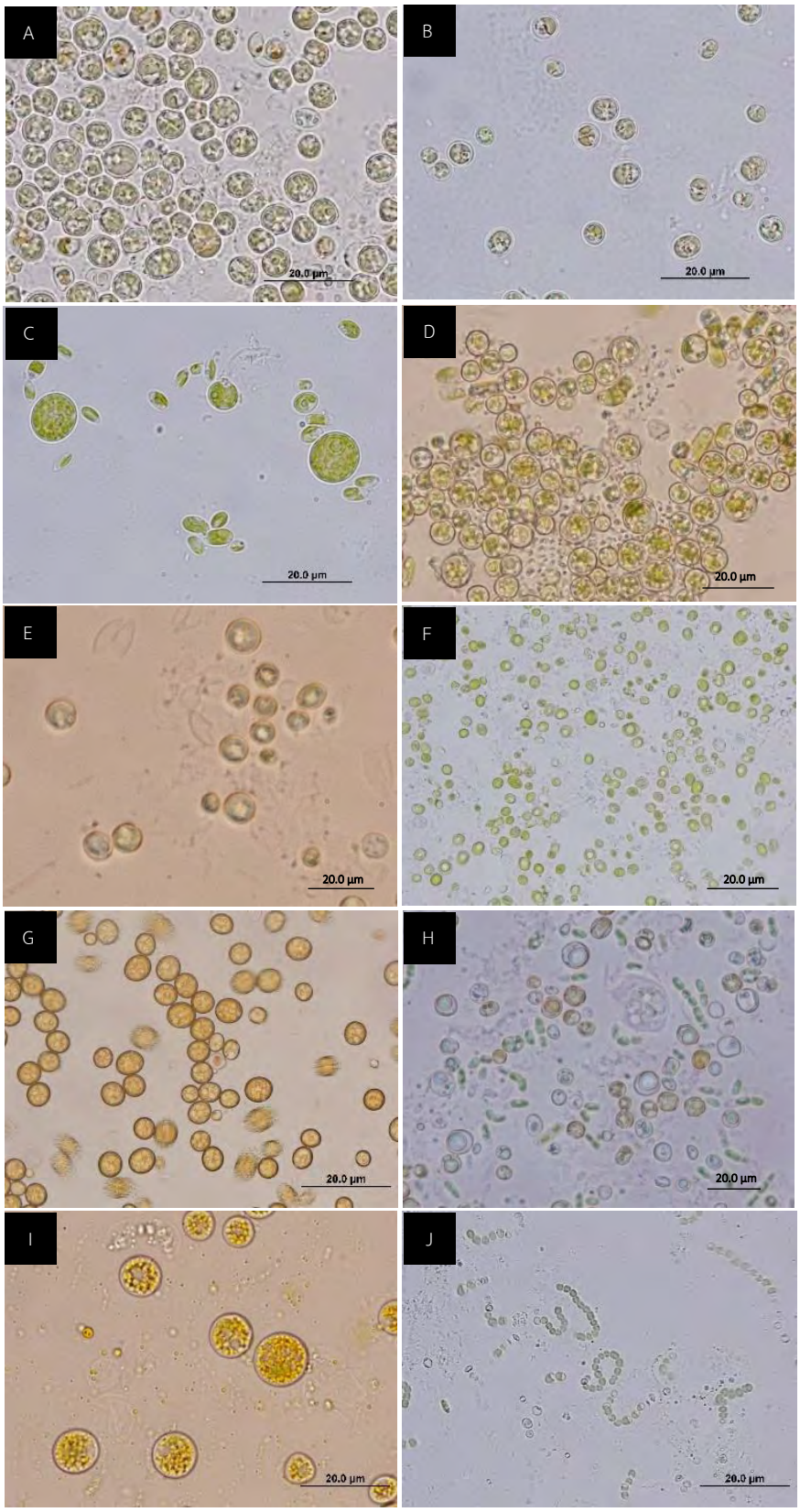
ภาพที่ 4.1 ลักษณะตัวอย่างไลเคน *P. Tinctorum* A-C) อำเภอแม่สรวย-จังหวัดเชียงราย D) อำเภอแม่ฟ้าหลวง-จังหวัดเชียงราย E) อำเภอลี้-จังหวัดลำพูน F-H) อำเภอดอยเต่า-จังหวัดเชียงใหม่ I-L) อำเภอจอมทอง-จังหวัดเชียงใหม่ M-T) อำเภอปากช่อง-จังหวัดนครราชสีมา

เมื่อได้ทำการตัด cross section จากตัวอย่างของไลเคนจะสามารถพบโครงสร้างแทลลัสของไลเคนโดยจะแบ่งออกเป็น 4 ส่วนได้แก่ ชั้น Upper cortex layer, ชั้น Algae layer, ชั้น Medulla layer และ ชั้น Lower cortex layer โดยพบว่าแทลลัสของไลเคนจะมีสัดส่วนของรา (mycobiont) ประมาณ 70-75 เปอร์เซ็นต์ และมีสัดส่วนของสาหร่าย (photobiont) ประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์

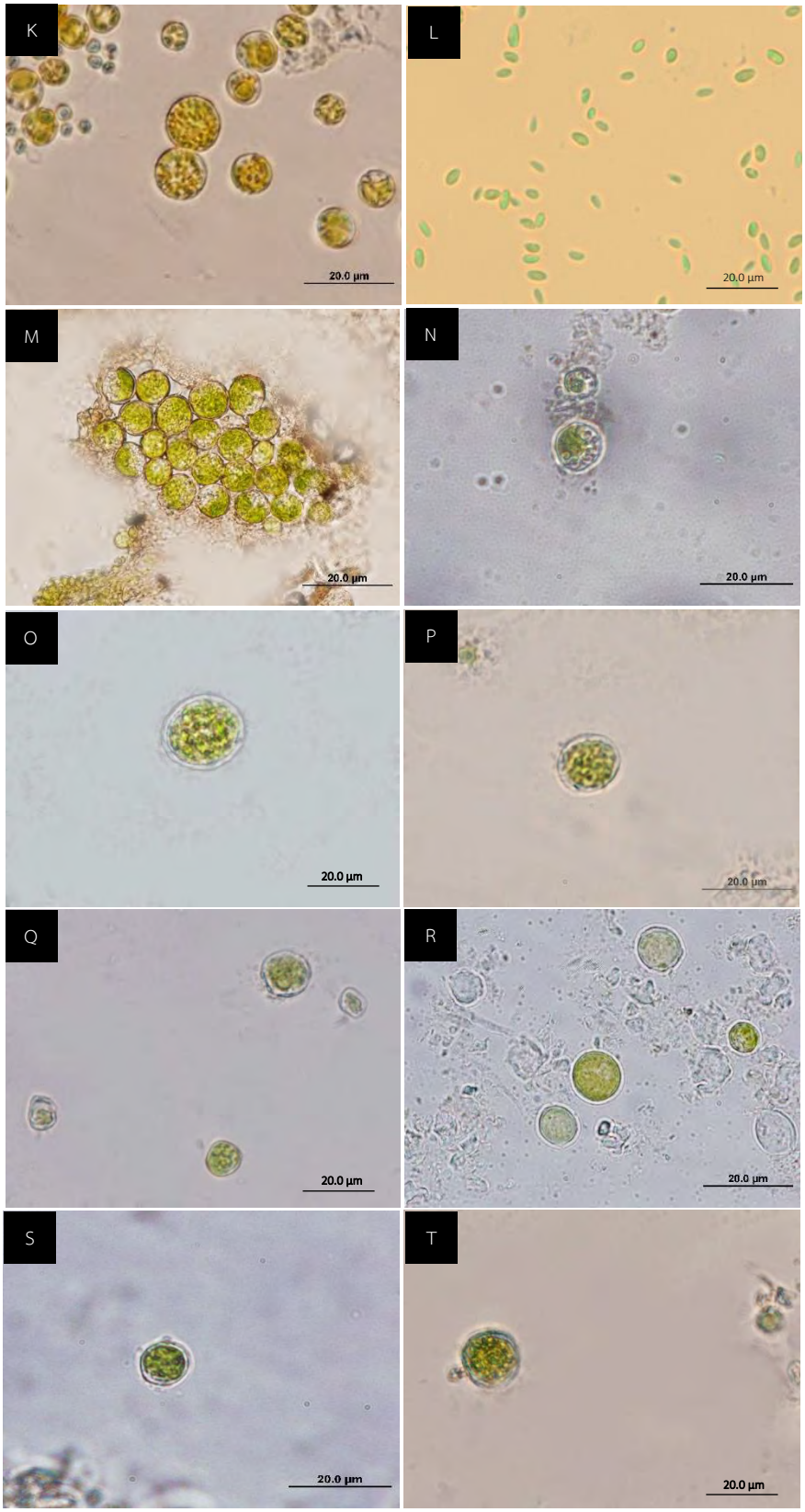


ภาพที่ 4.2 ภาพตัดตามขวางของไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale

จากการแยกสาหร่ายทั้งหมด 20 ตัวอย่างและนำไปเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 3 เดือน จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะสังเกตเห็นการเจริญเติบโตของสาหร่าย ดังภาพที่ 4.3 โดยพบว่ามีการเจริญเติบโตของสาหร่ายมีรูปร่างและลักษณะที่แตกต่างกัน สำหรับสาหร่ายที่พบส่วนมากเป็นสาหร่ายในสกุล *Trebouxia* จากผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาด้วยการ key character (ภาคผนวก ก) พบว่าสาหร่าย *Trebouxia* มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีหลายขนาด เป็นเซลล์ที่ไม่มีโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ มีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่คลุมทั่วทั้งเซลล์ และมักอาศัยอยู่กับราที่ก่อให้เกิดเป็นไลเคน จากผลการศึกษาทางสรีรวิทยาพบว่าสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงสูตร BBM ที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงที่สม่ำเสมอ และพบสาหร่ายที่แยกมาจากตัวอย่างแทลลัสไลเคนเดียวกันมากกว่า 1 ชนิด



ภาพที่ 4.3 ลักษณะของเซลล์สาหร่ายที่แยกจากไลเคน *P. tinctorum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสูตร BBM ที่อุณหภูมิ 25°C ในระยะเวลา 3 เดือน A-C) อำเภอแม่สรวย-จังหวัดเชียงราย, D) อำเภอแม่ฟ้าหลวง-จังหวัดเชียงราย, E) อำเภอลี้-จังหวัดลำพูน, F-H) อำเภอดอยเต่า-จังหวัดเชียงใหม่, I-J) อำเภอจอมทอง-จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะของเซลล์สาหร่ายที่แยกจากไลเคน *P. tinctorum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสูตร BBM ที่อุณหภูมิ 25°C ในระยะเวลา 3 เดือน K-L) อำเภอจอมทอง-จังหวัดเชียงใหม่ M-T) อำเภอปากช่อง-จังหวัดนครราชสีมา

4.3 การศึกษาสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum* โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา

จากการศึกษาสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum* โดยใช้ตัวอย่างไลเคนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอของสาหร่ายจากแทลลัสของไลเคน *P. tinctorum* และตามด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ตำแหน่งยีน *rbcL* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ rbcL203F และ rbcL991R มี target size ยาว 800-900 bp พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสาหร่ายได้ 12 ตัวอย่าง ได้แก่ PT03, PT04, PT08, PT10, PT11, PT13, PT15, PT16, PT17, PT18, PT19 และ PT20

สำหรับตัวอย่างสาหร่ายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ Tre18S_N2.for และ 18H มี target size ยาว 700-800 bp พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสาหร่ายได้ ทั้งหมด 11 ตัวอย่างได้แก่ PT04, PT06, PT07, PT08, PT09, PT10, PT12, PT16, PT17, PT18 และ PT19 ซึ่งสาหร่ายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 ตำแหน่งยีนคือ PT04, PT08, PT10, PT16, PT17, PT18 และ PT19

โดยในแต่ละตัวอย่างจะพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวจึงเป็นการยืนยันว่าได้ดีเอ็นเอที่มาจากสิ่งมีชีวิตเพียงแค่ชนิดเดียว (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *rbcL* และ 18S rDNA

ตัวอย่างไลเคน	รหัสสาหร่าย	*rbcL*	18S rDNA
P. tinctorum	PT01	-	-
P. tinctorum	PT02	-	-
P. tinctorum	PT03	✓	-
P. tinctorum	PT04	✓	✓
P. tinctorum	PT05	-	-
P. tinctorum	PT06	-	✓
P. tinctorum	PT07	-	✓
P. tinctorum	PT08	✓	✓
P. tinctorum	PT09	-	✓
P. tinctorum	PT10	✓	✓
P. tinctorum	PT11	✓	-

ตัวอย่างไลเคน	รหัสสาหร่าย	*rbcL*	18S rDNA
P. tinctorum	PT12	-	✓
P. tinctorum	PT13	✓	-
P. tinctorum	PT14	-	-
P. tinctorum	PT15	✓	-
P. tinctorum	PT16	✓	✓
P. tinctorum	PT17	✓	✓
P. tinctorum	PT18	✓	✓
P. tinctorum	PT19	✓	✓
P. tinctorum	PT20	✓	-

หมายเหตุ: ✓ หมายถึง สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำเร็จ

- หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำเร็จ

4.4 การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากการทำ DNA sequencing ที่ตำแหน่งยีน *rbcL* ดังตารางที่ ข1 (ภาคผนวก ข) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากการทำ DNA sequencing ที่ตำแหน่งยีน *rbcL* ดังตารางที่ ข1 (ภาคผนวก ข) โดยนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบเพื่อหาชนิดของสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) โดยให้ผลดังตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบชนิดของสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน *rbcL*

ไลเคน	รหัสสาหร่าย	ยีน *rbcL*		
		ชนิดสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank (Accession no.)	**%ค่าความเหมือน**	**E value**
Parmotrema tinctorum	PT03	*Trebouxia gelatinosa* (AB194853)	95.80%	0.0
	PT04	*Trebouxia* sp. Kirika 9651 (MT135807)	99.32%	0.0
	PT08	*Trebouxia* sp. Kirika 9651 (MT135807)	99.35%	0.0
	PT10	*Trebouxia anticipate* (MK314949)	95.86%	0.0
	PT11	*Trebouxia flava* (AB194849)	96.19%	0.0
	PT13	*Trebouxia corticola* (AB194846)	94.12%	0.0
	PT15	*Trebouxia* sp. Kirika 9721 (MT135808)	100.00%	0.0
	PT16	*Trebouxia corticola* (AB194846)	99.81%	0.0
	PT17	*Trebouxia corticola* (AB194846)	99.61%	0.0
	PT18	*Trebouxia corticola* (AB194846)	99.80%	0.0
	PT19	*Trebouxia* sp. Kirika 9651 (MT135807)	100.00%	0.0
	PT20	*Trebouxia corticola* (AB194847)	95.86%	0.0

จากตารางที่ 4.3 สาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum* ที่ตำแหน่งยีน *rbcL* ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ได้แก่ PT03, PT04, PT08, PT10, PT11, PT13, PT15, PT16, PT17, PT18, PT19 และ PT20 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายในสกุล *Trebouxia* และพบว่ามีสาหร่าย *Trebouxia* หลายชนิดที่อยู่ในไลเคน *P. tinctorum* ตัวอย่างสาหร่าย PT03 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia gelatinosa* มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT04 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia* sp. Kirika 9651 มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT08 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia* sp. Kirika 9651 มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT10 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia anticipate* มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT11 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia flava* มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT13 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย*Trebouxia corticola* มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT15 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia* sp. Kirika 9721 มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT16 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia corticola* มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT17 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia corticola* มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT18 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia corticola* มากที่สุด ตัวอย่างสาหร่าย PT19 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia* sp. Kirika 9651 มากที่สุด และตัวอย่างสาหร่าย PT20 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Trebouxia corticola* มากที่สุด

ส่วนในตำแหน่งยีน 18S rDNA มีทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ได้แก่ PT04, PT06, PT07, PT08, PT09, PT10, PT12, PT16, PT17, PT18 และ PT19 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank คือ ตัวอย่างสาหร่าย PT06 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Coccomyxa viridis* มากที่สุด และสาหร่าย PT19 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Coccomyxa glaronensis* มากที่สุด แต่พบว่าตัวอย่างสาหร่าย PT10, PT12 และ PT17 มีความคล้ายคลึงกับชนิดของรา ส่วนตัวอย่างสาหร่าย PT04, PT07, PT08 และ PT18 มีความคลายคลึงกับชนิดของแมลง ดังตารางที่ 4.4

เมื่อนำข้อมูลของตัวอย่างสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน *rbcL* ที่สามารถแสดงชนิดของสาหร่ายที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมด ไปทำ Phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายต่อไป

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบชนิดของสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน ยีน 18S rDNA

ไลเคน	รหัสสาหร่าย	ยีน 18s rDNA		
		ชนิดสาหร่ายจากฐานข้อมูล GenBank (Accession no.)	%ค่าความเหมือน	E value
Parmotrema tinctorum	PT04	*Gregarina* sp. (LR814106.1)	91.90%	0.0
	PT06	*Coccomyxa viridis* (AJ880281.1)	99.26%	0.0
	PT07	*Gregarina* sp. (LR814106.1)	83.97%	1e-170
	PT08	Gregarina sp. (LR814085.1)	76.20%	6e-63
	PT09	Uncultured eukaryote (EU087208.1)	96.05%	0.0
	PT10	*Bryoria nadvornikiana* (MK106005.1)	99.01%	0.0
	PT12	*Bryoria nadvornikiana* (MK106005.1)	98.05%	0.0
	PT16	Uncultured eukaryote (EU087208.1)	83.44%	5e-159
	PT17	*Ascomycota* sp. (MH430576.1)	92.50%	4e-04
	PT18	*Gregarina* sp. (LR814106.1)	88.91%	0.0
	PT19	*Coccomyxa glaronensis* (AM292034.1)	95.26%	0.0

4.5 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree

จากการนำลำดับเบสที่ตำแหน่ง *rbcL* ของตัวอย่างสาหร่ายที่และข้อมูลของสาหร่ายที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงที่มาจากฐานข้อมูลใน GenBank มาจัดทำ phylogenetic analysis จากภาพที่ 4.4 เป็น Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ยีน *rbcL* ของตัวอย่างสาหร่าย PT03, PT04, PT08, PT10, PT11, PT13, PT15, PT16, PT17, PT18, PT19 และ PT20 ที่มาจากไลเคน *Parmotrema tinctorum* ผลการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งสาหร่ายได้ออกเป็น 3 clades และสามารถแบ่งกลุ่มสาหร่ายได้ออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A กลุ่ม B กลุ่ม C กลุ่ม D และกลุ่ม E ตามความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการซึ่งอาจจะเป็นชนิดเดียวกันหรือชนิดที่ใกล้เคียงกันได้ ดังนี้

Clade I มีค่า bootstrap value เท่ากับ 98 ประกอบไปด้วยสาหร่ายในกลุ่ม A และกลุ่ม B

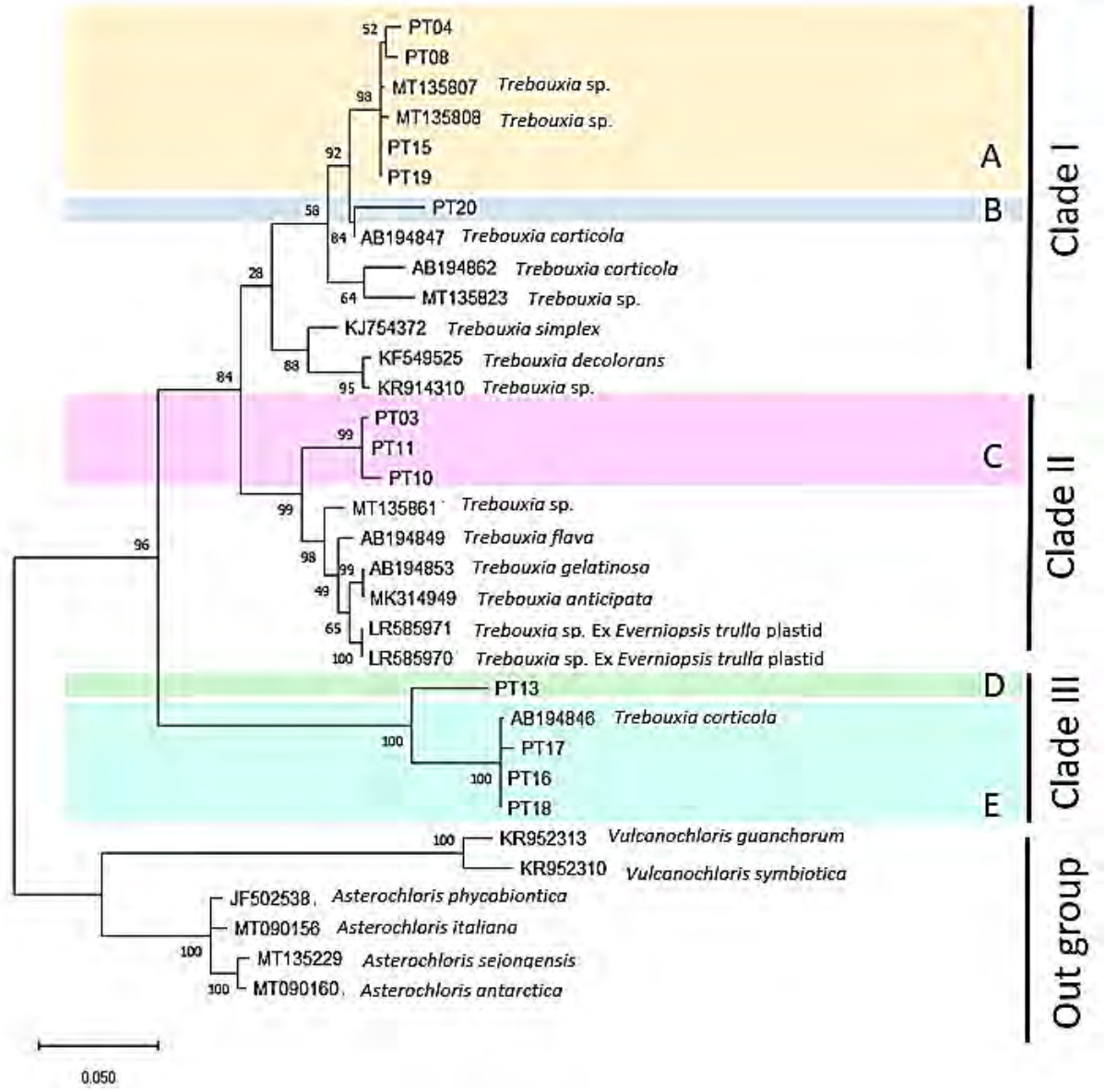
- กลุ่ม A ได้แก่ ตัวอย่างสาหร่าย PT04, PT08, PT15 และ PT19 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trebouxia* sp. โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 98 (แถบสีเหลือง)
- กลุ่ม B ได้แก่ ตัวอย่างสาหร่าย PT20 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trebouxia corticola* โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 84 (แถบสีน้ำเงิน)

Clade II มีค่า bootstrap value เท่ากับ 99 ประกอบไปด้วยสาหร่ายที่อยู่ในกลุ่ม C

- กลุ่ม C ได้แก่ ตัวอย่างสาหร่าย PT03 PT10 PT11 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trebouxia* sp. *Trebouxia gelatinosa Trebouxia anticipate* และ *Trebouxia flava* โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 99 (แถบสีชมพู)

Clade III มีค่า bootstrap value เท่ากับ 100 ประกอบไปด้วยสาหร่ายในกลุ่ม D และกลุ่ม E

- กลุ่ม D ได้แก่ ตัวอย่างสาหร่าย PT13 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trebouxia corticola* โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 100 (แถบสีเขียว)
- กลุ่ม E ได้แก่ ตัวอย่างสาหร่าย PT16, PT17 และ PT18 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trebouxia corticola* โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 100 (แถบสีฟ้า)



ภาพที่ 4.4 Phylogenetic tree สาหร่ายในไลเคน *P.tinctorum* ที่ตำแหน่งยีน *rbcL* โดยใช้รูปแบบ Tamura 3 parameter model + 1 และใช้ค่า bootstrap value เท่ากับ 100

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

โครงงานวิทยาศาสตร์นี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* ที่เก็บจากป่าประเภทต่าง ๆ ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา (molecular technique) เพื่อหาความสัมพันธ์วงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลเปรียบเทียบกับสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *rbcL* และ 18S rDNA โดยตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากไลเคน *Parmotrema tinctorum* ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง สามารถนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *rbcL* ได้ 12 ตัวอย่างและสามารถนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA ได้ 11 ตัวอย่าง สำหรับในตัวอย่างที่ไม่สามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 ตำแหน่งยีนอาจมีสาเหตุมาจากความสมบูรณ์ของตัวอย่าง ทำให้เมื่อสกัดดีเอ็นเอแล้วได้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยหรือไม่มีดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวรวมไปถึงตัวอย่างไลเคนบางตัวอย่างถูกเก็บไว้เป็นเวลานานจนทำให้ดีเอ็นเออาจสลายหรือถูกทำลาย

จากรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของสาหร่ายที่พบในไลเคน *Parmotrema tinctorum* ในอดีตโดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา พบว่าเป็นสาหร่ายสกุล *Trebouxia* โดย สาหร่าย *Trebouxia corticola* ซึ่งเป็นชนิดของสาหร่ายที่พบมากที่สุดในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Ohmura, Y. et al., 2019)

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่แยกได้จากตัวอย่างไลเคน *Parmotrema tinctorum* พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้มีมากกว่า 1 ชนิดในตัวอย่างไลเคนเดียวกันสาหร่ายสกุล *Trebouxia* เป็นสาหร่ายที่พบเป็นส่วนมาก และลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสกุลนี้มีขนาดใหญ่ทำให้สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน สำหรับสาหร่ายชนิดอื่นที่พบว่าอยู่ร่วมกันกับสาหร่าย *Trebouxia* ที่แยกได้จากไลเคน *P. tinctorum* นับว่ามีความน่าสนใจ จากการรายงานการศึกษาสาหร่ายในไลเคนที่ผ่านมาในอดีตพบว่ามีสาหร่ายเพียงไม่กี่สกุลและมีความหลากหลายน้อยกว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคน ทั้งนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าการแยกและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจากไลเคนให้บริสุทธิ์ทำได้ค่อนข้างยาก นอกจากนี้สาหร่ายบางชนิดก็ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ยีน *rbcL* พบว่าส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายในสกุล *Trebouxia* ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสาหร่ายสกุลนี้มีขนาดเซลล์ที่ใหญ่และมีคลอโรพลาสต์ที่ปกคลุมทั่วทั้งเซลล์อย่างชัดเจน จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์มากกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีน *rbcL* จึงทำได้ง่าย ซึ่งในงานวิจัยถัดไปอาจเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาหร่ายที่ต่างชนิดกัน เช่น บทบาทในการตรึงไนโตรเจน เป็นต้น

การศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ตำแหน่ง 18S rDNA อาจทำได้ยาก หากมีการอยู่ร่วมกันของสาหร่ายหลากหลายชนิดในตัวอย่างไลเคนเดียวกัน เนื่องจากจะเกิดการทับซ้อนกันของลำดับนิวคลีไทด์ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ยืนยันได้เป็นอย่างดีว่าข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ไม่สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่งยีน *rbcL* นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษายีนในตำแหน่ง 18S rDNA ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่มีความเหมาะสมกับการใช้ศึกษาสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *P. tinctorum* อย่างไรก็ตามในการศึกษาสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *P. tinctorum* นี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน ดังนั้นในการศึกษาชนิดและจำนวนของสาหร่ายหรือ photobiont ที่มีอยู่ในไลเคนชนิดนี้โดยการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลอื่น ๆ ยกตัวอย่างเช่น Next-Generation Sequencing จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและทำให้ได้ข้อมูลที่แท้จริงและชัดเจนมากขึ้นของสิ่งมีชีวิตที่เจริญอยู่ร่วมกันเป็นไลเคน ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาความสัมพันธ์เชิงโมเลกุลของสาหร่ายในไลเคน *Parmotrema tinctorum* จากการศึกษาในครั้งนี้การใช้ ยีน *rbcL* เนื่องจากเป็นยีนสำคัญในกระบวนการสร้าง ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและมีปริมาณที่มากที่สุดในโลก (Geilly and Taberlet, 1994) ดังนั้นจึงเป็นยีนมีความจำเพาะต่อพืชและถูกใช้ในการหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีคลอโรพลาสต์ได้ทุกชนิด จากตัวอย่างที่สามารถนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับสาหร่ายทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Trebouxia gelatinosa, Trebouxia* sp. Kirika 9651, *Trebouxia anticipate*, *Trebouxia flava*, *Trebouxia corticola* และ *Trebouxia* sp. Kirika 9721 โดยมีการรายงานว่าเป็นสาหร่าย (photobiont) ที่อยู่ร่วมกับรา (mycobiont) แล้วอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยเป็นไลเคน สอดคล้องกับรายงานการศึกษาชนิดของสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum* จากหลากหลายพื้นที่ในประเทศญี่ปุ่นที่ตำแหน่งยีน *rbcL* พบว่าได้เป็นสาหร่ายชนิดเดียวกัน คือ *Trebouxia gelatinosa, Trebouxia flava* และ *Trebouxia corticola* นอกจากนี้ยังพบสาหร่ายชนิดอื่นอีกคือ *Trebouxia* gigantea, *Trebouxia asymmetrica, Trebouxia crenulate, Trebouxia aggregate* และ*Trebouxia anticipata* จึงแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสาหร่ายในไลเคนชนิดนี้ (Ohmura, Y., Takeshita, S. and Kawachi, M., 2019)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาความสัมพันธ์เชิงโมเลกุลของสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum* จากการศึกษาในครั้งนี้การใช้ ยีน 18S rDNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ออกมาเป็นทั้งชนิดของสาหร่าย รา และแมลง แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 18S rDNA ไม่มีความจำเพาะต่อสาหร่าย ดังนั้นในการเลือกตำแหน่งของยีนและไพรเมอร์จึงมีความสำคัญ ควรเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมและมีความจำเพาะต่อชนิดของสาหร่ายในไลเคนที่ต้องการศึกษา ทั้งนี้มีการรายงานว่าที่ตำแหน่ง

ITS (Internal Transcribed Spacer) ซึ่งค้นพบว่าเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมในการหาชนิดของสาหร่ายในไลเคนและสามารถใช้เป็นตำแหน่งทำให้เกิดความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามากขึ้น โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ LR1 สามารถพบชนิดสาหร่ายในไลเคนได้หลากหลายคือ *Trebouxia corticola, Trebouxia jamesii, Trebouxia gigantea, Trebouxia showmanii, Trebouxia incrustata, Trebouxia asymmetrica, Trebouxia arboricola, , Trebouxia impressa, Trebouxia potteri, Trebouxia flava* และ *Trebouxia gelatinosa* (Ohmura et al, 2006) จากการแยกความแตกต่างของชนิดสาหร่ายสามารถทำได้โดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะทางสัญฐานวิทยาโดยพบว่าสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีรูปแบบการเรียงตัวของ pyrenoid ที่แตกต่างกันซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ภายในคลอโรพลาสต์และมีบทบาทสำคัญช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงคาร์บอนของคลอโรพลาสต์ในเซลล์สาหร่าย (Friedl, 1989)

จากผลการศึกษาจึงแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่อยู่ในไลเคนชนิดเดียวกันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ รวมทั้งมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่ายที่พบในไลเคนชนิดเดียวกัน จากผลทาง Phylogenetic tree พบว่าในบางตัวอย่างที่ได้ค่า bootstrap value ค่อนข้างต่ำอาจทำให้การหาสาหร่ายที่มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงได้ยากและหากมีโอกาสได้ทำงานวิจัยต่ออาจทำให้ได้ผลการศึกษาที่เปลี่ยนไป ทั้งนี้ในการยืนยันชนิดของสาหร่ายในไลเคนในงานวิจัยครั้งต่อไปควรใช้ตำแหน่งยีนอย่างน้อย 2 ตำแหน่งเพื่อยืนยันชนิดของสาหร่ายได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น และหากต้องการเห็นความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายในไลเคน *Parmotrema tinctorum* อาจจะต้องเพิ่มจำนวนของตัวอย่างมากขึ้นและเป็นแนวทางให้กับงานวิจัยต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular technique) ซึ่งพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *rbcL* และ 18S rDNA โดยตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากไลเคนที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลจาก Phylogenetic tree ของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *P. tinctorum* ที่ตำแหน่งยีน *rbcL* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างสาหร่ายได้รวมทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่มาจากจังหวัดเชียงราย 2 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trebouxia gelatinosa* และ *Trebouxia* sp. Kirika 9651 สำหรับตัวอย่างที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ 3 ตัวอย่างมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trebouxia* sp. Kirika 9651, *Trebouxia anticipate และ Trebouxia flava* สำหรับตัวอย่างที่มาจากจังหวัดนครราชสีมา 7 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสาหร่าย *Trebouxia corticola, Trebouxia* sp. Kirika 9721 และ *Trebouxia* sp. Kirika 9651 โดยพบว่าสาหร่าย *Trebouxia corticola* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในไลเคน *P. tinctorum*

วิเคราะห์ความหลากหลายของสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum* ที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA พบว่าสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้ได้แต่พบชนิดของสาหร่ายที่ไม่เป็น dominant ของสาหร่ายในไลเคนชนิดนี้คือ *Coccomyxa viridis และ Coccomyxa glaronensis* ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มาจากจังหวัดเชียงราย 1 ตัวอย่าง และจังหวัดนครราชสีมา 1 ตัวอย่าง รวมไปถึงพบชนิดของราคือ *Bryoria nadvornikiana,* Ascomycota และ Uncultured eukaryote ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ 3 ตัวอย่าง และจังหวัดนครราชสีมา 1 ตัวอย่าง พบชนิดของแมลง *Gregarina* sp. ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มาจากจังหวัดเชียงราย 1 จังหวัด เชียงใหม่ 2 ตัวอย่าง และจังหวัดนครราชสีมา 1 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงความไม่จำเพาะของยีน 18S rDNA ต่อกลุ่มสาหร่ายในไลเคน *P. tinctorum*

การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคน *P. tinctorum* ในประเทศไทย ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของสาหร่ายที่อยู่ในไลเคนชนิดนี้ในระดับสกุลถึงในระดับสปีชีย์ที่ว่าไม่ได้มีเพียงแค่สปีชีย์เดียว ทำให้ได้ข้อมูลที่เฉพาะเจาะจงมากขึ้นเพราะในอดีตเคยเชื่อว่าไลเคนชนิดเดียวจะมีสาหร่ายอาศัยอยู่เพียงแค่ 1 ชนิด ซึ่งจากงานวิจัยในครั้งนี้เลยทำให้ทราบว่าสามารถพบสาหร่ายมากกว่า 1 ชนิดในไลเคนชนิดเดียวกัน และจากข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการประยุกต์ต่อในทางเพาะเลี้ยงไลเคนเพื่อสกัดสารไปใช้ประโยชน์ต่อทางชีวภาพในงานวิจัยอื่นได้ต่อไป

รายการเอกสารอ้างอิง

หน่วยวิจัยไลเคน มหาลัยรามคำแหง. ไลเคนคืออะไร. [ออนไลน์]. 2558. แหล่งที่มา: http://www.lichen.ru.ac.th/index.php/lichen/benifit [13 ตุลาคม 2563]

หน่วยวิจัยไลเคน มหาลัยรามคำแหง. รู้จักไลเคน: ประโยชน์ของไลเคน. [ออนไลน์]. 2558. แหล่งที่มา: http://www.lichen.ru.ac.th/index.php/lichen/benifit [9 กันยายน 2563]

สำนักงานความหลากหลายทางชีวภาพ. [ออนไลน์]. 2558. แหล่งที่มา: http://fbd.forest.go.th/th/wp-content/uploads/2017/11/6_Lichen.pdf [9 กันยายน 2563]

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: 237-243.

Ahmadjian, V. 1993. The Lichen Photobiont: What Can It Tell Us about Lichen Systematics? *The Bryologist*96(3): 310-313.

Bačkor, M., Peksa, O., Škaloud, P., and Backorová, M. 2010. Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. *Ecotoxicology and Environmental Safety*73: 603-612.

Buaruang K. et al. 2017. A new checklist of lichenized fungi occurring in Thailand. *MycoKeys*23: 1-91.

Dahlkild, A., Kallersjo, M., Lohtander, K., and Tehler, A. 2001. Photobiont diversity in the Physciaceae (Lecanorales). *Bryologist*104: 527-536.

Divakar, P.K. and Upreti, D.K. 2005. Parmelinoid lichens in India (a revisionary study). *Bishen Singh Mahendra Pal Singh*: 295-380.

Feuerer, T. and D.L. Hawksworth. 2007. Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodiversity and Conversation*16: 85-98.

Friedl, T. 1989. Comparative ultrastructure of pyrenoids inTrebouxia (Microthamniales, Chlorophyta). *plant systematics and evolution164*: 145-159.

Friedl, T and Büdel, B. 2008. Photobionts. *In Lichen Biology*: 7-26.

Gielly, L. and Taberlet, P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Molecular Biology and Evolution11(5)*: 769-777.

Grube, M., P. T. DePriest, A. Gargas J. Hafellner. 1995. DNA isolation from lichen ascomata. *Mycological Research*99: 1321-1324.

Grube, M. and Muggia, L. 2010. Identifying algal symbionts in lichen symbioses. In Nimis P. L., Lebbe R. (eds.), *Tools for Identifying Biodiversity*: 295-299.

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, R.K. and Zimmer, E.A. 1988. Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* 160: 29-37.

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.

Hoffman, Y., Aflalo, C., Zarka, A., Gutman, J., James, T.Y., and Boussiba, S. 2008. Isolation and characterization of a novel chytrid species (phylum Blastocladiomycota), parasitic on green alga Haematococcus. *Mycological Research*112: 70-81.

Kagami M., Ad, B., Ibelings, B.W., and Donk, E.V. 2007. Parasitic chytrids: their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. *Hydrobiologia*578: 113-129.

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.

Lücking, R., B.P. Hodkinson., and S.D. Leavitt. 2017. The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota – Approaching one thousand genera. *The Bryologist*, 119(4): 361-416.

Muggia, L. and et al. 2020. Formally described species woefully underrepresent phylogenetic diversity in the common lichen photobiont genus Trebouxia (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *An impetus for developing an integrated taxonomy,Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume:149

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

Nelsen, M.P., Rivas Plata, E., Andrew, C.J., Lücking, R., and Lumbsch, H.T. 2011. Phylogenetic diversity of *trentepohlialean* algae associated with lichen-forming fungi. *Journal of Phycology* 47: 282-290.

Noicharoen, K. 2002. *Study on Biodiversity of foliose and fruticose lichens at Khao Yai National Park*. Master's thesis, Ramkhamhaeng University, Thailand.

Ohmura, Y., Kawachi, M., Kasai, F., Sugiura, H., Ohtara, K., Kon, Y. and Hamada, N. 2009. Morphology and chemistry of *Parmotrema tinctorum* (Parmeliaceae, Lichenized Ascomycota) transplanted into sites with different air pollution levels*. Bulletin of the National Museum of Nature and Science,* Series B35: 91-98.

Ohmura, Y., Kawachi, M., Kasaie, F., Watanabe, M.M. and Takeshita, S. 2006. Genetic combinations of symbionts in a vegetatively reproducing lichen, *Parmotrema tinctorum,* based on ITS rDNA sequences. *Bryologist109*: 43-59.

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

Ohmura, Y., Takeshita, S. and Kawachi, M. 2019. Photobiont diversity within populations of a vegetatively reproducing lichen, *Parmotrema tinctorum,* can be generated by photobiont switching. *Symbiosis77*: 59-72

Prescott, G.W. 1979. A contribution to a bibliography of Antarctic and Subantarctic algae together with a checklist of freshwater taxa reported to 1977. *Bibliotheca Phycologica*45: 312.

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.

Pooprang, T. 2001. Systematic study of the lichens family Parmeliaceae in Thailand. Master's thesis, Ramkhamhaeng University, Thailand.

Rankovic, B. and Marijana, K. 2015. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites, Branislav Rankovic, Lichen secondary metabolites, Bioactive properties and pharmaceutical, 1 th ed, Cham: Springer International Publishing.

Roca-Valiente, B., Divakar, P.K., Ohmura, Y., Hawksworth, D.L., and Crespo, A. 2013. Molecular phylogeny supports the recognition of the two morphospecies *Parmotrema pseudotinctorum* and *P. tinctorum* (*Parmeliaceae, Ascomycota*). Vieraea41: 333-348.

Sanders, W. 2001. Preliminary light microscope observations of fungal and algal colonization and lichen thallus initiation on glass slides placed near foliicolous lichen communities within a lowland tropical forest. Symbiosis31: 85-94.

Smith, D. C. 1980. Mechanisms of nutrient movement between lichen symbionts. *Cellular interactions in symbiosis and parasitism*: 197-227.

Takano, K., Ishikawa, Y., Mikami, H., Igarashi, S., Hino, S., Yoshioka, T. 2008. Fungal infection for cyanobacterium *Anabaena smithii* by two chytrids in eutrophic region of large reservoir Lake Shumarinai, Hokkaido, Japan. *Limnology*9: 213-218.

Tapper, R. 1981. Direct measurement of translocation of carbohydrate in the lichen *Cladonia convoluta*, *by quantitative autoradiography*. New Phytol89: 429-437.

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.

Tschermal-Woess, E. The algal partner. 1988. In: CRC Handbook of Lichenology. *vol. I (M.Galun).* pp.39-92. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Yahr, R., Florence, A., Skaloud, P. and Voytsekhovich, A. 2015. Molecular and morphological diversity in photobionts associated with Micarea s. str. (Lecanorales, Ascomycota). Lichenologist47: 403-415.

ภาคผนวก ก

Key Character by Divakar, P.K. and Upreti, D.K. 2005.

ไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale

Thallus foliose, loosely adnate, 5–15(–30) cm wide. Lobes broadly rounded, flattened, 10–20 mm wide, with eciliate margins. Upper surface green-grey to grey with mainly laminal, simple to branched or lobulate isidia. Lower surface black with a brown erhizinate margin; rhizines sparse, simple. Apothecia very rare, lecanorine. Ascospores 8 per ascus, hyaline, simple. Photobiont: chlorococcoid. Chemistry: cortex K+ yellow, C–, P–, with atranorin; medulla K–, C+ red, KC+ red, P–, with lecanoric acid.

1a Thallus fruticose or foliose..... 2

2b Thallus fruticose or foliose..... 11

11b Photobiont a green alga
(algal layer bright green in section)..... 17

17b Thallus with soredia or isidia..... 26

26b Thallus with isidia or phyllidia..... 39

39b Lobes adpressed to the substrate,
or ascending only at margins..... 40

40b Rhizines present..... 41

41b Margin of lobes without cilia or with simple cilia..... 44

44b Upper surface white to grey, K+ yellow..... 46

46b Lower surface dark (black to dark brown)..... 48

48a Rhizines present in the centre, but absent or poorly
developed in a broad marginal band..... 49

49b Medulla C+ red, P–, with lecanoric acid..... *P. tinctorum*

Key Character by Prescott, G.W., 1979.

สาหร่ายสกุล *Trebouxia cladoniae* (Chod.) G.M. Smith

1b Plants microscopic, or if macroscopic with cellular structures
and branches clearly visible to the unaided eye;
without whorls of branches clearly visible..... 4

4a Cells containing chloroplasts with green predominating;
or with other pigments predominating: yellow-green,
golden yellow, brownish, reddish or bluish-green..... 5

5a Plants grass or leaf-green; or grey-to violet-green, or tawny-green.
(Mostly chlorophyta, Euglenopgyta and
the violet-green Rhodophyta) 25

25b Organism non-motile in the vegetative condition. Cells solitary
or colonial, or filamentous forms..... 81

81b Plant not filamentous, but solotary cells; or a colony
of 2 or more cells, enclosed by mucilage
or by old mother-cell walls..... 82

82a Cells solitary or gregarious but not forming
colonies of adjoined cells..... 183

183b Cells free-floating, attached, or endophytic;
without a sessile lorica..... 184

184b Cells some other shape..... 194

194b Non-living in the tissues of plants nor on animals (but may be in
the mucilage of other algae) 201

201b cells not as above..... 202

202b Cells not attached, free-floating; or on moist soil, on snow,
sometimes forming a green film..... 212

212b Cells oval, circular (or nearly so), pyramidal, trapezoidal,
or star-shaped, isodiametrically angular, not more than
3 times the diameter in length..... 235

235b Cells not constricted in the midregion..... 247

247b Cells variously shaped but not enclosed

in such an envelope..... 248

248a Cells oval, ovoid, spherical or ellipsoid..... 249

249b Cells different in size and shape, or with

a different type of chloroplast..... 250

250b cell without spines or decorations..... 262

262a Cells associated with fungi to form lichens..... *Trebouxia*

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข1 ลำดับนิวลีโอไทด์ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่ตำแหน่ง *rbcL*

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน *rbcL*) (5'->3')**	**ความยาว (bp)**
PT3	TCAGTAACAAACTTATTTACTTCTATTGTTGGGAATGTTTTTGGGTTTAAAGCTC TTCGTGCACTACGATTAGAAGATCTTCGTATTCCTCCAGCATATGTTAAAACTTT CCAAGGACCTCCTCATGGAATTCAAGTAGAACGTGACAAATTGAACAAATACGG TCGTTCTCTTTTAGGTTGTACTATTAAACCAAAATTAGGTCTTTCTGCTAAAAAC TACGGTCGTGCAGTTTATGAATGTTTACGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAAGAT GATGAAAACGTAAACTCTCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTT GTTGCAGAAGCAATTTATAAATCTCAAGCAGAAACTGGTGAAATTAAAGGACAT TACCTAAACGCAACTGCTGGTAATAGTGAAGAAATGTTAATCCGTGCTGAAACT GCAAGAGATTTTGGTGTACCAATTGTTATGCATGACTACTTAACTGGTGGTTTT ACTGCAAACACAAGTTTAGCACATTACTGTCGTTATAACGGTTTATTATTACACA TTCACCGAGCTATGCACGCTGTTATTGACCGTCAACGTAATCACGGTATCCATT TCCGTGTTTTAGCTAAAACTCTTCGTATGTCAGGTGGTGACCACCTTCATTCTG GTACTGTTGTAGGTA	667
PT4	TACGAATAGAAGATCTTCGCATTCCTCCAGCATATGTTAAAACATTCCAAGGTC CTCCTCACGGAATCCAAGTTGAACGTGATAAACTAAACAAATATGGCCGTTCTC TTTTAGGTTGTACTATTAAACCAAAATTAGGTCTTTCTGCAAAAAATTACGGTCG TGCTGTTTATGAGTGTTTACGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAAGATGATGAAAA CGTAAACTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAGAGACCGCTTTGCATTTGTTGCAGA AGCAATTTACAAATCTCAAGCAGAAACAGGGGAAATTAAAGGACACTATCTAAA CGCAACTGCTGGTAATGTTGACGAAATGATAAAACGTGCTGAATGTGCAAGAGA TTTTGGTATGCCTATTGTTATGCATGACTACTTAACTGGTGGTTTCACTGCAAAT ACAACTTTAGCACATTATTGTCGTTATAATGGTTTATTATTACACATTCACCGAG CTATGCACGCTGTTATTGACCGTCAACGTAATCATGGTATCCATTTCCGTGTATT AGCTAAAACCCTTCGTATGTCAGGTGGTGATCACCTTCACTCTGGAACTGTGTA GTAA	602
PT8	TTTTTGGGGTTAAAGCTCTTCGCGCATTACGATTAGAAGATCTTCGTATTCCTCC AGCATATGTTAAAACATTCCAAGGGCCTCCTCACGGAATCCAAGTTGAACGTGA	628

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน *rbcL*) (5'->3')**	**ความยาว (bp)**
	TAAACTAAACAAATATGGCCGTTCTCTTTTAGGTTGTACTATTAAACCAAAATTA GGTCTTTCTGCAAAAAATTACGGGCGTGCTGTTTATGAGTGTTTACGTGGTGGT TTAGACTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAAACTCTCAACCTTTTATGCGTTGGA GAGACCGCTTTGCATTTGTTGCAGAAGCAATTTACAAATCTCAAGCAGAAACAG GGGAAATTAAAGGACACTATCTAAACGCAACTGCTGGTAATGTTGACGAAATGA TAAAACGTGCTGAATGTGCAAGAGATTTTGGTATGCCTATTGTTATGCATGACT ACTTAACTGGTGGTTTCACTGCAAATACAACTTTAGCACATTATTGTCGTTATAA TGGTTTATTATTACACATTCACCGAGCTATGCACGCTGTTATTGACCGTCAACG TAATCATGGTATCCATTTCCGTGTATTAGCTAAAACCCTTCGTATGTCAGGTGG TGATCACCTTCACTCTGGAACTGTTGTGTA	
PT10	TTCAAGTAGAACGCGACAAATTGAACAAATATGGTCGTTCTCTTTTAGGTTGTA CTATTAAACCAAAATTAGGTCTTTCTGCTAAAAACTACGGTCGTGCAGTTTATGA ATGTTTACGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAAACTCTCA ACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTGTTGCAGAAGCAATTTATAAA TCTCAAGCAGAAACTGGTGAAATTAAAGGACATTACCTAAACGCAACTGCTGGT AATAGTGAAGAAATGTTAATCCGTGCTGAAACTGCAAGAGATTTTGGTGTACCA ATTGTTATGCATGACTACTTAACTGGTGGTTTTACTGCAAACACAAGTTTAGCAC ATTACTGTCGTTATAACGGTTTATTATTACACATTCACCGAGCTATGCACGCTGT TATTGACCGTCAACGTAATCACGGTATCCATTTCCGTGTTTTAGCTAAAACTCTT CGTATGTCAGGTGGTGACCACCTTCACTCTGGTACTGTTGTGTAA	536
PT11	AAGATCTTCGTATTCCTCCAGCATATGTTAAAACTTTCCAAGGACCTCCTCATG GAATTCAAGTAGAACGTGACAAATTAAACAAATACGGTCGTTCTCTTTTAGGTT GTACTATTAAACCAAAATTAGGTCTTTCTGCTAAAAACTACGGTCGTGCAGTTTA TGAATGTTTACGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAAACTC TCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTGTTGCAGAAGCAATTTAT AAATCTCAAGCAGAAACTGGTGAAATTAAAGGACATTACCTAAACGCAACTGCT GGTAATAGTGAAGAAATGTTAATCCGTGCTGAAACTGCAAGAGATTTTGGTGTA CCAATTGTTATGCATGACTACTTAACTGGTGGTTTTACTGCAAACACAAGTTTAG CACATTACTGTCGTTATAACGGTTTATTATTACACATTCACCGAGCTATGCACGC TGTTATTGACCGTCAACGTAATCACGGTATCCATTTCCGTGTTTTAGCTAAAACT	604

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน *rbcL*) (5'->3')**	**ความยาว (bp)**
	CTTCGTATGTCAGGTGGTGACCACCTTCACTCTGGTACTGTTGTAGGTAAACTA GAAGG	
PT13	AGGATCTTCGTATCCCTCCTGCATATGTGAAAACTTTCCAAGGCCCGCCTCACG GTATCCAAGTAGAGCGTGACAAGTTAAACAAGTATGGTCGCTCTCTTTTAGGTT GTACTATCAAGCCTAAATTAGGCCTTTCTGCAAAAAACTACGGCCGTGCTGTTT ATGAGTGTTTGCGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAGGATGATGAGAACGTAAACT CTCAACCCTTTATGCGTTGGAGAGACCGATTCGCGTTTGTTGCAGAAGCTATTT ACAAATCTCAAGCTGAGACAGGTGAGATTAAGGGGCATTACCTTAACGCAACCG CTGGTCACGTGGACGAGATGCTGAAGCGTGCTGAGTGTGCAAGAGACTTTGGTG TGCCTATTGTTATGCATGACTACTTAACCGGTGGTTTCACTGCAAACACAACCC TAGCACATTACTGCCGTTACAACGGCC	459
PT15	AGATCTTCGTATTCCTCCAGCATATGTTAAAACATTCCAAGGGCCTCCTCACGG AATCCAAGTTGAACGTGATAAACTAAACAAATATGGTCGTTCTCTTTTAGGTTGT ACTATTAAACCAAAATTAGGTCTTTCTGCAAAAAATTACGGTCGTGCTGTTTATG AGTGTTTACGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAAACTCTC AACCTTTTATGCGTTGGAGAGACCGCTTTGCATTTGTTGCAGAAGCAATTTACA AATCTCAAGCAGAAACAGGGGAAATTAAAGGACACTATCTAAACGCAACTGCTG GTAATGTTGACGAAATGATAAAACGTGCTGAATGTGCAAGAGATTTTGGTATGC CTATTGTTATGCATGACTACTTAACTGGTGGTTTCACTGCAAATACAACTTTAGC ACATTATTGTCGTTATAATGGTTTATTATTACACATTCACCGAGCTATGCACGCT GTTATTGACCGTCAACGTAATCATGGTATCCATTTCCGTGTATTAGCTAAAACC CTTCGTATGTCAGGTGGTGATCACCTTCACTCTGGAACTGTTGTAGGTAAACTA GAAGG	603
PT16	GGATCCAGGTAGAGCGTGACAAGTTAAACAAGTACGGCCGATCTCTCTTGGGTT GTACTATCAAGCCTAAGTTAGGCCTTTCTGCAAAGAATTACGGCCGCGCTGTTT ATGAGTGCTTGCGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAGGATGATGAGAACGTAAACT CTCAACCCTTTATGCGTTGGAGAGACCGCTTCGCATTTGTTGCAGAAGCGATTT ACAAATCTCAAGCAGAGACGGGTGAGATTAAGGGGCATTACCTAAACGCAACCG CTGGTAACGTGGACGAGATGCTAAAGCGTGCTGAGTGTGCAAGGGACTTTGGTA TGCCTATTGTGATGCATGACTACTTAACCGGTGGTTTCACTGCAAACACAACCT TAGCACATTACTGCCGGTACAACGGCCTGTTGCTCCATATCCACCGAGCTATGC	548

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน *rbcL*) (5'->3')**	**ความยาว (bp)**
	ACGCTGTTATTGACCGCCAGCGCAACCATGGCATCCATTTCCGTGTGTTGGCAA AAACGCTCCGTATGTCGGGTGGTGACCACCTTCACTCAGGGACTGTTGTAGGTA AACTAGAA	
PT17	TATCCCTCCAGCATATGTGAAAACATTCCAAGGCCCGCCTCACGGGATCCAGGT AAAGCGTGACAAGTTAAACAAGTACGGCCGATCTCTCTTGGGTTGTACTATCAA GCCTAAGTTAGGCCTTTCTGCAAAGAATTACGGCCGCGCTGTTTATGAGTGCTT GCGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAGGATGATGAGAACGTAAACTCTCAACCCTT TATGCGTTGGAGAGACCGCTTCGCATTTGTTGCAGAAGCGATTTACAAATCTCA AGCATAGACGGGTGAGATTAAGGGGCATTACCTAAACGCAACCGCTGGTAACGT GGACGAGATGCTAAAGCGTGCTGAGTGTGCAAGGGACTTTGGTATGCCTATTGT GATGCATGACTACTTAACCGGTGGTTTCACTGCAAACACAACCTTAGCACATTA CTGCCGGTACAACGGCCTGTTGCTCCATATCCACCGAGCTATGCACGCTGTTAT TGACCGCCAGCGCAACCATGGCATCCA	513
PT18	CCGATCTCTCTTGGGTTGTACTATCAAGCCTAAGTTAGGCCTTTCTGCAAAGAA TTACGGCCGCGCTGTTTATGAGTGCTTGCGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAGGA TGATGAGAACGTAAACTCTCAACCCTTTATGCGTTGGAGAGACCGCTTCGCATT TGTTGCAGAAGCGATTTACAAATCTCAAGCAGAGACGGGTGAGATTAAGGGGCA TTACCTAAACGCAACCGCTGGTAACGTGGACGAGATGCTAAAGCGTGCTGAGTG TGCAAGGGACTTTGGTATGCCTATTGTGATGCATGACTACTTAACCGGTGGTTT CACTGCAAACACAACCTTAGCACATTACTGCCGGTACAACGGCCTGTTGCTCCA TATCCACCGAGCTATGCACGCTGTTATTGACCGCCAGCGCAACCATGGCATCCA TTTCCGTGTGTTGGCAAAAACGCTCCGTATGTCGGGTGGTGACCACCTTCACTC AGGGACTGTTGTAGGTAAACTAGAA	511
PT19	AATTCATTGCATATGTAGCTTACCCTTTAGATCTTTTTGAAGAAGGTTCAGTAAC AAACTTGTTTACTTCTATTGTTGGTAATGTTTTTGGGTTTAAAGCTCTTCGTGCA TTACGATTAGAAGATCTTCGTATTCCTCCAGCATATGTTAAAACATTCCAAGGG CCTCCTCACGGAATCCAAGTTGAACGTGATAAACTAAACAAATATGGTCGTTCT CTTTTAGGTTGTACTATTAAACCAAAATTAGGTCTTTCTGCAAAAAATTACGGTC GTGCTGTTTATGAGTGTTTACGTGGTGGTTTAGACTTTACTAAAGATGATGAAA ACGTAAACTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAGAGACCGCTTTGCATTTGTTGCAG AAGCAATTTACAAATCTCAAGCAGAAACAGGGGAAATTAAAGGACACTATCTAA	713

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน *rbcL*) (5'->3')**	**ความยาว (bp)**
	ACGCAACTGCTGGTAATGTTGACGAAATGATAAAACGTGCTGAATGTGCAAGAG ATTTTGGTATGCCTATTGTTATGCATGACTACTTAACTGGTGGTTTCACTGCAAA TACAACTTTAGCACATTATTGTCGTTATAATGGTTTATTATTACACATTCACCGA GCTATGCACGCTGTTATTGACCGTCAACGTAATCATGGTATCCATTTCCGTGTA TTAGCTAAAACCCTTCGTATGTCAGGTGGTGATCACCTTCACTCTGGAACTGTT GTAGGT	
PT20	CTAAAGACGATGAAAACGTAAACTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAGAGACCGCT TTGCTTTTGATTGCAGAAGCTGATTTACAAATCTCAAGCAGAAACAGGGGAGAT TAAAGGACACTATCTAAACGCAACTGCTGGTAATGTTGACGAAATGATAAAACG TGCTGAGTGTGCAAGAGATTTTGGTATGCCTATTGCTATGCATGACTACTTAAC TGGCGGTTTTACTGCAAATACAACTTTAGCACATTACTGTCGTTATAATGGTTTA TTACTACACATTCACCGAGCTATGCACGCTGTTATTGACCGTCAACGCAACCAT GGTATCCATTTCCGTGGATTAGCTAAAAACCCCTTCGGTATGTCAGGTGGTGAT CACCTTCACTCTGGAAACTGGTTGTTAGGTAAATT	414

ตารางที่ ข2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไลเคน *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nylander) Hale ที่ตำแหน่ง 18S rDNA

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน 18S rDNA) (5'->3')**	**ความยาว (bp)**
PT4	CCCAATCCCGATACGGGGAGGTAGTGACCAGAAATAGCAACGCAGGGCAAATG CTCTGTGATTGCAATGAGCGGAAAGCAAAACTGTTTGCGAGTATCTATTGGAGG GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA ATTGCTGCAGTTAAAGCGTCCGTAGTTGAATTTTGTTCAATCAGATTGGATTTG CAGAGTGTCTTCTGACTCTCTGTGCCTTTCGCTTTGAACTTGGAGGGAAAAGGG CCTTCGGTTCTTTTTTCCTCCCGTTACTTTGAGCAAATTGGAGTGCTTCAACCAG GCTAAAGCTTGAACAGCTCAGCATGGAATAACAAGATAGGACTTTGGTTCTTCT TTGTTGGTGTCATGGACCAAAAGTAATGGTTGATAAGGACATACGGGGGCATTT GTACTTGCTGGAGAGAGGTGAAATTCTAAGACCCAGCAAAGACAAACAAGTGCG AAAGCATTTGCCCAGTGTGTACCTGTTAATCAAGGACGAAAGTTGGGGGATCGA AGACGATTAGATACCGTCGTAGTCCCAACTATAAACTATGCCGACTGAGGATCG GCGGACGTACTATTACGACTCCTTCGGCACTCCAAGAGAAATCTAAGTCTTTGG GCCCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAA	700
PT6	GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGGAGGAAGA CGGCCCGTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTTGGAGAAGAACAACTGACGGTATCCA AGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG CAAGCGTTATCCGGATTCATTGGGCGTAAAGGGTCCTGAGGTGGCCTGTTTAGT CTACTGTGAAAGCTCAGGGCTTAACCCTGACAATGCGGTGGAAACTGGCAGGCT AGAATACGGTAGGGGCAAGGGGAATTCCCAATGTAGCGGTGAAATGCATAGATA TTGGGAGGAACACCAAAGGCGAAGGCACCTTGCTGGGCCGCTATTGACACTGA CAGACGAAAGCCAGGGGAGTAACCCGGATTAGATACCCGGCTAATCCTGGCTGT AAACGATGGACACTAAGTGTTGAACGATTCAAACGTTCAGTGCTGCAGCTAACG CGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTATGCTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATT GAC	540
	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAA ATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACCAGAAATAGCAACTCAGGGCCA TGCTCTGTGATTGCAATGAGCGGAAAGCAAAACTGTTTGCGAGTATCTATTGGA	648

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน 18S rDNA) (5'->3')**	**ความยาว (bp)**
PT7	GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGCAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTA AAATTGCTGCAGTTAAAGCGTCCGTAGTCGAATTTCGCTCATTTCAAATGGATG CAGACGCAACTTTGTTGTTGTCTTGCGCTTCTTGAATTGAGCTTGGGGAGAATT GGTGCCAACTTATTTTCTCCTCCGACTTTGAGCAAATTGTGGAGCTCCCAACAG GCTATATCTTGAACAGCTCAGCATGTAATAACAAGATATAACTTTGTCTCTTCTT GTTTTGGTGTTGAACCAAACGTGTTGGGTGATAAGGACATACACGGGCGTTTGT ACTTGTTGTTGAGAGGTGAAATTCTAAGACACAGAGAAGACAAACACGAGCGAC AGCGTTTGCGCAGAGTGTGCCTGTTGTTATAGGACAAGAGATGTGGGATCGAAG ACGATTATATACCGACGCAGTCCCAACTATATACTATGCCGACTGAGGAGAGCG	
PT8	AAACGGCTACCACATCTAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA CACGGGGAGGTAGTGACCAGAAATAGCAACTCAGGGCAATGCTCTCTGATTGCG ATGAGCGCGAAGCGCAACTGTGTTCGAGAATCTCTTGTGGGGCAAGACTGGGG CCCCCACCCGCGGGAATTCCCCATCCCCTATCGCATATTTAAATTGCTGCGCTT AAAGCGCCCGTGGACGAGTTTCTCTCCCTTTTGATGGATGCACACGCAACTTTG GTGTTGTCTTGCGCTTTTTGAATTGAGCTTGAGGAGAATTGGTGCCAACCCTTT TTCTCCTGCCACTTTCAGCTTGTTGTGCTGCTCCCAACATGCTATATGTTGAGC ACCTCATCATGTAATAACAAAAGACGACTTTTCCTCTTCTTGTTGTCGTCATGCA CCAAACGTGATGGATGAGAAGGTCATACGGGGGCTTTTGTTCTTGCTGAGGAGA GAAGTTATTCTACCACCCAGAGAAGA	512
PT9	CAGGACAATTAGTTCTGTGATTGCAATGAGCGGAAAGCAAAACTGTTTGCGAGT ATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATA GCGTATATTAAAGTTGCTGCAGTTAAAGCGCCCGTAGTCGGATATCGTCCTCTT GAATAGGATGCAGATGCCCTTTGGGCGCTCTAGCGCCTACTCTTCTGGACTAGA GGGAAGAAAGTTTCTCGCCTCACTCTGCTACCTTGAGCAAATTGGAGTGCTCCA ACCAGGCTTTAGCTTGTACAGCTTAGCATGGAATAACGAGATAAGACTTCGGCT CTTCTTGTTGGTGTCATGAATCGATAGTAATGGTTGATGAGGACATAGGGGGGC ATTTGTACTTGCTGGAGAGAGGTAAAATTCTAAGACCCTGCCAAGACAAACAAG TGCGAGAGCATTTGCCCAGGGTGAGCCTGTTGATCAAGGACGAAAGTTGGGGG ATCGAAGACGAATAGGAATCGACGTAGTCCCAACTATAAACTATGCCGACTGAG GATCAGTGGCCGTACTATTACGACTCCTTCGGCACTCCAACAGAAATATAAGTC	656

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน 18S rDNA) (5'->3')	ความยาว (bp)
	TTTGTGTCCTGCCGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGACACTTAATGGAATTGACGG AAGGACAGC	
PT10	GACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGGGTCTTGT AATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGT CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTT GCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAACTTGGCCTTGGCTGACCGGTCCGCCTCAC CGCGTGCACTGGTTCGGCCGGGGCTTTCCTTCTGGGGATCCGCATGGCCTTCAT TGGTCGTGTTGGGGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAG CAGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGGTC TATTTTGTTGGTTTCTAGGACCGCCGGAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGGCA TCAGAATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACT GCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAGTGAACGAAAGTTAGGGGA TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTGGGG ATCGGACGGT	604
PT12	CCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATT CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAA ACTTGGCCCTGGCTGACCGGACCGCCTCACCGCGTGCACTGGTCCGGCCGGGG CTTTCCTTCTGGGGATCTGCATGGCCTTCATTGGCTGTGTCGGGGAACCAGGAC TTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTAAGCTCGAATACATTA GCATGGAATAATGGAATAGGACGTGTGGTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGGACCG CCGTAATGATTAATAGGGATGGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTG AAATTCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGT TTTCATTAATCAGTGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCG TAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTGGGGATCGGACGGTGTTATCATTTTGA CCCGTTCGGCACCCTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGG TCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATG	619
PT16	TGAGATACGGTTACCACATCTAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATC CCGACACGGGGAGGTAGTGACCAGAAATAGCAACTCAGGACTATTATTTCTGTG ATTGCAATGAGCGGAAAGCAAAACTGTTTGCGAGTATCTATTGGAGGGCAAGTC TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCATCTCCAATAGCGTATATTAAAATTGCTG CAGTTAAAGCGTCCGTAGTCGGATTTCGTCCTTTCCAGTTAGATGTGCAGACTC	626

รหัสสาหร่าย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน 18S rDNA) (5'->3')	ความยาว (bp)
	CTCTTAGGCTCCGATCGCCTTCTCTTCTGGACTAGGGTGACGAAAAGTTACTTG TTTTCACTCTGTTACTTGAAGCAAACTGCAATGCTCCAACCATGCTTTAGCTTGA ACAGCTCTGCATGGAATATCGAAATACGACTTTGGATCTTGGTGCTGCTGCCTT TTTGTCATAAACCAGGTTGATAGGGAGATACGGCCGCATTTGTACTTTCTGGAT AGATGGGAAAATCTAAAACCCTGCAAACACCAACAAACGGGAAAGCGTTTGCCC ATTAGGCGCCTGTTGGTCTGTGGAGAAAGGTGGGGGATCGAAGAATATTAGGCA ACGACATACCCCCAAATATAAACTATGCCGA	
PT17	AATAAGATTACCAAATCCCGACACGGGGAGGTAGCGACCACAAATATAACTCAG GACAATGCCCTCCGAGATTGAATGAGGAGAATTCAACTCTGTGCGATAACTATA TTGGAGGACAACTGTGGCGCCAACACGCGGGGATTTTCCATCTCCCATAGCATA TATTAAATGTGCTGCAGATAGAGCGTGTGTACTCAGATCTTGCTCTCTCGTGAT GGATGCACTGGCCACTTTTAGTTTCCTAGCGCTTTCTCTACTGGACTAGGGAGA AGAAGGGTCCATTGTTTTGTCTCTCGCACTCTGAGAATATTGCAGCGTTCCCCC ACGGGTTTAAATTGAGCAGCTCAGCATGGAATAACGAGATAGGATTTCGGTTTT TCTTTTGGGAGTCATGA	395
PT18	GAGCGGAAAGCAAAACTGTTTGCGAATACCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA ACACCCGCGGAAATTCCATCTCCAATAGCGTATATTAAAATTGCTGCAGTTAAA GCGTCCGTAGTCGGATTTCGCCCTCTCGAGTTGGATGCAGAGGCTATTCTTAGT CTCCTAGCGCCTTCTCTTCTGGACTAGGGTGATGCAAGGTCGCTTGTTTTCACT CTGTTACTCTGAGCAAATTGGAGTGCTCCAACCAGGCTTTAGCTTGAACAGCTC AGCATGGAATAACGAGATAGGACTTTGGTTCTTCTTGTTGGTGTCATGAACCGA TAGGAATGGTTGATAAGGACATACGGGGGCATTTGTACTTGCTGGAGAGAGGTG AAATTCTAAGACCCTGCAAAGACAAACAAGTGGCAAAGCATTTGCCCAGGATGT GCCTGGTGATCAAGGACGAAAGTTGGGGGATCGAAGACGATTAAGAACCGGCG TAGTCCCAACTATAAACTATGCCGACTGAGGATCGGTGGCCGGATTTATACGAC TCCTTCGGCACTCCAAGAAAAATCTAAGTCTCTGGGCCCTGGGGGGAGTATGGT CGCAAGGCTGAAACTTAAAGGATTTGACGGAAGGGC	629
PT19	CGAAATCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGGAGGAAGACGGCCCGTGGGTTGTAA ACTCCTTTTCTTGGAGAAGAACAACTGACGGTATCCAAGGAATAAGCATCGTGT CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTATTACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAT TCATTGGGCGTAAAGGGTCCTGAGGTGGCCTGTTTAGTCTACTGTGAAAGCTCA	535

รหัสสาหร่าย	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีน 18S rDNA) (5'->3')**	**ความยาว (bp)**
	GGGCTTAACCCTGACAATGCGGTGGAAACTGGCAGGCTAGAATACGGTAGGGG CAAGGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCATATATATTGGGAGGAACACCA AAGGCGAAGGCACCTTGCTGGGCCGCTATTGACACTGACAGACGAAAGCCAGG GGAGTAACCCGGATTAGATACCCGGGTAATCCTGGCTGTAAACGATGGACACTA AGTGTTGAACGATTCAAACGTTCAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGTGTCCCGC CTGGGGAGTATGCTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCAA	

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสาร

1. สารสกัดเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ

1.1) Tris-Cl pH 8

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**
Tris base	121 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2) 0.5 M EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**
EDTA	186.10 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3) Washing buffer

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร**
PVP (Polyvinylpyrrolidone)	2 กรัม
Ascorbic acid	1.76 กรัม
1M Tris-HCl (pH 8.0)	20 มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Autoclaved water) จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4) 2X CTAB lysis buffer

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร**
CTAB	4 กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	8 มิลลิลิตร
NaCl	16.36 กรัม
1-mercaptoethanol	1 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.5) Choloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร**
Choloroform	192 มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8 มิลลิลิตร

1.6) Tris-EDTA buffer (TE buffer)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**
1 M Tris-Cl; pH 7.4, 7.5 หรือ 8.0	10 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA; pH 8.0	2 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากันนำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. สารเคมีในการทำพีซีอาร์และอิเล็คโตรโฟรีซิส

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

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย 500 มิลลิลิตร**
Tris (hydroxymethyl) amino methane	54 กรัม
EDTA	4.65 กรัม
Boric acid	27.50 กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Autoclaved water) จนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2) 1.5% Agarose gel (w/w)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**
Agarose	1.5 กรัม
1X TBE	100 มิลลิลิตร
Gel star	1 ไมโครลิตร

2.3) 3% Agarose gel (w/w)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**
Agarose	3.6 กรัม
1X TBE	120 มิลลิลิตร
Gel star	1.2 ไมโครลิตร

2.4) Washing buffer

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	2.00 กรัม
Ascorbic acid	1.76 กรัม
1 M Tris buffer; pH 8.0	20.00 มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4.00 มิลลิลิตร

เติมน้ำปราศจากประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล: รวีพัฒน์ จิวัฒนาสุข

วันเกิด: 2 ธันวาคม พ.ศ.2541

ที่อยู่ปัจจุบัน: 24/2-3 ซอยโรงเลี้ยงเด็ก ถนนบำรุงเมือง เขตป้อมปราบศัตรูพ่าย แขวงมหานาค จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10100

ประวัติการศึกษา

ชั้นประถม-มัธยมศึกษา: โรงเรียนเซนต์ฟรังซีสซาเวียร์คอนแวนต์

ปริญญาตรี: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย