บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ มีพื้นที่ส่วนหนึ่งเป็นป่าซึ่งมีสภาพค่อนข้างเสื่อมโทรมจึงถูกใช้เป็นพื้นที่พัฒนาเกษตรกรรมด้านต่างๆ ดังนั้นจึงมีการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาด้านเกษตรกรรม ปัจจุบันมีการศึกษาและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ *B. subtilis* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโรคพืชที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อที่มีการระบาดได้อย่างรวดเร็ว และยังไม่มีวิธีการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งอาจจะพิจารณาได้จากเหตุผลที่สำคัญคือมีความสามารถเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุของโรคพืชได้โดยตรง และสามารถแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน รวมทั้งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบอาศัยอยู่ในพืชโดยไม่ส่งผลกระทบต่อพืชที่อาศัยอยู่ และยังมีความสามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดีโดยการสร้างสปอร์

B. subtilis เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ทำให้ในแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะได้แตกต่างกัน และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อันเป็นสาเหตุของโรคพืชได้แตกต่างกัน วิธีแยกความแตกต่างของ *B. subtilis* ในปัจจุบันใช้วิธีการทางชีววิธี เป็นวิธีการที่ใช้ตัวอย่างจำนวนมาก ใช้เวลาในการศึกษานาน และมีข้อผิดพลาดได้ง่ายเนื่องจากการปนเปื้อน การกลายพันธุ์ การวิเคราะห์ผลซึ่งดูขนาดของการยับยั้ง ทำให้แยกความแตกต่างของ *B. subtilis* ออกมาไม่ชัดเจน การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางสรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามกระบวนการจัดจำแนกชนิดของเชื้อของ The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 บางครั้งก็เกิดความผิดพลาดได้ จึงมีการนำเครื่องหมายทางโมเลกุลมาใช้ในการจำแนก หรือตรวจสอบในระดับสายพันธุ์ ทั้งในระดับโปรตีน และดีเอ็นเอ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษา ความแตกต่างของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดย *B. subtilis* ในพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล วิธีแยกความแตกต่างของเชื้อในพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล เช่น วิเคราะห์ดีเอ็นเอ พลาสมิดดีเอ็นเอ ความแตกต่างของการเรียงตัวของเบสองค์ประกอบของ rRNA ความแตกต่างของ Strain-specific, fluorescent, oligonucleotide วิธีการต่างๆ เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR), Randomly

Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน วิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) เป็นวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำ โดยใช้ไพรเมอร์สายเดี่ยวที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะและมีความยาวเพียง 8-10 นิวคลีโอไทด์ นำมาใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต วิธีนี้ใช้ร่วมกับพีซีอาร์ เมื่อได้ผลิตผลของพีซีอาร์ นำไปตรวจสอบโดย เจลอีเลคโตรโฟรีซีส ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่เป็นเอกลักษณ์สำหรับสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ และสามารถนำไปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ การทดลองนี้จึงนำวิธี RAPD มาใช้บ่งบอกถึงคุณลักษณะจำเพาะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของ *B. subtilis* และแยกความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำมาเป็นพื้นฐานในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมเชื้อโรคพืช

วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เทคนิค RAPD ในการบ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของสายพันธุ์ต่างๆ ของ *B. subtilis* ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

ขอบเขตของการศึกษา

ศึกษาปัจจัยทางกายภาพ และชีวภาพที่มีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์ แล้วทำการจัดจำแนกชนิดของ *B. subtilis* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ของเชื้อ หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 6 ชนิด และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของ *B. subtilis* เพื่อยืนยันการจัดจำแนก และความสัมพันธ์กับผลความสามารถในการยับยั้ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ใช้เทคนิค RAPD มาพัฒนาเป็น probe เพื่อตรวจหา *B. subtilis* ในดิน
2. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชทางดิน