ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Bacillus subtilis* โดยเทคนิค RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

นาย นิพัทธ์ มณีโชติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0220-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY OF *Bacillus subtilis* BY RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

Mr. Nipat Maneechote

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of science

Chulalongkorn University

Academic year 2001

ISBN 974-17-0220-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Bacillus subtilis* โดยเทคนิค RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA
โดย	นาย นิพัทธ์ มณีโชติ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....รองคณบดีฝ่ายบริหาร
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์มนทกานติ วัชราภัย)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ)

นายนิพัทธ์ มณีโชติ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Bacillus subtilis* โดยเทคนิค RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA. (GENETIC DIVERSITY OF *Bacillus subtilis* BY RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 99 หน้า.
ISBN 974-17-0220-5

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในดินตัวอย่างที่เก็บได้จากพื้นที่ต่างๆ ในบริเวณศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดแปรผันอยู่ระหว่าง 2.7 x 10^5 – 5.2 x 10^7 โคโลนี/ กรัมของดิน ดินตัวอย่างมีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 4.03 - 37.13 ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.0 –7.69 เปอร์เซ็นต์และค่าอินทรีย์สารอยู่ในช่วง 7.12 – 15.73 เปอร์เซ็นต์ *B. subtilis* ที่คัดแยกได้จำนวน 35 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Bipolaris oryzae*, *Pyricularia grisea* และ *Collectotrichum glyeosporioides* พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค RAPD–PCR ด้วยไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถให้ผลิตผลพีซีอาร์ได้ หลังจากนั้นได้เลือกไพรเมอร์ 4 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณผลิตผลของพีซีอาร์ได้ชัดเจน มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของ *B. subtilis* แต่ละไอโซเลทได้อย่างชัดเจน และพบว่าบางไอโซเลทมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม RAPDistance สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันเป็นเชื้อเดียวกัน และแบ่งกลุ่ม *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท ออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งพบว่าการแบ่งกลุ่มโดยวิธี RAPD มีความสัมพันธ์กันกับผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคพืช 5 ชนิด

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2544

4172330123 : MAJOR GENETICS

KEY WORDS : RAPD/PHYLOGENETIC TREE/ANTIFUNGAL/ DNA FINGERPRINTING

NiPAT MANEECHOTE : GENETIC DIVERSITY OF *Bacillus subtilis* BY RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D. 99 pp.

ISBN 974-17-0220-5

Total bacterial numbers in soil samples collected from various areas in the Huay Hong Krai Royal Development Study Centre were determined. The results showed that the total numbers of bacteria were between $2.7x10^5$-$5.2x10^7$ cfu/g of soil, moisture content of soil ranged between 4.03-17.13%, pH ranged between 5.00-7.69, and organic matter content ranged between 7.12-15.73%. The ability of *Bacillus subtilis* bacterial isolates to inhibit the molds *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytopthora palmivora*, *Bipolaris oryzae*, *Pyricularia grisea*, and *Collectotrichum gloeosporioides* were tested. These bacterial isolates showed differential antagonistic property against the mold. Randomly amplified polymorphic DNA assay for DNA fingerprinting of *B. subtilis* using ten primers found that only eight gave reproducible PCR products. Four primers that showed the most distinct amplified reproducible PCR products were chosen to differentiate 35 *B. subtilis* isolates in the RAPD DNA fingerprinting assay. The RAPD profiles of the 35 isolates were analysed using the RAPDistance program with the clustering method of profile relatedness. *B. subtilis* isolates possessing a similar banding pattern were grouped together in the same cluster. This study could classify *B. subtilis* into four clusters according to the close relationship of the nearest neighbour analysis and the results of their antagonistic property against five mold species.

Department	Botany	Student's signature .....
Field of study	Genetics	Advisor's signature.....
Academic year	2001	

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในด้านต่างๆ รวมถึงตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์มนทกานติ วัชราภัย และรองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแนะนำในด้านต่างๆ รวมถึงตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์นภาศรี สุวรรณดิษฐ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ไขศรี เปี่ยมศุภทรัพย์ อาจารย์ลัดดา ใหม่มงคล และอาจารย์ยิ่งศักดิ์ นิตยฤกษ์ ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการเก็บตัวอย่าง รวมถึงอำนวยความสะดวกในด้านที่พักและการเดินทางเข้าไปยังพื้นที่

ขอขอบคุณกองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตรที่อนุเคราะห์เชื้อราสายพันธุ์มาตราฐาน เพื่อนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันราชภัฏธนบุรี ที่อนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์ และสถานที่ในทำการทดลองครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา	14
อุปกรณ์การศึกษา	14
วิธีการศึกษา	16
บทที่ 4 ผลการศึกษา	26
การศึกษาจำนวนแบคทีเรียจากดินในพื้นที่ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ	26
การศึกษาชนิดของ *Bacillus*	30
การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท โดยทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืช	34
การเตรียมดีเอ็นเอและศึกษาสภาวะที่ที่เหมาะสมต่อปฏิกริยา RAPD-PCR	51
การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* โดยวิธี RAPD-PCR	52
การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์กลุ่มด้วยวิธี cluster	53
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	67
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา	72
รายการอ้างอิง	74
ภาคผนวก	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	99

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้โดย *B. subtilis* 7
2. การเตรียมความเข้มข้นของปฏิกิริยา RAPD-PCR..... 24
3. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดินพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ในพื้นที่ป่าสงวนแห่งชาติป่าขุนแม่กวง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่..... 28
4. สมบัติทางกายภาพของดินตัวอย่าง ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ป่าสงวนแห่งชาติป่าขุนแม่กวง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่..... 29
5. สมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีของ *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท..... 31
6. จำนวน *B. subtilis* ที่จัดจำแนกได้ 35 ไอโซเลท จากดิน 5 แปลง..... 32
7. ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท จากดิน 5 แปลง ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 6 ชนิด..... 36
8. คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท ที่เตรียมได้..... 54
9. ความเหมือนกันทางพันธุกรรมโดย Jaccard ระหว่างคู่แต่ละคู่ของสายพันธุ์..... 65

ตารางภาคผนวกที่

1. ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช 6 ชนิด โดย *B. subtilis* ทั้ง 35 ชนิด ที่คัดเลือกได้ จากดินทั้ง 5 แปลง..... 91
2. แถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบใน *B. subtilis* 35 ไอโซเลท ที่ได้จากการตรวจนับการปรากฏ (1) และไม่ปรากฏ (0) วิเคราะห์โดยวิธี RAPD ด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด..... 95

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ หน้า

1. ตำแหน่งเก็บดินจากพื้นที่แปลงศึกษาตามแนวทะแยงมุม..... 17
2. วิธีการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อรา..... 21
3. กราฟแท่งเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในดินแต่ละแปลง ทั้ง 3 ครั้ง..... 28
4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *B. subtilis* PS5202-3 33
5. การยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 6 ชนิด บนอาหาร PDA โดย *B. subtilis* PS5202-2..... 35
6. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. parasitica* DOA-PPF 30-1 โดย *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท..... 39
7. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* DOA-PPF 38-4 โดย *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท..... 41
8. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* DOA-PPF 43-108 โดย *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท..... 43
9. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. oryzae* DOA-PPF 43-21 โดย *B. subtilis* 35 ไอโซเลท..... 45
10. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* DOA-PPF 43-136 โดย *B. subtilis* 35 ไอโซเลท..... 47
11. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* DOA-PPF 43-138 โดย *B. subtilis* 35 ไอโซเลท..... 49
12. RAPD profiles โดยใช้ปริมาณเอ็นไซม์ Taq Polymerase ที่ระดับความเข้มข้น 0.625 U, 1 U และ1.25 U ร่วมกับปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่ระดับ 12.5 pmol และ 25 pmol และ Annealing temperatere ที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที (A) ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที (B) ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที (C) ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที (D) 56

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพที่ **หน้า**

13. RAPD profiles ของ *B. subtilis* 3 ไอโซเลท ที่ระดับความเข้มข้น $MgCl_2$ ที่ 3 mM, 4 mM และ 4.5 mM ร่วมกับ Taq Polymerase ที่ความเข้มข้น 0.625 U (A), 1 U (B) และ 1.25 U (C) ที่ระดับความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pM และ 12.5 pM..... 57

14. RAPD profile ของ *B. subtilis* 4 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ 8 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้น MgCl 4 mM ร่วมกับ Taq Polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และไพรเมอร์เข้มข้น 25 pM..... 58

15. แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPR1..... 59

16. แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPR13..... 60

17. แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPR16..... 61

18. แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 1247..... 62

19. Dendrogram โดยคอมพิวเตอร์โปรแกรม RAPDistance..... 66