โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ปริมาณเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์บางชนิด

Cellulose content of cell wall of some chlorophyte and streptophyte algae

ชื่อนิสิต นางสาวกาญจนา เรือนผาม **เลขประจำตัว** 5832104023

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ปริมาณเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์บางชนิด

นางสาวกาญจนา เรือนผาม

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

Cellulose content of cell wall of some chlorophyte and streptophyte algae

Miss Karnjana Ruen-pham

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Bachelor of Science in Botany
Department of Botany
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2018

ชื่อเรื่อง	ปริมาณเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์บางชนิด
ชื่อนิสิต	กาญจนา เรือนผาม
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.มานิต คิดอยู่)

สิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ปริมาณเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์บางชนิด
ชื่อนิสิต	กาญจนา เรือนผาม
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

ผนังเซลล์เป็นลักษณะเฉพาะที่ปรากฏในกลุ่มสิ่งมีชีวิตบางกลุ่ม เช่น สิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Viridiplantae ซึ่งประกอบด้วยสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และกลุ่มสเตรปโตไฟต์ โดยผนังเซลล์ของ Viridiplantae นั้นประกอบด้วยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันนี้ข้อมูลปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสของสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์ยังขาดแคลน งานวิจัยนี้จึงศึกษาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายทั้งสองกลุ่ม เพื่อศึกษาปริมาณองค์ประกอบของของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสของสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์ ได้แก่ *Cladophora* sp., *Oedogonium* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp. และสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์ ได้แก่ *Spirogyra* sp. และ *Nitella* sp. โดยใช้วิธี 1) การย้อมด้วยสีย้อม Calcofluor white 2) การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย และ 3) การวิเคราะห์ทรานสคริปโตม (transcriptome) ผลการย้อมด้วย Calcofluor white และการวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวลสาหร่ายพบว่าสาหร่ายทั้งหกชนิดมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของสาหร่ายดังกล่าวที่พบยีนส์ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างที่ใช้สังเคราะห์เซลลูโลส และจากการวิเคราะห์มวลชีวภาพของสาหร่ายทั้งห้าชนิด พบว่า *Cladophora* sp. เป็นสาหร่ายที่มีมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสปริมาณมากที่สุดซึ่งเท่ากับ 34.92% ของมวลชีวภาพ

คำสำคัญ: สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์, สาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์, เซลลูโลส, โครงสร้างที่ใช้สังเคราะห์เซลลูโลส

Title	Cellulose content of cell wall of some chlorophyte and streptophyte algae
Student name	Karnjana Ruen-pham
Program	Botany
Department	Botany
Advisor	Dr. Anchittha Satjarak
Co-advisor	Associate Professor Dr. Sehanat Prasongsuk
Academic year	2017

Abstract

Cell wall plays significant role in Viridiplantae as it is one of the major cell components giving strength to plant cells. The main component of plant cell wall is cellulose. However, the knowledge of the cell wall component of Viridiplantae, the group of green organisms that consists of two main lineages – chlorophyte algae and streptophytes, is limited. To obtain more information of the main component of the cell wall namely cellulose, we investigated the presence and the content of cellulose present in cell walls of six green algae – *Cladophora* sp., *Oedogonium* sp., *Microspora* sp. and *Pithophora* sp. (chlorophyte algae) and *Spirogyra* sp. and *Nitella* sp. (streptophyte algae) using three techniques including 1) Calcofluor white staining, 2) biomass analyses, and 3) transcriptome analyses. Results from microscopic and biomass analyses showed that cellulose was present in cell wall of the six algae, which was congruent with results from transcriptome analyses where we found putative gene sequences that might be encoding for cellulose synthesizing complexes. In addition, of all five algae, *Cladophora* sp. had the highest cellulose content in the cell wall, which was equal to 34.92% of its biomass.

Keywords: chlorophyte algae, streptophyte algae, cellulose, cellulose synthesizing complexes

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อัญชิษฐา สัจจารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาและกำลังใจตลอดการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.มานิต คิดอยู่ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.วิชาณี แบนคีรี ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และกรุณาช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณโครงการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาสนับสนุนทุนวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้สารเคมี อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงงานวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่กรุณาอุดหนุนค่าใช้จ่ายในการเรียน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้องและเพื่อนฝูง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่ตลอดมา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การตรวจเอกสาร	3
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	6
4 ผลการศึกษา	17
5 อภิปรายผลการศึกษา	35
6 สรุปผลการศึกษา	39
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	46
ภาคผนวก ก	47
ภาคผนวก ข	49

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ	18
2	ผลการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีนด้วยเทคนิคการการแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจล	20
3	แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Cladophora* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน 23S rDNA ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์	24
4	แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Nitella* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน 23S rDNA ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์	25
5	แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน 23S rDNA ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์	26
6	แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Microspora* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน *rbc*L ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์	27
7	แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Microspora* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน *rbc*L ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์	28
8	ภาพของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ	30
9	ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา	32
10	แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโนของสาหร่าย *Cladophora glomerata*, *Spirogyra* sp. และ cellulose synthase ของแบคทีเรีย สาหร่ายสเตรปโตไฟต์และพืชด้วยวิธี Maximum-likelihood	34

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การระบุชนิดสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ	19
2	การแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย	19
3	ลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีนในสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา	21
4	เปอร์เซ็นต์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย	31
5	ปริมาณเซลลูโลสเฉลี่ยจากการสกัดและการปรากฏของเซลลูโลสแต่ละชนิด	

บทที่ 1
บทนำ

ผนังเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช เช่น ทำหน้าที่คงรูปร่าง ป้องกันการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์ เพิ่มความแข็งแรง และคัดกรองสารที่เข้าออกเซลล์ (Evert, 2006) ซึ่งการปรากฏของผนังเซลล์นี้เป็นลักษณะเฉพาะที่ปรากฏในกลุ่มสิ่งมีชีวิตบางกลุ่ม เช่น สิ่งมีชีวิตกลุ่ม Viridiplantae ในผนังเซลล์ของ Viridiplantae นั้นประกอบด้วยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โดยมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก (Popper et al., 2011; Sørensen et al., 2011; Fangel et al., 2012) ซึ่งเซลลูโลสนี้ถูกสังเคราะห์จากโครงสร้างที่เรียกว่า cellulose synthesizing complexes (CSCs) ประกอบด้วย protein subunits ที่สร้างจาก Golgi apparatus แล้วขนส่งไปยังบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อสังเคราะห์เซลลูโลสในผนังเซลล์ (Tsekos, 1999)

จากการศึกษาโครงสร้างของ CSCs ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Viridiplantae ด้วยวิธี freeze fracture นั้นพบว่าโครงสร้างดังกล่าวปรากฏที่บริเวณพื้นผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ และจากการสังเกตลักษณะการเรียงตัวของ CSC subunits พบโครงสร้างของ CSCs สองชนิด ได้แก่ 1) rosette terminal complex (rosette TC) ที่ประกอบไปด้วย 6 subunits ของ CSCs ที่มีโครงสร้างเรียงตัวเป็นวงคล้ายดอกกุหลาบ สามารถพบได้ใน Viridiplantae กลุ่มสเตรปโตไฟต์ เช่น สาหร่ายสีเขียว *Spirogyra* sp. (Herth, 1983) และในพืช เช่นถั่วอะซูกิ *Vigna angularis* (Kimura et al., 1999) และ 2) linear terminal complex (linear TC) ที่ประกอบไปด้วย 1-3 แถวของ subunits ของ CSCs ที่มีโครงสร้างเรียงตัวกันเป็นเส้นตรง (Saxena and Brown, 2005) สามารถพบได้ใน Viridiplantae ทั้งในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และกลุ่มสเตปโตไฟต์ เช่น สาหร่ายทะเลสีเขียว *Valonia macrophysa* (Itoh and Brown, 1984) และ *Boergesenia forbesii* (Kudlicka et al., 1987)

นอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ CSCs และเซลลูโลสไมโครไฟบริล (cellulose microfibril) พบว่า ชนิดของ CSCs ที่ต่างกัน ส่งผลให้ชนิดของเซลลูโลสที่ปรากฏแตกต่างกัน จึงเกิดสมมติฐานที่ว่า rosette TC จะสังเคราะห์เซลลูโลสชนิดบีตาเซลลูโลส (cellulose I_β) ที่มีโครงสร้างผลึกแบบโมโนคลินิก (monoclinic) เช่น สาหร่ายสีเขียว *Micrasterias denticulata* และ *M. rotate* (Kim et al., 1996) และ linear TC จะสังเคราะห์เซลลูโลสชนิดอัลฟาเซลลูโลส (cellulose I_α) ที่มีโครงสร้างผลึกแบบไตรคลินิก (triclinic) (Tsekos, 1999) เช่น สาหร่ายสีเขียว *Cladophora glomerata* (Xiang et al., 2016)

แม้ว่าการปรากฏของผนังเซลล์จะเป็นลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Viridiplantae อย่างไรก็ตามลักษณะของผนังเซลล์นี้ไม่ได้ปรากฏในสิ่งมีชีวิตที่เป็นบรรพบุรุษของ Viridiplantae และในกลุ่มสาหร่ายดึกดำบรรพ์จำพวก prasinophyte แต่การปรากฏของผนังเซลล์มีการวิวัฒนาการเกิดขึ้นในภายหลังทั้งในกลุ่มสาหร่ายคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์ ดังนั้นเพื่อเพิ่มความเข้าใจการเกิดวิวัฒนาการของการปรากฏเซลลูโลสในผนังเซลล์ของ Viridiplantae มากยิ่งขึ้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์บางชนิด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาปริมาณเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์บางชนิด
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของผนังเซลล์ในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์บางชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ปริมาณเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์บางชนิด
2. ได้เรียนรู้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของผนังเซลล์ในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์
3. ได้เรียนรู้เทคนิคและฝึกฝนทักษะทางวิทยาศาสตร์ในภาคปฏิบัติ

บทที่ 2
การตรวจสอบเอกสาร

1. ผนังเซลล์

ผนังเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การพัฒนา และการป้องกันตัวเองของเซลล์ด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ห่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์มีความแข็งแรง แต่ยังสามารถขยายขนาดเพื่อเจริญหรือตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว (Domozych, 2015) โดยผนังเซลล์จะพบในสิ่งชีวิตบางกลุ่มเท่านั้น เช่น สิ่งมีชีวิตกลุ่ม Viridiplantae ที่ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตสองกลุ่ม ได้แก่

1.) สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์ (chlorophyte algae)
2.) กลุ่มสเตรปโตไฟต์ (streptophyte) ซึ่งประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตอีกสองกลุ่ม คือสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์ (streptophyte algae) และพืช (embryophyte)

นอกจากนี้สาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์ประกอบด้วยสาหร่ายที่มีความหลากหลายของลักษณะสัณฐานวิทยามากกว่าหนึ่งพันชนิด ซึ่งพบได้ตั้งแต่สาหร่ายเซลล์เดียว (*Mesostigma viride*) สาหร่ายที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (*Scenedesmus acuminatus*) สาหร่ายที่เป็นเส้นสาย (*Spirogyra neglecta*) ตลอดจนสาหร่ายหลายเซลล์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน (*Chara corallina*) ซึ่งนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์นี้เป็นบรรพบุรุษของพืชเนื่องจากเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับพืชมากที่สุด โดยสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์เป็นสาหร่ายน้ำจืดที่สามารถยึดครองสภาพแวดล้อมที่แห้งได้อย่างช้า ๆ ผ่านเหตุการณ์ทางวิวัฒนาการเพื่อปรับตัวด้านสรีรวิทยาและโครงสร้าง ทำให้สาหร่ายเหล่านี้สามารถทนต่อความเครียดในสภาพแวดล้อมบกได้ เช่น รังสียูวี การขาดน้ำ ดังนั้นการพัฒนาโครงสร้างของผนังเซลล์จึงมีบทบาทสำคัญมาก (Popper et al., 2011; Sørensen et al, 2011, 2012; Buschmann and Zachgo, 2016)

ผนังเซลล์ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นเส้นใย (fibrillar polysaccharides) ของเซลลูโลส (cellulose) ที่ถูกตรึงอยู่ในเมทริกซ์ (matrix) และประกอบด้วยพอลิแซ็กคาร์ไรด์ชนิดอื่น ๆ โปรตีน และน้ำ (Domozych, 2015)

1.1. เซลลูโลส

เซลลูโลส คือ พอลิแซ็กคาไรด์ของกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β-1,4 จัดเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ มีลักษณะเป็น unbranched crystalline strand ที่เรียกว่า เซลลูโลสไมโครไฟบริล (cellulose microfibril) ซึ่งมีคุณสมบัติไบรีฟริงเจนซ์ (birefringence) โดยสามารถสังเกตคุณสมบัติไบรีฟริงเจนซ์ของเซลลูโลสนี้ได้จากการปรากฏของ pseudo-color ภายใต้แสงโพลาไรซ์ (Deguchi, Tsujiib, and Horikoshi, 2006)

สิ่งมีชีวิตกลุ่ม Viridiplantae พบเซลลูโลสไมโครไฟบริลเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ โดยเซลลูโลสไมโครไฟบริลที่สังเคราะห์จากสิ่งมีชีวิตจะเรียกว่า เซลลูโลสวัน (cellulose I) เป็นสายเซลลูโลสไมโครไฟบริลที่ขนานกันและมีโครงสร้างผลึกต่างแตกกันสองชนิด (Domozych, 2015) ได้แก่

1.) อัลฟาเซลลูโลส (cellulose I_α) มีโครงสร้างผลึกแบบไตรคลินิก (triclinic) ซึ่งพบได้มากในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์ โดยการรายงานของ Sucaldito และ Camacho (2017) พบว่าสาหร่าย *Cladophora rupestris* พบ cellulose I_α ถึง 88.0% และพบได้ในแบคทีเรีย โดยการรายงานของ Yan และคณะพบ cellulose I_α ในแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

2.) บีตาเซลลูโลส (cellulose I_β) มีโครงสร้างผลึกแบบโมโนคลินิก (monoclinic) ซึ่งพบได้มากในสิ่งมีชีวิตกลุ่มสเตรปโตไฟต์ โดยไม่มีการรายงานปริมาณ cellulose I_β ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ (Moon et al., 2010)

เซลลูโลสถูกสังเคราะห์จากโครงสร้างที่เรียกว่า cellulose synthesizing complexes (CSCs) ซึ่งมียีน Cellulose synthase (*Ces*A) ควบคุมการเรียงตัวของ cellulose synthase subunit เพื่อประกอบเป็น CSCs จากการศึกษาโครงสร้างด้วยวิธี freeze-fracture โดย Roberts, Roberts และ Delmer (2002) และการศึกษาโดย Tsekos (1999) พบการเรียงตัวของ cellulose synthase subunits ที่แตกต่างกัน จึงเกิดเป็นสมมติฐานดังนี้

1.) rosette terminal complex (rosette TC) ประกอบด้วย cellulose synthase subunits จำนวน 6 subunit ที่เรียงเป็นวง มีรูปร่างคล้ายดอกกุหลาบ สามารถพบได้ใน Viridiplantae กลุ่มสเตรปโตไฟต์ เช่น สาหร่ายสีเขียว *Spirogyra* sp. (Tsekos, 1999) และในพืช เช่น ถั่วอะซูกิ *Vigna angularis* (Kimura et al, 1999) ซึ่ง rosette TC จะสังเคราะห์บีตาเซลลูโลส

2.) linear terminal complex (linear TC) ประกอบด้วย cellulose synthase subunits ที่เรียงตัวกันเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 1-3 แถว (Saxena and Brown, 2005) สามารถพบได้ใน Viridiplantae ทั้งสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และกลุ่มสเตรปโตไฟต์ เช่น สาหร่ายทะเลสีเขียว *Valonia macrophysa* (Itoh and Brown, 1984) และ *Boergesenia forbesii* (Kudlicka et al, 1987) และพบได้ในแบคทีเรีย เช่น *Acetobacter xylinum* (Yan et al., 2008) ซึ่ง linear TC จะสังเคราะห์อัลฟาเซลลูโลส

2. เทคนิคการศึกษาเซลลูโลสไมโครไฟบริล

2.1 การย้อมด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye)

สารเรืองแสง Calcofluor white เป็นสีย้อมที่จับกับโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β-1,4 หากตัวอย่างที่ถูกย้อมมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ส่งผลให้สีย้อมดังกล่าวสามารถเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แหล่งกำเนิดแสงแบบ UV (Galbraith, 1981) นอกจากนี้แล้วการใช้สีย้อมชนิดนี้ยังสามารถใช้ประมาณปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีพันธะ β-1,4 ในตัวอย่างที่ถูกย้อมได้ เช่น ในการศึกษาของ Herth และ Schnepf (1980) พบว่าผนังเซลล์และขนแข็ง (bristle) ในสาหร่าย *Acanthosphaera zachariasi* ที่จัดอยู่ในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์ มีเซลลูโลสไมโครไฟบริลจากการเรืองแสงสีน้ำเงินของ Calcofluor white และการศึกษาของ Herburger และ Holzinger (2016) พบว่าผนังเซลล์ของสาหร่ายสกุล *Zygnema* และ *Klebsormidium* เรืองแสงสีน้ำเงินของ Calcofluor white เช่นกัน

2.2 การใช้วิธีทางเคมี

การใช้วิธีทางเคมีด้วยการใช้วิธีการของ Siddhanta และคณะ (2011) โดยอาศัยคุณสมบัติการละลายของอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสใน sodium hydroxide ความเข้มข้น 17.5% (w/w) ซึ่งได้รายงานอัตราส่วนของอัลฟาและบีตาเซลลูโลสที่พบในสาหร่ายทะเลจำนวน 21 ชนิด นอกจากนี้ยังพบวิธีการวิเคราะห์ T203 cm-99 ที่อาศัยคุณสมบัติการละลายของของอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสใน sodium hydroxide ความเข้มข้น 17.5% (w/w) และการไทเทรตกับ potassium dichromate เพื่อหาปริมาณอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลส (TAPPI, 1999) เช่น การรายงานของโศรดา ชารีฟ และอภิตา (2560) ใช้วิธีการวิเคราะห์ T203 cm-99 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสในเปลือกมะพร้าวอ่อน

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา

1. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1. วัสดุ อุปกรณ์

1.1.1. อุปกรณ์สำหรับการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน

- กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ Nikon eclipse E100 (Nikon Corporation, Japan)

1.1.2. อุปกรณ์สำหรับการแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย

- ปากคีบและเข็มเขี่ย
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
- เครื่องพ่นอากาศขนาด 1.5 ลิตรต่อนาที
- Petri dish

1.1.3. อุปกรณ์สำหรับการระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาวิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ

- ปิเปตต์ทิป
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
- เครื่องเซนตริฟิวจ์ รุ่น MicroCen 13 (Herolab, Germany)
- ปิเปตต์ รุ่น One Touch Single-channel 0.5-10 µL Mµlti และ 2 - 20 µL Mµlti (Biosigma, Italy)
- 0.2 ml PCR Tubes with Attached Bubble Caps (KIRGEN, China)
- Gel document analysis set (Bio-Rad Laboratories, USA)
- GeneJET Genomic DNA Purification Columns pre-assembled with Collection Tubes (Thermo Fisher Scientific, USA)
- PCR machine รุ่น PTC-100™ programmable Thermal Controller (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Stainless steel beads

1.1.4. อุปกรณ์สำหรับการศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์

- กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ Olympus BX51 (Olympus Corporation, Japan)

1.1.5. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย

- ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
- ตู้อบลมร้อน
- เตาเผาเถ้า
- ปั๊มสุญญากาศและชุดกรอง
- หม้อดูดความชื้น (Desiccator)
- Condenser และ heating mantle

- Sintered glass crucible เบอร์ 1

1.1.6. อุปกรณ์สำหรับการสกัดเซลลูโลสจากสาหร่าย

- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml และบีกเกอร์
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
- ตู้อบลมร้อน
- ปั๊มสุญญากาศและชุดกรอง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- หม้อดูดความชื้น (Desiccator)
- pH paper
- Sintered glass crucible เบอร์ 1

1.1.7. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสของสาหร่าย

- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml
- ตู้อบลมร้อน
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่อง microcentrifuge รุ่น Spectrafuge™ 16M (Labnet International, USA)
- กระดาษทดสอบค่า pH
- Sintered glass crucible เบอร์ 1

1.2. สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับการแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย

- soil medium

1.2.2 สารเคมีสำหรับการระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ

- 100bp DNA Ladder H3 RTU (GeneDireX, Taiwan)
- 10X Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer, pH8.3, Ultra Pure Grade (Vivantis, Malaysia)
- Green PCR Master Mix (biotechrabbit, Germany)
- Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Fisher Scientific, England)
- LE agarose (QP product, USA)
- Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

1.2.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์

- Calcofluor white (Sigma-Aldrich, USA)
- Potassium hydroxide (KOH) ความเข้มข้น 10%

1.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย

- Acetone
- Acid detergent
- Combined permanganate

- Decahydronaphthalene (Merck, Germany)
- Demineralizing
- Ethanol ความเข้มข้น 80% (v/v)
- Neutral detergent
- Sodium sulfite ($NaSO_3$)

1.2.5 สารเคมีสำหรับการสกัดเซลลูโลสจากสาหร่าย

- Hydrochloric acid (HCl) ความเข้มข้น 5% (v/v)
- Sodium chlorite ($NaClO_2$) (Ajex, France)
- 0.1 M Sodium acetate buffer pH 4.8
- 0.5 M Sodium hydroxide (NaOH)

1.2.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสของสาหร่าย

1) Sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 17.5% (w/w)
2) 3 N Sulfuric acid

2. วิธีการดำเนินการศึกษา

2.1 การระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน

เก็บสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ บันทึกชื่อและหมายเลขผู้เก็บ วันเดือนปีที่เก็บ และสถานที่เก็บ นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ Nikon eclipse E100 และระบุชนิดของสาหร่ายด้วย identification key ชื่อ How to know the fresh-water algae โดย Gerald Weber Prescott (1954)

2.2 การแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย

แยกสาหร่ายให้เป็น uni-algal culture (Andersen, 2005) เพาะเลี้ยงสาหร่ายใน soil medium ที่สภาวะอุณหภูมิ 25-26°C ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์จำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน และเติมอากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาด 1.5 ลิตรต่อนาที

2.3 การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ

สกัดดีเอ็นเอสาหร่ายด้วย Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้ประกอบด้วยดีเอ็นเอจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียที่ใช้สำหรับระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ จากนั้นเลือกเครื่องหมายยีน (gene marker) ที่เหมาะสมกับสกุลของสาหร่าย จากการเปรียบเทียบข้อมูลเครื่องหมายยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank® (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ซึ่งเครื่องหมายยีนที่ถูกคัดเลือกจะมีลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีนดังกล่าวของสกุลสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา จากการคัดเลือกเครื่องหมายยีนโดยรวบรวมข้อมูลจาก GenBank® ในวันที่ 13 เมษายน 2561 พบว่ามีเครื่องหมายยีนที่เหมาะสมต่อการระบุสกุลของสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 6 ยีน ดังนี้

- DNA internal transcribed spacer 2-5.8S ribosomal DNA (ITS2-5.8S rDNA)
- 18S ribosomal DNA (18S rDNA)
- 23S ribosomal DNA (23S rDNA)
- 28S ribosomal DNA (28S rDNA)
- ATP synthase beta subunit (*atp*B)
- ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L)

จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) จากการทบทวนวรรณกรรม พบไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีน ดังต่อไปนี้

3) ITS2-5.8S rDNA

Forward primer: CH-ITS-F6

5’-GATTGAATGGTCCGGTGAAGTG-3’

Reverse primer: FU-ITS-R8

5’-TGGGTCACACGATGCGTAGGGA-3’

ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที จากนั้นเข้าสู่วงรอบเพิ่มปริมาณจำนวน 31 รอบ โดยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 47°C นาน 2 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 66°C นาน 3 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 15 นาที (Sakayama et al., 2004)

4) 18S rDNA

Forward primer: SR-1

5’-TACCTGGTTGATCCTGCCAG-3’

Reverse primer: SR-12

5’-CCTTCCGCAGGTTCACCTAC-3’

ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 93°C นาน 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 2 นาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 3 นาที จำนวน 28 รอบ (Nakayama et al., 1996; Hanyuda et al., 2002)

5) 23S rDNA

Forward primer: p23SrV_f1

5’-GGACAGAAAGACCCTATGAA-3’

Reverse primer: p23SrV_r1

5-‘TCAGCCTGTTATCCCTAGAG-3’

ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 2 นาที จากนั้นเข้าสู่วงรอบเพิ่มปริมาณจำนวน 35 รอบ โดย ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 20 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 30 วินาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที (Sherwood and Presting, 2007)

6) 28S rDNA

Forward primer: F-SAS1

5’-TATGGCCGTACGTGTGCA-3’

Reverse primer: R-5.8S

5’-CCAAGAAATCCATTGTACAGTGT-3’

ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที จากนั้นเข้าสู่วงรอบเพิ่มปริมาณจำนวน 35 รอบ โดยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 15 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 15 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที (Taylor, Bailey, and Freshwaer, 2017)

7) *atp*B

External forward primer: *atpB*-175FZYG

5′-TRTWACYTGTGARGTACARCA-3′

External reverse primer: *atpB*-1404RZYG

5′-CYARRTARAACGCYTGTTCTGG-3′

Internal forward primer: *atpB*-700F

5′-TATGGTCAAATGAATGAACC-3′

Internal reverse primer: *atpB*-866R

5′-CCWACTGCAGAAGGCATAC-3′

ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 20 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 20 วินาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ โดยรอบที่หนึ่งใช้คู่ไพร์เมอร์ *atpB*-175FZYG + *atpB*-1404RZYG และรอบที่สองใช้คู่ไพร์เมอร์ *atpB*-700F + *atpB*-866R (Stancheva et al., 2013)

8) *rbc*L

Forward primer: RH1

5’-ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC-3’

Reverse primer: 1385R

5’-AATTCAAATTTAATTTCTTTCC-3’

สภาวะที่เหมาะสมตามวิธีดัดแปลงของ Drummond และคณะ (2005) ดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 2 นาที จากนั้นเข้าสู่วงรอบเพิ่มปริมาณจำนวน 34 รอบ โดยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 52°C นาน 30 วินาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 90 วินาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 4 นาที

ทดสอบผลการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีนด้วยเทคนิคการการแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจล (gel electrophoresis) บน 2% agarose gel เพื่อตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของเครื่องหมายยีน จากนั้นส่งผลผลิตของดีเอ็นเอไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank® โดยใช้โปรแกรม BLAST® (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) โดยใช้คำสั่ง blastn สำหรับค้นหาข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอจากฐานข้อมูลโดยใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน ITS2-5.8S rDNA, 18S rDNA, 23S rDNA และ 28S rDNA และ blastx สำหรับค้นหาข้อมูลของโปรตีนจากฐานข้อมูลโดยใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน *atp*B และ *rbc*L จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ตรวจสอบความถูกต้องและลำดับดีเอ็นเอของสาหร่าย (ภาคผนวก ข) มาวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ โดยการจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม MAFFT v 7.205 (Katoh and Standley, 2013) จากนั้น trim ลำดับดีเอ็นเอที่ผ่านการจัดเรียงตำแหน่งเทียบกันแล้ว โดยใช้คำสั่ง automated1 ด้วยโปรแกรม trimAL v 1.2 (Capella-Gutiérrez, Silla-Mart’ine, and Gabaldón, 2009) จากนั้นคำนวณ nucleotide substitution model ด้วยโปรแกรม jModelTest (Posada, 2008) แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม RAxML v 8.2.8 (Stamatakis, 2014) บน CIPRES XSEDE Portal (Miller, Pfeiffer, and Schwartz, 2010) และวิธีแบบเบย์ ด้วยโปรแกรม MrBayes v 3.2.6 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003)

2.4 การศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.4.1 การศึกษาลักษณะของผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ Olympus BX51 โดยใช้เทคนิค brightfield illumination

2.4.2 การศึกษาคุณสมบัติไบรีฟริงเจนซ์ของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ Olympus BX51 โดยใช้เทคนิค polarized illumination

2.4.3 การศึกษาลักษณะของเซลลูโลสในผนังเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Olympus BX51 โดยใช้เทคนิค fluorescence illumination ด้วยการย้อมสาหร่ายด้วย Calcofluor white (Herth and Schnepf, 1980)

วางสาหร่ายลงบนสไลด์ หยด Calcofluor white 1 หยด และ KOH ความเข้มข้น 10% 1 หยด วางกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ภายใต้แหล่งกำเนิดแสงแบบ UV ในห้องมืด

2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย

นำ sintered glass crucible เบอร์ 1 ขนาด 50 ml อบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำใส่หม้อดูดความชื้นจน sintered glass crucible อยู่ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกน้ำหนัก sintered glass crucible จากนั้นชั่งสาหร่าย *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. ที่ผ่านการอบแห้งจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ 60°C และบดจนละเอียดด้วยโกร่ง ชนิดละ 1 g นำมาวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) โดยนำสาหร่ายที่ผ่านการบดแล้วใส่ขวดก้นกลม เติม sodium sulfite 0.5 g, neutral detergent 100 ml และ decahydronaphthalene 2 ml เขย่าขวดก้นกลมให้สารเข้ากันเล็กน้อย นำขวดก้นกลมไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่สารเริ่มเดือด ถ่ายส่วนผสมที่รีฟลักซ์เสร็จลงใน sintered glass crucible ที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างสาหร่ายใน sintered glass crucible ด้วยน้ำร้อน 3-4 ครั้ง ล้างด้วย acetone 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยปั๊มสุญญากาศจนแห้ง นำ sintered glass crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำใส่หม้อดูดความชื้นจน sintered glass crucible อยู่ที่อุณหภูมิห้อง โดยบันทึกน้ำหนักที่แตกต่างกันของ sintered glass crucible ก่อนและหลังการสกัดด้วย neutral detergent ซึ่งคือน้ำหนักของ neutral detergent fiber (NDF) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ NDF ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$NDF\ (\%) = [(C - B) \times 100] / A$$

โดย C คือ น้ำหนัก sintered glass crucible หลังการสกัดด้วย neutral detergent (g)

B คือ น้ำหนัก sintered glass crucible (g)

A คือ น้ำหนักสาหร่าย (g)

นำสาหร่ายที่ผ่านการสกัดด้วย neutral detergent ถ่ายใส่ขวดก้นกลม เติม acid detergent 100 ml และ decahydronaphthalene 2 ml นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด ถ่ายส่วนผสมที่รีฟลักซ์เสร็จแล้วลงใน sintered glass crucible ใบเดิมที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างสาหร่ายใน sintered glass crucible ด้วยน้ำร้อน 3-4 ครั้ง ล้างด้วย ethanol ความเข้มข้น 80% (v/v) 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยปั๊มสุญญากาศจนแห้ง นำ sintered glass crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำใส่หม้อดูดความชื้นจน sintered glass crucible อยู่ที่อุณหภูมิห้อง โดยบันทึกน้ำหนักที่แตกต่างกันของ sintered glass crucible และ sintered glass crucible หลังการสกัดด้วย acid detergent ซึ่งคือน้ำหนักของ acid detergent fiber (ADF) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ ADF และปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเฮมิเซลลูโลส ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ADF (\%)} = [(D - B) \times 100] / A$$

$$\text{เฮมิเซลลูโลส (\%)} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

โดย D คือ น้ำหนัก sintered glass crucible หลังการสกัดด้วย acid detergent (g)
B คือ น้ำหนัก sintered glass crucible (g)
A คือ น้ำหนักสาหร่าย (g)
NDF คือ neutral detergent fiber (g)

เติม combined permanganate 25 ml ลงใน sintered glass crucible ที่มีสาหร่ายซึ่งผ่านการสกัดด้วย acid detergent แล้ว แช่ sintered glass crucible ในถาดที่มีน้ำแข็ง คนด้วยแท่งแก้วเพื่อไม่ให้สาหร่ายจับเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที ดูดสารละลายออกด้วยปั๊มสุญญากาศแล้วเติมสารละลาย combined permanganate 25 ml ลงใน sintered glass crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้ 45 นาที ดูดสารละลายออกด้วยปั๊มสุญญากาศ ล้างด้วย demineralizing จนสาหร่ายเป็นสีขาว จากนั้นล้างด้วย ethanol ความเข้มข้น 80% (v/v) และ acetone ดูดสารละลายออกด้วยปั๊มสุญญากาศ นำ sintered glass crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำใส่หม้อดูดความชื้นจน sintered glass crucible อยู่ที่อุณหภูมิห้อง โดยบันทึกน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง ADF และน้ำหนักของสาหร่ายที่ผ่านการสกัดลิกนินออก ซึ่งคือน้ำหนักของลิกนิน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นลิกนิน ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ลิกนิน (\%)} = [(D - E) \times 100] / A$$

โดย D คือ น้ำหนัก sintered glass crucible หลังการสกัดด้วย acid detergent (g)
E คือ น้ำหนัก sintered glass crucible หลังสกัดลิกนินออก (g)
A คือ น้ำหนักสาหร่าย (g)

นำ sintered glass crucible ที่มีสาหร่ายซึ่งผ่านการสกัดลิกนินออก เผาในเครื่องเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 500°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำใส่หม้อดูดความชื้นจน sintered glass crucible อยู่ที่อุณหภูมิห้อง โดยบันทึกน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง sintered glass crucible หลังสกัดลิกนินออก และน้ำหนัก sintered glass crucible หลังเผาเถ้า ซึ่งคือน้ำหนักเซลลูโลส และบันทึกน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่างน้ำหนัก sintered glass crucible และ sintered glass crucible หลังเผาเถ้า ซึ่งคือน้ำหนักเถ้า แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลส เถ้า และสารอื่น ๆ ซึ่งคำนวนได้จากสมการ

$$\text{เซลลูโลส (\%)} = [(E - F) \times 100] / A$$

$$\text{เถ้า (\%)} = [(F - B) \times 100] / A$$

$$\text{สารอื่น ๆ (\%)} = 100 - \%NDF - \%ADF - \text{เฮมิเซลลูโลส} - \text{เซลลูโลส}$$

โดย E คือ น้ำหนัก sintered glass crucible หลังสกัดลิกนินออก (g)
F คือ น้ำหนัก sintered glass crucible หลังเผาเถ้า (g)
A คือ น้ำหนักสาหร่าย (g)
B คือ น้ำหนัก sintered glass crucible (g)
NDF คือ neutral detergent fiber (g)
ADF คือ acid detergent fiber (g)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายชนิดละ 5 ซ้ำ

2.6 การวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย

2.6.1. การสกัดเซลลูโลสจากสาหร่าย

นำสาหร่าย *Cladophora* sp. และ *Spirogyra* sp. ที่ผ่านการอบแห้งจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ 60°C จำนวน 1 g มาสกัดเซลลูโลสตามวิธีดัดแปลงจาก Xiang และคณะ (2016) โดยนำสาหร่ายที่ผ่านการบดแล้ว เติม $NaClO_2$ 0.8 g และ sodium acetate buffer pH 4.8 ความเข้มข้น 0.1 M 20 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ใส่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายสาหร่ายลงใน sintered glass crucible ที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างสาหร่ายใน sintered glass crucible ด้วยน้ำกลั่นจน pH มีค่าประมาณ 7 นำสาหร่ายมาเติม NaOH ความเข้มข้น 0.5 M 24 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ทิ้งไว้ข้ามคืนใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60°C ถ่ายสาหร่ายที่ผ่านการฟอกลงใน sintered glass crucible ใบเดิมที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างสาหร่ายใน sintered glass crucible นำสาหร่ายเติม HCl ความเข้มข้น 5% (v/v) โดยใช้สัดส่วนสาหร่าย 0.25 กรัม เติม HCl ความเข้มข้น 5% (v/v) 6 ml ในบีกเกอร์พร้อมปิดปากบีกเกอร์ด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปต้มจนเดือด ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง ด้วยน้ำกลั่นจน pH มีค่าประมาณ 7 นำเซลลูโลสที่สกัดได้ไปอบที่

อุณหภูมิ 60°C จนแห้ง ทำการสกัดเซลลูโลสจากสาหร่าย *Cladophora* sp. และ *Spirogyra* sp. จำนวน 3 และ 2 ซ้ำตามลำดับ

2.6.2. การวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสของสาหร่าย

นำเซลลูโลสที่สกัดได้จากข้อ 2.6.1 มาวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสตามวิธีดัดแปลงจาก Siddhanta และคณะ (2011) เพื่อตรวจสอบการปรากฏของอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลส โดยใช้สัดส่วนปริมาณเซลลูโลส 1 g เติม NaOH ความเข้มข้น 17.5% (w/w) 30 ml บ่มที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml จากนั้นนำเซลลูโลสไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนของเหลวและตะกอนออกจากกัน โดยส่วนตะกอนคืออัลฟาเซลลูโลส ล้างอัลฟาเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่นจน pH มีค่าประมาณ 7 อบอัลฟาเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 60°C จนแห้ง จากนั้นนำส่วนของเหลวที่แยกจากอัลฟาเซลลูโลสมาเติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 3 N 20 ml ต้มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนบีตาเซลลูโลส โดยถ่ายบีตาเซลลูโลสจากสาหร่าย *Cladophora* ลงใน sintered glass crucible ที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH มีค่าประมาณ 7 จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C โดยบันทึกการปรากฏของอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสที่ตกตะกอนออกมา

2.7 การวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของสาหร่ายเพื่อหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลส

นำทรานสคริปโตมของสาหร่าย *Cladophora glomerata* และ *Spirogyra* sp. จากฐานข้อมูล 1000 plants (Matasci et al., 2014) มาวิเคราะห์โปรตีนที่น่าจะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เซลลูโลส โดยทำนายหา protein family ผ่านฐานข้อมูล Carbohydrate-active enzymes (CAZy) ใช้การเปรียบเทียบด้วยขั้นตอนวิธี HMMER (Yin et al, 2012) จากนั้นเลือกโปรตีนที่อยู่ใน glycosyltransferase family 2 (GT2) ซึ่งเป็น protein family ของ cellulose synthase มารวมกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลส (ภาคผนวก ข) มาจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม MAFFT v 7.205 (Katoh and Standley, 2013) trim ลำดับกรดอะมิโนที่ผ่านการจัดเรียงตำแหน่งเทียบกันแล้ว โดยใช้คำสั่ง automated1 ด้วยโปรแกรม trimAL v 1.2 (Capella-Gutiérrez, Silla-Mart'ine, and Gabaldón, 2009) จากนั้นคำนวณ protein substitution model ด้วยโปรแกรม ModelTest-NG (Darriba et al., 2019) แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม RAxML v 8.2.8 (Stamatakis, 2014) บน CIPRES XSEDE Portal (Miller, Pfeiffer, and Schwartz, 2010)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน

จากการเก็บสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ Nikon eclipse E100 และระบุชนิดระดับสกุลด้วย identification key โดยมีชื่อและหมายเลขผู้เก็บ วันเดือนปีที่เก็บ สถานที่เก็บ และผลการระบุชนิดดังตารางที่ 1 และลักษณะทางสัณฐานของสาหร่ายแต่ละชนิด มีดังต่อไปนี้

1) Cladophora sp.

สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนง หนึ่งเซลล์มีหลายนิวเคลียส คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นร่างแห มีไพรีนอยด์จำนวนมาก ผนังเซลล์หนา ดังภาพ 1a

2) Microspora sp.

สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง เซลล์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ผนังเซลล์หนามีลักษณะเป็นตัว H ดังภาพ 1b

3) Oedogonium sp.

สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นร่างแห พบเซลล์ซ้อนกันเป็นชั้นของวงแหวน เรียกว่า apical cap เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่พบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (oogonium) และเซลล์สืบพันธุ์แบบผู้ (antheridium) ดังภาพ 1c

4) Pithophora sp.

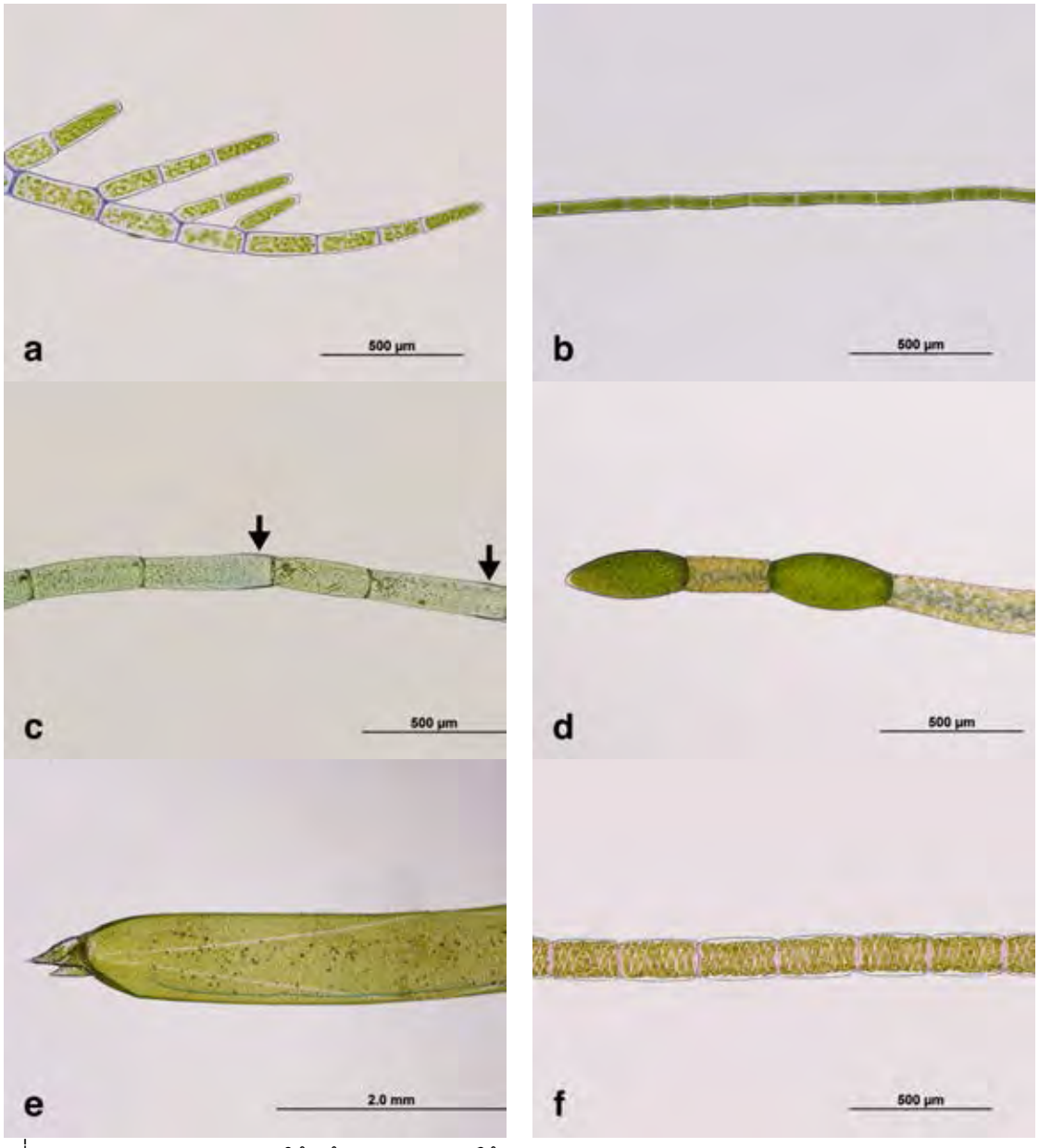
สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนง หนึ่งเซลล์มีหลายนิวเคลียส คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นร่างแห มีไพรีนอยด์จำนวนมาก พบ akinete ที่เป็น vegetative spore มีรูปร่างคล้ายถังเบียร์ สีเขียวเข้มและผนังเซลล์หนา ดังภาพ 1d

5) Nitella sp.

สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นทัลลัส เซลล์ปล้องเป็นเซลล์เดี่ยว ไม่พบ corticating cell ล้อมรอบ พบการแตกกิ่งอย่างสมมาตรเป็นวงล้อมรอบข้อ คลอโรพลาสต์เป็นรูปกลมแบน พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (globule) อยู่เหนือเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (nucule) ที่มี corona cell จำนวน 10 เซลล์ ดังภาพ 1e

6) Spirogyra sp.

สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นเกลียว ดังภาพ 1f



ภาพที่ 1 ภาพของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ

(a) *Cladophora* sp. (b) *Microspora* sp. (c) *Oedogonium* sp.

(d) *Pithophora* sp. (e) *Nitella* sp. (f) *Spirogyra* sp.

ลูกศรแสดงโครงสร้าง apical cap

ตารางที่ 1 การระบุชนิดสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

ชื่อและหมายเลขผู้เก็บ	วันเดือนปีที่เก็บ	สถานที่เก็บ	สกุล	กลุ่มของสาหร่าย
กาญจนา 05	13 กรกฎาคม 2561	สวนพฤกษศาสตร์ บ้านร่มเกล้า จังหวัดพิษณุโลก	*Pithophora* sp.	สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์
กาญจนา 06	14 สิงหาคม 2561	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	*Nitella* sp.	สาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์
กาญจนา 07	14 สิงหาคม 2561	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	*Oedogonium* sp.	สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์
กาญจนา 09	20 พฤศจิกายน 2561	แม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน	*Cladophora* sp.	สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์
กาญจนา 10	15 มกราคม 2562	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	*Microspora* sp.	สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์
กาญจนา 11	16 มกราคม 2562	ตำบลแม่ริม อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	*Spirogyra* sp.	สาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์

2. **การแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย**

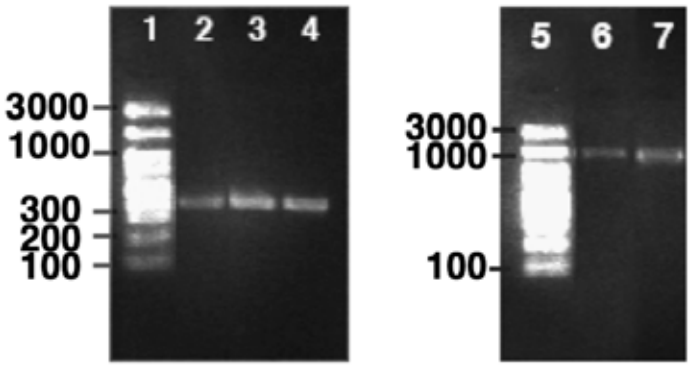
จากการแยกสาหร่ายให้เป็น uni-algal culture และการเพาะเลี้ยงสาหร่ายใน soil medium ที่สภาวะอุณหภูมิ 25-26°C ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์จำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน และเติมอากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาด 1.5 ลิตรต่อนาที ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ชื่อวิทยาศาสตร์	การแยกสาหร่ายให้เป็น uni-algal culture	การเพาะเลี้ยงสาหร่ายใน soil medium ของ uni-algal culture
Cladophora sp.	สามารถแยกเป็น uni-algal culture ได้	สามารถเพาะเลี้ยงได้
Microspora sp.	สามารถแยกเป็น uni-algal culture ได้	สามารถเพาะเลี้ยงได้
Oedogonium sp.	ไม่สามารถแยกเป็น uni-algal culture ได้ เนื่องจาก culture ปนด้วยไซยาโนแบคทีเรีย ไดอะตอมและ *Microspora* sp.	-
Pithophora sp.	สามารถแยกเป็น uni-algal culture ได้	สามารถเพาะเลี้ยงได้
Spirogyra sp.	สามารถแยกเป็น uni-algal culture ได้	ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้
Nitella sp.	สามารถแยกเป็น uni-algal culture ได้	สามารถเพาะเลี้ยงได้

3. **การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ**

จากการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีน ITS2-5.8S rDNA, 18S rDNA, 23S rDNA, 28S rDNA, *atp*B และ *rbc*L ในสาหร่าย *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Oedogonium* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และทดสอบผลการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีนด้วยเทคนิคการการแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจลบน 2% agarose gel เพื่อตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ได้ผลดังภาพที่ 2 จากนั้นส่งผลผลิตของดีเอ็นเอไปหาลำดับดีเอ็นเอ พบว่าสามารถหาลำดับดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3



ภาพที่ 2 ผลการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีนด้วยเทคนิคการการแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจล

(1),(5) DNA ladder (2) *Cladophora* sp. 23S rDNA (3) *Nitella* sp. 23S rDNA
(4) *Spirogyra* sp. 23S rDNA (6) *Microspora* sp. *rbc*L (7) *Spirogyra* sp. *rbc*L

ตารางที่ 3 ลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีนในสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	เครื่องหมายยีน	ลำดับดีเอ็นเอ	ความยาวลำดับดีเอ็นเอ (bp)
1	*Cladophora* sp.	23S rDNA	5'-GGAAGCTTGAAATGACTTGGACTTTACTATGCGCAGTATAGGTGGGAGGCTATGAAAATATTCTTGC GGCAATATTTGGAGCCATCAGTGAGATACCACTCTTATTGTGTTAGATTTCTAACTTTGCATCATTATCTG GTCAAAGGACAGTTTCAGGCGGGCAGTTTGACTGGGGCGGTCGCCTCCTAAACGGTAACGGAGGCG CACAAAGGTTTCCTCTGACGGGTAGAAATCGTATCTAGAGTGTAAAGGCATAAGGAAGCTTGACTGTG AGACCTACAAGTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCTGACGGTGCTGAGTGGAAAGGCC GTCACTCAACGGATAAAAAGTTACTCTAGGGAAAAAGGGGCTTGAA-3'	384
2	*Spirogyra* sp.	23S rDNA	5'-AGATCTGAGATTGGCTTTGGGCTTCTCTTGCGCAGATTAGGTGGAAGGCGAAGACGATATCCTTCCG GGGATGTAAGAGCCACCAATGAGACACCACCCTAGAGAGGCTAGAATTCTAACCCTATACCTACTAGA AGGTTAGGGGACAGTCCCAGGTAGACAGTTTCTATGGGGCGTAGGCCTCCCAAAAGGTAACGGAGGC GTGCAAAGGTTCCCTCAGGCTGGACGGAAATCAGCCATCGAGTATAAAGGCAGAAGGGAGCTTGACT GCAAGACTGACACGTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGCCTTAGTGATCCGACGGTTCCGAGTGGAAGG GCCGTCGCTCAACGGATAAAAGTTACTCTAGGGATGCCAGGCTGAACAAG-3'	385
3	*Nitella* sp.	23S rDNA	5'-CGTTCTGTGATTGGGTTGGGCTTTTCCTGCGCAGCTAGGTGGAAGGCTTAGAAGGTCTTTTTCCGGA AAGACTGGAGCCATCAGTGAGATACCACTCTTGAGAAGCTAGAATTCTAACCTTATGTCGTTTCCGGCT AAGGAAAAGTCTCAGGTAGACAGTTTCTATGGGGCGTAGGCCTCCCAAAGGGTAACGGAGGCGTGCA AAGGTTCCCTCAGGCTGGACGGAAATCAGCCATTGAGTGTAAAGGCAAAAGGGAGCTTGACTGCGAG ACTGACTCGTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGCCTTAGTGATCCGACGGTACCGAGTGGAAGGGCCGT CGCTCAACGGATAAAAGTTACTCTAGGGATACAATGCTGACAAA-3'	380

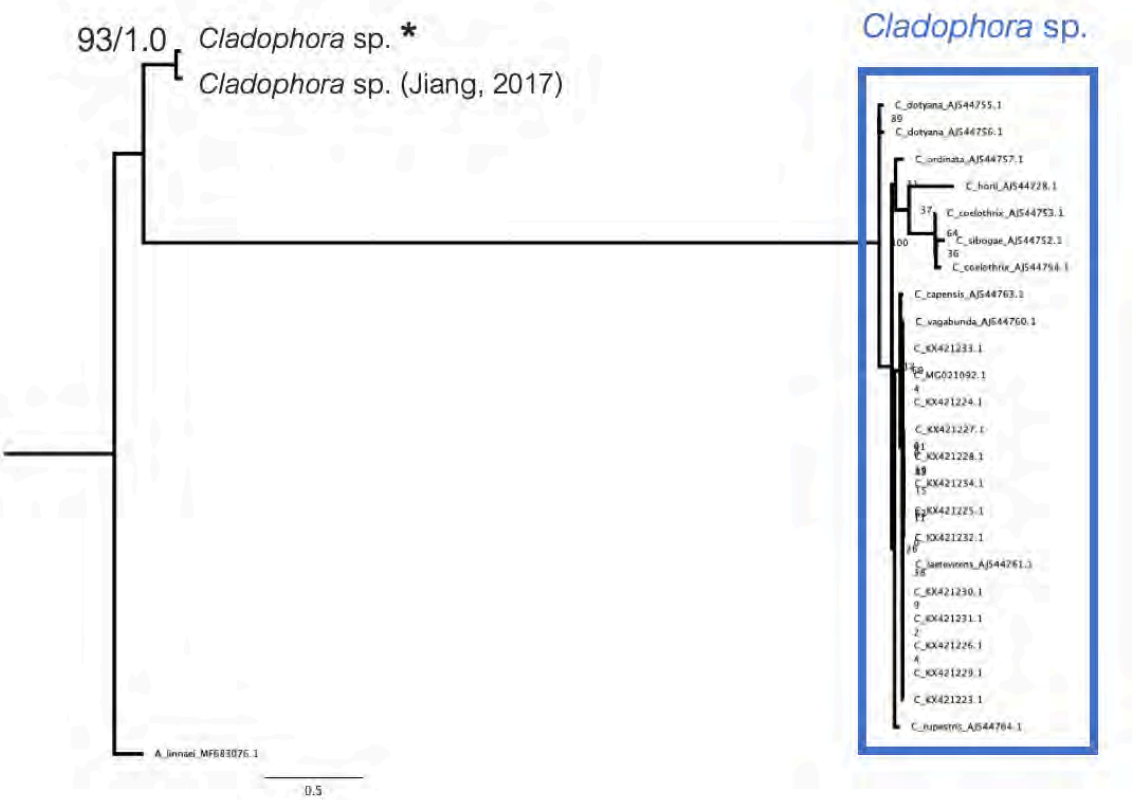
ลำดับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	เครื่องหมายยีน	ลำดับดีเอ็นเอ	ความยาวลำดับดีเอ็นเอ (bp)
4	*Microspora* sp.	*rbc*L	5'-AAGGCTAGCTGCTGAAAGCTGTCGTAGAAGTTATCGATTAACTTATTATACGCCAGACTACATTGTT AAAGATACTGTTATTCTTGCAGCTTTCCGTATGACTCCACAACCTGGCGTTCCACCACAAGAGCGCGG GGCTGCAGACCCCATGAGTCTTCAACAGGGACATGGACTACAGTATGGACTGATGGTTTAACTAGATT AGACCGTTATCAAGGTCGATGCTATGATATCGAGCCTGTACCAGGTGAAGAAAACCAGTATATTGCATA TGTAGCATACCCACTAGACTTGTTTGAAGAAGGTTCAGTTACAAACCTATTTACATCTATCGAAGGAAAC GTATTCGGATTCTAAGTTTTGCGTGCACTACGATTAGCAGACTTACGTATTCCACCTGCATATGCCACCA CTTTACAAGCGCCTCCACACGGTATTCAAGTGGAACGGGATAAACTGAACTAATATGGGCGTGATTAAC TAGGTTGTACAATTAAACCTAAATGAGGTCTTTCTGCTACAAACTATGGACGTGCTGGTTACGAATGAGT ACGTAGAGCTCTAGACTTTACTAAAGGCGATAAAACGTTAACTCACAATCTTTCGTGCGTTGGAGAGAC CGTATCCTATTTGTATCTGACGAGCTGTATCATGCTCAAGCAGAACCAGGAAAAACCCAAGGGCATTAT TTAAATTCGAGATAGCCACTTGTACAAGAAATGCTACGGCGTCCAGATGTACGAATGAACTAGAGGTAC CTTTTAAACGCATGACGATATGACTAGACGGCTCACTGCACATACTAGCCTGCAAATCACTGTCGTAAG CAGGAATTCTTCTATACGGTCACTGTGCCAAGCCGCGTATACCACGCCGTATAGATACACTGTATACGC TCACGTGGATACGAAGCAGTACGTATGTAAAGTTGTAGCCACTCAGACTGTAGTACTGATTTGTAACGA GAGGCGAACAGCAGTGACTCTAGTCTGTTCACTAAGAGTGAGATGTTTGTACAAGAACGAGCCTAGAA GCTCT-3'	1038

ลำดับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	เครื่องหมายยีน	ลำดับดีเอ็นเอ	ความยาวลำดับดีเอ็นเอ (bp)
5	*Spirogyra* sp.	*rbc*L	5'-AGGGGGGCTGGCATTAAGCAGGGTAAGATTATAGACTTACATATTACACTCCTGAATACGAGACCAA AGAAACTGATGTTTTAGCTGCATTTCGTATGACTCCTCAGCCTGGAGTACCACCTGAAGAAGCAGGTGC TGCTGTAGCAGCTGAGTCTTCTACAGGGAACATGGACTACTGTTTGGACAGATGGACTTACTAGCTTGG ATCGTTATAAAGGAAGATGTTATGATATTGAACCTGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATACATCGCTTATGTA GCTTATCCTCTAGATCTATTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACTTATTTACTTCTATTGTAGGTAACGTATTTG GTTTCAAAGCACTTCGAGCTTTACGTCTAGAAGATTTACGTATTCCTCCTGCATATTCTAAAACCTTCCAAG GTCCTCCTCATGGAATTCAAGTAGAAAGAGACAAGATCAATAAATATGGCCGTCCTTTATTAGGTTGTACT ATTAAACCTAAATTAGGATTATCTGCTAAAAACTATGGTAGAGCTGTATATGAATGTCTTCGTGGTGGTTTA GATTTTACAAAAGATGATGAAAACGTAAACTCTCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGCTTCTTATTTGTA GCAGAAGCTATCTACAAAGCACAAGCAGAAACCGGAGAAATTAAAGGGCATTATTTAAATGCTACTGCTG GTACCTGTGAAGAAATGCTAAAAAGAGCAGAATATGCTAAAGAACTAGGTGTACCAATTATTATGCATGAC TATTTGACAGGTGGTTTTACAGCTAATACTAGTTTAGCTCATTATTGCCGTGACAATGGTCTTCTTTTACATA TCCCCCGTGCTATGCACGCAGTTATCGACAGAAAGAAAAATCATGGTATTCATTTCCGTGTATAAGCTAAA GCTTTACGTATGTCTGGTGGAGACCACATTCATTCGGGGACTGTTGTAGGTAAACTTGAAGGGGAACGTC AAGTAACACTTGGGTTTGTAGAACTTTTTCCCGGAAAAATTAATATTAAAAAAAAAACGCAACCCCCGGGG AAT-3'	1065

นำลำดับดีเอ็นเอทั้ง 5 ตัวอย่างมาตรวจสอบความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank® โดยใช้โปรแกรม BLAST® โดยใช้คำสั่ง blastn สำหรับค้นหาข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอจากฐานข้อมูลโดยใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน 23S rDNA และ blastx สำหรับค้นหาข้อมูลของโปรตีนจากฐานข้อมูลโดยใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน *rbc*L จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ตรวจสอบความถูกต้องและลำดับดีเอ็นเอของสาหร่าย (ภาคผนวก ข) มาวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ โดยการจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม MAFFT v 7.205 trim ลำดับดีเอ็นเอที่ผ่านการจัดเรียงตำแหน่งเทียบกันแล้ว โดยใช้คำสั่ง automated1 ด้วยโปรแกรม trimAL v 1.2 คำนวณ nucleotide substitution model ด้วยโปรแกรม jModelTest แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม RAxML v 8.2.8 บน CIPRES XSEDE Portal และวิธีแบบเบย์ด้วยโปรแกรม MrBayes v 3.2.6 ได้แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ดังนี้

1) เครื่องหมายยีน 23S rDNA ของสาหร่าย *Cladophora* sp.

จากแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่าสาหร่าย *Cladophora* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการกับสาหร่าย *Cladophora* sp. จากการศึกษาของ Jiang (2017) มากที่สุด ดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำในรัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา โดยมีค่า bootstrap clade support เท่ากับ 93% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และ 1.0 จากการวิเคราะห์แบบเบย์

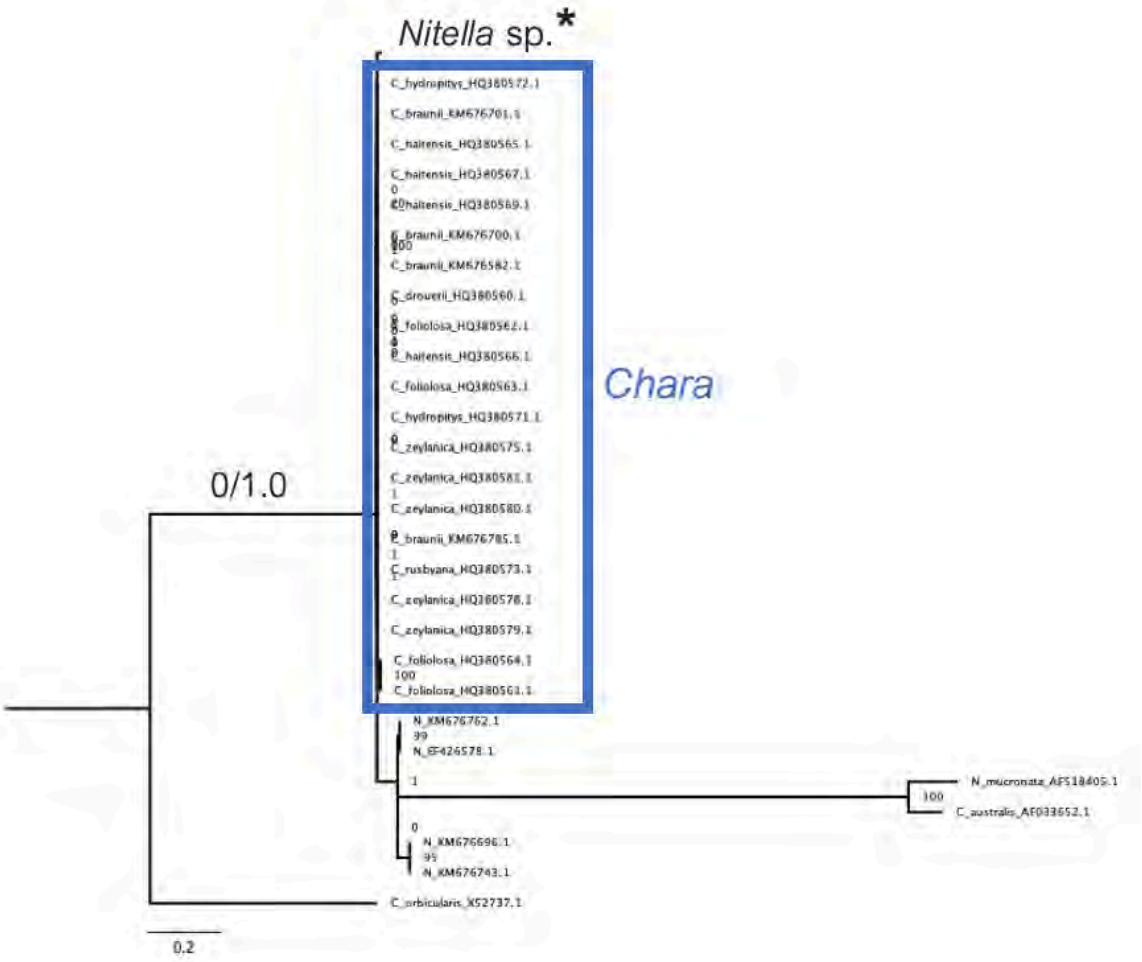


<u>ภาพที่ 3</u> แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Cladophora* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน 23S rDNA ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์

* คือ ตัวอย่างสาหร่าย *Cladophora* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

2) เครื่องหมายยีน 23S rDNA ของสาหร่าย *Nitella* sp.

จากแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่าสาหร่าย *Nitella* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการกับสาหร่ายสกุล *Chara* มากที่สุด ซึ่งเป็นสาหร่ายที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน ดังภาพที่ 4 โดยมีค่า bootstrap clade support เท่ากับ 0 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และ 1.0 จากการวิเคราะห์แบบเบย์

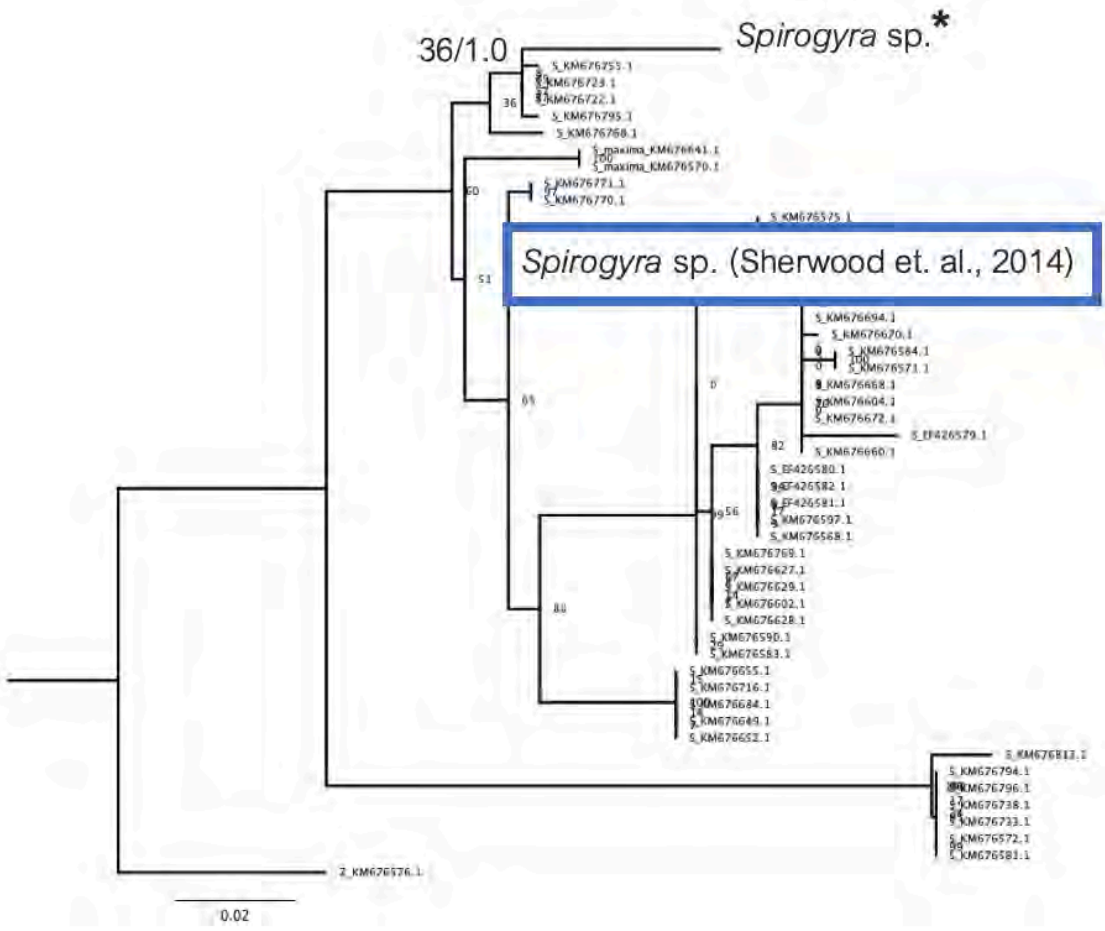


ภาพที่ 4 แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Nitella* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน 23S rDNA ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์

* คือ ตัวอย่างสาหร่าย *Nitella* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

3) เครื่องหมายยีน 23S rDNA ของสาหร่าย *Spirogyra* sp.

จากแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่าสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการกับสาหร่าย *Spirogyra* sp. จากการศึกษาของ Sherwood และคณะ (2014) มากที่สุด ดังภาพที่ 5 ซึ่งเป็นตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำในรัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา โดยมีค่า bootstrap clade support เท่ากับ 36% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และ 1.0 จากการวิเคราะห์แบบเบย์

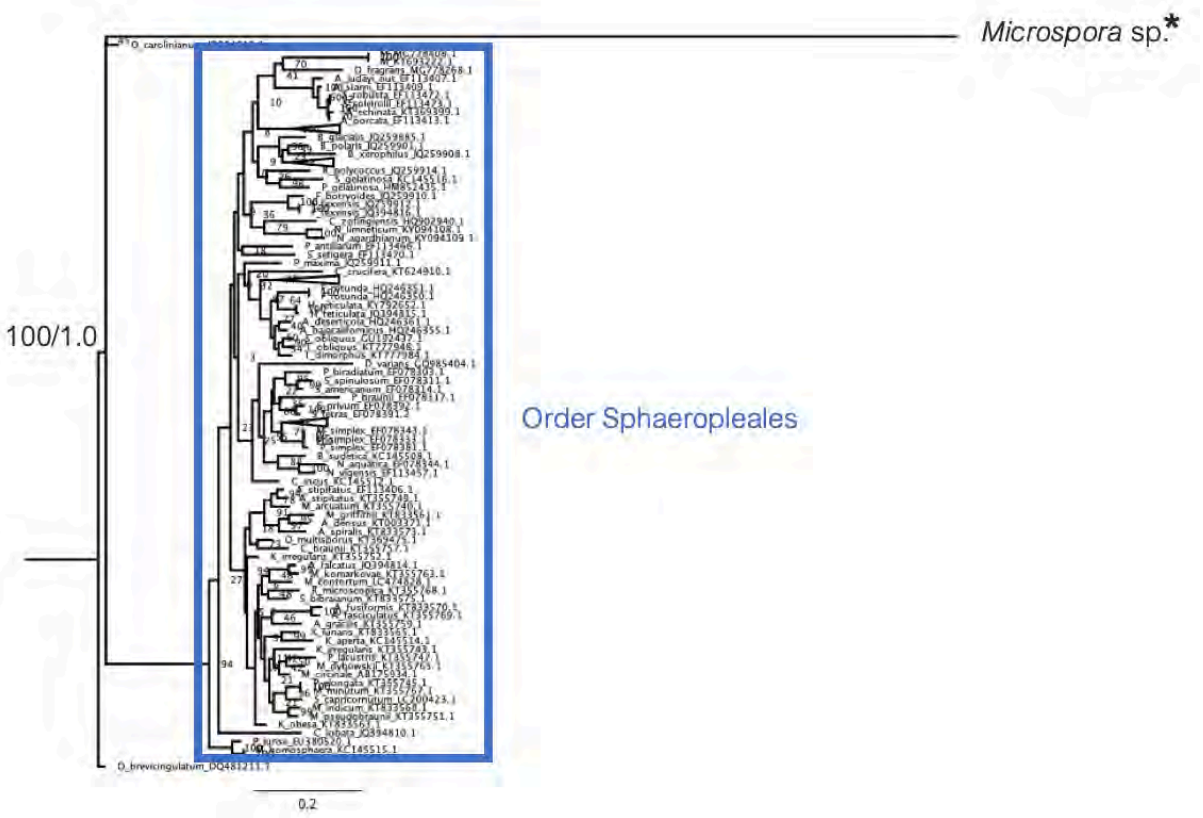


ภาพที่ 5 แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน 23S rDNA ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์

* คือ ตัวอย่างสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

4) เครื่องหมายยีน *rbc*L ของสาหร่าย *Microspora* sp.

จากแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่าสาหร่าย *Microspora* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ จัดอยู่ในอันดับ Sphaeropleales ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดของสาหร่ายได้ ดังภาพที่ 6 โดยมีค่า bootstrap clade support เท่ากับ 100% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และ 1.0 จากการวิเคราะห์แบบเบย์

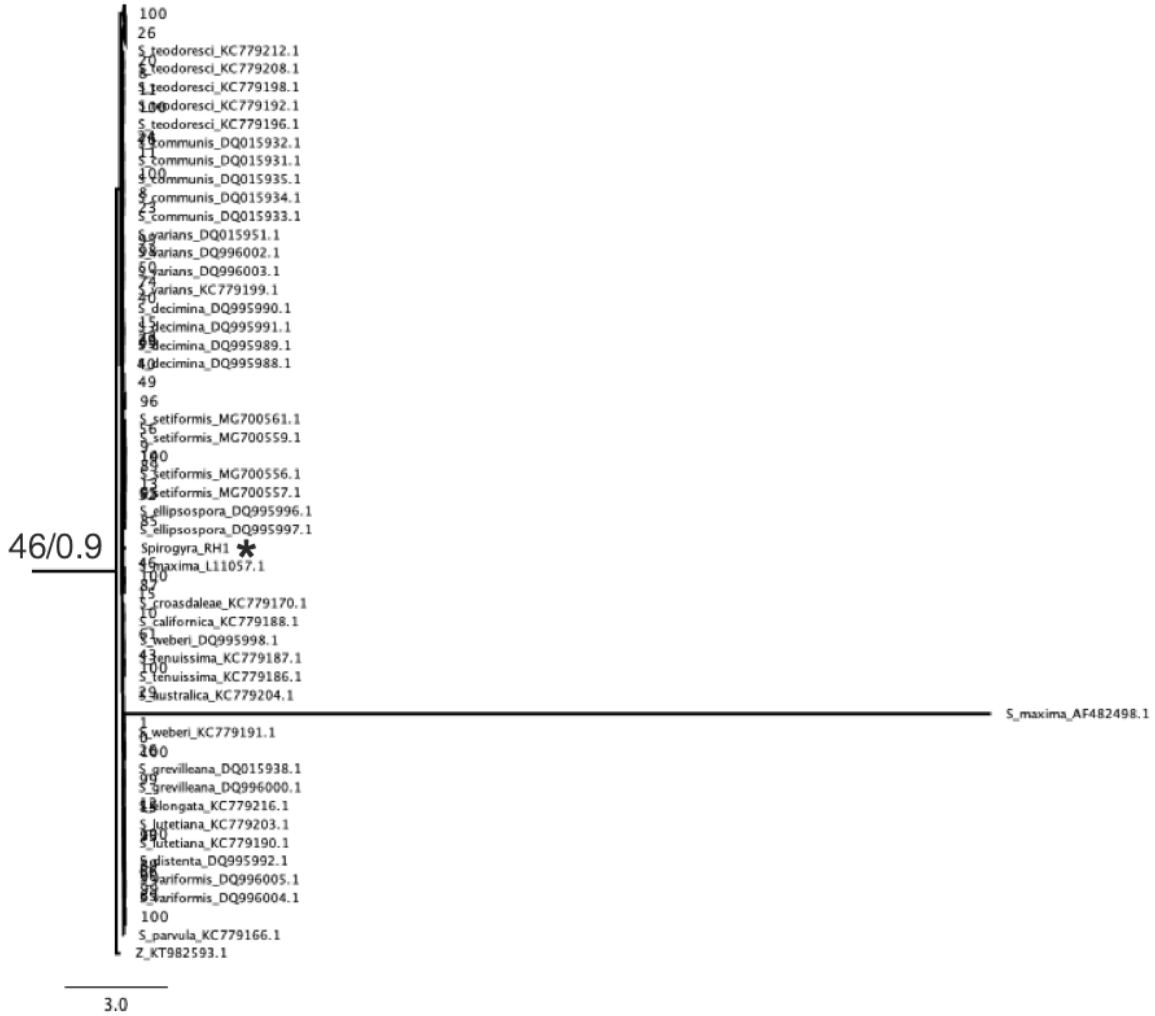


ภาพที่ 6 แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Microspora* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน *rbc*L ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์

* คือ ตัวอย่างสาหร่าย *Microspora* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

5) เครื่องหมายยีน *rbc*L ของสาหร่าย *Spirogyra* sp.

จากแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่าสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ จัดอยู่ในสกุล *Spirogyra* ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดของสาหร่ายได้ ดังภาพที่ 7 โดยมีค่า bootstrap clade support เท่ากับ 46% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และ 0.9 จากการวิเคราะห์แบบเบย์



<u>ภาพที่ 7</u> แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่สร้างจากลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน *rbc*L ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood แสดงค่า bootstrap clade support จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood และวิธีแบบเบย์

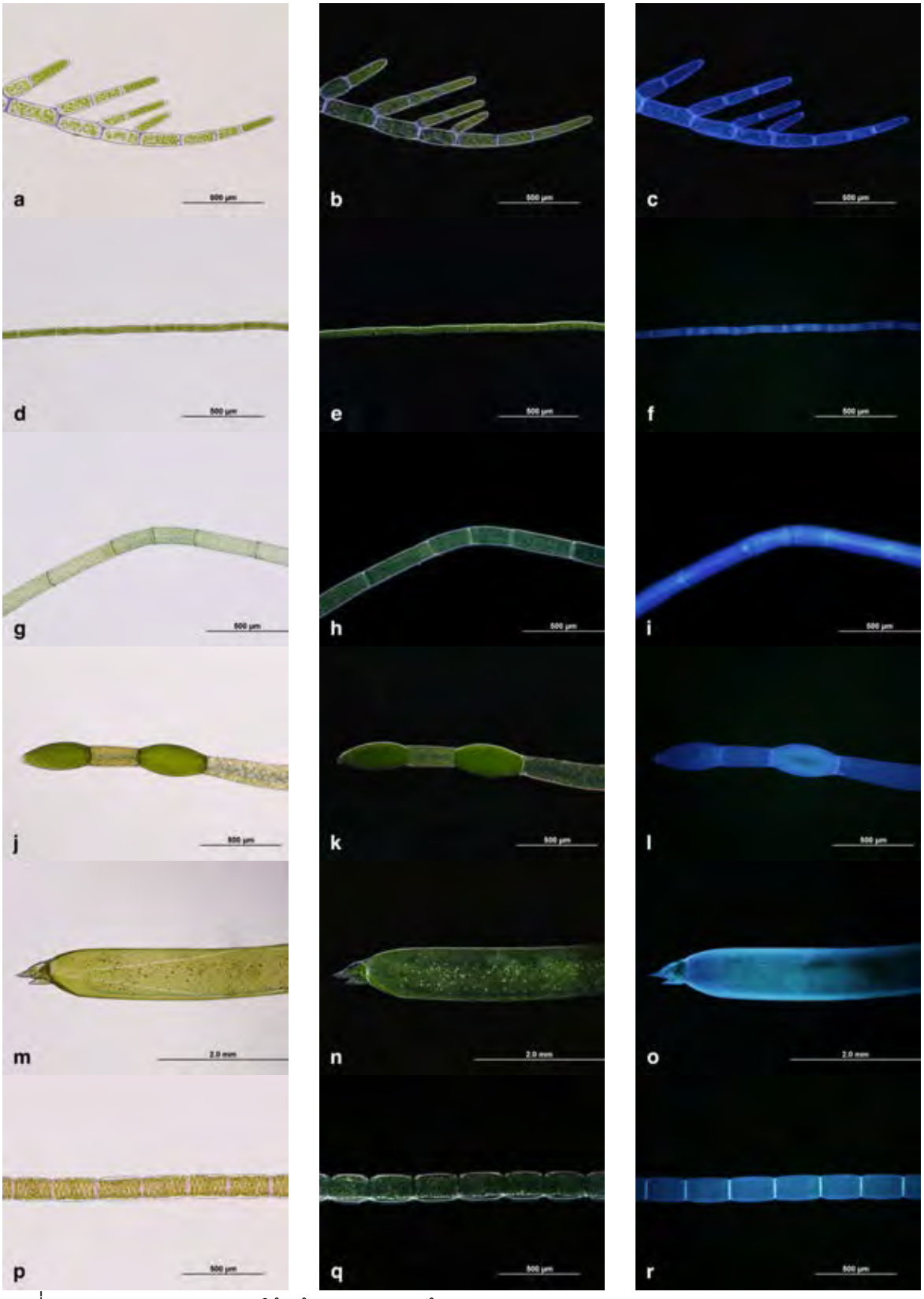
* คือ ตัวอย่างสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

4. **การศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์**

จากการศึกษาผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิค brightfield illumination เพื่อศึกษาลักษณะของผนังเซลล์ พบว่า สาหร่ายทุกชนิดพบขอบเขตการปรากฏของผนังเซลล์ซึ่งอยู่บริเวณชั้นนอกสุดของเซลล์ ดังภาพ 8a 8d 8g 8j 8m และ 8p

จากการศึกษาผนังเซลล์ของสาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิค polarized illumination เพื่อศึกษาคุณสมบัติไบรีฟริงเจนซ์ของเซลลูโลส พบว่า บริเวณชั้นนอกสุดของเซลล์สาหร่ายทุกชนิดจะปรากฏ pseudo-color ซึ่งเป็นลักษณะของการปรากฏของเซลลูโลสที่บริเวณผนังเซลล์ ดังภาพ 8b 8e 8h 8k 8n และ 8q

นอกจากนี้การศึกษาผนังเซลล์ของสาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิค fluorescence illumination ด้วยการย้อม Calcofluor white พบว่า บริเวณชั้นนอกสุดของเซลล์สาหร่ายทุกชนิดมีการเรืองแสงสีน้ำเงิน ภายใต้แหล่งกำเนิดแสงยูวี ดังภาพ 8c 8f 8i 8l 8o และ 8r ซึ่งแสดงถึงการปรากฏของเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่าย



ภาพที่ 8 ภาพของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ

(a)-(c) *Cladophora* sp. (d)-(f) *Microspora* sp. (g)-(i) *Oedogonium* sp. (j)-(l) *Pithophora* sp.
(m)-(o) *Nitella* sp. (p)-(r) *Spirogyra* sp. (a),(d),(g),(j),(m),(p) เทคนิค brightfield illumination
(b),(e),(h),(k),(n),(q) เทคนิค polarized illumination (c),(f),(i),(l),(o),(r) เทคนิค fluorescence illumination

5. การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์ ได้แก่ *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp. และสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์ ได้แก่ *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. โดยใช้วิธีจาก Goering และ Van Soest (1970) พบปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายดังตารางที่ 4 และภาพที่ 9

สาหร่าย *Cladophora* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นสารอื่น ๆ มากที่สุด เท่ากับ 46.26% รองลงมาคือ เซลลูโลส เถ้า เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.92%, 15.80%, 7.28% และ 3.49% ตามลำดับ

สาหร่าย *Microspora* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นสารอื่น ๆ มากที่สุด เท่ากับ 62.08% รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนินและเถ้า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.92%, 8.06%, 0.67% และ 0.65% ตามลำดับ

สาหร่าย *Pithophora* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นสารอื่น ๆ มากที่สุด เท่ากับ 42.08% รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนินและเถ้า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 33.97%, 19.58%, 3.5% และ 0.87% ตามลำดับ

สาหร่าย *Nitella* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นสารอื่น ๆ มากที่สุด เท่ากับ 73.79% รองลงมาคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เถ้าและลิกนิน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.68%, 10.94%, 1.48% และ 1.11% ตามลำดับ

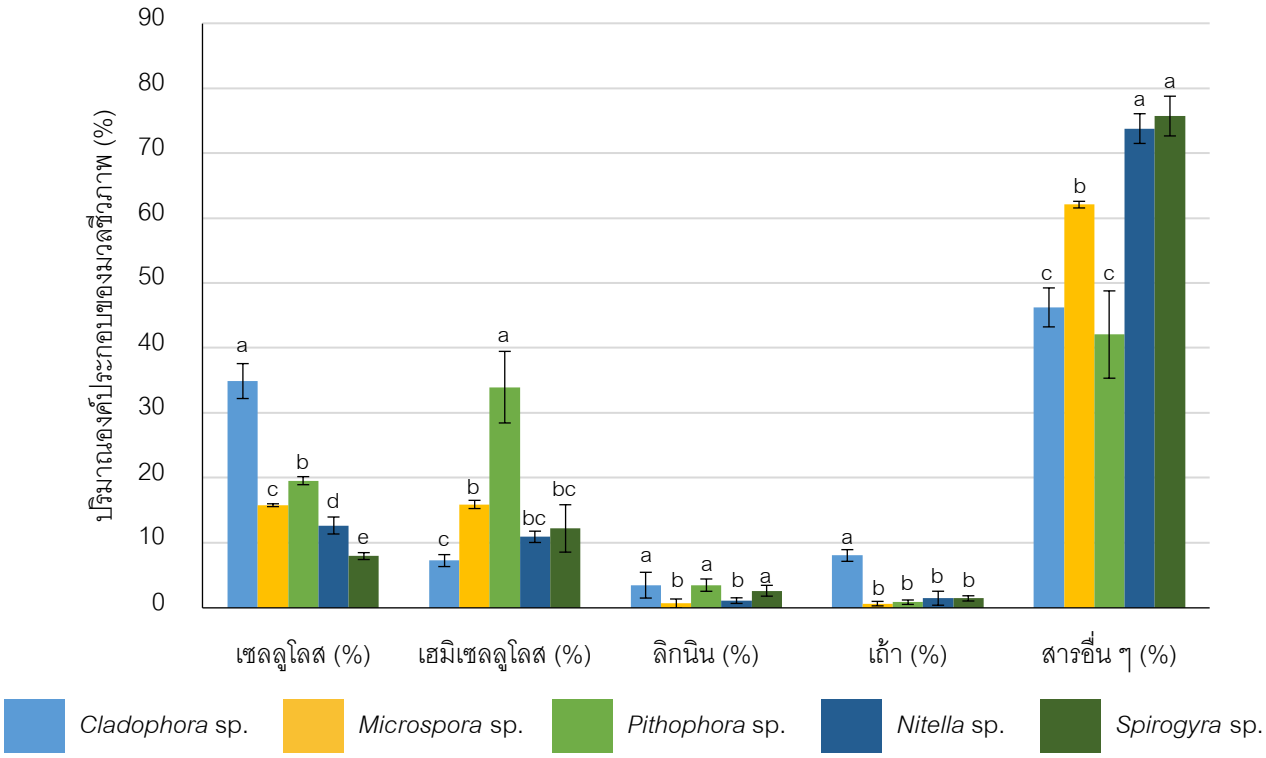
สาหร่าย *Spirogyra* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นสารอื่น ๆ มากที่สุด เท่ากับ 75.72% รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนินและเถ้า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.22%, 7.97%, 2.63% และ 1.46% ตามลำดับ

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย

ชนิดสาหร่าย	เปอร์เซ็นต์เซลลูโลสเฉลี่ย * (%)	เปอร์เซ็นต์เฮมิเซลลูโลสเฉลี่ย (%)	เปอร์เซ็นต์ลิกนินเฉลี่ย (%)	เปอร์เซ็นต์เถ้าเฉลี่ย (%)	เปอร์เซ็นต์สารอื่น ๆ เฉลี่ย (%)
Cladophora sp.	34.92 ± 2.69 ^{a}	7.28 ± 0.92 ^{c}	3.49 ± 1.98 ^{a}	8.06 ± 0.9 ^{a}	46.26 ± 3.00 ^{c}
Microspora sp.	15.80 ± 0.22 ^{c}	15.92 ± 0.63 ^{b}	0.67 ± 0.69 ^{b}	0.65 ± 0.35 ^{b}	62.08 ± 0.51 ^{b}
Pithophora sp.	19.58 ± 0.62 ^{b}	33.97 ± 5.51 ^{a}	3.5 ± 0.95 ^{a}	0.87 ± 0.34 ^{b}	42.08 ± 6.72 ^{c}
Nitella sp.	12.68 ± 1.31 ^{d}	10.94 ± 0.87 ^{bc}	1.11 ± 0.43 ^{b}	1.48 ± 1.08 ^{b}	73.79 ± 2.29 ^{a}
Spirogyra sp.	7.97 ± 0.53 ^{e}	12.22 ± 3.65 ^{bc}	2.63 ± 0.84 ^{a}	1.46 ± 0.40 ^{b}	75.72 ± 3.06 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่กำกับตัวเลขในช่องแสดงความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ($P \leq 0.05$) โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* สาหร่ายทุกชนิดมีจำนวน 5 ซ้ำ



ภาพที่ 9 ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา

แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ของปริมาณองค์ประกอบมวลชีวภาพซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เถ้า และสารอื่น ๆ ของสาหร่าย 5 ชนิด ได้แก่ *Cladophora* sp. (สีฟ้า) *Microspora* sp. (สีเหลือง) *Pithophora* sp. (สีเขียวอ่อน) *Nitella* sp. (สีน้ำเงิน) และ *Spirogyra* sp. (สีเขียวเข้ม) จำนวน 5 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ย โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เปรียบเทียบด้วยวิธี LSD

6. การวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย

จากการสกัดเซลลูโลสจากสาหร่าย *Cladophora* sp. และ *Spirogyra* sp. ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Xiang และคณะ (2016) และการวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสของสาหร่าย ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Siddhanta และคณะ (2011) พบปริมาณเซลลูโลสเฉลี่ยจากการสกัด การปรากฏของอัลฟาเซลลูโลสและการปรากฏของบีตาเซลลูโลส ดังตารางที่ 5

สาหร่าย *Cladophora* sp. มีค่าเฉลี่ยปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการสกัด 0.3307 g และพบการปรากฏของเซลลูโลสทั้งชนิดอัลฟาเซลลูโลส ดังภาพ 9a ซึ่งสามารถวัดปริมาณอัลฟาเซลลูโลสได้เท่ากับ 96.66% ของปริมาณเซลลูโลสที่สกัดได้ทั้งหมด และบีตาเซลลูโลส ดังภาพ 9c ซึ่งแสดงถึงบีตาเซลลูโลสที่ละลายอยู่ NaOH ความเข้มข้น 17.5% (w/w) และถูกตกตะกอนด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 3 N เมื่อเทียบกับภาพ 9b ซึ่งเป็นภาพก่อนการตกตะกอน ซึ่งไม่สามารถวัดปริมาณบีตาเซลลูโลสได้

สาหร่าย *Spirogyra* sp. มีค่าเฉลี่ยปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการสกัด 0.0277 g และพบการปรากฏเซลลูโลสทั้งชนิดอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลส ดังภาพ 9d และ 9e ตามลำดับ ซึ่งไม่สามารถวัดปริมาณอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสได้

ตารางที่ 5 ปริมาณเซลลูโลสเฉลี่ยจากการสกัดและการปรากฏของเซลลูโลสแต่ละชนิด

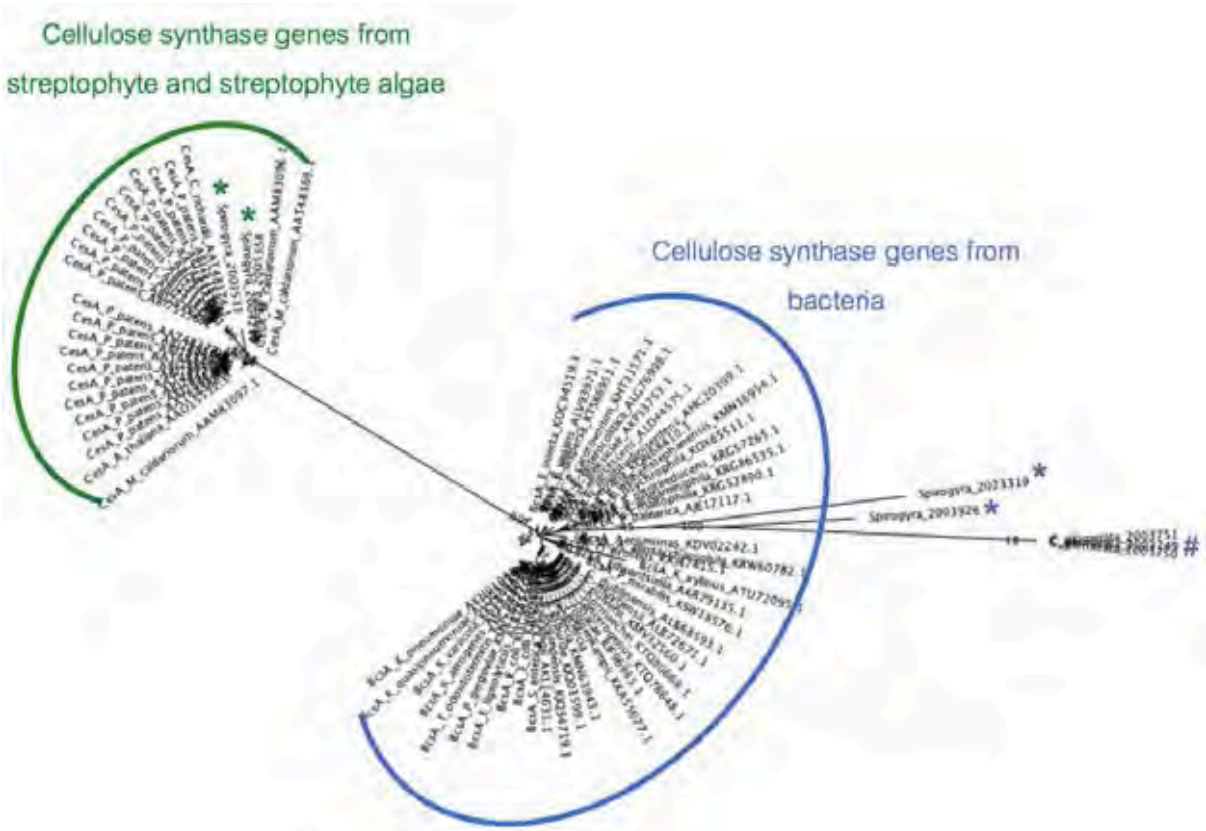
ชื่อวิทยาศาสตร์	กลุ่มของสาหร่าย	ปริมาณเซลลูโลสเฉลี่ยจากการสกัด (g)*	อัลฟาเซลลูโลส	บีตาเซลลูโลส
Cladophora sp.	สาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์	0.3307 ± 0.0034	+	+
Spirogyra sp.	สาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์	0.0277 ± 0.0006	+	+

* สาหร่าย *Cladophora* sp. และ *Spirogyra* sp. มีจำนวน 3 และ 2 ซ้ำตามลำดับ

7. **การวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของสาหร่ายเพื่อหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลส**

จากการนำทรานสคริปโตมของสาหร่าย *Cladophora glomerata* และ *Spirogyra* sp. จากฐานข้อมูล 1000 plants และลำดับกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลส (ภาคผนวก ข) มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum-likelihood ได้แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ ดังภาพที่ 10 พบว่าลำดับกรดอะมิโนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1) โปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากพืช สาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์และตัวอย่างสาหร่าย *Spirogyra* sp. จากฐานข้อมูล 1000 plants
2) โปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย ตัวอย่างสาหร่าย *Spirogyra* sp. และตัวอย่างสาหร่าย *Cladophora glomerata* จากฐานข้อมูล 1000 plants



<u>ภาพที่ 10</u> แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโนของสาหร่าย *Cladophora glomerata, Spirogyra* sp. และ cellulose synthase ของแบคทีเรีย สาหร่ายสเตรปโตไฟต์และพืชด้วยวิธี Maximum-likelihood

* คือ ตัวอย่างสาหร่าย *Spirogyra* sp.

\# คือ ตัวอย่างสาหร่าย *Cladophora glomerata*

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

1. การแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย

จากการแยกสาหร่าย *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Oedogonium* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. พบว่าสามารถแยก *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. ให้เป็น uni-algal culture ได้ แต่ไม่สามารถแยก *Oedogonium* sp. ให้เป็น uni-algal culture ได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถหาแหล่งน้ำที่มี *Oedogonium* sp. จำนวนมากเพียงพอต่อการนำ *Oedogonium* sp. มาวิเคราะห์องค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายได้

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. พบว่าสามารถเพาะเลี้ยง *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp., และ *Nitella* sp. ใน soil medium สภาวะอุณหภูมิ 25-26°C ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์จำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน และเติมอากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาด 1.5 ลิตรต่อนาทีได้ และไม่สามารถเพาะเลี้ยง *Spirogyra* sp. ได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Munir และคณะ (2015) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Spirogyra* sp. คือ การเพาะเลี้ยงใน Bold Basal medium อุณหภูมิ 24-28°C ค่า pH เท่ากับ 7.5 ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยง *Spirogyra* sp. ต่อไป

2. การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ

จากการระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการด้วยการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีน ITS2-5.8S rDNA, 18S rDNA, 23S rDNA, 28S rDNA, *atp*B และ *rbc*L ในสาหร่าย *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Oedogonium* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. พบว่าสามารถส่งผลผลิตของดีเอ็นเอไปหาลำดับดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องหมายยีน 23S rDNA ในสาหร่าย *Cladophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. และเครื่องหมายยีน *rbc*L ของสาหร่าย *Microspora* sp. และ *Spirogyra* sp. โดยตัวอย่างที่เหลือ พบว่าไม่สามารถเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีนได้ แม้จะดัดแปลงสถาวะที่เหมาะสมแล้ว

จากการวิเคราะห์เชิงวงศ์วิวัฒนาการผลผลิตของดีเอ็นเอทั้ง 5 ตัวอย่างร่วมกับลำดับดีเอ็นเอของสาหร่าย (ภาคผนวก ข) พบว่า ผลผลิตดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน 23S rDNA ในสาหร่าย *Cladophora* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วิวัฒนาการกับสาหร่าย *Cladophora* sp. (unpublished, NCBI accession number MGMG021094.1) จากการศึกษาของ Jiang (2017) มากที่สุด ซึ่งเป็นตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำในรัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา สาหร่าย *Nitella* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการกับสาหร่ายสกุล *Chara* มากที่สุด ซึ่งเป็นสาหร่ายที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน และผลผลิตดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีน *rbc*L ในสาหร่าย *Microspora* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จัดอยู่ในอันดับ Sphaeropleales สาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการกับสาหร่าย *Spirogyra* sp. จากการศึกษาของ Sherwood และคณะ (2014) มากที่สุด อย่างไรก็ตามไม่สามารถระบุชนิดหรือสกุลของสาหร่าย *Nitella* sp. และ *Microspora* sp. ได้ เนื่องจากฐานข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีนและสาหร่ายมีจำนวนจำกัด

3. การศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์

จากการศึกษาผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิค brightfield illumination, polarized illumination และ fluorescence illumination พบการปรากฏของเซลลูโลสในตำแหน่งเดียวกัน จึงอาจกล่าวได้ว่าสาหร่าย *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Oedogonium* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Herburger และ Holzinger (2016)

4. การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่ายน้ำจืด *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. เป็นครั้งแรก โดยใช้วิธีจาก Goering และ Van Soest (1970) พบว่า สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสมากที่สุดสามชนิดแรก คือ *Cladophora* sp. (34.92%) *Pithophora* sp. (19.58%) และ *Microspora* sp. (15.80%) สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเฮมิเซลลูโลสมากที่สุดสามชนิดแรก คือ *Pithophora* sp. (33.97%) *Microspora* sp. (15.92%) และ *Spirogyra* sp. (12.22%) สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นลิกนินมากที่สุดสามชนิดแรก คือ *Pithophora* sp. (3.5%) *Cladophora* sp. (3.49%) และ *Spirogyra* sp. (2.63%) สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเถ้ามากที่สุดสามชนิดแรก คือ *Cladophora* sp. (8.06%) *Nitella* sp. (1.48%) และ *Spirogyra* sp. (1.46%) สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นสารอื่น ๆ มากที่สุดสามชนิดแรก คือ *Spirogyra* sp. (75.72%) *Nitella* sp. (73.79%) และ *Microspora* sp. (62.08%)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของ *Cladophora* sp. พบว่า *Cladophora* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสมากกว่าเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.92% และ 7.28% ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Muztar, Slinger และ Burton (1978) ที่ศึกษาสาหร่ายน้ำจืด *Cladophora glomerata* ด้วยวิธีการเดียวกัน และพบปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสมากกว่าเฮมิเซลลูโลส โดยมีค่าเท่ากับ 30.8% และ 3.6% ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสของ *Microspora* sp. พบว่า ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสเท่ากับ 8.06% ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพในสาหร่ายสกุลนี้ แต่พบการศึกษาปริมาณเซลลูโลสในสาหร่ายที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสีย ซึ่งประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียว *Ulothrix* sp., *Microspora* sp., *Stigeoclonium* sp., *Oedogonium* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. โดยพบปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสเท่ากับ 7.10% (Ververis et al., 2007) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่ายสกุล *Microspora*

สาหร่าย *Pithophora* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสเท่ากับ 19.58% ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพในสาหร่ายสกุลนี้ แต่พบการศึกษาเซลลูโลสด้วย X-ray diffraction analysis (Pearlmutter and Lembi, 1980) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่ายสกุล *Pithophora*

สาหร่าย *Nitella* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสเท่ากับ 12.68% ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพในสาหร่ายสกุลนี้ แต่พบการศึกษาการ

เรียงตัวของเซลลูโลสไฟบริลในเซลล์ปล้องของสาหร่าย *Nitella opaca* (Neville and Levy, 1984) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่ายสกุล *Nitella*

สาหร่าย *Spirogyra* sp. มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสเท่ากับ 7.97% ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพในสาหร่ายสกุลนี้ แต่พบการศึกษาปริมาณเซลลูโลสด้วย Spectrophotometric method ของ *Spirogyra* sp. (Eshaq, 2010) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์ของสาหร่ายสกุล *Spirogyra*

มวลชีวภาพที่เป็นสารอื่น ๆ ของ *Spirogyra* sp. มีปริมาณเท่ากับ 75.72% ของมวลชีวภาพ สารอื่น ๆ นี้ได้แก่สารจำพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์สาหร่าย จากการศึกษาของ Tipnee, Ramaraj และ Unpaprom (2015) ได้ศึกษาปริมาณของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันในสาหร่าย *Spirogyra varians* พบว่ามีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันเท่ากับ 12.0-24.4%, 42.8-62.0% และ 14.8-21.0% ของน้ำหนักแห้งสาหร่ายตามลำดับ ซึ่งสารเหล่านี้จะปรากฏในส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ และจากการศึกษาของ Eshaq และคณะ (2010) ได้ศึกษาปริมาณน้ำตาลใน mucilage sheath ที่ชั้นนอกสุดของเซลล์ *Spirogyra* sp. ด้วย Spectrophotometric method พบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ มีค่าเท่ากับ 4.2% และ 2.7% ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายตามลำดับ

ในการศึกษานี้พบว่าปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพของสาหร่ายทั้งห้าชนิดที่เป็นเซลลูโลสน้อยกว่าปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพพืชที่เป็นเซลลูโลส เช่น ข้าวโพด กัญชงและนอร์เวย์สปรูซ ซึ่งมีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสโดยใช้วิธีการวิเคราะห์จาก Goering และ Van Soest มีค่าเท่ากับ 32%, 58% และ 68% ตามลำดับ (Thygesen et al., 2005) สาเหตุที่สาหร่ายมีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสน้อยกว่าพืชนั้นอาจเกิดจากการที่โครงสร้างของผนังเซลล์สาหร่ายมีความซับซ้อนน้อยกว่าผนังเซลล์พืช (Popper et al., 2011) ความซับซ้อนน้อยกว่าของผนังเซลล์สาหร่ายนี้มีความสอดคล้องกับจำนวนก๊อบปี้ของสารพันธุกรรมที่ใช้สังเคราะห์เซลลูโลสและสารประกอบอื่น ๆ ในผนังเซลล์ เช่น การศึกษาของ Appenzeller และคณะ (2004) พบว่า ข้าวโพดมียีน *Ces*A ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสและควบคุมการเรียงตัวของ cellulose synthesizing complex จำนวน 12 ยีน ในขณะที่ผลการศึกษาของ Roberts, Roberts และ Delmer (2002) พบว่าสาหร่าย *Mesotaenium caldariorum* ซึ่งเป็นสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์ มียีน *Ces*A เพียง 2 ยีนเท่านั้น

5. การวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย

จากการวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย พบว่า *Spirogyra* sp. และ *Cladophora* sp. มีอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ การปรากฏของอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสใน *Spirogyra* sp. นั้นเป็นไปตามสมมติฐานการปรากฏของ rosette TC ในขณะที่การปรากฏของอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสใน *Cladophor*a sp. นั้นไม่เป็นไปตามสมมติฐาน (Graham et al., 2016) ดังนั้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรากฏของบีตาเซลลูโลสใน *Cladophora* sp. ผู้ศึกษาจึงวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของสาหร่าย *Cladophora glmerata* (Matasci et al., 2014) เพื่อหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสต่อไป

จากการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของ *C. glmerata* (Matasci et al., 2014) โดยใช้ข้อมูลเอนไซม์ CesA ที่พบในพืชและสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์ และเอนไซม์ BscA ที่พบในแบคทีเรีย ร่วมกับโปรตีนที่น่าจะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เซลลูโลสที่ได้จากการทำ annotation ทรานสคริปโตมของ *Spirogyra*

sp. และ *C. glomerata* (Matasci et al., 2014) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 10 ประกอบด้วย

1) กลุ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากพืชและสาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์ (CesA) มีการเรียงตัวของ cellulose synthase subunit ที่เรียกว่า rosette TC และสามารถสังเคราะห์บีตาเซลลูโลส
2) กลุ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (BcsA) มีการเรียงตัวของ cellulose synthase subunit ที่เรียกว่า linear TC และสามารถสังเคราะห์อัลฟาเซลลูโลส

การที่กรดอะมิโนของสาหร่าย *Spirogyra* sp. ปรากฏอยู่ในกลุ่มของโปรตีนทั้งสองกลุ่มเป็นไปตามสมมติฐานการปรากฏของ rosette TC และ linear TC และสอดคล้องกับการปรากฏของอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสจากผลการวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย

อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของ *C. glomerata* พบว่า กรดอะมิโนของ *C. glomerata* ปรากฏอยู่ในกลุ่มของโปรตีนจากแบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งการปรากฏเพียงโปรตีนที่น่าจะเป็น BcsA นี้ สอดคล้องกับสมมติฐานการปรากฏของ linear TC ในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์ แต่ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายในการศึกษานี้

ผลที่ไม่สอดคล้องดังกล่าวอาจเกิดจากทรานสคริปโตมของ *C. glomerata* ที่ใช้ในการศึกษาไม่ใช่ทรานสคริปโตมที่รวบรวมเอ็มอาร์เอ็นเอของทุกยีนในจีโนมของสาหร่าย *C. glomerata* ซึ่งอาจมาจากการศึกษาในฐานข้อมูล 1000 plants ดังกล่าวมีการสกัดเอ็มอาร์เอ็นเอในขณะที่ยีน *Ces*A ไม่มีการแสดงออก โดยที่ *C. glomerata* มีทั้ง *Ces*A และ *Bcs*A ทำให้สาหร่ายดังกล่าวสามารถสังเคราะห์อัลฟาเซลลูโลสและเบต้าเซลลูโลสได้จากการวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาค้นคว้าภาพถ่ายจากเทคนิค freeze fracture จนถึงปัจจุบันนี้ ไม่พบการกรากฏของ rosette TC ในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และแบคทีเรีย

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษา

1. การระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน

จากการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน พบว่าสามารถระบุชนิดในระดับสกุลได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Oedogonium* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp.

2. การแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย

จากการแยกสาหร่าย *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Oedogonium* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. พบว่าสามารถแยก *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp., *Nitella* sp. และ *Spirogyra* sp. ให้เป็น uni-algal culture ได้ และสามารถเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cladophora* sp., *Microspora* sp., *Pithophora* sp., และ *Nitella* sp. ใน soil medium สภาวะอุณหภูมิ 25-26°C ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์จำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน และเติมอากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาด 1.5 ลิตรต่อนาทีได้

3. การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ

จากการระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาและการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการด้วยการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีน พบว่า *Cladophora* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการกับ *Cladophora* sp. จากการศึกษาของ Jiang (2017) มากที่สุด สาหร่าย *Nitella* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการกับสาหร่ายสกุล *Chara* มากที่สุด ซึ่งเป็นสาหร่ายที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน สาหร่าย *Microspora* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ จัดอยู่ในอันดับ Sphaeropleales ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดได้ และสาหร่าย *Spirogyra* sp. ที่ใช้ในศึกษาครั้งนี้ มีความใกล้ชิดเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการกับ *Spirogyra* sp. จากการศึกษาของ Sherwood และคณะ (2014) มากที่สุด

4. การศึกษาเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์

จากการศึกษาผนังเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิค brightfield illumination, polarized illumination และ fluorescence illumination พบการปรากฏของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย

5. การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย

จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย พบว่า สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเซลลูโลสโดยเรียงจากมากสุดไปน้อยสุด ได้แก่ *Cladophora* sp. (34.92%) *Pithophora* sp. (19.58%) *Microspora* sp. (15.80%) *Nitella* sp. (12.68%) และ *Spirogyra* sp. (7.97%) ตามลำดับ สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเฮมิเซลลูโลสโดยเรียงจากมากสุดไปน้อยสุด ได้แก่ *Pithophora* sp. (33.97%) *Microspora* sp. (15.92%) *Spirogyra* sp. (12.22%) *Nitella* sp. (10.94%) และ *Cladophora* sp. (7.28%) ตามลำดับ สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นลิกนินโดยเรียงจากมากสุดไปน้อยสุด ได้แก่ *Pithophora* (3.50%) *Cladophora* sp. (3.49%) *Spirogyra* sp. (2.63%) *Nitella* sp. (1.11%) และ *Microspora*

sp. (0.67%) ตามลำดับ สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นเถ้าโดยเรียงจากมากสุดไปน้อยสุด ได้แก่ *Cladophora* sp. (8.06%) *Nitell*a sp. (1.48%) *Spirogyra* sp. (1.46%) *Pithophora* sp. (0.87%) และ *Microspora* sp. (0.65%) ตามลำดับ สาหร่ายที่มีปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพที่เป็นสารอื่น ๆ โดยเรียงจากมากสุดไปน้อยสุด ได้แก่ *Spirogyra* sp. (75.72%) *Nitella* sp. (73.79%) *Microspora* sp. (62.08%) *Cladophora* sp. (46.26%) และ *Pithophora* sp. (42.08%) ตามลำดับ

6. การวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย

จากการวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย พบว่า *Cladophora* sp. และ *Spirogyra* sp. มีทั้งอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลส อย่างไรก็ตามการพบอัลฟาเซลลูโลสและบีตาเซลลูโลสใน *Cladophora* sp. นั้นไม่เป็นไปตามสมมติฐานการปรากฏของ linear TC และการปรากฏของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลส

ปัญหา อุปสรรคและข้อเสนอแนะ

1. ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเครื่องหมายยีนของสาหร่ายได้ครบทุกชนิด จึงไม่สามารถระบุชนิดในระดับสปีชีส์ได้ ซึ่งผู้ศึกษาอาจค้นคว้าข้อมูลหาเครื่องหมายยีนที่สามารถระบุชนิดในระดับสปีชีส์ของสาหร่ายแต่ละสกุล แต่อย่างไรก็ตามฐานข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเครื่องหมายยีนและสาหร่ายมีจำนวนจำกัด
2. สาหร่าย *Oedogonium* sp. มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพ และสาหร่าย *Microspora* sp., *Oedogonium* sp. และ *Pithophora* sp. มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ชนิดของเซลลูโลสในผนังเซลล์สาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายมีน้ำเป็นองค์ประกอบของเซลล์มากและมีความแน่นต่ำ ดังนั้นเพื่อให้สาหร่ายมีปริมาณเพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ ผู้ศึกษาอาจเพิ่มปริมาณสาหร่ายจากการเพาะเลี้ยง โดยค้นคว้าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย หรือเก็บสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งแหล่งน้ำที่เหมาะสมในการเก็บสาหร่ายนั้นควรจะเป็นแหล่งน้ำที่สะอาดและมีสาหร่ายชนิดที่ต้องการศึกษาเจริญเติบโตจำนวนมากเพียงชนิดเดียว
3. วิธีของ Xiang และคณะ (2016) ไม่สามารถใช้สกัดเซลลูโลสของสาหร่าย *Nitella* sp. ได้ จึงควรค้นคว้าหาวิธีอื่น ๆ เพื่อสกัดเซลลูโลสจากสาหร่ายชนิดนี้
4. จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพสาหร่าย พบว่า สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของมวลชีวภาพ ซึ่งปัจจุบันการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เฮมิเซลลูโลสในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์ยังขาดแคลน ดังนั้นการศึกษาเฮมิเซลลูโลสในสาหร่ายกลุ่มคลอโรไฟต์และสเตรปโตไฟต์จะสามารถเพิ่มความรู้และความเข้าใจวิวัฒนาการการปรากฏของเฮมิเซลลูโลสในพืชได้
5. ทรานสคิปโตมที่ใช้ในการวิเคราะห์หาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากทรานสคริปโตมของ *Cladophora glomerata* และ *Spirogyra* sp. ยังมีข้อจำกัด ทำให้ผลการวิเคราะห์อาจไม่สมบูรณ์ ผู้ศึกษาจึงควรใช้จีโนมของสาหร่ายในการวิเคราะห์หาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลสสำหรับการศึกษาในอนาคต

รายการเอกสารอ้างอิง

Andersen, R. A. 2005. *Algal culture technique*. Burlington: Elsevier Academic Press.

Appenzeller, L. et al. 2004. Cellulose synthesis in maize: isolation and expression analysis of the cellulose synthase (*Ces*A) gene family. *Cellulose* 11: 287-299.

Buschmann, H., and Zachgo, S. 2016. The evolution of cell division: from streptophyte algae to land plants. *Trends in Plant Science* 21: 872-883.

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Mart'inez, J. M., and Gabaldón, T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25: 1972-1973.

Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A. M., Stamatakis, A., Morel, B., and Flouri, T. 2019. ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *bioRxiv*: 612903.

Deguchi, S., Tsujiib, K., and Horikoshi, K. 2006. Cooking cellulose in hot and compressed water. *Chemical Communications*: 3293-3295.

Domozych, D. S. 2015. *Cell wall evolution and diversity*. New York: Springer International Publishing.

Drummond, C. S., Hall, J., Karol, K. G., Delwiche, C. F., and McCourt, R. M. 2005. Phylogeny of *Spirogyra* and *Sirogonium* (Zygnematophyceae) based on *rbc*L sequence data. *Journal of Phycology* 41: 1055-1064.

Evert, R. F. 2006. *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons.

Fangel, J. U. et al. 2012. Cell wall evolution and diversity. *Frontiers in Plant Science* 3.

Galbraith, D. W. 1981. Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplast using calcofluor white. *Physiologia Plantarum* 53: 111-116.

Goering, H. K., and Van Soest, P. J. 1970. *Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. Washington DC: Agriculture Research Service USDA.

Graham, E. L., Graham, J. M., Wilcox, L. W., and Cook, M. E. 2016. *Algae*. 3rd ed. Madison: LJLM Press.

Hanyuda, T., Wakana, I., Arai, S., Miyaji, K., Watano, Y., and Ueda, K. 2002. Phylogenetic relationships within Cladophorales (Ulvophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rRNA gene sequences, with special reference to *Aegagropila linnaei*. *Journal of Phycology* 38: 564-571.

Herburger, K., and Holzinger, A. 2016. Aniline blue and calcofluor white staining of callose and cellulose in the streptophyte green algae *Zygnema* and *Klebsormidium*. *Bio-protocol* 6: 20.

Herth, W. 1983. Arrays of plasma-membrane "rosettes" involved in cellulose microfibril formation of *Spirogyra*. *Planta* 159: 347-356.

Herth, W., and Schnepf, E. 1980. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma* 105: 129-133.

Itoh T., and Brown, R. M., Jr. 1984. The assembly of cellulose microfibrils in *Valonia macrophysa* Kiitz. *Planta* 160: 372-381.

Munir, N., Imtiaz, A., Sharif, N., and Naz, S. 2015. Optimization of growth conditions of different algal strains and determination of their lipid contents. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 25: 546-553.

Muztar, A. J., Slinger, S. J., and Burton, J. H. 1978. Chemical composition of aquatic macrophytes I. investigation of organic constituents and nutritional potential. *Canadian Journal of Plant Science* 58: 829-841.

Katoh, K., and Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.

Kim, N., Herth, W., Vuong, R., and Chanzy, H. 1996. The cellulose system in the cell wall of *Micrasterias*. *Journal of Structural Biology* 117: 195-203.

Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C. R., and Brown, R. M., Jr. 1999. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell* 11: 2075-2085.

Kudlicka, K., Wardrop, A., Itoh, T., and Brown Jr., R. M. 1987. Further evidence from sectioned material in support of the existence of a linear terminal complex in cellulose synthesis. *Protoplasma* 136: 96-103.

Matasci, N., et al. 2014. Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. *GigaScience* 3.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees in *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1-8.

Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsenf, J., and Youngblood, J. 2010. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews* 40: 3941-3994.

Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H., and Inouye, I. 1996. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rRNA sequence data. *Phycological Research* 44: 47-55.

Neville, A.C., and Levy, S. 1984. Helicoidal orientation of cellulose microfibrils in *Nitella opaca* internode cells: ultrastructure and computed theoretical effects of strain reorientation during wall growth. *Planta* 162: 370-384.

Pearlmutter, N., and Lembi, C. A. 1980. Structure and composition of *Pithophora oedogodia* (Chlorophyta) cell walls. *Journal of Phycology* 16: 602-616.

Popper, Z. A. et al. 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* 62: 567-590.

Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Prescott, G. W. 1954. *How to know the fresh-water algae*. Dubuque: W.C. Brown Co. Publishers.

Roberts, A. W., Roberts, E. M., and Delmer, D. P. 2002. Cellulose synthase (*CesA*) genes in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Eukaryotic Cell* 1: 847-855.

Ronquist, F., and Huelsenbeck, J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Sakayama, H., Hara, Y., Arai, S., Sato, H., and Nozaki, H. 2004. Phylogenetic analyses of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Phycologia* 43: 672-681.

Saxena, I. M., and Brown Jr., R. M. 2005. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Annals of Botany* 96: 9-21.

Sherwood, A. R., and Presting, G. G., 2007. Universal primers amplify a 23S rRNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* 43: 605-608.

Sherwood, A. R. et al. 2014. The Hawaiian freshwater algae biodiversity survey (2009-2014): systematic and biogeographic trends with an emphasis on the macroalgae. *BMC Ecology* 14.

Siddhanta, A. K. et al. 2011. The cellulose contents of Indian seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 23: 919-923.

Sørensen, I. et al. 2011. The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *The Plant Journal* 68: 201-211.

Sørensen, I.,Rose, J. K. C., Doyle, J. J., Domozych, D. S., and Willats, W. G. T. 2012. The Charophycean green algae as model systems to study plant cell walls and other evolutionary adaptations that gave rise to land plants. *Plant Signaling & Behavior* 7: 1-3.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.

Stancheva, R., Hall, J. D., McCourt, R. M., and Sheath, R. G. 2013. Identity and phylogenetic placement of *Spirogyra* species (Zygnematophyceae, Charophyta) from California streams and elsewhere. *Journal of Phycology* 49: 588-607.

Sucalditoa, M. R., and Camachoa D. H. 2017. Characteristics of unique HBr-hydrolyzed cellulose nanocrystals from freshwater green algae (*Cladophora rupestris*) and its reinforcement in starch-based film. *Carbohydrate Polymers* 169: 315-323.

Taylor, R. L., Bailey, J. C., and Freshwater, D. W. 2017. Systematics of *Cladophora* spp. (Chlorophyta) from North Carolina, USA, based upon morphology and DNA sequence data with a description of *Cladophora subtilissima* sp. nov. *Journal of Phycology* 53: 541-556.

Technical Association of the Pulp and Paper. 1999. *Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp*. [Online]. Available form: https://research.cnr.ncsu.edu/wpsanalytical/documents/T203.PDF [2018,10 august].

Tipnee, S., Ramaraj, R., and Unpaprom, Y. 2015. Nutritional Evaluation of Edible Freshwater Green Macroalga *Spirogyra varians. Emergent Life Sciences Research* 1: 1-7.

Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A. B., and Ståhl, K. 2005. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. *Cellulose* 12: 563-576.

Tsekos, I. 1999. The sites of cellulose synthesis in algae: diversity and evolution of cellulose-synthesizing enzyme complex. *Journal of Phycology* 35: 635-655.

Ververis, C. et al. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology* 98: 296-301.

Xiang, Z. et al. 2016. A comparison of cellulose nanofibrils produced from *Cladophora glomerata* algae and bleached eucalyptus pulp. *Cellulose* 23: 493-503.

Yan, Z., Chen, S., Wang, H., Wang, B., Wang, C., and Jiang, J. 2008. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of multi-walled carbon nanotubes. *Carbohydrate Research* 343: 73-80.

Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., and Xu, Y. 2012 dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research* 40: 445-451.

โศรดา กนกพานนท์, ชารีฟ อินทพันธ์ และ อภิตา บุญศิริ. 2560. การสังเคราะห์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากเปลือกมะพร้าวอ่อน. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของมวลชีวภาพ

1. Neutral detergent

ชั่ง Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 16.18 g และ Sodium tetraborate decahydrate (Borax) 6.81 g ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ นำไปต้มจนละลายหมด จากนั้นละลาย Sodium lauryl sulphate 30 g ในน้ำ แล้วเติม 2-ethoxyethanol 10 ml ใส่ในบีกเกอร์อีกใบ นำสารละลายทั้งสองบีกเกอร์มาผสมกัน จากนั้นชั่ง Disodium hydrogen phosphate anhydrous 4.58 g ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ แล้วนำไปต้มจนละลายหมด จากนั้นเติมสารละลายที่ผสมในบีกเกอร์ก่อนหน้านี้ ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.9-7.1

2. Acid detergent

ละลาย Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 20 g. ใน 1 N Sulfuric acid 1 แล้วปรับปริมาตรด้วย 1 N Sulfuric acid ให้ได้ 1 liter

3. Saturated potassium permanganate

ละลาย Potassium permanganate 50 g และ Silver sulphate 0.05 g ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 liter ควรเก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชาและห้ามโดนแสงแดด

4. Lignin buffer

ละลาย Ferric nitrate nonahydrate 6 g และ Silver nitrate 0.15 g ในน้ำกลั่น 100 ml เติม Acetic acid glacial 500 ml เติม Potassium acetate 5 g และเติม Tertiary butyl alcohol 400 ml ผสมให้เข้ากัน

5. Combined permanganate

ผสมสารละลาย Saturated potassium permanganate กับ Lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ควรเก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชาและห้ามโดนแสงแดด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแล้วจะสามารถนำมาใช้ได้อีก

6. Demineralizing

ละลาย Oxalic acid dehydrate 50 g ในน้ำกลั่น 700 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่น 250 ml และ Hydrochloric acid 50 ml ผสมให้เข้ากัน

7. Ethanol **ความเข้มข้น** 80% (v/v)

ผสม ethanol ความเข้มข้น 95% (v/v) 843 ml กับน้ำกลั่น 157 ml แล้วเขย่าให้เข้ากัน

ภาคผนวก ข

accession number

ภาคผนวก ข
accession number ของสาหร่ายสำหรับการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ

ตารางที่ ข1 accession number ของสาหร่ายที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานเครื่องหมายยีน 23S rDNA ของสาหร่าย *Cladophora* sp.

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
MF683076.1*	*Aegagropila linnaei*	16S ribosamal RNA gene, partal sequence
AJ544763.1	*Cladophora capensis*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544753.1	*Cladophora coelothrix*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544754.1	*Cladophora coelothrix*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544755.1	*Cladophora dotyana*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544756.1	*Cladophora dotyana*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544728.1	*Cladophora horii*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421223.1	*Cladophora* sp. JC1	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421224.1	*Cladophora* sp. JC2	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421225.1	*Cladophora* sp. JC3	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421226.1	*Cladophora* sp. LC1	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421227.1	*Cladophora* sp. LC2	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421228.1	*Cladophora* sp. SQW1	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421229.1	*Cladophora* sp. SQW2	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421230.1	*Cladophora* sp. SQW3	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421231.1	*Cladophora* sp. ST1	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421232.1	*Cladophora* sp. ST2	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421233.1	*Cladophora* sp. XA1	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
KX421234.1	*Cladophora* sp. XA2	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544761.1	*Cladophora laetevirens*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
MG021092.1	*Cladophora* sp. isolate JIAC-WT-Filamentous 2	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
MG021094.1	*Cladophora* sp. JIAC-WT-filamentous 2	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544757.1	*Cladophora ordinata*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544764.1	*Cladophora rupestris*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544752.1	*Cladophora sibogae*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
AJ544760.1	*Cladophora vagabunda*	Large subunit ribosomal RNA gene, partal sequence
MK863366	*Cladophora* sp.	23S ribosomal RNA gene, studied *Cladophora* sp.

* คือ outgroup

ตารางที่ ข2 accession number ของสาหร่ายที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานเครื่องหมายยีน 23S rDNA ของสาหร่าย *Nitella* sp.

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
AF033652.1	*Chara australis*	23S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 2, 4.5S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer, 5S ribosomal RNA gene, and 5S-tRNA-Arg intergenic spacer, complete sequence
KM676582.1	*Chara braunii*	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676700.1	*Chara braunii*	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676701.1	*Chara braunii*	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676785.1	*Chara braunii*	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380560.1	*Chara drouetii* strain KGK0467	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380561.1	*Chara foliolosa* strain KGK0333	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380562.1	*Chara foliolosa* strain KGK0341	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380563.1	*Chara foliolosa* strain KGK0393	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380564.1	*Chara foliolosa* strain KGK0428	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380565.1	*Chara haitensis* strain KGK0483	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380566.1	*Chara haitensis* strain S/T076	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380567.1	*Chara haitensis* strain TAMPS80	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380569.1	*Chara haitensis* strain X-901 23S	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380571.1	*Chara hydropitys* strain KGK0340	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380572.1	*Chara hydropitys* strain KGK0466	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380573.1	*Chara rusbyana* strain LG	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380575.1	*Chara zeylanica* strain KGK0343	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380578.1	*Chara zeylanica* strain KGK0403	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380579.1	*Chara zeylanica* strain KGK0468	23S ribosomal RNA gene, partial sequence

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
HQ380580.1	*Chara zeylanica* strain KGK0709	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
HQ380581.1	*Chara zeylanica* strain X-315	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF426578.1	*Nitella* sp. 00221	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676696.1	*Nitella* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676743.1	*Nitella* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676762.1	*Nitella* sp. 2 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
AF518405.1	*Nitella mucronata*	23S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 2, 4.5S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 3, and 5S ribosomal RNA gene, complete sequence
X52737.1*	*Coleochaete orbicularis*	Chloroplast DNA for transfer RNA-Ala, transfer RNA-Ile and 23S ribosomal RNA
MK855396	*Nitella* sp.	23S ribosomal RNA gene, studied *Nitella* sp.

* คือ outgroup

ตารางที่ ข3 accession number ของสาหร่ายที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานเครื่องหมายยีน 23S rDNA ของสาหร่าย *Spirogyra* sp.

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
EF426579.1	*Spirogyra* sp. 00509	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF426580.1	*Spirogyra* sp. 00554	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF426581.1	*Spirogyra* sp. 00237	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF426582.1	*Spirogyra* sp. 00239	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676568.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676571.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676572.1	*Spirogyra* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676575.1	*Spirogyra* sp. 6 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676578.1	*Spirogyra* sp. 6 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676581.1	*Spirogyra* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676583.1	*Spirogyra* sp. 7 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676584.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676590.1	*Spirogyra* sp. 7 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676597.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676602.1	*Spirogyra* sp. 8 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676604.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676606.1	*Spirogyra* sp. 6 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676627.1	*Spirogyra* sp. 8 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676628.1	*Spirogyra* sp. 8 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676629.1	*Spirogyra* sp. 8 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676649.1	*Spirogyra* sp. 5 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676652.1	*Spirogyra* sp. 5 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676655.1	*Spirogyra* sp. 5 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676660.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676668.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676670.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676672.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676674.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676684.1	*Spirogyra* sp. 5 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676694.1	*Spirogyra* sp. 9 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676716.1	*Spirogyra* sp. 5 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676722.1	*Spirogyra* sp. 2 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676723.1	*Spirogyra* sp. 2 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676733.1	*Spirogyra* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676738.1	*Spirogyra* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676754.1	*Spirogyra* sp. 6 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
KM676755.1	*Spirogyra* sp. 2 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676768.1	*Spirogyra* sp. 3 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676769.1	*Spirogyra* sp. 8 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676770.1	*Spirogyra* sp. 4 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676771.1	*Spirogyra* sp. 4 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676789.1	*Spirogyra* sp. 7 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676794.1	*Spirogyra* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676795.1	*Spirogyra* sp. 2 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676796.1	*Spirogyra* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676813.1	*Spirogyra* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676570.1	*Spirogyra maxima*	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676641.1	*Spirogyra maxima*	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
KM676576.1*	*Zygnema* sp. 1 AS-2014	23S ribosomal RNA gene, partial sequence
MK855399	*Spirogyra* sp.	23S ribosomal RNA gene, studied *Spirogyra* sp.

* คือ outgroup

ตารางที่ ข4 accession number ของสาหร่ายที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานเครื่องหมายยีน *rbc*L ของสาหร่าย *Microspora* sp.

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
HQ246355.1	*Acutodesmus bajacalifornicus* strain ZA1-4	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT003371.1	*Ankistrodesmus densus* strain CCMA_UFSCar 128	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ246361.1	*Acutodesmus deserticola* strain BCP-YPG-Char	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT369399.1	*Atractomorpha echinata*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ394814.1	*Ankistrodesmus falcatus* culture-collection UTEX:101	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355769.1	*Ankistrodesmus fasciculatus* culture-collection personal:Christina Bock:CB 2012/3	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT833570.1	*Ankistrodesmus fusiformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355759.1	*Ankistrodesmus gracilis* culture-collection UFScarCC:470	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113407.1	*Ankyra judayi* strain CH92	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113413.1	*Atractomorpha porcata* strain Hoffman Lemoncove 4	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT833573.1	*Ankistrodesmus spiralis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113409.1	*Ankyra starrii* strain UTEX 2158	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113406.1	*Ankistrodesmus stipitatus* strain SAG 202-5	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355749.1	*Ankistrodesmus stipitatus* culture-collection UFScarCC:278	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GQ985398.1	*Bracteacoccus aerius* strain UTEX 1250	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259862.1	*Bracteacoccus aggregatus* strain G2-3	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259866.1	*Bracteacoccus bullatus* strain BCP-CNP1-VF16	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GQ985402.1	*Bracteacoccus cohaerens* strain UTEX 1272	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JF717388.1	*Bracteacoccus cohaerens* strain BCP-SRS2VF3	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ246366.1	*Bracteacoccus giganteus* strain ATA1-4CV4	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259885.1	*Bracteacoccus glacialis* strain BCP-WJT36-VFNP6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GQ985396.1	*Bracteacoccus grandis* strain UTEX 1246	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GQ985400.1	*Bracteacoccus medionucleatus* strain UTEX 1244	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
JF717391.1	*Bracteacoccus minor* strain TOT 27	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259898.1	*Bracteacoccus occidentalis* strain BCP-WJT60-VFNP17	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259901.1	*Bracteacoccus polaris* strain KF30	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ246364.1	*Bracteacoccus pseudominor* strain BCP-WJT71VFNP15	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259863.1	*Bracteacoccus ruber* strain CCAP 221-7	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC145508.1	*Botryosphaerella sudetica* strain UTEX 2629	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EU380519.1	*Bracteacoccus terrestris* strain CCAP221/4	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259908.1	*Bracteacoccus xerophilus* strain BCP-NB2-VF24	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355757.1	*Chlorolobion braunii* culture-collection UFScarCC:462	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT624910.1	*Carteria crucifera*	clone ontig80 chloroplast, partial genome
KC145512.1	*Chlorotetraedron incus* strain SAG 43.81	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ394810.1	*Chaetophora lobata* culture-collection UTEX:LB1289	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ902940.1	*Chromochloris zofingiensis* culture SAG:211-14 strain SAG 211-14	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC315289.1	*Desmodesmus baconii*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT003374.1	*Desmodesmus communis* strain CCMA_UFSCar 030	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192427.1	*Desmodesmus costato-granulatus* strain Tow 10/11 T-3w	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192435.1	*Desmodesmus cuneatus* strain Tow 6/16 T-2w	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192429.1	*Desmodesmus denticulatus* var. linearis strain Tow 8/18 T-23w	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192426.1	*Desmodesmus elegans* strain Tow 6/16 T-32w	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG778268.1	*Dictyochloris fragrans*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192433.1	*Desmodesmus hystrix* strain NDem 9/21 T-9w	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192424.1	*Desmodesmus itascaensis* strain Tow 8/18 P-1d	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192431.1	*Desmodesmus multivariabilis* var. turskensis strain Mary 8/18 T-1w	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
GU192418.1	*Desmodesmus santosii* strain Tow 8/18 P-14w	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192409.1	*Desmodesmus serratus* strain Hegewald 1994-4	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT777977.1	*Desmodesmus spinosus* isolate 1283-1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GQ985404.1	*Dictyococcus varians* strain UTEX LB 62	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259910.1	*Follicularia botryoides* strain UTEX LB951	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ246350.1	*Flechtneria rotunda* strain BCP-SEV3VF49	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ246351.1	*Flechtneria rotunda* strain BCP-SEV3VF4	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259912.1	*Follicularia texensis* strain UTEX 1241	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ394816.1	*Follicularia texensis* culture-collection UTEX:1241	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078304.1	*Hydrodictyon africanum* strain UTEX LB782	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113449.1	*Hydrodictyon africanum* strain UTEX LB 782	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078309.1	*Hydrodictyon patenaeforme* strain CCAP236	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ394815.1	*Hariotina reticulata* culture-collection UTEX:LB1365	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KY792652.1	*Hariotina reticulata*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078305.1	*Hydrodictyon reticulatum* strain UTEX LB515	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078306.1	*Hydrodictyon reticulatum* strain Carolina Biological Supply	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078307.1	*Hydrodictyon reticulatum* strain SF0201NY	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078308.1	*Hydrodictyon reticulatum* strain ML0301CT	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078322.1	*Hydrodictyon reticulatum* strain NZ0301	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078341.1	*Hydrodictyon reticulatum* strain YB0505	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078401.1	*Hydrodictyon reticulatum* strain JHHydro	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC145514.1	*Kirchneriella aperta* strain SAG 2004	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355743.1	*Kirchneriella irregularis* var. spiralis culture-collection UFScarCC:174	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355752.1	*Kirchneriella irregularis* culture-collection UFScarCC:348	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
KT833565.1	*Kirchneriella lunaris*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT833563.1	*Kirchneriella obesa*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355740.1	*Monoraphidium arcuatum* culture-collection UFScarCC:24	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
AB175934.1	*Monoraphidium circinale* strain NIES-480	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
LC474828.1	*Monoraphidium contortum* NIES-4295	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355765.1	*Monoraphidium dybowskii* culture-collection personal:Christina Bock:CB 2009/27	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113452.1	*Mychonastes* sp. YHL/S/PLANKTON10	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT833561.1	*Monoraphidium griffithii*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC145515.1	*Mychonastes homosphaera* strain CAUP H6502	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT833568.1	*Monoraphidium indicum*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355763.1	*Monoraphidium komarkovae* culture-collection UFScarCC:632	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT693222.1	*Microspora* sp. UTEX LB472	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG778408.1	*Microspora* sp. UTEX LB472	chloroplast, partial genome
KT355767.1	*Monoraphidium minutum* culture-collection personal:Christina Bock:CB 2009/37	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355751.1	*Monoraphidium pseudobraunii* culture-collection UFScarCC:325	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078333.1	*Monactinus simplex* strain UTEX LB1601	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078343.1	*Monactinus simplex* strain ML0406MN	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KY094109.1	*Nephrocytium agardhianum* culture FACHB:2124	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078344.1	*Neochloris aquatica* strain UTEX 138	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KY094108.1	*Nephrocytium limneticum* culture FACHB:2123	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113457.1	*Neochloris vigensis* strain UTEX 1981	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ481211.1*	*Oedogonium brevicingulatum* strain M1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
JQ394813.1	*Oedocladium carolinianum* culture-collection UTEX:LB1686	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT369475.1	*Ourococcus multisporus*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KU961535.1	*Pseudopediastrum alternans* strain 01.021213	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078335.1	*Pediastrum angulosum* strain UETX LB1366	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113466.1	*Pseudoschroederia antillarum* strain SAG B 15.86	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HM852438.1	*Pseudomuriella aurantiaca* strain CCAP 249/1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078303.1	*Parapediastrum biradiatum* strain UTEX 37	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078319.1	*Pediastrum boryanum* f. forcipatum strain SAG 87.81	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078347.2	*Pseudopediastrum boryanum* strain AL0402MN	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds and GIY-YIG homing endonuclease (HEG) gene, complete cds
EF078317.1	*Pediastrum braunii* strain SAG 43.85	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ292739.1	*Pseudomuriella cubensis* strain KF2	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078390.2	*Pediastrum duplex* var. duplex strain ACOI893	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355745.1	*Pseudokirchneriella elongata* culture-collection UFScarCC:229	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HM770958.1	*Pseudomuriella engadinensis* strain UTEX 57	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ292736.1	*Pseudomuriella engadinensis* strain ATA4-KH47C	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HM852435.1	*Planktosphaeria gelatinosa* strain SAG 262-1b	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078315.1	*Pediastrum integrum* strain SAG 29.81	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MH180197.1	*Pseudopediastrum* cf. *integrum* MS-2018	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EU380520.1	*Pseudodictyosphaerium jurisii* strain CCAP260/1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078338.2	*Pseudopediastrum kawraiskyi* strain ML0412MN	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds and HEG pseudogene, complete sequence
KT355747.1	*Planktococcomyxa lacustris* culture-collection UFScarCC:261	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259911.1	*Planktosphaeria maxima* strain UTEX 1248	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
HQ292738.1	*Pseudomuriella schumacherensis* strain BCP-ZNP1-VF6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
EF078381.1	*Pediastrum simplex* var. echinulatum strain ACOI1041	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MH180192.1	*Pediastrum* cf. *subgranulatum* MS-2018	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT355768.1	*Raphidocelis microscopica* culture-collection personal:Christina Bock:CB 2009/6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
JQ259914.1	*Radiococcus polycoccus* strain SAG 217-1b	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078314.1	*Sorastrum americanum* strain SAG 13.94	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT833575.1	*Selenastrum bibraianum*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT777978.1	*Scenedesmus bijugus* isolate 76_1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
LC200423.1	*Selenastrum capricornutum* strain NIES-35	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC145516.1	*Schizochlamys gelatinosa* strain SAG 66.94	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
GU192437.1	*Scenedesmus obliquus* strain Tow 9/21 P-1w	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078392.1	*Stauridium privum* strain ACOI784	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT777981.1	*Scenedesmus quadricauda* isolate 4_2	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113472.1	*Sphaeroplea robusta* strain UTEX LB 2350	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113470.1	*Schroederia setigera* strain UTEX LB 2454	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF113473.1	*Sphaeroplea soleirolii* var. crassisepta strain Hoffman PASS C Iso E	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078311.1	*Sorastrum spinulosum* strain UTEX LB2452	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
EF078391.2	*Stauridium tetras* strain ACOI84	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds and HNH homing endonuclease (HEG) gene, complete cds
KT777984.1	*Tetradesmus dimorphus* isolate 959-3	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT777948.1	*Tetradesmus obliquus* isolate SM17-4	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

* คือ outgroup

ตารางที่ ข5 accession number ของสาหร่ายที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงวงศ์วานเครื่องหมายยีน *rbc*L ของสาหร่าย *Spirogyra* sp.

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
DQ995981.1	*Spirogyra africana*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995982.1	*Spirogyra africana*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995983.1	*Spirogyra africana*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995984.1	*Spirogyra africana*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995985.1	*Spirogyra africana*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995986.1	*Spirogyra africana*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995987.1	*Spirogyra africana*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779204.1	Spirogyra australica strain RSS019	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779189.1	Spirogyra borgeana strain RSS002	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779194.1	Spirogyra borgeana strain RSS007	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779209.1	Spirogyra borgeana strain RSS024	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779210.1	Spirogyra borgeana strain RSS025	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779188.1	Spirogyra californica strain RSS001	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015930.1	Spirogyra chunkingensis strain UTEX LB 1680	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015931.1	Spirogyra communis strain UTEX LB 2463	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015932.1	Spirogyra communis strain UTEX LB 2462	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015933.1	Spirogyra communis strain UTEX LB 2465	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015934.1	Spirogyra communis strain UTEX LB 2466	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015935.1	Spirogyra communis strain UTEX LB 2464	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015936.1	Spirogyra condensata strain UTEX LB 1744	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779170.1	*Spirogyra croasdaleae* strain JH0425	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995988.1	*Spirogyra decimina*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995989.1	*Spirogyra decimina*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995990.1	*Spirogyra decimina*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
DQ995991.1	*Spirogyra decimina*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995992.1	*Spirogyra distenta*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995993.1	*Spirogyra dubia*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995994.1	*Spirogyra dubia*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995995.1	*Spirogyra dubia*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995996.1	*Spirogyra ellipsospora*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995997.1	*Spirogyra ellipsospora*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779216.1	*Spirogyra elongata* strain RSS031	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779201.1	*Spirogyra fluviatilis* strain RSS016	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779218.1	*Spirogyra fluviatilis* strain RSS033	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779224.1	*Spirogyra fluviatilis* strain RSS040	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015937.1	*Spirogyra gracilis* strain UTEX LB 1743	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995999.1	*Spirogyra gracilis* strain UTEX LB1743	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015938.1	*Spirogyra grevilleana* strain UTEX LB 477	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ996000.1	*Spirogyra grevilleana* strain UTEX LB477	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779197.1	*Spirogyra grevilleana* strain RSS011	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779202.1	*Spirogyra grevilleana* strain RSS017	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015939.1	*Spirogyra juergensii* strain UTEX LB 1742	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779200.1	*Spirogyra juliana* strain RSS015	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015940.1	*Spirogyra liana* strain UTEX LB 1745	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779190.1	*Spirogyra lutetiana* strain RSS003	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779203.1	*Spirogyra lutetiana* strain RSS018	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
AF482498.1	*Spirogyra maxima*	Ribulose bisphosphate carboxylase large subunit (*rbc*L) gene; and cytochrome b6 (*pet*B) and cytochrome b6-f complex subunit 4 (*pet*D) genes, complete cds; chloroplast genes for chloroplast products

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
KC779193.1	*Spirogyra majuscula* strain RSS006	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015941.1	*Spirogyra maxima* strain UTEX LB 2495	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779211.1	*Spirogyra maxima* strain RSS026	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779213.1	*Spirogyra maxima* strain RSS028	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779217.1	*Spirogyra maxima* strain RSS032	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KM677029.1	*Spirogyra maxima*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KM677037.1	*Spirogyra maxima*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KU646489.1	*Spirogyra maxima* culture-collection UTEX:LB 2495	chloroplast, complete genome
L11057.1	*Spirogyra maxima*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, complete cds
NC_030355.1	*Spirogyra maxima*	chloroplast, complete genome
DQ015942.1	*Spirogyra mienningensis* strain UTEX LB 1681	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015943.1	*Spirogyra notabilis* strain UTEX LB 1682	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779195.1	*Spirogyra notabilis* strain RSS008	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015944.1	*Spirogyra occidentalis* strain UTEX LB 1683	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ996001.1	*Spirogyra occidentalis* strain UTEX LB1683	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779166.1	*Spirogyra parvula* strain JH0002	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015945.1	*Spirogyra pratensis* strain UTEX LB 924	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015946.1	*Spirogyra pratensis* strain UTEX LB 926	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015947.1	*Spirogyra pratensis* strain UTEX LB 927	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015948.1	*Spirogyra pratensis* strain UTEX LB 928	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015949.1	*Spirogyra pratensis* strain UTEX LB 1746	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015950.1	*Spirogyra quadrilaminata* strain UTEX LB 1684	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG700556.1	*Spirogyra setiformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG700557.1	*Spirogyra setiformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG700558.1	*Spirogyra setiformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
MG700559.1	*Spirogyra setiformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG700560.1	*Spirogyra setiformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG700561.1	*Spirogyra setiformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779206.1	*Spirogyra submaxima* strain RSS021	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG700554.1	*Spirogyra submaxima*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
MG700555.1	*Spirogyra submaxima*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779186.1	*Spirogyra tenuissima* strain JH1015	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779187.1	*Spirogyra tenuissima* strain ACOI 1925	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779192.1	*Spirogyra teodoresci* strain RSS005	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779196.1	*Spirogyra teodoresci* strain RSS010	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779198.1	*Spirogyra teodoresci* strain RSS012	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779208.1	*Spirogyra teodoresci* strain RSS023	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779212.1	*Spirogyra teodoresci* strain RSS027	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ015951.1	*Spirogyra varians* strain UTEX LB 479	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ996002.1	*Spirogyra varians*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ996003.1	*Spirogyra varians*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779199.1	*Spirogyra varians* strain RSS013	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ996004.1	*Spirogyra variformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ996005.1	*Spirogyra variformis*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
DQ995998.1	*Spirogyra weberi*	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KC779191.1	*Spirogyra weberi* strain RSS004	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds
KT982593.1*	*Zygnema* sp.	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) gene, partial cds

* คือ outgroup

ตารางที่ ข5 accession number ของพืช สาหร่ายกลุ่มสเตรปโตไฟต์และแบคทีเรียที่ใช้ในการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของสาหร่ายที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เซลลูโลส

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
KPF36204.1	*Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium	cellulose synthase, partial
ALR78545.1	*Enterobacter lignolyticus*	cellulose synthase
KRW60782.1	*Aeromonas allosaccharophila*	cellulose synthase
KDV02242.1	*Aeromonas* sp. HZM	cellulose synthase
AHG20399.1	*Chania multitudinisentens* RB-25	cellulose synthase
ALB68593.1	*Cronobacter dublinensis* subsp. dublinensis LMG 23823	cellulose synthase
ALB72671.1	*Cronobacter muytjensii* ATCC 51329	cellulose synthase
AKR79135.1	*Edwardsiella* sp. LADL05-105	cellulose synthase
KJQ01599.1	*Enterobacter asburiae*	cellulose synthase
KJQ34719.1	*Enterobacter bugandensis*	cellulose synthase
KTQ78648.1	*Enterobacter cancerogenus*	cellulose synthase
KIF96985.1	*Enterobacter cloacae*	cellulose synthase
KTQ80668.1	*Enterobacter hormaechei*	cellulose synthase
KKA55077.1	*Enterobacter roggenkampii*	cellulose synthase
KOC94519.1	*Erwinia iniecta*	cellulose synthase
KIH03626.1	*Escherichia coli*	cellulose synthase
KUG85545.1	*Escherichia coli*	cellulose synthase
KMV32560.1	*Franconibacter pulveris*	cellulose synthase
AKK82803.1	*Klebsiella aerogenes*	cellulose synthase
AKH01088.1	*Klebsiella pneumoniae*	cellulose synthase
ALD05976.1	*Klebsiella quasipneumoniae*	cellulose synthase
KKY80947.1	*Klebsiella variicola*	cellulose synthase
ATU72095.1	*Komagataeibacter xylinus*	cellulose synthase
KML25368.1	*Leclercia adecarboxylata*	cellulose synthase
KMN63943.1	*Leclercia* sp. LK8	cellulose synthase
KKI47415.1	*Obesumbacterium proteus*	cellulose synthase
KTS86951.1	*Pantoea dispersa*	cellulose synthase
ALV93971.1	*Pantoea vagans*	cellulose synthase
KHT31571.1	*Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum	cellulose synthase
AKL14631.1	*Phytobacter ursingii*	cellulose synthase
KMK36077.1	*Pluralibacter gergoviae*	cellulose synthase
KSW18576.1	*Proteus mirabilis*	cellulose synthase
AJE17117.1	*Pseudomonas balearica* DSM 6083	cellulose synthase
KOX65511.1	*Pseudomonas psychrophila*	cellulose synthase
KMN16954.1	*Pseudomonas weihenstephanensis*	cellulose synthase

accession number	ชื่อวิทยาศาสตร์	รายละเอียด
ALD44575.1	*Serratia marcescens*	cellulose synthase
KQN68410.1	*Serratia* sp. Leaf51	cellulose synthase
KRG86535.1	*Stenotrophomonas acidaminiphila*	cellulose synthase
KRG52890.1	*Stenotrophomonas maltophilia*	cellulose synthase
KRG57265.1	*Stenotrophomonas nitritireducens*	cellulose synthase
KNC94457.1	*Trabulsiella odontotermitis*	cellulose synthase
AKP33753.1	*Yersinia aleksiciae*	cellulose synthase
ALG76998.1	*Yersinia enterocolitica*	cellulose synthase
ABI78962.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase 10, partial
ABI78961.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase 8
ABI78960.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase 7
ABI78959.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase 6
ABI78958.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase 5
ABI78957.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase 4
ABI75158.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like D8
ABI75157.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like D7
ABI75156.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like D6
ABI75155.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like D5
ABI75154.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like D4
ABI75153.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like D3
ABI75152.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like D2
ABI75151.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like D1
AAT48373.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase-like protein, partial
AAT48372.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase catalytic subunit, partial
AAT48371.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase catalytic subunit, partial
AAT48370.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase catalytic subunit, partial
AAT48368.1	*Physcomitrella patens*	cellulose synthase catalytic subunit, partial
AAT48369.1	*Mesotaenium caldariorum*	cellulose synthase catalytic subunit
AAM83097.1	*Mesotaenium caldariorum*	cellulose synthase catalytic subunit, partial
AAM83096.1	*Mesotaenium caldariorum*	cellulose synthase catalytic subunit
AAT48374.1	*Ceratopteris richardii*	cellulose synthase-like protein, partial
AAO15532.1	*Arabidopsis thaliana*	cellulose synthase