ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การระบุเชิงโมเลกุล ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอของ *Spirogyra* spp.
ผู้เขียน	นายพีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. ยุวดี พีรพรพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ศ.ดร. สายสมร ลำยอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. กนกพร แสนเพชร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการระบุเชิงโมเลกุล ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอของ *Spirogyra* spp. ทำการเก็บสาหร่าย *Spirogyra* จำนวน 36 จากแหล่งน้ำบางแหล่งของประเทศไทยระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2552 ถึง เดือนพฤษภาคม 2555 ประกอบด้วย จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำปาง ลำพูน แพร่ น่าน แม่ฮ่องสอน ตาก อุตรดิตถ์ พิษณุโลก ลพบุรี อ่างทอง ปราจีนบุรี นครสวรรค์ สุพรรณบุรี ราชบุรี ชัยนาท กาญจนบุรี สระบุรี เพชรบุรี นครพนม อุดรธานี เลย มหาสารคาม กาฬสินธิ์ มุกดาหาร จันทบุรี ระยอง ชุมพร สุราษฎร์ธานี และประจวบคีรีขันธ์ พร้อมทั้งบันทึกคุณภาพของแหล่งน้ำได้แก่ ความเป็นกรดด่าง, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ค่าความนำไฟฟ้า ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ความเค็ม ของแข็งที่แขวนลอยในน้ำ โดยมีค่าเท่ากับ 4.09 – 9.04, 113 - 752 µs, 63 – 671 ppm, 0.1-0.8, and 5.5 - 11.2 mg/l ตามลำดับ

จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผลการศึกษาพบว่า สาหร่าย *Spirogyra* ถูกจัดจำแนกออกเป็น 5 รูปแบบ ตามลักษณะสัณฐานวิทยาดังนี้ รูปแบบที่ 1 ลักษณะของคลอโรพลาสต์มีการบิดเป็นเกลียวค่อนข้างแน่น รูปแบบที่ 2 เซลล์สั้น คลอโรพลาสต์บิดเกลียวไม่แน่นมาก และไม่ชัดเจน รูปแบบที่ 3 เซลล์ยาว คลอโรพลาสต์บิดเกลียวกันอย่างหลวมๆ ชัดเจน รูปแบบที่ 4 เซลล์สั้น คลอโรพลาสต์บิดเกลียวกันอย่างหลวมๆ และรูปแบบที่ 5 เซลล์ยาว คลอโรพลาสต์บิดเกลียวกันค่อนข้างแน่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาโดยการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของสาหร่าย *Spirogyra* ทั้งหมด 36 ตัวอย่างด้วยเทคนิค ISSR–PCR โดยใช้ primer 10 สายประกอบด้วย UBC 809, UBC 826, UBC 835, UBC 808, UBC 825, UBC 827, UBC 864, UBC 857, UBC 880 และ UBC 807 และ HAT-RAPD PCR โดยใช้ primer 5 สายประกอบด้วย O 15, O 16, V 14, V 15 และ B 01 พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 111 แถบ และ 69 แถบ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอสามารถจัดกลุ่มสาหร่ายโดย ISRR-PCR และ HAT-RAPD PCR พบว่าสาหร่าย *Spirogyra* ทั้ง 36 ตัวอย่างถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม

เมื่อพิจารณาลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ของสาหร่าย *Spirogyra* ทั้ง 5 รูปแบบ ด้วยชุดโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่า สาหร่าย *Spirogyra* รูปแบบที่ 1 มีความใกล้เคียงกับ *S. ellipsospora* Kütz ถึง 99% ส่วนสาหร่าย *Spirogyra* รูปแบบที่ 3 มีความใกล้เคียงกับ *S. neglecta* Kütz 93% ซึ่งสามารถใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของสาหร่าย *Spirogyra* ส่วนลำดับดีเอ็นเอของ ITS 2 พบว่า ลำดับเบสของสาหร่าย *Spirogyra* ทั้ง 5 รูปแบบ มีความใกล้เคียงกับ *Chlorella* ด้วยค่า similarity 89-96% ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีลำดับดีเอ็นเอของ ITS 2 ของสาหร่าย *Spirogyra* อยู่ในฐานข้อมูล NCBI นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งสองด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Molecular Identification, Genetic Relationships and Development of DNA Markers of *Spirogyra* spp.
Author	Mr. Pheravut Wongsawad
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Peerapornpisal Advisor
	Prof. Dr. Saisamorn Lamyong Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Saenphet Co-advisor

Abstract

This study was aimed to investigate the molecular identification, genetic relationships and development of DNA markers of *Spirogyra* spp. The 36 *Spirogyra* specimens were collected randomly in all part of Thailand during February 2009 to May 2011 including Chiang Rai, Chiang Mai, Phayao, Lampang, Lamphun, Phrae, Nan, Mae Hong Son, Tak, Uttaradit, Phitsanulok, Lop Buri, Ang Thong, Prachin Buri, Nakhon Sawan, Suphan Buri, Ratchaburi, Chainat, Kanchanaburi, Saraburi, Phetchaburi, Nakhon Phanom, Udon Thani, Loei, Maha Sarakham, Kalasin, Mukdahan, Chanthaburi, Rayong, Chumphon, Surat Thani, and Prachuap Khiri Khan provinces. The water quality from each collecting sites were recorded including pH, dissolve oxygen (DO), conductivity, biochemical oxygen demand (BOD), salinity and total dissolve solid (TDS), which was ranged from 4.09 – 9.04, 113 - 752 µs, 63 – 671 ppm, 0.1-0.8, and 5.5 - 11.2 mg/l, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

After that, all specimens of *Spirogyra* were investigated morphological characteristics under both of light microscope and scanning electron microscope. The results shown that, the *Spirogyra* specimens were classified into 5 patterns as fallows; Pattern 1: condensed and slightly compacted chloroplast spiral, Pattern 2: short cell with scattered chloroplast spiral, Pattern 3: long cell with less chloroplast spiral, Pattern 4: short cell with less chloroplast spiral and Pattern 5: long cell with condensed and compacted chloroplast spiral.

In addition, DNA markers of 36 *Spirogyra* specimens were investigated using 10 ISSR primers (UBC 809, UBC 826, UBC 835, UBC 808, UBC 825, UBC 827, UBC 864, UBC 857, UBC 880 and UBC 807) and 5 primers of HAT-RAPD PCR (O 15, O 16, V 14, V 15 and B 01). The results shown that, both of PCR techniques were amplified 111 and 69 fragments, respectively. The analysis of the DNA fragments can be grouped 36 *Spirogyra* specimens by ISRR-PCR and HAT-RAPD PCR which are separated into five groups.

Based on the 5 morphological patterns of DNA sequences of *rbcL* gene was sequenced and analyzed data by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. The sequences data of Pattern 1 revealed definitive identity matches in the range of 99% for consensus sequences of *S. ellipsospora* Kütz, while Pattern 3 indicated definitive identity matches in the range only 93% with *S. neglecta* Kütz, which DNA sequences of *rbcL* gene could use as DNA markers of *Spirogyra* spp. The DNA sequences of the ITS 2 region of 5 patterns of *Spirogyra* are close to the *Chlorella* with 89-96%. Because of the sequences data of this ITS 2 was not available on NCBI database. The

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

analysis of sequences data of both DNA sequences using UPGMA can be divided into five groups according to morphological characteristics.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved