

การยับยั้ง *Pythium aphanidermatum* สาเหตุของโรคเน่าเนืองในขิงด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ Inhibition of *Pythium aphanidermatum* Causing Rhizome Rot in Ginger by Antagonistic Bacteria

ศิริพร ทิพย์สิงห์ กาญจนา ภูมิธิรัตน์ สุภาธรรมาภรณ์ และ รัชฌู เมยดง*

Siriporn Thipsing Kanchana Pumiti Ratsupa Thammaporn and Ratchanu Meidong*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Department of Sciences, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University

*E-mail: ratchanu.me@bsru.ac.th

Received: Dec 22, 2022

Revised: Jan 17, 2023

Accepted: Jan 22, 2023

บทคัดย่อ

โรคเน่าเนืองที่มีสาเหตุมาจากราก่อโรคส่งผลกระทบต่อผลผลิตของขิง การใช้จุลินทรีย์เพื่อป้องกันและควบคุมโรคนี้เป็นวิธีที่น่าสนใจและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกราสเหตุโรคเน่าเนืองในขิง และเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรครุนแรงที่สุดจากรากที่แยกได้ ในการศึกษาครั้งนี้แยกราสเหตุโรคเน่าเนืองจากชิ้นส่วนของขิงที่เป็นโรคได้ 5 ไอโซเลต คือ ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 และ ZP5 จากการทดสอบการก่อโรคในขิง พบว่าไอโซเลตที่ก่อโรคได้รุนแรงที่สุด คือ ไอโซเลต ZP4 เมื่อใช้วิธีการทางสัณฐานวิทยาและทางอนุพันธุศาสตร์สามารถจัดจำแนกราก่อโรค ZP4 ได้เป็น *Pythium aphanidermatum* จากการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบ ๆ ต้นขิง พบว่าจากแบคทีเรียจำนวน 78 ไอโซเลตที่คัดแยกมา มีเพียง 11 ไอโซเลตที่ยับยั้ง *P. aphanidermatum* ZP4 ด้วยวิธี dual culture technique โดยมี 5 ไอโซเลตที่ผลิตแบคทีเรียอินในการยับยั้ง *P. aphanidermatum* ZP4 แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค *P. aphanidermatum* ZP4 ได้สูงที่สุด คือ ไอโซเลต CP-8f และ CP-13e ซึ่งสามารถจัดจำแนกด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis ได้เป็น *Bacillus velezensis* และ *Bacillus subtilis* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตนี้ผลิตเอนไซม์โปรติเอส แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และเพคติเนส การศึกษานี้บ่งชี้ว่า *Bacillus velezensis* CP-8f และ *Bacillus subtilis* CP-13e มีศักยภาพที่จะใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่ปลอดภัย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในการควบคุมราสาเหตุโรคเน่าเนืองในขิง

คำสำคัญ: แบคทีเรียปฏิปักษ์ ราก่อโรค ขิง โรคเน่าเนือง

Abstract

Rhizome rot caused by pathogenic fungi adversely affects ginger yield. The use of biocontrol microorganisms to prevent and control this disease is an interesting and environment-friendly method. This research aimed to isolate pathogenic fungi causing rhizome rot in ginger and to screen bacteria capable of inhibiting the most virulent pathogenic fungus from the isolated fungi. In this study, 5 isolates of rhizome rot causing fungi, ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 and ZP5, were isolated from the diseased parts of ginger. From the pathogenicity test in ginger, it was found that the most virulent pathogenic fungus was the isolate ZP4. By using morphological and molecular methods, the fungus isolate ZP4 was identified as *Pythium aphanidermatum*. From the screening of antagonistic bacteria from soil surrounding ginger plants, it was found that out of 78 selected bacterial isolates, only 11 isolates showed antifungal activity against *P. aphanidermatum* ZP4 by the dual culture technique among which 5 isolates produced bacteriocin to inhibit *P. aphanidermatum* ZP4. The antagonistic bacteria exhibited the highest activity against the fungal pathogen *P. aphanidermatum* ZP4 were the isolates

CP-8f and CP-13e which were identified by 16S rDNA sequence analysis as *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis*, respectively. Furthermore, both of them were found to produce proteinase, α -amylase, cellulase and pectinase. These findings indicated that *Bacillus velezensis* CP-8f and *Bacillus subtilis* CP-13e had potential to be safe and environment-friendly biological control agents against rhizome rot causing fungi.

Keywords: Antagonistic bacteria, Pathogenic fungi, Ginger, Rhizome rot

1. บทนำ

ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) เป็นพืชล้มลุก อยู่ในตระกูล Zingiberaceae เป็นพืชทางการค้าที่สำคัญในประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เหง้าหรือลำต้นใต้ดินของขิงถูกนำไปใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงอาหารที่ได้รับความนิยมและใช้กันทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีการนำขิงไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยาแผนโบราณ โดยมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ลดการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ รักษาอาการคลื่นไส้อาเจียน และรักษาโรคกระเพาะและลำไส้แปรปรวน อีกทั้งยังมีรายงานการวิจัยที่พบว่าขิงมีผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิต และต้านการอักเสบ [1] โดยประเทศอินเดียเป็นผู้ผลิตและส่งออกขิงรายใหญ่ที่สุดของโลก รองลงมาคือ จีน ไนจีเรีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ และไทย [2] ในประเทศไทยมีผลผลิตรวมต่อปีประมาณ 4,860 ตัน [3]

โรคเน่าเหง้า (Rhizome rot หรือ soft rot) เป็นโรคที่ทำลายผลผลิตของขิงมากที่สุด โดยมีสาเหตุมาจากราในกลุ่ม *Pythium* spp. [2], [4] และ *Fusarium* spp. รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม *Ralstonia* spp. [5], [6] โดย *Pythium* spp. เป็นราที่พบทั่วไปในน้ำและดิน ทั้งนี้มีรายงานว่าสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงทำให้เกิดโรคเน่าเหง้าในขิง ได้แก่ สายพันธุ์ *Pythium myriotylum* [2], *Pythium arrhenomanes*, *Pythium irregulare*, *Pythium iwayamai*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum* [7] และ *Pythium aphanidermatum* [8], [9] โดยรานี้จะแพร่กระจายไปยังเหง้า และอาจทำให้เนื้อเยื่อภายในถูกทำลาย บริเวณหน่อที่แตกออกมาใหม่จะมีลักษณะช้ำดำน้ำ ซึ่งต่อมาจะเน่าเปื่อยหักหลุดออกมาจากแง่งโดยง่าย ส่วนอาการทางใบมักจะเริ่มที่ใบแก่ที่อยู่ตอนล่าง ๆ โดยใบจะเหี่ยวลู่ลง ต่อมาจะม้วนเป็นหลอดและเหลือง จากนั้นอาการจะค่อย ๆ ลามจากล่างสูงขึ้นไปยังส่วนบน ในที่สุดใบจะม้วนและเหลืองแห้งทั้งต้น [6]

การจัดการในการเพาะปลูกขิงโดยเฉพาะการกำจัดและยับยั้งราสาเหตุโรคเน่าเหง้าในกลุ่ม *Pythium* spp. จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ถึงแม้ว่าการใช้สารเคมีในการกำจัดราก่อโรคจะได้ผลดี แต่ข้อเสียคือผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากสารเคมีที่ใช้นั้นตกค้างในดินได้เป็นเวลานาน [4] จึงจำเป็นต้องหาทางเลือกอื่นมาใช้ยับยั้งราก่อโรคนั้นแทนการใช้สารเคมี ซึ่งแนวทางที่ได้รับความสนใจวิธีหนึ่งคือการใช้สารชีวภาพที่ผลิตมาจากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. [10] มีงานวิจัยที่ทำการศึกษการใช้แบคทีเรียเพื่อป้องกันโรคจากราในระหว่างการเพาะปลูกพืชและส่งเสริมการเจริญของพืช โดยแบคทีเรียกลุ่มที่มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคคือแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. ตัวอย่างจากงานวิจัยของ Myo et al. [11] ที่ทำการตรวจสอบการใช้ *Bacillus velezensis* NKG-2 เพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากรา *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fulvia fulva* และ *Ustilagoideae virens* ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างเอนไซม์และสารอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile organic compounds) ที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ และงานวิจัยของ Goswami and Syiem [9] ซึ่งศึกษา *Bacillus altitudinis* ที่แยกจากตัวอย่างดินเพื่อใช้ยับยั้ง *P. aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าเหง้าในขิง โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารเซอแฟกติน (Surfactin) เพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรค นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Antagonistic bacteria) สามารถยับยั้งและทำลายราก่อโรคได้โดยอาศัยเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเส้นใยของรา เช่น ไคไตเนส (Chitinase) เบต้ากลูแคนเนส (β -Glucanase) เซลลูเลส (Cellulase) และแอลฟาอะไมเลส (α -Amylase) [11] ดังนั้นการตรวจสอบการสร้างสารต้านรา และการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์จึงมีความสำคัญ เพื่อใช้ประกอบการอธิบายประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งราก่อโรค ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกราสาเหตุโรคเน่าเหง้าจากขิงที่มีอาการของโรค และแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินรอบ ๆ ขิง เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราในระดับห้องปฏิบัติการและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เหมาะสมในการเป็นแบคทีเรียทางเลือกเพื่อพัฒนาไปใช้ยับยั้งราก่อโรคเน่าเหง้าในระดับแปลงปลูกต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การแยกราสาเหตุโรคנגั่วในขิง การพิสูจน์โรค และการจำแนกชนิด

แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของขิงที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร แล้วนำแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA; Himedia, India) และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แยกราให้บริสุทธิ์ [12] โดยการนำไปเลี้ยงลงบนอาหาร PDA ใหม่ และในอาหาร PDA slant บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อเป็น stock culture เก็บไว้ศึกษาต่อไป

การพิสูจน์โรคทำตามวิธีของ Tran et al. [13] โดยเริ่มจากการเตรียมรากโรคโดยเลี้ยงบน PDA slant จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและชุดผิวหน้าอาหารเพื่อเตรียมสปอร์แขวนลอย (Spore suspension) นับสปอร์ด้วย Haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (CX22, Olympus, Tokyo, Japan) การเตรียมขิงสำหรับการทดสอบทำโดยนำขิงที่ปราศจากโรคมามาแช่ด้วยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วใช้มีดปลอดเชื้อกรีดให้เป็นรอยแผล จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยของราที่ต้องการทดสอบ (5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ใส่ลงตรงรอยแผลที่ทำไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเตรียมสภาวะในการบ่มให้มีความชื้น จากนั้นนำขิงที่มีอาการของโรค มาแยกราที่ก่อโรครากลับอีกครั้งบนอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปจำแนกและเก็บรากโรคนี้ไว้ศึกษาต่อไป

การจำแนกชนิดของราทำโดยนาราที่ต้องการจำแนกชนิดไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะเลี้ยงราด้วยเทคนิค Slide culture บ่มเป็นเวลา 3-5 วัน นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากนั้นศึกษาต่อด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ (Molecular method) โดยสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [14] วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence) ด้วยโปรแกรม BLAST ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และนำข้อมูลไปสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7 [15]

2.2. การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างที่นำมาแยกแบคทีเรียคือดินบริเวณรอบ ๆ กองขิง โดยนำดินมา 1 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปลอดเชื้อ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อทำการเจือจางก่อนนำไปแยกเชื้อด้วยวิธี Plate count technique บนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนี (Colony) ของแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak บนอาหาร NA และเก็บในกลีเซอรอล (Glycerol) ความเข้มข้นร้อยละ 20 ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบการยับยั้งราสาเหตุโรคנגั่วในขิงต่อไป

2.3. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคנגั่วในขิง

การทดลองนี้เป็นขั้นตอนเบื้องต้นของการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคנגั่วในขิงจากแบคทีเรียที่แยกได้ โดยใช้วิธี Dual culture technique การเตรียมรากโรคทำโดยเลี้ยงรากโรคบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ส่วนการเตรียมแบคทีเรียทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งรากโรคด้วยวิธี Dual culture technique [12] ซึ่งทำโดยใช้ที่เจาะ (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวันบริเวณปลายเส้นใยของราที่เจริญบนอาหาร PDA นำมาวางบนอาหาร PDA ใหม่ โดยวางให้ห่างจากขอบของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร จากนั้นใช้ลูป (Loop) ปลอดเชื้อเชื่อมต่อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาขีดเป็นเส้นตรงด้านตรงข้ามกับขั้วราที่วางไว้ก่อน โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร โดยชุดการทดลองควบคุม (Control) ให้เลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยไม่ต้องการเลี้ยงแบคทีเรียร่วมด้วย หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยวัดขนาดของรัศมีของโคโลนีราสาเหตุโรคในชุดควบคุม และชุด

ทดสอบ แล้วนำมาคำนวณหาการยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth; PIRG) โดยสูตรคำนวณการยับยั้งการเจริญ คือ $PIRG = [(R1 - R2)/R1 \times 100]$ เมื่อ R1 คือความยาวรัศมีของโคโลนีของราสาเหตุโรคในชุดควบคุม (มิลลิเมตร) และ R2 คือความยาวรัศมีของโคโลนีของราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

2.4. การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการสร้างสารแบคทีเรียอินเพื่อยับยั้งราก่อโรค

การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการสร้างสารแบคทีเรียอินเพื่อยับยั้งราก่อโรคใช้วิธี Agar well diffusion assay ซึ่งทำโดยนำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลตที่ยับยั้งราก่อโรคได้ (จากการทดสอบด้วยวิธี Dual culture technique) คือ CP-7c, CP-7d, CP-8b, CP-8e, CP-8f, CP-11a, CP-11b, CP-11f, CP-13d, CP-13e และ CP-17d มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) แล้วนำไปปั่นแยกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใส (Supernatant) มาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล (2 N NaOH) จากนั้นเติมเอนไซม์ คตาเลส (Catalase; Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน (Pore size) เท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany) ในขณะที่ราก่อโรค เตรียมให้มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ก่อนกระจายบนผิวหน้าอาหาร PDA ด้วยวิธี Spread plate technique จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วเติมส่วนของแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เตรียมไว้ หลุมละ 70 ไมโครลิตร ในขณะที่หลุมควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NB เติมน้ำ [2] จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสของการยับยั้ง (Inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร

2.5. การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะ

นำไอโซเลต CP-7c, CP-7d, CP-8f, CP-11b และ CP-13e ซึ่งเป็นไอโซเลตที่สร้างแบคทีเรียอินในการยับยั้งราก่อโรคได้ มาศึกษาการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ โปรติเอส

(Protease) แอลฟาอะไมเลส (α -Amylase) เซลลูเลส (Cellulase) และเพคตินเอส (Pectinase) การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสใช้อาหาร Skimmed milk agar plate ตรวจสอบผลโดยดูจากโซนใสที่เกิดขึ้น [16] การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสใช้อาหาร Starch agar plate ตรวจสอบผลด้วยสารละลายไอโอดีน [17] การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสใช้อาหาร Carboxymethyl cellulose (CMC) agar plate ตรวจสอบผลด้วยการล้างด้วยสารละลาย Congo red ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (1 N NaOH) ต่อมาล้างด้วยกรดอะซิติก (Acetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น [18] และการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เพคตินเอส ตรวจสอบผลด้วยสารละลายไอโอดีน (Iodine solution) [19] การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตใช้ค่า Enzymatic index (EI) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $EI = \text{Hydrolysis zone diameter} / \text{Colony diameter}$ โดย Hydrolysis zone diameter คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ (ในหน่วยมิลลิเมตร) และ Colony diameter คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของแบคทีเรีย (ในหน่วยมิลลิเมตร)

2.6. การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ต้องการจำแนกชนิดมาจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้เทคนิคการย้อมแกรม (Gram staining) จากนั้นศึกษาต่อด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis โดยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR ใช้ไพรเมอร์ 20F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1500R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence) โดยนำไปเทียบในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และ EzTaxon server [20] แล้วนำข้อมูลไปสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7 [15]

2.7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One Way Analysis of Variance: ANOVA) หาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($p < 0.01$)

3. ผลการวิจัย

3.1. การแยกราสาเหตุโรคแ่งเน่าในขิง การพิสูจน์โรค และการจำแนกชนิด

เมื่อนำตัวอย่างขิงที่เป็นโรคแ่งเน่ามาแยกราสเหตุโรคแ่งเน่าสามารถแยกราสเหตุโรคที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ 5 ไอโซเลต (Isolate) คือ ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 และ ZP5 จากนั้นนำไปทดสอบการก่อโรคในขิง พบว่าไอโซเลต ZP4 เป็นไอโซเลตที่ก่อโรคในขิงรุนแรงที่สุดพิจารณาจากการก่อแผลที่แ่งขิงขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่น ๆ จึงเลือกไอโซเลต ZP4 ไปใช้ในการศึกษาต่อ เนื่องจากเป็นไอโซเลตที่มี

ความรุนแรงในการก่อโรคที่สุด และเมื่อใช้วิธีการทางสัณฐานวิทยาและทางอนุพันธุศาสตร์สามารถจำแนกราสเหตุโรค ZP4 ได้เป็น *Pythium aphanidermatum* (Figure 1)

3.2. การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

ในการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ ขิง พบว่าจากตัวอย่างดินทั้งหมด 17 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้ 78 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่แยกได้ถูกนำไปทดสอบการยับยั้งราสาเหตุโรคแ่งเน่า (*P. aphanidermatum* ZP4) ต่อไป

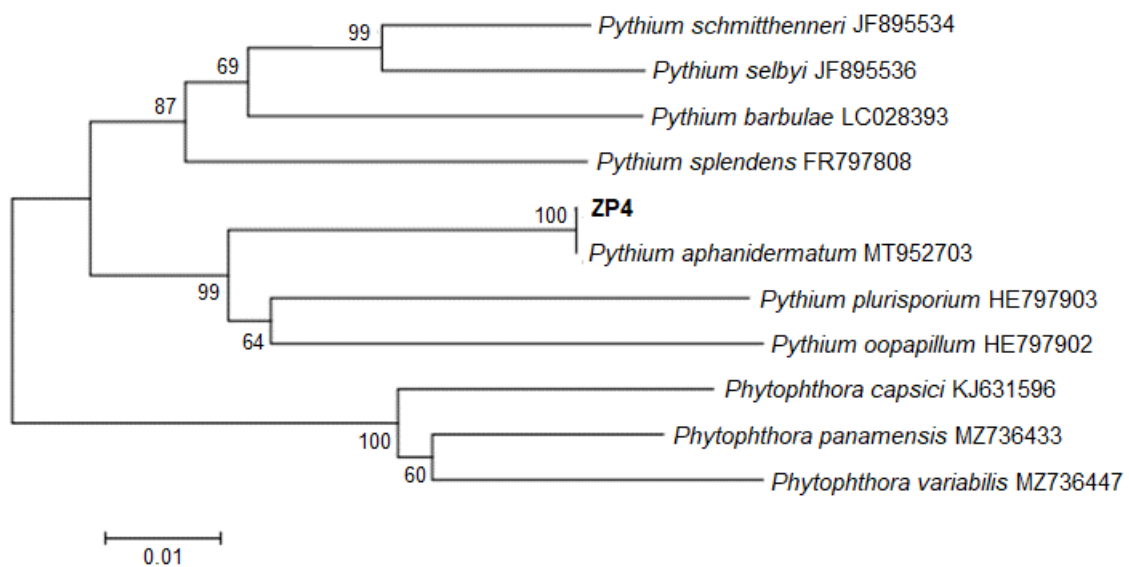


Figure 1 A phylogenetic tree based on ITS1-5.8S-ITS2 sequence region showing the position of the isolate ZP4. Numbers at nodes represent levels of bootstrap support (%) based on analysis of 1,000 replications. The scale bar represents an estimated 10 base substitutions per 1,000 nucleotide positions.

3.3. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคแ่งเน่าในขิง

การศึกษานี้ใช้วิธี Dual culture technique ในการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีศักยภาพยับยั้งการก่อโรค *P. aphanidermatum* ZP4 เบื้องต้น ผลการทดลองพบว่าจากแบคทีเรียที่แยกจากดินทั้งหมด 78 ไอโซเลต มีจำนวน 11 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *P. aphanidermatum* ZP4 ได้ โดยแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการก่อโรคได้ คือ CP-7c, CP-7d, CP-8b, CP-8e, CP-8f, CP-11a, CP-11b, CP-11f, CP-13d,

CP-13e และ CP-17d ซึ่งสามารถยับยั้งการก่อโรคได้ที่ร้อยละ 29.49 ถึงร้อยละ 47.62 โดยไอโซเลต CP-8f ยับยั้งการก่อโรคได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ที่ร้อยละ 47.62 รองลงมาคือไอโซเลต CP-11f, CP-13d และ CP-13e โดยยับยั้งได้ที่ร้อยละ 43.83, 37.56 และ 37.45 ตามลำดับ ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. aphanidermatum* ZP4 โดยแบคทีเรียปฏิชีวนะได้แสดงไว้ใน Figure 2 ส่วนใน Figure 3 แสดงผลการยับยั้ง *P. aphanidermatum* ZP4 โดยแบคทีเรียไอโซเลต CP-8f และ CP-13e เมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual culture technique

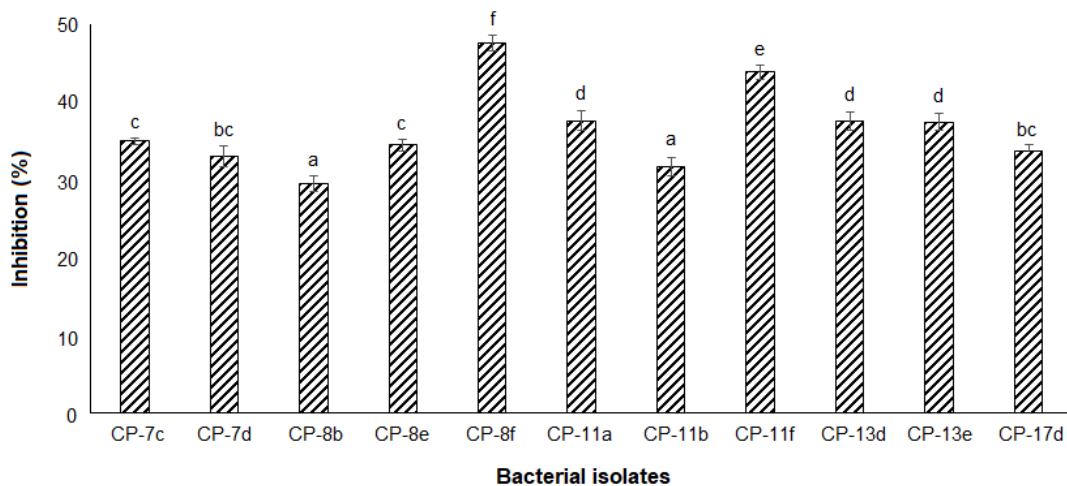


Figure 2 Antifungal activity of bacterial isolates against *P. aphanidermatum* ZP4
Means with different letters are significantly different ($p < 0.01$).

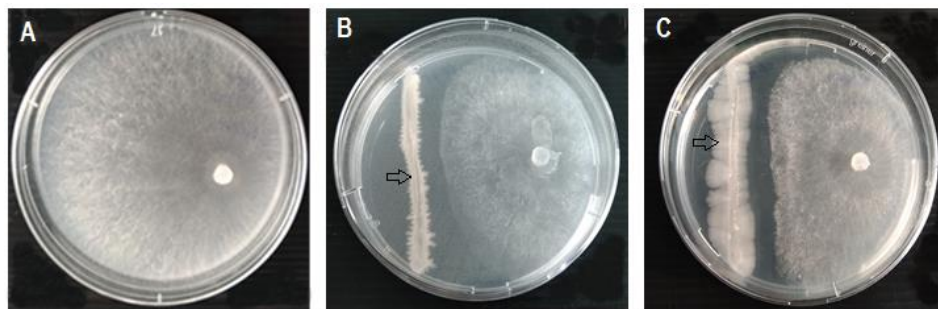


Figure 3 Antifungal activity of the isolates CP-8f and CP-13e against *P. aphanidermatum* ZP4 using the dual culture technique

- (A) Growth of *P. aphanidermatum* ZP4 without antagonistic bacteria;
(B) Inhibition of *P. aphanidermatum* ZP4 by the isolate CP-8f (arrow);
(C) Inhibition of *P. aphanidermatum* ZP4 by the isolate CP-13e (arrow)

หลังจากการคัดเลือกเบื้องต้นและได้แบคทีเรียปฏิชีวนะต่อราโรค *P. aphanidermatum* ZP4 จำนวน 11 ไอโซเลตแล้ว จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินเพื่อยับยั้งราโรค *P. aphanidermatum* ZP4 โดยใช้วิธี Agar well diffusion assay จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 5 ไอโซเลตที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินเพื่อยับยั้งราโรค *P. aphanidermatum* ZP4 ซึ่งได้แก่ CP-7c, CP-7d, CP-8f, CP-11b และ CP-13e โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสของการยับยั้ง (Inhibition zone) อยู่ระหว่าง 8.50 ± 0.64 - 20.76 ± 0.73 มิลลิเมตร (Figure 4A) แบคทีเรียปฏิชีวนะที่ให้

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสของการยับยั้งสูงสุด คือ ไอโซเลต CP-8f (Figure 4B) และไอโซเลต CP-13e (Figure 4C) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสของการยับยั้งเท่ากับ 20.76 และ 18.86 มิลลิเมตร ตามลำดับ

3.4. การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะ

จากการนำแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 5 ไอโซเลตที่มีการยืนยันแล้วว่าสามารถสร้างแบคทีเรียโอซินเพื่อยับยั้งราโรค *P. aphanidermatum* ZP4 มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และ

เพคตินเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการยับยั้งราก่อโรคได้ จากการทดลองพบว่ามียีสต์ 2 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้ง 4 ชนิด คือ ไอโซเลต CP-8f และไอโซเลต CP-13e (Table 1) โดยไอโซเลต CP-8f สามารถสร้างโปรติเอส เซลลูเลส และเพคตินเอสได้สูงสุด ในขณะที่ไอโซเลต CP-13e สามารถสร้างแอลฟาอะไมเลสได้สูงสุด

3.5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต CP-8f และไอโซเลต CP-13e มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค *P. aphanidermatum* ZP4 ได้ดีที่สุด และมีความสามารถ

ในการสร้างแบคทีเรียโอซิน โปรติเอส แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และเพคตินเอส ดังนั้นจึงได้เลือกแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตไปจำแนกชนิดต่อไป จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิคการย้อมแกรมเพื่อตรวจการติดสีแกรมและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าไอโซเลต CP-8f และไอโซเลต CP-13e เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน และสร้างเอนโดสปอร์ (Endospore) เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สามารถจำแนกไอโซเลต CP-8f และไอโซเลต CP-13e ได้เป็น *Bacillus velezensis* และ *Bacillus subtilis* ตามลำดับ (Figure 5)

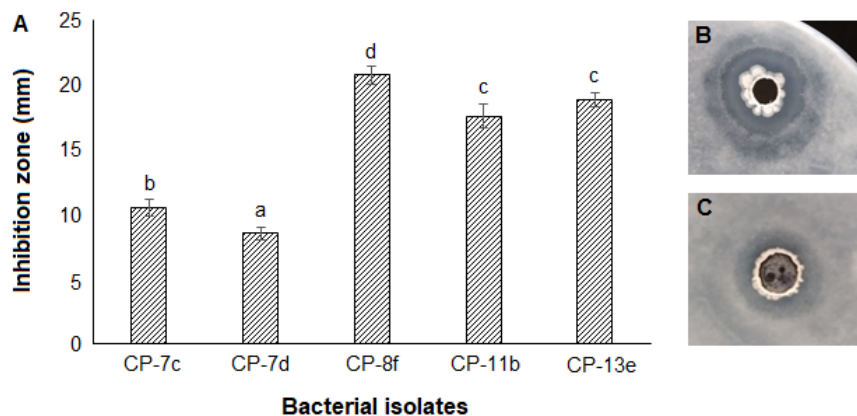


Figure 4 Antifungal activity of bacterial isolates against *P. aphanidermatum* ZP4 using the agar well diffusion assay

(A) Sizes of inhibition zones produced by different bacterial isolates [means with different letters are significantly different ($p < 0.01$)]; (B) Inhibition zone of the isolate CP-8f; (C) Inhibition zone of the isolate CP-13e

Table 1 Enzyme production of bacterial isolates

Bacterial isolates	Enzymatic index [hydrolysis zone diameter (mm)/colony diameter (mm)]			
	Protease	α -Amylase	Cellulase	Pectinase
CP-7c	2.30 $\pm$ 0.15 ^c	0.0 $\pm$ 0 ^a	1.23 $\pm$ 0.05 ^b	0.0 $\pm$ 0 ^a
CP-7d	1.76 $\pm$ 0.12 ^b	0.0 $\pm$ 0 ^a	0.0 $\pm$ 0 ^a	8.41 $\pm$ 0.08 ^b
CP-8f	2.70 $\pm$ 0.05 ^d	1.74 $\pm$ 0.07 ^b	3.43 $\pm$ 0.06 ^d	16.30 $\pm$ 0.04 ^d
CP-11b	1.52 $\pm$ 0.03 ^a	1.84 $\pm$ 0.05 ^b	0.0 $\pm$ 0 ^a	9.62 $\pm$ 0.05 ^c
CP-13e	2.28 $\pm$ 0.04 ^c	3.62 $\pm$ 0.04 ^c	2.83 $\pm$ 0.06 ^c	10.21 $\pm$ 0.03 ^c

Means with different superscript letters in a column are significantly different ($p < 0.01$).

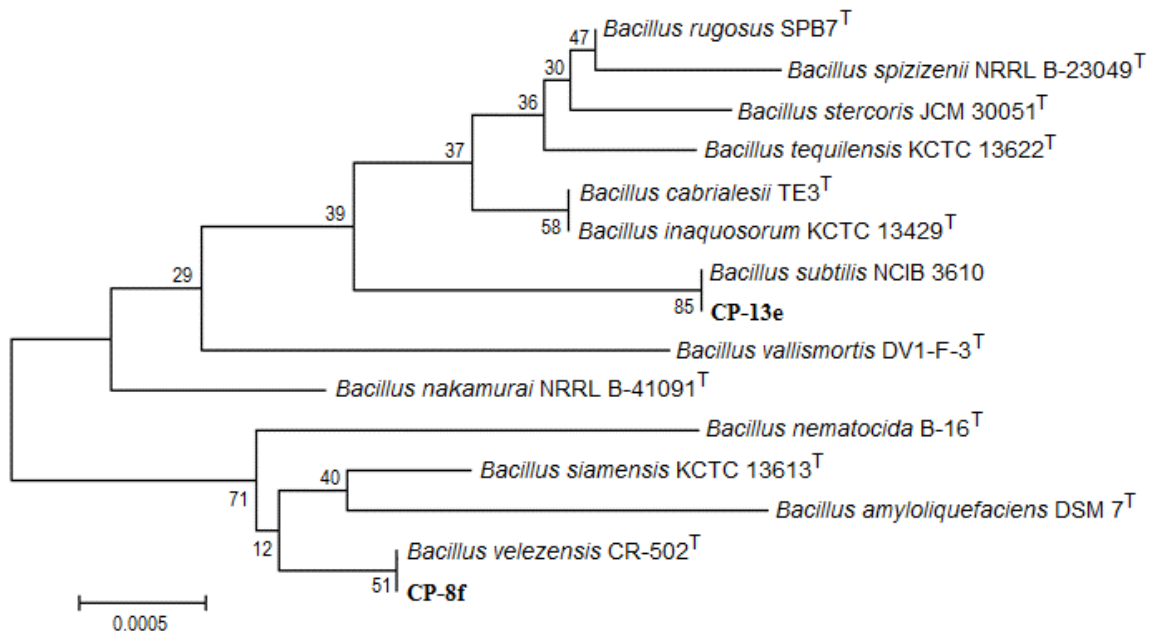


Figure 5 A phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of the isolates CP-8f and CP-13e. Numbers at nodes represent levels of bootstrap support (%) based on analysis of 1,000 replications. The scale bar represents an estimated 0.5 base substitutions per 1,000 nucleotide positions.

4. อภิปรายผลการวิจัย

ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมใช้ในการเป็นยาและเป็นส่วนประกอบในอาหารทั้งในไทยและหลายประเทศทั่วโลก แต่การเพาะปลูกซึ่งมักพบปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตระหว่างการเพาะปลูกที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งโรคที่พบมากคือโรคเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรากลุ่ม *Pythium* spp. [4] ในปัจจุบันนอกจากการใช้สารเคมีในการทำลายเชื้อราก่อโรคเหล่านี้แล้ว ยังมีการใช้สารทางชีวภาพที่มาจากแบคทีเรียในการทำลายราก่อโรคนี้ด้วย [2], [9] ซึ่งวิธีนี้เป็นทางเลือกที่ดีเพื่อลดการใช้สารเคมีและเป็นทางเลือกเพื่อความยั่งยืนในการเพาะปลูกซึ่งแบคทีเรียนี้นิยมนำมาใช้ในการยับยั้งราก่อโรคเน่าคือแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. [21] เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิดในการทำลายเชื้อก่อโรค

การศึกษานี้เริ่มจากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าในขิง โดยนำตัวอย่างขิงที่เป็นโรคนำมาแยกราก่อโรคด้วยวิธี Tissue transplant จากนั้นนำราก่อโรคที่แยกได้ไปทำการพิสูจน์โรคด้วยวิธี Koch's postulation พบว่าเชื้อราที่ก่อโรคได้รุนแรงที่สุดคือไอโซเลต ZP4 ซึ่งมีเส้นใยสีขาวฟูเมื่อเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และเมื่อจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ

ITS1-5.8S-ITS2 สามารถจำแนกได้เป็น *P. aphanidermatum* จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีราในสกุล (Genus) *Pythium* หลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคเน่าในขิง เช่น *P. myriotylum* [2] และ *P. aphanidermatum* [9] ข้อมูลเหล่านี้เป็นส่วนหนึ่งที่สนับสนุนว่าเชื้อรากลุ่ม *Pythium* spp. เป็นหนึ่งในกลุ่มเชื้อสาเหตุหลักของโรคเน่าในขิง

จากการแยกแบคทีเรียจากดินรอบ ๆ ขิงเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* ZP4 ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคเน่าในขิง พบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งรา *P. aphanidermatum* ZP4 โดยวิธี Dual culture technique จำนวน 11 ไอโซเลต และจากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion assay พบแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต (CP-7c, CP-7d, CP-8f, CP-11b และ CP-13e) ที่ผลิตแบคทีเรียอินฮิบิเตอร์ราก่อโรค แบคทีเรียอินฮิบิเตอร์ราก่อโรคโปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต สารดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด รวมทั้งราก่อโรค งานวิจัยของ Fira et al. [21] ได้ศึกษากลไกที่แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. ใช้ในการยับยั้งราก่อโรค ซึ่งกลไกหนึ่งคือการสร้างสารในกลุ่มแบคทีเรียอินฮิบิเตอร์ที่ออกฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ของรา และอีกกลไกหนึ่งคือการสร้างเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยสลายสารที่เป็น

องค์ประกอบในผนังเซลล์ของรา Goswami and Syiem [9] ได้ศึกษาความสามารถของ *Bacillus altitudinis* ที่แยกจากตัวอย่างดินในการยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเน่าเน่าในขิง และพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารเซอแฟกติน (Surfactin) เพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรค จากรายงานวิจัยที่กล่าวมาอาจเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนว่าสาเหตุที่ *Bacillus velezensis* CP-8f และ *Bacillus subtilis* CP-13e มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรค *P. aphanidermatum* ZP4 ได้ดีที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นนอกจากจะสามารถสร้างแบคทีเรียโอซินแล้ว ยังสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และเพคติเนส ได้ด้วย ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลตอื่นไม่สามารถสร้างสารดังกล่าวได้ครบทุกชนิด ผลการศึกษานี้อาจเป็นอีกหนึ่งข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนว่าเอนไซม์โปรติเอส แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และเพคติเนสที่สร้างโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. น่าจะมีส่วนช่วยในการยับยั้งราก่อโรค

แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการยับยั้งราก่อโรคเน่าเน่าในขิง *P. aphanidermatum* ZP4 ในงานวิจัยนี้ได้แก่ *Bacillus velezensis* CP-8f และ *Bacillus subtilis* CP-13e ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างสารชีวภาพได้หลากหลายชนิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ผ่านมาที่ศึกษาการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. ในการยับยั้งราก่อโรค ตัวอย่างเช่น การใช้ *Bacillus velezensis* ในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium myriotylum* สาเหตุโรคเน่าเน่าในขิง [2] การใช้ *Bacillus velezensis* [11], *Bacillus subtilis* และ *Bacillus flexus* [10] ในการยับยั้ง *Fusarium oxysporum* ที่เป็นเชื้อราสาเหตุโรคในพืชต่าง ๆ โดยพบว่ากลไกที่แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. ใช้ในการยับยั้งราก่อโรค คือ การสร้างเอนไซม์ไคติเนส เซลลูเลส เบต้ากลูแคนเนส และแอลฟาอะไมเลส [11] จากข้อมูลดังกล่าวมานี้สนับสนุนว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีศักยภาพในการนำไปใช้ควบคุมราก่อโรคในการเพาะปลูกขิงได้

5. บทสรุป

งานวิจัยนี้สามารถแยกรา *P. aphanidermatum* ZP4 ซึ่งเป็นราก่อโรคเน่าเน่าในขิงได้ และสามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคได้ด้วย โดยแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งรา *P. aphanidermatum* ZP4 ได้ดีที่สุดมี 2 ไอโซเลต คือ *Bacillus velezensis* CP-8f และ *Bacillus subtilis* CP-13e โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตดังกล่าวสามารถผลิต

แบคทีเรียโอซิน โปรติเอส แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และเพคติเนส ซึ่งสารเหล่านี้มีรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการยับยั้งราก่อโรคได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงชี้ให้เห็นว่า *Bacillus velezensis* CP-8f และ *Bacillus subtilis* CP-13e มีศักยภาพในการใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมราสาเหตุโรคเน่าเน่าในขิงได้ อย่างไรก็ตามหากจะนำแบคทีเรียดังกล่าวไปใช้จริงในอนาคต ควรมีการทดลองใช้ในการปลูกขิงระดับกระถาง ก่อนที่จะนำไปใช้จริงในแปลงปลูกต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

7. References

- [1] Mao, Q.Q. and et al. 2019. Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Foods**. 8(6): 185.
- [2] John, J., Mallikarjunaswamy, G.E. and Noushad, N. 2021. Probiotic rhizospheric *Bacillus* sp. from *Zingiber officinale* Rosc. Displays antifungal activity against soft rot pathogen *Pythium* sp. **Current Plant Biology**. 27(1): 100217.
- [3] Bureau of Agricultural Commodities Promotion and Management. 2021. **Ginger, Annual Report 2021, Vegetable and Mushroom Promotion Group**. <http://www.agriman.doae.go.th/home/news/2564/26ginger.pdf>. Accessed 9 September 2021. (in Thai).
- [4] Rai, M. and et al. 2018. Effective management of soft rot of ginger caused by *Pythium* spp. and *Fusarium* spp.: Emerging role of nanotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 102(1): 6827-6839.
- [5] Bamon, M. and et al. 2018. *In vitro* efficacy of bacterial endophytes against *Pythium* sp. causing soft rot of ginger in Meghalaya. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 7(8): 367-374.

- [6] Behera, S. and et al. 2020. *Pythium* soft rot management in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) - A review. **Current Journal of Applied Science and Technology**. 39(35): 106-115.
- [7] Daly, P. and et al. 2022. Genome of *Pythium myriotylum* uncovers an extensive arsenal of virulence-related genes among the broad-host-range necrotrophic *Pythium* plant pathogens. **Microbiology Spectrum**. 10(4): 1-26.
- [8] Cui, W. and et al. 2019. Biocontrol of soft rot of Chinese cabbage using an endophytic bacterial strain. **Frontiers in Microbiology**. 10: 1471.
- [9] Goswami, D. and Syiem, M.B. 2021. Biocontrol of *Pythium aphanidermatum* causing soft rot in ginger with biosurfactant produced by a rhizospheric *Bacillus* species. **Journal of Spices and Aromatic Crops**. 30(1): 69-80.
- [10] Jinal, N.H. and Amaresan, N. 2020. Evaluation of biocontrol *Bacillus* species on plant growth promotion and systemic-induced resistant potential against bacterial and fungal wilt-causing pathogens. **Archives of Microbiology**. 202: 1785-1794.
- [11] Myo, E.M. and et al. 2019. Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. **Biological Control**. 134: 23-31.
- [12] Xie, Z. and et al. 2021. Biocontrol efficacy of *Bacillus siamensis* LZ8 8 against brown spot disease of tobacco caused by *Alternaria alternata*. **Biological Control**. 154: 104508.
- [13] Tran, N.T. and et al. 2019. *Phyllosticta capitalensis* and *P. paracapitalensis* are endophytic fungi that show potential to inhibit pathogenic *P. citricarpa* on citrus. **Australasian Plant Pathology**. 48: 281-296.
- [14] Huzar-Novakowski, J. and Dorrance, A.E. 2018. Genetic diversity and population structure of *Pythium irregulare* from soybean and corn production fields in Ohio. **Plant Disease**. 102: 1989-2000.
- [15] Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. 33(1): 1870-1874.
- [16] Chandramohan, M. and et al. 2019. Production, characterization and optimization of fibrinolytic protease from *Bacillus pseudomycolides* strain MA02 isolated from poultry slaughter house soils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 22: 101371.
- [17] Ahmed, S.A. and et al. 2019. Application of one-factor-at-a-time and statistical designs to enhance α -amylase production by a newly isolate *Bacillus subtilis* strain-MK1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 22: 101397.
- [18] Ma, L. and et al. 2020. Screening of cellulolytic bacteria from rotten wood of Qinling (China) for biomass degradation and cloning of cellulases from *Bacillus methylotrophicus*. **BMC Biotechnology**. 20: 2.
- [19] Guo, F. and et al. 2019. Optimizing culture conditions by statistical approach to enhance production of pectinase from *Bacillus* sp. Y1. **BioMed Research International**. 2019: 8146948.
- [20] Kim, O. and et al. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 62: 716-721.
- [21] Fira, D. and et al. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**. 285: 44-55.