การจำแนก species ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Macrophomina phaseolina* และ *Sclerotium rolfsii*

Species Identification of the *Bacillus* Isolates Antagonistic to *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*

มัทนา ศรีหัตถกรรม หทัยรัตน์ อุไรรงค์

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

DNAs of *Bacillus* isolates namely B1, B5 and B7 which conspicuously inhibited mycelial growth of *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii* were identified by a PCR-based technique. The specific primers used were 63f (5´ - CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC - 3´) and 1387r (5´ – GGG CGG WGT GTA CAA GGC - 3´). The PCR running conditions were as following : initial denature 94°C 3 Min; 30 3-step cyclings : denature 94°C 55 Sec., annealing 55°C 55 Sec., extention 70°C 55 Sec.; final extension 72°C 10 Min and stop PCR 4°C. Results revealed that these three *Bacillus* DNAs were of *B. subtilis*.

บทคัดย่อ

ได้ทำการจำแนก *Bacillus* spp. ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ *Macrophomina phaseolina* และ *Sclerotium rolfsii* ดี จำนวนสามไอโซเลท คือ B1, B5 และ B7โดยเทคนิค PCR B1 เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินปลูกถั่วเขียว ยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* B5 แยกได้จากดินปลูกถั่วเหลือง ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ส่วน B7 แยกได้จากดินป่าที่เก็บมาจาก ตำบล กระบกเตี้ย อำเภอ หันคา จังหวัด ชัยนาท ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* มีขั้นตอนการทดลองดังนี้ สกัด genomic DNA ของเชื้อ โดยใช้ QIAGEN DNA Extraction Kit

---

รหัสทะเบียนวิจัย 04 109333 002

จากนั้นนำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ไปเพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ด้วยเครื่อง Gene Amp PCR System 9700 Thermocycler โดยใช้ specific primer 63f (5´- CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3´) และ 1387r (5´ – GGG CGG WGT GTA CAA GGC - 3´) และใช้ *Tag* PCR Master Mix Kit ตั้ง PCR running condition ดังนี้ initial denature 94 องศาเซลเซียส 3 นาที เพิ่มจำนวน 30 รอบ คือ denature 94 องศาเซลเซียส 55 วินาที annealing 55 องศาเซลเซียส 55 วินาที extention 70 องศาเซลเซียส 55 วินาที final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที stop PCR 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาด (molecular weight) ของชิ้นดีเอ็นเอใน PCR product โดยวิธี electrophoresis ใน 0.5 X TBE buffer ใช้ไฟ 200 โวลท์ 50 มิลลิแอมแปร์ นาน 60 นาที โดยมี agarose gel 0.9 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่เป็นตะแกรงคัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ และมี 1 kb DNA ladder เป็น marker นำแผ่นเจลไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation ภายหลังจากย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide นาน 30 นาที และล้างด้วยน้ำ 5 นาที ทำ PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAGEN PCR Purification Kit และตรวจสอบขนาด (molecular weight) ของชิ้นดีเอ็นเอใน PCR product โดยวิธี electrophoresis ดังวิธีการข้างต้น แต่ใช้ไฟ 80 โวลท์ 50 มิลลิแอมแปร์ นาน 80 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบสโดยเครื่อง automate sequencer แล้วเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่มีอยู่ใน EMBL (European Molecular Biology Library) โดยใช้โปรแกรม Fasta 3 และ สร้าง phylogenetic tree, cluster analysis โดยใช้โปรแกรม Genebee Service ผลการจำแนกเชื้อ พบว่า PCR product ของ B1, B5 และ B7 ที่เพิ่มปริมาณได้ มีขนาด 1,300 เบสแพร์ และเมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ใน EMBL พบว่าเป็น *B. subtilis* ทั้งสามไอโซเลท

คำนำ

ในการปลูกถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ และถั่วเหลืองมักมีโรคต่างๆ มารบกวน ที่เป็นปัญหาสำคัญในหลายแหล่งปลูก คือ โรครากและโคนเน่าที่เกิดจาก *M. phaseolina* และ *S. rolfsii* โรคนี้สามารถเข้าทำลายได้ทั้ง ถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ ถั่วเหลือง และพืชเศรษฐกิจอื่นอีกหลายชนิด ทำให้เมล็ดเน่าก่อนงอก ถ้าเข้าทำลายในระยะกล้า จะทำให้พืชเป็นโรครากและโคนเน่า ถั่วยืนต้นตายเป็นบริเวณกว้าง หรือเจริญเติบโตไม่ดี ทำให้ผลผลิตลดลง นอกจากนี้เชื้อยังสามารถติดไปกับเมล็ด (มัทนา, 2542) ทำให้เมล็ดเน่า คุณภาพเมล็ดเสีย ขายได้ราคาไม่ดี หรือเก็บผลผลิตไม่ได้ การป้องกันกำจัด *M. phaseolina* และ *S. rolfsii* ในดินปลูก พบว่ากระทำได้ยากยิ่ง เนื่องจากเชื้อ

ทั้งสองชนิดสร้าง sclerotia ที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และสามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้ยาวนานหลายปี กอรปกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินกับพืชไร่ ที่ปลูกเป็นบริเวณกว้าง นอกจากจะต้องลงทุนสูงแล้ว สารพิษที่สะสมอยู่ในเมล็ดและดินภายหลังการใช้ ยังเป็นพิษต่อคนสัตว์และสิ่งแวดล้อม จึงทำให้โรคที่เกิดจากเชื้อนี้เป็นปัญหาให้กับพืชปลูกมาจนถึงปัจจุบัน และมีแนวโน้มว่าจะก่อความเสียหายรุนแรงยิ่งขึ้น ถ้ายังไม่มีวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ดีเหมาะสม เนื่องจากพบ sclerotia ในดินปลูกถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ ถั่วเหลือง มากถึง 1 - 43 sclerotia/ดินแห้ง 1 กรัม เฉลี่ย 8 sclerotia / ดินแห้ง 1 กรัม (มัทนา, 2540) ในพื้นที่ปลูกบริเวณกว้าง การป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธีน่าจะเป็นทางเลือกที่ดี เหมาะสม

ปี 2534 มัทนา และคณะ พบ *Bacillus* spp. (B1, B5, และ B7) ที่แยกได้จากดินป่า ต. กระบกเตี้ย อ. หันคา จ. ชัยนาท แสดงปฏิกิริยายับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* และ *S. rolfsii* บนอาหาร Potato Dextrose Agar(PDA) เกิด clear zone เป็นบริเวณกว้าง แต่เชื้อไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เมื่อนำไปทดสอบในกระถาง อาจจะเป็นไปได้ว่า ใช้วิธีการปลูกเชื้อที่ไม่เหมาะสม ในปี พ.ศ. 2534 – 2543 มัทนาและคณะ พบแบคทีเรียที่แยกได้จากดินป่า และดินปลูกถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ และถั่วเหลือง แสดงปฏิกิริยายับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* และ *S.rolfsii* บนอาหาร PDA และ Nutrient Agar (NA) ทำให้เกิด clear zone ระหว่างโคโลนีของแบคทีเรีย กับ *M. phaseolina* และ *S. rolfsii* เป็นบริเวณกว้าง จึงทำการจำแนกแบคทีเรียที่พบทางสัณฐานวิทยาสรีรวิทยา และชีวเคมี(Anonymous, 1986; Buchanan and Gibbons, 1974; Chan *et al*., 1993; Baron and Finegold, 1990; Krieg, 1984) พบว่าเป็น *Bacillus* spp. โดยมีบางไอโซเลทเป็น *B. subtilis* แต่บางไอโซเลท ไม่สามารถชี้ชัดได้ จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ช่วยในการจำแนกเชื้อให้ชัดเจนยิ่งขึ้น เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการจำแนกและตรวจสอบเชื้อกันอย่างกว้างขวางทั่วโลก เพราะเป็นเทคนิคง่ายๆ มีความไว ความเฉพาะเจาะจง ถูกต้อง แม่นยำสูง และ รวดเร็ว เพียงมีดเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อเพียงหนึ่ง copy ก็สามารถจำแนกเชื้อได้โดยไม่จำเป็นต้องทำให้เชื้อบริสุทธิ์ และไม่จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (สุรินทร์, 2543) ถ้าสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ได้ จะเป็นประโยชน์ในการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับตัวเชื้อและสารพิษที่เชื้อนี้ผลิตออกมา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่องานป้องกันกำจัดโรคพืช โดยเฉพาะโรคที่เกิดจาก *M. phaseolina* และ *S. rolfsii*

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

เพื่อจำแนกชนิดของ *Bacillus* spp. ไอโซเลทที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *M. phaseolina* และ *S. rolfsii* โดยใช้เทคนิค PCR

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง
2. ตู้บ่มเชื้อ
3. spectrophotometer
4. electrophoresis tank และ power supply
5. Gene Amp PCR System 9700 Thermocycler
6. water bath
7. vortex mixer
8. สารเคมี/สารละลายที่ใช้ในการดำเนินการ

8.1 สารเคมี /สารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ คือ

- สารละลายเอนไซม์ (lysozyme 20 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ; 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.0; 2 มิลลิโมลาร์ EDTA; 1.2 เปอร์เซ็นต์ Triton X)
- สารละลาย proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
- สารละลาย RNase A (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
- สารละลาย AL buffer
- สารละลาย AW1 buffer
- สารละลาย AE buffer
- เอธานอล 96 - 100 เปอร์เซ็นต์
- deionized distilled water

8.2 สารเคมี / สารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

- สารละลาย *Tag* PCR Master Mix (2.5 ยูนิต *Tag* DNA Polymerase, 1 x QIAGEN PCR Buffe (มี $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์) และ 200 ไมโครโมลาร์ ของ dNTP แต่ละชนิด)
- สารละลาย 16S rDNA primer คือ 63f (5´ - CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC - 3´) และ 1387r (5´ – GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3´) ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์
- สารละลาย Template DNA
- deionized water (RNase free water)

8.3 สารละลาย/ สารเคมีที่ใช้ในการทำ electrophoresis

- สารละลาย PCR product
- 6 x loading dye
- 1 kb DNA Ladder
- สารละลาย ethidium bromide (EtBr) (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
- agarose

8.4 สารละลาย/ สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR purification

- PB buffer
- PE buffer
- EB buffer หรือ deionized water

9. culture ของ *Bacillus* spp.ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* และ *S. rolfsii* มากที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ B1, B5 และ B7

B1 เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินปลูกถั่วเขียว ยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* ดี

B5 แยกได้จากดินปลูกถั่วเหลือง ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ดี

B7 แยกได้จากดินป่าที่เก็บมาจาก ตำบล กระบกเตี้ย อำเภอ หันคา จังหวัดชัยนาท ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ดี

10. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)

11. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่

- หลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- PCR reaction tube
- micro pipette
- cuvette หนา 10 มิลลิเมตร

วิธีการ

มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. สกัด genomic DNA ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท B1, B5 และ B7 โดยใช้ QIAGEN DNA Extraction Kit มีวิธีการตามลำดับดังนี้

1.1 เลี้ยงเชื้อไอโซเลท B1, B5 และ B7 ในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 140 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 - 7 ชั่วโมง

1.2 แยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร NB โดยการนำไปปั่นเหวี่ยง 7500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เซลล์แบคทีเรียจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้งไป

1.3 ละลายเซลล์แบคทีเรียที่ได้ในสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

1.4 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรียในข้อ 1.3 ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex mixer แล้วบ่มไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส โดยในระหว่างการบ่ม ต้องผสมให้เข้ากันดี (vortex) ทุกๆ 30 นาที จนกระทั่งเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำให้แตกอย่างสมบูรณ์ซึ่งกินเวลา 3-6 ชั่วโมง

1.5 นำสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2-4 นาที

1.6 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรียในข้อ 1.5 ผสมให้เข้ากันดี (pulse - vortexing) เป็นเวลา 15 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 - 4 วินาที

1.7 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย AL buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรียในข้อ 1.6 แล้วผสมให้เข้ากันดี (pulse - vortexing) เป็นเวลา 15 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 - 4 วินาที

1.8 ใช้ไปเปตดูดเอธานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรียในข้อ 1.7 แล้วผสมให้เข้ากันดี (pulse - vortexing) เป็นเวลา 15 วินาที จะเห็นตะกอนสีขาวๆ เกิดขึ้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 - 4 วินาที

1.9 ใช้ไปเปตดูดสารละลายเซลล์แบคทีเรียในข้อ1.8 มาใส่ใน QIAamp spin column ซึ่งบรรจุอยู่ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร โดยไม่ให้เปื้อนบริเวณขอบของ column ปิดฝา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เสร็จแล้วถอด spin column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่

1.10 ใช้ไปเปตดูด AW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน QIAamp spin column โดยไม่ให้เปื้อนบริเวณขอบของ column ปิดฝาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เสร็จแล้วถอด spin column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่

1.11 ใช้ไปเปตดูด AW2 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน QIAamp spin column โดยไม่ให้เปื้อนบริเวณขอบของ column ปิดฝาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เสร็จแล้วถอด spin column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่

1.12 นำ spin column ที่ใส่อยู่ใน collection tube อันใหม่ ไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด AW2 buffer ไม่ให้ตกค้างอยู่ใน spin column เสร็จแล้วถอด spin column ไปใส่ในหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.13 ใช้ไปเปตดูด AE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หรือ deionized distilled water ใส่ลงไปใน spin column ที่บรรจุอยู่ในหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะล้าง(elute) ดีเอ็นเอลงมาในหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง จะได้สารละลายดีเอ็นเอ 400 ไมโครลิตร

1.14 นำสารละลายดีเอ็นเอ ไปตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 260 นาโนมิเตอร์

1.15 เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. เพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ1 โดยเครื่อง Gene Amp PCR System 9700 Thermocycler โดยใช้ specific primer 63f และ 1387r และ *Tag* PCR Master Mix Kit ดังนี้

2.1 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย *Tag* PCR Master Mix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หรือในอัตราส่วน *Tag* PCR Master Mix 1 ส่วน : (สารละลาย primer และ สารละลาย template DNA) 1 ส่วน มาใส่ลงใน PCR reaction tube ที่วางอยู่บนน้ำแข็งในกล่องพลาสติก

2.2 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย primer ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร (final concentration = 0.1 - 0.5 ไมโครโมลาร์) ใส่ลงใน PCR reaction tube แล้วดูดขึ้นลง เพื่อผสมสารละลายให้เข้ากันดี

2.3 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย Template DNA ปริมาณ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครกรัม/ ปฏิกิริยา ใส่ลงใน PCR reaction tube แล้วดูดขึ้นลง เพื่อผสมสารละลายให้เข้ากันดี

2.4 ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ไมโครลิตร (total volume) ด้วย deionized water (RNase free water) ปิดฝา แล้วผสมให้เข้ากันดีโดยการใช้ปลายนิ้วสกิด PCR reaction tube เบา

2.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2-4 วินาที ก่อนนำไปใส่ลงในเครื่อง Gene Amp PCR System 9700 Thermocycler ตั้งโปรแกรม PCR running condition ดังนี้

Initial denature	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	
denature	94 องศาเซลเซียส	55 วินาที	จำนวน 30 รอบ
annealing	55 องศาเซลเซียส	55 วินาที	
extension	70 องศาเซลเซียส	55 วินาที	
final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
stop PCR	4 องศาเซลเซียส		

3. ตรวจสอบขนาด (molecular weight) ของชิ้นดีเอ็นเอในสารละลาย PCR product ที่ได้ในข้อ2 โดยวิธี electrophoresis ใน 0.5 X TBE buffer ใช้ไฟ 200 โวลท์ 50 มิลลิแอมแปร์ นาน 60 นาที โดยมี agarose gel 0.9 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่เป็นตะแกรงคัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ และมี 1 kb DNA ladder เป็น marker นำแผ่นเจลไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation ภายหลังจากย้อมเจลด้วย ethidium bromide นาน 30 นาที และล้างน้ำ 5 นาที

4. นำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAGEN PCR Purification Kit มีวิธีการคือ

4.1 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย PCR product ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

4.2 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย PB buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ตามลงไป แล้วผสมให้เข้ากันดี

4.3 ใช้ไปเปตดูดสารละลายในข้อ 4.2 ใส่ลงใน QIAquick spin column ซึ่งบรรจุอยู่ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 - 60 วินาที

4.4 ถอด QIAquick spin column ออก เท filtrate ที่บรรจุอยู่ใน collection tube ลงในถุงของเสีย เสร็จแล้วนำ QIAquick spin column ใส่ลงไปใหม่

4.5 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย PE buffer ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ใส่ลงใน QIAquick spin column ปิดฝา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 - 60 วินาที

4.6 ถอด QIAquick spin column ออก เท filtrate ที่บรรจุอยู่ใน collection tube ลงในถุงของเสีย เสร็จแล้วนำ QIAquick spin column ใส่ลงไปใหม่ ปิดฝาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 วินาที

4.7 ถอด QIAquick spin column ออก แล้วนำไปใส่ลงใน หลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

4.8 ใช้ไปเปตดูดสารละลาย EB buffer หรือ deionized water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงตรงจุดกึ่งกลางของ QIAquick membrane ภายใน QIAquick spin column ตั้งทิ้งไว้ 60 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 วินาที เพื่อชะล้าง (elute) ดีเอ็นเอลงมาในหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ

4.9 ถอด QIAquick spin column ทิ้งไป นำหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อที่มีดีเอ็นเอ บรรจุอยู่ภายใน ไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5. ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในสารละลาย PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยวิธี electrophoresis ตามวิธีการข้างต้น แต่ใช้ไฟ 80 โวลท์ 50 มิลลิแอมแปร์ นาน 80 นาที

6. นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ไปหาลำดับเบสโดยเครื่อง automate sequencer

7. sequence analysis มีขั้นตอน ดังนี้

7.1 นำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ใน EMBL (European Molecular Biology Library) โดยใช้โปรแกรม Fasta 3

7.2 สร้าง phylogenetic tree และทำ cluster analysis โดยใช้โปรแกรม Genebee Service

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2545 – กันยายน 2546

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

PCR product ของ B1, B5 และ B7 มีขนาด 1,300 เบสแพร์ (Fig1.) เมื่อนำลำดับเบสที่ได้ (Fig. 2 a,b) ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ใน EMBL พบว่า B1, B5 และ B7 มีลำดับเบสของ reverse sequence เหมือน (identity) กับลำดับเบสของ *B. subtilis* 91.888, 92.574 และ 92.193 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ B7 มีลำดับเบสของ forward sequence เหมือนกับลำดับเบสของ *B. subtilis* 96.934 เปอร์เซ็นต์ ได้แสดง phylogenetic tree และ cluster analysis ไว้ใน Fig. 3 จาก phylogenetic tree และ cluster analysis สามารถสรุปได้ว่า B1 และ B7 เหมือนกัน เป็นตัวเดียวกัน ส่วน B5 มีลำดับเบสต่างจาก B1 และ B7 9 เปอร์เซ็นต์ เหตุที่ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ reverse sequence ของ B1 B5 และ B7 กับลำดับเบสที่มีอยู่ใน EMBL ค่อนข้างต่ำ อาจจะเนื่องมาจาก reverse sequence ที่ได้ น่าจะเป็นบริเวณที่เป็น hyper variable region ของ 16S rDNA gene จึงมีความแปรปรวนมาก ทำให้เปอร์เซ็นต์การเปรียบเทียบต่ำ hyper variable region จะเป็นประโยชน์มากในการใช้จำแนกเชื้อต่าง species กัน ส่วนบริเวณที่เป็น conserve region ของ 16S rDNA gene ลำดับเบสจะแตกต่างกันไม่มาก (Borneman *et al*., 1996; Desiliyarni, *et al*.,1999) สามารถใช้จำแนกเชื้อได้ดีเช่นกัน ส่วน forward sequence ของ B7 น่าจะเป็นบริเวณที่เป็น conserve region ของ 16S rDNA gene จึงมีเปอร์เซ็นต์การเปรียบเทียบสูงมาก

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

Bacillus spp. ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* และ *S. rolfsii* ดี ทั้งสามไอโซเลท เป็น *B. subtilis* จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความเฉพาะเจาะจง ถูกต้อง แม่นยำสูง และรวดเร็ว ใช้เวลาเพียง 1-2 วัน ก็สามารถจำแนกเชื้อได้ถึงระดับ species และสามารถแก้ข้อจำกัดของวิธีการจำแนกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นควรสนับสนุนให้มีการใช้เทคนิค PCR ในการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์กันอย่างแพร่หลายต่อไป

เอกสารอ้างอิง

มัทนา ศรีหัตถกรรม จรัสพร ถาวรสุข เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง และไพฑูรย์ พูลสวัสดิ์. 2534 ก. ความสัมพันธ์ระหว่าง saprophytic microorganisms และเชื้อสาเหตุของโรครากและโคนเน่าของถั่วเขียวผิวดำ. หน้า 97 – 117. ใน : รายงานผลงานวิจัยถั่วเขียว และพืชไร่ในเขตชลประทาน 2534. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

มัทนา ศรีหัตถกรรม จรัสพร ถาวรสุข เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง และไพฑูรย์ พูลสวัสดิ์. 2534 ข. ความสัมพันธ์ระหว่าง saprophytic microorganisms และ *Sclerotium rolfsii* เชื้อสาเหตุของโรครากและโคนเน่าของถั่วลิสง. หน้า 97 – 117. ใน : รายงานผลงานวิจัยถั่วเขียว และพืชไร่ในเขตชลประทาน 2534. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

มัทนา ศรีหัตถกรรม. 2541. การจำแนกชนิดของเชื้อรา และแบคทีเรียที่แยกได้จากดินปลูกถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ และถั่วเหลือง. หน้า 222 - 223. ใน : รายงานผลการวิจัยประจำปี 2541. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท และสถานีทดลองพืชไร่พิษณุโลก สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Anonymous. 1986. Microbiology methods Manual. University of Western Australia. Western Australia.

Baron, E. J. and S. M. Finegold. 1990. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. The C. V. Mosby Company. Toronto.

Borneman, J., P. W. Skroch, K. M. O'Sullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, J. Nienhuis and E. W. Triplett. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol*. 62(6) : 1935–1943.

Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.

Chan, E. C. S.; M. J. Jr. Pelczar and N. R. Krieg. 1993. Laboratory exercises in microbiology. McGraw-Hill, Inc. New York.

Desiliyarni, T., A. Suwanto, M. T. Suhartono and T. Purwadaria. 1999. Genetic diversity analysis of thermophilic bacteria from Candradimuka crater in central Java employing PCR-RFLP of 16S rRNA gene. *Biotropia*. 14 : 1-9.

Krieg, N. R. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol.1. Williams & Wilkins. London.

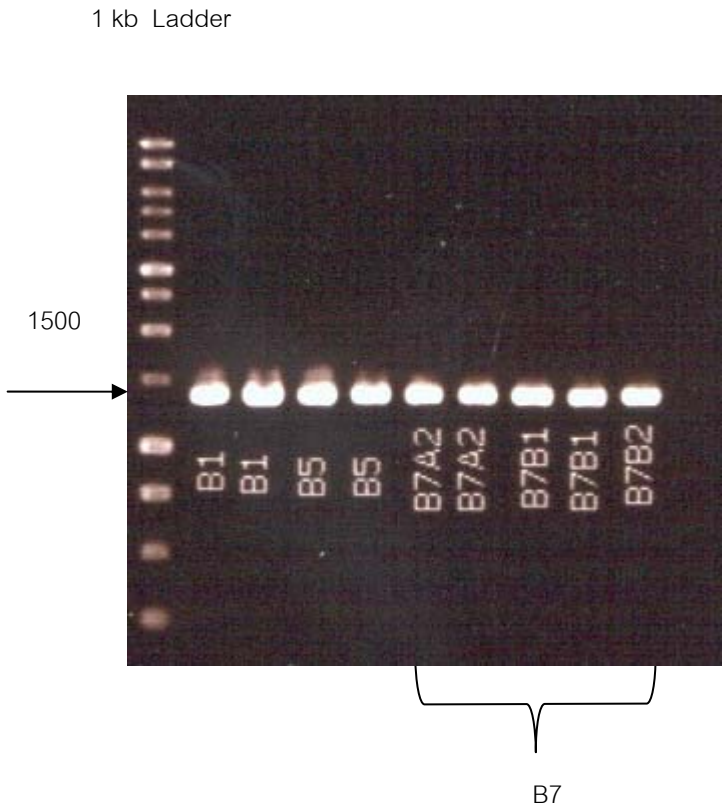

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplification products from the *Bacillus* isolates (B1, B5 and B7).

Fig 2a Reverse nucleotide sequences of *Bacillus* isolates B1, B5 and B7.

B1

CagCATTCGCTTACGCAGTCGTTTGAGACTGCGATCCGACTGAGAACAGATTTA
GGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCA
CGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTNGACGTCAcCCCCACCTTC
TANATcggTTTTgTCACCGGCAGtCACCNNAgAGTGCCCAACTGAATGCTGGCA
ACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTCGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC
GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGNCCT
ATCCTCTAGGATTGTCAGAGGANGTCAAGACCTGGTNAGGTTCTTCGCGTTGCT
tCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTcGA
GTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCCAGGCGGAGTGCTTAAATGCGTTAGCtG
CAGCACtAAGGGGCCGGAAACCCCCCCTAACACCTTANCACCTCATCGGTTTNA
CCGGCGGCNGGACNACCCAAGGGGNNATCCTAAATCCCTGGTTTCCGCCTCCCC
CAACCGCCTTTTCNNCNTCCNTCANGCGNTCAGGTTTAACCAGNACCCNAAANA
NG

B5

gCCTAATACATGCAAGTCgaGCGGACAGATGGGAGCTGCTCCCTGATGTATAGC
GGCGGACGGGTGAGTATACAGCGTGGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAACCGGGCTAGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCCACCTT
CCTccggTTTTgTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAA
CyAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG
AGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTA
TCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTNGTTTC
GAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTCGAGT
TTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCANGCGGAGTGCTTAATGCGTcAGCTGCAGC
ACTAANGGGCGGAAACCCCCCCTAACACTTAAGCACTCATCCGCTCACGGCCTG
GACTACCANGGNAATCcAAACCCTGTTCCGCTTCCCCCACGCTTTTTCGCCTCC
CTTCAGCCGCTCAGTTTAACAAGAACCCAAAANAAGNTCCGCCCTTTCNCCCAC
NNGGGGGTNNCCCTCCCACAANCCTCTACCGCAATTTTNNANCCCGNCNACCAC
NTNGGGAAATTCCCNCCTCTNNCCC

B7

GGAAGTATCTCCGCGGCANGNNTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCAC
GCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCT
TAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
CAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGT
CACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGG
TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAC
CATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGT
CAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA
CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGA
AACCCCCTAACACTTANCACTCATCGTTTACGGCGTGGANTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCANCGTCAGTTACAGANCNAAAG
AGTCGCCNTCGCCCCTGGGGGTTCCTCCACATCTCTACGCANTTTCACCGCTAC
ACGTGGAATTCNACTCNCCTCTTTTGCACTCAAGTTNCCCCNNTTTCCAATGAC
CCTCCCCGGNTGANNCNGGGGGNTTTCACATCANANTTNANAAACCGCCCNGCA
NNCCCTTTNCCCCCAATAATTNCNGAAAAACCNTGGCCNCCTACNTATTACCCC
GNCTTNNTGGNACNTANTTAACCCGGGNNTTTNNGGNTAGGTAACCCCNAAGGN
GCCCCCCCTNTTNCAAAAGGGNCTTNTTTTTTCCCTAAAAACAANNNTTTTNNN
AANC

Fig 2b Forward nucleotide sequences of *Bacillus* isolate B7.

NCGGACNTATCCGAGCTTGNTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC
GGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCAC
TTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCT
GTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGGAAACTGGGGGAA
CTTGAGTGCAGAAGAAGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTANA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAANGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTG
AAGAGCGAAAGCGTGGGGNGCGAACANGANTNAGATACCCTGGTTAGTCCCCGC
CCNTAAACNATGANTGCTNAANTGTTAGGGGGNTTNCCGCCCCTTANTGCTGCA
GCTNANCCNNTAAANCACTCCCCCCTGGGGAGTACGGNCGCCAGACTNNAANCT
CAAAGGAATTNNCNGGGGNCCCCCNCANANNGGGGGNACNTTTGNNTTTTNTTC
NAAACANCCCGNAAAAACCNTTNCNGGGNTTNGACNTCCN

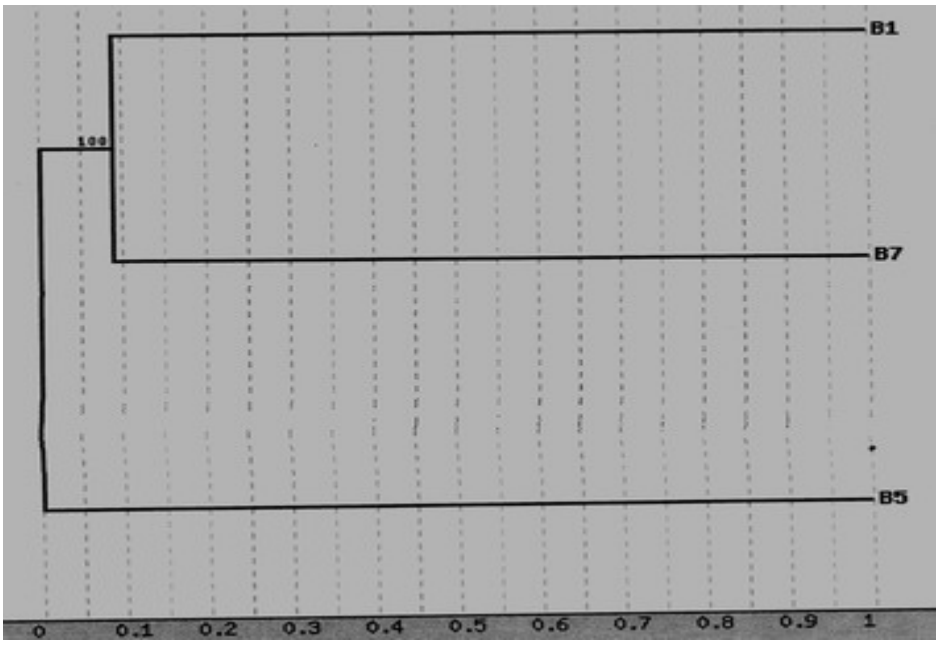

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences from the *Bacillus* isolates, B1, B5 and B7.