การใช้เชื้อรา *Trichoderma asperellum* สายพันธุ์ท้องถิ่นร่วมกับสายพันธุ์กลายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศ

Using Combination of Wild Type and Mutant Strains of *Trichoderma asperellum* for Increasing The Efficiency to Control Damping-off Disease of Tomato

วาริน อินทนา[1*], อรรถกร พรมวี[1] และ ปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์[2]
Warin Intana[1*], Athakorn Promwee[1] and Punnawich Yenjit[2]

Abstract

Seven isolates of *Pythium* spp., a causal agent of damping-off disease, were isolated from tomato seedlings collected from three districts in Nakhon Si Thammarat province. These isolates provided 53.61 – 89.69% of disease severity on Hang Chat tomato seedling under greenhouse condition. Isolate Py-NST-004 gave the highest disease severity of 89.69%. Mycelial compatibility of three strains of *T. asperellum* (highly effective to control plant diseases), i.e., *T. asperellum* FR-NST-009 (wild type strain) *T. asperellum* FR-NST-009-mt (mutant strain) and *T. asperellum* CB-Pin-01 (comparative strain) were tested on potato dextrose agar. All 3 strains were found to be mycelial compatible. These strains of *T. asperellum* were applied to controll the damping-off disease of Hang Chat tomato under greenhouse condition, having treatments with individual and also two strains combination. The results showed that, all treatments with fungi antagonist significantly reduced disease severity by 38.55 – 68.07%, compared to the control. Treatment with *T. asperellum* FR-NST-009+FR-NST-009-mt gave the highest efficacy to reduce disease severity (68.07%), while using metalaxyl chemical gave 52.41% reduction. Moreover, all treatments with individual and two strains combination, *T. asperellum* strain was found to survive in planting soil and colonized tomato root. The treatment with *T. asperellum* FR-NST-009+FR-NST-009-mt showed highest population and root colonization with 8.1×10^5 CFU/g of soil and 95.00%, respectively.

Keywords: Damping-off disease, biological control, antagonist combination, fungal antagonists

---

[1] หน่วยวิจัยไม้ผลเขตร้อน สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161
The Tropical Fruit Research Unit, School of Agricultural Technology, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161, Thailand
[2] ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ 6000
Department of Agricultural Technology, Faculty of Agricultural Technology and Industrial Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University, Nakhon Sawan, 60000, Thailand
รับเรื่อง : พฤษภาคม 2559
รับตีพิมพ์ : กรกฎาคม 2559
[*] Corresponding author : iwarin@wu.ac.th

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Pythium* spp. จำนวน 7 ไอโซเลตที่เป็นสาเหตุโรคเน่าระดับดิน ถูกแยกจากต้นกล้ามะเขือเทศจาก 3 อำเภอในจังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อนำมาทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคในโรงเรือนปลูกพืชพบว่าทุกไอโซเลต สามารถก่อโรคกับต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์ห้างฉัตรได้ในช่วง 53.61 – 89.69 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะไอโซเลต Py-NST-004 ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด 89.69 เปอร์เซ็นต์ นำเชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคพืชจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *T. asperellum* FR-NST-009 (สายพันธุ์ดั้งเดิม), *T. asperellum* FR-NST-009-mt (สายพันธุ์กลาย) และ *T. asperellum* CB-Pin-01 (สายพันธุ์เปรียบเทียบ) มาทดสอบความเข้ากันได้ของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar พบว่าเชื้อรา *T. asperellum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างเส้นใยที่เจริญเข้ากันได้ ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศพันธุ์ห้างฉัตรในระดับโรงเรือนปลูกพืชทั้งรูปแบบการใช้เชื้อราปฏิปักษ์เพียงสายพันธุ์เดียวและการใช้ 2 สายพันธุ์ร่วมกัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์สามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรคได้ในช่วง 38.55 – 68.07 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 ที่ใส่เชื้อรา *Pythium* sp. โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009+FR-NST-009-mt ที่พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้สูงที่สุด (68.07 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl ลดความรุนแรงของโรคได้ที่ 52.41 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อรา *T. asperellum* ในดินปลูกและพบการครอบครองรากในทุกกรรมวิธีที่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009+FR-NST-009-mt ที่ตรวจพบปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ในดินปลูกและการครอบครองรากมะเขือเทศสูงที่สุดที่ 8.1×10^5 CFU ต่อดิน 1 กรัม และ 95.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำสำคัญ : โรคเน่าระดับดิน การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกัน เชื้อราปฏิปักษ์

คำนำ

มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) เป็นผักเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ทั้งการปลูกเพื่อการบริโภคสดและเพื่อการแปรรูป ถึงแม้แหล่งปลูกมะเขือเทศหลักจะอยู่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย แต่สามารถพบการปลูกมะเขือเทศในทุกจังหวัดของประเทศ จังหวัดนครศรีธรรมราชถือเป็นพื้นที่ปลูกมะเขือเทศที่สำคัญของภาคใต้ ในการปลูกมะเขือเทศนั้นพบปัญหาด้านโรคพืชและแมลงศัตรูพืชหลายชนิด โดยเฉพาะโรคเน่าระดับดิน (damping-off) ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pythium* spp. โดยเชื้อราชนิดนี้อาศัยอยู่ในดิน (soil borne fungi) และซากพืชในพื้นที่เพาะปลูก เมื่อมีการปลูกมะเขือเทศ เชื้อรา *Pythium* spp. สามารถสร้างเส้นใยเข้าทำลายทั้งเมล็ดและต้นกล้ามะเขือเทศได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เมล็ดเน่าหรือต้นกล้าเน่าระดับดินตายในที่สุด ในการควบคุมโรคดังกล่าวนิยมใช้ทั้งสารเคมีในกลุ่ม metalaxyl และ fosetyl-Al รวมทั้งการใช้ชีววิธีโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนี้ถือว่าเป็นทางเลือกที่สำคัญเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีเพื่อช่วยลดปัญหาการต้านทานสารเคมี การสะสมสารเคมีในสภาพแวดล้อมและผลผลิตทางการเกษตร ตลอดจนลดการเสียสมดุลทางธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์ในแหล่งปลูกพืช อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยทั่วไปเห็นผลการ

ควบคุมโรคพืชช้ากว่าการใช้สารเคมี เกษตรกรจึงให้การยอมรับน้อยกว่าการใช้สารเคมี ดังนั้นการศึกษาหาแนวทางและวิธีการในการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่ผ่านการคัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคพืช สายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และสายพันธุ์เปรียบเทียบ *T. asperellum* CB-Pin-01 มาทดสอบการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศทั้งการใช้เพียงสายพันธุ์เดียวและการใช้ 2 สายพันธุ์ร่วมกัน โดยคาดหวังว่าจะทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าระดับดินในมะเขือเทศสูงยิ่งขึ้นและใกล้เคียงกับการใช้สารเคมี อันจะนำมาซึ่งประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรและผู้บริโภคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แยกและทดสอบความสามารถในการก่อโรคพืช

นำต้นกล้ามะเขือเทศที่แสดงอาการโรคเน่าระดับดินจำนวน 7 ตัวอย่าง จากพื้นที่ 3 อำเภอ (อำเภอท่าศาลา อำเภอปากพนัง และอำเภอชะอวด) ของจังหวัดนครศรีธรรมราช มาทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue transplanting technique (Agrios, 2005) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่เติม streptomycin (PDAS) จากนั้นนำเชื้อราทุกไอโซเลตที่แยกได้มาเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ก่อนทำการจำแนกชนิดเบื้องต้นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อคัดเลือกเอาเชื้อรา *Pythium* spp. และเก็บรักษาไว้ทำการทดลองต่อไป (Intana and Chamswarng, 2007)

เลี้ยงเชื้อรา *Pyhtium* spp. ทุกไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำมาตัดชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราเจริญอยู่แล้วนำไปผสมในน้ำนึ่งฆ่าเชื้ออัตรา 1 จานเลี้ยงเชื้อต่อน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 500 มิลลิลิตร (มล.) ทำการปั่นเส้นใยเชื้อราให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer (รุ่น D-500 ยี่ห้อ Dragon Lab) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (rpm) ดูดสารแขวนลอยเส้นใยเชื้อรา *Pythium* spp. ปริมาตร 0.1 มล. ไปหยดในแต่ละหลุมของกระบะปลูกพืชที่บรรจุดินปลูกปลอดเชื้อโรค (ดินผสมที่มีหน้าดิน: ปุ๋ยหมัก: ขุยมะพร้าว อัตรา 2: 1: 1 โดยปริมาตร, นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยระยะเวลาห่างกัน 24 ชั่วโมง) จากนั้นปลูกเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ห้างฉัตรที่ปลอดเชื้อ (แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ก่อนล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง) จำนวน 1 เมล็ดต่อหลุม ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 100 เมล็ด เมื่อ 14 วันหลังเมล็ดงอก ตรวจนับจำนวนต้นกล้ามะเขือเทศที่งอกและรอดตายเปรียบเทียบกับกรรมวิธี control (น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ)

คำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคจากสูตร DS=(Nd/Nc)x100 เมื่อ Nd คือค่าเฉลี่ยจำนวนต้นกล้ามะเขือเทศที่เกิดโรคในแต่ละกรรมวิธี และ Nc คือค่าเฉลี่ยจำนวนต้นกล้ามะเขือเทศที่งอกในกรรมวิธี control (น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ) (Intana *et al.,* 2003) คัดเลือกไอโซเลตที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma asperellum*

เชื้อราปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดลองมี 3 สายพันธุ์ คือ *T. asperellum* FR-NST-009 ซึ่งเป็นเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้จากดินบริเวณรอบราก (rhizosphere soil) ของต้นเฟิร์นมหาสดำ (*Cyathea borneensis* Copel.) บนเทือกเขาหลวงจังหวัดนครศรีธรรมราช เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการควบคุมโรคกาบใบเน่าโรคเมล็ดด่างของข้าว และสามารถส่งเสริมการเจริญ

เติบโตของต้นข้าวได้ดี (Warin and Montree, 2009), *T. asperellum* FR-NST-009-mt เป็นสายพันธุ์กลายของ *T. asperellum* FR-NST-009 ที่เกิดจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมสารเคมี benomyl ความเข้มข้น 100 ppm (PDA+100 ppm benomyl) ได้ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum, Colletotrichum capsici, Sadocladium oryzae* และ *Curvularia oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคสำคัญในพืชต่างๆ ได้ดี และ *T. asperellum* CB-Pin-01 (Charoenrak and Chamswarng, 2015) ที่เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ควบคุมโรคพืชได้กว้างขวางที่สุดในปัจจุบัน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง ห้องปฏิบัติการการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

3.ศึกษาการเข้ากันได้ของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma asperellum*

ศึกษาการเข้ากันได้ของเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ตามวิธีการของ Hossein *et al.,* (2011) โดยการเจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ขณะเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร (ซม.) ก่อนนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในแนวตรงข้ามกันและห่างกัน 4 ซม. บ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ก่อนบันทึกลักษณะการเข้ากันได้ของเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ โดยสังเกตการสร้างบริเวณใสยับยั้ง (clear zone) และการสร้างแนว เส้นใยกั้นระหว่างกัน (obvious line)

4.ประสิทธิภาพการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืช

นำดินปลูก (ตามสูตรในข้อ 1) ใส่ในบ่อซีเมนต์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 80 ซม. สูง 40 ซม.) โดยให้ดินผสมต่ำจากขอบบนของบ่อซีเมนต์เป็นระยะ 15 ซม. จากนั้นสเปรย์เส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *Pythium* spp. Py-NST-004 (ความเข้มข้นดังข้อ 1) ปริมาตร 10 มล. ให้ทั่วผิวหน้าดินปลูก ก่อนนำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ห้างฉัตรที่ปลอดเชื้อและผ่านการแช่ในสปอร์แขวนลอยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* (เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ก่อนขูดเอาสปอร์มาผสมในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมนับความเข้มข้นด้วย haemacytometer ที่ 1.0×10^4 สปอร์ต่อมล. (CFU)) ปริมาตร 10 มล. (ในกรรมวิธีที่ใช้ 2 สายพันธุ์ร่วมกันใช้สปอร์แขวนลอยสายพันธุ์ละ 5 มล. รวมสุทธิ 10 มล.) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มาหว่านในบ่อซีเมนต์อัตรา 100 เมล็ดต่อบ่อซีเมนต์ หลังจากเมล็ดมะเขือเทศงอกเป็นเวลา 30 วัน บันทึกจำนวนต้นกล้ามะเขือเทศที่งอกและรอดตายเปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 9 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 บ่อซีเมนต์ที่ปลูกเมล็ดมะเขือเทศจำนวน 100 เมล็ด) ซึ่งกรรมวิธีในการทดลองคือ 1) *T. asperellum* CB-Pin-01 2) *T. asperellum* FR-NST-009 3) *T. asperellum* FR-NST-009-mt 4) *T. asperellum* (CB-Pin-01+FR-NST-009 5) *T. asperellum* (CB-Pin-01+FR-NST-009-mt 6) *T. asperellum* FR-NST-009+FR-NST-009-mt 7) สารเคมี metalaxyl 8) Control 1 ไม่ใส่เชื้อรา *Pythium* sp. (สาเหตุโรคพืช) และ 9) Control 2 ใส่เชื้อรา *Pythium* sp. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคตามสูตรในข้อ 1

คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดความรุนแรงของโรคได้จากสูตร 100 - ($DS_{ทดสอบ}/DS_{ควบคุม}$) x100 เมื่อ $DS_{ทดสอบ}$ คือเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ และ $DS_{ควบคุม}$ คือเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม 2 ใส่เชื้อรา *Pythium* sp. (Intana *et al.,* 2003)

5.บันทึกปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์และการครอบครองรากมะเขือเทศ

หลังจากมะเขือเทศงอกเป็นเวลา 30 วัน นำตัวอย่างดินและรากของต้นกล้ามะเขือเทศจากการทดลองในข้อ 4 มาตรวจปริมาณของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ในดินและการครอบครองรากต้นกล้ามะเขือเทศ ในการตรวจปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ในดินใช้วิธีการ soil dilution spread plate technique (Intana *et al.* 2003) โดยการนำตัวอย่างดินในแต่ละกรรมวิธีปริมาณ 5 กรัม มาผสมในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มล. ก่อนเขย่าด้วยเครื่องเขย่าดิจิตอล (ยี่ห้อ DAIHAN รุ่น SHO 2D) ความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเจือจางดินแขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^{-4} เท่า ดูดดินแขวนลอยปริมาตร 0.1 มล. มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Martin's medium และ Martin's medium ที่เติมสารเคมี benomyl ความเข้มข้น 100 ppm (Martin's medium+100 ppm benomyl) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ก่อนบันทึกปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ในแต่ละกรรมวิธี

สำหรับการครอบครองรากตรวจสอบโดยนำรากต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละกรรมวิธีมาตัดให้มีความยาว 1 ซม. จำนวน 50 ชิ้น ก่อนใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มล. พร้อมเขย่าด้วยเครื่อง mixer (รุ่น VTX-3,000L) ความเร็ว 100 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำตัวอย่างรากมาซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู่นึ่งฆ่าเชื้อ และนำรากมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PDA+100 ppm benomyl โดยวางจานเลี้ยงเชื้อละ 5 ชิ้น จำนวน 10 จานเลี้ยงเชื้อต่อกรรมวิธี บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ก่อนบันทึกเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ที่เจริญออกจากรากมะเขือเทศในแต่ละกรรมวิธี (Intana *et al.* 2003)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองด้วยวิธี Dancan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.0

ผลและวิจารณ์

1.แยกและทดสอบความสามารถในการก่อโรคพืช

สามารถแยกเชื้อรา *Pythium* spp. ได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต (Py-NST-001- Py-NST-007) จากตัวอย่างต้นกล้ามะเขือเทศที่เกิดโรคเน่าระดับดิน จำนวน 7 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจาก 3 อำเภอ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งแต่ละไอโซเลตเจริญได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง โดยสามารถเจริญคลุมทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใน 3 วัน

เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคกับมะเขือเทศพันธุ์ห้างฉัตร พบว่าทุกไอโซเลตสามารถก่อโรคกับมะเขือเทศได้ โดยมีความรุนแรงของโรคในช่วง 53.61 – 89.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี control ที่ใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเฉพาะไอโซเลต Py-NST-004 ที่ก่อโรคได้รุนแรงที่สุดที่ 89.69 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) สำหรับอาการของโรคที่พบมี 2 ลักษณะคือ 1) เมล็ดมะเขือเทศเกิดอาการเน่าตายก่อนงอก และ 2) ต้นกล้ามะเขือเทศที่งอกพ้นดินปลูกเกิดอาการเน่าและคอดกิ่วบริเวณโคนต้น (ผิวดิน) ก่อนหักพับและแห้งตายในที่สุด จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อรา *Pythium* spp. สามารถเข้าทำลายมะเขือเทศได้ทั้งในระยะก่อนเมล็ดงอก (pre-emergence) และระยะหลังเมล็ดงอกพ้นผิวดินได้ (post-emergence) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่กล่าวว่า

Table 1 Numbers of survived tomato seedlings and disease severity of *Pythium* spp. after treatment for 14 d under greenhouse conditions

Treatment	Collection place	Survival seedling (%)[1/]	Disease severity (%)[2/]
Pythium sp. Py-NST-001	Tha Sala district	33.00 b [2/]	69.07 b
Pythium sp. Py-NST-002	Tha Sala district	21.00 ab	81.44 ab
Pythium sp. Py-NST-003	Pak Panang district	48.00 c	53.61 c
Pythium sp. Py-NST-004	Cha-uat district	13.00 a	89.69 a
Pythium sp. Py-NST-005	Cha-uat district	27.00 b	75.26 b
Pythium sp. Py-NST-006	Cha-uat district	31.00 b	71.13 b
Pythium sp. Py-NST-007	Cha-uat district	46.00 c	55.67 c
Control (distilled water)	-	97.00 d	2.06 d

[1/] Percentage of survived tomato seedlings after treated with *Pythium* spp. for 14 d.

[2/] Tomato damping-off severity after treated with *Pythium* spp. for 14 d.

[3/] Mean in each column followed by the same letter were not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) P=0.05.

เชื้อรา *Pythium* spp. เป็นเชื้อราโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดิน (soil borne fungi) และสามารถเจริญสร้างเส้นใยอย่างรวดเร็วเพื่อเข้าทำลายพืช โดยสามารถก่อให้เกิดโรคเน่าระดับดินกับพืชได้ทั้งในระยะก่อนและหลังการงอกของเมล็ดพืช (Kim *et al.,* 2014)

2.ศึกษาการเข้ากันได้ของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma asperellum*

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อเจริญบน จานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างเส้นใยที่เจริญเข้ากันได้ โดยไม่พบการสร้างบริเวณใส (clear zone) ยับยั้งการเจริญระหว่างเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ และไม่พบการสร้างแนวเส้นใย (obvious line) ที่ยับยั้งการเจริญระหว่างกัน (Table 2) ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญและสร้างเส้นใยที่เข้ากันได้ (mycelial compatibility) ดังที่ Hossein *et al.* (2011) ได้ทดลองและกล่าวว่าเชื้อราที่เป็นสปีชีส์เดียวกันจะสร้างเส้นใยที่สามารถเจริญเข้ากันได้ โดยไม่สร้างแนวเส้นใยกั้นหรือผลิตและปลดปล่อยสารใดๆ มายับยั้งการเจริญซึ่งกันและกัน และการทดสอบการเข้ากันได้ของเส้นใยเชื้อราด้วยวิธีการนี้สามารถนำมาจัดแบ่งกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อราในเบื้องต้นได้

Table 2 Mycelial compatibility of Trichoderma asperellum after culture on potato dextrose agar for 4 d

Treatment	Clear zone	Obvious line	Mycelial compatibility
T. asperellum (CB-Pin-01+FR-NST-009)	-	-	+
T. asperellum (CB-Pin-01+FR-NST-009-mt)	-	-	+
T. asperellum (FR-NST-009+FR-NST-009-mt)	-	-	+

- = No clear zone.

+ = Mycelial growth of *T. asperellum* were compatibility.

3. ประสิทธิภาพการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืช

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการลดความรุนแรงของโรคเน่าระดับดินของต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์ห้างฉัตรในสภาพโรงเรือนปลูกพืช พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ทั้งแบบการใช้สายพันธุ์เดียว และการใช้ 2 สายพันธุ์ร่วมกันสามารถลดความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 (ใส่เชื้อราโรคพืช) ซึ่งกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ในช่วง 38.55 – 68.07 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. asperellum* (FR-NST-009+FR-NST-009-mt) สามารถลดความรุนแรงของโรคได้สูงที่สุดที่ 68.07 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *T. asperellum* (CB-Pin-01+FR-NST-009-mt) ที่ลดความรุนแรงของโรคที่ 58.43 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เพียง 52.41 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* spp. ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานที่กล่าวว่าเชื้อรา *T. asperellum* จัดเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการควบคุมโรคพืชต่างๆ ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pythium* spp. โดยมีกลไกที่สำคัญคือการแข่งขันเพื่อปัจจัยในการดำรงชีวิต การเป็นเชื้อปรสิต การสร้างสารปฏิชีวนะ การชักนำให้เกิดความต้านทานในต้นพืช และการครอบครองส่วนต่างๆ ของพืช (Jeyaseelan *et al.,* 2012; Mahbobe *et al.,* 2012) ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดความรุนแรงของโรคระหว่างการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* และการใช้สารเคมี metalaxyl พบว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เทียบเท่าหรือดีกว่าการใช้สารเคมี ซึ่งเมื่อระยะเวลาการทดลองนานยิ่งขึ้นกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีพบการตายของต้นกล้ามะเขือเทศมากยิ่งขึ้น ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์พบการตายของต้นกล้ามะเขือเทศเพิ่มเพียงเล็กน้อย ซึ่งข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์หรือชีววิธีมีแนวโน้มในการลดความรุนแรงของโรคพืชได้ยั่งยืนมากกว่าการใช้สารเคมี (Chiradej, 2006)

เปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* เพียงสายพันธุ์เดียวกับกรรมวิธีที่ใส่ 2 สายพันธุ์ร่วมกัน พบว่ากรรมวิธีที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ 2 สายพันธุ์ร่วมกันลดความรุนแรงของโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศได้มากกว่ากรรมวิธีที่ใส่เพียงสายพันธุ์เดียว แสดงให้เห็นว่าการนำเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* สายพันธุ์ที่เส้นใยเจริญเข้ากันได้มาใช้ร่วมกันในการควบคุมโรคพืชช่วยทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืชสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Harman (2000) และ Mohammad *et al.* (2011) ที่กล่าวว่าการนำเชื้อ

Table 3 Tomato damping-off disease severity and disease reduction after treatment with three strains of *Trichoderma asperellum* for 30 d under greenhouse conditions

Treatment	Disease severity (%)[1/]	Disease reduction (%)[2/]
T. asperellum CB-Pin-01	46.50 cd[2/]	43.98 cd
T. asperellum FR-NST-009	43.50 c	47.59 cd
T. asperellum FR-NST-009-mt	51.00 d	38.55 d
T. asperellum (CB-Pin-01+FR-NST-009)	50.50 d	39.16 d
T. asperellum (CB-Pin-01+FR-NST-009-mt)	34.50 bc	58.43 c
T. asperellum (FR-NST-009+FR-NST-009-mt)	26.50 b	68.07 b
Metalaxyl	39.50 c	52.41 c
Control 1 without *Pythium* sp.	1.01 a	98.78 d
Control 2 with *Pythium* sp.	83.00 e	0.00 a

[1/] Percentage of survived tomato seedlings after treated with *Pythium* sp. for 30 d.

[2/] Tomato damping-off reduction after treated with *Pythium* sp. for 30 d.

[3/] Mean in each column followed by the same letter were not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) P=0.05.

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ร่วมกันในการควบคุมโรคพืช สามารถช่วยให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืชดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านี้ส่งเสริมการเจริญเติบโตซึ่งกันและกัน หรือการใส่ร่วมกันทำให้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการควบคุมโรคพืชหลากหลายมากยิ่งขึ้น หรือเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจไปอาศัยอยู่หลายบริเวณรอบรากพืชได้ดียิ่งขึ้น จึงสามารถช่วยปกป้องต้นพืชได้ดีกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงสายพันธุ์เดียว

4. บันทึกปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์และการครอบครองรากมะเขือเทศ

จากการตรวจปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในดินปลูกมะเขือเทศทดสอบnโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Martin's medium สามารถตรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทุกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราดังกล่าวโดยตรวจพบในช่วง $0.1x10^5$ – $8.1x10^5$ CFU ต่อดิน 1 กรัม พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009+FR-NST-009-mt ตรวจพบเชื้อราปริมาณมากที่สุดที่ $8.1x10^5$ CFU ต่อดิน 1 กรัม ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Martin's medium+100 ppm benomyl ตรวจพบเชื้อรา *T. asperellum* เฉพาะในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009-mt ทั้งกรรมวิธีที่ใส่สายพันธุ์เดียว และใส่ร่วมกับสายพันธุ์อื่นๆ โดยพบว่ากรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009-mt *T. asperellum* (FR-NST-009+FR-NST-009-mt) และ *T. asperellum* (CB-Pin-01+FR-NST-009-mt) ตรวจพบเชื้อราปริมาณ $1.6x10^5$ $0.7x10^5$ และ $0.1x10^5$ CFU ต่อดิน 1 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* (ใช้สารเคมี metalaxyl, Control 1 ไม่ใส่เชื้อราโรคพืช และ Control 2 ใส่เชื้อราโรคพืช) ไม่สามารถตรวจพบเชื้อรา *T. asperellum* ในทั้ง 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Table 4) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. asperellum* ทุกสายพันธุ์สามารถมีชีวิตรอดและเพิ่ม

ปริมาณได้ในดินปลูกมะเขือเทศ โดยสอดคล้องกับการรายงานที่กล่าว ว่าเชื้อรา *T. asperellum* เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน (soil borne fungi) ที่มีศักยภาพสูงมากในการปรับตัวให้อยู่รอดในดินตามสภาพแวดล้อมต่างๆซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่ทำให้เชื้อราปฏิปักษ์ในกลุ่มนี้ประสบความสำเร็จสูงและมีความยั่งยืนมากเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรคพืช เพราะการที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญและเพิ่มปริมาณได้ในแหล่งปลูกพืช แสดงถึงแนวโน้มในการป้องกันไม่ให้เกิดการระบาดของโรคพืชได้ระยะเวลาที่ยาวนานมากยิ่งขึ้น (Howell, 2003; Intana and Chamswarng, 2007)

การตรวจสอบการครอบครองรากของมะเขือเทศของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ตรวจพบการครอบครองรากของมะเขือเทศ ซึ่งพบการครอบครองในช่วง 52.00 – 95.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่ากรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *T. asperellum* (FR-NST-009+FR-NST-009-mt) พบการครอบครองรากมะเขือเทศสูงที่สุดที่ 95.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA+100 ppm benomyl พบการครอบครองรากเฉพาะในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009-mt ทั้งกรรมวิธีที่ใส่สายพันธุ์เดียว และใส่ร่วมกับสายพันธุ์อื่นๆ โดยพบว่ากรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009-mt *T. asperellum* (FR-NST-009+FR-NST-009-mt) และ *T. asperellum* (CB-Pin-01+FR-NST-009-mt) ตรวจพบการครอบครองรากที่ 59.00 56.00 และ 52.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* (ใช้สารเคมี metalaxyl, Control 1 ไม่ใส่เชื้อราโรคพืช และ Control 2 ใส่เชื้อราโรคพืช) ไม่สามารถตรวจพบการครอบครองรากมะเขือเทศโดยเชื้อรา *T. asperellum* ทั้งการตรวจโดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PDA+100 ppm benomyl (Table 4) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเพิ่มปริมาณและเข้าครอบครองบริเวณผิวรากมะเขือเทศ (rhizoplane) ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่กล่าวว่าเชื้อรา *T. asperellum* เป็นเชื้อราที่มีศักยภาพสูงมากในการเจริญเพิ่มปริมาณเข้าครอบครองรากหรือส่วนต่างๆ ของพืช ทั้งส่วนราก ลำต้น กิ่งก้าน และใบพืช โดยการใช้ประโยชน์จากธาตุอาหารที่ขับ ออกมาจากรากและส่วนต่างๆของพืช (plant exudates) ซึ่งคุณสมบัติการครอบครองส่วนของพืชนี้ถือเป็นกลไกที่เด่นและสำคัญที่ทำให้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ประสบความสำเร็จสูงมากเมื่อนำไปประยุกต์ใช้การควบคุมโรคพืช เพราะทำให้เชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าวสามารถปกป้องส่วนต่างๆ ของพืชเพื่อไม่ให้เชื้อโรคพืชเข้ามาทำลายต้นพืชได้ (Howell, 2002; Harman, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Intana and Chamswarng (2007) ที่กล่าวว่าเชื้อรา *T. asperellum* สามารถสร้างเส้นใยเข้าครอบครองส่วนของพืชและเจริญสร้างสปอร์ได้ปริมาณมากบนรากพืช ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืชที่มีความยั่งยืนมากยิ่งขึ้น

Table 4 Populations of *Trichoderma asperellum* in planting soil and tomato root colonization after treatment for 30 d under greenhouse conditions

Treatment	Population of *T. asperellum* (x10^5 CFU/g)[1/]		Root colonization (%)[2/]	
	Martin's medium	Martin's medium+100 ppm benomyl	PDA	PDA+100 ppm benomyl
T. asperellum CB-Pin-01	6.4	0.0	82.00 [b3/]	0.00 [e]
T. asperellum FR-NST-009	6.8	0.0	77.00 [bc]	0.00 [e]
T. asperellum FR-NST-009-mt	4.9	1.6	62.00 [c]	59.00 [c]
T.asperellum (CB-Pin-01+FR-NST-009)	5.1	0.0	86.00 [ab]	0.00 [e]
T.asperellum (CB-Pin-01+FR-NST-009-mt)	7.3	0.1	94.00 [a]	52.00 [d]
T. asperellum (FR-NST-009+FR-NST-009-mt)	8.1	0.7	95.00 [a]	56.00 [cd]
Metalaxyl	0.0	0.0	0.00 [e]	0.00 [e]
Control 1 without *Pythium* sp.	0.0	0.0	0.00 [e]	0.00 [e]
Control 2 with *Pythium* sp.	0.0	0.0	0.00 [e]	0.00 [e]

[1/] Population of *T. asperellum* in planting soil when assay by soil dilution spread plate technique using Martin's medium and Martin's medium+100 ppm benomyl.

[2/] Tomato root colonization of *T. asperellum* after observe on PDA and PDA+100 ppm benomyl media.

[3/] Mean in each column followed by the same letter were not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) P=0.05.

สรุป

เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ (*T. asperellum* FR-NST-009 *T. asperellum* FR-NST-009-mt และ *T. asperellum* CB-Pin-01) สามารถสร้างเส้นใยที่เจริญเข้ากันได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และทุกสายพันธุ์สามารถลดความรุนแรงของโรคเน่าระดับดินในต้นกล้ามะเขือเทศ สามารถเจริญเพิ่มปริมาณในดินปลูก และสามารถเจริญเข้าครอบครองรากของต้นกล้ามะเขือเทศได้ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้การใช้เชื้อรา *T. asperellum* มีแนวโน้มสู่ความยั่งยืนในการควบคุมโรคพืชได้ และแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการควบคุมโรคพืชคือการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* 2 สายพันธุ์ร่วมกัน โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009 (สายพันธุ์ท้องถิ่น) ร่วมกับ *T. asperellum* FR-NST-009-mt (สายพันธุ์กลาย)

คำขอบคุณ

ขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หน่วยวิจัยไม้ผลเขตร้อนแห่งมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่สนับสนุนอุปกรณ์และอำนวยความสะดวก

เอกสารอ้างอิง

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Press. New York. 922 p.

Charoenrak, P. and C. Chamswarng. 2015. Application of *Trichoderma asperellum* fresh culture bioproduct as potential biological control agent of fungal diseases to increase yield of rice (*Oryzasativa* L.). J. ISSAAS. 21(2): 67-85.

Chiradej, C. 2006. Biological Control. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 323 pp. (*In Thai*).

Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol change in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84: 377–393.

Harman, G.E. 2005. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96(2): 190–194.

Hossein, I., H. Asghar, J.N. Mohammad and S.I. Agaveli. 2011. Pathogenicity variation and mycelial compatibility groups in *Sclerotinia sclerotiorum*. J. Plant Protect. 51(4): 329–336.

Howell, C.R. 2002. Cotton seedling preemer gence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Phytopathology, 92: 177–180.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87: 4–10.

Intana, W., C. Chamswarng, W. Intanoo, C. Hongprayoon and K. Sivasithamparam. 2003. Use of mutant strains for improved efficacy of *Trichoderma harzianum* for controlling cucumber damping-off. Thai J. Agric. Sci. 36(4): 429–439.

Intana, W. and C. Chamswarng. 2007. Control of Chinese-kale damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* by antifungal metabolites of *Trichoderma virens*. Song klanakarin J. Sci. Technol. 29(4): 919–927.

Jeyaseelan, E.C., S. Tharmila and K. Niranjan. 2012. Antagonistic activity of *Tricho derma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. Arch. Appl. Sci. Res. 4(4): 1623–1627.

Kim, Z.A., M. Samuel and N. Berlin. 2014. Pythium damping-off of soybean. Plant disease management NUSD Extension Service. 701: 11–14.

Mahbobe A., R. Kamran, M. Mojtaba, O. Fark hondeh and Z. Masoud. 2012. The *in vitro* efficacy of *Trichoderma* isolates against *Pythium aphanidermatum*, the causal agent of sugar beet root rot. J. Res. Agric. Sci. 8(1): 79–87.

Mohammad, A., G. Hadi and A. Masoud. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling Fusarium rot of lentil. Afr. J. Biotechnol. 10(14): 2653–2658.

Warin, I. and I. Montree. 2009. Collection, screening and development of beneficial indigenous microorganisms as the formulations for organic crop production system. Final report. Walailak University. Nakhon Si Thammarat. 318 pp. (in Thai).