โรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวและการควบคุมโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์
Fruit Rot Disease of Rambutan and Its Control by Bacterial Antagonist

บุญญวดี จิระวุฒิ อมรา ชินภูติ รัตตา สุทธยาคม
Boonyawadee Chirawut Amara Chinaphuti and Ratta Suttayakom

ABSTRACT

Fruit rot disease caused by *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. and Phomopsis sp. is the major problem to reduce quality and shelf life of harvested rambutan fruits. This research was conducted to determine the effectiveness of bacterial antagonists to control fruit rot disease in rambutan fruit. Ten isolates of bacterial antagonists were isolated from peanut, dried longan, crown of banana and red kidney bean. The pre-inoculated treatment was conducted by spraying 10 isolates of bacterial antagonists with concentration at 10^8 cfu/ml on *L. theobromae* inoculated rambutan fruits for 18 h which compared to water or imazalil at 500 mg/l spraying (as control). The results showed that isolates of DL9, PN10 and DL7 could inhibit disease severity by 57.82, 55.82 and 52.97 % respectively, whilst imazalil at 500 mg/l inhibited the disease severity only 16.91% and 0% for water treatment. Then the isolates of PN10, DL7 and DL9 were identified as *Bacillus* spp. which were gram-positive rods, endospore-forming and catalase positive. API test kit and molecular analysis were used to identify these 3 isolates. The 16S rDNA gene sequence of DL7 strain was 100 % similar to *Bacillus siamensis* and PN10 and DL9 were closely related to *B. siamensis* and *B. amyloliquefaciens* sub sp. *plantarum* (99.91 and 99.86 % identity, respectively). After that crude extract were tested for cytotoxicity against Vero cell (African green monkey kidney), cytotoxic was not found. Subsequently, each bacterial antagonist strains were individually developed into 3- different powder formulations. After 6 months storage at room temperature, the result showed that the formulation of 100 g rice flour mixed with 1 ml soybean oil and 10 g sucrose was the best carrier to maintain bacterial survival. The survivals of PN10, DL7 and DL9 were 7.55 x 10^8, 3.73 x 10^8 and 8.53 x 10^7 cfu/g respectively. The efficacy of this bio- agent formulation to control rambutan fruit rot disease was not significantly different from using antagonist directly.

Key words: antagonist, *Bacillus*, fruit rot disease, rambutan

กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
Post-Harvest and Products Processing Research and Development Division

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าของเงาะ สาเหตุเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้คุณภาพของผลเงาะลดลง อายุการเก็บรักษาสั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ โดยแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากเมล็ดถั่วลิสง ลำไยอบแห้ง ขั้วหวีของกล้วย และเมล็ดถั่วแดง ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 10 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* เป็นเวลา 18 ชม. หลังจากนั้นพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เปรียบเทียบกับพ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) และอิมาซาลิล 500 มก./ล. พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL9, PN10 และ DL7 สามารถยับยั้งความรุนแรงโรคผลเน่าของเงาะได้ 57.82, 55.82 และ 52.97 % ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าอิมาซาลิล 500 มก./ล. จากการจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างเอ็นโดสปอร์ และสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาจัดจำแนกชนิดด้วยชุดตรวจสอบ API test kit และ เทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า สายพันธุ์ DL7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* 100.00 % ส่วน PN 10 และ DL 9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย 2 ชนิด 99.91 และ 99.86% ได้แก่ *Bacillus siamensis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* sub sp. *plantarum* เมื่อนำสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิง (African green monkey kidney) จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ มาพัฒนาชีวภัณฑ์ผง 3 สูตร หลังจากเก็บชีวภัณฑ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรชีวภัณฑ์ที่มีส่วนผสมแป้งข้าวเจ้า 100 ก. น้ำมันถั่วเหลือง 1 มล. และซูโครส 10 ก. มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 สูง เท่ากับ 7.55 x 10^8, 3.73 x 10^8 และ 8.53 x 10^7 cfu/g ตามลำดับ และชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่ปลูกเชื้อรา *L. theobromae* ได้ดีเช่นเดียวกับการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยตรง

คำสำคัญ: เงาะ แบคทีเรียปฏิปักษ์ บาซิลัส โรคผลเน่า

บทนำ

เงาะ (*Nephelium lappaceum* L.) เป็นผลไม้ที่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั้งภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศ สาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว คือการเข้าทำลายของเชื้อราและก่อให้เกิดอาการผลเน่า (สมศิริและคณะ, 2540) มีรายงานว่า พบเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะหลังเก็บเกี่ยวหลายชนิด ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Greeneria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. (บุญญวดีและสุภา, 2552) ก่อให้เกิดอาการผลเน่าเป็นจุดสีน้ำตาล และเน่าลามอย่างรวดเร็วทั่วทั้งผล

การควบคุมโรคผลเน่าในปัจจุบันให้ความสำคัญกับการลดการใช้สารเคมีในขบวนการผลิตตั้งแต่แปลงปลูกจนถึงผู้บริโภค การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรค ที่มีความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค วารินและคณะ (2548) ได้ทดสอบเชื้อรา *Trichoderma harzianum* จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของแตงกวา พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* ได้สูง 79 % และใช้สารสกัดจากเชื้อรา *T. harzianum* strain T- 35-wt ความเข้มข้น 1,000 มก./กก. ควบคุมโรคผลเน่าของเงาะพันธุ์โรงเรียน พบว่า สารสกัดมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค โดยพบความรุนแรงของโรคเพียง 12.5 % ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม (เมทานอล ความเข้มข้น 2 %) มีความรุนแรงของโรค 79.5 % ทัศวรรณ (2547) ได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ผิวพืชจากส่วนต่าง ๆ ของต้นเงาะทรงพุ่ม ในการควบคุมการเกิดโรคผลเน่าที่เกิดจากรา *L. theobromae* พบว่า ยีสต์ *Candida krusei* (ไอโซเลท 44-52/2) แสดงประสิทธิภาพดีในการควบคุมการเกิดโรค เมื่อมีการใช้ยีสต์ก่อนการปลูกเชื้อราสาเหตุของโรค สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 42.6 % นอกจากนี้มีการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารต้านเชื้อรา ควบคุมโรคผลเน่าหลังเก็บเกี่ยวผลไม้หลายชนิด เช่น การใช้แบคทีเรีย *Bacillus amyloliqufaciens* PPCB004 ร่วมกับน้ำมันตะไคร้ในสภาพบรรยากาศดัดแปร ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลพีช (Arrebola *et al.*, 2010b) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ และการผลิตชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ

นำผลเงาะที่เน่าเสียหลังเก็บเกี่ยวมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าด้วยวิธี tissue transplanting โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ ทำการแยกเชื้อราจนได้เชื้อบริสุทธิ์ และจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

2. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์

2.1 การแยกแบคทีเรียจากผลิตผลเกษตร

แยกแบคทีเรียจากผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ ลำไยอบแห้ง ถั่วลิสง ถั่วแดง และขั้วหวีกล้วยหอม นำชิ้นเนื้อเยื่อหรือเมล็ดแช่ในคลอรอกซ์ 10 % นาน 5 นาที วางชิ้นเนื้อเยื่อหรือเมล็ดในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา สังเกตจากบริเวณยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้น

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพสารจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการงอกของ สปอร์เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำแบคทีเรียมาขีดเป็นเส้น 3 เส้น ห่างเท่ากัน ในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีสารจากแบคทีเรีย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มล. นำมาวางในอาหาร PDA ที่ผสมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ 4 จุด บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม. บันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ

นำผลเงาะที่สมบูรณ์ และไม่เป็นโรค จากสวน จ. จันทบุรี ทำแผลโดยการตัดขนเงาะ 1 เส้น ปลูกเชื้อรา *L. theobromae* (เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าที่ทำให้เกิดอาการของโรครุนแรง) ลงบนผลเงาะ เรียงใส่ตะกร้าหุ้มถุงพลาสติก พ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลานำชิ้นวุ้นออก จากนั้นนำผลเงาะมาพ่นด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ 10 สายพันธุ์ คือ PN2, PN-A3, PN-A5, PN7, PN 10, PN12, DL7, DL9, BA1 และ BP ปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวของคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (10^8 cfu/ml) เปรียบเทียบกับการพ่นน้ำ และอิมาซาลิล 500 มก./ล. ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลเงาะเก็บใส่ถุงยืดอายุผักและผลไม้ชนิด M2 ขนาด 7 x 10 นิ้ว จำนวนถุงละ 6 ผล ปิดปากถุงพลาสติกด้วยเครื่องซีล เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 °ซ เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 12 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ ๆ ละ 6 ผล ประเมินความรุนแรงของโรค โดยวัดขนาดของแผลบริเวณที่ปลูกเชื้อรา *L. theobromae* และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความรุนแรงของโรคโดยใช้สูตร

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความรุนแรงของโรค = [(A – B) / A] x 100

A = ค่าเฉลี่ยของขนาดแผลบนผลเงาะที่พ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม)

B = ค่าเฉลี่ยของขนาดแผลบนผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ และอิมาซาลิล 500 มก./ล.

4. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือก

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ (จากข้อ 3) จำนวน 3 ไอโซเลท คือ PN10, DL7 และ DL9 เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. บันทึกรูปร่างของเซลล์ และการติดสี โดยการย้อมสีแบบแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 การศึกษาคุณสมบัติด้านชีวเคมี

4.2.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase)

เตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่นเดียวกับข้อ 4.1 หยดไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 % ลงบนสไลด์ที่สะอาดและแห้ง ใช้ลูปแตะแบคทีเรีย 2 ลูป แตะลงในหยดของไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วใช้ลูปกวนให้เข้ากัน บันทึกผลการเกิดฟองก๊าซ ถ้าเป็นผลบวก จะเกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ผลลบ ไม่เกิดฟองก๊าซขึ้น แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส

4.2.2 จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Test Kits 50 CHB

นำแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. นำมาทดสอบด้วย API Test Kits 50 CHB บันทึกผล และแปรผลโดยการใช้โปรแกรม APIWEB ในการวิเคราะห์เพื่อจำแนกสกุล และสปีชีส์ของแบคทีเรีย

4.3 จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ส่งตัวอย่างแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับคลีโอไทด์ เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ที่ห้องปฏิบัติการศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

5. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเซลล์

เตรียมสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการตรวจสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยใช้วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney) ตรวจผลด้วยการนับเซลล์ไตลิงที่มีชีวิตที่ติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein based assay)

6. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์

เตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) 300 มล. เขย่า 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 3,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 นาที นำเฉพาะเซลล์ของแบคทีเรียมาเจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ความยาวของคลื่นแสง 600 นาโนเมตร

เตรียมส่วนผสมของชีวภัณฑ์ จำนวน 3 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 20 มล. มาผสมกับ magnesium sulfate 2.47 % ปริมาตร 20 มล. ตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาที หลังจากนั้นเติม carboxymethyl cellulose (CMC) 2.5 % ปริมาตร 20 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำทัลคั่มน้ำหนัก 100 ก. มาผสมคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน (ดัดแปลงจากสูตรของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร)

สูตรที่ 2 นำทัลคั่ม 60 ก. แคลเซียม 30 ก. CMC 8 ก. และน้ำมันฝรั่ง 2 มล. นำมาผสมรวมกัน หลังจากนั้นนำสารละลายแบคทีเรีย 20 มล. มาผสมให้เข้ากัน (ดัดแปลงสูตรของวราภรณ์, 2553)

สูตรที่ 3 แป้งข้าวเจ้า 100 ก. น้ำมันถั่วเหลือง 1 มล. และซูโครส 10 ก. นำมาผสมรวมกัน หลังจากนั้นนำสารละลายแบคทีเรีย 20 มล. มาผสมให้เข้ากัน (ดัดแปลงสูตรของ ณิชกานต์, 2554)

สารทุกชนิดนำมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบความชื้นความดันสูง (autoclave) 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 1 วัน

นำส่วนผสมในแต่ละสูตรไปทำให้แห้งโดยใช้เตาอบอุณหภูมิ 40 °ซ จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด นำชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรต่าง ๆ ที่ผลิตได้ แบ่งใส่ถุงฟอยล์ 15 ก./ถุง เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 $\pm$ 2 °ซ) จากนั้นนำชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูตรต่าง ๆ มาตรวจปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี dilution plate count ทุก 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน

7. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ

นำผลเงาะที่สมบูรณ์ และไม่เป็นโรค ทำแผลโดยการตัดขนเงาะ 1 เส้น จากนั้นทำการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* เรียงใส่ตะกร้าคลุมด้วยถุงพลาสติกที่พ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชม. เมื่อครบกำหนดนำชิ้นวุ้นออก เตรียมสารชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PN 10 DL 7 และ DL9 ความเข้มข้นของ

แบคทีเรีย 10^8 cfu/ml จำนวน 10 ก. ผสมน้ำ 200 มล. มากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำมาพ่นลงบนผลเงาะ เปรียบเทียบกับการพ่นน้ำ และอิมาซาลิล 500 มก./ล. ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลเงาะเก็บใส่ถุงยืดอายุผักและผลไม้ ชนิด M2 ขนาด 7 x 10 นิ้ว จำนวนถุงละ 6 ผล ปิดปากถุงพลาสติกด้วยเครื่องซีลเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 °ซ เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดขนาดของแผลที่แสดงอาการของโรค

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ

โรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยว มีสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิด คือ *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Greeneria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ตรงกับการศึกษาของ สมศิริและคณะ (2540) ที่รายงานว่าเชื้อราที่เข้าทำลายผลเงาะจากภาคตะวันออก และภาคใต้ คือ เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *L. theobromae*, G. *bulbilium*, *Greeneria* sp. และ *C. gloeosporioides*

2. คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์

2.1 แยกแบคทีเรียจากผลิตผลเกษตร

คัดเลือกแบคทีเรียจากเมล็ดถั่วลิสง เมล็ดถั่วแดง ลำไยอบแห้ง ขั้วหวีของกล้วยหอมทอง สามารถแยกแบคทีเรียได้ 10 สายพันธุ์ คือ PN2, PN-A3, PN-A5, PN7, PN10, DL7, DL9, BA1 และ BP ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อน สังเกตจากการเกิดบริเวณยับยั้ง และเชื้อราไม่สามารถเจริญต่อไปได้

2.2 ประสิทธิภาพสารจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า

ผลการทดสอบ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 10 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าทั้ง 6 ชนิด คือ เชื้อรา *L. theobromae*, *Gliocephalotrichum bulbilium*, *Greeneria* sp., *C. gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. โดยสารจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN7 DL9 PN10 และ PN12 มีประสิทธิภาพสูง สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* เกิดบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 1.84 1.83 1.75 และ1.68 ซม. เชื้อรา *G. bulbilium* เกิดบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 1.64 1.38 1.33 และ 1.42 ซม. และ เชื้อรา *Greeneria* sp. เกิดบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 2.05 2.09 1.96 และ 1.93 ซม. ตามลำดับ (Table 1) Zhang *et al.* (2012) รายงานว่าสารสกัดหยาบของ lipopeptides จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* TF28 แยกมาจากรากของถั่วเหลือง มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิดเช่นกัน

3. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ

แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งความรุนแรงของโรคผลเน่าบนผลเงาะ แตกต่างกันทางสถิติ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL9 PN10 และ DL7 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ เปรียบเทียบจากขนาดแผลบริเวณที่เชื้อรา *L. theobromae* เข้าทำลาย มีขนาดแผล

Table 1 Efficacy of bacterial secondary metabolize on inhibition of spore germination of fungi causing rambutan fruit rot disease on potato dextrose agar (PDA) ofter 48 hr incaubatron

Bacteria	Clear zone diameter (cm)[1]					
	L. theobromae	***G. bulbilium***	***Greenria sp.***	***C. gloeosporioides***	***Phomopsis sp.***	*Pestalotiopsis* ***sp.***
PN 2	1.66 cdef	1.49 b	1.34 d	0.00 g	1.11 e	1.57 de
PN-A 3	1.62 ef	1.18 f	1.81 bc	1.02 ef	1.71 c	1.66 cd
PN-A 5	1.57 f	1.25 ef	1.69 c	1.23 de	1.41 d	1.61 cde
PN 7	1.84 a	1.64 a	2.05 a	1.42 ab	2.03 a	1.69 c
PN 10	1.75 bc	1.33 cde	1.96 ab	1.58 a	1.81 bc	1.80 b
PN 12	1.68 cde	1.42 bc	1.93 ab	1.39 bc	1.94 ab	2.03 a
DL7	1.64 def	1.27 def	1.39 d	1.24 cd	1.83 bc	1.65 cd
DL9	1.83 ab	1.38 bcd	2.09 a	1.41 b	1.78 bc	1.87 b
BA 1	1.73 cd	1.28 def	2.03 a	1.09 de	1.65 c	1.90 b
BP	1.41 g	1.06 g	1.42 d	0.90 f	1.24 de	1.52 e
CV (%)	4.12	6.17	7.31	11.41	8.10	4.67

Means in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 1% level by DMRT

3.40 3.56 และ 3.77 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นด้วยน้ำ และ อิมาซาลิล 500 มก./ล. มีขนาดแผล 8.04 และ 6.62 ซม. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL9 PN10 และ DL7 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ 57.82 55.82 และ 52.97 % ตามลำดับ (Table 2 และ Figure 1)

4. จำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือก

ผลการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ PN10 DL7 และ DL9 พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ได้ ลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีคือ สามารถทำให้เกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่า สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ รวมถึงสามารถสร้างสารในการยับยั้งเชื้อรา (antifungal) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ตรงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* จึงได้นำข้อมูลเบื้องต้นนี้ไปใช้ในการเลือกชุดทดสอบเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ PN10 DL7 และ DL9 คือ แบคทีเรีย *Bacillus subtillis* หรือ *B. amyloliquefaciens* มีค่าความเชื่อมั่นของการจำแนก 99.1-99.9 % (Table 3) และการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยนำลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวอย่างเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่า สายพันธุ์ PN10 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ

Table 2 Efficacy of bacterial antagonists to control fruit rot disease of *Lasiodiplodia theobromae* inoculated rambutans kept at 13 °C for 7 days

Treatment	Lesion diameter (cm)[(1)]	Inhibition of disease severity (%)[(1)]
control (water)	8.04 f	0.00 g
imazalil 500 mg/l	6.62 e	16.91 f
PN2	5.42 cd	32.44 de
PN-A3	5.96 d	25.67 e
PN-A5	6.75 e	15.67 f
PN7	4.40 b	45.30 c
PN10	3.56 a	55.82 a
PN12	4.34 b	46.04 bc
DL7	3.77 ab	52.97 ab
DL9	3.40 a	57.82 a
BA1	4.27 b	46.72 bc
BP	5.19 c	35.25 d
F-test	**	**
CV (%)	9.71	15.42

(a) Means in the same column followed by a common letter(s) are not significantly different at 1% level by DMRT

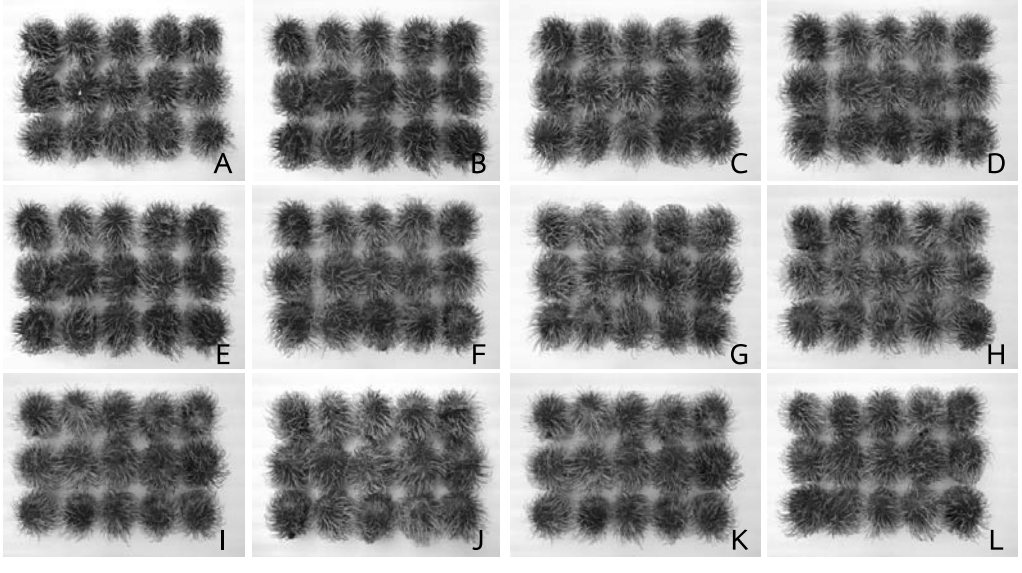

Figure 1 Lesion of fruit rot disease of *Lasiodiplodia theobromae* inoculated rambutan after application of bacterial antagonist then kept at 13 °C for 7 days

A) water (control) B) imazalil 500 mg/l C) PN2
D) PN-A3 E) PN-A5 F) PN7
G) PN10 H) PN12 I) DL7
J) DL9 K) BA1 L) BP

Table 3 Identification of *Bacillus* spp. by means of API Test kits 50 CHB

Bacteria	species	Identification (% ID)
PN10	*Bacillus subtillis/amyloliquefaciens*	99.8
DL7	*Bacillus subtillis/amyloliquefaciens*	99.9
DL9	*Bacillus subtillis/amyloliquefaciens*	99.1

16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย 2 ชนิด 99.91 % ได้แก่ *Bacillus siamensis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* ขณะที่สายพันธุ์ DL7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* 100.00 % สายพันธุ์ DL9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย 2 ชนิด 99.86 % ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* และ *Bacillus siamensis*

Bacillus siamensis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้าง endospore รูปท่อน strain PD-A10^{T} แยกมาจากปูเค็ม จาก จ. นครปฐม ประเทศไทย มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NBRC 15535^{T}, *B. subtilis* DSM 10^{T}, *B. vallismortis* DSM 11031^{T} และ *B. mojavensis* IFO 15718^{T} เท่ากับ 99.5, 99.4, 99.4 และ 99.2% ตามลำดับ (Sumpavapol *et al.*, 2010) *B. siamensis* KCTC13613 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizotonia solan*i และ *Botrytis cinerea* เป็นสาเหตุโรคของพืช (Jeong *et al.*, 2012)

6. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเซลล์ไตของลิง

สารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความใกล้เคียงกับเซลล์มนุษย์ พบว่า สารสกัดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10 DL7 และ DL9 ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิง (Table 4)

7. ผลการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์

การประเมินความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสารชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร ที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ PN10 DL7 และ DL9 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงที่สุด แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL7, DL9 และ PN10 มีจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในเดือนที่ 6 เท่ากับ 7.55 x10^{8}, 3.73 x 10^{8} และ 8.53 x 10^{7} cfu/g ตามลำดับ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL7และ DL9 ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงกว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10 ของชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงกว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 (Table 5) สอดคล้องกับการทดลองของณิชกานต์ (2554) ที่ผลิตสารชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท ในรูปแบบผง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง หลังการผลิต 4-6 เดือน พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์มีชีวิตรอดมากกว่า 75-100 %

Table 4 *In vitro* cytotoxin activity of crude extract of bacteria antagonist PN10, DL7 and DL9 against Vero cell line (African green monkey kidney)

item	Screening code	Sample code	Final Concentration (µg/ml)	Fluorescence unit at Day 0		Fluorescence unit at Day 4		% Cell growth	Cytotoxicity	IC_{50} (µg/ml)
				Average	SD	Average	SD			
	Nagative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	1490	49	3209	167	100.00	-	-
	Positive	Ellipticine	4.00	1503	51	1579	66	4.11	Cytotoxic	
			2.00	1533	53	1739	80	11.99	Cytotoxic	
			1.00	1526	46	1975	113	26.12	Cytotoxic	0.541
			0.50	1502	46	2438	138	54.47	Non-Cytotoxic	
			0.25	1482	52	2788	206	75.92	Non-Cytotoxic	
			0.13	1493	52	3050	197	90.57	Non-Cytotoxic	
1	V9557	PN10	50.00	1574	32	4839	315	189.85	Non-Cytotoxic	-
			16.67	1490	30	3949	95	142.99	Non-Cytotoxic	-
			5.56	1480	25	3662	157	126.87	Non-Cytotoxic	-
			1.85	1451	21	3479	125	177.88	Non-Cytotoxic	-
			0.62	1441	21	3437	127	116.05	Non-Cytotoxic	-
			0.21	1460	13	3410	50	113.40	Non-Cytotoxic	-
2	V9558	DL7	50.00	1572	59	4875	168	192.06	Non-Cytotoxic	-
			16.67	1518	39	4138	132	152.35	Non-Cytotoxic	-
			5.56	1488	21	3774	109	132.90	Non-Cytotoxic	-
			1.85	1467	25	3587	94	123.29	Non-Cytotoxic	-
			0.62	1499	27	3578	89	120.93	Non-Cytotoxic	-
			0.21	1549	86	3611	159	119.89	Non-Cytotoxic	-
3	V9559	DL9	50.00	1537	40	3819	78	132.71	Non-Cytotoxic	-
			16.67	1496	5	3701	71	128.20	Non-Cytotoxic	-
			5.56	1493	20	3558	75	120.05	Non-Cytotoxic	-
			1.85	1438	5	3385	61	113.22	Non-Cytotoxic	-
			0.62	1454	16	3401	110	113.22	Non-Cytotoxic	-
			0.21	1473	21	3364	133	109.94	Non-Cytotoxic	-

Method: Green Fluorescent Protein (GFP)-based assay

IC_{50} of positive control: Ellipticine = 0.541 µg/ml

Cytotoxicity against Vero cells: >50% cell growth = non-cytotoxicity

≥ 50% cell growth = cytotoxicity

Table 5 Survival of bacterial antagonists as biocontrol agents kept at room temperature for 6 months

Bacteria	formulation	Number of bacterial colonies (cfus/g)					
		1st month	2nd month	3rd month	4th month	5th month	6th month
PN10	No. 1	3.45 x10^6	1.72 x 10^6	6.93 x 10^6	5.38 x 10^6	4.75 x 10^6	4.53 x 10^6
	No. 2	2.23 x 10^5	1.57 x 10^5	1.56 x 10^5	6.88 x 10^5	2.96 x 10^5	8.00 x 10^4
	No. 3	8.45 x 10^7	1.19 x 10^7	8.65 x 10^7	8.08 x 10^7	9.18 x 10^7	8.53 x 10^7
DL7	No. 1	7.90 x 10^6	5.33 x 10^6	1.05 x 10^7	9.30 x 10^6	9.73 x 10^6	1.18 x 10^7
	No. 2	2.21 x 10^7	1.31 x 10^7	1.42 x 10^7	1.38 x 10^7	3.28 x 10^7	1.98 x 10^7
	No. 3	1.17 x 10^9	4.68 x 10^8	3.18 x 10^8	8.60 x 10^8	3.48 x 10^8	7.55 x 10^8
DL9	No. 1	1.73 x 10^7	2.55 x 10^6	9.65 x 10^6	8.73 x 10^6	1.04 x 10^7	9.83 x 10^6
	No. 2	1.48 x 10^7	8.95 x 10^6	1.22 x 10^7	1.23 x 10^7	1.25 x 10^7	1.25 x 10^7
	No. 3	2.23 x 10^9	8.70 x 10^8	1.19 x 10^9	1.25 x 10^9	1.39 x 10^9	3.73 x 10^8

Average of 4 replications

8. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ

ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10 DL7 และ DL9 ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ ที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* พบว่า ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL9 PN10 และ DL7 มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ พบการเกิดแผลขนาด 3.82 3.99 และ 4.85 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นด้วยน้ำ และ อิมาซาลิล 500 มก./ล. มีขนาดแผล 7.32 และ 7.31 ซม. และเมื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ DL9 PN10 และ DL7 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* ได้ 47.92 45.44 และ 33.83 % ตามลำดับ (Table 6) ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการใช้เซลล์แบคทีเรียโดยตรง (ผลการทดลองข้อ 3)

สรุปผลการทดลอง

โรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยว มีสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิด คือ *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Greeneria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis* sp. และ *Pestalotiopsis* sp และสามารถแยกแบคทีเรียได้ 10 สายพันธุ์ คือ PN2 PN-A3 PN-A5 PN7 PN10 DL7 DL9 BA1 และ BP จากเมล็ดถั่วลิสง เมล็ดถั่วแดง ลำไยอบแห้ง ขั้วหวีของกล้วยหอมทอง และพบว่า สารจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN7 DL9 PN10 และ PN12 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae*, G. *Bulbilium*,

Table 6 Efficacy of biocontrol agent formula 3 to control fruit rot disease of *Lasiodiplodia theobromae* inoculated rambutans kept at 13 °C for 7 days

Treatment	Lesion diameter (cm)[(1)]	Inhibition of disease severity (%)[(1)]
water (control)	7.32 b	-
imazalil 500 mg/l	7.31 b	6.84 c
PN10	3.99 a	45.44 ab
DL7	4.85 a	33.83 b
DL9	3.82 a	47.92 a
F-test	**	**
CV (%)	15.76	30.05

[(1)] Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 1% level by LSD

และ *Greeneria* sp. และสามารถควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ โดยสามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ 57.82 55.82 และ 52.97 % ตามลำดับ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ DL7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* 100.00 % ส่วน PN10 และ DL9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรียได้แก่ *Bacillus siamensis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* 99.91 และ 99.86% และสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง

ชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ PN10 DL7 และ DL9 มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูง มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์

เอกสารอ้างอิง

ณิชกานต์ นเรวุฒิกุล. 2554. *สูตรชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคทางดินของมะเขือเทศ.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 109 หน้า.

ทัศวรรณ ศรีวะอุไร. 2547. *การคัดเลือกจุลินทรีย์ผิวพืชเพื่อการควบคุมรา Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) *สาเหตุโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะพันธุ์โรงเรียน.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 84 หน้า.

บุญญวดี จิระวุฒิ และสุภา อโนธารมณ์. 2552. การใช้สารในกลุ่ม GRAS ในการควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ. น. 80-96. *ใน : การประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ปี 2552 28-30 มิถุนายน 2552* ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช, ชะอำ, เพชรบุรี.

วาริน อินทนา, มนตรี อิสรไกรศรี, ปัญจพร เลิศรัตน์ และประคอง เย็นจิตต์. 2548. การควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* โดยใช้สารต่อต้านเชื้อราจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.* 36 (3-4) : 171-178.

วราภรณ์ ภู่ภักดีพันธ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2553. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าว. แหล่งที่มา kucon.lib.ku.ac.th/ Fulltext/KC4801027 สืบค้นเมื่อ 18/5/2555

สมศิริ แสงโชติ, อุดม ฟ้ารุ่งสาง และนวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง. 2540. การเข้าทำลายของผลเงาะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่า และการควบคุมโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยว.หน้า 108-116. *ใน รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 35 สาขาพืช* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Arrebola, E., R. Jacobs and L. Korsten. 2010a. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogen. *Appl. Microbio.* 108:386-395.

Arrebola, E., D. Sivakumar, R. Bacigalupo, L. Korsten. 2010b. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest disease. *Crop Prod* 29:311-410.

Gong A-D, H-P Li, Q-S Yuan, X-S Song, W Yao, W-J He, J-B Zhang, Y-C Liao. 2015. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spiles against *Fusarium graminearum. Plos One.* 10:e0116871

Hsieh, F.C., T.C. Lin, M. Meng and S.S. Koa. 2008. Comparing method for identifying *Bacillus* stains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr Microbiol* 56:1-5.

Jeong, H., D-E. Jeong, S.H. Kim, G.C. Song, S-Y. Park, C-M. Ryu, S-H. Park and S-K. Choi. 2012. Draft Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}. *J. Bacterio.* 194:4148-4149.

Kim, P.I., J. Ryu, Y.H. Kim, Y.T. Chl. 2010. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. J. *Microbiol. Biotechnol.* 20:138-145.

Mager-Dana, R., L. Thimin, F. Peypoux and M. Ptack. 1992. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74:1047-1051.

Sumpavapol, P., L. Tongyonk, S. Tanasupawat, N. Chokesajjawatee, P. Luxananil and W. Visessanguan. 2010. *Bacillus siamensis* sp. Nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *Int. J. Sys. and Evol. Microbio.* 60:2364-2370.

Zhang, S.M., Y.X Wang. L.Q. Meng, J. Li, X.Y. Zhao, X. Cao, X.L. Chen, A.X. Wang and J.F. Li. 2012. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens. Afri. J. Microbio. Res.* 6:1747-1755.