การระบุชนิดสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย

IDENTIFICATION OF GREEN ALGAE ISOLATED FROM NATURAL WATER SOURCES IN THAILAND

กชพร เสรีตระกูล
พิชามญชุ์ ชุ่มสุคันธ์
พิมพ์ลดา ทศรักษา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การระบุชนิดสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย

IDENTIFICATION OF GREEN ALGAE ISOLATED FROM NATURAL WATER SOURCES IN THAILAND

T149437

กชพร เสรีตระกูล
พิชามญชุ์ ชุ่มสุคันธ์
พิมพ์ลดา ทศรักษา

ฉบ.12885411
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 149437
วัน เดือน ปี 8 มี.ค. 2561

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IDENTIFICATION OF GREEN ALGAE ISOLATED FROM NATURAL WATER SOURCES IN THAILAND

KODCHAPORN SEREETRAKUL
PICHAMON CHUMSUKARN
PIMLADA TOSSARAKSA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การระบุชนิดสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย Identification of Green Algae Isolated from Natural Water Sources in Thailand
ชื่อนักศึกษา	นางสาว กชพร เสรีตระกูล รหัสนักศึกษา 55051052 นางสาว พิชามญชุ์ ชุ่มสุคันธ์ รหัสนักศึกษา 55051139 นางสาว พิมพ์ลดา ทศรักษา รหัสนักศึกษา 55051140
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ คณะกรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ คณะกรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การระบุชนิดสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชพร เสรีตระกูล รหัสนักศึกษา 55051052
	นางสาวพิชามญชุ์ ชุ่มสุคันธ์ รหัสนักศึกษา 55051139
	นางสาวพิมพ์ลดา ทศรักษา รหัสนักศึกษา 55051140
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ทำการระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย โดยวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลักษณะทางอณูชีววิทยา จากการศึกษาขนาดและรูปร่างของสาหร่ายสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถจัดแบ่งกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวได้เป็น 3 กลุ่มตามรูปร่างของเซลล์ (สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะกลม สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะทรงกระบอก และสาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะวงรี) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S rDNA ทั้งหมด 15 ไอโซเลท สามารถแบ่งสาหร่ายสีเขียวได้เป็น 6 จีนัส ประกอบ ด้วยสาหร่าย *Chlorella* sp. 9 ไอโซเลท, สาหร่าย *Scenedesmus* sp. 2 ไอโซเลท, สาหร่าย*Coelastella* sp. 1 ไอโซเลท, สาหร่าย *Coelastrum* sp. 1 ไอโซเลท, สาหร่าย *Micractinium* sp. 1 ไอโซเลท และสาหร่าย *Neochloris* sp. 1 ไอโซเลท ในการระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวในระดับจีนัสต้องทำการศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลักษณะทางอณูชีววิทยา

คำสำคัญ : 18S rDNA สาหร่ายสีเขียว สัณฐานวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Identification of Green Algae Isolated from Natural Water Sources in Thailand	
Student	Miss Kodchaporn Sereetrakul	student ID 55051052
	Miss Pichamon Chumsukarn	student ID 55051139
	Miss Pimlada Tossaraksa	student ID 55051140
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic year	2015	
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch	

Abstract

In this study, a total of 15 green algae isolated from natural water sources in Thailand were identified by morphological and molecular characteristics. Their cell size and shape was determined under microscope. It was found that three colony shapes of morphology characters (round, cylinder and oval colonies) were shown in the green algal isolates. By 18S rDNA sequencing analysis, 15 green algal isolates were classified into 6 genus, 9 isolotes as *Chorella* sp., 2 isolates as *Scenedesmus* sp., 1 isolate as *Coelastrum* sp., 1 isolate as *Micractinum* sp. and 1 isolate as *Neochloris* sp. Not only morphology characters but also molecular characters were used for identification at a genus-level in green algae.

Keywords : 18S rDNA, green algae, morphology

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะวิทยาศาสตร์ ซึ่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากหลายบุคคล

ขอขอบพระคุณอย่างสูงสุดแก่ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และแนวทางที่เป็นประโยชน์อย่างใกล้ชิด ตลอดทั้งให้คำปรึกษาเพื่อแก้ไขปัญหา ข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้น และให้กำลังใจตลอดการดำเนินโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน แห่งคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ทุ่มเทแรงกาย แรงใจ มอบความรู้ตลอดเวลาสี่ปีที่ผ่านมา ทำให้สามารถนำความรู้มาแก้ไขปรับปรุงโครงงานพิเศษ และการได้รับการอบรมจริยธรรมทำให้เกิดความรับผิดชอบ

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโท-เอก ณ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล 407 ตึกจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวก จัดเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ สารเคมี ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้เรียบร้อยสมบูรณ์ รวมถึงบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมา ผู้จัดทำโครงงานขอขอบคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้

กชพร เสรีตระกูล
พิชามญชุ์ ชุ่มสุคันธ์
พิมพ์ลดา ทศรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 สาหร่าย 3
2.1.1 หลักเกณฑ์การจัดจำแนกสาหร่าย 3
2.1.2 การแบ่งกลุ่มสาหร่ายตามหลักการของ Bold และ Wynne (1978) 4
2.2 สาหร่ายสีเขียว 5
2.2.1 วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียว 5
2.2.2 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว 6
2.2.3 รูปร่างของสาหร่ายสีเขียว 6
2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 9
2.3.1 ชนิดของนิวคลีโอไทด์ 9
2.3.2 ความสำคัญทางชีวภาพของนิวคลีโอไทด์ 9
2.3.3 พอลินิวคลีโอไทด์ 10
2.3.4 โครงสร้างของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 10
2.3.5 ยีน 18S rRNA 11
2.4 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 12
2.4.1 การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน 12
2.4.2 การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ 12
2.4.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ 12
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 15
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง 15
3.2 อุปกรณ์ 16
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสีเขียว 16
3.4 สารเคมี 16
3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ 16
3.4.2 สารเคมีสำหรับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 17
3.4.3 สารเคมีสำหรับเทคนิคเจลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 17
3.4.4 ชุดทดสอบ (Kit) 18
3.5 วิธีการทดลอง 18
3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว 18
3.5.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว 18
3.5.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA 18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล 22
4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว 22
4.1.1 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะกลม 23
4.1.2 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะทรงกระบอกและมีแฟลกเจลลา 23
4.1.3 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะวงรี 23
4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA 26
4.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ 26
4.2.2 การเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 26
4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA 28
4.2.4 การเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียว ทั้งหมด 15 ไอโซเลทกับสาหร่ายสีเขียวในฐานข้อมูลธนาคารยีน 29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 44
5.1 สรุปผลการวิจัย 44
5.2 ข้อเสนอแนะ 44
เอกสารอ้างอิง 45
ภาคผนวก 47
ภาคผนวก ก 48
ภาคผนวก ข 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ค 50
ภาคผนวก ง 51
ภาคผนวก จ 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในงานวิจัยมีจำนวน 15 ไอโซเลท 15
3.2 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 20
3.3 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 20
4.1 ลักษณะรูปร่างและขนาดของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลท 22
4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลท 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	วัฏจักรชีวิตของ *Chlamydomonas* sp.	5
2.2	*Ulothrix* sp.	6
2.3	*Chlamydomonas reinhardtii*	6
2.4	*Chlorella* sp.	7
2.5	*Spirogyra* sp.	7
2.6	*Micrasterias* sp.	8
2.7	*Caulerpa racemosa*	8
2.8	โครงสร้างของมอนอนิวคลีโอไทด์	9
2.9	rRNA ภายใน ribosomal subunit ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอต	11
2.10	แผนภาพแสดงขั้นตอนของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	13
4.1	ลักษณะโคโลนีกลมของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 1SinS1.1 (A), 2TKS2.2 (B), A25.1 (C), 8260 (D), 8412 (E), 2SinS4 (F), CH (G), ChiS4 (H), ChiW1 (I), LSD-W2 (J), NakS4 (K) และ OvalG (L)	23
4.2	ลักษณะโคโลนีทรงกระบอกของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8641 (A) และ L (B)	25
4.3	ลักษณะโคโลนีวงรีของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท SD	25
4.4	จีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวแยกได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	27
4.5	ผลิตภัณฑ์เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 18S rDNA วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	28
4.6	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Chlorella* sp.	30
4.7	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Coelastella* sp.	35
4.8	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Coelastrum* sp.	36
4.9	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Micractinium* sp.	38
4.10	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Neochloris* sp.	40
4.11	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Scenedesmus* sp.	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (Eukaryote) ที่สามารถสร้างอาหารได้จากกระบวนการการสังเคราะห์ด้วยแสง สาหร่ายสีเขียวเป็นสาหร่ายที่จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) ซึ่งเป็นกลุ่มสาหร่ายที่พบมากที่สุดคือ มีประมาณ 8,000 สปีชีส์ พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งเป็นเซลล์เดี่ยวและเป็นกลุ่มเซลล์ รงควัตถุของสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แคโรทีนอยด์ และแซนโทฟิลล์ สาหร่ายสีเขียวถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์ ใช้เป็นอาหารเสริม ใช้ผลิตไบโอดีเซล และใช้ผลิตไฮโดรเจน เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยมีลักษณะทางภูมิศาสตร์เป็นพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง และมีที่ราบสูง รวมทั้งภูเขาในภาคอื่น จึงก่อให้เกิดแหล่งน้ำธรรมชาติหลากหลาย อาทิ แหล่งน้ำจืด แหล่งน้ำเค็ม อ่าว ทะเล เป็นต้น ซึ่งแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งหมดเหล่านี้จัดเป็นแหล่งที่อยู่สำคัญของสาหร่ายสีเขียว และมีผลทำให้เกิดความหลากหลายของสาหร่ายสีเขียวตามแหล่งน้ำเหล่านั้น

ในปัจจุบัน การระบุชนิดสาหร่ายสีเขียวจะใช้ข้อมูลพื้นฐานที่ได้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) โดยพิจารณาจากลักษณะ รูปร่าง ขนาด รงควัตถุ และโครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว ซึ่งการพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวนั้น ไม่สามารถระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวได้อย่างแน่ชัด เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะ รูปร่าง และขนาดที่คล้ายคลึงกันมาก จึงมีการใช้วิธีการวิเคราะห์ระดับอณูชีววิทยาเข้ามาร่วมในการระบุชนิดสาหร่ายสีเขียวด้วย

โครงงานพิเศษนี้ ใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA เนื่องจากยีน 18S rDNA มีคุณสมบัติเป็นบริเวณอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หากเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน บริเวณยีน 18S rDNA ก็จะต่างกันด้วย ทำให้สามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อระบุชนิดสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำในประเทศไทยโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาลักษณะของสาหร่ายสีเขียว โดยวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะรูปร่าง และขนาด

2. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA โดยทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และการทำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ พร้อมทั้งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งสามารถบอกความหลากหลายของสาหร่ายสีเขียวในประเทศไทยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย

สาหร่าย (Algae พหูพจน์ และ Alga เอกพจน์) เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารได้เองจากกระบวนการการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยอาศัยรงควัตถุที่เรียกว่าคลอโรฟิลล์ สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางธรรมชาติโดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ตั้งแต่สาหร่ายขนาดเล็กที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าที่เรียกว่าจุลสาหร่าย (Microalgae) หรือขนาดใหญ่ที่เรียกว่ามหสาหร่าย (Macroalgae) สาหร่ายมีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ เซลล์เดี่ยว รวมกันเป็นกลุ่มหรือโคโลนี เป็นเส้นสายแตกแขนงและไม่แตกแขนง ในธรรมชาติสามารถพบสาหร่ายได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป ในดิน หน้าดิน หิมะหรือในแหล่งที่ร้อนอย่างน้ำพุร้อน ฯลฯ (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2556)

2.1.1 หลักเกณฑ์การจัดจำแนกสาหร่าย

สาหร่ายสามารถจัดจำแนกได้เป็นหลายชนิด โดยมีหลักเกณฑ์ที่พิจารณา ดังนี้

2.1.1.1 ชนิดของรงควัตถุ

สาหร่ายทุกชนิดมีรงควัตถุหลักคือคลอโรฟิลล์ เอ และมีรงควัตถุอื่นซึ่งแตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีแดงมีรงควัตถุคือ ไฟโคไซยานินและไฟโคเออริธริน

2.1.1.2 องค์ประกอบของผนังเซลล์

สาหร่ายแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน องค์ประกอบผนังเซลล์ของสาหร่ายบางชนิดเป็นเซลลูโลส บางชนิดผนังเซลล์เป็นสารสะสมบางอย่าง เช่น สาหร่ายแดงมีองค์ประกอบผนังเซลล์เป็นอัลจิเนต เป็นต้น

2.1.1.3 อาหารที่สะสมอยู่ในเซลล์

อาหารที่สะสมภายในเซลล์ของสาหร่ายส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากคาร์โบไฮเดรตแล้ว สาหร่ายยังมีอาหารชนิดอื่นที่สะสมอยู่ในเซลล์แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีเขียวจะพบอะไมโลสและอะไมโลเพคติน สาหร่ายสีน้ำตาลพบลามินาริน เป็นต้น

2.1.1.4 จำนวนและตำแหน่งของแฟลกเจลลัม

สาหร่ายที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะพบแฟลกเจลลัมหรือที่เรียกว่าหนวดหรือแส้ ส่วนสาหร่ายที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จะไม่พบแฟลกเจลลัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การแบ่งกลุ่มสาหร่ายตามหลักการแบ่งของ Bold และ Wynne (1978)

2.1.2.1 ดิวิชันไซยาโนไฟตา (Division Cyanophyta) สาหร่ายกลุ่มนี้จัดเป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอต ได้แก่ พวกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) พบในที่ชื้นและแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป มีการดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วในที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหาร

2.1.2.2 ดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว (Green algae) ซึ่งเป็นกลุ่มสาหร่ายที่พบมากที่สุด มีรูปร่างหลากหลาย พบได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช บางชนิดมีขนาดใหญ่ยึดเกาะกับดินหรือหินใต้น้ำ

2.1.2.3 ดิวิชันแคโรไฟตา (Division Charophyta) สาหร่ายที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ สาหร่ายไฟ (Stoneworts) มีลักษณะคล้ายสาหร่ายหางกระรอกซึ่งเป็นพืชชั้นสูง ยึดเกาะกับพื้นดินใต้น้ำ ส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายน้ำจืด

2.1.2.4 ดิวิชันยูกลีโนไฟตา (Division Euglenophyta) ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอน ลพืช ได้แก่ Euglenoids เจริญเติบโตได้ในแหล่งน้ำที่คุณภาพไม่ดีจึงสามารถใช้เป็นสิ่งมีชีวิตที่เป็นตัวชี้วัดคุณภาพน้ำได้

2.1.2.5 ดิวิชันฟีโอไฟตา (Division Phaeophyta) ได้แก่ สาหร่ายสีน้ำตาล (Brown algae) พบมากในน้ำเค็ม บางชนิดเจริญคล้ายพืชน้ำ เป็นสาหร่ายที่มีการสะสมของอัลจิเนตจึงมีความสำคัญในอุตสาหกรรม

2.1.2.6 ดิวิชันคริสโซไฟตา (Division Chrysophyta) ได้แก่ สาหร่ายสีน้ำตาลแกมทอง (Golden algae) สาหร่ายสีเขียวแกมเหลือง (Yellow green algae) ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช มีรงควัตถุสีน้ำตาลมากกว่าคลอโรฟิลล์ทำให้มองเห็นเซลล์ชัดเจน

2.1.2.7 ดิวิชันไพโรไฟตา (Division Pyrrhophyta) ได้แก่ Dinoflagellates สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนที่ได้ มีแฟลกเจลลัม 2 เส้น ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช พบได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป

2.1.2.8 ดิวิชันคริปโตไฟตา (Division Cryptophyta) เป็นกลุ่มสาหร่ายที่ได้พบน้อยที่สุด มีแฟลกเจลลัม 2 เส้น สามารถเคลื่อนที่ได้ ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช พบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป ได้แก่ *Cryptomonas*

2.1.2.9 ดิวิชันโรโดไฟตา (Division Rhodophyta) ได้แก่ สาหร่ายสีแดง (Red algae) พบในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป รวมถึงบริเวณผิวดิน หรือหิน มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถนำมาสกัดวุ้นได้

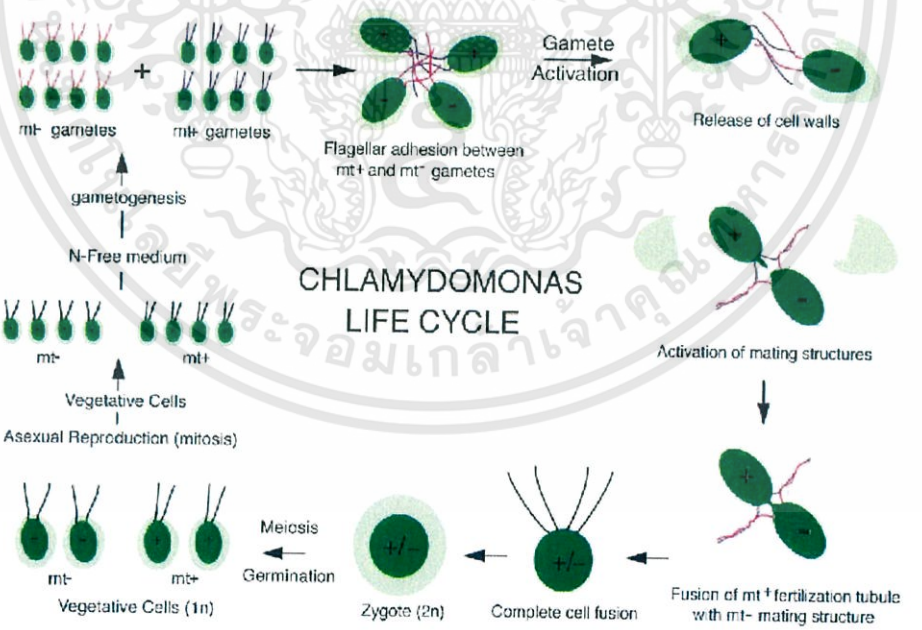
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) เป็นกลุ่มสาหร่ายกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดคือมีประมาณ 8,000 สปีชีส์ สาหร่ายสีเขียวพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืช มีบางชนิดที่ดำรงชีวิตโดยการยึดเกาะกับดิน พืชน้ำ หรือหินใต้น้ำ รงควัตถุที่พบได้ในสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แคโรทีน (Carotene) ได้แก่ แอลฟา-แคโรทีน เบต้า-แคโรทีน และแกมมา-แคโรทีน เป็นต้น และแซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) ได้แก่ ลูทีน (Lutein) ไวโอลาแซนธิน (Violaxanthin) เป็นต้น คลอโรพลาสต์ มีหลายรูปแบบ เช่น รูปถ้วย รูปเกือกม้า ตาข่าย ขดเป็นเกลียว แฉกรูปดาวและเป็นแถบ ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ประกอบไปด้วยเซลลูโลสและเพคติน อาหารที่สะสมในเซลล์ ได้แก่ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน มีการสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมหรือคลอโรพลาสต์ นอกจากนี้ สาหร่ายยังสะสมอาหารในรูปน้ำมันและกลีเซอรอล

2.2.1 วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียว

วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียวมี 2 แบบ คือ แฮปพลอนติก (Haplontic) เป็นวัฏจักรที่เซลล์มีจำนวนโครโมโซม n เกิดขึ้นในระยะไซโกตแบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์ และแบบที่ 2 คือ ดิปพลอนติก (Diplontic) เป็นวัฏจักรที่เซลล์มีจำนวนโครโมโซม 2n เกิดขึ้นในเซลล์ปกติ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 วัฏจักรชีวิตของ *Chlamydomonas* sp.
ที่มา : http://www.chlamycollection.org

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว

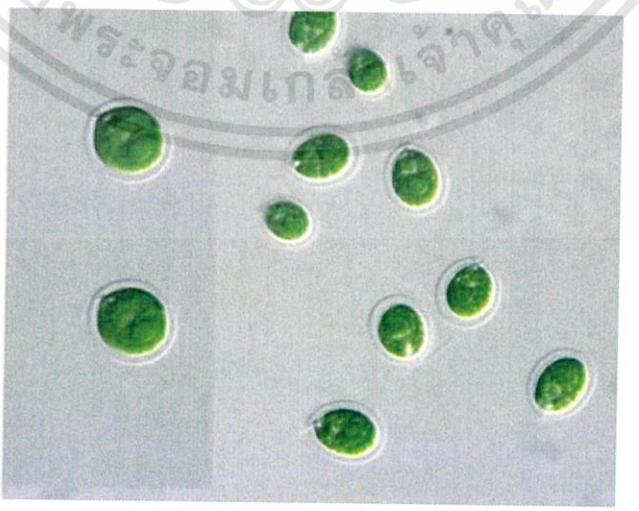
การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งเกิดจากการรวมกันของแกมีต และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น การแบ่งเซลล์และสร้างสปอร์ ฯลฯ

2.2.3 รูปร่างของสาหร่ายสีเขียว

2.2.3.1 เซลล์เรียงตัวเป็นสาย (Filamentous body) เซลล์มีการแบ่งเซลล์ตามขวางในระนาบเดียว เซลล์มีลักษณะเรียงต่อกันเป็นสาย มีทั้งสายที่มีแขนงและสายที่ไม่มีแขนง เช่น *Ulothrix* sp. (รูปที่ 2.2)

รูปที่ 2.2 *Ulothrix* sp.
ที่มา : http://cfb.unh.edu

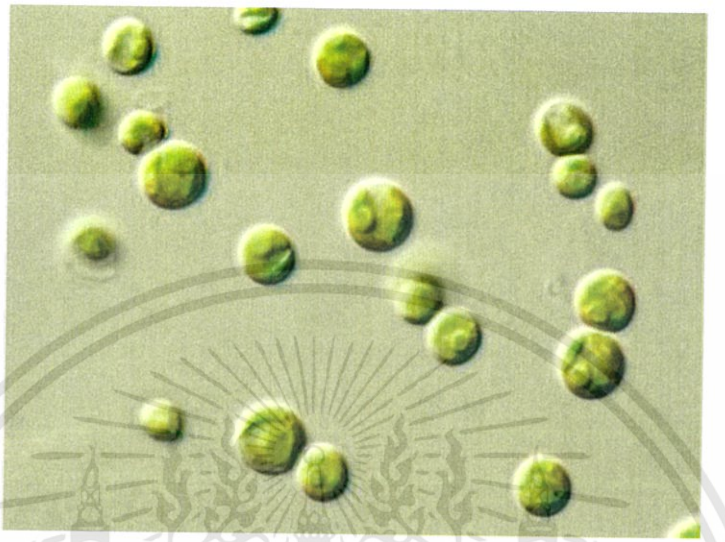
2.2.3.2 เซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ (Motile colony) เป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากมีแฟลกเจลลา เช่น *Chlamydomonas* sp. (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 *Chlamydomonas reinhardtii*
ที่มา : http://protist.i.hosei.ac.jp

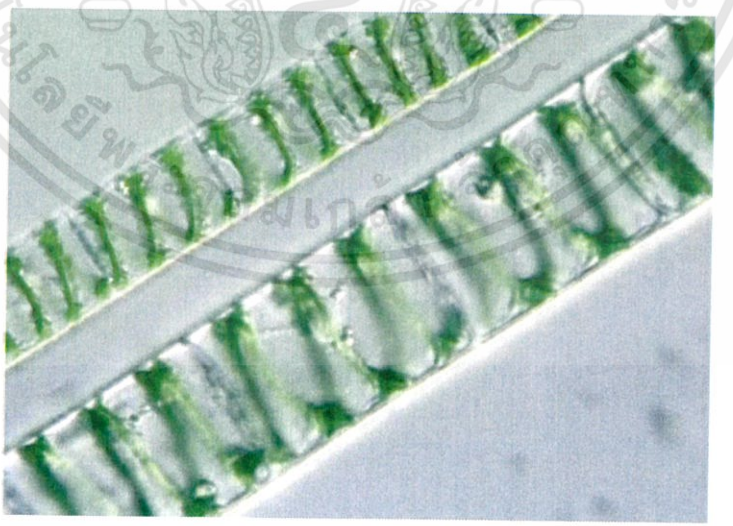
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.3 เซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ (Non-motile colony) มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่พบแฟลกเจลลา เช่น *Coelastrum* sp., *Chlorella* sp. (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 *Chlorella* sp.
ที่มา : http://cfb.unh.edu

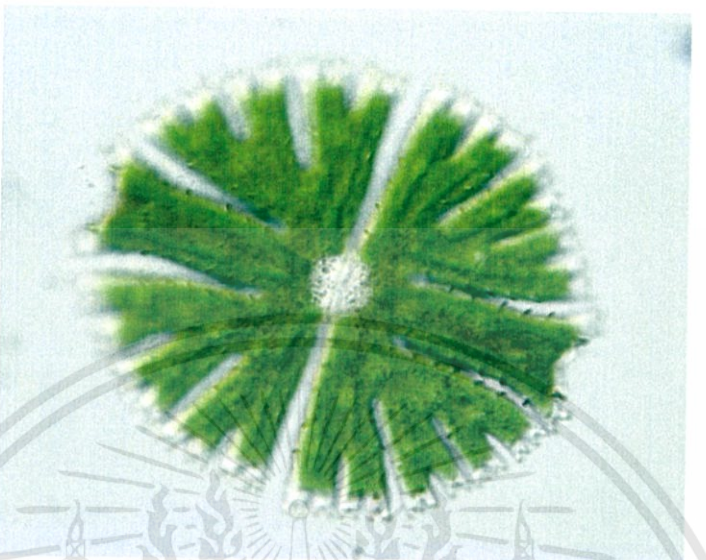
2.2.3.4 เซลล์เรียงตัวเป็นแผ่น (Membranous body) เซลล์มีการแบ่งตัวสองระนาบ เรียงตัวกันเป็นแผ่นบาง มีความทนทานต่อคลื่นและกระแสน้ำได้ดีกว่าพวกที่เป็นสาย (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 *Spirogyra* sp.
ที่มา : http://protist.i.hosei.ac.jp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.5 เซลล์มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อพาเรนไคมา (Parenchymatous body) เซลล์มีการเจริญสามระนาบ รูปร่างของเซลล์เป็นแฉก เช่น *Micrasterias* sp. (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 *Micrasterias* sp.
ที่มา : http://protist.i.hosei.ac.jp

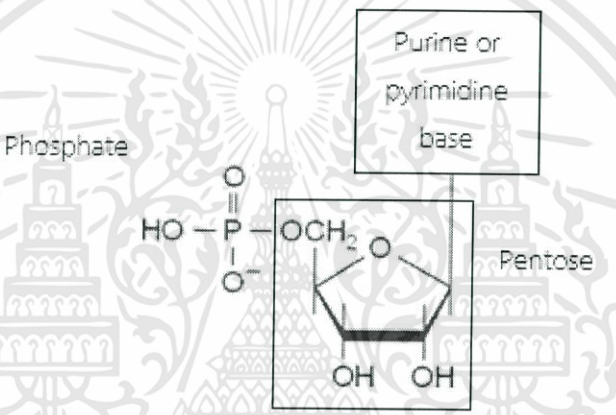
2.2.3.6 เซลล์มีลักษณะเป็นท่อหรือเป็นถุง (Siphonous body) ลักษณะเซลล์เป็นท่อหรือถุง บางชนิดมีรูปร่างคล้ายถ้วย เช่น *Caulerpa racemosa* (รูปที่ 2.7)

รูปที่ 2.7 *Caulerpa racemosa*
ที่มา : http://www.algaebase.org

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552)

นิวคลีโอไทด์เป็นเอสเทอร์ชนิดฟอสเฟต (Phosphate Ester) ของนิวคลีโอไซด์ นิวคลีโอไทด์เป็นสารประกอบที่เกิดจากน้ำตาลจับกับเบสด้วยพันธะไกลโคไซด์ และจับกับหมู่ฟอสเฟตด้วยพันธะเอสเทอร์ ตำแหน่งในโมเลกุลของน้ำตาลที่สามารถเกิดพันธะเอสเทอร์กับกรดฟอสฟอริกแตกต่างกันตามชนิดของน้ำตาล ถ้าเป็นน้ำตาลไรโบสจะเกิดพันธะได้ที่ตำแหน่ง 2', 3' และ 5' ถ้าเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบสจะเกิดพันธะได้เฉพาะที่ตำแหน่ง 3' และ 5' เท่านั้น นิวคลีโอไทด์ที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นชนิดที่มีหมู่ฟอสเฟตจับอยู่ที่ตำแหน่ง 5' นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล เบส และฟอสเฟตอย่างละ 1 โมเลกุลเรียกว่า มอนอนิวคลีโอไทด์ (Mononucleotide) โครงสร้างของมอนอนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของมอนอนิวคลีโอไทด์
ที่มา : พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ, 2555

2.3.1 ชนิดของนิวคลีโอไทด์

นิวคลีโอไทด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ คือ ไรโบนิวคลีโอไทด์ (Ribonucleotide) และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (Deoxyribonucleotide) ซึ่งนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ยังแบ่งย่อยออกไปตามชนิดของเบส คือ พิวรีนไรโบนิวคลีโอไทด์ และพิริมิดีนไรโบนิวคลีโอไทด์

2.3.2 ความสำคัญทางชีวภาพของนิวคลีโอไทด์

หน้าที่และความสำคัญของนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิต มีดังนี้

2.3.2.1 นิวคลีโอไทด์เป็นสารประกอบหน่วยการสร้างของกรดนิวคลีอิก 5' ไรโบนิวคลีโอไทด์เป็นหน่วยการสร้างของอาร์เอ็นเอ ส่วน 5' ดีออกซีไรโบนิวคีโอไทด์เป็นหน่วยการสร้างของดีเอ็นเอ

2.3.2.2 นิวคลีโอไทด์ทำหน้าที่เป็นสารเก็บพลังงานซึ่งได้จากการเผาผลาญอาหาร นิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่นี้เป็นพวกที่มีฟอสเฟตมากกว่า 1 หมู่ ที่มีบทบาทมากที่สุดก็คือ ATP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนชนิดอื่นที่ทำหน้าที่นี้เช่นกันแต่ในระดับที่น้อยกว่ามาก คือ GTP เนื่องจากสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้ ATP ดังนั้น ATP จัดเป็นสารพลังงานสากลในโลกของสิ่งมีชีวิต

2.3.2.3 นิวคลีโอไทด์เป็นตัวกลางในการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน คือ cAMP และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บางชนิดได้

2.3.3 พอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide)

พอลินิวคลีโอไทด์เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ที่เกิดจากนิวคลีโอไทด์ต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ พอลินิวคลีโอไทด์แบ่งเป็น 2 ชนิดตามองค์ประกอบของหน่วยการสร้าง คือ ชนิดที่มีไรโบนิวคลีโอไทด์เป็นหน่วยการสร้าง เรียกว่า **พอลิไรโบนิวคลีโอไทด์** (Polyribonucleotide) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดที่สองมีดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์เป็นหน่วยการสร้าง เรียกว่า พอลิดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (Polydeoxyribonucleotide) หรือดีเอ็นเอ (DNA)

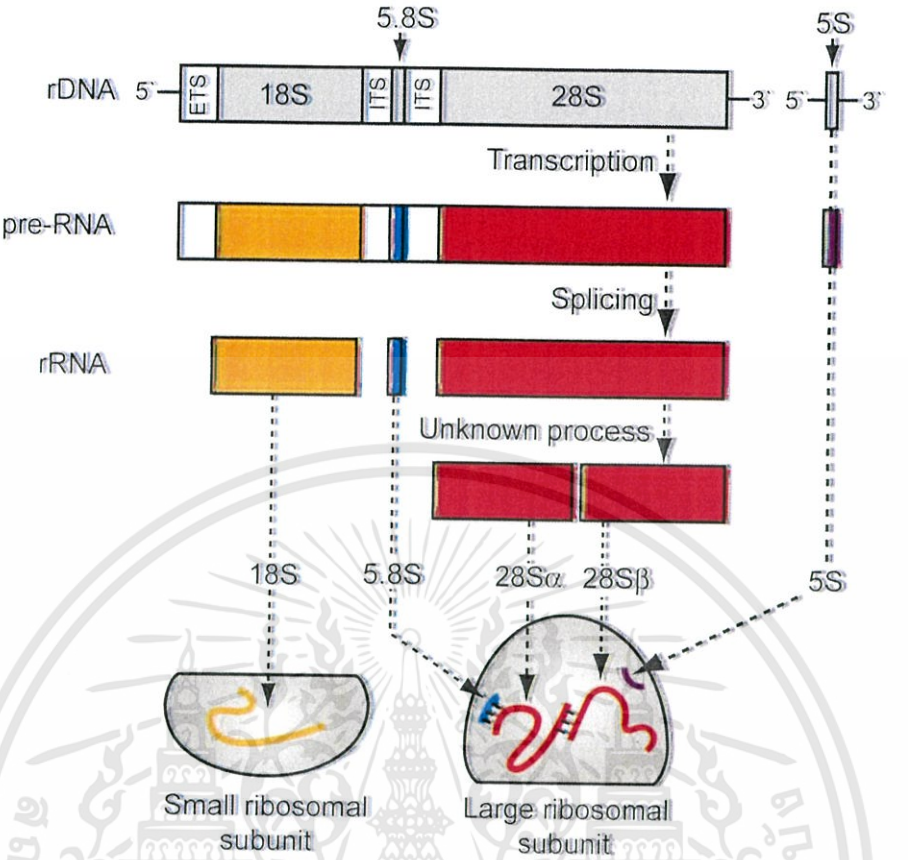
2.3.4 โครงสร้างของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (Ribosomal RNA: rRNA)

โครงสร้างของ rRNA มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับ RNA ชนิดอื่น rRNA จะอยู่รวมกับโปรตีนหลายหน่วยย่อยในรูปของไรโบโซม ซึ่งใช้เป็นแหล่งในการสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมมีองค์ประกอบ 2 หน่วยย่อย คือ หน่วยย่อยเล็กและหน่วยย่อยใหญ่ สิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอตจะมีไรโบโซมขนาด 70S และสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอตจะมีไรโบโซมขนาด 80S (S เป็นคำย่อของ Svedberg Unit หมายถึงอัตราเร็วในการตกตะกอน ขึ้นกับลักษณะรูปร่าง และน้ำหนักมวลสาร มีค่าเท่ากับ 10^{-13} วินาที)

ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอต ไรโบโซมมีขนาด 70S ประกอบด้วยหน่วยย่อยเล็กขนาด 30S และ หน่วยย่อยใหญ่ขนาด 50S โดยภายใน 30S ประกอบด้วย 16S rRNA รวมอยู่กับโปรตีนอีก 21 ชนิด และภายใน 50S ประกอบด้วย rRNA ชนิด 23S และ 5S อยู่รวมกับโปรตีนอีก 34 ชนิด หน่วยย่อยเล็กและหน่วยย่อยใหญ่ของไรโบโซมสามารถอยู่รวมกันหรือแยกออกจากกันได้โดยอาศัยการกระตุ้นของแมกนีเซียมไอออน rRNA ภายใน ribosomal subunit ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอตแสดงดังรูปที่ 2.9

ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต ไรโบโซมมีขนาด 80S ประกอบด้วยหน่วยย่อยเล็กขนาด 40S และหน่วยย่อยใหญ่ขนาด 60S โดยภายในหน่วยย่อยเล็ก 40S ประกอบด้วย 18S rRNA อยู่รวมกับโปรตีนอีก 33 ชนิด และภายใน 60S ประกอบด้วย rRNA ชนิด 28S, 5.8S และ 5S อยู่รวมกับโปรตีนอีก 50 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 rRNA ภายใน ribosomal subunit ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอต
ที่มา : Winnebeck และคณะ, 2010

2.3.5 ยีน 18S rRNA (Gopanenko และคณะ, 2015)

ยีน 18S rRNA จัดเป็นยีนหลักที่ใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต และยีน 16S rRNA เป็นยีนที่ใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอต ยีน 18S rRNA และ 16S rRNA เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ คือ ในสิ่งมีชีวิตประเภทเดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน สิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน บริเวณยีนนี้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน ด้วยความสามารถที่ไม่เกิดการรวมตัวกัน (Self-Assembly) ต่างกับหน่วยย่อยใหญ่ของไรโบโซมในสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอต คือ 50S และหน่วยย่อยใหญ่ของไรโบโซมในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต คือ 60S ที่มีการรวมตัวกันของ rRNA และโปรตีนภายในทั้งหมด ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

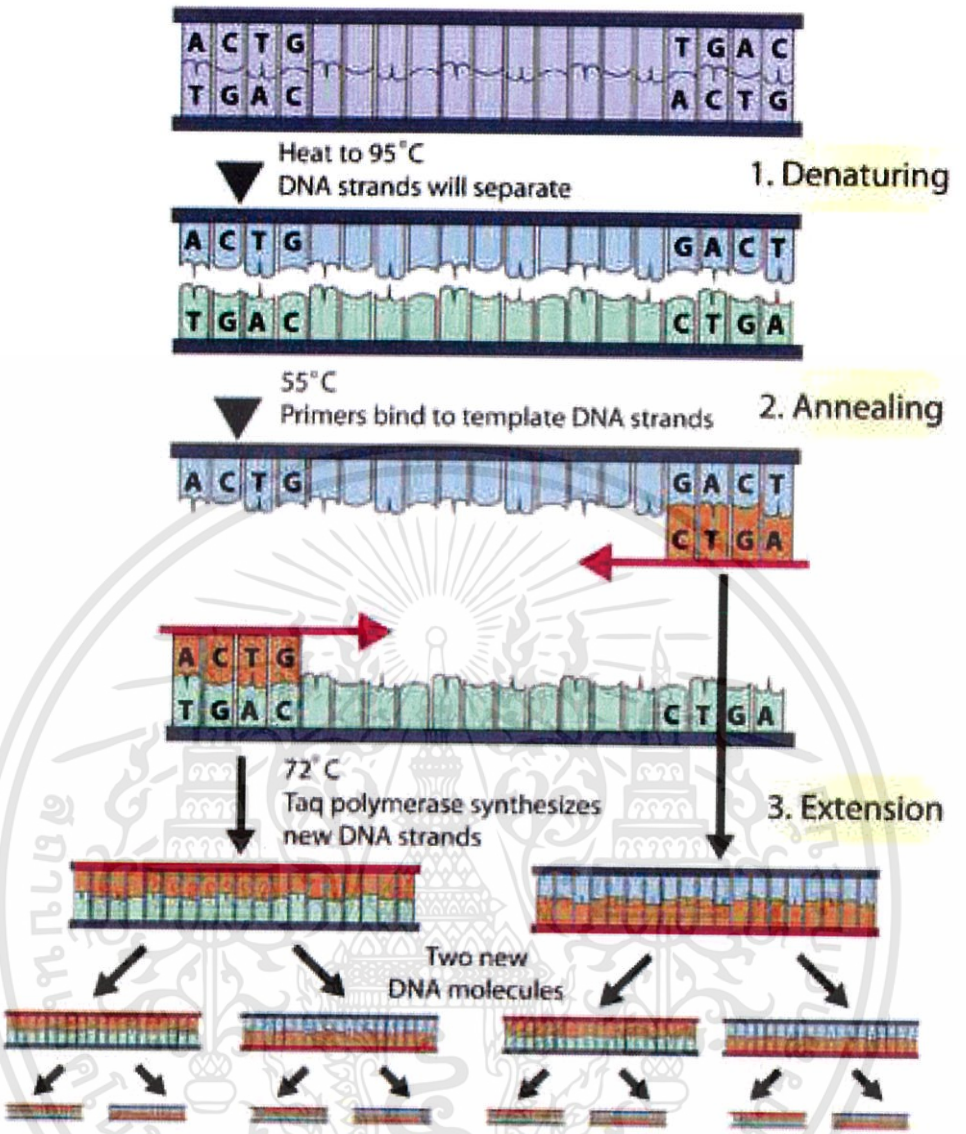
เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) เป็นกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (รูปที่ 2.10)

2.4.1 **การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation)** เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากเส้นเกลียวคู่ให้กลายเป็นสายดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92–95 องศาเซลเซียส

2.4.2 **การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)** ขั้นตอนนี้อุณหภูมิจะลดลงอยู่ในช่วง 40–62 องศาเซลเซียส ให้ไพรเมอร์เข้ามาจับกับลำดับเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ

2.4.3 **การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension)** เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ ใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 68–72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 แผนภาพแสดงขั้นตอนของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอรเรส
ที่มา : https://qph.ec.quoracdn.net

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Haddad และคณะ (2014) ศึกษาการระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียว Chlorophyceae ที่คัดแยกได้จากอ่าวเปอร์เซีย โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากผิวน้ำทะเลในอ่าวเปอร์เซีย และนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ A (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAG-3') และไพรเมอร์ SSU-inR1 (5'-CACCAGACTTGCCCTCCA-3') จากการทดลองพบว่าสาหร่ายทั้งหมด 11 ชนิดที่สามารถระบุสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง สามารถใช้ในการวิเคราะห์แผนผังวิวัฒนาการได้ และคณะผู้วิจัยยังสามารถระบุสายพันธุ์ของ Chlorophyta (*Chlorella sorokiniana, Chlamydomonas* sp.,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Neochloris aquatic, Picochlorum sp. และ*Nannochloris atomus*) ได้ จึงสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลที่มีประสิทธิภาพในการบอกความหลากหลายของสาหร่ายในธรรมชาติ

Wongsawad และ Peerapornpisal (2014) พบว่าไม่สามารถระบุชนิดของ *Spirogyra* จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้อย่างชัดเจน จึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมควบคู่ไปด้วย จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ของ *Spirogyra* จากทั้งหมด 19 ตัวอย่างจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยบันทึกขนาดเซลล์ (ความกว้างและความยาว) จำนวนและตำแหน่งของคลอโรพลาสต์และไพรีนอยด์ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ 5 ลักษณะ ($P<0.5$) จากการศึกษาระดับโมเลกุลโดยใช้ 10 ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์พบว่า ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มี 108 ชิ้นส่วนมีขนาด 200-2,500 คู่เบสและสามารถนำมาจัดจำแนกสาหร่ายออกเป็น 2 กลุ่มคือสาหร่ายกลุ่มภาคเหนือและสาหร่ายกลุ่มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

Heeg และ Wolf (2015) ศึกษาการจัดจำแนกกลุ่มสาหร่ายที่คล้ายคลึงกับ *Chlorella* ด้วยวิธีตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณยีน ITS2 (Internal transcribed spacer2) และบริเวณยีน 18S rDNA พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุชนิดของสาหร่ายได้สมบูรณ์เท่ากับการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยยีน ITS2 จะสามารถระบุชนิดได้ดีกว่า 18S rDNA เนื่องจากมีความแปรผันต่ำกว่า จากนั้นทำแผนผังวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS2 และ 18S rDNA จากตัวอย่าง 60 สายพันธุ์ สามารถแบ่งได้เป็น *Chlorella*-clade 34 สายพันธุ์ และ *Parachlorella*-clade 26 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวน 15 ไอโซเลท เป็นสาหร่ายที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในงานวิจัยมีจำนวน 15 ไอโซเลท

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	แหล่งที่มาของตัวอย่าง
1	1SinS1.1	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดสิงห์บุรี
2	2TKS2.2	น้ำจากนาข้าว	อำเภอตาคลี จังหวัดนครสวรรค์
3	2SinS4	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดสิงห์บุรี
4	8260	น้ำจืด	จังหวัดกรุงเทพฯ
5	8412	น้ำจืด	สวนสาธารณะกองทัพอากาศ เขตดอนเมือง จังหวัดกรุงเทพฯ
6	8641	น้ำจืด	อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี
7	A25.1	น้ำจืด	จังหวัดชัยนาท
8	CH	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ
9	ChiS4	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดชัยนาท
10	ChiW1	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดชัยนาท
11	L	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ
12	LSD-W2	น้ำจากนาข้าว	หาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี
13	NakS4	น้ำจากนาข้าว	จังหวัดนครสวรรค์
14	OvalG	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ
15	SD	น้ำจืด	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Nikon Eclipse Ci-L, Japan)

3.2.2 เครื่องแก้วต่างๆ (Glassware)

3.2.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) (Gallenkamp T490811, UK)

3.2.4 เครื่องชั่งสาร (Balance) (Sartorius SI-234, Germany)

3.2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)

3.2.6 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Genie-2, Scientific Industries, USA)

3.2.7 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) (Mettler-Toledo Group, Switzerland)

3.2.8 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) (Eppendorf Master cycler ep Gradients, USA)

3.2.9 เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Heat block) (Labnet, USA)

3.2.10 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)

3.2.11 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพเจลอะกาโรส (Gel documentation) (Syngene, MD1 1019, Japan)

3.2.12 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (Advance, Mupid-exu, Japan)

3.2.13 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.2.14 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)

3.2.15 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก 1.5 มิลลิลิตร (Microcentifuge tube) (Gunster Biotech, Taiwan)

3.2.16 ไมโครปิเปต (Micropipette) (Labnet, USA)

3.2.17 ไมโครปิเปตทิป (Micropipettetip) (Axygen, USA)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสีเขียว

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate Medium(TAP) (ภาคผนวก ก)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani medium (LB)(ภาคผนวก ข)

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1.1 กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba, Italy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.4.1.2 กรดอะซิติก (Glacial acetic acid) (Ajax Finechem, Australia)

3.4.1.3 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Mallinckrodt Baker, USA)

3.4.1.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.4.1.5 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.4.1.6 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.4.1.7 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Merck, Germany)

3.4.1.8 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$) (British Drug Houses, England)

3.4.1.9 เปปโตน (Peptone) (Difco, USA)

3.4.1.10 ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์(Na_2EDTA) (Promega, USA

3.4.1.11 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba, Italy)

3.4.1.12 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba, Italy)

3.4.1.13 ทริสเบส (Tris-base) (Vivantis, Malaysia)

3.4.1.14 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) (Difco, USA)

3.4.1.15 อะการ์ (Agar) (Difco, USA)

3.4.1.16 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.4.1.17 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.4.1.18 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.4.1.19 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Carlo Erba, Italy)

3.4.2 สารเคมีสำหรับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.4.2.1 ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, USA)

3.4.2.2 น้ำบริสุทธิ์

3.4.2.3 พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (Fermentas, USA)

3.4.2.4 แมกนีเซียมคลอไรด์ (Fermentas, USA)

3.4.2.5 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (Bio Basic Inc., Thailand)

3.4.2.6 เอนไซม์ *Taq*DNA polymerase (Fermentas, USA)

3.4.3 สารเคมีสำหรับเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

3.4.3.1 อะกาโรส (Research Organics Inc., USA)

3.4.3.2 Gelstar nucleic acid gel stain (BioWhittaker Molecular, USA)

3.4.3.3 Tris-Boric-EDTA (TBE buffer) (ภาคผนวก ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149437

3.4.4 ชุดทดสอบ (Kit)

3.4.4.1 Wizard V genomic DNA purification system kit (Promega, USA)

3.4.4.2 Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

นำสาหร่ายสีเขียวทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงโดยการเขี่ย (Streak) เชื้อบนอาหารแข็ง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์ นำมายืนยันความบริสุทธิ์ของสาหร่ายสีเขียวบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ข) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดเวลาแล้ว หากไม่มีการเจริญของแบคทีเรียแสดงว่าสาหร่ายสีเขียวมีความบริสุทธิ์ เมื่อยืนยันผลว่าสาหร่ายมีความบริสุทธิ์แล้ว จึงนำสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที

3.5.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว

นำสารละลายเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาหยดลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Nikon Eclipse Ci-L) ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า ถ่ายภาพเซลล์สาหร่ายโดยใช้โปรแกรม NIS-Elementsn เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและวัดขนาดของเซลล์สาหร่ายสีเขียว

3.5.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวมีวิธีการศึกษาดังนี้

3.5.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียว

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวใช้ชุดทดสอบ Wizard V genomic DNA purification system kit (Promega, USA) ทำการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของสาหร่ายสีเขียวลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย Digestion ปริมาตร 255 ไมโครลิตร (สารละลาย Digestion ประกอบด้วยสารละลาย Nuclei Lysis 200 ไมโครลิตร EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและเอนไซม์ ProtinaseK 5 ไมโครลิตร) บ่มสารละลายเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Wizard SV Lysis ลงไป 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ Vortex จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดย้ายไปใส่ในคอลัมน์ที่มีตัวกรอง นำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง ทำการล้างโดยเติมสารละลาย Wizard SV wash 650 ไมโครลิตร (ที่มีเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ผสมอยู่) ใส่ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง ทำการล้างซ้ำ 4 ครั้ง จากนั้นนำตัวกรองกับคอลัมน์เปล่าปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายตัวกรองใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมสารละลาย Nuclease free water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งตัวกรอง และเก็บจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.3.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.2 กรัม ใส่ในฟลาส์ก เติมบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA (TBE) 1 เท่า (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกับสารละลายบัฟเฟอร์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อุณหภูมิลดต่ำลงเติมเจลสตาร์ (Gelstar) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายเจลเทลงถาด ทิ้งให้เนื้อเจล แข็งตัวประมาณ 30 นาที ย้ายเจลใส่ลงใน Chamber ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอของตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวและดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที นำแผ่นเจลมาส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII) และถ่ายภาพเจลโดยชุดอุปกรณ์ถ่ายรูป (Gel documentation) และคำนวณหาปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ง)

3.5.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวที่ได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท มาทำการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 18SrRNAF1 (5'-CTGCGAATGGCTCATTAAATC-3') และ 18SrRNAR1 (5'-AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3') (Rasoul-Amini และคณะ, 2009) สารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงในตารางที่ 3.2 และสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA Thermal Cycler) แสดงในตารางที่ 3.3 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ขนาดและปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำบริสุทธิ์	26.5
5X บัฟเฟอร์	10
25 mM $MgCl_2$	3
2.5 mMdNTP	4
Forward primer (18S $rRNAF_1$5'-CTGCGAATGGCTCATTAAATC-3')	2.5
Reverse primer (18S$rRNAR_1$5'-AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3')	2.5
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1

ตารางที่ 3.3 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	94	5 นาที	
Denaturation	94	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	55	60 วินาที	
Extension	72	90 วินาที	
Final Extension	72	10 นาที	

3.5.3.4 การทำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์จากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) จากขั้นตอนที่ 3.5.3.3 ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทดสอบ Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan) โดยดูดสารละลายผลิตภัณฑ์ PCR ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ DF 5 เท่าของปริมาตรตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันโดยการ Vortex จากนั้นนำ DF column ใส่ลงในหลอด Collection tube แล้วดูดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผสมกับ DF buffer ข้างต้นลงไป ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง ทำการล้างโดยการเติมสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (ที่มีเอทานอลผสมอยู่) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้ายตัวกรองใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ และเติม Elution buffer ลงไป 30 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งตัวกรอง จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.5.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ 18S rRNAF1 (5'-CTGCGAATGGCTCATTAAATC-3') และ 18S rRNAR1 (5'-AAGGCCAGGGACGTAA TCAA-3') ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE จำกัด ประเทศมาเลเซีย นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ Chromatogram และเทียบหาความเหมือนกับฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blastn จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซโลท มา Alignment กับสาหร่ายสีเขียวของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม ClustalW แล้วนำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ร่วมกับสัณฐานวิทยา เพื่อระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลท โดยนำเซลล์สาหร่ายมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse Ci) ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า พบว่าสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะรูปร่างและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะรูปร่างและขนาดของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ลักษณะรูปร่าง	ขนาด(μm)
1SinS1.1	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
2TKS2.2	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
2SinS4	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
8260	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
8412	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
A25.1	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
CH	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	10
ChiS4	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	10
ChiW1	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
LSD-W2	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
NakS4	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
OvalG	เซลล์มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้กัน	5
8641	เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม 2-4 เซลล์ เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกระบอกเรียงเป็นแถว พบแฟลกเจลลาทั้ง 2 ด้านของเซลล์	10
L	เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม 2-4 เซลล์ เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกระบอกเรียงเป็นแถว พบแฟลกเจลลาทั้ง 2 ด้านของเซลล์	10
SD	เซลล์มีลักษณะกลมและรูปไข่ บางเซลล์อยู่ติดกัน 2 เซลล์	5

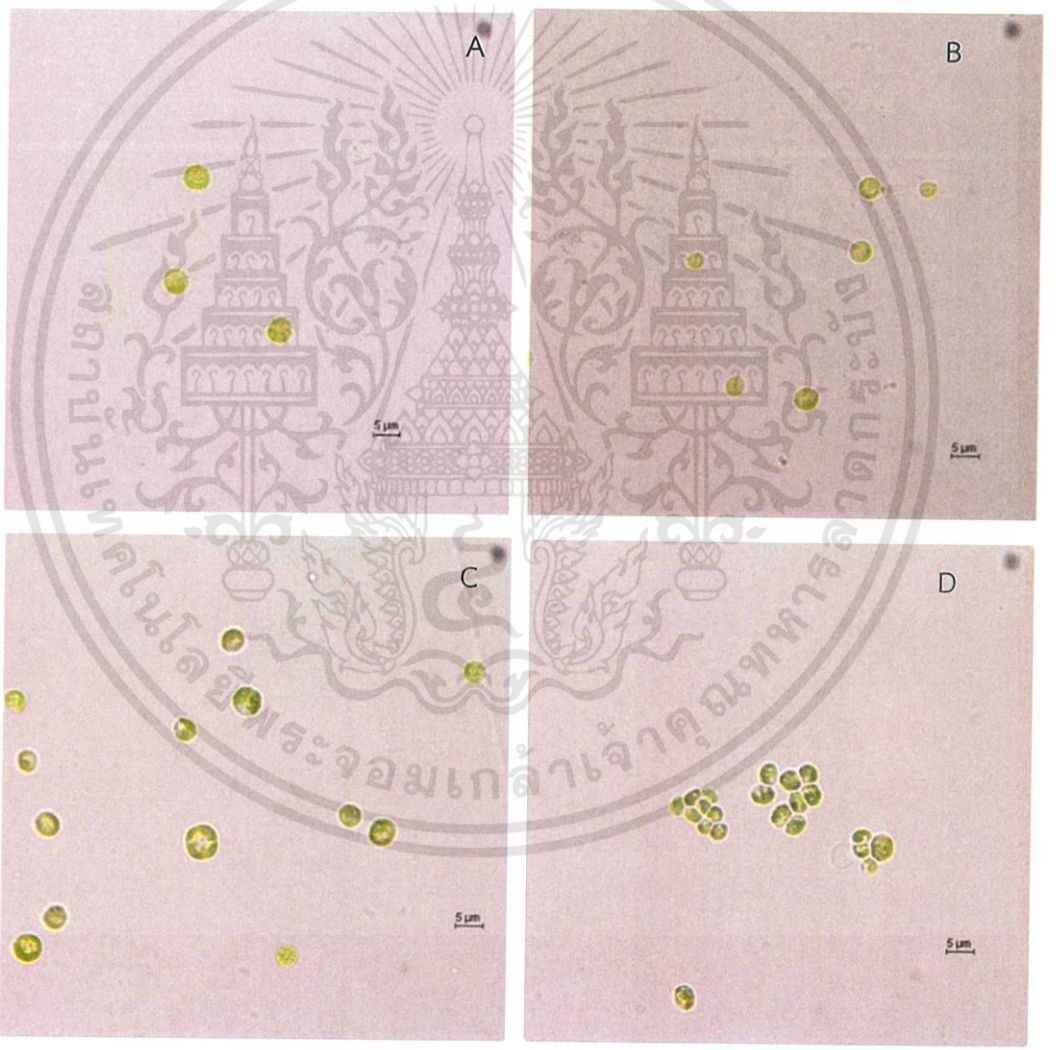
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 สาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลท สามารถจัดแบ่งกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวได้เป็น 3 กลุ่มตามรูปร่างของเซลล์ ดังนี้

4.1.1 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะกลม ประกอบด้วยไอโซเลท 1SinS1.1, 2TKS2.2, A25.1, 8260, 8412, 2SinS4, CH, ChiS4, ChiW1, LSD-W2, NakS4 และ OvalG (รูปที่ 4.1)

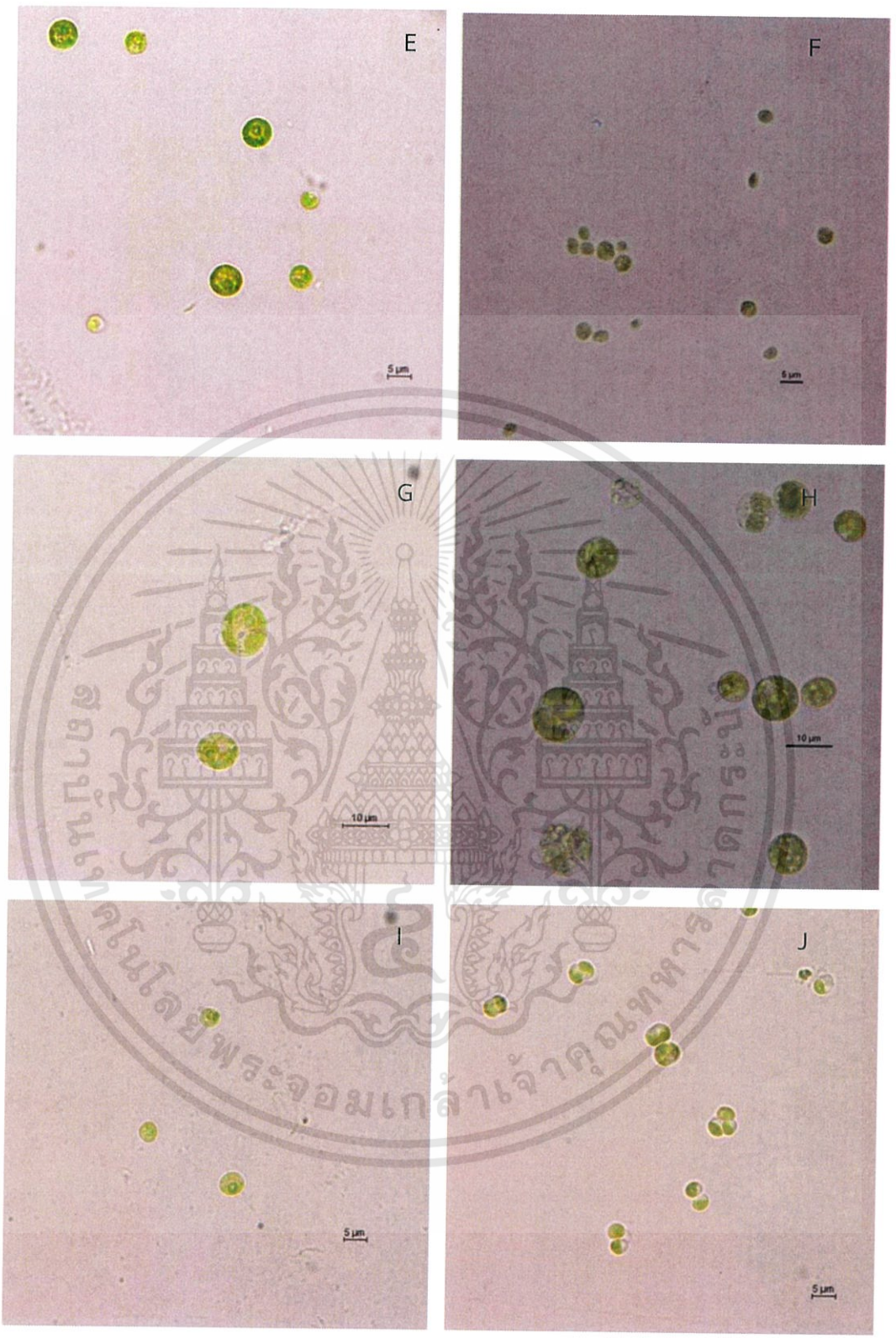
4.1.2 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะทรงกระบอกและมีแฟลกเจลลา ประกอบไปด้วยไอโซเลท 8641 และ L (รูปที่ 4.2)

4.1.3 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะวงรี ประกอบด้วย 1 ไอโซเลทคือ ไอโซเลท SD (รูปที่ 4.3)



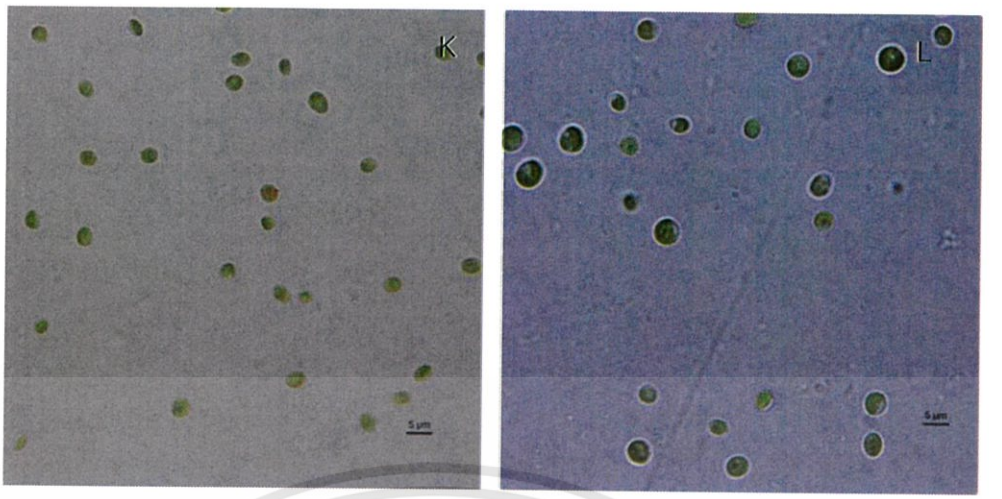
รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีกลมของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 1SinS1.1 (A), 2TKS2.2 (B), A25.1 (C), 8260 (D), 8412 (E), 2SinS4 (F), CH (G), ChiS4 (H), ChiW1 (I), LSD-W2 (J), NakS4 (K) และ OvalG (L)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



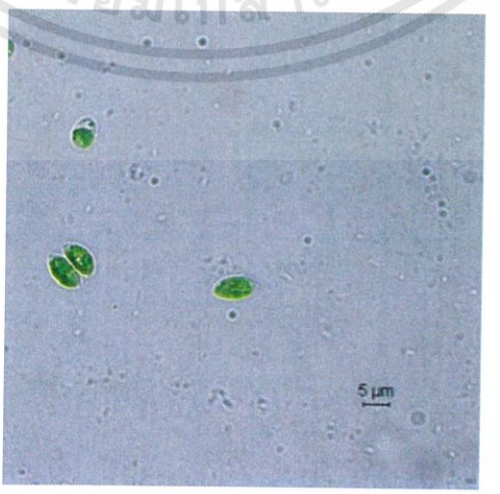
รูปที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีกลมของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 1SinS1.1 (A), 2TKS2.2 (B), A25.1 (C), 8260 (D), 8412 (E), 2SinS4 (F), CH (G), ChiS4 (H), ChiW1 (I), LSD-W2 (J), NakS4 (K) และ OvalG (L)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีกลมของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 1SinS1.1 (A), 2TKS2.2 (B), A25.1 (C), 8260 (D), 8412 (E), 2SinS4 (F), CH (G), ChiS4 (H), ChiW1 (I), LSD-W2 (J), NakS4 (K) และ OvalG (L)

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีทรงกระบอกของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8641 (A) และ L (B)



รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีวงรีของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท SD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว พบว่าไม่สามารถจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวได้ เนื่องจากกลุ่มสาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะกลมประกอบไปด้วยไอโซเลท 1SinS1.1, 2TKS2.2, A25.1, 8260, 8412, 2SinS4, CH, ChiS4, ChiW1, LSD-W2, NakS4 และ OvalG มีรูปร่าง สีที่เหมือนกัน และมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดเซลล์อยู่ในช่วงระหว่าง 5-10 ไมโครเมตร เช่นเดียวกับกลุ่มสาหร่ายที่มีลักษณะวงรี ได้แก่ ไอโซเลท SD ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาไม่ชัดเจน จึงไม่สามารถระบุชนิดของสาหร่ายได้ กลุ่มสาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะทรงกระบอกและมีแฟลกเจลลา ประกอบด้วย 2 ไอโซเลท คือ 8641 และ L เป็นกลุ่มที่มีสัณฐานวิทยาคล้ายกับสาหร่ายสีเขียวในจีนัส *Scenedesmus* sp. เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของกลุ่มสาหร่ายสีเขียวจึงต้องทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลทร่วมด้วย

4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

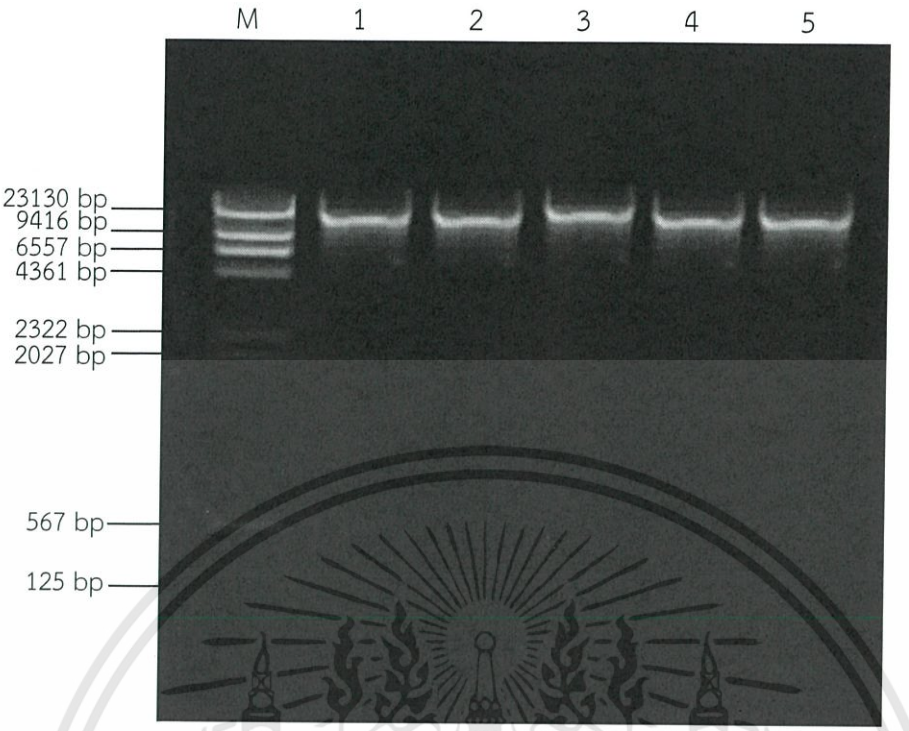
4.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวจำนวน 15 ไอโซเลท โดยใช้ชุดสกัด Wizard V Genomic DNA Purification system kit (Promega, USA) และนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า และให้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที เมื่อครบเวลาการให้กระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าขนาดของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดประมาณ 20,000 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII) และมีปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.4) จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ เนื่องจากไม่พบ DNA หรือ RNA เป็นแถบปื้น จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มีประสิทธิภาพสามารถนำมาเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการทำ PCR ต่อไป

4.2.2 การเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 18S rRNAF1 (5'-CTGCGAATGGCTCATTAAATC-3') และ 18S rRNAR1 (5'-AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3') และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หลังจากนั้น ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500-1,900 คู่เบส เมื่อเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII (รูปที่ 4.5) โดยขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ตรงกับขนาดของดีเอ็นเอที่คาดหวัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 จีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวแยกได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII)

Lane 1 : จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท 1SinS1.1

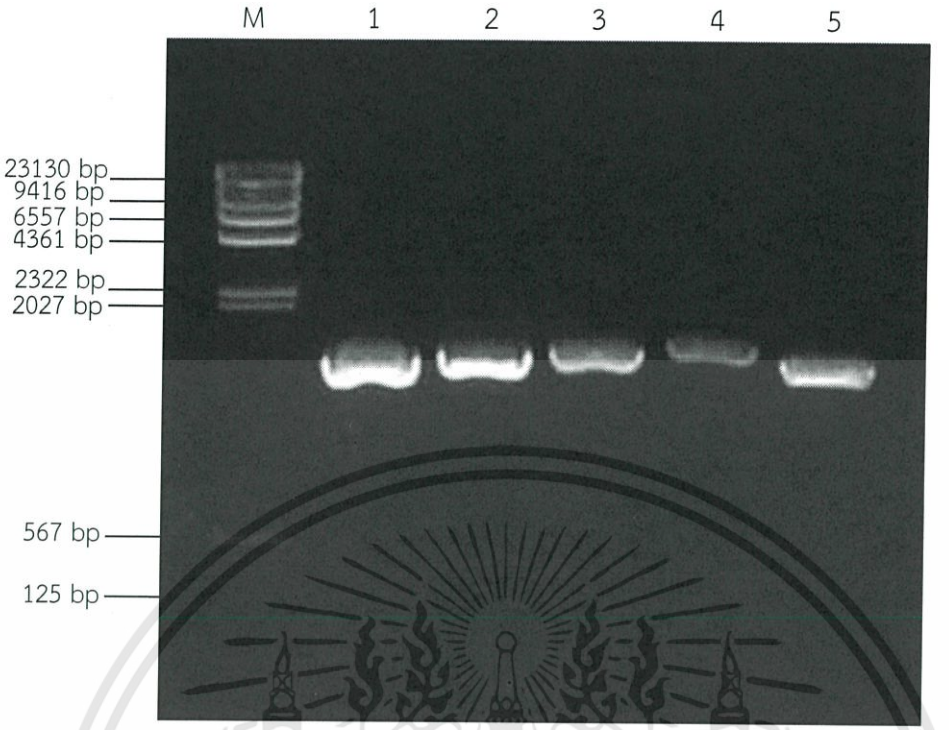
Lane 2 : จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท 2TKS2.2

Lane 3 : จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท 2SinS4

Lane 4 : จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท 8260

Lane 5 : จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท 8412

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 18S rDNA วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII)

Lane 1 : ผลิตภัณฑ์เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไอโซเลท 1SinS1.1

Lane 2 : ผลิตภัณฑ์เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไอโซเลท 2TKS2.2

Lane 3 : ผลิตภัณฑ์เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไอโซเลท 2SinS4

Lane 4 : ผลิตภัณฑ์เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไอโซเลท 8260

Lane 5 : ผลิตภัณฑ์เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไอโซเลท 8412

4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว 15 ไอโซเลท ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ 18S rRNAF1 (5'-CTGCGAATGGCTCATTAAATC-3') และ 18S rRNAR1 (5'-AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3') พบว่าสาหร่ายสีเขียวทั้ง 15 ไอโซเลท มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ขนาด 1,300-1,700 คู่เบส (ตารางที่ 4.2) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไปเปรียบเทียบหาความเหมือนกับฐานข้อมูลของธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าสาหร่ายสีเขียว 9 ไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Chlorella* sp. สาหร่ายสีเขียว 2 ไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Scenedesmus* sp. สาหร่ายสีเขียว 1 ไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Neocloris* sp. สาหร่ายสีเขียว 1 ไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Coelastella* sp. สาหร่ายสีเขียว 1 ไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Coelastrum* sp. และสาหร่ายสีเขียว 1 ไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Micractinium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลท

ชนิดของสาหร่ายสีเขียว	ไอโซเลท	Identities	Gaps
Chlorella sp.	1SinS1.1	1367/1367(100%)	0/1367(0%)
	2TKS2.2	1414/1423(99%)	1/1423(0%)
	2SinS4	1417/1417(100%)	0/1417(0%)
	8260	1409/1409(100%)	0/1409(0%)
	ChiS4	1401/1402(99%)	0/1402(0%)
	ChiW1	1407/1410(99%)	0/1410(0%)
	LSD-W2	1385/1387(99%)	0/1387(0%)
	NakS4	1406/1418(99%)	4/1418(0%)
	OvalG	1411/1411(100%)	0/1411(0%)
Coelastella sp.	CH	1426/1427(99%)	1/1427(0%)
Coelastrum sp.	SD	1401/1402(99%)	0/1402(0%)
Micractinium sp.	A25.1	1661/1752(95%)	29/1752(1%)
Neochloris sp.	8412	1312/1312(100%)	0/1312(0%)
Scenedesmus sp.	8641	1381/1382(99%)	0/1382(0%)
	L	1736/1789(97%)	29/1789(1%)

4.2.4 การเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลทกับสาหร่ายสีเขียวในฐานข้อมูลธนาคารยีน

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลท แบ่งได้เป็น 6 ชนิด คือ *Chlorella* sp., *Coelastella* sp., *Coelastrum* sp., *Micractinium* sp., *Neocloris* sp., และ *Scenedesmus* sp. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 15 ไอโซเลทมาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวในฐานข้อมูลของธนาคารยีน (ตารางที่ 4.2) และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4.1 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Chlorella* sp.

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว 9 ไอโซเลท ประกอบด้วย 1SinS1.1, 2TKS2.2, 2SinS4, 8260, ChiS4, ChiW1, LSD-W2, NakS4 และ OvalG มาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดอยู่ระหว่าง 1,300-1,400 คู่เบส (ตารางที่ 4.2) มีความเหมือนกับฐานข้อมูลธนาคารยีนของสาหร่าย *Chlorella* sp. (Accession Number KJ734869.1) 99-100 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 9 ไอโซเลทอยู่ในจีนัส *Chlorella* sp.

```
ChiS4_F1nR1          ACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATATATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
ChiW1_F1nR1          ACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
8260_F1nR1           ACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
OvalG_F1nR1          ACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
Chlorella            ACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
2SinS4_F1nR1         ACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
LSD-W2F1nR1          ACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
NakS4_F1R1           ACGTGCGCAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
1SinS1_1_F1nR1       ----------TCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
2TKS2_2_F1nR1        ACGTGCGCAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGC
                              ************************ ************************

ChiS4_F1nR1          TTTGCCCGACCCGCGGTGAATCATGATATCTTCACGAAGCGCATGGCCTTGCGCCGGCGC
ChiW1_F1nR1          TCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGA
8260_F1nR1           TCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGA
OvalG_F1nR1          TCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGA
Chlorella            TCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGA
2SinS4_F1nR1         TCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGA
LSD-W2F1nR1          TTTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGA
NakS4_F1R1           -TTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTCGTGCTGGCGA
1SinS1_1_F1nR1       -TTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTCGTGCTGGCGA
2TKS2_2_F1nR1        -TTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTCGTGCTGGCGA
                      ******** ***************** ********* ********** * ** ****

ChiS4_F1nR1          TGTTCCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
ChiW1_F1nR1          TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
8260_F1nR1           TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
OvalG_F1nR1          TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
Chlorella            TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
2SinS4_F1nR1         TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
LSD-W2F1nR1          TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
NakS4_F1R1           TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
1SinS1_1_F1nR1       TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
2TKS2_2_F1nR1        TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
                     **** ************************************************************

ChiS4_F1nR1          GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
ChiW1_F1nR1          GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
8260_F1nR1           GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
OvalG_F1nR1          GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
Chlorella            GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
2SinS4_F1nR1         GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
LSD-W2F1nR1          GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
NakS4_F1R1           GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
1SinS1_1_F1nR1       GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
2TKS2_2_F1nR1        GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
                     ************************************************************
```

รูปที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Chlorella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
ChiS4_F1nR1          CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGA
ChiW1_F1nR1          CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
8260_F1nR1           CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
OvalG_F1nR1          CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
Chlorella            CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
2SinS4_F1nR1         CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
LSD-W2F1nR1          CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
NakS4_F1R1           CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
1SinS1_1_F1nR1       CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
2TKS2_2_F1nR1        CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGA
                     ******************************************** ** ************

ChiS4_F1nR1          CAATAAATAACAATACCGGGC-ATTTCATGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAT
ChiW1_F1nR1          CAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
8260_F1nR1           CAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
OvalG_F1nR1          CAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
Chlorella            CAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
2SinS4_F1nR1         CAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
LSD-W2F1nR1          CAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
NakS4_F1R1           CAATAAATAACAATACCGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
1SinS1_1_F1nR1       CAATAAATAACAATACCGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
2TKS2_2_F1nR1        CAATAAATAACAATACCGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAC
                     *************** ****  ***** ******************************

ChiS4_F1nR1          CCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
ChiW1_F1nR1          CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
8260_F1nR1           CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
OvalG_F1nR1          CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
Chlorella            CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
2SinS4_F1nR1         CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
LSD-W2F1nR1          CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
NakS4_F1R1           CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
1SinS1_1_F1nR1       CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
2TKS2_2_F1nR1        CCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
                     *************** ********************************************

ChiS4_F1nR1          CCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGT
ChiW1_F1nR1          CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGG
8260_F1nR1           CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGG
OvalG_F1nR1          CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGG
Chlorella            CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGG
2SinS4_F1nR1         CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGG
LSD-W2F1nR1          CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGG
NakS4_F1R1           CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGA
1SinS1_1_F1nR1       CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGG
2TKS2_2_F1nR1        CCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGG
                     ********************** ************************************

ChiS4_F1nR1          TCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAGTACTG---CTATGGCCTTCCTTTCTGTCGGGGACGGG
ChiW1_F1nR1          CCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGC-CCACCTTGTTGCCGGGGACGGG
8260_F1nR1           CCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGC-CCACCTTGTTGCCGGGGACGGG
OvalG_F1nR1          CCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGC-CCACCTTGTTGCCGGGGACGGG
Chlorella            CCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGC-CCACCTTGTTGCCGGGGACGGG
2SinS4_F1nR1         CCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGC-CCACCTTGTTGCCGGGGACGGG
LSD-W2F1nR1          CTTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGC-CCACCTTGTTGCCGGGGACGGG
NakS4_F1R1           CCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCCCCACCTTGTTGCCGGGGACGAG
1SinS1_1_F1nR1       CCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGC-CCACCTTGTTGCCGGGGACGAG
2TKS2_2_F1nR1        CCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGC-CCACCTTGTTGCCGGGGACGAG
                      *  *********  *   * ** *     *   *  *  ****  ** ******** *
```

รูปที่ 4.6 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Chlorella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
ChiS4_F1nR1          CTTCTGGGCTTAACTGTCCGGGACTCGGAGTCGACGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
ChiW1_F1nR1          CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
8260_F1nR1           CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
OvalG_F1nR1          CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
Chlorella            CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
2SinS4_F1nR1         CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
LSD-W2F1nR1          CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
NakS4_F1R1           CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
1SinS1_1_F1nR1       CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
2TKS2_2_F1nR1        CTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT
                     ** ******** ********************** **  **********************

ChiS4_F1nR1          GTTCAAAGCAGGCTTACGCCCTGAATACTTTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
ChiW1_F1nR1          GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
8260_F1nR1           GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
OvalG_F1nR1          GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
Chlorella            GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
2SinS4_F1nR1         GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
LSD-W2F1nR1          GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
NakS4_F1R1           GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
1SinS1_1_F1nR1       GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
2TKS2_2_F1nR1        GTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGC
                     ************* ***** ******** ********************************

ChiS4_F1nR1          CTATCTTGTTGGTCTGTAGGACTGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
ChiW1_F1nR1          CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
8260_F1nR1           CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
OvalG_F1nR1          CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
Chlorella            CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
2SinS4_F1nR1         CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
LSD-W2F1nR1          CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
NakS4_F1R1           CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
1SinS1_1_F1nR1       CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
2TKS2_2_F1nR1        CTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGT
                     ***** *************** ************************************

ChiS4_F1nR1          ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
ChiW1_F1nR1          ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
8260_F1nR1           ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
OvalG_F1nR1          ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
Chlorella            ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
2SinS4_F1nR1         ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
LSD-W2F1nR1          ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
NakS4_F1R1           ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
1SinS1_1_F1nR1       ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
2TKS2_2_F1nR1        ATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
                     ************************************************************

ChiS4_F1nR1          TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
ChiW1_F1nR1          TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
8260_F1nR1           TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
OvalG_F1nR1          TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
Chlorella            TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
2SinS4_F1nR1         TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
LSD-W2F1nR1          TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
NakS4_F1R1           TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
1SinS1_1_F1nR1       TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
2TKS2_2_F1nR1        TGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
                     ************************************************************
```

รูปที่ 4.6 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Chlorella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
ChiS4_F1nR1          CGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCGAATGTTTTTTTAATGAC
ChiW1_F1nR1          CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
8260_F1nR1           CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
OvalG_F1nR1          CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
Chlorella            CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
2SinS4_F1nR1         CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
LSD-W2F1nR1          CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
NakS4_F1R1           CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
1SinS1_1_F1nR1       CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
2TKS2_2_F1nR1        CGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC
                     **** ********************************** **** ****** **  *****

ChiS4_F1nR1          TTCGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
ChiW1_F1nR1          TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
8260_F1nR1           TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
OvalG_F1nR1          TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
Chlorella            TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
2SinS4_F1nR1         TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
LSD-W2F1nR1          TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
NakS4_F1R1           TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
1SinS1_1_F1nR1       TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
2TKS2_2_F1nR1        TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
                     * **** ****************************************************

ChiS4_F1nR1          GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA-GCCTGCGGCTTAAT
ChiW1_F1nR1          GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCTTGGA-ACCTGCGGCTTAAT
8260_F1nR1           GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA-GCCTGCGGCTTAAT
OvalG_F1nR1          GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA-GCCTGCGGCTTAAT
Chlorella            GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA-GCCTGCGGCTTAAT
2SinS4_F1nR1         GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA-GCCTGCGGCTTAAT
LSD-W2F1nR1          GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA-GCCTGCGGCTTAAT
NakS4_F1R1           GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAACCCTGCGGCTTAAT
1SinS1_1_F1nR1       GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA-GCCTGCGGCTTAAT
2TKS2_2_F1nR1        GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA-GCCTGCGGCTTAAT
                     ****************************************** ****  **************

ChiS4_F1nR1          TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
ChiW1_F1nR1          TTGACTCAACCCGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
8260_F1nR1           TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
OvalG_F1nR1          TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
Chlorella            TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
2SinS4_F1nR1         TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
LSD-W2F1nR1          TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
NakS4_F1R1           TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
1SinS1_1_F1nR1       TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
2TKS2_2_F1nR1        TTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG
                     ********** ************************************************

ChiS4_F1nR1          CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
ChiW1_F1nR1          CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
8260_F1nR1           CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
OvalG_F1nR1          CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
Chlorella            CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
2SinS4_F1nR1         CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
LSD-W2F1nR1          CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
NakS4_F1R1           CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
1SinS1_1_F1nR1       CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
2TKS2_2_F1nR1        CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGT
                     ************************************************************
```

รูปที่ 4.6 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Chlorella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
ChiS4_F1nR1          CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCCTAGTTGCTTTTTG
ChiW1_F1nR1          CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGTT-CGC
8260_F1nR1           CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCT-CGC
OvalG_F1nR1          CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCT-CGC
Chlorella            CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCT-CGC
2SinS4_F1nR1         CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCT-CGC
LSD-W2F1nR1          CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCT-CGC
NakS4_F1R1           CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCT-CGC
1SinS1_1_F1nR1       CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCT-CGC
2TKS2_2_F1nR1        CAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCT-CGC
                     ********************************************   ****  *

ChiS4_F1nR1          CAGCTAGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTTAGTCAATGGAAGTATGAGGCAATA
ChiW1_F1nR1          CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
8260_F1nR1           CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
OvalG_F1nR1          CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
Chlorella            CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
2SinS4_F1nR1         CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
LSD-W2F1nR1          CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
NakS4_F1R1           CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
1SinS1_1_F1nR1       CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
2TKS2_2_F1nR1        CAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATA
                     ****  ** ************************  *** ********* ***********

ChiS4_F1nR1          ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
ChiW1_F1nR1          ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
8260_F1nR1           ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
OvalG_F1nR1          ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
Chlorella            ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
2SinS4_F1nR1         ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
LSD-W2F1nR1          ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
NakS4_F1R1           ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
1SinS1_1_F1nR1       ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
2TKS2_2_F1nR1        ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAA
                     ************************************************************

ChiS4_F1nR1          CAAGCCTATCCTTGACCGAAAGGTCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATA
ChiW1_F1nR1          CGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATA
8260_F1nR1           CGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATA
OvalG_F1nR1          CGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATA
Chlorella            CGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATA
2SinS4_F1nR1         CGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATA
LSD-W2F1nR1          CGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGA--
NakS4_F1R1           CGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTGGAATCTGCATCGTGATGGGGATA
1SinS1_1_F1nR1       CGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTGGAATCTGCATCGTGATGGGGATA
2TKS2_2_F1nR1        CGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTGGAATCTGCATCGTGATGGGGATA
                     * ****** ***** **** *** ************ *** *****************
```

รูปที่ 4.6 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Chlorella* sp.

4.2.4.2 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Coelastella* sp.

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท CH มาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 1,427 คู่เบส (ตารางที่ 4.2) มีความเหมือนกับฐานข้อมูลธนาคารยีนของสาหร่าย *Coelasttella* sp. (Accession number KM020087.1) 99 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท CH อยู่ในจีนัส *Coelastella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
CH_F1nR1        TCGGATACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGAC
Coelastrella    CGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGAC
                  *   ************************************************
CH_F1nR1        GTATATATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTTTGCCCGACCCGCGGTGAATCATGATATCT
Coelastrella    GTATATATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTTTGCCCGACCCGCGGTGAATCATGATATCT
                ************************************************************

CH_F1nR1        TCACGAAGCGCATGGCCTTGTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTT
Coelastrella    TCACGAAGCGCATGGCCTTGTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTT
                ************************************************************

CH_F1nR1        TCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGAT
Coelastrella    TCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGAT
                ************************************************************

CH_F1nR1        TCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
Coelastrella    TCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
                ************************************************************

CH_F1nR1        TACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCATTTAATGTC
Coelastrella    TACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCATTTAATGTC
                ************************************************************

CH_F1nR1        TGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCT
Coelastrella    TGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCT
                ************************************************************

CH_F1nR1        GGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAA
Coelastrella    GGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAA
                ************************************************************

CH_F1nR1        AAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAGTACTGCTAT
Coelastrella    AAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAGTACTGCTAT
                ************************************************************

CH_F1nR1        GGCCTATCTTTCTGTCGGGGACGGGCTTCTGGGCTTAACTGTCCGGGACTCGGAGTCGAC
Coelastrella    GGCCTATCTTTCTGTCGGGGACGGGCTTCTGGGCTTAACTGTCCGGGACTCGGAGTCGAC
                ************************************************************

CH_F1nR1        GTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCCTGAATACTTTAGCA
Coelastrella    GTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCCTGAATACTTTAGCA
                ************************************************************

CH_F1nR1        TGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACTGGAGTAATGATT
Coelastrella    TGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACTGGAGTAATGATT
                ************************************************************

CH_F1nR1        AAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATG
Coelastrella    AAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATG
                ************************************************************

CH_F1nR1        AAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGT
Coelastrella    AAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGT
                ************************************************************

CH_F1nR1        TGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGG
Coelastrella    TGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGG
                ************************************************************

CH_F1nR1        GATTGGCGAATGTTTTTTTAATGACTTCGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGG
Coelastrella    GATTGGCGAATGTTTTTTTAATGACTTCGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGG
                ************************************************************

CH_F1nR1        GTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCAC
Coelastrella    GTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCAC
                ************************************************************

CH_F1nR1        CAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACA
Coelastrella    CAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACA
                ************************************************************
```

รูปที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Coelastella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
CH_F1nR1        TAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCG
Coelastrella    TAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCG
                ************************************************************

CH_F1nR1        TTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTG
Coelastrella    TTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTG
                ************************************************************

CH_F1nR1        CTAAATAGTCCTAGTTGCTTTTTGCAGCTAGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTT
Coelastrella    CTAAATAGTCCTAGTTGCTTTTTGCAGCTAGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTT
                ************************************************************

CH_F1nR1        AGTCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCA
Coelastrella    AGTCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCA
                ************************************************************

CH_F1nR1        CGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCTTGACCGAAAGGTCCGGGTAATCTT
Coelastrella    CGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCTTGACCGAAAGGTCCGGGTAATCTT
                ************************************************************

CH_F1nR1        TGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCT
Coelastrella    TGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCT
                *********************************************
```

รูปที่ 4.7 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Coelastella* sp.

4.2.4.3 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Coelastrum* sp.

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท SD มาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 1,402 คู่เบส (ตารางที่ 4.2) มีความเหมือนกับฐานข้อมูลธนาคารยีนของสาหร่าย *Coelastrum* sp. (Accession number KT279487.1) 99 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท SD อยู่ในจีนัส *Coelastrum* sp.

```
SD_F1nR1        ------------------AATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAG
Coelastrum      TACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAG
                                  ****************************************

SD_F1nR1        GGACGTATATATTAGATAAAAGGCCGACCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATCATGAT
Coelastrum      GGACGTATATATTAGATAAAAGGCCGACCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATCATGAT
                ************************************************************

SD_F1nR1        ATCTTCACGAAGCGCATGGCCTTGTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCCTATCA
Coelastrum      ATCTTCACGAAGCGCATGGCCTTGTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCCTATCA
                ************************************************************

SD_F1nR1        ACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTT
Coelastrum      ACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTT
                ************************************************************

SD_F1nR1        CGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGC
Coelastrum      CGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGC
                ************************************************************

SD_F1nR1        AAATTACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCATTTCA
Coelastrum      AAATTACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCATTTTA
                ************************************************************ *
```

รูปที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Coelastrum* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
SD_F1nR1        TGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAA
Coelastrum      TGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAA
                ************************************************************

SD_F1nR1        GTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAG
Coelastrum      GTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAG
                ************************************************************

SD_F1nR1        TTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAGTACTG
Coelastrum      TTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAGTACTG
                ************************************************************

SD_F1nR1        CTATGGCCTTCCTTTCTGTCGGGGACGGGCTTCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGT
Coelastrum      CTATGGCCTTCCTTTCTGTCGGGGACGGGCTTCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGT
                ************************************************************

SD_F1nR1        CGACGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCAGAATACTTTA
Coelastrum      CGACGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCAGAATACTTTA
                ************************************************************

SD_F1nR1        GCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATG
Coelastrum      GCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATG
                ************************************************************

SD_F1nR1        ATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTT
Coelastrum      ATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTT
                ************************************************************

SD_F1nR1        ATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAA
Coelastrum      ATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAA
                ************************************************************

SD_F1nR1        AGTTGGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACT
Coelastrum      AGTTGGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACT
                ************************************************************

SD_F1nR1        AGGGATTGGCGAATGTTTTTTTAATGACTTCGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTT
Coelastrum      AGGGATTGGCGAATGTTTTTTTAATGACTTCGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTT
                ************************************************************

SD_F1nR1        TGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCAC
Coelastrum      TGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCAC
                ************************************************************

SD_F1nR1        CACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAG
Coelastrum      CACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAG
                ************************************************************

SD_F1nR1        ACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGG
Coelastrum      ACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGG
                ************************************************************

SD_F1nR1        CCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGC
Coelastrum      CCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGC
                ************************************************************

SD_F1nR1        CTGCTAAATAGTCTCAGTTGCTTTTTGCAGCTGGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCG
Coelastrum      CTGCTAAATAGTCTCAGTTGCTTTTTGCAGCTGGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCG
                ************************************************************

SD_F1nR1        TTTAGTCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCC
Coelastrum      TTTAGTCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCC
                ************************************************************

SD_F1nR1        GCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCTTGACCGAAGGGTCTGGGTAAT
Coelastrum      GCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCTTGACCGAAGGGTCTGGGTAAT
                ************************************************************

SD_F1nR1        CTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATT
Coelastrum      CTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATT
                ****************************************
```

รูปที่ 4.8 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Coelastrum* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4.4 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Micractinium* sp.

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท A25.1 มาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 1,752 คู่เบส (ตารางที่ 4.2) มีความเหมือนกับฐานข้อมูลธนาคารยีนของสาหร่าย *Micractinuim* sp. (Accession number FM205863.1) 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท A25.1 อยู่ในจีนัส *Micractinium* sp.

```
A25.1_F1nR1       --AAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCT-CGCC
Micractinium      GTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTCTGCC
                    ************************************************  ***

A25.1_F1nR1       CGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTC
Micractinium      CGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTC
                  ************************************************************

A25.1_F1nR1       ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAAC
Micractinium      ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAAC
                  ************************************************************

A25.1_F1nR1       GGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC
Micractinium      GGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC
                  ************************************************************

A25.1_F1nR1       CAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAA
Micractinium      CAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAA
                  ************************************************************

A25.1_F1nR1       ATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTTA
Micractinium      ATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTTA
                  ************************************************************

A25.1_F1nR1       ACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTAAAATTGCTGTTGCCAGAAAGAGTAGGCAAA
Micractinium      ACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTAAAATTGCTGTTGCCAGAGATAGTAGGGCAC
                  ********************************************* * ******  *

A25.1_F1nR1       TGAAACCTGCTAGTCGAGGAGC----------CTATATGTTTGAATGGGCTGGCTCCCG
Micractinium      TGTGCGAACAGTGTTATGCCTGCTAGTCGAGCAGCCATCTAATGAATGGGCTGGCTGCCG
                  **         **   *                 ************** ***

A25.1_F1nR1       GCGAGACGACCTGGAACGGGGGAAGCCTTCGACTCGGCTCTTTGGGCCGAGCCGGCTAAT
Micractinium      GCAAGACGACCTGGTACGGGGAAAGCCTTCACCCTC---TGCTTGCAGAGGCCGGCCAAT
                  ** *********** ****** ********  *        * *     ****** ***

A25.1_F1nR1       CCCGTGGCGAGCTCTCGAAGAGCAATCTTTTTTGAGCCGTCGTAACGCACGGTAAGGCGT
Micractinium      CCCGTGGCGAGTCCTTGAAGAGCGATCTTCTCTGGACCGTCGTAACGCACGGTAAGGCGT
                  ***********  ** ******* ***** * **  ************************

A25.1_F1nR1       CGGCTGACTCTCAGAGTTGGCTTAAGGGACGTGCTAATCCCATCCGATGACAAAGGATGC
Micractinium      CGGCTGACTCTCTGAGTTGGCTTAAGGGACGTGCTAATCCCACACGATGACAAAGTGTGC
                  ************ ****************************  ***********  ***

A25.1_F1nR1       TCAGAGCAATAGCACCCATTCTGCGAAGGCTCTGGGGGGCTACAGTGTCTCGAGGAAATG
Micractinium      TCTAGAGAATAGCTCCCATTCGGCGAAGCTCTAGAGGGGCGATAGTGTGTTGAGGAAATG
                  **     ****** ******* ******     * ***** * ***** * *********

A25.1_F1nR1       CCTGACACTGCCCGGTAGAAATGGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTAT
Micractinium      CTTCACACTGCCCGGTATCAATGGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTAT
                  * * *************  ****************************************
```

รูปที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Micractinium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
A25.1_F1nR1     ATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGC-TCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGGCCTGCCGGTCC
Micractinium    ATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAA--GCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGGCCTGCCGGTCC
                ********************    **********************************

A25.1_F1nR1     GCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCCACCTTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTC
Micractinium    GCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCCACCTTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTC
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     ACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGG
Micractinium    ACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGG
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     CCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGG
Micractinium    CCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGG
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     TCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCA
Micractinium    TCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCA
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     GAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGT
Micractinium    GAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGT
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     TTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCTC
Micractinium    TTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCTC
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     AACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACC
Micractinium    AACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACC
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     TTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAA
Micractinium    TTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAA
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     AGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACG
Micractinium    AGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACG
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     GGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATT
Micractinium    GGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATT
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     CTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCG
Micractinium    CTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCG
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     GTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTCGCCAGCCGGCGGACTT
Micractinium    GTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGTTCTCCAGCCGGCGGACTT
                ************************************** ** ***************

A25.1_F1nR1     CTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATG
Micractinium    CTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATG
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     CCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGCCTTG
Micractinium    CCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGCCTTG
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     GCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTA
Micractinium    GCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTA
                ************************************************************

A25.1_F1nR1     TTAATCT-CAA
Micractinium    TTAATCTTCAA
                ******* ***
```

รูปที่ 4.9 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Micractinium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4.5 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Neochloris* sp.

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8412 มาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 1,312 คู่เบส (ตารางที่ 4.2) มีความเหมือนกับฐานข้อมูลธนาคารยีนของสาหร่าย *Neochloris* sp. (Accession number KM020061.1) 100 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8412 อยู่ในจีนัส *Neochloris* sp.

```
Neochloris      TATATATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTCTGCCCGACCCGCGGTGAATCATGATATCTT
8412_F1nR1      -ATATATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTCTGCCCGACCCGCGGTGAATCATGATATCTT
                 ************************************************************

Neochloris      CACGAATCGCATAGCCTTGTGCTGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTT
8412_F1nR1      CACGAATCGCATAGCCTTGTGCTGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTT
                ************************************************************

Neochloris      CGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATT
8412_F1nR1      CGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATT
                ************************************************************

Neochloris      CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATT
8412_F1nR1      CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATT
                ************************************************************

Neochloris      ACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACATTTCCGGGCACATCGTGTCT
8412_F1nR1      ACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACATTTCCGGGCACATCGTGTCT
                ************************************************************

Neochloris      GGAAAATGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTG
8412_F1nR1      GGAAAATGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTG
                ************************************************************

Neochloris      GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAA
8412_F1nR1      GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAA
                ************************************************************

Neochloris      AAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCTTCGGTGAGTACTGCTATGG
8412_F1nR1      AAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCTTCGGTGAGTACTGCTATGG
                ************************************************************

Neochloris      CCTTCCTTTCTACGGGGGACGGGCTCCTGGGATTCACTTCTCGGGATCCGGATTCCGTGA
8412_F1nR1      CCTTCCTTTCTACGGGGGACGGGCTCCTGGGATTCACTTCTCGGGATCCGGATTCCGTGA
                ************************************************************

Neochloris      TGATACTTTGAGTAAATTGGAGTGTTCAAAGCAAGCCTGCGCTCTGAACATTTTAGCATG
8412_F1nR1      TGATACTTTGAGTAAATTGGAGTGTTCAAAGCAAGCCTGCGCTCTGAACATTTTAGCATG
                ************************************************************

Neochloris      GAATATCACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACCAGAGTAATGATTAA
8412_F1nR1      GAATATCACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACCAGAGTAATGATTAA
                ************************************************************

Neochloris      GAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAA
8412_F1nR1      GAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAA
                ************************************************************

Neochloris      AGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTG
8412_F1nR1      AGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTG
                ************************************************************
```

รูปที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Neochloris* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

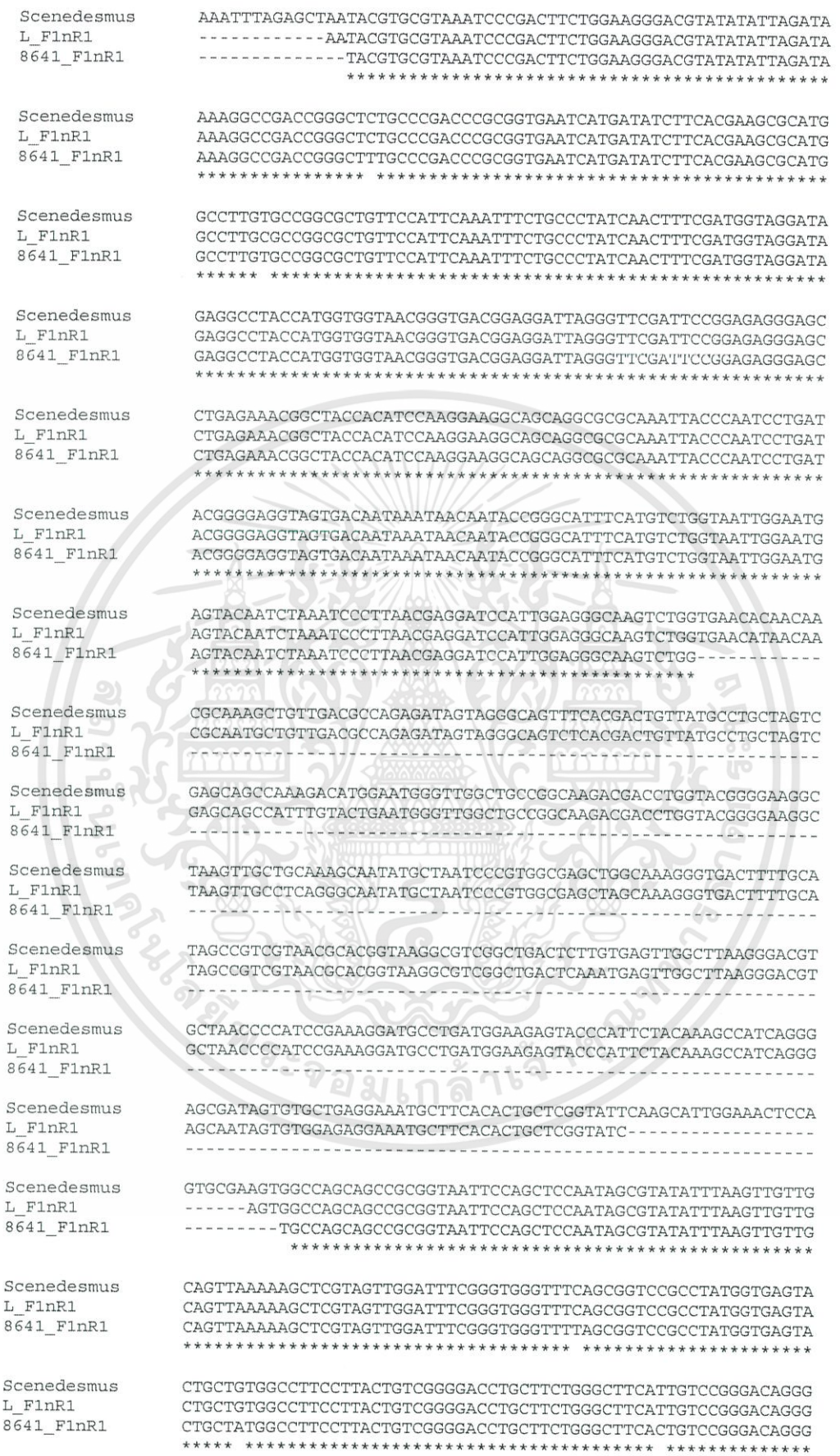
```
Neochloris      GGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGA
8412_F1nR1      GGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGA
                ************************************************************

Neochloris      TTAGCAGACGTTTCATTGATGACTCTGCTAGCACCTTATGTGAAAACAAAGTTTTTGGGT
8412_F1nR1      TTAGCAGACGTTTCATTGATGACTCTGCTAGCACCTTATGTGAAAACAAAGTTTTTGGGT
                ************************************************************

Neochloris      TCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
8412_F1nR1      TCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
                ************************************************************

Neochloris      GGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATA
8412_F1nR1      GGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATA
                ************************************************************

Neochloris      GTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT
8412_F1nR1      GTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT
                ************************************************************

Neochloris      CTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCTCCTA
8412_F1nR1      CTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCTCCTA
                ************************************************************

Neochloris      AATAGTCCATGCCGCCTTTTGGCGGTATGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTCTA
8412_F1nR1      AATAGTCCATGCCGCCTTTTGGCGGTATGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTCTA
                ************************************************************

Neochloris      GCCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCAC
8412_F1nR1      GCCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCAC
                ************************************************************

Neochloris      GCGCGCTACACTGATGCGTTCAACGAGCCTATCCTTGACCGAGAGGTCCGGGTAATCTTT
8412_F1nR1      GCGCGCTACACTGATGCGTTCAACGAGCCTATCCTTGACCGAGAGGTCCGGGT-------
                ***************************************************
```

รูปที่ 4.10 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Neochloris* sp.

4.2.4.6 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Scenedesmus* sp.

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียว 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย 8641 และ L มาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดอยู่ระหว่าง 1,300-1,700 คู่เบส (ตารางที่ 4.2) มีความเหมือนกับฐานข้อมูลธนาคารยีนของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. (Accession number JQ315576.1) 97-99 เปอร์เซ็นต์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท L ในช่วงประมาณ 540-820 คู่เบส เป็นบริเวณที่มีเบสเกินแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท 8641 และ *Scenedesmus* sp. เมื่อนำเบสในช่วงนี้ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลธนาคารยีนพบว่าไม่สามารถระบุชนิดได้ เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 2 ไอโซเลท อยู่ในจีนัส *Scenedesmus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Scenedesmus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
Scenedesmus     ATTCGGCATGGTTACTTTGAGTAAATTGGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCGTGAACAT
L_F1nR1         ATTCGGCATGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCGTGAATAC
8641_F1nR1      ATTCGGCATGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTGAATAC
                *************************** ******************** ******** *

Scenedesmus     TTTAGCATGGAATAACATGATAGGACTCTGCCCTATTCTGTTGGCCTGTAGGAGTGGAGT
L_F1nR1         TTTAGCATGGAATAACATGATAGGACTCTGCCCTATTCTGTTGGCCTGTAGGAGTGGAGT
8641_F1nR1      TTTAGCATGGAATAACATAATAGGACTCTGCCCTATTTTGTTGGCCTGTAGGAGTGGAGT
                ******************* ******************* **********************

Scenedesmus     AATGATTAAGAGGAACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGGAATTCTTGG
L_F1nR1         AATGATTAAGAGGAACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGG
8641_F1nR1      AATGATTAAGAGGAACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGG
                ************************************************** *********

Scenedesmus     ATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA
L_F1nR1         ATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA
8641_F1nR1      ATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA
                ************************************************************

Scenedesmus     CGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCC
L_F1nR1         CGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCC
8641_F1nR1      CGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCC
                ************************************************************

Scenedesmus     GACTAGGGATTGGCGGACGTTTTTGCATGACTCCGTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGT
L_F1nR1         GACTAGGGATTGGCGGACGTTTTTGCATGACTCCGTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGT
8641_F1nR1      GACTAGGGATTGGCGGACGTTTTTGCATGACTCCGTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGT
                ************************************************************

Scenedesmus     TTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGG
L_F1nR1         TTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGG
8641_F1nR1      TTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGG
                ************************************************************

Scenedesmus     CACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTC
L_F1nR1         CACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTC
8641_F1nR1      CACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTC
                ************************************************************

Scenedesmus     CAGACATAGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCA
L_F1nR1         CAGACATAGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCA
8641_F1nR1      CAGACATAGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCA
                ************************************************************

Scenedesmus     TGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGTCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTC
L_F1nR1         TGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGTCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTC
8641_F1nR1      TGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGTCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTC
                ************************************************************

Scenedesmus     AGCCTTTAAATAGTCACTGTCGCTTTTTGCGGCTGGCT-TTGACTTCTTAGAGGGACAGT
L_F1nR1         AGCCTTTAAATAGTCACAGTCGCTTTTTGCGGCTGGCT-TTGACTTCTTAGAGGGACAGT
8641_F1nR1      AGCCTTTAAATAGTCACTGTCGCTTTTTGCGGCTGGCTTTTGACTTCTTAGAGGGACAGT
                ***************** ******************* **********************

Scenedesmus     TGGCGTTTAGTCAACGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCT
L_F1nR1         TGGCGTTTAGTCAACGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCT
8641_F1nR1      TGGCGTTTAGTCAACGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCT
                ************************************************************

Scenedesmus     GGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCCTTGCCGAAAGGCACGG
L_F1nR1         GGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCCTAGCCGAAAGGCTCGG
8641_F1nR1      GGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCCTAGCCGAAAGGCTCGG
                ********************************************* ********** ***

Scenedesmus     GTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCTTCAACGA
L_F1nR1         GTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCTCAACGAT
8641_F1nR1      GTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTA----------------------
                ************************************
```

รูปที่ 4.11 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Scenedesmus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. จากการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียว 15 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยด้วยวิธีการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA สรุปได้ว่าสามารถระบุชนิดสาหร่ายสีเขียว 15 ไอโซเลท แบ่งได้เป็น 6 ชนิด ประกอบด้วยสาหร่าย *Chlorella* sp. 9 ไอโซเลท, *Coelastella* sp., *Coelastrum* sp., *Micractinium* sp., *Neochloris* sp. ชนิดละ 1 ไอโซเลท และ *Scenedesmus* sp. 2 ไอโซเลท

2. การระบุชนิดของสาหร่ายสีเขียวโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S rDNA ระบุได้ถึงระดับจีนัสเท่านั้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

การระบุถึงระดับสายพันธุ์ต้องทำการวิเคราะห์วิธีอื่น เช่น การศึกษาจีโนมของสาหร่าย หรือการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Internal transcribed spacer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กวี สุจิปุลิ. 2547. “พันธุศาสตร์โมเลกุลเบื้องต้น.” [Online].Available: http://conf.agi.nu.ac.th/webnewasp/ereading/gene/unit5.pdf.

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552. อณูพันธุศาสตร์เบื้องต้น. มหัศจรรย์ของดีเอ็นเอ. กรุงเทพ : แอคทีฟ พริ้นท์ จำกัด.

พจน์ ศรีบุญลือ, พัชรี บุญศิริ, ชฎามาศ พินิจสุนทรและเปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์. 2555. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 6.ขอนแก่น:ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภาสกร สกุลศิลปกร. 2549. “สาหร่ายสีเขียว Division Chlorophyta.” [Online]. Available: http://knowledge.eduzones.com/knowledge-2-5-28773.html.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2556. สาหร่ายน้ำจืดในประเทศไทย.พิมพ์ครั้งที่2. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. “ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.” [Online]. Available: https://th.wikipedia.org/wiki/ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.

Baldisserotto, C. Ferroni, L. Giovanardi, M. Boccaletti, L. Pantaleoni L. and Pancaldi S. 2012. “Salinity promotes growth of freshwater Neochlorisoleoabundans UTEX 1185 (Sphaeropleales, Chlorophyta): morphophysiological aspects.” Phycologia. 51(6) : 700-710.

Bold, H.C. and Wynne, M.J. 1978. “Introduction to the algae : structure and reproduction” Englewood Cliffs, New Jersey : Prentice-Hall.

Center University of Minnesota. 2016. *Chlamydomonas* Resource.[Online]. Available: http://www.chlamycollection.org.

Gopanenko, A.V. Malygin, A.A. and Karpova, G.G. 2015. “Exploring human 40S ribosomal proteins binding to the 18S rRNA.” BiochimicaetBiophysicaActa. 1854 : 101-109

Haddad, R. Alemzadeh, E. Ahmadi A.R. Hosseini, R. and Moezzi, M 2014. “Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf.” Iran J Microbiol. 6(6): 437–442.

Heeg, J.S. and Wolf, M. 2015. “ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of Chlorella and allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae).” Plant Gene. : 20-28.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hoshina, R. 2014. "DNA analyses of a private collection of microbial green algae contribute to a better understanding of microbial diversity." BMC Research Notes. 7:592.

Luo, W. Pflugmacher, S. Schold, T.P. Walz, N. and Krienitz, L. 2006. "Genotype versus Phenotype Variability in Chlorella and Micractinium (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)." Protist. 157: 315-333.

M.D. Guiry in Guiry, M.D. andGuiry, G.M. 2016. *Caulerparacemosa*.[Online]. Available: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=1221.

Protist information server. 2016. Chlorophyta. [Online]. Available: http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta.

Rasoul-Amini, S. Ghasemi, Y. Morowvat, M. H. and Mohagheghzadeh, A. 2009. "PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae." Food Chemistry. 116 : 129-136.

Roy, A.S. and Pal, R. 2015. "An investigation on Morphotaxonomy and Diversity of Planktonic Chlorophytes from fresh water Eutrophic Wetland of Indian Ramsar Site." Phykos. 45(2): 29-42.

Science information. 2012. Polymerase chain reaction (PCR).[Online]. Available: http://scienceinfoworld.blogspot.com/2012/11/polymerase-chain-reaction-pcr.html.

University of New Hampshire. 2016. Chlorophyceae.[Online]. Available: http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae.

Uzunov, B.A. Stoyneva, M.P. Gartner, G. and Kofler W. 2008. "First record of Coelastrella species (Chlorophyta: Scenedesmaceae) in Bulgaria." Ber. nat.-med. Verein Innsbruck. 95 : 27-34.

Winnebeck, E.C. Millar, C.D. and Warman, G.R. 2010. "Why does insect RNA look degraded?" Journal of Insect Science. 10(159).

Wongsawad, P. and Peerapornpisal, Y. 2014."Morphological and molecular profiling of Spirogyra from northeastern and northern Thailand using inter simple sequence repeat (ISSR) markers." Saudi Journal of Biological Sciences. 22(4) : 382-389.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP) (Harris, 1989)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP 1 ลิตร ประกอบด้วย

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร
Tris – Base	2.42	กรัม
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)	1	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.5		
Agar	15	กรัม

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ Trace mineral solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ประกอบด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับพีเอช 6.5 ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วเติมสารตามด้านล่างทีละตัว ตามลำดับ

เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิบเดรตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะมีสีเหลืองเขียวเปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้นเติมสารตามด้านล่างเพิ่ม ตามลำดับ

20 มิลลิลิตร 1M Stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock 6.8 กรัมต่อ 50 มล.)

30 มิลลิลิตร 1M Stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock 8.7 กรัมต่อ 50 มล.)

ปรับพีเอช 7.2 นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani medium (LB) (Bertani et al, 1951)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB agar ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

เปปโตน (Peptone)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	10	กรัม

ปรับพีเอชให้ได้ 7.4

นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี Tris-Boric-EDTA (TBE buffer)

การเตรียม 5X TBE buffer

ละลาย Tris-base 54 กรัม และ Boric acid 27.5 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม EDTA ควมเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปรับพีเอช 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

การเตรียม 1X TBE buffer

กรณีใช้ในการตรวจสอบขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส นำ 5X TBE buffer 100 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีการคำนวณ

สูตรหาปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

$$\text{ปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอ} = \frac{\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน (ng)}}{\text{ผลรวมของขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน}} \times (\text{ขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้เทียบ}) \times \frac{\text{ความเข้มของขนาดดีเอ็นตัวอย่าง (เท่า)}}{\text{ปริมาตรการหยอดดีเอ็นเอตัวอย่าง (µl)}}$$

ตัวอย่าง กรณีใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII)

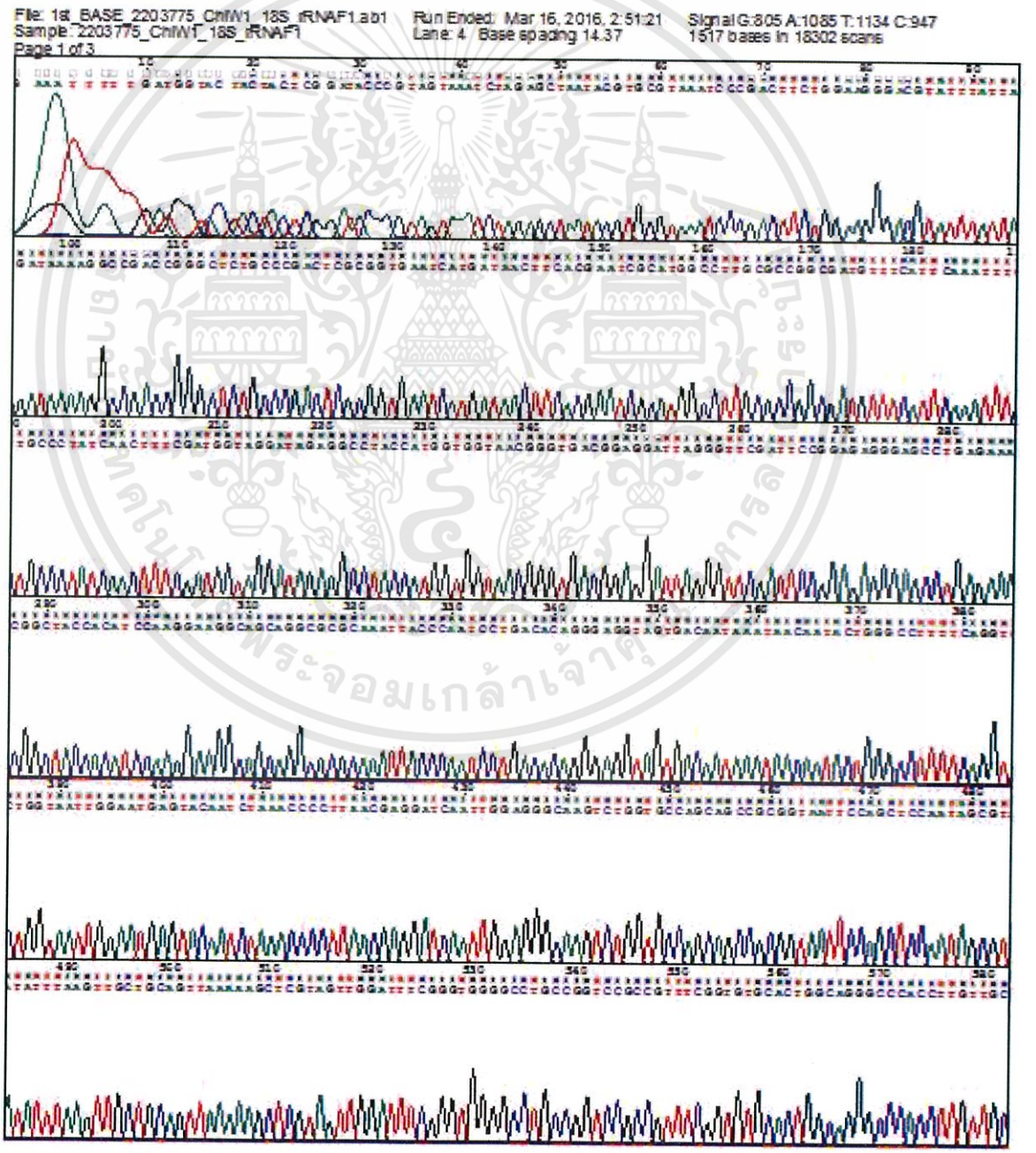
$$\text{ปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอ} = \frac{500\ (\text{ng})}{48{,}500} \times (\text{ขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้เทียบ}) \times \frac{\text{ความเข้มของขนาดดีเอ็นตัวอย่าง (เท่า)}}{\text{ปริมาตรการหยอดดีเอ็นเอตัวอย่าง (µl)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

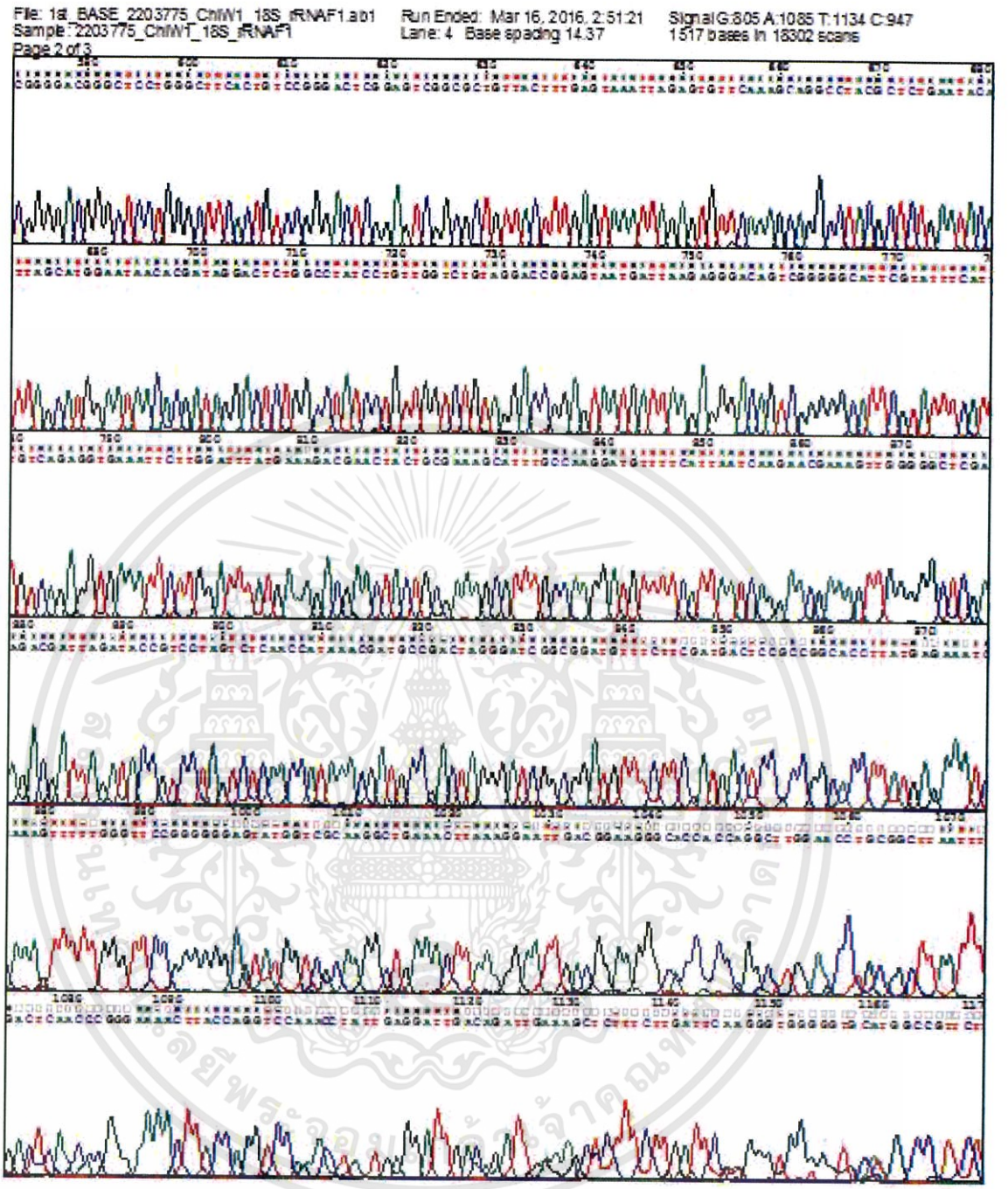
ภาคผนวก จ

แสดงภาพโครมาโตแกรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท ChiW1 ที่เพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วย ไพรเมอร์ 18S rRNAF1 (5’-CTGCGAATGGCTCATTAAATC-3’) และ 18S rRNAR1 (5’-AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3’) ที่ได้รับจากบริษัท First Base จำกัด ประเทศมาเลเซีย

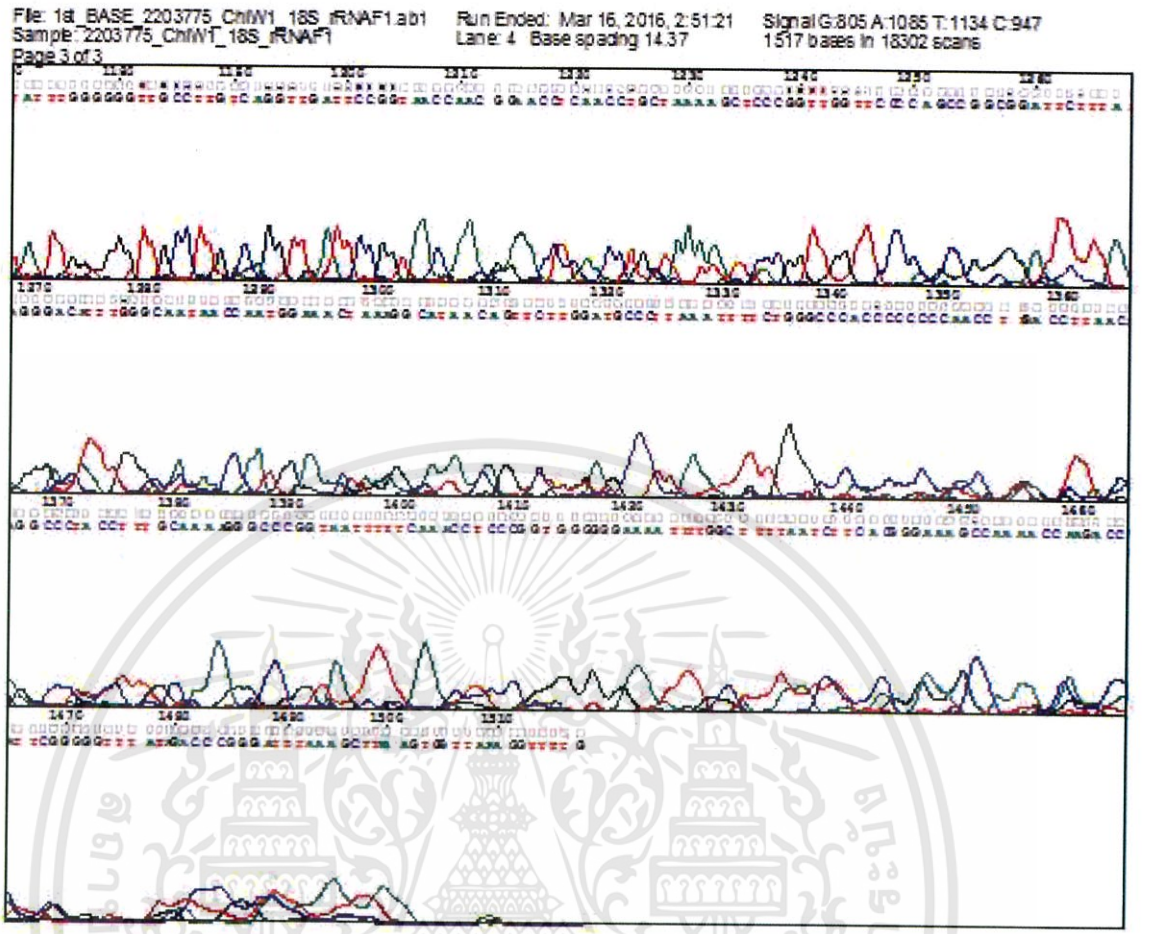
แสดงภาพโครมาโตแกรมของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท ChiW1 ที่เพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยไพรเมอร์ 18S rRNAF1 (5’-CTGCGAATGGCTCATTAAATC-3’)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

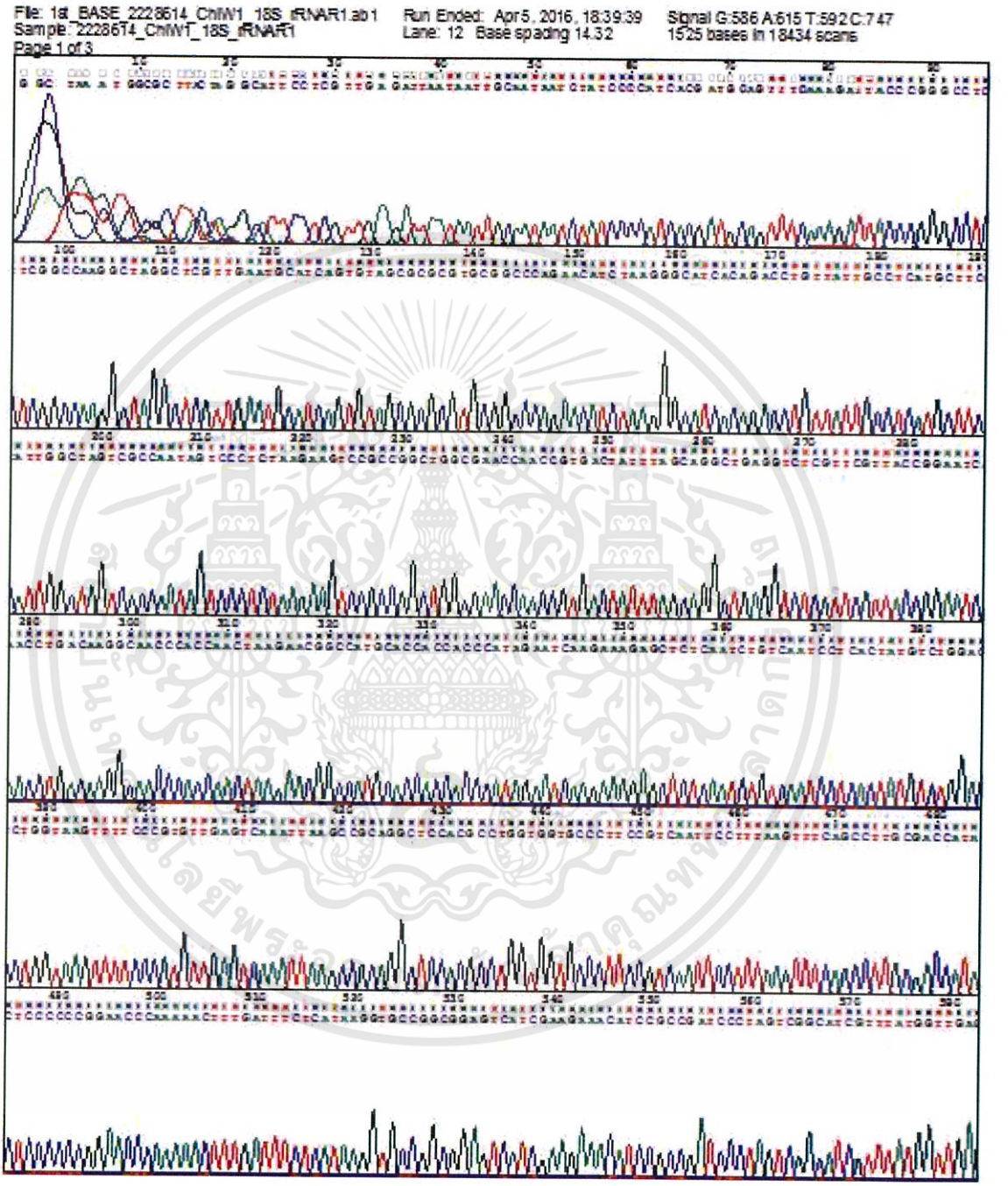


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

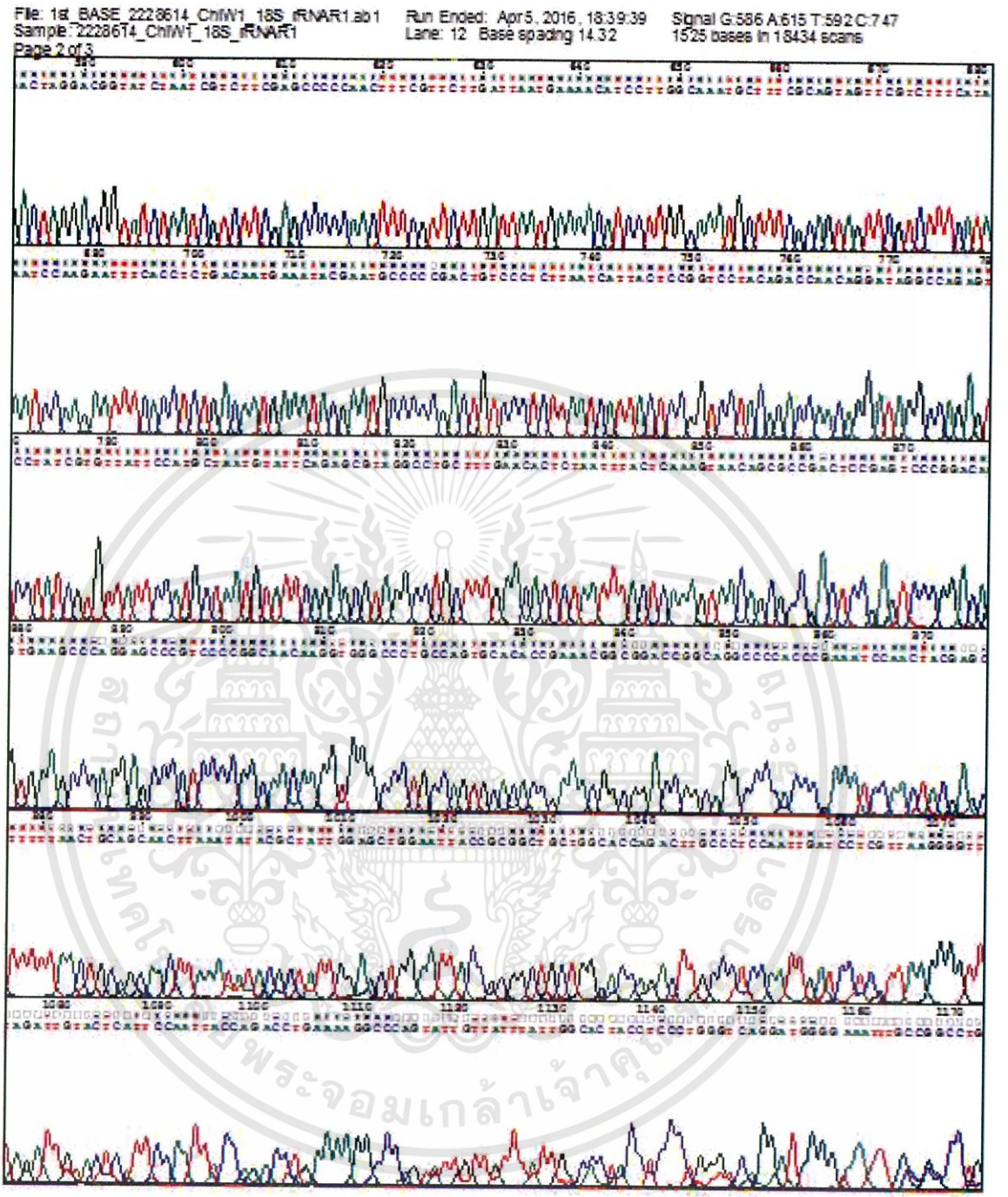


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

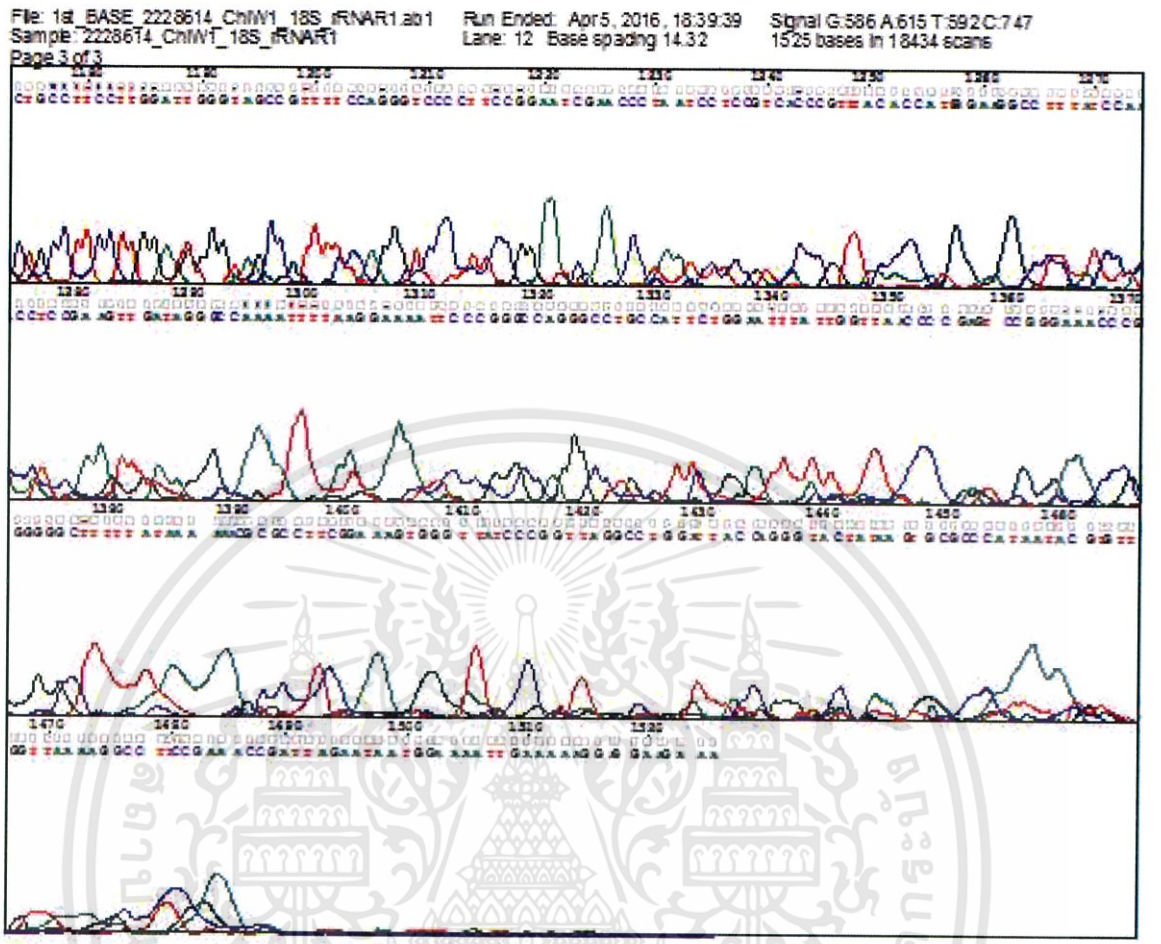
แสดงภาพโครมาโตแกรมของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท ChiW1 ที่เพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ด้วยไพรเมอร์ 18S rRNAR1 (5’-AAGGCCAGGGACGTAATCAA-3’)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้