

การปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* โดยการทำให้กลายพันธุ์¹

Generalized Mutagenesis of *Bacillus subtilis*

มัทนา ศรีหัตถกรรม หทัยรัตน์ อุไรวงศ์

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Macrophomina phaseolina* และ *Sclerotium rolfsii* มากยิ่งขึ้น รวมทั้งให้สามารถนำไปใช้ป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่นๆ โครงการวิจัยนี้มีหลายการทดลองเกี่ยวเนื่องกันเป็นขั้นตอน เริ่มจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงยูวีขนาด 30 วัตต์ ฉายลงไปบนเซลล์ของ *B. subtilis* เป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 และ 170 วินาที เสร็จแล้วนำเซลล์ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการฉายแสงแล้ว ไปทำ serial dilution ทันที เพื่อตรวจสอบการรอดตายของเชื้อบนอาหาร Nutrient Agar (NA) จากนั้นนำ *B. subtilis* ที่รอดตายไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* โดยวิธี Dual Culture Plate Technique โดยให้เชื้อทั้งสองอยู่ห่างกัน 6 เซนติเมตร และทำการคัดเลือกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แสดงปฏิกิริยาการยับยั้งออกมา แล้วตัดวุ้นตรงบริเวณ clear zone ของแต่ละไอโซเลทไปทดสอบพิษของสารพิษที่อยู่ภายในวุ้นกับ *M. phaseolina* โดยวิธี Dual Culture Plate Technique (วางวุ้นห่างจากเชื้อ 3 เซนติเมตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน จึงทำการถ่ายเชื้อไอโซเลทที่วุ้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* เก็บไว้บนอาหาร NA ที่ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป นำเชื้อไอโซเลทที่เก็บไว้ไปทดสอบฤทธิ์กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 เชื้อ (*Pyricularia oryzae*, *Cercospora canescens*, *Botryodiplodia theobromae*, *Rhizoctonia oryzae* และ *S. rolfsii*) โดยวิธี Dual Culture Plate Technique บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และ NA (วางห่างกัน 6 เซนติเมตร) และนำไปตรวจสอบหาความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ โดยวิธี Pulsed-Field Gel Electrophoresis

ผลการทดลอง พบว่า *B. subtilis* เกิดการกลายพันธุ์โดยแสงยูวี ได้สายพันธุ์กลายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ดีกว่า *B. subtilis* ที่ไม่ได้ผ่านการฉายแสงยูวี จำนวน 117 สายพันธุ์ และจากการทดสอบพิษของสารพิษที่อยู่ภายในร่วมกับ *M. phaseolina* พบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ จากจำนวนสายพันธุ์กลาย 117 สายพันธุ์ คือ B7T1010⁻² MS11R3, B7T1010⁻³ MS3R3 และ B7T6010⁻³ R1 ที่สร้างสารพิษยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ได้นานถึง 10 วัน ได้ clear zone กว้าง 0.1, 0.1 และ 0.2 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้งสามสายพันธุ์ และสารพิษที่สายพันธุ์กลายผลิตออกมาในวัน ไปทดสอบฤทธิ์กับเชื้อราสาเหตุโรคพืชห้าเชื้อ ปรากฏว่าทั้งตัวเชื้อและสารพิษที่เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตออกมา สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* และ *C. canescens* ได้ยาวนาน 15 วัน ยับยั้งการเจริญของ *S. rolfisii* ได้ดีพอสมควรบนอาหาร NA แต่ยับยั้ง ได้น้อยบนอาหาร PDA พบความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายต่างๆ บ่งชี้ว่าได้เกิดการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์ต่างๆ จริง เป็นผลให้สายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบต่างกัน

คำนำ

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ทั่วไปในดิน และน้ำ มีประโยชน์ต่อวงการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและยา ปศุสัตว์ และทางการเกษตรอย่างมาก เพราะได้มีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* spp. หลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารกำจัดแมลง amino acid nucleotide และ nucleosides อย่างกว้างขวางในวงการเหล่านี้ เพราะมีความปลอดภัยสูง และไม่ปรากฏว่าก่อให้เกิดโรคหรือเข้าไปใน host (Sonenshein *et al.*, 1993) ในทางการเกษตร เท่าที่มีรายงาน คือการใช้ *Bacillus thuringiensis* กำจัดหนอนผีเสื้อ เช่น หนอนกระทู้หอม และ หนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นต้น และการถ่ายฝากยีนที่กำหนดการสร้างสารพิษจาก *B. thuringiensis* (bt toxin) เข้าสู่ต้นฝ้าย ยาสูบ มะเขือเทศ มันฝรั่ง และข้าวโพด และอื่นๆ ในปี พ.ศ. 2534 มัทนาและคณะพบว่า *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินป่า แสดงปฏิกริยายับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* และ *S. rolfisii* บนอาหาร PDA และ NA ทำให้เกิด clear zone ระหว่างโคโลนีของ *Bacillus* spp. กับ *M. phaseolina* และ *Bacillus* spp กับ *S. rolfisii* เมื่อนำเส้นใยบริเวณ clear zone ของเชื้อทั้งสองมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เส้นใยของ *M. phaseolina* มีการเจริญผิดปกติ มีเซลล์สั้นลง และหักงอ หยุดการเจริญ เส้นใยถัดเข้ามาข้างในสร้างเม็ด sclerotia เพื่อให้ทนต่อสารพิษที่ *Bacillus* sp. ผลิตออกมา ส่วนเส้นใยของ *S. rolfisii* มีการแตกกิ่งสั้นๆ หักงอ สูญเสีย cytoplasm

และ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งจากลักษณะของปฏิกิริยายับยั้ง คาดว่า น่าจะมีสาเหตุมาจาก toxin ของ *Bacillus* spp. ถ้าสามารถปรับปรุงพันธุ์ของ *Bacillus* spp. ให้สร้างสารพิษมากขึ้น และรุนแรงยิ่งขึ้น จะเป็นประโยชน์ต่องานป้องกันกำจัดโรคพืช โดยเฉพาะโรคที่เกิดจาก *M. phaseolina*

M. phaseolina เป็นเชื้อสาเหตุของโรครากและโคนเน่าในพืชหลายชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฝ้าย ปอกระเจา ฯลฯ เชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้ ตั้งแต่ ราก จนถึงเมล็ด ทำให้เป็นโรครากและโคนเน่าลามขึ้นข้างบน ใบและกิ่งใหม่ และเมล็ดเน่า เป็น seed borne ที่สำคัญของถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเขียวผิวดำ (มัทนา, 2542) ทำให้เป็นปัญหา ในการส่งออก และจากการตรวจนับปริมาณของ sclerotia ของ *M. phaseolina* ในดินปลูกถั่ว เหลือง ถั่วเขียว และถั่วเขียวผิวดำ พบว่า มีปริมาณเฉลี่ย 8 sclerotia / ดินแห้ง 1 กรัม (พบมาก ที่สุด 43 sclerotia / ดินแห้ง 1 กรัม พบน้อยที่สุด 1 sclerotia / ดินแห้ง 1 กรัม) (มัทนา, 2541) ซึ่ง คาดว่า จะก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่พืชปลูกได้ ถ้ายังไม่มีวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ เหมาะสม การป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธี น่าจะเป็นทางเลือกที่ดี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสร้าง *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ให้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* และ *S. rolfii* มากยิ่งขึ้น รวมทั้งให้สามารถนำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้ไปใช้ป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช อื่นๆ
2. เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายในระดับดีเอ็นเอโดยวิธี Pulsed-Field Gel Electrophoresis

อุปกรณ์และวิธีการ

งานวิจัยนี้มี 3 การทดลอง

- การทดลองที่ 1** การปรับปรุงพันธุ์ *B. subtilis* โดยการทำให้กลายพันธุ์โดยการใส่แสงยูวี
- การทดลองที่ 2** การทดสอบฤทธิ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สาเหตุโรคพืช
- การทดลองที่ 3** การตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์กลายในระดับดีเอ็นเอ โดยวิธี Pulsed - Field Gel Electrophoresis

อุปกรณ์

1. culture ของ *B. subtilis* ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* มากที่สุดจำนวน 1 ไอโซเลท คือ *B. subtilis* wild type B7 ซึ่งแยกได้จากดินป่าที่เก็บมาจาก ตำบลกระบกเตี้ย อำเภอ หันคา จังหวัด ชัยนาท
 2. culture ของ *M. phaseolina* แยกเชื้อจากต้นถั่วเขียวผิวดำที่เป็นโรคเน่าดำ
 3. culture ของ เชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 เชื้อ มีดังนี้
 - 3.1 *P. oryzae* ได้รับการอนุเคราะห์เชื้อจาก ดร. รัศมี ลูติเกียรติพงศ์ กลุ่มงานวิจัยโรคข้าว สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร
 - 3.2 *C. canescens* race 2 (ไอโซเลทเชียงใหม่) เป็นไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวรุนแรงที่สุด (มัทนา, 2543)
 - 3.3 *B. theobromae* เชื้อสาเหตุของโรคเน่าดำในไม้ยางพารา ได้รับการอนุเคราะห์เชื้อจากกรมป่าไม้
 - 3.4 *R. oryzae* ได้รับการอนุเคราะห์เชื้อจาก ดร. ลือชัย อาริยะรังษุณี กลุ่มวิจัยศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร
 - 3.5 *S. rolfsii* แยกเชื้อจากต้นถั่วเหลืองที่เป็นโรครากและโคนเน่า จากแปลงปลูกในจังหวัดเชียงใหม่
 4. culture ของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ คือ B7T1010⁻² MS11R3(#6), B7T1010⁻³ MS3R3(#8) และ B7T6010⁻³ R1(#19) ที่ได้จากการทดลองนี้
 5. culture ของ *B. subtilis* wild type B1 (#22) แยกได้จากดินปลูกถั่วเขียว, B5 (#23) แยกจากดินปลูกถั่วเหลือง และ B7 (#24) แยกจากดินป่าที่เก็บมาจาก ตำบลกระบกเตี้ย อำเภอหันคา จังหวัดชัยนาท
 6. Nutrient Agar (NA)
 7. Nutrient Broth (NB)
 8. Potato Dextrose Agar (PDA)
 9. ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
 10. ฟลาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร
 11. จานเลี้ยงเชื้อ เข้มเขี่ย และอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในงานโรคพืช
 12. หลอดยู่วี 30 W
 13. หลอดปั่นแยกหลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
 14. ไปเปิด

15. gel cast
16. agarose plug mold
17. spectrophotometer
18. electrophoresis tank และ power supply
19. PFGE chamber
20. เครื่องปั่นเหวี่ยง
21. ตู้ปัมเชื้อ
22. สารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl
23. สารละลาย PIV (PIV solution) (1 โมลาร์ Tris-HCl pH 7.5 10 มิลลิลิตร, NaCl 58.4 กรัม และ deionized water 1 ลิตร) ใช้ 10 ยูนิต/1 ไมโครลิตร
24. 2 เปอร์เซ็นต์ low melting point agars ใน 1 X TE buffer (LMPA)
25. 1 X TE buffer (10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.0 และ 1 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0)
26. สารละลาย EC (ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีสารต่างๆ ดังนี้ 1 โมลาร์ Tris-HCl pH 7.5 0.6 มิลลิลิตร, 0.5 โมลาร์ Na₂EDTA pH 8.0 20 มิลลิลิตร, Polyoxyethylene-20 cetyl 0.5 กรัม, Sodium Lauryl Sarcosine 0.5 กรัม, Deoxycholic acid 0.5 กรัม, NaCl 5.8 กรัม)
27. สารละลาย EC + lysozyme 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ECL)
28. ES buffer (ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีสารต่างๆ ดังนี้ Na₂EDTA 18.61 กรัม pH 9.0 และ Sodium Lauryl Sarcosine 1.0 กรัม)
29. ES + proteinase K (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (ESP)
30. restriction buffer
31. restriction enzyme 2 ชนิด คือ *Not* I (GC/GGCCGC) และ *Sma* I (CCC/GGG)
32. High Melting Point Agarose (HMA)
33. 10 X TBE buffer (Boric acid 61.8 กรัม, Tris base 121.4 กรัม, Na₂EDTA 7.4 กรัม และ deionized water 1 ลิตร)
34. ethidium bromide (EtBr) 2 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์ *B. subtilis* โดยการทำให้กลายพันธุ์โดยใช้แสงยูวี

การทดลองนี้ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย คือ

1.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงยูวี ดำเนินการตามวิธีการของ Cutting and Vader Horn (1990) ดังนี้

1.1.1 คัดเลือกไอโซเลทของ *B. subtilis* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina*/*S. rolfsii* มากที่สุดมา 1 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.1.2 ถ่ายเชื้อที่ได้เลี้ยงไว้บนอาหาร NA ลงในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 100 - 140 รอบ/ นาที จนเชื้อมีค่า O.D₆₀₀ 0.7 - 1.0 มีปริมาณเซลล์ = 1×10^{10} - 2×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร

1.1.3 ใช้ไปเปิดดูดเชื้อในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

1.1.4 ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ล้าง 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้มาละลายในสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl 100 มิลลิลิตร

1.1.5 ใช้ไปเปิดดูดเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (มีปริมาณเซลล์ ประมาณ 5×10^{10} - 1×10^{11} เซลล์) ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 12 จาน/ซ้ำ ทำ 3 ซ้ำ แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปวางใต้หลอดยูวี 30 วัตต์ เป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 และ 170 วินาที ตามลำดับ โดยให้จานเลี้ยงเชื้ออยู่ห่างจากหลอดยูวีเป็นระยะทาง 15 เซนติเมตร และจานเลี้ยงเชื้อห่างกัน 20 เซนติเมตร

1.1.6 นำแต่ละจานเลี้ยงเชื้อมาทำ Dilution Plate Count บนอาหาร NA ทันทีที่เสร็จสิ้นการฉายแสงของแต่ละกรรมวิธี โดยให้มีระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-7} ทำ dilution ละ 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 - 7 วัน

1.1.7 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร เพื่อหาปริมาณการรอดของเชื้อ

1.1.8 เก็บเชื้อที่รอดตายไว้บนอาหาร NA เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์กับ *M. phaseolina* ต่อไป

1.2 การทดสอบ *B. subtilis* ที่รอดตายในการยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* บนอาหาร NA โดยวิธี Dual Culture Plate Technique มีวิธีการดังนี้

1.2.1 เลี้ยง *B. subtilis* ที่รอดตายบนอาหาร NA และเลี้ยง *M. phaseolina* บนอาหาร PDA เมื่อเชื้อเจริญมากพอจึงนำมาใช้ในการทดลอง

1.2.2 ถ้าย *B. subtilis* ที่รอดตาย และ *M. phaseolina* ลงบนอาหาร NA โดยให้เชื้อทั้งสองอยู่ห่างกัน 6 เซนติเมตร ทำเชื้อละ 4 ซ้ำ เสร็จแล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่ง *M. phaseolina* ที่เป็นชุดเปรียบเทียบ (ไม่มี *B. subtilis* อยู่ในจานอาหาร) เจริญถึงจุดที่อยู่ตรงข้ามหรือเจริญได้ 6 เซนติเมตร จึงนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจสอบปฏิกิริยาการยับยั้ง บันทึกความกว้างของ clear zone และคำนวณหาอัตราการกลายพันธุ์ที่ระยะเวลาการฉายแสงต่างๆ โดยการเทียบบัญญัติไตรยางค์ ดังนี้

$$\text{อัตราการกลายพันธุ์(\%)} = \frac{\text{จำนวนไอโซเลทของ } B. subtilis \text{ ที่ยับยั้ง } M. phaseolina \text{ ดีกว่าที่เป็นชุดเปรียบเทียบ}}{\text{จำนวน } B. subtilis \text{ ที่รอดตายที่ระยะเวลาการฉายแสงต่างๆ}} \times 100$$

1.2.3 ทำการคัดเลือกจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่แสดงปฏิกิริยาการยับยั้งออกมา แล้วตัดวุ้นตรงบริเวณ clear zone ของแต่ละไอโซเลท ขนาด 1 x 4 x 0.2 เซนติเมตร ไปทดสอบพิษของสารพิษที่อยู่ภายในวุ้นกับ *M. phaseolina* บนอาหาร NA โดยวิธี Dual Culture Plate Technique (วางวุ้นห่างจากเชื้อ 3 เซนติเมตร) เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารพิษที่อาจจะเกิดขึ้นได้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน จึงนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจสอบปฏิกิริยาการยับยั้ง บันทึกความกว้างของ clear zone และเก็บเชื้อไอโซเลทที่วุ้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุดไว้บนอาหาร NA ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่นๆ

วิธีการ

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in RCB 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยแรก คือ แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ *B. subtilis* สายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ และ *B. subtilis* wild type ปัจจัยที่สอง เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 เชื้อ และวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยใช้ IRRISTAT program

การทดลองนี้ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย คือ

2.1 การทดสอบฤทธิ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลาย ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ 5 เชื้อ บนอาหาร NA และ PDA โดยวิธี Dual Culture Plate Technique มีวิธีการดังนี้

เลี้ยง *B. subtilis* ทั้งสายพันธุ์กลาย และ ที่เป็น wild type บนอาหาร NA และเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 เชื้อบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อเจริญมากพอ จึงใช้เข็มเย็บเย็บเชื้อลงบนอาหาร NA และ PDA โดยวาง *B. subtilis* ห่างจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช 6 เซนติเมตร ตามวิธีการ Dual Culture Plate Technique และตามแผนการทดลองที่ได้วางไว้ ปมเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่เป็นชุดเปรียบเทียบ (ไม่มี *B. subtilis* อยู่ในจาน) เจริญมาถึงจุดตรงข้าม หรือเจริญได้ 6 เซนติเมตร จึงนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจสอบปฏิกิริยาการยับยั้ง และบันทึกความกว้างของ clear zone และนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารพิษที่ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายผลิตออกมา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ 5 เชื้อ บนอาหาร NA และ PDA โดยวิธี Dual Culture Plate Technique ดังนี้

คัดเลือกจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่แสดงปฏิกิริยาการยับยั้งออกมา แล้วตัดวงตรงบริเวณ clear zone ขนาด $1 \times 4 \times 0.2$ เซนติเมตร ไปทดสอบพิษของสารพิษที่อยู่ภายในวงกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 เชื้อตามที่ได้ระบุไว้ โดยวางวงที่ตัดมาห่างจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 เซนติเมตร (เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารพิษก่อนเกิดปฏิกิริยาการยับยั้ง) ในกรณีที่เกิด clear zone น้อยให้ตัดวงบริเวณรอบๆ clear zone แล้วมาวางให้ได้ปริมาตร $1 \times 4 \times 0.2$ เซนติเมตรตรงจุดที่กำหนดไว้ ปมเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน จึงทำการบันทึกความกว้างของ clear zone

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์กลายในระดับดีเอ็นเอโดยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) เป็น electrophoresis process ที่ใช้ electric field มากกว่าหนึ่ง field และ electric field ที่ใช้จะต้องสลับกันไปมาตามระยะเวลา switch time หรือ pulse time และตาม reorientation angle (มุมปลายแหลมระหว่าง electric field สลับของ electric field) เพื่อที่จะแยกดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดต่างๆ ออกจากกัน โดยมีเจลทำหน้าที่เป็นเหมือนตระแกรง (sieve) แยกดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดต่างๆ ออกจากกัน ดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดเล็ก จะสามารถเคลื่อนผ่านเจลได้ง่ายและเร็วกว่า จึงเคลื่อนผ่านออกมาก่อน ส่วนดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดใหญ่ จะเคลื่อนผ่านเจลได้ยาก และเคลื่อนด้วยความเร็วใกล้เคียงกัน (ทำให้เจลไม่สามารถแยกดีเอ็นเอโมเลกุล

ขนาดใหญ่ออกจากกันได้โดยวิธี electrophoresis ธรรมดา) ดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดใหญ่ต้องปรับรูปร่าง และขนาด (reorientation) ไปตามกระแสไฟฟ้าที่ผ่านมาในแต่ละ electric field จึงจะสามารถเคลื่อนผ่านช่อง (pore) ในเจลลงมาได้ ด้วยวิธีการนี้จึงสามารถแยกดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดใหญ่ออกจากกัน เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆกันบนเจล PFGE สามารถแยกดีเอ็นเอโมเลกุลได้ตั้งแต่ 100 – 10,000 กิโลเบส(Suwanto, 1994) ดังนั้นจึงนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ (strain) ของเชื้อจุลินทรีย์ ใช้ศึกษา genome rearrangement, plasmid finger printing, mutant analysis, cloning และสร้าง physical map เป็นต้น

วิธีการ

ดำเนินการตามวิธีการของ Suwanto (1994) มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม intact genomic DNA มีวิธีการดังนี้

1.1 เลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์กลาย และ *B. subtilis* wild type ในอาหาร NB ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 – 7 ชั่วโมง จนเชื้อมีค่า O.D₆₀₀ 0.7 – 0.9

1.2 ใช้ไปเปิดขวดเชื้อในอาหาร NB ปริมาตร 1 มิลลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ของเชื้อแล้วเทส่วนใสทิ้งไป

1.3 ละลายเซลล์ในสารละลาย PIV ปริมาตร 1 มิลลิตร โดยใช้นิ้วสะกิดเบาๆให้เซลล์ละลายทั่วสารละลาย PIV

1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วเทส่วนใสทิ้งไป

1.5 ละลายเซลล์ในสารละลาย PIV ปริมาตร 0.75 มิลลิตร โดยใช้นิ้วสะกิดเบาๆ ให้เซลล์ละลายทั่วสารละลาย PIV เสร็จแล้วเติม 2 เปอร์เซ็นต์ LMPA ปริมาตร 0.75 มิลลิตร อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียสลงไป ผสมให้เข้ากันดีโดยใช้นิ้วสะกิดเบาๆ

1.6 รินนำไปเทลงใน agarose plug mold ในขณะที่ LMPA ยังคงเหลวอยู่ เสร็จแล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ LMPA แข็งตัว

1.7 นำ plug ที่ได้ใส่ลงในสารละลาย ECL ปริมาตร 5 มิลลิตรใน 25 มิลลิตร Erlenmeyer flask นำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 – 12 ชั่วโมง

1.8 เทสารละลาย ECL ทิ้งไป แล้วเติมสารละลาย ESP ปริมาตร 5 มิลลิตร ลงไป นำไปปั่นที่ 55 องศาเซลเซียส 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.9 เทศสารละลาย ESP ทิ้งไป แล้วล้าง (rinse) plug ทุกๆ 2 ชั่วโมง ด้วย 1X TE buffer (เติม 10 เท่าของปริมาตร plug) ล้าง 3 ครั้ง

1.10 เท 1X TE buffer ทิ้งไป แล้วเติม ES buffer ลงไป เก็บ plug ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. restriction endonuclease digestion ตัดดีเอ็นเอที่อยู่ใน agarose plug ด้วย restriction enzyme ตามวิธีการของ Suwanto (1994) ดังนี้

2.1 ตัด agarose plug ให้เป็นชิ้นเล็กๆขนาด 2.5 x 10 x 1 มม. โดยใช้ cover glass ที่ฉีกเอาขอบแล้ว เสริมแล้วตัด gel insert 5-6 ชิ้น ใส่ลงในหลอดปั่นแยกปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 equilibrate gel insert ใน 1X restriction buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.3 เทบัฟเฟอร์ทิ้งไป แล้วเติม restriction buffer ที่เตรียมใหม่ๆปริมาตร 150 ไมโครลิตร และเติม restriction enzyme ลงไป ใส่ *NotI* 20 ยูนิต(ใส่ 2 ครั้งๆ ละ 10 ยูนิต)/ gel insert (ขนาด 2.5 x 10 x 1 มม.) 5 - 6 plug ส่วน *SmaI* ใช้อัตรา 1000 ยูนิต/ gel insert (ขนาด 2.5 x 10 x 1 มม.) 5 - 6 plug ใช้ *SmaI* อัตรา 1000 ยูนิต เนื่องจากเกรงว่าเอนไซม์อาจจะเสื่อม นำไป บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของแต่ละเอนไซม์ (บ่ม *NotI* ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วน *SmaI* บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง)

2.4 เทบัฟเฟอร์ทิ้งไป เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม

2.5 เติมสารละลาย ES ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ และเพื่อล้าง DNA-binding protein ออกจากดีเอ็นเอ บ่มไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.6 เทศสารละลาย ES ทิ้งไป แล้ว dialyze ด้วย 1x TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที

2.7 เท 1X TE buffer ทิ้งไป แล้วเติม ES buffer ลงไป นำ gel insert ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. running PFGE มีขั้นตอนดังนี้

3.1 ชั่ง 0.9 กรัม HMA ใส่ลงใน 0.5 X TBE buffer นำไปทำให้ร้อนจน HMA ละลาย เสริมแล้วปรับปริมาตร HMA ให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.5 X TBE buffer ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ให้คลายร้อน

3.2 เทศสารละลาย HMA ลงใน gel cast ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจน HMA แข็งตัว จึงดึงหัวออก

3.3 เติม 1 X TE buffer ลงไปให้เต็ม well ในแผ่น HMA gel แล้วใส่ gel insert ลงไปใน well

3.4 นำ HMA gel ที่มี gel insert ใน well ไปวางลงใน PFGE chamber

3.5 ตั้ง running buffer temperature, ramping pulse time (initial time and final time), voltage และ running time ของแต่ละการ running PFGE ให้อยู่ในช่วงต่างๆตามวิธีการของ Suwanto (1994), Itaya and Tanaka (1991), McClelland *et al.* (1987), Amjad *et al.* (1990), และ Smith and Condemine (1990) โดยจะปรับ parameter เหล่านี้หลายครั้ง เพื่อให้ได้ resolution ที่เห็นความแตกต่างดีที่สุดดังนี้

running buffer temperature 14 องศาเซลเซียส

ramping pulse time อยู่ระหว่าง 12 – 48 วินาที และ 180 วินาที, linear โดยเวลา 18 วินาที เหมาะสำหรับแยกดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดต่ำกว่า 200 กิโลเบส ขณะที่ 48 วินาที เหมาะสำหรับแยกดีเอ็นเอโมเลกุลขนาด 200 – 450 กิโลเบส ส่วนที่ 180 วินาที สำหรับแยกดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดมากกว่า 500 กิโลเบส

voltage 3 โวลต์/เซ็นติเมตร($V\ cm^{-1}$) - 6 โวลต์/เซ็นติเมตร และ 150 โวลต์/เซ็นติเมตร

running time 40 – 72 ชั่วโมง

angle 120 องศา

4. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

4.1 นำเจลไปย้อมสารละลาย EtBr เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกรอง (deionized water) เป็นเวลา 15 นาที

4.2 นำเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอใต้แสงยูวี 280 นาโนเมตร พร้อมบันทึกภาพเก็บไว้

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2545 - กันยายน 2547

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์ *B. subtilis* โดยการทำให้กลายพันธุ์โดยใช้แสงยูวี

การรอดตายของเชื้อลดลงมาก เหลือเพียง 181 โคโลนี/0.1 มิลลิลิตร จากจำนวนมากกว่า 21,511 โคโลนี /0.1 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อได้รับแสงยูวีนาน 10 วินาที และลดลงไปตามลำดับเมื่อได้รับแสงยูวีนานขึ้น เชื้อถูกฆ่าตายหมด เมื่อได้รับแสงยูวีนาน 170 วินาที (2.5 นาที) แต่อัตราการกลายพันธุ์ของเชื้อที่รอดตายกลับเป็นไปในทางตรงกันข้าม คือ มีร้อยละของการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น เมื่อเชื้อได้รับแสงยูวีนานขึ้น (ตารางที่ 1) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า แสงยูวีทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *B. subtilis* ในขณะเดียวกันก็เป็นอุปสรรคสำคัญในการนำ *B. subtilis* ไปใช้ในสภาพธรรมชาติ เพราะแสงยูวีที่มีอย่างเหลือเฟือและเข้มข้น อาจจะทำให้เชื้อตายหมดในเวลารวดเร็ว ซึ่งนักวิชาการควรนำมาพิจารณา เพื่อหาแนวทางป้องกันตัวเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้ในสภาพธรรมชาติ หรือควรพิจารณาใช้สารพิษที่เชื้อนี้ผลิตออกมา แทนการใช้ตัวเชื้อซึ่งอ่อนแอต่อแสงยูวีมากกว่า

ผลการทดสอบฤทธิ์ของ *B. subtilis* ที่รอดตายในการยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* บนอาหาร NA โดยวิธี Dual Culture Plate Technique พบว่า *B. subtilis* ที่รอดตาย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ดีกว่าตัวเปรียบเทียบ (*B. subtilis* ที่ไม่ได้ผ่านการฉายแสงยูวี) 117 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) ในจำนวนนี้มีทั้งที่สร้างสารพิษรุนแรงทำให้ปลายเส้นใยของ *M. phaseolina* ตรงบริเวณ clear zone ตายเป็นสีเหลือง และชะงักการเจริญ เชื้อสร้างเม็ด sclerotia จำนวนมาก ตรงบริเวณเส้นใยถัดเข้ามาข้างในโคโลนี เห็นเป็นแนวดำ และที่ไม่สร้างสารพิษรุนแรง จึงไม่ทำให้ปลายเส้นใยของ *M. phaseolina* เป็นสีเหลือง และไม่สร้าง sclerotia ซึ่งคาดว่าสารพิษของ *B. subtilis* กลุ่มนี้อาจจะไม่รุนแรงเท่ากลุ่มแรก แต่อาจจะมีปริมาณมาก จึงยังคงยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ได้ดี ข้อสรุปนี้ยืนยันได้จากผลของการตัดวุ้นตรงบริเวณ clear zone ของแต่ละไอโซเลท ไปทดสอบพิษ พบว่า มีสารพิษของ 3 ไอโซเลทเท่านั้น คือ B7T1010⁻² MS11R3, B7T1010⁻³ MS3R3 และ B7T6010⁻³ R1 ที่มีพิษยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ได้นานถึง 10 วัน ได้ clear zone ในวันที่ 10 หลังการบ่มเชื้อ กว้าง 0.1, 0.1 และ 0.2 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งทั้งสามไอโซเลทเป็นเชื้อในกลุ่มที่สร้างสารพิษรุนแรง ที่ทำให้เส้นใยของ *M. phaseolina* เป็นสีเหลือง จึงได้คัดเลือกเชื้อทั้งสามไอโซเลทนี้ไว้ เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่นๆ และการทดลองขั้นต่อไป

จากการตรวจเอกสาร พบว่า *B. subtilis* สร้างสารชีวภัณฑ์หลายชนิด และที่มีคุณสมบัติเป็น antifungal ใช้ในทางการเกษตร ได้แก่ Alboleutin, Bacillomycin, Bacilysin, Botrycidin,

Chlorotetain, Fengycin, Iturin, Mycosubtilin, Rhizocticins และ Subtilin เป็นต้น (Zuber *et al.*, 1993) แต่ไม่พบว่า มีสารชีวภัณฑ์ชนิดใดที่มีคุณสมบัติเป็น antifungal ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ดังนั้นการค้นพบ *B. subtilis* ที่สร้างสารพิษมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ตลอดจนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จนได้สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษรุนแรงยิ่งขึ้นในการทดลองนี้ จึงเป็นประโยชน์ต่องานป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจาก *M. phaseolina* อย่างยิ่ง และน่าจะได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารพิษตัวนี้ต่อไป

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ผลการทดลองบนอาหาร PDA พบว่า ไม่มีปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง *B. subtilis* สายพันธุ์กลาย และเชื้อราสาเหตุของโรค ที่มีต่อปฏิกริยาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ($F = <1$ ns) และไม่มี ความแตกต่างกันในฤทธิ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ($F = <1$ ns) แต่มีความแตกต่างกันของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (121.56 **, ตารางที่ 4) โดยพบว่า *P. oryzae* และ *C. canescens* ถูก *B. subtilis* สายพันธุ์กลายยับยั้งการเจริญอย่างเด่นชัด ($P < 0.01$) *S. rolfsii* ถูกยับยั้งน้อย และ *B. theobromae* และ *R. oryzae* ไม่ถูกยับยั้ง มีค่า clear zone เป็นศูนย์เป็นส่วนใหญ่ ส่วน B7 wild type ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 5 เชื้อได้น้อยจนถึงไม่ยับยั้ง (มีค่า clear zone เป็นศูนย์) จึงไม่สามารถนำค่า clear zone ของ *B. theobromae*, *R. oryzae* และ B7 wild type มาเข้าวิเคราะห์ทางสถิติ เนื่องจากเป็นข้อกำหนดของโปรแกรม IRRISTAT

ส่วนบนอาหาร NA พบว่า ไม่มีปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง *B. subtilis* สายพันธุ์กลายและเชื้อราสาเหตุโรคพืช ที่มีต่อปฏิกริยาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ($F = 2.21$ ns) แต่มีความแตกต่างกันของปัจจัยหลัก (main effect) (ตารางที่ 5) คือแตกต่างกันระหว่างฤทธิ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ($F = 7.02$ **) และระหว่างเชื้อราสาเหตุโรคพืช ($F = 114.02$ **) โดยพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์กลาย B7T1010⁻³MS3R3 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีที่สุด แต่ไม่แตกต่างจาก B7T1010⁻²MS11R3 ส่วน B7T1010⁻²MS11R3 และ B7T6010⁻³R1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้พอๆกัน ($P < 0.01$) เชื้อราสาเหตุของโรคที่ถูกยับยั้งการเจริญมากที่สุด คือ *P. oryzae* รองลงมาคือ *B. theobromae*, *S. rolfsii* และ *R. oryzae* ($P < 0.01$) ตามลำดับ เนื่องจาก *C. canescens* เจริญไม่ติดบนอาหาร NA เก็บผลการทดลองไม่ได้ จึงตัดเชื้อนี้ออกไป ไม่นำผลมาวิเคราะห์สถิติ ส่วน B7 wild type ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 5 เชื้อได้น้อย

จนถึงไม่ยับยั้ง จึงไม่สามารถนำค่า clear zone ของ *C. canescens* และ B7 wild type มาเข้าวิเคราะห์ทางสถิติ เนื่องจากเป็นข้อกำหนดของโปรแกรม IRRISTAT

จากผลการทดลองกล่าวได้ว่า ตัว *B. subtilis* สายพันธุ์กลายทั้งสามสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า เช่น *P. oryzae* (ยับยั้งได้ดีมากทั้งบนอาหาร PDA และ NA) และ *C. canescens* (บนอาหาร PDA) ส่วนเชื้อที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว เช่น *R. oryzae* และ *S. rolfisii* จะยับยั้งได้น้อย ถึงไม่ยับยั้ง ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจาก *B. subtilis* สายพันธุ์กลายไม่สามารถสร้างสารพิษได้มากพอ ได้ทันต่อการรุกเข้ามาอย่างรวดเร็วของ *R. oryzae* และ *S. rolfisii* เป็นผลให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชเจริญเข้ามาประชิดโคโลนีของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลาย และยับยั้งอยู่เช่นนั้นเป็นเวลานาน

สารพิษที่เชื้อผลิตออกมาในวุ้นบริเวณ clear zone ขนาดปริมาตร 1 x 4 x 0.2 เซนติเมตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* (ทั้งบนอาหาร PDA และ NA), *C. canescens* (บนอาหาร PDA) และ *B. theobromae* (บนอาหาร NA) ได้นาน 15 วัน (ตารางที่ 6, 7) ซึ่งน่าจะนำไปเปรียบเทียบฤทธิ์กับฤทธิ์ของสารเคมีกำจัดโรคพืชต่อไป ส่วนกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่นๆจะแสดงปฏิกิริยายับยั้งในช่วง 7 วันแรกเท่านั้น มี clear zone กว้างมาก (อยู่ระหว่าง 1.0 – 2.0 เซนติเมตร) ในช่วงนี้ ต่อมาเชื้อมีการเจริญอีกครั้งเข้าไปใน clear zone และเจริญต่อไปบนวุ้น

ปฏิกิริยาของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่มีต่อ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายทั้งสามสายพันธุ์บนอาหาร PDA มีดังนี้

ในปฏิกิริยาระหว่าง B7T1010⁻² MS11R3 และ B7T1010⁻³ MS3R3 กับ *P. oryzae* พบว่า *P. oryzae* สร้างสารพิษ pyriculol (Turner, 1971) สีเหลืองออกมามากผิดปกติ ทำให้อาหารบริเวณรอบๆโคโลนีเป็นสีเหลืองเข้ม เพื่อต่อต้านพิษของ B7T1010⁻² MS11R3 และ B7T1010⁻³ MS3R3 ส่วนปฏิกิริยาระหว่าง B7T6010⁻³ R1 กับ *P. oryzae* และระหว่าง *B. subtilis* wild type กับ *P. oryzae* พบว่าสร้าง pyriculol น้อย ในขณะที่ *P. oryzae* ที่เป็นตัวเปรียบเทียบ ก็พบว่าสร้าง pyriculol น้อย

C. canescens มีขอบโคโลนีสีเขียว - สีดำ แบบราบ มองดูเปียก และไม่สร้างสารพิษ cercosporin สีแดงรอบๆ โคโลนี ส่วน *C. canescens* ที่เป็นตัวเปรียบเทียบ สร้างสารพิษ cercosporin มาก (เกษม, 2532)

S. rolfisii มีเส้นใยตรงบริเวณ clear zone เปลี่ยนเป็นสีเหลือง หยดการเจริญ เชื้อจะสร้างเม็ด sclerotia มากตรงบริเวณนี้

ส่วนปฏิกิริยาของ *B. theobromae* และ *R. oryzae* ที่มีต่อ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายทั้งสามสายพันธุ์ ไม่แตกต่างจากตัวเปรียบเทียบ

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์กลายในระดับดีเอ็นเอโดยวิธี pulsed - field gel electrophoresis

แถบดีเอ็นเอของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายมีความแตกต่างกัน และแตกต่างจาก *B. subtilis* wild type (ภาพที่ 1 a, b, c และ d) บ่งชี้ว่า *B. subtilis* สายพันธุ์กลายเหล่านี้ มีความแตกต่างกันในระดับดีเอ็นเอ มีกระบวนการกลายพันธุ์ โดยแสงยูวีไปทำลายเบสบางเบสให้เสียไปแบบสุ่ม (Cutting and Vander Horn, 1990) ทำให้บริเวณการตัดของเอนไซม์เปลี่ยนไปจากเดิม ดังนั้นเมื่อใช้ endonuclease restriction enzyme ตัด intact DNA จึงได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกไป เป็นผลให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างกันบนเจล หมายเหตุ tri-nucleotide frequencies ใน genome ของ *B. subtilis* มีดังนี้ TAG/CTA1.81, CCC/GGG1.88, CGT/ACG2.10, TAC/GTA2.13, GTC/GAC2.19, CAC/GTG2.20, ACT/AGT2.26, CGC/GCG2.31, ACC/GGT2.36, GCC/GGC2.49 (McClelland *et al.*, 1987) จากภาพที่ 1 จะเห็นว่าแถบดีเอ็นเอไม่แยกเป็นแถบเล็กๆชัดเจน เนื่องจากขาดแคลนเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราที่ Itaya and Tanaka (1991) ใช้ คือ ดีเอ็นเอ 4 - 10 ไมโครกรัม/*NotI* 10 ยูนิต และ McClelland *et al.* (1987) ใช้ คือ ดีเอ็นเอ 1 - 10 ไมโครกรัม/*NotI* 20 - 200 ยูนิต นอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจาก *NotI* ซึ่งสามารถตัดดีเอ็นเอของ *B. subtilis* ได้ 50 fragment ได้ดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 50 - 150 กิโลเบส แต่ไม่แยกออกจากกันชัดเจนเมื่อนำมาตรวจสอบโดยวิธี pulsed - field gel electrophoresis (Amjad *et al.*, 1990) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้จากการทดลองนี้ จะเห็นความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอได้

NotI ตัดดีเอ็นเอได้ดีกว่า *SmaI* (ภาพที่ 1) แต่จากรายงานทางวิชาการ พบว่าเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับ *B. subtilis* คือ *SfiI* (GGCCN₄NGGCC) (Itaya and Tanaka, 1991 ; Amjad *et al.*, 1990) ซึ่งมีราคาแพง งบประมาณไม่พอ จึงไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองนี้

เนื่องจาก *B. subtilis* มีแต่โครโมโซมดีเอ็นเอ ขนาด 4.2 kb เท่านั้น และไม่มี plasmid (Suwanto, 1990) ดังนั้นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอบนเจลในการทดลองนี้ จึงเป็นความแตกต่าง ของโครโมโซมดีเอ็นเอเท่านั้น

การที่สารพิษของ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายไอโซเลท B7T1010⁻² MS11R3, B7T1010⁻³ MS3R3 และ B7T6010⁻³R1 มีพิษยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ได้นานถึง 10 วัน ในขณะที่สารพิษ จากสายพันธุ์กลายสายพันธุ์อื่นๆไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง น่าจะมีสาเหตุมาจาก แสงยูวีได้ไปทำลายเบสบางเบสตรงตำแหน่งที่เป็นบริเวณ conserve ที่ผลิตสารพิษ หรือ สารปฏิชีวนะให้เสียไป มีผลให้สารพิษ หรือ สารปฏิชีวนะที่ถูกสร้างขึ้นมามีโครงสร้างเปลี่ยนไป ซึ่งจะไม่มีผลต่อชนิดและปริมาณของสารพิษที่ถูกสร้างออกมาได้ แต่การกลายพันธุ์โดยใช้แสงยูวีไม่คงทนถาวร เนื่องจาก *B. subtilis* สามารถรักษาเบสที่เสียหายได้ (Yasbin *et al.*, 1990) แม้จะเก็บเชื้อไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ดังเช่นที่พบในการทดลองนี้ ดังนั้นควรเก็บสายพันธุ์กลายที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

สรุปผลการทดลอง

สามารถเหนี่ยวนำให้ *B. subtilis* เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงยูวี ได้สายพันธุ์กลายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. phaseolina* ดีกว่า *B. subtilis* ที่ไม่ได้ผ่านการฉายแสงยูวี 117 สายพันธุ์ แต่เมื่อตัดวุ้นตรงบริเวณ clear zone ของแต่ละสายพันธุ์ ไปทดสอบพิษ พบว่า มีเพียง 3 สายพันธุ์ เท่านั้น คือ B7T1010⁻² MS11R3, B7T1010⁻³ MS3R3 และ B7T6010⁻³ R1 ที่มีพิษยับยั้งการเจริญของเชื้อได้นานถึง 10 วัน ได้ clear zone กว้าง 0.1, 0.1 และ 0.2 เซนติเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้งสามสายพันธุ์ และสารพิษที่สายพันธุ์กลายผลิตออกมาในวุ้น ไปทดสอบฤทธิ์กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช *P. oryzae*, *R. oryzae*, *C. canescens*, *S. rolfsii* และ *B. theobromae* ปรากฏว่า ทั้งตัวเชื้อและสารพิษที่เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตออกมา สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* และ *C. canescens* ได้ยาวนาน 15 วัน พบความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายต่างๆ บ่งชี้ว่าได้เกิดการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์ต่างๆจริง เป็นผลให้อิโซเลทสายพันธุ์กลายแต่ละไอโซเลท มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบต่างกัน เนื่องจากแสงยูวีเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และการตายของ *B. subtilis* ดังนั้นก่อนนำเชื้อไปใช้ในสภาพธรรมชาติ ควรหาแนวทางป้องกันตัวเชื้อจากแสงยูวี หรือควรพิจารณาใช้สารพิษที่เชื้อผลิตออกมาแทนการใช้ตัวเชื้อ ซึ่งอ่อนแอต่อแสงยูวีมากกว่า การทดลองนี้ได้ตัว *B. subtilis* สายพันธุ์กลายที่ผลิตสารพิษที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ที่สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยให้เกิดประโยชน์ต่อเกษตรกรได้

เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. 2532. ผลของสารพิษที่ผลิตโดยเชื้อรา *Cercospora canescens* จากถั่วเขียว.
ว. วิชาการ กษ. 7 : 44-47.
- มัทนา ศรีหัตถกรรม จรัสพร ถาวรสุข เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง และไพฑูรย์ พูลสวัสดิ์. 2534. ความสัมพันธ์ระหว่าง saprophytic microorganisms และเชื้อสาเหตุของโรครากและโคนเน่าของถั่วเขียวฝักดำ. หน้า 97 – 117. ใน : รายงานผลงานวิจัยถั่วเขียว และพืชไร่ในเขตชลประทาน 2534. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.
- มัทนา ศรีหัตถกรรม. 2542. การศึกษาชนิดของจุลินทรีย์สาเหตุของโรคเมล็ดเน่าในถั่วเขียว ถั่วเขียวฝักดำ และถั่วเหลือง. หน้า 170-189. ใน : รายงานผลการวิจัยประจำปี 2542 ถั่วเขียวข้าวโพดฝักสด และพืชไร่ในเขตชลประทาน. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

- มัทนา ศรีหัตถกรรม 2541. การจำแนกและการตรวจนับชนิดและปริมาณของเชื้อรา และแบคทีเรีย
ในดินปลูกถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ และถั่วเหลือง. หน้า 222-223. ใน : รายงานผลการวิจัย
ประจำปี 2541. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท และสถานีทดลองพืชไร่พิษณุโลก สถาบันวิจัยพืชไร่
กรมวิชาการเกษตร.
- มัทนา ศรีหัตถกรรม สมยศ พิธิตพร และ จรัส กิจบำรุง. 2543. ปฏิกริยาของถั่วเขียวสายพันธุ์ต่างๆ
ต่อไอโซเลท (isolate) ของเชื้อ *Cercospora canescens*. ว. *วิชาการเกษตร*. 18 (1) : 79-90.
- Amjad, M., J. M. Castro, H. Sandoval, J-J Wu, M. Yang, D. J. Henner and P. J. Piggot.
1990. An *Sfi*I restriction map of the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Gene* : 101 :
15-21.
- Cutting, S. M. and P. B. Vander Horn. 1990. Genetic analysis, p. 27-74. In : Harwood, C.
R. and S. M. Cutting (eds.). *Molecular biological methods for Bacillus*. John
Wiley & Son. New York.
- Itaya, M. and T. Tanaka. 1991. Complete physical map of the *Bacillus subtilis* 168
chromosome constructed by a gene-directed mutagenesis method. *J. Mol. Biol.*
220 : 631-648.
- McClelland, M., R. Jones, Y. Patel and M. Nelson. 1987. Restriction endonucleases for
pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 15 (15) : 5985-
6005.
- Smith, C. L. and G. Condemine. 1990. New approaches for physical mapping of small
genomes. *J. Bacteriol.* 172 (3) : 1167-1172.
- Suwanto, A. 1994. Pulse-field gel electrophoresis : a revolution in microbial genetics in
Asia Pacific. *J. Mol. Biol. Biotech.* 2 (2) : 78-85.
- Turner, W.B. 1971. *Fungal metabolites*. Academic Press. New York.
- Yasbin, R. E., W. Firshein, J. Laffan and R. G. Wake. 1990. DNA repair and DNA
replication in *Bacillus subtilis*, p. 295-326. In : Harwood, C. R. and S. M. Cutting
(eds.). *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Son. New York.
- Zuber, P., M. M. Nakano and M. A. Marahiel. 1993. Peptide antibiotics, p. 897-917. In :
Sonenshein, A. C., J. A. Hooh and R. Losick(eds.) *Bacillus subtilis* and other
gram-positive bacteria : biochemistry, physiology, and molecular genetics.
American Society for Microbiology. Washington, D.C.

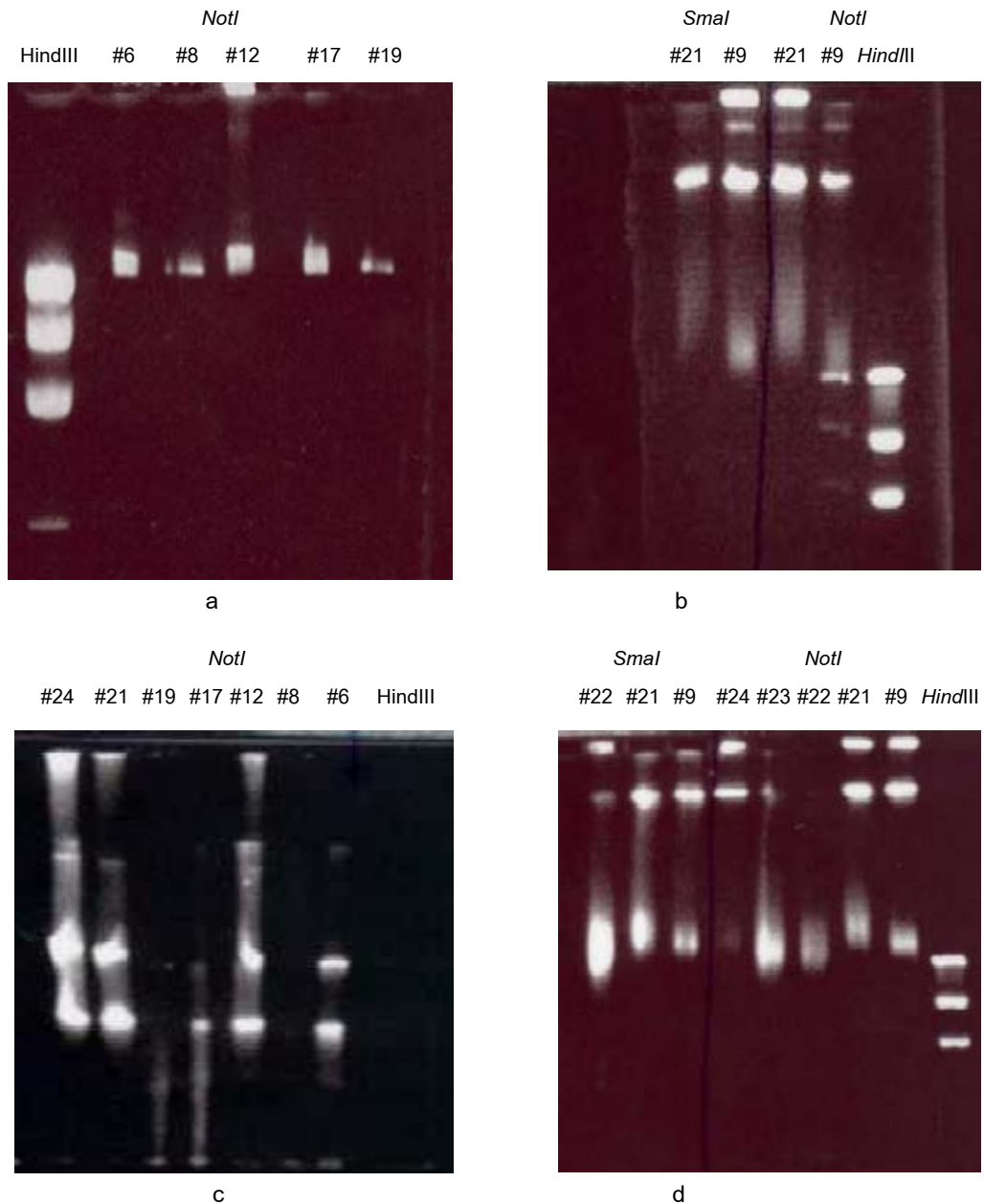


Fig.1 Pulsed-field gel electrophoresis to discriminate intact DNAs of the *Bacillus subtilis* mutant isolates among them and from the wild type. Running conditions : a : running electrophoresis in 1% agarose, 0.5xTBE, 40 V cm⁻¹, 8 Amp and 18 h running time. b : 1 % agarose, 0.5xTBE (14⁰ C), 18 s pulse time, 3 V cm⁻¹ and 40 h running time. c : 1 % agarose, 0.5xTBE (14⁰ C), 18 s pulse time, 3 V cm⁻¹, and 72 h running time followed by running electrophoresis in 1 % agarose, 0.5xTBE, 160 V cm⁻¹, 29 Amp and 4 h running time . d : 1 % agarose, 0.5xTBE (14⁰ C), 18-48 s pulse time, 3 V cm⁻¹ and 40 h running time.

- เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์กลาย คือ #6 = B7T1010⁻² MS11R3, #8 = B7T1010⁻³ MS3R3, #12 = B7T2010⁻⁴ MS1R1, #17 = B7T5010⁻³ R1, #19 = B7T6010⁻³ R1 และ #21 = B7T10010⁻² R2

- เชื้อ *B. subtilis* wild type คือ #22 = (B1), #23 = (B5) และ #24 = (B7)

Table 1 Mutant percentages of *B. subtilis*(B7) after radiating with ultraviolet light at varying times and testing against *M. phaseolina*.

UV radiation time (second)	No. survival isolate found (isolate)	No. mutant derived (isolate)	Mutant percentage (%)
0	>21,511	0	0
10	181	61	33.7
20	56	23	41.1
30	34	14	41.2
40	8	4	50.0
50	9	7	77.8
60	5	5	100
70	1	0	0
80	1	1	100
90	8	1	12.5
100	4	1	25.0
170	0	0	0

Table 2 The efficacy of *B. subtilis* (B7) mutant isolates in inhibiting growth of *M. phaseolina*

Treatment	Growth of <i>M. phaseolina</i> and B7 in dual culture plates		
	<i>M. phaseolina</i>	B7	Clear zone
B7 (wild type)	0	2.0	0
<i>M. phaseolina</i> (M)	6.3	0	0
M + B7 (wild type)	3.4	1.0	1.6
M + B7T1010 ⁻¹ (mutant isolates)			
MS1R2	2.7	1.5	1.8
MS2R1	3.0	0.9	2.1
MS2R2	2.9	1.3	1.8
MS4R1	3.1	0.7	2.2
MS4R3	3.1	1.2	1.7
MS5R1	3.3	0.7	2.0
MS7R1	3.0	1.3	1.7
MS9R1	3.0	1.2	1.8
MS10R1	2.9	1.1	2.0
MS11R1	2.9	1.2	1.9
MS12R1	3.4	0.8	1.8
MS14R1	3.5	0.7	1.8
MS15R1	3.2	0.9	1.9
MS16R1	3.4	0.8	1.8
MS17R1	3.1	1.0	1.9
MS17R2	3.2	0.8	2.0
MS19R1	3.3	0.8	1.9
MS20R1	3.4	0.9	1.7
MS20R3	3.2	1.1	1.7
MS21R1	3.3	0.8	1.9
MS22R2	3.3	1.0	1.7
MS22R3	3.7	0.6	1.7
MS23R2	3.3	1.0	1.7
MS24R2	3.1	1.0	1.9
MS25R2	2.7	1.6	1.7
MS27R2	3.3	1.0	1.7

Table 2 (cont.)

Growth of *M. phaseolina* and B7 in dual culture plates

Treatment	(cm.)		
	<i>M. phaseolina</i>	B7	Clear zone
MS30R2	3.1	0.9	2.0
MS33R2	3.2	0.9	1.9
MS34R2	3.2	0.9	1.9
MS36R2	2.8	1.2	2.0
MS39R2	3.5	0.7	1.8
MS40R2	2.9	1.2	1.9
MS44R3	3.3	1.0	1.7
MS46R2	2.0	2.3	1.7
MS48R2	3.1	1.3	1.6
MS54R2	2.6	1.5	1.9
M + B7T1010 ⁻² (mutant isolates)			
MS1R1	3.5	0.7	1.8
MS1R3	3.5	0.7	1.8
MS2R1	3.1	1.1	1.8
MS5R1	2.9	1.2	1.9
MS5R2	2.5	1.7	1.8
MS5R3	3.6	0.7	1.7
MS6R1	3.4	0.5	2.1
MS6R3	3.6	0.5	1.9
MS7R1	3.4	0.8	1.8
MS8R1	3.0	1.1	1.9
MS8R2	2.5	1.7	1.8
MS9R3	3.6	0.5	1.9
MS10R3	3.6	0.5	1.9
MS11R3	3.7	0.5	1.8
MS18R3	3.7	0.6	1.7
MS21R3	3.5	0.4	2.1
MS23R3	3.6	0.7	1.7
MS26R3	3.7	0.5	1.8
MS28R3	3.7	0.4	1.9

Table 2 (cont.)

Treatment	Growth of <i>M. phaseolina</i> and B7 in dual culture plates		
	<i>M. phaseolina</i>	(cm.) B7	Clear zone
M + B7T1010 ⁻³ (mutant isolates)			
MS1R3	3.8	0.4	1.8
MS2R3	3.7	0.5	1.8
MS3R3	3.7	0.5	1.8
M + B7T1010 ⁻⁴ (mutant isolates)			
MS1R2	3.4	0.6	2.0
MS2R1	3.1	0.8	2.1
MS3R1	3.5	0.5	2.0
M + B7T2010 ⁻¹ (mutant isolates)			
MS1R1	3.6	0.7	1.7
MS2R1	3.6	0.6	1.8
MS7R2	3.5	0.7	1.8
MS8R3	3.0	1.3	1.7
MS9R2	3.2	0.9	1.9
MS12R2	3.2	0.9	1.9
MS13R2	3.4	0.8	1.8
MS14R2	2.9	1.4	1.7
M + B7T2010 ⁻² (mutant isolates)			
MS1R1	3.4	0.8	1.8
MS1R2	3.1	1.2	1.7
MS3R2	2.9	1.1	2.0
MS4R1	2.9	1.0	2.1
MS5R1	2.5	1.6	1.9
MS6R1	3.0	1.1	1.9
MS7R1	3.2	1.0	1.8
MS8R1	3.4	0.7	1.9
MS9R1	3.1	1.0	1.9
MS10R1	3.2	1.0	1.8
M + B7T2010 ⁻³ (mutant isolates)			
MS1R1	3.0	1.1	1.9

Table 2 (cont.)

Treatment	Growth of <i>M. phaseolina</i> and B7 in dual culture plates		
	<i>M. phaseolina</i>	B7	Clear zone
M + B7T2010 ⁻⁴ (mutant isolates)			
MS1R1	3.2	0.8	2.0
MS1R2	3.0	1.2	1.8
MS2R2	3.3	0.8	1.9
MS3R2	3.2	1.0	1.8
M + B7T3010 ⁻¹ (mutant isolates)			
MS1R3	3.0	1.3	1.7
MS4R2	3.3	0.9	1.8
MS4R3	3.4	0.9	1.7
MS7R3	3.5	0.7	1.8
MS8R3	3.3	1.0	1.7
M + B7T3010 ⁻² (mutant isolates)			
MS3R3	3.9	0.3	1.8
MS4R3	3.7	0.4	1.9
MS9R3	3.4	0.9	1.7
MS10R3	3.7	0.6	1.7
MS13R3	3.5	0.8	1.7
MS14R3	3.3	1.0	1.7
M + B7T3010 ⁻⁴ (mutant isolates)			
MS1R2	3.2	0.9	1.9
MS3R2	3.0	1.0	2.0
MS5R2	3.2	0.9	1.9
M + B7T4010 ⁻¹ (mutant isolates)			
MS1R2	2.0	1.8	2.2
M + B7T4010 ⁻³ (mutant isolates)			
R1	3.1	0.9	2.0
M + B7T4010 ⁻⁴ (mutant isolates)			
MS1R1	3.0	0.8	2.2
MS2R1	3.4	0.8	1.8

Table 2 (cont.)

Treatment	Growth of <i>M. phaseolina</i> and B7 in dual culture plates		
	<i>M. phaseolina</i>	B7	Clear zone
M + B7T5010 ⁻¹ (mutant isolates)			
MS2R2	3.4	0.8	1.8
MS3R2	3.1	1.0	1.9
M + B7T5010 ⁻² (mutant isolates)			
R1	3.0	1.2	1.8
R2	3.5	0.7	1.8
M + B7T5010 ⁻³ (mutant isolates)			
R1	3.2	0.8	2.0
R2	2.7	1.1	2.2
M + B7T5010 ⁻⁴ (mutant isolates)			
MS2R2	3.4	0.7	1.9
M + B7T6010 ⁻³ (mutant isolates)			
R1	2.8	1.0	2.2
M + B7T6010 ⁻⁴ (mutant isolates)			
MS1R1	3.2	1.0	1.8
MS2R1	3.1	1.2	1.7
MS3R1	3.0	0.9	2.1
MS4R1	3.2	0.9	1.9
M + B7T8010 ⁻² (mutant isolates)			
MS1R2	3.4	0.8	1.8
M + B7T9010 ⁻³ (mutant isolates)			
MS4R3	3.8	0.4	1.8
M + B7T10010 ⁻² (mutant isolates)			
R2	3.1	0.8	2.1

Table 3 The toxicity test of an antifungal toxin in the clear zone

Treatment	<i>M. phaseolina</i> growth (cm.)	Clear zone (cm.)
<i>M. phaseolina</i> (<i>M</i>)	5.4	0
M + toxin B7 (wild type)	4.3	0
M + toxin B7T1010 ⁻² (mutant isolate)		
MS1R3	3.2	0
MS10R3	3.0	0
MS11R3	2.9	0.1
MS21R3	3.2	0
M + toxin B7T1010 ⁻³ (mutant isolate)		
MS1R3	3.2	0
MS3R3	2.9	0.1
M + toxin B7T2010 ⁻¹ (mutant isolate)		
MS10R3	3.4	0
M + toxin B7T3010 ⁻² (mutant isolate)		
R2	3.4	0
M + toxin B7T6010 ⁻³ (mutant isolate)		
R1	2.8	0.2
M + toxin B7T6010 ⁻⁴ (mutant isolate)		
MS1R1	3.5	0

Table 4 The efficacy of the three mutant isolates in inhibiting mycelial growth of the fungal plant pathogens on PDA.

Mutant isolate	Clear zone(cm.)			Mutant isolate mean
	<i>P. oryzae</i>	<i>C. canescens</i>	<i>S. rolfsii</i>	
#6	2.08	2.15	0.58	1.60
#8	2.53	2.23	0.45	1.73
#19	2.15	2.15	0.53	1.61
Pathogen mean	2.25 a	2.18 a	0.52 b	

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

C.V. = 18.7 %

L.S.D(P<0.01) for comparion among fungal pathogens = 0.35

Table 5 The efficacy of the three mutant isolates in inhibiting mycelial growth of the fungal plant pathogens on NA.

Mutant isolate	Clear zone(cm.)				Mutant isolate mean
	<i>P. oryzae</i>	<i>B. theobromae</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>S. rolfsii</i>	
#6	3.13	2.25	0.70	1.23	1.83 ab
#8	3.10	2.18	1.35	1.40	2.01 a
#19	2.60	1.78	0.98	1.18	1.63 b
Pathogen mean	2.94 a	2.07 b	1.01 d	1.27 c	

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

C.V. = 15.5 %.

L.S.D(P<0.01) for comparion among mutant isolates = 0.55.

L.S.D(P<0.01) for comparion among fungal pathogens = 0.32.

Table 6 The efficacy of toxin produced by the three mutant isolates in inhibiting mycelial growth of the fungal plant pathogens on PDA.

Mutant isolate toxin	Clear zone(cm.)		
	<i>P. oryzae</i>	<i>C. canescens</i>	<i>S. rolfsii</i>
#6	0.1	0.3	0
#8	0.03	0.2	0
#19	0.05	0.5	0

Table 7 The efficacy of toxin produced by the three mutant isolates in inhibiting mycelial growth of the fungal plant pathogens on NA.

Mutant isolate toxin	Clear zone (cm.)			
	<i>P. oryzae</i>	<i>B. theobromae</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>S. rolfsii</i>
#6	0.7	0.5	0	0
#8	0.5	1.4	0	0
#19	0.6	0	0	0