1st 8th INSCIC
Yala Rajabhat University
21-22 Feb 2023

PROCEEDING
รายงานสืบเนื่องจาก

การประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 8 และ การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 1

The 8th National Conference on Science and Technology 2023 (NSCIC2023) and
The 1st International Conference on Science and Technology 2023 (INSCIC2023)

วันที่ 21-22 กุมภาพันธ์ 2566
คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

รายงานสืบเนื่องจากงานประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 8 และ
งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 1
The 8th National Conference on Science and Technology 2023: NSCIC2023 and
the 1st International Conference on Science and Technology 2023: INSCIC2023

จัดพิมพ์โดย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
พิมพ์ครั้งที่ 1
ปีที่พิมพ์ 2566

เลขมาตรฐานสากลประจำหนังสืออิเล็กทรอนิกส์ 978-616-8297-28-5
ข้อมูลทางบรรณานุกรมของหอสมุดแห่งชาติ
National Library of Thailand Cataloging in Publication data

ISBN (e-book) 978-616-8297-28-5

สงวนลิขสิทธิ์โดย
มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
133 ถนนเทศบาล 3 ตำบลสะเตง อำเภอเมืองยะลา
จังหวัดยะลา 95000 โทรศัพท์ 073 299 699

จัดพิมพ์แบบ อิเล็กทรอนิกส์

การควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกจากก้านใบทุเรียนพื้นบ้าน ในการยับยั้งโรคเหี่ยวในพืช

Biocontrol of Endophytic Bacteria Isolated from Local Durian Petioles (*Durio* sp.) Against Fusarium Wilt in Plant

วารุณี หะยีมะสาและ[1*] จารุ นิคม[2] และยาสมี เลาหสกุล[1]
Warunee Hajimasalaeh[1*], Jani Nikom[2], and Yasmi Loushasakul[1]

[1]หลักสูตรชีววิทยาเทคโนโลยีและนวัตกรรม คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000
[2]ภาควิชาคณิตศาสตร์และวิทยาการคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี 94000

[1] Department of Biological Technology and Innovation, Faculty of Science Technology and Agriculture,
Yala Rajabhat University, Muang, Yala 95000, Thailand
[2] Department of Mathematics and Computer Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University,
Muang, Pattani 94000, Thailand
*Corresponding author, e-mail: warunee.h@yru.ac.th

บทคัดย่อ

ความเสียหายของผลผลิตทางการเกษตรเกิดขึ้นจากเชื้อก่อโรคพืช ซึ่งเป็นภัยคุกคามที่สำคัญต่อการผลิตอาหาร การใช้สารควบคุมทางชีวภาพที่ได้จากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาควบคุมเชื้อก่อโรคพืชได้ โดยเป็นกลไกการยับยั้งการติดเชื้อในพืชได้ ดังนั้นเป้าหมายหลักของงานวิจัยนี้จึงเป็นการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากก้านใบทุเรียนพื้นบ้าน และทดสอบประสิทธิภาพการต้านทานเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium* sp. สาเหตุของโรคเหี่ยวในพืชหลายชนิด ซึ่งพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลต และมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 3 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ คือ S1.1, S1.2 และ S1.6 โดยสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ร้อยละ 33.43, 36.29 และ 36.71 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA พบว่า มีความเหมือนกับ *Bacillus altitudinis*, *Enterobacter cloacae* และ *Bacillus stratosphericus* ตามลำดับ ที่ระดับความเหมือนร้อยละ 99 และคณะนักวิจัยได้ตั้งชื่อเป็น *B. altitudinis* YRU_ S1-1, *E. cloacae* YRU_S1-2 และ *B. stratosphericus* YRU_S1-6 จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากก้านใบทุเรียนพื้นบ้านมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้

คำสำคัญ : แบคทีเรียเอนโดไฟต์ เชื้อรา *Fusarium* sp. การควบคุมทางชีวภาพ

Abstract

Harvest loss of agricultural commodities due to pathogens is a serious problem that threatens global food production every year. Microbial biocontrol agents play a significant role in the control of plant pathogenic organisms. Biocontrol agents or antagonists keep pathogens from infecting the host plant. This important control mechanism has been proposed to be those that work exceptionally well against pathogens. The primary goal of this study was to isolate endophytic bacteria from the petioles of local durian cultivar and examined their antimicrobial activity against the fungal plant pathogen *Fusarium* sp. causes Fusarium wilt diseases in several plant species. Eleven endophytic bacteria were isolated. Three isolates of endophytic bacteria, including S1.1, S1.2 and S1.6, inhibited *Fusarium* sp. with percentage inhibition of radial growth (PIRGs) of 33.43, 36.29 and 36.71, respectively. The full legth 16s rRNA gene

sequence results showed that the bacteria are 99% identical was *Bacillus altitudinis*, *Enterobacter cloacae* and *Bacillus stratosphericus* and it was named by the researchers as *B. altitudinis* YRU_S1-1, *E. cloacae* YRU_S1-2 and *B. stratosphericus* YRU_S1-6, respectively. These findings suggested that endophytic bacteria isolated from the petioles of a local durian plant have potentials that could be used to manage the fungal phytopathogen *Fusarium* sp.

Keywords: Endophytic bacteria, *Fusarium* sp., Biocontrol

บทนำ

โรคระบาดในพืชเป็นปัญหาสำคัญที่ควรได้รับการจัดการที่เหมาะสม โดยไม่กระทบต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งเมื่อมีการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคพืช เกษตรกรนิยมป้องกันและกำจัดโรคด้วยสารเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และสามารถลดการระบาดของโรคที่เกิดขึ้นอย่างได้ผล แต่มักก่อให้เกิดปัญหาตามมา เช่น เกิดอันตรายโดยตรงต่อเกษตรกร อันตรายจากสารตกค้างในผลผลิตต่อผู้บริโภค ทำลายระบบนิเวศ และก่อให้เกิดการต้านทานของเชื้อโรค เป็นต้น โดยปัญหาเรื่องสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรยังเป็นอุปสรรคต่อการส่งออก และมีผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ทั้งนี้จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสารทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเพื่อให้สอดคล้องกับสถานการณ์ปัจจุบันมากขึ้น ทำให้มีการพยายามคิดค้นวิธีการใหม่ๆ มาใช้ควบคุมการระบาดของโรคพืชแทนการใช้สารเคมี ซึ่งการควบคุมทางชีวภาพ (Biological Control) เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนสารเคมีได้ โดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืช (เกษม, 2551) สำหรับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผู้วิจัยทำการศึกษา คือ แบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชเจ้าบ้านแบบภาวะพึ่งพากัน (mutualism) และภาวะอิงอาศัยหรือเกื้อกูล (commensalism) (Ryan *et al*., 2008) มีคุณประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้พืชทนความแห้งแล้ง ความเค็มและโลหะหนัก และส่งเสริมให้พืชทนทานต่อแมลงศัตรูพืช เชื้อก่อโรคพืช เป็นต้น (Chen *et al*., 2012; Singh *et al*., 2017) สำหรับกลไกการป้องกันเชื้อก่อโรคพืชด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์มีทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยกลไกการป้องทางตรงเป็นการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟต์กับเชื้อก่อโรคพืช ตัวอย่างเช่น การผลิตสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชในรูปแบบสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ เปปไทด์ ควิโนน แอลคาลอยด์ ฟีนอล สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และ โพลีคีไทด์ เป็นต้น ทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์และโปรตีนของเชื้อก่อโรคพืชได้ (Mousa and Raizada, 2013; Lugtenberg *et al*., 2016) หรือการหลั่งเอนไซม์ไลติค (Lytic enzymes) ได้แก่ cellulases และ hemicellulase เป็นต้น ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคพืชได้ การแข่งขันในการแย่งชิงสารอาหารและพื้นที่อาศัย และการผลิตไซเดอโรเฟอร์ (siderophore) ซึ่งส่งผลกระทบต่อการดูดซึมธาตุเหล็กของเชื้อก่อโรคพืช (Fadiji and Babalola, 2020) ส่วนกลไกการป้องกันทางอ้อมเป็นการส่งเสริมให้เกิดการป้องกันตนเองของพืช โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคพืช ซึ่งมี 2 รูปแบบ คือ induced systemic resistance (ISR) เป็นการสังเคราะห์และสะสม oxidative enzyme และสาร phytoalexins เพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคพืช และ systemic acquired resistance (SAR) เป็นการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน pathogenesis-related (PR protein) ในพืช ทำหน้าที่ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช (Fadiji and Babalola, 2020)

ตัวอย่างแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการต้านทานหรือการควบคุมเชื้อก่อโรคในพืช เช่น แบคทีเรียสกุล *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia* และ *Stenotrophomonas* ที่คัดแยกจากต้น *Hypericum perforatum* และต้น *Ziziphora capitata* มีความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (Egamberdieva *et al*. 2017) หรือการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าว ได้แก่ *Helminthosporium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium fujikuroi* และ *Pyricuralia oryzae* ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวหอมปทุมธานี 1 และข้าวสังข์หยด (วรัญญา, สุรพล, และดวงแขฑิตา, 2563) *Chryseobacterium kwangyangense* เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากผลเงาะมีความสามารถป้องกันเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช (สมคิดและวีรพงศ์, 2558) และความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าวและสัปปะรดที่เพาะเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. *Klebsiella* sp. สามารถ

แสดงกิจกรรมการต้านเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ *Ascomycetes* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. และ *Rhizopus nigricans* (ฉัตรฎา, 2559) เป็นต้น

จากปัญหาการระบาดของเชื้อรา *Fusarium* sp. ส่งผลกระทบรุนแรงและสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตอย่างกว้างขวาง เชื้อรานี้เป็น soil borne fungi และเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ ได้แก่ โรคเหี่ยว (fusarium wilt) สร้างความเสียหายแก่ผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ และพืชไร่หลายชนิด เช่น กล้วย กาแฟ มะเขือเทศ เป็นต้น โดยเข้าทำลายพืชบริเวณที่อยู่เหนือดิน และลำต้น ทำให้เกิดโรคทางระบบท่อลำเลียงของพืช ส่งผลให้เกิดโรคเน่าในหัว เหง้า และรากพืช เชื้อรานี้สามารถแพร่กระจายได้ทุกพื้นที่ทั่วโลก ทั้งในเขตอบอุ่น เขตร้อนชื้น และเขตหนาว โดยเฉพาะในดินเขตร้อนและในเรือนกระจก (อภิรัชตและคณะ, 2555; Booth, 1971) โดยสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคในพืชแต่ละชนิด จะมีชนิดต่างกัน เช่น โรคตายพรายของกล้วย มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. cubense โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. lycopersici และโรคเหี่ยวในพืชตระกูลแตง จากเชื้อรา *F. oxysporum f.sp. melinis* เป็นต้น (อภิรัชตและคณะ, 2555) นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2563 มีรายงานการเกิดโรคกิ่งแห้งของทุเรียนหมอนทองจากพื้นที่ปลูกทุเรียนในเขตจังหวัดชุมพร จันทบุรี และตราด ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *F. solani* เข้าทำลายบริเวณกิ่ง ทำให้ท่อลำเลียงน้ำและอาหารถูกทำลาย น้ำจากรากที่ถูกลำเลียงขึ้นมาไปเลี้ยงกิ่งและใบไม่ได้ ทำให้กิ่งแห้ง แผลแห้ง สีน้ำตาลเข้มถึงน้ำตาลอ่อน เนื้อแผลด้านในสีน้ำตาลอ่อน อาการแผลสีน้ำตาลบริเวณลำต้น ใบเหลืองและแห้ง ร่วง และต้นตายในที่สุด (รัติยาและคณะ, 2563) จากรายงานนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อรา *F. solani* สามารถทำความเสียหายให้กับทุเรียนได้เช่นกัน

จากรายงานความเสียหายที่เกิดจากการติดเชื้อรา *Fusarium* sp. และเกษตรกรจัดการปัญหาการระบาดด้วยสารเคมีเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจพัฒนาการควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวในพืชหลายชนิดด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากก้านใบทุเรียนบ้านจากตำบลลำพะยา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา ในเบื้องต้นเป็นการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธี dual culture ระดับห้องปฏิบัติการ สำหรับเป็นแนวทางในการพัฒนาชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไปใช้ในการควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อรา *Fusarium* sp. ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากก้านใบทุเรียนบ้านและศึกษาประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. และระบุสายพันธุ์แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากก้านใบของต้นทุเรียนบ้าน

ทำการเก็บตัวอย่างใบทุเรียนบ้านจากต้นทุเรียนบ้านที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค และออกผลทุกๆ ปี ในตำบลลำพะยา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา เก็บใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อแล้วมาล้างให้สะอาด ฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวใบด้วย 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เป็นเวลา 30 และ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นทำความสะอาดด้วยสารละลาย NaOCl เป็นเวลา 4 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ สำหรับวิธีการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ดัดแปลงจาก de Almeida Lopes et al. (2016) โดยนำตัวอย่างก้านใบมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และบดให้ละเอียด เติมสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพื่อให้แบคทีเรียแขวนลอย แล้วทำการเจือจางตัวอย่างแบบ ten-fold dilution จากนั้น spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันเพื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรม จากนั้นทำให้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp.

2. การคัดแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธี tissue transplanting method

สำหรับวิธีการคัดแยกเชื้อราก่อโรคพืชได้ดัดแปลงจากเบญจพล ศรีทองคำและจินตนา อันอาตม์งาม (2558) โดยวิธีการคัดแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. จากขั้วหวีกล้วยหอมทองที่แสดงอาการของโรคขั้วหวีเน่า ทำการตัดเนื้อเยื่อขั้วหวีเน่าขนาด 5×5 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย NaOCl เป็นเวลา 5 นาที นำมาวางในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ศึกษารูปร่างสัณฐานของเชื้อรา *Fusarium* sp. โดยการย้อมด้วยสี lactophenol cotton

blue เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธี dual culture

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปวางในแนวตรงข้ามกับรอยขีดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร แบคทีเรียเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลต ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp. ในชุดควบคุมและชุดทดสอบเพื่อทำการคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง (percent inhibition of radial growth - PIRG) ตามวิธีการของ Skidmore and Dickinson (1976) จากสูตร

$$\text{ร้อยละของการยับยั้ง (PIRG)} = [(R1-R2)/R1]x100$$

กำหนดให้ R1 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp. ในชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp. ในชุดทดสอบ

4. การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ 16s rRNA และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

วิธีการดัดแปลงจากจุฬารัตน์ หน่อแก้ว และคณะ (2564) ดังนี้ นำส่งแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ 16s rRNA และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ผ่านทางบริษัท Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนยีน 16s rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers คือ 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3) และ 1492R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') โดยลำดับดีเอ็นเอยีน 16s rRNA ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจาก phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbour-joinng

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากก้านใบของต้นทุเรียนบ้าน

จากการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากก้านใบทุเรียนบ้านในตำบลลำพะยา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์เบื้องต้นได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 4 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมบวก 7 ไอโซเลต ส่วนลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA มีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

2. การคัดแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธี tissue transplanting method

เชื้อรา *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากขั้วหวีกล้วยหอมทองที่แสดงอาการของโรคขั้วหวีเน่า ลักษณะโคโลนีเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาวอมม่วง เส้นใยฟู (ภาพที่ 1A) ส่วนลักษณะรูปร่างของแมคโครโคนิเดีย (macroconidia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า รูปร่างเรียวยาว โค้ง ปลายเซลล์มน และไมโครคอนีเดีย (microconidia) ลักษณะสั้น หัวท้ายมน (ภาพที่ 1B)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธี dual culture

เมื่อนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 11 ไอโซเลต มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธี dual culture พบว่า มีเพียง 3 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. คือ ไอโซเลต S1.1, S1.2 และ S1.6 (ภาพที่ 2) โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp. เท่ากับร้อยละ 33.43, 36.29 และ 36.71 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราของทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยวิธี one way ANOVA

4. การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ 16s rRNA และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

ในการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต S1.1, S1.2 และ S1.6 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16s rRNA แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* *Enterobacter cloacae* และ *Bacillus stratosphericus* ตามลำดับ และทางคณะผู้วิจัยได้ปรับชื่อไอโซเลตที่ได้เป็น *Bacillus altitudinis* YRU_S1-1, *Enterobacter cloacae* YRU_S1-2 และ *Bacillus stratosphericus* YRU_S1-6 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3)

อภิปรายผลการวิจัย

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกจากก้านใบของทุเรียนบ้านด้วยวิธี dual culture และจากการระบุสายพันธุ์ด้วยวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ 16s rRNA ของไอโซเลต S1.1, S1.2 และ S1.6 พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. เท่ากับร้อยละ 33.43, 36.29 และ 36.71 ตามลำดับ และปรับชื่อแต่ละไอโซเลตเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *B. altitudinis* YRU_S1-1, *E. cloacae* YRU_S1-2 และ *B. stratosphericus* YRU_S1-6 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของชุดทดสอบ พบการหยุดหรือยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา เทียบกับชุดควบคุมที่มีการเจริญของเส้นใยครอบคลุมเต็มจานเพาะเชื้อ คาดว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์หลั่งสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิออกมานอกเซลล์ในรูปแบบ extracellular fluid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจจะเป็นสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ที่สามารถต้านการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ *B. altitudinis* YRU_S1-1 และ *B. stratosphericus* YRU_S1-6 มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด (Ongena and Jacques, 2008) เช่น *Bacillus* spp., *B. subtilis*, *B. altitudinis*, *B. stratosphericus* เป็นต้น ทำให้มีหลายงานวิจัยนำแบคทีเรียสกุล Bacillus มาใช้ประโยชน์ทางด้านการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช ได้แก่ *Bacillus* spp. SM1 และ *Bacillus* spp. LPDD3-2 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพาราได้ร้อยละ 66.43 และ 54.29 ตามลำดับ โดยทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะผิดปกติ เช่นเดียวกับลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า ผนังเซลล์เส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* เป็นรูเกิดรอยย่นบนพื้นผิวบริเวณที่เซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เกาะติดอยู่ (ศุภรัตน์และคณะ, 2564) หรือการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* SP20 ที่แยกได้จากดินจอมปลวกในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุของโรคผลเน่าในฝรั่ง โดยพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ร้อยละ 72.4 (ศิริพรและคณะ, 2562) อีกทั้งรายงานของ Cao *et al* (2011) ในการใช้ *B. subtilis* SQR9 ในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวในพืชหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับเรือนทดลองได้ดี เช่นเดียวกับรายงานประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. altitudinis* JSCX-1 ในการลดการติดเชื้อรา *Phytophthora sojae* ในต้นถั่วเหลือง และมีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. sojae* ด้วยอัตราการยับยั้งเท่ากับ 63.94±3.94 เปอร์เซ็นต์ (Lu *et al*., 2017) และมีรายงานการคัดแยกแบคทีเรีย *B. stratosphericus* LW-03 จากหัวของลิลลี่ (*Lilium wardii*) เมื่อนำมาทดสอบการต้านเชื้อราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Botryosphaeria dothidea Botrytis cinerea F. fujikuroi* และ *F. oxysporum* โดยวัดการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าว พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. dothidea*, *B. cinerea*, *F. fujikuroi* และ *F. oxysporum* ได้ 74.56±2.35, 71.91±2.87, 69.54±2.73 และ 65.13±1.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นั่นแสดงว่า *B. stratosphericus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชดังกล่าวได้ โดยสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิที่หลั่งออกมาจากเซลล์เป็นกลุ่มของสารต้านจุลินทรีย์ เช่น สาร 4-hydroxy-2-nonenylquinoline N-oxide และสาร sphingosine ceramides เป็นต้น (Khan *et al*., 2020) เช่นเดียวกับความสามารถของ *B. stratosphericus* ที่แยกได้จากดินในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Urkholderia glumae*, *Xanthomonas oxyzae* pv. Oryzae, *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum* และ *Ralstonia solanacearum* (Durairaj *et al*., 2017)

ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *E. cloacae* YRU_S1-2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. เช่นเดียวกับความสามารถของ *E. cloacae* ที่แยกได้จากรากของพืชสกุลส้มมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุของโรคเน่าคอดิน (damping-off) ในต้นแตงกวา ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 5 มิลลิเมตร และสามารถทำให้เส้นใยของ *P. Aphanidermatum* ผิดปกติและหดตัวเมื่อพิจารณาภายใต้กล้องอิเลคตรอนแบบส่องกราด เมื่อทำการทดสอบในระดับเรือน

ทดลองพบว่าต้นกล้าของแตงกวามีอัตราการรอดสูงถึง 73 เปอร์เซ็นต์ (Kazerooni *et al*., 2020) สอดคล้องกับฤทธิ์ในยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่ก่อโรคเน่าคอดิน (damping-off) ในต้นมะเขือเทศ สามารถลดการเกิดโรคได้ 85 เปอร์เซ็นต์ในระดับเรือนทดลอง (Yuliar *et al.,* 2019)

ตารางที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาและชนิดแกรมของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกจากก้านใบของทุเรียนบ้าน

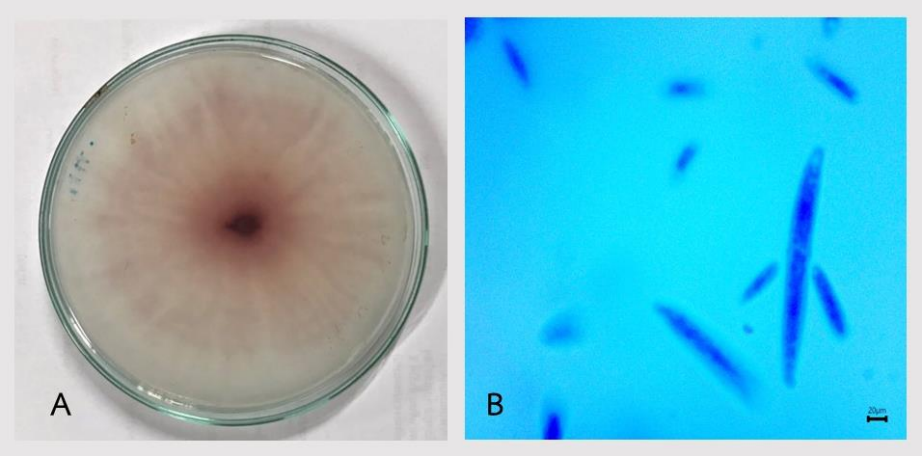
ลำดับที่	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	ชนิดแกรม
1	S1.1	สีน้ำตาลอ่อน รูปร่างกลม ขอบเรียบ	ท่อน	+
2	S1.2	สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขอบเรียบ	กลม	-
3	S1.3	สีขาวขุ่น รูปร่างกลม ขอบขรุขระ	ท่อน	+
4	S1.5	สีเหลืองเข้ม รูปร่างกลม ขอบขรุขระ	ท่อน	-
5	S1.6	สีขาวขุ่น รูปร่างกลม ขอบขรุขระ	ท่อน	+
6	S2.1	สีส้ม รูปร่างกลม ขอบขรุขระ	ท่อน	-
7	S2.2	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	กลม	+
8	S2.3	สีเหลืองขุ่น รูปร่างกลม ขอบเรียบ	กลม	+
9	S2.4	สีขาวขุ่น รูปร่างกลม ขอบเรียบ	กลม	+
10	S2.5	สีเหลืองขุ่น รูปร่างกลม ขอบเรียบ	ท่อน	+
11	S3.1	สีขาวขุ่น ขอบขรุขระ	ท่อน	-

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp.

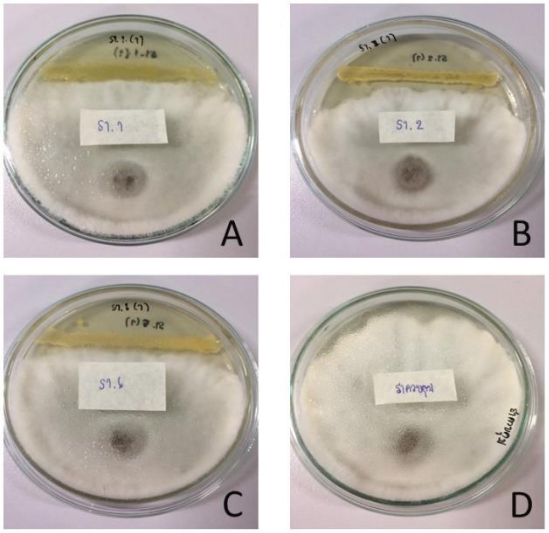
ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
S1.1	33.43±1.87
S1.2	36.29±2.13
S1.6	36.71±2.22

ตารางที่ 3 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA

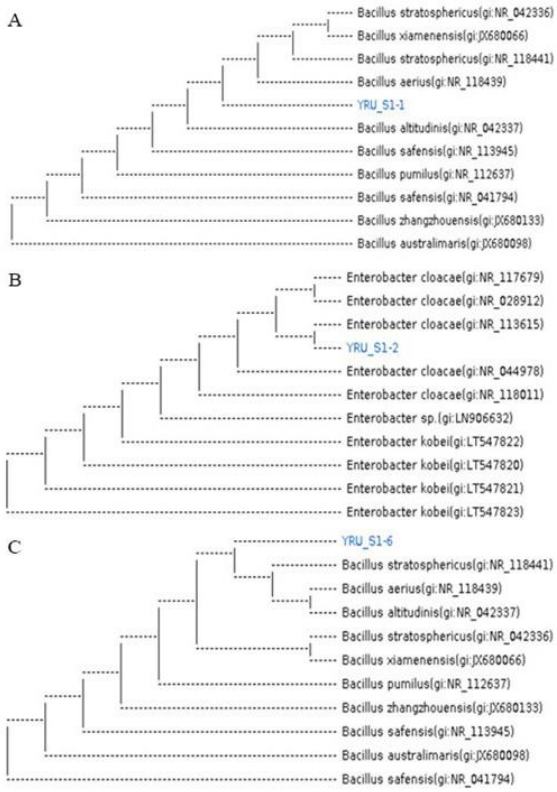
ไอโซเลต	สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	Accession number	การตั้งชื่อใหม่
S1.1	*Bacillus altitudinis*	99	NR_042337.1	*Bacillus altitudinis* YRU_S1-1
S1.2	*Enterobacter cloacae*	99	CP_001918.1	*Enterobacter cloacae* YRU_S1-2
S1.6	*Bacillus stratospericus*	99	NR_042336.1	*Bacillus stratosphericus* YRU_S1-6



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีและโคนีเดียของเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากขั้วหวีกล้วยหอมทองที่เป็นโรคขั้วหวีเน่า (A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (B) ลักษณะแมคโครโคนีเดียและไมโครโคนีเดีย



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลต โดย (A) S1.1 (B) S1.2 (C) S1.6 และ (D) เชื้อรา *Fusarium* sp. เป็นชุดควบคุม



ภาพที่ 3 phylogenetic tree ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลต โดย (A) S1.1 (B) S1.2 และ (C) S1.6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการคัดแยกและทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากก้านใบทุเรียนพื้นบ้านในพื้นที่ตำบลลำพะยา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา พบว่า มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 3 ไอโซเลต คือ S1.1, S1.2 และ S1.6 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. สาเหตุของโรคเหี่ยวในพืช เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 33.43, 36.29 และ 36.71 ตามลำดับ ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราของทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 3 ไอโซเลต มีความเหมือนกับ *B. altitudinis*, *E. cloacae* และ *B. stratosphericus* ตามลำดับ และทางคณะผู้วิจัยได้ปรับชื่อไอโซเลตที่ได้ ดังนั้น *Bacillus altitudinis* YRU_S1-1, *Enterobacter cloacae* YRU_S1-2 และ *Bacillus stratosphericus* YRU_S1-6 จากความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. นั่นแสดงว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้มีความสามารถในการควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อราก่อโรคเหี่ยวในพืชได้ ควรมีการวิเคราะห์ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แบคทีเรียเอนโดไฟต์สร้างขึ้น และการทดสอบเพิ่มเติมในพืชระดับเรือนทดลอง เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ในการควบคุมทางชีวภาพต่อการระบาดของโรคเหี่ยวในพืชทดแทนสารเคมีกำจัดเชื้อราต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาชายแดนภาคใต้ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยงบบำรุงการศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2564 ในการดำเนินการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. (2551). *เทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
จุฬารัตน์ หน่อแก้ว วันพร เข็มมุกด์ โรเบิร์ต เจมส์ แมกกอฟเวิ่น และ ชัยวัฒน์ โตอนันต์. (2564). การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Fusarium fujikuroi* สาเหตุโรคถอดฝักดาบข้าว. *วารสารแก่นเกษตร*, *49*(1), 144-154.

ฉัตรชฎา กันทะเรียน. (2559). *การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

เบญจพล ศรีทองคำ และ จินตนา อันอาตม์งาม. (2558). การจำแนกเชื้อรา *Fusarium* species จากพืชอาศัยต่าง ๆ ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, *46*(3), 309-320.

รัติยา พงศ์พิสุทธา ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากลุ สัณฐิติ บินคาเดอร์ กนกพร ฉัตรไชยศิริ และพัชรี บุญเรืองรอด. (2563). การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุของโรคกิ่งแห้งของทุเรียน. *วารสารแก่นเกษตร*, *48*(4), 703-714.

วรัญญา พริ้งแป้น สุรพล ฐิติธนากลุ และดวงแขพิตา กาญจนโสภา. (2563). ประสิทธิภาพของเอนโดไฟติกแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและศักยภาพการควบคุมเชื้อราก่อโรคข้าว. *วารสารแก่นเกษตร*, *48*(1), 325-330.

ศิริพร ทิพย์สิงห์ สถิตย์ พันวิไล จรัญ ประจันบาล และรัชนู เมยดง. (2562). ประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. จากดินจอมปลวกในการต้านรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุของโรคผลเน่าในฝรั่ง. *วารสาร Veridian E-Journal Science and Technology*, *6*(2), 1-14.

ศุภรัตน์ สังข์ทอง อัจฉรา เพ็งหนู และภวิกา บุณยพิพัฒน์. (2564). ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อราในดิน *Rigidoporus microporus* ภายใต้สภาพควบคุม. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*, *8*(1), 34-43.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี ธารทิพย ภาสบุตร และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ. (2555). *การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อรา Fusarium oxysporum สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic Fusarium) ในการควบคุมเชื้อรา Fusarium oxysporum*. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Booth, C. (1971). The Genus Fusarium. The Eastern Press Limited, London.

Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B. & Shen, Q. (2011). *Bacillus subtilis* SQR 9 can control Fusarium wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, *47*(5), 495–506.

Chen, L., Luo, s., Chen, J. L., Wan, Y., Liu, C., Liu, Y. T., Pang X. Y., & Zeng G. M. (2012). Diversity of endophytic bacterial populations associated with hyperaccumulator plant *solanum nigrum* L. grown in mine tailings. *Applied soil Ecology*, *62*, 24-30.

de Almeida Lopes K. B., Carpentieri-Pipolo V., Oro T. H., Stefani Pagliosa E. & Degrassi G. (2016). Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. *Journal of Applied Microbiology*, *120*, 740–755.

Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J. H., Chang, W. S., Park, Y.J., Senthilkumar, P., Choi, K. M., Lee, J. H. & Oh, B. T. (2017). Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting throughboth induced plant resistance and direct antagonism. *FEMS Microbiology Letters*, *364*, 1-8.

Egamberdieva, D., Wirth, S., Behrendt, U., Ahmad, P. & Berg, G. (2017). Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 199.

Fadiji, A.E. & Babalola, O.O. (2020). Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities with Multifunctional Prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*:467.

Khan, M.S., Gao, J., Zhang, M., Chen, X., Moe, T.S., Du, Y., Yang, F., Xue, J. & Zhang, X. (2020). Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic bacteria *Bacillus stratosphericus* LW-03 from *Lilium wardii*. *3 Biotech*, *10*, 1-15.

Kazerooni, E.A., Al-Shibli, H., Nasehi, A. & Al-Sadi, A.M. (2020). Endophytic *Enterobacter cloacae* exhibits antagonistic activity against Pythium damping-off of cucumber. *Ciência Rural*, *50*:8.

Lu, X., Zhou, D., Chen, X., Zhang, J., Huang, H. & Wei, L. (2017). Isolation and characterization of *Bacillus*

altitudinis JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean [Glycine max (L.) Merr.]. *Plant Soil*, *416*, 1-14.

Lugtenberg, B. J., Caradus, J. R., and Johnson, L. J. (2016). Fungal endophytes for sustainable crop production. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*, 1–17.

Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*, *4*:65.

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, *16*, 115–125.

Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A. & Ryan, D.J. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, *278*, 1-9.

Singh, M., Kumar, A., Singh, R. & Pandey, K.D. (2017). Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech*, *7*(315), 1-14.

Skidmore, A.M. & Dickinson, C.H. (1976). Colony interaction and hyphal interference between Septoria nodorum and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, *66*, 57-64.

Yuliar, Kartadi, S.F. & Salmah, A. (2019). Combined use of *Enterobacter cloacae* MB20 and the microelements of copper and manganese to control damping-off of tomato. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *308*.