

RUDSAMEE WASUWAN : CLASSIFICATION AND NITROGEN
FIXATION EFFICIENCY ANALYSIS OF *AZOLLA* SPECIES IN RICE
FIELDS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHOKCHAI WANAPU, Ph.D.
86 pp.

CLASSIFICATION/ NITROGEN FIXATION/ AZOLLA/ RICE

The classification of *Azolla* (Azollaceae) has been quite complicated and continued for a long time. Because most taxonomies of *Azolla* (Azollaceae) focus primarily on reproductive structures which are rarely present in nature and unclear in some species, this study aimed to classify *Azolla* species by observing their morphology through stereo microscope, SEM and DNA analysis. Three isolated *Azolla* (AZO1, AZO2 and AZO3) were collected from the two ponds: one in the university's farm and the other in the organic farm, Suranaree University of Technology. The morphological study which was based on diameters of vegetative, epidermal trichomes and float number in megasporocarp found that the three species of *Azolla* were further classified as follows: AZO1 as *A. microphylla*, AZO2 as *A. cristata* and AZO3 as *A. filiculoides*. Then, DNA sequences (18S rDNA and ITS region) were investigated. The alignment sequencing (18S rDNA) indicated that AZO1 had 99.2% homology with *Azolla* sp. Qiu 02051, AZO2 had 99.6% homology with *A. filiculoides* and AZO3 had 99.4% homology with *A. filiculoides*. However, 18S rDNA could not be used to classify deep down to species level for AZO2, so the ITS region was used for more specific results. From the sequencing of ITS region, it was indicated that AZO1 had 99.3% homology with *A. microphylla*, AZO2 had 99.0%

homology with *A. mexicana* and AZO3 had 99.2% homology with *A. filiculoides*. The results indicated that the ITS region identification corresponded with the morphological study. so the molecular method using ITS region was needed. Furthermore, the application of *Azolla* species as biofertilizer in the rice field has been evaluated by comparing with the chemical fertilizer (12-8-8 kg N-P₂O₅-K₂O/rai or 0.075-0.05-0.05t N-P₂O₅-K₂O / ha). The highest grain yield (4.97 t/ha or 795.2 kg/rai) obtained from the rice field incorporated with AZO1 (*A. microphylla*), did not significantly differ from the chemical fertilizer. Nevertheless, the grain yield (16.72%) obtained from AZO1 was higher than that from chemical fertilizer (12.28%). Therefore, *A. microphylla* could be used as biofertilizer with the same result as chemical fertilizer.

School of Biotechnology

Academic Year 2008

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

รัศมี หะสุวรรณ : การจำแนกสายพันธุ์และการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการตรึง
ไนโตรเจนของແນແຈงในนาข้าว (CLASSIFICATION AND NITROGEN
FIXATION EFFICIENCY ANALYSIS OF AZOLLA SPECIES IN RICE
FIELDS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย วนภู, 86 หน้า

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของແນແຈงมีมาอย่างยาวนานและค่อนข้างมีความซับซ้อน โดยส่วนมากจะเน้นการศึกษาลักษณะโครงสร้างของสปอร์ซึ่งหาได้ยากในธรรมชาติ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อจำแนกสายพันธุ์โดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยคัดเลือกແນແຈงได้จากบ่อภายในฟาร์มและสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ (AZO1 AZO2 และ AZO3) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ในส่วนของสปอร์เพกเมีย (megaspore) จะพบฟลูต (float) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญที่ใช้ในการจำแนกร่วมกับการศึกษาขนาดของใบและลักษณะของขนใบ (trichome) ผลของการจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าແນແຈงทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ใน section *Azolla* AZO1 คือสายพันธุ์ *A. microphylla*, AZO2 คือสายพันธุ์ *A. cristata* และ AZO3 คือ สายพันธุ์ *A. filiculoides* สำหรับการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากของແນແຈงเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอร่วมกับ 18S rDNA และ ITS region จากนั้นนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยนำมาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของແນແຈงใน GenBank พบว่าการใช้ 18S rDNA ให้ผลลำดับเบสของ AZO1 มีความใกล้เคียงกับ *Azolla* sp. Qiu 02051 99.2% AZO2 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.6% และ AZO3 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.4% ผลจากการใช้ 18S rDNA ไม่สามารถจำแนก AZO2 ในระดับสปีชีส์ได้ ดังนั้น จึงนำ ITS region มาใช้เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่จำเพาะเจาะจงขึ้น จากการใช้ ITS ให้ผลลำดับเบสของ AZO1 มีความใกล้เคียงกับ *A. microphylla* 99.3% AZO2 ใกล้เคียงกับ *A. mexicana* 99.0% และ AZO3 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.2% ดังนั้นการใช้วิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการใช้ ITS region จึงเป็นวิธีที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของແນແຈงได้อย่างชัดเจน

สำหรับการใช้ແນແຈงเพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว เปรียบเทียบผลของการใช้ແນແຈงแต่ละสายพันธุ์กับการใช้ปุ๋ยเคมี (12-8-8 กก. N-P₂O₅-K₂O/ไร่ หรือ 0.075-0.05-0.05 ตัน N-P₂O₅-K₂O/เฮกตาร์) ผลผลิตของเมล็ดที่สูงที่สุดคือ 4.97 ตัน/เฮกตาร์ (795.2 กก./ไร่) ซึ่งพบในแปลงข้าวที่ปลูกร่วมกับการไถกลบແນແຈงสายพันธุ์ AZO1 (*A. microphylla*) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ปุ๋ยเคมี โดยผลผลิตที่ได้จากการใช้ແນແຈงสายพันธุ์นี้มีผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าແນແຈงสายพันธุ์

A. microphylla เป็นแผนแดงสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่จะใช้เป็นปุ๋ยในนาข้าวโดยเพิ่มผลผลิตได้เทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____