

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การศึกษาจำนวนแบคทีเรียจากดินในพื้นที่ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

1.1 ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพของดิน

ผลการศึกษาค่าพีเอชที่วัดได้จากดินในแต่ละแปลง จำนวนทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 มีค่าอยู่ในช่วง 5.91 – 7.72 ครั้งที่ 2 มีค่าอยู่ในช่วง 6.44–7.37 และครั้งที่ 3 มีค่าอยู่ในช่วง 5.0 – 7.69 จะเห็นได้ว่าค่าพีเอชทั้ง 3 ครั้งมีผลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง พีเอชเป็นกลาง ประมาณ 7.0 ยกเว้นแปลงป่าปลูกฟื้นฟูสภาพมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.91 – 6.44

ผลของปริมาณความชื้น จากดินในแต่ละแปลง จำนวนทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 มีค่าอยู่ในช่วง 4.03–26.40 ครั้งที่ 2 มีค่าอยู่ในช่วง 20.99–37.1 และครั้งที่ 3 มีค่าอยู่ในช่วง 12.73–27.08 ดังตารางที่ 4 จากตารางจะเห็นได้ว่าค่าปริมาณความชื้นครั้งที่ 2 มากกว่าครั้งที่ 3 และครั้งที่ 1 ตามลำดับ ค่าปริมาณความชื้นของดินตัวอย่าง 5 แปลง ทั้ง 3 ครั้ง แปลงป่าสักธรรมชาติมีปริมาณความชื้นมากที่สุด ครั้งที่ 1 แปลงขยายพันธุ์ปริมาณความชื้นน้อยที่สุด และครั้งที่ 3 แปลงป่าปลูกฟื้นฟูสภาพมีปริมาณความชื้นน้อยที่สุด

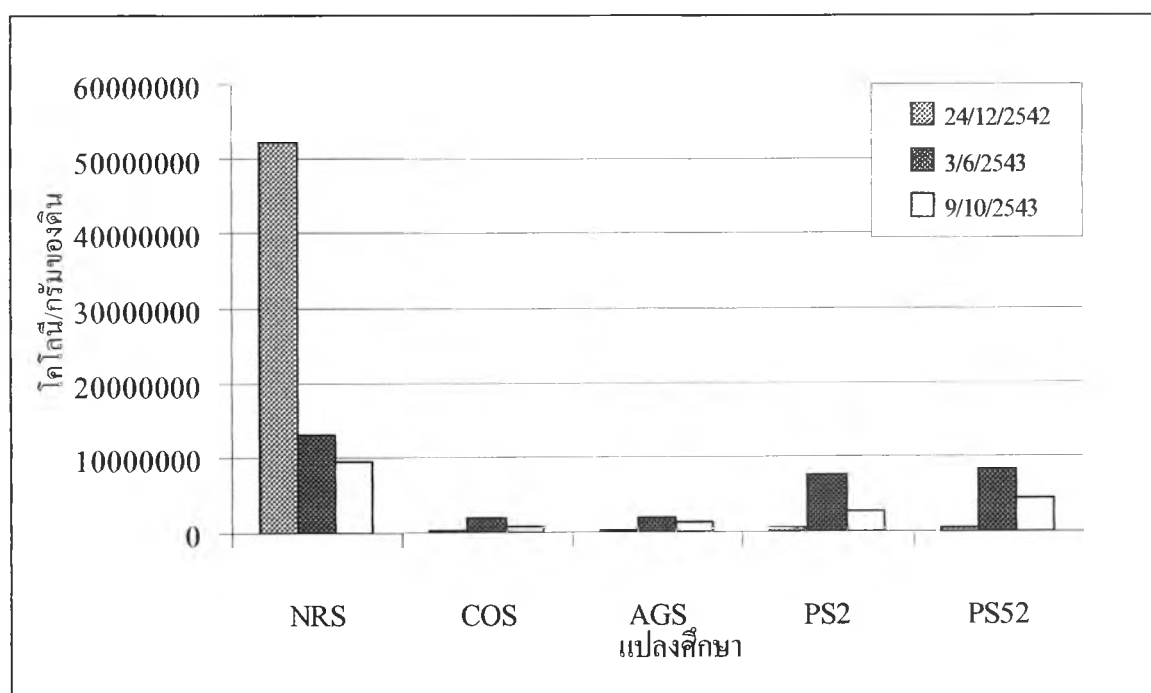
1.2 ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากดินในพื้นที่ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด จากดินทั้ง 5 แปลง ในพื้นที่หมู่บ้านป่าสักงาม ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอคอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ แสดงในตาราง 3 เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ช่วงความลึก 7-15 เซนติเมตร ที่มีสภาพดินแตกต่างกัน โดยเก็บดินที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง $2.7 \times 10^5 - 5.2 \times 10^7$ โคโลนี / กรัมของดิน โดยดินป่าสักธรรมชาติ มีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดคือ 5.2×10^7 โคโลนี / กรัมของดิน และดินแปลงขยายพันธุ์ มีปริมาณแบคทีเรียน้อยที่สุดคือ 2.7×10^5 โคโลนี / กรัมของดิน ครั้งที่ 2 พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง $1.92 \times 10^6 - 1.3 \times 10^7$ โคโลนี / กรัมของดิน โดยดินป่าสักธรรมชาติ มีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด

คือ 1.3×10^7 โคลโลนี / กรัมของดิน และดินแปลงขยายพันธุ์ พบน้อยที่สุดคือ 1.92×10^6 โคลโลนี / กรัมของดิน ครั้งที่ 3 พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง $7.2 \times 10^5 - 9.6 \times 10^6$ โคลโลนี / กรัมของดิน โดยดินป่าสักธรรมชาติมีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดคือ 9.6×10^6 โคลโลนี / กรัมของดิน ส่วนในดินป่าสร้าง มีปริมาณแบคทีเรียน้อยที่สุด 7.2×10^5 โคลโลนี / กรัมของดิน เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในดิน 5 แปลง ทั้งหมด 3 ครั้ง มีปริมาณแบคทีเรียที่นับได้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน (ภาพที่ 3) ซึ่งจะเห็นได้ว่าดินตัวอย่างที่เก็บมาจากป่าสักธรรมชาติทั้งหมด 3 ครั้ง มีปริมาณแบคทีเรียที่มากที่สุด

ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดินพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ในพื้นที่ป่าสงวนแห่งชาติป่าขุนแม่กวง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

แปลงศึกษา	รหัส	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (โคโลนี/กรัมของดิน)		
		24 ธันวาคม 2543	3 มิถุนายน 2544	9 ตุลาคม 2544
ป่าสักธรรมชาติ	NRS	5.20×10^7	1.30×10^7	9.60×10^6
ป่าปลูกฟื้นฟูสภาพ	COS	3.60×10^5	1.96×10^6	7.20×10^5
แปลงขยายพันธุ์	AGS	2.70×10^5	1.92×10^6	1.40×10^6
แปลง 2	PS2	4.60×10^5	7.75×10^6	2.70×10^6
แปลง 52	PS52	5.80×10^5	8.10×10^6	4.40×10^6



ภาพที่ 3 กราฟแท่งเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในดิน 5 แปลง ทั้งหมด 3 ครั้ง

ตารางที่ 4 สมบัติทางกายภาพของดินตัวอย่าง ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ป่าสงวนแห่งชาติป่าขุนแม่กวง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ครั้งที่ 1, 24 ธันวาคม 2542

สถานที่เก็บ	รหัสดินตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	อินทรีย์วัตถุ (เปอร์เซ็นต์)
แปลง				
ป่าสักธรรมชาติ	NRS	7.72	22.39	15.31
ป่าปลูกฟื้นฟูสภาพ	COS	5.91	12.85	5.68
แปลงขยายพันธุ์	AGS	7.62	4.03	8.74
แปลง 2	PS 2	7.58	16.23	12.85
แปลง 52	PS 52	7.63	26.40	15.73

ครั้งที่ 2, 3 มิถุนายน 2543

ป่าสักธรรมชาติ	NRS	7.22	37.13	13.80
ป่าปลูกฟื้นฟูสภาพ	COS	6.44	20.99	3.68
แปลงขยายพันธุ์	AGS	7.29	92.97	7.12
แปลง 2	PS 2	7.31	28.80	9.13
แปลง 52	PS 52	7.37	27.27	10.60

ครั้งที่ 3, 9 ตุลาคม 2543

ป่าสักธรรมชาติ	NRS	7.68	21.88	9.68
ป่าปลูกฟื้นฟูสภาพ	COS	5.00	12.73	3.26
แปลงขยายพันธุ์	AGS	7.61	27.08	6.95
แปลง 2	PS 2	7.61	22.44	8.80
แปลง 52	PS 52	7.69	27.27	10.67



2. การศึกษาชนิดของ *Bacillus* ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

การจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* ตาม The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 ได้จัดแบคทีเรียไว้ในอาณาจักร Prokaryotae ชื่อ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ ได้จัดไว้ใน Division Firmiatae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ดังภาพที่ 4A) แบคทีเรียที่แยกได้ตามคุณสมบัติการสร้างสปอร์ ได้ทั้งหมด 750 ไอโซเลท จัดได้ว่าอยู่ในสกุล *Bacillus* ตามคุณสมบัติที่สร้างสปอร์ได้ สามารถเจริญได้ในสภาวะแอโรบิก หรือ facultative anaerobic และการสร้าง catalase ได้ ในการจัดจำแนกชนิด (species) ได้ศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ตามกระบวนการจัดจำแนกชนิดของเชื้อสกุล *Bacillus* ของ The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (Sneath and Sharpe, 1986; Gordon, Haynes and Pang, 1973) ดังรายละเอียดในตาราง 5 พบว่าสามารถจำแนกชนิดของ *B. subtilis* ได้ 35 ไอโซเลท มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ *B. subtilis* โคโลนีที่มีรูปร่างกลม บางสายพันธุ์มีรูปร่างไม่แน่นอน โคโลนีจะทึบแสง (dull) เมื่อเจริญบน nutrient agar จะสร้างสี่เหลี่ยม การเจริญจะสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ (foliiform) เซลล์สร้างสปอร์แบบ cylindrical ตรงกลางเซลล์ สปอร์มีขนาดเท่ากับขนาดเซลล์ (ดังภาพที่ 4B) บางสายพันธุ์เจริญในสภาพไม่มีอากาศได้ และเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาพพีเอชเป็นกรด สามารถใช้ D-glucose arabinose xylose mannitol และซีเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถสร้างเอนไซม์ catalase สามารถ reduce nitrate สามารถย่อย casein gelatin และแป้งได้และเจริญได้ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 40 50 และ 55 ได้ (ดังตารางที่ 5) เมื่อพิจารณาการกระจายของ *B. subtilis* ในดินทั้ง 5 แปลง ที่ระดับความลึก 5-15 เซนติเมตร ปรากฏผลดังตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าจำนวน *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท พบในดิน แปลง 52 ได้มากที่สุด รองลงมา คือป่าธรรมชาติ ป่าปลูกฟื้นฟูสภาพ แปลงขยายพันธุ์ และแปลง 2 ตามลำดับ

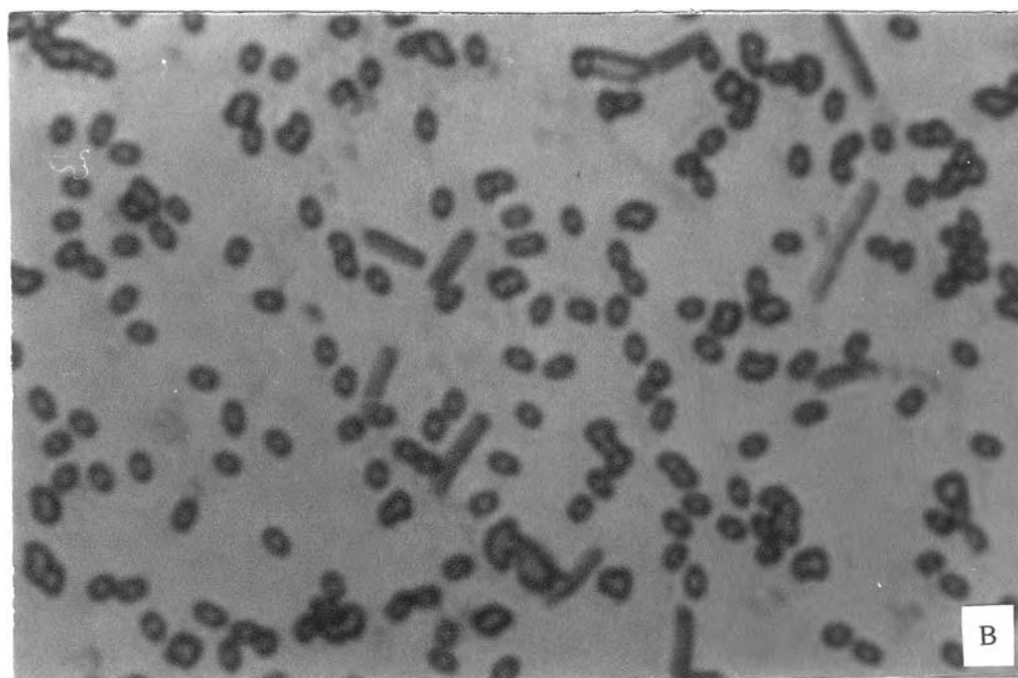
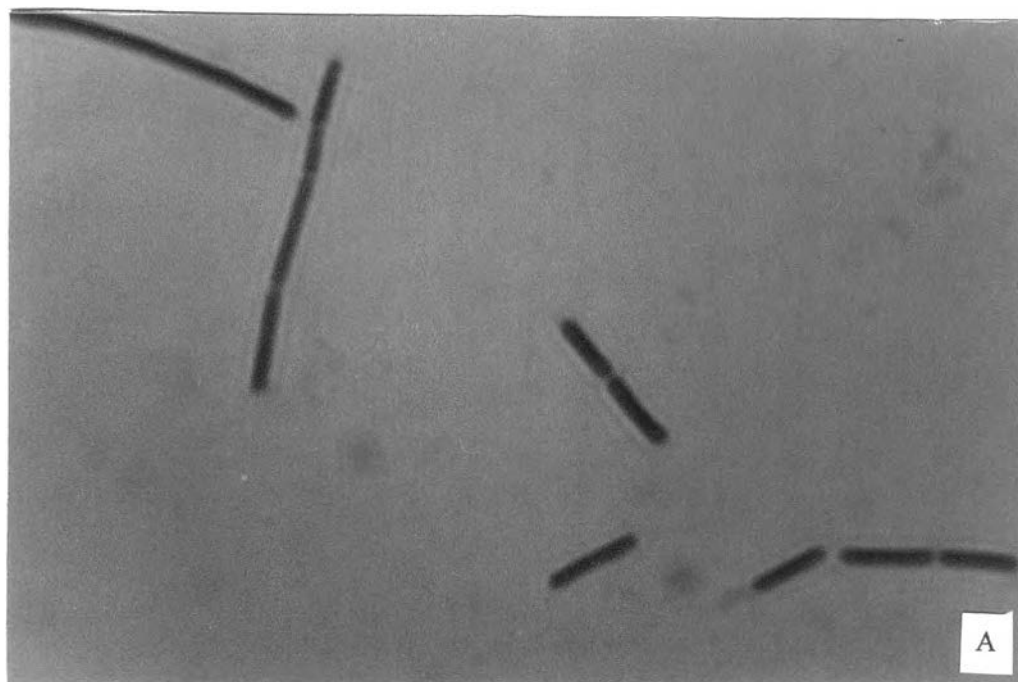
ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท

คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และ คุณสมบัติทางชีวเคมี	ชนิดของ <i>B. subtilis</i>
การติดสีแกรม	+
ตำแหน่งของเอนโดสปอร์	cs
การเคลื่อนที่ของเซลล์	+
คุณสมบัติทางชีวเคมี	
การสร้างเอนไซม์ catalase	+
การเจริญบนอาหาร VP	+
การใช้ Glucose เป็นแหล่งคาร์บอน	+
การใช้ Arabinose เป็นแหล่งคาร์บอน	+
การใช้ Xylose เป็นแหล่งคาร์บอน	+
การใช้ Mannitol เป็นแหล่งคาร์บอน	+
การใช้ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอน	+
การย่อย Casein	+
การย่อย Gelatin	+
การย่อยแป้ง	+
การเจริญที่พีเอช 7.0	+
การเจริญที่พีเอช 5.7	+
ความสามารถ Reduce nitrate	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	+

หมายเหตุ cs = central spore

ตารางที่ 6 จำนวน *B. subtilis* ที่จัดจำแนกได้ 35 ไอโซเลท จากดิน 5 แปลง

ตัวอย่างดิน	รหัสตัวอย่างดิน	วันที่/ เดือน/ ปีที่ เก็บตัวอย่างดิน	จำนวนเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่จัดจำแนกได้
ป่าสักธรรมชาติ	NRS	24 ธันวาคม 2542	3
	NRS	3 มิถุนายน 2544	4
	NRS	9 ตุลาคม 2544	2
ป่าปลูกฟื้นฟูสภาพ	COS	24 ธันวาคม 2542	1
	COS	3 มิถุนายน 2544	1
	COS	9 ตุลาคม 2544	4
แปลงขยายพันธุ์	AGS	24 ธันวาคม 2542	-
	AGS	3 มิถุนายน 2544	2
	AGS	9 ตุลาคม 2544	1
แปลง 2	PS 2	24 ธันวาคม 2542	-
	PS 2	3 มิถุนายน 2544	2
	PS 2	9 ตุลาคม 2544	-
แปลง 52	PS 52	24 ธันวาคม 2542	2
	PS 52	3 มิถุนายน 2544	7
	PS 52	9 ตุลาคม 2544	6



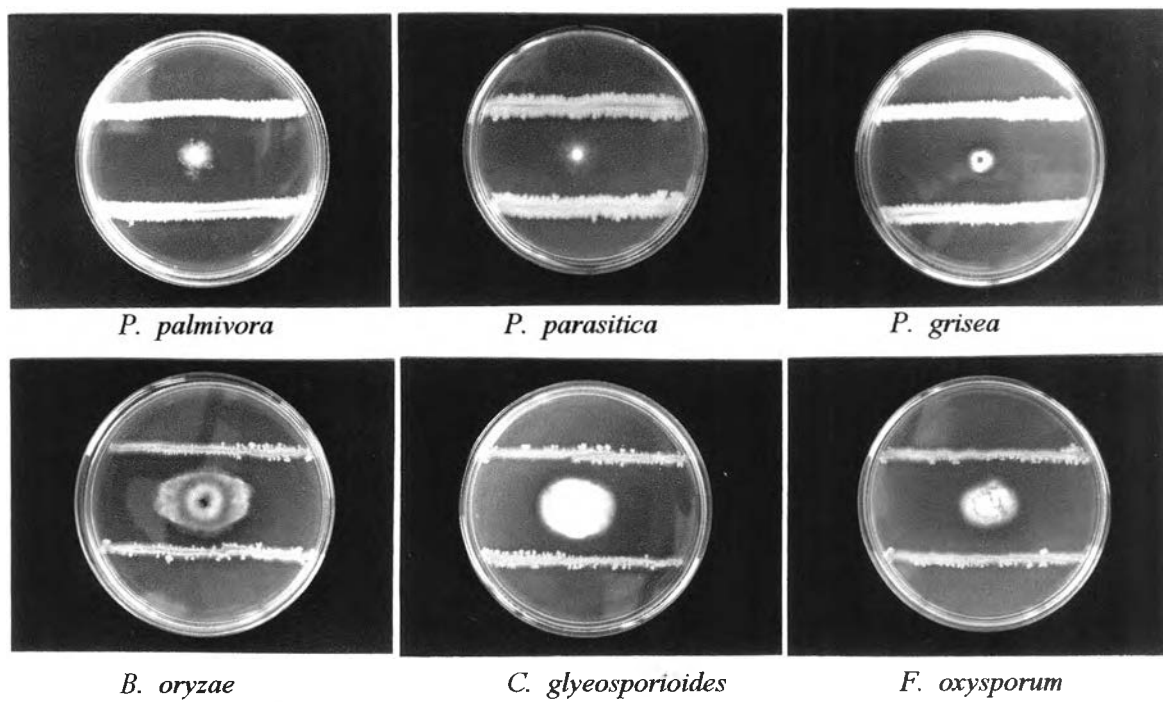
ภาพที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *B. subtilis*

A การติดสีแกรมของ *B. subtilis* รหัส PS5202-3

B การติดสีสปอร์ของ *B. subtilis* รหัส PS5202-3

3. การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท โดยทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืช

ผลการศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* *P. grisea* *B. oryzae* *C. glyeosporioides* และ *F. oxysporum* พบว่า *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (แสดงในภาพที่ 6 7 8 9 10 และ 11 ตามลำดับ) ซึ่งตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่ถูกยับยั้งเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญปกติ และนำมาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง สามารถแบ่งกลุ่มตามความสามารถในการยับยั้งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งเป็นกลุ่มไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ประกอบด้วยเชื้อ *B. subtilis* NRS01-2 *B. subtilis* NRS02-2 *B. subtilis* NRS02-3 *B. subtilis* NRS03-1 *B. subtilis* NRS03-2 *B. subtilis* COS03-2 *B. subtilis* COS03-3 *B. subtilis* PS5202-2 *B. subtilis* PS5202-8 *B. subtilis* PS5202-9 และ *B. subtilis* PS5203-4 ส่วนกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิด พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งใกล้เคียงกัน คือเชื้อ *B. subtilis* NRS02-1 *B. subtilis* NRS02-4 *B. subtilis* COS03-1 *B. subtilis* COS03-4 *B. subtilis* COS03-5 *B. subtilis* AGS02-1 *B. subtilis* AGS02-2 *B. subtilis* *B. subtilis* AGS03-1 *B. subtilis* PS202-1 *B. subtilis* PS202-2 *B. subtilis* PS5202-1 *B. subtilis* PS5202-3 *B. subtilis* PS5203-4 *B. subtilis* PS5202-6 *B. subtilis* PS5202-7 *B. subtilis* PS5202-3-1 *B. subtilis* PS5203-1 *B. subtilis* PS5202-2 *B. subtilis* PS5203-3 *B. subtilis* PS5203-5 *B. subtilis* PS5203-6 *B. subtilis* PS5203-7 และ *B. subtilis* PS5203-8 ส่วนผลการยับยั้งเจริญเชื้อรา *P. parasitica* ให้ผลแตกต่างไปจากผลการยับยั้งการเจริญเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ซึ่งให้ผลการยับยั้งไม่แตกต่างกันแสดงในตารางที่ 7 และเมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช *P. palmivora* *P. parasitica* *P. grisea* *B. oryzae* *C. glyeosporioides* และ *F. oxysporum* ชนิด โดย *B. subtilis* สายพันธุ์เดียวกัน คือ *B. subtilis* PS202-1 พบว่าให้ผลการยับยั้งแตกต่างกัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังนี้ 12.44 34.88 46.19 29.73 35.37 และ 19.80 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 6 ชนิด บนอาหาร PDA โดย *B. subtilis* PS5202-2

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของ *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท จากดิน 5 แปลง ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 6 ชนิด

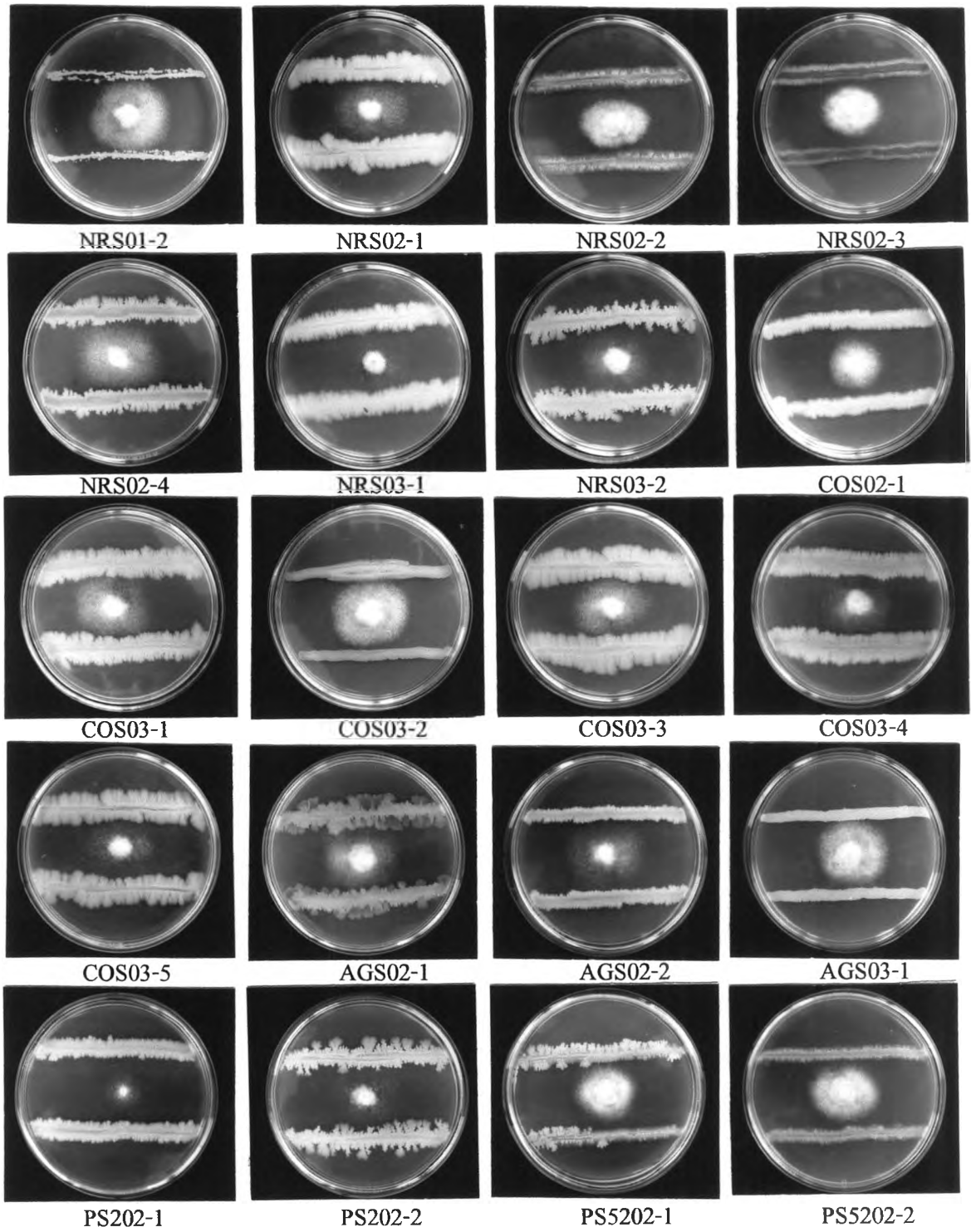
เชื้อแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
	<i>P. palmivora</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>P. grisea</i>
<i>B. subtilis</i> NRS01-2	3.56	18.05	0.00
<i>B. subtilis</i> NRS02-1	45.33	32.44	47.62
<i>B. subtilis</i> NRS02-2	8.00	40.73	0.00
<i>B. subtilis</i> NRS02-3	5.56	30.98	0.00
<i>B. subtilis</i> NRS02-4	28.89	24.39	39.52
<i>B. subtilis</i> NRS03-1	36.44	30.00	47.62
<i>B. subtilis</i> NRS03-2	39.11	32.44	52.36
<i>B. subtilis</i> COS02-1	14.22	39.02	6.19
<i>B. subtilis</i> COS03-1	34.67	30.00	47.62
<i>B. subtilis</i> COS03-2	0.00	24.39	0.00
<i>B. subtilis</i> COS03-3	12.44	40.73	0.00
<i>B. subtilis</i> COS03-4	37.78	27.56	47.62
<i>B. subtilis</i> COS03-5	25.78	38.29	47.62
<i>B. subtilis</i> AGS02-1	36.44	26.10	44.29
<i>B. subtilis</i> AGS02-2	25.78	25.12	53.81
<i>B. subtilis</i> AGS03-1	25.78	21.95	47.62
<i>B. subtilis</i> PS202-1	12.44	34.88	46.19
<i>B. subtilis</i> PS202-2	36.44	34.15	55.71
<i>B. subtilis</i> PS5202-1	36.44	26.83	47.62
<i>B. subtilis</i> PS5202-2	15.56	26.1	0.00
<i>B. subtilis</i> PS5202-3	18.67	28.54	41.43
<i>B. subtilis</i> PS5202-4	37.78	26.83	47.62
<i>B. subtilis</i> PS5202-5	24.44	23.17	50.95
<i>B. subtilis</i> PS5202-6	42.22	25.61	49.05
<i>B. subtilis</i> PS5202-7	23.11	35.37	52.38

ตารางที่ 7 ต่อ

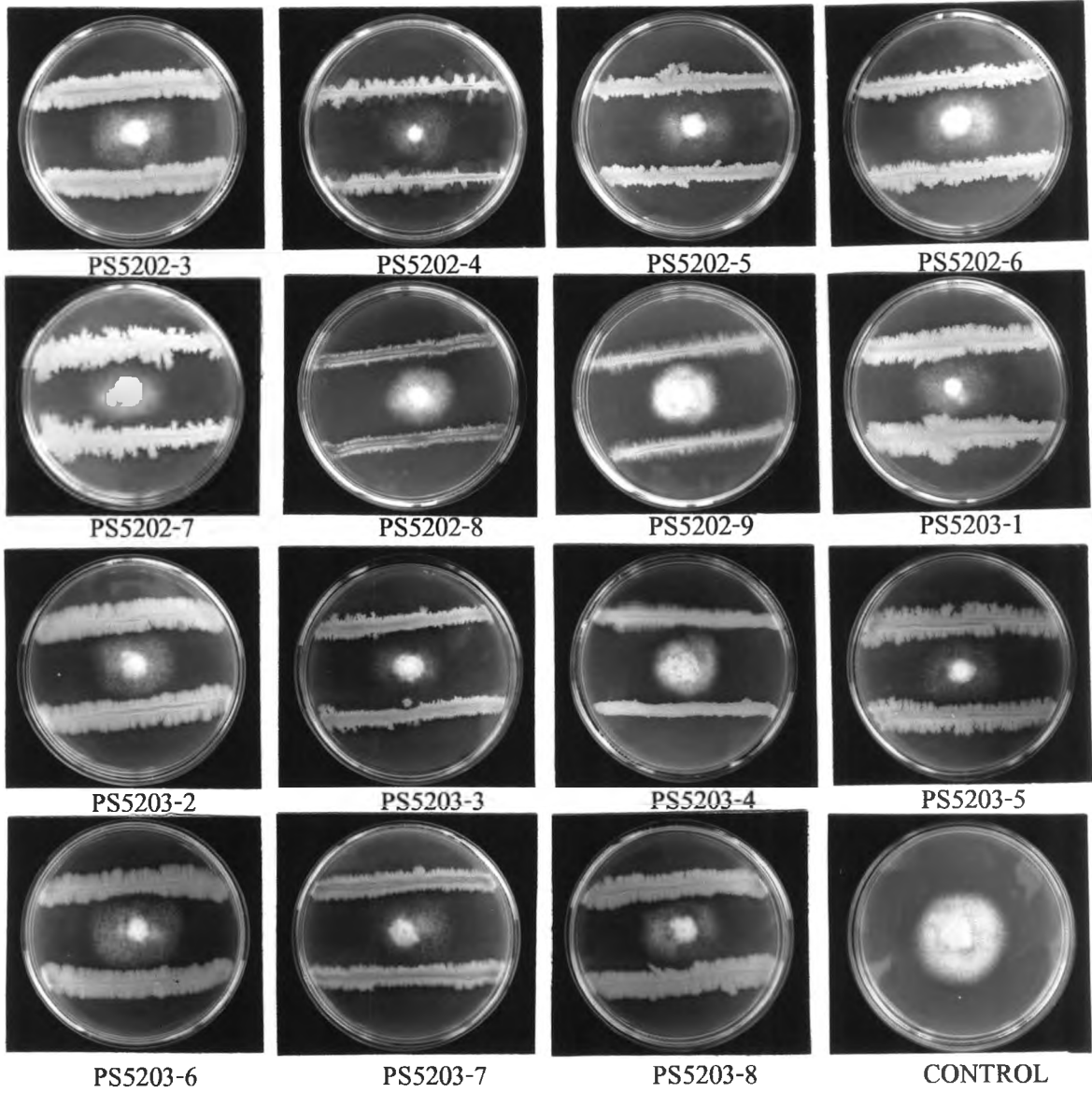
<i>B. subtilis</i> PS5202-8	0.00	29.27	0.00
<i>B. subtilis</i> PS5202-9	15.56	31.71	8.10
<i>B. subtilis</i> PS5203-1	48.44	26.83	47.62
<i>B. subtilis</i> PS5203-2	37.78	28.05	49.05
<i>B. subtilis</i> PS5203-3	30.22	26.83	47.62
<i>B. subtilis</i> PS5203-4	0.00	24.39	0.00
<i>B. subtilis</i> PS5203-5	36.44	26.83	49.05
<i>B. subtilis</i> PS5203-6	34.67	20.73	46.19
<i>B. subtilis</i> PS5203-7	39.11	19.51	47.62
<i>B. subtilis</i> PS5203-8	40.89	26.10	50.95
เชื้อแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
	<i>B. oryzae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>B. subtilis</i> NRS01-2	0.00	0.00	0.00
<i>B. subtilis</i> NRS02-1	29.73	35.37	19.80
<i>B. subtilis</i> NRS02-2	0.00	13.30	0.00
<i>B. subtilis</i> NRS02-3	0.00	16.76	0.00
<i>B. subtilis</i> NRS02-4	29.73	36.17	28.71
<i>B. subtilis</i> NRS03-1	22.70	0.00	30.69
<i>B. subtilis</i> NRS03-2	42.43	0.00	35.31
<i>B. subtilis</i> COS02-1	0.00	0.00	28.91
<i>B. subtilis</i> COS03-1	30.81	30.05	23.10
<i>B. subtilis</i> COS03-2	0.00	0.00	14.13
<i>B. subtilis</i> COS03-3	0.00	0.00	28.71
<i>B. subtilis</i> COS03-4	33.51	33.51	28.71
<i>B. subtilis</i> COS03-5	33.51	44.15	32.01
<i>B. subtilis</i> AGS02-1	32.43	30.05	27.39
<i>B. subtilis</i> AGS02-2	29.73	33.51	36.30
<i>B. subtilis</i> AGS03-1	30.81	33.51	35.31
<i>B. subtilis</i> PS202-1	29.73	35.37	19.80

ตารางที่ 5 ต่อ

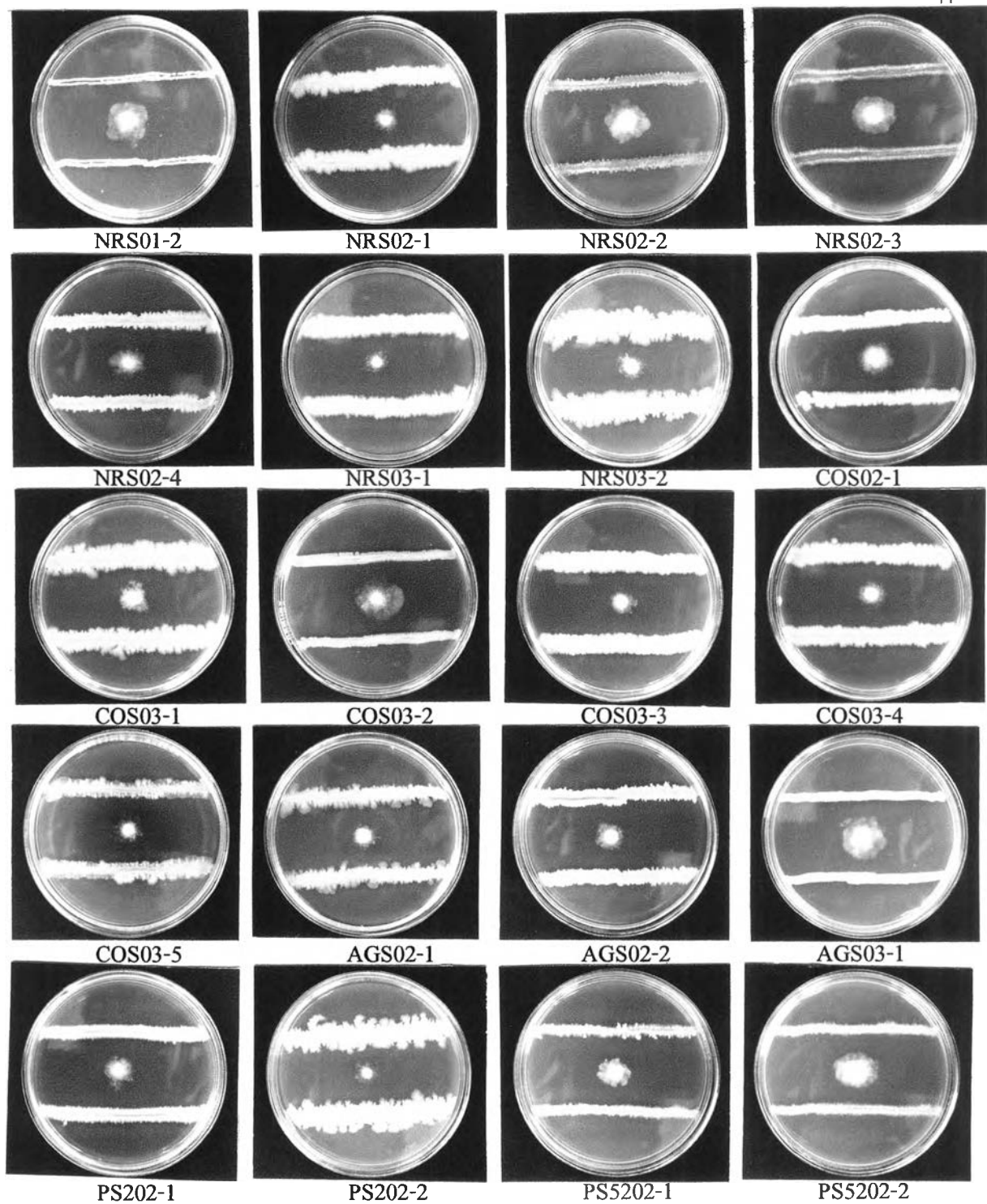
<i>B. subtilis</i> PS202-2	39.73	31.91	32.01
<i>B. subtilis</i> PS5202-1	28.92	34.57	35.99
<i>B. subtilis</i> PS5202-2	0.00	45.21	0.00
<i>B. subtilis</i> PS5202-3	28.11	35.37	20.79
<i>B. subtilis</i> PS5202-4	28.11	30.85	17.49
<i>B. subtilis</i> PS5202-5	37.84	32.71	20.79
<i>B. subtilis</i> PS5202-6	27.03	35.37	27.39
<i>B. subtilis</i> PS5202-7	21.62	36.17	23.1
<i>B. subtilis</i> PS5202-8	0.00	0.00	0.00
<i>B. subtilis</i> PS5202-9	0.00	0.00	26.41
<i>B. subtilis</i> PS5203-1	32.43	33.51	33.00
<i>B. subtilis</i> PS5203-2	27.03	30.05	18.81
<i>B. subtilis</i> PS5203-3	24.32	33.51	28.38
<i>B. subtilis</i> PS5203-4	0.00	0.00	0.00
<i>B. subtilis</i> PS5203-5	30.81	35.37	33.99
<i>B. subtilis</i> PS5203-6	30.81	35.37	33.00
<i>B. subtilis</i> PS5203-7	28.92	35.37	25.41
<i>B. subtilis</i> PS5203-8	24.32	34.57	19.81



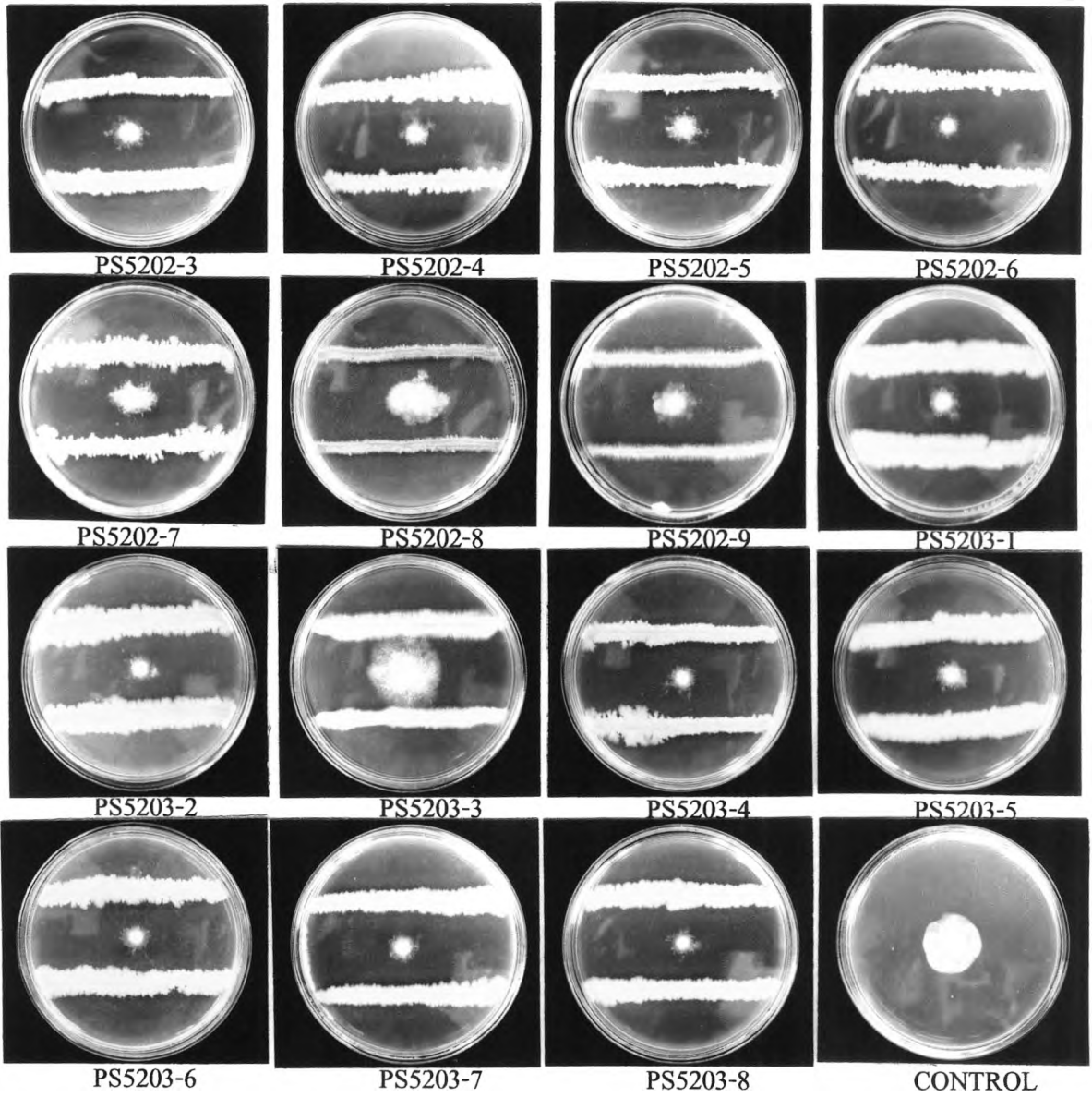
ภาพที่ 6 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. parasitica* DOA-PPF 30-1 โดย *B. subtilis*
 ทั้ง 35 ไอโซเลต



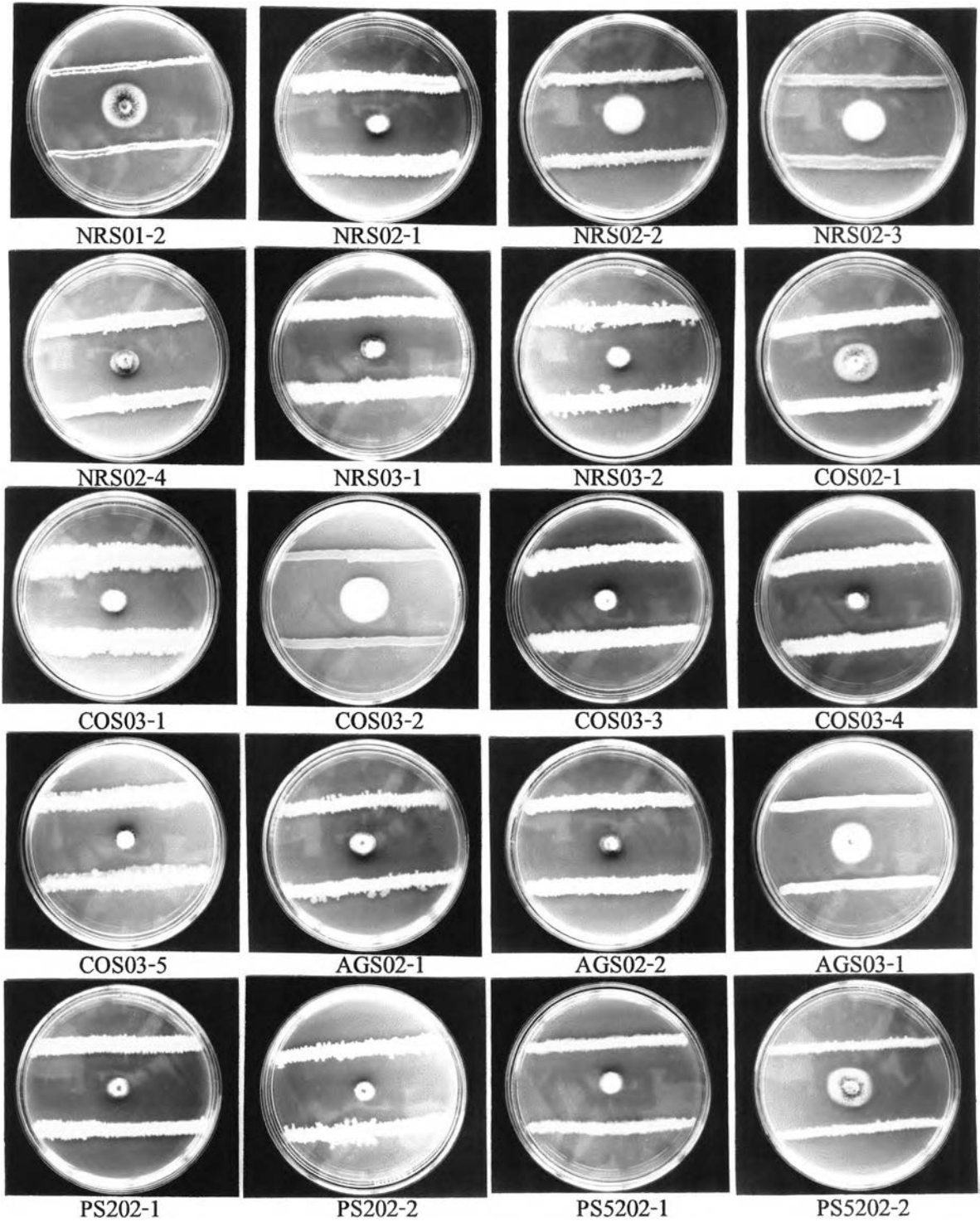
ภาพที่ 6 (ต่อ)



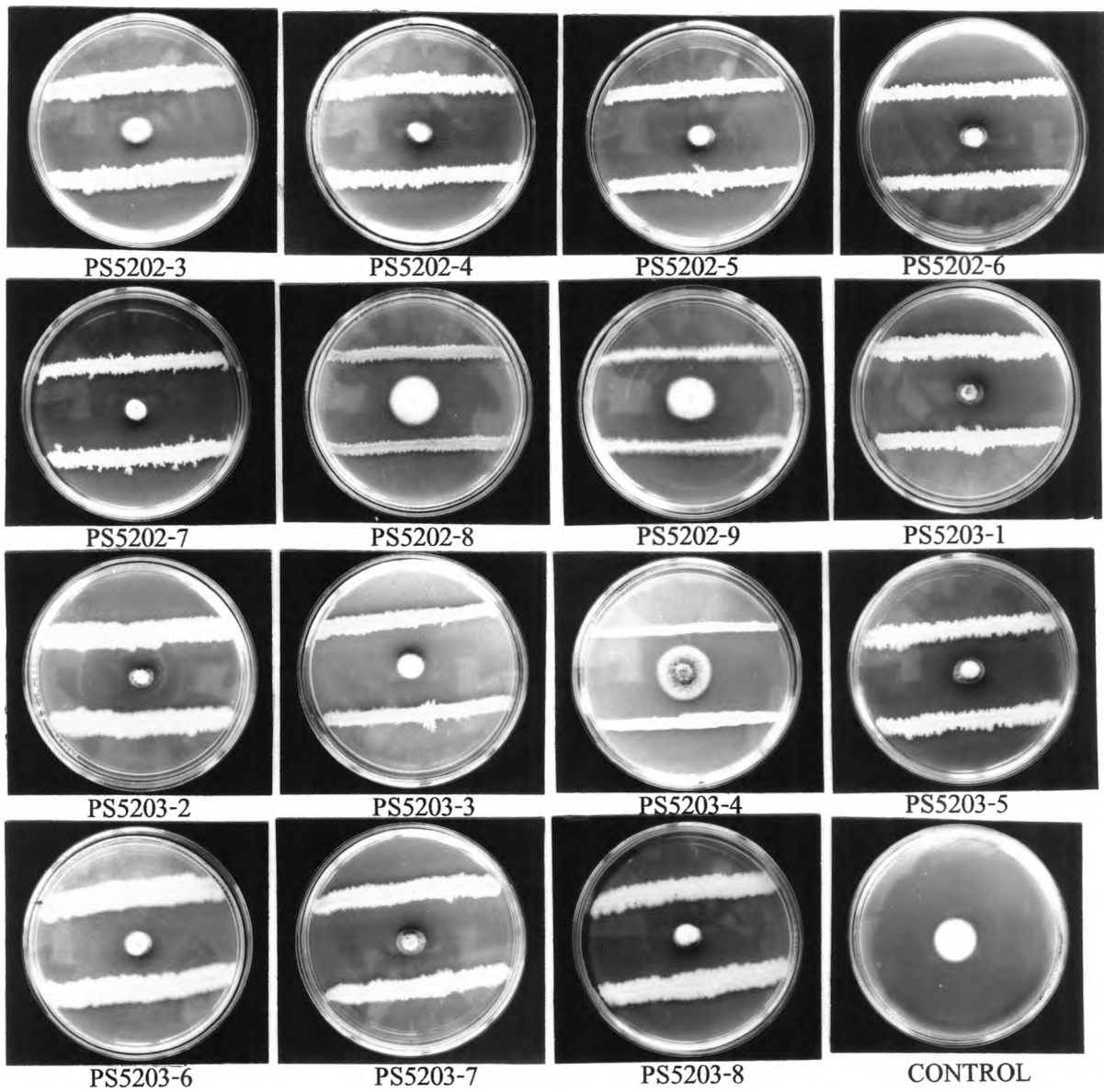
ภาพที่ 7 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* DOA-PPF 38-4 โดย *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท



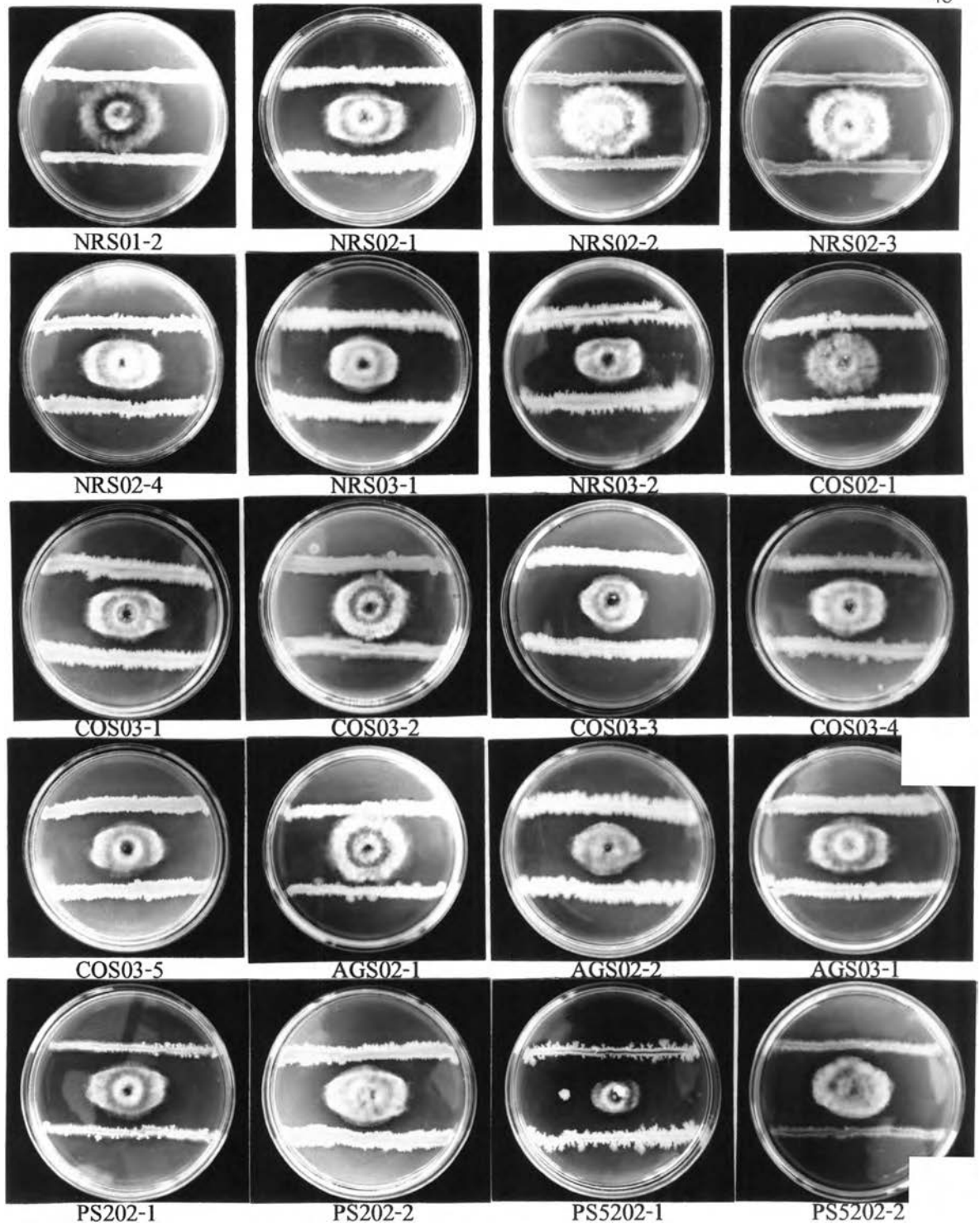
ภาพที่ 7 (ต่อ)



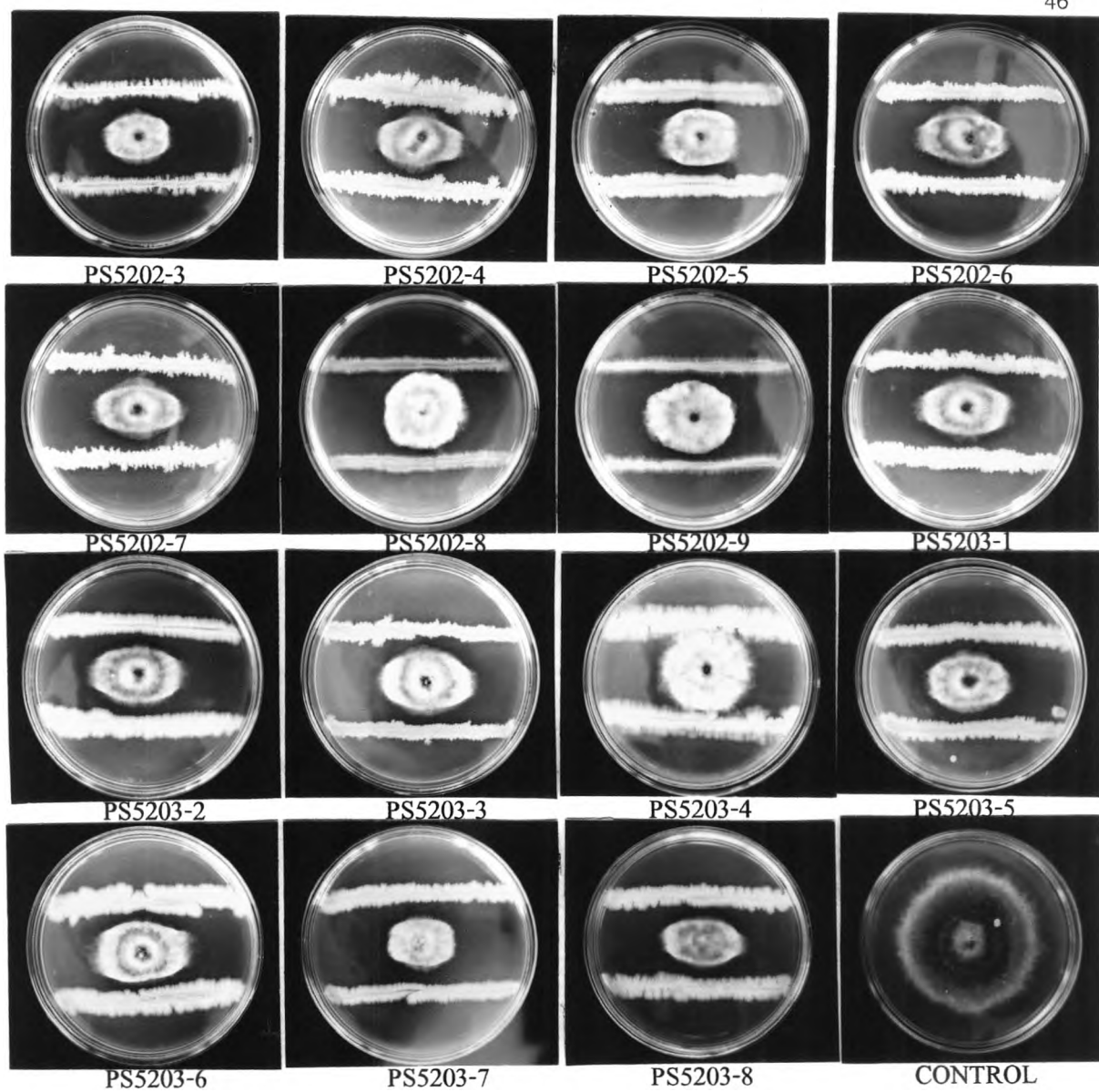
ภาพที่ 8 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* DOA-PPF 43-108 โดยเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท



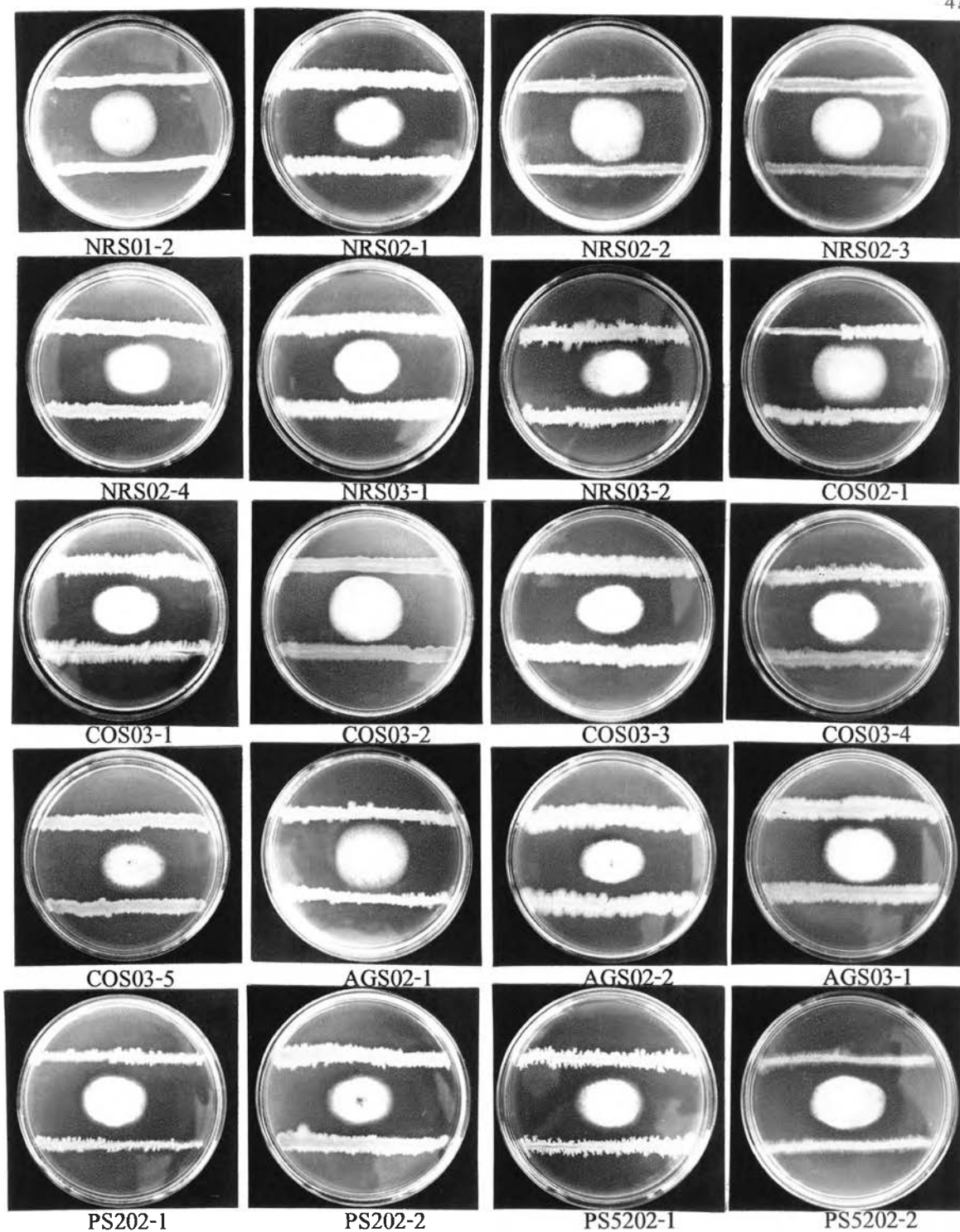
ภาพที่ 8 (ต่อ)



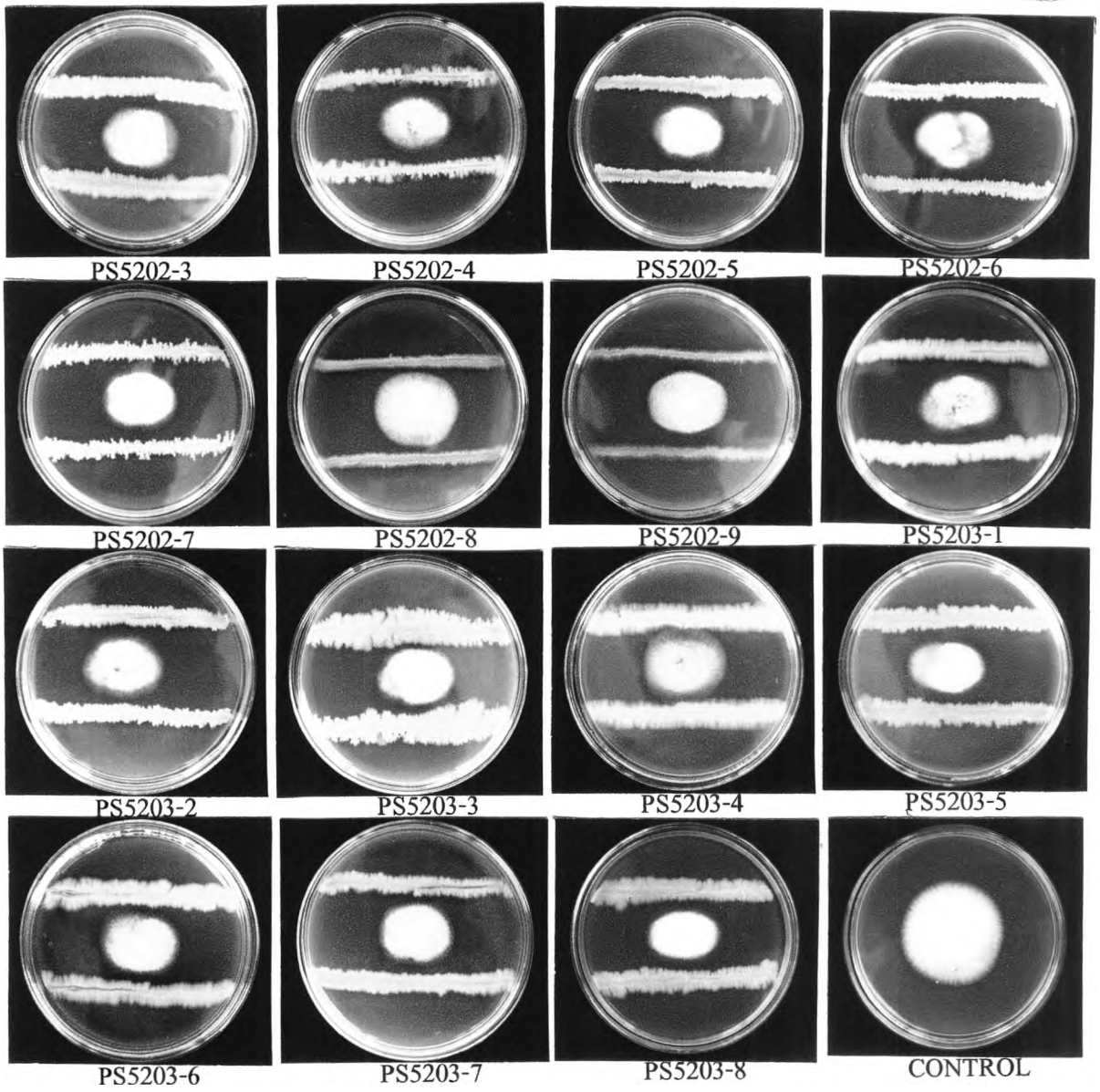
ภาพที่ 9 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. oryzae* DOA-PPF 43-21 โดย *B. subtilis* 35
ไอโซเลท



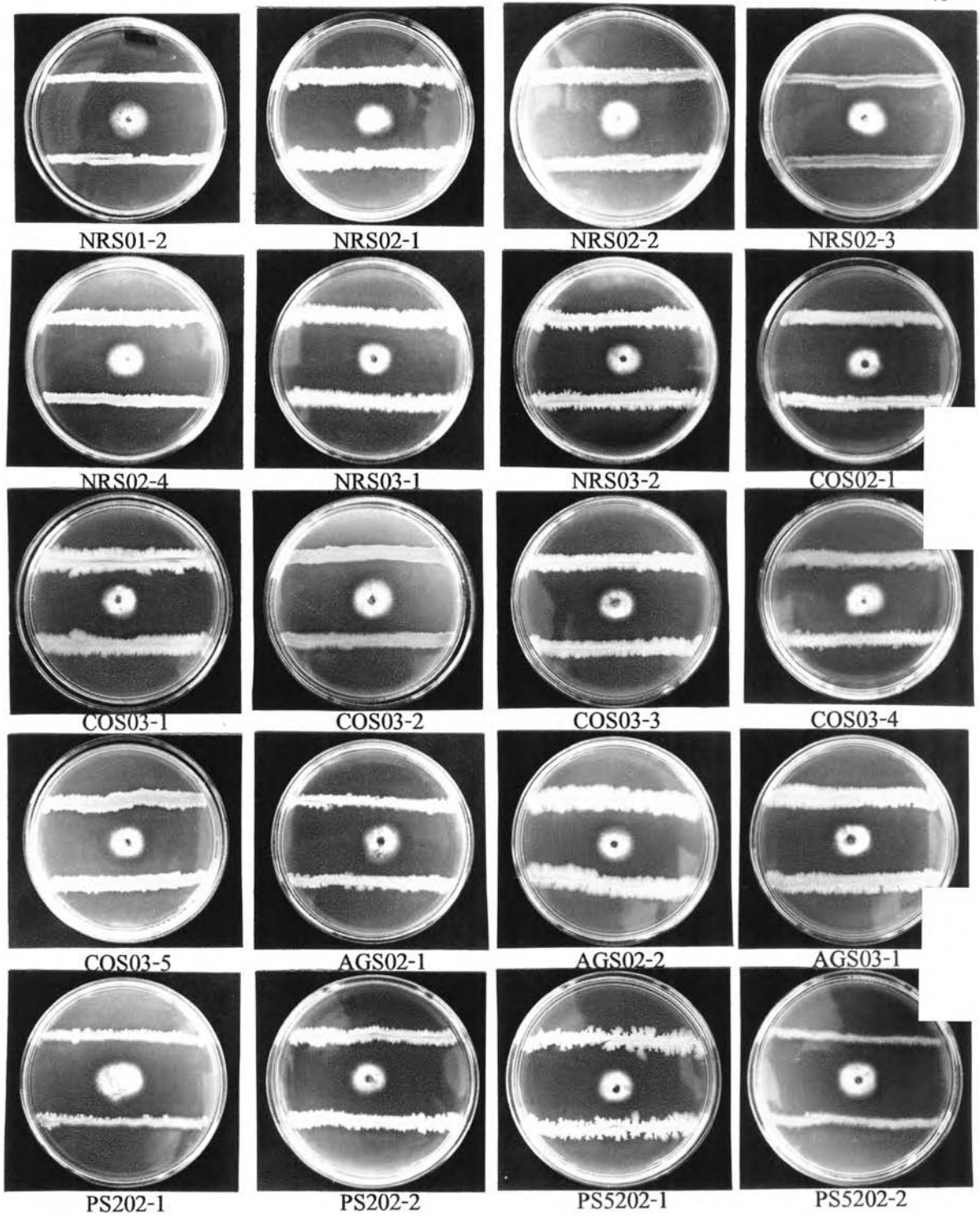
ภาพที่ 9 (ต่อ)



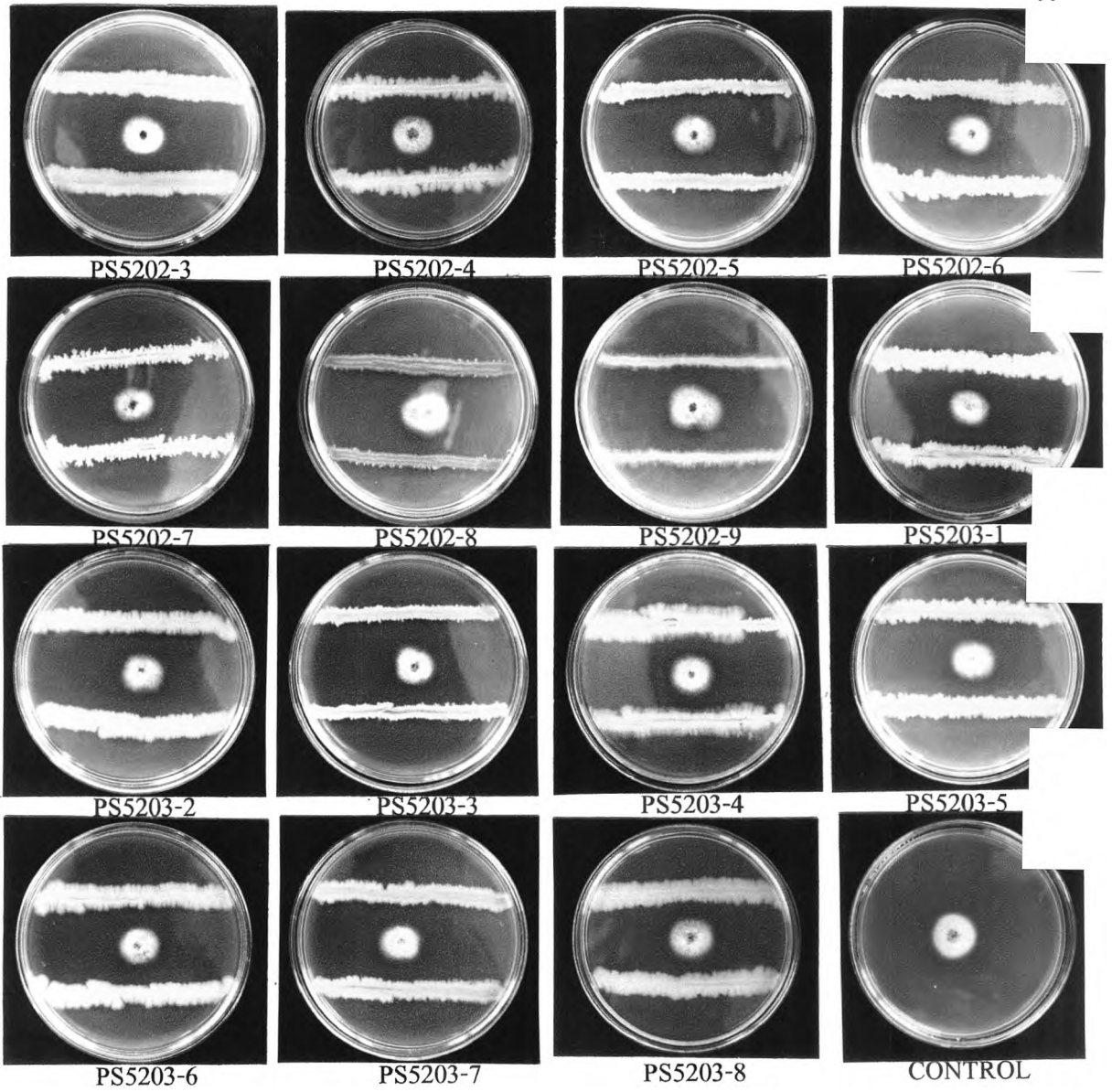
ภาพที่ 10 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* DOA-PPF 43-136 โดย *B. subtilis* 35 ไอโซเลท



ภาพที่ 10 (ต่อ)



ภาพที่ 11 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* DOA-PPF 43-138 โดย *B. subtilis* 35 ไอโซเลท



ภาพที่ 11 (ต่อ)

4. การเตรียมดีเอ็นเอและศึกษาสภาวะที่ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา RAPD-PCR

4.1 ผลการตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้ เมื่อนำมาตรวจสอบ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่า สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จาก *B. subtilis* 35 ไอโซเลท มีค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} อยู่ในช่วง 1.7-2.0 ดังแสดงในตารางที่ 8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีคุณภาพดีมีความบริสุทธิ์สูงและเมื่อนำค่า OD_{260} มาคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นที่ถูกต้องพบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. subtilis* 35 ไอโซเลท มีปริมาณดีเอ็นเอมาก คือมีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 75-2225 $\mu\text{g/ml}$

4.2 การศึกษาสภาวะของอุณหภูมิและช่วงเวลาในขั้นตอน annealing ร่วมกับปริมาณความเข้มข้นของเอ็นไซม์ Taq Polymerase และความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา RAPD-PCR ปริมาณเอ็นไซม์ Taq Polymerase ที่ใช้มีระดับความเข้มข้น 0.625 U (Vettori C. และคณะ 1996) 1 U (Batinic และคณะ 1998) และ 1.25 U (Romimus, Parker and Morgan, 1997) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่ระดับ 12.5 pmol และ 25 pmol และ Annealing temperature ที่ 32 องศาเซลเซียส 36 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส สภาวะของอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา ทำตามวิธีของ Batinic และ คณะ (1998) ดังภาพที่ 12 แสดง ผลผลิตของ RAPD-PCR โดยใช้ Annealing temperature ที่ 36 องศาเซลเซียส 32 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ให้ผลผลิตของ RAPD-PCR ไม่แตกต่างกัน ผลผลิตของ RAPD-PCR ที่ชัดเจนขึ้นแปรผันตรงกับปริมาณความเข้มข้นของ Taq DNA Polymerase ที่เพิ่มขึ้น ส่วนผลผลิตของ RAPD-PCR ที่ระดับความเข้มข้น ของไพรเมอร์ทั้ง 2 ระดับให้ผลผลิตของ RAPD-PCR ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากชนิดของ Taq Polymerase ที่ใช้มี PCR Buffer ที่ต่างจากชนิดอื่นๆ คือ มี NH_4^+ ซึ่งช่วยขยายช่วงของ Annealing Temperature ให้กว้างขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย และทำให้สภาวะความเข้มข้นของ ไพรเมอร์ ที่ต่างกัน สามารถปฏิกิริยาภายในสภาวะเดียวกันได้

จากสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้ไพรเมอร์ จับดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งมีผลต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำมาศึกษาช่วงเวลา annealing temperature ที่เหมาะสมต่อ ผลผลิตของ RAPD-PCR ซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส ที่ 15 วินาที เปรียบเทียบกับ ช่วงเวลา annealing temperature ที่ 36 องศาเซลเซียส 20 วินาที พบว่าช่วงเวลา annealing temperature ที่ 20 วินาที ให้ผลผลิตของพีซีอาร์ ที่ชัดเจนกว่าช่วงเวลา annealing temperature ที่ 15 วินาที ดังภาพที่ 12 ซึ่งตรงกับรายงานผลการทดลองของ Kangfu และ Pauls (1992) รายงานว่าเวลาที่ใช้

สำหรับ annealing temperature มีความสัมพันธ์กับค่า GC content ของไพรเมอร์ สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือไพรเมอร์ OPR1 = 5' TGC GGGTCCT 3', OPR16 = 5' CTCTGCGCGT 3' มีค่า GC content เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และ OPR13 = 5' GGACGACAAG 3', 1247 = 5'-AAGAGCCCGT-3' มีค่า GC content เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์

4.3 ผลการศึกษาปริมาณ $MgCl_2$ ร่วมกับความเข้มข้นของ Amphi Taq Polymerase และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อ RAPD-PCR เมื่อนำเอาสถานะของอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในข้อ 4.1 มาศึกษาพร้อมกับปริมาณของ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 3 mM 4 mM และ 4.5 mM ที่ Taq Polymerase 0.625 U 1 U และ 1.25 U ดังภาพที่ 13 พบว่าผลของระดับความเข้มข้นที่ 3 mM 4 mM และ 4.5 mM ให้ผลผลิตของ PCR-RAPD ไม่แตกต่างกัน ผลของแถบดีเอ็นเอ ที่ชัดเจนขึ้นแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ Taq Polymerase ที่เพิ่มขึ้น และพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ 25 pM ให้ผลผลิตของ PCR-RAPD มีแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น

5. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* โดยวิธี RAPD-PCR

การตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *B. subtilis* ATCC6633 *B. subtilis* PS5202-5 *B. subtilis* AGS02-1 และ *B. subtilis* NRS02-2 ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีการเคลื่อนที่แยกออกจากกันอย่างชัดเจน และพบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 3-8 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 300-3400 คู่เบส ดังภาพที่ 14 จากนั้นได้เลือก ไพรเมอร์ 4 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ 35 ไอโซเลท พบว่าได้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 703 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 212-2894 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดต่างกัน (Polymorphic band) สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ *B. subtilis* ได้ ซึ่งดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายกันมากมีความแตกต่างกันน้อยแสดงว่าสายพันธุ์ที่นำมาศึกษานั้นมีความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ หรือมีความแปรผันทางพันธุกรรมในสายพันธุ์น้อย (ภาพที่ 15-18) บางไอโซเลทมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันแสดงว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน คือ *B. subtilis* NRS02-2 และ *B. subtilis* NRS02-3 *B. subtilis* COS02-1 และ *B. subtilis* COS03-1 *B. subtilis* AGS02-1 *B. subtilis* AGS02-2 และ *B. subtilis* AGS03-1 *B. subtilis* PS5203-6 *B. subtilis* PS5203-1 *B. subtilis* PS5202-6 และ *B. subtilis* PS5202-1

6. การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม และการวิเคราะห์กลุ่มของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลต โดยข้อมูล RAPD-PCR ด้วยวิธี cluster analysis

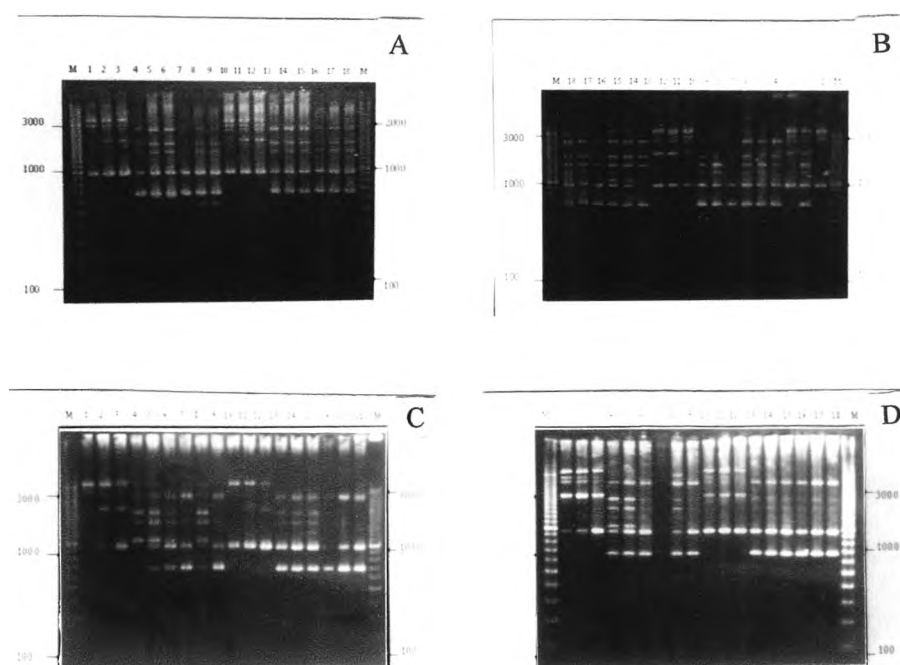
6.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลต โดยข้อมูล RAPD-PCR ด้วยวิธี cluster analysis ข้อมูลในตารางที่ 9 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันทางพันธุกรรม (S) แต่ละคู่ของสายพันธุ์เป็นการคำนวณโดย Jaccard แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ *B. subtilis* จากแปลงป่าธรรมชาติ แปลงป่าปลูกฟื้นฟูสภาพ แปลงขยายพันธุ์ แปลง 2 และแปลง 52 มีค่า 0-0.94 0.58-0.95 0-0.91 0.51-0.74 และ 0.21-0.95 ตามลำดับ เมื่อสังเกตสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ *B. subtilis* NRS02-3 และ *B. subtilis* NRS02-2 มีค่า 0.87 *B. subtilis* AGS02-1 *B. subtilis* AGS02-2 และ *B. subtilis* AGS03-1 มีค่า 0.91 *B. subtilis* COS02-1 และ *B. subtilis* COS03-1 มีค่า 0.94 เมื่อเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันภายในกลุ่ม ค่าของสัมประสิทธิ์ความเหมือนแปลงขยายพันธุ์มีความแปรผันทางพันธุกรรมต่ำที่สุด คือมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (S=0.91) ส่วนแปลง 2 มีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมสูงสุด คือมีค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์ความเหมือน (S=0.63) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างกลุ่ม แปลงป่าธรรมชาติ และแปลงป่าปลูกฟื้นฟูสภาพมีค่าแปรผันทางพันธุกรรมต่ำสุด คือ มีค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์ความเหมือน (S=0.86); แปลง 52 และแปลง 2 มีค่าแปรผันทางพันธุกรรมสูงสุด คือมีค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์ความเหมือน (S=0.68)



ตารางที่ 8 คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท ที่เตรียมได้

แบคทีเรีย	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (μg/ml)
<i>B. subtilis</i> NRS01-2	0.385	0.22	1.75	962.5
<i>B. subtilis</i> NRS02-1	0.836	0.472	1.77	2090
<i>B. subtilis</i> NRS02-2	0.884	0.472	1.87	2210
<i>B. subtilis</i> NRS02-3	0.696	0.397	1.75	1740
<i>B. subtilis</i> NRS02-4	0.339	0.183	1.85	847.5
<i>B. subtilis</i> NRS03-1	0.069	0.041	1.68	172.5
<i>B. subtilis</i> NRS03-2	0.890	0.490	1.82	2225
<i>B. subtilis</i> COS02-1	0.319	0.180	1.77	797.5
<i>B. subtilis</i> COS03-1	0.336	0.176	1.90	840
<i>B. subtilis</i> COS03-2	0.306	0.19	1.61	765
<i>B. subtilis</i> COS03-3	0.066	0.039	1.69	165
<i>B. subtilis</i> COS03-4	0.327	0.170	1.88	817.5
<i>B. subtilis</i> COS03-5	0.194	0.116	1.67	485
<i>B. subtilis</i> AGS02-1	0.367	0.183	2.00	917.5
<i>B. subtilis</i> AGS02-2	0.214	0.133	1.61	535
<i>B. subtilis</i> AGS03-1	0.340	0.190	1.79	850
<i>B. subtilis</i> PS202-1	0.195	0.113	1.73	487.5
<i>B. subtilis</i> PS202-2	0.349	0.200	1.75	872.5
<i>B. subtilis</i> PS5202-1	0.073	0.045	1.62	182.5
<i>B. subtilis</i> PS5202-2	0.069	0.036	1.92	172.5
<i>B. subtilis</i> PS5202-3	0.092	0.049	1.88	230
<i>B. subtilis</i> PS5202-4	0.049	0.029	1.69	122.5
<i>B. subtilis</i> PS5202-5	0.096	0.057	1.68	240
<i>B. subtilis</i> PS5202-6	0.027	0.014	1.93	67.5
<i>B. subtilis</i> PS5202-7	0.128	0.076	1.71	320
<i>B. subtilis</i> PS5202-8	0.144	0.084	1.71	235
<i>B. subtilis</i> PS5202-9	0.094	0.035	1.71	235

ตารางที่ 8 ต่อ				
<i>B. subtilis</i> PS5203-1	0.339	0.184	1.84	847.5
<i>B. subtilis</i> PS5203-2	0.335	0.176	1.90	837.5
<i>B. subtilis</i> PS5203-3	0.537	0.300	1.79	1342.5
<i>B. subtilis</i> PS5203-4	0.290	0.170	1.71	725
<i>B. subtilis</i> PS5203-5	0.788	0.450	1.75	1970
<i>B. subtilis</i> PS5203-6	0.030	0.017	1.76	75
<i>B. subtilis</i> PS5203-7	0.350	0.200	1.75	875
<i>B. subtilis</i> PS5203-8	0.297	0.163	1.82	742.5

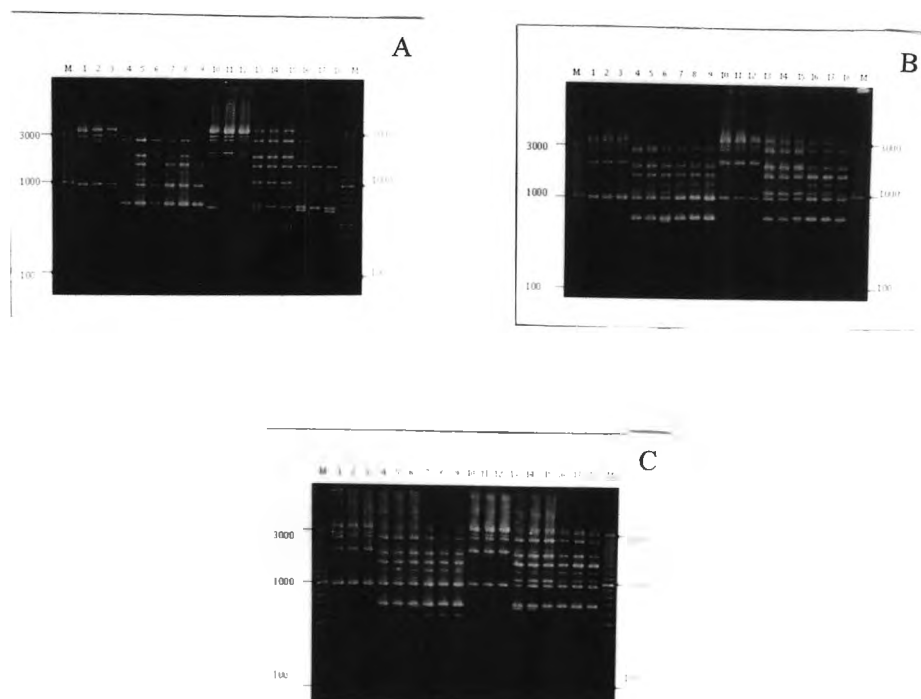


ภาพที่ 12 RAPD profiles โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ Taq Polymerase ที่ระดับความเข้มข้น 0.625 U 1 U และ 1.25 U ร่วมกับปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1247 ที่ระดับ 12.5 pmol และ 25 pmol และ annealing temperature ที่ 32 องศาเซลเซียส (A) ที่ 36 องศาเซลเซียส 15 วินาที (B) ที่ 36 องศาเซลเซียส 20 วินาที (C) ที่ 40 องศาเซลเซียส (D)

lane ที่ 1 – 3 RAPD profiles ของ *B. subtilis* ATCC 6633 ที่ระดับความเข้มข้นของ Taq Polymerase ที่ความเข้มข้น 0.625 U 1 U และ 1.25 U ตามลำดับ ที่ไพรเมอร์ เข้มข้น 25 pM และ lane ที่ 10 – 12 ที่ไพรเมอร์เข้มข้น 12.5 pM

lane ที่ 4 – 6 RAPD profiles ของ *B. subtilis* รหัส PS5202-5 ที่ระดับความเข้มข้นของ Taq Polymerase ที่ความเข้มข้น 0.625 U 1 U และ 1.25 U ตามลำดับที่ไพรเมอร์ เข้มข้น 25 pM และ lane ที่ 13 – 15 ที่ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ 12.5 pM

lane ที่ 7 – 9 RAPD profiles ของ *B. subtilis* รหัส AGS02-2 ที่ระดับความเข้มข้นของ Taq Polymerase ที่ความเข้มข้น 0.625 U 1 U และ 1.25 U ตามลำดับที่ไพรเมอร์ เข้มข้น 25 pM และ lane ที่ 17 – 18 ที่ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ 12.5 pM

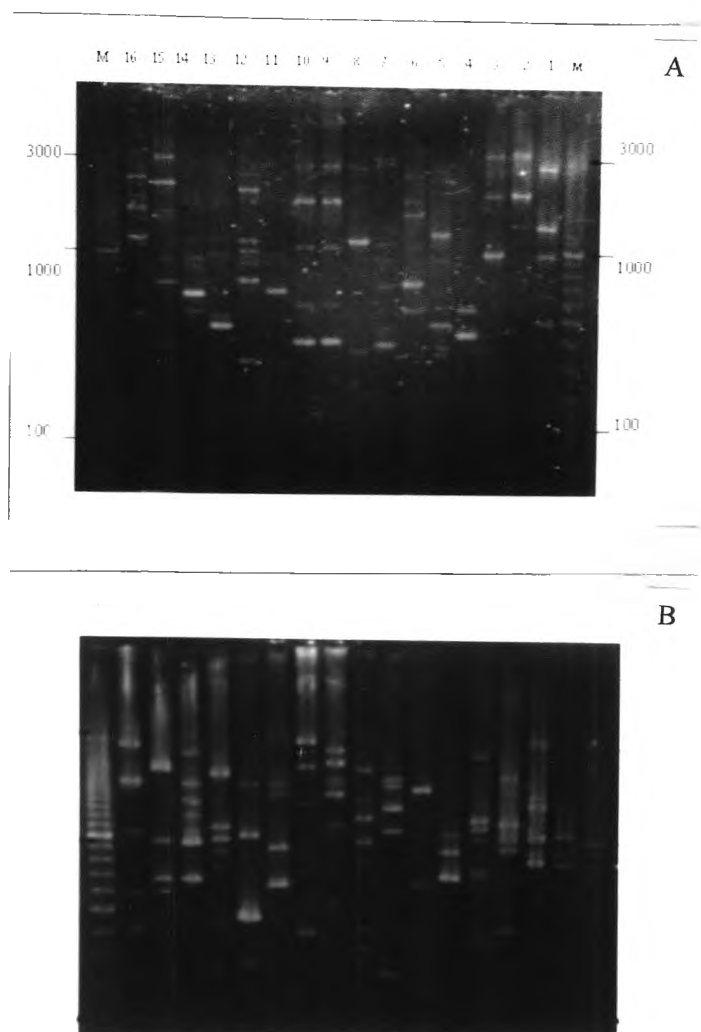


ภาพที่ 13 RAPD profiles ของ *B. subtilis* 3 ไอโซเลท ที่ระดับความเข้มข้น $MgCl_2$ ที่ 3 mM 4 mM และ 4.5 mM ร่วมกับ Taq Polymerase ที่ความเข้มข้น 0.625 U (A) 1 U (B) และ 1.25 U (C) ที่ระดับความเข้มข้นไพโรเมอร์ 25 pM และ 12.5 pM

lane ที่ 1-3 RAPD profiles ของ *B. subtilis* ATCC 6633 ที่ระดับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 3 mM 4 mM และ 4.5 mM ตามลำดับ ที่ไพโรเมอร์ เข้มข้น 25 pM และ lane ที่ 10-12 ที่ไพโรเมอร์เข้มข้น 12.5 pM

lane ที่ 4-6 RAPD profiles ของ *B. subtilis* รหัส PS5202-5 ที่ระดับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 3 mM 4 mM และ 4.5 mM ตามลำดับ ที่ไพโรเมอร์ เข้มข้น 25 pM และ lane ที่ 13-15 ที่ไพโรเมอร์เข้มข้น 12.5 pM

lane ที่ 7-9 RAPD profiles ของ *B. subtilis* รหัส AGS02-2 ที่ระดับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 3 mM 4 mM และ 4.5 mM ร่วมกับ Amphi Taq Polymerase ที่ความเข้มข้น 0.625 U, 1 U และ 1.25 U ตามลำดับ ที่ไพโรเมอร์ เข้มข้น 25 pM และ lane ที่ 16-18 ที่ไพโรเมอร์เข้มข้น 12.5 pM lane



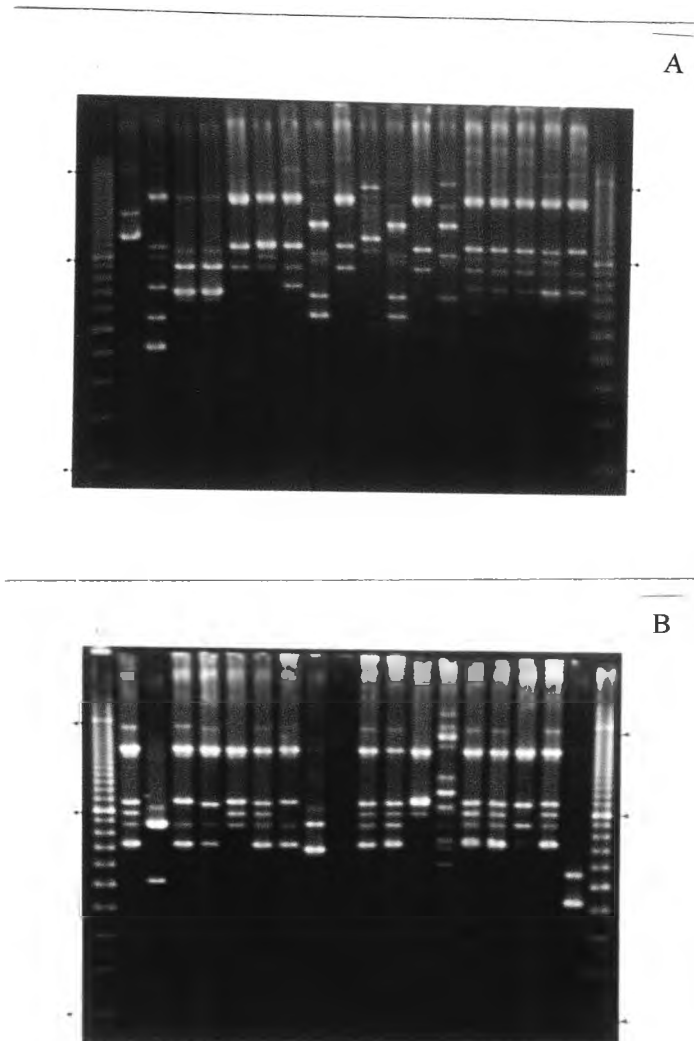
ภาพที่ 14 RAPD profile ของ *B. subtilis* 4 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ 8 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้น $MgCl_2$ 4 mM ร่วมกับ Taq Polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และไพรเมอร์เข้มข้น 25 pM

A แถบดีเอ็นเอของ *B. subtilis* ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPR1 OPR2 OPR13 OPR16 OPR20 1247 1252 และ 1253

M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน lane 1-8 *B. subtilis* ATCC6633 และ lane 9-18 *B. subtilis* AGS02-2

B แถบดีเอ็นเอของ *B. subtilis* ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPR1 OPR2 OPR13 OPR16 OPR20 1247 1252 และ 1253

M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน lane 1-8 *B. subtilis* รหัส PS5202-5 และ lane 9-18 *B. subtilis* NRS02-2

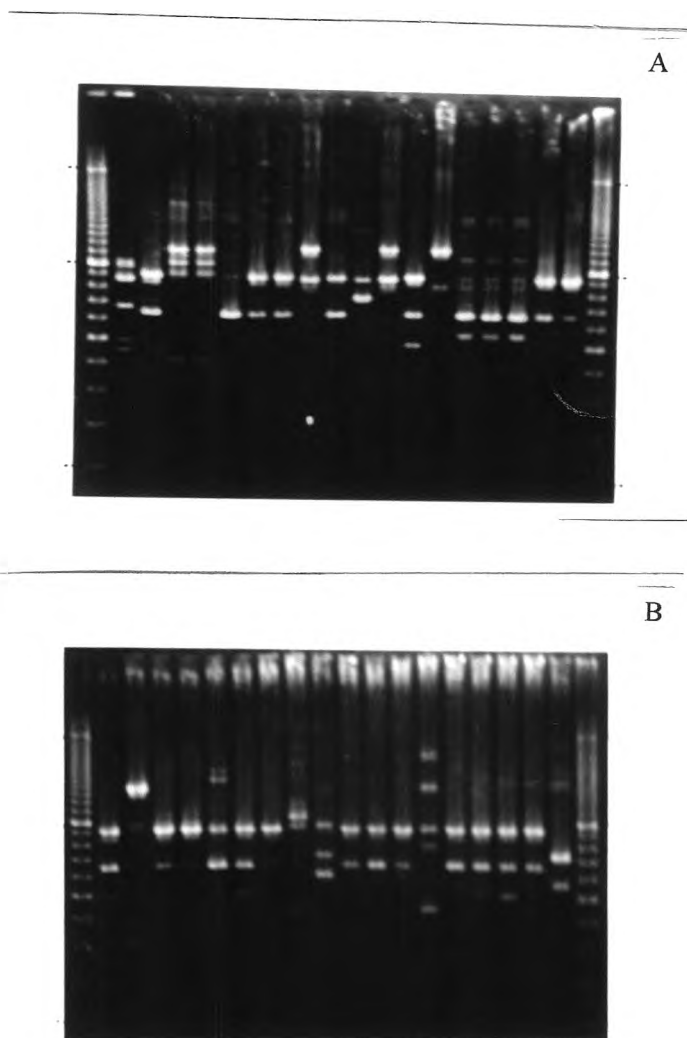


ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ไพรเมอร์ OPR1

M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

A (1-18) *B. subtilis* รหัส NRS01-2 NRS02-1 NRS02-2 NRS02-3 NRS02-4 NRS03-1
NRS03-2 COS02-1 COS02-2 COS02-3 COS02-4 COS02-5 COS03-1 AGS02-1 AGS02-2
AGS03-1 PS202-1 และ PS202-2 ตามลำดับ

B (1-18) *B. subtilis* รหัส PS5202-1 PS5202-2 PS5202-3 PS5202-4 PS5202-5 PS5202-6
PS5202-7 PS5202-8 PS5202-9 PS5203-1 PS5203-2 PS5203-3 PS5203-4 PS5203-5 PS5203-6
PS5203-7 PS5203-8 และ ATCC6633 ตามลำดับ

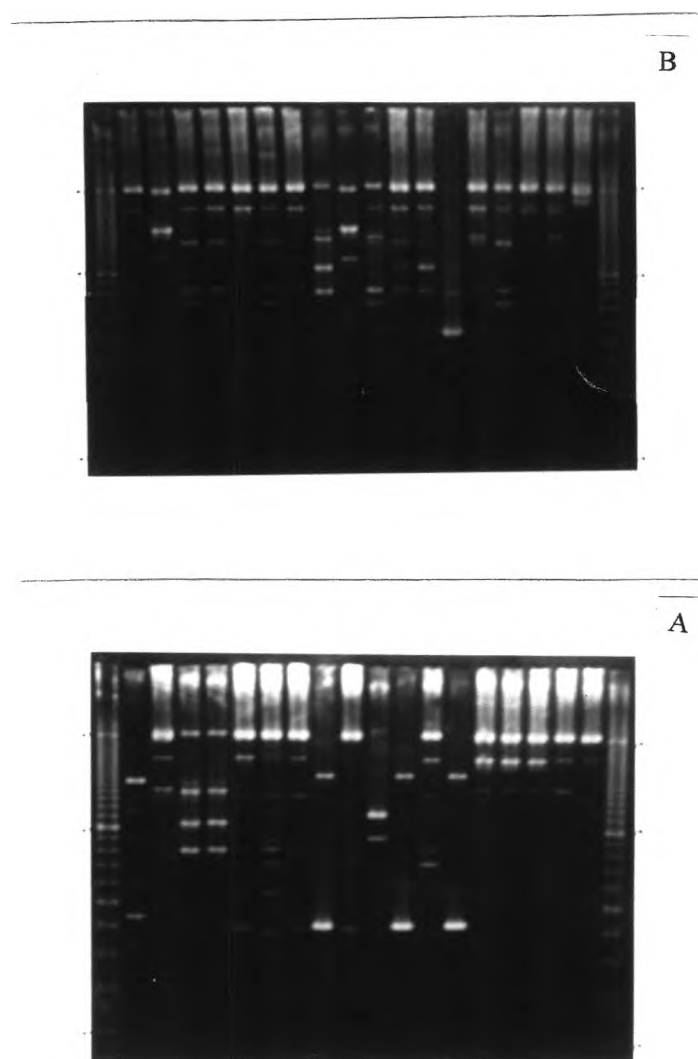


ภาพที่ 16 แอบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPR13

M คือ แอบดีเอ็นเอมาตรฐาน

A (1-18) *B. subtilis* รหัส NRS01-2 NRS02-1 NRS02-2 NRS02-3 NRS02-4 NRS03-1
NRS03-2 COS02-1 COS02-2 COS02-3 COS02-4 COS02-5 COS03-1 AGS02-1 AGS02-2
AGS03-1 PS202-1 และ PS202-2 ตามลำดับ

B (1-18) *B. subtilis* รหัส PS5202-1 PS5202-2 PS5202-3 PS5202-4 PS5202-5 PS5202-6
PS5202-7 PS5202-8 PS5202-9 PS5203-1 PS5203-2 PS5203-3 PS5203-4 PS5203-5 PS5203-6
PS5203-7 PS5203-8 และ ATCC6633 ตามลำดับ

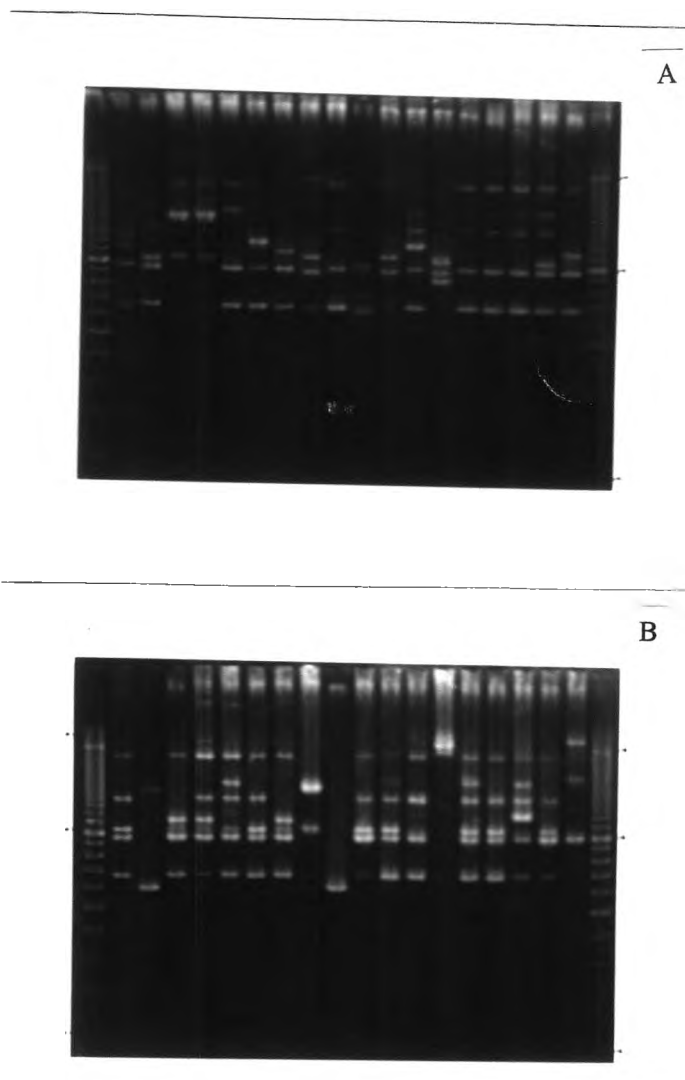


ภาพที่ 17 แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPR16

M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

A (1-18) *B. subtilis* รหัส NRS01-2 NRS02-1 NRS02-2 NRS02-3 NRS02-4 NRS03-1
NRS03-2 COS02-1 COS02-2 COS02-3 COS02-4 COS02-5 COS03-1 AGS02-1 AGS02-2
AGS03-1 PS202-1 และ PS202-2 ตามลำดับ

B (1-18) *B. subtilis* รหัส PS5202-1 PS5202-2 PS5202-3 PS5202-4 PS5202-5 PS5202-6
PS5202-7 PS5202-8 PS5202-9 PS5203-1 PS5203-2 PS5203-3 PS5203-4 PS5203-5 PS5203-6
PS5203-7 PS5203-8 และ ATCC 6633 ตามลำดับ



ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 1247

M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

A (1-18) *B. subtilis* รหัส NRS01-2 NRS02-1 NRS02-2 NRS02-3 NRS02-4 NRS03-1
NRS03-2 COS02-1 COS02-2 COS02-3 COS02-4 COS02-5 COS03-1 AGS02-1 AGS02-2
AGS03-1 PS202-1 และ PS202-2 ตามลำดับ

B (1-18) *B. subtilis* รหัส PS5202-1 PS5202-2 PS5202-3 PS5202-4 PS5202-5 PS5202-6
PS5202-7 PS5202-8 PS5202-9 PS5203-1 PS5203-2 PS5203-3 PS5203-4 PS5203-5 PS5203-6
PS5203-7 PS5203-8 และ ATCC 6633 ตามลำดับ

6.2 การวิเคราะห์กลุ่มของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท โดยข้อมูล RAPD-PCR ด้วยวิธี cluster analysis

Dendrogram สร้างโดยคอมพิวเตอร์โปรแกรม RAPDistance สรุปผลบนพื้นฐาน ระยะห่างทางพันธุกรรม แสดงในภาพที่ สามารถแบ่ง *B. subtilis* ที่ใช้ศึกษาออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่ม 1 ประกอบด้วย *B. subtilis* 2 ไอโซเลท เป็นเชื้อได้จากดินป่าสร้าง และแปลง 52 กลุ่ม 2 ประกอบด้วย 24 ไอโซเลท ได้จากป่าปลูกฟื้นฟูสภาพ และป่าธรรมชาติ กลุ่ม 3 ประกอบด้วย 4 ไอโซเลท ได้จากแปลง 52 และป่าธรรมชาติ กลุ่ม 4 ประกอบด้วย 5 ไอโซเลท ได้จากป่าธรรมชาติ และแปลง 52

กลุ่ม 1 ประกอบด้วย *B. subtilis* PS5203-4 และ *B. subtilis* COS03-2

กลุ่ม 2 ประกอบด้วย *B. subtilis* AGS03-1 *B. subtilis* AGS02-2 *B. subtilis* AGS02-1 *B. subtilis* NRS03-1 *B. subtilis* COS03-1 *B. subtilis* NRS02-4 *B. subtilis* COS03-4 *B. subtilis* NRS02-1 *B. subtilis* PS5203-3 *B. subtilis* PS5202-7 *B. subtilis* PS5202-3 *B. subtilis* PS5202-2 *B. subtilis* NRS03-2 *B. subtilis* PS5203-7 *B. subtilis* PS5203-5 *B. subtilis* PS02-1 *B. subtilis* PS5203-2 *B. subtilis* PS5202-4 *B. subtilis* PS5203-8 *B. subtilis* PS5203-6 *B. subtilis* PS5203-1 *B. subtilis* PS5202-6 *B. subtilis* PS5202-1 และ *B. subtilis* PS5202-5

กลุ่ม 3 ประกอบด้วย *B. subtilis* COS03-5 *B. subtilis* COS03-3 *B. subtilis* COS02-1 และ *B. subtilis* NRS01-2

กลุ่ม 4 ประกอบด้วย *B. subtilis* PS5202-1 *B. subtilis* PS5202-2 *B. subtilis* PS5202-8 *B. subtilis* NRS02-3 และ *B. subtilis* NRS02-2

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 5 ชนิดสามารถแบ่ง *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท ออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่สามารถยับยั้งการเจริญ และกลุ่มที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 5 ชนิดได้ ซึ่งเมื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์โดยวิธี cluster analysis พบว่ามีความสัมพันธ์กับผลของความสามารถในการยับยั้ง และสามารถแบ่งกลุ่มตามความสัมพันธ์ได้ดังนี้ กลุ่มแรกประกอบไปด้วย *B. subtilis* PS5203-4 *B. subtilis* COS03-2 *B. subtilis* COS03-5 *B. subtilis* COS03-3 *B. subtilis* COS02-1 *B. subtilis* PS5202-9 *B. subtilis* PS5202-2 *B. subtilis* PS5202-8 *B. subtilis* NRS02-3 และ *B. subtilis* PS5202-2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 5 ชนิด ซึ่งตรงกับผลการวิเคราะห์ cluster กลุ่มที่ 1 3 และ 4 และกลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วย *B. subtilis* AGS03-1 *B. subtilis* AGS02-2 *B. subtilis* AGS02-1 *B. subtilis* NRS03-1 *B. subtilis* COS03-1 *B. subtilis* NRS02-4 *B. subtilis* COS03-4 *B. subtilis* NRS02-1 *B. subtilis*

PS5203-3 *B. subtilis* PS5202-7 *B. subtilis* PS5203-1 *B. subtilis* PS5023-6 *B. subtilis* PS5202-3
B. subtilis PS5202-2 *B. subtilis* NRS03-2 *B. subtilis* PS5203-7 *B. subtilis* PS5203-5 *B. subtilis*
PS202-1 *B. subtilis* PS5203-2 *B. subtilis* PS5202-4 *B. subtilis* PS5203-8 *B. subtilis* PS5203-6
B. subtilis PS5202-1 และ *B. subtilis* PS5202-5 ซึ่งเป็นกลุ่มที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 5
ชนิดได้ ซึ่งตรงผลการวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis) กลุ่มที่ 2

NRS01-2 0 910642 0 92582 0 92582 0 900604 0 921954 0 917663 0 921954 0 945905 0 919898 0 921954 0 937043 0 886523 0 918937 0 918937 0 914991 0 921954 0 883452 0 945905 0 910642 0 869539 0 866405 0 883452 0 894427 0 929981 0 956603 0 883452 0 883452 0 888523 0 898717 0 876038 0 883452 0 866025 0 886405

NRS02-1 0 866025 0 866025 0 679366 0 69282 0 65938 0 901388 0 722315 0 875595 0 901388 0 822233 0 901388 0 694808 0 694808 0 694808 0 565685 0 645497 0 565685 0 866405 0 679366 0 588348 0 52915 0 565685 0 832456 0 866405 0 92582 0 565685 0 5 0 589768 0 908893 0 518875 0 565685 0 565685 0 588348

NRS02-2 0 0 842424 0 856349 0 870988 0 939336 0 83205 0 918559 0 939336 0 901388 0 921132 0 861892 0 861892 0 861892 0 874475 0 856349 0 874475 0 83205 0 887625 0 87831 0 87831 0 874475 0 866025 0 763763 0 902671 0 874475 0 874475 0 856349 0 866025 0 885316 0 874475 0 894427 0 87831

NRS02-3 0 842424 0 856349 0 870988 0 939336 0 83205 0 918559 0 939336 0 901388 0 921132 0 861892 0 861892 0 861892 0 874475 0 856349 0 874475 0 83205 0 887625 0 87831 0 87831 0 874475 0 866025 0 763763 0 902671 0 874475 0 874475 0 856349 0 866025 0 885316 0 874475 0 894427 0 87831

NRS02-4 0 522233 0 603023 0 956183 0 547723 0 875595 0 956183 0 589768 0 956183 0 730297 0 730297 0 730297 0 620174 0 645497 0 666667 0 909718 0 679366 0 681385 0 588348 0 666667 0 878366 0 860663 0 946864 0 666667 0 666667 0 645497 0 806226 0 669534 0 666667 0 666667 0 881385

NRS03-1 0 547723 0 953463 0 632456 0 83887 0 953463 0 603023 0 953463 0 774597 0 774597 0 774597 0 832456 0 603023 0 832456 0 902671 0 845497 0 650444 0 0 0 832456 0 645497 0 848528 0 983624 0 632456 0 679366 0 803023 0 872872 0 681385 0 632456 0 679366 0 650444

NRS03-2 0 950382 0 57735 0 85485 0 950382 0 617213 0 830949 0 720082 0 720082 0 720082 0 589768 0 333333 0 589768 0 866025 0 534522 0 651677 0 612372 0 589768 0 447214 0 834058 0 938083 0 589768 0 589768 0 458831 0 82717 0 650444 0 589768 0 522233 0 612372

COS02-1 0 946864 0 912871 0 0 953463 0 748331 0 945905 0 945905 0 945905 0 92582 0 915811 0 887625 0 966092 0 921132 0 891133 0 910259 0 887625 0 901388 0 966092 0 982607 0 887625 0 901388 0 966092 0 982607 0 887625 0 887625 0 935414 0 932505 0 897527 0 887625 0 92582 0 891133

COS03-1 0 841625 0 946864 0 690066 0 946864 0 733799 0 733799 0 733799 0 707107 0 832456 0 707107 0 884652 0 722315 0 72111 0 72111 0 707107 0 6742 0 852803 0 932505 0 707107 0 707107 0 632456 0 781736 0 745356 0 707107 0 707107 0 72111

COS03-2 0 912871 0 83887 0 890564 0 870388 0 870388 0 870388 0 83655 0 53887 0 83656 0 841625 0 875595 0 842424 0 866025 0 83656 0 850963 0 922958 0 916515 0 83656 0 83688 0 83887 0 83656 0 852803 0 83656 0 861357 0 816497

COS03-3 0 953463 0 748331 0 945905 0 945905 0 945905 0 92582 0 915811 0 887625 0 966092 0 921132 0 891133 0 910259 0 887625 0 901388 0 966092 0 982607 0 887625 0 887625 0 935414 0 932505 0 897527 0 887625 0 92582 0 891133

COS03-4 0 953463 0 707107 0 707107 0 707107 0 57735 0 65938 0 679366 0 902671 0 733799 0 693889 0 6 0 679366 0 89282 0 902671 0 942809 0 679366 0 632456 0 603023 0 899735 0 838285 0 679366 0 632456 0 693889

COS03-5 0 912871 0 912871 0 912871 0 887525 0 894427 0 866025 0 946864 0 901388 0 870388 0 891133 0 866025 0 901388 0 946864 0 963624 0 866025 0 866025 0 894427 0 866025 0 866025 0 87831 0 866025 0 907485 0 870388

AGS02-1 0 0 0 643268 0 742781 0 718421 0 879883 0 790569 0 728869 0 695608 0 718421 0 762001 0 901388 0 894427 0 718421 0 68313 0 666667 0 87178 0 647576 0 718421 0 68313 0 728869

AGS02-2 0 0 643268 0 742781 0 718421 0 879883 0 790569 0 728869 0 695608 0 718421 0 762001 0 901388 0 894427 0 718421 0 68313 0 666667 0 87178 0 647576 0 718421 0 68313 0 728869

AGS03-1 0 643268 0 742781 0 718421 0 879883 0 790569 0 728869 0 695608 0 718421 0 762001 0 901388 0 894427 0 718421 0 68313 0 666667 0 87178 0 647576 0 718421 0 68313 0 728869

PS02-1 0 510754 0 489898 0 870988 0 565685 0 518875 0 518875 0 489898 0 565685 0 845154 0 930949 0 489898 0 489898 0 57735 0 816497 0 34641 0 489898 0 608581 0 518875

PS02-2 0 510754 0 877058 0 436436 0 466252 0 6 0 510754 0 318228 0 816497 0 942809 0 510754 0 510754 0 534522 0 794719 0 588348 0 510754 0 57735 0 540062

PS5202-1 0 894427 0 417029 0 208514 0 353553 0 0 0 417029 0 845154 0 950382 0 0 294884 0 510754 0 825723 0 34641 0 0 489898 0 208514

PS5202-2 0 909718 0 898027 0 898027 0 894427 0 866405 0 774597 0 745356 0 894427 0 894427 0 877058 0 895735 0 883883 0 894427 0 894427 0 898027

PS5202-3 0 361158 0 52915 0 417029 0 308507 0 860663 0 946864 0 417029 0 5 0 845497 0 816497 0 518875 0 417029 0 565685 0 456435

PS5202-4 0 0 208514 0 361158 0 850963 0 951972 0 208514 0 353553 0 540062 0 825723 0 392232 0 208514 0 447214 0 288675

PS5202-5 0 353553 0 52915 0 850963 0 951972 0 353553 0 353553 0 540062 0 852803 0 392232 0 353553 0 447214 0 4

PS5202-6 0 417029 0 845154 0 950382 0 0 294884 0 510754 0 825723 0 34641 0 0 489898 0 208514

PS5202-7 0 83205 0 946864 0 417029 0 417029 0 589768 0 816497 0 518875 0 417029 0 5 0 456435

PS5202-8 0 932505 0 845154 0 845154 0 816497 0 82717 0 881357 0 845154 0 870988 0 850963

PS5202-9 0 950382 0 950382 0 942809 0 953463 0 937437 0 950382 0 950382 0 933257

PS5203-1 0 294884 0 510754 0 825723 0 34641 0 0 489898 0 208514

PS5203-2 0 510754 0 825723 0 34641 0 294884 0 408248 0 353553

PS5203-3 0 806226 0 588348 0 510754 0 510754 0 540062

PS5203-4 0 841625 0 825723 0 859727 0 834058

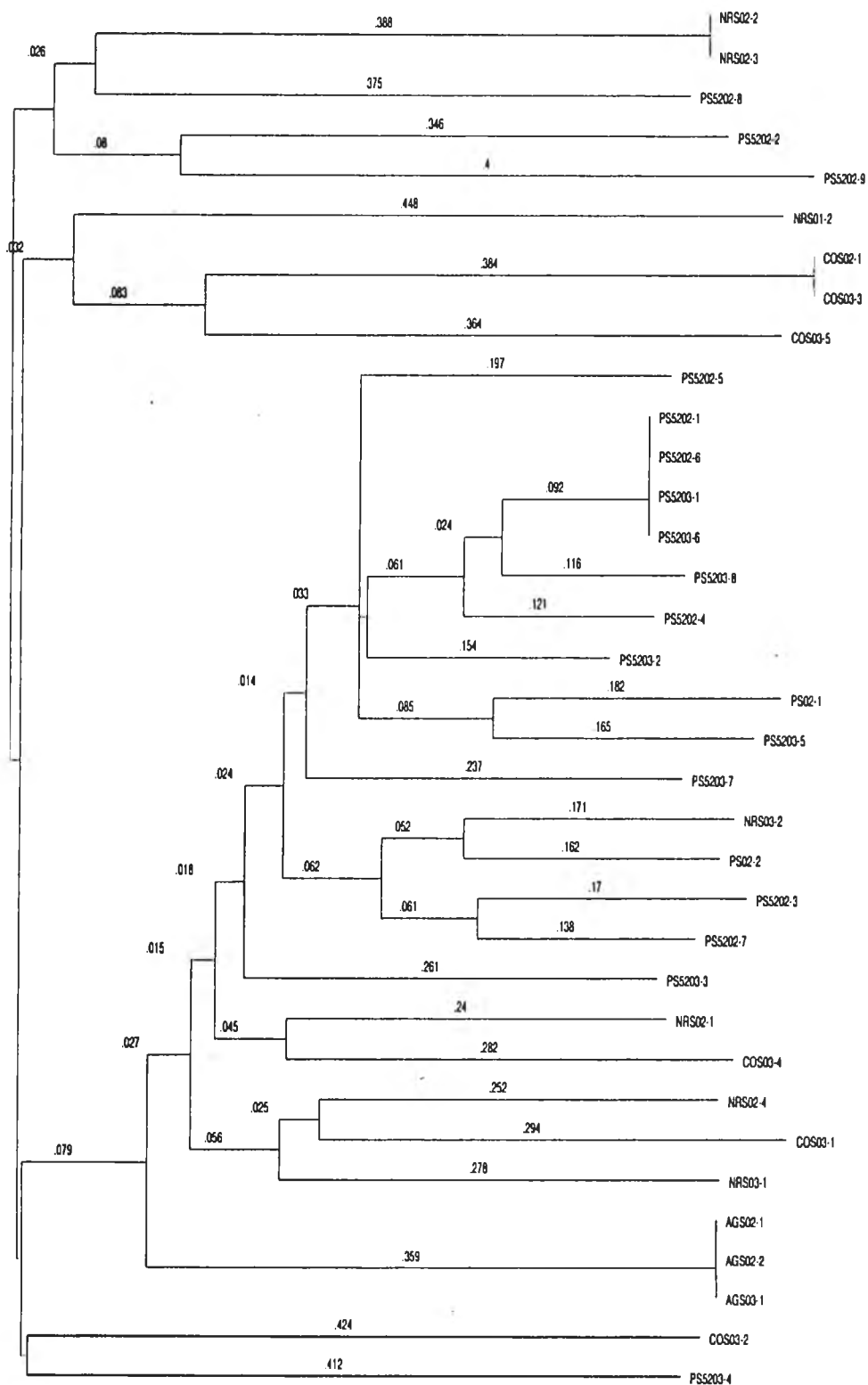
PS5203-5 0 34641 0 509175 0 392232

PS5203-6 0 489898 0 208514

PS5203-7 0 518875

PS5203-8

ตารางที่ 9 ความเหมือนกันทางพันธุกรรมโดย Jaccard ระหว่างคู่แต่ละคู่ของสายพันธุ์



ภาพที่ 19 Dendrogram โดยคอมพิวเตอร์โปรแกรม RAPDistance