

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก
ของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน

โดย

ดร.ปานมุก วัชรปิยะโสภณ

นายประพันธ์ ไตรยสุทธิ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก
ของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน

คณะผู้วิจัย

ดร.ปานมุก วัชรปิยะโสภณ

นายประพันธ์ ไตรยสุทธิ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้ และศึกษา

นโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ ในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สกุณฉวี บวรสมบัติ คุณสุนทร จามรวรรณ คุณนิเวศ ศรีล้อม คุณสมบัติ ใจคำ ที่คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และจัดหาเกี่ยวกับอุปกรณ์ รวมทั้งเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT_R250004

คณะผู้วิจัย

โครงการ	ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทาง ไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน
คณะผู้วิจัย	ดร.ปานมุก วัชรปิยะโสภณ นายประพันธ์ ไตรยสุทธิ์

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกจากลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S internal transcribed spacer (16S-23S ITS), intergenic spacer (PC-IGS) ของไฟโคไซยานินโอเปอรอน และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว (Short and long tandemly repeat repetitive sequence; STRR and LTRR) จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนจำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Synechococcus* sp. SK70, *Synechococcus* sp. SK50, *Synechococcus* sp. PD55, *Phormidium* sp. SK45, *Phormidium* sp. PD40, *Phormidium* sp. PR40, *Scytonema* sp. TP40, *Scytonema* sp. TP40-1, *Leptolyngbya* sp. PR40, *Chroococcidiopsis* sp. PR45 และ *Oscillatoria* sp. KC45 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียที่พบจากแหล่งอื่นๆ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S-23S ITS ที่ได้กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่ามีความเหมือนกับข้อมูลใน Genbank ระหว่าง 88-100 % ส่วนลำดับเบสของ PC-IGS มีความเหมือนกับข้อมูลใน Genbank 94 – 95 % ลำดับเบสของ *Phormidium* sp. และ *Oscillatoria* sp. ไม่เหมือนกับข้อมูลในฐานข้อมูล ในส่วนของการศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกจากลำดับเบสของดีเอ็นเอพบว่า แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก (Phylogenetic tree) ของ PC-IGS มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนแผนภูมิที่ได้จากลำดับเบสของ 16S-23S ITS แสดงความสัมพันธ์ของกลุ่มยังไม่ชัดเจนเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความผันแปรสูง และมีแนวโน้มที่จะมีความเหมาะสมกับไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น 2 ชนิด คือ STRR 1A และ STRR 1B เมื่อทำ cluster analysis พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ สามารถใช้บ่งบอกความแตกต่างของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนได้ในระดับจีนัส ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาว 2 ชนิด คือ LTRR1 และ LTRR2 ไม่มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มนี้

**Project Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship of Hot Spring
Cyanobacteria**

Researcher Dr. Panmuk Vacharapiyasophon
 Mr. Prapun Triyasut

Abstract

The study of genetic diversity and phylogenetic relationship of 16S-23S internal transcribed spacer (16S-23S ITS), intergenic spacer of phycocyanin operon (PC-IGS) and DNA fingerprints of short and long tandemly repeat repetitive sequences (STRR and LTRR) from 11 hot spring cyanobacteria strains: *Synechococcus* sp. SK70, *Synechococcus* sp. SK50, *Synechococcus* sp. PD55, *Phormidium* sp. SK45, *Phormidium* sp. PD40, *Phormidium* sp. PR40, *Scytonema* sp. TP40, *Scytonema* sp. TP40-1, *Leptolyngbya* sp. PR40, *Chroococcidiopsis* sp. PR45 and *Oscillatoria* sp. KC45 was performed. It was found that, the genetic of Thai hot spring cyanobacteria differs from cyanobacteria from other sources. The comparison of 16S-23S ITS sequences with Genbank showed 88-100 % similarity to the database. While the sequence of PC-IGS showed 94 – 95 % similarity. There was no similarity between PC-IGS of *Phormidium* sp. and *Oscillatoria* sp. to the database. Phylogenetic relationship study showed that the phylogenetic tree PC-IGS related with the morphological classification. On the other hand, the tree from 16S-23S ITS showed an unclear grouping because this region has high degree of variation. This marker may be suitable to classify cyanobacteria within the same genera. Cluster analysis of DNA fingerprints obtained from two primers specific to short tandemly repeat, STRR 1A and STRR 1B, distinguished hot spring cyanobacteria at genus level. On the other hand, two primers specific to long tandemly repeat repetitive sequences, LTRR1 and LTRR2, were not suitable to generate DNA fingerprints in this group of cyanobacteria.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	4
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	23
บทที่ 4 ผลการศึกษา	29
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	52
บทที่ 6 ปัญหาและข้อเสนอแนะ	61
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก ก	77
ภาคผนวก ข	79
ภาคผนวก ค	82
ภาคผนวก ง	89
ภาคผนวก จ	93

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ลักษณะของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องที่พบในจีโนมของโปรคาริโอต	16
2	ไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกมาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา	23
3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	26
4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาแยกตาม Order	29
5	ค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S-23S ITS ของ ไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน กับ ข้อมูลใน NCBI	38
6	ข้อมูลของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทาง ไฟโลเจเนติกของ 16S-23S ITS จากฐานข้อมูลใน NCBI	41
7	ค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของไฟโคไซยานิน โอเปอรอน intergenic spacer (PC-IGS) ของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน กับข้อมูลใน NCBI	43
8	ข้อมูลของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทาง ไฟโลเจเนติกของ PC-IGS จากฐานข้อมูลใน NCBI	45
9	ข้อมูลการปรากฏ (1) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (0) ในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ STRR 1A	47
10	ข้อมูลการปรากฏ (1) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (0) ในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ STRR 1B	50
11	แสดงปัญหา อุปสรรค และแนวทางการแก้ไข	61

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	บริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้ (conserved region) ของยีน 16S rRNA ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด	10
2	แผนภาพของยีน 16S rRNA แสดงบริเวณ 16S-23S rRNA ITS	13
3	ตำแหน่งของ IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอนระหว่างสับยูนิตเบตา <i>cpcB</i> และสับยูนิตแอลฟา <i>cpcA</i>	14
4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนจันส์ที่ใช้ในการศึกษา	32
5	จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนที่ใช้ในการศึกษา	33
6	จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก <i>Synechococcus</i> sp. SK50 โดยใช้ glass bead ร่วมกับ extraction buffer	34
7	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 16S-23S ITS ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 16S-1247f และ 23S-1608r	35
8	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 16S-23S ITS ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 1114F และ 23S-xxr	36
9	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ PC-IGS ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ PCBF และ PCAR	37
10	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียจากลำดับเบสของ 16S-23S ITS ที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยวิธี Neighbor-Joining	40
11	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียจากลำดับเบสของ PC-IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอนที่ ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี Neighbor-Joining	44
12	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1A	46
13	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย ที่ได้จากลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1A	48
14	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1B	49
15	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย ที่ได้จากลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1B	51

บทที่ 1

บทนำและวัตถุประสงค์

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant cyanobacteria หรือ thermotolerant blue-green algae) พบได้ทั่วไปตามบ่อน้ำร้อน และน้ำพุร้อน เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่ผิดปกติ นับว่าเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณค่าสูงได้มีการนำเอาเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน รงควัตถุ และสารอื่นๆ มาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และด้านการแพทย์ เนื่องจากคุณสมบัติของการคงความสามารถในการทำงานที่อุณหภูมิสูงได้ ดังนั้นการศึกษาถึงความหลากหลาย และการจัดจำแนกโดยใช้นุกรมวิธานแบบโพลีฟาสิก (polyphasic taxonomy) โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม จึงมีความจำเป็นเพื่อความถูกต้องในการจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย

ในปัจจุบันการจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย จะใช้ข้อมูลพื้นฐานจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติและสภาวะในการเพาะเลี้ยง จะมีผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไปและเนื่องมาจากไซยาโนแบคทีเรียมีวิวัฒนาการมานาน ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความหลากหลายสูง คือมีทั้งที่ใช้ชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม หรืออยู่เป็นเส้นสาย มีการเปลี่ยนแปลงเซลล์บางเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง การพิจารณาจัดจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียวนั้นอาจมีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นได้ ซึ่งทำให้จำนวนชนิดของไซยาโนแบคทีเรียอาจจะมีมากกว่าความเป็นจริง จึงได้มีความพยายามที่จะใช้ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมเข้ามาร่วมในการจัดจำแนก และจากความก้าวหน้าทางด้านอนุชีววิทยาทำให้มีเทคนิค และวิธีการที่สามารถศึกษาได้ถึงความแตกต่างในระดับพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยพิจารณาจากความเหมาะสมและระดับของการจัดจำแนก ข้อมูลทางพันธุกรรมที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ คือลำดับเบสของยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S internal transcribed spacer (16S-23S ITS) และ intergenic spacer (PC-IGS) ของไฟโคไซยานินโอเปอรอน วิเคราะห์ข้อมูลเหล่านี้เพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน ซึ่งการนำเอาลำดับเบสของดีเอ็นเอจากในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกัน หรือมีความใกล้เคียงกันมาเปรียบเทียบกับจะสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มนั้นๆ ได้มากกว่าการเปรียบเทียบจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว

สิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสของดีเอ็นเอต่างกัน ย่อมมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันควรจะมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันด้วย การศึกษา

พิมพ์ดีเอ็นเอมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและระดับของการจัดจำแนก โดยปกติในจีโนมของโปรคาริโอตจะพบว่ามีลำดับเบสซ้ำกัน (repeated repetitive sequences) ประมาณ 1% และสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีทั้งรูปแบบซ้ำที่มีความเหมือนหรือแตกต่างกันในแต่ละนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความจำเพาะในแต่ละจีโนมการใช้ลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจในการพิจารณาความแตกต่างในระดับของจีโนม และสปีชีส์ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องประเมินความเหมาะสมของเทคนิคที่ใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีความสำคัญต่อการบ่งชี้ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติได้อย่างรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย มีด้วยกัน 2 ระบบ ได้แก่ ระบบดั้งเดิมทางพฤกษศาสตร์ (traditional botanical taxonomy) และระบบทางแบคทีเรีย (bacteriological taxonomy) โดยในระบบดั้งเดิมทางพฤกษศาสตร์นั้นได้จัดอยู่ในวงศ์ Cyanophyceae ทำการจัดจำแนกโดยการสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติ การเรียกชื่อก็ใช้ระบบเดียวกับระบบพฤกษศาสตร์ ขณะที่ Bold and Wynne (1985) ได้จัดไซยาโนแบคทีเรียอยู่ใน Division Cyanophyta แต่ปัญหาที่มักเกิดขึ้นคือความผันแปรทางลักษณะสัณฐานวิทยาที่เกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันก็ตาม อีกระบบหนึ่งคือการจัดจำแนกโดยใช้ระบบทางแบคทีเรีย ซึ่งเสนอโดย Rippka *et al.* (1979) ทำการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียจากสายพันธุ์บริสุทธิ์ (axenic culture) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยา ซึ่งเป็นเพียงส่วนน้อยในจำนวนชนิดที่มีการจัดจำแนกโดยใช้ระบบดั้งเดิมทางแบคทีเรีย มีการรวบรวมการจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียไว้ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ซึ่งเรียบเรียงขึ้นโดย Castenholz (2001) ซึ่งในปัจจุบันนี้การจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียได้ก้าวหน้าไปสู่ระบบที่มีความซับซ้อนสูงมากขึ้น โดยมีการนำเอาข้อมูลอื่นๆ ทั้งลักษณะชนิดขององค์ประกอบของไขมันในเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมเข้ามามีร่วมกับข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาเพื่อความถูกต้องในการจัดจำแนก

ถึงแม้ว่าจะมีการนำเสนอวิธีการหรือเทคนิคใหม่ๆ ที่ใช้ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรีย และจากความก้าวหน้าของเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา ทำให้เทคนิคนี้มีส่วนสำคัญในการเข้ามาช่วยศึกษาตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียได้คราวละมากๆ และรวดเร็วจนนำไปสู่การพัฒนาโพรบหรือชิป ที่มีความจำเพาะและช่วยในการจัดจำแนกได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ แต่ยังคงหลงและค้นคว้ามากขึ้น ก็นำมาซึ่งความขัดแย้งกันระหว่างข้อมูลการจัดจำแนกทางด้านสัณฐานวิทยา และข้อมูลทางด้านพันธุกรรมที่ไม่สอดคล้องกัน แต่เมื่อใดก็ตามที่พบความขัดแย้งจะนำมาสู่การเปิดประเด็นใหม่ในการศึกษาและวิจัย ซึ่งจะมีประโยชน์ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อหาลำดับเบสของ 16S-23S ITS และ PC-IGS ของไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน
2. ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ได้ศึกษา จัดทำเป็นแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน
3. เปรียบเทียบการจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย โดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ศึกษา
4. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว ประเมินความเหมาะสมของเทคนิคที่ใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อบ่งชี้ชนิดของ ไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

1. ไชยาโนแบคทีเรีย

ไชยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงและได้ออกซิเจน (oxygenic photosynthetic bacteria) จากการพบซากดึกดำบรรพ์ (fossil) ในยุค Archaeozoic ซึ่งเป็นเวลามากกว่า 2 พันล้านปีมาแล้วทำให้เข้าใจว่า ไชยาโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีชีวิตที่โบราณที่สุดในบรรดาสสิ่งมีชีวิตทั้งหลายที่มีคลอโรฟิลล์อยู่ในเซลล์ (ยูวดี, 2549) โดย ไชยาโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศต่างๆ ที่หลากหลาย ด้วยคุณสมบัติที่สำคัญในการสังเคราะห์แสงและผลิตก๊าซออกซิเจนสู่บรรยากาศ จึงนับได้ว่าเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น (primary producer) ในระบบนิเวศทั้งในมหาสมุทร (Paerl, 2000) และน้ำจืด (Oliver and Ganf, 2000; Stockner *et al.*, 2000) หรือในดิน (Whitton, 2000) ไชยาโนแบคทีเรียนับเป็นกลุ่มของสาหร่ายที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด คือมีถึง 7,500 สปีชีส์ หรืออาจจะพบว่ามียามากกว่านี้ (Chapman and Chapman, 1975) ส่วนใหญ่เป็นพวกอยู่ในน้ำจืด ด้วยความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่อาศัยอยู่ได้ดี และจากการมีวิวัฒนาการมานานทำให้สามารถพบไชยาโนแบคทีเรียได้ในสภาวะแวดล้อมหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นรูปแบบการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Adams, 2000) หรือแม้แต่พบในสภาวะแวดล้อมสุดขั้ว (extreme environment) เช่น ขั้วโลก (Vincent, 2000) ในทะเลทราย (Wyn-Williams, 2000) ในน้ำพุร้อน (Ward and Castenholz, 2000) หรือแหล่งที่มีความเค็มสูง (Oren, 2000)

2. อนุกรมวิธานของไชยาโนแบคทีเรีย

ไชยาโนแบคทีเรียจัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta หรืออาจจะมีชื่อเรียกเป็นดิวิชันอื่น เช่น Myxophyta, Myxophycophyta, Cyanochloronta และ Cyanophycophyta (Bold and Wynne, 1985) แต่ผู้เชี่ยวชาญทางแบคทีเรียจะเรียกว่า ไชยาโนแบคทีเรีย และจัดไว้ใน Class Schizophyceae อยู่ใน Division Schizomycophyta ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับแบคทีเรียทั่วไป ทั้งนี้เพราะสาหร่ายชนิดนี้มีโครงสร้างของนิวเคลียสคล้ายคลึงกับนิวเคลียสของแบคทีเรีย และบางชนิดยังมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับแบคทีเรียด้วย อย่างไรก็ตามนักวิชาการทางด้านสาหร่ายก็ยังจัดกลุ่มของสาหร่ายพวกนี้แยกออกมาจากแบคทีเรีย เนื่องจากไชยาโนแบคทีเรียมีคลอโรฟิลล์เอ

(chlorophyll a) และมีการปล่อยออกซิเจนสู่สิ่งแวดล้อมจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป (ยูวดี, 2549)

การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย ในระดับของจีนัสและสปีชีส์นั้นจะอาศัยจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Rippka, 1988) โดยพิจารณาจากลักษณะการเจริญเติบโต เป็นเซลล์เดี่ยว รวมกันเป็นกลุ่ม หรือเรียงตัวกันอยู่เป็นเส้นสาย ลักษณะของโคโลนีเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง การมีลักษณะโครงสร้างที่เป็นเส้นสาย เส้นสายอย่างง่าย (simple filament) เช่น *Oscillatoria* sp. และ *Lyngbya* sp. เป็นต้น เส้นสายที่เป็นกิ่งก้าน (branching filament) ยังสามารถแบ่งออกเป็น กิ่งก้านแท้ (true branching) เช่น *Fischerella* sp. และ *Stigonema* sp. และกิ่งก้านเทียม (false branching) เช่น *Plectonema* sp. และ *Scytonema* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังพิจารณาจากความแตกต่างกันของเซลล์ที่เรียงกันอยู่บนเส้นสาย เช่นใน *Anabaena* sp. โดยส่วนใหญ่พบว่า มี อะคินีท (akinetes) เรียงตัวอยู่ใกล้ๆ กับ เซพเทอโรซิสต์ (heterocyst) *Gloeotrichia* sp. จะมีเซพเทอโรซิสต์อยู่บริเวณปลายของเส้นสาย การสร้างชีทหุ้ม (sheath) เช่นใน *Lyngbya* sp. และ *Phormidium* sp. เป็นต้น

ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างเป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย (single cell, unicellular or non filamentous form) อาจจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เช่น *Chroococcus* หรืออาจจะอยู่รวมกันเป็นโคโลนีแบบพาล์มเลลา เช่น *Merismopedia*, *Eucapsis* และ *Anacystis* เป็นต้น เซลล์ของพวกนี้มีรูปร่างต่างๆ กันเช่น กลม รูปไข่ ทรงกระบอก หรือรูปไข่แบบแหลมหัวแหลมท้าย พวกที่อยู่เป็นโคโลนีแบบพาล์มเลลาอาจมีลักษณะของโคโลนีกลม แบน สีเหลี่ยม หรือมีรูปร่างที่แน่นอนก็ได้ ส่วนในแบบที่ 2 มีรูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form) เซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสายเรียกว่า ตรีโคม (trichome) เส้นสายนี้อาจจะตรงและเรียบไม่มีการแตกแขนง มีเซลล์ชนิดเดียวกันมาเรียงต่อกันเรียกว่า homocystous forms เช่น *Oscillatoria* และ *Lyngbya* เป็นต้น และอีกกลุ่มเส้นสายที่มีเซลล์ปกติและมีเซพเทอโรซิสต์มาเรียงสลับหรืออยู่ที่ปลายสุดของตรีโคม เรียกว่า heterocystous forms เช่น *Nostoc* และ *Anabaena* เป็นต้น บางชนิดเส้นสายนั้นอาจจะมีปลายโค้งงอหรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Arthrospira* และ *Spirulina* (ยูวดี, 2549) อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในหลายๆ จีนัสที่มีความคล้ายคลึงกันมาก เช่น *Phormidium*, *Oscillatoria* และ *Lyngbya* ยังมีปัญหาอย่างมาก และจากความก้าวหน้าทางด้านเทคนิคทางอนุชีววิทยาในปัจจุบัน จึงทำให้สามารถศึกษาได้ถึงลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งจะให้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย ที่ใช้ข้อมูลพื้นฐานจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก โดยมีหลายระบบ เช่น Geitler (1932) อ้างโดยอักษร (2527) แบ่งออกเป็น 4 Order Frey (1934) อ้างโดยอักษร (2527) แบ่งออกเป็น 3 Order Fritsch (1945) แบ่งออกเป็น 5 Order Smith (1950)

แบ่งเป็น 2 Order Bold and Wynne (1985) แบ่งออกเป็น 3 Order Desikachary (1959) อ้างโดย กาญจนภาชนะ (2527) แบ่งออกเป็น 5 Order

Rippka *et al.* (1979) ได้จัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดย แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 Chroococcales เป็นเซลล์เดี่ยว เพิ่มจำนวนโดย binary fission หรือ budding

กลุ่มที่ 2 Pleurocapsales เป็นเซลล์เดี่ยว เพิ่มจำนวนโดย multiple fission ทำให้ได้

baecocytes

กลุ่มที่ 3 Oscillatoriales เป็นเส้นสาย เพิ่มจำนวนโดย binary fission ในระนาบเดียว ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเซลล์ไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ หรือ อะคินีท

กลุ่มที่ 4 Nostocales เป็นเส้นสาย เพิ่มจำนวนโดย binary fission ในระนาบเดียว มีการเปลี่ยนแปลงเซลล์ไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ หรือ อะคินีท

กลุ่มที่ 5 Stigonematales เป็นเส้นสาย เพิ่มจำนวนโดย fission ในหลายระนาบ ทำให้ได้เส้นสายที่แตกกิ่งก้านอย่างแท้จริง และมีการเปลี่ยนแปลงเซลล์ไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง

ระบบของ Anagnostidis and Komarek (1988); Komarek and Anagnostidis (1989); Anagnostidis and Komarek (1990); Komarek and Anagnostidis (1999); และ Komarek (2003) ได้จัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียใหม่ โดยแบ่งออกเป็น 4 Order คือ

1. Order Chroococcales เป็นพวกเซลล์เดี่ยว โดยเซลล์อาจจะอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นโคโลนีสืบพันธุ์โดยวิธีการแบ่งเซลล์

2. Order Oscillatoriales มีลักษณะเป็นเส้นสาย อาจจะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนงหรือแตกแขนงแบบไม่แท้จริง บางชนิดมีเมือกหุ้ม เซลล์มีรูปร่างแบบทรงกระบอก ไม่มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ (ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน) หรืออะคินีท (เป็นเซลล์ในระยะพักตัว) สืบพันธุ์โดยการใช้อิทธิบาทเป็นท่อนๆ

3. Order Nostocales มีลักษณะเป็นเส้นสายไม่แตกแขนง มีซิทูมหนาหรือบางแล้วแต่ชนิด เซลล์มีรูปร่างกลม หรือเหลี่ยมเล็กน้อยแล้วป่องตรงกลาง บางชนิดเป็นแบบทรงกระบอกสร้างอะคินีท มีเฮเทอโรซิสต์ ที่สามารถงอกออกเป็นเส้นสายใหม่ได้อีกด้วย

4. Order Stigonematales มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้หลายแบบ มีทั้งแตกแขนงแท้จริงและไม่แท้จริง และแต่ละแบบจะมีการแตกแขนงหลายทิศทาง เซลล์ที่ประกอบด้วยเส้นสายนั้นอาจประกอบด้วยเซลล์แถวเดียว 2 แถว หรือมากกว่า แตกแขนงที่แตกออกไปมักเป็นเซลล์แถวเดียว แต่อาจจะมีมากกว่าหนึ่งแถวก็ได้ ซิทูมมักมีสีเหลือง หรือน้ำตาล มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ ไม่พบว่าการสร้างอะคินีท สืบพันธุ์โดยการขาดออกเป็นท่อน

การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามระบบของ Rippka เดิมถูกแบ่งออกเป็น 5 Order เมื่อมีการจัดจำแนกใหม่โดยระบบของ Anagnostidis และ Komarek เหลือเพียง 4 Order โดยในกลุ่มของ Order Pleurocapsales ได้ถูกจัดเข้าไปอยู่ใน Order Chroococcales ซึ่งเป็นพวกเซลล์เดียวเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน

ไซยาโนแบคทีเรียมีความพิเศษแตกต่างจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ คือสามารถเปลี่ยนสีได้ การเปลี่ยนสีขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นแสง (wavelength) และความเข้มแสง (intensity) โดยในปี 1902 Gaidukov ได้ตั้งสมมติฐานที่เรียกว่า Gaidukov phenomenon อธิบายว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนสีได้เมื่อเลี้ยงในที่ที่มีแสงสีต่างๆกัน ทำให้สร้างรงควัตถุที่แตกต่างกันและมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันด้วย (Tandeau de Marsac, 1977) โดย Gaidukov ได้ใช้ *Oscillatoria* ทดลองให้แสงสีเขียว ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จะมีสีแดงเพราะแสงสีเขียวไปกระตุ้นให้สร้างรงควัตถุสีแดงพวกไฟโคเออร์ริทริน แต่ถ้าเลี้ยงในแสงสีแดงจะทำให้สาหร่ายมีสีน้ำเงินมากขึ้น เพราะแสงสีแดงกระตุ้นให้สร้างไฟโคไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน เป็นต้น ส่วนอีกการทดลองหนึ่งให้ความเข้มขึ้นของแสงต่างกัน พบว่าถ้าให้ความเข้มของแสงสูงสาหร่ายจะมีสีน้ำเงิน ถ้าความเข้มขึ้นของแสงต่ำจะเป็นสีแดง ซึ่งตรงกับความจริงตามธรรมชาติที่ว่าไซยาโนแบคทีเรียที่ขึ้นในระดับน้ำลึกๆ จะมีสีแดงหรือสีม่วง ส่วนที่ขึ้นอยู่ผิวน้ำหรือผิวดินจะมีสีน้ำเงินเข้ม การเปลี่ยนสีอีกประการหนึ่งของไซยาโนแบคทีเรียคาดว่าจะเกี่ยวกับการขาดไนโตรเจนพบว่าถ้าขาดสารอาหารชนิดนี้จะทำให้มีสีซีดลง หรือเป็นสีเหลือง แต่สำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากสิ่งแวดล้อมก็จะไม่พบกรณีดังกล่าว (ยวดี, 2549)

อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียมักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ และสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Doers and Parker, 1988) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน อาจทำให้ถูกจัดจำแนกเป็นอีกสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ จึงทำให้จำนวนจีนัสและสปีชีส์ของไซยาโนแบคทีเรียน่าจะมีมากกว่าความเป็นจริงตามธรรมชาติซึ่งในปัจจุบันนี้ การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียได้มีการพัฒนาก้าวหน้าไปสู่ระบบที่มีความซับซ้อนสูงมากขึ้น โดยมีการนำเอาข้อมูลต่างๆ ทั้งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางด้านพันธุกรรมมาใช้ร่วมกันเพื่อความถูกต้องแม่นยำในการจัดจำแนก (Wilmotte 1994, Palinska *et al.*, 1996, Otsuka *et al.*, 1999a, Otsuka *et al.*, 2001) โดยได้มีการนำเอาเทคนิควิธีการและทฤษฎีต่างๆ ที่จะสามารถจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียได้ โดยอาศัยจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบเห็น และอาศัยวิวัฒนาการซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของยีนในสิ่งมีชีวิตเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง (Theriot, 1989)

3. การศึกษาด้านความหลากหลายทางอนุชีววิทยา (molecular diversity)

การศึกษาคความหลากหลายของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมนั้นมีข้อจำกัดอยู่ที่ จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้ในอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมได้จากห้องปฏิบัติการ การคัดแยกและศึกษาคความหลากหลายจากจุลินทรีย์ที่รวบรวมจากแหล่งธรรมชาติจึงมีไม่ถึง 1% ของจำนวนชนิดที่มีอยู่จริง (Embry and Stackebrandt, 1997; Ward *et al.*, 1990) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว การศึกษาคความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ การใช้เทคนิคทางด้านอนุชีววิทยาด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rDNA) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถศึกษาได้โดยไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยง (Amman *et al.*, 1995) ทำให้การศึกษานุกรมวิธานของจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพ และครอบคลุมชนิดของจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีอยู่จริงได้มากที่สุด

การศึกษาข้อมูลความแตกต่างของพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา เพื่อที่จะนำมาใช้ในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียมีด้วยกันหลายวิธี ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและระดับของการจัดจำแนกความแตกต่างได้ในระดับจีโนม หรือสปีชีส์ โดยข้อมูลทางพันธุกรรมต่างๆ ที่นำมาใช้เช่น การอ่านลำดับเบสของยีน 16S rRNA ยีน *nifH* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมรหัสในการสังเคราะห์เอนไซม์ dinitrogenase reductase ยีน *rpoC1* (DNA-dependent RNA polymerase) ยีน *nifD* (nitrogen-fixation) ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ intergenic spacer (IGS) ระหว่างไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ของสับยูนิต *cpcB* และ *cpcA* ในไฟโคไซยานินโอเปอรอน ความแตกต่างของลำดับเบสในช่วง 16S-23S ITS นอกจากนี้ยังมีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) จากเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว (short and long tandem repeat repetitive sequences; STRR and LTRR) เทคนิคที่สำคัญที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการ เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสหรือใช้ศึกษาเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยเครื่อง Thermal cycler ในตำแหน่งของยีน หรือดีเอ็นเอช่วงที่ต้องการศึกษาในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรีย

นอกจากนี้ การศึกษาคความหลากหลายทางด้านอนุชีววิทยาของไซยาโนแบคทีเรียยังรวมถึงการศึกษานุกรมวิธานด้วยองค์ประกอบทางเคมี (chemotaxonomic) เช่นการศึกษารูปแบบของกรดไขมัน (fatty acid composition) โพลีเอไมด์ (polyamines) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) รูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme patterns) ไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein patterns) การศึกษา

ลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ เช่น รูปแบบของ aromatic amino acid pathway และการศึกษาด้านภูมิคุ้มกันเปรียบเทียบลักษณะของโปรตีนเพื่อวัดอัตราส่วนในการจับตัวตกตะกอนระหว่างแอนติบอดี (antibody) กับแอนติเจน (antigen) อย่างไรก็ตามการศึกษาข้อมูลเหล่านี้เพื่อใช้ในการจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียนั้นยังมีไม่มากนัก เนื่องจากลักษณะเหล่านี้จะมีความผันแปรไม่สม่ำเสมอขึ้นกับสถานะในการเพาะเลี้ยง (Wilmotte, 1994)

เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนามาเพื่อทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ ซึ่งสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนไปของลำดับเบสได้แม้เพียงเบสเดียว โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีการเติมปลายทางด้านใดด้านหนึ่งด้วย GC-clamp (Muyzer *et al.*, 1993) การตรวจวัดด้วยวิธีนี้มักใช้ควบคู่ไปกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ปกติมักใช้กับ marker genes โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยีนของ 16S rRNA หรือ rDNA ซึ่งเป็นโมเลกุลที่นิยมใช้ในการศึกษาในแง่ของความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จากแหล่งที่อยู่ใดๆ ก็ตามในธรรมชาติ เทคนิค DGGE มีข้อดีที่ไม่ต้องทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ก่อน เพียงแต่อาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และตรวจสอบความแตกต่างดังกล่าวโดยการทำ gel electrophoresis ในสภาพที่มีสารเคมีซึ่งทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันจะเสียสภาพที่ความเข้มข้นของสารเคมีแตกต่างกัน ด้วยความแตกต่างนี้เอง จึงทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ เพื่อทำการติดตามตรวจสอบจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่างจากธรรมชาติได้ (Ward and Bora, 2004) การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยการแยกชิ้นดีเอ็นเอจาก gel electrophoresis ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส จากนั้นตรวจสอบลำดับเบสและหาความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีอยู่ในฐานข้อมูลสากล

การเลือกลำดับสายดีเอ็นเอเพื่อนำมาศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก มักจะมุ่งเน้นไปที่ยีนที่อนุรักษ์ไว้ (conserved gene) ในระดับที่เหมาะสม (Page and Holmes, 1998) กล่าวคือ อาจจะเป็นยีนที่สามารถถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ หรือโปรตีนที่ทำงานเฉพาะอย่าง โดยมีอัตราการสะสมการเปลี่ยนแปลงของลำดับสายดีเอ็นเอในระดับที่ไม่มาก หรือน้อยเกินไป การศึกษาความหลากหลายทางด้านอนุชีววิทยาส่วนใหญ่ นิยมใช้วิธีการเปรียบเทียบด้วยการอ่านลำดับเบสของดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้โดยตรง ในการวัดการสืบทอดทางพันธุกรรมร่วมกันจากบรรพบุรุษร่วมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ข้อสำคัญในการศึกษาโดยใช้ลักษณะระดับอนุชีววิทยาคือ ต้องเลือกยีนหรือโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) ที่จะใช้ให้ม้อัตราการวิวัฒนาการเหมาะสมกับกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษา โดยใช้ยีนที่มีวิวัฒนาการช้า กลับกลุ่มที่มีวิวัฒนาการแยกจากกันตั้งแต่ครั้งโบราณ (ancient groups) ตัวอย่างเช่น ribosomal

subunit DNA คือ ยีนที่ถอดรหัสเพื่อให้อาร์เอ็นเอชนิดที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซม (ribosomal RNA gene; rRNA gene; rDNA) ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีวิวัฒนาการช้ามาก (ภาพ 1) ทำให้สามารถศึกษาได้ถึงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดได้ ขณะที่เลือกใช้ยีนที่มีวิวัฒนาการเร็วกับกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เพิ่งแยกออกจากกันไม่นานมาแล้ว (recent groups) ตัวอย่างเช่น mitochondrial genes ซึ่งมีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสดีเอ็นเอ (base substitution rate) เร็วกว่าใน nuclear genes ถึง 10 เท่า และถูกใช้อย่างแพร่หลายในระบบวิธานของสัตว์ (เจษฎา, 2547)

human	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAG...
yeast	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAG...
corn	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAG...
<i>Escherichia coli</i>	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG...
<i>Anacystis nidulans</i>	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGAGGGCAAGCGTTATCCGGAAATTATGGGCGTAAAGCG...
<i>Thermotoga maritima</i>	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTACCCGGATTACTGGGCGTAAAGGG...
<i>Methanococcus vannielii</i>	...GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCGACGGCCCGAGTGGTAGCCACTCTTATTGGGCCATAAGCG...
<i>Thermococcus celer</i>	...GTGGCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCCCGAGTGGTGGCCGTATTATTGGGCCATAAGCG...
<i>Sulfolobus sulfotaricus</i>	...GTGTCAGCCGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCCAGTGGTCGGGGTGATTACTGGGCCATAAGCG...

ภาพ 1 บริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้ (conserved region) ของยีน 16S rRNA ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (Olsen, 2000)

4. แผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก (phylogenetic tree)

การจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ปัจจุบันนี้ ข้อมูลจากลักษณะทางสรีรวิทยา การวิเคราะห์ทางเคมี และความรู้ทางอณูชีววิทยา ได้ถูกนำเข้ามาช่วยปรับปรุงการจัดจำแนกแบบดั้งเดิม จากการใช้ข้อมูลของ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน มาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกที่ออกมาในรูปแผนภูมิ (topology) มีลักษณะแตกเป็นกิ่งก้าน แผนภูมิดังกล่าวนี้นี้กำลังเป็นที่นิยมในการศึกษาด้านชีววิทยาหลายสาขาคู่กัน การศึกษาแผนภูมิต้นไม้เพื่อแสดงให้เห็นถึงแนวทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งการใช้แนวความคิดนี้มีส่วนสอดคล้องกับการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม โดยพิจารณาว่า การจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายกันไว้เป็นกลุ่มเดียวกัน ก็เนื่องมาจากว่าสิ่งมีชีวิตนั้นได้มีวิวัฒนาการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมเดียวกันนั่นเอง (Page and Holmes, 1998; เจษฎา, 2547)

แผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติกทำให้ทราบถึงวิวัฒนาการของยีนหรือโปรตีน ที่เราใช้ในการศึกษา ความรู้ที่ได้นี้จะบอกถึงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกในอนุกรมวิธานที่แสดงตำแหน่งของสิ่งมีชีวิตที่มีความชัดเจนมากขึ้นในแผนภูมิ และยังนับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาอนุกรมวิธานแบบโพลิฟาสิก (polyphasic) ที่อาจทำให้ได้รายละเอียดใหม่ของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะเป็นระดับสปีชีส์หรือระดับอื่นที่สูงกว่า (Ludwig *et al.*, 1998)

4.1 ขั้นตอนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก

การจัดเรียงลำดับสายดีเอ็นเอ (alignment of DNA sequences) โดยทำการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์จากสายดีเอ็นเอหลายๆสาย และทำการเพิ่มลำดับของดีเอ็นเอที่เป็น out group มาใส่เพิ่มเข้าไปในชุดข้อมูล เพื่อให้เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่นอกกลุ่มที่จะบอกให้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทราบถึงตำแหน่งที่เหมาะสมในการสร้าง rooted ในการเลือกสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มนั้นมักจะใช้ลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Escherichia coli* สำหรับการศึกษา 16S rRNA ยีนในกลุ่มโปรคาริโอต ทำการจัดเรียงข้อมูลจนกระทั่งมีระดับของความเหมือนกันสูงสุดโดยการแทรกช่องว่าง (gap) เพื่อให้ช่องว่างและจำนวนที่ทำให้เกิดสายดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (mismatch) น้อยที่สุด วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้มีหลายวิธี ได้แก่

4.1.1 Distance matrix เป็นการใช้ตารางความแตกต่างโดยรวมระหว่างสายดีเอ็นเอต่างๆ ที่ศึกษาซึ่งจะมีการจัดข้อมูลแบบ UPGMA (Unweighted pair-Group Method with Arithmetic Mean) และวิธี neighbour-joining (NJ)

4.1.2 Maximum likelihood วิธีนี้จะอาศัยการคำนวณหาความน่าจะเป็นที่ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นจากแผนภูมิที่เป็นไปได้ประกอบกับแบบจำลองต่างๆ ของการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการ แผนภูมิที่ได้จึงเป็นแผนภูมิที่มีความเป็นไปได้สูงสุด

4.1.3 Maximum parsimony เป็นแผนภูมิที่อาศัยจำนวนของการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ในการอธิบายความแตกต่างที่พบที่ได้จากข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่มีความยาวของแผนภูมิต้นไม้จากโครงสร้างที่เป็นไปได้ในแต่ละแบบจะถูกประมาณขึ้นจากดีเอ็นเอดำแหน่งที่ให้ข้อมูลบนตารางเมตริกซ์ จากนั้นความยาวของกิ่งแต่ละกิ่งบนแผนภูมินั้นจะถูกประมาณขึ้น ตามจำนวนของการเปลี่ยนแปลงในแต่ละตำแหน่งของดีเอ็นเอ

เมื่อได้แผนภูมิแล้วจะมีค่าสนับสนุนทางสถิติ (statistic supporting value) คือค่า bootstrap บนแผนภูมิที่เกิดขึ้นออกมาในรูปของร้อยละ ถ้ามีค่าใกล้ 100 จะมั่นใจได้ว่า กิ่ง (branch) หรือเคลด (clade) ที่เกิดขึ้นบนแผนภูมิน่าจะเกิดขึ้นได้จริงและเป็นแผนภูมิที่มีความถูกต้อง

4.2 โปรแกรมคอมพิวเตอร์

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาแผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก ในปัจจุบันมีอยู่หลายโปรแกรมทั้งที่สามารถดาวน์โหลดมาใช้งานได้ และโปรแกรมที่ต้องเสียค่าใช้จ่าย โปรแกรมที่เป็นที่นิยมซึ่งได้แก่ PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony method) เขียนโดย Swofford โปรแกรม Hennig86 เขียนโดย Farris และโปรแกรม PHYLIP ที่เขียนโดย Felsenstein เป็นชุด packages ที่รวมเอาโปรแกรมย่อยๆ เอาไว้ (Theriot, 1989; เจษฎา, 2547) นอกจากนี้ยังมีโปรแกรมอื่นๆ ที่พัฒนาขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) package version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) และ MEGA software version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) เป็นต้น

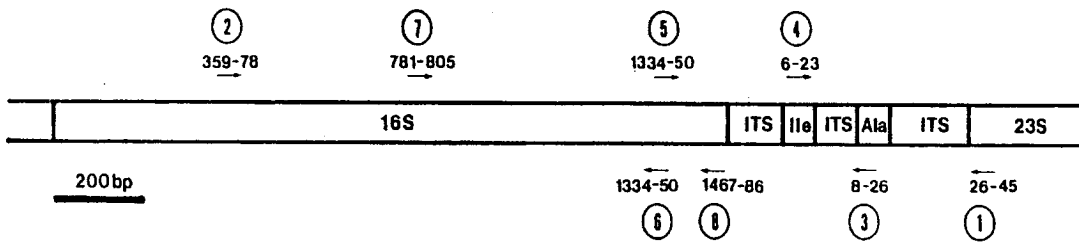
5. อนุกรมวิธานโดยใช้ชีววิทยา (molecular taxonomy)

5.1 16S-23S internal transcribed spacer (16S-23S ITS)

ในโพลาริโอด ยีนที่เป็นรหัสของไรโบโซมของอาร์เอ็นเอ จะอยู่เรียงต่อกันเป็นโอเปอรอน ซึ่งมีลำดับการเรียงตัวของยีนที่จำเพาะคือ 16S, 23S และ 5S rRNA เรียกว่า *rrn operon* โดยปกติแล้วในจีโนมของแบคทีเรียจะพบหลายชุดด้วยกัน เช่นใน *E. coli* และ *Salmonella* มี 7 ชุด ใน *Bacillus subtilis* มี 10 ชุด ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีนเรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) 16S-23S ITS เป็นบริเวณที่อาจมียีนที่เป็นรหัสของ rRNA ซึ่งสามารถนำไปศึกษาทางไฟโลเจเนติกได้ (Boyer *et al.*, 2001) ก่อนหน้านี้นี้ได้มีการศึกษาเพียง RFLP ของ 16S-23S ITS ในไซยาโนแบคทีเรีย ต่อมา Otsuka *et al.* (1999b) ได้ศึกษาลำดับเบสของ ITS โดยตรงเป็นครั้งแรกในไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis* จำนวน 47 สายพันธุ์ และพบว่าความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกแบ่งออกเป็น 3 clusters ใน cluster แรก จะประกอบไปด้วยสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ และไม่สร้างสารพิษ ใน cluster ที่สอง มีเพียงสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษเท่านั้น และกลุ่มสุดท้ายใน cluster ที่สามเป็นกลุ่มของสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษเท่านั้น และเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จะไม่สัมพันธ์กับลักษณะทาง morphotype จากการวิเคราะห์แผนภูมิไฟโลเจเนติกยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างจีโนสและสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกัน

จากการศึกษาของ Boyer *et al.* (2002) ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และ 16S-23S ITS โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด (ภาพ 4) ในไซยาโนแบคทีเรีย *Microcoleus* จำนวน 31 สายพันธุ์ จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA มีความคล้ายคลึงกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ของ *Microcoleus* อยู่สองสายพันธุ์ โดยพบว่ามีค่าความเหมือนกับ *Microcoleus steenstrupii* ระหว่าง 91.5-99.4% และมีความเหมือนกับ *M. vaginatus* อยู่ระหว่าง 97.1-99.9% ซึ่งกลุ่มผู้วิจัยคาดว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ เมื่อดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจจะมีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันแต่มีลักษณะทางจีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกัน (cryptic species) ส่วนการศึกษาลำดับเบสของ 16S-23S ITS พบว่ามีความแตกต่างกันของ *Microcoleus* ทั้งสองสายพันธุ์ และแนะนำการศึกษา 16S-23S ITS ควรศึกษาควบคู่ไปกับการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA



ภาพ 2 แผนภาพของยีน 16S rRNA แสดงบริเวณ 16S-23S rRNA ITS (Boyer *et al.*, 2002)

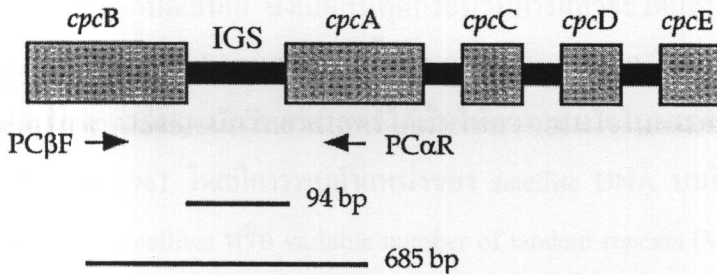
Ferris *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Synechococcus* ในน้ำพุร้อนเพื่อศึกษาความแตกต่างในลำดับเบสของ 16S-23S ITS จากบริเวณที่มีการเจริญเป็นผืน (mat community) พบว่า *Synechococcus* ที่เจริญอยู่บริเวณชั้นบนจะมีความแตกต่างกับพวกที่เจริญอยู่ในชั้นล่าง ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะมีความผันแปรและตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไซยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่ และในกรณีต้องศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกเพื่อใช้ในการจัดจำแนก ควรศึกษาควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

ถึงแม้ว่า rRNA โอเปอรอนจะพบได้ทั่วไปในไซยาโนแบคทีเรีย (Iteman *et al.*, 2000; Boyer *et al.*, 2001) และ 16S-23S ITS อาจจะพบว่ามีหลายชุดในลำดับเบส แต่สิ่งที่จะต้องพิจารณาคือ ขนาด ความยาว โครงสร้างทุติยภูมิ การมี หรือไม่มี rRNA ยีนระหว่างโอเปอรอนในแต่ละสายพันธุ์ ลำดับเบสของ ITS นี้จึงไม่สามารถใช้เปรียบเทียบได้ระหว่างสายพันธุ์ที่เป็น orthology จึงมักพบปัญหาเวลาใช้ศึกษา population genetic และ molecular systematic และควรระมัดระวังในการใช้ศึกษา กับไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่มใหญ่ๆ

5.2 ไฟโคไซยานินโอเปอรอน (phycocyanin intergenic sequence, PC-IGS)

ไฟโคไซยานินโอเปอรอน (phycocyanin intergenic sequence, PC-IGS) ไฟโคไซยานินเป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งที่เสริมการทำงานของคลอโรฟิลล์ในการสังเคราะห์แสงในไซยาโนแบคทีเรีย

(accessory pigment) โดยไฟโคไซยานินมีโครงสร้างหลักเป็นโพลีเปปไทด์สองสายคือ หน่วยย่อยแอลฟา และเบตา ซึ่งควบคุมรหัสโดยยีน *cpcA* และ *cpcB* (ภาพ 5) ซึ่งอยู่เรียงกันเป็น โอเปอรอน ส่วนของดีเอ็นเอระหว่างยีนทั้งสองนี้ ถูกนำมาใช้ในการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรีย



ภาพ 3 แสดงตำแหน่งของ IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอนระหว่างสับยูนิตเบตา *cpcB* และสับยูนิตแอลฟา *cpcA* (Neilan *et al.*, 1995)

โดย Neilan *et al.* (1995) ได้ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรีย โดยดูจากความแตกต่างของตำแหน่ง PC-IGS ของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ บริเวณที่ทำการศึกษายู่ระหว่างสับยูนิตแอลฟา และเบตา โดยสองสับยูนิตนี้จะมีคามผันแปรสูง และมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาการจัดจำแนกได้ถึงระดับสายพันธุ์ได้ จากนั้น Robertson *et al.* (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของ *Synechococcus* โดยวิเคราะห์จากลำดับเบสของ 16S rDNA และ ไฟโคไซยานิน โอเปอรอน (PC-IGS) พบว่า *Synechococcus* สายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน แต่เมื่อดูจากสายความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกจะแยกกันอยู่คนละกิ่ง การวิเคราะห์ลำดับเบสของไฟโคไซยานิน พบว่าสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

5.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)

หากจะกล่าวถึงลายพิมพ์นิ้วมือของคนเราแล้ว เป็นที่ทราบกันดีว่าสามารถบ่งบอกถึงตัวบุคคลนั้นได้เป็นอย่างดี เนื่องมาจากในแต่ละตัวบุคคลย่อมจะมีลักษณะของลายพิมพ์นิ้วมือที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้น ได้รับการพัฒนาและใช้เป็นครั้งแรกโดย Alec Jeffreys ในปี ค.ศ. 1985 เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อบ่งบอกลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคลหรือสิ่งมีชีวิตด้วยดีเอ็นเอ เกล็ดเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ถึงแม้ว่าจะไม่มีนิ้วมือให้เห็นเป็นลายเส้นที่ชัดเจน แต่ด้วยความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันนี้ เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลได้เข้ามามี

บทบาทสำคัญในการศึกษาและวิจัย ทำให้ทราบถึงความแตกต่างกันของลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จึงเรียกว่าลายพิมพ์ของดีเอ็นเอนั่นเอง โดยทั่วไปแล้ว ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หมายถึงการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) หรือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) หรือวิธีการใดๆ ก็ตามที่ใช้กับดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการแล้วจะได้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก มีลักษณะเหมือนแถบ bar code และใช้บ่งชี้ความแตกต่างของจีโนมในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ (ธานินทร์, 2538; สุรินทร์, 2545) นักวิทยาศาสตร์ได้เริ่มให้ความสนใจในการศึกษาลำดับเบสซ้ำในสิ่งมีชีวิตมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1961 โดยมีการพบตำแหน่งของ satellite DNA บนจีโนม แบ่งออกเป็น microsatellites และ minisatellites หรือ variable number of tandem repeats (VNTRs) ซึ่งต่อมาในปัจจุบันลำดับเบสกลุ่มนี้ มีความสำคัญในแง่ของการใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Gelfand *et al.*, 2007)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ส่วนใหญ่มุ่งศึกษาตรงส่วนของ ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดที่มีจำนวนซ้ำสูงมาก และแต่ละชุดซ้ำมีการเรียงต่อกันในทิศทางเดียวกันตลอด (tandemly repeated DNA sequence) เช่น minisatellite DNA เป็นดีเอ็นเอที่มีหลายชุดซ้ำ ขนาดของแต่ละชุดยาวประมาณ 15 - 100 คู่เบส จำนวนชุดซ้ำที่พบมีความแตกต่างกันมาก เรียกว่า Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) ซึ่งความแตกต่างนี้เองที่นำมาใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต microsatellite DNA เป็นดีเอ็นเอที่มีหลายชุดซ้ำ ขนาดของแต่ละชุดสั้นมากเพียง 1-4 คู่เบส จำนวนชุดซ้ำพบมากถึง 0.2 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอจีโนม มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า Simple Sequence Repeat (SSR) ส่วนใหญ่ใช้ในการศึกษาแผนที่จีโนมและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ประภัสสร, 2550)

ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอต หรือโปรคาริโอต มักจะพบลำดับเบสซ้ำๆ กัน หลายรูปแบบ และจะมีชื่อเรียกเฉพาะที่ต่างกัน ในจีโนมของยูคาริโอตมักนิยมเรียกลำดับเบสซ้ำเหล่านั้นว่า minisatellite และ microsatellite ในส่วนของลำดับเบสซ้ำในโปรคาริโอต มักจะเรียกลำดับเบสซ้ำเหล่านั้นว่า short sequence repeats ; SSRs (van Belkum *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2002) short tandem repeats ; STRs (van Belkum *et al.*, 1998) short and long tandemly repeated repetitive (STRR and LTRR) sequence (Mazel *et al.*, 1990; Masepohl *et al.*, 1996; Vioque, 1997; Rasmussen and Svenning, 1998; Guevara *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2002) นอกจากนี้ ยังมีชื่อเรียกเฉพาะของลำดับเบสซ้ำลักษณะอื่นๆ ในบริเวณต่างๆ ของยีนอีกด้วย เช่น repetitive extragenic palindrome (REP) หรือ palindromic unit (PU), intergenic repeat unit (IRU) หรือ enterobacterial

repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence (Lupski and Weinstock, 1992) ซึ่งส่วนใหญ่ มักจะศึกษาในจีโนมของ eubacteria

โดยในระยะแรกนั้น Versalovic *et al.* (1991) ศึกษาการกระจายของลำดับเบสซ้ำที่เป็น REP และ ERIC sequence เพื่อที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นลายพิมพ์ คีเอ็นเอในจีโนมของแบคทีเรีย ต่อมา Sharples and Lloyd (1990) ทำการศึกษาลำดับเบสซ้ำนี้เพื่อใช้ในการบ่งชี้ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* และแบคทีเรียใน Family *Enterobacteriaceae* พบว่า REP หรือ PU sequence จะอยู่ในบริเวณของยีนที่ควบคุมเกี่ยวกับการ translation ของ polycistronic operons ใน mRNA ส่วน ERIC หรือ IRU sequence มีขนาดประมาณ 126 bp ซึ่งใกล้เคียงกับ REP sequence ซึ่งอยู่บริเวณที่เป็น noncoding transcribed บนโครโมโซม และมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ ลำดับเบสซ้ำส่วนใหญ่ที่ได้จะมาจากข้อมูลของลำดับเบสในจีโนมทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ ที่ได้ทำการวิเคราะห์ไว้แล้วในฐานข้อมูล ลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง อาจจะมีหลายแบบ และหลาย copy ในแต่ละจีโนม ดังตาราง 1

ตาราง 1 ลักษณะของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องที่พบในจีโนมของโปรคาริโอต (van Belkum *et al.*, 1998)

Length of repeat unit	Repeat	Annotation
Homogeneous repeat		
1	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAA-3'	5'-(A) ₁₅ -3'
2	5'-ATATATATATATATAT-3'	5'-(AT) ₈ -3'
3	5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3'	5'-(GCC) ₈ -3'
4	5'-GATCGATCGATCGATCGATCGATC-3'	5'-(GATC) ₆ -3'
5	5'-GCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC-3'	5'-(GCTCC) ₅ -3'
6	5'-AAAATTAAAATTAAAATTAAAATT-3'	5'-(AAAATT) ₄ -3'
Heterogeneous repeat		
	5'----AACC AAC AAC GTCTC GTCTC AT AT AT AT AT AT----3'	
Degenerate repeat		
A	5'- GATCGATCAA	GATCGATCAA GATCGATCAA -3'
B	5'- --A-----	-----A-- -----G----- -3'
C	5'- ---G-----	----- -T----- -3'
D	5'- -----	CTA----- -----TT -3'

ในส่วนของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องที่พบในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียที่เรานั้นพบว่าจะมีกระจุกกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในกลุ่มที่เป็นเส้นสาย และกลุ่มที่สร้างเฮเทอโรซิส ลำดับเบสซ้ำเหล่านี้จะพบทั้งที่อยู่ระหว่าง หรือพบในยีน และยังไม่ทราบบทบาทหน้าที่ที่แน่ชัด (Bauer *et al.*, 1993) ต่อมาได้มีการศึกษาและวิจัยใน *Calothrix* sp. PCC7601 (Mazel *et al.*, 1990) มีการพบลำดับเบสซ้ำมากถึง 100 copy ซึ่งในขณะนั้นได้ตั้งชื่อลำดับเบสส่วนนั้นว่า ลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น (short tandemly repeated repetitive; STRR sequence) ซึ่งลำดับเบสซ้ำกลุ่มนี้มีความจำเพาะในพวกที่มีเฮเทอโรซิส

Rouhiainen *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นที่พบในโครโมโซมของ *Anabaena* sp. PCC 7120 เพื่อที่จะพัฒนาเป็นตัวตรวจวัด (probe) ของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสารพิษไมโครซิสตินที่ทำการเก็บตัวอย่างมาจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ซึ่งสามารถช่วยจัดจำแนกกลุ่มที่สร้างสารพิษชนิด hepatotoxic และ neurotoxin ออกจากกันได้ จากนั้น Masepohl *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับยีน transposon Tn5-1087b ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ nitrogen fixation ของ mutant YC16 ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 พบลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาว (long tandemly repeated repetitive ; LTRR sequence) มีลักษณะเป็น inverted repeat sequence ซึ่งพบในไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นเส้นสาย

ในปัจจุบันนี้ การวิเคราะห์หาลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องในไซยาโนแบคทีเรียสามารถศึกษาได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น โดยอาศัยข้อมูลจากจีโนมทั้งหมดของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้วิเคราะห์ลำดับเบสไว้ครบถ้วนแล้วเป็นแหล่งข้อมูลในการศึกษา โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป TRF (Tandem Repeat Finder) ver. 3.01 (Katayama *et al.*, 2002) ซึ่งพบตำแหน่งของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องตำแหน่งใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนในไซยาโนแบคทีเรีย สายพันธุ์ *Anabaena* sp. PCC7120, *Synechocystis* sp. PCC6830, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Synechococcus* sp. WH8120 และ *Prochlorococcus marinus* sp. MED4

Mazel *et al.* (1990) ศึกษาลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น (short tandemly repeated repetitive sequence, STRR) จำนวน 3 ลักษณะที่พบในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Calothrix* sp. PCC7601 และใช้เป็นตัวติดตามในการทำ southern hybridization จากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ และยังทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* ซึ่งพบว่าลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นทั้งสามแบบนี้มีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกัน และมีความเป็นไปได้ที่จะนำลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องนี้มาศึกษาในด้านอนุกรมวิธานต่อไป Guevara *et al.* (2002) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ที่อยู่ร่วมกับต้น *Gunnera* ที่แยกมาได้จากสถานะแวดล้อมที่แตกต่างกัน 3 แหล่ง โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสซ้ำ

ต่อเนื่องช่วงสั้น (STRR) ในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถใช้จัดกลุ่ม *Nostoc* ในสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น ที่พบในประเทศไทย คือ การศึกษาของ Chonudomkul *et al.* (2004) ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ กับ ลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น (STRR) ในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรีย *Cylindrospermopsis raciborskii* จำนวน 24 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้มี 19 สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย พบว่าจากการจัดกลุ่มของ *C. raciborskii* โดยใช้ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น ไม่สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นไม่เหมาะสมกับการแบ่งกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียสปีชีส์นี้

Masepohl *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาว (long tandemly repeated repetitive sequence, LTRR) ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 โดยศึกษาเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนในระบบทรานสโปซอนเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่เป็น wild-type และที่เป็น mutant โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องเหล่านี้ เพื่อดูความแตกต่างและตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไปใน wild-type และ mutant ซึ่งสามารถใช้แยกสองกลุ่มนี้ออกจากกันได้ Rasmussen and Svenning (1998) ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของ STRR และ LTRR บนจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียสังเคราะห์ไฟเบอร์สำหรับการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก *Nostoc* สายพันธุ์ที่อยู่ร่วมกับต้น *Gunnera* ชนิดเดียวกันนั้นมีความคล้ายคลึงกันมาก ในขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียต่างชนิดกันมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยตรงจากการใช้เส้นสายหรือเซลล์เดี่ยวโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอก่อน

นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีการตรวจหาลำดับเบสซ้ำที่เรียกว่า Color-coding method ซึ่งอาศัยการจำแนกโดยสังเกตลักษณะสีที่ code ไว้ในแต่ละนิวคลีโอไทด์แล้วตรวจหาสีที่คล้ายคลึงกันที่เรียงไว้ในแต่ละแถว โดยใช้โปรแกรมแสดงผล Java color-coding viewer (Liu *et al.*, 2002) ปัจจุบันนี้ข้อมูลลำดับเบสซ้ำได้ถูกเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลที่สามารถเข้าไปสืบค้นได้ เช่นในฐานข้อมูลของ TRBD-The Tandem Repeats Database ซึ่งได้รวบรวมข้อมูลลำดับเบสซ้ำของสิ่งมีชีวิตเอาไว้ เพื่อใช้ประโยชน์ในด้าน genomic marker และ DNA fingerprints (Gelfand *et al.*, 2007) และในฐานข้อมูลของ VNTRDB : a bacterial variable number tandem repeat locus database ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลำดับเบสซ้ำในจุลินทรีย์ (Chang *et al.*, 2007)

6. การศึกษาด้านความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนในประเทศไทย

น้ำพุร้อนเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติ ส่วนใหญ่เกิดในบริเวณที่หินเกิดรอยเลื่อนและรอยแตกซึ่งมีขนาดใหญ่และมีการเคลื่อนที่ ทำให้เกิดการแผ่ความร้อนระหว่างรอยเลื่อนและรอยแตกของหินจากการพิจารณาคุณสมบัติทางเคมี พบว่าน้ำพุร้อนมีต้นกำเนิดมาจากน้ำฝนที่ตกลงมาสู่ผิวโลก ฝนและมักจะเกิดในบริเวณที่น้ำจะต้องไหลออกมาตามธรรมชาติ ปริมาณน้ำพุร้อนที่ไหลขึ้นมาหรือถูกปล่อยออกมาตามธรรมชาติจะมากหรือน้อยต่างกันในแต่ละบริเวณ ปกติแล้วปริมาณของน้ำที่ไหลออกมาจะไม่สม่ำเสมอ ไม่ขึ้นกับฤดูกาล (กรมทรัพยากรธรณี, 2529) บริเวณน้ำพุร้อนจะมีการไหลของน้ำพุร้อนไปยังลำธาร คลอง ทำให้มีระดับความร้อนแตกต่างกัน สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนมีการปรับตัว (adaptation) ให้สามารถอยู่ในที่มีอุณหภูมิสูงๆ ได้ สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่สามารถเจริญได้ในน้ำพุร้อน โดยสาหร่ายแต่ละชนิดจะเจริญได้ในแต่ละระดับของอุณหภูมิที่ต่างกัน และการที่สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถเจริญได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ (physical factor) ปัจจัยทางเคมี (chemical factor) และปัจจัยทางชีวภาพ (biological factor) (สระบุรี, 2523)

ในน้ำพุร้อนมีสิ่งมีชีวิตเพียงไม่กี่กลุ่มที่สามารถเจริญอยู่ได้ หนึ่งในนั้นคือไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตหลักที่พบมากที่สุดกลุ่มหนึ่งในระบบนิเวศน้ำพุร้อน และเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่น่าสนใจในด้านการนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม เพราะจุลินทรีย์ประเภทนี้สังเคราะห์แสงเพื่อให้ได้พลังงานในการเจริญและการแพร่พันธุ์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในระดับอุตสาหกรรมจะลดต้นทุนในการผลิตในส่วนของการเลี้ยงเชื้อ เพราะสาหร่ายประเภทนี้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์แสง (Round, 1973) ชุมชีพไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนมีความหลากหลายสูงและจัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณค่ามหาศาล มีการศึกษาการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน รงควัตถุ และอื่นๆ จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน ในทางเกษตรกรรม การแพทย์ และในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากคุณสมบัติของการคงความสามารถในการทำงานที่อุณหภูมิสูง

บริเวณน้ำพุร้อนจะมีการไหลของน้ำพุร้อนไปยังลำธารตามธรรมชาติ ทำให้น้ำมีระดับความร้อนที่แตกต่างกัน สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนจึงมีการปรับตัว (adaptation) ให้สามารถอยู่ในที่มีอุณหภูมิสูงๆ ได้ เมื่อทำการวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิต่างๆ โดยใช้ปริมาณคลอโรฟิลล์ โปรตีน และ RNA เป็นเครื่องบ่งชี้โดยกำหนดให้สิ่งแวดล้อมอื่นๆ คงที่พบว่าอุณหภูมิเป็นตัวควบคุมการเจริญของสาหร่ายในน้ำพุร้อน (Brock, 1966) และเป็นปัจจัยจำกัดทางสิ่งแวดล้อมที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ในน้ำพุร้อน (Brock, 1978) ระดับอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มีค่าไม่เท่ากัน โดยพบว่าสิ่งมีชีวิตประเภท

ยูคาริโอตทนอุณหภูมิสูงได้ต่ำกว่าสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรคาริโอต ในกลุ่มของแบคทีเรียมีระดับความทนต่ออุณหภูมิสูงสุดประมาณ 115 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็นกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 70-73 องศาเซลเซียส นอกจากอุณหภูมิแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน ได้แก่ แสงสว่าง เป็นปัจจัยทางกายภาพที่ควบคุมการผลิต (Odum, 1971) ความเข้มของแสงสว่างจะส่งผลต่อผู้ผลิตขั้นปฐมภูมิ (primary producer) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ยังมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำพุร้อนจะถูกจำกัดด้วยค่าความเป็นกรดแก่ หรือด่างแก่ ซึ่งในน้ำพุร้อนที่มีสภาพเป็นกรดแก่จะมีการออกซิไดซ์ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นกรดกำมะถัน น้ำพุร้อนที่มีสภาพเป็นกรดแก่จะจำกัดการกระจายของสิ่งมีชีวิต สาหร่ายที่สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำพุร้อนที่มีสภาพเป็นกรดแก่ ได้แก่ *Cyanidium caldarium* และน้ำพุร้อนที่มีสภาพเป็นด่างซึ่งมีอุณหภูมิระหว่าง 51-56 องศาเซลเซียส จะพบไซยาโนแบคทีเรีย *Mastigocladus laminosus*, *Phormidium laminosum* และ *Synechococcus* sp. เป็นจำนวนมาก (Fogg, 1973; Lynch and Poole, 1979)

การละลายของออกซิเจนในน้ำ เป็นปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตในน้ำพุร้อน ซึ่งปริมาณการละลายของออกซิเจนในน้ำจะแปรผันตามอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณการละลายของออกซิเจนในน้ำจะลดน้อยลง (Lynch and Poole, 1979) ซึ่งมีผลต่อชนิดและจำนวนของสิ่งมีชีวิตในน้ำพุร้อน นอกจากนั้นความเข้มข้นของสารอินทรีย์ยังมีผลต่อการกระจายตัวของจุลินทรีย์ ในน้ำพุร้อนส่วนใหญ่จะมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ต่ำ จึงเป็นปัจจัยจำกัดที่กำหนดชนิดของจุลินทรีย์แต่มีผลต่อไซยาโนแบคทีเรียน้อย เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้

ปัจจัยทางชีวภาพที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตในน้ำพุร้อน เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่ง Odum (1971) กล่าวว่า ในน้ำพุร้อนขนาดใหญ่จะมีความสมดุลของมวลทางชีวภาพเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของสิ่งมีชีวิตอยู่เสมอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตอยู่ในสภาวะคงตัว นอกจากนั้นการถ่ายทอดพลังงานในน้ำพุร้อนก็เช่นเดียวกับระบบนิเวศทั่วไป โดยผู้ผลิตส่วนใหญ่จะเป็นไซยาโนแบคทีเรีย

การสำรวจความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนของประเทศไทย โดยสระบุรี (2523) ทำการศึกษาสาหร่ายและจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่พบในน้ำพุร้อนโป่งส่อม ตำบลออนหลวย อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 10 สปีชีส์ โดยชนิดเด่นที่พบเป็นไซยาโนแบคทีเรีย กาญจนา และคณะ (2532) ศึกษาและสำรวจความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือ 3 แหล่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ และกำแพงเพชร พบไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นสปีชีส์เด่น คือ *Calothrix* sp., *Oscillatoria terebriformis* และ *Synechococcus* sp.

ต่อมา ประวิทย์ (2533) ได้ศึกษานิเวศวิทยาของสาหร่ายบริเวณน้ำพุร้อนบ้านโป่งยอม อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 98 สปีชีส์ สปีชีส์เด่นได้แก่ *Myxosarcina amethystina*, *Navicula* sp., *Oscillatoria* spp. และ *Synechococcus aeruginosus* ต่อมา วิรัชญ์ (2534) ศึกษาสปีชีส์และชีววิทยาของสาหร่ายในน้ำพุร้อน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง ที่ช่วงอุณหภูมิ 53-59 องศาเซลเซียส พบสาหร่ายทั้งหมด 14 สปีชีส์ ได้แก่ *Myxosarcina amethystina*, *Oscillatoria* spp., *Phormidium* spp. และ *Synechococcus elongatus* กาญจนา และ สุทธิรักษ์ (2535) สำรวจสปีชีส์ของไซยาโนแบคทีเรียในบ่อน้ำร้อนหินดาด อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และบ่อน้ำร้อนท่าไม้แดง จังหวัดกำแพงเพชร มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 40-49 องศาเซลเซียส พบไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix* sp., *Mastigocladus* sp., *Oscillatoria* spp. และ *Synechococcus* sp. อุดมลักษณ์ (2544) ได้สำรวจความหลากหลายของสาหร่ายในน้ำพุร้อน 9 แหล่ง ใน 4 จังหวัดบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย คือ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และลำปาง พบสาหร่ายทั้งหมด 78 สปีชีส์ ส่วนใหญ่เป็นไซยาโนแบคทีเรีย พบมากถึง 39 สปีชีส์ ชนิดเด่นที่พบได้แก่ *Phormidium boryanum*, *Synechococcus lividus* และ *Synechococcus* sp. ช่วงอุณหภูมิที่พบไซยาโนแบคทีเรียมากที่สุดคือ 30-39 องศาเซลเซียส และพบน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส และ วราภรณ์ (2545) ทำการแยกและหาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงของไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนบางแหล่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากช่วงอุณหภูมิ 40-80 องศาเซลเซียส pH 7-10 เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่อุณหภูมิ 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส และศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญพบว่า *Leptolyngbya* sp., *Mastigocladus laminosus*, *Phormidium* sp. และ *Pseudanabaena galeata* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วน *Chroococcidiopsis thermalis*, *Synechococcus bigranulatus*, *Synechococcus lividus* สายพันธุ์ SKP50 และ DSK74 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญพบว่า *Mastigocladus laminosus* และ *Phormidium* sp. เจริญได้ดีที่ pH 7 *Chroococcidiopsis thermalis*, *Leptolyngbya* sp., *Pseudanabaena galeata* และ *Synechococcus lividus* สายพันธุ์ SKP50 เจริญได้ดีที่ pH 9 ส่วน *Synechococcus bigranulatus* และ *Synechococcus lividus* สายพันธุ์ DSK74 เจริญได้ดีที่ pH 10

Sompong (2006) เก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน 6 แหล่ง ในประเทศไทย ที่อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-75 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ทางอนุชีวโมเลกุลโดยใช้ลำดับเบส 16S rDNA เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ พบไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 14 ชนิด จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยกล้องจุลทรรศน์ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบคือ *Synechococcus* cf. *lividus*

Copeland, *Cyanothece* sp., *Phormidium* cf. *boryanum* (Bory ex Gomont) Anagnostidis and Komarek และ *Leptolyngbya* sp. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดมี 55 ตัวอย่าง และวิเคราะห์โดยใช้วิธี denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) จำนวน 80 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ใช้การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตัดสินได้ยาก พบว่าความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่การวิเคราะห์โดยใช้วิธี DGGE สามารถแสดงความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากผลการศึกษาความหลากหลายทางอนุชีวโมเลกุลของไซยาโนแบคทีเรีย ที่มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิและลักษณะทางภูมิประเทศ เมื่อวิเคราะห์จากตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนทั้งทางภาคเหนือและภาคใต้ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ ภายในช่วงอุณหภูมิและฤดูกาล พบว่า *Synechococcus* cf. *lividus*, *Cyanothece* sp. และ *Phormidium* cf. *boryanum* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับน้ำพุร้อนทางภาคเหนือ ในช่วงอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 50-75 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นไซยาโนแบคทีเรียชนิดเด่น ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางเคมีบางประการ เช่น ค่าการนำไฟฟ้า soluble reactive phosphorus ไนเตรต แอมโมเนียม ปริมาณซัลไฟด์ที่ละลายน้ำ และซัลเฟต ส่วนรูปแบบการกระจายตัวของ ไซยาโนแบคทีเรียเมื่อดูจาก 16S rDNA gene DGGE banding พบว่าในน้ำพุร้อนหลายแหล่งมีความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียแตกต่างกันในระหว่างช่วงอุณหภูมิ แต่ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละฤดูกาล

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย

การวิจัยในครั้งนี้จะทำการศึกษาลำดับเบสของ 16S-23S ITS และ PC-IGS และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว (STRR and LTRR) ของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนของประเทศไทย (ตาราง 2) ที่มีอยู่ใน culture collection ของห้องวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ทำการวินิจฉัยชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการจัดจำแนกเป็นหมวดหมู่ในระดับจิ้นส์ หรือ สปีชีส์ แล้วโดย อุดมลักษณ์ (2544) และ Sompong (2006) โดยคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้บริสุทธิ์ ปราศจากแบคทีเรียอื่นๆ เข้ามาเจริญร่วม และเป็นตัวแทนของจิ้นส์ หรือ สปีชีส์ ที่มีความแตกต่างกันทางด้านสัณฐานวิทยามาเป็นตัวแทนในการศึกษาจากน้ำพุร้อนบางแหล่งของประเทศไทย

ตาราง 2 ไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกมาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา

ไซยาโนแบคทีเรีย	Order	อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PR 45	Chroococcales	40 °C
<i>Phormidium</i> sp. SK 45	Oscillatoriales	40 °C
<i>Leptolyngbya</i> sp. PR 40	Oscillatoriales	40 °C
<i>Oscillatoria</i> sp. KC 45	Oscillatoriales	40 °C
<i>Phormidium</i> sp. PD 40	Oscillatoriales	40 °C
<i>Phormidium</i> sp. PR 40	Oscillatoriales	40 °C
<i>Scytonema</i> sp. TP 40	Nostocales	40 °C
<i>Scytonema</i> sp. TP 40-1	Nostocales	40 °C
<i>Synechococcus</i> sp. PD 55	Chroococcales	50 °C
<i>Synechococcus</i> sp. SK 50	Chroococcales	50 °C
<i>Synechococcus</i> sp. SK 70	Chroococcales	50 °C

ที่มา : Sompong (2006)

1.1 การแยกไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนให้บริสุทธิ์

ทำการแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ปราศจากแบคทีเรียอื่นๆ เข้ามาเจริญร่วมด้วยเทคนิคต่างๆ ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทำการศึกษา

1.1.1 วิธี streak plate หรือ spread plate (ยูวดี และฉมาภรณ์, 2546) บนอาหารแข็ง สังเกตการเจริญและเลือกโคโลนีที่อยู่เดี่ยวๆ ไปปลูกซ้ำบนอาหารใหม่ จนกว่าจะได้ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นชนิดเดี่ยวๆ (axenic culture)

1.1.2 การแยกจากเส้นสายเดี่ยวๆ ใช้เข็มเย็บเชื้อลากไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายบนอาหารแข็ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม จนไซยาโนแบคทีเรียเจริญแผ่เส้นสายออกไป สังเกตการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอเลือกเก็บเอาเส้นสายเดี่ยวๆ ในช่วงปลายของกลุ่มเส้นสาย นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต่อไป (Castenholz, 1981)

1.1.3 ทำการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ที่เจริญอยู่ร่วมกับตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย โดยนำอาหารที่เพาะเลี้ยงมา streak หรือ spread บนอาหารแข็ง LB plate บ่มที่อุณหภูมิ 40 หรือ 50 องศาเซลเซียส แล้วแต่สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบจากนั้นสังเกตการเจริญของโคโลนีแบคทีเรีย ถ้าพบว่าการเจริญของแบคทีเรียเข้ามาร่วมด้วย ต้องกลับไปทำการแยกและเพาะเลี้ยงใหม่อีกครั้ง

1.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารสูตร D medium (Castenholz, 1981) ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์ซึ่งอยู่ที่ 40 และ 50 องศาเซลเซียส (ตาราง 1) ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา ที่ความเข้มแสงประมาณ 250 ลักซ์ (lux) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

2. การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA)

การสกัดดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ คัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) ดังนี้

2.1 ปั่นเก็บเซลล์ที่ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที

2.2 ล้างเซลล์ด้วย TE buffer 500 ไมโครลิตร ปั่นเก็บเซลล์ที่ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที

2.3 ละลายตะกอนเซลล์ใน TE buffer

2.4 เติม CTAB extraction buffer ในปริมาตร 1.5 เท่า ของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixer บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 1-2 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 30 นาที

2.5 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที คูด supernatant ใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่

2.6 สกัดด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที คูด supernatant ใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่

2.7 สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ที่แช่เย็น ปริมาตร 1.5 เท่า ของตัวอย่าง กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที คูด supernatant ใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่

2.8 เติม sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน เติม absolute ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1.5 เท่าของตัวอย่าง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

2.9 ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็น ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง

2.10 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย sterile deionize water หรือ TE buffer ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ถ้ามีความจำเป็นต้องใช้สมน้ำเสมอเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บตัวอย่าง ดีเอ็นเอระยะยาวเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.11 ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ agarose เข้มข้น 0.8% ตามวิธีการของ Sambrook and Russel (2001)

3. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

3.1 องค์ประกอบที่ใช้ในการพีซีอาร์ ในปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ได้แก่ PCR buffer (1X), dNTPs (200 μ M), primer (1 μ M), *Taq* polymerase (1unit), template DNA (1-3 ng)

3.2 สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ คือ Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 4 นาที Denature 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 รอบ และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที โดยที่อุณหภูมิในขั้น annealing จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ใช้ในแต่ละปฏิกิริยา

3.3 ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer โดยเทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่นโดยใช้ไพรเมอร์ 16S-1247f และ 23S-1608r (ตาราง 3) (Rocap *et al.*, 2002)

3.4 ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ Phycocyanin Intergenic Spacer (PC-IGS) โดยเทคนิคโพลีเมอเรส เซน รีแอคชั่นโดยใช้ไพรเมอร์ PCBF และ PCAR (ตาราง 3) (Neilan *et al.*, 1995)

3.6 ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว (STRR and LTRR) โดยเทคนิคโพลีเมอเรส เซน รีแอคชั่นโดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1A, STRR 1B และ LTRR 1, LTRR 2 (ตาราง 3) (Rasmussen and Svenning, 1998)

3.7 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ agarose เข้มข้น 1% ตามวิธีการของ Sambrook and Russel (2001)

ตาราง 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→3'	การใช้งาน	แหล่งอ้างอิง
F1114	GCAACGAGCGCAACCC (59.24)	sequencing	Neilan <i>et al.</i> , 1997
16S-1247f	CGTACTACAATGCTACGG (42.90)	PCR และ sequencing	Rocap <i>et al.</i> , 2002
23S-1608r	CYACCTGTGTCGGTTT (35.40)	PCR	Rocap <i>et al.</i> , 2002
23S-xxr	CTCTGTGTGCCTAGGTATCC (59.85)	sequencing	Boyer <i>et al.</i> , 2002
PCBF	GGCTGCTTGTTTACGCGACA (48.70)	PCR และ sequencing	Neilan <i>et al.</i> , 1995
PCAR	CCAGTACCACCAGCAACTAA(46.65)	PCR และ sequencing	Neilan <i>et al.</i> , 1995
STRR 1A	CCARTCCCCARTCCCC (37.31)	PCR	Rasmussen and Svenning (1998)
STRR 1B	GGGGAYTGGGGAYTGG (37.31)	PCR	Rasmussen and Svenning (1998)
LTRR 1	GGATTTTTGTAGTTAAAC (25.00)	PCR	Rasmussen and Svenning (1998)
LTRR 2	CTATCAGGGATTGAAAG (41.18)	PCR	Rasmussen and Svenning (1998)

4. การโคลนผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ก่อนวิเคราะห์หาลำดับเบส

4.1 ในกรณีที่จำเป็นต้องโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ จะทำการเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T Easy Vector ของบริษัท Promega ก่อนการหาลำดับเบส (ภาคผนวก ค)

4.2 ถ่ายโอนยีนโดยวิธี Transformation โดยใช้ *E.coli* JM109 เป็น competent cell (ภาคผนวก ค)

4.3 คัดเลือกหาโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ คัดเลือก colony สีขาวจากอาหาร LB plate ที่มี ampicillin/IPTG/X-Gal ตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยใช้วิธี colony PCR (ภาคผนวก ค)

4.4 ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยใช้ Plasmid Miniprep Kit ของบริษัท Fermentas (ภาคผนวก ค)

4.5 การวิเคราะห์หาชิ้นส่วน insert ในพลาสมิด โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ภาคผนวก ค)

5. การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ให้บริสุทธิ์

ก่อนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับเบส นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DNA and Gel Band Purification Kit ของบริษัท GE Healthcare (ภาคผนวก ค)

6. การวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี ลำดับเบสแสดงไว้ (ภาคผนวก ง) โดยใช้ไพรเมอร์ในตาราง 3 ซึ่งสังเคราะห์โดยบริษัท Bio Basic Inc.

7. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไซยาโนแบคทีเรีย

นำลำดับเบสที่ได้ทำการ BLAST search ในฐานข้อมูลของ NCBI GenBank เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสของไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูล เพื่อดูความเหมือนกับไซยาโนแบคทีเรีย จินัส หรือสปีชีส์ ที่จะเป็นไปได้มากที่สุด

การทำ multiple alignment โดยโปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.0.0 (Hall, 1999) เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ กับลำดับเบสของไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการ down load มาจากฐานข้อมูลของ NCBI ให้ตรงกันในแต่ละตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์

การสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก (Phylogenetic tree) โดยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ),

Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) , Maximum Parsimony (MP) เพื่อดูความเหมาะสมของแผนภูมิที่ได้จากแต่ละวิธี

8. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง

นำข้อมูลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Gel Analysis Software บริษัท SYNGENE มาศึกษาเป็น dendrogram หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่ม โดยโปรแกรมทางสถิติ SPSS Ver.6 โดยใช้ Cluster analysis แสดงการปรากฏ (1) และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (0) ในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และประเมินความเหมาะสมของการใช้เทคนิคการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว ที่ใช้ในการบ่งชี้ความแตกต่างในระดับจีโนส หรือ สปีชีส์ของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน

บทที่ 4
ผลการศึกษา

1. ไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา จำนวน 11 สายพันธุ์ (ภาพ 6) มีรายละเอียดตามตารางที่ 4

ตาราง 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาแยกตาม Order

ไชยาโนแบคทีเรีย	Order	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PR45	Chroococcales	เซลล์มีรูปร่างกลม อยู่รวมกันเป็นโคโลนีสีเขียว มี sheath หุ้มที่บาง แต่สามารถมองเห็นได้ชัดเจน มีขนาด 1.5-2.0 μm เซลล์มีการแบ่งตัวที่ไม่แน่นอน มีการฟอร์มเป็น baeocyte หรือ endospore ซึ่งมีตั้งแต่ 4 8 16 จนถึง 32 baeocyte
<i>Synechococcus</i> sp. PD55	Chroococcales	เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ตรงหรือโค้งเล็กน้อย ปลายเซลล์มน อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีความกว้างประมาณ 1.4-1.5 μm ยาว 3-8 μm ปลายเซลล์ทั้งสองด้านจะมีเม็ด granule เห็นเป็นจุดเล็กๆ สีเข้ม เซลล์มีการแบ่งตัวแบบ binary fission บางครั้งเซลล์ที่แบ่งแล้วจะอยู่ติดกัน เห็นเป็นเซลล์ที่มีลักษณะการคอดเว้าบริเวณกลาง หรือปลายเซลล์
<i>Synechococcus</i> sp. SK50	Chroococcales	เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีขนาดกว้างประมาณ 1.2-1.5 μm ยาว 4-17 μm ปลายเซลล์มนเซลล์มีการแบ่งตัวแบบ binary fission บางครั้งเซลล์ที่แบ่งแล้วจะอยู่ติดกัน เห็นเป็นเซลล์ที่มีลักษณะการคอดเว้าบริเวณกลาง

ตาราง 4 (ต่อ)

ไซยาโนแบคทีเรีย	Order	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
<i>Synechococcus</i> sp. SK70	Chroococcales	เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีขนาดกว้างประมาณ 1.1-1.2 μm ยาว 4-10 μm ปลายเซลล์มนเซลล์มีการแบ่งตัวแบบ binary fission บางครั้งเซลล์ที่แบ่งแล้วจะอยู่ติดกัน เห็นเป็นเซลล์ที่มีลักษณะการคอดเว้าบริเวณกลาง
<i>Scytonema</i> sp. TP40	Nostocales	เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสายสีเขียว มีเฮเทอโรซิสต์ และ/หรือ อะคินีต มีการแตกแขนงไม่แท้จริง แขนงที่แตกออกมาจะเป็นแขนงคู่ (false branch in pair) ระหว่างเฮเทอโรซิสต์ เซลล์มีรูปร่างทรงกระบอก มีขนาด 2.2x2.5 μm ซิทที่หุ้มอาจไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอมเหลือง เส้นสายมีความยาวประมาณ 16-24 μm
<i>Scytonema</i> sp. TP40	Nostocales	เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสายสีเขียว มีเฮเทอโรซิสต์ และ/หรือ อะคินีต มีการแตกแขนงไม่แท้จริง แขนงที่แตกออกมาจะเป็นแขนงคู่ระหว่างเฮเทอโรซิสต์เซลล์มีรูปร่างทรงกระบอก มีขนาด 2.2x2.5 μm ซิทที่หุ้มอาจไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอมเหลืองมีความยาวประมาณ 16-24 μm
<i>Leptolyngbya</i> sp. PR40	Oscillatoriales	เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสาย ตรงหรือโค้งอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก ผนังเซลล์ไม่คอดเว้า เซลล์มีความกว้างประมาณ 3.5 μm ยาว 2-4 μm ปลายเซลล์มน มี sheath หุ้มใสไม่มีสี ขึ้นออกมาเห็นชัดเจน

ตาราง 4 (ต่อ)

ไซยาโนแบคทีเรีย	Order	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
<i>Oscillatoria</i> sp. KC45	Oscillatoriales	เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสาย ครัยโคมเป็นทรงกระบอก เหยียดตรงหรือเป็นเกลียวเล็กน้อย ไม่มีซีทหุ้ม เซลล์มีรูปร่างคล้ายเหรียญ เส้นสายมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เซลล์มีสี น้ำตาล เซลล์มีความกว้างประมาณ 3-4 μm ยาว 4-5 μm
<i>Phormidium</i> sp. SK45	Oscillatoriales	เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสาย ตรงหรือโค้งเล็กน้อย สีน้ำตาล อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีความกว้างประมาณ 1.5 μm ยาว 1.6-1.7 μm ปลายเซลล์แหลม มีลักษณะตรง หรือโค้งงอผนังเซลล์มีการคอดเว้าเล็กน้อย
<i>Phormidium</i> sp. PD40	Oscillatoriales	เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสาย ตรงหรือโค้งเล็กน้อย เซลล์มีสีน้ำตาล อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีความกว้างประมาณ 2 μm ยาว 2 μm ปลายเซลล์แหลม มีลักษณะตรง หรือโค้งงอผนังเซลล์มีการคอดเว้าเล็กน้อย
<i>Phormidium</i> sp. PR40	Oscillatoriales	เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสาย ตรงหรือโค้งเล็กน้อย เซลล์มีสีน้ำตาล อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีความกว้างประมาณ 1.2-1.3 μm ยาว 2 μm ปลายเซลล์แหลม มีลักษณะตรง หรือโค้งงอผนังเซลล์มีการคอดเว้าเล็กน้อย

* อักษรย่อแทนสถานที่เก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน

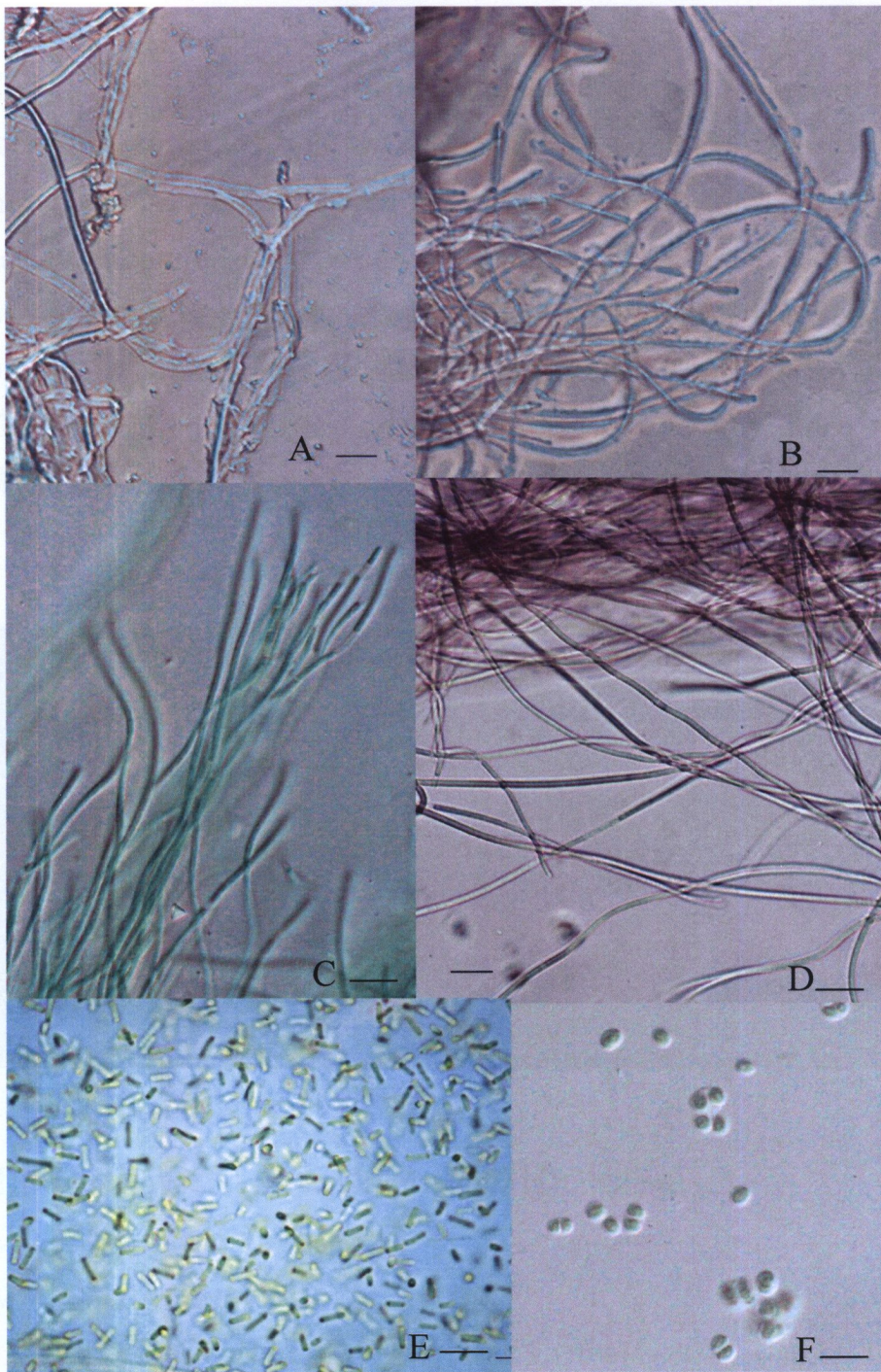
SK : San Kamphaeng, Chiang Mai

PD : Pong Dued, Chiang Mai

TP : Theppanom, Chiang Mai

PR : Pra Rueang, Kamphaeng

KC : Khaochaison, Phatthalung



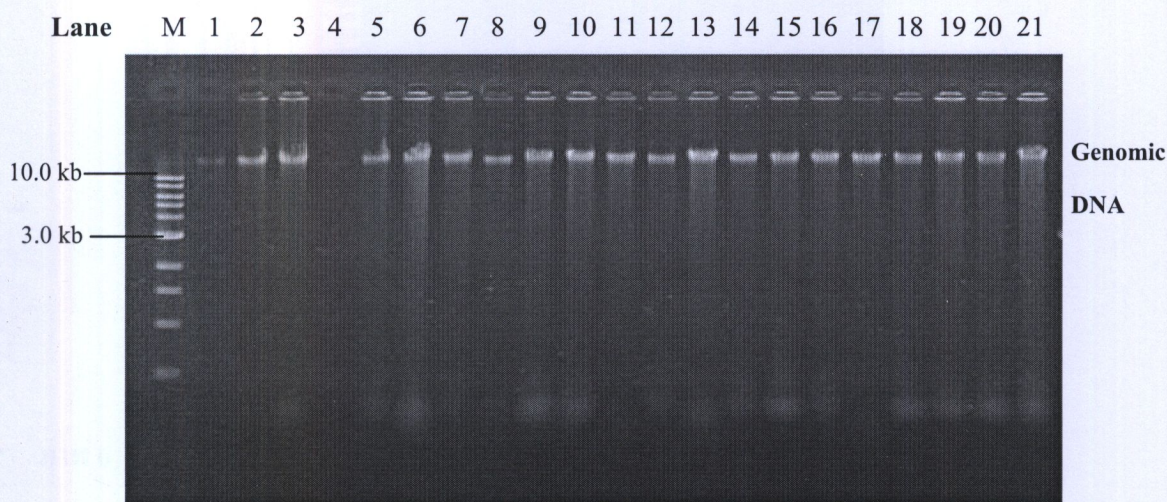
(scale bar : 10 μm)

ภาพ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนจีนส์ที่ใช้ในการศึกษา

(A) *Scytonema* sp., (B) *Phormidium* sp. (brown filament), (C) *Phormidium* sp. (green filament), (D) *Oscillatoria* sp., (E) *Synechococcus* sp. และ (F) *Chroococcidiopsis* sp.

2. การสกัดดีเอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน

ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนนั้น เยื่อหุ้มเซลล์จะคงตัวเมื่อความร้อนสูงและเยื่อหุ้มเซลล์จะมีลึบดที่ละลายในกรดไขมันจำนวนมาก บางชนิดเกาะเป็นกลุ่มมีเมือกหนาหุ้มเพื่อการทนต่ออุณหภูมิที่สูง ในขั้นตอนการหาสภาวะและวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ พบว่าการใช้ extraction buffer ที่มีส่วนผสมของ CTAB 4% และ PVPP 1% ร่วมในการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีคุณสมบัติในการกำจัดสารในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ออกจากตัวอย่างได้ดี โดยไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ lysozyme หรือ proteinase K ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง และทำให้คุณภาพดีเอ็นเออยู่ในระดับที่สามารถใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยเทคนิคพีซีอาร์ได้ ดังภาพ 5



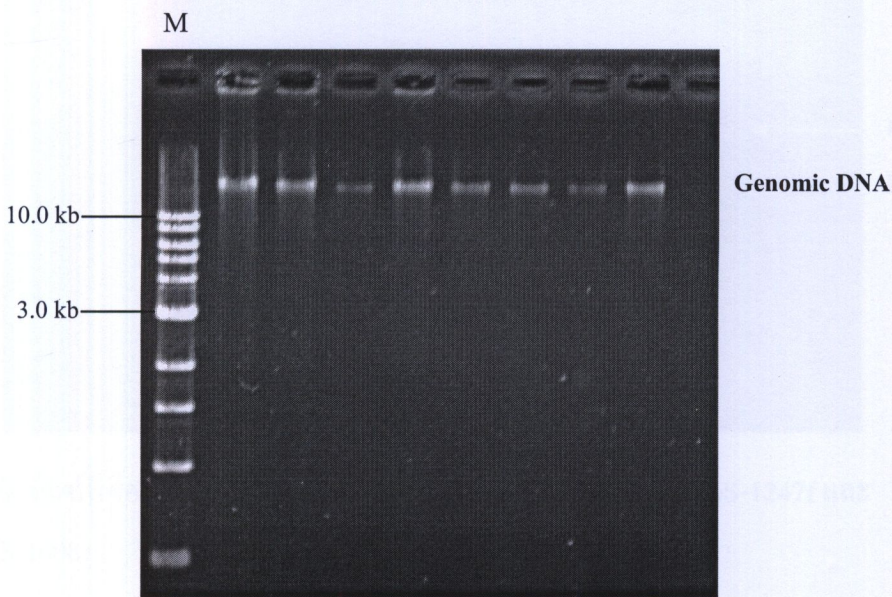
ภาพ 5 จีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนที่ใช้ในการศึกษา

1 % agarose gel ใน 1x TAE buffer

M = 1 kb DNA Ladder

Lane 1,2: *Chococidiopsis* sp. PR45; **Lane 3,4:** *Phormidium* sp. SK45; **Lane 5,6:** *Leptolyngbya* sp. PR40; **Lane 7,8:** *Oscillatoria* sp. KC45; **Lane 9,10:** *Phormidium* sp. PD40; **Lane 11,12:** *Phormidium* sp. PR40; **Lane 13,14:** *Scytonema* sp. TP40; **Lane 15,16:** *Scytonema* sp. TP40-1; **Lane 17,18:** *Synechococcus* sp. PD55; **Lane 19,20:** *Synechococcus* sp. SK50 และ **Lane 21:** *Synechococcus* sp. SK70

ในส่วนของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เซลล์มีขนาดเล็ก เช่น ในจีโนส *Synechococcus* sp. ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ในบางครั้งจำเป็นต้องใช้ grass bead ร่วมด้วยเพื่อให้เชื้อหุ้มเซลล์แตก ก่อนใช้ extract buffer ที่มีส่วนผสมของ CTAB 4 % และ PVPP 1% ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีคุณสมบัติช่วยในการกำจัดสารในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ออกจากตัวอย่างได้ดี จะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น ดังภาพ 6



ภาพ 6 จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Synechococcus* sp. SK50 โดยใช้ glass bead ร่วมกับ extraction buffer

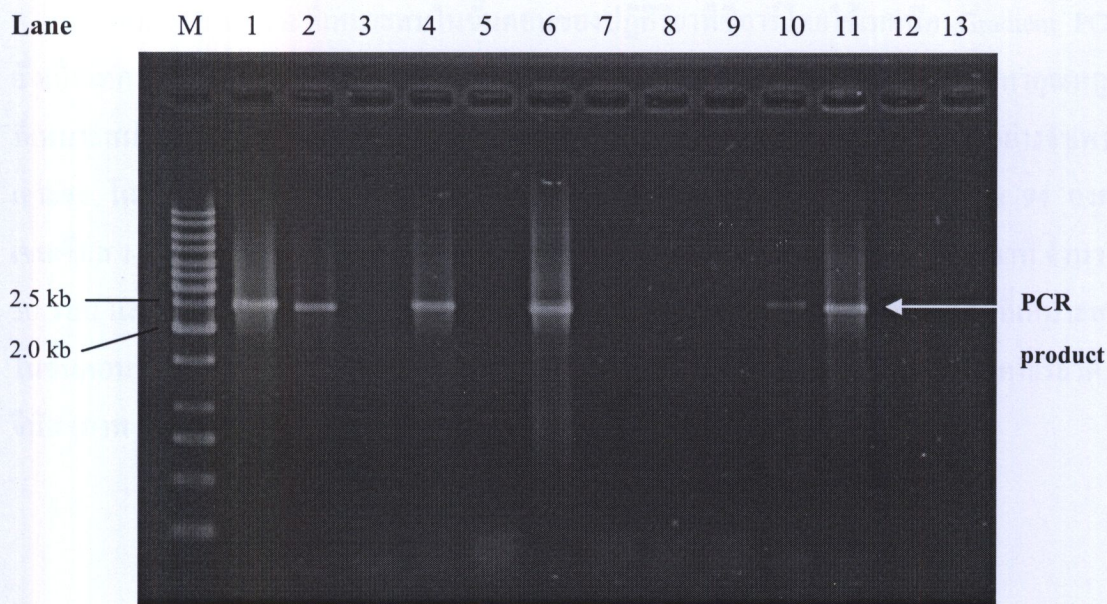
1% agarose gel ใน 1x TAE buffer

M = 1 kb DNA ladder

3. สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S ITS

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ บริเวณ 16S-23S ITS โดยใช้ไพรเมอร์ 16S-1247f และ 23S-1608r ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีจำเพาะต่อไซยาโนแบคทีเรีย (Rocap *et al.*, 2002) โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมีองค์ประกอบคือ PCR buffer (1X), dNTPs (200 μ M), Primer (1 μ M), *Taq* polymerase (1 unit), Template DNA (1-3ng) โดยตัวเลขในวงเล็บที่ใช้จะเป็นความเข้มข้นสุดท้ายของสารในปฏิกิริยา และทำการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น annealing โดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 45-60 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 4 นาที denature 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 50 องศาเซลเซียส 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 องศา

เซลล์เชื้อส 10 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 2500 bp กับไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ (ภาพ 7)



ภาพ 7 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 16S-23S ITS ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 16S-1247f และ 23S-1608r

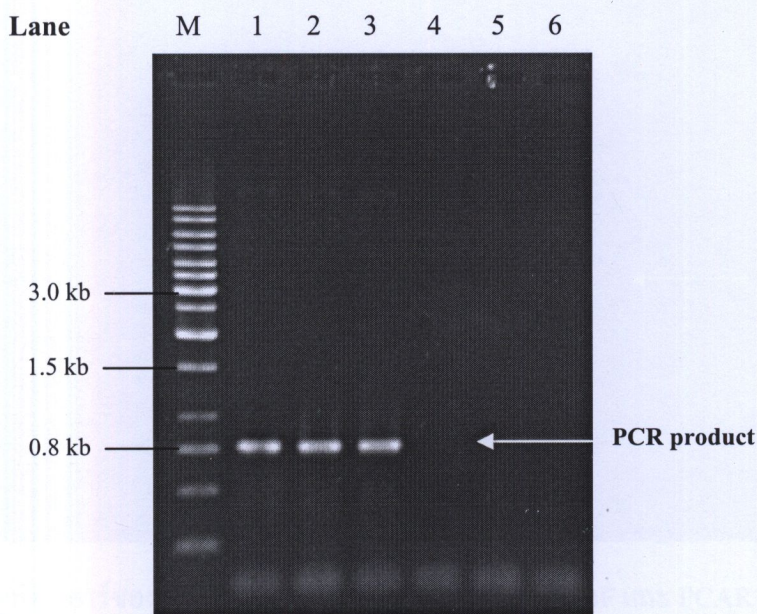
1% agarose gel ใน 1X TAE buffer M = 1 kb DNA Ladder

Lane 1: *Scytonema* sp. TP40; **Lane 2:** *Leptolyngbya* sp. PR40; **Lane 3:** *Chroococcidiopsis* sp. PR45; **Lane 4:** *Scytonema* sp. TP40-1; **Lane 5:** *Oscillatoria* sp. KC45; **Lane 6:** *Phormidium* sp. PR40; **Lane 7:** *Phormidium* sp. PD40; **Lane 8:** *Synechococcus* sp. PD55; **Lane 9:** *Synechococcus* sp. SK50; **Lane 10:** *Synechococcus* sp. SK70; **Lane 11:** *Phormidium* sp. SK45; **Lane 12:** *Escherichia coli*; **Lane 13:** Negative control

เนื่องจากบริเวณ ITS ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอต จะมีความแปรผันสูง จึงมีความจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ที่อยู่ในบริเวณของยีนที่มีการอนุรักษ์ไว้ ถึงแม้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้จะครอบคลุม ITS ตำแหน่งที่อยู่ระหว่างยีน 16S rRNA และ 23S rRNA ซึ่งเป็นช่วงที่กว้างมีความยาวถึง 2500 bp แต่มีบางจีโนมที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาได้ จึงได้ทดลองใช้ไพรเมอร์คู่อื่น ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียจีโนมที่ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยเลือกไพรเมอร์ F1114 (Neilan *et al.*, 1997) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ sequencing ของยีน 16S rRNA

และไพรเมอร์ 23S-xxr (Boyer *et al.*, 2002) เป็นไพรเมอร์ที่อยู่ในตำแหน่งเบสที่ 26-45 ในยีน 23S rRNA ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 800-900 bp จะทำให้สะดวกและง่ายต่อการหาลำดับเบส

ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เทคนิค Gradient PCR ซึ่งเป็นเทคนิคพีซีอาร์โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sambrook and Russel (2001) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยาขั้น annealing ที่จะทำให้ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้สภาวะดังนี้ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 4 นาที denature 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 60-70 องศาเซลเซียส 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing คือ 70 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียได้ 3 จินัส (ภาพ 8)



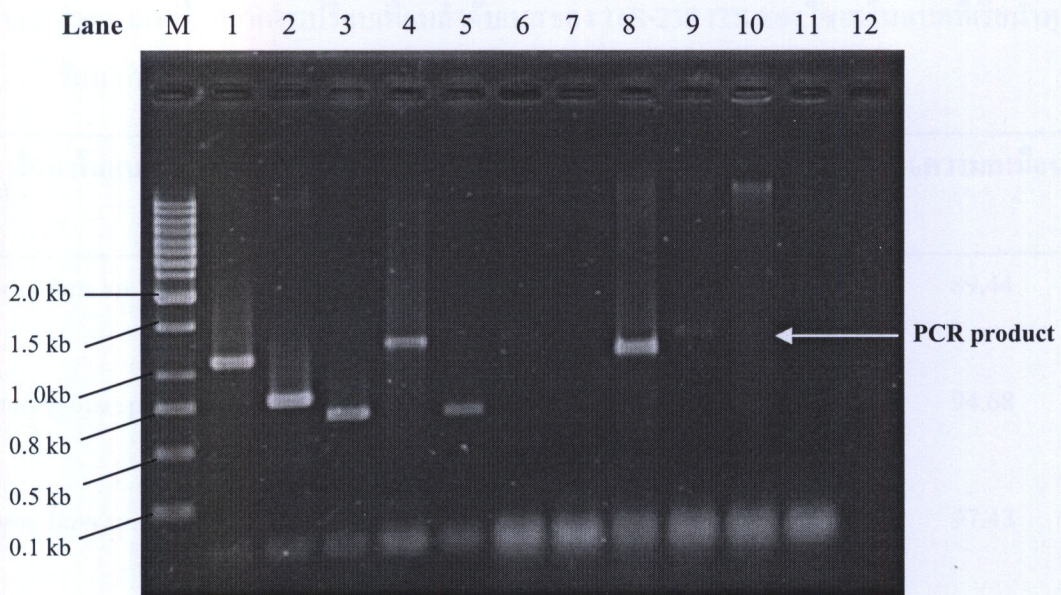
ภาพ 8 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 16S-23S ITS ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 1114F และ 23S-xxr

1% agarose gel ใน 1X TAE buffer M = 1 kb DNA Ladder

Lane 1: *Oscillatoria* sp. KC45; **Lane 2:** *Chroococcidiopsis* sp. PR45; **Lane 3:** *Phormidium* sp. PD40; **Lane 4:** *Synechococcus* sp. SK50; **Lane 5:** *Synechococcus* sp. PD55; **Lane 6:** *Synechococcus* sp. SK70

4. สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของ PC-IGS ในไฟโตไซยานินโอเปอรอน

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ PC-IGS โดยใช้ไพรเมอร์ PCBF และ PCAR ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไซยาโนแบคทีเรีย (Neilan *et al.*, 1995) โดยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมีส่วนประกอบคือ PCR buffer (1X), dNTPs (200 μ M), Primer (1 μ M), *Taq* polymerase (1 unit), Template DNA (1-3 ng) โดยตัวเลขในวงเล็บที่ใช้เป็นความเข้มข้นสุดท้ายของสารในปฏิกิริยาและทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค Gradient PCR คัดแปลงมาจากวิธีการของ Sambrook and Russel (2001) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยาขั้น annealing สภาวะที่ใช้คือ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 4 นาที denature 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 50-60 องศาเซลเซียส 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยาขั้น annealing คือ 50 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 750-1400 bp (ภาพ 9)



ภาพ 9 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ PC-IGS ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ PCBF และ PCAR

1% agarose gel ใน 1X TAE buffer

M = 1 kb DNA Ladder

Lane 1: *Phormidium* sp. PD40 ขนาด 1100 bp; **Lane 2:** *Phormidium* sp. PR40 ขนาด 800 bp; **Lane 3:** *Synechococcus* sp. SK50 ขนาด 750 bp ; **Lane 4:** *Oscillatoria* sp. KC45 ขนาด 1400bp ; **Lane 5:** *Synechococcus* sp. SK70 ขนาด 750bp; **Lane 6:** *Leptolyngbya* sp.PR40;**Lane 7:** *Scytonema* sp. TP40; **Lane 8:** *Chroococcidiopsis* sp. PR45 ขนาด 1400 bp; **Lane 9:** *Scytonema* sp.TP40-1; **Lane 10:** *Synechococcus* sp. PD55; **Lane 11:** *Phormidium* sp. SK45; **Lane 12:** Negative control

5. ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบส

5.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S-23S internal transcribed spacer

ลำดับเบสของ 16S-23S ITS มีขนาดประมาณ 2500 คู่เบส ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบส ที่ได้มาจากการ sequence โดยใช้ไพรเมอร์ 16S-1247f และ 23s-xxr ซึ่งจะได้ลำดับเบสที่สั้นกว่า มีขนาดประมาณ 900 bp จากนั้นนำมาจัดเรียง โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 เมื่อได้เป็นสายดีเอ็นเอที่ต่อเนื่องกันแล้ว (ภาคผนวก ง) นำเอาลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูลไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ที่มีรายงานและถูกเก็บไว้ใน National center for Biotechnology Information (NCBI) (ตาราง 5, ภาคผนวก จ) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาทำ multiple alignment และใช้โปรแกรม MEGA version 4.0 เพื่อสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกในแต่ละกลุ่ม

ตาราง 5 ค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S-23S ITS ของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน กับ ข้อมูลใน NCBI (ข้อมูลเมื่อวันที่ 25 เมษายน 2551)

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความยาว (bp)	ความเหมือนสูงสุด	%ความเหมือน
<i>Phormidium</i> sp. PR40	787	<i>Leptolyngbya</i> sp. LLi18 (DQ786166.1)	89.44
<i>Leptolyngbya</i> sp. PR40	870	<i>Leptolyngbya</i> sp. LLi18 (DQ786166.1)	94.68
<i>Phormidium</i> sp. PD40	794	<i>Leptolyngbya appalachiana</i> (EF429286.1)	97.43
<i>Scytonema</i> sp. TP40	840	<i>Leptolyngbya</i> sp. LLi18 (DQ786166.1)	97.55
<i>Scytonema</i> sp. TP40-1	839	<i>Leptolyngbya appalachiana</i> (EF429286)	97.43
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PR45	1280	Uncultured Antarctic cyanobacterium (EU032390.1)	88.41
<i>Phormidium</i> sp. PD40	1126	<i>Leptolyngbya appalachiana</i> (EF429286.1)	100

ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Oscillatoria* sp. KC45 ซึ่งใช้ไพรเมอร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์และในการหาลำดับเบสคือ 1114F และ 23S-xxr พบว่าลำดับเบสที่ได้มีขนาดสั้นมากเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าลำดับเบสที่ได้มานั้นยังอยู่ในส่วนของยีน 16S rRNA ซึ่งไม่ใช่ลำดับเบสในช่วงของ 16S-23S ITS

ไซยาโนแบคทีเรียในจินัส *Synechococcus* ซึ่งประกอบไปด้วย *Synechococcus* sp. SK50, *Synechococcus* sp. SK70 และ *Synechococcus* sp. PD55 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้โดยการไพรเมอร์ 16S-1247f กับ 23S-1608r และไพรเมอร์ 1114F กับ 23S-xxr เมื่อนำลำดับเบสของไพรเมอร์ที่อยู่ในช่วงของยีน 16S rRNA คือ 16S-1247f กับ 1114F พบว่าไม่มีตำแหน่งที่เป็นคู่สมที่จะทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบในส่วนของยีน 16S rRNA

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S ITS กับฐานข้อมูลใน NCBI (ตาราง 5, ภาคผนวก จ) ลำดับเบสส่วนใหญ่มีความเหมือนกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลก่อนข้างคำคือ 88-94 % (ภาคผนวก จ) และพบว่าลำดับเบสมีความเหมือนกับจินัส *Leptolyngbya* สูงสุดที่ 100%

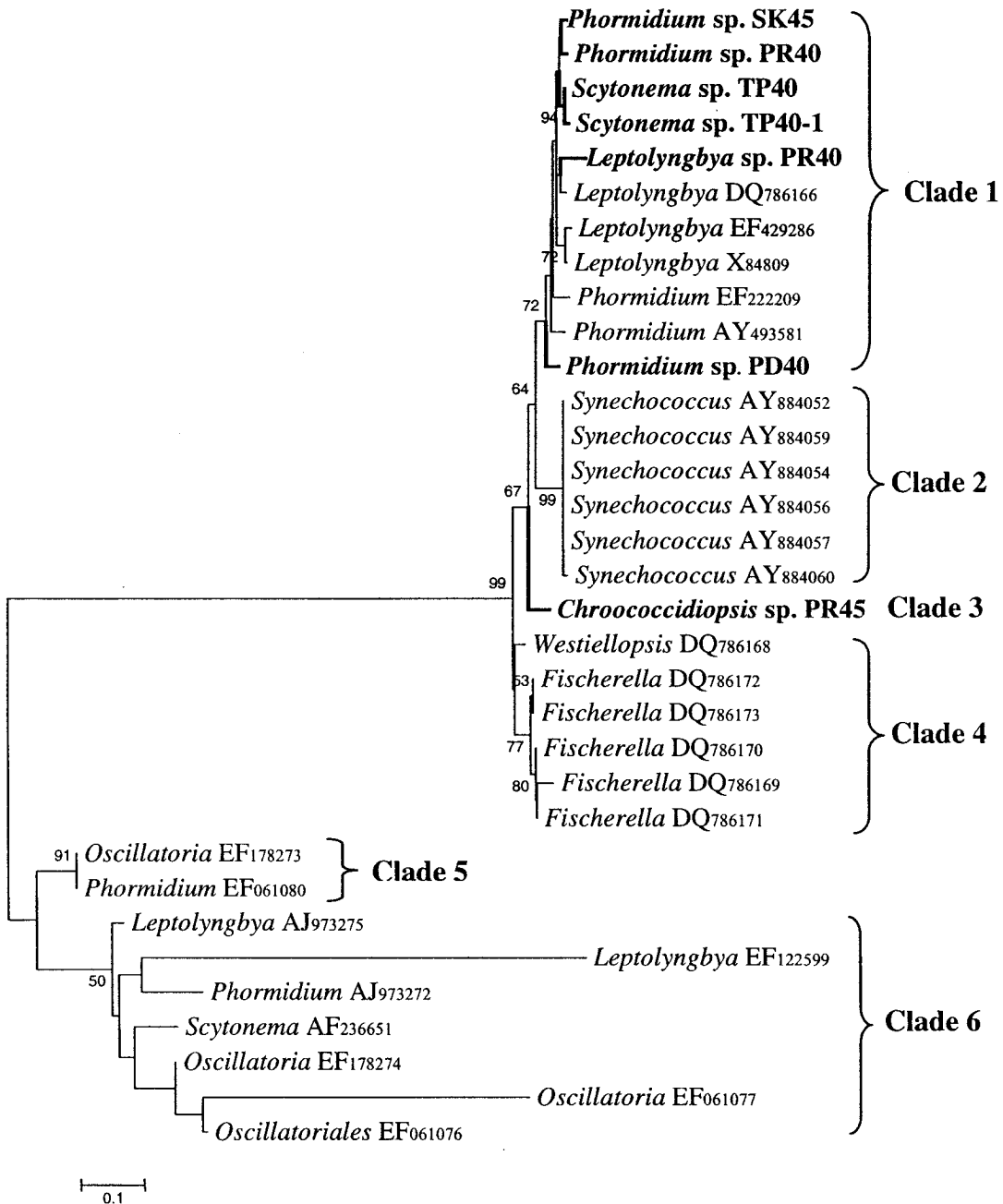
แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกจากลำดับเบสของ 16S-23S ITS ของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนแสดงใน ภาพ 10 โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบส 16S-23S ITS ของไซยาโนแบคทีเรียอื่นจากฐานข้อมูลใน GenBank (ตาราง 6) จากข้อมูลของลำดับเบสในไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสายและอยู่ใน Order Oscillatoriales ได้แก่ *Phormidium* sp. SK45, *Phormidium* sp. PR40, *Phormidium* sp. PD40 และ *Leptolyngbya* sp. PR40 ใน Order Nostocales ซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสายและสร้างเฮทเทอโรซิสต์ ได้แก่ *Scytonema* sp. TP40 และ *Scytonema* sp. TP40-1 จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของลำดับเบสบริเวณ 16S-23S ITS พบว่าแบ่งออกได้เป็น 6 clade ใหญ่ๆ โดยกลุ่มที่เป็นเส้นสาย และกลุ่มที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆแยกออกจากกันใน clade 1 และ clade 2 โดยใน Order Chroococcales คือ *Chroococcidiopsis* sp. PR45 ได้แยกอยู่และมีความใกล้ชิดกันกับกลุ่มที่เป็นเซลล์เดี่ยว แต่ไม่สามารถแยกกลุ่มเส้นสายที่สร้างและไม่สร้างเฮทเทอโรซิสต์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ในแผนภูมิ มีความสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระดับของจินัส ถึงแม้ว่าลำดับเบสในช่วงนี้จะมีความผันแปรสูง แต่ความสัมพันธ์ของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนก็มีความใกล้ชิดกันเองภายในกลุ่มมากกว่าไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งอื่นๆ ที่มีความแตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนสายพันธุ์อื่น และจากการทดลองใช้วิธีการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกด้วยวิธี Neighbor Joining (NJ), Maximum Parsimony และ UPGMA ตำแหน่งของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนในแต่ละแผนภูมิไม่มีความ

แตกต่างกันมากนัก

จึงได้นำเสนอเพียงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกที่ได้จากวิธี

Neighbor-Joining



ภาพ 10 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียจากลำดับเบสของ 16S-23S ITS ที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยวิธี Neighbor-Joining (Bootstrap percentages less than 50% not report)

ตาราง 6 ข้อมูลของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก
ของ 16S-23S ITS จากฐานข้อมูลใน NCBI

Cyanobacteria	Accession number	Reference
<i>Fischerella</i> sp. MV9*	DQ786169	Finsinger <i>et al.</i> (2008)
<i>Fischerella</i> sp. MV11*	DQ786170	Finsinger <i>et al.</i> (2008)
<i>Fischerella</i> sp. MV11*	DQ786171	Finsinger <i>et al.</i> (2008)
<i>Fischerella</i> sp. RV14*	DQ786172	Finsinger <i>et al.</i> (2008)
<i>Fischerella</i> sp. RV14*	DQ786173	Finsinger <i>et al.</i> (2008)
<i>Leptolyngbya appalachiana</i>	EF429286	Unpublished
<i>Leptolyngbya nodulosa</i> UTEX 2910	EF122599	Li and Brand (2007)
<i>Leptolyngbya</i> sp. LLi18*	DQ786166	Unpublished
<i>Leptolyngbya valderiana</i> BDU 140441	AJ973275	Premanandh <i>et al.</i> (2006)
<i>Leptolyngbya</i> sp.	X84809	Nelissen <i>et al.</i> (1996)
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6407	EF178273	Cadel <i>et al.</i> (2007)
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 7112	EF178274	Cadel <i>et al.</i> (2007)
<i>Oscillatoriales cyanobacterium</i>	EF061076	Cadel <i>et al.</i> (2007)
<i>Oscillatoriales cyanobacterium</i>	EF061077	Cadel <i>et al.</i> (2007)
<i>Phormidium favosum</i> PCC 10111	EF061080	Cadel <i>et al.</i> (2007)
<i>Phormidium autumnale</i>	EF222209	Unpublished
<i>Phormidium willei</i> BDU 130511	AJ973272	Premanandh <i>et al.</i> (2006)
<i>Scytonema hyalinum</i>	AF236651	Boyer <i>et al.</i> (2001)
<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab*	AY884052	Allewalt <i>et al.</i> (2006)
<i>Synechococcus</i> sp. TS-15*	AY884054	Allewalt <i>et al.</i> (2006)
<i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a(2-13)	AY884057	Allewalt <i>et al.</i> (2006)
<i>Synechococcus</i> sp. TS-97*	AY884056	Allewalt <i>et al.</i> (2006)
<i>Synechococcus</i> sp. TS-104*	AY884059	Allewalt <i>et al.</i> (2006)
<i>Synechococcus</i> sp. TS-91*	AY884060	Allewalt <i>et al.</i> (2006)
<i>Westiellopsis</i> sp. Ar73*	DQ786168	Finsinger <i>et al.</i> (2008)

* thermotolerant cyanobacteria

5.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของไฟโคไซยานินโอเปอรอน intergenic spacer (PC-IGS)

ลำดับเบสของไฟโคไซยานินโอเปอรอน intergenic spacer (PC-IGS) มีขนาดที่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาจัดเรียง โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 เมื่อได้เป็นสายดีเอ็นเอที่ต่อเนื่องกันแล้ว นำเอาลำดับเบสที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่อยู่ในฐานข้อมูลของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ที่มีรายงานและถูกเก็บไว้ใน National center for Biotechnology Information (NCBI) แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้มาทำ multiple alignment และใช้โปรแกรม MEGA version 4.0 เพื่อสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกในแต่ละกลุ่ม

ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Scytonema* sp. TP40, *Scytonema* sp. TP40-1, *Leptolyngbya* sp. PR40, *Chroococcidiopsis* sp. PR45, *Synechococcus* sp. PD55 และ *Phormidium* sp. SK45 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้จากการใช้ไพรเมอร์ PCBF และ PCAR

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสจากดีเอ็นเอบริเวณ PC-IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอน กับฐานข้อมูลของลำดับเบสใน NCBI (ตาราง 7, ภาคผนวก จ) ลำดับเบสส่วนใหญ่เหมือนกับฐานข้อมูลค่อนข้างต่ำ ในจีโนม *Synechococcus* มีความเหมือนสูงสุดอยู่ระหว่าง 94-95 % (ภาคผนวก จ) ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายใน Order Oscillatoriales ได้แก่ไซยาโนแบคทีเรียในจีโนม *Phormidium* และ *Oscillatoria* พบว่าไม่มีความเหมือนกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI แสดงว่าลำดับเบสบริเวณ PC-IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอน ในไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนของประเทศไทย มีความแตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่พบในฐานข้อมูล

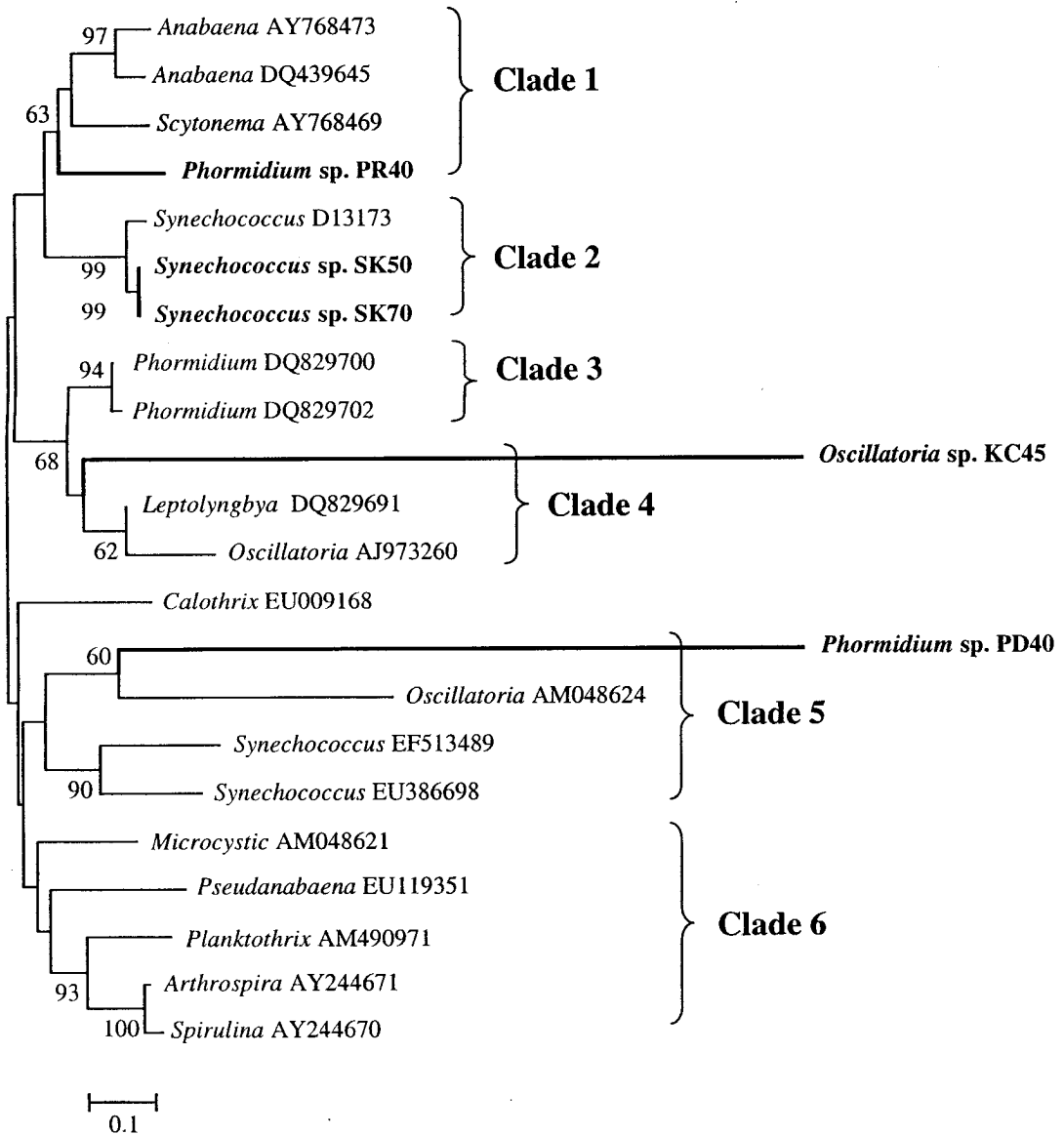
ตาราง 7 ค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของไฟโคไซยานินโอเปอรอน intergenic spacer (PC-IGS) ของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน กับข้อมูลใน NCBI (ข้อมูลเมื่อวันที่ 25 เมษายน 2551)

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความยาว (bp)	ความเหมือนสูงสุด	%ความเหมือน
<i>Synechococcus</i> sp. SK70	669	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> (BA000039.2)	95.05
<i>Synechococcus</i> sp. SK50	665	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> (BA000039.2)	94.43
<i>Phormidium</i> sp. PR40	725	No significant similarity Found	-
<i>Oscillatoria</i> sp. KC45	1086	No significant similarity Found	-
<i>Phormidium</i> sp. PD40	1027	No significant similarity Found	-

จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกจากลำดับเบสของ PC-IGS แสดงในภาพ 11 โดยใช้ข้อมูลลำดับเบส PC-IGS ของไซยาโนแบคทีเรียอื่นจากฐานข้อมูล GenBank (ตาราง 8) เนื่องจากลำดับเบสของ PC-IGS ที่ได้มีความเหมือนเฉพาะในจีนัส *synechococcus* ใน clade 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกที่ได้ จึงมีความสัมพันธ์กับการจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในจีนัส *Synechococcus* ส่วนไซยาโนแบคทีเรียจีนัสอื่นๆ จะอยู่บนกิ่งไม่สอดคล้องการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดย *Phormidium* sp. PR40 ใน Order Oscillatoriales จะอยู่ใน clade 1 โดยอยู่ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียใน Order Nostocales และอยู่ในกิ่งเดียวกับจีนัส *Scytonema* ซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสายที่สร้างเฮทเทอโรซิสต์ และใน clade 1 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์มีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสายและสร้างเฮทเทอโรซิสต์

ความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกใน clade 4 จะเป็นกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายใน Order Oscillatoriales ความสัมพันธ์ในกลุ่มนี้จะมีความสอดคล้องกันกับสัณฐานวิทยา แต่ก็มี ความแตกต่างสูง คือมีค่า bootstrap ค่อนข้างต่ำ ทำให้กิ่งบนแผนภูมิของ *Oscillatoria* sp. KC45 อยู่ห่างจากจีนัสอื่นและใน clade 5 พบว่า *Phormidium* sp. PD40 อยู่ในกิ่งเดียวกับไซยาโนแบคทีเรียในจีนัส *Oscillatoria* ซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสายแต่ก็มีความแตกต่างกันมากเมื่อดูจากความยาวของกิ่งบนแผนภูมิ แต่ความสัมพันธ์ในกลุ่มใหญ่กลับพบว่าอยู่ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียในจีนัส

Synechococcus ซึ่งจัดอยู่ใน Order Chroococcales ความสัมพันธ์ของแผนภูมิที่ได้ภายในกลุ่มใหญ่มีการจัดกลุ่มสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา แต่เมื่อพิจารณาจากกลุ่มย่อยแล้วพบว่าไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไปอยู่ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายแต่ความสัมพันธ์ในกิ่งเดียวกันของแผนภูมิก็น่าจะมีความสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา



ภาพ 11 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียจากลำดับเบสของ PC-IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอนที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี Neighbor-Joining (bootstrap percentages less than 50% not report)

จากการทดลองใช้วิธีการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกด้วยวิธี Maximum likelihood, Maximum Parsimony และ UPGMA โดยใช้ข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI (ตาราง 8) ตำแหน่งของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนในแต่ละแผนภูมิไม่มีความแตกต่างกันมากนัก จึงได้นำเสนอเพียงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกที่ได้จากวิธี Neighbor-Joining

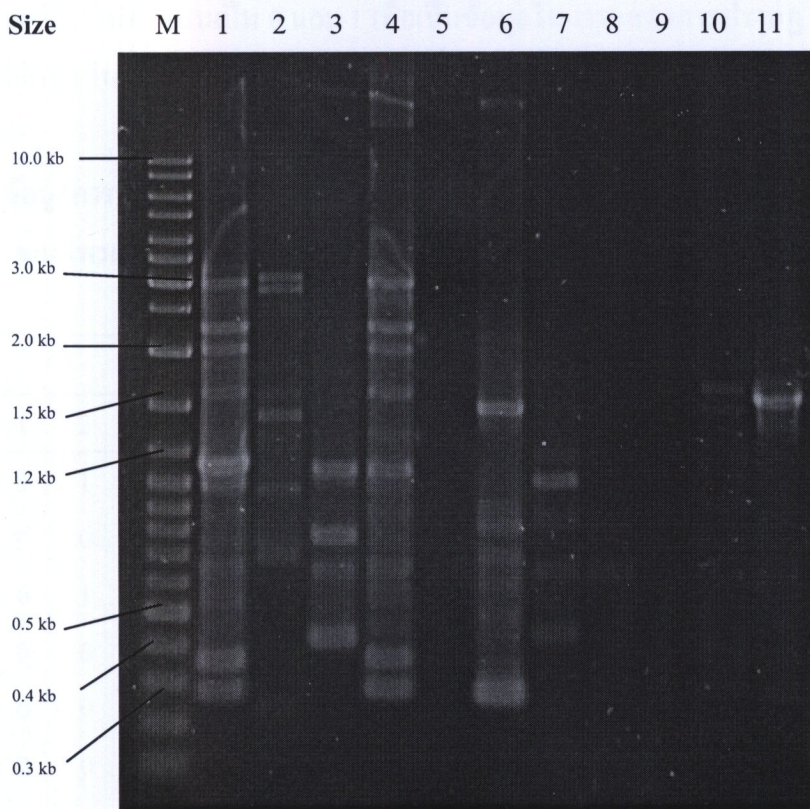
ตาราง 8 ข้อมูลของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของ PC-IGS จากฐานข้อมูลใน NCBI

Cyanobacteria	Accession number	Reference
<i>Anabaena</i> sp. PCC 9109	AY768473	Unpublished
<i>Anabaena sphaerica</i> UTEX 'B 1616'	DQ439645	Unpublished
<i>Arthrospira platensis</i> FACHBOUQDS6	AY244671	Unpublished
<i>Calothrix</i> sp. UAM 370	EU009168	Berrendero <i>et al.</i> (2008)
<i>Leptolyngbya valderiana</i> BDU 140801	DQ829691	Unpublished
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AM048621	Haande <i>et al.</i> (2007)
<i>Oscillatoria salina</i> BDU 30411	AJ973260	Premanandh <i>et al.</i> (2006)
<i>Oscillatoria</i> sp.	AM048624	Unpublished
<i>Phormidium</i> sp. BDU 100962	DQ829700	Unpublished
<i>Phormidium willeyi</i> BDU 141621	DQ829702	Unpublished
<i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 537	AM490971	Unpublished
<i>Pseudanabaena</i> sp. CCY9714	EU119351	Unpublished
<i>Scytonema hofmanni</i> PCC 7110	AY768469	Unpublished
<i>Spirulina</i> sp. FACHB440	AY244670	Unpublished
<i>Synechococcus elongates</i>	D13173	Unpublished
<i>Synechococcus</i> sp. CCY9202	EF513489	Haverkamp <i>et al.</i> (2008)
<i>Synechococcus</i> sp. CCY0491	EU386698	Unpublished

7. ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง

7.1 ลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น (short tandemly repeat repetitive sequence; STRR)

เมื่อทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น กับดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น (STRR 1A และ STRR 1B) คือ Initial denaturation 94°C 4 นาที denature 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นโดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1A ดังแสดงในภาพ 12



ภาพ 12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1A

1% agarose gel ใน 1X TAE buffer

M = GeneRuler DNA Ladder Mix

Lane 1: *Scytonema* sp. TP 40-1; lane 2: *Leptolyngbya* sp. PR 40; lane 3 : *Phormidium* sp. PD 40; lane 4: *Scytonema* sp. TP 40; lane 5: *Chroococcidiopsis* sp. PR 45; lane 6: *Phormidium* sp. PR 40; lane 7: *Synechococcus* sp. PD 55; lane 8: *Synechococcus* sp. SK 50; lane 9: *Synechococcus* sp. SK 70; lane 10: *Oscillatoria* sp. KC 45; lane 11: *Phormidium* sp. SK 45

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1A (ภาพ 12) พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง มีขนาดอยู่ระหว่าง 300-3,000 bp โดยในไซยาโนแบคทีเรียจีส *Scytonema* sp. TP 40-1 และ *Scytonema* sp. TP 40 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายที่สุด ส่วนในจีส *Chroococcidiopsis* sp. PR 45, *Synechococcus* sp. SK 50 และใน *Synechococcus* sp. SK 70 ไม่พบแถบดีเอ็นเอหลังจากผ่านปฏิกิริยาพีซีอาร์ หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากรูปโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Gel analysis software version 3.06 (d) เพื่อหาตำแหน่งที่แน่นอนของแถบดีเอ็นเอ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม cluster analysis โดยใช้เกณฑ์การให้คะแนนเป็น 0 และ 1 เพื่อเป็นข้อมูลในการแสดงการปรากฏ (1) หรือไม่ปรากฏ (0) แถบดีเอ็นเอ ในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ ดังแสดงในตาราง 9

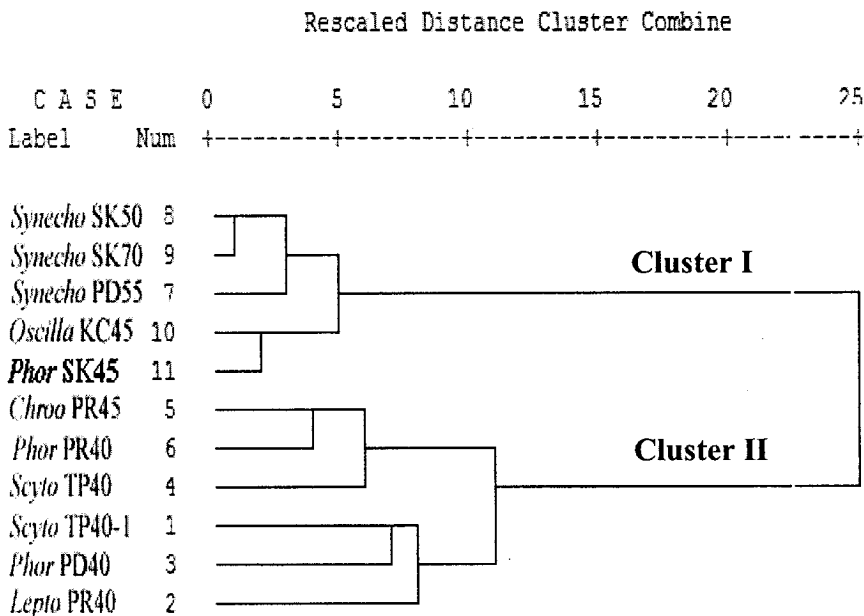
ตาราง 9 ข้อมูลการปรากฏ (1) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (0) ในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ STRR 1A

Lane	Band (primer STRR 1A)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Scy TP40-1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
Lep PR40	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
Phor PD40	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Scy TP40	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Chro PR45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phor PR40	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
Syne PD55	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Syne SK50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Syne SK70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Osci KC45	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phor SK45	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

จากตาราง 9 Lane หมายถึงตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาซึ่งมีด้วยกันทั้งหมด 11 ตัวอย่าง (ดูภาพ 17 ประกอบ) ส่วน Band คือ ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่พบทั้งหมด

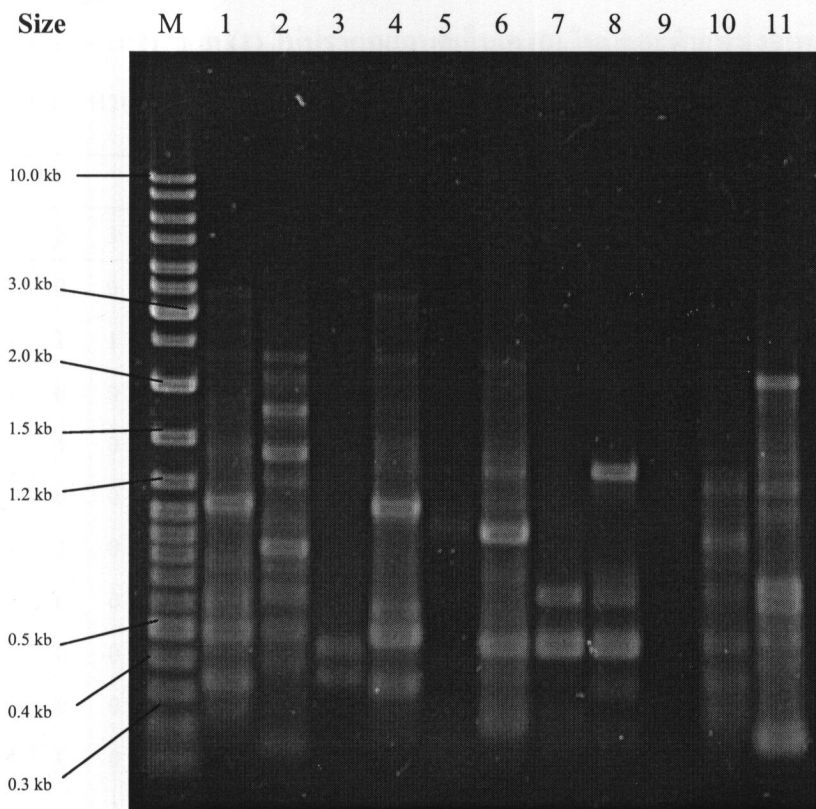
ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม cluster analysis ดังแสดงในภาพ 13 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยไซยาโนแบคทีเรียในจีส *Synechococcus* sp. PD 55, *Synechococcus* sp. SK 50, *Synechococcus* sp. SK 70, *Oscillatoria* sp. KC 45 และ *Phormidium* sp. SK 45 และ โดย *Synechococcus* ทั้งสามตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ใกล้ชิดกัน และสอดคล้องกับการจัดจำแนกตามลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา ในกลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยไซยาโนแบคทีเรียในจีส *Chroococcidiopsis* sp. PR 45, *Phormidium* sp. PR40, *Scytonema* sp. TP 40, *Scytonema* sp. TP 40-1, *Phormidium* sp. PD 40 และ *Leptolyngbya* sp. PR 40 มีความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ไม่ชัดเจนมากนัก และในจีสเดียวกันคือ *Phormidium* sp. PR40 กับ PD40 และ *Scytonema* sp. TP40 กับ TP40-1 กลับพบว่ามี ความสัมพันธ์อยู่คนละกลุ่มย่อย แต่อย่างไรก็ตามผลการจัดกลุ่มที่ได้พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นของไพรเมอร์ STRR 1A สามารถใช้บ่งชี้ความแตกต่างของไซยาโนแบคทีเรียในระดับของจีสได้

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



ภาพ 13 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย ที่ได้จากลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1A

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นของไพรเมอร์ STRR 1B (ภาพ 14) ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอกับไซยาโนแบคทีเรีย 9 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง และมีความหลากหลายมากกว่าลายพิมพ์ของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1A มีขนาดอยู่ระหว่าง 200 – 3,500 bp โดยแถบดีเอ็นเอมีความหลากหลายมากที่สุดพบอยู่ในจีโนม *Leptolyngbya* sp. PR 40 ส่วนในจีโนม *Chroococcidiopsis* sp. PR 45 และ *Synechococcus* sp. SK 70 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์



ภาพ 14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1B

1% agarose gel ใน 1X TAE buffer M = GeneRuler DNA Ladder Mix

Lane 1: *Scytonema* sp. TP 40-1; **lane 2:** *Leptolyngbya* sp. PR 40; **lane 3 :** *Phormidium* sp. PD 40; **lane 4:** *Scytonema* sp. TP 40; **lane 5:** *Chroococcidiopsis* sp. PR 45 ; **lane 6 :** *Phormidium* sp. PR 40; **lane 7:** *Synechococcus* sp. PD 55; **lane 8:** *Synechococcus* sp. SK 50; **lane 9:** *Synechococcus* sp. SK 70; **lane 10:** *Oscillatoria* sp. KC 45; **lane 11:** *Phormidium* sp. SK 45

จากการวิเคราะห์หาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอบนเจลในภาพ 14 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Gel analysis software version 3.06 (d) เพื่อหาตำแหน่งที่แน่นอนของการปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม cluster analysis โดยใช้เกณฑ์การให้คะแนนเป็น 0 และ 1 เพื่อเป็นข้อมูลในการแสดงการปรากฏ (1) หรือไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอ ในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ STRR 1B ดังตาราง 10 ซึ่งพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอถึง 20 แถบที่มีความแตกต่างกัน จากตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย 11 ตัวอย่าง

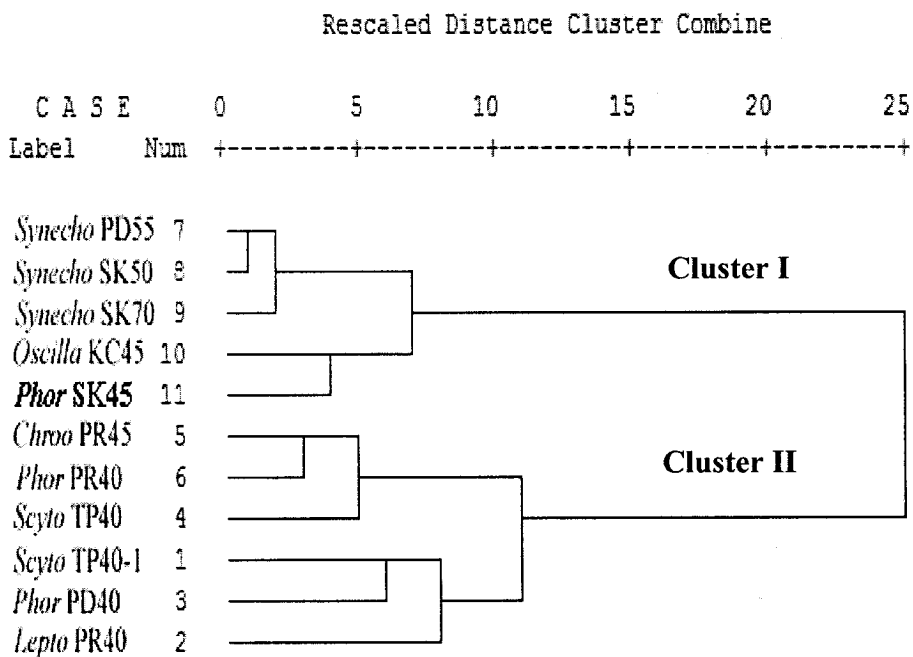
ตาราง 10 ข้อมูลการปรากฏ (1) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (0) ในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ STRR 1B

Lane	Band (primer STRR 1B)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
4	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
11	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1

จากตาราง 10 Lane หมายถึงตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาซึ่งมีด้วยกันทั้งหมด 11 ตัวอย่าง (ดูภาพ 20 ประกอบ) ประกอบไปด้วย lane 1: *Scytonema* sp. TP 40-1; lane 2: *Leptolyngbya* sp. PR 40; lane 3 : *Phormidium* sp. PD 40; lane 4: *Scytonema* sp. TP 40; lane 5: *Chroococcidiopsis* sp. PR 45; lane 6 : *Phormidium* sp. PR 40; lane 7: *Synechococcus* sp. PD 55; lane 8: *Synechococcus* sp. SK 50; lane 9: *Synechococcus* sp. SK 70; lane 10: *Oscillatoria* sp. KC 45; lane 11: *Phormidium* sp. SK 45 ส่วน Band คือ ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่พบทั้งหมด

ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม cluster analysis ดังแสดงในภาพ 15 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คล้ายกับแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1A (ภาพ 13) ถึงแม้ไพรเมอร์ STRR 1B จะเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายมากกว่าก็ตาม โดยตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาจะอยู่ตำแหน่งเดียวกันบนแผนภูมิกลุ่มความสัมพันธ์ของ cluster analysis ของไพรเมอร์ทั้งสองชนิด ยกเว้นในกลุ่มความสัมพันธ์ของจีโนส *Synechococcus* ซึ่งมีความสัมพันธ์ภายในกลุ่มย่อยแตกต่างจากแผนภูมิที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1A โดยพบว่า *Synechococcus* sp. PD55 กับ SK50 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า *Synechococcus* sp. SK70 อย่างไรก็ตามจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสองชนิด สามารถใช้บ่งชี้ความแตกต่างของแต่ละจีโนสได้

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



ภาพ 15 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย ที่ได้จากรายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1B

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกจากลำดับเบสของยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S internal transcribed spacer (16S-23S ITS) และ intergenic spacer (PC-IGS) ของไฟโคไซยานินโอเปอรอนจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนจำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Synechococcus* sp. SK70, *Synechococcus* sp. SK50, *Synechococcus* sp. PD55, *Phormidium* sp. SK45, *Phormidium* sp. PD40, *Phormidium* sp. PR40, *Scytonema* sp. TP40, *Scytonema* sp. TP40-1, *Leptolyngbya* sp. PR40, *Chroococcidiopsis* sp. PR45 และ *Oscillatoria* sp. KC45 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียที่พบจากแหล่งอื่นๆ โดยเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอ ของ 16S-23S ITS จำนวน 5 สายพันธุ์ มีความเหมือนกันกับ *Leptolyngbya* อยู่ระหว่าง 88-100% ส่วนลำดับเบสของ PC-IGS มีความเหมือนกันอยู่ระหว่าง 94-95% และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Phormidium* sp. PR40, *Phormidium* sp. PD40 และ *Oscillatoria* sp. KC45 ไม่มีความเหมือนกับดีเอ็นเอในฐานข้อมูลของ NCBI

ในส่วนของการศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก จากลำดับเบสของดีเอ็นเอพบว่า แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก (Phylogenetic tree) โดยใช้วิธี Neighbor Joining, Maximum Parsimony และ UPGMA ตำแหน่งของไซยาโนแบคทีเรียบนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกไม่มีความแตกต่างกันมากนักในแต่ละวิธี โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของ PC-IGS ของไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแต่ละ Order และสามารถแสดงความหลากหลายในกลุ่มที่แยกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ยาก ส่วนแผนภูมิที่ได้จากลำดับเบสของ 16S-23S ITS แสดงความสัมพันธ์ของกลุ่มยังไม่ชัดเจนเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความผันแปรสูง และมีแนวโน้มที่จะมีความเหมาะสมกับกลุ่มที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสซ้ำที่พบในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรีย STRR 1A และ STRR 1B ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในสภาวะดังนี้ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 4 นาที denature 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที แลบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1A จำนวน 15 แล็บ และ STRR 1B จำนวน 20 แล็บ มี

ขนาดอยู่ระหว่าง 300 - 3,000 bp และ 200 - 3,500 bp ตามลำดับ จากผลวิเคราะห์การจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม cluster analysis พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ STRR 1A และ STRR 1B สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ แต่ความสัมพันธ์ภายในกลุ่มเดียวกันยังไม่ชัดเจนระหว่างกลุ่มที่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นเส้นสาย และกลุ่มที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ แต่สามารถใช้บ่งชี้ความแตกต่างได้ในระดับของจีโนส ในส่วนของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาวที่ใช้ไพรเมอร์ LTRR1 และ LTRR2 ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ อาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอของตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาไม่มีลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาว ที่จะมีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ทำการทดลองในครั้งนี้

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน โดยในระยะแรกใช้เอนไซม์ proteinase K และ lysozyme แต่เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีเยื่อหุ้มเซลล์คงตัว เมื่อโดนความร้อนสูงจะมีลึปิดที่ละลายในกรดไขมันจำนวนมาก การที่ลึปิดละลายในกรดไขมันทำให้เยื่อหุ้มเซลล์คงตัว อีกทั้งมีโพลีแซคคาไรด์ เป็นชั้นหุ้มหนา การสกัดด้วยวิธีการใช้เอนไซม์จึงไม่เหมาะสม และทำการเปลี่ยนมาใช้ extraction buffer ที่มีส่วนผสมของ CTAB และ PVPP ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) สารในกลุ่มนี้จะช่วยในการกำจัดโพลีแซคคาไรด์ออกจากตัวอย่างได้ดี ซึ่งเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อพืช หลังจากสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้แล้ว จะช่วยให้ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ และมีปริมาณสูงอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Phillips *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากสาหร่ายสีน้ำตาลที่มีปริมาณโพลีแซคคาไรด์สูง โดยพบว่าการเติม PVPP ร่วมกับการใช้ CTAB จะช่วยให้ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ขึ้น สำหรับตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่เจริญอยู่เป็น mat การสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างทำได้ยากกว่าปกติ การใช้ extraction buffer ที่มีส่วนผสมของ CTAB และ PVPP นี้จะต้องบ่มที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมินี้จะทำให้โพลีแซคคาไรด์ออกมาจากตัวอย่างมากกว่าปกติ และได้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย สามารถหลีกเลี่ยงโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่ง Wattier *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาสกัดดีเอ็นเอจากสาหร่ายทะเลสีแดงด้วยการบ่มที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจาก CTAB และ PVPP ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง การบ่มที่อุณหภูมิเพียง 37 องศาเซลเซียส จึงต้องมีการเติมกรดลงไปเพื่อให้ extraction buffer สามารถทำงานที่อุณหภูมิต่ำได้ แต่วิธีนี้จะมีข้อจำกัดที่ต้องหาชนิดและความเข้มข้นของกรดที่เติมลงไปให้เหมาะสม

การหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S-23S ITS และ PC-IGS เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มากพอที่จะใช้วิเคราะห์ลำดับเบส เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอต จึงได้ใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่อาจจะปนเปื้อนจากตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการศึกษา โดยการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้น annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ระหว่าง 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งคำนวณจากลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้เทคนิค Gradient PCR ซึ่งสามารถใช้ศึกษาปฏิกิริยาของพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิในขั้น annealing ได้หลายอุณหภูมิภายในปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียวพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 55-56 องศาเซลเซียส และได้ทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยาขั้นนี้ การใช้เวลาเพียง 1 นาที ก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด ซึ่งการมีตำแหน่งของดีเอ็นเอต้นแบบให้ไพรเมอร์เกาะอย่างพอเพียง และการมีตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะได้อย่างสมบูรณ์ จะสมดุลที่อุณหภูมิหนึ่งซึ่งจะสูงกว่าค่า T_m ของไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิสูงกว่าค่า T_m ไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบได้น้อย อุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่า T_m ของไพรเมอร์ลงไปประมาณ 5 องศาเซลเซียส จะเกาะได้อย่างสมบูรณ์ในตำแหน่งที่ถูกต้อง (สุรินทร์, 2545) อย่างไรก็ตาม การมี %GC สูงๆ ของไพรเมอร์หรือในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียจะมีผลต่ออุณหภูมิในขั้น annealing ด้วยเช่นกัน จึงต้องทำการศึกษาอุณหภูมิในช่วงกว้าง นอกจากนี้การใช้เทคนิค Hot start PCR เพื่อลดโอกาสการจับกันอย่างไม่จำเพาะของปฏิกิริยาในระหว่างขั้นตอน denaturation ของปฏิกิริยา ซึ่งระหว่างที่มีการเพิ่มอุณหภูมิ หรือลดอุณหภูมิเพื่อเข้าสู่ขั้นตอนต่อไปของปฏิกิริยานั้น มักจะผ่านอุณหภูมิที่สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้ และการจับกันอย่างผิดพลาดในปฏิกิริยารอบแรกๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกนำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยารอบต่อไป

ในบริเวณ 16S-23S ITS ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เพียง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Scytonema* sp. TP40, *Scytonema* sp. TP40-1, *Leptolyngbya* sp. PR40, *Phormidium* sp. PD40 และ *Phormidium* sp. PR40 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคือ 16S-247f และ 23S-1608r ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะอยู่ลึกเข้าไปในส่วนของ 16S และ 23S ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 2500 bp ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์ตำแหน่งดังกล่าวควรจะมี ความจำเพาะต่อดีเอ็นเอไซยาโนแบคทีเรีย (Rocap et al., 2002) ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Oscillatoria* sp. KC45, *Chroococcidiopsis* sp. PR45 และ *Phormidium* sp. PD40 ซึ่งใช้ไพรเมอร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์และในการหาลำดับเบสคือ 1114F และ 23S-xxr พบว่าลำดับเบสที่ได้มีขนาดสั้นมากเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน

16S rRNA พบว่าลำดับเบสที่ได้มานั้นยังอยู่ในส่วนของยีน 16S rRNA ซึ่งไม่ใช่ลำดับเบสในช่วงของ 16S-23S ITS

ไซยาโนแบคทีเรียในจีนัส *Synechococcus* ซึ่งประกอบไปด้วย *Synechococcus* sp. SK50, *Synechococcus* sp. SK70 และ *Synechococcus* sp. PD55 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้โดยการไพรเมอร์ 16S-1247f กับ 23S-1608r และไพรเมอร์ 1114F กับ 23S-xxr เมื่อพิจารณาลำดับเบสของยีน 16S rRNA (ประพันธ์, 2551) พบว่าไม่มีตำแหน่งที่เป็นคู่สมที่จะทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ได้

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณ IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอน ไม่สามารถเพิ่มจำนวนกับดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Leptolyngbya* sp. PR40, *Scytonema* sp. TP40, *Chroococcidiopsis* sp. PR45, *Phormidium* sp. SK45, *Synechococcus* sp. PD55 และ *Scytonema* sp. TP40-1 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้มีมากเกินไป อีกทั้งวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีโพลีแซคคาไรด์อยู่สูงอาจจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาวนั้น พบว่า ในส่วนของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ STRR 1A และ STRR 1B ซึ่งเป็นลำดับเบสซ้ำที่มีความจำเพาะกับกลุ่มที่เป็นเส้นสาย และกลุ่มที่สร้างเฮเทอโรซิส ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ถึงแม้ว่าลำดับเบสซ้ำที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้จะมีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อทดสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่เจริญร่วมกับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จึงได้ใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ แบคทีเรียปนเปื้อนที่คัดแยกได้จากตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการศึกษา จำนวน 2 ไอโซเลต พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ เนื่องจากลำดับเบสซ้ำที่ใช้ในการศึกษานี้พบว่ายู่ในบริเวณที่ใกล้เคียงกับ *cpe* operon และ *apc* operon ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุกลุ่ม phycobilin (Mazel et al., 1990)

จากนั้นจึงทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อจะได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความคมชัด โดยการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้น annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ระหว่าง 50-60 °C ซึ่งคำนวณจากลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้เทคนิค Gradient PCR ซึ่งสามารถใช้ศึกษาปฏิกิริยาของพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิในขั้น annealing ได้หลายอุณหภูมิภายในปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 55-56 องศาเซลเซียส และได้ทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในปฏิกิริยาขั้นนี้ การใช้เวลาเพียง 1 นาที ก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด

ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนในประเทศไทย

ตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์ จัดอยู่ใน Order Oscillatoria เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Phormidium* sp. SK45, *Phormidium* sp. PD40, *Phormidium* sp. PR40, *Scytonema* sp. TP40, *Scytonema* sp. TP40-1, *Leptolyngbya* sp. PR40 และ *Oscillatoria* sp. KC45 และใน Order Chroococcales ได้แก่ *Synechococcus* sp. SK70, *Synechococcus* sp. SK50, *Synechococcus* sp. PD55 และ *Chroococcidiopsis* sp. PR45 ที่เก็บไว้ใน culture collection ของห้องวิจัยสาหร่าย ประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งน้ำพุร้อนทั่วประเทศ ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมเนื่องจากเป็นกลุ่มที่เป็นชนิดเด่น พบได้ตามน้ำพุร้อนในประเทศไทย (Sompong, 2006)

ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนในประเทศไทย เมื่อพิจารณาจากความแตกต่างของลำดับเบสที่ได้จากการศึกษา กับลำดับเบสของไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI (ภาคผนวก จ) พบว่าส่วนใหญ่มีความเหมือนกับลำดับเบสของไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลค่อนข้างต่ำ ซึ่งแสดงว่าไซยาโนแบคทีเรียที่พบในประเทศไทยมีความแตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียที่พบในแหล่งอื่นๆ

ความพยายามในการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA จากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนไม่ค่อยประสบความสำเร็จมากนัก ปานมุกและคณะ (2550) สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rRNA ได้เพียง 5 สายพันธุ์ ต่อมาประพันธ์ (2551) สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 16S rRNA ได้อีก 5 สายพันธุ์ ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยเหล่านี้เป็นไพรเมอร์ที่เคยมีการใช้งานกับไซยาโนแบคทีเรียมาแล้ว (Wilmottet et al., 1993; Neiland et al., 1997; Rocap et al., 2002) แต่กลับไม่ค่อยมีความเหมาะสมกับไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนจากประเทศไทย ลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ได้ประกอบกับข้อมูลเกี่ยวกับ 16S-23S ITS ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมีความผันแปรค่อนข้างสูง และไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนจากประเทศไทยมีความแตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียที่มีการศึกษาในต่างประเทศ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความหลากหลายในระดับอนุชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ต่อไป

ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Oscillatoria* sp. KC45 ที่เก็บตัวอย่างมาจาก บ่อน้ำพุร้อนในจังหวัดพัทลุง จากผลของการวิเคราะห์หาลำดับบริเวณ IGS ของไฟโคไซยานิน ไม่พบว่ามีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตใดเลย ซึ่งไฟโคไซยานินโอเปอรอนนี้จะพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียเพราะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง จึงมั่นใจได้ว่าลำดับเบสของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่ได้มาจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนระหว่างการเพาะเลี้ยง ซึ่งควรทำการศึกษาต่อถึงลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยา ประกอบกับลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจจะเป็น *Oscillatoria* sp. ที่มีความแตกต่างจากชนิดอื่นหรืออาจจะเป็นชนิดใหม่ที่พบเฉพาะในประเทศไทย

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S-23S ITS พบว่าไชยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Phormidium* sp. PR40, *Leptolynebya* sp. PR40, *Phormidium* sp. PD40, *Scytonema* sp. TP40 และ *Scytonema* sp. TP40-1 มีความเหมือนกับลำดับเบสของไชยาโนแบคทีเรียในฐานข้อมูลในจีโนม *Leptolynebya* อยู่ระหว่าง 89-97%

ความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไชยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนในประเทศไทย

จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกที่ได้ จะมองดูเหมือนเป็นแผนภูมิของยีนมากกว่าจะเป็นแผนภูมิของสปีชีส์ เนื่องจากการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไม่สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม โดยความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไชยาโนแบคทีเรียนี้จะอยู่บนพื้นฐานของความคล้ายคลึงกันแบบจำเพาะเช่นในยีน 16S rRNA ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไม่เพียงแต่อาศัยความคล้ายคลึงโดยรวมของลักษณะที่พบเห็นทางฟีโนไทป์ การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียวอาจจะบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ไม่ชัดเจน ไชยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์อาจจะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสารอาหารที่ใช้ในการดำรงชีวิต ลักษณะภูมิประเทศหรือสภาพอากาศ รวมทั้งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ เช่น ปัจจัยทางกายภาพ (Ward *et al.*, 1998) หรือการเกิดวิวัฒนาการแบบเข้าหากัน กล่าวคือ ไชยาโนแบคทีเรียบางชนิดอาจจะไม่ได้มีบรรพบุรุษร่วมเดียวกัน (common ancestor) แต่มีรูปร่างคล้ายคลึงกันเพราะอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันหรือสภาพภูมิประเทศแบบเดียวกัน ลักษณะแบบนี้จะพบเห็นได้ชัดเจนในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต จนบางครั้งรูปร่างอาจจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ส่วนในไชยาโนแบคทีเรียที่เก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบางสายพันธุ์รูปร่างจะเปลี่ยนแปลงไปด้วย

ในปัจจุบันนี้การศึกษานุกรมวิธานแบบ polyphasic ในไชยาโนแบคทีเรียมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องมาจากการมีข้อมูลทางพันธุกรรมหรือลำดับเบสของจีโนมจากยีนต่างๆ เพิ่มมากขึ้น การเข้าถึงข้อมูลเหล่านี้จึงนำไปสู่การพัฒนาการจัดจำแนกไชยาโนแบคทีเรีย โดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับลักษณะทางพันธุกรรม การจัดจำแนกไชยาโนแบคทีเรียโดยใช้นุกรมวิธานแบบ polyphasic จึงมีความสำคัญมากขึ้นในปัจจุบันและเป็นที่น่าเชื่อถือมากกว่าการจัดจำแนกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว

สำหรับลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของจีโนมไซยาโนแบคทีเรีย โดยการศึกษาครั้งนี้ ใช้ไพรเมอร์จากการศึกษาของ Rasmussen and Svenning (1998) คือ STRR 1A, STRR 1B, LTRR 1 และ LTRR 2 ลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาวเริ่มศึกษาโดย Mazel *et al.* (1990) และ Masepohl *et al.* (1996) ตามลำดับ ซึ่งลำดับเบสของ STRR ไพรเมอร์นั้น Rasmussen and Svenning ได้ออกแบบมาจากลำดับเบสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียจากการศึกษาของ Mazel และคณะ ซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนที่เป็น STRR 1A ซึ่งมีความจำเพาะกับลำดับเบสของตำแหน่ง STRR1 และไพรเมอร์ STRR 1B ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ STRR 1A ซึ่งลำดับเบสกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะกับไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย และกลุ่มที่สร้างเฮเทอโรซิส

จากการทดลองพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1A จะสามารถเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดระหว่าง 300 - 3,000 bp กับไซยาโนแบคทีเรีย *Scytonema* sp. TP 40-1, *Leptolyngbya* sp. PR 40, *Phormidium* sp. PD 40, *Scytonema* sp. TP 40, *Phormidium* sp. PR 40, *Synechococcus* sp. PD 55 และ *Phormidium* sp. SK 45 ในส่วนของการใช้ไพรเมอร์ STRR 1B ผลลัพธ์ที่ได้มีขนาดระหว่าง 200 - 3,500 bp จากไซยาโนแบคทีเรียชนิดเดียวกับที่ได้จากไพรเมอร์ STRR 1A และจาก *Synechococcus* sp. SK50 ซึ่งไม่ให้แถบดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ STRR 1A

ไซยาโนแบคทีเรียที่ได้แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ใน Order Oscillatoriales และ Nostocales ซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสายและสร้างเฮเทอโรซิส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ STRR ทั้งสองชนิดทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอกับ *Phormidium* sp. SK 45, *Synechococcus* sp. PD 55 ซึ่งอยู่ใน Order Chroococcales ซึ่งมีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แม้ว่าจะไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Rasmussen and Svenning (1998) ที่กล่าวว่า ลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นนี้จะมีความจำเพาะกับกลุ่มที่เป็นเส้นสายและสร้างเฮเทอโรซิส แต่ในจีโนมนั้นมี %GC สูงๆ ก็จะมีโอกาสที่จะเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นได้ หลังจากผ่านปฏิกิริยาพีซีอาร์เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้นั้นมีส่วนของเบส GC อยู่ค่อนข้างสูง (Mazel *et al.*, 1990) โดยในจีโนมของ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง พบว่ามี %GC อยู่ประมาณ 54% (Nakamura *et al.*, 2002)

การใช้ไพรเมอร์ STRR 1B พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากหลายมากกว่าในการใช้ไพรเมอร์ STRR 1A คือได้จำนวนดีเอ็นเอทั้งหมด 20 แถบ เมื่อเทียบกับไพรเมอร์ STRR 1A ที่ได้จำนวนดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ จากการที่ไพรเมอร์ STRR 1A และ STRR 1B มีลำดับเบสคู่สมกันนั้นคือไพรเมอร์ทั้งสองชนิด จะจับบนดีเอ็นเอต้นแบบที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่จะทำให้เกิด amplification

ไปในทิศทางตรงกันข้าม แสดงว่าทิศทางและการกระจายตัวของ STRR1 บนจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน เอื้อต่อการเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ STRR 1B มากกว่า STRR 1A

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้ cluster analysis

แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ STRR 1A และ STRR 1B ถึงแม้จะมีความหลากหลายแตกต่างกัน แต่เมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์แล้วพบว่า ตำแหน่งของแต่ละจีโนสในแผนภูมิความสัมพันธ์ทั้งสองแบบไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในกลุ่มของ *Synechococcus* มีตำแหน่งแตกต่างกัน อาจเป็นไปได้ว่าเทคนิคการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นนี้ มีความละเอียดในการบ่งชี้ความแตกต่างสูงเหมาะที่จะใช้ศึกษาในระดับของกลุ่มที่อยู่ในจีโนสเดียวกัน แต่มีความแตกต่างของสปีชีส์ เมื่อนำมาใช้ศึกษาความแตกต่างของไซยาโนแบคทีเรียหลายกลุ่มจึงทำให้ความเหมาะสมในการจัดจำแนก มีผลกับเฉพาะจีโนส *Synechococcus* เท่านั้น

จากการศึกษาของ Chonudomkul *et al.* (2004) ได้ออกแบบไพรเมอร์เพิ่มเติมจากการศึกษาของ Mazel *et al.* (1990) จากลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น STRR1 โดยใช้ไพรเมอร์สองชนิดร่วมกันที่เป็นทั้ง forward และ reward ไพรเมอร์ที่ไม่ใช่ลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเองในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในครั้งเดียวเพื่อให้มีโอกาสเกิดแถบดีเอ็นเอได้มากขึ้น จากนั้นทำการวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์จากแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ neighbor joining method พบว่าในบางกลุ่มความสัมพันธ์ภายในกลุ่มเดียวกันไม่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการทดลองครั้งนี้ทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดบนเจลโดยใช้โปรแกรม Gel Analysis Software บริษัท SYNGENE เป็นโปรแกรมวิเคราะห์ซึ่งมีความแม่นยำในการอ่านค่าและประมวลผลแถบที่เกิดขึ้นจริง Guevara *et al.* (2002) ได้ใช้ลำดับเบสซ้ำ STRR นี้ในการศึกษาความหลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นเอใน *Nostoc* ซึ่งเจริญอยู่ร่วมกับ *Gunnera tinctoria* จากตัวอย่างที่เก็บจากพืชอาศัยที่มาจากสถานที่แตกต่างกัน โดยพบว่าการศึกษา cluster analysis โดยใช้ UPGMA ถึงแม้จะเป็นจีโนสเดียวกันแต่ความสัมพันธ์ระหว่าง *Nostoc* ที่มาจากพืชอาศัยหรือสถานที่เก็บตัวอย่างไม่มีความสัมพันธ์กัน

ลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาวของไพรเมอร์ LTRR 1 และ LTRR 2 ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งมาจากการศึกษาของ Masepohl *et al.* (1996) โดย Rasmussen and Svenning ได้แบ่งออกเป็นสองส่วนคือ LTRR 1 เป็นลำดับเบสที่เป็น forward primer ไปทาง 5' และ LTRR 2 ซึ่งเป็นลำดับเบสที่เป็น reward primer ไปทาง 3' ของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องบริเวณที่ทำการศึกษา เนื่องมาจากลำดับเบสซ้ำเหล่านี้มีขนาดที่ยาวมีความผันแปรของเบส การกำหนดสภาวะที่เหมาะสมจึงเป็นไปได้ยาก อย่างไรก็ตามหากตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพไม่ด้นักการเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในตำแหน่งหรือบริเวณที่มีความยาวมาก เช่นลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาว อาจทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ไม่ด้นัก ในทางตรงกันข้ามหากเลือกศึกษาบริเวณลำดับเบสซ้ำที่มีความยาวไม่มาก อย่างเช่นลำดับ

เบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีขนาดไม่ใหญ่นัก โอกาสที่ไพรเมอร์จะจับบนจีโนมย่อมมีโอกาสสำเร็จครบถ้วนมากกว่าลำดับเบสซ้ำที่มีความยาวมากๆ (ธานีรินทร์, 2538) หรืออาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอของไฮยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีตำแหน่งของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาวที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ที่ทำการทดลองครั้งนี้ พบว่าจะมีความแตกต่าง และไม่สัมพันธ์กับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องมาจากไฮยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการมานานทำให้มีความหลากหลายสูง มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในหลายสภาพะ การใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียวจึงอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการจัดจำแนกได้ การที่ไฮยาโนแบคทีเรียมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน แต่อาจจะมีคุณสมบัติแปร และความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าลักษณะที่พบเห็นจากภายนอก การจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้ลักษณะความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ จึงอาจทำให้เกิดความขัดแย้งขึ้นได้

อย่างไรก็ตาม การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาวในไฮยาโนแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนในครั้งนี้ เป็นเพียงเทคนิควิธีที่ช่วยบ่งชี้ความแตกต่างอย่างรวดเร็วของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มเท่านั้นยังไม่สามารถใช้ในการจัดจำแนกได้ การมีข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงเป็นข้อมูลประกอบที่ใช้ในการพิจารณาจัดจำแนก อีกทั้งลำดับดีเอ็นเอหรือยีนที่ใช้เป็น marker ก็มีผลสำคัญที่จะบ่งบอกความแตกต่างขึ้นอยู่กับระดับของการจัดจำแนก และความเหมาะสมของกลุ่มตัวอย่าง การเลือกใช้ดีเอ็นเอส่วนที่มีความสามารถในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจึงมีความสำคัญเช่นกัน จึงควรทำการศึกษาควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน หรือทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้เพื่อเป็นการยืนยันว่าเป็นลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง ที่ต้องการศึกษาจริง ซึ่งจะมีความถูกต้องแม่นยำและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้อย่างสมบูรณ์ต่อไป

บทที่ 6

ปัญหา อุปสรรค และแนวทางแก้ไข

ในการศึกษาการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก จาก ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S internal transcribed spacer (16S-23S ITS) และ intergenic spacer (PC-IGS) ของไฟโคไซยานิน โอเปอรอนจากไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน และ การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว (STRR and LTRR) ปัญหาและอุปสรรคที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตาราง 11 แสดงปัญหา อุปสรรค และแนวทางการแก้ไข

ปัญหา อุปสรรค	แนวทางแก้ไข
1. เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่เจริญร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	1. คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรียเข้ามาเจริญร่วมด้วยวิธี streak plate หรือ spread plate ด้วยวิธีเดิมหลายๆ ครั้งจนได้ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นชนิดเดียว การแยกจากเส้นสายเดี่ยวๆ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายบนอาหารแข็ง D medium ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอเลือกเขี่ยเส้นสายเดี่ยวๆ ในช่วงปลายของเส้นสาย นำมาเพาะเลี้ยงใน flask อาหาร D medium - ทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย โดยนำอาหารที่เพาะเลี้ยงมา streak หรือ spread บนอาหารแข็ง LB plate บ่มที่อุณหภูมิ 40 หรือ 50 องศาเซลเซียส ในสภาวะเดียวกับการเพาะเลี้ยงสำหรับสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบถ้าพบว่าการเจริญของแบคทีเรียเข้ามาร่วมด้วย ต้องกลับไปทำการแยกและเพาะเลี้ยงใหม่อีกครั้ง

ตาราง 11 (ต่อ)

ปัญหา อุปสรรค	แนวทางแก้ไข
2. การสกัดดีเอ็นเอ จากตัวอย่างทำได้ยาก เนื่องจากผนังเซลล์หนาและมีเมือกหุ้มอยู่	2. ปรับปรุงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากที่ใช้กับตัวอย่างพืชที่มียางและโพลีแซคคาไรด์อยู่สูง โดยใช้ CTAB และ PVPP เข้าช่วยเป็นส่วนผสมใน extraction buffer แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ lysozyme หรือ protenase K ซึ่งมีราคาแพง
3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้น และช่วงยาว	3. ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุณหภูมิที่ใช้ในขั้น annealing ในปฏิกิริยา โดยใช้เทคนิค gradient PCR ซึ่งทำให้สามารถศึกษาช่วงของอุณหภูมิที่หลากหลายได้ในการทำงานของ Thermal cycle เพียงครั้งเดียว
4. ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหลังปฏิกิริยาพีซีอาร์ กับไพรเมอร์ของลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงยาว	4. ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค gradient PCR และ Hot start PCR ร่วมกัน เพื่อให้เกิด PCR product
5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis ได้ลักษณะแถบที่มีหลายขนาด ทำให้ยากในการตรวจสอบโดยผู้ทดลอง	5. เนื่องจากแถบดีเอ็นเอทุกแถบมีความสำคัญในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์ใน cluster analysis จึงใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Gel Analysis Software Version 3.06 (d) เพื่อให้การอ่านตำแหน่งที่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความสม่ำเสมอมากกว่าการอ่านโดยสายตาของผู้ทดลอง
6. ลำดับเบสซ้ำที่ใช้ในการศึกษาเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความละเอียดในการจัดจำแนกสูง ทำให้ความสัมพันธ์ของ dendrogram ไม่สอดคล้องกับการจัดจำแนกในระดับของ Order	6. เนื่องจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้ cluster analysis เป็นเพียงการศึกษาความแตกต่างเบื้องต้นจึงอาจจะใช้วิธีการอื่นๆ ที่มีความละเอียดสูงกว่า อีกทั้งลำดับเบสซ้ำที่มีความจำเพาะและความเหมาะสมมีผลกับเฉพาะไซยาโนแบคทีเรียจีสเดียวกันเท่านั้น จึงควรใช้ลำดับเบสซ้ำช่วงสั้นนี้กับไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ในจีสเดียวกัน แต่ต่างสปีชีส์จะมีความเหมาะสมมากกว่า

ตาราง 11 (ต่อ)

ปัญหา อุปสรรค	แนวทางแก้ไข
7. ไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ 16S-23S ITS ที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้กับไซยาโนแบคทีเรียในจินัส <i>Synechococcus</i> spp. ซึ่งมีจำนวน 3 สายพันธุ์ - ลำดับเบสที่ได้จากการอ่านโดยเครื่องอ่านอัตโนมัติมีขนาดสั้น และยังอยู่ในช่วงของยีน 16S rRNA 8. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไฟโคไซยานินโอเปอรอน (PC-IGS) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียได้เพียง 5 สายพันธุ์	7. สามารถใช้ผลของลำดับเบสของยีน 16S rRNA สามารถใช้ลำดับเบสที่ได้ออกแบบไพร์เมอร์ที่จะมีความจำเพาะต่อไซยาโนแบคทีเรียจินัส <i>Synechococcus</i> และเลือกใช้ไพร์เมอร์ของยีน 23S rRNA ซึ่งจะสามารถครอบคลุมช่วงของ ITS ที่อยู่ระหว่าง 16S และ 23S ได้ - ทำการโคลนจีนผลิตภัณฑ์พีชีอาร์ที่ได้ ก่อนส่งตัวอย่างที่เป็นพลาสมิดไปอ่านลำดับเบส จะสามารถอ่านลำดับเบสได้ยาวขึ้น 8. ทำการเลือกใช้และเจือจางปริมาณดีเอ็นเอ ให้เหมาะสมในปฏิกิริยาของพีชีอาร์ อาจจะกระทำโดยการใช้อุณหภูมิต่างๆ ในขั้น annealing ของปฏิกิริยาพีชีอาร์ แล้วใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในครั้งต่อไป โดยใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อความจำเพาะเจาะจง
9. ข้อมูลลำดับเบสในฐานะข้อมูลของยีน 16S-23S ITS และ PC-IGS ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI มีน้อย 10. การศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ ไม่สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	9. พยายามส่งผลการอ่านลำดับเบสที่ได้ไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อใช้อ้างอิงได้อย่างสมบูรณ์ในอนาคต 10. แผนภูมิที่ได้เป็นแผนภูมิของยีน จึงควรทำการศึกษาโดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนหลายชนิดเพื่อดูความสัมพันธ์และความสอดคล้องของแผนภูมิที่ได้
11. แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้ จากข้อมูลของลำดับเบสในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นกลุ่มเส้นสายจะมีความสอดคล้องกันระหว่างการจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและถ้าใช้ศึกษาความสัมพันธ์ใน	11. เลือกใช้ marker gene ที่มีความเหมาะสมกับกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการศึกษา โดยพิจารณาจากระดับของการจัดจำแนก โดยเลือกใช้ในระดับของ Order จะมีความเหมาะสมมากกว่า ในขณะที่ยีน 16S rRNA มีความเหมาะสม

ตาราง 11 (ต่อ)

ปัญหา อุปสรรค	แนวทางแก้ไข
กลุ่มใหญ่ๆ ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละจีนัส และ Order จะมีความสัมพันธ์ที่ขัดแย้งกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	เนื่องจากเป็นบริเวณที่เป็น conserve gene ในส่วนของ PC-IGS มีความจำเพาะเนื่องจากไฟโคไซยานิน โอเปรอน จะพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดแต่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอได้ยากและมีขนาดต่างกัน และใน 16S-23S ITS ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความผันแปรสูงในไซยาโนแบคทีเรีย จึงควรระมัดระวังในการเลือกใช้ศึกษาในกลุ่มใหญ่ๆ

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนภาณุ ลิ้มโนมนต์. (2527). *สำหรับ*. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กาญจนา ชามูสง่าเวช และ สุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์. (2535). แบคทีเรียสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญ ณ อุณหภูมิสูง. *วารสารวิทยาศาสตร์*, 2: 71 – 75.
- กาญจนา ชามูสง่าเวช, สุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์, ศิริเพ็ญ เวชการัญย์. (2532). “การวินิจฉัยชนิดของ แบคทีเรียสีน้ำเงินแกมเขียว ประเภทที่เจริญ ณ อุณหภูมิสูงในบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของ ประเทศไทย”. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 13. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- กรมทรัพยากรธรณี. (2529). การสำรวจแหล่งพลังงานความร้อนใต้พิภพทางภาคเหนือของประเทศไทย. รายงานฉบับสมบูรณ์.
- เจษฎา เค่นดวงบริพันธ์. (2547). วงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล (molecular phylogenetics) อนุกรมวิธาน ระบบวิทยา และวงศ์วานวิวัฒนาการ. *จุลสารพันธุศาสตร์*, 24 (1) : 18-23.
- ธานินทร์ ภูพัฒน์. (2538). *วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช*. ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะแพทย ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี พืชรพพิศาล. (2549). *สำหรับวิทยา*. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี พืชรพพิศาล และ ฉมาภรณ์ นิवासบุตร. (2546). *คู่มือปฏิบัติการสำหรับวิทยา*. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วรารณ ปานอยู่. (2545). การแยกและการหาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงของสาหร่ายสี เขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนบางแหล่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วิรัชชัย ภูจิตวิทย์. (2534). การศึกษาชนิดและชีววิทยาของสาหร่ายน้ำพุร้อน อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง. ปัญญาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- ประพันธ์ ไตรยสุทธิ. (2551). ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก ของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ประภัสสร สรวัฒนาวรรณ. “การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช.” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/DNAfingerprinting.html> (10 มกราคม 2550).

- ประวิทย์ พิทักษ์วาลี. (2533). นิเวศวิทยาของสาหร่ายบริเวณน้ำพุร้อนบั้งโป่งฮ่อม อ. สันกำแพง จ. เชียงใหม่. การค้นคว้าอิสระเชิงวิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการสอนชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.
- ปานมุก วัชรปิยะโสภณ ยุวดี พิรพรพิศาล ประพันธ์ ไตรยสุทธิ์ และสุดาพร ดงศิริ. (2550). ลำดับเบสของยีน 16S rRNA และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียน้ำพุร้อน. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สระบุรี ไชยมงคล. (2523). จุลินทรีย์ในน้ำพุร้อนโป่งฮ่อม ตำบลออนหลวย อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่. การค้นคว้าอิสระเชิงวิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการสอนชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อักษร ศรีเปล่ง. (2527). สาหร่าย ตอนที่ 1: สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- อุดมลักษณ์ สมพงษ์. (2544). ความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายในน้ำพุร้อนบางแหล่งในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Adams, D.G. (2000). Symbiotic interactions. In: Whitton, B. A. and Potts, M. (eds.). *The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space*, (pp.523–561), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Amman, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59:143-169.
- Allewalt, J.P., Bateson, M.M., Revsbech, N.P., Slack, K. and Ward, D.M. (2006). Effect of temperature and light on growth and photosynthesis by *Synechococcus* isolates typical of those predominance in the octopus spring microbial mat community of Yellowstone national park. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1):544-550.
- Anagnostidis, K and Komarek, J. (1988). Modern approach to the classification system of cyanobacteria 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies*, 50(53):327-427.

- Anagnostidis, K and Komarek, J. (1990). Modern approach to the classification system of cyanobacteria 5. Stigonematales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies*, 59:1-73.
- Ballot, A., Dadheech, P.K. and Krienitz, L. (2004). Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium* and *Spirulina* strains from Kenyan and Indian waterbodies. *Algological Studies*, 113:37-56.
- Beltran, E.C. and Neilan, B.A. (2000). Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10):4468-4474.
- Berrendero, E., Perona, E. and Mateo, P. (2008). Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(PT2):447-460.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J. (1985). *Introduction to the algae*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Boyer, S.L., Flechtner, R.V., and Johansen, R.J. (2001). Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematizes and population genetic a case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6):1057-1069.
- Boyer, S.L., Johansen, J.R., and Flechtner, V.R. (2002). Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *Journal of Phycology*, 38:1222-1235.
- Brock, T.D. (1966). *Principle of microbial ecology*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Brock, T.D. (1978). *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. New York: Springer-Verlag.
- Cadel, S.S., Peyraud, T.C., Briant, L., Tandeau De Marsac, N., Rippka, R. and Mejean, A. (2007). Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23):7605-7614.
- Casamatta, D.A., Johansen, J.R., Vis, M.L. and Broadwater, S.T. (2005). Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 41(2): 421-438.
- Castenholz, R.W. (1981). *Isolation and cultivation of thermophilic cyanobacteria*. in Starr M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. (eds.), *The prokaryotes: A*

- handbook on habitats, isolation and identification of bacteria: Vol.I, (pp.236-246), New York: Springer-Verlag.
- Castenholz, R.W. (2001). *Cyanobacteria : Oxygenic photosynthesis bacteria*. In: Boone, D.R., and Castenholz, R.W. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, (pp.437-599), New York: Springer-Verlag.
- Chang, C., Chang, Y., Underwood, A., Chiou, C. and Kao, C. (2007). VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. *Nucleic Acids Research*, 35:416-421.
- Chapman, V.J. and Chapman, D.J. (1975). *The algae*. London: The Macmillan press, Ltd.
- Chonudomkul, D., Wongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K. and Watanabe, M.M. (2004). Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 201:79-82.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Doers, M.P. and Parker, D.L. (1988). Properties of *Microcystis aeruginosa* and *M. flos-aquae* (Cyanophyta) in culture: taxonomic implication. *Journal of Phycology*, 24:502-508.
- Embry, T.M. and Stackebrandt, E. (1997). *Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural sample*. in Claridge, M.F., Dawah, H.A. and Wilson, M.R. (eds.), *Species: The units of biodiversity*, (pp.61-68), London: Chapman and Hall.
- Ferris, J.M., K hl, M., Wieland, A. and Ward, M.D. (2003). Cyanobacterial ecotypes in different optical microenvironments of a 68⁰C hot spring mat community revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:2893-2898.
- Finsinger, K., Scholz, I., Serrano, A., Morales, S., Uribe, L.L., Mora, M. Sittenfeld, A., Weckesser, J. and Hess, W.R. (2008). Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Environmental Microbiology*, 10(2):460-473.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P., Walsby, A.E. (1973). *The blue-green algae*. New York: Academic Press-London.
- Fritsch, F.E. (1945). *Structure and reproduction of the algae*, Vol.1. Cambridge: The university Press.

- Gelfand, Y., Rodriguez, A. and Benson, G. (2007). TRDB-the tandem repeats database, *Nucleic Acids Research*, 35: 80-87.
- Guevara, R., Armesto, J.J. and Caru, M. (2002). Genetic diversity of *Nostoc* microsymbionts from *Gunnera tinctoria* revealed by PCR-STRR fingerprinting. *Microbiology Ecology*, 44:127-136.
- Gugger, M.F. and Hoffmann, L. (2004). Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:349-357.
- Hall, T.A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Ser., 41:95-98.
- Haande, S., Ballot, A., Rohrlack, T., Fastner, J., Wiedner, C and Edvardsen, B. (2007). Diversity of *Microcystis aeruginosa* isolates (Chroococcales, Cyanobacteria) from East-African waterbodies. *Archives of Microbiology*, 188(1):15-25.
- Haverkamp, T., Acinas, S.G., Doeleman, M., Stomp, M., Huisman, J. and Stal, L.J. (2008). Diversity and phylogeny of Baltic Sea picocyanobacteria inferred from their ITS and phycobiliprotein operons. *Environmental Microbiology*, 10(1):174-188.
- Hongmei, J., Aitchison, J.C., Lacap, D.C., Peerapornpisal, Y., Sompong, U. and Pointing, S.B. (2005). Community phylogenetic analysis of moderately thermophilic cyanobacteria mats from China, the Philippines and Thailand. *Extremophiles*, 9:325-332.
- Ishida, T., Watanabe, M.M., Sugiyama, J. and Yokota, A. (2001). Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 201:79-82.
- Ishida, T., Yokota, A. and Sugiyama, J. (1997). Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacteria taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence. *Journal of General and Applied Microbiology*, 43(4):237-241.
- Iteman, I., Rippka, R., De Marsac, T.N. and Herdman, M. (2000). Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*, 146:1275-1286.

- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau De Marsac, N. and Herdman, M. (2002). rDNA analysis of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. *Microbiology*, 148:481-496.
- Jensen, R., van Embden, J.D.A., Gaastra, W. and Schouls, M.L. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6): 1565-1575.
- Katayama, T., Okamoto, S., Narikawa, R., Fujisawa, T., Kawashima, S., Itoh, M., Ohmori, M. and Kanehisa, M. (2002). Comprehensive analysis of tandem repeat sequences in cyanobacteria genome. *Genome Informatics*, 13:400-401.
- Komarek, J. (2003). *Cocoid and Colonial Cyanobacteria*. In Wehr, J.D. and Sheath, R.F. (eds.), *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*, (pp.59-116), California: Academic Press.
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of cyanobacteria 4. Nostocales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies*, 56:247-345.
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1999). *Cyanoprokaryota : Chroococcales, 1. Teil*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5:150-163.
- Li, R., Carmichael, W.W., Liu, Y. and Watanabe, M.M. (2000). Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA gene sequences. *Hydrobiology*, 438:99-105.
- Li, Z. and Brand, J. (2007). *Leptolyngbya nodulosa* sp. nov. (Oscillatoriaceae), a subtropical marine cyanobacterium that produces a unique multi-cellular structure. *Phycologia*, 46(4):396-401.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. and Schleifer, K.H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, 19:554-568.
- Luesch, H., Moore, R.E., Paul, V.J., Mooberry, S.L. and Corbett, T.H. (2001). Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total

- stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. *Journal of Natural Product*, 64(7):907-910.
- Lupski, R.J. and Weinstock, M.G. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, 174:4525-4529.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L. And Sivonen, K. (2001). Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt2):513-526.
- Lynch, J.M. and Poole, N.J. (1979). *Extreme environment: microbial ecology: a conceptual approach*. New york: Halsted Press.
- Masepohl, B., Görlitz, K. and Böhme, H. (1996). Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1307:26-30.
- Mazel, D., Houmard, J., Castets, A.M. and Tandeau De Marsac, N. (1990). Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *Journal of Bacteriology*, 172:2755-2761.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:695-700.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shinpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., and Tabata S. (2002). Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Research*. Aug 31; 9(4):123-130.
- Neilan, B.A., Jacobs, D. and Goodman, E. A. (1995). Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 16:3875-3883.
- Neilan, B.A., Jacobs, D., Dot, T.D., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T., and Goodman, A. E. (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47:693-697.

- Nelissen, B., De Baere, R., Wilmotte, A. and De Wachter, R. (1996). Phylogenetic relationship of nonaxenic filamentous cyanobacteria strains based on 16S rRNA sequence analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 42(2):194-200.
- Nübel, U., Garcia, P.F. And Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8):3327-3332.
- Odum, E.A. (1971). *Fundamental of ecology*. 3rd ed., Philadelphia: W.B. Saundress Company.
- Oliver, R. L. and Ganf, G. G. (2000). *Freshwater blooms*. In: Whitton, B. A. and Potts, M. (eds). *The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space*, (pp.149–194), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Olsen Gary. (2000). "Molecular Phylogeny". [Online]. Available <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/ClassAndPhylo/molPhylogeny.html> (25 April 2008).
- Oren, A. (2000). *Salts and brines*. In: Whitton, B.A. and Potts, M. (eds). *The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space*, (pp.281–306), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M.M. (1998). 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters*, 164:119-124.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M.M. (1999a). Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*, 47: 189–197.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M.M. (1999b). Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Micorcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 172:15-21.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M.M. (2001). A proposal for the unidentification of five species of the cyanobacteria genus *Microcystis* Kützing ex lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:873–879.

- Paerl, H.W. (2000). *Marine plankton*. In: Whitton, B.A. and Potts, M. (eds). The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space, (pp.121–148), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Page, R.D.M. and Holmes, E.C. (1998). *Molecular evolution: A Phylogenetic Approach*. Cornwall: Blackwell Science Ltd.
- Palinska, K.A., Liesack, E.R. and Krumbein, W.E. (1996). Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Mersmopedia*-like isolates. *Archives of Microbiology*, 166:224-233.
- Phillips, N., Smith, C.M. and Morden, W.C. (2001). An effective DNA extraction protocol for brown algae. *Phycologia*, 49: 97-102.
- Premanandh, J., Priya, B., Teneva, I., Dzhabazov, B., Prabakaran, D. and Uma, L. (2006). Molecular characterization of marine cyanobacteria from the Indian subcontinent deduced from sequence analysis of the phycocyanin operon (*cpcB*-IGS-*cpcA*) and 16S-23S ITS region. *Microbiology*, 44(6):607-616.
- Pointing, S.B., Warren-Rhodes, K.A., Lacap, D.C., Rhodes, K.L. and McKay, C.P. (2007). Hypolithic community shifts occur as a result of liquid water availability along environmental gradients in China's hot and cold hyperarid deserts. *Environmental Microbiology*, 9(2):414-424.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kastovska, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komarek, J. and Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(P1):11-26.
- Rasmussen, U. and Svenning, M.M. (1998). Fingerprinting of cyanobacterial based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:265-272.
- Rippka, R. 1988. Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, 167:28-67.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waerbury, J., Herdman, M. and Stanier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111: 1-61.

- Robertson, R.B., Tezuka, N. and Watanabe, M.M. (2001). Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:861-871.
- Rocap, G., Distel, L.D., Waterbury, B.J. and Chisholm, W.S. (2002). Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosome DNA internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1180-1191.
- Rouhiainen, L., Sivonen, K., Buikema, W. and Haselkorn, R. (1995). Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. *Journal of Bacteriology*, 177(20): 6021-6026.
- Round, F.E. (1973). *The Biology of the algae*. London: Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume I*, 3th ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, F., Scott, M., Mühling, M., Whitton, B.A., Belay, A. and Wilmotte, A. (1999). *Arthrospira* ('*Spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letter*, 172:213-222.
- Sharples, G.J. and Lloyd, R.G. (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 18:6503-6508.
- Smith, G.M. (1950). *The freshwater algae of the United States*. New York: McGraw-Hill book company Inc.
- Sompong, U. (2006). *Morphological and phylogenetic criteria in taxonomic studies of cyanobacteria at some hot spring areas in Thailand*. thesis for doctor of philosophy in biology, Chiang Mai University.
- Stackebrandt, E and Goodfellow, M. (1991). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Stackebrandt, E and Gobel, U.B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-RNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 4:846-849.

- Stockner, J. G., Callieri, C., and Cronberg, G. (2000). *Picoplankton and other non-bloom forming cyanobacteria in lakes*. In: Whitton, B.A. and Potts, M. (eds). *The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space*, (pp.195–238), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Suda, S., Watanabe, M.M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N., Liu, Y. and Day, J.G. (2002). Taxonomic revision of water-bloom-forming species of Oscillatoroid cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt5):1577-1595.
- Takachi, S., Mochimaru, M., Maoka, T. and Katoh, H. (2005). Myxol and 4-Ketomyxol 2'-Fucosides, not Rhamnosides, from *Anabaena* sp. PCC7120 and *Nostoc punctiforme* PCC73102 and proposal for the biosynthetic pathway of carotenoids. *Plant Cell Physiology*, 46(3):497-504.
- Tandeau De Marsac, N. (1977). Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 130:82-91.
- Theriot, E. (1989). Phylogenetic systematics for phycology. *Journal of Phycology*, 25:407–411.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumer S. (2007). MEGA4 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.
- Turner, S., Huang, T.C. and Chaw, S.M. (2001). Molecular phylogeny of nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria. *Botanical Bulletin of Academic Sinica*, 41:181-186.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P. and Palmer, J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4):327-338.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L. and Verbrugh, H. (1998). Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2) : 275-293.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, R.J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacteria genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24):6823-6831.

- Vincent, W.F. (2000). *Cyanobacteria dominance in the polar regions*. In: Whitton, B. A. and Potts, M. (eds). *The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space*, (pp.321–340), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Vioque, A. (1997). The RNase P RNA from cyanobacteria : short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Research*, 25(17):3471-3477.
- Ward, A. and Bora, N. (2004). *Workshop on denaturing gradient gel electrophoresis. 4 – 6th May 2004*. Department of Biology. Faculty of Science. Chiang Mai University.
- Ward, D.M. and Castenholz, R.W. (2000). *Cyanobacteria in geothermal habitats*. In: Whitton, B. A. and Potts, M. (eds). *The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space*, (pp. 37–59), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Ward, D.M., Ferris, M.J., Nold, S.C. and Bateson, M.M. (1998). A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacteria mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4):1353-1370.
- Ward, D.M., Weller, R. and Bateson, M.M. (1990). 16S Ribosomal RNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345:63-65.
- Wattier, R.A., Paulo, A.P. and Christine, A.M. (2000). DNA isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Plant Molecular Biology*, 18:275-281.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G. and De Wachter, R. (1993). Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF ('*Masgigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letter*, 317:96-100.
- Wilmotte, A. (1994). *Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria*. In: Bryant, D.A. (ed.) *The molecular biology of cyanobacteria*, (pp.1-25), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Whitton, B.A. (2000). *Soils and rice-fields*. In: Whitton, B.A. and Potts, M. (eds). *The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space*, (pp.233–255), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Whynn-Williams, D.D. (2000). *Cyanobacteria in deserts – life at the limit?* In: Whitton, B.A. and Potts, M. (eds). *The ecology of cyanobacteria their diversity in time and space*, (pp.341–366), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อไฮยาโนแบคทีเรีย สูตร medium D (20X) (Castenholz, 1981)

Nitritotriacetic acid (NTA)	2.00	g
NaCl	0.16	g
KNO ₃	2.06	g
FeCl ₃ (0.2905 g/L)	20	ml
NaNO ₃	13.78	g
CaSO ₄ ·2H ₂ O	1.20	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.00	g
Na ₂ HPO ₄	2.22	g
Nitsch's solution	10	ml
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	1 L	เก็บที่ 4 °C

ก่อนใช้นำมาเจือจางให้เหลือความเข้มข้นหนึ่งเท่า ปรับ pH เป็น 8.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ถ้าเป็นอาหารแข็ง ให้เติมวุ้น 1.5% ต้มจนวุ้นละลายก่อนนำเข้า autoclave

Nitsch's solution

MnSO ₄ ·H ₂ O	2.28	g
H ₃ BO ₃	0.50	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.075	g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025	g
H ₂ SO ₄	0.5	ml
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	1 L	เก็บที่ 4 °C

2. สูตรอาหาร LB agar

Tryptone	10.00	g
Yeast extract	5.00	g
NaCl	5.00	g
Agar	15.00	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1 L	
pH 7.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ยกเว้น agar ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มจนส่วนผสมละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. สูตรอาหาร LB agar สำหรับ screening transformants

ใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับ LB agar โดยเติม ampicillin ให้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 100 µg/ml จากนั้นเทอาหารบนจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้งตัว เติม IPTG 100 µl (stock 100 mM) และ X-Gal 20 µl (stock 50 mg/ml) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ spread ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน หลังจากเตรียมแล้วควรเก็บไว้ในที่เย็น

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด Genomic DNA

1. 1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)

ละลาย Tris (hydroxyl methyl) aminomethane 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 โดยใช้ HCl จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่ 4 °C

2. CTAB extraction buffer (ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle, 1990)

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

20 mM EDTA (pH 8.0)

1.4 M NaCl

1% PVPP

4% CTAB

ผสม Tris-HCl กับ EDTA ให้เข้ากัน จากนั้นละลาย CTAB ที่อุณหภูมิ 65 °C แล้วเติม PVPP คนต่อไปให้เข้ากัน PVPP มีมวลโมเลกุลสูงจึงทำให้สารละลายหนืด และเหลือบางส่วนที่ไม่ละลายเป็นตะกอนสีขาว จากนั้นจึงเติม NaCl คนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ก่อนใช้เติม 0.1% β -mercaptoethanol และอุ่นที่อุณหภูมิ 65 °C หลังใช้เสร็จเก็บไว้ที่ 4 °C

3. 3M Sodium acetate

ละลาย sodium acetate $\cdot 3H_2O$ 408.3 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. 0.5M Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)

ชั่ง EDTA $\cdot H_2O$ 186.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (pH 8.0) 800 มิลลิลิตร คนให้ละลายและค่อยปรับ pH โดยใช้ NaOH ให้ได้ 8.0 ซึ่ง EDTA จะละลายหมดพอดี (EDTA จะไม่ละลายถ้า pH ต่ำกว่า 8.0) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บที่ 4 °C

5. 5M NaCl

ละลาย NaCl 292 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. TE buffer (100mM Tris-HCl, 10mM EDTA)

ผสมสารละลาย 1M Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 0.1 ml และ 0.5M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. Phenol

นำ phenol มาห่อมละลายที่อุณหภูมิ 68 °C โดยเติม hydroxyquinolines จนได้ final concentration 0.1% เพื่อยับยั้ง RNase และ chelator ion และเพิ่มสีเหลืองให้กับชั้น organic phase จากนั้นเติม 0.5M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตรเท่ากับ phenol ทำการ equilibrated phenol คนด้วย magnetic stirrer 15 นาที ทิ้งไว้จนแยกชั้น ดูดสารชั้นบนออกให้ได้มากที่สุด จากนั้นทำซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ 0.1M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่เหลืออยู่ คนให้เข้ากันจนกระทั่งวัด pH ได้สูงกว่า 7.8 ทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดสารชั้นบนออกให้ได้มากที่สุด จากนั้นเติม 0.1M Tris-HCl pH 8.0 (10%) ของปริมาตรทั้งหมด เพื่อปิดผิวหน้าของสารละลาย phenol ที่ equilibrated เสร็จแล้ว เก็บในขวดสีชา ที่ 4 °C ได้นาน 1 เดือน หรือจนสารละลายดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีส้ม

สารเคมีในการทำ Gel electrophoresis

1. 50X TAE buffer

Tris-base	242.00 g
Glacial acetic acid	57.10 ml
EDTA.2Na	37.20 g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	1 L (pH 8.0)

ละลาย Tris-base และ EDTA.2Na ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม glacial acetic acid ลงไป (ทำในตู้ดูดควัน) คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

2. 6X loading dye

Bromophenol blue	0.25	mg
Glycerol	3	ml
5X TAE buffer	1	ml
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	10	ml

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งเก็บไว้ใน microcentrifuge tube ที่ -20°C

3. Ethydium bromide

5mM EtBr	60	μl
TAE buffer	250	ml

ละลาย EtBr ลงใน 1X TAE buffer ผสมให้เข้ากัน เก็บให้พ้นแสง ที่ 4°C

สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการโคลนชิ้นส่วนพีซีอาร์**1. 0.1M CaCl_2**

CaCl_2 121 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

2. 0.1M IPTG (stock solution)

IPTG 2.4 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้ filter sterile เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3. 50 mg/ml X-Gal (stock solution)

X-Gal 0.2 g ละลายใน 4 ml *N,N*-dimethylformamide เก็บอย่าให้โดนแสงที่อุณหภูมิ -20°C

4. 100 mg/ml Ampicilin (stock solution)

Ampicilin 500 mg ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 5 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้ filter sterile เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

ภาคผนวก ค

1. การตรวจสอบสภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

1.1 การเตรียมเจล (Agarose gel)

1.1.1 เตรียมถาดสำหรับเทเจล โดยใช้เทปกาวปิดบริเวณหัวท้ายของถาด วางหวี (comb) ซึ่งจะทำให้เกิดหลุม (well) สำหรับหยดตัวอย่างลงในเจล ให้สูงกว่าพื้นถาดประมาณ 0.5-1.0 mm. ให้วางถาดในพื้นที่ราบได้ระนาบเดียวกัน

1.1.2 เตรียมสารละลาย 1X TAE buffer จาก stock solution 50X ปริมาตรเพียงพอสำหรับใส่ในแท็งก์และใช้เตรียม agarose

1.1.3 ละลาย 1% agarose ด้วย 1X TAE buffer นำไปหลอมจนละลายเข้ากันดี ทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 55 °C เทใส่ถาดที่เตรียมไว้หนาประมาณ 0.3-0.5 cm หรือแล้วแต่ความต้องการทิ้งเจลไว้ให้แข็งตัวประมาณ 30-45 นาที

1.1.4 ดึงหวี และเทปกาวออกจากถาดเทเจลอย่างระมัดระวัง โดยเฉพาะบริเวณที่วางหวี อย่าให้เจลแตก วางถาดเจลลงในแท็งก์ เท 1X TAE buffer ให้ท่วมเจลประมาณ 1 mm

1.2 การทำ Electrophoresis

1.2.1 ผสม loading dye กับ size marker ในอัตราส่วน 1:5

1.2.2 หยด size marker ลงในหลุมแรกและหลุมสุดท้าย เวลาหยดสารละลายลงในหลุมควรแน่ใจว่าปลายปิเปตจุ่มอยู่ต่ำกว่าปากหลุม เพื่อให้สารละลายตกลงไปอยู่ในหลุมให้หมด

1.2.3 ผสมตัวอย่างกับ loading dye ในอัตราส่วน 1:5 แล้วหยดตัวอย่างลงในหลุมถัดไป

1.2.4 ปิดฝาแท็งก์ในแน้ใจว่าขั้วบวกอยู่ในทิศทางตรงกันข้ามกับทิศทางของหลุมตัวอย่าง ตั้งค่าความต่างศักย์ที่ประมาณ 5-8 volt/cm เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ควรเห็นฟองอากาศผุดขึ้นมาจากลวดนำไฟฟ้า ที่ขั้วไฟฟ้าทั้งสองข้าง

1.2.5 สังเกตทิศทางการเคลื่อนที่ของ loading dye หากเคลื่อนที่ผิดทาง แสดงว่าการต่อขั้วไฟฟ้าผิดข้าง ควรปิดเครื่องและเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง

1.2.6 สังเกตการณ์เคลื่อนที่ของสี methylene blue เมื่อถึงระยะที่เหมาะสม ปิดเครื่อง

1.3 การอ่านผล

ย้อมเจลโดยการแช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที แล้วล้างเจลเพื่อลด background โดยการแช่ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง Transilluminator ซึ่ง

เป็นอุปกรณ์ที่ผลิตขึ้นมาเพื่อความสะดวกในการตรวจสอบเจล โดยส่วนใหญ่ติดตั้งหลอด UV ไว้ได้ แทนวางเจล แสง UV ส่วนใหญ่มีความยาวคลื่น 302 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสม และไม่ทำให้ DNA เสียหายมาก ซึ่งแสง UV นี้จะทำให้เกิด nick บนสาย DNA

ผลการทำ electrophoresis ที่ได้ อาจถ่ายรูปเก็บไว้ได้โดยใช้กล้องโพลาไรซ์ หรือใช้กล้อง CCD ร่วมกับ thermal printer หรือเก็บภาพไว้ในระบบดิจิทัลได้

2. การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจล โดยใช้ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, USA)

- 2.1 ตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- 2.2 เติม capture buffer 10 μ l ต่อน้ำหนัก agarose gel 10 mg
- 2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15-20 นาที หรือจนกว่า agarose gel จะละลาย กลับหลอดไปมาทุกๆ 5 นาที
- 2.4 ใช้ autopipette ดูด agarose gel ที่ละลายแล้วใส่ลงใน GFX column บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
- 2.5 นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสใน collection tube ที่
- 2.6 เติม wash buffer 500 μ l ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วินาที (ปั่น 2 ครั้ง)
- 2.7 ย้ายส่วนของ GFX column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ที่ตัดฝาหลอดทิ้งไปเพื่อให้วาง GFX column ลงไปได้
- 2.8 เติม elution buffer 10-50 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
- 2.9 ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที
- 2.10 ดูดสารละลายใส (ดีเอ็นเอบริสุทธิ์) ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3. การเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, USA)

- 3.1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ เติม capture buffer ให้ปริมาตรรวมกันไม่เกิน 300 μ l ใช้ autopipette ดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน
- 3.2 ดูดสารผสมในข้อ 3.1 ใส่ลงใน GFX column บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

3.3 นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วินาทีเทส่วนใสใน collection tube ทิ้ง

3.4 เติม wash buffer 500 µl ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วินาที (ปั่น 2 ครั้ง)

3.5 ย้ายส่วนของ GFX column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ที่ได้อัดฝาหลอดทิ้งไปเพื่อให้วาง GFX column ลงไปได้

3.6 เติม elution buffer 10-50 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

3.7 ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที

3.8 คูณสารละลายใส (ดีเอ็นเอบริสุทธิ์) ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

4. การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับ pGem-T Easy vectors (Promega, USA)

4.1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ใช้เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ ควรใช้ชิ้นส่วนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยกระบวนการพีซีอาร์ในทันที หากมีความจำเป็นที่ต้องใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เก็บรักษาไว้ ก่อนทำการ ligation นำ PCR Product ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการเติมปลาย A โดยเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

DNA (PCR product)	7.5	µl
MgCl ₂	0.5	µl
2.5mM dNTPs	0.9	µl
Taq polymerase (Fermentus)	0.1	µl
10X buffer	1.0	µl
<u>Total volume</u>	10.0	µl

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 15 นาที หรือนำเข้าเครื่อง Thermal cycle ตั้งอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10-15 นาที ก็ได้ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

4.2 ผสมสารเหล่านี้ใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml

	<u>SD reaction</u>	<u>Positive control</u>	<u>Negative control</u>
2X rapid ligation buffer	5 μ l	5 μ l	5 μ l
pGEM-T Easy vector	1 μ l	1 μ l	1 μ l
insert (purified DNA)	3 μ l	-	-
Control insert DNA	-	2 μ l	-
T4 DNA ligation	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Deionized water to a final	0 μ l	1 μ l	3 μ l

volume of 10 μ l

4.3 บ่มไวที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

5. การเตรียม competent cell

5.1 นำแบคทีเรีย *Escherichia coli* JM109 มา streak บนอาหาร LB Agar ที่ไม่มี antibiotic แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2 ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย มา 1 โคโลนี แล้วนำมาเลี้ยงต่อในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 ml บ่มเชื้อใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3 ดูดแบคทีเรียจากข้อ 5.2 ปริมาตร 250 μ l เติมลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 ml ขวดใหม่ แล้วนำไปบ่มเชื้อใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญอยู่ในระยะ log phase

5.4 ปั่นเก็บเซลล์ ที่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

5.5 ละลายตะกอนแบคทีเรียด้วย 0.1 M CaCl_2 ที่แช่เย็นปริมาตร 5 ml เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

5.6 เมื่อครบเวลา ปั่นเก็บเซลล์ที่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

5.7 เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนแบคทีเรียด้วย 0.1 M CaCl_2 ที่แช่เย็นปริมาตร 500 μ l เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วบ่มในน้ำแข็งอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการ transformation

5.8 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ competent cell จึงแบ่งเอา competent cell ก่อนที่จะนำไปทำ transformation มาทำ standard plate count ด้วยอาหาร LB Agar ที่ไม่มี antibiotic เพื่อดูการรอดชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการ treat ด้วย 0.1 M CaCl_2

6. การถ่ายโอนยีนโดยวิธี Transformation

6.1 เติม competent cell ปริมาตร 100 μl ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา

6.2 เติม recombinant plasmid ที่ได้จากการทำ ligation ลงไป 5 μl เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน

6.3 นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

6.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C (heat shock) 45 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที 2 นาที

6.5 เติม LB broth 900 μl นำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45 นาที

6.6 คูดเชื้อแบคทีเรีย 200 μl หยดลงบน LB plate ที่มี ampicillin/IPTG/X-Gal และทำการ spread plate

6.7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.8 คัดเลือก colony สีขาวจาก LB plate และใช้ไม้จิ้มฟันที่นิ่งมาเชื้อแล้วแต่ละ colony มาซึดบนอาหาร LB plate ที่มี ampicillin/IPTG/X-Gal และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้แน่ใจว่าเป็น colony สีขาวจริง

7. การตรวจสอบหา insert product ใน plasmid โดยวิธี Colony PCR

7.1 ใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกับที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่เป็นทั้งเส้น Foreword และ Reword ไพรเมอร์

7.2 เตรียม master mix ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

<u>Component</u>	<u>Final concentration</u>	<u>Volume/reaction</u>
10X buffer	1X	2.0 μl
dNTPs	20 mM	0.4 μl
MgCl ₂	1.0 mM	2.0 μl
Primer F	10 μM	1.0 μl
Primer R	10 μM	1.0 μl
Taq polymerase	5 Unit/reaction	0.1 μl
H ₂ O	-	13.5 μl
DNA template	-	-
<u>Total volume</u>	-	20 μl

DNA template ไม่คิดปริมาตร

7.3 ผสม master mix ให้เข้ากัน แบ่งใส่ลงใน PCR tube หลอดละ 20 μ l

7.4 เติม DNA template ลงใน PCR tube (ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อแตะโคโลนีที่ต้องการตรวจสอบมาผสมลงไปเพียงเล็กน้อย)

7.5 ใส่ PCR tube ลงในเครื่อง thermal cycle ตั้งโปรแกรมปฏิกิริยาการทำพีซีอาร์ ในสถานะเดียวกับที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละยีนที่ศึกษา

7.6 ตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder

7.7 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของ insert ไปทำการสกัด plasmid

8. การสกัด plasmid โดยใช้ QIA perp® Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

8.1 เลี้ยง transformant ที่ได้จากข้อ 7.7 ในอาหาร LB broth ที่มี Ampicillin (0.1 mg/ml) 10 ml นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.2 ปั่นเก็บเซลล์ที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

8.3 ล้างเซลล์ด้วย TE buffer ปริมาตร 1.5 ml vortex แล้วทำการปั่นเก็บเซลล์อีกครั้งหนึ่ง

8.4 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย buffer P1 250 μ l นำไป vortex เพื่อละลายตะกอน

8.5 เติม buffer P2 250 μ l ใช้ autopipette คูดขึ้นลงช้าๆ หรือกลับหลอดไปมา

8.6 เติม buffer N3 350 μ l ใช้ autopipette คูดขึ้นลงช้าๆ หรือกลับหลอดไปมา

8.7 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที คูดเอาเฉพาะส่วนใสไว้ใน

QIA prep spin column

8.8 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง

8.9 ล้าง column โดยเติม buffer PB 500 μ l นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เท buffer ที่ไหลผ่าน column ทิ้ง

8.10 ล้าง column โดยเติม buffer PE 750 μ l นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที เท buffer ที่ไหลผ่าน column ทิ้ง

8.11 ปั่นเหวี่ยง column เปล่า เป็นเวลา 1 นาที

8.12 นำส่วนของ column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ที่ตัดฝาออกเพื่อให้ใส่ column ลงไปได้

8.13 เติม buffer EB 50 μ l ใส่ใน column แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

8.14 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที

8.15 คูดเก็บเฉพาะส่วนใสที่กรองได้ ใส่ลงใน microcentrifuge tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

9. การทำ Restriction Enzyme Analysis

9.1 เตรียม reaction สำหรับ restriction enzyme analysis ดังต่อไปนี้

plasmid	2	μl
10X buffer	2	μl
<i>EcoRI</i>	1	μl
Water nuclease free	15	μl
<u>Total volume</u>	20	μl

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1Kb DNA ladder (Fermentas)

ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษา

1. ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S ITS

Phormidium sp. PR40

787 bp

GCATTGCGAG	AATTGCGCTT	ATCCCATAAA	CCGAGGCTCA	GGTTCAGATT	GCAGGCGTGC
AACTCGCCTG	CATGAAGGCG	GAATCGCATA	GTAAATCGCA	GGTCAGCATA	CTGCGGTGAA
TACGATTCCC	GGGTCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACACCAT	GGGAGTTGGC	CACGCCCCGAA
GTCGTTATCC	TAACCCATGT	GGAGGGAGAT	GCCGAAGGCA	GGGCTGATGA	CTGGGGTGAA
GTCGTAACAA	GGTAGCCGTA	CCGGAAGGTG	TGGCTGGATC	ACCTCCTTTT	TAGGGAGACC
TCCCGACTCT	AAAGGCTGAA	GGCACAGTGC	CATTAAGCCA	AGAGTTGGTC	ATCCCAAGGT
CAATCGAGAT	AGAGGGATGT	TTCTCACTCT	ACAAGGTCTC	TTTTTGCGCT	ATCTATCTCC
GTGGTGAGAA	ACGCACTCTC	TATGATCAAG	TGTGTGATGT	CTCTGGGTCT	CACAGATCCT
TCCTGGACTC	TCC TTC AATA	TAATCTTTGC	GAAATATTAT	AGAATCAACA	TTTTCTTCCT
AACGATTAAT	TTCCACAAAT	ACCGATTGAG	TGTTTTAACT	CAGTAGAGAC	TTAGCCCCTA
GTCTTTGAAG	CGATGATGTA	TCGCACTGCA	GATGTACTGC	TAACCTCCGC	TGAAGGAAAC
GACTCTATTT	CTGACTCGCA	TTAATCTTTC	CGAAAACCTA	TCCTTATACA	CCCTTAAGAT
TGACATATTT	CAGCTTGCTG	GTATTAATTG	CACTAAATAA	CTTGCTGGAC	AGTAATAGCC
AAGAAAC					

Phormidium sp. PD40

794 bp

GCACTCGCGA	GGAGGCGCCT	ATCCCATAAA	CCGGAGGCTC	AGGTTTCAGAT	TGCAGGCTGC
AACTCGCCTG	CATGAAGGCG	GAATCGCTAG	TAATCGCAGG	TCAGCATACT	GCGGTGAATA
CGTTCCCGGG	CCTTGTAACAC	ACCGCCCGTC	ACACCATGGG	AGTTGGCCAC	GCCCGAAGTC
GTTACTCCAA	CCGATTCTGT	CGGAGGAGGA	TGCCGAAGGC	AGGGCTGATG	ACTGGGGTGA
AGTCGTAACA	AGGTAGCCGT	ACCGGAAGGT	GTGGCTGGAT	CACCTCCTTT	TCAGGGAGAC
CTACTGACTT	AGAGAGATAG	GAGAGACGAG	AGCGTCCACA	GGAGTTTGAA	GAAACTCTTG
CTTGAGACTC	GAGTCGCTCA	AACCAAATGG	ATACATCTCC	TAAGTTGGTC	ATCCCAAGGT
CGTTCCGGGA	ATAAGTGTTA	GGCTTTCAAA	CTAGATTGGT	TCGGTTCGTG	GGCTATTAGC
TCAGGTGGTT	AGAGCGCACC	CCTGATAAGG	GTGAGGTCCC	TGGTTCGAGT	CCAGGATGGC
CCACCTTTAC	AGTAGCGGT	GGACAGTAA	CAGCAAGCTG	CAAAAGCGAT	TGGTTGAGCG
GTGAAGACTG	TTGATTGAAG	ACTGAGAAGT	GTTTTTGGGG	GTTTAGCTCA	GTTGGTAGAG
CGCCTGCTTT	GCAAGCAGGA	TGTCAGCAGT	TGAGTCTGCT	TAACCTCCAC	TGGGC AAAAG
CCCAAGCGAT	ACATTTTCAG	CAACTGGTTT	AGAGCAGCCT	GAGAGGCTGA	GTCTAAAGAG
CCTGCTGGAA	GTTT				

Leptolyngbya sp. PR40

870 bp

ACGGACAAAG	GGTTGCCAAC	TGGCGACAGT	GAGCTATCCC	GTAAACCGA	GGCTCAGTTC
AGATTGCAGG	CTGCAACTCG	CCTGCATGAA	GGCGGAATCG	CTAGTAATCG	CCGGTCAGCA
TACGGCGGTG	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	TGGGAGTTGG
CCACGCCCCG	AGTCGTTACT	CCAACCGATT	CTGTCGGAGG	AGGACGCCGA	AGGCAGGGCT
GATGACTGGG	GTGAAGTCGT	AACAAGGTAG	CCGTACCGGA	AGGTGTGGCT	GGATCACCTC
CTTTATAGGG	AGACCTCCCC	ACTCTACGCC	TGAAAGCGAC	GTGCGATTAA	GGTAAGAGTT
GGTCATCCCA	AGGTCGGTCA	GGCAGTGGTG	CAGAGGCTTT	CAAACCTAGCT	GGTTCGGTTC
ATGGGCTATT	AGCTCAGGTG	GTTAGAGCGC	ACCCCTGATA	AGGGTGAGGT	CCCTGGTTTC
AGTCCAGGAT	GGCCACCTT	GGCAAGAGGG	AAGAGGGAAG	AAGGGAAACA	GAAGAGAGCC
TGATTTTCTT	TGGTTTTGAA	TCTTCCGGAT	TCAATCTTCG	ACATGGGGGT	TTAGCTCAGT
TGGTAGAGCG	CCTGCTTTGC	AAGCAGGATG	TCAGCGGTTC	GAGTCCGCTA	ACCTCCACTG
GGATTACCGC	CCAAGGTGAG	TAGTTATTGA	GTAGTTATTA	GGAGACATTC	AGCACCCTGGT
CTTGAGGCTT	GAGGGAAGCG	CGCAAGAGAG	ACTGCTGGAT	GCTATCCAGC	CAGGACCTAG
AAAAC TGCAT	AGCAAGAAAT	AGTCAGGTAG	CAACAACAGA	TACCAATGTT	GACATGGTCA

AGCTAGAAAAG GGCTGATGGT GGATACCTAG

Scytonema sp. TP40

840 bp

GACTGCGAGA GGCGCCTATC CCATAAACCG AGGCTCAGTT CAGATTGCAG GCTGCAACTC
 GCCTGCATGA AGGCGGAATC GCTAGTAATC GCAGGTCAGC ATACTGCGGT GAATACGTTC
 CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCACACC ATGGGAGTTG GCCACGCCCG AAGTCGTTC
 TCCAACCGAT TCTGTCCGAG GAGGATGCCG AAGGCAGGGC TGATGACTGG GGTGAAGTCG
 TAACAAGGTA GCCGTACCGG AAGGTGTGGC TGGATCACCT CCTTTTCAGG GAGACCTACT
 GACTTAGAGA GATAGGAGAG ACGAGAGCGT CCAGAGGAGT TTGACGAAAC TCTTGCTTGA
 GACTCGAGTC GCTCAAACCA AATGGATACA TCTCCTAAGT TGGTCATCCC AAGGTCGTTC
 GGGGAATAAG TGTTAGGCTT TCAAACCTAGA TTGGTTTCGGT TCGTGGGCTA TTAGCTCAGG
 TGTTTAGAGC GCACCCCTGA TAAGGGTGAG GTCCCTGGTT CGAGTCCAGG ATGGCCCACC
 TTTACAGTAG GCGGTGGACA GTAAACAGCA AGCTGCAAAA GCGATTGGTT GAGCGGTGAA
 GACTGTTGAT TGAAGACTGA GAAGTGT TGGGGGTTTA GCTCAGTTGG TAGAGCGCCT
 GCTTTGCAAG CAGGATGTCA GCAGTTCGAG TCTGCTAACC TCCACTGGGC AAAAGCCCAA
 GCGATAGATT TTCAGCAACT GGTTTAGAGC AGCCTGAGAG GCTGAGTCTA AAGAGCCTGC
 TGGAAGTTTC CAGCTAGAAC CTAGAAAACCT GCATAGCGAT AATAGTCAGG TAGCAAAAAC

Scytonema sp. TP40-1

838 bp

GGCGCCTATC CCATAAACCG GAGGCTCGAT GTTCAGATTG CAGGCTGCAA CTCGCCTGCA
 TGAAGGCGGA ATCGCTAGTA ATCGCAGGTC AGCATACTGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC
 TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TTGGCCACGC CCGAAGTCGT TACTCCAACC
 GATTCTGTCTG GAGGAGGATG CCGAAGGCAG GGCTGATGAC TGGGGTGAAG TCCTAACAAG
 GTAGCCGTAC CGGAAGGTGT GGCTGGATCA CCTCCTTTTC AGGGAGACCT ACTGACTTAG
 AGAGATAGGA GAGATGAGAG CGTCCAGAGG AGTTTGAAGA AACTCTTGCT GAGACTCGAG
 TCGCTCAAAC CAAATGGATA CATCTCCTAA GTTGGTCATC CCAAGGTCGT TCGGGGAATA
 AGTGTTAGGC TTTCAAACCTA GATTGGTTCTG GTTCGTGGGC TATTAGCTCA GGTGGTTAGA
 GCGCACCCCT GATAAGGGTG AGGTCCCTGG TTCGAGTCCA GGATGGCCCA CCTTTACAGT
 AGGCGGTGGA CAGTAAACAG CAAGCTGCAA AAGCGATTGG TTGAGCGGTG AAGACTGTTG
 ATTGAAGACT GAGAAGTGT TTTGGGGGTT TAGCTCAGTT GCTAGAGCGC CTGCTTTGCA
 AGCAGGATGT CAGCAGTTCTG AGTCTGCTAA CCTCCACTGG GCAAAAGCCC AAGCGATAGA
 TTTTCAGCAA CTGGTTTGA GCAGCCTGAG AGGCTGAGTC TAAAGAGCCT GCTGGAAGTT
 TCCAGCCCAG AACCTAGAAA CTGCATAGCG ATAATAGTCA GGTAGCAAAA ACAGACAC

Phormidium sp. PD40

1126 bp

GCAACGAGCG CAACCCTCGT TTCTAGTTGC CATCATTAAG TTGGGCACTC TGGAGAGACT
 GCCGGTGACA AACCAGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAGT CAGCATGCCC CTTACGTCCT
 GGGCTACACA CGTACTACAA TGCTGTGGAC AAAGAGCAGC CAGACCGCGA GGTGTAGCTA
 ATCTCATAAA CCACGGCTCA GTTCAGATTG CAGGCTGCAA CTCGCCTGCA TGAAGGCGGA
 ATCGCTAGTA ATCGCAGGTC AGCATACTGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAG
 CGCCCGTCAC ACCATGGGAG TTGGCCACGC CCGAAGTCGT TACTCCAACC GCTTGCGGAG
 GAGGACGCCG AAGGCAGGGC TGATGACTGG GGTGAAGTCG TAACAAGGTA GCCGTACCGG
 AAGGTGTGGC TGGATCACCT CCTTTTTAGG GAGACCTACC CACTTAGAGA GAGGAGCGAG
 GAGAGAGGAG AGAGGAGTTG GAAGAACTTC TCATCGAGAC TCGACTCAGC GAAGCAGTTG
 TAAGCATCTC CTAAGTTGGT CATCCCAAGG TCGGTCGAGT TTTAAGTGTG GGCTTTCAAA
 CTAGCTTGGT TCGATGATGG GCTATTAGCT CAGGTGGTTA GAGCGCACCC CTGATAAGGG
 TGAGGTCCCT GGTTCGAGTC CAGGATGGCC CACCTTTAGG AGGAAGCGGG ATGAAAGATA
 AAGGATGAAC TGGAAGCAT TCGGGCTTTA GCGTTCATGC TTCCGCCTTT TATCGGGGGG
 TTTAGCTCAG TTGGTAGAGC GCCTGCTTTG CAAGCAGGAT GTCAGCGGTT CGAGTCCGCT
 AACCTCCACT GAGAGCGAGA GCTTTCAACG GGAAGATTT CAGCAACGGG TCTAGGGAAG
 CGACGTGCTT CAGTAGATAG CCTGCTGGAG TTGGTTCCAG CCAGAACCTT GAAAACCTGCA
 TAGAACTTGT CAGGTAGTGA TTAGGTGACA GGGAAATAGG GACCGGGGGT AGGAGAAATG
 TCTACCTCGT AAACCCTGAG CCCTGAACCC TGAAAACACA GACACCAATG AACTTGTTAA
 GTGGTCAAGC TAATAAGGGC TAACGGTGGA TACCTAGGCA CACAGA

Chroococidiopsis* sp. PR45*1042 bp**

CAACGAGCGC AACCCCTCGTT TTTAGTTGCC AGCATTAAAGT TGGGCACTCT AGAAAGACTG
 CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAGTC AGCATGCCCC TTACGCTCTG
 GGCTACACAC GTACTACAAT GCTGTGGACA AAGGGCAGCA AGAATGCGAA TTCAAGCAAA
 TCCCAGAAAC CACGGCTCAG TTCAGATCGC AGGCTGCAAC TCGCCTGCGT GAAGGCGGAA
 TCGCTAGTAA TCGCCGGTCA GCCATACGGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC
 CGCCCGTCAC ACCATGGAAG CTGGCCACGC CCGAAGTCGT TACCCTAACC TTTCGAGGAG
 GGGGACGCCG AAGGCAGGGC TGGTGAAGTCG GGTGAAGTCG TAACAAGGTA GCCGTACCGG
 AAGGTGTGGC TGGATCACCT CCTTTT TAGG GAGACCTACC CAACACGAGT TGCTCGCGCA
 GCGAGTGTCA GGTCAACCGA GGTGCGTCA GGCAGATGT GTGGCTTTCA AACTCTGGTT
 TGGTTAAGAG GAGCGAAACC GAGCAAGGGC TATTAGCTCA GGTGGTTAGA GCGCACCCCT
 GATAAGGGTG AGGTCCCTGG TTCGAGTCCA GGATGGCCCA CCTAAAGAAG TGAAAGTGGG
 TGCAGCGAGC TGCTTGAAGG TGGCGACTTG ACGGGAGAGA TGCTAGACTA GAAAAAGGTG
 CGAAAAATTC AGCAAGCGGT ACCCAAGCCA AACTGCTGGA GAATCGCCAG CCAGAACCTT
 GAAACTGCA TAATCATGCC AAAGAAATAG CAGGTAGGAT GTAACGGTGC CGCAGTGGCG
 CCAAAGTTAC AAAACCGAAT AGCCAATAAG ACAACTAACT GAAGAACAGA AAGTGGTCAA
 CGCTACAGAA GGCTGATGGT GGATAGCCTA GGCATCACAG ACGAATCAGC TAGTGAATTC
 GCGGCCGCCCT GCAGGTCGAC CATATGGGAG AGCTCCCAA CGCGTAGGAT GCATAGCTTG
 AGTATTTATA GTTCGCAATG TC

2. ลำดับเบสของ PC-IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอน***Synechococcus* sp. SK70****669 bp**

TTGGCTGCTT GTTTACGCGA CATGGAAATC ATCTTGCGCT ATGTGACCTA CGCCATTTTG
 GCCGGTGA CT CAGCGTGCT CGATGATCGC TGCTTGAACG GCCTGCGGGA AACCTACCAA
 GCCCTTGGTA CCCCCGGCTC CTCCGTGGCT GTGGCTATCC AAAAAATGAA AGATGCCGCG
 ATCGCGATCG CCAATGATCC CAATGGCATC ACCCCTGGCG ATTGCAGCGC CCTGATGTCC
 GAAATCGCTG GCTACTTTGA TCGTGCCGCT GCCGCTGTTG CCTAAGGCAC CTTTGACGTT
 CTCTAACTTT GACCGTTCTG AACACGCACA TTTT TTAGGG AGATATTTTA TCCATGAAAA
 CGCCGATTAC TGAAGCCATT GCCGCCGCCG ATACCCAAGG TCGTTTCCCTC AGCAACACCG
 AACTGCAAGC GGTTGACGGT CGCTTCAAGC GCGCTGTGGC CAGCATGGAA GCTGCTCGCG
 CCCTGACCAA CAATGCTCAG AGCCTGATTG ACGGCGCAGC CCAAGCGGTG TACCAAAAAT
 TCCCCTACAC CACCACCATG CAAGGCTCTC AATATGCCTC GACCCCCGAA GGCAAAGCCA
 AGTGCGCCCC TGACATCGGC TACTACCTGC GGATGGTGAC CTACTGCTTA GTTGCTGGTG
 GGTACTGGA

Synechococcus* sp. SK50*665 bp**

TGGCTGCTTT TTTACGCGAC ATGGAAATCA TCTTGCGCTA TGTGACCTAC GCCATTTTGG
 CGGGTGA CT GCGTGCTCGA TGATCGCTGC TTGAACGGTT GCGGGAAACC TACCAAGCCC
 TTGGTACCCC CGGCTCCTCC GTGGCTGTGG CTATCCAAAA AATGAAAGAT GCCGCGATCG
 CGATCGCCAA TGATCCCAAT GGCATCACCC CTGGCGATTG CAGCGCCCTG ATGTCCGAAA
 TCGCTGGCTA CTTTGATCGT GCCGCTGCCG CTGTTGCCTA AGGCACCTTT GACGTTCTCT
 AACTTTGACC GTTCTGAACA CGCACATTTT TTAGGGAGAT ATTTTATCCA TGAAAACGCC
 GATTACTGAA GCCATTGCCG CCGCCGATAC CCAAGGTCGT TTCCTCAGCA ACACCGAACT
 GCAAGCGGTT GACGGTCGCT TCAAGCGCGC TGTGGCCAGC ATGGAAGCTG CTCGCGCCCT
 GACCAACAAT GCTCAGAGCC TGATTGACGG CGCAGCCCAA GCGGTGTACC AAAAATTCCC
 CTACACCACC ACCATGCAAG GCTCTCAATA TGCTTCGACC CCCGAAGGCA AAGCAAAGTG
 CAGCCGTGAC ATCGGCTACT ACCTGCGGAT GGTGACCTAC TGCTTAGTTG CTGGGGGTAC
 TGGAA

Phormidium* sp. PR40*725 bp**

TGTAACCTAT GCTACTTTGG CTGGTGATTG TAGTGTTCTA GATGATCGTT GCTTGAACGG
 CTTGCGCGAA ACTTACCAAG CTCTGGGTGT TCCCGGTGGT TCCGTTGCGG CTGGCGTTCA

GAAAATGAAG GATGCTGCTA TCTCGATCGC AAACGATCAA AACGGTATCA CTCCTGGTGA
 TTGCAGTGCC TTAATTTCTG AAGTTTCTAG CTACTTCGAT CGCGCTGCTG CTGCTGTTGC
 TTAATCCAGT GCTTCGTTTT TAGAGGTTTG TTTTATAGCTG GGTTAGGTTG CTCTACTCGC
 TTAAGGTGCA AACCTTCCCC TGGCGTTAAA AACAAACCGCC TAAACAACCTG ATAGCTAAAC
 AAACCTTTTT GAACGCAAAC CTTTTCGGAC TACAAATTTT AGGGAGATAA CTCAACATGA
 AGACCCCAT TACTGAGGCA ATCGCTGCTG CTGACACTCA AGGTCGTTTC CTCAGCAACA
 CCGAACTGCA AGCTGTTAAT GGACGGTTTG AGCGTGCTGT TGCCAGCATG GAAGCGGCTC
 GTGCTCTCAC CAACAAAGCT CAGCAACTGA TTGACGGTGC AGCAAACGCT GTTTATCAGA
 AGTTCCCTTA CACCACTCAA ATGCAAGGGG CAAACTTTGC GGCTGATTCT CGCGGTAAGT
 CCAAGTGTGC TCGTGACATC GGCTACTACC TGC GGATGGT AACCTACTGC TTAGTTGCTG
 TGGGG

Phormidium* sp. PD40*1027 bp**

CAGCTATGCG CTTGGTGGCT GGAGATACCG ATGTTTTAGA TGAGCGGGTT CTGGAAGGGT
 GCGAGAAACC TACAATTCTC TGGGTGTACC TATTGGTCCA ACCGTTCAAG GTATTTCAGAT
 TATGAAGAAT ATTGTGAAGG AACTGGTATC AGAAGCTGGA ATCGAGGATG TGGGGATTGT
 AGAGCAGCCA TTTGACTACA TGACCCGTGA GTTGGGTGAA AAGGATCTGT AAAGTACTGA
 CTTGCCCTGT GGGGAAAAGC CCAAAGATTT TAGCAGAGGA GGGGCGATCG CCTCTCCTCT
 GTCATGTTTT CTACTGTTTA ATTTTCTACT GCTTAAAGTG TCACCCTTTT ATCCCGCTCT
 GATCACGCTT GAGGAAGATA AATTCTGAGA CTACCTGGTT TCCACGGCTC TGCCTGAAAA
 GGATCGATAG GAGGGCACAG CCTCTTTTGC GATGGAACAA TCATTAGGC AATCAGGATT
 CCCTACCCGA CTGACTGAGC ATCCGCTTCC AGCACCCAGA TCGCATCCCC TTCAGGGGTG
 CGGGTAATAA TCGTTTCGTC TCCCCTGCGA CCTAATTTAA CCGCAAACCTC CAGAGCCTGC
 TGGCGAGTCT CTGCTACCTT GAATAAACCG TAGTATCGAC CATCTACCTG AATAGCTTCC
 AGGTGCTCAT CCAGATCTGG AACCCGAATC TGACACATCA AATAGCGGCT GCGATCACTT
 AAAATGCGAC AGGTGGTGGA CGCGATGGGT TTGTGAGCTG GTGAAGTGGA AGAGCGAGGC
 GGAGTCTGGG GAATCGCATC TGGTTCAAAA ACCCAGATTG CATAGCCTTT GGCAATTTTT
 GTGTCAGGAT TTGATGCCCT TTCACGATCA GCCGCCGACA GATTTTCGAGG GTCTGTTGCC
 TGGTTTGAGT GACCTTGACC AGACTGTAAT ACTTCCCCTC GACAACGATG GCAGCCGTGC
 GGTGGCTATC TCCTGGTAAC CGGATGTGGC AGGAACGGTA GCTGGCTGCG GGATTTCAGCA
 GCCGGAT

Oscillatoria* sp. KC45*1086 bp**

GCGTAAACTT ACATCTTTTG CGGGTGGGAC GTGGGGACCA ACTGCCAAGT CCTGGAGCAG
 TTCAACAACC CCGCTGCGGG TTGACAAGGC ACGACCTCAA ATCGCTCAGC TTTCCGAATT
 GGGCTTGGTC GAATTAACGC GCAAACGCCA GGGCCAAAAT ATTTATGAGC TGTTTGGGCA
 AACCTGCCCC ACCTGTAGTG GGTAGGGCA TTTAGTGCAT TTACCGGGTG AAATTGAACA
 GGCGGTGCCT GAACCTGTAG AAGTGCTGCG GGTAGCCCC GTTGCAGAAC CGCGCATTGC
 TCTGCGAGAA ACTTGGGACC GAAATACGGA TGAGTTCGAT AATGACGGTA CTTCTGACTT
 GCAGGAGTTG GATTTAACCA ATCATCCCAA CTATCAGGAA CGCAGCCGAG GTGGCGATCG
 GCGGCGGCGA CGCACTCGTT TGAAGAATGA ACCGCCCGTT AAAGGCGGAC TGCCGCGGGT
 TGGAGTTGAG TTAGAAACTG AAGAAGAGGT TGGTCCGGTT GAGGAGGCC CAGCCTACCG
 AGTCAGTCCG ATTCGTCCGG CTAAGGAAGC GCGCAGTGAG AAACCTGAAC GGAATCGGGG
 AAGACGGGAA AAACCGCCTG CCGAACCACC GCAAGTGATT TCGGTGGAAA TGACACCGGA
 AGAGCAAGAT GTTTATGCTC TAATGGGTAT CTCTCCACTG GTATTAGCTT CAGACCCGTG
 TAAGGATCCA AAGTCAACCA TCATTGCGAT TACGGCCCC GGTGAGTCTC CTCGATCTGA
 GTATCAGTTG GCTGTTGCCC AAACCTGGACA AGCCGCTGAA TCTGCTCTAG CCGATGATGC
 CGCTGATATT TCGACTACGA TGGAGACTCG GATGACCTAG AGGCGGAAAT GGCAGTCAAT
 GACGAATTGG ATACCGCTGA TATCGCCGAG ACTGCAAACG GCTCTGGGTT CACGGCACCC
 ACGCTAGCAA ATTCCGCACC CGGCGGCTTT AATCCTGCCG AAGTTGGAAT TGACCCAGC
 AGACGGCGGC GCGGCGGCG GTCTTCAACC TCAGGTGGTT GATTTCGCCT GTGTTCCGAG
 ACTTCT

ภาคผนวก จ

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของไซยาโนแบคทีเรียกับฐานข้อมูล NCBI

ลำดับเบสของ 16-23S ITS

1. ลำดับเบสของ 16S-23S ITS ของ *Phormidium* sp. SK45

> gb|EF429286.1| *Leptolyngbya appalachiana* GSM-SFF-MF60 16S ribosomal RNA, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Leu gene, tRNA-Ala gene, complete sequence; and 23S ribosomal RNA, partial sequence
Length=1804
Score = 527 bits (285), Expect = 3e-146
Identities = 467/547 (85%), Gaps = 43/547 (7%)
Strand=Plus/Plus

Query 14	GGCGC-CT-ATCCCATAAACCGGAGGCTCAGGTTGAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC	71
Sbjct 888	GGCGCGCTAATCCCATAAACC-GAGGCTCA-GTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC	945
Query 72	ATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC	131
Sbjct 946	ATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC	1005
Query 132	CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAAC	191
Sbjct 1006	CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAAC	1065
Query 192	CGATTCTGTCTCGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA	251
Sbjct 1066	C--TTA-G--GGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA	1120
Query 252	GGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTCAGGGAGACCTACTGACTTA	311
Sbjct 1121	GGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAT-AGGGAGACCTCCC-ACTTG	1178
Query 312	--G--AGA-GATAGGAGAGACGAGA-GCGTCCACAGGAGTTTGAAGAAACTCTTGCT--T	363
Sbjct 1179	TTGGTAGAAGCTTT-AGAGAT-AGAAGA-TA-A-AGGAATA--AAGTAA-T-TTACTCCT	1229
Query 364	GAGACTCGAGTCGCTCAAACCAAATGGATACATC-TCCTAAGTTGGTCATCCCAAGGTCG	422
Sbjct 1230	AAGTTT-GACTCTTTTCAG-C-AT-TC-AT-CATCCTTC-AAGCTGGTCAACC-AAGGTCG	1281
Query 423	TTCGGGGAATAAGTG--TTAGGCTTTCAAACCTAGATTGGTTTCGGTTCGTGGGCTATTAGC	480
Sbjct 1282	GTCGAGGTTTCA-TGGCTT-GACTTTCAAACCTATCT-GGTTTCGGATA-TGGGCTATTAGC	1337
Query 481	TCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGC	540
Sbjct 1338	TCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGC	1397
Query 541	CCACCTT	547
Sbjct 1398	CCACCTT	1404
Score = 134 bits (72), Expect = 7e-28		
Identities = 76/78 (97%), Gaps = 0/78 (0%)		
Strand=Plus/Plus		
Query 635	TTGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCAGTTCGA	694
Sbjct 1403	TTGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTCGA	1462

Sbjct = ลำดับเบสของ *Leptolyngbya appalachiana* (EF429286.1)

> gb|DQ786166.1| **Leptolyngbya** sp. LLi18 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence;
16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala
genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=2156
Score = 438 bits (237), Expect = 1e-119
Identities = 322/360 (89%), Gaps = 17/360 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 21	ATCCCATAAACCGAGGCTCAGGTTT	80
Sbjct 1204	ATCCCATAAACCGAGGCTCA-GTTCAGATTGTCAGGC-TGCAACTCGCCTGCATGAAGGCG	1261
Query 81	GAATCGCATAGTTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGATTCCC	140
Sbjct 1262	GAATCGC-TAG-TAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACG-TTCCC	1318
Query 141	CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTA-TCCTAACCCAT-	198
Sbjct 1319	CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCC-AACCGTTC	1377
Query 199	GTGGAGGGA-GATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	257
Sbjct 1378	GCGGA-GGAGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	1436
Query 258	GTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCT-CCCGACTCTAAAGGC	316
Sbjct 1437	GTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTA-AGGGAGACCTACCC-ATTC-AGATTC	1493
Query 317	TGAAGGCACAGTGCCATTAAGC-CAAGAGTTGGTCATCCCAAGGTCAATCGAGATA-GAG	374
Sbjct 1494	TGAAAGCACAGAGCAATAGGGACT-GAATTGGTCATCCCAAGGTTCGTTTCGAGGTATGAG	1552

Subjct = ลำดับเบสของ *Leptolyngbya* sp. LLi18 (DQ786166.1)

```
> gb|DQ786166.1| Leptolyngbya sp. LLi18 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence;16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala
genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=2156
Score = 641 bits (347), Expect = 1e-180
Identities = 459/509 (90%), Gaps = 23/509 (4%)
Strand=Plus/Plus
```

```

Query 2      CGGACAAAGGGTTGCCAACTGGCGACAGTGAG-CTATCCCGTTAAACCGAGGCTCAGTTC 60
|||||
Sbjct 1169   CGGACAAAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGCAAGCCAATCCC-ATAACCGAGGCTCAGTTC 1227

Query 61     AGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCA 120
|||||
Sbjct 1228   AGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCA 1287

Query 121    TACGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGG 180
|||||
Sbjct 1288   TACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGG 1347

Query 181    CCACGCCCCAAGTCGTTACTCCAACCGATTCTGTCGAGGAGGACGCCGAAGGCAGGGCT 240
|||||
Sbjct 1348   CCACGCCCCAAGTCGTTACTCCAACCG-TTC-G-CGGAGGAGGACGCCGAAGGCAGGGCT 1404

Query 241    GATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTC 300
|||||
Sbjct 1405   GATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTC 1464

Query 301    CTTTATAGGGAGACCT-CCCGACTCT-ACGCTTGAAAGCGAC-GTGCGATTAAGGTAA-G 356
|||||
Sbjct 1465   CTTTA-AGGGAGACCTACCC-ATTCAGATTC-TGAAAGC-ACAGAGCAAATAGGG-ACTG 1519

Query 357    AGTTGGTCATCCCAAGGTCGGTC-AGGCAGTG-GTGCAGAGGCTTTCAAACCTAGCT---G 411
|||||
Sbjct 1520   AATTGGTCATCCCAAGGTCGTTTCGAGGTA-TGAGTGTA-AGGCTTTCAAACCTAT-TAAAG 1576

Query 412    GTTCGGTTCATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTC 471
|||||
Sbjct 1577   GTTCGGAT-ATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTC 1635

Query 472    CCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTT 500
|||||
Sbjct 1636   CCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTT 1664

Score = 143 bits (77), Expect = 1e-30
Identities = 89/94 (94%), Gaps = 3/94 (3%)
Strand=Plus/Plus
Query 568    GATTCAATCTTCGACATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGG 627
|||||
Sbjct 1668   GATT-AATATT-G-CACGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGG 1724

Query 628    ATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTAACCTCCACTGG 661
|||||
Sbjct 1725   ATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTAACCTCCACTGG 1758

```

Query = ลำดับเบสของ *Leptolyngbya* sp. PR40

Sbjct = ลำดับเบสของ *Leptolyngbya* sp. LLi18 (DQ786166.1)

4. ลำดับเบสของ 16S-23S ITS ของ *Scytonema* sp. TP40

```

> gb|DQ786166.1| Leptolyngbya sp. LLi18 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence;
16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala
genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=2156
Score = 486 bits (263), Expect = 5e-134
Identities = 279/286 (97%), Gaps = 4/286 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 14     GCCTATCCCATAAACCGAGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGG 73
|||||
Sbjct 1200   GCCAATCCCATAAACCGAGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGG 1259

```

Query 74 CGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTAC 133
 |||
 Sbjct 1260 CGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTAC 1319
 |||
 Query 134 ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCAGTCGTTACTCCAACCGATTCT 193
 |||
 Sbjct 1320 ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCAGTCGTTACTCCAACCG-TTC- 1377
 |||
 Query 194 GTCGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC 253
 |||
 Sbjct 1378 G-CGGAGGAGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC 1436
 |||
 Query 254 GTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTCAGGGAGACCTAC 299
 |||
 Sbjct 1437 GTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTA-AGGGAGACCTAC 1481
 |||

Score = 204 bits (110), Expect = 6e-49
 Identities = 133/144 (92%), Gaps = 2/144 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query 400 TTGGTCATCCCAAGGTCGTTTCGGGAATAAGTGTTAGGCTTTCAAACCTA-GATTGGTTTCG 458
 |||
 Sbjct 1522 TTGGTCATCCCAAGGTCGTTTCGAGGTATGAGTGTAAGGCTTTCAAACCTATTAAAGGTTTCG 1581
 |||
 Query 459 GTTCGTGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGG 518
 |||
 Sbjct 1582 GAT-ATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGG 1640
 |||
 Query 519 TTCGAGTCCAGGATGGCCACCTT 542
 |||
 Sbjct 1641 TTCGAGTCCAGGATGGCCACCTT 1664
 |||

Score = 137 bits (74), Expect = 6e-29
 Identities = 158/195 (81%), Gaps = 19/195 (9%)
 Strand=Plus/Plus

Query 632 GGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCAGTTTCGAGT 691
 |||
 Sbjct 1682 GGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGT 1741
 |||
 Query 692 CTGCTAACCTCCACTGG-GCAAA-AGCCCAAGCGATAGATTTTCAGCAACTGGTTTAGAG 749
 |||
 Sbjct 1742 CCGCTAACCTCCACTGGAGTTGATAGAGCAAGCGA--GATTG--AGGAACAG-TTCAG- 1794
 |||
 Query 750 CAGCCTGAG--AGGCTGAGT-CTAAAGAGCCTGCTGGAAGTT-TCCAGCTAGAACC-TAG 804
 |||
 Sbjct 1795 CAACTT-ATCTAGG--GAATGCTAGAGAGCCTGCTGGGA-TTGTCCAGCCAGAACCAT-G 1849
 |||
 Query 805 AAAACTGCATAGCGA 819
 |||
 Sbjct 1850 AAAACTGCATAGCGA 1864
 |||

Query = ลำดับเบสของ *Scytonema* sp. TP40

Sbjct = ลำดับเบสของ *Leptolyngbya* sp. LLi18 (DQ786166.1)

5. ลำดับเบสของ 16S-23S ITS ของ *Scytonema* sp. TP40-1

> gb|EF429286.1| *Leptolyngbya appalachiana* GSM-SFF-MF60 16S ribosomal RNA,
 partial
 sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Leu
 gene, tRNA-Ala gene, complete sequence; and 23S ribosomal
 RNA, partial sequence
 Length=1804
 Score = 529 bits (286), Expect = 9e-147
 Identities = 468/548 (85%), Gaps = 44/548 (8%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1      GGC GC-CT-ATCCCATAAACCGAGGCTCGATGTTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG 58
Sbjct 888    GGC GCGCTAATCCCATAAACC-GAGGCTC-A-GTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG 944

Query 59     CATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGG 118
Sbjct 945    CATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGG 1004

Query 119    CCTTGTAACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAA 178
Sbjct 1005   CCTTGTAACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAA 1064

Query 179    CCGATTCTGTGCGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA 238
Sbjct 1065   CC--TTA-G--GGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA 1119

Query 239    AGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTCAGGGAGACCTACTGACTT 298
Sbjct 1120    AGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAT-AGGGAGACCTCCC-ACTT 1177

Query 299    A--G--AGA-GATAGGAGAGATGAGA-GCGTCCAGAGGAGTTTGAAGAACTCTTGCT-- 350
Sbjct 1178    GTTGGTAGAAGCTTT-AGAGAT-AGAAGA-TA-A-AGGAATA--AAGTAA-T-TTACTCC 1228

Query 351    TGAGACTCGAGTCGCTCAAACCAAATGGATACATC-TCCTAAGTTGGTCATCCCAAGGTC 409
Sbjct 1229    TAAGTTT-GACTCTTTCAG-C-AT-TC-AT-CATCCTTC-AAGCTGGTCAACC-AAGGTC 1280

Query 410    GTTCGGGGAATAAGTG--TTAGGCTTTCAAACCTAGATTGGTTTCGGTTCGTGGGCTATTAG 467
Sbjct 1281    GGTTCGAGGTTTCA-TGGCTT-GACTTTCAAACCTATCT-GGTTTCGGATA-TGGGCTATTAG 1336

Query 468    CTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGG 527
Sbjct 1337    CTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGG 1396

Query 528    CCCACCTT 535
Sbjct 1397    CCCACCTT 1404

Score = 134 bits (72), Expect = 8e-28
Identities = 76/78 (97%), Gaps = 0/78 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 623    TTGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCAGTTCGA 682
Sbjct 1403    TTGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGA 1462

Query 683    GTCTGCTAACCTCCACTG 700
Sbjct 1463    GTCCGCTAACCTCCACTG 1480

```

Query = ลำดับเบสของ *Scytonema* sp. TP40-1

Sbjct = ลำดับเบสของ *Leptolyngbya appalachiana* (EF429289.1)

6. ลำดับเบสของ 16S-23S ITS ของ *Phormidium* sp. PD40

```

> gb|EF429286.1| Leptolyngbya appalachiana GSM-SFF-MF60 16S ribosomal RNA,
partial
sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Leu
gene, tRNA-Ala gene, complete sequence; and 23S ribosomal
RNA, partial sequence
Length=1804
Query start position
Subject start position
Score = 846 bits (458), Expect = 0.0
Identities = 635/713 (89%), Gaps = 42/713 (5%)

```

Strand=Plus/Plus

Query 1 GCAACGAGCGCAACCCTCGTTTCTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACCTCGGAGAGACT 60
 |||
 Sbjct 717 GCAACGAGCGCAACCCTCGTTTCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCGGAGAGACT 776

Query 61 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCT 120
 |||
 Sbjct 777 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCT 836

Query 121 GGGCTACACACGTACTACAATGCTGT-GGACAAAGAGCAGCCAGACC-GCGA-GGTTGAG 177
 |||
 Sbjct 837 GGGCTACACACGTACTACAATGCT-TCGGACAAAGGGTTGCCA-ACCAGCGATGGC-GCG 893

Query 178 CTAATCTCATAAACC-ACGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCTTCATGAAGG 236
 |||
 Sbjct 894 CTAATCCCATAAACC GA-GGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCTTCATGAAGG 952

Query 237 CGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGAT 296
 |||
 Sbjct 953 CGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGAT 1012

Query 297 ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTACTCCAACCGCTT-G 355
 |||
 Sbjct 1013 ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTACTCCAAC--TTAG 1070

Query 356 CGGAGGAGGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT 415
 |||
 Sbjct 1071 -GGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT 1129

Query 416 ACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTACCCACTTaga-gag-ag 473
 |||
 Sbjct 1130 ACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAT-AGGGAGACCT-CCCACTT-GTTG-GTAG 1185

Query 474 gagcg--ag-gagagaggagagaggagTTGGAAG-AACTT-CTCATCGAGACTCGACTCA 528
 |||
 Sbjct 1186 AAGCTTTAGAGATAGAAGATAAAGGAATA--AAGTAATTTACTCCTA-AGTTT-GACTCT 1241

Query 529 G-CGAAGCAGTTGTAAGCATC-TCCTAAGTTGGTCATCCCAAGGTCGGTCGAGTTTAAAG 586
 |||
 Sbjct 1242 TTC-A-GCA-TTC-AT-CATCCTTC-AAGCTGGTCAACC-AAGGTCGGTCGAGGTTTCA- 1293

Query 587 TG--TTGGCTTTCAAACCTAGCTTGGTTCG-ATGATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAG 643
 |||
 Sbjct 1294 TGGCTTGACTTTCAAACCTATCT-GGTTCCGAT-ATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAG 1351

Query 644 CGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTT 696
 |||
 Sbjct 1352 CGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTT 1404

Score = 145 bits (78), Expect = 5e-31
 Identities = 78/78 (100%), Gaps = 0/78 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 776 GGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTCGAGT 835
 |||
 Sbjct 1405 GGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTCGAGT 1464

Query 836 CCGCTAACCTCCACTGAG 853
 |||
 Sbjct 1465 CCGCTAACCTCCACTGAG 1482

Score = 91.6 bits (49), Expect = 7e-15
 Identities = 65/72 (90%), Gaps = 5/72 (6%)
 Strand=Plus/Plus

Query 1057 CACAGACACCAA-TG-AACTTGTTAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCTAACGGTGGATACC 1114
 |||
 Sbjct 1735 CACAGACACCAATTGAAAC--GTT-AGTGGTCRAGCTAACAAGGGCTAACGGTGGATACC 1791

Query 1115 TAGGCACACAGA 1126
 |||||
 Sbjct 1792 TAGGCACACAGA 1803

7. ลำดับเบสของ 16S-23S ITS ของ *Chroococcidiopsis* sp. PR45

> gb|EU032390.1| Uncultured Antarctic cyanobacterium clone N184-3 16S
 ribosomal
 RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic
 spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial
 sequence
 Length=1280
 Score = 763 bits (413), Expect = 0.0
 Identities = 580/656 (88%), Gaps = 29/656 (4%)
 Strand=Plus/Plus

Query 1 CAACGAGCGCAACCCCTCGTTT TAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAAAGACTG 60
 |||||
 Sbjct 320 CAACGAGCGCAACCCCTCGTTT TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTG 379

Query 61 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGCTCTG 120
 |||||
 Sbjct 380 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTTCTG 439

Query 121 GGCTACACACGTACTACAATGCTGTGGACAAAGGGCAGCAAGA-ATGCGAAT-TCAAGCA 178
 |||||
 Sbjct 440 GGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGTAGCAAGACA-GCGA-TGTCAAGCC 497

Query 179 AATCCCAGAAACCACGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGCGG 238
 |||||
 Sbjct 498 AATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGG 557

Query 239 AATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGC-CATACGGCGGTGAATACGTTCCCCGGGCCTTGTACA 297
 |||||
 Sbjct 558 AATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCAC-TACTGCGGTGAATACGTTCCCCGGGCCTTGTACA 616

Query 298 CACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGCC-ACGCCCAGAGTCGTTACCCTAACCTTTTCTGA 356
 |||||
 Sbjct 617 CACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGCTTA-GCCCAGAGTCGTTACCCTAAC-TGTA-A 673

Query 357 GGAGGGGGACGCCGAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA 416
 |||||
 Sbjct 674 GGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA 733

Query 417 CCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTT TAGGGAGACCT-ACCCAAC-ACGAGT-TGC 473
 |||||
 Sbjct 734 CCGGAAGGTGTGGCTAGATCACCTCCTTTT-AGGGAGACCTTACCCTTCTA--ACTCTGA 790

Query 474 -TCGCGCAGCGAGT-G-TC-AGGTCAAC-CGAGGTCGGTCGAGGCGAGATGTGTG-GCTT 527
 |||||
 Sbjct 791 ATTGAGTAA-GAGTAGATAGAGGTTATCTCAAGGTCGGTCGAGGTTATATGTGTGTAGCTT 849

Query 528 TCAAACCTCTGTTTGGTTAAGAGGAGCGAAACCGAGCAAGGGCTATTAGCTCAGGTGGTT 587
 |||||
 Sbjct 850 CCAAATTTTGCTCTGGTTTTT-A--ATT-AA-CC-AGTACGGGCTATTAGCTCAGATGGTT 903

Query 588 AGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCT 643
 |||||
 Sbjct 904 AGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCT 959

ลำดับเบสของ PC-IGS ของไฟโคไซยานินโอเปอรอน

1. ลำดับเบสของ PC-IGS ของ *Synechococcus* sp. SK70

> dbj|BA000039.2|

Thermosynechococcus elongatus BP-1 DNA, complete genome

Length=2593857

Features in this part of subject sequence:

phycocyanin beta subunit

phycocyanin alpha subunit

Score = 1016 bits (550), Expect = 0.0

Identities = 615/647 (95%), Gaps = 2/647 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 2      TGGCTGCTTGTTTACGCGACATGGAAATCATCTTGCCTATGTGACCTACGCCATTTTGG 61
             |||
Sbjct 2041911 TGGCTGCCTGCCTGCGCGACATGGAAATTATCTTGCCTATGTGACCTACGCCATTTTGG 2041970

Query 62      CCGGTGACTCCAGCGTGCTCGATGATCGCTGCTTGAACGGCCTGCGGGAAACCTACCAAG 121
             |||
Sbjct 2041971 CCGGTGACTCCAGCGTGCTCGATGATCGCTGCTTAAATGGTCTGCGGGAAACCTACCAAG 2042030

Query 122     CCCTTGGTACCCCCGGCTCCTCCGTGGCTGTGGCTATCCAAAAAATGAAAGATGCCGCGA 181
             |||
Sbjct 2042031 CCCTGGGTACCCCCGGCTCCTCTGTGGCTGTGGCCATTGAGAGATGAAGGATGCCGCGA 2042090

Query 182     TCGCGATCGCCAATGATCCCAATGGCATCACCCCTGGCGATTGCAGCGCCCTGATGTCCG 241
             |||
Sbjct 2042091 TCGCGATCGCCAATGATCCCAATGGCATCACCCCTGGCGATTGCAGCGCCCTGATGTCCG 2042150

Query 242     AAATCGCTGGCTACTTTGATCGTGCCGCTGCCGCTGTTGCCAAGGCACCTTTGACGTTC 301
             |||
Sbjct 2042151 AAATCGCCGGCTACTTTGATCGTGCCGCTGCCGCTGTTGCCAAGACACCTTAGACATTC 2042210

Query 302     TCT-AACTTTGACCGTTCTGAACACGCACATTTTTTAGGGAGATATTTTATCCATGAAAA 360
             |||
Sbjct 2042211 -CTTAACTTTGACCGTTCTGAACACGCACATTTTTTAGGGAGATACTTTATCCATGAAAA 2042269

Query 361     CGCCGATTACTGAAGCCATTGCCGCCGCCGATACCCAAGGTCGTTTCCTCAGCAACACCG 420
             |||
Sbjct 2042270 CGCCGATTACTGAAGCTATTGCCGCCGCCGATACCCAAGGTCGTTTCCTGAGCAACACCG 2042329

Query 421     AACTGCAAGCGGTTGACGGTCGCTTCAAGCGCGCTGTGGCCAGCATGGAAGCTGCTCGCG 480
             |||
Sbjct 2042330 AACTGCAAGCGGTTGATGGTCGCTTCAAGCGCGCTGTGGCCAGCATGGAAGCTGCTCGCG 2042389

Query 481     CCCTGACCAACAATGCTCAGAGCCTGATTGACGGCGCAGCCCAAGCGGTGTACCAAAAAT 540
             |||
Sbjct 2042390 CCCTGACCAACAACGCCAGAGCTTGATTGACGGCGCAGCCCAAGCGGTGTATCAAAAAT 2042449

Query 541     TCCCCACACCACCACCATGCAAGGCTCTCAATATGCCTCGACCCCCGAAGGCAAAGCCA 600
             |||
Sbjct 2042450 TCCCCACACCACGACCATGCAAGGCTCTCAGTATGCCTCGACCCCCGAAGGCAAAGCCA 2042509

Query 601     AGTGCGCCCGTGACATCGGCTACTACCTGCGGATGGTGACCTACTGC 647
             |||
Sbjct 2042510 AGTGCGCCCGTGACATCGGCTACTACCTGCGGATGGTGACCTACTGC 2042556

```

Query = ลำดับเบสของ *Synechococcus* sp. SK70

Sbjct = ลำดับเบสของ *Thermosynechococcus elongatus* (BA000039.2)

2. ลำดับเบสของ PC-IGS ของ *Synechococcus* sp. SK50

> dbj|BA000039.2|

Thermosynechococcus elongatus BP-1 DNA, complete genome

Length=2593857

Features in this part of subject sequence:

phycocyanin beta subunit

phycocyanin alpha subunit

Score = 990 bits (536), Expect = 0.0

Identities = 611/647 (94%), Gaps = 5/647 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 15      CGCGACATGGAAATCATCTTGCGCTATGTGACCTACGCCATTTTGGCGGGTGACT--AGC 72
|||
Sbjct 2041925 CGCGACATGGAAATTATCTTGCGCTATGTGACCTACGCCATTTTGGCGGGTGACTCCAGC 2041984

Query 73      GTGCTCGATGATCGCTGCTTGAACGGT-TGCGGGAAACCTACCAAGCCCTTGGTACCCCC 131
|||
Sbjct 2041985 GTGCTCGATGATCGCTGCTTAAATGGTCTGCGGGAAACCTACCAAGCCCTGGGTACCCCC 2042044

Query 132     GGCTCCTCCGTGGCTGTGGCTATCCAAAAATGAAAGATGCCGCGATCGCGATCGCCAAT 191
|||
Sbjct 2042045 GGCTCCTCTGTGGCTGTGGCCATTGAGAAGATGAAGGATGCCGCGATCGCGATCGCCAAT 2042104

Query 192     GATCCCAATGGCATCACCCCTGGCGATTGCAGCGCCCTGATGTCCGAAATCGCTGGCTAC 251
|||
Sbjct 2042105 GATCCCAATGGCATCACCCCTGGCGATTGCAGCGCCCTGATGTCCGAAATCGCCGGCTAC 2042164

Query 252     TTTGATCGTGCCGCTGCCGCTGTTGCCTAAGGCACCTTTGACGTCTCTT-AACTTTGACC 310
|||
Sbjct 2042165 TTTGATCGTGCCGCTGCCGCTGTTGCCTAAGGCACCTTTAGACATTC-CTTAACTTTGACC 2042223

Query 311     GTTCTGAACACGCACATTTTTTAGGGAGATATTTTATCCATGAAAACGCCGATTACTGAA 370
|||
Sbjct 2042224 GTTCTGAACACGCACATTTTTTAGGGAGATACTTTATCCATGAAAACGCCGATTACTGAA 2042283

Query 371     GCCATTGCCGCCGCCGATACCCAAGGTCGTTTCCTCAGCAACACCGAACTGCAAGCGGTT 430
|||
Sbjct 2042284 GCTATTGCCGCCGCCGATACCCAAGGTCGTTTCCTGAGCAACACCGAACTGCAAGCGGTG 2042343

Query 431     GACGGTCGCTTCAAGCGCGCTGTGGCCAGCATGGAAGCTGCTCGCGCCCTGACCAACAAT 490
|||
Sbjct 2042344 GATGGTCGCTTCAAGCGCGCTGTGGCCAGCATGGAAGCTGCTCGCGCCCTGACCAACAAC 2042403

Query 491     GCTCAGAGCCTGATTGACGGCGCAGCCCAAGCGGTGTACCAAAAATTCCCCCTACACCACC 550
|||
Sbjct 2042404 GCCCAGAGCTTGATTGACGGCGCAGCCCAAGCGGTGTATCAAAAATTCCCCCTACACCACG 2042463

Query 551     ACCATGCAAGGCTCTCAATATGCCTCGACCCCCGAAGGCAAAGCCAAGTGCGTCCGTGAC 610
|||
Sbjct 2042464 ACCATGCAAGGCTCTCAGTATGCCTCGACCCCCGAAGGCAAAGCCAAGTGCGCCCGTGAC 2042523

Query 611     ATCGGCTACTACCTGCGGATGGTGACCTACTGCTTAGTTGCTGGGGG 657
|||
Sbjct 2042524 ATCGGCTACTACCTGCGGATGGTGACCTACTGCTTAGTTGCTGGGGG 2042570

```

Query = ลำดับเบสของ *Synechococcus* sp. SK50

Sbjct = ลำดับเบสของ *Thermosynechococcus elongatus* (BA000039.2)