

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเหินแดงมีมาอย่างยาวนานและค่อนข้างมีความซับซ้อน โดยส่วนมากจะเน้นการศึกษาลักษณะโครงสร้างของสปอร์ซึ่งหาได้ยากในธรรมชาติ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อจำแนกสายพันธุ์โดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยคัดเลือกเหินแดงได้จากบ่อภายในฟาร์มและสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ (AZO1 AZO2 และ AZO3) โดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ในส่วนของสปอร์เพสเมีย (megaspore) จะพบฟลูตอย (float) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ร่วมกับการศึกษาขนาดของใบและลักษณะของขนใบ (trichome) ผลของการจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเหินแดงทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ใน section *Azolla* AZO1 คือสายพันธุ์ *A. microphylla*, AZO2 คือสายพันธุ์ *A. cristata* และ AZO3 คือสายพันธุ์ *A. filiculoides* สำหรับการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากของเหินแดงเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอร่วมกับ 18S rDNA และ ITS region จากนั้นนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยนำมาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของเหินแดงใน GenBank พบว่าการใช้ 18S rDNA ให้ผลลำดับเบสของ AZO1 มีความใกล้เคียงกับ *Azolla* sp. Qiu 02051 99.2% AZO2 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.6% และ AZO3 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.4% ผลจากการใช้ 18S rDNA ไม่สามารถจำแนก AZO2 ในระดับสปีชีส์ได้ ดังนั้น จึงนำ ITS region มาใช้เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่จำเพาะเจาะจงขึ้น จากการใช้ ITS ให้ผลลำดับเบสของ AZO1 มีความใกล้เคียงกับ *A. microphylla* 99.3% AZO2 ใกล้เคียงกับ *A. mexicana* 99.0% และ AZO3 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.2% ดังนั้นการใช้วิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ ITS region เป็นวิธีที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเหินแดงได้อย่างชัดเจน สำหรับการใช้น้ำเหินแดงเพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว เปรียบเทียบผลของการใช้น้ำเหินแดงแต่ละสายพันธุ์กับการใช้ปุ๋ยเคมี (12-8-8 กก. N-P₂O₅-K₂O /ไร่) ผลผลิตของเมล็ดที่สูงที่สุดคือ 4.97 ตัน/เฮกเตอร์ ซึ่งพบในแปลงข้าวที่ปลูกร่วมกับการไถกลบเหินแดงสายพันธุ์ AZO1 (*A. microphylla*) พบว่าไม่มีความแตกต่างกับการใช้ปุ๋ยเคมี โดยผลผลิตที่ได้จากการใช้น้ำเหินแดงสายพันธุ์นี้มีผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าเหินแดงสายพันธุ์ *A. microphylla* เป็นเหินแดงสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่จะใช้เป็นปุ๋ยในนาข้าวโดยเพิ่มผลผลิตได้เทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมี

The classification of *Azolla* (Azollaceae) has been quite complicated and continued for a long time. Because most taxonomies of *Azolla* (Azollaceae) focus primarily on reproductive structures which are rarely present in nature and unclear in some species, this study aimed to classify *Azolla* species by observing their morphology through stereo microscope, SEM and DNA analysis. Three isolated *Azolla* (AZO1, AZO2 and AZO3) were collected from the two ponds: one in the farm and the other in the organic garden, Suranaree University of Technology. The morphological study which was based on diameters of vegetative, epidermal trichomes and float number in megasporocarp found that the three species of *Azolla* were further classified as follows: AZO1 as *A. microphylla*, AZO2 as *A. cristata* and AZO3 as *A. filiculoides*. Moreover, DNA sequences (18S rDNA and ITS region) were investigated. The alignment sequencing (18S rDNA) indicated that AZO1 had 99.2% homology with *Azolla* sp. Qiu 02051, AZO2 had 99.6% homology with *A. filiculoides* and AZO3 had 99.4% homology with *A. filiculoides*. However, 18S rDNA could not be used to classify deep down to species level for AZO2, so the ITS region was used for more specific results. From the sequencing of ITS region, it was indicated that AZO1 had 99.3% homology with *A. microphylla*, AZO2 had 99.0% homology with *A. mexicana* and AZO3 had 99.2% homology with *A. filiculoides*. In addition, these results were in accordance with the morphological study, so the molecular method using ITS region was needed. Furthermore, the application of *Azolla* species as biofertilizer in the rice field has been evaluated by comparing with the chemical fertilizer (12-8-8 kg / rai). The highest grain yield (4.97 t/ha) obtained from the rice field incorporated with AZO1 (*A. microphylla*), did not significantly differ from the chemical fertilizer. Nevertheless, the grain yield (16.72%) obtained from AZO1 was higher than that from chemical fertilizer (12.28%). Therefore, *A. microphylla* could be used as biofertilizer with the same result as chemical fertilizer.