รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว

# Development of Antagonist *Bacillus subtilis* for Control of Rice Diseases


โดย

นางวิจิตรา ลีละศุภกุล[1] น.ส.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร[2] น.ส.ลัดดา นิลรัตน์[2] น.ส.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล[3] นางดวงพร คันธโชติ[2] นายอรัญ หันพงศ์กิตติกูล[4] นายมานะ กาญจนมณีเสถียร[5] น.ส.สุวิณา รัดนชัยวงศ์[6] นายดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง[7] น.ส.ขวัญจิต อึ้งโพธิ์[7] นางเพ็ญแข วันไชยธนวงศ์[8] นายสมคิด ดิสถาพร[9] นางนงรัตน์ นิลพานิชย์[9] นายพากเพียร อรัญนารถ[9] นายวิชิต ศิริสันธนะ[9] นางพาณี หนูนิ่ม[10] และนางนลินี จาริกภากร[11]

[1]ภาควิชาชีวเคมี [2]ภาควิชาจุลชีววิทยา [3]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ [4]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ อุตสาหกรรมเกษตร [5]ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ [6]ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ และ [7]ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ [8]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ [9]กลุ่มงานวิจัยโรคข้าว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา [10]ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง สถาบันวิจัยข้าว [11]สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 สงขลา กรมวิชาการเกษตร



เลขหมู่ 630.5 T14 ส322
Bib Key 207614



สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

รหัสโครงการ : PG2/014/2538 และ RDG2/022/2540

ระยะเวลาโครงการ : เมษายน 2538 - พฤศจิกายน 2542

# บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมวิชาการเกษตร ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ Antagonist *B. subtillis* ที่มีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อราโรคข้าว ศึกษากลไกต้านโรค พันธุกรรมของสายพันธุ์ สมบัติและธรรมชาติของสารที่ผลิต จุลินทรีย์จำพวก *bacilli* ถูกคัดเลือกจากเมล็ดข้าวและดิน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการผลิตสารออกฤทธิ์และ เอนไซม์ β 1-3-กลูคาเนส เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีพบว่า สารปฏิชีวนะจาก *bacilli* เหล่านี้เป็นสารจำพวก Iturin A และ Surfactin มีประสิทธิภาพทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราและสปอร์ราโดยผ่านกลไกการเกิดรูพรุนเมื่อศึกษาด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและจุลทรรศน์อิเลกตรอน สารสกัดหยาบที่สามารถแยกได้โดยวิธี Thin layer chromatography มีค่าการยับยั้ง (MIC) และ ($EC_{50}$) ต่อเชื้อราโรคไหม้และโรคกาบใบแห้ง เป็น ( 0.4 - 1.5 ) และ ( 1 - 16 ) µg/ml. ตามลำดับ การศึกษาพันธุกรรม *bacilli* โดยเทคนิค Repetitive PCR สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้จากแบบแผนเอกลักษณ์ของ DNA หรือศึกษาจากลำดับเบสของยีนไรโบโซมอลชนิด 16S ใช้ติดตามแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้จากต้นข้าวที่ฉีดพ่นเชื้อแล้ว ในแง่ของความปลอดภัยมีผลการทดลองที่ยืนยันว่าสารออกฤทธิ์ไม่มีผลต่อมนุษย์ในระดับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันรวมทั้งไม่มีผลกระทบต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจของร่างกายมนุษย์ มีการทดลองหาสภาวะการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *bacilli* ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ในระดับขวดเขย่าและถังหมักจนถึงระดับหนึ่งตัน มีการพัฒนาสูตรเชื้อ *bacilli*_สำหรับใช้ง่าย สะดวกและเก็บได้นานในรูปสูตรเหลวและสูตรผง การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเชื้อ *bacilli* เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยวิเคราะห์ค่าทางสถิติในเรื่องความสูงสัมพัทธ์ของแผลและผลผลิตที่ได้แสดงผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ในระดับเรือนทดลองและราโรคกาบใบแห้งในระดับเรือนทดลอง แปลงนาเล็กและ แปลงนาใหญ่ งานวิจัยได้มุ่งเน้นศึกษาเรื่องความคุ้มทุนทางเศรษฐกิจในการผลิตระดับกึ่งอุตสาหกรรมและการพัฒนาสูตรที่เหมาะสำหรับใช้กับการถวบคุมโรคในระดับแปลงนาใหญ่ อนึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเชื้อ *bacilli* ในการต้าน *R.solani* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์อื่นๆและยาวาลิดามัยซินเพื่อขึ้นทะเบียนตำรับสูตรผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ *bacilli*

## Abstract

A Biological control of fungal infections in rice.was conducted by the research teams from Prince of Songkla University (PSU), collaborating with various scientific researchers, from PSU, KSU and DOA of Thailand, has isolated and cultivated antagonistic strains of *Bacillus subtilis* from rice seeds and field. It was found that the bacteria produced anti-fungal substances identified as Iturin A, Surfactin and β 1-3 glucanase The disruption of the fungal spores and hyphae exposed to the active substances was clearly observed by scanning electron micrograph. The MIC and $EC_{50}$ on growths of *Pyricularia grisea* and *Rhizoctonia solani* were obtained. The molecular genetics of the strains were used as a marker to monitor bacteria in bioassays. Patterns of DNA fingerprints obtained from the repetitive PCR and the 16S ribosomal sequences confirmed the identity of the antagonists. The safety of bio-active products for human use from these antagonists is conclusively shown. The optimal growth conditions in various culture media were investigated. The *bacilli* were produced using fermentation technology. Two formulations of active bacteria, i.e., liquid and powder preparations were employed to control blast and sheath blight inoculated rice plants. The effectiveness of the antagonists were tested at greenhouse and small field levels. The significant differences of the finding in relative lesion heights, bio mass and yields between the *bacilli*-treated and disease-control plants were demonstrated. The successful development of a formulation, a large scale production of the *bacilli* and their efficacy test against *R.solani* were conducted. The results obtained from the large field trials confirmed the effectiveness of the BCA formulation. An attempt to register this antagonistic *bacilli* product has been done by testing the efficiency of these BCA formulations against *R. solani* compared with other BCA products and validamycin drug.


PSU = Prince of Songkla University, KSU = Kasetsart University, DOA = Department of Agriculture

Keywords : biological control, *Bacillus subtilis*, rice, *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, fermentation, repetitive PCR