



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล
SCAR ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเล
Development of DNA Barcoding and DNA Finger Printing
Using SCAR Markers for Seagrass Identification

ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

รหัสโครงการ 258237

สัญญาเลขที่ 131/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล
SCAR ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเล

Development of DNA Barcoding and DNA Finger Printing

Using SCAR Markers for Seagrass Identification

ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน

คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา เรื่องการพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCAR ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเล (Development of DNA Barcoding and DNA Finger Printing Using SCAR Markers for Seagrass Identification รหัสโครงการ 258237 /สัญญาเลขที่ 131/2560 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น ๓๖๑,๐๐๐ บาท (สามแสนหกหมื่นหนึ่งพันบาทถ้วน) ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี 9 เดือน (13 ธันวาคม 2559 ถึง 15 กันยายน 2562)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา DNA barcodes และลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์หญ้าทะเลชนิด 7 ชนิด ได้แก่ *Thalassia hemprichii* *Cymodocea serrulata* *Halodule uninervis* *Enhalus acoroides* *Halophila ovalis* *Halophila minor* และ *Halodule pinifolia* ผลการศึกษาวិจัยพบว่า ยีนมาตรฐาน *rbcl*, *matK*, *rpoB* และ *rpoC1* มีขนาดประมาณ 720 900 520 และ 590 คู่เบส ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ายีนดังกล่าวสามารถใช้มาพัฒนาเป็น barcoding เพื่อจำแนกชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเลได้

ในการการพัฒนา SCAR Marker ชนิด genetic barcode พบว่าของหญ้าทะเล 6 ชนิดคือ *Thalassia hemprichii* *Cymodocea serrulata* *Halodule uninervis* *Enhalus acoroides* *Halophila ovalis* และ *Halodule pinifolia* สามารถสร้าง genetic barcode ได้ 2, 2, 1, 1, 2 และ 1 genetic barcode ตามลำดับ โดย genetic barcode เหล่านี้ถูกสร้างขึ้นมาจากยีนที่มีหน้าที่เฉพาะ และสามารถแยกหญ้าทะเลแต่ละชนิดออกจากกันได้

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, เครื่องหมายโมเลกุล SCAR, หญ้าทะเล

Abstract

The objectives of this study were to develop DNA barcodes and DNA fingerprints by using Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) that are specific to 7 species of sea grass species, *Thalassia hemprichii*, *Cymococea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, *Halophila minor* and *Haludole pinifolia*. The results showed that the barcoding genes *rbcl*, *matK*, *rpoB* and *rpoC1* were generated approximately 720, 900, 520 and 590 bp, respectively. They can be developed as barcoding for identification of seagrass species.

In the development of SCAR markers by genetic barcode were able to generated genetic barcode marker, which is 2, 2, 1, 1, 2, and 1 marker from 6 species of seagrass, *Thalassia hemprichii*, *Cymococea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis* and *Haludole pinifolia*, respectively. They could be served as a specific functional marker for identified species of seagrass.

Keywords: DNA barcodes, DNA fingerprint, SCAR marker, Seagrass

ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการวิจัย

โครงการวิจัย เรื่องการพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCAR ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเล (Development of DNA Barcoding and DNA Fingerprinting Using SCAR Markers for Seagrass Identification) ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาตินั้น รหัสโครงการ 258237 /สัญญาเลขที่ 131/2560 ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการวิจัย มีดังนี้

1. ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการนำยีนมาตรฐานมาใช้ในการจำแนกชนิดของหญ้าทะเลที่พบขึ้นประจำถิ่นอยู่ในเขตชายฝั่งภาคตะวันออกของอ่าวไทย ได้แก่ *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Halophila ovalis* *Halophila minor* และ *Thalassia hemprichii*
2. การพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCAR ซึ่งเมื่อได้ข้อมูลหน้าที่ของยีนที่ถูกต้องแล้ว จึงได้พัฒนาเป็น Genetic barcode marker ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเล

ผลลัพธ์ (outcome) ที่ได้จากโครงการวิจัย

หญ้าทะเลเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา ความหลากหลายนี้ไม่ได้เกิดจากโครงสร้างทางจีโนมเท่านั้น แต่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันก็อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน ทำให้เกิดลักษณะภายนอก (Phenotype) ที่ต่างกันด้วย ในหญ้าทะเลชนิดเดียวกัน แต่อาศัยอยู่ต่างสถานที่ อาจเกิดความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นได้ โดยมีสาเหตุหลายประการ เช่น การขาดช่วงทางพันธุกรรม การคัดเลือก โดยธรรมชาติหรือมนุษย์ และการกลาย ซึ่งทั้งหมดนี้ขึ้นอยู่กับการถ่ายทอดของยีน (gene flow) ซึ่งถ้ามีการถ่ายทอดของยีนมาก ประชากรก็จะแตกต่างกันน้อย และถ้ามีน้อยหรือไม่มีเลยก็จะแตกต่างกันมาก ดังนั้น

1. เกิดองค์ความรู้ใหม่เชิงวิชาการ ได้แก่ การสร้าง DNA barcodes สำหรับบ่งชี้หรือจำแนกสายพันธุ์หญ้าทะเล และลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด SCAR ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์หญ้าทะเล ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาและพัฒนาอนุกรมวิธานของหญ้าทะเล
2. เกิดการพัฒนาข้อมูลพื้นฐานและงานวิจัยด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์ของหญ้าทะเล
3. ผลการวิจัยสามารถวิเคราะห์ถึงวิวัฒนาการ ความสัมพันธ์และการแพร่กระจายของหญ้าทะเลในแต่ละชนิดพันธุ์ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในอนุรักษ์และคุ้มครองพันธุ์พืชได้
4. ผลการค้นคว้าวิจัยสามารถตีพิมพ์และเผยแพร่ได้ในการประชุมวิชาการหรือวารสารระดับชาติและนานาชาติ

ข้อเสนอแนะ

หญ้าทะเลเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์ทางทะเลเป็นอย่างมาก เช่น แหล่งหญ้าทะเลเป็นผลิตขั้นปฐมภูมิ (Primary producers) ในระบบห่วงโซ่อาหาร (Food chain) ทางทะเล คือหญ้าทะเลเป็นพืชที่มีสีเขียวที่คอยดึงเอาพลังงานความร้อนจากดวงอาทิตย์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากสัตว์ต่าง ๆ ในน้ำหายใจออกมา สำหรับการสังเคราะห์แสง ในขณะเดียวกันหญ้าทะเลก็จะปล่อยก๊าซออกซิเจนออกมาให้กุ้ง หอย ปู ปลา และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ นำกลับไปใช้หายใจ และเมื่อหญ้าทะเลหลุดร่วงลงก็จะถูกพวกจุลินทรีย์ในน้ำทำหน้าที่ย่อยสลายให้กลายเป็นอาหารของพวกแพลงตอนต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนอื่น ๆ อีกต่อไป ซึ่งสัตว์น้ำพวกนี้เมื่อโตขึ้นจะเป็นอาหารของสัตว์กินเนื้อต่อไปเป็นวงจรแห่งวัฏจักรห่วงโซ่

การสร้างระบบการจัดจำแนกหญ้าทะเลที่มีประสิทธิภาพนับว่าเป็นสิ่งที่ควรกระทำ ซึ่งการจัดจำแนกโดยใช้รูปทรงหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ การนำความรู้ด้านชีวโมเลกุลเข้ามาช่วย จะได้ผลที่ได้รับความนิยมถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น เพราะลักษณะภายนอกสามารถแปรเปลี่ยนไปได้ตามสภาพแวดล้อมนั้น ๆ แต่ลักษณะทางพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอสามารถเปลี่ยนได้ ดังนั้นการผลลัพธ์จากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถต่อยอดไปยังการพัฒนาระบบ DNA barcode ของหญ้าทะเลพันธุ์อื่นๆ เพื่อสร้างเอกลักษณ์และอนุรักษ์ไปพร้อมกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 131/2560

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 131/2560).

คำนำ

หญ้าทะเลเป็นพืชที่มีคุณค่ามากทั้งต่อระบบนิเวศหญ้าทะเล และวิถีชุมชน ปัจจุบันพบว่าหญ้าทะเลทั่วโลกถูกทำลายจำนวนมาก นับเป็นการสูญเสียที่ต้องเร่งฟื้นฟูกลับมา นอกจากนี้ หญ้าทะเลเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา ความหลากหลายนี้ไม่ได้เกิดจากโครงสร้างทางจีโนมเท่านั้น แต่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันก็อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน ในหญ้าทะเลชนิดเดียวกัน แต่อาศัยอยู่ต่างสถานที่ อาจเกิดความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นได้ โดยมีสาเหตุหลายประการ เช่น การขาดช่วงทางพันธุกรรม การคัดเลือก โดยธรรมชาติหรือมนุษย์ และการกลาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาเครื่องมือที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างที่เกิดขึ้นเหล่านี้

ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลและดีเอ็นเอบาร์โค้ด นับเป็นเครื่องมือทางอนุกรมวิธานที่สำคัญในการที่จำแนกหรือบ่งชี้สปีชีส์ รวมทั้งสปีชีส์ที่เกิดใหม่ได้เป็นอย่างดี อันจะเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ อนุรักษ์พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การสนับสนุนงานทางด้านอนุกรมวิธาน (Taxonomy) สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของหญ้าทะเลในประเทศไทย การขยายพันธุ์ รวมไปถึงมาตรการการคุ้มครองพันธุ์พืชในอนาคตอีกด้วย

ปัทมา ศรีน้ำเงิน
กันยายน 2562

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ii
สารบัญรูป	v
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
กรอบแนวคิด	3
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	4
หญ้าทะเล	4
ดีเอ็นเอมาตรฐานหรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcodes)	5
เครื่องหมายโมเลกุล	7
บทที่ 3 วิธีการศึกษาวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัยและอภิปราย	20
ส่วนที่ 1 การศึกษา DNA barcoding ในหญ้าทะเล	20
ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ความน่าจะเป็น DNA Barcoding ของยีนมาตรฐานใน หญ้าทะเลด้วยโปรแกรม DNA Subway	36
ส่วนที่ 3 การพัฒนา SCAR Marker ชนิด genetic barcode	44
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาวิจัย	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	56
รายงานสรุปการเงิน	57
ภาพผนวกที่ 1	58
ภาพผนวกที่ 2	64
ประวัติผู้วิจัย	66

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>ITS</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>rpoB</i> และ <i>rpoC1</i>	18
3.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือไพรเมอร์ชนิด SRAP	19
4.1	ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด	24
4.2	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะกับเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อสร้ง barcoding ของหญ้าทะเล	26
4.3	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากบริเวณอนุรักษ์ <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>rpoB</i> และ <i>rpoC1</i> ของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม BLASTN	32
4.4	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่ถูกสร้างขึ้นยืนยันมาตรฐาน <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>rpoB</i> และ <i>rpoC1</i> ของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม BLASTX	34
4.5	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากที่ได้จากความแตกต่างหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม BLASTN	48
4.6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและบาร์โค้ดชนิด Genetic Barcode	50

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางสัณฐานภายนอกของหญ้าทะเล ก. <i>H. pinifolia</i> ข. <i>H. uninervis</i>	5
2.2 ribosomal RNA แสดงบริเวณ ITS	6
3.1 การเก็บตัวอย่างหญ้าทะเลชนิด <i>Enhalus acoroides</i>	11
3.2 การล้างทำความสะอาดหญ้าทะเลในห้องปฏิบัติการ	12
3.3 การบันทึกภาพถ่ายเพื่อการจำแนกชนิดของหญ้าทะเล	12
3.4 การบดตัวอย่างหญ้าทะเลโดยใช้ไนตริเจนเหลว	13
3.5 การสกัดดีเอ็นเอของหญ้าทะเลโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Tiangen	14
4.1 หญ้าทะเลชนิด <i>Thalassia hemprichii</i> บริเวณเกาะกระดาด จ.ตราด	20
4.2 หญ้าทะเลชนิด <i>Cymodocea serrulata</i> บริเวณเกาะกระดาด จ.ตราด	21
4.3 หญ้าทะเลชนิด <i>Halodule uninervis</i> บริเวณกระดาด จ.ตราด	21
4.4 หญ้าทะเลชนิด <i>Enhalus acoroides</i> บริเวณกระดาด จ.ตราด	22
4.5 หญ้าทะเลชนิด <i>Halophila ovalis</i> บริเวณกระดาด จ.ตราด	22
4.6 หญ้าทะเลชนิด <i>Halophila minor</i> บริเวณฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี	23
4.7 หญ้าทะเลชนิด <i>Halodule pinifolia</i> บริเวณหมู่บ้านร็อคคาเด็นท์ จ.ระยอง	23
4.8 จีโนมิตีเอ็นเอของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด บนเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	24
4.9 ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด <i>rbcL</i> บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด	27
4.10 ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด <i>matK</i> บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด	28
4.11 ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด <i>rpoB</i> บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด	29
4.12 ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด <i>rpoC1</i> บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด	30
4.13 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตรฐาน <i>rbcL</i> ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP MJ ด้วยโปรแกรม DNA Subway	38
4.14 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตรฐาน <i>rbcL</i> ในหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.15	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตรฐาน <i>matK</i> ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYMLIP MJ ด้วยโปรแกรม DNA Subway	40
4.16	การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตรฐาน <i>matK</i> ในหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway	40
4.17	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตรฐาน <i>rpoB</i> ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYMLIP MJ ด้วยโปรแกรม DNA Subway	41
4.18	การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตรฐาน <i>rpoB</i> ในหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway	41
4.19	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตรฐาน <i>rpoC1</i> ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYMLIP MJ ด้วยโปรแกรม DNA Subway	42
4.20	การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตรฐาน <i>rpoC1</i> ในหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway	42
4.21	ผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์ em15-me5 จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด	45
4.22	ผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์ em12-me4 จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด	46

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หญ้าทะเลเป็นพืชที่มีคุณค่ามากทั้งต่อระบบนิเวศหญ้าทะเล และวิถีชุมชน แนวหญ้าทะเลเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและอนุบาลสัตว์น้ำ การทำประมงชายฝั่ง และการเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของพะยูน ปัจจุบันพบว่า หญ้าทะเลทั่วโลกถูกทำลายไปแล้วประมาณ 29 เปอร์เซ็นต์ (Waycott *et al.*, 2009) นับเป็นการสูญเสียที่ต้องเร่งฟื้นฟูกลับคืนมา ทั้งเพื่อความสมบูรณ์ของระบบนิเวศเอง และการดำรงชีวิตของมนุษย์ นอกจากนี้หญ้าทะเลเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา ความหลากหลายนี้ไม่ได้เกิดจากโครงสร้างทางจีโนมเท่านั้น แต่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันก็อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน ทำให้เกิดลักษณะภายนอก (Phenotype) ที่ต่างกันด้วย ในหญ้าทะเลชนิดเดียวกัน แต่อาศัยอยู่ต่างสถานที่ อาจเกิดความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นได้ โดยมีสาเหตุหลายประการ เช่น การขาดช่วงทางพันธุกรรม การคัดเลือก โดยธรรมชาติหรือมนุษย์ และการกลาย ซึ่งทั้งหมดนี้ขึ้นอยู่กับการถ่ายเทของยีน (gene flow) ซึ่งถ้ามีการถ่ายเทของยีนมาก ประชากรก็จะแตกต่างกันน้อย และถ้าน้อยหรือไม่มีเลยก็จะแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาเครื่องมือที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างที่เกิดขึ้นเหล่านี้

จากความก้าวหน้าทางอณูชีววิทยา ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ ๆ ขึ้นมากมายที่เป็นประโยชน์ต่อการพิสูจน์ทราบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการพิสูจน์เอกลักษณ์หรือการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าทะเล จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ เช่น PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) analysis, Polymerase Chain Reaction (PCR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) และ ชนิด Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) ในขณะเดียวกันการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcodes) เป็นอีกเทคนิคทางอณูชีววิทยาหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากเพราะมีประสิทธิภาพ และความแม่นยำสูงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นเครื่องมือโมเลกุลและดีเอ็นเอบาร์โค้ด นับเป็นเครื่องมือทางอนุกรมวิธานที่สำคัญในการที่จำแนกหรือบ่งชี้สปีชีส์ รวมทั้งสปีชีส์ที่เกิดใหม่ได้เป็นอย่างดี อันจะเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ อนุรักษ์พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การสนับสนุนงานทางด้านอนุกรมวิธาน (Taxonomy) สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของหญ้าทะเลในประเทศไทย การขยายพันธุ์ รวมไปถึงมาตรการการคุ้มครองพันธุ์พืชในอนาคตอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนา DNA barcodes และลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์หญ้าทะเลชนิด 6 ชนิด ได้แก่ *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Halophila ovalis* และ *Thalassia hemprichii*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ

- เกิดองค์ความรู้ใหม่เชิงวิชาการ ได้แก่ การสร้าง DNA barcodes สำหรับบ่งชี้หรือจำแนกสายพันธุ์หญ้าทะเล และลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด SCAR ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์หญ้าทะเล ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาและพัฒนาอนุกรมวิธานของหญ้าทะเล
- เกิดการพัฒนาข้อมูลพื้นฐานและงานวิจัยด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์ของหญ้าทะเล
- ผลการวิจัยสามารถวิเคราะห์ถึงวิวัฒนาการ ความสัมพันธ์และการแพร่กระจายของหญ้าทะเลในแต่ละชนิดพันธุ์ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในอนุรักษ์และคุ้มครองพันธุ์พืชได้
- ผลการค้นคว้าวิจัยสามารถตีพิมพ์และเผยแพร่ได้ในการประชุมวิชาการหรือวารสารระดับชาติและนานาชาติ

บทที่ 2

ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตหรือการจัดอนุกรมวิธานนั้น แต่เดิมจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และกายวิภาคศาสตร์ ซึ่งเป็นการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะที่ปรากฏที่มองเห็นด้วยสายตาใจการจัดจำแนก ซึ่งก่อให้เกิดความผิดพลาดได้ เนื่องจากบางครั้งลักษณะที่ปรากฏอาจเป็นมาจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดความแปรปรวนของสิ่งมีชีวิต ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุล เพื่อช่วยในการระบุชนิดและการบอกความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต เช่น ข้อมูลโปรตีน และข้อมูลดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการทางชีวโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน มาประยุกต์ใช้ โดยอาศัยหลักการที่ว่า สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีสารพันธุกรรมที่เกิดจากการจัดเรียงตัวของเบส 4 ชนิด คือ A (Adenine) T (Thymine) C (Cytosine) และ G (Guanine) ในลำดับนิวคลีโอไทด์หรือสายดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะเป็นเอกลักษณ์ในสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ซึ่งแตกต่างไปจากสิ่งมีชีวิตอื่น และสามารถแยกได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโตหรือทุกระยะของการพัฒนา (วิชัย, 2552)

ปัจจุบันองค์กร The Consortium for the Barcode of Life (CBOL), Canadian Centre for DNA Barcoding, Global Biodiversity Information Facility (CBIF) กำลังจัดทำมาตรฐานและคู่มือในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่สัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เช่น ยีน cytochrome C oxidase (COI) ของไมโทคอนเดรียเป็นบาร์โค้ดที่ค่อนข้างดีคือสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างชนิดพันธุ์ได้ดี ในขณะที่ในพืชพบว่ายีน *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*, *accD*, *ndhA*, *ndhJ* และ *ndhK* สามารถใช้เป็นยีนมาตรฐานในพืชได้ (พรรษาและอรุณรัตน์, 2556)

หญ้าทะเลเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา จากที่ต้องได้รับผลกระทบและแรงกดดันจากสภาพสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้น การอนุรักษ์ ความหลากหลายทางชีวภาพจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตสามารถระบุได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

หญ้าทะเล

หญ้าทะเล (seagrass) อยู่ใน Division Magnoliophyta จัดอยู่ใน Class Liliopsida Genera Angiospermae Subclass Alismatidae จัดเป็นพวก Hydrophytes หญ้าทะเลเป็นกลุ่มพืชดอกพิเศษกลุ่มเดียวเท่านั้นที่พัฒนากลับลงไปสู่ทะเล จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ที่มีระบบท่อน้ำเลี้ยงอย่างแท้จริงโดยลำต้นของหญ้าทะเลส่วนที่อยู่ใต้ดิน (Rhizome) จะทอดขนานไปในแนวราบบริเวณพื้นทะเล โดยลำต้นใต้ดินจะมีลักษณะเป็นข้อต่อ (Node) ซึ่งแบ่งส่วนของลำต้นใต้ดินเป็นช่วง ๆ ในส่วนของลำต้นที่โผล่ขึ้นมาจากผิวดินและใบจะตั้งตรงขึ้นมาจากพื้น สีของใบเป็นสีเขียว ลำต้น ราก และใบของหญ้าทะเลมีสารประกอบลิกนิน มีเส้นใบ และช่องอากาศ ดอกของหญ้าทะเลจะมีขนาดเล็ก มีละอองเรณูลักษณะยาวคล้ายเส้นด้าย เมล็ดมีขนาดเล็ก บางชนิดมีการพัฒนาผลขนาดเล็กอยู่ข้างใน ผลมีลักษณะอ่อนนุ่ม จากรายงานพบหญ้าทะเลหลายชนิดขึ้นกระจายตามชายฝั่งบริเวณน้ำตื้นเกิดเป็น “แนวหญ้าทะเล” (Seagrass beds หรือ Seagrass meadows)

ในประเทศไทยเริ่มมีการสำรวจการแพร่กระจายในปี 2529 และรายงานในปี 2537 พบว่ามีทั้งหมด 12 ชนิด แบ่งเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานของใบ ดังนี้

1. กลุ่มใบยาว ประกอบด้วย *Enhalus acorides*, *Syringodium isoetifolium*, *Halodule uninervis*, *Halodule pinifolia*, *Ruppia maritime*, *Cymodocea rotundata*, *Cymodocea serrulata* และ *Thalassia hemprichii*.
2. กลุ่มใบสั้น ประกอบด้วย *Halophila ovalis*, *H. minor*, *H. decipiens* และ *H. beccarii*

จากลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏ พบว่า *H. uninervis* และ *H. pinifolia* มีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก (ภาพที่ 2.1) จึงมักเกิดความสับสนและผิดพลาดในการจำแนก และมีรายงานว่าหญ้าทะเลชนิดนี้มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง (Short et al., 2010)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานภายนอกของหญ้าทะเล ก. *H. pinifolia* ข. *H. uninervis*
ที่มา: www.symbiosis.nre.gov.my

ดีเอ็นเอมาตรฐานหรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcodes)

Hebert et al (2003) มีความคิดที่จะจำแนกสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั่วโลกที่มีจำนวนมากกว่า 1,800,000 ชนิด โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ของบางยีนที่มีความคงตัว และเป็นมาตรฐาน มาสร้างเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อให้ง่ายต่อการจำแนก ตรวจสอบ และติดตามชนิดของสิ่งมีชีวิต และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณปลายด้าน 5' ของยีน *Cytochrome c oxidase subunit 1* (*Cox1* หรือ *COI*) ในสัตว์ที่อยู่บริเวณไมโทคอนเดรีย ที่มีขนาดประมาณ 648 คู่เบส มีความแตกต่างกันพอที่จะแยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในขณะที่สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความแตกต่างกันน้อยมากหรือไม่มีเลย ทำให้มีความนิยมใช้ยีนนี้ในการจำแนกชนิดในสัตว์ ดังนั้น Hebert จึงได้เสนอคำว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อใช้สำหรับเรียกดีเอ็นเอบริเวณหนึ่งๆ ในจีโนมที่มีลำดับดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด แต่ในพืชพบว่ามียีน *COI* นี้ไม่สามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ เนื่องจากมีความแตกต่างระหว่างชนิดต่ำมาก หรือมีวิวัฒนาการต่ำ จึงมีการใช้ยีนอื่นๆ ที่อยู่ในคลอโรพลาสต์แทนได้แก่ ยีน *maturaseK* (*matK*), *trnH-psbA intergenic spacer*, *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit* (*rbcl*) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานยีนบริเวณคลอโรพลาสต์ที่มีความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพิ่มเติม ได้แก่ *atpF-atpH spacer*, *rpoB*, *rpoC1* และ *psbK-psbI spacer* (CBOL, 2009) ปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกประมาณ 50 ประเทศ 150 หน่วยงาน ร่วมมือกันก่อตั้งองค์การความร่วมมือระหว่างประเทศ Consortium for the Barcode of Life (CBOL) เพื่อศึกษา และรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต อันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิวัฒนาการและความผันแปรของสิ่งมีชีวิตต่อไป

Internal Transcribed Spacer (ITS)

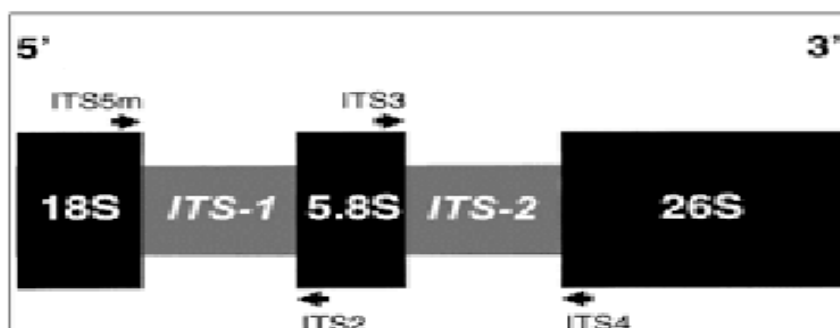
ดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacers (ITSs) ของ ribosomal DNA (rDNA) (ภาพที่ 2.2) มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปในการศึกษาเพื่อจำแนกหรือบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่น ๆ ของ rDNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ ซึ่งในปัจจุบันมีการนำ ITS มาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตกันอย่างแพร่หลาย

ยีน *maturaseK* (*matK*)

ยีน *matK* รายงานครั้งแรกใน มีขนาดประมาณ 1,550 คู่เบส ซึ่งเมื่อแปลรหัส (translation) จะได้ขึ้น polypeptide ของเอนไซม์ maturase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนไลซีน (lysine) โดยมีรายงานว่ายีน *matK* มี วิวัฒนาการเร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีนที่อยู่ใน คลอโรพลาสต์ และเป็นยีนที่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ได้ง่าย (Plunkett et al., 1997)

ยีน ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*)

ยีน *rbcL* ในพืชมี หลากหลายขนาด เช่น 1,428, 1,431 หรือ 1,434 คู่ เบส เป็นยีนที่ไม่มีอินตรอน (intron) สอดแทรกอยู่ภายใน เมื่อถอดรหัส (transcription) และแปลรหัสจะได้หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์ รูบิสโก (rubisco) หรือ ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide fixation) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) มีรายงานว่าการใช้ยีน *matK* ร่วมกับ *rbcL* เป็นรหัส แท่งดีเอ็นเอจะทำให้การจัดกลุ่มและการพิสูจน์ เอกลักษณ์ชัดเจนขึ้น (Plunkett et al., 1997)



ภาพที่ 2.2 ribosomal RNA แสดงบริเวณ ITS

ที่มา <http://hermes.bionet.nsc.ru/pg/32/42.htm>

ยีนมาตรฐาน *trnH-psbA*

ยีน *trnH* (tRNA-His) เป็นยีนในส่วนที่ไม่ได้แปลรหัสเป็นโปรตีนของคลอโรพลาสต์ ถูกถอดรหัสได้เป็น tRNA^{His} (GUG) และจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine, H) เพื่อนำไปสู่การต่อสาย พอลิเปปไทด์ (polypeptide) และกลายเป็นโปรตีนในที่สุด ส่วนยีน *psbA* (photosystem II protein D1) เป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ photosystem II ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชอีกบริเวณหนึ่งด้วย เนื่องจากการแปรผันของดีเอ็นเอภายในสปีชีส์ (intraspecific variation) สูงที่สุดในพลาสต์ดีเอ็นเอ

ยีนมาตรฐาน *rpoC1*

ยีน *rpoC1* คือยีนที่แปลรหัสได้เป็นพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์ อินทรอนที่พบในยีน *rpoC1* เป็นลักษณะปกติที่สามารถพบได้ในพืชดอกที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน โดยเป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่มาก มีอัตราการเปลี่ยนแปลงในเอกซอนและอินทรอนที่ให้ข้อมูลเพียงพอในพืชหลายชนิด ผลจากบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงแทนที่มากจะถูกวิเคราะห์เป็นข้อมูลความสัมพันธ์ได้ดี

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker)

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker) อาจเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของยีนหรือไม่ใช่ยีน อาจจะมีหน้าที่หรือไม่ก็ได้ในทางชีววิทยา เป็นเครื่องหมายบอกขอบเขตหรือตำแหน่งในจีโนม ดังนั้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมจึงเป็นประโยชน์สำหรับการทำแผนที่จีโนม การพัฒนาทางชีวโมเลกุลในการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแสดงวิวัฒนาการและการจำแนกพันธุ์ ตลอดจนติดตามเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Marker) เครื่องหมายโมเลกุลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ Biochemical Marker และ DNA Marker

1. Biochemical Markers เครื่องหมายโมเลกุลทางชีวเคมีที่เป็นการวิเคราะห์โปรตีนได้แก่

ไอโซไซม์ (Isozyme) และอัลโลไซม์ (Allozyme) (Markert and Moller, 1959; Smith, 1984) เครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้มีการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1966 ใน *Drosophila* (Lewontin and Hubby, 1966) หลังจากนั้นจึงเริ่มมีการศึกษาในพืชชั้นสูง และเริ่มมีการใช้อย่างแพร่หลายทั้งในพืชและสัตว์ เพื่อศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต (Arus, 1993)

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอบน

โครโมโซม ในนิวเคลียสหรือนอกนิวเคลียส ในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียที่อาจเกิดความแปรปรวนได้ภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอและมีความหลากหลายที่สามารถตรวจสอบได้ โดยการแบ่งตรวจสอบออกได้เป็น 2 วิธี คือ (1) วิธีไฮบริดไดเซชัน (Hybridization) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme) โดยอาศัยการจับอย่างจำเพาะระหว่างโพรบ (probe) ซึ่งอาจเป็นยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจกับดีเอ็นเอเป้าหมายในจีโนม ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (2) Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณใด ๆ ที่สนใจ โดยอาจเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวหรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกันหลายตำแหน่งก็ได้ เป็นวิธีที่ทำได้สะดวกและรวดเร็ว เช่น RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeat), AFLP (amplified fragment length polymorphism), MSAP (methylation-sensitive amplified polymorphism) และ SRAP (sequence-related amplified polymorphism) เป็นต้น

เครื่องหมายโมเลกุล sequence-related amplified polymorphism (SRAP)

SRAP หรือ sequence-related amplified polymorphism เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Li and Quiros. (2001) เพื่อสร้างแผนที่ยีนและทำ gene tagging ใน *Brassica oleracea* โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิดคือ ชนิด forward มีขนาด 17 เบส ประกอบด้วยส่วนของ filler ต่อด้วยเบส CCGG เพื่อให้จับกับคู่กันได้ดีกับ exon หรือ open reading frame (ORF) ซึ่งมักเป็นบริเวณที่มีองค์ประกอบของเบสเป็น GC rich ในขณะที่ไพรเมอร์ reverse มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยส่วนของ filler ต่อด้วยเบส AATT เพื่อให้จับกันได้ดีกับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณ AT สูง ซึ่งมักพบในส่วนของ intron และโปรโมเตอร์ของยีน ข้อดีของเครื่องหมาย SRAP คือทำได้ง่าย รวดเร็ว ไม่ต้องการทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งใกล้เคียงกับเทคนิค AFLP แต่ทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่า (สุรินทร์, 2543)

เครื่องหมายโมเลกุล Start Codon Targeted (SCoT)

Start Codon Targeted (SCoT) เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลชนิดใหม่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Bertrand et.al (2009) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการรวมข้อดีของเทคนิค SRAP และ TRAP (Target region amplified polymorphism; Hu and Vick, 2003) เข้าไว้ด้วยกัน โดยเทคนิค SCoT จะใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวที่ประกอบด้วยตำแหน่ง ATG อยู่ในไพรเมอร์ ทำให้ตำแหน่งการตรวจจับของไพรเมอร์จะเป็นบริเวณยีนหรือ รอบๆ coding region จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ปฏิบัติการได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง ไพรเมอร์ที่ใช้เป็น universal primer ผลการตรวจสอบมีความน่าเชื่อถือ เกิดโพลิเมอร์ฟิซิมและมีประสิทธิภาพ สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชได้

เครื่องหมายโมเลกุล Sequence characterized amplified region (SCAR)

Sequence Characterized Amplified Regions (SCARs) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่เปลี่ยนมาจากแถบ AFLP หรือ RAPD หรือ โมเลกุลเครื่องหมายชนิดอื่นๆ ซึ่งอยู่บนพื้นฐานของการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มหลายตำแหน่ง โดยการโคลนและหาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างเพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับปริมาณดีเอ็นเอแถบที่จำเพาะนั้นเพียงแถบเดียว ด้วยเทคนิคการทำพีซีอาร์ ดังนั้นผลที่ได้จะมีความแม่นยำ มีความสม่ำเสมอและสามารถทำซ้ำได้ ซึ่งจัดว่าเป็นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดจำเพาะได้ (specific molecular markers) สามารถนำไปใช้ในการทำ Marker assisted selection เพื่อการพัฒนาพันธุ์พืช หรือใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์พืช

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วุฒิพงษ์ มหาคำ (2554) DNA barcodes ของพืชหลักการพื้นฐานการประยุกต์ใช้ และข้อจำกัดพบว่า DNA barcode เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมา เพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทป์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อ วิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบกับนั้น อาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและเป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่นๆที่ต้องการใช้เปรียบเทียบกับวิธีการสร้างระบบ DNA barcode จะช่วยให้ระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ รวมถึงในสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็ก ทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักอนุกรมวิธานและบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธานและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา นิติศาสตร์และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพและเภสัชภัณฑ์ เป็นต้น ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันว่าระบบ DNA barcode ของพืชมีประสิทธิภาพในการแยกและระบุชนิดพืชได้ดีไม่ด้อยไปกว่าของสัตว์และยังไม่สามารถนำไปใช้ได้ครอบคลุมกับกลุ่มในบทความนี้ได้เสนอข้อมูลพื้นฐานและการประยุกต์ใช้เกี่ยวกับ DNA barcode ของพืช นอกจากนี้ ยังชี้ให้เห็นถึงข้อพึงระวังในการใช้ข้อมูลให้ถูกต้อง รวมถึงข้อจำกัดของวิธีการนี้ด้วย

วลัยลักษณ์ (2554) ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์ เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ สละสุมาลี สละเนืองวงศ์ และสละหม้อ พบว่าสามารถพัฒนา SCAR markers ได้สองคู่ที่สามารถแยกสละทั้งสามขนาดออกจากกันได้

พรรษา และคณะ 2556 รายงานการศึกษาการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสมุนไพรแปรรูปสกุลซีเหล็ก (*Senna*) จำนวน 14 ชนิด โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ ได้แก่ *matK*, *rbcl* และ *trnH-psbA* intergenic spacer พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดประจำชนิดพืชคือ *trnH-psbA* intergenic spacer และ *rbcl*

สามารถระบุชนิดพืชได้โดยมีค่าความผันแปรของนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.029-0.647 และ 0.010-0.062 ตามลำดับ และพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnH-psbA* intergenic สามารถใช้ระบุชนิดพืชได้ดีที่สุดโดยระบุชนิดได้ 71.43 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *matK* ไม่สามารถใช้ในการระบุชนิดของพืชได้ ซึ่งสอดคล้องการรายงานผลการวิจัยของ de Groot et al (2011) ระบุว่า ยีน *rbcl* และ *trnH-psbA* intergenic spacer สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเฟิร์น (NW-European fern) ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ยีน *matK* ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้

นฤมล และคณะ (2557) รายงานผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม จำนวน 12 ชนิด โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาตรฐานยีน *matK*, *rbcl*, *rpoB*, *rpoC1* และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH-psbA* พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcl* สามารถแยกกล้วยไม้สกุลกลอกตาหมู่สิงโตสยามออกจากกันได้ ยกเว้น สิงโตกำมพูใหญ่และสิงโตกำมพูแดงสามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* หรือขึ้นดีเอ็นเอ *trnH-psbA*

Saunders (2005) รายงานผลการศึกษาเบื้องต้นของการนำยีน *Cox1* มาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อบ่งชี้ชนิดพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายชนิด red macroalgae ได้แก่ สปีชีส์ *Mazzaella*, *Dilsea*, *Neodilsea* และ *Asteromenia* ที่ขึ้นบริเวณทะเลแปซิฟิกเหนือ จำนวนทั้งหมด 37 สปีชีส์ ซึ่งผลการทดลองทดลองว่า ยีน *Cox1* มีแนวโน้มที่จะบ่งสปีชีส์ของ red macroalgae ได้ดี และตรวจพบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ แต่ยังคงต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เนื่องจาก ยีน *Cox1* เป็นยีนในไมโทคอนเดรียซึ่งมีความผันแปรต่ำ

Lucas et al (2012) ทำการพัฒนาระบบเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในหญ้าทะเลจำนวน 14 ชนิดพันธุ์ที่พบบริเวณแถบชายฝั่งประเทศอินเดีย โดยการใช้ยีนจำเพาะ *rbcl* และ *matK* ผลการทดลองพบว่า ยีน *matK* มีประสิทธิภาพในการระบุหรือจำแนกสายพันธุ์ได้ดีกว่ายีน *rbcl*

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างหญ้าทะเล

ทำการเก็บใบอ่อนของหญ้าทะเลทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *E. acoroides* *H. pinifolia* *Cymodocea serrulata* *Halodule uninervis* *Halophila ovalis* และ *Thalassia hemprichii* ซึ่งสามารถเก็บได้ตามแนวชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัด ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด โดยล้างใบอ่อนของหญ้าทะเลให้สะอาด ปราศจากโคลนและ epiphytes ต่าง ๆ วางบนน้ำแข็งเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการต่อไป (ภาพที่ 3.1)

จากนั้นล้างทำความสะอาดในห้องปฏิบัติการอีกครั้ง โดยล้างน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่าง ๆ บันทึกรายละเอียดของหญ้าทะเลต่างด้วยการถ่ายภาพแล้วจำนวนชนิดของหญ้าทะเลเบื้องต้นโดยการเปลี่ยนเทียบกับหนังสือคู่มือการจำแนกหญ้าทะเล (สมบัติ และคณะ, 2549) (ภาพที่ 3.2-3.3)



ภาพที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides*



ภาพที่ 3.2 การล้างทำความสะอาดห้วยทะเลในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 3.3 การบันทึกภาพถ่ายเพื่อการจำแนกชนิดของห้วยทะเล

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Tiangen Biotech (Beijing) CO.LTD) โดย บดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียด แล้วใส่ในไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ Buffer LP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และใส่ RNase ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ใส่ Buffer LP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสม 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ปิดส่วนใส่ไมโครทิวใหม่ ใส่ Buffer LP3 ปริมาตร 1.5 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน 15 วินาที ปิดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน คอลัมน์ CB3 ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที หลังจากนั้นเทน้ำใน คอลัมน์ CB3 ที่ใส่ Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบต่อนาที 30 วินาที หลังจากนั้นเทน้ำใน คอลัมน์ CB3 ที่ ทำขั้นตอนที่ 7 ซ้ำอีก 2 รอบ ปั่นเหวี่ยงคอลัมน์เปล่าด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบ/นาที 2 นาที เปิดฝาคอลัมน์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จน DNA แห้ง นำคอลัมน์ CB3 ใส่ใน ไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิด Buffer TE ปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบต่อนาที 2 นาที เก็บตัวอย่าง DNA ที่สกัดไว้ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ในขั้นตอนถัดไป (ภาพที่ 3.4-3.5)



ภาพที่ 3.4 การบดตัวอย่างหญ้าทะเลโดยใช้ไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 3.5 การสกัดดีเอ็นเอของเหี่ยวทะเลโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Tiangen

3. การวิเคราะห์ DNA barcodes

3.1 การค้นหายีน: *ITS*, *trnH-psbA*, *rbcl*, *matK*, *rpoB* และ *rpoC1*

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษาวรรณอนุรักษของเหี่ยวทะเลทั้ง 6 ชนิดนี้ โดยการวิเคราะห์ยีน *ITS*, *trnH-psbA*, *rbcl*, *matK*, *rpoB* และ *rpoC1* ตามวิธีของ Nguyen et al (2014) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนดังกล่าว ดังตารางที่ 1 ดังนี้ นำดีเอ็นเอเหี่ยวทะเลที่สกัดได้ปริมาณ 50 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ความเข้มข้น 1 พิโคโมล 1x *Taq* buffer dNTP mix ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมล และ เอนไซม์ *Taq* polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต ต่อปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำด้วยเครื่อง DNA thermal cycle ด้วยระดับอุณหภูมิดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denature	95	องศาเซลเซียส นาน 4 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denature	95	องศาเซลเซียส นาน 25 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	52	องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	72	องศาเซลเซียส นาน 35 วินาที (ซ้ำ 30 รอบ)
ขั้นตอนที่ 5 final-extension	72	องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

จากนั้นแยกความแตกต่างของซันดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซันดีเอ็นเอที่ถูกตัด จะถูกแยกสกัดออกจากเจล เพื่อหาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย จากนั้นวิเคราะห์ความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม BLASTN และ/หรือ BLASTX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และหาค่าความเหมือนและความสามารถในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

3.2 การวิเคราะห์ความน่าจะเป็นของยีนมาตรฐานในการเป็น DNA barcode ของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม DNA subway

ซันดีเอ็นเอของยีนมาตรฐาน rbcL, rpoB, matK, ITS, trnH-psbA และ rpoC1 ที่ถูกต้องของกอกจันทบูรจากขั้นตอนที่ 3.1 จะถูกสกัดออกมาจากเจล เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส เมื่อได้ลำดับเบสของดีเอ็นเอสังเคราะห์นั้น ๆ แล้ว จะนำมาการศึกษาความน่าจะเป็นของการเป็น DNA barcode ด้วยโปรแกรม DNA subway (<https://dnasubway.cyverse.org/>) โดยเลือกการวิเคราะห์แบบ Determine Sequencing Relationship (blue line) เปรียบเทียบกับ reference data จาก common plant และ monocot และสร้างแผนภูมิพันธุกรรมแสดงความน่าจะเป็นของการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีนมาตรฐานเหล่านั้นด้วย Phylip Maximum Likelihoods (PHYML MJ)

4.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SCAR

4.2.1 การหาความแตกต่างของชนิดพันธุ์หญ้าทะเลด้วยเทคนิค SRAP และ SCoT

นำดีเอ็นเอของหญ้าทะเลแต่ละชนิด เข้มข้น 50 นาโนกรัม มาทำปฏิกิริยากับพีซีอาร์กับไพรเมอร์ ชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 ด้วยเครื่อง thermal cycle ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ 1x *Taq* buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.25 μ M forward และ reverse primers และ 1 unit *Taq* polymerase โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ชนิดนั้น ๆ (ตารางที่ 2.2) จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย nature 12% polyacrylamide gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ ความคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีเพื่อให้แถบดีเอ็นเอปรากฏด้วย 1 mg/mL ethidium bromide

โปรแกรมสำหรับ SRAP

94 องศาเซลเซียส	4 นาที	}	4 รอบ
94 องศาเซลเซียส	45 วินาที		
30 องศาเซลเซียส	45 วินาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	}	34 รอบ
45 องศาเซลเซียส	45 วินาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	7 นาที		

โปรแกรมสำหรับ SCoT

94 องศาเซลเซียส	3 นาที	}	34 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที		
45 องศาเซลเซียส	30 วินาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	7 นาที		

4.2.2 การ recovery และการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่สนใจ

จากเทคนิค SRAP และ SCoT แถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism และคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจจะถูก recovery ออกมาจากเจล polyacrylamide โดยใช้ PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) จากนั้นดีเอ็นเอที่ได้จะส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เมื่อทราบข้อมูลลำดับเบสเรียบร้อยแล้ว ทำ annotation ของลำดับเบสนั้น ๆ ผ่านโปรแกรม BLASTN และ BLASTX ของฐานข้อมูลยีนสาธารณะ Genbank โดยตั้งค่าการตรวจสอบคือ $E\text{-value}$ เท่ากับ 10^{-3} และ amino acid identity เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ผลที่ได้ไปใช้สำหรับการพัฒนา SCAR marker โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนดีเอ็นเอที่มีบางส่วนของยีนควบคุมลักษณะที่เป็นประโยชน์ของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) และ Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) และทำการสร้าง genetic barcode โดยใช้โปรแกรม DNA Barcode Generator (<http://bioradads.com/DNABarcodeWeb/>)

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *ITS*, *trnH-psbA*, *rbcL*, *matK*, *rpoB* และ *rpoC1*

Name of primer	Gene Primer (5'-3')		PCR product size (bp)	References
<i>ITS1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGC		290	White et al., 1990
<i>ITS2</i>	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		290	White et al., 1990
<i>ITS3</i>	GCATCGATGAAGAACGCAGC		330	White et al., 1990
<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC		700	White et al., 1990
<i>ITS5</i>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		315	White et al., 1990
	Forward	Reverse		
<i>trnH-psbA-trnH2</i>	CGCGCATGGTGGATTCAAA TCC		296-1120	Tate et al., 2003
<i>trnH-psbA-trnH</i>	ACTGCCTTGATCCACTTGGC		296-1120	Tate et al., 2003
<i>trnH-psbA-psbAF</i>		GTTATGCATGAACGTAATGCTC	296-1120	Tate et al., 2003
<i>trnH-psbA-psbA</i>		CGAAGCTCCATCTACAAATGG	296-1120	Tate et al., 2003
<i>rbcL-a</i>	ATGTCACCACAAACAGAGAC TAAAGC	CTTCTGCTACAAATAAGAATC GATCTC	550-600	Kress et al., 2007
<i>rbcL1-174</i>	ATGTCACCACAAACAGAAAC	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	724	Fay et al., 1997
<i>matK 390-1326</i>	CGATCTATTCATTCAATATT TC	TCTAGCACACGAAAGTCGAAG T	930	Cuénoud et al., 2002
<i>rpoB</i>	ATGCAACGTCAAGCAGTTCC	GATCCCAGCATCACAATTCC	415	CBOL., 2009
<i>rpoC1</i>	GTGGATACACTTCTTGATAA TGG	CCATAAGCATATCTTGAGTTG G	486	CBOL., 2009

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือไพรเมอร์ชนิด SRAP

Gene Primer (5'-3')			
Name of primer	Forward	Name of primer	Reverse
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTTGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGTAG	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGTTG	em7	GACTGCGTACGAATTATG
me8	TGAGTCCAAACCGGTGT	em12	GACTGCGTACGAATTGTC
me9	TTCAGGGTGGCCGGATG	em13	GACTGCGTACGAATTGGT
me10	TGGGGACAACCCGGCTT	em14	GACTGCGTACGAATTCAG
me11	CTGGCGAACTCCGGATG	em15	GACTGCGTACGAATTCTG
me12	GGTGAACGCTCCGGAAG	em16	GACTGCGTACGAATTCCG
		em17	GACTGCGTACGAATTCCA
		em18	GACTGCGTACGAATTGGT
		em19	GACTGCGTACGAATTCCG

บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัย และการอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 การศึกษา DNA barcoding ใ หญ้าทะเล

1. การเก็บตัวอย่างหญ้าทะเล

ได้ทำการเก็บตัวอย่างหญ้าทะเลในบริเวณ 3 จังหวัดในเขตภาคตะวันออกตามแนวชายฝั่งอ่าวไทยเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยดังนี้ บริเวณเกาะกระดาด จังหวัดตราด โดยมีพิกัด $11^{\circ}50'27.8''N$ $102^{\circ}31'14.9''E$ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่หญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis* และ *Enhalus acoroides* บริเวณหมู่บ้านรือคคาเด็นท์ อำเภอแกลง จังหวัดระยอง พิกัด $12^{\circ}39'46.2''N$ $101^{\circ}39'30.4''E$ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Halodule pinifolia* และ *Halophila ovalis* และบริเวณหน้าฐานทัพเรือสัตหีบ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พิกัด $12^{\circ}39'17.9''N$ $100^{\circ}55'09.9''E$ จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Halophila minor* ซึ่งหญ้าทะเลชนิดนี้เป็นเดิมไม่พบในเขตนี้มาก่อนในรอบ 3 ปีที่ผ่านมา รวมตัวอย่างหญ้าทะเลที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทั้งหมด 7 ชนิดพันธุ์ (ภาพที่ 4.1-4.7)



ภาพที่ 4.1 หญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii* บริเวณเกาะกระดาด จ.ตราด



ภาพที่ 4.2 หญ้าทะเลชนิด *Cymodocea serrulata* บริเวณเกาะกระดาด จ.ตราด



ภาพที่ 4.3 หญ้าทะเลชนิด *Halodule uninervis* บริเวณกระดาด จ.ตราด



ภาพที่ 4.4 หญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* บริเวณกระดาด จ.ตราด



ภาพที่ 4.5 หญ้าทะเลชนิด *Halophila ovalis* บริเวณกระดาด จ.ตราด



ภาพที่ 4.6 หญ้าทะเลชนิด *Halophila minor* บริเวณฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี



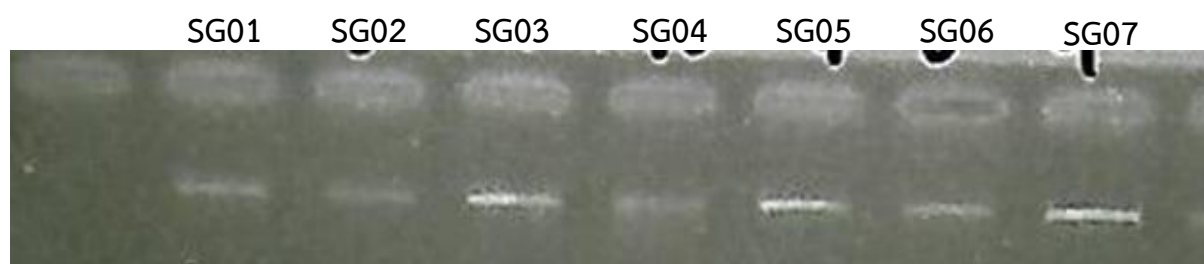
ภาพที่ 4.7 หญ้าทะเลชนิด *Haludole pinifolia* บริเวณหมู่บ้านรือคกาเด็นท์ จ.ระยอง

2. การสกัดดีเอ็นเอของหญ้าทะเล

ทำการสกัดดีเอ็นเอหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด โดยการผสมรวมเนื้อเยื่อทั้งส่วนของใบอ่อน ราก และ ลำต้น โดยใช้ชุดสำเร็จแยกสกัดสารพันธุกรรม (ชุด Kit) Tian Gen (ประเทศจีน) เมื่อแยกสกัดดีเอ็นเอได้แล้ว นำมาตรวจเช็คปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Nanodrop) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 9.80-19.90 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และวัดค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเหล่านั้นที่ $O.D._{260/280 \text{ nm}}$ โดยพบว่ามีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 1.65-1.96 ซึ่งถือว่าคุณภาพดีมาก และตรวจคุณภาพดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้งด้วยตรวจด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโพลีซิสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จึงกล่าวได้ว่า ดีเอ็นเอของหญ้าทะเลเหล่านี้มีคุณภาพดีปราศจากการปนเปื้อนด้วยอาร์เอ็นเอและโปรตีนที่เสียสภาพ แม้จะมีความเข้มข้นน้อย แต่เพียงพอสำหรับการทำงาน ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.8

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด

ลำดับที่	รายชื่อหญ้าทะเล	รหัส	ความเข้มข้น (ng/ μ L)	ความบริสุทธิ์ ($OD_{260/280}$)
1	<i>Thalassia hemprichii</i>	SG01	12.90	1.65
2	<i>Cymodocea serrulata</i>	SG02	15.50	1.80
3	<i>Halodule uninervis</i>	SG03	9.80	1.73
4	<i>Enhalus acoroides</i>	SG04	19.90	1.96
5	<i>Halophila ovalis</i>	SG05	12.40	1.80
6	<i>Halophila minor</i>	SG06	16.70	1.83
7	<i>Halodule pinifolia</i>	SG07	19.30	1.92



ภาพที่ 4. 8 จีโนมดีเอ็นเอของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด บนเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโพลีซิสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้นี้สามารถนำมาใช้ในขั้นตอนถัดไปคือ นำไปใช้สร้าง barcoding และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCAR ที่พัฒนามาจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP/SCoT ต่อไปได้

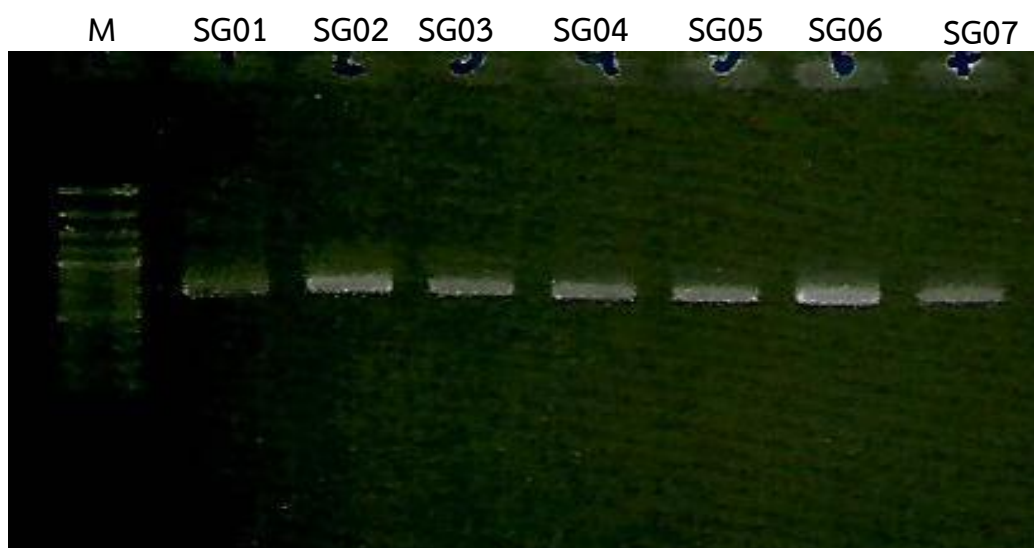
3. การสร้างเครื่องหมาย DNA barcoding ที่บริเวณยีน *ITS*, *matK*, *rbcl*, *rpoB*, *rpoC₁* และ *trnH-psbA* intergenic spacer

ดีเอ็นเอของหญ้าทะเลที่แยกสกัดได้ในขั้นตอนที่ 2 ถูกนำมาใช้ในสร้าง barcoding ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นบริเวณอนุรักษ์ในพืช แต่มีความสามารถในการจำแนกชนิดพันธุ์ได้โดยอาศัยการเกิดการกลายพันธุ์บางตำแหน่งในสายพันธุ์กรรมได้ด้วยเทคนิค PCR ขั้นตอนคือ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนมาตรฐานดังกล่าว ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมล, 1x *Taq* buffer, dNTP mix ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 4 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq* polymerase ความเข้มข้น 2 ยูนิต ต่อปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำด้วยเครื่อง DNA thermal cycle ด้วยระดับอุณหภูมิดังนี้ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที, 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 52-55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที (ซ้ำ 34 รอบ) และตรวจสอบความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองพบว่า ยีนมาตรฐาน *matK*, *rbcl*, *rpoB* และ *rpoC₁* สามารถนำไปพัฒนาหรือศึกษาความสามารถในการเป็น DNA barcoding ในขณะที่ยีนมาตรฐาน *ITS* และ *trnH-psbA* intergenic spacer ยังไม่สามารถนำมาใช้ได้ (ดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.9-4.12) และขั้นตอนทั้งหมดได้ถูก recovery ออกมาจากเจลอะกาโรส พร้อมทั้งทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกสารพันธุกรรม NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย เพื่อนำผลมาใช้ในวิเคราะห์ค่าความเหมือนและความสามารถในการเป็น DNA barcoding

ตารางที่ 4.2 ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะกับเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อสร้าง barcoding ของ
หญ้าทะเล

ชนิดของหญ้าทะเล	ชนิดของยีน มาตรฐาน	ชิ้นดีเอ็นเอ	ความยาว (bp)	Annealing tem. (°C)
<i>Thalassia hemprichii</i>	<i>rbcL</i>	SG01-rbcL	723	55
	<i>matK</i>	SG01-matK	888	50
	<i>rpoB</i>	SG01-rpoB	523	50
	<i>rpoC₁</i>	SG01-rpoC1	596	50
<i>Cymodocea serrulata</i>	<i>rbcL</i>	SG02-rbcL	722	55
	<i>matK</i>	SG02-matK	909	50
	<i>rpoB</i>	SG02-rpoB	522	50
	<i>rpoC₁</i>	SG02-rpoC1	597	50
<i>Halodule uninervis</i>	<i>rbcL</i>	SG03-rbcL	720	55
	<i>matK</i>	SG03-matK	915	50
	<i>rpoB</i>	SG03-rpoB	526	50
	<i>rpoC₁</i>	SG03-rpoC1	593	50
<i>Enhalus acoroides</i>	<i>rbcL</i>	SG04-rbcL	722	55
	<i>matK</i>	SG04-matK	358	50
	<i>rpoB</i>	SG04-rpoB	530	50
	<i>rpoC₁</i>	SG04-rpoC1	599	50
<i>Halophila ovalis</i>	<i>rbcL</i>	SG05-rbcL	719	55
	<i>matK</i>	SG05-matK	914	50
	<i>rpoB</i>	SG05-rpoB	525	50
	<i>rpoC₁</i>	SG05-rpoC1	597	50
<i>Halophila minor</i>	<i>rbcL</i>	SG06-rbcL	720	55
	<i>matK</i>	SG06-matK	910	50
	<i>rpoB</i>	SG06-rpoB	526	50
	<i>rpoC₁</i>	SG06-rpoC1	600	50
<i>Halodule pinifolia</i>	<i>rbcL</i>	SG07-rbcL	722	55
	<i>matK</i>	SG07-matK	913	50
	<i>rpoB</i>	SG07-rpoB	529	50
	<i>rpoC₁</i>	SG07-rpoC1	597	50



ภาพที่ 4.9 ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rbcL* บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด

M คือ DNA ladder marker 100 bp plus

SG01 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rbcL* บน *Thalassia hemprichii* ขนาด 723 bp

SG02 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rbcL* บน *Cymodocea serrulata* ขนาด 722 bp

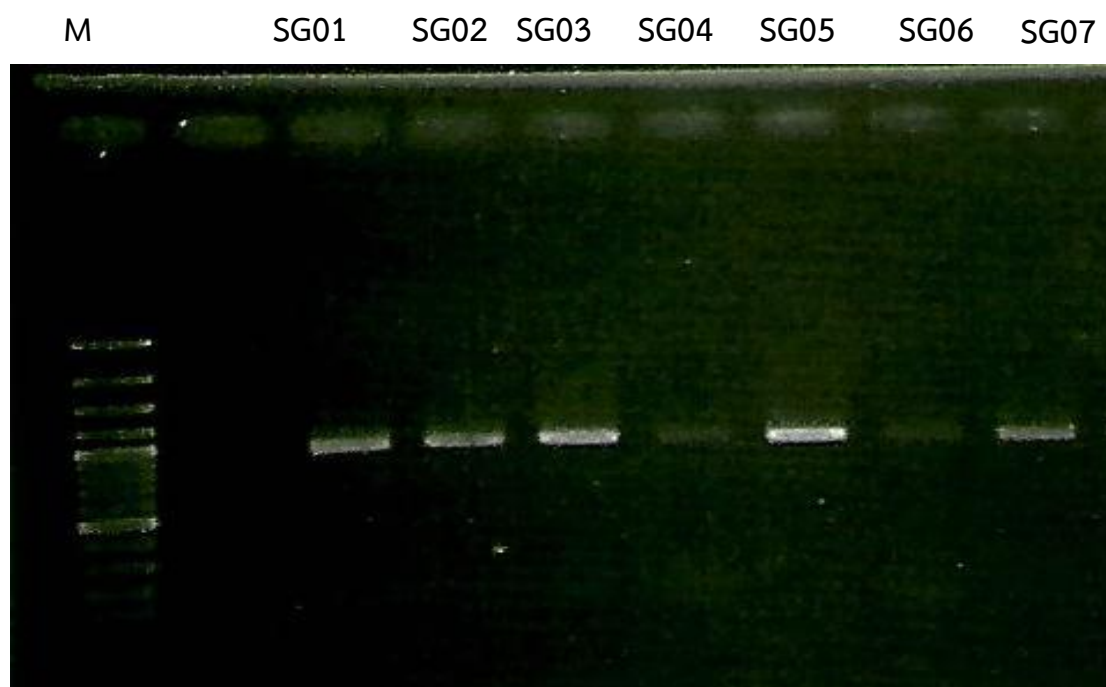
SG03 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rbcL* บน *Halodule uninervis* ขนาด 720 bp

SG04 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rbcL* บน *Enhalus acoroides* ขนาด 722 bp

SG05 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rbcL* บน *Halophila ovalis* ขนาด 719 bp

SG06 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rbcL* บน *Halophila minor* ขนาด 720 bp

SG07 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rbcL* บน *Halodule pinifolia* ขนาด 722 bp



ภาพที่ 4.10 ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *matK* บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด

M คือ DNA ladder marker 100 bp plus

SG01 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *matK* บน *Thalassia hemprichii* ขนาด 888 bp

SG02 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *matK* บน *Cymodocea serrulata* ขนาด 909 bp

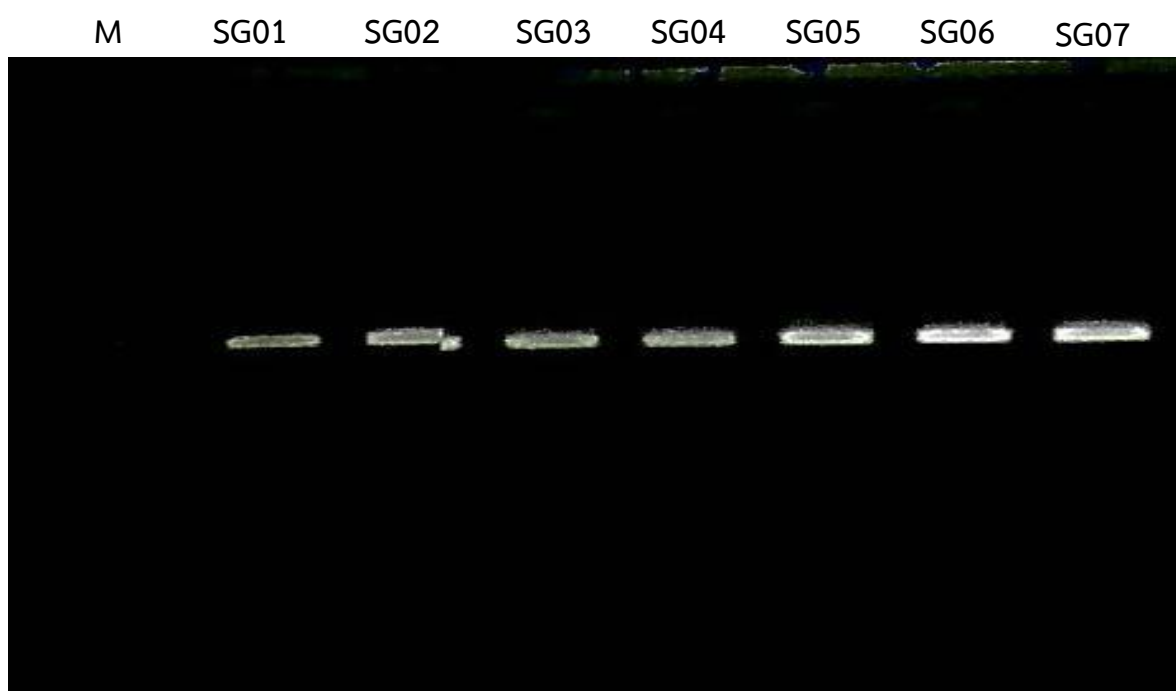
SG03 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *matK* บน *Halodule uninervis* ขนาด 915 bp

SG04 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *matK* บน *Enhalus acoroides* ขนาด 358 bp

SG05 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *matK* บน *Halophila ovalis* ขนาด 914 bp

SG06 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *matK* บน *Halophila minor* ขนาด 910 bp

SG07 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *matK* บน *Halodule pinifolia* ขนาด 913 bp



ภาพที่ 4.11 ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoB* บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด

M คือ DNA ladder marker 100 bp plus

SG01 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoB* บน *Thalassia hemprichii* ขนาด 523 bp

SG02 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoB* บน *Cymodocea serrulata* ขนาด 522 bp

SG03 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoB* บน *Halodule uninervis* ขนาด 526 bp

SG04 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoB* บน *Enhalus acoroides* ขนาด 530 bp

SG05 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoB* บน *Halophila ovalis* ขนาด 525 bp

SG06 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoB* บน *Halophila minor* ขนาด 526 bp

SG07 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoB* บน *Halodule pinifolia* ขนาด 529 bp

M SG01 SG02 SG03 SG04 SG05 SG06 SG07



ภาพที่ 4.12 ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoC1* บนหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด

M คือ DNA ladder marker 100 bp plus

SG01 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoC1* บน *Thalassia hemprichii* ขนาด 569 bp

SG02 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoC1* บน *Cymodocea serrulata* ขนาด 597 bp

SG03 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoC1* บน *Halodule uninervis* ขนาด 593 bp

SG04 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoC1* บน *Enhalus acoroides* ขนาด 599 bp

SG05 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoC1* บน *Halophila ovalis* ขนาด 597 bp

SG06 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoC1* บน *Halophila minor* ขนาด 600 bp

SG07 คือ ผลผลิตของยีนมาตรฐานชนิด *rpoC1* บน *Halodule pinifolia* ขนาด 597 bp

4. การวิเคราะห์ค่าความเหมือนโดยใช้โปรแกรม BLAST

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนบริเวณอนุรักษ์ *rbcL*, *matK*, *rpoB* และ *rpoC₁* ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN และ BLASTX algorithm พบว่า ซีนตีเอ็นเอ SG01-*rbcL*, SG02-*rbcL*, SG03-*rbcL*, SG04-*rbcL*, SG05-*rbcL*, SG06-*rbcL* และ SG07-*rbcL* มีความเหมือนกับยีน *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase* หรือยีน *rbcL* ในหญ้าทะเลพันธุ์ *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis* และ *Halodule pinifolia* ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) การที่สามารถตรวจพบโดเมน RuBisCo_large Superfamily นั้นเป็นการยืนยันถึงการมีอยู่และการทำงานในบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้ (ตารางที่ 4.4)

ซีนตีเอ็นเอ SG01-*matK*, SG02-*matK*, SG03-*matK*, SG04-*matK*, SG05-*matK*, SG06-*matK* และ SG07-*matK* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *matK* ในหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Nemacheilus ornatus*, *Halophila ovalis* และ *Halodule pinifolia* ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) การที่สามารถตรวจพบโดเมน MatK_N superfamily นั้นเป็นการยืนยันถึงการมีอยู่และการทำงานในบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้ (ตารางที่ 4.4)

ซีนตีเอ็นเอ SG01-*rpoB* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rpoB* ในหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii*. ซีนตีเอ็นเอ SG02-*rpoB* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rpoB* ในหญ้าทะเล *Cymodocea serrulata*, SG03-*rpoB* และ SG07-*rpoB* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rpoB* ในหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* ซีนตีเอ็นเอ SG04-*rpoB* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rpoB* ในหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* และ ซีนตีเอ็นเอ SG05-*rpoB* และ SG06-*rpoB* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rpoB* ในหญ้าทะเล *Halophila ovalis* (ตารางที่ 4.3) การที่สามารถตรวจพบโดเมน RNA_Pol_B_RPB2 Superfamily นั้นเป็นการยืนยันถึงการมีอยู่และการทำงานในบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้ (ตารางที่ 4.4)

ซีนตีเอ็นเอ SG01-*rpoC₁* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rcoC₁* ในหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ซีนตีเอ็นเอ SG02-*rpoC₁* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rcoC₁* ในพืช *Albidella nymphaeifolia* ซีนตีเอ็นเอ SG03-*rpoC₁*, SG06-*rpoC₁* และ SG07-*rpoC₁* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rcoC₁* ในหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* และ ซีนตีเอ็นเอ SG04-*rpoC₁* และ SG05-*rpoC₁* มีความเหมือนกับยีนมาตรฐาน *rcoC₁* ในหญ้าทะเล *Halophila ovalis* (ตารางที่ 4.3) การที่สามารถตรวจพบโดเมน RNA_Pol_Rpb1_2 Superfamily นั้นเป็นการยืนยันถึงการมีอยู่และการทำงานในบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้ (ตารางที่ 4.4)

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ซีนตีเอ็นเอที่สามารถตรวจพบได้เหล่านี้ เป็นยีนมาตรฐานจริง และสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ถึงความสามารถในการเป็น Barcoding ต่อไปได้

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากบริเวณอนุรักษ์ *rbcl*, *matK*, *rpoB* และ *rpoC₁* ของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม BLASTN

Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		
			Description	E-value	Identity
SG01-rbcL	723	KX527484.1	<i>Thalassia hemprichii</i> voucher DZY WQF0715 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	0.0	87%
SG02- rbcL	722	KF488491.1	<i>Cymodocea serrulata</i> voucher C2599 ribulose-1,5-carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; plastid	0.0	99%
SG03- rbcL	720	KF488495.1	<i>Halodule uninervis</i> voucher C2567 ribulose-1,5-carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; plastid	0.0	99%
SG04- rbcL	722	KF632850.1	<i>Enhalus acoroides</i> voucher C2565 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99%
SG05- rbcL	719	AB004890.1	<i>Halophila ovalis</i> chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, partial cds	0.0	99%
SG06- rbcL	720	AB004890.1	<i>Halophila ovalis</i> chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, partial cds	0.0	99%
SG07- rbcL	722	KF488494.1	<i>Halodule pinifolia</i> voucher C2602 ribulose-1,5-carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; plastid	0.0	99%
SG01-matK	888	AB002577.1	<i>Thalassia hemprichii</i> chloroplast matK DNA for maturase, partial cds	0.0	99%
SG02- matK	909	KF488507.1	<i>Cymodocea serrulata</i> voucher C2601 maturase K (matK) gene, partial cds; plastid	0.0	99%
SG03- matK	915	KF488510.1	<i>Halodule uninervis</i> voucher C2567 maturase K (matK) gene, partial cds; plastid	0.0	99%
SG04- matK	358	GQ174363.1	<i>Nemacheilus ornatus</i> isolate FLMNH 2008-0865 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	8e-24	77%
SG05- matK	914	AB002570.1	<i>Halophila ovalis</i> chloroplast matK DNA for maturase, partial cds	0.0	99%
SG06- matK	910	AB002570.1	<i>Halophila ovalis</i> chloroplast matK DNA for maturase, partial cds	0.0	99%

Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		E-value	Identity
			Description			
SG07- matK	913	KF488509.1	<i>Halodule pinifolia</i> voucher C2602 maturase K (matK) gene, partial cds; plastid		0.0	100%
SG01-rpoB	523	JF975528.1	<i>Thalassia hemprichii</i> RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds; chloroplast		0.0	100%
SG02- rpoB	522	AB970741.1	<i>Cymodocea rotundata</i> chloroplast rpoB gene for RNA polymerase beta subunit, partial cds		0.0	97%
SG03- rpoB	526	AB970742.1	<i>Halodule pinifolia</i> chloroplast rpoB gene for RNA polymerase beta subunit, partial cds		0.0	99%
SG04- rpoB	530	JF975516.1	<i>Enhalus acoroides</i> RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds; chloroplast		0.0	100%
SG05- rpoB	525	LC128155.1	<i>Halophila ovalis</i> chloroplast rpoB gene for RNA polymerase beta subunit, partial cds,		0.0	99%
SG06- rpoB	526	LC128155.1	<i>Halophila ovalis</i> chloroplast rpoB gene for RNA polymerase beta subunit, partial cds		0.0	99%
SG07- rpoB	529	AB970742.1	<i>Halodule pinifolia</i> chloroplast rpoB gene for RNA polymerase beta subunit, partial cds		0.0	99%
SG01-rpoC1	596	JF975546.1	<i>Thalassia hemprichii</i> RNA polymerase beta' subunit (rpoC) gene, partial cds; chloroplast		1e-61	72%
SG02- rpoC1	597	KX980078.1	<i>Albidella nymphaeifolia</i> RNA polymerase beta' subunit (rpoC) gene, partial cds; chloroplast		0.0	94%
SG03- rpoC1	593	AB970746.1	<i>Halodule pinifolia</i> chloroplast rpoC1 gene for RNA polymerase subunit, partial cds		0.0	99%
SG04- rpoC1	599	JF975535.1	<i>Halophila ovalis</i> RNA polymerase beta' subunit (rpoC) gene, partial cds; chloroplast		0.0	92%
SG05- rpoC1	597	JF975535.1	<i>Halophila ovalis</i> RNA polymerase beta' subunit (rpoC) gene, partial cds; chloroplast		0.0	100%
SG06- rpoC1	600	AB970746.1	<i>Halodule pinifolia</i> chloroplast rpoC1 gene for RNA polymerase subunit, partial cds		0.0	99%
SG07- rpoC1	597	AB970746.1	<i>Halodule pinifolia</i> chloroplast rpoC1 gene for RNA polymerase subunit, partial cds		0.0	99%

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่ถูกสร้างขึ้นยืนยันทราบฐาน *rbcL*, *matK*, *rpoB* และ *rpoC₁* ของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม BLASTX

Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		Putative Conserved Domain
			Description	E-value	
SG01-rbcL	723	AJO64585.1	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [<i>Hydrilla verticillata</i>]	6e-72	RuBisCo_large Superfamily
SG02- rbcL	722	AGZ90806.1	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [<i>Neraudia melastomifolia</i>]	3e-167	RuBisCo_large Superfamily
SG03- rbcL	720	CAA73427.2	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [<i>Oxychloe andina</i>]	7e-169	RuBisCo_large Superfamily
SG04- rbcL	722	AIG22650.1	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [<i>Enhalus acoroides</i>]	5e-155	RuBisCo_large Superfamily
SG05- rbcL	719	BAX07762.1	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [<i>Halophila ovalis</i>]	4e-153	RuBisCo_large Superfamily
SG06- rbcL	719	BAX07762.1	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast) [<i>Halophila ovalis</i>]	3e-152	RuBisCo_large Superfamily
SG07- rbcL	722	AIF76081.1	ribulose-1,5-carboxylase/oxygenase large subunit, partial (plastid) [<i>Halodule pinifolia</i>]	2e-152	RuBisCo_large Superfamily
SG01-matK	888	BAB18667.1	maturase, partial (chloroplast) [<i>Thalassia hemprichii</i>]	0.0	MatK_N superfamily
SG02- matK	909	AIF76095.1	maturase K, partial (plastid) [<i>Cymodocea serrulata</i>]	0.0	MatK_N superfamily
SG03- matK	915	AIF76098.1	maturase K, partial (plastid) [<i>Halodule uninervis</i>]	0.0	MatK_N superfamily
SG04- matK	358	AJF21687.1	cytochrome b, partial (mitochondrion) [<i>Squalidus argentatus</i>]	0.018	QcrB superfamilt
SG05- matK	915	BAB18660.1	maturase, partial (chloroplast) [<i>Halophila ovalis</i>]	0.0	MatK_N superfamily
SG06- matK	910	BAB18660.1	maturase, partial (chloroplast) [<i>Halophila ovalis</i>]	0.0	MatK_N superfamily

Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		Putative Conserved Domain
			Description	E-value	
SG07- matK	913	AIF76097.1	maturase K, partial (plastid) [<i>Halodule pinifolia</i>]	0.0	MatK_N superfamily
SG01-rpoB	523	AEI58826.1	RNA polymerase beta subunit, partial (chloroplast) [<i>Thalassia hemprichii</i>]	7e-105	RNA_Pol_B_RP B2 Superfamily
SG02- rpoB	522	BAR73112.1	RNA polymerase beta subunit, partial (chloroplast) [<i>Cymodocea rotundata</i>]	3e-108	RNA_Pol_B_RP B2 Superfamily
SG03- rpoB	526	BAR73113.1	RNA polymerase beta subunit, partial (chloroplast) [<i>Halodule pinifolia</i>]	7e-109	RNA_Pol_B_RP B2 Superfamily
SG04- rpoB	530	AEI58814.1	RNA polymerase beta subunit, partial (chloroplast) [<i>Enhalus acoroides</i>]	1e-106	RNA_Pol_B_RP B2 Superfamily
SG05- rpoB	525	AEI58815.1	RNA polymerase beta subunit, partial (chloroplast) [<i>Halophila ovalis</i>]	5e-105	RNA_Pol_B_RP B2 Superfamily
SG06- rpoB	526	AEI58815.1	RNA polymerase beta subunit, partial (chloroplast) [<i>Halophila ovalis</i>]	1e-104	RNA_Pol_B_RP B2 Superfamily
SG07- rpoB	529	BAR73113.1	RNA polymerase beta subunit, partial (chloroplast) [<i>Halodule pinifolia</i>]	1e-108	RNA_Pol_B_RP B2 Superfamily
SG01-rpoC1	596	AKI87998.1	RNA polymerase beta subunit-1, partial (chloroplast) [<i>Celosia cristata</i>]	3e-46	RNA_Pol_Rpb1 _2 Superfamily
SG02- rpoC1	597	CAO98945.1	RNA polymerase beta' chain, partial (plastid) [<i>Agave salmiana</i>]	6e-132	RNA_Pol_Rpb1 _2 Superfamily
SG03- rpoC1	593	CAP11834.1	RNA polymerase beta' subunit, partial (chloroplast) [<i>Conostylis setigera</i>]	1e-130	RNA_Pol_Rpb1 _2 Superfamily
SG04- rpoC1	599	CAP11838.1	RNA polymerase beta' subunit, partial (chloroplast) [<i>Cypripedium henryi</i>]	4e-89	RNA_Pol_Rpb1 _2 Superfamily
SG05- rpoC1	597	AFU53926.1	RNA polymerase C, partial (chloroplast) [<i>Berberis bergmanniae</i>]	4e-130	RNA_Pol_Rpb1 _2 Superfamily
SG06- rpoC1	600	CAP11834.1	RNA polymerase beta' subunit, partial (chloroplast) [<i>Conostylis setigera</i>]	8e-138	RNA_Pol_Rpb1 _2 Superfamily
SG07- rpoC1	597	CAO98935.1	RNA polymerase beta' chain, partial (plastid) [<i>Agave aurea</i>]	3e-142	RNA_Pol_Rpb1 _2 Superfamily

ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ความน่าจะเป็น DNA Barcoding ของยีนมาตรฐานในหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม DNA Subway

การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือการใช้ลำดับเบสของดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ (short genetic loci) ที่มีความผันแปรสูง มาชี้เฉพาะสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้อย่างรวดเร็ว โดยช่วงดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นบาร์โค้ดนั้น ต้องเป็นช่วงดีเอ็นเอที่ผ่านการตกลงและยอมรับ (standardized genetic loci) ให้เป็นบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ กล่าวคือสามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต เหมือนกับบาร์โค้ดที่สามารถระบุชนิดสินค้า ซึ่งในทางปฏิบัติอาจมีการกำหนดตำแหน่ง (locus) ดีเอ็นเอมาตรฐานมากกว่า 1 ช่วงสำหรับใช้เป็นบาร์โค้ดเพื่อประสิทธิภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ซึ่งในปัจจุบันมี ช่วงดีเอ็นเอที่ผ่านการศึกษาคือการใช้เป็นบาร์โค้ดสำหรับพืชหลายช่วงด้วยกัน ตัวอย่างเช่น *matK*, *rbcl*, internal transcribed spacers (ITS), *psbA-trnH* intergenic spacer ซึ่งโดยสรุปช่วงดีเอ็นเอที่เหมาะสมจะใช้เป็นบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต ต้องมีลักษณะดังนี้ (<http://www.pharm.su.ac.th/dna2/dna1.php>)

1. มีความผันแปรระหว่างสปีชีส์สูงเพียงพอ
2. มีความยาวเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบส
3. มี conserved sequence อยู่ปลายทั้งสองด้านที่เหมาะสมแก่การออกแบบ PCR primer ที่สามารถใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตหลากหลายสปีชีส์ (universal)

การทำ DNA barcode มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการระบุสิ่งมีชีวิต และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีนักอนุกรมวิธานในการสร้างระบบอ้างอิงที่ถูกต้องเพราะฐานข้อมูลจะต้องเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างที่มีการระบุชนิดอย่างถูกต้องโดยนักอนุกรมวิธานเท่านั้น DNA barcode จึงเป็นเครื่องมือวิเคราะห์อย่างง่ายที่มีพื้นฐานอยู่บนความรู้ของนักอนุกรมวิธานในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต (พรณรงค์ และอรุณรัตน์, 2554) โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ให้เข้าเกาะบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และครอบคลุมในส่วนที่ผันแปร เพื่อให้ผลผลิตที่เกิดจากการผันแปรนั้นมาใช้ในการจำแนกชนิด ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นตามสายวิวัฒนาการ

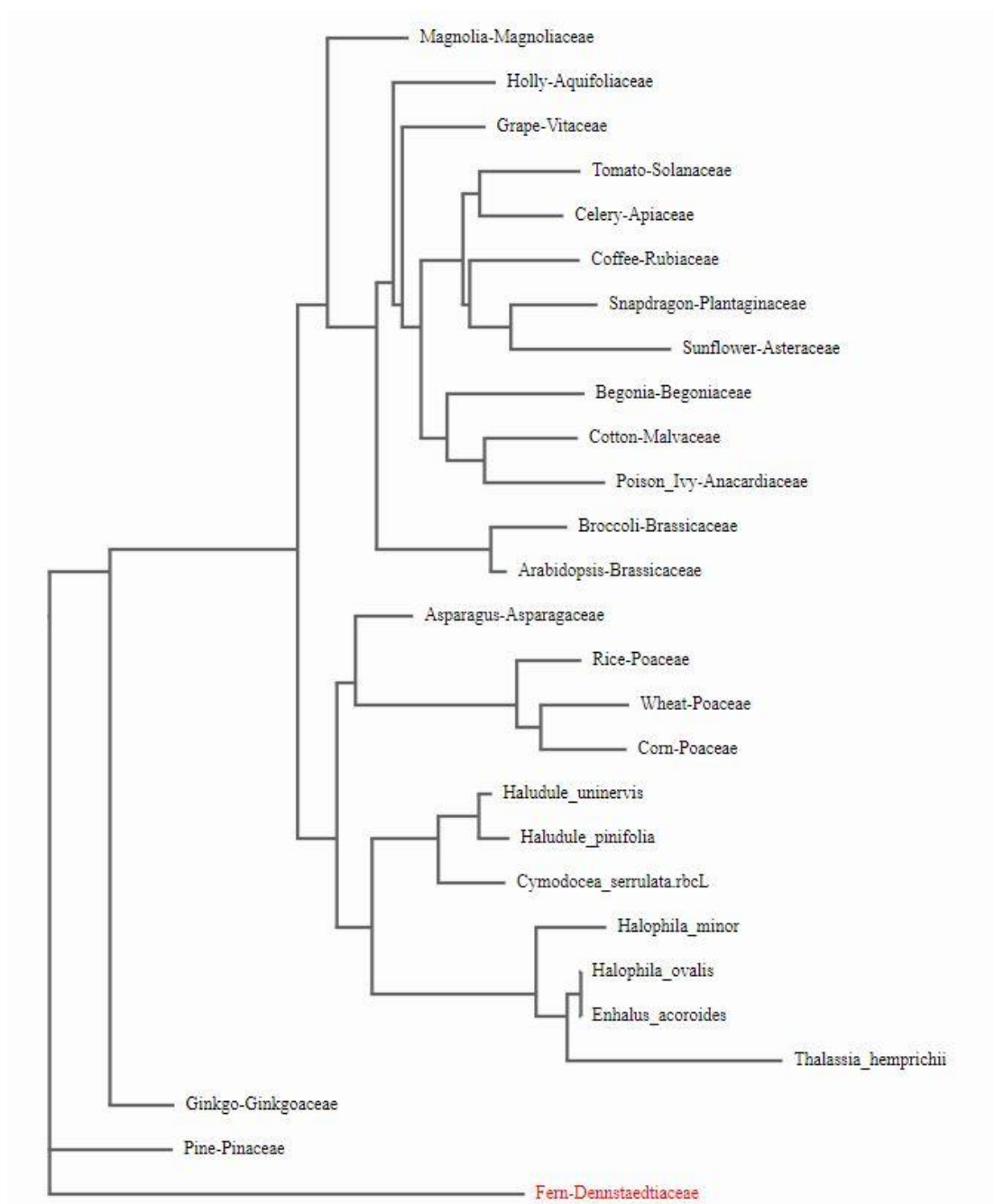
เมื่อทำการวิเคราะห์ความน่าจะเป็นของการเป็น DNA Barcoding ของยีนมาตรฐาน *rbcl*, *rpoB*, *matK* และ *rpoC1* ที่ถูกต้องของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดนี้ คือ *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis* และ *Enhalus acoroides* บริเวณ *Halodule pinifolia*, *Halophila ovalis* และ *Halophila minor* ด้วยโปรแกรม DNA Subway พบว่า

1. ยีนมาตรฐาน *rbcl* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหญ้าทะเลทุกชนิดออกจากพืชอื่น ๆ ได้ และสามารถแยกหญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Halodule pinifolia* และ *Halophila minor* ออกจากกันได้แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* และ *Halophila ovalis* ออกจากกันได้ (ภาพที่ 4.13) และพบว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequence) นี้จะมีความแปรปรวนสูงของยีนมาตรฐาน *rbcl* ความยาวประมาณ 550 คู่เบส (ภาพที่ 4.14)

2. ยีนมาตรฐาน *matK* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหญ้าทะเลทุกชนิดออกจากพืชอื่น ๆ ได้ แต่ไม่สามารถแยก *Halophila ovalis* ออกจาก *Halophila minor* และไม่สามารถแยก *Halodule pinifolia* ออกจาก *Halodule uninervis* แต่สามารถแยกหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* และ *Thalassia hemprichii* (ภาพที่ 4.15) และพบว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequence) นี้จะมีความแปรปรวนสูงของยีนมาตรฐาน *matK* ความยาวประมาณ 800 คู่เบส (ภาพที่ 4.16) การที่ยีนมาตรฐาน *matK* มีช่วงผันแปรสูง จะเป็นตัวบ่งชี้ในความสามารถในการจำแนกชนิดได้ดี (Lucas et al, 2012)

3. ยีนมาตรฐาน *rpoB* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหญ้าทะเลทุกชนิดออกจากพืชอื่น ๆ ได้ และอาจจะสามารถแยก *Halophila ovalis* ออกจาก *Halophila minor* และอาจจะสามารถแยก *Halodule pinifolia* ออกจาก *Halodule uninervis* ซึ่งต้องใช้ยีนมาตรฐานชนิดอื่นเข้าร่วมในการแยกความแตกต่าง ทั้งนี้ทั้งนั้นสามารถแยกหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* และ *Thalassia hemprichii* ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.17) และพบว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequence) นี้จะมีความแปรปรวนสูงของยีนมาตรฐาน *rpoB* ความยาวประมาณ 500 คู่เบส (ภาพที่ 4.18)

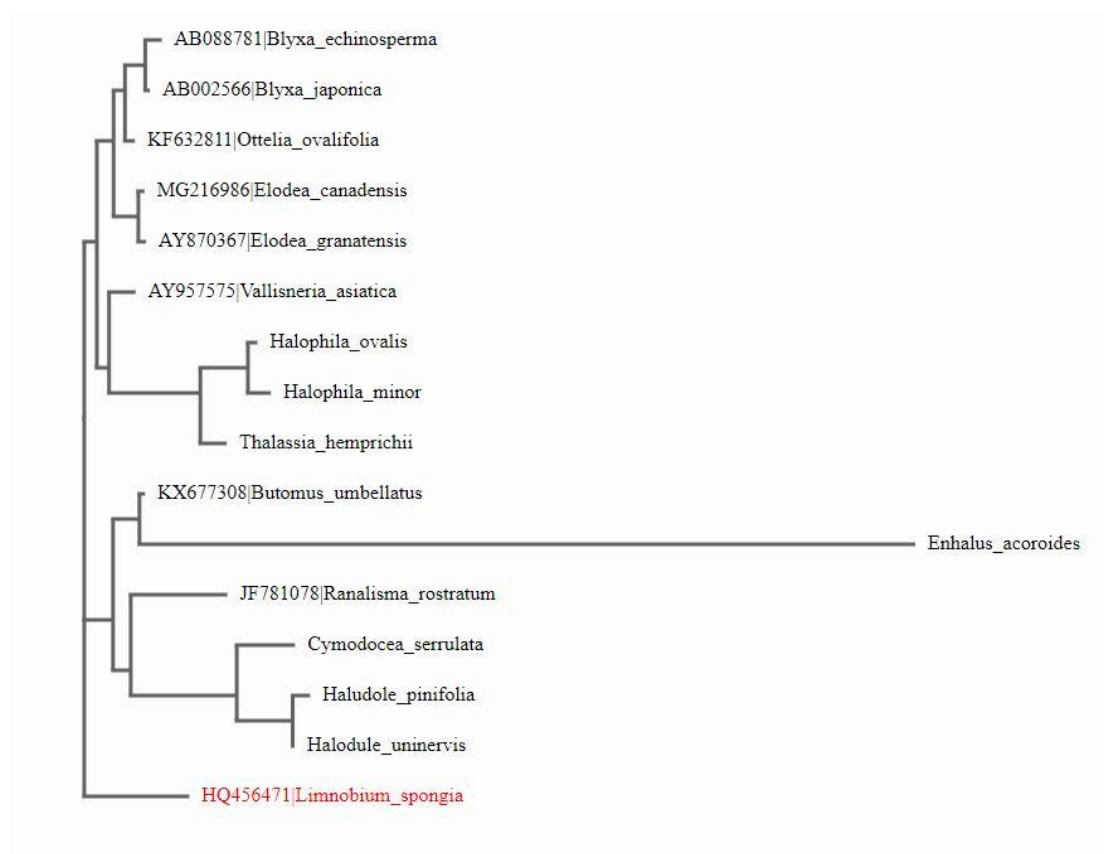
4. ยีนมาตรฐาน *rpoC1* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหญ้าทะเลทุกชนิดออกจากพืชอื่น ๆ ได้ และสามารถแยกหญ้าทะเลทุกชนิดออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถแยกหญ้าทะเลชนิด *Halodule pinifolia* ออกจาก *Halodule uninervis* ได้ (ภาพที่ 4.19) และพบว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequence) นี้จะมีความแปรปรวนสูงของยีนมาตรฐาน *rpoC1* ความยาวประมาณ 600 คู่เบส (ภาพที่ 4.20)



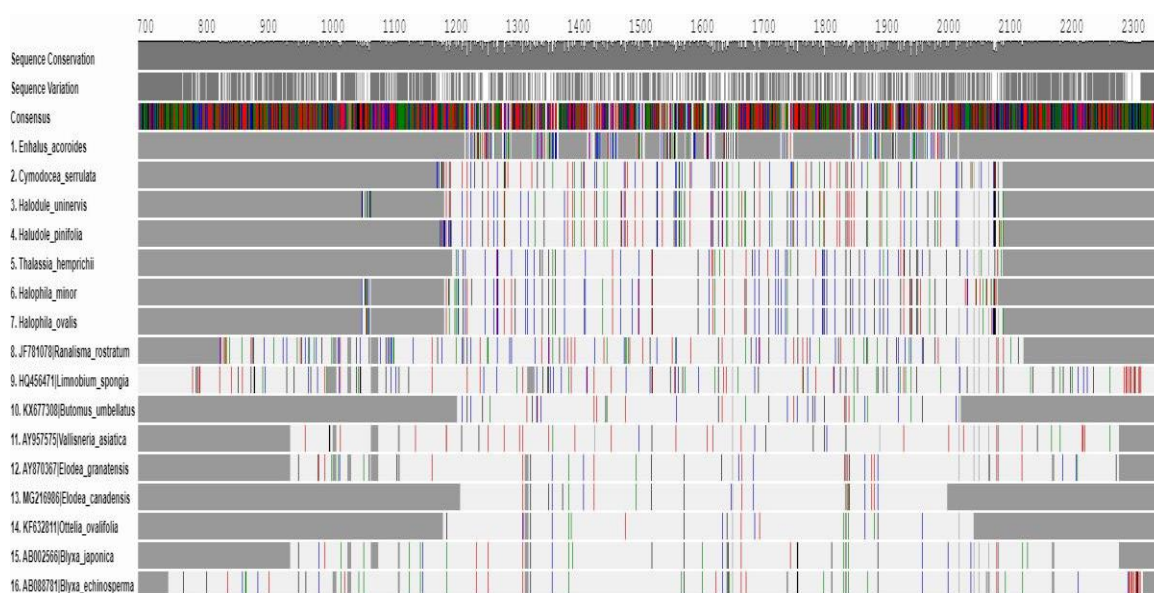
ภาพที่ 4.13 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตรฐาน *rbcL* ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP MJ ด้วยโปรแกรม DNA Subway



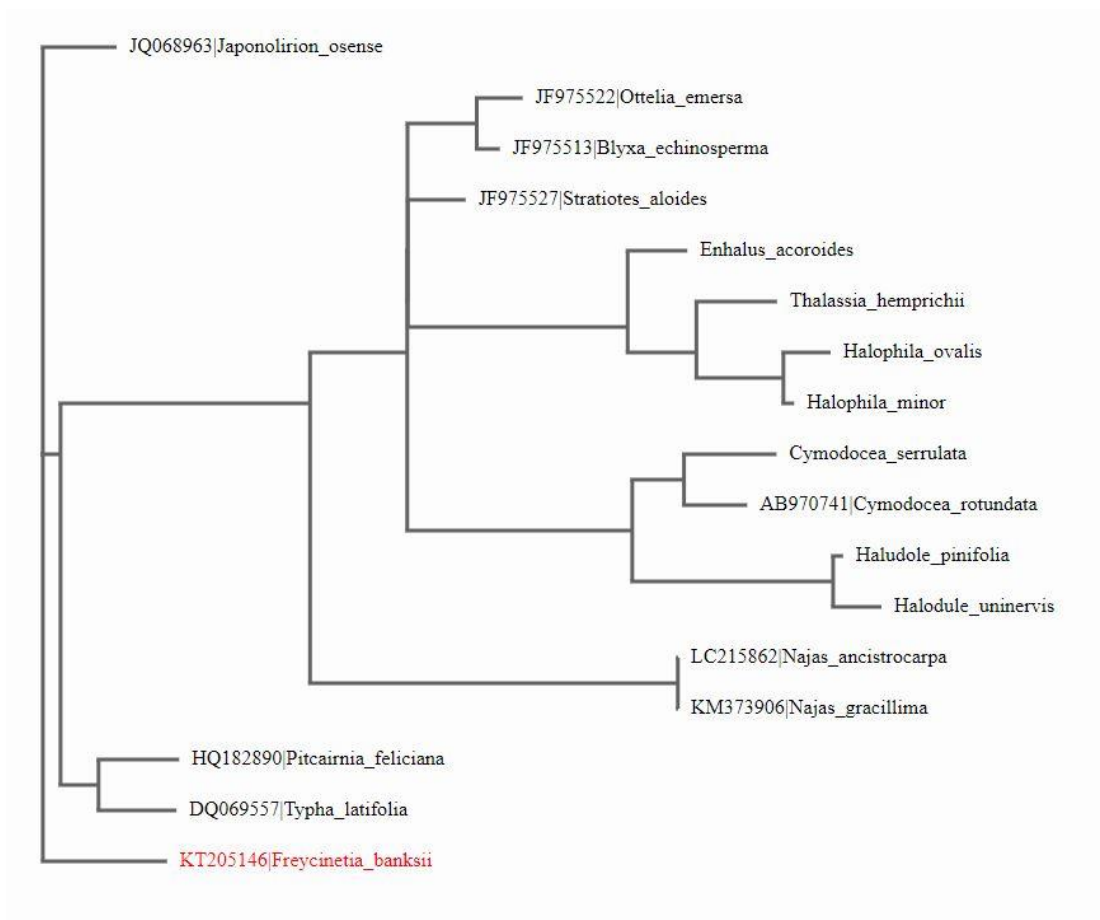
ภาพที่ 4.14 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตรฐาน *rbcL* ในหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway



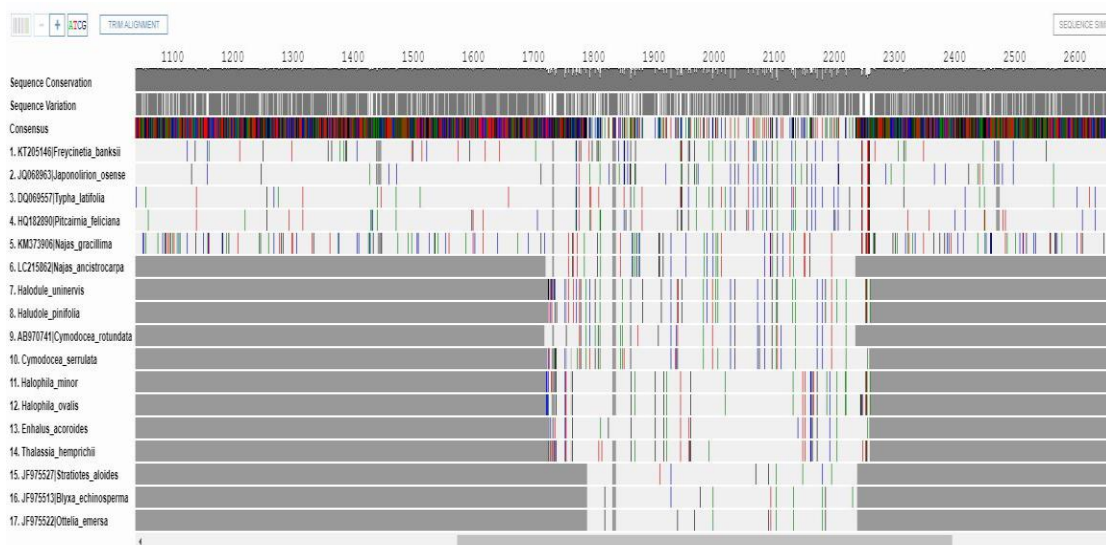
ภาพที่ 4.15 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตรฐาน *matK* ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP MJ ด้วยโปรแกรม DNA Subway



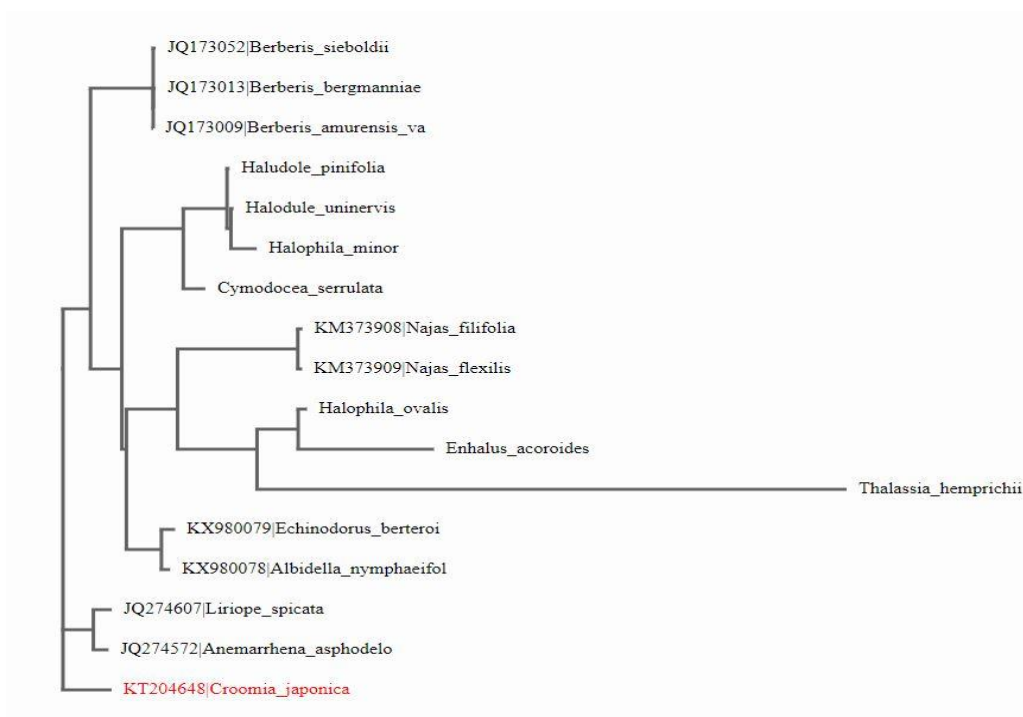
ภาพที่ 4.16 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตรฐาน *matK* ในหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway



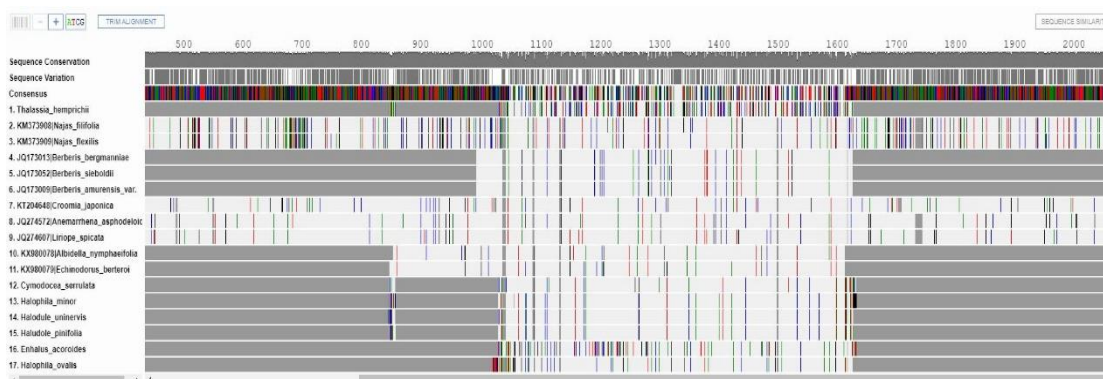
ภาพที่ 4.17 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตรฐาน *rpoB* ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP MJ ด้วยโปรแกรม DNA Subway



ภาพที่ 4.18 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตรฐาน *rpoB* ในหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway



ภาพที่ 4.19 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตรฐาน *rpoC1* ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP MJ ด้วยโปรแกรม DNA Subway



ภาพที่ 4.20 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตรฐาน *rpoC1* ในหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway

จากการวิจัยจะพบว่าหญ้าทะเลบางชนิดเช่น *Enhalus acoroides* *Thalassia hemprichii* และ *Cymodocea serrulata* สามารถใช้ยีนมาตรฐานเพียงชนิดเดียวคือ *matK* และ *rbcl* ก็สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมออกจาก ในขณะที่หญ้าทะเลบางชนิดเช่น *Halodule uninervis*, *Halodule pinifolia*, *Halophila ovalis* และ *Halophila minor* ยีนมาตรฐานเพียงชนิดเดียวไม่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของหญ้าทะเลเหล่านี้ออกจากกันได้ ต้องใช้ยีนมาตรฐานหลายชนิดเข้าร่วม อาจเนื่องด้วยหญ้าทะเลเหล่านี้จัดอยู่ใน Genus เดียวความใกล้เคียงทางพันธุกรรมจึงมาากตาไปด้วย เช่น *Halodule uninervis* - *Halodule pinifolia* และ *Halophila ovalis* - *Halophila minor* สอดคล้องกับการวิจัยของ Lucas et al (2012) ได้ศึกษายีนมาตรฐาน *rbcl* และ *matK* ในการเป็น DNA Barcode ของหญ้าทะเล *Cymodocea rotundata* Ehrenb. & Hempr. ex Asch., *Cymodocea serrulata* (R.Br.) Asch. & Magnus, *Enhalus acoroides* (L. f.) Royle, *Halodule pinifolia* (Miki) den Hartog, *Halodule uninervis* (Forsk.) Asch., *Halodule wrightii* Asch., *Halophila beccarii* Asch., *Halophila decipiens* Ostenf., *Halophila ovalis* (R.Br.) Hook. f., *Halophila ovata* Gaud., *Halophila ovalis* subsp. *ramamurthiana*, *Halophila stipulacea* (Forsk.) Asch. *Syringodium isoetifolium* (Asch.) Dandy, *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Asch.] ซึ่งเก็บจากบริเวณอ่าว ปาล์ม ประเทศอินเดีย พบว่า ยีนมาตรฐาน *matK* มีความสามารถในการเป็น DNA Barcode ได้ดีกว่ายีน *rbcl* หรือต้องใช้ร่วมกัน เช่นเดียวกับ de Groot et al (2011) ระบุว่า ยีน *rbcl* และ *trnH-psbA* intergenic spacer สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเฟิร์น (NW-European fern) ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ยีน *matK* ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้

นฤมลและคณะ (2557) ได้วิเคราะห์จีโนมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด โดยตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *matK*, *rbcl*, *rpoB*, *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่าไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณใดที่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ออกจากกันได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* ร่วมกันสามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม ออกจากกันได้ ยกเว้นสิงโตกำมพูใหญ่และสิงโตกำมพูแดงซึ่งสามารถแยกด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* หรือชิ้นดีเอ็นเอ *trnH-psbA*

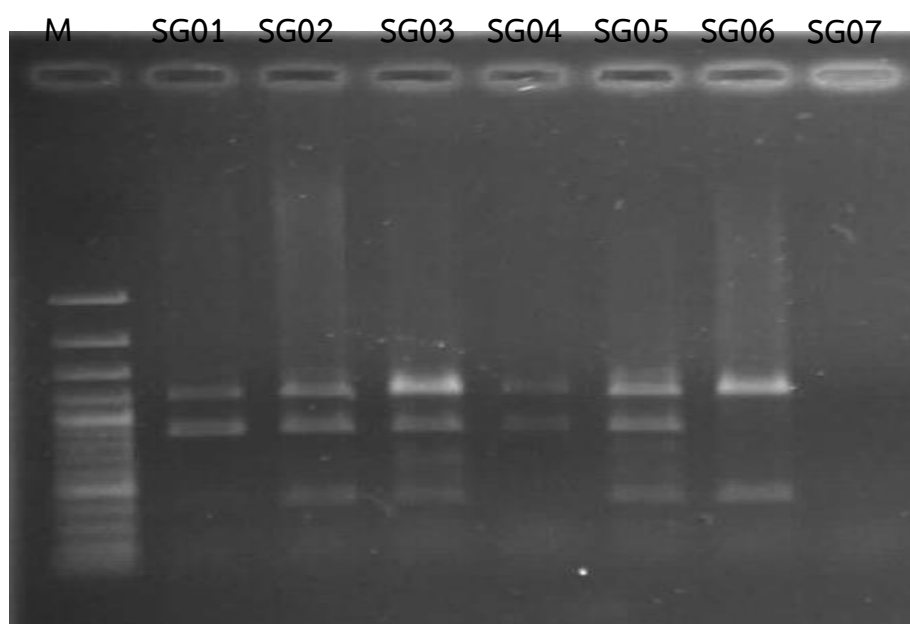
ส่วนที่ 3 การพัฒนา SCAR Marker ชนิด genetic barcode

3.1 วิเคราะห์ความลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR

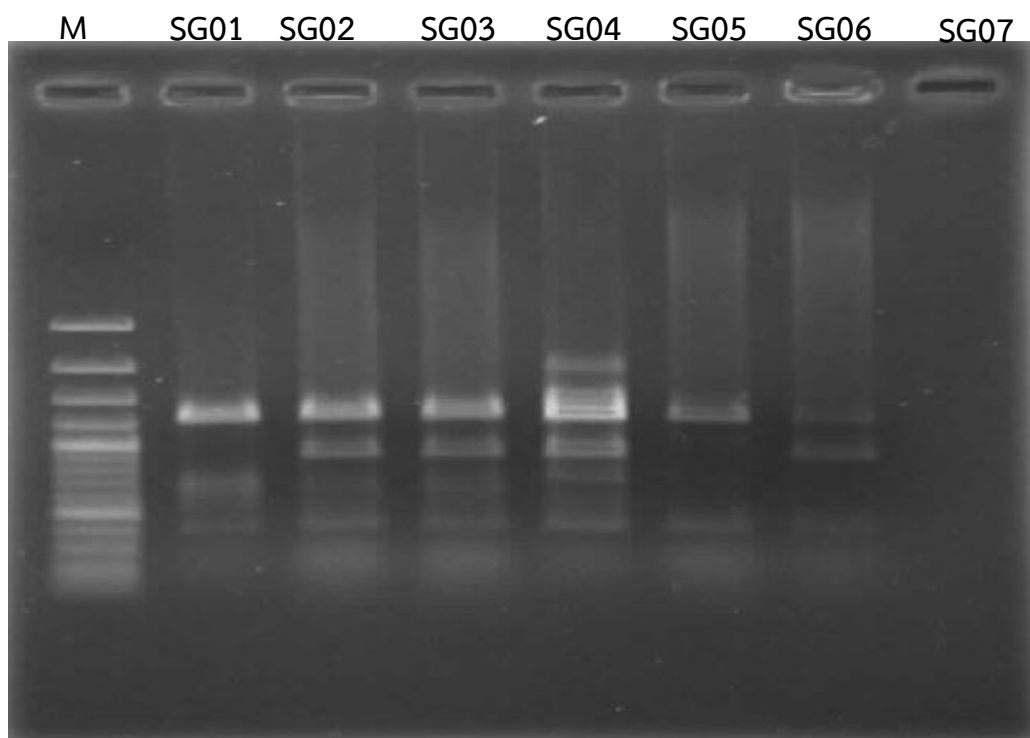
ในการวิเคราะห์ความลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าทะเลทั้ง 7 ชนิดนี้ คือ *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis* และ *Enhalus acoroides* บริเวณ *Halodule pinifolia*, *Halophila ovalis* และ *Halophila minor* โดยได้ทำการทดลองแยกความแตกต่างของชนิดพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SRAP โดยได้ดัดแปลงเทคนิคการตรวจวิเคราะห์จาก Li and Quiros. (2001) ดังนี้ นำดีเอ็นเอของหญ้าทะเลดังกล่าวปริมาณ 30-50 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ SRAP (me-em) ความเข้มข้น 0.75 ไมโครโมล 1x Taq buffer dNTP mix ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมล $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล และเอนไซม์ Taq polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต ต่อปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำด้วยเครื่อง DNA thermal cycle ด้วยระดับอุณหภูมิดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denature	94	องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denature	94	องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	45	องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	72	องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (ซ้ำ 35 รอบ)
ขั้นตอนที่ 5 final-extension	72	องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

และตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 4.21 และ 4.22 ซึ่งขณะนี้ได้ทำการตรวจสอบครบทั้ง 20 คู่ไพรเมอร์แล้ว อยู่ระหว่างการ score ความแตกต่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป พบว่าหญ้าทะเลชนิด *Halophila minor* ไม่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค SRAP ได้ จึงได้ตัดออกจากการศึกษาวิจัย



ภาพที่ 4.21 ผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์ em15-me5 จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP บนหน่กล้า
ทะเลทั้ง 7 ชนิด



ภาพที่ 4.22 ผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์ em12-me4 จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP บนหน้
ทะเลทั้ง 7 ชนิด

3.2 การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้นดีเอ็นเอจากที่ได้จากความแตกต่างหรือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม BLASTN

ในการพัฒนา SCAR marker ในครั้งนี้จะใช้บางส่วนของยีนที่มีหน้าที่จากการทำนายผ่าน
โปรแกรม BLAST ขึ้นดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเลที่ได้จากการใช้เทคนิค
SRAP และ SCoT ถูกนำไปวิเคราะห์และทำนายหน้าที่ ได้ผลดังตารางที่ 4.5

1. ขึ้นดีเอ็นเอ SG01-01 มีขนาด 359 คู่เบส เป็นขึ้นดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้า
ทะเลชนิด *Thalassia hemprichii* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ หรือตรวจพบในหญ้าทะเลชนิดนี้แต่ไม่พบ
ในหญ้าทะเลชนิดอื่น พบว่ามีเหมือนกับยีน GATS protein-like 2 (GATSL2) ใน *Myotis brandtii*
ซึ่งมีความสามารถเป็น negative inhibitor ในเซลล์

2. ขึ้นดีเอ็นเอ SG01- 18 มีขนาด 728 คู่เบส เบส เป็นขึ้นดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของ
หญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ หรือตรวจพบในหญ้าทะเลชนิดนี้แต่
ไม่พบในหญ้าทะเลชนิดอื่น พบว่ามีเหมือนกับยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ NADH ของหญ้าทะเล
Thalassia hemprichii ในการหายใจระดับเซลล์ NADH เป็นสารที่มีพลังงานสูง มีสมบัติเป็นตัวให้อิ
เลคตรอน (reducing agent) เข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เพื่อนำพลังงานที่อยู่ใน NADH
มาใช้สร้าง ATP ต่อไป

3. ขึ้นตีเอ็นเอ SG01- 32 มีขนาด 731 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ มีความเหมือนกันยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ trypsin-7-like ซึ่งเอนไซม์นี้มีหน้าที่ในการย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน

4. ขึ้นตีเอ็นเอ SG01- 40 มีขนาด 556 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ มีความเหมือนกันยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ubiquitin-conjugating ในข้าว ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายโปรตีน และการควบคุมวัฏจักรเซลล์และการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (สุปรานี กองคำ, 2556)

5. ขึ้นตีเอ็นเอ SG02- 16 มีขนาด 336 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Cymodocea serrulata* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ มีความเหมือนกับ *Ananas comosus* villin-2 และ ยีนที่กำหนดการสร้าง actin bind protein ใน *Lilium longiflorum* ซึ่ง actin bind protein มีหลายชนิด เช่น formin thymosin profilin และ tyopomyosin

6. ขึ้นตีเอ็นเอ SG02-26 มีขนาด 375 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Cymodocea serrulata* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความเหมือนกับยีน rps11-rpl36 intergenic spacer, partial sequence ในไม้น้ำ *Elodea Canadensis*

7. ขึ้นตีเอ็นเอ SG02- 33 มีขนาด 408 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Cymodocea serrulata* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความเหมือนกับยีน disulfide oxidoreductase ในข้าวโพด และ apoptosis-inducing factor ใน *Setaria italic* และ *Sorghum bicolor*

8. ขึ้นตีเอ็นเอ SG02- 38 มีขนาด 561 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Cymodocea serrulata* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความเหมือนกับยีน kinesin-like protein ใน *Camellia sinensis* *Coffea Arabica* (XM_027263042.1), *Brassica napus* (XM_013831283.2), *Eucalyptus grandis* (XM_010025606.2), *Oryza sativa Japonica* (XM_015768324.2) ซึ่งเป็น Motor Protein ชนิดหนึ่ง กำลังขนส่งเวสิเคิล(Vesicle) ไปตามไมโครทิวบูลในกิจกรรมของเซลล์

9. ขึ้นตีเอ็นเอ SG03- 09 มีขนาด 544 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Halodule uninervis* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความเหมือนกับยีน serine/threonine-protein ของ *Hevea brasiliensis*

10. ขึ้นตีเอ็นเอ SG04-07 มีขนาด 273 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความเหมือนกับยีน Ty3-gypsy retrotransposon ใน *Beta vulgaris* subsp และ aluminium-activated citrate transporter ใน *Hordeum vulgare* ซึ่งทำให้ข้าวบาร์เลย์สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีอะลูมิเนียมสูง (Furukawa et al, 2007)

11. ขึ้นตีเอ็นเอ SG05-12 มีขนาด 286 คู่เบส เป็นขึ้นตีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Halophila ovalis* กับหญ้าทะเลชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความเหมือนกับยีน alcohol dehydrogenase 1 (adh1) ในข้าวโพด โดยยีนนี้มีหน้าที่ช่วยให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ และต้านทานต่อความเครียดทั้ง biotic และ abiotic stress (Shi et al, 2017) และมีความเหมือนกันยีนมนโดเม MADS-domain transcription factor ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการออกดอกในพืช

12. ^{๕๕}ชั้นดีเอ็นเอ SG07- 20 มีขนาด 588 คู่เบส เป็นชั้นดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของหญ้าทะเลชนิด *Halodule pinifolia* ซึ่งมีความเหมือนกับยีนG-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase ใน *Cannabis sativa* หรือกัญชา

เมื่อพิจารณาถึงหน้าที่การทำงานจึงเลือกชั้นดีเอ็นเอจำนวน 10 ชั้นคือ SG01-18, SG01-32, SG02-16, SG02-26, SG02-33, SG03-09, SG04-07, SG05-12, SG05-35 และ SG07-20 มาใช้พัฒนา SCAR marker ชนิด Genetic barcoding ต่อไป

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอจากที่ได้จากความแตกต่างหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม BLASTN

Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		
			Description	E-value	Identity (%)
SG01-01	359	XM_014548502.1	PREDICTED: <i>Myotis brandtii</i> GATS protein-like 2 (GATSL2), mRNA.	2.9	96.30
SG01- 18	728	KU642088.1	<i>Thalassia hemprichii</i> NADH dehydrogenase subunit 9 (nad9) gene, complete cds; mitochondrial	3e-41	77.69
SG01- 32	713	XM_022962610.1	PREDICTED: <i>Spodoptera litura</i> trypsin-7-like (LOC111350894),transcript variant X2, mRNA.	1.8	91.43
SG01- 40	556	XM_015764646.2	PREDICTED: <i>Oryza sativa</i> Japonica Group probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 23 (LOC4326008)	1.4	83.33
SG02- 16	336	XM_020252365.1	PREDICTED: <i>Ananas comosus</i> villin-2 (LOC109723872), transcript variant X2, mRNA.	7e-14	78.50
		AF088901.1	<i>Lilium longiflorum</i> actin bundling protein ABP135 (Y5-7) mRNA, complete cds.	1e-04	71.96
SG02-26	375	MF370229.1	<i>Zostera marina</i> chloroplast, complete genome	1e-126	90.12
		KC812631.1	<i>Elodea canadensis</i> isolate cp2367A from USA ribosomal protein S11 (rps11) gene, partial cds; and rps11-rpl36 intergenic spacer,partial sequence; chloroplast.	1e-119	89.63

Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		E- value	Identity (%)
			Description			
SG02- 33	408	NM_001155372.1	<i>Zea mays</i> disulfide oxidoreductase/ electron carrier/ oxidoreductase (LOC100282462), mRNA.		4e-12	82.14
		XM_022828980.1	<i>Setaria italica</i> apoptosis-inducing factor homolog B (LOC101760924), mRNA		1e-11	81.18
		XM_002448983.2	<i>Sorghum bicolor</i> apoptosis-inducing factor 2 (LOC8070656), mRNA		1e-11	81.18
		NM_001320476.1	<i>Zea mays</i> FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein (LOC107275229), mRNA.		1e-11	81.18
SG02- 38	561	XM_028199314.1	<i>Camellia sinensis</i> kinesin-like protein KIN- 10A (LOC114259304), mRNA		2e-05	82.81
SG03- 04	225	CP023761.1	<i>Solanum lycopersicum</i> cultivar I-3 chromosome 5		0.14	75.95
SG03- 09	544	XM_021815188.1	<i>Hevea brasiliensis</i> CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 21 (LOC110657823), mRNA		0.11	81.48
SG04-07	273	HE598770.1	<i>Beta vulgaris</i> subsp. vulgaris Ty3-gypsy retrotransposon env-like Elbe4-5.		2e-08	74.77
		LC330943.1	<i>Hordeum vulgare</i> FM404 HvAACT1 gene for aluminium-activated citrate transporter, and upstream sequence of HvAACT1 gene, partial sequence		5e-08	79.49
SG04- 44	460	XM_019191764.1	woniella bestiolae CBS 10118 3'(2'),5'- bisphosphate nucleotidase partial mRNA.		0.091	100
SG05-12	286	AF123535.1	<i>Zea mays</i> alcohol dehydrogenase 1 (adh1) gene, adh1-F allele, complete cds		3e-05	75.58
		AJ850298.1	<i>Zea mays</i> m19 gene for putative MADS- domain transcription factor, allele ZMM19_T232, exons 1-8, cultivar T232		3e-05	75.58
SG05- 28	457	XM_003703996.2	<i>Megachile rotundata</i> zinc finger protein 395 (LOC100881646), mRN		0.090	85.71

Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		Identity (%)
			Description	E- value	
SG05- 35	274	NC_043774.1	<i>Thalassia hemprichii</i> chloroplast, complete genome	2e- 109	96.00
SG07- 20	588	XM_030638778.1	PREDICTED: <i>Cannabis sativa</i> G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase LECRK1 (LOC115710414), mRNA.	0.12	91.89

3.3 การพัฒนา SCAR Marker ชนิด genetic barcode

เป็นการนำขึ้นดีเอ็นเอที่สนใจที่ได้จากตารางที่ 4.5 มาพัฒนา SCAR marker เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดบาร์โค้ด เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในสร้าง genetic barcode โดยใช้โปรแกรม DNA Barcode Generator พบว่ามีเพียงขึ้นดีเอ็นเอ SG01-18, SG01-32, SG02-16, SG02-26, SG02-33, SG03-09, SG04-07, SG05-12, SG05-35 และ SG07-20 สามารถนำมาสร้าง Genetic Barcode ต่อยีนดังกล่าวได้ ดังตารางที่ 4.6 ดังนี้

ตารางที่ 4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและบาร์โค้ดชนิด

Genetic Barcode

ขึ้นดีเอ็นเอ	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	Genetic Barcode
SG01-18	F	5'- TGAGTCCAAACCGGATA -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTGGT -3'	
SG01-32	F	5'- TGAGTCCAAACCGGATA -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTCCG -3'	
SG02-16	F	5'- TGAGTCCAAACCGGAGC -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTGTC -3'	
SG02-26	F	5'- TGAGTCCAAACCGGAGC -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTCGG -3'	
SG02-33	F	5'- TGAGTCCAAACCGGATA -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTCCG -3'	
SG03-09	F	5'- TGAGTCCAAACCGGATA -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTGCA -3'	
SG04-07	F	5'- TGAGTCCAAACCGGAGC -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTTGA -3'	
SG05-12	F	5'- TGAGTCCAAACCGGATA -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTGTC -3'	
SG05-35	F	5'- TGAGTCCAAACCGGATA -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTCCG -3'	
SG07-20	F	5'- TGAGTCCAAACCGGATA -3'	
	R	5'- GACTGCGTACGAATTGGT -3'	

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาวิจัย

ในการศึกษาวิจัยพัฒนา DNA barcodes ที่จำเพาะกับหญ้าทะเล และลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์หญ้าทะเลชนิด 7 ชนิด ได้แก่ *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, *Halophila minor* และ *Halodule pinifolia* ได้มีการศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR marker ให้อยู่ในรูปแบบ genetic barcode โดยการสร้างจากยีนที่แสดงหน้าที่แตกต่างกัน สามารถสรุปได้ดังนี้

ส่วนที่ 1 การศึกษา DNA barcoding ในหญ้าทะเล พบว่า

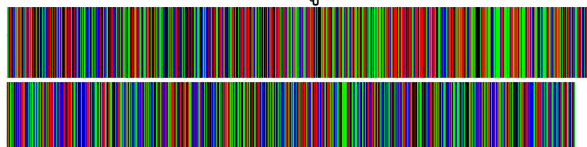
1. ยีนมาตรฐาน *rbcl* ในหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis* และ *Halodule pinifolia* มีขนาด 723, 722, 720, 722, 719, 720 และ 722 คู่เบส ตามลำดับ (หรือประมาณ 720 คู่เบส)
2. ยีนมาตรฐาน *matK* ในหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis* และ *Halodule pinifolia* มีขนาด 888, 909, 915, 358, 914, 910, 913 เบสตามลำดับ (หรือประมาณ 900 คู่เบส)
3. ยีนมาตรฐาน *rpoB* ในหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis* และ *Halodule pinifolia* มีขนาด 523, 522, 526, 530, 525, 526, 529 เบสตามลำดับ (หรือประมาณ 520 คู่เบส)
4. ยีนมาตรฐาน *rpoC1* ในหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis* และ *Halodule pinifolia* มีขนาด 596, 597, 593, 599, 597, 600 และ 597 เบสตามลำดับ (หรือประมาณ 590 คู่เบส)

ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ความน่าจะเป็น DNA Barcoding ของยีนมาตรฐานในหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม DNA Subway พบว่า

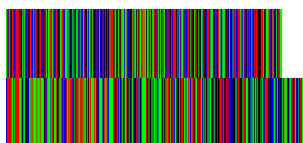
1. หญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* และ *Cymodocea serrulata* สามารถใช้ยีนมาตรฐาน คือ *rbcl*, *matK*, *rpoB* และ *rpoC1* ทุกตัวสร้าง barcoding ได้
2. หญ้าทะเล *Enhalus acoroides* สามารถใช้ยีนมาตรฐาน *matK* หรือใช้ร่วมกับ *rpoB* และ *rpoC1* เพื่อสร้าง barcoding ได้
3. หญ้าทะเล *Halodule uninervis*, *Halophila ovalis*, *Halophila minor* และ *Halodule pinifolia* สามารถใช้ยีนมาตรฐาน *rbcl* และใช้ร่วมกับ *matK* หรือร่วมกับยีนมาตรฐาน *rpoB* และ *rpoC1* เพื่อสร้าง barcoding ได้

ส่วนที่ 3 การพัฒนา SCAR Marker ชนิด genetic barcode พบว่า

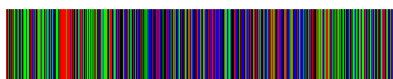
1. หญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* มี 2 genetic barcode คือ SG01-18 และ SG01-32 มีขนาด 728 และ 713 คู่เบส ตามลำดับ



2. หญ้าทะเล *Cymodocea serrulata* มี 2 genetic barcode คือ SG02-26 และ SG02-33 มีขนาด 375 และ 408 คู่เบส ตามลำดับ



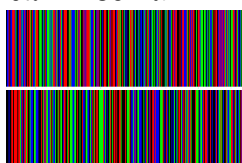
3. หญ้าทะเล *Halodule uninervis* มี 1 genetic barcode คือ SG03-09 มีขนาด 544 คู่เบส



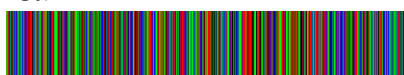
4. หญ้าทะเล *Enhalus acoroides* มี 1 genetic barcode คือ SG04-07 มีขนาด 273 คู่เบส



5. หญ้าทะเล *Halophila ovalis* มี 2 genetic barcode คือ SG05-12 และ SG05-35 มีขนาด 286 และ 274 คู่เบส ตามลำดับ



6. หญ้าทะเล *Haludole pinifolia* มี 1 genetic barcode คือ SG07-20 มีขนาด 588 คู่เบส



เอกสารอ้างอิง

- นฤมล ธนารักษ์ เกียรติชัย แซ่ใต้ และธีระชัย ธนารักษ์. 2557. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของกล้วยไม้สิ่งโตกลอกตา หมูสิ่งโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(4): 523-530.
- พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีราช. 2554 .ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต กรณีศึกษา: จิน Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์. ว.มรม. 5(2):205-210
- พรรษา มนต์แข็ง, อรุณรัตน์ ฉวีราช, ธวัชชัย ธานี และ รุ่งลาวัลย์ สุดมูล. 2556. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อ การระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลซีเหล็ก (*Senna*). ว. มข. (บศ.) 13(2): 18-30
- ปรานี กองทองคำ. 2556. ยูพีเอส: วิธีการสลายโปรตีนกับการต้านมะเร็ง สุธรรมศาสตร์เวชสาร ปีที่ ๑๓ ฉบับที่ ๒ ประจำ เดือนเมษายน-มิถุนายน
- วลัยลักษณ์ หัตถบุรณ์. 2554. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์ เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขา ชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ.
- วิชัย โฆสิตรัตน์. 2552. แท่งรหัสดีเอ็นเอ (DNA Barcode): รหัสจำแนกสิ่งมีชีวิต. ข่าวสาร เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร AG-BIO 1(3): 14- 15.
- วุฒิพร มหาคำ. (2554) DNA barcoding ของพืช: หลักการพื้นฐานการประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. ว.พฤกษาศาสตร์ไทย 3(1): หน้า 1-30
- สมบัติ ภูวชีรานนท์, กาญจนา อุดุลยานุโกศล, ภูธร แซ่หลิม, อติศร เจริญวัฒนาพร, ชัยมงคล แยม อรุณพัฒนา และ จันทรเพ็ญ วุฒิวงค์. 2549. *หญ้าทะเลในน่านน้ำไทย*. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Arus, P. 1993. Genetic Purity of Commercial Seed Lots. In S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). *Isozymes in Plant Breeding*. Elsevier Science Publishers B.V. New York. 415 – 423 pp.
- CBOL Plant working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 106: 12794-12797.
- Cuénoud, P., V. Savolainen, L. W. Chatrou, M. Powell, R. J. Gray and M. W. Chase. 2002. Molecular phylogenetics of caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *Am. J. Bot.*, 89: 132–144.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-14.

- Fay, M. F., S. M. Swensen and M. W. Chase. 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bull.*, 52: 111–120.
- Furukawa J., Yamaji N., Wang H., Mitani N., Murata Y, Sato K., Katsuhara M., Takeda K., Ma JF. 2007. *Plant Cell Physiol.* 48(8):1081-91
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313-321.
- Kress, W. J. and D.L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the noncoding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 2, e508.
- Li, G. and C. F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103:455–461.
- Lucas C., T. Thangaradjou and J. Papenbrock. 2012. Development of a DNA Barcoding System for Seagrasses: Successful but Not Simple. *PLoS ONE* 7(1): e29987.
- Nguyen, V.X., M. Detcharoen, P. Tuntiprapas, U. Soe-Htun, J. B. Sidik, M.Z. Harah, A. Prathep and J. Papenbrock. 2014. Genetic species identification and population structure of *Halophila* (Hydrocharitaceae) from the Western Pacific to the Eastern Indian Ocean. *BMC Evol. Ecol.*14: 92.
- Plunkett, G.M., Soltis, D.E. and P.S. Soltis. 1997. Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *matK* and *rbcl* sequence data. *Amer. J. Bot.* 84: 565-580.
- Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360, 1879–1888.
- Shi H., Liu W., Yao Y., Wei Y., Chan Z. 2017. Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) confers both abiotic and biotic stress resistance in Arabidopsis. *Plant Sci.* 262: 24-21
- Short, F.T., S.L. Williams, T.J.R. Carruthers, M. Waycott, G.A. Kendrick, J.W. Fourqurean, A. Callabine, W.J. Kenworthy and W.C. Dennison. 2010. *Halodule pinifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Tate, J. A. and B. B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.*, 28, 723–737.
- Waycott, M., C.M. Duarte, T.J.B. Carruthers, R.J. Orth, W.C. Dennison, S. Olyarnik, A. Calladine, J.W. Fourqurean, K.L. Heck, A.R. Hughes, G.A. Kendrick, W.J. Kenworthy, F.T. Short and S.L. Williams. 2009. Accelerating loss of seagrasses

across the globe threatens coastal ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12377–12381.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocol: A guide to methods and applications*. Academic Press, pp. 315-322.

ภาคผนวก

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 2560A10802026 สัญญาเลขที่ 131/2560

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCAR ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเล

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 13 ธันวาคม 2559 ถึงวันที่ 15 กันยายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ.....2.....ปี9..... เดือน ตั้งแต่วันที่ 13 ธันวาคม 2559

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 180,500 บาท เมื่อที่ 13 ธันวาคม พ.ศ. 2559

งวดที่ 2 (40%) 144,400 บาท เมื่อวันที่ 14 กันยายน พ.ศ. 2560

งวดที่ 3 (10%) บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี.....

รวม 361,000 (สามแสนหกหมื่นหนึ่งพันบาทถ้วน)

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1.ค่าตอบแทน	36,000	36,000	0
2.ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย	60,000	60,000	0
3. ค่าวัสดุ	50,000	50,000	0
4. ค่าใช้สอย	178,900	178,900	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ -ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	36,100	36,100	0
รวม	361,000	361,000	0

(.....ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน.....)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาพผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาตรฐาน

```
>Thalassia_hemprichii
AGAATTGGTGTATTATGATAATGTACTTCTGATACTCCGAAATATGAAACCAAAGATACTGATATATTGGCAGCATTCCGAGTCACGCCG
CACCCTGGAGTTCCTCCCTGAAGAAGCAGGGGCTGCAGTAGCTGCCGAATCTTCCACTGGTACATGGACAACGTGTGGACTGATGGACTG
ACTAGCCTTGACCGTTACAAAGGAGGATGCTACCACTCTTGAGTATTTCCCGTTGCTGGAGAAGAAGATCAATATATTGCTTATGTAGCT
TATCCTTGATACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTGACTTCCATTGTGCGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCTCTCCGAGCT
CTACGCTTGAGGATTTGCGACCTTCTTATTCACAACTTTCCAAAGGTCCACCTCATGTGGTAGAATCCAAGTGAAAGAGATAGATTG
AACAAATACGGCCGCCCTCTACTAGGATGTACTATGAAACCCAAATTGGGCCGCGAAAACTATGGTAGAGCAGTTTATGAATGTCTACG
TGTTGGACTGGATTGTACTAAAGATGATGAACAAGGAGAGACCGTTTCCTATTTTGTGCCGAAGCATACCCATTTTGAAGAAACAGGTTT
AATCCAAATTACTTTCATGCTACTGCAGTAACTGCGAAGTGAAATCAAAGGACATTACTTGAATGCTACTGCAGATACATGCGAAGGTTT
ATT
```

ภาพผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *rbcl* ของหอยทะเล *Thalassia_hemprichii* (SG01)

```
>Cymodocea_serrulata
GGACATGTTGGTGGATTCAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGAATATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGC
AGCATTCCGAGTAACCTCAACCTGGGGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCCGAGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAAC
TGTGTGGACTGATGGACTTACTAGTTTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGTTGGGGAAGAAGATCAATTTAT
TGCTTATGTAGCTATCCTTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCCGTTACCAACATGTTTACTTCCATTGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAA
AGCTCTACGAGCTTACGCTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTCCTGCTTATTCACAACTTTCCAAAGGTCCGCCACCGGAATACAGGTTGA
GAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTTATTTGGGATGTACTATTAACCAAAATTTGGGATTATCCGCGAAAACTACGGTAGAGC
GGTTTATGAATGCTCGCTGGTGGACTTGTATTTACCAAGATGATGAGAACGTGAACCTCACAAACATTATGCGTTGGAGAGATCGTTT
CTTATTTTGTGCCGAAGCTATTTATAAATCGCAAGCCGAAACAGGTGAAATCAAAGGACATTACTTGAATGCTACTGCAGTAACTGCGA
AA
```

ภาพผนวกที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *rbcl* ของหอยทะเล *Cymodocea_serrulata* (SG02)

```
>Halodule_uninervis
GCCGTTGGTGGATTACGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGAATATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGC
ATTCCGAGTAACCTCAACCTGGAGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCCGAGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTG
ATGGACTGATGGACTTACTAGCTTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTTGCTGGGGAAGAAGAACAATATATTGC
TTATGTAGCTATCCTTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCCGTTACCAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAACGTATTTGGGTTCAAAGC
TCTACGAGCTCTACGTTTGGAGGATCTGCGAATTCCTCCTGCTTATTCACAACTTTCCAAAGGTCCGCCACCGGAATCCAGGTTGAGAG
AGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTTATTTGGGATGTACTATTAACCAAAATTTGGGATTATCCGCGAAAACTACGGTAGAGCGGT
TTATGAATGCTCGCTGGTGGACTTGTATTTACCAAGATGATGAGAACGTGAACCTCACAAACATTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTT
ATTTTGTGCCGAAGCTATTTATAAAGCACAAGCCGAAACCGGTGAAATCAAAGGACATTACTTGAATGCTACTGCAGTAAACATGCGAAA
AA
```

ภาพผนวกที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *rbcl* ของหอยทะเล *Halodule uninervis* (SG03)

```
>Enhalus_acoroides
GGGCTTGTGTTGGATTACGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGACTTATTATACTCCAGAATATGAAACCAAAGATACTGATATATTGGCAG
CATTCGAGTCACGCCGCAACCTGGAGTTCCCCCTGAAGAAGCAGGTGCTGCAGTAGCTGCCGAATCTTCCACTGGTACATGGACAACGTG
TGTGGACTGATGGACTTACTAGCTTACCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAACCCGTTGCTGGAGAAGAAGATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGCGTAATGTATTTGGGTTCAAAG
CTCTCCGAGCTCTACGCTTGGAGGATTTGCGAATTCCTCCTTATTCACAACTTTCCAAAGGTCCACCTCATGGAATCCAAAGTGAAAA
GAGATAGATTGAACAAATACGGCCGCCCTCTACTAGGATGTACTATTAACCAAAATTTGGGATTATCCGCGAAAACTACGGTAGAGCAG
TTTATGAATGCTACGTTGGTGGACTGGATTTTACTAAAGATGATGAAAACGTCAATTCCAGCCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCC
TATTTTGTACCGAAGCCATTTTATAAAGCACAAGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGACATTACTTGAATGCTACTGCAGTAAACATGCCAA
AA
```

ภาพผนวกที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *rbcl* ของหอยทะเล *Enhalus_acoroides* (SG04)

```
>Halophila_ovalis
GGGCTTGTGTTGGATTACGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGACTTATTATACTCCAGAATATGAAACCAAAGATACTGATATATTGGCAG
CATTCGAGTCACGCCGCAACCTGGAGTTCCCCCTGAAGAAGCAGGTGCTGCAGTAGCTGCCGAATCTTCCACTGGTACATGGACAACGTG
TGTGGACTGATGGACTTACTAGCTTACCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAACCCGTTGCTGGAGAAGAAGATCAATATATTG
CTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGCGTAATGTATTTGGGTTCAAAG
CTCTCCGAGCTCTACGCTTGGAGGATTTGCGAATTCCTCCTTATTCACAACTTTCCAAAGGTCCACCTCATGGAATCCAAAGTGAAAA
GAGATAGATTGAACAAATACGGCCGCCCTCTACTAGGATGTACTATTAACCAAAATTTGGGATTATCCGCGAAAACTACGGTAGAGCAG
TTTATGAATGCTACGTTGGTGGACTGGATTTTACTAAAGATGATGAAAACGTCAATTCCAGCCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCC
TATTTTGTACCGAAGCCATTTTATAAAGCACAAGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGACATTACTTGAATGCTACTGCAGTAAACATGCCAA
AA
```

ภาพผนวกที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *rbcl* ของหอยทะเล *Halophila_ovalis* (SG05)


```
>Halophila_minor
CAACTTGTGGATTACAGCTGGTGTAAGATTATAAATTGACTTATTATACTCCAGAATATGAAACCAAAGATACTGATATATTGGCAGCA
TTCCGAGTTTCTCCGCAACCTGGAGTTCCCCCTGAAGAAGCGGGGGCTGCAGTAGCTGCCGAATCTTCCACTGGTACATGGACCACTGTG
TGGACTGATGGACTTACTAGCCTTGACCGTTACAAAGGACGATGCTATCACATCGAACCTGTTGCTGGAGAAGAAGAGCAATATATTGCT
TATGTAGCTTATCCTTTAGACTCTTTTTGAAGAAGGTTCCGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGCGGGAATGTATTGGGTTCAAAGCT
CTCCGAGCTCTACGCTTGAGGATTTGCGAATTCCTCCTGCCTATTCACAAACTTCCAAAGGTCCACCTCATGGAATCCAAGTGGAAAGA
GATAGATTGAACAAATACGGCCGCCCTCTACTAGGATGTACTATTAACCAAAATTTGGGATTATCCGCGAAAACTACGGTAGAGCAGTT
TATGAATGTCTACGTGGTGGATTGGATTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAAATTTCCAGCCATTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCCTA
TTTTGTACCGAATCCATTATAAAGCGCAAGCCGAAACAGGTGAAGTCAAAGGACATTACTTGAATGCTACTGCGTAACCTTGCCAAAA
```

ภาพผนวกที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *rbcL* ของหอยทากทะเล *Halophila_minor* (SG06)

```
>Haludule_pinifolia
GGGACGTGTTGGGATTACAGCTGGTGTTAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGAATATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCA
GCATTCCGAGTAACCTCAACCTGGAGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGGCCGAGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCT
GTATGGACTGATGGACTTACTAGCTTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCCGTGCTGGGGAAGAAGACAATATATT
GCTTATGTAGCCTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCCGTTACCAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAACGTATTTGGGTTCAA
GCTCTACGAGCTCTACGTTTGGAGGATCTGCGAATTCCTCCTGCTTATTCCAAAACCTTCCAAAGGTCCGCTCACGGAATCCAGGTTGAG
AGAGATAAATGAACAAGTATGGTCGTCCCTATTGGGATGTACTATTAACCAAAATTTGGGATTATCCGCGAAAACTACGGTAGAGCG
GTTTATGAATGTCTGCGTGGTGGACTTGATTTTACCAAGATGATGAGAAGCTGAACCTCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTC
TATTTTGTGCCGAAGCTATTTATAAAGCACAAGCCGAAACCGGTGAATCAAAGGACATTACTTGAATGCTACTGACGTAACCTTGCGA
AA
```

ภาพผนวกที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *rbcL* ของหอยทากทะเล *Haludule_pinifolia* (SG07)

```
>Thalassia_hemprichii
TTATGTATCCGATATAGGAATCCCTTATCCTATTCATCTCGAAATCTTGATTCCAATTTACAAATCCTGGATTCCAGATGTTCCCTCTTT
GCATTTCTTGCGATTTTTTCTATACGAATCTCCTAATTGGAATCGTTTCAATTGCTCGAAAGAAATCGATTCTTATTTGTTCAAAGAGAA
TCCAAGACTCTTTCCGTTCTATTAATTCTTATGTCTCTGAATATGAATCAGTATTTTGTCTCCGTAGACATCTCTTTTATTTACT
ATCCACATCTTCTGGAGACTTTATTGAGCGAACCATTCTATGGAAAAATAGAGTATCTTGTAGTAGTTTGTGCGTAATGATTTTCAGAA
AAGCTTACAGTTGTTCAAGGATCCTTGCATGCAATATGTGAGATATCAAGGAAAAATCCATTTTTCATCAAAAGAAACCTATTTCTGAT
GAAGAAATGGAAATGTTACCTTGTCTTTTTTGGCAGTGTCATTTTCTTTTTGGTCTCAATCATATAGGATTCTATCAACCAATTATC
CAAGAATTATTTTCGATTTTTTGGGTTATCTTCAAGTGATTAATAAATTTCTTGGCAGTCCGGAGTCAAATGCTAGAGTCTTCATTTCT
AATAGACACTGTGACTAAGAAATTCGAGACTATAGTCCCAGTTATCTCTCATTTGGATCCTTGTCAAAGCTCAATTTTGAATGTATC
CGGTATCCTGTTAGTAAGCGGATTTGGACGGGTTTATCCGATTCTGATATGATTGATCGATTTGGTCCGATATGTAGGAATCTTTCTCA
TTATATAGTGGGATCCTCAAACAAACAGAGTTTGTATCGAATAAAGTATATACTTCGACTTTCTGTTGGTGCTAAAA
```

ภาพผนวกที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *matK* ของหอยทากทะเล *Thalassia_hemprichii* (SG01)

```
>Cymodocea_serrulata
CCGGGAAGTAGTTTTTCCATGTTAATTATGTGTCAGATATATAATACCTTATCCCATTCAGCTCGAAATCTTGGTTCAAATTTTACAAT
CCTGGATACAAGATGTTCCAGTTTTTTCATTTATGCGATTTTTTCTTTACGAATATCATAATTGTAATAGTTTGATTACTCTAAGGAAAT
CCATTTCTATTTTTTCAAAGAGAAATCAAAGATTCTTTTCGTTTACTATATAATTATTACTTATCTGAATATGAATCCGTGTTTTGTTTTT
TACGTAACACTTCCTCTTATTTACTATCAACATCCTTTGTAGACTTTATTGACCGAACACATTTTATGGAAAAATAGAACATCTTGCGG
TAGTTTTTCGTAATGATTTTCAGAAAACCTACGATTGCTCAAGAGATCCTTTCCCTGCATTATGTTAGATATCAAGGAAAAATCAATCTTG
CGTCAAAGGGAACATCTTATAATGAAGAAATGGAAATATTACCTTGTCCATTTTGGCAATGGAATTTTTATTTTTTGGTCTCAACCAC
ATAGGATTCATATAAACCAATTATCAAAATAATTCCCTATATTTTATGGGTTATCTTTCTAGTGTATTGATAAATCCTTTGACAGTAAGGA
GTAAATGTTAGAGTATCTTTTATAATAGACATTGTTAGTAATAAATTCGATACTCTAGTTCGAATATTCCTCTCATTGGATCTTTAT
CGAAAGCAAAATTTTGAATGTATCCGGGTATCCCATTAGTAAGCCAGTTTGGACCGATTATCTGATTCTGATATTATTGATCGATTTG
GTCGTATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGGTCCTCAAAAAACATAAATTTGTATCGAATCAAGTATATACTTCGACTTCGTG
GGGCTAGAA
```

ภาพผนวกที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *matK* ของหอยทากทะเล *Cymodocea_serrulata* (SG02)

```
>Halodule_uninervis
GCCGGGTAAAGGTCACTTTTCCATGTTAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATCCCATTCATCTCGAAATCTTGGTTCAAATTTTAC
AATCCCGGATACAAGATGTTCTTACTTTGCATTTATTGCGATTTTTTCTCTACGAATATCACAATTTGGAATAATTTCAATTACTCTAAGGA
AATCCATTCTCTTTTTTCAAAGAGAAATCCAAGATCTTTTCGTTTACTATATAATTATTATTTATCTGAATATGAATCTGTGTTTTGTT
TTCTACGTAAACATTCCTCTTATTACTATCAGTATCCTTTGGAGACTTATTGATCGAACACATTTTATGGAAAAATAGAACATCTTG
CGGTAGTTTTTTCGTAATGATTTTTCAGAAGACCCTACGATTATTCAGGGATCCTTTTCATGCATTATGTTAGATATCAAGGAAAAATCAATCT
TGCTTCAAAGGGAACATCTTATAATGAAGAAATGGAAATATTACTTTGTAAATTTTTTGGCAATGGAATTTTTATTTTTTGGTCTCAAC
CACATAAGATTTCATATAAACCAATTATCAAAGAATTCTTATATTTTCTGGGTTATCTTTCCAGTGTATTAAGAAATCCTTTGATAGTAA
ATAGTAAATGCTAGAGATTTCTTTTTTAAAGACATCTTTTATTAATAAATTCGATACTATAGTTCCGATTATTCCTCTCATTTGGATCTT
TATCTAAAGCAAAATTTTGAATGTATCTGGGTATCCCTTAGTAAGCCAAATTTGGACCGATTATCTGATTCTGAGATTATTGATCGGT
TTAGTCGTATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAACAGAGTTTGTATCGAATGAAGTATATACTTCGACTTC
GGGGGGGGCTAGAAA
```

ภาพผนวกที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *matK* ของหอยทากทะเล *Halodule_uninervis* (SG03)

>Enhalus_acoroides
 NNNTANNNNANCCNNNCGNTCATGNTANTGTTTTAGTCTTAANCNNCCTGATCCGCCGTTAAAGTTAAAAATTCTACNANCTATAAAA
 CCGATGCCACTTGCCCAATGATCATATAATCNGGCNCCTACTGGTATCCCCCAATCCACGTAAGAATTGCTATGTCTGCCANTAGGGTTCA
 TAAAAGGACTTGGGTAATGCGCCGGAATGCTAATCCTCGCTGTTTGTGGTGAGGANGATGNGNACAACACTAGCATTTTTTACCATAAAAT
 TCCATAGCTAATACTCTCGCTAGCTTGTAGGGATGGATCGACTAAAANCGTATGCTATTACTACCTATTTTTTCCGGTGAAAGCTAG

ภาพผนวกที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *matK* ของหญ้าทะเล *Enhalus_acoroides* (SG04)

>Halophila_ovalis
 CGCGGTTTAGGACGATTTTCCATATAAATTATATATCCAATATAGGAATCCCTTATCCTATTCATCTCGAAATCTTGATTCCAATTCTAC
 AATCCCGGATTCCAGATGTTCTCTTTTGCATTTTTTGCGGTTTTTCTATACGAATCTCCTAATTGGAATCGTTTCATTACTCGAAAGA
 AATCGATTTCTATTTGTTCAAAAGAGAATCCAAGACTCTTTCGGTTCTATATAATTCTTATCTCTCTGAATATGAATCAGTATTTTGT
 TTATCCGTAGACATTCCTTTTATTACTATCCACATCTTCTGGAGACTTTCTTGAGCGAATCCATTCTATGGAAAAATAGAGTATCTTG
 TAGTAGTTTGTCTGAATGATTTTTCAGAAAAGCTTACAGTTGTTCAAGGATCCCTTGCAATGCATTATGTGAGATATCAAGGAAAATCCATT
 TTGCATCAAAAGGAACCTATTTTCTGATGAAGAAATGGAATGTTACCTTGTTTCGTTTTTGGCAATGTCATTTTTCTTTTGGTCTCAAC
 CGTATAGGATTCTATCAACCCATTATCCAAAAATCTTTCGATTTTTGGGGTTATCTTTCAAGTGATTAATCAATCCTTTGGCAGTCC
 GGAGTCAAATGCTAGAGTCTTCAATTTCTAATAGACACTGTGACTCAGAAATTCGAGACTATAGTCCCAGTTATTCCTCTGATTGGATCCT
 TGTCGAAAAGCTCAATTTTGAATGTATCTGGGGATCCCTATTAGTAAGGCTGTTTGGACGGGTTTTTCTGATTCTGATATAATTGATCGGT
 TTGGTCGGATATGTAGGAATCTTCTCATTATTATAGTGGATCCTCAACAAACAGAGTTTGTATCGAATGAAATATATACTTCGATTCCG
 GGGGGGGCTAGAAA

ภาพผนวกที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *matK* ของหญ้าทะเล *Halophila_ovalis* (SG05)

>Halophila_minor
 CGCGGGGAAGGTCGATTTTCCAGATAAATTATATATCCAATATAGGAATCCCTTATCCTGTTTCATCTCGAAATCTTGATTCCAATTCTAC
 AATCCCGGATTCCAGATGTTCTCTTTTGCATTTTTTGCGGTTTTTCTATACGAATCTCCTAATTGGAATCGTTTCATTACTCGAAAGA
 AATCGATTTCTATTTGTTCAAAAGAGAATCCAAGACTCTTTCGGTTCTATATAATTCTTATCTCTCTGAATATGAATCAGTATTTTGT
 TTATCCGTAGACATTCCTTTTATTACTATCCACATCTTCTGGAGACTTCTTGAGCGAATCCATTCTATGGAAAAATAGAGTATCTTG
 TAGTAGTTTGTCTGAATGATTTTTCAGAAAAGCTTACAGTTGTTCAAGGATCCCTTGCAATGCATTATGTGAGATATCAAGGAAAATCCATT
 TTGCATCAAAAGGAACCTATTTTCTGATGAAGAAATGGAATGTTACCTTGTTTCGTTTTTGGCAATGTCATTTTTCTTTTGGTCTCAAC
 CGTATAGGATTCTATCAACCCATTATCCAAAAATCTTTCGATTTTTGGGGTTATCTTTCAAGTGATTAATCAATCCTTTGGCAGTCC
 GGAGTCAAATGCTAGAGTCTTCATTTCTAATAGACACTGTGACTCAGAAATTCGAGACTATAGTCCCAGTTATTCCTCTGATTGGATCCT
 TGTCGAAAAGCTCAATTTTGAATGTATCTGGGGATCCCTATTAGTAAGGCTGTTTGGACGGGTTTTTCTGATTCTGATATAATTGATCGGT
 TTGGTCGGATATGTAGGAATCTTCTCATTATTATAGTTGGATCCTCTAACTAACAGAGTTATGATTCGTATTGAAATATAATCTATCGG
 CTTATGTTGG

ภาพผนวกที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *matK* ของหญ้าทะเล *Halophila_minor* (SG06)

>Haludule_pinifolia
 ACCTCAGCCTTCCACGTGCATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATCCCATTCATCTCGAAATCTTGTTCAAATTTTACAATCCCGG
 ATACAAGATGTTCTACTTTTGCATTTATTGCGATTTTTTCTCTACGAATATCACAAATGGAATAATTTTCAATTACTCTAAGGAAATCCATT
 TCTCTTTTTTCAAAGAGAATCCAAGATTCTTTTCGTTTACTATATAATTATTATTTATCTGAATATGAATCTGTGTTTTGTTTTCTACGT
 AAACATCTCTCTTATTTTACTATCAGTATCCTTTGTAGACTTTATTTGATCGAACACATTTTATGGAAAAATAGAACATCTTGCGGTAGTT
 TTTGTAATGATTTTTCAGAAAGACCTACGATTATTCAGGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGATATCAAGGAAAATCAATCTTGGCTTCA
 AAGGGAATCATCTTATAATGAAGAAATGGAATATTACTTTGTAAATTTTTTGGCAATGGAATTTTTATTTTTTGGTCTCAACCACATAAG
 ATTCATATAAACCAATTATCAAGAATTCTTTATTTTTCTGGGTTATCTTCCAGTGTATTAAGAAATCCTTTGACAGTAAATAGTAAA
 ATGCTAGAGTATTTCTTTTAAATAGACATTTTATTAATAAAATTCGATACTATAGTTCCGATTATTCCTCTCATTGGATCTTTATCTAAA
 GCAAAATTTTGAATGTATCTGGGTATCCCTTAGTAAGCCAATTTGGACCGATTATCTGATTCTGAGATTATTGATCGGTTTAGTCGT
 ATATGTAGAAATCTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAACAGAGTTTGTATCGAATGAAGTATATACTTCGACTTCGGGGGGG
 TAAAAA

ภาพผนวกที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *matK* ของหญ้าทะเล *Haludule_pinifolia* (SG07)

>Thalassia_hemprichii
 GGGGCTTCGGAGTGCATTGTTGGACTGGGCTGGAGGCCAAGTGGCCCTAGATTTCGGGGGTTTCGGCTATAGCCGAACATGCGGTAAAGAT
 CATTTATACTGATACTCACAAAGATGATTTTATCAAAGAATGGAACACTATAAGCATTCCATTAGTTATGTATCAAGGTTCCAACAAAAA
 GACTTATATGCATCAAAACCTCAGGTTTTCACGGGGTAAATATGTGAAAAAAGGGCAAATTTTAGCGGACGGTGCAGCTACCGTTGGTGG
 GGAACCTCGCTTTGGGAAAAATGTATTAATAGCTTATATGCCATGGGAAGGCTACAATTTTGAAGATGCAGTACTTATTAGTGAACGTCT
 AGTATATGACGATATTTTACTTCTTTTACATACGGAAGTATGAAATTCATACTTATATGACACCTGAAGGTCCGGAAAGAATTACTAA
 GGAATCCCGCATTTAGAAGATCATTTACTCCGCAATTTAGACAGAAATGGAATTGTGAGCTTGGGGATCAAA

ภาพผนวกที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ *rpoB* ของหญ้าทะเล *Thalassia_hemprichii* (SG01)

>Cymodocea_serrulata
 CCCTGTGCGAGAGTGCATTGTTGGACCGGGCTGGACGCCAAGTAGCCTTGGATTTCGGGAGTTTCTGCTATAGCGGAACGCGAGGGAAAGAT
 CATTGTACTGATACTCAAAAAATTATTTTATCAAGTAATGGGAACACTATAAGCATTCCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAA
 TACTTGTATGCACCAAAAAATCCCGGGTTCCACGGGGTAAATACATTAAAAAGGGCAAATTTTAGCAGACGGTGC GGCTACTGTTGGTGG
 AGAACTCGCTTTGGGAAAAACGTATTAGTAGCTTATATGCCATGGGAAGGCTACAATTTTGAAGACGCGGTACTTATCAGTGAACGTCT
 GGATATAATGATATCTATCTACTTCTTTTTCACATACGGAAATATGAAATTCAGACTCATATGACAAGTCAAGGTCCCGAAAGAATCACTAA
 GGAAATACCTCATTAGAGGATCATTACTCCGAAATTTAGACAGAAATGGAATTGTGAGCCTGGGATCAAA

ภาพผนวกที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoB* ของหญ้าทะเล *Cymodocea_serrulata* (SG02)

>Halodule_uninervis
 GGGGCTGCGGAAGTGCATTGTTGGACCGGGTTGGAACGTCAAGCGGCCTTGGATTTCGGGAGTTTCCGCTATAGCGGAACACGAGGGAAAG
 ATCATTTTACTGATACTCACAAGATGATTTTATCAAGTAATGGGAACACTATAAGCGTTCCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAGA
 AATACTTGATGCACCAAAAAACCTCGTGTTCGCGGGGTAAATACATTAAAAAGGGCAAATTTTAGCAGACGGCGCGGCTACTGTTGAT
 GGAGAACCTCGCTTTGGGAAAAACGTATTAGTAGCTTATATGCCATGGGAAGGCTACAATTTTGAAGACGCGAGTACTTATCAGTGAACGT
 CTGGTATATAAGGATATTTATCTTCTTTTTCACATAAGGAAATATGAAATTCAGACTCATATGACAAGTCAAGGTCCCGAAAGAATCACT
 AGGGAATACCTCATTAGAGATCATTACTCCGAAATTTAGACAGAAATGGAATTGTGAGCCTGGGGATCAAAA

ภาพผนวกที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoB* ของหญ้าทะเล *Halodule uninervis* (SG03)

>Enhalus_acoroides
 TGGGCCCCGTGAAGTGCATTGTTGGACTGGGCTGGAAGGCCAAGTGGCCCTAGATTTCGGGGGTTTCGGCTATAGCCGAACACGAGGAAAG
 ATCATTTGATACTGATACTCACAAGATGATTTTATCAAGAATGGGAACACTATAAGCATTCCATTAGTTATGTATCAAGGTTCC
 AACAAAAAGACTTATATGATCATACTCAAAAAACCTCAGGTTTCACGGGGTAAATATATGAAAAAGGGCAAATTTTAGCGGACGGTGC GGCTACC
 GTTGGTGGGAACCTCGCTTTGGGAAAAATGTATTAATAGCTTATATGCCATGGGAAGGCTACAATTTTGAAGATGCAGTACTTATAGT
 GAACGTCTAGTATATGACGATATTTATCTTCTTTTTCACATACGGAAGTATCAAATTCATACTTATATGACACCTGAAGGTCCCGAAAGA
 ATTACTAAGGAAATCCCGCATTTAGAAGATCATTACTCCGCAATTTAGACAGAAATGGAATTGTGAGCCTGGGATCAAAA

ภาพผนวกที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoB* ของหญ้าทะเล *Enhalus_acoroides* (SG04)

>Halophila_ovalis
 CCACCGGTCGGAGTGCATTGTTGGACTGGGCTGGAGGCCAAGTGGCCCTAGATTTCGGGGGTTTCGGCTATAGCCGAACACGCGGGAAAGA
 TCATTTTACTGATACTCACAAGATGATTTTATCAAGAATGGAAACACTATAAGCATTCCATTAGTTATGTATCAAGGTTCCAACAAAA
 AGACTTATATGCATCAAAAAACCTCAGGTTTCACGGGGTAAATACATGAAAAAGGGCAAATTTTAGCGGACGGTGC GGCTACCGTTGGTG
 GGGAACTCGCTTTAGGAAAAAATGTATTAATAGCTTATATGCCATGGGAAGGCTACAATTTTGAAGATGCAGTACTTATAGTGAACGTC
 TAGTATATGACGATATTTATCTTCTTTTTCACATACAGAAGTATGAAATTCATACTTATATGACACCTGATGGTCCGGAAGAATTACTA
 AGAAAAATCCCGCATTTAGAAGATCATTACTCCAAAATTTAGACAGAAATGGAATTGTAGCCTTGGGGATCAAAA

ภาพผนวกที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoB* ของหญ้าทะเล *Halophila_ovalis* (SG05)

>Halophila_minor
 CCCCCGGTTGGGAGTGCATTGTTGGACTGGGCTGGAGGCCAAGTGGCCCTAGATTTCGGGGGTTTCGGCTATAGCCGAACACGCGGGAAAG
 ATCATTTTACTGATACTCACAAGATGATTTTATCAAGAATGGAAACACTATAAGCATTCCATTAGTTATGTATCAAGGTTCCAACAAA
 AAGACTTATATGCATCAAAAAACCTCAGGTTTCACGGGGTAAATACATGAAAAAGGGCAAATTTTAGCGGACGGTGC GGCTACCGTTGGT
 GGGGAACCTCGCTTTAGGAAAAAATGTATTAATAGCTTATATGCCATGGGAAGGCTACAATTTTGAAGATGCAGTACTTATAGTGAACGT
 CTAGTATATGACGATATTTATCTTCTTTTTCACATACAGAAGTATGAAATTCATACTTATATGACACCTGATGGTCCGGAAGAATTACT
 AAGAAAAATCCCGCATTTAGAAGATCATTACTCCAAAATTTAGACAGAAATGGAATTGTGAGCCTGGGGATCAAAA

ภาพผนวกที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoB* ของหญ้าทะเล *Halophila_minor* (SG06)

>Halodule_pinifolia
 TTGGCCTGTGGGAGGTGCATTGTTGGACCGGGTTGGAACGTCAAGCGGCCTTGGATTTCGGGAGTTTCCGCTATAGCGGAACACGAGGGGA
 AAGATCATTTTACTGATACTCACAAGATGATTTTATCAAGTAATGGGAACACTATAAGCGTTCCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAAC
 AGAAATACTTGATGCACCAAAAAACCTCGTGTTCGCGGGGTAAATACATTAAAAAGGGCAAATTTTAGCAGACGGCGCGGCTACTGTT
 GATGGAGACTCGCTTTGGGAAAAACGTATTAGTAGCTTATATGCCATGGGAAGGCTACAATTTTGAAGACGCGAGTACTTATCAGTGAA
 CGTCTGGTATATAAGGATATTTATCTTCTTTTTCACATAAGGAAATATGAAATTCAGACTCATATGACAAGTCAAGGTCCCGAAAGAATC
 ACTAGGGAATACTCATTAGAGATCATTACTCCGAAATTTAGACAGAAATGGAATTGTGAGCCTGGGGATCAAAA

ภาพผนวกที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoB* ของหญ้าทะเล *Halodule_piniifolia* (SG07)

>Thalassia_hemprichii

AAATAGAAATGCTTATGGAGAGGTCATAATAGAGTTTACAAGTGCTTTTCCGATGTCATGGAAAGCAAAGAAGAAGGATTTCTTGAGACTA
CGCTGGTTCGAACGACTAGTTGATTCTTCGCGCCTTCCATCGTCGTGGGGCCCCCTTCTTTTTCATTACATCGATGCTTATTACCTCAAA
AAATAATAATCCAACCTTTTCCCGGTTGTTGTGATTGGTGGACTCATACAACATGTTGTTGCTTCCAACAGGAGTGTGCAAAACAGACTTA
TTAAAAAAAACACCTGTGGGTGGAAAAATCTTCAAGAAATGGGGCGAGGTCCTCCAGTGTTGATGAATACACCACCCCCCTACATT
TATTAAGAATAGCGGTCTTCCCCCTATATTGGAGGAGGGACGTGTTGTTCTTTACCTCTATTATGTTGGGAGGTCTTTGATGACTATT
ATGACGATCAAAATGGTGGTTCTTCAAATTTCTTTTCTTGGATCCTCCTGAAGAGGGCCTACTACTGATGTCTCCTCATAGCATCTGT
TGCTCCTACTGTGGAGCAGCCACTCTCCCACTACTCAAAAGATTATTATGGAA

ภาพผนวกที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoC1* ของหอยทากทะเล *Thalassia_hemprichii* (SG01)

>Cymodocea_serrulata

GCTAGGGGTACATGACGACGGTCATAATAAAGTTTACAAGTCCTTTTCAGATGTAATTGAGGGCAAAGAGGGAAGATTTCCGAAACTCT
GCTTGGTAAACGAGTCGATTATTTCGGGACGTTCCGTTATTGTCGTGGGGCCCCCTCACTTTCATTACATCAATGTGGATTACCTCGAGAAAT
AGCAATAGAGCTTTTCCAGACATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAGACGACATGTGGCTTCCAACATAGGGATTGCTAAAAGTAAATTAG
AGAAAAAGAACTGATTGTATGGGAAATACTTCAAGAAGTTATGCAGGGACATCCTGTATTGCTGAATAGAGCACCACCCCTGCATAGATT
AGGAATACAGGCATTTCAACCTATTTTAGTGGAGGGACGCGCTATTTGTTTACACCCATTAGTTTGTAAAGGGCTTAAATGCAGACTTTGA
TGGGGATCAAATGGCTGTTTCATGTACCTTTATCTTTGGAAGCTCAAGCCGAGGCTCGTTTACTTATGTTCTCTCATATGAATCTCTTGTC
TCCAGCTATTGGGGACCCCATTTCTATACCAACTCAAGAATGGCTTTATGGGAACCA

ภาพผนวกที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoC1* ของหอยทากทะเล *Cymodocea_serrulata* (SG02)

>Halodule_uninervis

ABCCCTAGGGTACATGTAGGACGGTCATAATAAAGTTTATAAGTCCTTTTCCAATGTAATTGAGGGCAAAGAGGGAAGATTCCGCGAGAC
TCTGCTTGGTAAACGAGTCGATTATTTCGGGACGTTCCGTTATTGTCGTGGGGCCCCCTCACTTTCATTACATCAATGTGGATTACCTCGAGA
AATAGCAATAGAGCTTTTCCAGACATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAGACAACATGCGGCTTCCAACATAGGGATTGCTAAAAGTAAAT
TCGAGAAAGAACTGATTGTATGGGAAATCTTCAAGAAGTTATGCAGGGACATCCTGTATTACTGAATAGAGCACCACCCCTGCATAG
ATTAGGAATACAAGCATTTCAACCTATTTTAGTAGAGGGACGCGCTATTTGTTTACACCCATTAGTTTGTAAAGGGCTTAAATGCAGACTT
TGATGGGGATCAAATGGCTGTTTCATGTACCTTTATCCTTGGGAAGCTCAAGCCGAGGCTCGTTTACTTATGTTCTCTCATATGAATCTCTCT
GTCTCCAGCTATTGGGGACCCCATTTCTATACCAACTCAAGAATGGCTTAAATGGA

ภาพผนวกที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoC1* ของหอยทากทะเล *Halodule uninervis* (SG03)

>Enhalus_acoroides

TCATAGATGCTGTAGATATTAATAATAGGGTTTACGGTGCTTTTCCGATATCAATGAAGGGGGCAGAGAGGGGAGATTACGTCAGACCCCT
GCTCGGTGAACGAGTCGATTATTTCGGGACGTTCCCTCCGTTGTCTGGGGCCCCCTTCCCTTTCTTTACTTCATCGCTGAGTACCGCCACAAAT
AATAATCAAACCTTTTCTTCACGATTGTGATTCTTGATCTAATCATACAACATGTTGCTGCCAACACAGTATTGCAAAAAGTCAAATTAG
AGAAAAAGAACCAATTGTGTGGGAAATACTTCAAGAAGTTGTGCAAGGGCACCCTGTATTGCTGAATATTGCACCTACCCACATATAAAT
AGGAATACAGGCATTTCAACCTATTTTAGTGGAAAGGACGCGCTATTTCTTTACATCCATTAATTTGTAAGGGCTTAAATGGAACTTTGA
CGGATATCAAATGGGTGTTTCATATACCTTTATCCTTGGGAAGCTCAAGCCGAGGCCCCGTTTACTTATGTTTTCTCATATGAATCTCTTGTC
TCCAACCTATTGGGAACCCCATTTTCGCTACCAACTCAAAATATGCTTATGGTGCTTATGG

ภาพผนวกที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoC1* ของหอยทากทะเล *Enhalus_acoroides* (SG04)

>Halophila_ovalis

TCCTATTTTCGGCTATATAAGATATTAATAAGAGGGTTTACAAGTGCTTTTCCGATATCATTGAAGGGGGCAAAGAGGGGAGATTTTCGTCA
GACCTTGCTCGGTAAACGAGTCGATTATTTCGGGACGTTCCGTTATTGTCGTGGGGCCCCCTTCCCTTTTCATTACATCAATGCGGATTACCTCG
AGAAATAGCAATCGAATTTTCCAGACATTTGTGATTCTGATCTAATCAGACAACATGTTGCTTCCAACATAGGTATTGCAAAAAGTCA
AATTAGAGAAAAAGAACCGATTGTGTGGGAAATACTTCAAGAAGTTGTGCAAGGGCACCCTGTATTGCTGAATAGAGCACCCTACCTTACA
TAGATTAGGAATACAGGCATTTCAACCTATTTTAGTGGAAAGGACGCGCTATTTCTTTACATCCATTAGTTTGTAAAGGGCTTAAATGCAGA
CTTTGACGGAGATCAAATGGGTGTTTCATATACCTTTATCCTTGGGAAGCTCAAGCCGAGGCCCCGTTTACTTATGTTTTCTCATATGAATCT
CTTGCTCTCCAACCTATTGGGAACCCCATTTGCGTACCAACTCAAGAATTGCTTATGGG

ภาพผนวกที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoC1* ของหอยทากทะเล *Halophila_ovalis* (SG05)

>Halophila_minor

CACTAGTATCGCAATATGGGACGGTCATAATAAGTTTATAAGTCCTTTTCCAATGTAATTGAGGGCAAAGAGGGAAGATTTCCGCGAGACT
CTGCTTGGTAAACGAGTCGATTATTTCGGGACGTTCCGTTATTGTCGTGGGGCCCCCTCACTTTCATTACATCAATGTGGATTACCTCGAGAA
ATAGCAATAGAGCTTTTCCAGACATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAGACAACATGCGGCTTCCAACATAGGGATTGCTAAAAGTAAATTT
CGAGAAAAAGAACTGATTGTATGGGAAATACTTCAAGAAGTTATGCAAGGGCCATCCTGTATTACTGAATAGAGCACCACCCCTGCATAGA
TTAGGAATACAAGCATTTCAACCTATTTTAGTAGAGGGACGCGCTATTTGTTTACACCCATTAGTTTGTAAAGGGCTTAAATGCAGACTTT
GATGGGGATCAAATGGGTGTTTCATGTACCTTTATCCTTGGGAAGCTCAAGCCGAGGCTCGTTTACTTATGTTCTCTCATATGAATCTCCTG
TCTCCAGCTATTGGGGACCCCATTTCTATACCAACTCAAGAATGGCTTAAATGGTGGGGG

ภาพผนวกที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoC1* ของหอยทากทะเล *Halophila_minor* (SG06)

```
>Haludule_pinifolia
GCCTAAGGTAACAATGTAGGACGGTCATAATAAAGTTTATAAGTCCTTTTCCAATGTAATTGAGGGCAAAGAGGGAAGATTCCGCGAGAC
TCTGCTTGGTAAACGAGTCGATTATTCGGGACGTTCCGTTATTGTCGTGGGCCCCCTCACTTTCATTACATCAATGTGGATTACCTCGAGA
AATAGCAATAGAGCTTTTCCAGACATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAGACAACATGCGGCTTCCAACATAGGGATTGCTAAAAGTAAAAT
TCGAGAAAAAGAACTGATTGTATGGGAAATACTTCAAGAAGTTATGCAGGGCCATCCTGTATTACTGAATAGAGCACCCACCCTGCATAG
ATTAGGAATACAAGCATTTCAACCTATTTTAGTAGAGGGACGCGCTATTTGTTTACACCCATTAGTTTGTAAAGGGCTTTAATGCAGACTT
TGATGGGGATCAATGGCTGTTTCATGTACCTTTATCCTTGGAAGCTCAAGCCGAGGCTCGTTTACTTATGTTCTCTCATATGAATCTCCT
GTCTCCAGCTATTGGGGACCCCATTTCTATACCAACTCAAGAATGGCCTTAATGGAA
```

ภาพผนวกที่ 28 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ *rpoC1* ของเห็ดราทะเล *Haludule_pinifolia* (SG07)

ภาคผนวกที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้นต้นเอ็นเอจากที่ได้จากความแตกต่างหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ หญาทะเลเพื่อใหพัฒนา SCAR marker และสร้าง Genetic Barcode

>SG01-18

GAGTTCGTCATAATCATTGCACATCTCATATGTGGATGGAGCCACCATCCTGTTGAGGTCCATCACTAGGGTATGTCGTAGCGTCCATCG
ACTACAACCCACGTATGATCTCCCTGGGACTCAAGGTGTTCCCATCTCAGCTAATAGCAATGGTGTAATCTCAATGCAAAATCATCGAT
GGTAGATCTAATAGTCGGGCATTAGACCCCTTCGTGCCATCAGGCGTGGCTGCAACCAAAGGGCAACACCGTCCATGCTGAAAGCTTTCTA
TGCGGACAATTTGAGGGAGTCTTGCATTCTTGGTTACCAATGACGAGGAGGTGACGATTGGGATCTTTAGAGTTCTCAATGAACATATAA
ACAGCTTCAAATCTTCATTTTCGAGAGGGGATAATCAATTCTGCAAATTCGATTGAACTTGAATCCATGTAAAGTATGCAATTTGACA
AAGCACAAATAAAGATAGATAGTTCAATCTTTTGATGTATTCTTGTGTTTCAATCTTTTGATTTTCTGTATCCATATCTTAGGCAAG
TCTCCCATTCATCTTGGTATATATATTTGTTACCCATAAATATGGGGGACTTTTATATAAATGCCAATAAAAACCTTCAAATAACTTTA
ATTTAGTAAGAAAATTCATACTACGTAAATGCCACCAAAAAGTTAACTCTATTTATATAGACGTGACTTCCATGTCAAATTCGTACGCAG
TCATTGAA

>SG01-32

GATGAAGATGTCTCTTCTTTATGCCACACAAGCAACAAGTAGTATCCAGATCTTCTACCCACCTTCGCCTTCGCTTCTTAGTAACCG
GCCACGCCTCTTTAGCAGCAAAGGAAGATCTTAACGTTAAAGGGGACCTTTAAACACCATAGAAAGACGACAATCCTCTTCCACATTAGA
CGCAGGGGAAGTCATTCCTCTCAATATTTTGTATGCCTTGGTTATGGTAAATCGTCCCTCAATCCCGATGAGGTGGTCCACCATCGAAGA
GTTTCATATGAATATCATGAAGATCGAAAGTAGAAGCTGCAAGTCTTGCACCCGAGCATCAGATAGAGCTACACCCGACATGATTGACAA
CGACCTAGACTCTTCATTCCTCCCAATGTCTTCCACCTTGCAAGTTTTATTATCCACAAGTGCAAAAAATCTTGGAAACCAAAGCATCGAAGCA
GCTTGCCTTCATTGAGTCATCCGACCAGAACTTGGAGACTCTTCCATTTCCACCTTAGGGTGGAAGAAAGGTGCCACCCCTTTGCATTAT
TAGGACCAAAAGCCCTTCAGAAAGCAAATGCACCACGGGGAATTACCATCTCTCCATCATAGATAGCACGTCACCATAATCATCTATGTA
GAGATGGCGCCACATATTGTCTTCTCCCCAACCTAGTTTCACCACCAATCTCNTAACCGACACGTCATTCGTAACGCAGTCA

>SG02-16

ATCTAGCTTCTCTTTCTGCATATCCTGCTTCCACTTCGGTTGCGTGTAGAATTTATCCTTCGGAATTCCAAACACGGACAGGAACCTCAGCA
TCGGACAAGTACGCCTGCACGCTCGTGTGCATTTTGAAGCATGTAACAATCCCGGTACAAGATGAATTATAAGAAGATGAATGTCTAGAT
GATACCTCTCGTCTTTTGTATCATCAATCTCTTGGACTGGATTGGAGGAACCTGGCTTCAAACGCTCGTAACCAAATGTGCACGCACCTTCTTT
TATCATCCGTCTCCACCTCTTCGGGTTTAGCAAATTCGTACGCAGTCAAA

>SG02-26

NNNNNNNNNANCTTTCTTAANGANTTTTAAACGAAGGGCCAATATAAAATAAATAAAAGGTCAAAACATGAAATGGATATCTCCGTATA
TTTCTGACTCATATTTATAAGATGATAAAATATGGCAAAACCTATACCAAAAATTTGGTTACGTAGGAATGGACGTATCGGTTACGTAA
AAATGGACCGTAGAATACCAAAAAGGAGTTATTCATGTTCAAGCGAGTTTCAACAATACCATTGTAACTGTTACAGATGTACAAGGTCAGGT
GGTTTCTTGGTCTCCGCGGGTACTTCCGGATTCAAAGGCACAAGAAGAGGGACACCTTTTGCCGCCCAAGCAGCCGCACCTAAATGCAAT
TCGTACGCAGTCAAA

>SG02-33

CAATAGGCCCAATCAGCAATTCAGAAAAACAGGTGCGCCCTGGCATCAACATACGGGTCGACGAGAACGAGGTGCGCGTGAAACTGAAGA
GTCTTGGCGAGAGTGGCGCGCGGCGACGCCCTCCTCCAACGACCACGACGGTGCTCTTCTTACATCCTCCATGCTCCGCGACTGCGACGAA
GAACGAATGAAGAGCCAAACGCGAGGCGAAGGTCGATAGATCGGAGTGGTGGAGAGGGCAGGGCTGGTCTCTCCCTCTATACATGAACGC
CTGAGGACCCGTGGCTTCGCGGCAGCGTCATAGTGACATGACTACGCAATTCGTATATCTTCTTCTCTGTAAAGAAAGTATTATTAGA
TGTTTGAATAATTAATCTTCTTGTACCAATTCGTACGCAGTCACG

>SG03-09

CTTGAGCTGNAGTAAGGACAGTCAGGANAAAGAAAGTGCTCTCAGGTAAATACAAAGTACAACGAGCACCGGAAAGAGTTTTTTTTATTT
TTCTTGTGGATGCAACTTTCAGGAGAAGAAGAAGATGAAGTGCCTAACAAAAATGGATTGCAAAACCTCGTGGGGATCCCGTAGGAACGT
GCAGCTCCGTGAGGAGAAGACCCCGCTGGCGTCTCTCCGGAGGGGTCTCCGACGTATACGCCAACGTGCGTAACGTATCTACCGGCGTTC
CCATGGAATCCCGTGCTCTTCGCTCCCTCGCCGTAACCAAAACGCGGGTTCGCGGAGTGCCCGTACCTCGTCGGATTGCTGTACAGCGT
ACGCCACTGTATTATAGGCTTCTCCGCTATTGCCATAATGCCCGTCCATCCCCACGAGGTACTCGTGTGGGATTAATAATCCAATTTA
ATCTGACAGAGATAAGAGGAAGGAGCGCACGTGAACCAAGGAATCAAACCTTGACAGGAACTCAGCGAGTGCAATCTGTAAACGCAGTCA
CAAA

>SG04-07

CTCGTGGGTCAGTCAAATTACAAACAGGCCTCCGTGTGCGGAGACCGTAAACTTGTGCCCTAAGAAAGAACGGATGTCCCGGACCGAGC
AGGGAATTTGGTAGTTTAGAAATTATATTATCTTTCTCGGTCCACTTGGATACCTCTTTTACAGAGACGAGGTGTCCAAGGACGATGCCTT
CTGGTACCATAAAGTGGCTCTTCTCCCAAGAAAGAACAGGTTTACATTAATGCATCGCTTAAAGTCTTGGTCAAATTCGTACGCAGTC
AAG

>SG05-12

GNNCNGTTTNGGCGCTGCCTTTCAGGCTTCACCTCGTGTTAGTCCATTTGAAAGCAGTCAAAACACATTCTACGCTACGTTTTGGATACCC
CAGATCTAGGTCTCTTTTACCCTAGCTCTGAGCGTTTGGATCTGTTTGCTTATAGTGACGCGGATTATGCAGGACGCGCACTGATCGCA
AGAGCACTAGTGGGACATGCCAGTCTTGGGTGCTTCCTAGTCTCTTGGAGTTCAAAGAAGCAGACCAAGTGTGTCTCTCTACTACAG
AATTCGTACGCAGTCA

>SG05-35

AGGGCGGTTGTTTTGTTACTGCTTATGGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGATGAAACCAAGTGGAGGTC
CGAACCGACTGATGTTGAAAAATCAGCGGATGAGTTGTGGTTAGGGGTGAAATGCCACTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAA
TGCGTCGAGGCGCAGCAGTTGACTGTACATCTAGGGGTAAAGCAACTGTTTCGGTGCGGGCTGCAATAGCGGTACCAATTCGTACGCAGT
CAAA

>SG06-20

AATATCCACTGACCACCTAANCCAACCATCCTCTTGTTTTGCACATACCATAAGCTTATAATGCAGGCTTTCAAAAAGTCAGCTCACTCG
TCAAATCTGAGTAAAACATGATGTTGATCCAATTCCACTAAGTAGAAGCACCCCTTGCCACTGACCTTGAGAATTTAGGACAACCTTGATG
CACTGCAATGGTGATCTCCCCACATGAAATTTTCTACCAAAGTATATTAGAATGTCTCAACCATCTTGAAGACCTCTTTCTCCATGAAA
CAAACCATAAGATTCCCATTGATAATTTTAGGAGGACGAATGTCAACACCACTAAACCTTGGAGACCGACAAAACCTTTTATTGTTTTTG
GCAAAGGATTGGTAAGCATTAGGTCTCATCGCTGATTAAAATTCCTGAAAGAAATTTGATGATTGAAAGGGTCCATTGAATCTTTCAAC
ATTTCTACATATGTTCTTAATGCCACAATCTTCATCCCCATCCATGAGAGATAGCCTTTTAAGACCTACCTTAGGTGAAACCAATCAT
CAGGATTTACCCATCACCAACACAGAAACACTTCAGTACGATACAAGG

ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ นางสาวปัทมา ศรีน้ำเงิน

ชื่อ Miss Pattama Srinamngoen

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3620100927245

3. ตำแหน่งปัจจุบันอาจารย์

เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมง: สัปดาห์) 15 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขต

จันทบุรี โทรศัพท์ 039-310000 ต่อ 2039 , 094-691-4535 โทรสาร 039-310128

E-mail pattama@buu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

2541 วท.บ (เกษตรศาสตร์)

เทคโนโลยีการผลิตพืช

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า

เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2546 วท.ม (เกษตรศาสตร์)

สาขาพืชไร่

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2557 พร.ด (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

เทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องหมายโมเลกุล และความหลากหลายทางพันธุกรรม

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัยชุด การพัฒนาตัวติดตามทางชีวภาพเพื่อใช้ประเมินการสะสมของโลหะหนักบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทยสำหรับการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2562

7.งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

1. Pattama Srinamngoen* . Sontichai Chanprame . Nongluk Teinseree . Ismail Dweikat.

(2019). Colinearity of putative flowering gene in both sugarcane and sorghum.

Euphytica, 215(614), 215:62.

2. วราลี รื่นรมย์ Titnarong Heng และ ปัทมา ศรีน้ำเงิน*. (2561). Callus Induction in *Sacha inchi* (*Plukenetia Volubilis* L.) In The 5th King Mongkut's Agricultural Conference (pp.27-31)

3. ปัทมา ศรีน้ำเงิน* และ พัทนิตา เคลิ้มกระโทก. (2560). ผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุ่นต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มอคคาร่า ในการประชุมการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 9 (pp.124-128)
4. พันทิพา ลิ่มสงวน สนธิชัย จันทรเปรม อธิฤทธิ์ อังวิเชียร ปัทมา ศรีน้ำเงิน และ เสริมศิริ จันทรเปรม. (2560). การปรับปรุงพันธุ์โดยชักนำการกลายพันธุ์ในเบญจมาศโดยใช้รังสีแกมมาและการตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยวิธีเอเอฟแอลพี. ว. วิทย์. กษ. 48, 334-345.
5. ปัทมา ศรีน้ำเงิน*, เพชรดา ปินใจ, สุมิตร คุณเจตน์และ สนธิชัย จันทรเปรม. 2559. การสะสมคาร์บอนของหญ้าทะเลบริเวณพื้นที่ศึกษาเขตศูนย์การศึกษาพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี. ว. พิษ ศาสตร์สงขลานครินทร์ 3 (พิเศษ) (II):29-35.
6. ปัทมา ศรีน้ำเงิน*. 2558.การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าทะเลในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย AFLP. ว. วิทย์. กษ. 46(3) (พิเศษ): 217-220.
7. ปัทมา ศรีน้ำเงิน* และ กนกอร ดวงปากดี. 2558. การศึกษาการเกิด DNA methylation ของหญ้าทะเลชนิด *Halodule pinifolia* โดยใช้เทคนิค MSAP. ว. วิทย์. กษ. 46(3) (พิเศษ): 221-224.
8. ปัทมา ศรีน้ำเงิน* และ Titnarong Heng. 2558. การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแอปเปิ้ลด้วยเทคนิค SRAP. ว.เกษตรพระจอมเกล้า 33(1) (พิเศษ): 18-23.
9. Titnarong Hengและ ปัทมา ศรีน้ำเงิน*. 2558. การคัดเลือกแคลลัสแอปเปิ้ลทนแล้งในหลอดทดลองและการทดสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมาย Sequence-related amplified polymorphism (SRAP). ว.เกษตรพระจอมเกล้า 33(1) (พิเศษ): 79-87.
10. Srinamngoen P*. and K. Duangpakdee. 2015. Genetic diversity of seagrass across the eastcoast of Thailand based on Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) technique. In Proceeding of 2nd International Symposium on Agricultural Technology. A-One the Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. July 1-3, 2015. pp 329-332.
11. ปัทมา ศรีน้ำเงิน และ สนธิชัย จันทรเปรม*. 2557. การศึกษาการเกิด DNA methylation ของอ้อยปลูก อ้อยป่า และลูกผสมอ้อยข้ามชนิดชั่วที่ 1. ว.วิทย์.กษ.45(3): 259-268.
12. ปัทมา ศรีน้ำเงิน,นงลักษณ์ เทียนเสรี และ สนธิชัย จันทรเปรม*. 2557. การโคลนบางส่วนของยีน *APETALA1 (AP1)* ในอ้อยและการทำนายเชิงหน้าที่ของยีน โดยวิธี *in silico*. ว.วิทย์.กษ. 45(3): 249-257.
13. Srinamngoen, P., N. Tiensaree, S. Chanprame and I. Dweikat*. Colinearity of Putative Flowering Genes in Sweet Sorghum and Sugarcane. Oral presentation at The

International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences (ISSAAS). Acacia Hotel Manila, Philippines. November 11-15, 2013.

14. Srinamngoen, P., N. Tiansaree and S. Chanprame*. Genome remodeling of DNA methylation in F₁ sugarcane interspecific cross. Poster presentation at The 2013 Cold Spring harbor Asia Conference: Plant cell & Developmental Biology. Suzhou Industrial Park Conference Center, Jiangsu Province, China. June 17-21, 2013.

8.งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. QTL mapping of novel agronomic traits in a RILs population of Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] by Srinamngoen, P., J. Rajewski, N. La Borde, S. Chanprameand I. Dweikat*
2. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าทะเลในเขตภาคตะวันออกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล
3. .การสะสมคาร์บอนของหญ้าทะเลที่มีผลต่อการลดผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในพื้นที่ศึกษาเขตศูนย์การศึกษาพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่อง มาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี
4. การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและค้นหายีนที่ตอบสนองต่อการเจริญเติบโตในสภาพน้ำกร่อยของต้นกกจันทบุรี (*Cyperus corymbosus* Rottb) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล เพื่อใช้ประกอบการขอรับรองสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ในอนาคต

9.งานวิจัยที่กำลังทำ

ชื่อโครงการวิจัย	แหล่งทุน
1.การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (<i>Paphiopedilum</i> spp.) ในประเทศไทย	คณะกรรมการดำเนินงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

·หัวหน้าโครงการ สัดส่วนลู่ = 90%	สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรม ราชกุมารีปีงบประมาณ 2559
2.การศึกษาบทบาทของคาร์บอนสีน้ำเงินในหญ้าทะเลบริเวณ ชายฝั่งตะวันออกของประเทศไทย ·หัวหน้าโครงการ สัดส่วนลู่ = 90%	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2560-61 *โครงการต่อเนื่อง 2 ปี
3.การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายโมเลกุล SCAR ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของหญ้าทะเล ·หัวหน้าโครงการ สัดส่วนลู่ = 70%	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2560
4. การศึกษาวิวัฒนาการ การแพร่กระจาย และความ แปรปรวนทางพันธุกรรมของหญ้าทะเลชนิด <i>Enhalus acoroides</i> ในเขตแนวทะเลฝั่งอ่าวไทย ตะวันออกของ ประเทศไทย หัวหน้าโครงการสัดส่วนลู่ = 40%	สวทช. ปีงบประมาณ 2561
5. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสม โลหะหนักในหญ้าทะเลด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing -หัวหน้าโครงการ สัดส่วนลู่ = 50%	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2562