ชุดโครงการ : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

กิจกรรมย่อย : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณประสิทธิภาพและการจำแนกสกุลและชนิดของปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Evaluation Genera of Cyanobacteria Using Molecular and Morphological Analyses

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางประไพ ทองระอา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นางสาวศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

: นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

: นางสาวกัลยกร โปร่งจันทึก กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการจำแนกสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยวิธีสัณฐานวิทยา และวิธีชีวโมเลกุล ดำเนินการโดยรวบรวมสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่จำแนกสกุลโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และกรมวิชาการเกษตร จำนวน 8 สกุล คือ *Anabaena , Calothrix, Cylindrospermum, Hapalosiphon, Nostoc, Scytonema, Stigonema* และ *Tolypothrix* จากนั้นนำมาจำแนกสกุลโดยวิธีชีวโมเลกุล โดยใช้ยีน 16S rRNA ผลการทดลองพบว่า วิธีการจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยใช้ ยีน 16S rRNA สามารถระบุสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ตรงกันกับวิธีสัณฐานวิทยาจำนวน 5 สกุล 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena siamensis* TISTR8012, *Calothrix marchica* TISTR8016, *Cylindrospermum* sp. DASH03105, *Nostoc entophylum* TISTR8161 และ *Scytonema* sp.DASH07103 โดยมีความเหมือนเท่ากับ 95 91 98 98 และ 93% ตามลำดับ ส่วนการจำแนกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Anabaena cylindrica* DASH01101, *Hapalosiphon* sp. DASH05101, *Stigonema hormoides* TISTR8984 และ *Tolypothrix distorta*TISTR8985 นั้น ให้ผลการจำแนกไม่ตรงกับวิธีสัณฐานวิทยา

Abstract

Molecular taxonomic study was investigated in 8 genera of nitrogen-fixing cyanobacteria that procured from TISTR and DOA based on morphological feature were *Anabaena, Calothrix, Cylindrospermum, Hapalosiphon, Nostoc, Scytonema, Stigonema* and *Tolypothrix*. These genera were identified by the 16S rRNA gene analysis. The result revealed that the 16S rRNA gene from the *Anabaena siamensis* TISTR8012, *Calothrix marchica* TISTR8016, *Cylindrospermum* sp. DASH03105, *Nostoc entophylum* TISTR8161 and *Scytonema* sp.DASH07103 showed 95, 91, 98, 98 and 93% identity to that from *Anabaena siamensis* TISTR 8012, *Calothrix* sp. PCC7101, *Cylindrospermum* sp. CENA33, *Nostoc entophylum* IAM M-267 and *Scytonema* sp. YK02 respectively, while the 16S rRNA gene from some genera were *Hapalosiphon* sp. DASH05101, *Stigonema hormoides* TISTR8984 and *Tolypothrix distorta*TISTR8985 showed different genera from the morphological character identification.

คำนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน(cyanobacteria)เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีลักษณะคล้ายพืช แต่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพวกที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้มีจำนวน 27 สกุล มีทั้งพวกที่มีเฮเทอโรซีสต์ และไม่มีเฮเทอโรซีสต์ซึ่งจัดเป็นปุ๋ยชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อพืช ปัจจุบันมีผู้ประกอบการนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีเฮเทอโรซีสต์ มาผลิตปุ๋ยชีวภาพเป็นการค้าซึ่งตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ได้กำหนดหลักเกณฑ์ในการขอใบสำคัญขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพสำหรับผู้ผลิตปุ๋ยชีวภาพเชิงการค้าหรือนำเข้าปุ๋ยชีวภาพเพื่อการค้า จะต้องระบุชื่อสกุลทางวิทยาศาสตร์ และปริมาณจุลินทรีย์รับรองของผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพที่จะขอขึ้นทะเบียน กรมวิชาการเกษตรในฐานะเป็นหน่วยงานหลักที่ตรวจรับรองผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสำหรับผู้ผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อการค้า หรือนำเข้าปุ๋ยชีวภาพเพื่อการค้า ยังไม่มีวิธีการตรวจวิเคราะห์สกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอย่างเป็นสากล เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์สกุลแบบวิธีเดิมนั้นใช้วิธีทางสัณฐานวิทยา ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องใช้ผู้ที่มีความรู้และประสบการณ์ในการตรวจวิเคราะห์ ทำให้เป็นข้อจำกัดในการปฏิบัติงาน การตรวจวิเคราะห์สกุลโดยวิธีชีวโมเลกุลโดยใช้ ยีน 16S rRNA เป็นวิธีการหนึ่งที่ให้ผลแม่นยำมากกว่าวิธีสัณฐานวิทยาและสามารถแก้ไขข้อจำกัดข้างต้นได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สกุลของปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยใช้ยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับวิธีสัณฐานวิทยาเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สกุลของปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อไป

วิธีดำเนินการ

วัสดุและอุปกรณ์

1.เชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Anabaena , Calothrix, Cylindrospermum, Hapalosiphon, Nostoc, Scytonema, Stigonema และ Tolypothrix*

2. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ TE buffer, 10% SDS, 5M NaCl, 10% CTAB/0.7M NaCl, Chloroform, Phenol/Chloroform, Isopropanol, 70% Ethanol for DNA, 50mg/ml lysozyme, 20 mg/ml proteinase K, 100 mg/ml RNase A

3.สารเคมีสำหรับทำปฏิกริยาพีซีอาร์ ได้แก่ Taq polymerase, 10 mM Nucleotide Mix, 25 mM $MgCl_2$, 10X PCR buffer (ผลิตภัณฑ์ของ Promega, USA)

4. ชุดสกัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR purification kit)(ผลิตภัณฑ์ของ Geneaid, USA)

5. ดีเอ็นเอ มาร์คเกอร์ ได้แก่ 1 kb DNA Ladder และ 100 bp DNA Ladder (ผลิตภัณฑ์ของ NEB, USA)

6. เจลโหลดดิ้งดาย (6 เท่า)

7. วุ้นอะกาโรส

8. เครื่องพีซีอาร์ (Thermal cycles)

9. เครื่องปั่นความเร็วสูง (Centrifuge)

10. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ

11. ตู้เย็น

12. ตู้บ่มเชื้อ

13. ตู้เขี่ยเชื้อ

14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

วิธีการ

1.การรวบรวมสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

รวบรวมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 8 สกุล ที่ได้จำแนกเชื้อตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Desikachary, 1959) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และจากกรมวิชาการเกษตร ทำการบันทึกภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายแต่ละสกุลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.การสกัดดีเอ็นเอสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

แยกเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งปราศจากไนโตรเจนสูตร BG-11 (Allen and Arnon , 1955) และทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้

1.เขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งประมาณ 1-2 ลูป ใส่ใน TE buffer 400 ไมโครลิตร

2.เติม lysozyme(50mg/ml) 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

3.เติม prteinase K(20mg/ml) 4 ไมโครลิตร 10%SDS 20 ไมโครลิตร และ RNaseA(100mg/ml) 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

4.เติม 5 M NaCl 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

5.เติม 10% CTAB (10% CTAB/0.7M NaCl) 55 ไมโครลิตร

6.บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที

7.เติม chloroform ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลายจากนั้นกลับหลอดไปมา

8.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

9.ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ ทำซ้ำตามข้อ 7 อีก 1 รอบ

10. เติม phenol/chloroform ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย กลับหลอดไปมา

11.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที

12.ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่

13.เติม Isopropanol ปริมาตรที่เท่ากับสารละลายส่วนใส และกลับหลอดไปมา

14.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

15.ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

16.เทส่วนใสทิ้งผึ่งตะกอนให้แห้ง

17.ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

18.นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบปริมาณเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับทำการเพิ่มปริมาณต่อไป

3.การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ยีน 16S rRNA และการตรวจสอบ

3.1 ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มีดังนี้

1. น้ำกรอง Ultra pure นึ่งฆ่าเชื้อ 38.0 ไมโครลิตร
2. 5X Go Taq buffer 5.0 ไมโครลิตร
3. $MgCl_2$ Solution, 25 mM 2.2 ไมโครลิตร
4. PCR Nucleotide Mix, 10 mM each 1.0 ไมโครลิตร
5. Primer 16S 27f (10 μM) 2.0 ไมโครลิตร
6. Primer 16S 1389r (10 μM) 2.0 ไมโครลิตร
7. Go Taq DNA polymerase (5U/μl) 0.25 ไมโครลิตร
8. Template DNA ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (25 ng/μl) 2.0 ไมโครลิตร)

3.2 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Pre-denature 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 denature 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที **จำนวน 30 รอบ**

Primer extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

ขั้นตอนที่ 3 Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 4 Hold end 4 องศาเซลเซียส จำนวน 1 รอบ

3.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ใช้เทคนิค gel electrophoresis โดยการหยอด PCR product ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แช่แผ่นวุ้นในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที บันทึกภาพแถบ ดีเอ็นเอ ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ ที่ได้กับ DNA Marker (M) โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น DNA Marker จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์(purify) โดยใช้ชุดสกัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

3.4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA (16S rDNA) โดยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (automated DNA sequencing) จากนั้นส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST

ระยะเวลา ตุลาคม 2553 - กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ที่ใช้ในการศึกษา

สามารถรวบรวมสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากศูนย์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และจากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร ได้ จำนวน 8 สกุล รวม 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena cylindrica* DASH01101, *Anabaena siamensis* TISTR8012, *Calothrix marchica* TISTR8016, *Cylindrospermum* sp. DASH03105, *Hapalosiphon* sp.DASH05101, *Nostoc entophylum* TISTR8161, *Stigonema hormoides* TISTR8984, *Scytonema* sp.DASH07103 และ *Tolypothrix* sp.TISTR8985 และผลการบันทึกภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุลต่างๆ รายละเอียดดังภาพที่ 1

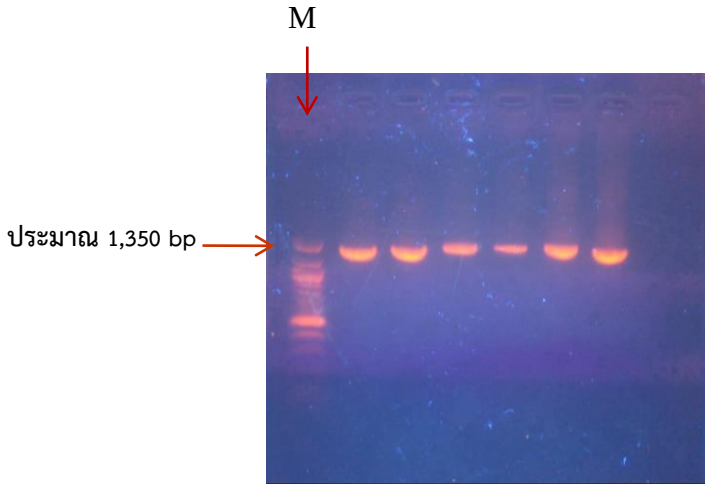
ภาพที่ 1 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

(ก)*Anabaena cylindrica* DASH01101 (ข) *Anabaena siamensis* TISTR8012 (ค) *Calothrix marchica* TISTR8016 (ง) *Cylindrospermum* sp. DASH03105 (จ) *Hapalosiphon* sp.DASH05101 (ฉ) *Nostoc entophylum* TISTR8161 (ช) *Stigonema hormoides* TISTR8984 (ซ) *Scytonema* sp.DASH07103 (ฌ) *Tolypothrix distorta* TISTR8985

(TISTR : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, DASH : กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน 16S rRNA และการตรวจสอบ

ผลการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอยีน 16S rRNA ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 8 สกุล รวม 9 สายพันธุ์ พบว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 1,350 bp (ภาพที่ 2) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ Near-full-length 16S rRNA gene ที่ใช้ในการวิเคราะห์สกุลของ *Anabaena* และ *Trichormus* ซึ่งมีขนาด 1,444 bp (Choi *et al*., 2012)



ภาพที่ 2 **แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ** ยีน 16S rRNA **ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน**
(M : Marker 100 bp)

3. การจำแนกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยวิธีใช้ ยีน 16S rRNA

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน16S rRNA ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจุลินทรีย์ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ให้ผลดังตารางที่ 1 จะพบว่า วิธีการจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยใช้ ยีน 16S rRNA สามารถระบุสกุลของสาหร่ายสีเขียว

แกมน้ำเงินได้ตรงกันกับวิธีสัณฐานวิทยาจำนวน 5 สกุล 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena siamensis* TISTR8012, *Calothrix marchica* TISTR8016, *Cylindrospermum* sp. DASH03105, *Nostoc entophylum* TISTR8161, *Scytonema* sp.DASH07103 โดยมีความเหมือนเท่ากับ 95 91 98 98 และ 93% ตามลำดับ ส่วนการจำแนกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Anabaena cylindrica* DASH01101, *Hapalosiphon* sp. DASH05101, *Stigonema hormoides* TISTR8984 และ *Tolypothrix distorta*TISTR8985 นั้น ให้ผลการจำแนกไม่ตรงกับวิธีสัณฐานวิทยา กรณีของ *Anabaena cylindrica* DASH01101 เมื่อจำแนกโดยใช้ยีน 16S rRNA พบว่าให้ผลตรงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Trichormus azollae* สายพนธุ์ Kom BAI/1983 โดยมีความเหมือนกัน 99% ซึ่งจากการตรวจเอกสารการจำแนกเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Anabaena ในปัจจุบัน(Komarek and Anagnostidis, 1989) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยปัจจุบันมีการใช้ข้อมูลพื้นฐานของการพัฒนาอะคินีต(basis of akinete development) ของสาหร่ายเข้ามาเกี่ยวข้องในการจำแนก ดังนั้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Anabaena เดิมบางชนิดจึงถูกแยกไปเป็นสกุล *Trichormus* เช่น *Anabaena variabilis*, *Anabaena azollae* และ *Anabaena doliolum* เป็นต้น (Rajaniemi *et al*., 2005) ดังนั้นจึงทำให้การจำแนกเชื้อโดยวิธีสัณฐานวิทยา และวิธีใช้ยีน 16S rRNA ให้ผลไม่ตรงกัน อนึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุลอื่นๆ ที่มีการจำแนกเชื้อแล้วให้ผลการจำแนกสกุลไม่ตรงกันอาจเนื่องมาจากเกิดความผิดพลาดจากการจำแนกเชื้อทางด้านสัณฐานวิทยาในเบื้องต้น

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความเหมือนกัน(Sequence identities) กับฐานข้อมูล nucleotide-nucleotide BLAST(blastn) ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

สกุล-ชนิด-สายพันธุ์	GenBank accession no. 16S rRNA[a]	Best match in NCBI database	Similarity (%)
Anabaena cylindrica DASH01101	AJ630454	*Trichormus azollae* Kom BAI/1983	99
Anabaena siamensis TISTR8012	JQ657825	*Anabaena siamensis* TISTR 8012	95
Calothrix marchica TISTR8016	AB325535	*Calothrix sp.* PCC7101	91
Cylindrospermum sp. DASH03105	AY218831	*Cylindrospermum* sp. CENA33	98
Hapalosiphon sp. DASH05101	AM709634	*Fischerella muscicola* SAG 2027	92
Nostoc entophylum TISTR8161	AB093490	*Nostoc entophylum* IAM M-267	98

Stigonema hormoides TISTR8984	DQ786168	*Westiellopsis* sp. Ar73	98
Scytonema sp.DASH07103	AB 694929.1	*Scytonema* sp. YK-02	93
*Tolypothrix distorta*TISTR8985	NC_019682.1	*Calothrix* sp. PCC7507	91

[a] วิเคราะห์จากจำนวน 1,350 เบส ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจำแนกสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยวิธีชีวโมเลกุลโดยใช้ยีน 16S rRNA สามารถจำแนกสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินส่วนใหญ่ได้ตรงกับสกุลที่จำแนกโดยวิธีสัณฐานวิทยาซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับฐานข้อมูล nucleotide-nucleotide BLAST(blastn) ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง ซึ่งสามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์สกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ในงานตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถนำไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สกุลของปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ เพื่อเป็นการสนับสนุนภาระกิจงานขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

-

เอกสารอ้างอิง

Allen and Arnon . 1955. Allen and Arnon' s blue-green algae medium micronutrients. Plant Physiol. 30 : 366-372.

Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. Indian council of agricultural research. New Delhi. 617p.

Choi, G-g, S-K Yoon, H-S Kim, C-Y Ahn and H-M Oh. 2012. Morphological and molecular analyses of Anabaena variabilis and Trichormus variabilis(Cyanobacteria) from Korea. Korean J. Environ. Biol. 30(1) : 54-63

Rajaniemi, P.,P. Hrouzek, K. Kastovska, R. Willame, A. Rantala, L. Hoffmann, J. Komarek and K. Sivonen. 2005. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). International J. Systematic Evolu Microbio. 55 : 11-26.

Komarek, J. and K. Anagnostidis. 1889. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. Arch Hydrobiol Suppl. 82 : 247-345