

ประสิทธิภาพและคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* ไอโซเลต BB35
ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของ
ข้าวโพดหวาน

Efficiency and characteristic of *Bacillus velezensis* isolate BB35 in
controlling *Burkholderia gladioli* causing leaf stripe and stem rot of sweet
corn diseases

อรณภา เชียงแขก¹ และ อังสนา อัครพิศาล^{1*}

Onnapha Chiangkhak¹ and Angsana Akarapisan^{1*}

¹ สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹ Division of Plant Pathology, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพและตรวจสอบยีนที่กำหนดการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต BB35 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวาน จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. ด้วยวิธี dual culture พบว่า *Bacillus* sp. ไอโซเลต BB35 สามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* ได้ โดยมีรัศมีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 7.50 มิลลิเมตร เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับยีนของไอโซเลต BB35 จำนวน 3 ยีน ได้แก่ DNA gyrase subunit A (*gyrA*), DNA ribosomal RNA (16S *rRNA*), และ DNA-directed RNA polymerase subunit beta (*rpoB*) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต BB35 คือ *Bacillus velezensis* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น การสร้างสารละลายฟอสเฟต การละลายโพแทสเซียม และการสร้าง siderophore ได้ อีกทั้งเมื่อตรวจสอบหา ยีนที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะ พบว่า แบคทีเรีย *B. velezensis* ไอโซเลต BB35 สามารถตรวจพบยีนจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *sfAA*, *fenD*, *bamA* และ *ituA* ซึ่งกำหนดการสร้างสาร surfactin, fengycin D, bacillomycin A และ iturin A ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นศักยภาพที่สามารถนำแบคทีเรียไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวานในสภาพแปลงปลูกต่อไปได้

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี; 16S *rRNA*; *gyrA*; *rpoB*; ยีนปฏิชีวนะ

ABSTRACT: The objectives of this study were to determine the efficacy and check the gene of antibiotic synthesis-related genes from *Bacillus* sp. isolate BB35 concerning the inhibition of plant pathogen mechanisms of sweet corn. The results showed that *Bacillus* sp. isolate BB35 could inhibit *Burkholderia gladioli* and had an inhibition zone of a radial of 7.5 mm based on their efficacy with the dual culture method. The *Bacillus* sp. isolate BB35 was molecularly identified as *Bacillus velezensis* using the sequences of the DNA gyrase subunit A (*gyrA*), DNA ribosomal RNA (16S *rRNA*), and DNA-directed RNA polymerase subunit beta (*rpoB*) genes. Additionally, by producing siderophores and solubilizing inorganic phosphate, potassium, and phosphorus, the *B. velezensis* isolate BB35 functioned as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). The investigation of genes related to antibiotic

* Corresponding author: Angsana.aka@gmail.com

Received: date; June 27, 2023 Revised date; November 21, 2023

Accepted: date; November 27, 2023 Published: date; April 19, 2024

synthesis was conducted for the *B. velezensis* isolate BB35. The findings showed that the production of antibiotic substances, such as surfactin, fengycin, bacillomycin D, and itulin A, was regulated by the biosynthesis genes *urfAA*, *fenD*, *bamA*, and *ituA*, respectively. In accordance with this research, it could be possible to manage the causes of stem rot and leaf stripe in sweet corn by using antagonistic bacteria in both greenhouse and field conditions.

Keywords: biological control; *16S rRNA*; *gyrA*; *rpoB*; antibiotic gene

บทนำ

ข้าวโพดหวาน (*Zea mays* L.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ภาครัฐและภาคเอกชนให้ความสนใจ เนื่องจากมีการขยายตัวทางการตลาดสูงขึ้น และมีศักยภาพในการส่งออก อีกทั้งยังมีแนวโน้มในการขยายการเติบโตในด้านอุตสาหกรรมมากขึ้น (เบญจวรรณ และเทพศักดิ์, 2562) แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคต่อการผลิตข้าวโพดหวาน ได้แก่ การระบาดของโรคแมลง และวัชพืช โดยโรคที่เริ่มพบว่าเป็นปัญหาต่อการผลิตข้าวโพดหวานตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตที่สำคัญ ได้แก่ โรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวาน ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Burkholderia gladioli*

สำหรับโรคใบขีดและลำต้นเน่า (leaf strip and stem rot) ของข้าวโพดหวานมีเชื้อสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* ซึ่งจากลักษณะอาการที่พบเริ่มจากบริเวณโคนข้าวโพดมีจุดสีขาว-เหลืองขนาดเล็ก จากนั้นขยายใหญ่ขึ้นจนเป็นเส้นยาว ขนาดประมาณกว้าง 0.3 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และเมื่ออาการเริ่มรุนแรงจะทำให้ใบแห้งตาย ส่วนอาการบริเวณลำต้นจะมีจุดฉ่ำน้ำขนาดเล็ก และขยายขนาดใหญ่ขึ้น จากนั้นเชื้อเริ่มเข้าทำลายไปยังบริเวณท่อลำเลียงน้ำและท่ออาหารของพืช จนทำให้ลำต้นหักและตายในที่สุด (Gijon-Hernandez et al., 2011)

ส่วนการควบคุมโรคพืช โดยใช้สารเคมี ในปัจจุบันต้องตระหนักถึงความเป็นพิษและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงการพัฒนาการของเชื้อสาเหตุโรคที่สามารถต้านทานต่อสารเคมีกำจัดโรคพืช จึงมีการจัดการเกี่ยวกับการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชชนิดใหม่อย่างเข้มงวด และมีความคาดการณ์ว่าการขึ้นทะเบียนของสารเคมีชนิดใหม่มีแนวโน้มที่จะลดลง ดังนั้นการควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปและสามารถนำมาใช้ในการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานได้ (integrated pest management: IPM) (Raymaekers et al., 2020) เช่น การนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโดยชีววิธีมากที่สุด (Mijakovic et al., 2020) เนื่องจาก *Bacillus* sp. มีความสามารถในการส่งผลต่อกลไกต่าง ๆ ของเชื้อสาเหตุโรค ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ การสร้างเอนไซม์ hydrolytic การสร้าง siderophore และการชักนำให้เกิดความต้านทานของพืช (Beneduzi et al., 2012) มากไปกว่านั้น *Bacillus* sp. ยังทำหน้าที่สร้างสารกระตุ้นในการดูดซึมธาตุอาหารชนิดต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย เช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และสามารถช่วยในการส่งเสริมกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชได้ (Souza et al., 2015) เช่น งานวิจัยของทิพวรรณ และคณะ (2560) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้จากแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* พบว่า กรรมวิธีที่พ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการของโรค ทุก ๆ 7 วัน สามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* pv. *gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลได้ดี ตัวอย่างของ *Bacillus* spp. หลายชนิดที่สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ เช่น *B. subtilis*, *B. siamensis*, *B. velezensis* และ *B. amyloliquefaciens* เป็นต้น (Andric et al., 2020) ทั้งนี้ *Bacillus* มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลาย (Beric et al., 2012) โดย *Bacillus* สามารถผลิตสารทุติยภูมิในกลุ่มลิโปเปปไทด์เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ surfactin iturin และ fengycin (Lang, 2002) ซึ่งสารแต่ละชนิดมีหน้าที่ควบคุมการผลิตแตกต่างกัน เช่น ยีน *urfAA* กำหนดการสร้างสาร surfactin ยีน *fenD* กำหนดการสร้างสาร fengycin (Joshi and Gardener, 2008) ยีน *ituA* กำหนดการสร้างสาร itulin A (Rahman et al., 2012) ยีน *bamA* กำหนดการสร้างสาร bacillomycin A (Athukarala et al., 2009) เป็นต้น เช่น การรายงานของ Pajcin et al. (2020) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *B. velezensis* ไอโซเลต IP22 ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ ได้แก่ fengycin และ locillomycin ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas euvesicatoria* ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ และตรวจสอบยีนที่กำหนดการสร้าง

สารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวาน

วิธีการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

นำแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* ไอโซเลท MHSL06 (accession no: OQ025071) สาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวานที่ได้มาจากห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Burkholderia gladioli*

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 จากห้องปฏิบัติการแบคทีเรียสาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการยับยั้งเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวาน ด้วยวิธี 'dual culture' ดังนี้ เตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียสาเหตุโรคและ *Bacillus* sp. ที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับ 10^9 cfu/ml (ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 600 นาโนเมตร) จากนั้นเทอาหาร NA ปริมาตร 10 ml เพื่อใช้เป็นฐาน และนำอาหาร NA ปริมาตร 10 ml ผสมกับเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียสาเหตุโรคปริมาตร 0.1 ml เททับลงบนอาหารที่เตรียมไว้ ดัดแปลงมาจาก Pedraza-Herrera et al. (2021) ในส่วนของ *Bacillus* sp. นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปริมาตร 10 μ l หยดลงบนกระดาษกรอง (paper disc; Machery-Nagel, Germany) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 cm ที่ไว้สักครู่ แล้วจึงย้ายมาวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น และหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในปริมาตรที่เท่ากันบนกระดาษกรองเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเกิดวงใสรอบบริเวณที่แสดงการยับยั้งของแบคทีเรีย (inhibition zone) ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ จากนั้นนำมาคำนวณด้วยสมการ

$$(\text{Inhibition zone} = ((\text{เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรอง})/2)$$

การจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

จัดจำแนก *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 ด้วยยีน *16S rRNA*, *gyrA* และ *rpoB* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนทั้ง 3 ยีน ตามตารางที่ 1 จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยเตรียมไพรเมอร์ให้มีความเข้มข้น 100 μ M สำหรับใช้เป็น stock primers และใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 μ M เตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ใน microcentrifuge tube ขนาด 200 μ l ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 2 μ l forward primer ปริมาตร 2 μ l reverse primer ปริมาตร 2 μ l Quick tag (HS DyeMix 2x master mix PCR (TOYOBO, Japan)) ปริมาตร 12.5 μ l และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 15 โอห์ม ให้ได้ปริมาตร 50 μ l จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR รุ่น A200 Gradient Thermal cycler (LongGene, China) ในส่วนของยีน *16S rRNA* ทำตามขั้นตอน ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 64 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 2 นาที และปฏิกิริยา 1 รอบของ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 10 นาที และในส่วนของยีน *gyrA* และ *rpoB* ทำปฏิกิริยา PCR ตั้งค่าแบบ gradient ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที annealing ที่ช่วงอุณหภูมิ 53-62 °C เป็นเวลา 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 75 °C เวลา 50 วินาที และปฏิกิริยา 1 รอบของ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 5 นาที ตรวจผลผลิต PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิค Fluorescent dye-terminator sequencing โดยเครื่อง ABI Prism™ 3730xl DNA sequencers (Bio Basic Inc) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับยีนของแบคทีเรียในฐานข้อมูล Genbank (NCBI) ด้วยโปรแกรม Blastn จากนั้นนำลำดับเบสวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ phylogenetic tree แบบ maximum-likelihood ที่ค่า bootstrap ทั้งหมด 1,000 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar et al., 2018; Yurnaliza et al., 2020)

Table 1 List of primers used for identifying *Bacillus* sp. isolate BB35

Gene name	Primers	Sequence	size (bp)	Ta ^{1/} (°C)	reference
16s rRNA	16SF	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	1,500	64	Liu et al., 2009
	16SR	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'			
gyrA	p-gyrA-f	5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT3'	970	53	Cui et al., 2020
	p-gyrA-r	5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT -3'			
rpoB	rpoBF	5'-AGGTCAACTAGTTCAGTATGGACG-3'	831	57	Cui et al., 2020
	rpoBRO	5'-GTCCTACATTGGCAAGATCGTATC-3'			

Ta^{1/} = annealing temperature

การศึกษาคุณสมบัติในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

เลี้ยง *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 1×10^9 cfu/ml (ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 μ m) และนำมาหยดลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 cm ปริมาตร 10 μ l ผึ่งทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งหมด 3 คุณสมบัติ ดังนี้

ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pi culture medium (Jasim et al., 2013; Gorai et al., 2021) จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แล้วสังเกตการเกิดวงใสบริเวณผิวหน้าอาหารทดสอบ

ทดสอบความสามารถในการละลายโพแทสเซียมบนอาหาร Alexandrov culture medium (Yan et al., 2022) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วสังเกตการเกิดวงใสบริเวณรอบโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารทดสอบ

ทดสอบความสามารถในการสร้าง siderophore บนอาหาร Chrome Azurol S agar (CAS) (Yu et al., 2011) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารรอบ ๆ แบคทีเรียเจริญ

การศึกษายีนที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค

ตรวจสอบยีนที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *bamA* *fenD* *ituA* และ *sfAA* โดยเตรียมไพรเมอร์ (Table 2) ให้มีความเข้มข้น 100 μ M สำหรับใช้เป็น stock primers เตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ใน microcentrifuge tube ขนาด 200 μ l ประกอบด้วย DNA template ปริมาตร 1 μ l forward primer ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 1 μ l reverse primer ปริมาตร 1 μ l Quick tag (HS DyeMix 2x master mix PCR (TOYOBO, Japan)) ปริมาตร 6.25 μ l และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 15 โอมห์ ให้ได้ปริมาตร 25 μ l จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR รุ่น A200 Gradient Thermal cycler (LongGene, China) โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ที่เฉพาะต่อยีนแต่ละชนิด ดังนี้ ในขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เวลา 45 วินาที annealing ที่ช่วงอุณหภูมิ 50-60 °C เป็นเวลา 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 60 วินาที และปฏิกิริยา 1 รอบของ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 10 นาที หลังจากเพิ่มปริมาตรของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้ว นำผลผลิตของ PCR มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิค Fluorescent dye-terminator sequencing โดยเครื่อง ABI Prism™ 3730xl DNA sequencers (Bio Basic Inc) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย โดย Blast ลำดับเบสเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่อยู่ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) database

Table 2 List of primers used for detecting antibiotic synthesis-related gene from *Bacillus* spp. isolate BB35

Antibiotic	Gene	Primer	Sequence (5' – 3')	size (bp)	Ta ^{1/} (°C)	reference
Bacillomycin A	<i>bamA</i>	BACA-F	TGAAACAAAGGCATATGCTC	482	58	Athukorala et al. (2009)
		BACA-R	AAAAATGCATCTGCCGTTCC			
Fengycin D	<i>fenD</i>	FEND-F	CCTGCAGAAAGGAGGAGAAGTGAAG	293	58	Joshi and Gardener (2006)
		FEND-R	TGCTCATCGTCTTCCGTTTC			
Iturin A	<i>ituA</i>	ITUD1F	GATGCGATCTCCTTGATGT	647	58	Rahman et al. (2012)
		ITUD1R	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG			
surfactin	<i>srfAA</i>	SRF-F	ATGAAGATTTACGGAATTTA	201	52	Joshi and Gardener (2006)
		SRF-R	CCACTCAAACGGATAATCCTGA			

^{1/} Ta = annealing Temperature

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 ในการควบคุมเชื้อ *B. gladioli* ไอโซเลท MHSL06 สาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวาน ด้วยวิธี dual culture พบว่า *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ได้ โดยมีขนาดของรัศมีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 7.50 mm (**Figure 1**) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Srimai and Akarapisan (2023) ที่ได้รายงานไว้ว่า *B. velezensis* ไอโซเลท BB22 ที่แยกมาจากดินบริเวณรอบรากพืชสามารถควบคุมเชื้อ *Pantoea agglomerans* และเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคท่อน้ำได้ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 30.1 และ 13.0 mm ตามลำดับ และจากการรายงานของ Pedraza-Herrera et al. (2021) ได้รายงานไว้ว่า *Bacillus velezensis* ไอโซเลท IBUN2755 ที่แยกมาจากรากพืชชนิดต่าง ๆ สามารถควบคุมเชื้อ *Burkholderia glumae* ไอโซเลท CIAT-3853 ได้สูงที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 8.1 ± 1 cm

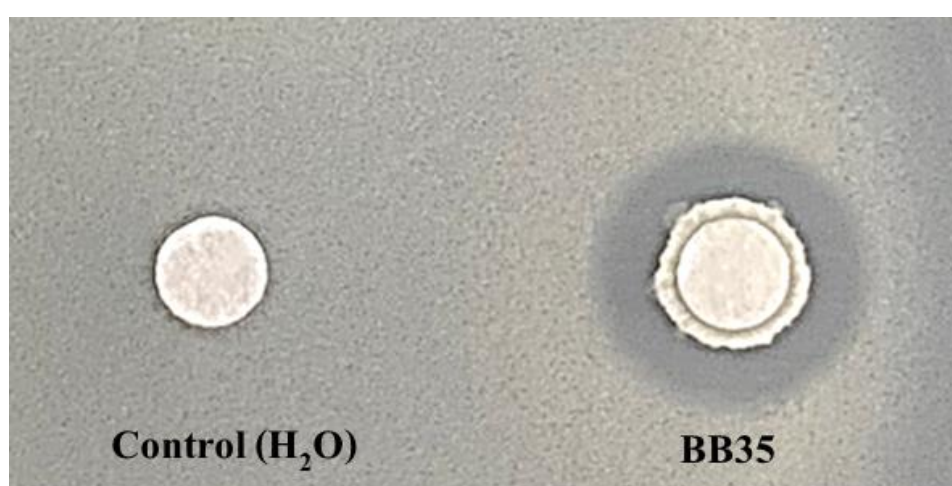


Figure 1 The effectiveness of *Bacillus* sp. BB35 to inhibit *Burkholderia gladioli* causal agent of leaf stripe and stem rot disease of sweet corn on NA medium by using dual culture method under room temperature for 3 days.

การจัดจำแนก *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA*, *gyrA* และ *rpoB*

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 ด้วยยีนทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *16S rRNA*, *gyrA* และ *rpoB* ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 1,500, 970 และ 831 bp ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จาก NCBI database โดยใช้โปรแกรม BLAST (Table 3) พบว่า ยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียไอโซเลท BB35 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับยีนของ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท GH1-13 (CP019040.1) ในตำแหน่งที่ 9146 – 10932 ส่วนยีน *gyrA* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับยีนในตำแหน่งที่ 6752 – 7713 และยีน *rpoB* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับยีนในตำแหน่งที่ 122645 – 122815 ซึ่งมีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 99.07, 99.90 และ 99.42 ตามลำดับ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 3 ยีน ที่ได้มาศึกษาความสัมพันธ์ระดับยีน พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท BB35 จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ *Bacillus velezensis* และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย phylogenetic tree พบมีความใกล้เคียงกับ *B. velezensis* ไอโซเลท GH1-13 (Figure 2) ซึ่งจากรายงานของ Kim et al. (2017) ที่ได้นำ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท GH1-13 ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากข้าวมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และนำมาใช้เป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และจากรายงานของ Ercole et al. (2023) ได้ศึกษาและจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน จากยีนจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *16S rRNA*, *rpoB*, *gyrA* และ *recA* และสามารถจัดจำแนกชนิดของ *B. velezensis* ได้จำนวน 3 ไอโซเลท จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การนำยีนจำนวน 3 ยีน มาจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* spp. นั้นมีความจำเป็นอย่างมาก เนื่องจาก *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่ลักษณะทางพันธุกรรมมีความหลากหลายและมีความใกล้ชิดกันอย่างมาก

Table 3 Source and information of *Bacillus* spp. used in this study and reference for phylogenetic analysis of the complete genome sequence

strains	source	Whole genome (accession No.)	Accession No./ Locus tag of whole genome			reference
			<i>16S rRNA</i>	<i>gyrA</i>	<i>rpoB</i>	
BB35	Thailand	-	OR797014	OR784321	OR784322	This study
GH1-13	Korea	CP019040	9146 - 10932	6752 - 7713	122645 - 122815	Kim et al., 2017
M75	Korea	CP016395	31485 - 32671	6753 - 7714	122585 - 122755	Kim et al., 2017
LS69	China	CP015911	80252 - 81438	3913245 - 3914206	105496 - 105666	Liu et al., 2017
AS43.3	South Africa	NC_019842	31776 - 32962	7064 - 8025	122565 - 122735	Adeniji et al., 2019
UTB96	Germany	CP036527	91467 - 92653	7068 - 8029	122653 - 122823	Vahidinasab et al., 2022
YPS-32	China	CP080629.1	9703 - 10889	-	121547 - 121715	Zhou et al., 2022
B5n5	China	CP002468.1	2222126 - 2223312	-	2336851 - 2337019	Deng et al., 2011
NCBI3610	United state	CP020102.1	10149 - 11335	-	121989 - 122157	Nye et al., 2017
PY79	United state	CP006881.1	10111 - 11297	-	121950 - 122118	Schroeder and Simmons, 2013
B28	Korea	CP066219.1	9649 - 10835	6656 - 7617	122828 - 122998	Heo et al., 2021
SCSIO 05746	China	CP025001.1	1018910 - 1020096	4262042 - 4263003	4146809 - 4146979	Pan et al., 2019
YB-1631	China	CP110268.1	9651 - 10837	6656 - 7617	122542 - 122712	Dong et al., 2023
Ba13	China	CP073635.1	9655 - 10841	6661 - 7622	122487 - 122657	Ji et al., 2021
205	China	CP054415.1	31394 - 32580	6661 - 7622	122487 - 122657	Zhao et al., 2020
YP6	China	CP032146.1	91382 - 92568	6757 - 7718	122459 - 122629	Meng et al., 2019
LL3	China	CP002634.1	10065 - 11251	7072 - 8033	117069 - 117239	Dang et al., 2019
PP19	China	CP062984.1	9652 - 10838	6656 - 7617	122554 - 122724	Zheng et al., 2021
HT18	Japan	AP024504.2	9209 - 10395	-	113668 - 113833	Matsunaka et al., 2022

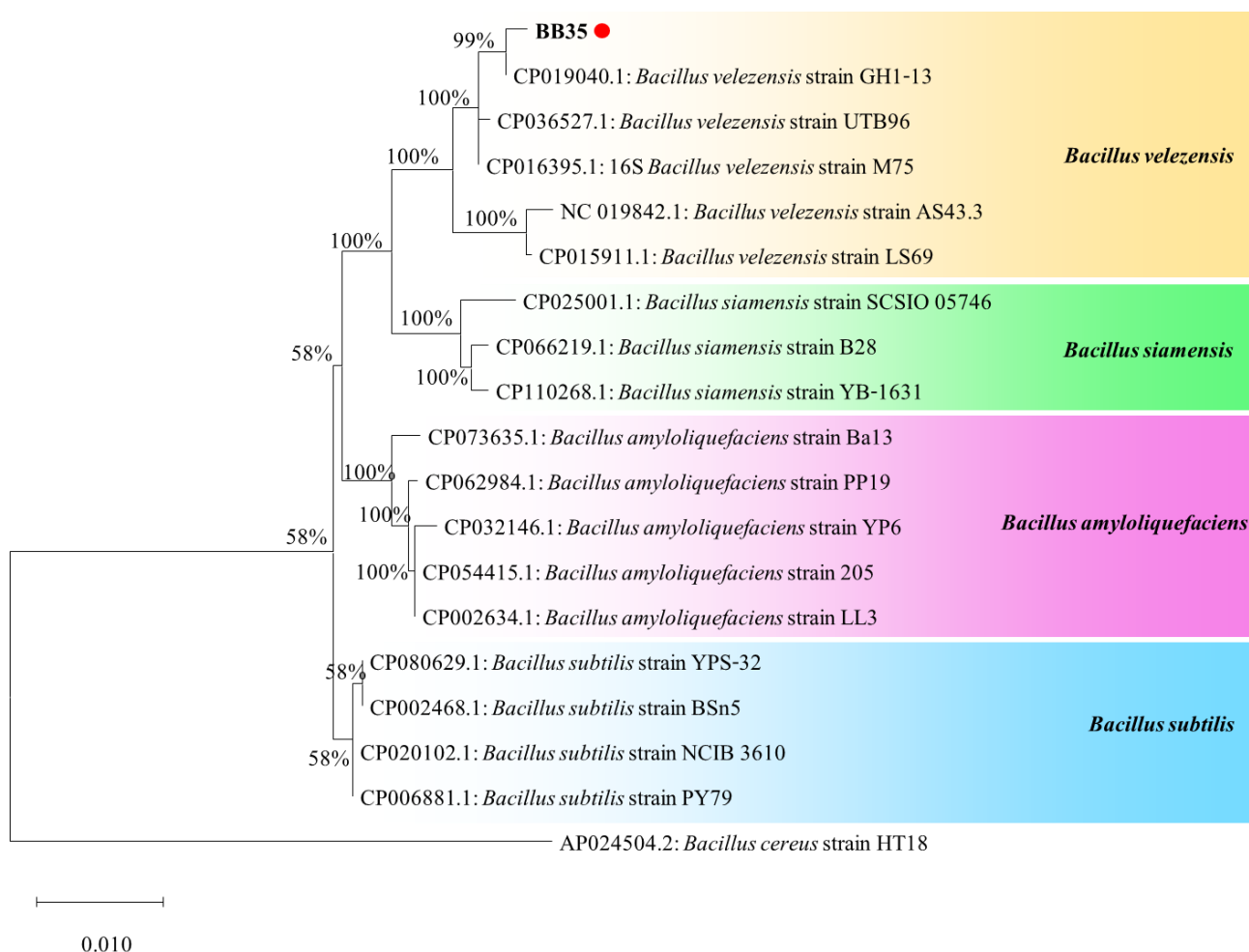


Figure 2 Phylogenetic tree analysis of antagonistic bacteria based on concatenated alignment of 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB* gene sequence by maximum likelihood (ML) method with bootstraps 1,000 replication with *Bacillus cereus* strain HT18 was used as an out-group.

การศึกษาคุณสมบัติของ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท BB35 ในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

จากการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่า *B. velezensis* ไอโซเลท BB35 มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตได้ โดยทำให้เกิดวงใสบริเวณรอบ ๆ โคโลนีบนอาหาร Pi culture medium ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1.9 cm (**Figure 3a-2**) สามารถละลายโพแทสเซียมได้ เนื่องจากมีการเกิดวงใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.86 cm (**Figure 3b-2**) นอกจากนี้ยังสามารถสร้าง siderophore บนอาหาร Chrome Azurol S agar (CAS) เนื่องจากพบการเกิดวงใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3.0 cm บนอาหารทดสอบที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (**Figure 3c-2**) ซึ่งสอดคล้องกับการงานวิจัยของ Yan et al. (2022) ที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของ *B. velezensis* ไอโซเลท YYC ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อต้นมะเขือเทศและช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* โดยแบคทีเรียไอโซเลท YYC มีคุณสมบัติในการดูดซับโพแทสเซียม การละลายฟอสเฟต และสามารถสร้าง siderophore ได้ และจากการทดลองของ Perea-Molina et al. (2022) ที่ได้รายงานว่า *B. velezensis* ไอโซเลท IBUN2755 สามารถลดจำนวนประชากรของเชื้อ *Burkholderia glumae* บริเวณรอบรากข้าวได้ นอกจากนี้ *B. velezensis* ยังช่วยสร้างสารในการส่งเสริมต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้

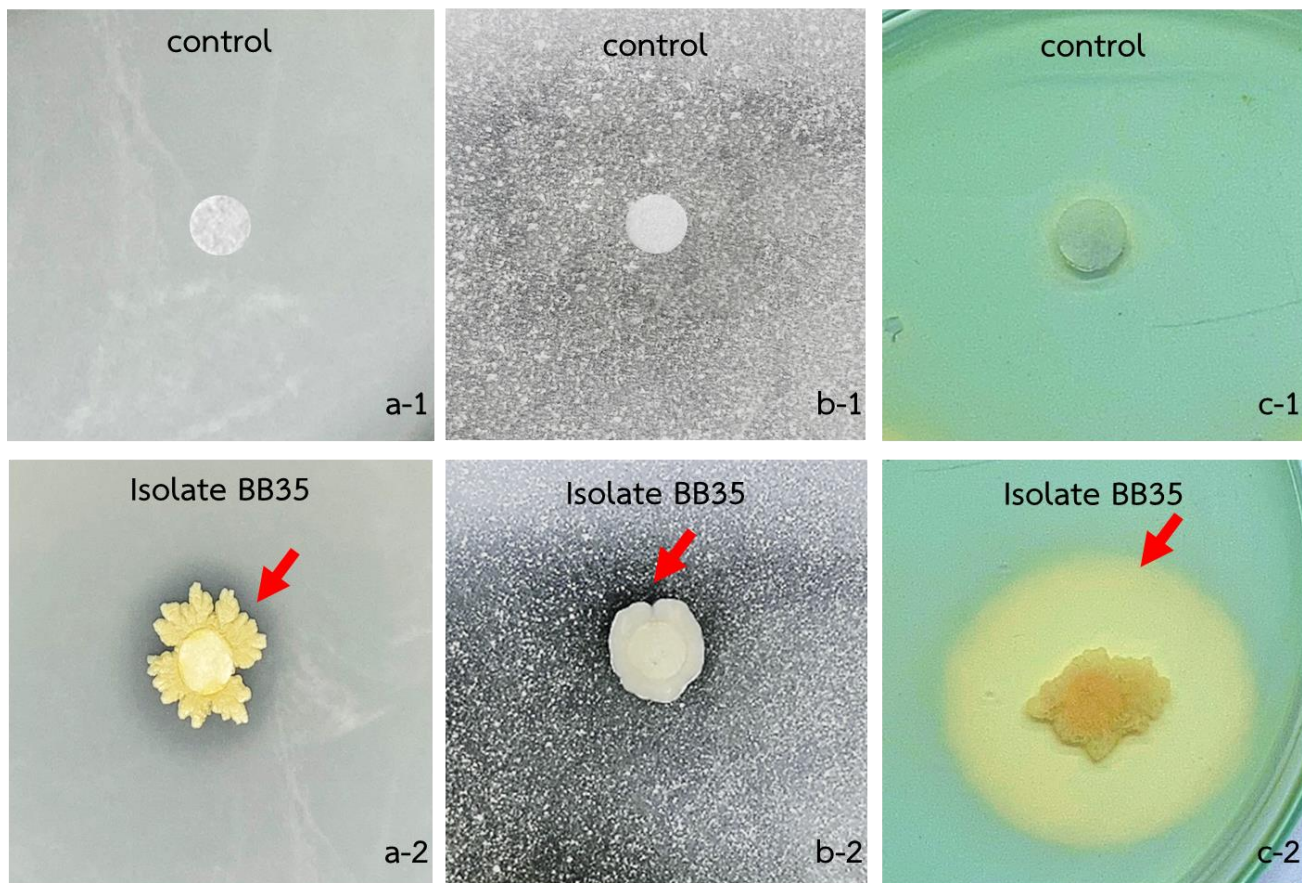


Figure 3 Plant growth-promoting activities of *Bacillus velezensis* strain BB35: a) phosphate solubilization; b) potassium solubilization and c) producing siderophore test

การศึกษาหายีนที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะของ *Bacillus velezensis* ไอโซเลท BB35 ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค

จากการศึกษาหายีนจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *sfAA*, *fenD*, *bamA* และ *ituA* ที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะ surfactin, fengycin D, bacillomycin A และ iturin A ตามลำดับ จาก *B. velezensis* ไอโซเลท BB35 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวาน พบว่า ตรวจพบทั้ง 4 ยีน ใน *B. velezensis* ไอโซเลท BB35 โดยยีน *sfAA*, *fenD*, *bamA* และ *ituA* มีขนาดของผลผลิต PCR ที่ตำแหน่งประมาณ 201 (lane 2), 293 (lane 3), 482 (lane 4) และ 647 (lane 5) bp ตามลำดับ (Figure 4) และเมื่อนำไปตรวจสอบความสัมพันธ์ระดับยีน พบว่า ยีนที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะจำนวน 2 ยีน มีความสัมพันธ์กับ *B. velezensis* คือยีน *sfAA* (OR784405) และยีน *ituA* (OR784325) ส่วนอีก 2 ยีน มีความสัมพันธ์กับ *B. amyloliquefaciens* คือยีน *fenD* (OR784324) และยีน *bamA* (OR784323) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kumvinit and Akarapisan (2023) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. velezensis* ไอโซเลท CR74 ที่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแห้งดำและโรคเน่าและของมันฝรั่งได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*, *Dikeya dadantii*, *Pectobacterium putida* และ *Bacillus altitudinis* และการรายงานของ Li et al. (2020) ที่ได้นำ *B. velezensis* ไอโซเลท CPA1-1 ที่แยกจากกุ้งฝอย มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคของสัตว์น้ำจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas veronii*, *Plesimonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Citrobacter freundii* และเมื่อศึกษาหายีนที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะจาก *B. velezensis* CPA1-1 พบว่า แบคทีเรียไอโซเลทนี้สามารถตรวจพบยีนที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ทั้งหมด 7 ยีน ได้แก่ *sfAA*, *ituA*, *fenA*, *dhbA*, *bmyA*, *beaS* และ *dfnA* นอกจากนี้มีการศึกษาของ Li et al. (2023) ที่ได้

ศึกษาองค์ประกอบและกิจกรรมของสารในกลุ่ม lipopeptide ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค จากการศึกษพบว่า *B. velezensis* ไอโซเลท FUA2155 พบการแสดงออกของยีนจำนวน 3 ยีน ได้แก่ *sfAA*, *fenA* และ *ituA* ที่กำหนดการสังเคราะห์สาร surfactin, fengycin และ itulin A ตามลำดับ โดยยีนที่กำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่ต่างกัน ดังนี้ ยีน *sfAA* กำหนดการสร้างสาร surfactin มีความสามารถในการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ทำงานอย่างไม่มีเสถียรภาพ มีผลต่อชั้นไขมันและเกิดรูพรุนส่งผลให้ออกเอนวกภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอก (Lilge et al., 2022) ผลกระทบของยีน *fenD* กำหนดการสร้างสาร fengycin เมื่อสารเข้าสู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแล้วส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเกิดรอยร้าว (Medeot et al., 2020) ส่วนยีน *bamA* กำหนดการสร้างสาร bacillomycin D สามารถช่วยส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์มของของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* (Kaspar et al., 2019) และยีน *ituA* กำหนดการสร้างสาร itulin มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และจะส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเกิดเป็นรูพรุน (Zerouh et al., 2011)

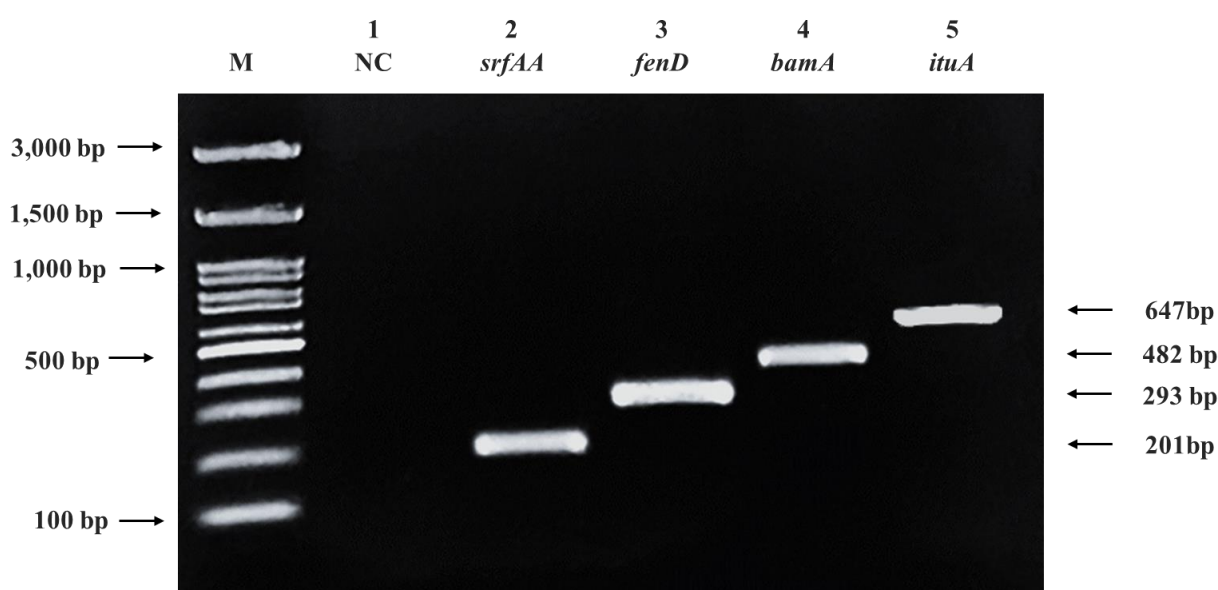


Figure 4 PCR detections of antibiotic synthesis-related genes from *Bacillus velezensis* isolate BB35 detection of *sfAA* (201 bp), *fenD* (293 bp), *bamA* (482 bp) and *ituA* (647 bp); M=DNA marker ladder and NC=negative control using 15-ohm sterile water.

สรุป

แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB35 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวานในสภาพห้องปฏิบัติการได้ และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ความสัมพันธ์ระดับยีนจำนวน 3 ยีน พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท BB35 คือ *Bacillus velezensis* ที่มีความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และตรวจพบยีนจำนวน 4 ยีน ซึ่งกำหนดการสร้างสารปฏิชีวนะ surfactin fengycin D bacillomycin A และ iturin A ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแบคทีเรีย *B. velezensis* ไอโซเลท BB35 มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคใบขีดและลำต้นเน่าของข้าวโพดหวานทั้งในสภาพโรงเรือนและแปลงปลูกได้ อีกทั้งมีโอกาสจะนำแบคทีเรียมาพัฒนาในรูปแบบของชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคต่อไปได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนนักศึกษาช่วยสอนและช่วยวิจัย (teacher and researcher assistant scholarship: TA/RA) จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- ทิพวรรณ กันหาญาติ, ณัฐริมา ไชยิตเจริญกุล, บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และรุ่งนภา ทองเครื่อง. 2560. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้สาเหตุจากแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*. รายงานผลงานประจำปี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. 1062-1071.
- เบญจวรรณ สุขนิยม และเทพศักดิ์ บุญรัตน์พันธุ์. 2562. ปัจจัยที่มีผลสัมฤทธิ์ในการนำงานวิจัยข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 ของกรมวิชาการเกษตรไปใช้ประโยชน์. วารสารนวัตกรรมการศึกษาและการวิจัย. 3(1): 15-24.
- Adeniji, A.A., D.T. Loots, and O.O. Babalola. 2019. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. Applied Microbiology and Biotechnology. 103: 3669-3682.
- Andric, S., T. Meyer, and M. Ongena. 2020. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. Frontiers in Microbiology. 11(1350): 1-9.
- Athukarala, S.N.P., W.G.D. Fernando, and K.Y. Rashid. 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. Canadian Journal of Microbiology. 55: 1021-1032.
- Beneduzi, A., A. Ambrosini, and L. M. P. Passaglia. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology. 34(4) (suppl): 1044-1051.
- Beric, T., M. Kojic. S. Stankovic, and L. Topisirovic. 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. Food Technology and Biotechnology. 50(1): 25-31.
- Cui, L., C. Yang, L. Wei, T. Li, and X. Chen. 2020. Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab. Biological Control. 141(104156): 1-7.
- Deng, Y. Y. Zhu, P. Wang, L. Zhu, J. Zheng, R. Li, L. Ruan, D. Peng, and M. Sun. 2011. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of amorphophallus konjac with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Journal of Bacteriology. 193(8): 2070-2071.
- Dong, Q., Q. Liu, P.H. Goodwin, X. Deng, W. Xu, M. Xia, J. Zhang, R. Sun, C. Wu, Q. Wang, K. Wu, and L. Yang. 2023. Isolation and genome-based characterization of biocontrol potential of *Bacillus siamensis* YB-1631 against wheat crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum*. Journal of Fungi. 9(5): 1-19.
- Ercole, T.H., V.M. Kava, R. Aluizio, V. Pauletti, M. Hungria, and L.V. Galli-Terasawa. 2023. Co-inoculation of *Bacillus velezensis* and *Stenotrophomonas maltophilia* strains improves growth and salinity tolerance in maize (*Zea mays* L.). Rhizosphere. 27 (1-14).
- Gijon-Hernandez, A., D. Teliz-Oreiz, D. Mejia-Sanchez, R.D.L. Torre-Almaraz, E. Cardenas-Soriano, C.D. Leon, and A. Mora-Aguilera. 2011. Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. Journal of Phytopathology. 159: 377-381.

- Gorai, P.S., R. Ghosh, S. Mandal, S. Ghosh, S. Chatterjee, S.K. Gond, and N.C. Mandal. 2021. *Bacillus siamensis* CNE6- a multifaceted plant growth-promoting endophyte of *Cicer arietinum* L. having broad spectrum antifungal activities and host colonizing potential. *Microbiological Research*. 252: 1-12.
- Heo, S., J.H. Kim, M.S. Kwak, D.W. Jeong, and M.H. Sung. 2021. Functional genomic insights into probiotic *Bacillus siamensis* strain B28 from traditional Korean fermented kimchi. *Foods*. 10(8): 1-12.
- Jasim, B., C. J. Jimtha, M. Jyothis, and E. K. Radhakrishnan. 2013. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regulation*. 71: 1-11.
- Ji, C., M. Zhang, Z. Kong, X. Chen, X. Wang, W. Ding, H. Lai, and Q. Guo. 2021. Genomic analysis reveals potential mechanisms underlying promotion of tomato plant growth and antagonism of soilborne pathogens by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13. *Microbiology spectrum*. 9(3): 1-13.
- Joshi, R., and M. Gardener. 2006. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Biological Control*. 96(2): 145-154.
- Kaspar, F., P. Neubauer, and M. Gimpel. 2019. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: A comprehensive review. *Journal of Natural Products*. 82: 2038-2053.
- Kim, S.Y., H. Song, M.K. Sang, H.Y. Weon, and J. Song. 2017. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* strain GH1-13 reveals agriculturally beneficial properties and a unique plasmid. *Journal of Biotechnology*. 259(10): 221-227.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6): 1547-1549.
- Kumvinit, A., and A. Akarapisan. 2023. Antibiotic biosynthesis gene of *Bacillus velezensis* as a bioagent for controlling blackleg and soft rot of potato. *International Journal of Agriculture Technology*. 19(2): 505-516.
- Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 7: 12-20.
- Li, Z., K. X. Fernandez, J. C. Vederas, and M. G. Ganzle. 2023. Composition and activity of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus* spp. in *daqu* fermentation. *Food Microbiology*. 111: 1-10.
- Lilge, L., N. Ersig, P. Hubel, M. Aschern, E. Pillai, P. Klausmann, J. Pfannstiel, M. Henkel, K. M. Heravi, and R. Hausmann. 2022. Surfactin shows relatively low antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and other bacterial model organisms in the absence of synergistic metabolites. *Microorganisms*. 10(779): 1-19.
- Liu, B., H. Qiao, L. Huang, H. Buchenauer, Q. Han, Z. Kang, and Y. Gong. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*. 49: 277-285.
- Matsunaka, M., N. C. Thanh, T. Uedoi, T. Lida, Y. Fujino, T. Ohmori, Y. Hiromasa, T. Ohshima, and K. Doi. 2022. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* strain HT18, isolated from forest soil. *Environmental Microbiology*. 11(3): 1.
- Medeot, D. B., M. Fernandez, G. M. Morales, and E. Jofre. 2020. Fengycins from *Bacillus amyloliquefaciens* MEP₂ 18 exhibit antibacterial activity by producing alterations on the cell surface of the pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeryginosa* PA01. *Frontiers in Microbiology*. 10(3107): 1-12.

- Meng, D., W. Jiang, J. Li, L. Huang, L. Zhai, L. Zhang, Z. Guan, Y. Cai, and X. Liao. 2019. An alkaline phosphatase from *Bacillus amyloliquefaciens* YP6 of new application in biodegradation of five broad-spectrum organophosphorus pesticides. *Journal of Environmental Science and Health, Path B.* 54(4): 336-343.
- Miljakovic, D., J. Marinkovic, and S. Balesevic-Tubic. 2020. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms.* 8(1037): 1-19.
- Mnif, I., and D. Ghribi. 2015. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection.* 77: 52-64.
- Nye, T.M., J.W. Schroeder, D.B. Kearns, and L.A. Simmons. 2017. Complete genome sequence of undomesticated *Bacillus subtilis* strain NCIB 3610. *Genome Announcements.* 5(20): 1-2.
- Pajcin, I., V. Vlajkov, M. Frohme, S. Grebinyk, M. Grahovac, M. Mojicevic, and J. Grahovac. 2020. Pepper bacterial spot control by *Bacillus velezensis*: bioprocess solution. *Microorganisms.* 8(1463): 1-22.
- Pan, H., X. Tian, M. Shao, Y. Xie, and H. Huang. 2019. Genome mining and metabolic profiling illuminate the chemistry driving diverse biological activities of *Bacillus siamensis* SCSIO 05746. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 103(10): 4153-4165.
- Rahman, M.M., M.E. Ali, A.A. Khan, A.M. Akanda, Md.K. Uddin, U. Hashim, and S.B.A. Hamid. 2012. Isolation, characterization, and identification of biological control agent for potato soft rot in Bangladesh. *The Scientific World Journal.* 723293: 1-6.
- Raymaekers, K., L. Ponet, D. Holtappels, B. Berckmans, and B.P.A. Cammue. 2020. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biological Control.* 144: 104-240.
- Schroeder, J.W., and L.A. Simmons. 2013. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain PY79. *Genome Announcements.* 1(16): 1.
- Souza, R. D., A. Ambrosini, and L. M. P. Passaglia. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology.* 38(4): 401-419.
- Srimai, K., and A. Akarapisan. 2023. Occurrence, identification and preliminary biological control of bulb rot of onion (*Allium cepa*). *Chiang Mai Journal of Science.* 50(3): 1-13.
- Vahidinasab, M., I. Adiek, B. Hosseini, S.O. Akintayo, B. Abrishamchi, J. Pfannstiel, M. Henkel, L. Lilge, R.T. Voegelé, and R. Hausmann. 2022. Characterization of *Bacillus velezensis* UTB96, demonstrating improved lipopeptide production compared to the strain *B. velezensis* FZB42. *Microorganisms.* 10(11): 1-17.
- Yan, Y., W. Xu, Y. Hu, R. Tian, and Z. Wang. 2022. *Bacillus velezensis* YYC promotes tomato growth and induces resistance against bacterial wilt. *Biological Control.* 172(104977): 1-12.
- Yu, X., C. Ai, L. Xin, and G. Zhou. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology.* 47(2): 138-145.
- Yurnaliza, Y., D.I. Rambe, L. Sarimunggu, M. Purba, I. Nurwahyuni, S. Lenny, A. Lutfia, and A. Hartanto. 2020. Screening of *Burkholderia* spp. from oil palm plantation with antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity.* 21(8): 3431-3437.

- Zeriuoh, H., D. Romero, L. G. Gutierrez, F. M. Cazorla, A. de Vicente, and A. P. Garcia. 2011. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial disease of cucurbits. *The American Phytopathological Society*. 24(12): 1540-1552.
- Zhao, X., H. Zheng, J. Zhen, W. Shu, S. Yang, J. Xu, H. Song, and Y. Ma. 2020. Multiplex genetic engineering improves endogenous expression of mesophilic α -amylase gene in a wild strain *Bacillus amyloliquefaciens* 205. *International Journal of Biological Macromolecules*. 165: 609-618.
- Zheng, L., S. Huang, T. Hsiang, G. Yu, D. Guo, Z. Jiang, and J. Li. 2021. Biocontrol Using *Bacillus amyloliquefaciens* PP19 Against Litchi Downy Blight Caused by *Peronophythora litchii*. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1-9.
- Zhou, Y., Q. Li, Z. Peng, J. Zhang, and J. Li. 2022. Biocontrol effect of *Bacillus subtilis* YPS-32 on potato common scab and its complete genome sequence analysis. *Agricultural and Food Chemistry*. 70(17): 5339-5348.