

5. การศึกษาลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristics)

การศึกษาทางด้านองค์ประกอบของสารสีภายในเซลล์ *Cylindrospermopsis* sp. ทั้ง 12 สายพันธุ์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ พบว่าทั้งหมดมีสารสีหลักอยู่ 2 ชนิด คือ (1) chlorophyll a ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ในช่วง 436-441 นาโนเมตร และ 679-680 นาโนเมตร และ (2) phycocyanin ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 633 นาโนเมตร (Table 11) แต่เมื่อทำการสกัดสารสีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ phycocyanin แตกต่างไปจากเดิมเล็กน้อย คือมีค่าอยู่ในช่วง 617-623 นาโนเมตร และต่างจาก phycocyanin ของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากประเทศออสเตรเลียที่มีค่าอยู่ในช่วง 612-614 นาโนเมตร (Table 12) นอกจากนี้สารสีอื่นก็มีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างไปจากเดิมเช่นกัน

Table 11 *In vivo* absorption spectra of *Cylindrospermopsis* sp.

Strain No.	λ_{max} (nm)	
	Chlorophyll a	Phycocyanin
51001	441, 679	633
51002	437, 679	633
51003	436, 680	633
51004	438, 679	633
51005	437, 679	633
51006	436	633
51007	437, 679	633
51008	678	633
51009	437, 678	633
51010	436, 679	633
51011	680	633
51012	436, 680	633
CRJ1	436, 680	633
CRJ2	438, 680	633
CRJ*	436, 680	633

Table 12 Phycobiliprotein absorption spectra of *Cylindrospermopsis* sp.

Strain No.	λ max (nm)	
	Phycocyanin	Others
51001	621	454, 418, 522
51002	623	454, 418, 521
51003	621	454
51004	619	453
51005	622	455, 480
51006	617	519
51007	617	-
51008	621	454, 521
51009	622	454
51010	621	454, 481, 519
51011	617	521
51012	621	452, 519
CRJ1	612	-
CRJ2	614	453
CRJ*	613	454, 479

6. การศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ (genetic characteristics)

6.1 16S rRNA gene sequence

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรีย

Cylindrospermopsis sp. ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ ประกอบ 19 สายพันธุ์ที่แยกจากประเทศไทย (51001-51019) 2 สายพันธุ์จากประเทศออสเตรเลีย (CRJ1 และ CRJ2) และ 3 สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น (KJA1, KJA2 และ KJA3) พบว่าจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA จะอยู่ในช่วง 1354-1374 bp (Table 13 และ Table 14) ซึ่งจะสั้นกว่า *C. raciborskii* สายพันธุ์เดิมที่ Sarker และคณะ (1999) ได้รายงานไว้ โดยเมื่อตัด gap แล้ว พบว่าสายพันธุ์จากประเทศไทยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *C. raciborskii* AF067819

การวิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการจาก 16S rDNA (ซึ่งเป็นส่วนของพันธุกรรมที่มีการอนุรักษ์สูง) จาก *C. raciborskii* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 24 สายพันธุ์ รวมกับ *C. raciborskii* 2 สายพันธุ์ที่มีข้อมูลอยู่ใน GeneBank (AF067818 และ AF067819) และตัวแทนสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย 6 ยีนส์ โดยมี *E. coli* เป็น outgroup ซึ่งเมื่อทำการ alignment หลังจากปรับตำแหน่งเบสแล้ว เทียบได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 112-1488 ของ *E. coli* โดย 16S rDNA ของ

C. raciborskii จะมีจำนวนเบสเท่ากับ 1376 โดยมี DNA sequence similarity สูงกว่า 99.5 % (Table 15) และเมื่อทำการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการแล้วพบว่า *C. raciborskii* ทั้งหมดมีความใกล้เคียงกันมาก (Figure 13) โดยรวมกลุ่มอยู่ใน cluster เดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saker และ Neilan (2001) อย่างไรก็ตามโครงสร้างของต้นไม้วิวัฒนาการนี้อาจไม่น่าเชื่อถือมากนักเนื่องจากว่าความแตกต่างของจำนวนเบสใน 16S rDNA ของ *C. raciborskii* มีน้อยมากจนไม่เพียงพอที่จะแสดงถึงความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการได้

Table 13 Base sequences of 16S rDNA of *Cylindrospermopsis* sp. Isolated from Thailand, Japan and Australia.

>51001

```

CGGGTGAGTA ACGCGTGAGA ATCTGGCTCC AGGTCGGGGA TAACAGTTGG AAACGACTGC
TAATACCGGA TGTGCCGAGA GGTGAAAGAT TTATTGCCTG GAGATGAGCT CGCGTCTGAT
TAGCTAGTTG GTGGTGTAAG GGACCACCAA GCGTCGATC AGTAGCTGGT CTGAGAGGAT
GATCAGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA
TTTTCCGCAA TGGGCGAAAG CCTGACGGAG CAATACCGCG TGAGGGAGGA AGGCTCTTGG
GTCGTAAACC TCTTTTCTCA AGGAAGAAGA AAGTGACGGT ACTTGAGGAA TAAGCATCGG
CTAACTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGATGCA AGCGTTATCC GGAATGATTG
GGCGTAAAGG GTCTGCAGGT GGAAGTAAA GTCTGCTGTT AAAGAGTTTG GCTTAACCAA
ATAAAGCGG TGGAAGTAC AGAAGTAGAG TCGGGTAGGG GCAAAAGGAA TTCCTGGTGT
AGCGGTGAAA TCGGTAGATA TCAGGAAGAA CACCGGTGGC GAAAGCGTTT TGCTAGACCG
TAACTGACAC TGAGGGACGA AAGCTAGGGG AGCGAATGGG ATTAGATACC CCAGTAGTCC
TAGCCGTAAA CGATGGATAC TAGGCGTGGC TTGTATCGAC CCGAGCCGTG CCGGAGCTAA
CGCGTTAAGT ATCCCGCCTG GGGAGTACGC ACGCAAGTGT GAAACTCAA GGAATTGACG
GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGTATGTGGT TTAATTCGAT GCAACGCGAA GAACCTTACC
AAGACTTGAC ATCCTGCGAA TCCTGGTGAA AGCTGGGAGT GCCTTAGGGA GCGCAGAGAC
AGGTGGTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTAAAGT CCCGCAACGA
GCGCAACCCT CGTTTTTAGT TGCCAGCATT AAGTTGGGCA CTCTAGAGAG ACTGCCGGTG
ACAAACCGGA GGAAGGTGAG GATGACGTCA AGTCAGCATG CCCCTTACGT CTTGGGCTAC
ACACGTACTA CAATGCTACG GACAGAGGGC AGCGAAGCCA GGGATGGCAA GCGAATCCAG
AAACCGTAGC TCAGTTCAGA TCGAAGGCTG CAACTCGCCT TCGTGAAGGA GGAATCGCTA
GTAATTGCAG GTCAGCATA TGCAGTGAAT TCGTTCCCGG GCCTTGTACA CACCGCCCGT
CACACCATGG AAGTTGGTCA CGCCCGAAGT CATTACCCCA ACCGAAAGGA GGGGGATGCC
TAAGGTAGGA CTGGTGACTG GGGTGAAGTC GTAACAAG

```

//

>51002

```

GTGAGTAACG CGTGAGAATC TGGCTCCAGG TCGGGGATAA CAGTTGGAAA CACTGCTAA
TACCGGATGT GCCGAGAGGT GAAAGATTTA TTGCCTGGAG ATGAGCTCGC GTCTGATTAG
CTAGTTGGTG GTGTAAGGGA CCACCAAGGC GTCGATCAGT AGCTGGTCTG AGAGGATGAT
CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATTT
TCCGCAATGG GCGAAAGCCT GACGGAGCAA TACCGCGTGA GGGAGGAAGG CTCTTGGGTC
GTAAACCTCT TTTCTCAAGG AAGAAGAAAG TGACGTACTG AGGAATAAGC ATCGGCTAAC
TCCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGGAGG ATGCAAGCGT TATCCGGAAT GATTGGGCGT
AAAGGGTCTG CAGGTGGAAC TGAAAGTCTG CTGTTAAAGA GTTTGGCTTA ACCAAATAAA
AGCGGTGGAA ACTACAGAAC TAGAGTGGG TAGGGGCAA AGGAATTCCCT GGTGTAGCGG
TGAAATGCGT AGATATCAGG AAGAACACCG GTGGCGAAAG CGTTTTGCTA GACCGTAAC
GACACTGAGG GACGAAAGCT AGGGGAGCGA ATGGGATTAG ATACCCAGT AGTCCTAGCC
GTAAACGATG GATACTAGGC GTGGCTTGTA TCGACCCGAG CCGTGCCGGA GCTAACGCGT
TAAGTATCCC GCCTGGGGAG TACGCACGCA AGTGTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGGC
CCGCACAAGC GGTGGAGTAT GTGGTTTAAAT TCGATGCAAC GCGAAGAACC TTACCAAGAC
TTGACATCCT GCGAATCCTG GTGAAAGCTA GGAGTGCCTT AGGGAGCGCA GAGACAGGTG
GTGCATGGCT GTCGTCAGCT CGTGTCGTGA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA
ACCTCGTTT TTAGTTGCCA GCATTAAGTT GGGCACTCTA GAGAGACTGC CGGTGACAAA
CCGGAGGAAG GTGAGGATGA CGTCAAGTCA GCATGCCCTT TACGTCTTGG GCTACACACG
TACTACAATG CTACGGACAG AGGGCAGCGA GCCAGGGATG GCAAGCGAAT CCAGAAACCG
TAGCTCAGTT CAGATCGAAG GCTGCAACTC GCCTTCGTGA AGGAGGAATC GCTAGTAATT
GCAGGTCAGC ATACTGCAGT GAATTTCGTT CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCACACC
ATGGAAGTTG GTCACGCCCG AAGTCATTAC CCCAACCGAA AGGAGGGGGA TGCCTAAGGT
AGGACTGGTG ACTGGGGTGA AGTCGTAACA AGGT

```

//

Table 13 (continued).

>51003

TGGCGCACGG	TGAGTAACGC	GTGAGAATCT	GGCTCCAGGT	CGGGGATAAC	AGTTGGAAAC
GACTGCTAAT	ACCGGATGTG	CCGAGAGGTG	AAAGATTTAT	TGCCTGGAGA	TGAGCTCGCG
TCTGATTAGC	TAGTTGGTGG	TGTAAGGGAC	CACCAAGGCG	TCGATCAGTA	GCTGGTCTGA
GAGGATGATC	AGCCACACTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAGA	CTCCTACGGG	AGGCAGCAGT
GGGGAATTTT	CCGCAATGGG	CGAAAGCCTG	ACGGAGCAAT	ACCGCGTGAG	GGAGGAAGGC
TCTTGGGTCTG	TAAACCTCTT	TTCTCAAGGA	AGAAGAAAGT	GACGGTACTT	GAGGAATAAG
CATCGGCTTA	ACTCCGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGGA	GGATGCAAGC	GTTATCCGGA
ATGATTGGGC	GTAAAGGGTC	TGCAGGTGGA	ACTGAAAGTC	TGCTGTTAAA	GAGTTTGGCT
TAACCAAATA	AAAGCGGTGG	AAACTACAGA	ACTAGAGTGC	GGTAGGGGCA	AAAGGAATTC
CTGGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGATATCA	GGAAGAACAC	CGGTGGCGAA	AGCGTTTTGC
TAGACCGTAA	CTGACACTGA	GGGACGAAAG	CTAGGGGAGC	GAATGGGATT	AGATACCCCA
GTAGTCCTAG	CCGTAAACGA	TGGATACTAG	GCGTGGCTTG	TATCGACCCG	AGCCGTGCCG
GAGCTAACGC	GTTAAGTATC	CCGCCTGGGG	AGTACGCACG	CAAGTGTGAA	ACTCAAAGGA
ATTGACGGGG	GCCCCGACAA	GCGGTGGAGT	ATGTGGTTTA	ATTTCGATGCA	ACGCGAAGAA
CCTTACCAAG	ACTTGACATC	CTGCGAATCC	TGGTGAAAGC	TGGGAGTGCC	TTAGGGAGCG
CAGAGACAGG	TGGTGCATGG	CTGTCTCGTC	CTCGTGTCTG	GAGATGTTGG	GTTAAGTCCC
GCAACGAGCG	CAACCCTCGT	TTTTAGTTGC	CAGCATTAAAG	TTGGGCACTC	TAGAGAGACT
GCCGGTGACA	AACCGGAGGA	AGGTGAGGAT	GACGTCAAGT	CAGCATGCCC	CTTACGTCTT
GGGCTACACA	CGTACTACAA	TGCTACGGAC	AGAGGGCAGC	AAGCCAGGGA	TGGCAAGCGA
ATCCAGAAAC	CGTAGCTCAG	TTCAGATCGA	AGGCTGCAAC	TCGCCTTCGT	GAAGGAGGAA
TCGCTAGTAA	TTGCAGGTCA	GCATACTGCA	GTGAATTTCGT	TCCCCGGCCT	TGTACACACC
GCCCGTCACA	CCATGGAAGT	TGGTCACGCC	CGAAGTCATT	ACCCCAACCG	AAAGGAGGGG
GATGCCTAAG	GTAGGACTGG	TGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC	GTA

//

>51004

GGGTGAGTAA	CGCGTGAGAA	TCTGGCTCCA	GGTCGGGGAT	AACAGTTGGA	AACGACTGCT
AATACCGGAT	GTGCCGAGAG	GTGAAAGATT	TATTGCCTGG	AGATGAGCTC	GCGTCTGATT
AGCTAGTTGG	TGGTGTAAAG	GACCACCAAG	GCGTCGATCA	GTAGCTGGTC	TGAGAGGATG
ATCAGCCACA	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTGGGGAAT
TTTCCGCAAT	GGGCGAAAGC	CTGACGGAGC	AATACCGCGT	GAGGGAGGAA	GGCTCTTGGG
TCGTAAACCT	CTTTTCTCAA	GGAAGAAGAA	AGTGACGGTA	CTTGAGGAAT	AAGCATCGGC
TAACCTCCGTG	CCAGCAGCCG	CGGTAATACG	GAGGATGCAA	GCGTTATCCG	GAATGATTGG
GCGTAAAGGG	TCTGCAGGTG	GAAGTGAAG	TCTGCTGTTA	AAGAGTTTGG	CTTAACCAAA
TAAAAGCGGT	GGAAACTACA	GAAGTAGAGT	GCGGTAGGGG	CAAAAGGAAT	TCCTGGTGTA
GCGGTGAAAT	GCGTAGATAT	CAGGAAGAAG	ACCGGTGGCG	AAAGCGTTTT	GCTAGACCGT
AACTGACACT	GAGGGACGAA	AGCTAGGGGA	GCGAATGGGA	TTAGATACCC	CAGTAGTCCT
AGCCGTAAAC	GATGGATACT	AGGCGTGGCT	TGTATCGACC	CGAGCCGTGC	CGGAGCTAAC
GCGTTAAGTA	TCCCGCCTGG	GGAGTACGCA	CGCAAGTGTG	AAACTCAAAG	GAATTGACGG
GGGCCCCGCAC	AAGCGGTGGA	GTATGTGGTT	TAATTTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCA
AGACTTGACA	TCCTGCGAAT	CCCCGTGAAA	GCTGGGAGTG	CCTTAGGGAG	CGCAGAGACA
GGTGGTGCAT	GGCTGTCTGC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG
CGCAACCCTC	GTTTTTGTAGT	GCCAGCATTA	AGTTGGGCAC	TCTAGAGAGA	CTGCCCGTGA
CAAACCGGAG	GAAGGTGAGG	ATGACGTCAA	GTCAGCATGC	CCCTTACGTC	TTGGGCTACA
CACGTACTAC	AATGCTACGG	ACAGAGGGCA	GCAAGCCAGG	GATGGCAAGC	GAATCCAGAA
ACCGTAGCTC	AGTTCAGATC	GAAGGCTGCA	ACTCGCCTTC	GTGAAGGAGG	AATCGCTAGT
AATTGCAGGT	CAGCATACTG	CAGTGAATTC	GTTCCCGGGC	CTTGTAACACA	CCGCCCCGTCA
CACCATGGAA	GTTGGTCACG	CCCGAAGTCA	TTACCCCAAC	CGAAAGGAGG	GGGATGCCTA
AGGTAGGACT	GGTGAAGTGG	GTGAAGTCGT	AACAAGGT		

//

Table 13 (continued).

>51005

```

TGGCGCACGG GTGAGTAACG CGTGAGAATC TGGCTCCAGG TCGGGGATAA CAGTTGGAAA
CGACTGCTAA TACCGGATGT GCCGAGAGGT GAAAGATTTA TTGCCTGGAG ATGAGCTCGC
GTCTGATTAG CTAGTTGGTG GTGTAAGGGA CCACCAAGGC GTCGATCAGT AGCTGGTCTG
AGAGGATGAT CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG
TGGGGAATTT TCCGCAATGG GCGAAAGCCT GACGGAGCAA TACCGCGTGA GGGAGGAAGG
CTCTTGGGTC GTAAACCTCT TTTCTCAAGG AAGAAGAAAG TGACGTACTT GAGGAATAAG
CATCGGCTAA CTCCGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGGAG GATGCAAGCG TTATCCGGAA
TGATTGGGCG TAAAGGTGCT GCAGGTGGAA CTGAAAGTCT GCTGTTAAAG AGTTTGGCTT
AACCAAATAA AAGCGGTGGA AACTACAGAA CTAGAGTGCG GTAGGGGCAA AAGGAATTCC
TGGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGATATCAG GAAGAACACC GGTGGCGAAA GCGTTTTGCT
AGACCGTAAC TGACACTGAG GGACGAAAGC TAGGGGAGCG AATGGGATTA GATACCCAG
TAGTCCTAGC CGTAAACGAT GGATACTAGG CGTGGCTTGT ATCGACCCGA GCCGTGCCGG
AGCTAACGCG TTAAGTATCC CGCCTGGGGA GTACGCACGC AAGTGTGAAA CTCAAAGGAA
TTGACGGGGG CCCGCACAAG CCGTGGAGTA TGTGGTTTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC
CTTACCAAGA CTTGACATCC TCGGAATCCT GGTGAAAGCT AGGAGTGCCT TAGGGAGCGC
AGAGACAGGT GGTGCATGGC TGTCGTCAGC TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCG
CAACGAGCGC AACCCCTCGTT TTTAGTTGCC AGCATTAAAGT TGGGCACTCT AGAGAGACTG
CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGAGGATG ACGTCAAGTC AGCATGCCCC TTACGTCTTG
GGCTACACAC GTACTACAAT GCTACGGACA GAGGGCAGCA AGCCAGGGAT GGCAAGCGAA
TCCAGAAACC GTAGCTCAGT TCAGATCGAA GGCTGCAACT CGCCTTCGTG AAGGAGGAAT
CGCTAGTAAT TGCAGGTCAG CATACTGCAG TGAATTCGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG
CCCGTCACAC CATGGAAGTT GGTACGCCCC GAAGTCATTA CCCCAACCGA AAGGAGGGGG
ATGCCTAAGG TAGGACTGGT GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG T

```

//

>51006

```

TGGCGCACGG GTGAGTAACG CGTGAGAATC TGGCTCCAGG TCGGGGATAA CAGTTGGAAA
CGACTGCTAA TACCGGATGT GCCGAGAGGT GAAAGATTTA TTGCCTGGAG ATGAGCTCGC
GTCTGATTAG CTAGTTGGTG GTGTAAGGGA CCACCAAGGC GTCGATCAGT AGCTGGTCTG
AGAGGATGAT CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG
TGGGGAATTT TCCGCAATGG GCGAAAGCCT GACGGAGCAA TACCGCGTGA GGGAGGAAGG
CTCTTGGGTC GTAAACCTCT TTTCTCAAGG AAGAAGAAAG TGACGGTACT TGAGGAATAA
GCATCGGCTA ACTCCGTGCC AGCAGGCCGC GTAATACGGA GGATGCAAGC GTTATCCGGA
ATGATTGGGC GTAAAGGGTC TGCAGGTGGA ACTGAAAGTC TGCTGTTAAA GAGTTTGGCT
TAACCAAATA AAAGCGGTGG AAACACAGA ACTAGAGTGC GGTAGGGGCA AAAGGAATTC
CTGGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGATATCA GGAAGAACAC CGGTGGCGAA AGCGTTTTGC
TAGACCGTAA CTGACACTGA GGGACGAAAG CTAGGGGAGC GAATGGGATT AGATACCCCA
GTAGTCCTAG CCGTAAACGA TGGATACTAG GCGTGGCTTG TATCGACCCG AGCCGTGCCG
GAGCTAACGC GTTAAGTATC CCGCCTGGGG AGTACGCACG CAAGTGTGAA ACTCAAAGGA
ATTGACGGGG GCCCGCACAA GCGGTGGAGT ATGTGGTTTA ATTGATGCA ACGCGAAGAA
CCTTACCAAG ACTTGACATC CTGCGAATCC TGGTGAAAGC TAGGAGTGCC TTAGGGAGCG
CAGAGACAGG TGGTGCATGG CTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC
GCAACGAGCG CAACCCTCGT TTTTAGTTGC CAGCATTAAG TTGGGCACTC TAGAGAGACT
GCCGGTGACA AACCGGAGGA AGGTGAGGAT GACGTCAAGT CAGCATGCCC CTTACGTCTT
GGGCTACACA CGTACTACAA TGCTACGGAC AGAGGGCAGC AAGCCAGGGA TGGCAAGCGA
ATCCAGAAAC CGTAGCTCAG TTCAGATCGA AGGCTGCAAC TCGCCTTCGT GAAGGAGGAA
TCGCTAGTAA TTGCAGGTCA GCATACTGCA GTGAATTCGT TCCCGGGCCT TGTACACACC
GCCCGTCACA CCATGGAAGT TGGTCACGCC CGAAGTCATT ACCCAACCG AAAGGAGGGG
GATGCCTAAG GTAGGACTGG TGAAGTGGGT GAAGTCGTAA CAAGG

```

//

Table 13 (continued).

>51007

GGTGAGTAAC	GCGTGAGAAT	CTGGCTCCAG	GTCGGGGATA	ACAGTTGGAA	ACGACTGCTA
ATACCGGATG	TGCCGAGAGG	TGAAAGATTT	ATTGCCTGGA	GATGAGCTCG	CGTCTGATTA
GCTAGTTGGT	GGTGTAAGGG	ACCACCAAGG	CGTCGATCAG	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA
TCAGCCACAC	TGGGACTGAG	ACACGGCCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTGGGGGAATT
TTCCGCAATG	GGCGAAAGCC	TGACGGAGCA	ATACCGCGTG	AGGGAGGAAG	GCTCTTGGGT
CGTAAACCTC	TTTTCTCAAG	GAAGAAGAAA	GTGACGGTAC	TTGAGGAATA	AGCATCGGCT
AACTCCGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGG	AGGATGCAAG	CGTTATCCGG	AATGATTGGG
CGTAAAGGGT	CTGCAGGTGG	AACTGAAAGT	CTGCTGTAA	AGAGTTTGGC	TTAACCAAAT
AAAAGCGGTG	GAAACTACAG	AACTAGAGTG	CGGTAGGGGC	AAAAGGAATT	CCTGGTGTAG
CGGTGAAATG	CGTAGATATC	AGGAAGAACA	CCGGTGGCGA	AAGCGTTTTG	CTAGACCGTA
ACTGACACTG	AGGGACGAAA	GCTAGGGGAG	CGAATGGGAT	TAGATACCCC	AGTAGTCCTA
GCCGTAAACG	ATGGATACTA	GGCGTGGCTT	GTATCGACCC	GAGCCGTGCC	GGAGCTAACG
CGTTAAGTAT	CCCGCCTGGG	GAGTACGCAC	GCAAGTGTGA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG
GGCCCGCACA	AGCGGTGGAG	TATGTGGTTT	AATTCGATGC	AACGCGAAGA	ACCTTACCAA
GACTTGACAT	CCTGCGAATC	CTGGTGAAAG	CTGGGAGTGC	CTTAGGGAGC	GCAGAGACAG
GTGGTGCATG	GCTGTCGTCA	GCTCGTGTCT	TGAGATGTTG	GGTTAAGTCC	CGCAACGAGC
GCAACCCTCG	TTTTTAGTTG	CCAGCATTA	GTTGGGCACT	CTAGAGAGAC	TGCCGGTGAC
AAACCGGAGG	AAGGTGAGGA	TGACGTCAAG	TCAGCATGCC	CCTTACGTCT	TGGGCTACAC
ACGTACTACA	ATGCTACGGA	CAGAGGGCAG	CAAGCCAGGG	ATGGCAAGCG	AATCCAGAAA
CCGTAGCTCA	GTTTCAGATCG	AAGGCTGCAA	CTCGCCTTCG	TGAAGGAGGA	ATCGCTAGTA
ATTGCAGGTC	AGCATACTGC	AGTGAATTCG	TTCCCGGGCC	TTGTACACAC	CGCCCGTCAC
ACCATGGAAG	TTGGTCAACG	CCGAAGTCAT	TACCCCAACC	GAAAGGAGGG	GGATGCCTAA
GGTAGGACTG	GTGACTGGGG	TGAAGTCGTA	ACAAGG		

//

>51008

GGTGAGTAAC	GCGTGAGAAT	CTGGCTCCAG	GTCGGGGATA	ACAGTTGGAA	ACGACTGCTA
ATACCGGATG	TGCCGAGAGG	TGAAAGATTT	ATTGCCTGGA	GATGAGCTCG	CGTCTGATTA
GCTAGTTGGT	GGTGTAAGGG	ACCACCAAGG	CGTCGATCAG	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA
TCAGCCACAC	TGGGACTGAG	ACACGGCCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTGGGGGAATT
TTCCGCAATG	GGCGAAAGCC	TGACGGAGCA	ATACCGCGTG	AGGGAGGAAG	GCTCTTGGGT
CGTAAACCTC	TTTTCTCAAG	GAAGAAGAAA	GTGACGGTAC	TTGAGGAATA	AGCATCGGCT
AACTCCGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGG	AGGATGCAAG	CGTTATCCGG	AATGATTGGG
CGTAAAGGGT	CTGCAGGTGG	AACTGAAAGT	CTGCTGTAA	AGAGTTTGGC	TTAACCAAAT
AAAAGCGGTG	GAAACTACAG	AACTAGAGTG	CGGTAGGGGC	AAAAGGAATT	CCTGGTGTAG
CGGTGAAATG	CGTAGATATC	AGGAAGAACA	CCGGTGGCGA	AAGCGTTTTG	CTAGACCGTA
ACTGACACTG	AGGGACGAAA	GCTAGGGGAG	CGAATGGGAT	TAGATACCCC	AGTAGTCCTA
GCCGTAAACG	ATGGATACTA	GGCGTGGCTT	GTATCGACCC	GAGCCGTGCC	GGAGCTAACG
CGTTAAGTAT	CCCGCCTGGG	GAGTACGCAC	GCAAGTGTGA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG
GGCCCGCACA	AGCGGTGGAG	TATGTGGTTT	AATTCGATGC	AACGCGAAGA	ACCTTACCAA
GACTTGACAT	CCTGCGAATC	CTGGTGAAAG	CTGGGAGTGC	CTTAGGGAGC	GCAGAGACAG
GTGGTGCATG	GCTGTCGTCA	GCTCGTGTCT	TGAGATGTTG	GGTTAAGTCC	CGCAACGAGC
GCAACCCTCG	TTTTTAGTTG	CCAGCATTA	GTTGGGCACT	CTAGAGAGAC	TGCCGGTGAC
AAACCGGAGG	AAGGTGAGGA	TGACGTCAAG	TCAGCATGCC	CCTTACGTCT	TGGGCTACAC
ACGTACTACA	ATGCTACGGA	CAGAGGGCAG	CGAGCCAGGG	ATGGCAAGCG	AATCCAGAAA
CCGTAGCTCA	GTTTCAGATCG	AAGGCTGCAA	CTCGCCTTCG	TGAAGGAGGA	ATCGCTAGTA
ATTGCAGGTC	AGCATACTGC	AGTGAATTCG	TTCCCGGGCC	TTGTACACAC	CGCCCGTCAC
ACCATGGAAG	TTGGTCAACG	CCGAAGTCAT	TACCCCAACC	GAAAGGAGGG	GGATGCCTAA
GGTAGGACTG	GTGACTGGGG	TGAAGTCGTA	ACAAGG		

//

Table 13 (continued).

>51009

```

GGTGAGTAAC GCGTGAGAAT CTGGCTCCAG GTCGGGGATA ACAGTTGGAA ACGACTGCTA
ATACCGGATG TGCCGAAAGG TGAAAGATTT ATTGCCTGGA GATGAGCTCG CGTCTGATTA
GCTAGTTGGT GGTGTAAGGG ACCACCAAGG CGTCGATCAG TAGCTGGTCT GAGAGGATGA
TCAGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGGAATT
TTCCGCAATG GGCGAAAGCC TGACGGAGCA ATACCGCGTG AGGGAGGAAG GCTCTTGGGT
CGTAAACCTC TTTTCTCAAG GAAGAAGAAA GTGACGGTAC TTGAGGAATA AGCATCGGCT
AACTCCGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGG AGGATGCAAG CGTTATCCGG AATGATTGGG
CGTAAAGGGT CTGCAGGTGG AACTGAAAGT CTGCTGTTAA AGAGTTTGGC TTAACCAAAT
AAAAGCGGTG GAAACTACAG AACTAGAGTG CGGTAGGGGC AAAAGGAATT CCTGGTGTAG
CGGTGAAATG CGTAGATATC AGGAAGAACA CCGGTGGCGA AAGCGTTTGT CTAGACCGTA
ACTGACACTG AGGGACGAAA GCTAGGGGAG CGAATGGGAT TAGATACCCC AGTAGTCCTA
GCCGTAAACG ATGGATACTA GGCCTGGCTT GTATCGACCC GAGCCGTGCC GGAGCTAACG
CGTTAAGTAT CCCGCCTGGG GAGTACGCAC GCAAGTGTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG
GGCCCGCACA AGCGGTGGAG TATGTGGTTA ATTCTGATGA ACGCGAAGAA CCTTACCAAG
ACTTGACATC CTGCGAATCC CCGTGAAAGC TGGGAGTGCC CTTAGGGAGC GCAGAGACAG
GTGGTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTCTG TGAGATGTTG GGTTAAGTCC CGCAACGAGC
GCAACCCTCG TTTTTAGTTG CCAGCATTA GTTGGGCACT CTAGAGAGAC TGCCGGTGAC
AAACCGGAGG AAGGTGAGGA TGACGTCAAG TCAGCATGCC CTTTACGTCT TGGGCTACAC
ACGTACTACA ATGCTACGGA CAGAGGGCAG CAGAGCCAGG GATGGCAAGC GAATCCAGAA
ACCGTAGCTC AGTTCAGATC GAAGGCTGCA ACTCGCCTTC GTGAAGGAGG AATCGCTAGT
AATTGCAGGT CAGCATACTG CAGTGAATTC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA
CACCATGGAA GTTGGTCAAC CCCGAAGTCA TTACCCCAAC CGAAAGGAGG GGGATGCCTA
AGGTAGGACT GGTGACTGGG GTGAAGTCGT AACAAGGT

```

//

>51010

```

GGCGCACGGG TGAGTAACGC GTGAGAATCT GGCTCCAGGT CGGGGATAAC AGTTGGAAAC
GACTGCTAAT ACCGGATGTG CCGAGAGGTG AAAGATTTAT TGCCTGGAGA TGAGCTCGCG
TCTGATTAGC TAGTTGGTGG TGTAAGGGAC CACGCAAGGC GTCGATCAGT AGCTGGTCTG
AGAGGATGAT CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG
TGGGGAATTT TCCGCAATGG GCGAAAGCCT GACGGAGCAA TACCGCGTGA GGGAGGAAGG
CTCTTGGGTC GTAAACCTCT TTTCTCAAGG AAGAAGAAAG TGACGTACTT GAGGAATAAG
CATCGGCTAC TCCGTGCCAA GCAGCCCGGT AATACGGAGG ATGCAAGCGT TATCCGGAAT
GATTGGGCGT AAAGGGTCTG CAGGTGGAAC TGAAAGTCTG CTGTTAAAGA GTTTGGCTTA
ACCAAATAAA AGCGGTGGAA ACTACAGAAC TAGAGTGCGG TAGGGGCAAA AGGAATTCCT
GGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATCAGG AAGAACACCG GTGGCGAAAG CGTTTTGCTA
GACCGTAAT GACACTGAGG GACGAAAGCT AGGGGAGCGA ATGGGATTAG ATACCCAGT
AGTCCTAGCC GTAAACGATG GATACTAGGC GTGGCTTGTA TCGACCCGAG CCGTGCCGGA
GCTAACGCGT TAAGTATCCC GCCTGGGGAG TACGCACGCA AGTGTGAAAC TCAAAGGAAT
TGACGGGGGC CCGCACAAGC GGTGGAGTAT GTGGTTTAAAT TCGATGCAAC GCGAAGAACC
TTACCAAGAC TTGACATCCT GCGAATCCTG GTGAAAGCTG GGAGTGCCTT AGGGAGCGCA
GAGACAGGTG GTGCATGGCT GTCGTCAGCT CGTGTCTGTA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC
AACGAGCGCA ACCCTCGTTT TTAGTTGCCA GCATTAAGTT GGGCACTCTA GAGAGACTGC
CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGAGGATGA CGTCAAGTCA GCATGCCCTT TACGTCTTGG
GCTACACACG TACTACAATG CTACGGACAG AGGGCAGCGA GCCAGGGATG GCAAGCGAAT
CCAGAAACCG TAGCTCAGTT CAGATCGAAG GCTGCAACTC GCCTTCGTGA AGGAGGAATC
GCTAGTAATT GCAGGTCAGC ATACTGCAGT GAATTCGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC
CCGTACACC ATGGAAGTTG GTCACGCCCC AAGTCATTAC CCCAACCGAA AGGAGGGGGA
TGCCTAAGGT AGGACTGGTG ACTGGGGTGA AGTCGTAACA AGGT

```

//

Table 13 (continued).

>51011

```

GGGTGAGTAA\ CGCGTGAGAA TCTGGCTCCA GGTGCGGGAT AACAGTTGGA AACGACTGCT
AATACCGGAT GTGCCGAGAG GTGAAAGATT TATTGCCTGG AGATGAGCTC GCGTCTGATT
AGCTAGTTGG TGGTGTAAGG GACCACCAAG GCGTCGATCA GTAGCTGGTC TGAGAGGATG
ATCAGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT
TTTCCGCAAT GGGCGAAAGC CTGACGGAGC AATACCGCGT GAGGGAGGAA GGCTCTTGGG
TCGTAAACCT CTTTTCTCAA GGAAGAAGAA AGTGACGGTA CTTGAGGAAT AAGCATCGGC
TAACTCCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG GAGGATGCAA GCGTTATCCG GAATGATTGG
GCGTAAAGGG TCTGCAGGTG GAACTGAAAG TCTGCTGTTA AAGAGTTTGG CTTAACCAAA
TAAAAGCGGT GGAAACTACA GAACTAGAGT GCGGTAGGGG CAAAAGGAAT TCCTGGTGTA
GCGGTGAAAT GCGTAGATAT CAGGAAGAAC ACCGGTGGCG AAAGCGTTTT GCTAGACCGT
AACTGACACT GAGGGACGAA AGCTAGGGGA GCGAATGGGA TTAGATACCC CAGTAGTCCT
AGCCGTAAAC GATGGATACT AGGCGTGGCT TGTATCGACC CGAGCCGTGC CGGAGCTAAC
GCGTTAAGTA TCCCGCCTGG GGAGTACGCA CGCAAGTGTG AAACCTCAAAG GAATTGACGG
GGGCCCACAC AAGCGGTGGA GTATGTGGTT TAATTGATG CAACGCGAAG AACCTTACCA
AGACTTGACA TCCTGCGAAT CCTGGTGAAA GCTAGGAGTG CCTTAGGGAG CGCAGAGACA
GGTGGTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG
CGCAACCCTC GTTTTTAGTT GCCAGCATTA AGTTGGGCAC TCTAGAGAGA CTGCCGGTGA
CAAACCGGAG GAAGGTGAGG ATGACGTCAA GTCAGCATGC CCCTTACGTC TTGGGCTACA
CACGTACTAC AATGCTACGG ACAGAGGGCA GCAAGCCAGG GATGGCAAGC GAATCCAGAA
ACCGTAGCTC AGTTCAGATC GAAGGCTGCA ACTCGCCTTC GTGAAGGAGG AATCGCTAGT
AATTGCAGGT CAGCATACTG CAGTGAATTC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA
CACCATGGAA GTTGGTCACG CCCGAAGTCA TTACCCCAAC CGAAAGGAGG GGGATGCCTA
AGGTAGGACT GGTGACTGGG GTGAAGTCGT AACAAAGT

```

//

>51012

```

GGTGAGTAAC GCGTGAGAAT CTGGCTCCAG GTCGGGGATA ACAGTTGGAA ACGACTGCTA
ATACCGGATG TGCCGAGAGG TGAAAGATTT ATTGCCTGGA GATGAGCTCG CGTCTGATTA
GCTAGTTGGT GGTGTAAGGG ACCACCAAGG GGTGCGATCAG TAGCTGGTCT GAGAGGATGA
TCAGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATT
TTCCGCAATG GGCGAAAGCC TGACGGAGCA ATACCGCGTG AGGGAGGAAG GCTCTTGGGT
CGTAAACCTC TTTTCTCAAG GAAGAAGAAA GTGACGGTAC TTGAGGAATA AGCATCGGCT
AACTCCGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGG AGGATGCAAG CGTTATCCGG AATGATTGGG
CGTAAAGGGT CTGCAGGTGG AACTGAAAGT CTGCTGTAA AGAGTTTGGC TTAACCAAAT
AAAAGCGGTG GAAACTACAG AACTAGAGTG CCGTAGGGGC AAAAGGAATT CCTGGTGTAG
CGGTGAAATG CGTAGATATC AGGAAGAACA CCGGTGGCGA AAGCGTTTTG CTAGACCGTA
ACTGACACTG AGGGACGAAA GCTAGGGGAG CGAATGGGAT TAGATACCCC AGTAGTCCTA
GCCGTAAACG ATGGATACTA GCGGTGGCTT GTATCGACCC GAGCCGTGCC GGAGCTAACG
CGTTAAGTAT CCGGCCTGGG GAGTACGCAC GCAAGTGTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG
GGCCCGCACA AGCGGTGGAG TATGTGGTTT AATTCGATGC AACCGGAAGA ACCTTACCAA
GACTTGACAT CCTGCGAATC CTGGTGAAAG CTGGGAGTGC CTTAGGGAGC GCAGAGACAG
GTGGTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG GGTTAAGTCC CGCAACGAGC
GCAACCCTCG TTTTtagTTG CCAGCATTA GTTGGGCACT CTAGAGAGAC TGCCGGTGAC
AAACCGGAGG AAGGTGAGGA TGACGTCAAG TCAGCATGCC CTTACGTCT TGGGCTACAC
ACGTACTACA ATGCTACGGA CAGAGGGCAG CGAGCCAGGG ATGGCAAGCG AATCCAGAAA
CCGTAGCTCA GTTCAGATCG AAGGCTGCAA CTCGCCTTCG TGAAGGAGGA ATCGCTAGTA
ATTGCAGGTC AGCATACTGC AGTGAATTCG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC
ACCATGGAAG TTGGTCACGC CCGAAGTCAT TACCCCAACC GAAAGGAGGG GGATGCCTAA
GGTAGGACTG GTGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAA

```

//

Table 13 (continued).

>51013

```

GTGAGTAACG CGTGAGAATC TGGCTCCAGG TCGGGGATAA CAGTTGGAAA CGACTGCTAA
TACCGGATGT GCCGAnAGGT GAAAGATTTA TTGCCTGGAG ATGAGCTCGC GTCTGATTAG
CTAGTTGGTG GTGTAAGGGA CCACCAAGGC GTCGATCAGT AGCTGGTCTG AGAGGATGAT
CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATTT
TCCGCAATGG GCGAAAGCCT GACGGAGCAA TACCGCGTGA GGGAGGAAGG CTCTTGGGTC
GTAAACCTCT TTTCTCAAGG AAGAAGAAAG TGACGGTACT TGAGGAATAA GCATCGGCTA
ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGATGCAAGC GTTATCCGGA ATGATTGGGC
GTAAAGGGTC TGCAGGTGGA ACTGAAAGTC TGCTGTATAA GAGTTTGGCT TAACCAAATA
AAAGCGGTGG AAACCTACAGA ACTAGAGTGT GGTAGGGGCA AAAGGAATTC CTGGTGTAGC
GGTGAAATGC GTAGATATCA GGAAGAACAC CGGTGGCGAA AGCGTTTTGC TAGACCGTAA
CTGACACTGA GGGACGAAAG CTAGGGGAGC GAATGGGATT AGATACCCCA GTAGTCCTAG
CCGTAAACGA TGGATACTAG GCGTGGCTTG TATCGACCCG AGCCGTGCCG GAGCTAACGC
GTAAAGTATC CCGCCTGGGG AGTACGCACG CAAGTGTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG
GCCCGCACAA GCGGTGGAGT ATGTGGTTTA ATTCGATGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAAG
ACTTGACATC CTGCGAATCC TGGTGAAAGC TAGGAGTGCC TTAGGGAGCG CAGAGACAGG
TGGTGCATGG CTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG
CAACCCTCGT TTTTAGTTGC CAGCATTAAG TTGGGCACTC TAGAGAGACT GCCGGTGACA
AACC GGAGGA AGGTGAGGAT GACGTCAAGT CAGCATGCC CTTACGTCTT GGGCTACACA
CGTACTACAA TGCTACGGAC AGAGGGCAGC GAGCCAGGGA TGGCAAGCGA ATCCAGAAAC
CGTAGCTCAG TTCAGATCGA AGGCTGCAAC TCGCCTTCGT GAAGGAGGAA TCGCTAGTAA
TTGCAGGTCA GCATACTGCA GTGAATTCGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCGTCACA
CCATGGAAGT TGGTCACGCC CGAAGTCATT ACCCCAACCG AAAGGAGGGG GATGCCTAAG
GTAGGACTGG TGA CTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGT

```

//

>51014

```

GGTGAGTAAC GCGTGAGAAT CTGGCTCCAG GTCGGGGATA ACAGTTGGAA ACGACTGCTA
ATACCGGATG TGCCGAGAGG TGAAAGATTT ATTGCCTGGA GATGAGCTCG CGTCTGATTA
GCTAGTTGGT GGTGTAAGGG ACCACCAAGG CATCGATCAG TAGCTGGTCT GAGAGGATGA
TCAGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATT
TTCCGCAATG GGC GAAAGCC TGACGGAGCA ATACCGCGTG AGGGAGGAAG GCTCTTGGGT
CGTAAACCTC TTTTCTCAAG GAAGAAGAAA GTGACGGTAC TTGAGGAATA AGCATCGGCT
AACTCCGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGG AGGATGCAAG CGTTATCCGG AATGATTGGG
CGTAAAGGGT CTGCAGGTGG AACTGAAAGT CTGCTGTAA AGAGTTTGGC TTAACCAAT
AAAAGCGGTG GAAACTACAG AACTAGAGTG CGGTAGGGGC AAAAGGAATT CCTGGTGTAG
CGGTGAAATG CGTAGATATC AGGAAGAACA CCGGTGGCGA AAGCGTTTTG CTAGACCGTA
ACTGACACTG AGGGACGAAA GCTAGGGGAG CGAATGGGAT TAGATACCCC AGTAGTCCTA
GCCGTAAACG ATGGATACTA GGCGTGGCTT GTATCGACCC GAGCCGTGCC GGAGCTAACG
CGTTAAGTAT CCCGCCTGGG GAGTACGCAC GCAAGTGTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG
GGCCCGCACA AGCGGTGGAG TATGTGGTTT AATTCGATGC AACGCGAAGA ACCTTACCAA
GACTTGACAT CCTGCGAATC CTGGTGAAAG CTGGGAGTGC CTTAGGGAGC GCAGAGACAG
GTGGTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG GGTTAAGTCC CGCAACGAGC
GCAACCCTCG TTTT TAGTTG CCAGCATTA GTTGGGCACT CTAGAGAGAC TGCCGGTGAC
AAACCGGAGG AAGGTGAGGA TGACGTCAAG TCAGCATGCC CTTACGTCT TGGGCTACAC
ACGTACTACA ATGCTACGGA CAGAGGGCAG CAAGCCAGGG ATGGCAAGCG AATCCAGAAA
CCGTAGCTCA GTTCAGATCG AAGGCTGCAA CTCGCCTTCG TGAAGGAGGA ATCGCTAGTA
ATTGCAGGTC AGCATACTGC AGTGAATTCG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC
ACCATGGAAG TTGGTCACGC CCGAAGTCAT TACCCCAACC GAAAGGAGGG GGATGCCTAA
GGTAGGACTG GTGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAAGGT

```

//

Table 13 (continued).

>51015

```

GTGAGTAACG\CGTGAGAATC TGGCTCCAGG TCGGGGATAA CAGTTGGAAA CGACTGCTAA
TACCGGATGT GCCGAGAGGT GAAAGATTTA TTGCTTGGAG ATGAGCTCGC GTCTGATTAG
CTAGTTGGTG GTGTAAGGGA CCACCAAGGC GTGATCAGT AGCTGGTCTG AGAGGATGAT
CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCAG ACTCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATTT
TCCGCAATGG GCGAAAGCCT GACGGAGCAA TACCGCGTGA GGGAGGAAGG CTCTTGGGTC
GTAAACCTCT TTTCTCAAGG AAGAAGAAAG TGACGGTACT TGAGGAATAA GCATCGGCTA
ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGATGCAAGC GTTATCCGGA ATGATTGGGC
GTAAAGGGTC TGCAGGTGGA ACTGAAAGTC TGCTGTAAA GAGTTTGGCT TAACCAAATA
AAAGCGGTGG AAAGTACAGA ACTAGAGTGT GGTAGGGGCA AAAGGAATTC CTGGTGTAGC
GGTGAAATGC GTAGATATCA GGAAGAACAC CGGTGGCGAA AGCGTTTTGC TAGACCGTAA
CTGACACTGA GGGACGAAAG CTAGGGGAGC GAATGGGATT AGATACCCCA GTAGTCCTAG
CCGTAAACGA TGGATACTAG GCGTGGCTTG TATCGACCCG AGCCGTGCCG GAGCTAACGC
GTTAAGTATC CCGCCTGGGG AGTACGCACG CAAGTGTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG
GCCCCGACAA GCGGTGGAGT ATGTGGTTTA ATTCGATGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAAG
ACTTGACATC CTGCGAATCC TGGTGAAAGC TAGGAGTGCC TTAGGGAGCG CAGAGACAGG
TGGTGCATGG CTGTCGTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG
CAACCCTCGT TTTTAGTTGC CAGCATTAAG TTGGGCACTC TAGAGAGACT GCCGGTGACA
AACCGGAGGA AGGTGAGGAT GACGTCAAGT CAGCATGCC CTTACGTCTT GGGCTACACA
CGTACTACAA TGCTACGGAC AGAGGGCAGC GAGCCAGGGA TGGCAAGCGA ATCCAGAAAC
CGTAGCTCAG TTCAGATCGA AGGCTGCAAC TCGCCTTCGT GAAGGAGGAA TCGCTAGTAA
TTGCAGGTCA GCATACTGCA GTGAATTCGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCGTCACA
CCATGGAAGT TGGTCACGCC CGAAGTCATT ACCCCAACCG AAAGGAGGGG GATGCCTAAG
GTAGGACTGG TGAAGTGGGT GAAGTCGTAA CAAGGT

```

//

>51016

```

GCGCACGGGT GAGTAACGCG TGAGAATCTG GCTCCAGGTC GGGGATAACA GTTGGAACG
ACTGCTAATA CCGGATGTGC CGAGAGGTGA AAGATTTATT GCCTGGAAAT GAGCTCGCGT
CTGATTAGCT AGTTGGTGGT GTAAGGGACC ACCAAGGCGT CGATCAGTAG CTGGTCTGAG
AGGATGATCA GCCACACTGG GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG
GGGAATTTTC CGCAATGGGC GAAAGCCTGA CGGAGCAATA CCGCGTGAGG GAGGAAGGCT
CTTGGGTCGT AAACCTCTTT TCTCAAGGAA GAAGAAAGTG ACGGTACTTG AGGAATAAGC
ATCGGCTAAC TCCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGGAGG ATGCAAGCGT TATCCGGAAT
GATTGGGCGT AAAGGGTCTG CAGGTGGAAC TGAAAGTCTG CTGTTAAAGA GTTTGGCTTA
ACCAAATAAA AGCGGTGGAA ACTACAGAAC TAGAGTGCGG TAGGGGCAAA AGGAATTCCT
GGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATCAGG AAGAACACCG GTGGCGAAAG CGTTTTGCTA
GACCGTAAC TACACTGAGG GACGAAAGCT AGGGGAGCGA ATGGGATTAG ATACCCAGT
AGTCCTAGCC GTAAACGATG GATACTAGGC GTGGCTTGTA TCGACCCGAG CCGTGCCGGA
GCTAACGCGT TAAGTATCCC GCCTGGGGAG TACGCACGCA AGTGTGAAAC TCAAAGGAAT
TGACGGGGGC CCGCACAAGC GGTGGAGTAT GTGGTTTAAT TCGATGCAAC GCGAAGAACC
TTACCAAGAC TTGACATCCT GCGAATCCTG GTGAAAGCTG GGAGTGCCCT AGGGAGCGCA
GAGACAGGTG GTGCATGGCT GTCGTCAGCT CGTGTGCTGA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC
AACGAGCGCA ACCCTCGTTT TTAGTTGCCA GCATTAAGTT GGGCACTCTA GAGAGACTGC
CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGAGGATGA CGTCAAGTCA GCATGCCCTT TACGTCTTGG
GCTACACACG TACTACAATG CTACGGACAG AGGGCAGCGA GCCAGGGATG GCAAGCGAAT
CCAGAAACCG TAGCTCAGTT CAGATCGAAG GCTGCAACTC GCCTTCGTGA AGGAGGAATC
GCTAGTAATT GCAGGTGAGC ATACTGCAGT GAATTCGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC
CCGTACACAC ATGGAAGTTG GTCACGCCCG AAGTCATTAC CCAACCGAA AGGAGGGGGA
TGCTTAAGGT AGGACTGGTG ACTGGGGTGA AGTCGTAACA AGG

```

//

Table 13 (continued).

>51017

TGGCGCACCG	GGTGAGTAAC	GCGTGAGAAT	CTGGCTCCAG	GTCGGGGATA	ACAGTTGGAA
ACGACTGCTA	ATACCGGATG	TGCCGAGAGG	TGAAAGATTT	ATTGCCTGGA	GATGAGCTCG
CGTCTGATTA	GCTAGTTGGT	GGTGTAAGGG	ACCACCAAGG	CGTCGATCAG	TAGCTGGTCT
GAGAGGATGA	TCAGCCACAC	TGGGACTGAG	ACACGGCCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA
GTGGGGAATT	TTCCGCAATG	GGCGAAAGCC	TGACGGAGCA	ATACCGCGTG	AGGGAGGAAG
GCTCTTGGGT	CGTAAACCTC	TTTTCTCAAG	GAAGAAGAAA	GTGACGGTAC	TTGAGGAATA
AGCATCGGCT	AACTCCGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGG	AGGATGCAAG	CGTTATCCGG
AATGATTGGG	CGTAAAGGGT	CTGCAGGTGG	AACTGAAAGT	CTGCTGTTAA	AGAGTTTGGC
TTAACCAAAT	AAAAGCGGTG	GAAACTACAG	AACTAGAGTG	CGGTAGGGGC	AAAAGGAATT
CCTGGTGTAG	CGGTGAAATG	CGTAGATATC	AGGAAGAACA	CCGGTGGCGA	AAGCGTTTTG
CTAGACCGTA	ACTGACACTG	AGGGACGAAA	GCTAGGGGAG	CGAATGGGAT	TAGATACCCC
AGTAGTCCTA	GCCGTAAACG	ATGGATACTA	GGCGTGGCTT	GTATCGACCC	GAGCCGTGCC
GGAGCTAACG	CGTTAAGTAT	CCCGCCTGGG	GAGTACGCAC	GCAAGTGTGA	AACTCAAAGG
AATTGACGGG	GGCCCGCACA	AGCGGTGGAG	TATGGTGGTT	TAATTCGATG	CAACCGGAAG
AACCTTACCA	AGACTTGACA	TCCTGCGAAT	CCTGGTGAAA	GCTAGGAGTG	CCTTAGGGAG
CGCAGAGACA	GGTGGTGCAT	GGCTGTCTGC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT	GGGTAAAGTC
CCGCAACGAG	CGCAACCCTC	GTTTTTAGTT	GCCAGCATT	AGTTGGGCAC	TCTAGAGAGA
CTGCCGGTGA	CAAACCGGAG	GAAGGTGAGG	ATGACGTCAA	GTCAGCATGC	CCCTTACGTC
TTGGGCTACA	CACGTACTAC	AATGCTACGG	ACAGAGGGCA	GCGAGCCAGG	GATGGCAAGC
GAATCCAGAA	ACCGTAGCTC	AGTTCAGATC	GAAGGCTGCA	ACTCGCCTTC	GTGAAGGAGG
AATCGCTAGT	AATTGCAGGT	CAGCATACTG	CAGTGAATTC	GTTCCCGGGC	CTTGTAACACA
CCGCCCCGTC	CACCATGGAA	GTTGGTCAAG	CCCGAAGTCA	TTACCCCAAC	CGAAAGGAGG
GGGATGCCTA	AGGTAGGACT	GGTGACTGGG	GTGAAGTCGT	AACAAGGTAG	CCGT

//

>51018

GTGAGTAACG	CGTGAGAATC	TGGCTCCAGG	TGGGGGATAA	CAGTTGGAAA	CGACTGCTAA
TACCGGATGT	GCCGAGAGGT	GAAAGATTTA	TTGCCTGGAG	ATGAGCTCGC	GTCTGATTAG
CTAGTTGGTG	GTGTAAGGGA	CCACCAAGGC	GTCGATCAGT	AGCTGGTCTG	AGAGGATGAT
CAGCCACACT	GGGACTGAGA	CACGGCCCGG	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	TGGGGAATTT
TCCGCAATGG	GCGAAAGCCT	GACGGAGCAA	TACCGCGTGA	GGGAGGAAGG	CTCTTGGGTC
GTAAACCTCT	TTTCTCAAGG	AAGAAGAAAG	TGACGGTACT	TGAGGAATAA	GCATCGGCTA
ACTCCGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGGA	GGATGCAAGC	GTTATCCGGA	ATGATTGGGC
GTAAGGGGTC	TGCAGGTGGA	ACTGAAAGTC	TGCTGTTAAA	GAGTTTGGCT	TAACCAAATA
AAAGCGGTGG	AAACTACAGA	ACTAGAGTGC	GGTAGGGGCA	AAAGGAATTC	CTGGTGTAGC
GGTGAAATGC	GTAAGATATCA	GGAAGAACAC	CGGTGGCGAA	AGCGTTTTGC	TAGACCGTAA
CTGACACTGA	GGGACGAAAG	CTAGGGGAGC	GAATGGGATT	AGATACCCCA	GTAGTCCTAG
CCGTAAACGA	TGGATACTAG	GCGTGGCTTG	TATCGACCCG	AGCCGTGCCG	GAGCTAACGC
GTAAAGTATC	CCGCCTGGGG	AGTACGCACG	CAAGTGTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG
GCCCGCACAA	GCGGTGGAGT	ATGTGGTTTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAGAA	CCTTACCAAG
ACTTGACATC	CTGCGAATCC	TGGTGAAAGC	TGGGAGTGCC	TTCGGGAGCG	CAGAGACAGG
TGGTGCATGG	CTGTCTGTCAG	CTCGTGTCTG	GAGATGTTGG	GTTAAGTCCC	GCAACGAGCG
CAACCCTCGT	TTTTAGTTGC	CAGCATTAAG	TTGGGCACTC	TAGAGAGACT	GCCGGTGACA
AACCGGAGGA	AGGTGAGGAT	GACGTCAAGT	CAGCATGCCC	CTTACGTCTT	GGGCTACACA
CGTACTACAA	TGCTACGGAC	AGAGGGCAGC	GAGCCAGGGA	TGGCAAGCGA	ATCCAGAAAC
CGTAGCTCAG	TTCAGATCGA	AGGCTGCAAC	TCGCCTTCGT	GAAGGAGGAA	TCGCTAGTAA
TTGCAGGTCA	GCATACTGCA	GTGAATTCGT	TCCCGGGCCT	TGTACACACC	GCCCGTCACA
CCATGGAAGT	TGGTCAACGC	CGAAGTCATT	ACCCCAACCG	AAAGGAGGGG	GATGCCTAAG
GTAGGACTGG	TGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC	GTA	

//

Table 13 (continued).

>51019

```

GGGTGAGTAA CGCGTGAGAA TCTGGCTCCA GGTCGGGGAT AACAGTTGGA AACGACTGCT
AATACCGGAT GTGCCGAGAG GTGAAAGATT TATTGCCTGG AGATGAGCTC GCGTCTGATT
AGCTAGTTGG TGGTGTAAGG GACCACCAAG GCGTCGATCA GTAGCTGGTC TGAGAGGATG
ATCAGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT
TTTCCGCAAT GGGCGAAAGC CTGACGGAGC AATACCGCGT GAGGGAGGAA GGCTCTTGGG
TCGTAAACCT CTTTTCTCAA GGAAGAAGAA AGTGACGTAC TGAGGAATAA GCATCGGCTA
ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTATACGGAG GATGCAAGCG TTATCCGGAA TGATTGGGCG
TAAAGGGTCT GCAGGTGGAA CTGAAAGTCT GCTGTTAAAG AGTTTGGCTT AACCAAATAA
AAGCGGTGGA AACTACAGAA CTAGAGTGCG GTAGGGGCAA AAGGAATTCC TGGTGTAGCG
GTGAAATGCG TAGATATCAG GAAGAACACC GGTGGCGAAA GCGTTTTGCT AGACCGTAAC
TGACACTGAG GGACGAAAGC TAGGGGAGCG AATGGGATTA GATACCCAG TAGTCCTAGC
CGTAAACGAT GGATACTAGG CGTGGCTTGT ATCGACCCGA GCCGTGCCGG AGCTAACGCG
TTAAGTATCC CGCCTGGGGA GTACGCACGC AAGTGTGAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG
CCCGCACAAAG CGGTGGAGTA TGTGGTTTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAAGA
CTTGACATCC TGCGAATCCT GGTGAAAGCT AGGAGTGCCT TAGGGAGCGC AGAGACAGGT
GGTGCATGGC TGTCGTCAGC TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC
AACCTCGTT TTAGTTGCC AGCATTAAAGT TGGGCACTCT AGAGAGACTG CCGGTGACAA
ACCGGAGGAA GGTGAGGATG ACGTCAAGTC AGCATGCCCC TTACGTCTTG GGCTACACAC
GTACTACAAT GCTACGGACA GAGGGCAGCA AGCCAGGGAT GGCAAGCGAA TCCAGAAACC
GTAGCTCAGT TCAGATCGAA GGCTGCAACT CGCCTTCGTG AAGGAGGAAT CGCTAGTAAT
TGCAGGTCAG CATACTGCAG TGAATTCGTT CCCGGGCCCT GTACACACCG CCCGTCACAC
CATGGAAGTT GGTCACGCCC GAAGTCATTA CCCCAACCGA AAGGAGGGGG ATGCCTAAGG
TAGGACTGGT GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGG

```

//

>CRJ1

```

GGGTGAGTAA CGCGTGAGAA TCTGGCTCCA GGTCGGGGAT AACAGTTGGA AACGACTGCT
AATACCGGAT GTGCCGAGAG GTGAAAGATT TATTGCCTGG AGATGAGCTC GCGTCTGATT
AGCTAGTTGG TGGTGTAAGG GACCACCAAG GCGTCGATCA GTAGCTGGTC TGAGAGGATG
ATCAGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT
TTTCCGCAAT GGGCGAAAGC CTGACGGAGC AATACCGCGT GAGGGAGGAA GGCTCTTGGG
TCGTAAACCT CTTTTCTCAA GGAAGAAGAA AGTGACGTA CTTGAGGAAT AAGCATCGGC
TAACTCCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG GAGGATGCAA GCGTTATCCG GAATGATTGG
GCGTAAAGGG TCTGCAGGTG GAACTGAAAG TCTGCTGTTA AAGAGTTTGG CTTAACCAAA
TAAAAGCGGT GGAACTACA GAACTAGAGT GCGGTAGGGG CAAAAGGAAT TCCTGGTGTA
GCGGTGAAAT GCGTAGATAT CAGGAAGAAC ACCGGTGGCG AAAGCGTTTT GCTAGACCAT
AACTGACACT GAGGGACGAA AGCTAGGGGA GCGAATGGGA TTAGATACCC CAGTAGTCCT
AGCCGTAAAC GATGGATACT AGGCGTGGCT TGTATCGACC CGAGCCGTGC CGGAGCTAAC
GCGTTAAGTA TCCCGCCTGG GGAGTACGCA CGCAAGTGTG AAACTCAAAG GAATTGACGG
GGGCCCCGAC AAGCGGTGGA GTATGTGGTT TAATTCGATG CAACGCGAAG AACCTTACCA
AGACTTGACA TCCTGCGAAT CCTGGTGAAA GCTGGGAGTG CCTTAGGGAG CGCAGAGACA
GGTGGTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG
CGCAACCCTC GTTTTTAGTT GCCAGCATTA AGTTGGGCAC TCTAGAGAGA CTGCCGGTGA
CAAACCGGAG GAAGGTGAGG ATGACGTCAA GTCAGCATGC CCCTTACGTC TTGGGCTACA
CACGTACTAC AATGCTACGG ACAGAGGGCA GCAAGCCAGG GATGGCAAGC GAATCCAGAA
ACCGTAGCTC AGTTCAGATC GAAGGCTGCA ACTCGCCTTC GTGAAGGAGG AATCGCTAGT
AATTGCAGGT CAGCATACTG CAGTGAATTC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA
CACCATGGGA AGTTGGTAC GCGCGAAGTC ATTACCCCAA CCGAAAGGAG GGGGATGCCT
AAGGTAGGAC TGGTGACTGG GGTGAAGTCG TAACAAGGT

```

//

Table 13 (continued).

>CRJ2

```

GGTGAGTAAC GCGTGAGAAT CTGGCTCCAG GTCGGGGATA ACAGTTGGAA ACGACTGCTA
ATACCGGATG TGCCGAGAGG TGAAAGATTT ATTGCCTGGA GATGAGCTCG CGTCTGATTA
GCTAGTTGGT GGTGTAAGGG ACCACCAAGG CGTCGATCAG TAGCTGGTCT GAGAGGATGA
TCAGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATT
TTCCGCAATG GCGGAAAGCC TGACGGAGCA ATACCGCGTG AGGGAGGAAG GCTCTTGGGT
CGTAAACCTC TTTTCTCAAG GAAGAAGAAA GTGACGGTAC TTGAGGAATA AGCATCGGCT
AACTCCGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGG AGGATGCAAG CGTTATCCGG AATGATTGGG
CGTAAAGGGT CTGCAGGTGG AACTGAAAGT CTGCTGTTAA AGAGTTTGGC TTAACCAAAT
AAAAGCGGTG GAAACTACAG AACTAGAGTG CGGTAGGGGC AAAAGGAATT CCTGGTGTAG
CGGTGAAATG CGTAGATATC AGGAAGAACA CCGGTGGCGA AAGCGTTTTG CTAGACCGTA
ACTGACACTG AGGGACGAAA GCTAGGGGAG CGAATGGGAT TAGATACCCC AGTAGTCCTA
GCCGTAAACG ATGGATACTA GCGGTGGCTT GTATCGACCC GAGCCGTGCC GGAGCTAACG
CGTTAAGTAT CCCGCCTGGG GAGTACGCAC GCAAGTGTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG
GGCCCGCACA AGCGGTGGAG TATGTGGTTT AATTCGATGC AACGCGAAGA ACCTTACCAA
GACTTGACAT CCTGCGAATC CTGGTGAAAG CTGGGAGTGC CTTAGGGAGC GCAGAGACAG
GTGGTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTCTG TGAGATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC
GCAACCCTCG TTTTLAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT CTAGAGAGAC TGCCGGTGAC
AAACCGGAGG AAGGTGAGGA TGACGTCAAG TCAGCATGCC CCTTACGTCT TGGGCTACAC
ACGTACTACA ATGCTACGGA CAGAGGGCAG CGAGCCAGGG ATGGCAAGCG AATCCAGAAA
CCGTAGCTCA GTTCAGATCG AAGGCTGCAA CTCGCCCTCG TGAAGGAGGA ATCGCTAGTA
ATTGCAGGTC AGCATACTGC AGTGAATTCG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC
ACCATGGAAG TTGGTCACGC CCGAAGTCAT TACCCCAACC GAAAGGAGGG GGATGCCTAA
GGTAGGACTG GTGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAAG CCGTA

```

//

>KJA1

```

CGGGTGAGTA ACGCGTGAGA ATCTGGCTCC AGGTCGGGGA TAACAGTTGG AAACGACTGC
TAATACCGGA TGTGCCGAGA GGTGAAAGAT TTATTGCCTG GAGATGAGCT CGCGTCTGAT
TAGCTAGTTG GTGGTGTAAAG GGACCACCAA GGCGTCGATC AGTAGCTGGT CTGAGAGGAT
GATCAGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA
TTTTCCGCAA TGGGCGAAAG CCTGACGGAG CAATACCGCG TGAGGGAGGA AGGCTCTTGG
GTCGTAAACC TCTTTTCTCA AGGAAGAAGA AAGTGACGTA CTGAGGAATA AGCATCGGCT
AACTCCGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGG AGGATGCAAG CGTTATCCGG AATGATTGGG
CGTAAAGGGT CTGCAGGTGG AACTGAAAGT CTGCTGTTAA AGAGTTTGGC TTAACCAAAT
AAAAGCGGTG GAAACTACAG AACTAGAGTG CGGTAGGGGC AAAAGGAATT CCTGGTGTAG
CGGTGAAATG CGTAGATATC AGGAAGAACA CCGGTGGCGA AAGCGTTTTG CTAGACCGTA
ACTGACACTG AGGGACGAAA GCTAGGGGAG CGAATGGGAT TAGATACCCC AGTAGTCCTA
GCCGTAAACG ATGGATACTA GCGGTGGCTT GTATCGACCC GAGCCGTGCC GGAGCTAACG
CGTTAAGTAT CCCGCCTGGG GAGTACGCAC GCAAGTGTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG
GGCCCGCACA AGCGGTGGAG TATGTGGTTT AATTCGATGC AACGCGAAGA ACCTTACCAA
GACTTGACAT CCTGCGAATC CTGGTGAAAG CTAGGAGTGC CTTAGGGAGC GCAGAGACAG
GTGGTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTCTG TGAGATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC
GCAACCCTCG TTTTLAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT CTAGAGAGAC TGCCGGTGAC
AAACCGGAGG AAGGTGAGGA TGACGTCAAG TCAGCATGCC CCTTACGTCT TGGGCTACAC
ACGTACTACA ATGCTACGGA CAGAGGGCAG CAAGCCAGGG ATGGCAAGCG AATCCAGAAA
CCGTAGCTCA GTTCAGATCG AAGGCTGCAA CTCGCCCTCG TGAAGGAGGA ATCGCTAGTA
ATTGCAGGTC AGCATACTGC AGTGAATTCG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC
ACCATGGAAG TTGGTCACGC CCGAAGTCAT TACCCCAACC GAAAGGAGGG GGATGCCTAA
GGTAGGACTG GTGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTT

```

//

Table 13 (continued).

>KJA2

```

CGGGTGAGTA\ ACGCGTGAGA ATCTGGCTCC AGGTCGGGGA TAACAGTTGG AAACGACTGC
TAATACCGGA TGTGCCGAGA GGTGAAAGAT TTATTGCCTG GAGATGAGCT CGCGTCTGAT
TAGCTAGTTG GTGGTGTAAG GGACCACCAA GGCGTCGATC AGTAGCTGGT CTGAGAGGAT
GATCAGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA
TTTTCCGCAA TGGGCGAAAG CCTGACGGAG CAATACCGCG TGAGGGAGGA AGGCTCTTGG
GTCGTAAACC TCTTTTCTCA AGGAAGAAGA AAGTGACGTA CTTGAGGAAT AAGCATCGGC
TAACTCCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG GAGGATGCAA GCGTTATCCG GAATGATTGG
GCGTAAAGGG TCTGCAGGTG GAACTGAAAG TCTGCTGTTA AAGAGTTTGG CTTAACCAAA
TAAAAGCGGT GGAAACTACA GAACTAGAGT GCGGTAGGGG CAAAAGGAAT TCCTGGTGTA
GCGGTGAAAT GCGTAGATAT CAGGAAGAAC ACCGGTGGCG AAAGCGTTTT GCTAGACCGT
AACTGACACT GAGGGACGAA AGCTAGGGGA GCGAATGGGA TTAGATACCC CAGTAGTCCT
AGCCGTAAAC GATGGATACT AGGCGTGGCT TGTATCGACC CGAGCCGTGC CGGAGCTAAC
GCGTTAAGTA TCCCGCCTGG GGAGTACGCA CGCAAGTGTG AAACCTCAAAG GAATTGACGG
GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GTATGTGGTT TAATTCGATG CAACGCGAAG AACCTTACCA
AGACTTGACA TCCTGCGAAT CCTGGTGAAA GCTAGGAGTG CCTTAGGGAG CGCAGAGACA
GGTGGTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG
CGCAACCCTC GTTTTTAGTT GCCAGCATT AAGTTGGGCAC TCTAGAGAGA CTGCCGGTGA
CAAACCGGAG GAAGGTGAGG ATGACGTCAA GTCAGCATGC CCCTTACGTC TTGGGCTACA
CACGTACTAC AATGCTACGG ACAGAGGGCA GCAAGCCAGG GATGGCAAGC GAATCCAGAA
ACCGTAGCTC AGTTCAGATC GAAGGCTGCA ACTCGCCTTC GTGAAGGAGG AATCGCTAGT
AATTGCAGGT CAGCATACTG CAGTGAATTC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA
CACCATGGAA GTTGGTCACG CCCGAAGTCA TTACCCCAAC CGAAAGGAGG GGGATGCCTA
AGGTAGGACT GGTGACTGGG GTGAAGTCGT AACAAGGTAA GCCGT

```

//

>KJA3

```

CGGGTGAGTA ACGCGTGAGA ATCTGGCTCC AGGTCGGGGA TAACAGTTGG AAACGACTGC
TAATACCGGA TGTGCCGAGA GGTGAAAGAT TTATTGCCTG GAGATGAGCT CGCGTCTGAT
TAGCTAGTTG GTGGTGTAAG GGACCACCAA GGCGTCGATC AGTAGCTGGT CTGAGAGGAT
GATCAGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA
TTTTCCGCAA TGGGCGAAAG CCTGACGGAG CAATACCGCG TGAGGGAGGA AGGCTCTTGG
GTCGTAAACC TCTTTTCTCA AGGAAGAAGA AAGTGACGGT ACTGAGGAAT AAGCATCGsC
TAACTCCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG GAGGATGCAA GCGTTATCCG GAATGATTGG
GCGTAAAGGG TCTGCAGGTG GAACTGAAAG TCTGCTGTTA AAGAGTTTGG CTTAACCAAA
TAAAAGCGGT GGAAACTACA GAACTAGAGT GCGGTAGGGG CAAAAGGAAT TCCTGGTGTA
GCGGTGAAAT GCGTAGATAT CAGGAAGAAC ACCGGTGGCG AAAGCGTTTT GCTAGACCGT
AACTGACACT GAGGGACGAA AGCTAGGGGA GCGAATGGGA TTAGATACCC CAGTAGTCCT
AGCCGTAAAC GATGGATACT AGGCGTGGCT TGTATCGACC CGAGCCGTGC CGGAGCTAAC
GCGTTAAGTA TCCCGCCTGG GGAGTACGCA CGCAAGTGTG AAACCTCAAAG GAATTGACGG
GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GTATGTGGTT TAATTCGATG CAACGCGAAG AACCTTACCA
AGACTTGACA TCCTGCGAAT CCTGGTGAAA GCTAGGAGTG CCTTAGGGAG CGCAGAGACA
GGTGGTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG
CGCAACCCTC GTTTTTAGTT GCCAGCATT AAGTTGGGCAC TCTAGAGAGA CTGCCGGTGA
CAAACCGGAG GAAGGTGAGG ATGACGTCAA GTCAGCATGC CCCTTACGTC TTGGGCTACA
CACGTACTAC AATGCTACGG ACAGAGGGCA GCAAGCCAGG GATGGCAAGC GAATCCAGAA
ACCGTAGCTC AGTTCAGATC GAAGGCTGCA ACTCGCCTTC GTGAAGGAGG AATCGCTAGT
AATTGCAGGT CAGCATACTG CAGTGAATTC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA
CACCATGGAA GTTGGTCACG CCCGAAGTCA TTACCCCAAC CGAAAGGAGG GGGATGCCTA
AGGTAGGACT GGTGACTGGG GTGAAGTCGT AACAAGGTAG CCGT

```

//

Table 14 Numbers of bases in 16S rRNA sequences of *Cylindrospermopsis* sp. Isolated from Thailand, Japan and Australia.

Strain	Origin	No. of bases	Pos. of base difference*
51001	Thailand	1,359	1103
51002	Thailand	1,354	864, 1103
51003	Thailand	1,373	-
51004	Thailand	1,358	853
51005	Thailand	1,371	864
51006	Thailand	1,365	375, 376, 864
51007	Thailand	1,356	-
51008	Thailand	1,357	1103
51009	Thailand	1,358	853
51010	Thailand	1,364	1103
51011	Thailand	1,358	864
51012	Thailand	1,354	1103
51013	Thailand	1,356	503, 864, 1103
51014	Thailand	1,357	150
51015	Thailand	1,356	503, 864, 1103
51016	Thailand	1,363	99, 1103
51017	Thailand	1,374	864, 1103
51018	Thailand	1,363	875, 1103
51019	Thailand	1,354	864
CRJ1	Australia	1,359	590
CRJ2	Australia	1,365	1103
KJA1	Japan	1,358	864
KJA2	Japan	1,365	864
KJA3	Japan	1,364	864

* After removed all gaps.

Table 15 Similarities of 16S rDNA between each sequence pair of *C. raciborskii*.

	51001	51002	51003	51004	51005	51006	51007	51008	51009	51010	51011	51012	51013	51014	51015	51016	51017	51018	51019	CRJ1	CRJ2	KJA1	KJA2	KJA3	RF1
51002	99.9																								
51003	99.9	99.8																							
51004	99.8	99.8	99.9																						
51005	99.8	99.9	99.9	99.8																					
51006	99.7	99.8	99.8	99.7	99.8																				
51007	99.9	99.8	100	99.9	99.9	99.8																			
51008	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9																		
51009	99.8	99.7	99.8	99.9	99.8	99.6	99.8	99.8																	
51010	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	100	99.8																
51011	99.8	99.9	99.9	99.8	100	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8															
51012	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	100	99.8	100	99.8														
51013	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8													
51014	99.8	99.8	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7												
51015	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	100	99.7											
51016	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.8	99.9	99.7	99.9	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8										
51017	99.9	100	99.8	99.8	99.9	99.8	99.8	99.9	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8									
51018	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.8	99.9	99.7	99.9	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8								
51019	99.5	99.6	99.6	99.5	99.7	99.8	99.6	99.5	99.5	99.5	99.7	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.6	99.5							
CRJ1	99.8	99.8	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.5						
CRJ2	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	100	99.8	100	99.8	100	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	99.9	100	99.8					
KJA1	99.8	99.9	99.9	99.8	100	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.8				
KJA2	99.8	99.9	99.9	99.8	100	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.8	100			
KJA3	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.7	99.6	99.8	99.9	99.9		
RF1	99.8	99.7	99.8	99.9	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.8	99.6	99.7	99.7	99.7	99.5	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	
RF2	99.8	99.8	99.8	100	99.8	99.7	99.9	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.5	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9

Remark: RF1= *C. raciborskii* 1 AF067818; RF2 = *C. raciborskii* 2 AF067819

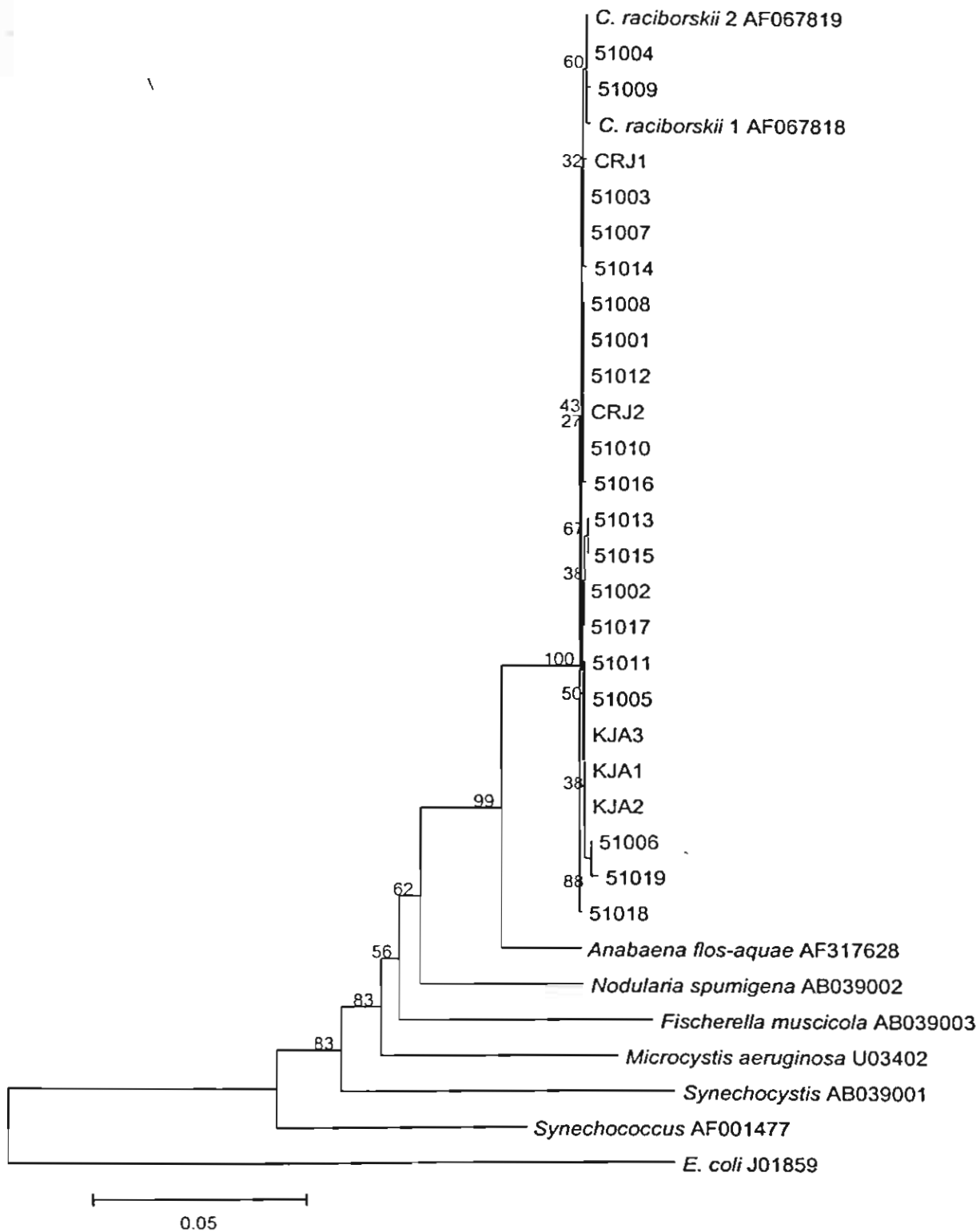


Figure 13 Phylogenetic tree of *C. raciborskii* constructed from 16S rDNA by using the neighbor-joining method. The scale bar presents 5 base substitution per 1,000 nucleotide position. Bootstrap percentages calculated from 1,000 resampling are indicated at nodes.

6.2 ลายพิมพ์ DNA ในส่วนของ Short Tandemly Repeated Repetitive (STRR) Sequences

ในการวิเคราะห์ STRR sequence ของ *C. raciborskii* ทั้ง 24 สายพันธุ์ โดยใช้ primer 3 คู่ที่วิเคราะห์ได้จากยีนของไซยาโนแบคทีเรีย (Mazel *et al.*, 1990) ประกอบด้วย STRR1F และ STRR3F, STRR1F และ STRR 3R, STRR1R และ STRR3R หลังจากทำการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยเทคนิค PCR แล้ว พบว่า PCR products ของสายพันธุ์จากประเทศไทยกับออสเตรเลียมีขนาดใกล้เคียงกันมาก คืออยู่ในช่วง 0.3-5.6 Kb เมื่อใช้ primer ด้วย STRR1F และ STRR3F, STRR1F และ STRR 3R และช่วง 0.6-4.8 Kb เมื่อใช้ STRR1R และ STRR3R ในขณะที่สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นมีค่าที่อยู่ในช่วงที่กว้างกว่า คือ ระหว่าง 0.2-5.6 Kb สำหรับ primer สองคู่แรก และ 0.3-6.7 Kb ใน primer คู่สุดท้าย (Table 16) อย่างไรก็ตามขนาดของ STRR-PCR products ที่ได้นี้มีขนาดใหญ่กว่าที่ได้เคยมีรายงานใน 13 สายพันธุ์จากประเทศออสเตรเลีย โดยมีขนาดอยู่ระหว่างประมาณ 0.1 ถึง 2.5 Kb (Wilson *et al.*, 2000)

Table 16 The ranged in size of the amplified PCR products of *Cylindrospermopsis* spp. isolated from different country.

Combination of primers	Approximately ranged in size (Kb)		
	Thailand	Australia	Japan
STRR1F and STRR3F	0.3-5.6	0.3-5.6	0.2-5.6
STRR1F and STRR3R	0.3-5.6	0.3-5.6	0.2-5.6
STRR1R and STRR3R	0.6-4.8	0.6-4.8	0.3-6.7

จากการใช้ primer 3 คู่ ให้ผลของ DNA band pattern ที่แตกต่างกันและสามารถเห็นความแตกต่างในสายพันธุ์ต่างๆ ของ *C. raciborskii* (Figure 14) โดยที่คู่ primer STRR1F-STRR3F และ STRR1R-STRR3R ให้ผลค่อนข้างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคู่ของ STRR1R-STRR3R ที่สังเกตเห็น band pattern ของสายพันธุ์ *C. raciborskii* มีความแตกต่างกันถึงแม้ว่าจะแยกมาจากแหล่งน้ำเดียวกัน ตัวอย่างเช่น ระหว่างสายพันธุ์ 51005 กับ 51006 ที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง จังหวัดฉะเชิงเทรา ระหว่างสายพันธุ์ 51007 และ 51008 จากบ่อน้ำหนองไผ่แก้ว จังหวัดชลบุรี ระหว่างสายพันธุ์ 51009 และ 51010 จากเขื่อนทับเสลา จังหวัดอุทัยธานี ระหว่างสายพันธุ์ 51017, 51018 และ 51019 จากบ่อปลาที่อำเภอสวรรคภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด นอกจากนี้ยังเห็นความแตกต่างระหว่าง 6 สายพันธุ์ที่มี trichome แบบขดเกลียว ได้แก่ 51004, 51005,

51007, 51009, 51017 และ 51019 อย่างไรก็ตาม primer คู่นี้ไม่สามารถจัดกลุ่มของทั้ง 6 สายพันธุ์ไว้ด้วยกัน (Figure 14C and Figure 15) สำหรับ primer คู่ระหว่าง STRR1F and STRR3F แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งทั้ง 13 สายพันธุ์ที่มี trichome แบบเส้นตรง และสามารถรวมกลุ่มพวกนี้ไว้ด้วยกัน แต่มี 1 สายพันธุ์ที่มี trichome แบบเกลียวปนอยู่ด้วย (Figure 14A and Figure 16) เป็นที่น่าสนใจที่ primer คู่ STRR1R-STRR3R สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่แยกจากประเทศญี่ปุ่น แต่คู่ระหว่าง STRR1F-STRR3F ไม่สามารถแสดงความแตกต่างได้ และผลเช่นนี้ก็พบระหว่างสายพันธุ์จากประเทศออสเตรเลียเช่นกัน สำหรับ primer คู่ระหว่าง STRR1F-STRR3R ไม่สามารถแสดงความแตกต่างของ DNA band pattern เลย อย่างไรก็ตาม primer ทุกคู่ให้ผลพ้องกันในการแสดงความแตกต่างของ band pattern ของสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น (KJA1, KJA2 และ KJA3) ที่แยกออกจากสายพันธุ์ประเทศไทยและออสเตรเลีย (Figure 14-16) ผลการทดลองนี้แตกต่างจากที่ Wilson *et al.* (2000) ได้รายงานไว้ว่า primer คู่ระหว่าง STRR1R และ STRR3R ให้ band pattern ที่คล้ายกัน แต่ primer คู่ STRR1F และ STRR3F แสดงความแตกต่างได้ดีกว่า

ดังนั้นวิวัฒนาการที่สร้างจากข้อมูลโบนารีของ band pattern จาก STRR sequence แสดงให้เห็นการจัดกลุ่ม *C. raciborskii* ออกเป็น 3 cluster แยกออกตามประเทศแหล่งกำเนิด ได้แก่ Cluster I - สายพันธุ์จากประเทศไทย Cluster II - สายพันธุ์จากประเทศออสเตรเลีย และ Cluster - III สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น และยังแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์จากประเทศไทยและออสเตรเลียนมีความใกล้ชิดกัน (Figure 17) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ 51014 ที่อยู่บนกิ่งเดียวกับ CRJ1 สำหรับสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นแยกเป็นกลุ่มอิสระจากสายพันธุ์อื่นๆทั้งหมด ซึ่งสามารถสรุปว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค STRR นี้สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์ *C. raciborskii* ตามแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ (Ernst, 2003; Finlay, 2002) ที่ประกอบด้วยอย่างน้อย 3 genotype clusters ได้แก่ Thai strain cluster (Cluster I), Australian strain cluster (Cluster II) และ Japanese strain cluster (Cluster III) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Cluster III ที่แยกออกมาเป็นอิสระ และเป็นที่น่าทึ่งที่ *C. raciborskii* สามารถสร้างสารพิษที่เรียกว่า cylindrospermopsin แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า *C. raciborskii* มีทั้งชนิดที่สร้างสารพิษ (toxic strain) และไม่สร้างสารพิษ (non-toxic strain) และในกลุ่มที่สร้างสารพิษก็มีปริมาณแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saker และ Neilan (2001) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจที่สายพันธุ์ใน Cluster I เท่านั้นที่สร้างสารพิษได้ในปริมาณที่สูง (Figure 17 และ Table 17)

ในงานทดลองก่อนหน้านี้ได้มีการนำเทคนิค STRR sequence ไปใช้อย่างได้ผลในการศึกษาความหลากหลายและจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียฟิงฟาอาศัย (cyanobacteria symbionts) ใน host ต่างๆ เช่น *Nostoc-Gunnera* symbiosis (Rasmussen and Svenning, 1998; Nilsson *et al.*, 2000) และ *Nostoc-Azolla* symbiosis (Zheng *et al.*, 1999) การทดลองนี้สรุปให้เห็นว่าเทคนิคการวิเคราะห์ STRR sequence สามารถนำมาใช้ในการจำแนกระหว่าง

สายพันธุ์ *Cylindrospermopsis* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำเดียวกันและต่างกัน โดยสามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมได้ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงความเชื่อมโยงระหว่างgenotype กับความสามารถในการสร้างสารพิษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นที่มีลักษณะทางgenotype ของตนเองและแยกจากกลุ่มอื่นตามแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์

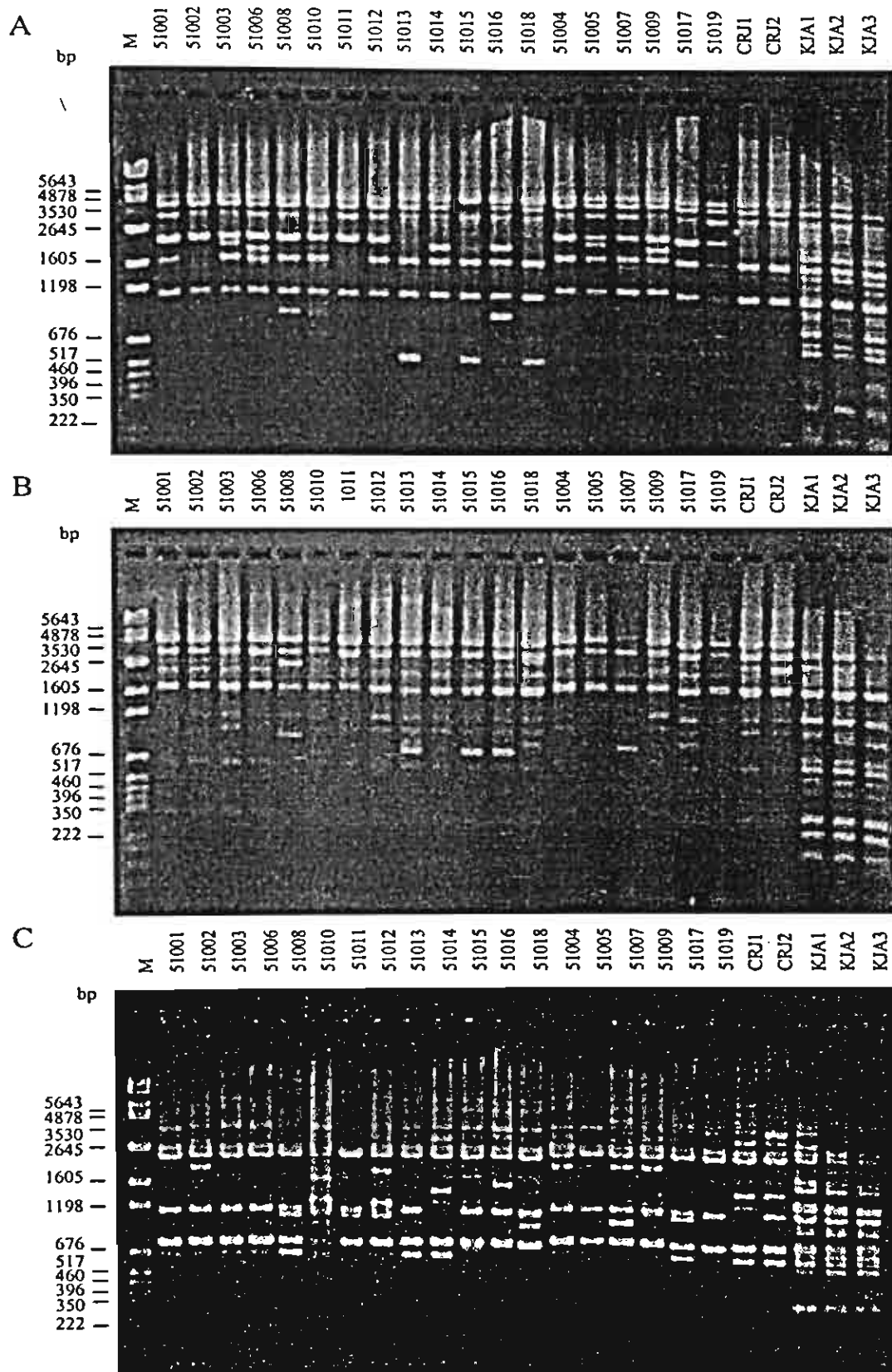


Figure 14 DNA fingerprint of STRR sequences of *C. raciborskii*;

A: combination of primer STRR1F and STRR3F; B: combination of primer STRR1F and STRR 3R; C: combination of primer STRR1R and STRR 3R.

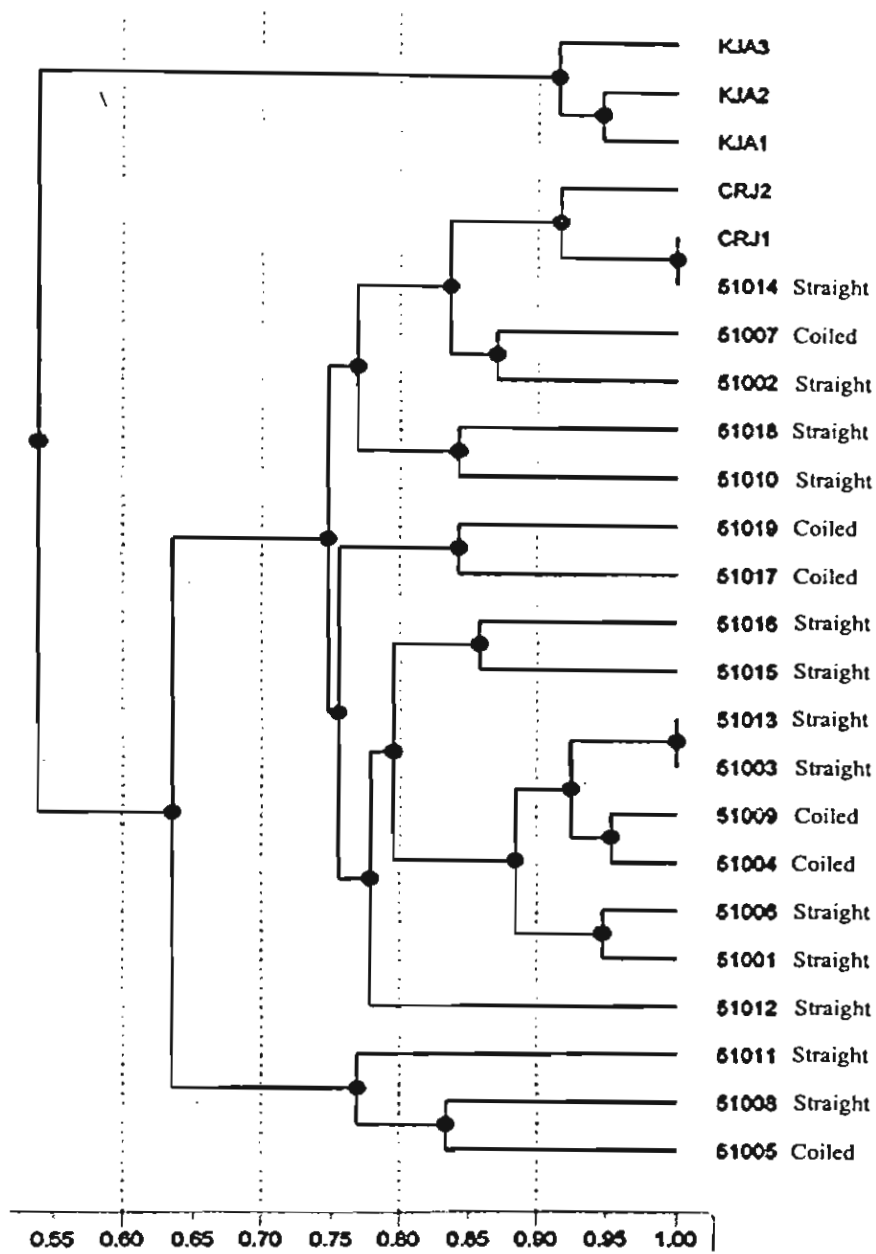


Figure 15 Phylogenetic tree of *C. raciborskii* constructed from band pattern difference of primer combination of STRR1R and STRR3R by using Image Master 2 Delite Ver 2.00 software.

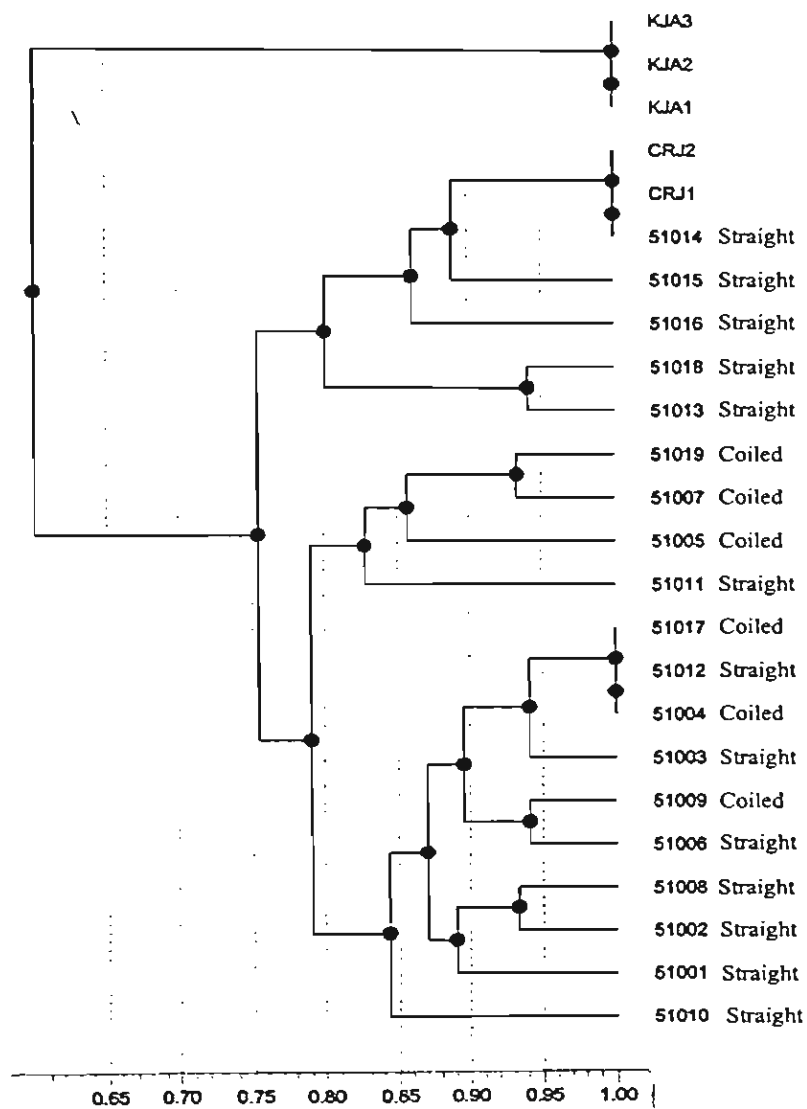


Figure 16 Phylogenetic tree of *C. raciborskii* constructed from band pattern difference of primer combination of STRR1F and STRR3F by using Image Master 2 Delite Ver 2.00 software.

NJ

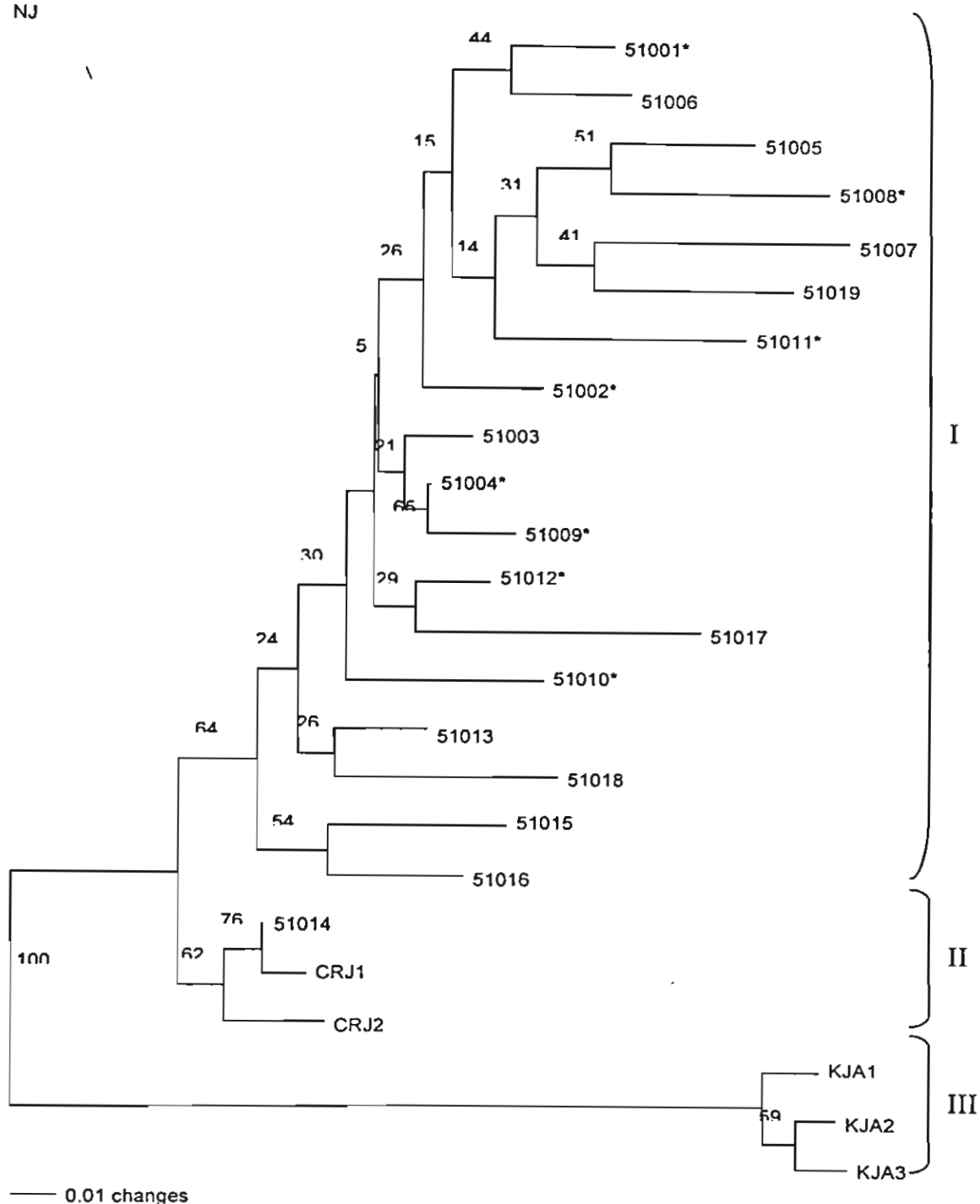


Figure 17 Phylogenetic tree of *C. raciborskii* constructed from total character different of band pattern analysis of STRR sequence by the neighbor-joining method.
* = Toxin was detected.

7. ปริมาณสารพิษ cylindrospermopsin

การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ cylindrospermopsin ที่เป็นกลุ่ม alkaloid hepatotoxin ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ ในรายงานนี้จึงใช้ค่าสัมพัทธ์ (relative value) ที่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ 51001 ที่แยกได้จากอ่างเก็บน้ำห้วยชัยประดู่ และมีรายงานก่อนหน้านี้ว่ามีสารพิษ cylindrospermopsin และ deoxy-cylindrospermopsin (Li *et al.*, 2001) โดยให้ค่าปริมาณสารพิษเท่ากับ 1 จากนั้นเปรียบเทียบขนาดของพื้นที่ใต้ peak ของสายพันธุ์อื่น พบว่าสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นและออสเตรเลียไม่มีสารพิษเลย ในขณะที่สายพันธุ์จากประเทศไทย 8 สายพันธุ์ ได้แก่ 51001, 51002, 51004, 51008, 51009, 51010, 51011, และ 51012 มีสารพิษ cylindrospermopsin อยู่ในระดับน้อยถึงสูงมาก (Table 17) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ AWT205 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ Sarker และ Neilan (2001) ได้รายงานว่าปริมาณพิษสูง โดยที่สายพันธุ์ 51009 และ 51010 มีปริมาณสารพิษใกล้เคียงกับสายพันธุ์ AWT205 แต่สายพันธุ์ 51011 และ 51012 มีปริมาณสารพิษมากกว่าสายพันธุ์ AWT205 ถึง 1.5 เท่า และ 2.5 เท่าตามลำดับ และเมื่อพิจารณาประกอบกับต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจาก STRR sequence พบว่าสายพันธุ์ไทยกลุ่มที่สร้างสารพิษส่วนใหญ่อยู่ใน Cluster I แต่สายพันธุ์ที่อยู่ใน Cluster II และ Cluster III ไม่สร้างสารพิษ (Figure 17)

Table 17 Relative quantity* of cylindrospermopsin in each sample.

Strain	Relative value	Strain	Relative value
51001	1	51014	0
51002	1.764	51015	0
51003	0	51016	0
51004	0.603	51017	0
51005	0	51018	0
51006	0	51019	0
51007	0	CRJ1	0
51008	1.300	CRJ2	0
51009	2.188	KJA1	0
51010	2.847	KJA2	0
51011	3.109	KJA3	0
51012	5.530	AWT 205 monoclonal	2.076
51013	0		

Remark: * = Based on peak area

เอกสารอ้างอิง

- อภารัตน์ มหำพันธ์, ประไพภัทร คลังทรัพย์, พรรณรัตน์ รัตนโชติ, วัลลภา อรุณไพโรจน์, โทโมฮารุ ซาโน, มาโกโตะ เอ็ม วาดานาเบ, คูนิมิทซึ คายา และพูนศุข อัดตะสัมปยุตตะ. 2542. ความเป็นพิษของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในประเทศไทย วท.(14) 1 : หน้า 7-22.
- Bishop, C.T., E.F.L. Anet, and P.R. Gorham. 1959. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. Can. J. Biochem. Physiol. 37 : 453.
- Bourke, A.T.C., R.B. Hawes, A. Neilson and N.D. Stallman. 1983. An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. Toxicon. 3: 45-48.
- Branco, C.W.C. and P.A.C. Senna. 1991. The taxonomic elucidation of the Pananoa Lake (Brasilia, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. Bull. Jard. Bot. Belg. 61: 85-91.
- Byth, S. 1980. Palm Island mystery disease. Med. J. Aust. 2: 40-42.
- Chonudomkul, D., W. Yongmanitchai, G. Theeragool and M.M. Watanabe. 2000. The occurrence of a toxic cyanobacteria *Cylindrospermopsis* spp. in Thailand. P.129. In RGJ-Ph.D. Congress I. May 2-4, 2000. Felix Hotel, Kanchana Buri, Thailand.
- Ernst, A., S. Becker, U.I. Wollenzein and C. Postius. 2003. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. Microbiology. 149: 217-228.
- Falconer, I.R. 1989. Effects on human health of some cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes, and rivers. Toxicity Assessment. 4 : 175.
- Finlay, B.J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. Science. 296: 1061-1063.
- Hoshaw, R. and J.R. Rosowski. 1973. Methods for microscopic algae. In Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements, pp. 53-68. Edited by J.R.Stein. London: Cambridge University Press.
- Ichimura, T., 1971. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in seucal reproduction of *Closterium strigosum*. In Proceeding of the 7th International Seaweed Symposium., p.208-214.
- Komarek, J. and H. Kling. 1991. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). Algological Studies. 61: 21-45.
- Komarkova, J. 1998. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (cyanophytes, cyanobacteria). p. 327-340. In T. Azevedo (ed.), Anais dos IV Congresso

- Latino-Americano de Ficologia, II Reuniao Ibero Americana de Ficologia e VII Reuniao Brasileira de Ficologia, Vol. I. Sao Paulo, Brazil.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software, Bioinformatics (submitted). Arizona State University, tempe, Arizona, USA.
- Lagos, N., H. Onodera, P.A. Zagatto, D. Andrinolo, S.M.F.Q. Azevedo and Y. Oshima. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*. 37: 1359-1373.
- Li, R. 1998. Taxonomic Studies on Planktonic Species of *Anabaena* (Cyanobacteria). Ph. D. Thesis, University of Tsukuba. pp. 186.
- Li, R., W.W. Carmichael, Y. Liu and M.M. Watanabe. 2000. Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA gene sequences. *Hydrobiologia*. 438: 99-105.
- Li, R., W.W. Carmichael, S. Brittain, G.K. Eaglesham, G.R. Shaw, A. Mahakhan, N. Noparatnaraporn, W. Yongmanitchai, K. Kaya and M.M. Watanabe. 2001. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Toxicon*. 39: 937-980.
- Mazel, D., J. Houmard, A.M. Casters and N. Tandeau de Marsac. 1990. Highly repetitive sequences in cyanobacterial genomes. *J. Bacteriol.* 172 (5): 2755-2761.
- Nilsson, M., B. Berman and U. Rasmussen. 2000. Cyanobacterial diversity in geographically related and distant host plants of the genus *Gunnera*. *Arch. Microbiol.* 173: 97-102.
- Ohtani, I., R.E. Moore and M.T.C. Runnegar. 1992. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114:7941-7942.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto and M.M. Watanabe. 1998. 26S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiol. Lett.* 164:119-124.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto and M.M. Watanabe. 1998. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains

- of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. FEMS Microbiol. Lett., 172:15-21.
- Provasoli, L. and I.J. Pintner. 1959. Artificial media for fresh-water algae: problems and suggestions. In *The Ecology of Algae*, Edited by Tryon, C.A. and R.T. Hartmann. Spec. Publ. No. 2, p.84-96.
- Rasmussen, U. and M. M. Svenning. 1998. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. Appl. Environ. Microbiol. 64 (1): 265-272.
- Sarker, M.L. and B.A. Neilan. 2001. Varied diazotrophies, morphologies and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. Appl. Environ. Microbiol. 67 (4): 1839-1845.
- Sarker, M.L., B.A. Neilan and D.J. Griffiths. 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. J. Phycol. 35: 599-606.
- Thompson, A., S., Rhodes, J. C. and Pettman, I. 1988. Natural Environmental Research Council Culture Collection of Algae and Protozoa-Catalogue of Strains, p.22. Ambleside: Freshwater Biology Association (U.K.).
- Watanabe, M. 1995. Studies on planktonic blue-green algae 5. A new species of *Cylindrospermopsis* (Nostocaceae) from Japan. Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser.B. 21(2):45-48.
- Watanabe, M.M., M. Kawachi, M. Hiroki and F. Kasai. 2000. NIES-Collection, List of strains Microalgae and Protozoa 6^{ed}., National Institute for Environmental Studies, Environment Agency, Japan. 159 p.
- Wilmotte, A. 1994. Molecular evolution and taxonomy of the Cyanobacteria. In Bryand, D.A. (Ed.). *The Molecular Biology of the Cyanobacteria*. pp.1-25, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Wilmotte, A., J.-N. Neffs and R.D. Wachter. 1994. Evaluation affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacteria *Trichodesmium* sp. Strain NIBB1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis. Microbiology. 140:2159-2164.
- Wilson, K.M., A. Schembri, P. D. Baker and C. P. Saint. 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. Appl. Environ. Microbiol. 66 (1): 332-338.

- Yongmanitchai, W., D. Chonudomkul, P. Intachote and N. Noparatraporn. 1999. Diversity of toxic cyanobacteria in water reservoirs of Thailand. pp. 689-696. *In* International Conference on Asian Network on Microbial Research. November 29- December 1, 1999. Chiang Mai, Thailand
- Zheng, W. W., M. Nilsson and B. Bergman. 1999. Genetic diversity and classification of cyanobacteria in different *Azolla* species by the use of PCR fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* 99: 1187-1193.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Morphology, Molecular Diversity Based on 16S rDNA and DNA Fingerprint of Short Tandemly Repeated Repetitive (STR) Sequences, and Toxicities of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) from Thailand, Australia and Japan

Duenrut Chonudomkul^a, Wichien Yongmanitchai^a, Gunjana Theeragool^a, Makoto M. Watanabe^b, Masanobu Kawachi^b and Fumie Kasai^b

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

^bNational Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305-0053, Japan.

กำลังดำเนินการส่งไปยัง Journal of Applied and Environmental Microbiology (ภาคผนวก)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- งานวิจัยนี้จะนำไปสู่การตื่นตัวและเฝ้าระวังการระบาดของไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Cylindrospermopsis* ในแหล่งน้ำจืด ที่ประชากรในเขตชนบทนำไปใช้ในการอุปโภค-บริโภค
- ผลการวิจัยน่าจะนำไปสู่การวางแผนการป้องกันอันตรายจากสารพิษ cylindrospermopsin ที่มาจากแหล่งน้ำเพื่อการอุปโภค-บริโภค

ภาคผนวก

Manuscript ของผลงานวิจัยที่จะส่งไปตีพิมพ์ที่
Journal of Applied and Environmental Microbiology

Morphology, Molecular Diversity Based on 16S rDNA and DNA Fingerprint of Short Tandemly Repeated Repetitive (STRR) Sequences, and Toxicities of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) from Thailand, Australia and Japan

Duenrut Chonudomkul^a, Wichien Yongmanitchai^a, Gunjana Theeragool^a, Masanobu Kawachi^b, Fumie Kasai^b and Makoto M. Watanabe^b

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

^bNational Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305-0053, Japan.

Abstract

Morphological observations, 16S rDNA sequence analysis and the PCR fingerprint of short tandemly repeated repetitive (STRR) sequence analysis were performed to characterize twenty-four strains of toxic cyanobacteria, *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Thailand, Australia and Japan. All strains shared common morphological traits characteristic of *C. raciborskii* and showed high 16S rDNA sequence similarity, forming a defined cluster. Various combinations of STRR primers revealed different DNA band patterns and represented unique band among strains of *C. raciborskii*. Constructed phylogenetic tree revealed that the *C. raciborskii* strains were separated into the three genotypic clusters which is mostly corresponding to the geographic origins of strains. Toxic strains were restricted to Cluster I composed of Thai strains. In particular, the Japanese strains formed a clearly distinct cluster from others and were not toxic, suggesting a geographically differentiated genotype.

Introduction

Cylindrospermopsis raciborskii is known to be a toxic and water-bloom-forming cyanobacterium. It produces alkaloid hepatotoxin called cylindrospermopsin (Ohatani *et al.*, 1992) and neurotoxic saxitoxin analogs (Lagos *et al.*, 1992). In 1979, an outbreak of hepatoenteritis at Solomon Dam, Palm Island, Queensland, required the hospitalization of 148 people (Byth, 1980). The subsequent surveys suggested that *C. raciborskii* is the most likely causative agent of this outbreak (Bourke *et al.*, 1983; Hawkins *et al.*, 1985).

The description of *C. raciborskii* in Solomon Dam contained two distinct morphotypes of trichome, straight and coiled ones. Taxonomic and phylogenetic studies using the culture strains isolated from Australia revealed that these morphotypes showed the clear and consistent morphological and physiological differences (Saker *et al.*, 1999), but all isolates was confirmed by the high level of similarity of 16S rDNA gene sequences (Saker *et al.*, 1999) and of *rpoC1* gene sequences (Wilson *et al.*, 2000). It has been suggested that all of the *C. raciborskii* isolates from Australia belonged to the same species, including straight and coiled forms (Wilson *et al.*, 2000). In contrast, the highly iterative palindrome (HIP1) repeated sequence (Sarker and Neilan, 2001) and short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences (Wilson *et al.*, 2000) showed greater variations among isolates of *C. raciborskii*. These DNA polymorphism techniques have supposed to be a useful method for distinguishing a genetic heterogeneity among isolates of *C. raciborskii* (Saker *et al.*, 1999).

The above studies on *C. raciborskii* limited to the isolates from Australia. *C. raciborskii* is a cosmopolitan species found in tropical, subtropical, and temperate regions (Baker and Humpage 1994). Although it is commonly conjectured that many free-living microbial species have a global distribution because of their large abundance that rarely restrict by geographic boundaries (Finlay, 2002; Ernst *et al.*, 2003) postulated ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria. At present it is difficult to draw conclusion for the above controversion from the poor understandings so far on taxonomy and ecogeography of cyanobacteria. However, much attention should be paid to the recent report on polyphasic taxonomy of water-bloom-forming oscillatoroid cyanobacteria using 75 axenic strains collected worldwide (Suda *et al.*, 2002). According to them, *Planktothrix agardhii* and *Planktothrix rubescens* could not be separated by 16S rDNA sequences analysis, morphology, fatty acid composition or G+C content, but were distinguishable by phycobilin pigment composition, growth at different temperatures and salinities and DNA-DNA hybridization. *P. agardhii* distributes worldwide, while *P. rubescens* restricts to central-north Europa. *Planktothrix pseudoagardhii*, which was found only in Thailand and P.R. China, shared the same phenotypic characters as *P. agardhii* but were well separated by 16S rDNA sequence analysis from *P. agardhii* (Suda *et al.*, 2002). Thus, polyphasic approach using the culture strains of various geographic origins is required for bacteriological taxonomy, geography and ecology on cyanobacteria.

Recently we found the occurrence of *C. raciborskii* in fresh water reservoirs, dams and ponds in several parts of Thailand (Yongmanitchai *et al.*, 1999; Chonudomkul *et al.*, 2000) and in Japan and isolated a number of axenic strains of this species from there. The cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin were detected in some strains of *C. raciborskii* isolated from a reservoir in Thailand (Li *et al.*, 2001) but not in some strains. In this study, 24 strains that may be assigned to *C. raciborskii* in morphology were obtained from culture collection and freshly isolated. The aim of this study is to establish whether or not correlations exist between cylindrospermopsin production, morphological characteristics and phyletic line, based on 16S rDNA sequences and STRR sequences.

Materials and Methods

Strains and culture conditions. Twenty four strains of *C. raciborskii* were obtained from the NIES-Collection and isolated from lakes, reservoirs and ponds in Thailand and Japan (Table 1). Strains that were not axenic and/or clonal were purified and cloned by the micropipette-washing method (Hoshaw and Rosowski, 1973). The purity of the strains was checked with bacterial check medium (Watanabe *et al.*, 2000) and microscopy. Stock cultures were maintained in screw-capped test tubes (18 x 150 mm) with 10 ml CT medium (Watanabe *et al.*, 2000) and incubated at 20 ± 10 , under a 12h:12h light/dark cycle at $30 \mu\text{mol/m}^2/\text{sec}$ provided by day-light fluorescent lamps (National Co., Ltd., Japan).

Axenic cultures of *Cylindrospermopsis* used in this study were obtained from samples by pipet washing technique. The cultures were grown in CT medium (Watanabe and Hiroki, 1997) at 25°C under daylight fluorescent lamps at an intensity of $40 \mu\text{mol/m}^2/\text{sec}$ and 12:12 h light/dark cycle for 14 days.

Morphology. Strains of *Cylindrospermopsis* were cultured in 125 ml Erlenmeyer flask containing 25 ml of CT medium and incubated at 25°C under

daylight fluorescent lamps at an intensity of $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ with 12:12 h light/dark cycle. After 4 weeks, the morphological characteristics were observed using a light-microscope. Identification of strains were carried out using typical morphological characteristics such as cell size and shape, heterocyst and akinete formation, etc. based on Sarker *et al.* (1999), Branco and Senna (1991), Komarek and Kling (1991), Watanabe (1995). For determination of cell dimension, fifty filaments were randomly selected and the largest and the smallest cells of each filament were measured. The mean cell size and standard deviation of 100 cells were measured for each strain.

DNA extraction. Ten ml of *Cylindrospermopsis* culture was harvested by centrifugation at 15,000 rpm for 10 min. 500 μl of 2% cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 5 μl of mercaptoethanol were added and incubated at 50°C for 1 h. Cells were homogenized by adding glass beads (0.1 mm of diameter) and beaten with Mini-BeadbeaterTM machine for 30 sec, 3 times. DNA was extracted with 500 μl of chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) followed by centrifugation at 14,000 rpm for 2 min. DNA was precipitated and purified with QIAEX II kit.

16S rDNA sequence analyses. Amplifications of 16S rDNA were performed using primers 107F and 1497R. PCR reaction mixture (100 μl) consisted of ----- ng genomic DNA, 50 pmol primers, 10X EX TaqTM buffer, 2.5 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 5 units of Takara EX TaqTM (Takara Biomedicals, Otsu, Shiga, Japan). Reaction was carried out in a thermal cycler (Takara PCR Thermal Cycler Personal, Takara Biomedicals, Japan) which was initialized for 1 cycle at 95°C for 3 min followed by 30 cycles at 94°C for 10 sec, 53°C for 10 sec and 72°C for 1 min 30 sec and terminated by 1 cycle of 72°C for 8 min and finally held at 4°C .

For 16S rDNA sequence determination, about 0.1 pmol of PCR product, 1.5-2.5 pmol of 16S rRNA gene-sequencing primers (522F, 959R, 882F, 517R, 1185F, 1387R) and Dye namic ET terminator cycle sequencing kit were used to determine the nucleotide sequence of *Cylindrospermopsis*. The reaction conditions consisted of 30 cycles at 95°C 20 sec, 50°C 15 sec and 60°C 1 min and finally held at 4°C .

Nucleotide sequences was performed on an automated DNA sequencer (ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation).

Sequences of PCR primer of 16S rDNA

Primer	Sequence (5'—3')
107F	GGCGCACGGGTGAGTAA
1497R	ACGGCTACCTTGTTACGAC
522F	CAGCAGCCGCGGTAATAC
959R	TTCGCGTTGCATCGAATTAA
882F	CCGCCTGGGGAGTACG
517R	ACGCGGCTGCTGGCACG
1185F	GTGGGGATGACGTCAAGTC
1387R	GGGCGGTGTGTACAAGGC

Phylogenetic analysis. DNA sequences were aligned using the multiple sequence alignment software, ClustalW1.8. Ambiguous characters in which a deletion, insertion recorded from any strains were removed from the aligned data. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) and a tree was constructed using neighbor-joining algorithm. Bootstrap analyses were performed with 1,000 replicates.

STRR sequence analyses. The primers of STRR sequence were developed from repeated sequence in genome of the cyanobacteria (Mazel, *et al.*, 1990). Sequence of primers were as followed, STRR1F: (5'-CCCCARTCCCCART-3'), STRR1R: (5'-GGGGAYTGGGGAYT-3'), STRR3F: (5'-CAACAGTCAACAGT-3'), STRR3R: (5'-ACTGTTGACTGTTG-3'). The 50 μ l of PCR reaction mixture consisted of ----- ng of genomic DNA, 50 pmol of primers, 10XEX TaqTM buffer, 2.5 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 5 units of Takara EX TaqTM (Takara Biomedicals, Otsu, Shiga, Japan). PCR was performed in Takara PCR Thermal Cycler which was programmed for 1 cycle at 94°C for 10 min; 30 cycles at 94°C for 30 sec, 42°C for 1 min and 65°C for 4 min; 1 cycle of 65°C for 7 min and finally held at 4°C.

The PCR fingerprint patterns of STRR sequence were analyzed by using Image Master 2 Delite Ver 2.00 software. The fingerprint patterns were converted to binary data by scoring the presence or absence of bands for each strain as one or zero. These data were used to calculate total character differences, which were used to construct a neighbor-joining tree with PUAP.

Toxin analysis. Each strain was cultured in 10 ml of Jaworski's medium (Thompson *et al.*, 1988) for one month. Toxin was extracted with methanol, after removal of solvent, the residue was re-dispersed in water and filtered with membrane filter. The solution was then passed through ODS cartridge (Sep-Pak C18, Waters Corporation, Massachusetts, USA). The pass-through fraction was collected and concentrated under reduced pressure. Concentrated samples were analysed with HPLC-MS for Cylindrospermopsin using TSK-gel Amide-80 column (100x2 mm) with linear gradient 100 to 60% acetonitrile/water for 30 minutes at 0.2 ml/minute. Photodiode array (262 nm, SIM) and Ma (M+416 m/z and M-414 m/z) were used as detectors.

Results

Morphology. The strains were separated into two distinct morphotypes, one with straight trichomes and another with coiled trichomes (Fig.1). Excepted the trichome forms, all the strains shared the common morphological characteristics as outlined below, though a little variations were shown by the different strains. Solitary trichomes, both coiled and straight ones, were not constricted or slightly constricted at the cross walls. Cells with gas vesicles, were cylindrical in shape, 1.9 – 6.3 μ m wide and 3.0 – 18.5 μ m long and the ratio of cell length to cell width was 0.8 – 7.0. The minimum cell width was 2.7 ± 0.6 μ m (strain 51011) and the maximum was 4.7 ± 0.7 μ m (strain 51004). In contrast, the mean and standard deviation for cell length ranged from 5.8 ± 1.5 μ m (strain 51005) to 11.6 ± 3.9 μ m (strain 51016). End cells were cylindrical, conical or rounded. Heterocysts were developed from a terminal cell, being single or in pairs in some strains at one or both ends of the trichome. Some Thai and Australian strains rarely developed intercalary heterocysts (Fig. 1C). Terminal heterocysts were never curved, conical, cylindrical or rounded in shape, 1.9 – 7.0 μ m wide and 4.4 – 11.9 μ m. The minimum width was 2.7 ± 0.5 μ m (strain 51011) and the maximum was 5.2 ± 0.7 μ m (strain CRJ*). In contrast, the mean and standard deviation for heterocyst length ranged from 4.6 ± 0.7 μ m (strain 51009) to 8.5 ± 1.6 μ m (strain KJA3). Akinetes were observed in three Thai strains (51013, 51014, 51016), two Australian strains (CRJ1, CRJ2) and three Japanese strains (KJA1-3). They were formed neighbor to the heterocysts, sometimes two cells distant from the heterocysts, solitary, in pairs or rarely up to three in series, being cylindrical

in shape, 2.8 – 7.0 μm wide and 8.5 – 17.1 μm long and the ratio of cell length to cell width was 1.5 – 5.8. The minimum of width was $3.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (strain 51014) and the maximum was $5.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$ (strain CRJ2). The mean and standard deviation for akinete length ranged from $11.3 \pm 2.1 \mu\text{m}$ (strain 51014) to $14.2 \pm 2.4 \mu\text{m}$ (strain KJA2). Since standard deviation ranges of strains in cell, heterocyst and akinete sizes overlapped continuously (Fig. 2), clear divisions cannot be made among the strains on the basis of quantitative characters. In conclusion, there were no clear differences in morphology among the strains and the morphological characteristics observed were very similar to those of *C. raciborskii*.

Phylogenetic analysis of the conserved regions of 16S rDNA. Near-complete 16S rDNA sequences were determined for 24 *C. raciborskii* isolates that were available in axenic cultures. GenBank accession numbers are given in Table. A phylogenetic tree was reconstructed from an alignment of 33 sequences, including 24 *C. raciborskii* isolates and the two strains of *C. raciborskii* Form 1 (coiled: AF067818) and Form 2 (straight: AFF067819), representatives of the major lineages of cyanobacteria with *Escherichia coli* as the outgroup (Fig. 3). The corrected sequence alignment, which formed the basis of the phylogenetic analyses, corresponded to positions 112-1488 according to the *E. coli* numbering system and was 1376 bases in length after gaps, inserts, and ambiguous positions had been removed. All the strains of *C. raciborskii* including the additional two strains of this species (AF067818 and AFF067819) showed high DNA sequence similarity (Table 2) exceeding 99.5 %.

Constructed phylogenetic trees revealed that all the *C. raciborskii* strains formed a defined cluster, in agreement with the result of Saker and Neilan (2001). The topology within the *C. raciborskii* cluster may not be reliable because the numbers of 16S rDNA base differences were so small that insufficient information was given about the relationships among *C. raciborskii* strains.

Phylogenetic analysis of STRR sequences. The twenty four strains of *C. raciborskii* were analyzed by the combination of three pairs of primers derived from cyanobacterial repeat sequences, namely STRR1F and STRR3F, STRR1F and STRR3R, STRR1R and STRR3R. These combinations of primers established the DNA profiles for each isolates (Fig. 4). The amplified PCR products of *Cylindrospermopsis* isolates from Thailand and Australia had the same range in size but narrow than those from Japan (Table 3).

The various primer combinations presented the various DNA band patterns and distinguished among strains of *C. raciborskii*. The greatest variation among the Thai strains was shown in both primer combinations of STRR1F-STRR3F and STRR1R-STRR3R. Clear differences in banding patterns obtained by using primer combination of STRR1R-STRR3R were observed even among isolates from the same ponds; that is, between strains 51005 and 51006 from shrimp pond in Chachoengsao, between strains 51007 and 51008 from Nong Phai Khaew in Chonburi, strains 51009 and 51010 from Thap Salao Dam in Uthai Thani, strains 51017, 51018 and 51019 from fish pond at Suwannaphum in Roi Et. Furthermore, the different banding patterns were obtained among all the six strains with coiled trichomes, strains 51004, 51005, 51007, 51009, 51017 and 51019, but this primer combination did not group strains with coiled trichomes (Figs. 4C and 5). The primer combination of STRR1F and STRR3F showed the variation among the Thai strains and distinguished among all the thirteen strains with straight trichomes but grouped strain with coiled trichomes and one with straight trichomes together (Figs. 4A and 6). The primer combination of STRR1R-STRR3R showed variation among Japanese strains whereas that of

STRR1F-STRR3F did not. The same was true among Australian strains. The DNA fingerprint of primer combination of STRR1F-STRR3R did not show further differences among strains than those of STRR1F-STRR3F and STRR1R-STRR3R (Fig. 4B). Each primer combination showed that DNA band patterns of Japanese strains (KJA1, KJA2 and KJA3) were highly different from the Thai and Australian strains (Figs. 4-6).

The phylogenetic tree constructed from the binary data of band patterns of STRR sequence demonstrated that interesting *C. raciborskii* were separated by the country into the three clusters, Thai strain cluster (cluster I), Australian strain cluster (cluster II) and Japanese strain cluster (cluster III) (Fig. 7). Among these clusters, Thai and Australian clusters were relatively close to each other. One of Thai strains, 51014 was closely related with Australian strain (CRJ1) and assigned to cluster 2. (Fig. 7). Japanese strains formed an independent phylogenetic cluster clearly separated from the others.

Toxin production. The alkaloid hepatotoxin, cylindrospermopsin was detected in some Thai strains of Cluster I but neither in any strains of Clusters II and III nor in the additional strains isolated from same pond of Japan (Table 4 and Fig. 7).

Discussion

All the strains shared the common morphological traits mostly corresponding to the description of *C. raciborskii* and formed a defined phylogenetic cluster together with the two strains of *C. raciborskii* (AF067818 and AF067819) already reported for their morphological and growth characteristics. The morphological characteristics observed in these strains are clearly different from the related species, *C. philippinensis* with spiral trichomes and slightly curved, conical shaped heterocysts, *C. africana* with rounded end-cells and with long cells showing high ratio of length to width (1.6-13.2), *C. cuspid* with conically pointed end-cells and with long cells showing high ratio of length to width (4.2-22.8) and *C. curvispora* with strongly curved, conical shaped heterocysts having rounded end. So the present strains should be identified as *C. raciborskii*. The morphological changes in vegetative cell and heterocyst dimensions of *C. raciborskii* were induced by different nitrogen sources. Although the changes recognized does not directly influence on the distinction between species shown above, the taxonomic and phylogenetic significances of these morphologically different species must be evaluated by examining the direct correlation between phenotypic and genotypic diversity.

The two morphological forms, one with straight trichomes and another with coiled trichomes have been observed in *C. raciborskii* (Saker *et al.*, 1999). Taxonomic and phylogenetic studies using the culture strains of these morphotypes suggested that all of the *C. raciborskii* isolates from Australia belonged to the same species, including straight and coiled forms (Saker *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000; Saker and Neilan, 2001). The *C. raciborskii* strains used in this study also formed a defined cluster together with the two strains of *C. raciborskii* used by Saker *et al.*, (1999), in agreement with the result of Saker and Neilan (2001). The STRR sequence analyses using 13 Australian strains indicated that the Australian isolates with coiled trichomes grouped together, suggesting some linkage between trichome coiling and genotype (Wilson *et al.*, 2000). However, our strains with coiled trichomes were not clustered together (Figs. 5-7).

The size of STRR-PCR products were approximately 0.3 to 5.6 kb in Thai strains and Australian strains and 0.2 to 6.7 kb in Japanese strains that were larger than previously reported in thirteen isolates of *C. raciborskii* from Australia, which

had ranged in size from approximately 0.1 to 2.5 kb (Wilson *et al.*, 2000). The combination of primer STRR1R-STRR3R represented the greatest variation among strains and clearly distinguished the *Cylindrospermopsis* clones at strain level. However, the primer combination of STRR1F-STRR3F showed variation among Thai strains but little variation among Japanese and Australian strains. These results were different from Wilson *et al.* (2000) who reported that the primer combination of STRR1R and STRR3R has the very similar patterns, while the greatest variation was seen in the primer combination of STRR1F and STRR3F.

The phylogenetic tree constructed from the binary data of band patterns of STRR grouped the *C. raciborskii* strains mostly corresponding to their geographic origin (Fig. 7), showing that *C. raciborskii* is composed of at least three genotype clusters, Thai strain cluster (Cluster I), Australian strain cluster (Cluster II) and Japanese strain cluster (Cluster III). In particular, Japanese strains formed a clearly independent cluster from the others. Although it is well known that *C. raciborskii* produce the toxin, cylindrospermopsin, the present results clearly showed that there were toxic and non-toxic strains in *C. raciborskii* and a great variation in toxin contents among toxic strains, in agreement with Saker and Neilan (2001). Interestingly, only Cluster I included the strains with high toxin content (Fig. 7).

The present study clearly showed that STRR sequence was useful method to distinguish among strains of *Cylindrospermopsis*, which were isolated from the same and different habitats and to classify the different genetic clusters. It suggested some linkage between toxin production and genotype. In particular, Japanese strains seem to possess their own genotypic characters different from the others, being geographically differentiated genotype.

Acknowledgments

We thank Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand and Environmental Biology Division, National Institute for Environmental Studies, Japan for providing the research facility. Financial support from The Thailand Research Fund under Royal Golden Jubilee Ph.D. research assistant fellowship.

References

1. Baker, P.D. and A.R. Humpage. 1994. Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray Darling Basin, Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 45: 773-786.
2. Bourke, A.T.C., R.B. Hawes, A. Neilson and N.D. Stallman. 1983. An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon.* 3: 45-48.
3. Branco, C.W.C. and P.A.C. Senna. 1991. The taxonomic elucidation of the Pananoa Lake (Brasilia, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Bull. Jard. Bot. Belg.* 61: 85-91.
4. Byth, S. 1980. Palm Island mystery disease. *Med. J. Aust.* 2: 40-42.
5. Chonudomkul, D., W. Yongmanitchai, G. Theeragool and M.M. Watanabe. 2000. The occurrence of a toxic cyanobacteria *Cylindrospermopsis* spp. in Thailand. P.129. *In* RGJ- Ph.D. Congress I. Mmay 2-4, 2000. Felix hotel, Kanchana Buri, Thailand.

6. Ernst, A., S. Becker, U.I. Wollenzein and C. Postius. 2003. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology*. 149: 217-28.
7. Finlay, B.J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*. 296: 1061-3.
8. Hawkins, P.R., M.T.C. Runnegar, A.R.B. Jackson and I.R. Falconer. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (5): 1292-1295.
9. Hoshaw, R. and J.R. Rosowski. 1973. Methods for microscopic algae. *In* Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements, pp. 53-68. Edited by J.R.Stein. London: Cambridge University Press.
10. Komarek, J. and H. Kling. 1991. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). *Algological Studies*. 61: 21-45.
11. Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software, Bioinformatics (submitted). Arizona State University, tempe, Arizona, USA.
12. Lagos, N., H. Onodera, P.A. Zagatto, D. Andrinolo, S.M.F.Q. Azevedo and Y. Oshima. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*. 37: 1359-1373.
13. Li, R., W.W. Carmichael, S. Brittain, G.K. Eaglesham, G.R. Shaw, A. Mahakhant, N. Noparatnaraporn, W. Yongmanitchai, K. Kaya and M.M. Watanabe. 2001. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Toxicon*. 39: 937-980.
14. Mazel, D. J. Houmard, A.M. Casters and N. Tandeau de Marsac. 1990. Highly repetitive sequences in cyanobacterial genomes. *J. Bacteriol.* 172 (50): 2755-2761.
15. Ohani, I., R.E. Moore and M.T.C. Runnegar. 1992. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 7941-7942.
16. Sarker, M.L. and B.A. Neilan. 2001. Varied diazotrophies, morphologies and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (4): 1839-1845.
17. Sarker, M.L., B.A. Neilan and D.J. Griffiths. 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *J. Phycol.* 35: 599-606.
18. Suda, S., M.M. Watanabe, S. Otsuka, A. Mahakahant, W. Yongmanitchai, N. Nopartnaraporn, Y. Lui and J.G. Day. 2002. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoroid cyanobacteria. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 52: 1-19.
19. Thompson, A., S., Rhodes, J. C. and Pettman, I. 1988. Natural Environmental Research Council Culture Collection of Algae and Protozoa-Catalogue of Strains, p.22. Ambleside: Freshwater Biology Association (U.K.).
20. Watanabe, M. 1995. Studies on planktonic blue-green algae 5. A new species of *Cylindrospermopsis* (Nostocaceae) from Japan. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser.B.* 21(2):45-48.

21. **Watanabe, M.M. and M. Hiroki.** 1997. NIES-Collection, List of strains, Microalgae and Protozoa 5^{ed}., National Institute for Environmental Studies, Environment Agency, Japan. 140 p.
22. **Watanabe, M.M., M. Kawachi, M. Hiroki and F. Kasai.** 2000. NIES-Collection, List of strains Microalgae and Protozoa 6^{ed}., National Institute for Environmental Studies, Environment Agency, Japan. 159 p.
23. **Wilson, K.M., A. Schembri, P. D. Baker and C. P. Saint.** 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. Appl. Environ. Microbiol. 66 (1): 332-338.
24. **Yongmanitchai, W., D. Chonudomkul, P. Intachote and N. Noparatraporn.** 1999. Diversity of toxic cyanobacteria in water reservoirs of Thailand. pp. 689-696. *In* International Conference on Asian Network on Microbial Research. November 29- December 1, 1999. Chiang Mai, Thailand

TABLE 1. Strains of *Cylindrospermopsis* used in this study.

Strain	Trichome morphology	Sampling place	Province/ Country
51001	Straight	Huai Suppradoo	Nakhon Ratchasima, Thailand
51002	Straight	Pond in Public park	Tak, Thailand
51003	Straight	Huai Tung Thao	Chiang Mai, Thailand
51004	Coiled	Pa Chan Reservoir	Chiang Rai, Thailand
51005	Coiled	Shirmp pond	Chachoengsao, Thailand
51006	Straight	Shirmp pond	Chachoengsao, Thailand
51007	Coiled	Nong Phai Khaew	Chonburi, Thailand
51008	Straight	Nong Phai Khaew	Chonburi, Thailand
51009	Coiled	Thap Salao Dam	Uthai Thani, Thailand
51010	Straight	Thap Salao Dam	Uthai Thani, Thailand
51011	Straight	Kang Kra Chan Dam	Phetchaburi, Thailand
51012	Straight	Chong Khao Khat Dam	Uttaradit, Thailand
51013	Straight	Huai Pa Daeng Reservoir	Phetchabun, Thailand
51014	Straight	Ubolrat Dam	Khonkaen, Thailand
51015	Straight	Nong Mek	Udon Thani, Thailand
51016	Straight	Ban Kok Kang	Nong Khai, Thailand
51017	Coiled	Fish pond at Suwannaphum	Roi Et, Thailand
51018	Straight	Fish pond at Suwannaphum	Roi Et, Thailand
51019	Coiled	Fish pond at Suwannaphum	Roi Et, Thailand
CRJ1*	Coiled	Palm Island	Australia
CRJ2*	Straight	Palm Island	Australia
KJA1	Straight	Kuono pond	Ibaraki, Japan
KJA2	Straight	Kuono pond	Ibaraki, Japan
KJA3	Straight	Kuono pond	Ibaraki, Japan

Remark: * = Strains were obtained by M.M. Watanabe through Dr. Brett Neilan from Australian Water Quality Center Culture Collection and now maintained in NIES-Collection at National Institute for Environmental Studies, Japan.

TABLE 2. Similarities of 16S rDNA between each sequence pair of *C. raciborskii*.

	S1001	S1002	S1003	S1004	S1005	S1006	S1007	S1008	S1009	S1010	S1011	S1012	S1013	S1014	S1015	S1016	S1017	S1018	S1019	CRJ1	CRJ2	KJA1	KJA2	KJA3	RF1
S1002	99.9																								
S1003	99.9	99.8																							
S1004	99.8	99.8	99.9																						
S1005	99.8	99.9	99.9	99.8																					
S1006	99.7	99.8	99.8	99.7	99.8																				
S1007	99.9	99.8	100	99.9	99.9	99.8																			
S1008	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9																		
S1009	99.8	99.7	99.8	99.9	99.8	99.6	99.8	99.8																	
S1010	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	100	99.8																
S1011	99.8	99.9	99.9	99.8	100	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8															
S1012	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	100	99.8	100	99.8														
S1013	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8													
S1014	99.8	99.8	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7													
S1015	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	100	99.7											
S1016	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.8	99.9	99.7	99.9	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8										
S1017	99.9	100	99.8	99.8	99.9	99.8	99.8	99.9	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8									
S1018	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.8	99.9	99.7	99.9	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8								
S1019	99.5	99.6	99.6	99.5	99.7	99.8	99.6	99.5	99.5	99.5	99.7	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.6	99.5							
CRJ1	99.8	99.8	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.5							
CRJ2	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.7	99.9	100	99.8	100	99.8	100	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	99.9	100	99.8					
KJA1	99.8	99.9	99.9	99.8	100	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.8				
KJA2	99.8	99.9	99.9	99.8	100	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.8	100			
KJA3	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.8	99.7	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.7	99.6	99.8	99.8	99.9	99.9		
RF1	99.8	99.7	99.8	99.9	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.8	99.6	99.7	99.7	99.7	99.5	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	
RF2	99.8	99.8	99.8	100	99.8	99.7	99.9	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.5	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9

Remark: RF1 = *C. raciborskii* 1 AF067818; RF2 = *C. raciborskii* 2 AF067819

TABLE 3. Size of the PCR products of *C. raciborskii* isolated from different countries.

Combination of primers	Approximately ranged in size (kb)		
	Thailand	Australia	Japan
STRR1F and STRR3F	0.3-5.6	0.3-5.6	0.2-5.6
STRR1F and STRR3R	0.3-5.6	0.3-5.6	0.2-5.6
STRR1R and STRR3R	0.6-4.8	0.6-4.8	0.3-6.7

TABLE 4. Relative quantity* of cylindrospermopsin in each sample.

Strain	Relative value	Strain	Relative value
51001	1	51014	0
51002	1.764	51015	0
51003	0	51016	0
51004	0.603	51017	0
51005	0	51018	0
51006	0	51019	0
51007	0	CRJ1	0
51008	1.300	CRJ2	0
51009	2.188	KJA1	0
51010	2.847	KJA2	0
51011	3.109	KJA3	0
51012	5.530	AWT 205 monoclonal	2.076
51013	0		

Remark: * = Based on peak area

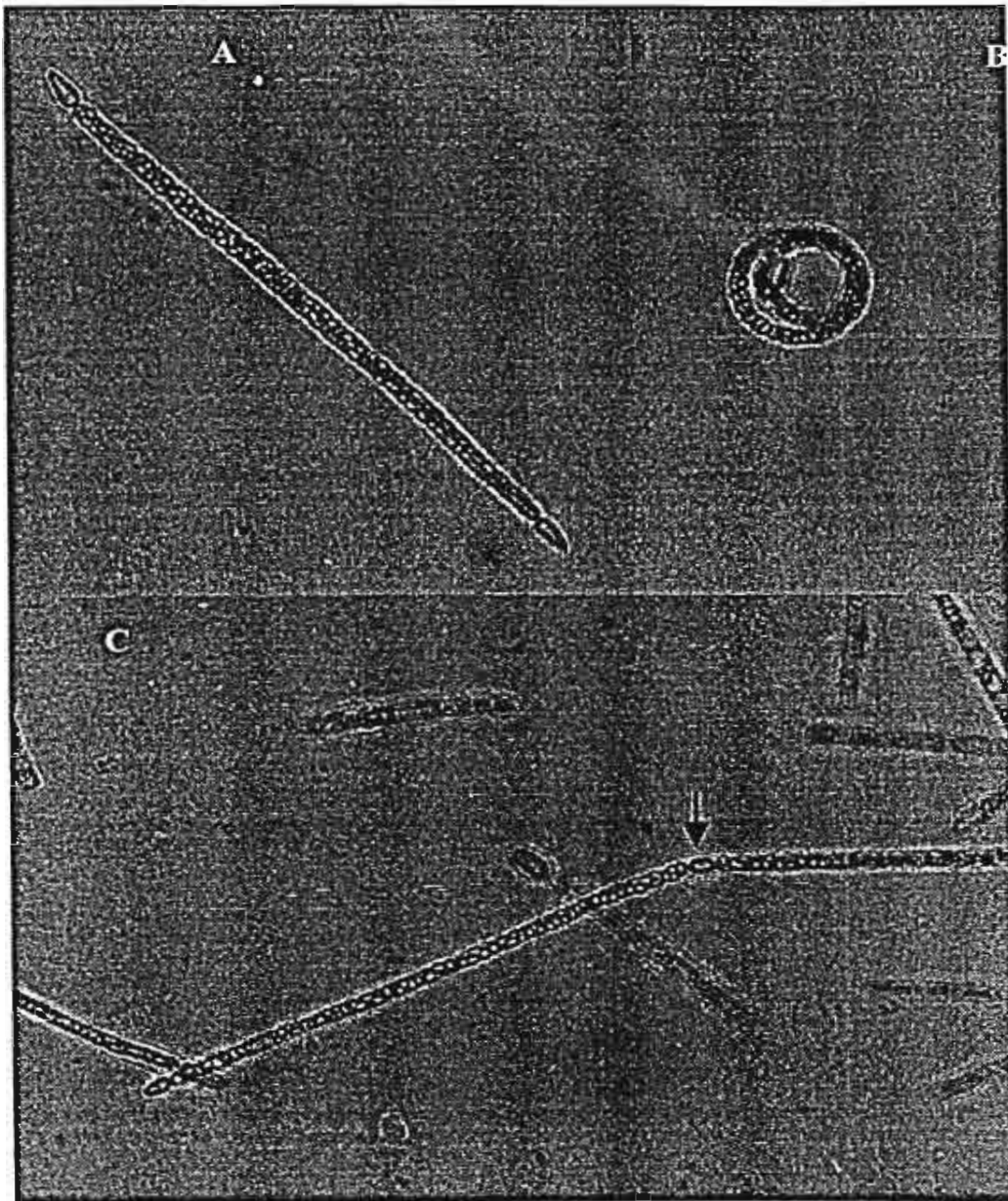


FIG. 1. Morphology of *C. raciborskii* (A) straight trichome, (B) coiled trichome and (C) intercalary heterocyst.

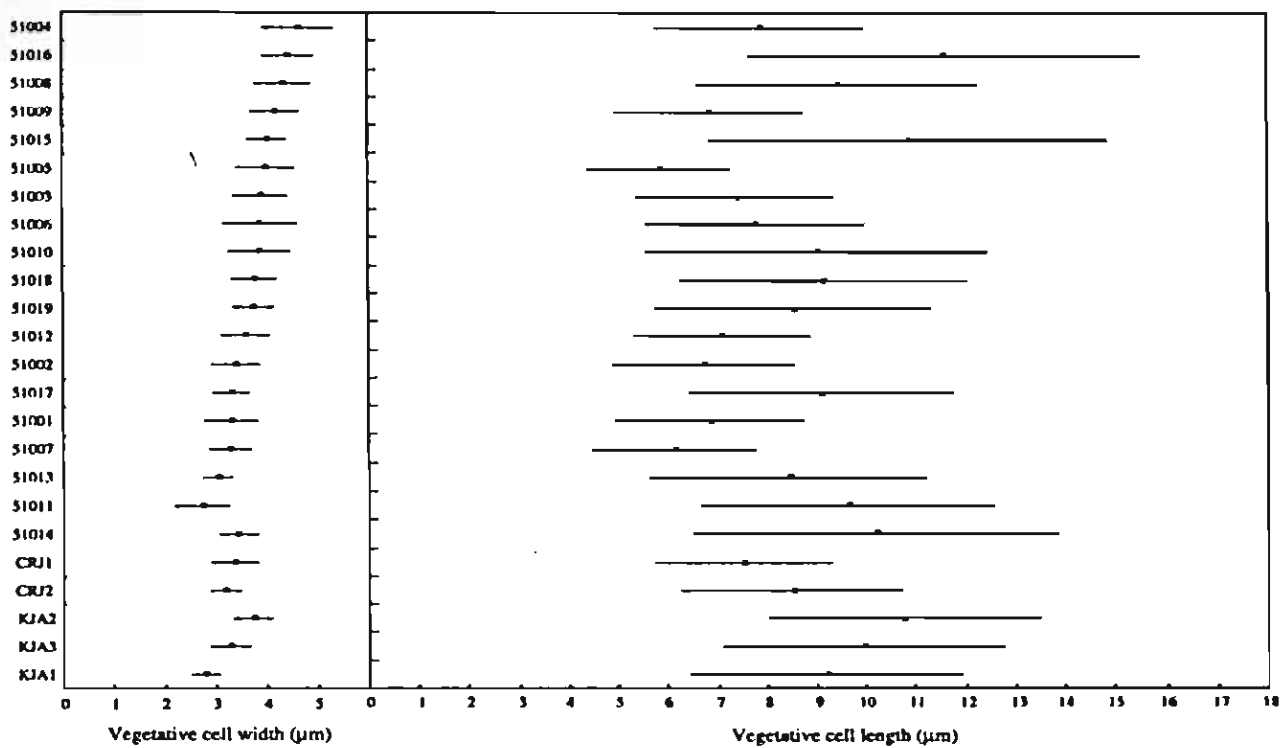


FIG. 2A. Vegetative cell dimensions of *C. raciborskii* of groups I-III. Thick lines indicate the mean; narrow lines indicate the standard deviation.

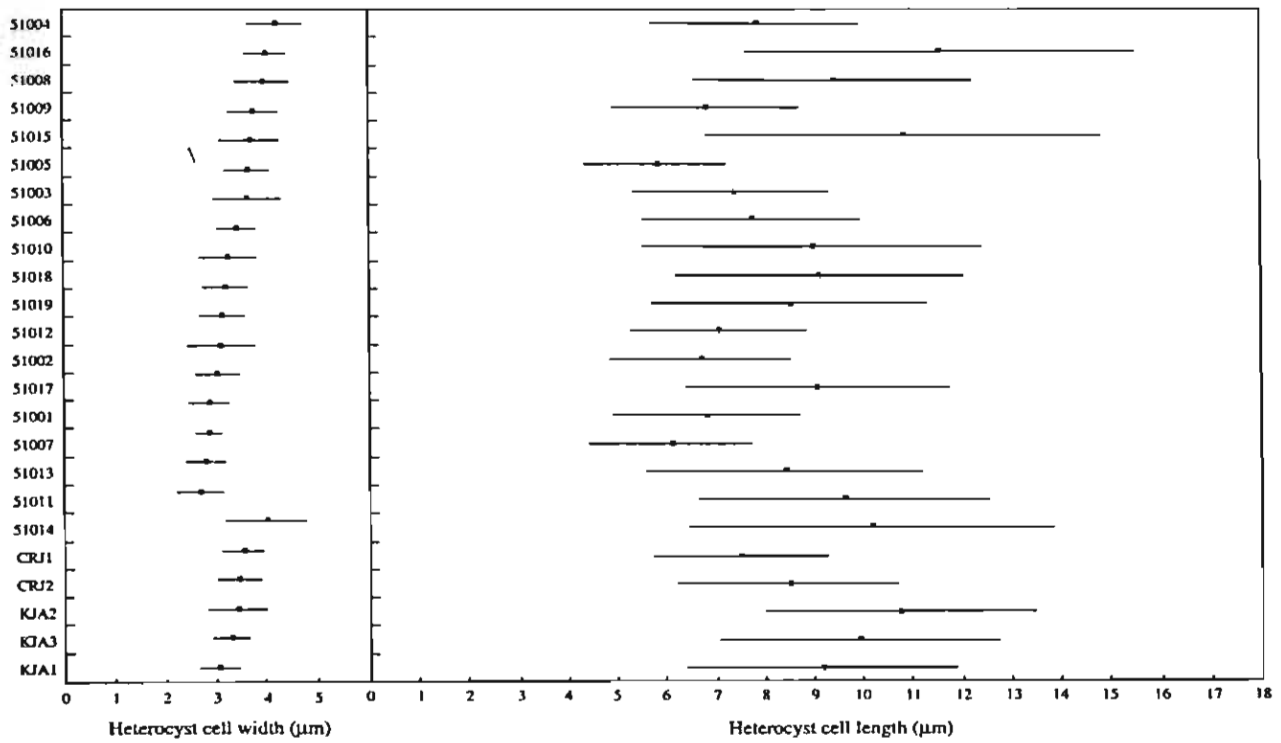


FIG. 2B. Heterocyst cell dimensions of *C. raciborskii* of groups I-III. Thick lines indicate the mean; narrow lines indicate the standard deviation.

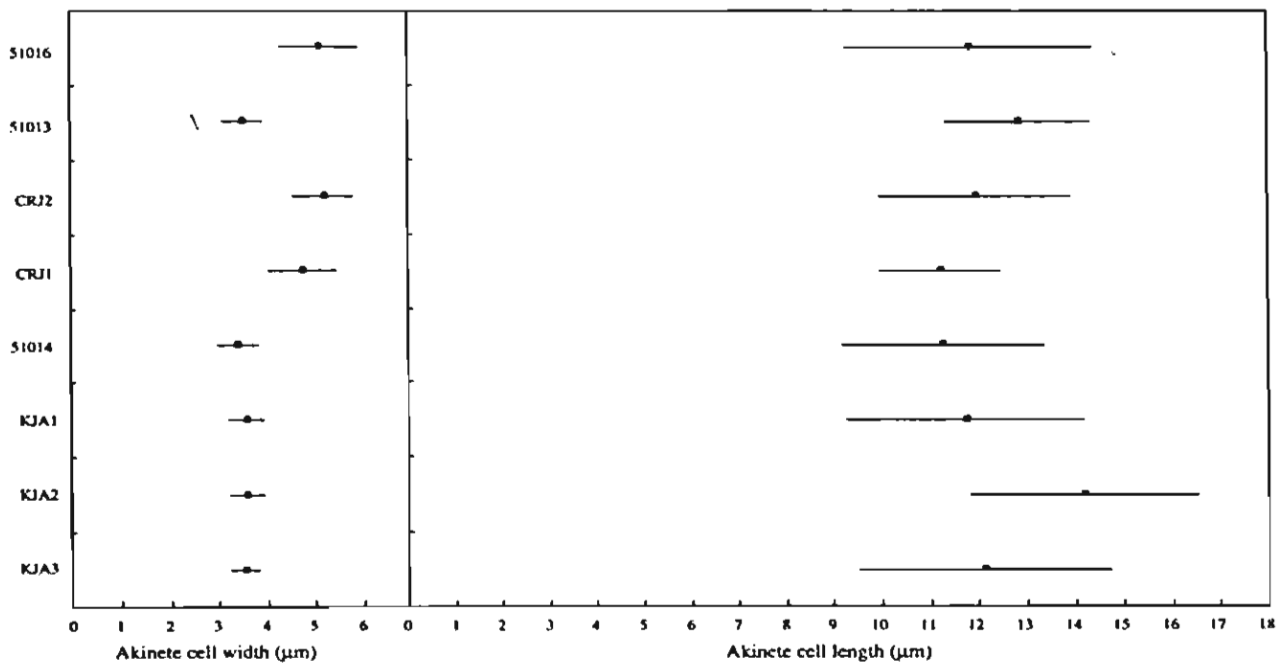


FIG. 2C. Akinete cell dimensions of *C. raciborskii* of groups I-III. Thick lines indicate the mean; narrow lines indicate the standard deviation.

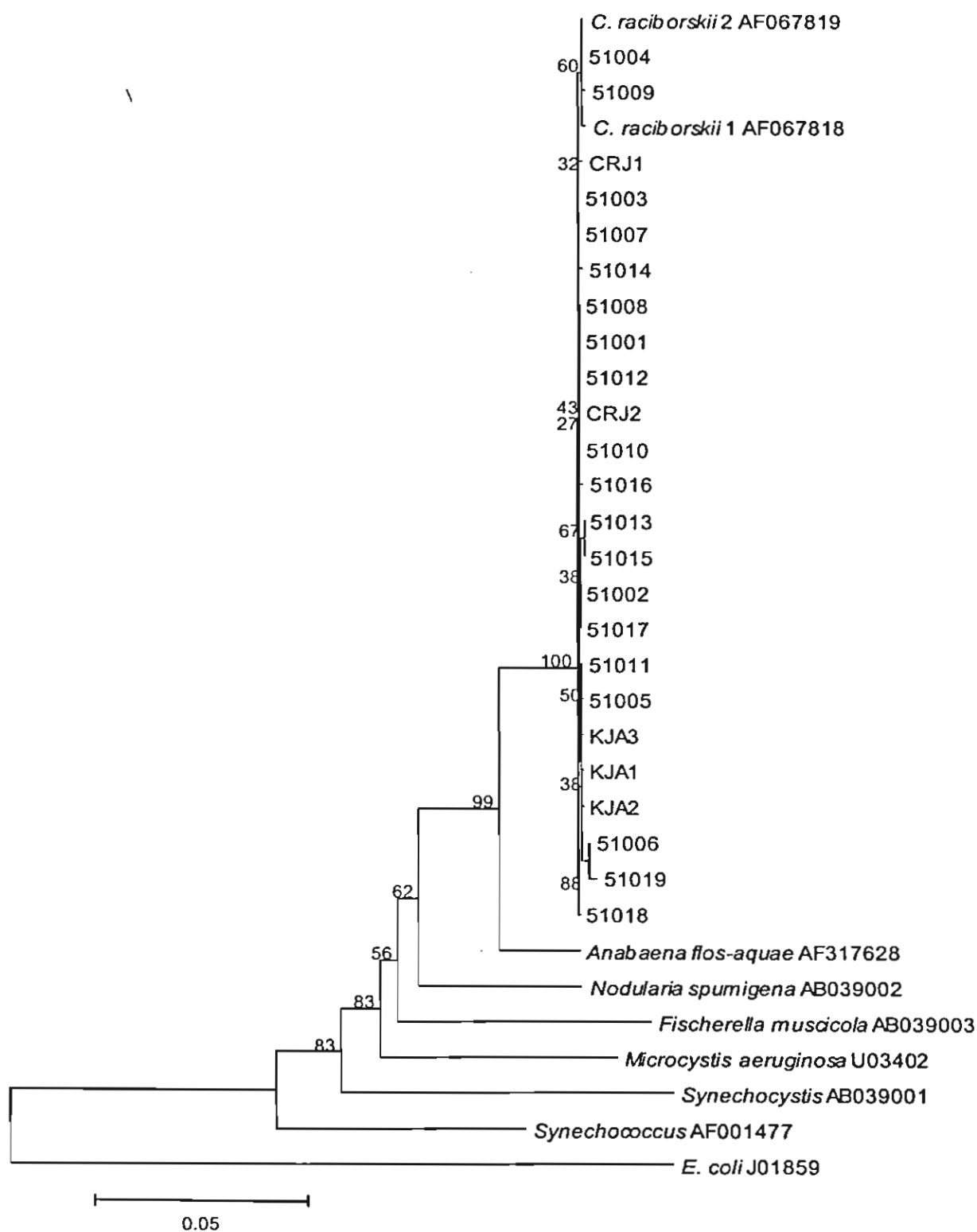


FIG. 3. Phylogenetic tree of *C. raciborskii* constructed from 16S rDNA by using the neighbor-joining method. The scale bar presents 5 base substitution per 1,000 nucleotide position. Bootstrap percentages calculated from 1,000 resampling are indicated at nodes.

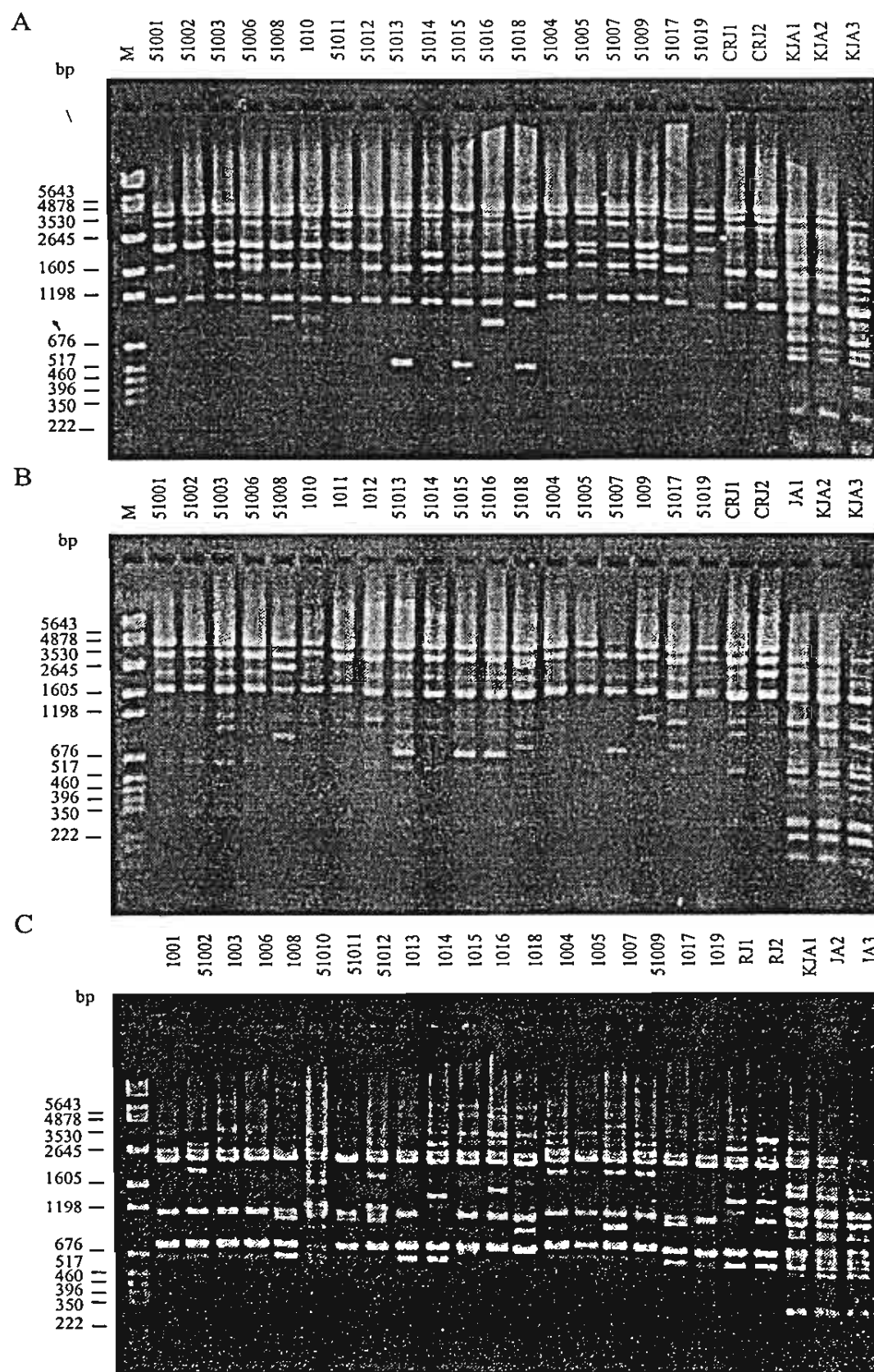


FIG. 4. DNA fingerprint of STRR sequences of *C. raciborskii*;
 A: combination of primer STRR1F and STRR3F; B: combination of primer STRR1F and STRR 3R; C: combination of primer STRR1R and STRR 3R.

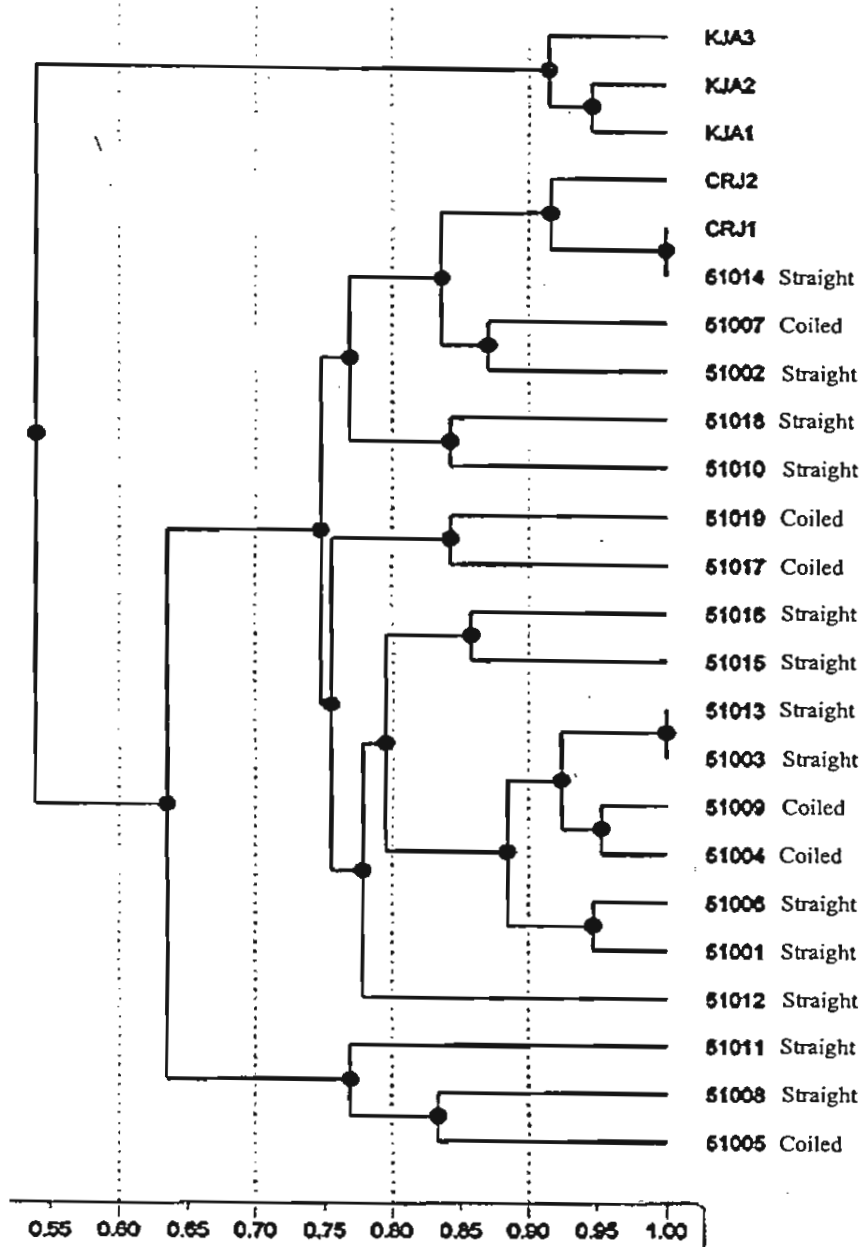


FIG. 5. Phylogenetic tree of *C. raciborskii* constructed from band pattern difference of primer combination of STRR1R and STRR3R by using Image Master 2 Delite Ver 2.00 software.

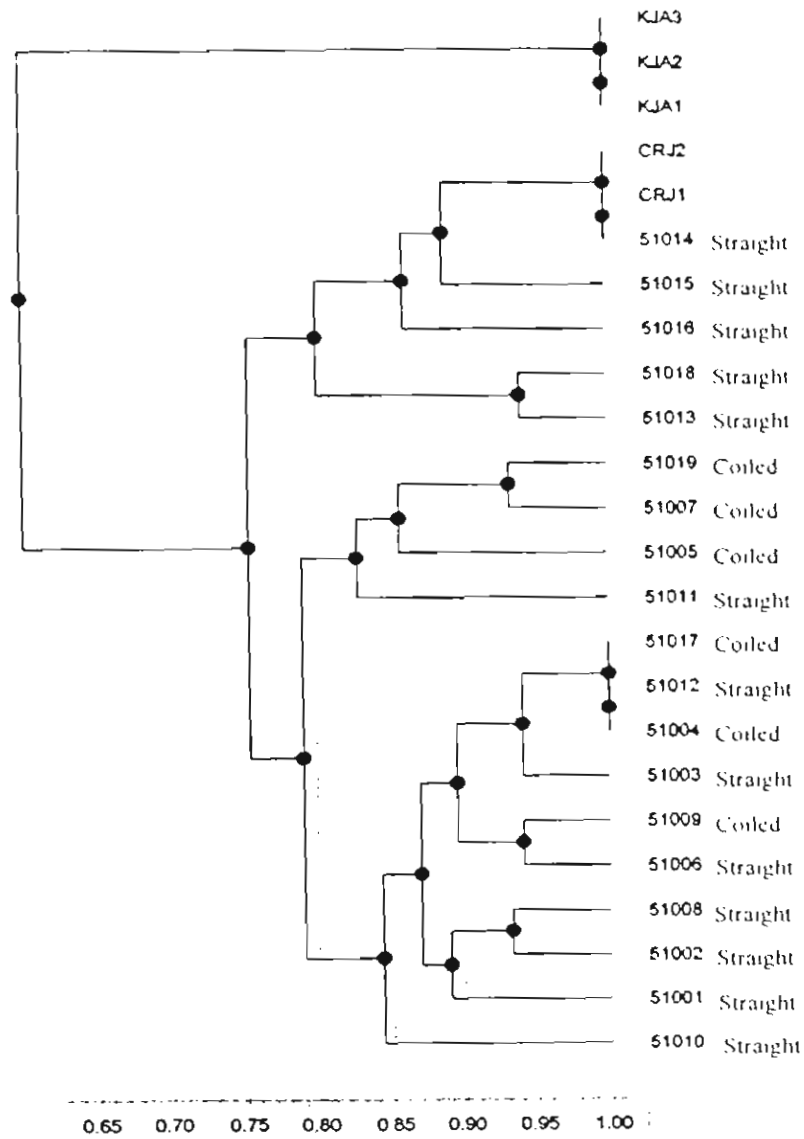


FIG. 6. Phylogenetic tree of *C. raciborskii* constructed from band pattern difference of primer combination of STRR1F and STRR3F by using Image Master 2 Delite Ver 2.00 software.

NJ

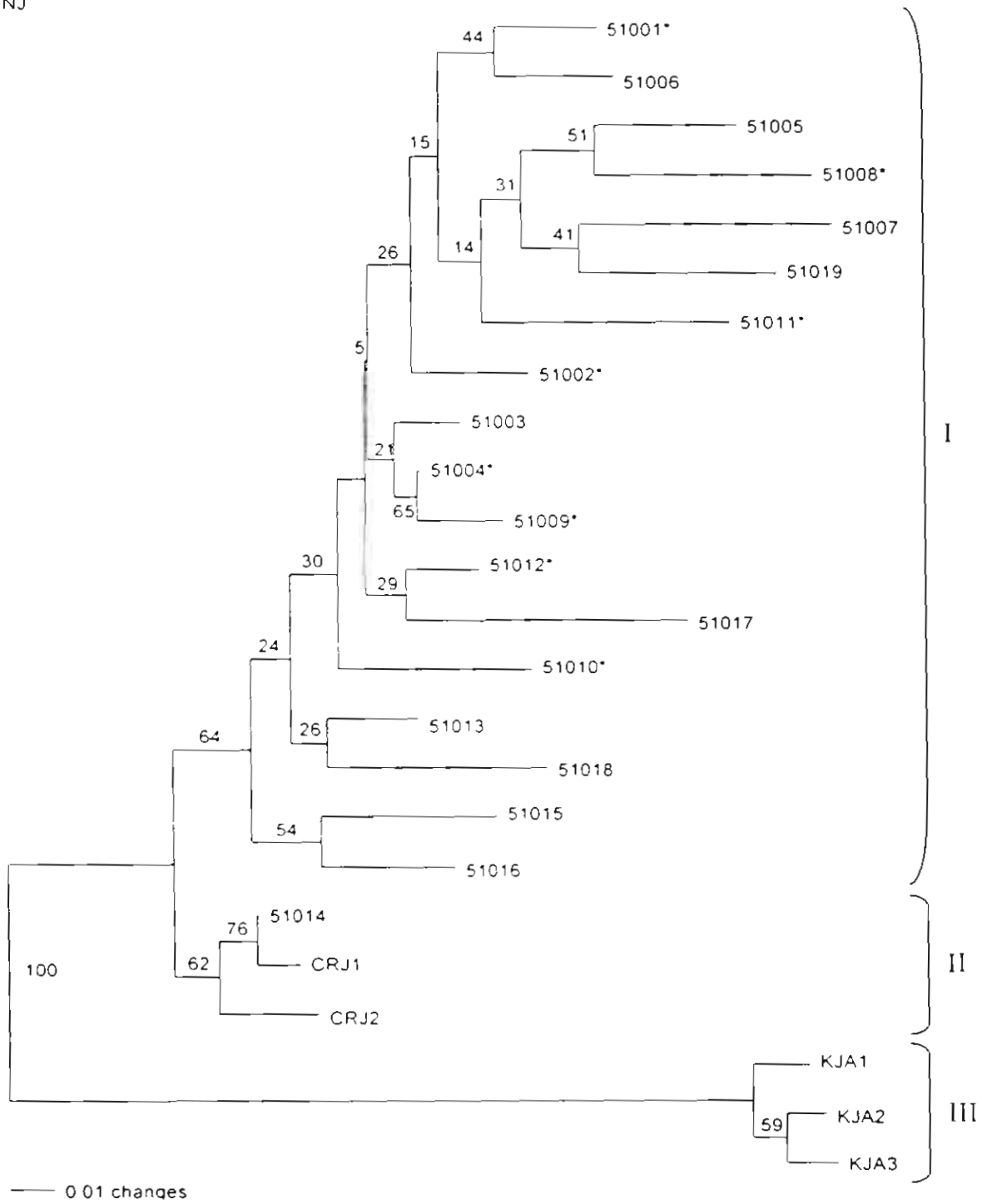


FIG. 7. Phylogenetic tree of *C. raciborskii* constructed from total character different of band pattern analysis of STRR sequence by the neighbor-joining method.
 * = Toxin was detected.

บทความสำหรับการเผยแพร่

จากการสำรวจแหล่งน้ำจืดทั้งหมด 176 แหล่ง พบไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Cylindrospermopsis* จำนวน 38 ตัวอย่าง จาก 24 จังหวัด ลักษณะของ trichome ที่พบมีทั้ง 2 แบบ คือแบบเส้นตรง (straight trichome) และแบบเกลียว (coiled trichome) ลักษณะรูปร่างของ heterocyst ที่มีอยู่ 2 แบบเช่นกัน คือ รูปใบหอก (spear-head) และรูปไข่ (oval) จากการคัดแยกโดยเทคนิค single trichome isolation สามารถรวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์จากประเทศไทยได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์

การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาของ *Cylindrospermopsis* sp. ทั้ง 24 สายพันธุ์ (ไทย 3 สายพันธุ์ ออสเตรเลีย 2 สายพันธุ์ และญี่ปุ่น 3 สายพันธุ์) พบว่าเซลล์ปกติมีรูปร่างทรงกระบอก ขนาดกว้าง 1.9-6.3 μm และยาว 3.0-18.5 μm คิดเป็นสัดส่วนความยาว:ความกว้าง 0.8-7.0 สาย trichome อาจมี heterocyst ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้ง 2 ด้านและมีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.9-7.0 μm และยาวเฉลี่ย 3.3-11.9 μm คิดเป็นสัดส่วนความยาว:ความกว้าง 0.9-5.2

จากการเพาะเลี้ยง *Cylindrospermopsis* sp. ทั้ง 12 สายพันธุ์ในสภาวะมาตรฐานโดยใช้ CT medium พบว่าทั้งหมดมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน โดยที่สายพันธุ์ 51002 มีอัตราการเจริญสูงสุดถึง 9.9×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใน 4 สัปดาห์ และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ 0.1597 วัน⁻¹ ในสัปดาห์ที่ 1 ส่วนสายพันธุ์ 51011 มีอัตราการเจริญต่ำสุดที่ 1.6×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลาเดียวกันและมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.0751 วัน⁻¹ ในสัปดาห์ที่ 3

ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียใน nitrogen free CT medium พบว่าจากเชื้อเริ่มต้นที่ trichome ส่วนใหญ่ไม่พบ heterocyst จะมีจำนวน heterocyst เพิ่มขึ้นในทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ในระยะ 2-4 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังสังเกตพบ มีการสร้าง heterocyst อยู่ภายในสาย trichome คล้าย intercalary heterocyst ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นขั้นตอนการสร้าง heterocyst ภายในสายก่อนที่จะแบ่งสาย trichome ออกเป็นสองเส้น ผลกระทบของสภาวะการขาดไนโตรเจนเห็นได้ชัดเจนในสายพันธุ์ที่มีการสร้าง heterocyst น้อยจะมีการเจริญต่ำกว่าสายพันธุ์ที่สร้าง heterocyst มาก

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญพบว่าทั้งหมดไม่สามารถเจริญได้ที่ 40°C 7 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ 30°C โดยสายพันธุ์ 51005 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ OD_{600nm} เท่ากับ 2.089 ใน 30 วันของการเพาะเลี้ยง และ 5 สายพันธุ์ที่เหลือเจริญได้ดีที่สุดที่ 35°C โดยสายพันธุ์ 51007 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ OD_{600nm} เท่ากับ 2.146 หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 30 วัน

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Cylindrospermopsis* sp. ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ พบว่าจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จะอยู่ในช่วง 1354-1373 bp โดยบางสายพันธุ์จากประเทศไทยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *C. raciborskii* AF067819 และลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 16S rDNA ของ *C. raciborskii* ทั้ง 24 สายพันธุ์มี DNA sequence similarity สูงกว่า 99.5 % ซึ่งเมื่อทำการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการแล้วพบว่า *C. raciborskii* ทั้งหมดรวมกลุ่มอยู่ใน cluster เดียวกัน

ในการวิเคราะห์ STRR sequence ของ *C. raciborskii* ทั้ง 24 สายพันธุ์ โดยใช้ primer 3 คู่ ได้แก่ STRR1F และ STRR3F, STRR1F และ STRR 3R, STRR1R และ STRR3R พบว่า PCR products ของสายพันธุ์จากประเทศไทยกับออสเตรเลียมีขนาดใกล้เคียงกันมาก คืออยู่ในช่วง 0.3-5.6 Kb (STRR1F และ STRR3F, STRR1F และ STRR 3R) และช่วง 0.6-4.8 Kb (STRR1R และ STRR3R) ในขณะที่สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นมีค่าที่อยู่ในช่วงที่กว้างกว่า คือระหว่าง 0.2-5.6 Kb และ 0.3-6.7 Kb ตามลำดับ ความแตกต่างในสายพันธุ์ต่างๆ ของ *C. raciborskii* สามารถเห็นได้จาก DNA band pattern ของ primer ทั้ง 3 คู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคู่ของ STRR1R-STRR3R ที่แสดง band pattern ที่แตกต่างกันถึงแม้ว่าจะเป็นสายพันธุ์แยกมาจากแหล่งน้ำเดียวกัน และยังสามารถแยกกลุ่มของสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย ที่มี trichome แบบเกลียวทั้ง 6 สายพันธุ์ออกจากกันอย่างชัดเจน สำหรับ primer คู่ระหว่าง STRR1F and STRR3F แสดงให้เห็นความแตกต่างและสามารถรวมกลุ่มของสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งทั้ง 13 สายพันธุ์ที่มี trichome แบบเกลียว นอกจากนี้ primer คู่ STRR1R-STRR3R สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่แยกจากประเทศญี่ปุ่น อย่างไรก็ตาม primer ทุกคู่ให้ผลพ้องกันในการแสดงความแตกต่างของ band pattern โดยแยกกลุ่มสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น (KJA1, KJA2 และ KJA3) ออกจากสายพันธุ์ประเทศไทยและออสเตรเลีย ดังนั้นวิวัฒนาการที่สร้างจากข้อมูลไบনারีของ band pattern จาก STRR sequence แสดงให้เห็นการจัดกลุ่ม *C. raciborskii* ออกเป็น 3 cluster แยกออกตามประเทศแหล่งกำเนิด ได้แก่ Cluster I - สายพันธุ์จากประเทศไทย Cluster II - สายพันธุ์จากประเทศออสเตรเลีย และ Cluster - III สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น และยังแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์จากประเทศไทยและออสเตรเลียมีความใกล้ชิดกัน โดยแยกสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นเป็นกลุ่มอิสระจากสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ cylindrospermopsin พบว่าสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นและออสเตรเลียไม่มีสารพิษเลย ในขณะที่สายพันธุ์จากประเทศไทยที่ส่วนใหญ่อยู่ใน cluster I จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ 51001 51002 51004 51008 51009 51010 51011 และ 51012 มีสารพิษ cylindrospermopsin โดยที่สายพันธุ์ 51011 และ 51012 มีปริมาณสารพิษมากกว่าสายพันธุ์ AWT205 ถึง 1.5 เท่า และ 2.5 เท่าตามลำดับ