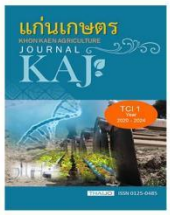
วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



ปัจจัยต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกจากดินปลูกทุเรียนและบทบาทการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน

Growth factors of *Trichoderma* spp. isolated from durian planting soil and their antagonistic role against root and stem rot pathogens of durian

กาญจนา ถมจังหรีด[1], รัติยา พงศ์พิสุทธา[1]* และ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1]

Kanchana Thomchangrit[1], Ratiya Pongpisutta[1]* and Chainarong Rattanakreetakul[1]

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

บทคัดย่อ: เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งมีความแตกต่างในลักษณะโคโลนี แยกมาจากตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกทุเรียนจังหวัดจันทบุรีและชุมพร ด้วยวิธี soil dilution plate ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำมาศึกษาการระบุเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 จำแนกเชื้อราได้เป็น 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Trichoderma. asperellum* (DCHA2005), *T. harzianum* (DCHU1603), *T. koningiopsis* (DCHA602) และ *T. virens* (DCHU1101) การทดสอบปัจจัยทางสรีรวิทยาที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยและกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและเซลลูเลส พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ มีการเจริญและสร้างเส้นใยได้ดีบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25°C มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.27, 8.83, 6.70 และ 9.00 ซม. ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเชื้อรา *T. asperellum* (DCHA2005), *T. harzianum* (DCHU1603) และ *T. virens* (DCHU1101) เจริญได้ดีบนอาหารที่มีค่า pH 5-7 ส่วนเชื้อรา *T. koningiopsis* (DCHA602) เจริญได้ดีที่ค่า pH 5 เชื้อราทั้ง 4 สปีชีส์ มีการตอบสนองต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกลูโคสและเปปโตนซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* (DCHU1603)สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส ได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.3630 มก./มล.ในขณะที่เชื้อรา *T. koningiopsis* (DCHA602 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด เท่ากับ 19.0272 หน่วย/ลิตร จากการทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 4 สปีชีส์ กับเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน จำนวน 6 สปีชีส์ ด้วยวิธี dual culture ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *T. virens* (DCHU1101) สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. inflatum* (DCHU301) และ *P. cucurbitacearum* (DCHU1003) ได้ โดยพบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 44.81 และ 41.85% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อรา *T. harzianum* (DCHU1603) ยับยั้งเชื้อรา *P. inflatum* ได้ 41.11% อย่างไรก็ตามเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ ที่นำมาศึกษาด้วยวิธีนี้ไม่สามารถควบคุมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (DTRA212) ได้แต่อย่างใด

คำสำคัญ: *Trichoderma*; ปัจจัยการเจริญ; โรครากเน่าโคนเน่า; ทุเรียน

ABSTRACT: Four different isolates based on colony characteristic of *Trichoderma* spp. were isolated from soil samples in durian plantations in Chantaburi and Chumphon provinces using soil dilution plate technique which supporting from Mycology laboratory, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University. Based on morphological characteristics, molecular technique and ITS1-5.8S-ITS2 sequencing analysis, four isolates were identified into 4 species as *Trichoderma asperellum* (DCHA2005), *T. harzianum* (DCHU1603), *T. koningiopsis* (DCHA602) and *T. virens* (DCHU1101). Physiological factor of mycelial growth and

* Corresponding author: agrryp@ku.ac.th

Received: date; February 15, 2022 Accepted: date; May 30, 2022 Published: date; October 12, 2022

chitinase and cellulase activities were examined. All four species of *Trichoderma* could grow and develop mycelia very well on PDA which incubated at 25°C with mycelial growth diameter at 8.27, 8.83, 6.70 and 9.00 cm, respectively. In addition, *T. asperellum* (DCHA2005), *T. harzianum* (DCHU1603) and *T. virens* (DCHU1101) could dramatically grow at pH 5-7. Whilst *T. koningiopsis* (DCHA602) showed rapid growth at pH5. The four species showed the greatest response to the media containing glucose and peptone as carbon and nitrogen sources, respectively. Moreover, it was found that *T. harzianum* (DCHU1603) significantly produced cellulase with enzyme activity at 0.3630 mg/ml whereas *T. koningiopsis* (DCHA602) potentially produced chitinase with 19.0272 units/L. Antagonistic interaction between 4 species of *Trichoderma* and 6 species of fungal pathogens causing root and stem rot of durian was assessed using dual culture technique. The result showed that *T. virens* (DCHU1101) could retard mycelial growth of *Pythium inflatum* (DCHU301) and *P. cucurbitacearum* (DCHU1003) at the inhibitions of 44.81 และ 41.85%, respectively. Whilst *T. harzianum* (DCHU1603) inhibited mycelial growth of *P. inflatum* (DCHU301) at the inhibition of 41.11%. Moreover, four species of *Trichoderma* using this technique did not have high inhibition capacity over isolate of *Phytophthora palmivora* (DTRA212), absolutely.
Keywords: *Trichoderma*; growth factors; root and stem rot; durian

บทนำ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murray) เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดใหญ่ที่ให้ผลผลิตได้ดีในเขตที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น อุณหภูมิประมาณ 20 – 38°C ปริมาณฝนไม่น้อยกว่า 2,000 มล./ปี ความชื้นสัมพัทธ์ 75 – 85% แหล่งปลูกทุเรียนที่สำคัญของโลกโดยส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่กลุ่มอาเซียน ได้แก่ ไทย เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) จากสภาพแวดล้อมดังกล่าวข้างต้นนอกจากจะทำให้ทุเรียนมีผลผลิตที่ดีแล้ว ยังส่งผลทางอ้อมต่อความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินที่ปลูกทุเรียนด้วย (Cuadros-Orellana et al., 2013)

เชื้อรา *Trichoderma* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ทั่วไปบริเวณดิน และเศษซากพืชในธรรมชาติ รวมทั้งยังพบได้จากแหล่งอาหารใต้ทะเล ปะการัง ฟองน้ำ และตะกอนทราย (Thrane et al., 2001; Polizzi et al., 2011) จากรายงานของ Weindling ในปี ค.ศ. 1934 พบว่าเชื้อราในสกุลดังกล่าวสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ รวมถึงแสดงบทบาทการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรคในดินได้ดี ยังส่งผลกระทบโดยตรงในการช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรค การเพิ่มผลผลิตและการเจริญเติบโตของพืช รวมไปถึงประสิทธิภาพของกระบวนการดูดซับแร่ธาตุ (Ghazanfar et al., 2018) ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น สาร trichotoxin A50 ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. harzianum* PC01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *P. palmivora* (Suwan et al., 2000) เชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกได้จากดิน ได้แก่ *T. harzianum*, *T. virens*, *T. koningiopsis* และ *T. asperellum* ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วได้สูงกว่าปกติ (Mayo-Prieto et al., 2020) นอกจากนี้ มีรายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* มีประโยชน์ในด้านการลดมลภาวะทางดิน และแหล่งน้ำ (Harman et al., 2004) โดยเฉพาะเชื้อรา *T. virens* นำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ในการศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิเพื่อการจำกัดการเจริญของเซลล์มะเร็งในลำไส้มนุษย์ (Garo et al., 2003)

สำหรับทางด้านการเกษตรได้มีนำเชื้อรา *Trichoderma* มาประยุกต์ใช้ในระบบการเกษตรกรรม เพื่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชแบบชีววิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน ซึ่งการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* พบมีกลไกการเป็นปฏิปักษ์หลายรูปแบบ เช่น การเป็นภาวะปรสิต (parasitism) โดยการเข้าทำลายเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยตรง การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) เพื่อยับยั้งการงอกของส่วนขยายพันธุ์ หรือการเจริญของเส้นใย การแข่งขัน (competition) เพื่อครอบครองพื้นที่ และแหล่งอาหาร รวมถึงการสร้างสารพิษที่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่น เป็นต้น (จิระเดช, 2563)

ปัจจุบันได้มีการรายงานและค้นพบเชื้อรา *Trichoderma* หลายสายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ แต่การนำมาประยุกต์ใช้นั้นยังเป็นเรื่องที่จำเป็นต้องศึกษา เนื่องจากเชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีการเจริญเติบโต และความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคที่แตกต่างกันไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกได้จากดินบริเวณแปลงปลูกทุเรียนในพื้นที่จังหวัดจันทบุรีและชุมพร มาทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน รวมถึงศึกษาการตอบสนองต่อปัจจัยทางสรีรวิทยาและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนา รวมถึงเป็นแนวทางสำคัญที่นอกจากจะช่วยให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ ความต้องการด้านอาหาร

การแพร่กระจาย และประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค เพื่อเป็นเทคนิคสำหรับการนำเชื้อรานี้ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชและการจัดการแปลงทุเรียนอย่างมีประสิทธิภาพที่เหมาะสมต่อไป

วิธีการศึกษา

เชื้อราที่ใช้ในการศึกษา

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกจากดินในพื้นที่ปลูกทุเรียนจังหวัดจันทบุรีและชุมพร ด้วยวิธี soil dilution plate ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ DCHA602 และ DCHA2005 จากจังหวัดจันทบุรี และ DCHU1101 และ DCHU1603 จากจังหวัดชุมพร นำมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นย้ายลงหลอดอาหารเอียงที่บรรจุ potato carrot agar (PCA) เก็บที่อุณหภูมิ 14°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การระบุชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

นำเชื้อรา *Trichoderma* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอเชื้อราตามวิธีการของ Pongpisutta et al. (2013) โดยการกำจัดโปรตีนด้วย proteinase K และสารละลาย phenol chloroform isoamyl alcohol (PCI) จากนั้นตกตะกอนสารพันธุกรรมด้วย absolute alcohol ทำความสะอาดตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปล่อยให้ตะกอนของดีเอ็นเอแห้ง โดยวิธี air drying method นาน 20 - 30 นาที เติมสารละลาย 1xTE buffer (10 mm Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20°C

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGAT ATGC’3)/ITS5 (5’ GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG’3) (White et al., 1990) ผสมกับสาร ทำปฏิกิริยา (master mix) ดังแสดงใน **Table 1** ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PCR thermal cycling (Sensoquest GmbH, Göttingen, Germany) โดยตั้งโปรแกรม pre-denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ ปฏิกิริยารอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบ PCR product บน 1.2% agarose gel โดยให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่าน 80 โวลต์ เป็นเวลา45 นาที บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation จากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ ATGC Co., Ltd. นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม BLASTn ผ่านครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

Table 1 Configuration of master mix for PCR

Element	Concentration	Final concentration	Volume/1 reaction (µl)
1. DNA template	100 ng/µl	-	2
2. *Taq* buffer	10X	0.96X	2.4
3. $MgCl_2$	25 mM	2.4 mM	2.4
4. dNTPs	10 µM	0.48 µM	1.2
5. Forward primer	10 µM	0.48 µM	1.2
6. Reverse primer	10 µM	0.48 µM	1.2
7. *Taq* polymerase	5 U/µl	1 U	0.2
8. Sterile distilled water	-	-	14.4
Total			25

การทดสอบความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture

นำเชื้อราจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Phytophthora palmivora* (DTRA212), *Phytopythium vexans* (DCHA207), *Pythium cucurbitacearum* (DCHU1003), *Pythium deliense* (DCHA101), *Pythium inflatum* (DCHU301) และ *Pythium splendens* (DCHU1301) ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน มาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 วัน ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคของเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 4 ไอโซเลท โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา ย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา (mycelial disc) ลงอาหาร PDA โดยวางเชื้อรา *Trichoderma* และเชื้อราสาเหตุโรคในตำแหน่งตรงข้ามกัน ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 1 ซม. บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C วัดการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ทุกวัน จนครบ 5 วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (Percent inhibition of radial growth, PIRG) โดยใช้สูตร

$$PIRG = (R1-R2)/R1x100$$

โดยที่ R1 คือ รัศมีของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดลองควบคุม และ R2 คือ รัศมีของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี least significant difference test (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma*

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราเพื่อให้ได้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา นำไปทดสอบการตอบสนองต่ออุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด – ด่าง แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ดังนี้

อุณหภูมิ

นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มภายใต้แสง near UV สลับมืด ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 5, 10, 15, 25, 35 และ 45°C

ความเป็นกรด-ด่าง

นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา ย้ายลงบนอาหาร PDA ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 4 ระดับ ได้แก่ 3, 5, 7 และ 9 โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย HCl ความเข้มข้น 3% และ NaOH ความเข้มข้น 5M จากนั้นบ่มภายใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C

การตอบสนองต่อแหล่งคาร์บอน

นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราเลี้ยงบนอาหาร czapek's agar (CZA) ที่ผสมแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose), น้ำตาลซูโครส (sucrose) และเซลลูโลส (cellulose) ความเข้มข้น 10% ต่อปริมาณอาหาร 1 ลิตร

การตอบสนองต่อแหล่งไนโตรเจน

นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราวางบนอาหาร CZA ที่ผสมแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) และเปปโตน (peptone) ความเข้มข้น 10% ต่อปริมาณอาหาร 1 ลิตร

การบันทึกผลและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

บันทึกผลโดยวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* ทุกวันจนครบ 5 วัน และถ่ายภาพ วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม R stat version 3.6.1 เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$

ความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* ในการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ

การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหาร PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C นาน 3 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. เจาะบริเวณขอบโคโลนีย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราลงอาหารเหลว czapek

broth (CZB) ที่ไม่เติมกลูโคส และซูโครส ปริมาตร 250 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 115 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน นำตัวอย่างอาหารเหลวที่มีเชื้อราเจริญอยู่ มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเส้นใย จากนั้นดูดสารแขวนลอยเก็บที่อุณหภูมิ -20°C นำมาใช้วิเคราะห์เอนไซม์ต่อไป

การวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์ไคติเนส (chitinase)

ทดสอบกิจกรรมไคติเนส ด้วยวิธีการของ Nelson (1994) ซึ่งตรวจสอบจากปริมาณน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine (NAGA) เตรียม colloidal chitin เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น ในอัตรา 2.5 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่อน้ำ 250 มล. ดูดสารละลาย colloidal chitin ที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.5 มล. ตามด้วยตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 0.2 มล. ตามด้วยสารละลาย solution D ปริมาตร 0.5 มล. แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมด้วยสารละลาย solution E ปริมาตร 3 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เปรียบเทียบ standard curve ของ NAGA ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม R stat version 3.6.1 เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$

การวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

ประเมินกิจกรรมของเซลลูเลส โดยการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารสุดท้ายในกระบวนการสลายตัวของเซลลูโลส โดยดัดแปลงวิธีการของ Nelson (1994) และ Somogyi (1952) โดยเตรียมสารละลาย carboxyl methyl cellulose ความเข้มข้น 1% (1% CMC) อัตรา 2.5 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่อน้ำ 250 มล. เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น ตามด้วยสารละลาย solution D ปริมาตร 0.5 มล. แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วเติมสารละลาย solution E ปริมาตร 3 มล. เขย่าให้เขากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับ standard curve ของน้ำตาลกลูโคส ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม R stat version 3.6.1 เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การระบุชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ DCHA602 DCHA2005 DCHU1101 และ DCHU1603 บนอาหาร PDA พบว่า เชื้อราทุกไอโซเลทมีการเจริญค่อนข้างรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างเส้นใยสีขาวในช่วง 1 – 2 วันแรก ต่อมามีการสร้างกลุ่มสปอร์สีเขียวจากบริเวณกลางโคโลนี ขอบโคโลนีสีขาว แผ่ราบไปกับผิวหน้าอาหาร ด้านหลังโคโลนีส่วนใหญ่มีสีขาว การระบุเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามคำอธิบาย ในหนังสือ *Trichoderma* identification and agricultural applications (Samuels and Hebbar, 2015) สามารถแยกเชื้อราได้ดังนี้

ไอโซเลท DCHA602 สร้างเส้นใยสีขาว กลุ่มของ conidia มีสีเขียว ลักษณะเป็นวงซ้อนกัน ขอบโคโลนีเรียบ ด้านล่างโคโลนี (reversed colony) มีสีขาว ลักษณะเป็นวงซ้อนกัน (**Figure 1A, 1B**) เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบ conidiophores บริเวณใต้ septa มีการแตกแขนงของ phialides ออกจากจุดเดียวกัน 2 - 3 phialides หรืออาจเกิดแบบเดี่ยว ๆ ลักษณะ phialides ใส ไม่มีสี โค้งงอเล็กน้อย บริเวณก้านมีลักษณะเรียว (lageniform) ปลายก้านมีลักษณะโป่ง (ampulliform) ให้กำเนิด conidia รูปไข่ (obovoid) ถึงรูปร่างรี (ellipsoidal) สีเขียวสว่าง ขนาด 3.47 – 4.41 x 4.49 – 6.94 ไมโครเมตร (**Figure 1C, 1D**) จำแนกเป็นเชื้อรา *Trichoderma koningiopsis*

ไอโซเลท DCHA2005 สร้างเส้นใยสีขาว การสร้าง conidia เป็นแบบปุยอัดแน่น มีสีเขียวเข้ม เกิดเป็นวงซ้อนกัน ส่วนด้านล่างโคโลนีมีสีขาวถึงเทา (**Figure 1E, 1F**) ส่วน conidiophores แตกกิ่งก้านจาก somatic hyphae ออกทางด้านข้างมักแตกเป็นเดี่ยวหรือคู่ บริเวณใต้ septa มีการแตกกิ่งก้านของ primary phialides ออกด้านข้างแบบคู่ ทั้งสองข้างมีแนวโน้มที่ความยาวใกล้เคียงกัน ส่วนปลายมี

การแตกของ secondary phialides จำนวน 2 – 3 phialides มีลักษณะเรียว บริเวณกลางขยายเล็กน้อย ปลายโค้งงอเล็กน้อย ส่วนที่ให้กำเนิด conidia มีลักษณะโป่ง conidia รูปร่างกลม (globose) ถึงค่อนข้างกลม (subglobose) มีขนาด 3.66 – 4.34 x 4.17 – 4.76 ไมโครเมตร (**Figure 1G, 1H**) จากลักษณะดังกล่าว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Trichoderma asperellum* และ *T. asperelloides*

ไอโซเลท DCHU1101 สร้างเส้นใยสีขาว เจริญฟูจากผิวหน้าอาหาร กลุ่มของ conidia อัดแน่น จากบริเวณกลางโคโลนี มีสีเขียวอ่อน ถึงเขียวเข้ม ด้านล่างโคโลนีมีสีขาวถึงเทา (**Figure 1I, 1J**) conidiophores ค่อนข้างสั้น แตกกิ่งก้านจาก somatic hyphae ออกทางด้านข้าง มีการแตกกิ่งของ primary phialides แบบคู่ตรงข้ามกันจากบริเวณใต้ septa ของ conidiophores ส่วนปลายพบ secondary phialides แตกแขนงแบบ verticillate ไม่เป็นระเบียบ บางครั้งเกิดจากจุดเดียวกันและหนาแน่น จำนวน 3 – 6 phialides มีลักษณะฐานกว้างส่วนปลายเรียว คล้ายขวด ส่วนที่ให้กำเนิด conidia มีลักษณะโป่ง conidia รูปร่างค่อนข้างกลมจนถึงทรงกลม มีขนาด 2.74 – 3.63 x 2.74 – 4.17 ไมโครเมตร ผนังเรียบ (**Figure 1K, 1L**) จากลักษณะดังกล่าว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Trichoderma virens*

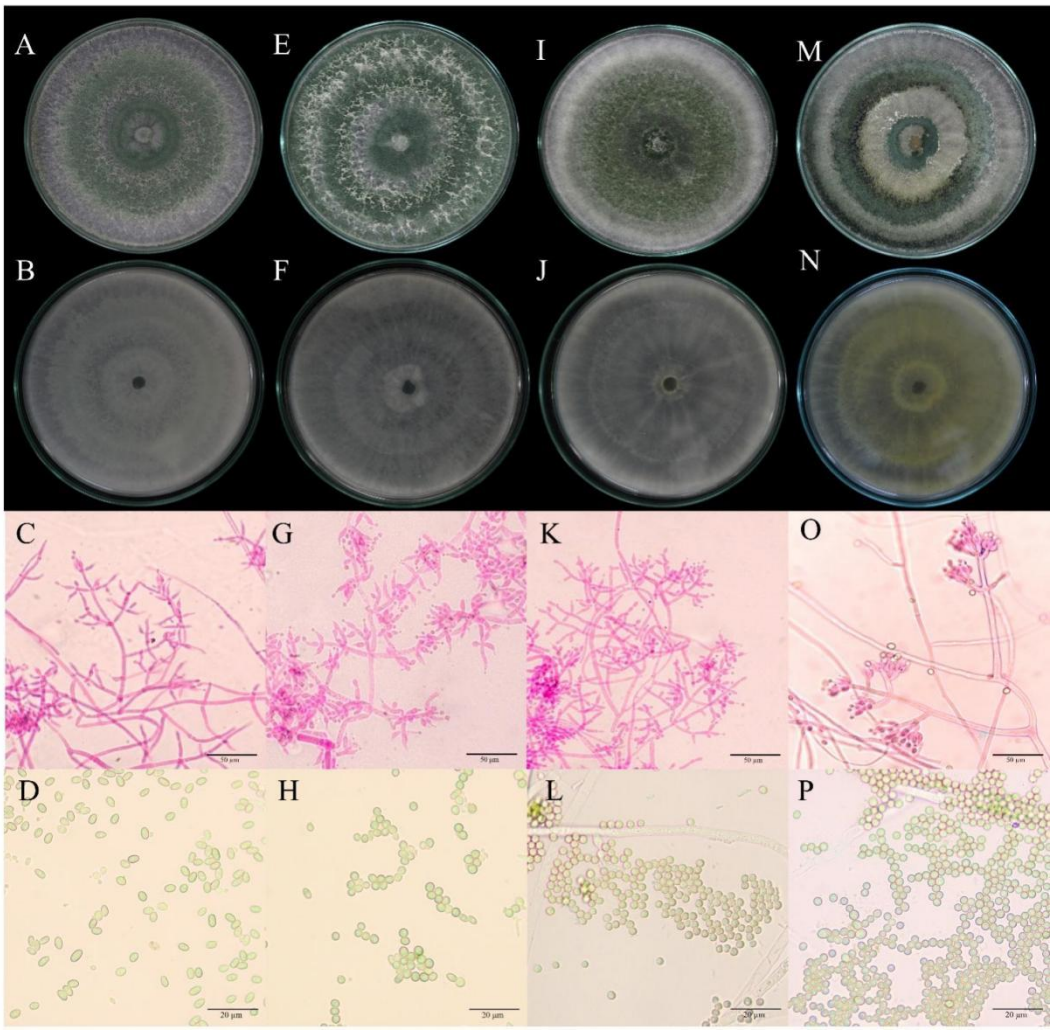


Figure 1 Four species of *Trichoderma* spp. on PDA at 3d incubation period (A-D) *Trichoderma koningiopsis* (DCHA602), (E-H) *T. asperellum* (DCHA2005), (I-L) *T. virens* (DCHU1101), (M-P) *T. harzianum* (DCHU1603), (A, E, I, M) colony type, (B, F, J, N) reversed colony, (C, G, K, O) phialides (scale bar= 50 µm) and (D, H, L, P) conidia (scale bar= 20 µm)

ไอโซเลท DCHU1603 สร้างเส้นใยสีขาว เจริญฟูจากผิวหน้าอาหาร กลุ่มของ conidia มีปริมาณหนาแน่น มีสีเขียวแกมเหลือง จนถึงสีเขียวเข้ม เกิดเป็นวงซ้อนกัน ด้านล่างโคโลนีมีสีขาว เมื่ออายุมากขึ้นพบการสร้างเม็ดสี (pigment) สีเหลือง (**Figure 1M, 1N**) conidiophores ค่อนข้างสั้น แตกกิ่งก้านออกด้านข้างแบบเดี่ยวหรือคู่จาก somatic hyphae บริเวณใต้ septa ของ conidiophores มีการแตกกิ่งของ primary phialides เกิดแบบเดี่ยวหรือคู่ตรงข้ามกัน ส่วนปลายพบ secondary phialides แตกแขนงแบบ verticillate มีลักษณะฐานกว้างส่วนปลายเรียว คล้ายขวด จำนวน 2 – 4 phialides ส่วนที่ให้กำเนิด conidia มีลักษณะโป่ง conidia มีรูปร่างค่อนข้างกลมไปจนถึงรูปไข่ มีขนาด 2.85 – 3.82 x 3.07 – 3.7 ไมโครเมตร (**Figure 1O, 1P**) จำแนกได้เป็นเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่า DCHA602 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *T. koningiopsis* (accession number: MH624141.1) ที่ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity) เท่ากับ 99.83% ไอโซเลท DCHA2005 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *T. asperellum* (accession number: MK210562.1) มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม เท่ากับ 99.83% ไอโซเลท DCHA305, DCHU1101, DCHU1401 และ DCHU1402 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *T. virens* (accession number: KP056781.2) มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม เท่ากับ 99.83% และไอโซเลท DCHU1603 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *T. harzianum* (accession number: MT422092.1) มีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม เท่ากับ 99.50% เมื่อทำการตรวจสอบถึงสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อหาระยะห่างทางพันธุกรรม ด้วยวิธีการ unweighted pairs group method with arithmetic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม MEGA version X. โดยคำนวณค่าความน่าเชื่อถือของ phylogenetic tree ที่ค่า bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง พบว่าไอโซเลท DCHA602 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *T. koningiopsis* (100% bootstrap value) ไอโซเลท DCHA2005 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *T. asperellum* (99% bootstrap value) ซึ่งจากข้อมูลใน **Figure 2** พบว่าไอโซเลทที่นำมาศึกษานี้จัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (accession number: LC123601) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้าของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ส่วนไอโซเลท DCHU1101 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *T. virens* (100% bootstrap value) และไอโซเลท DCHU1603 อยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *T. harzianum* (98% bootstrap value) (**Figure 2**)

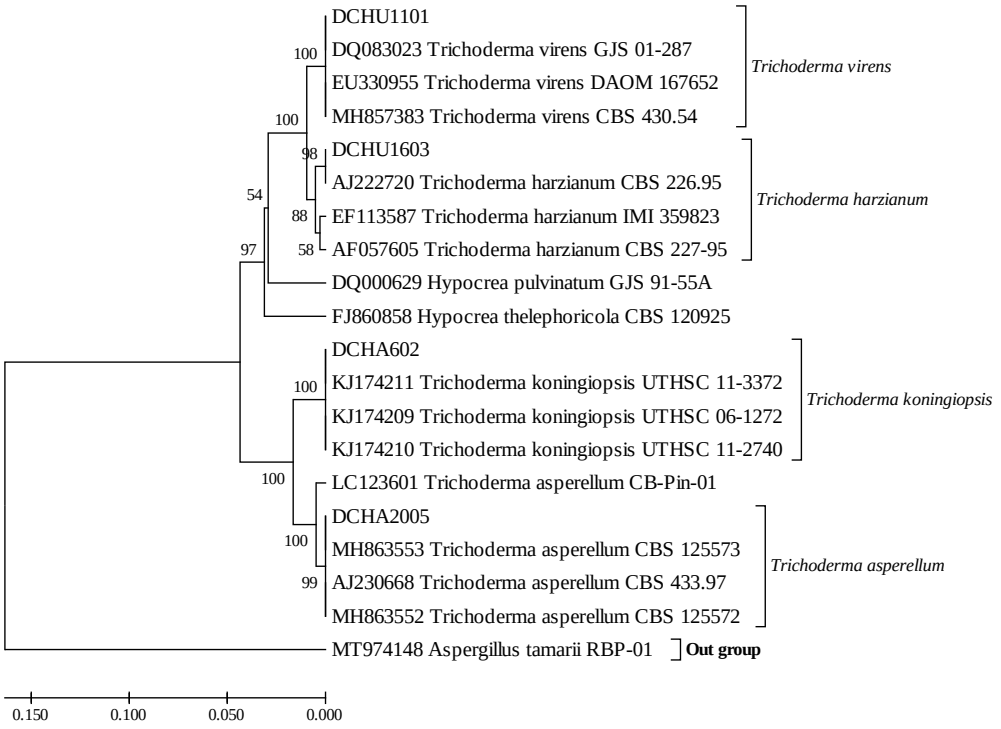


Figure 2 The UPGMA tree was constructed using sequences of 15 *Trichoderma* species in the GeneBank based on ITS1-5.8S-ITS2 genomic data. The numbers on the node are bootstrap values (1,000 replications) analyzed by MEGA software version X. *Aspergillus tamarii* isolate RBP-01 was used as an out group

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าการระบุเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอ เนื่องจากเชื้อราในสกุล *Trichoderma* มีความคล้ายคลึงกับเชื้อราในสกุล *Hypocrea* และ *Gliocladium* อีกทั้งความแตกต่างของเชื้อราในแต่ละสปีชีส์ยังมีความไม่ชัดเจน (Rehner and Samuels, 1994; Lieckfeldt et al., 1998) ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล จึงเข้ามามีบทบาทในการระบุเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 (Kullnig-gradinger et al., 2002; Mistry and Bariya, 2022) ยังคงเป็นเครื่องมือที่ให้ผลได้ค่อนข้างแม่นยำ แม้ว่าในปัจจุบันนี้การระบุเชื้อรานั้นได้มีการประยุกต์ใช้ gene/region อื่น ๆ เช่น translation elongation factor-1 (*tef*-1), chitinase 18-5 (*chi18*-5), RNA polymerase II subunit (*rpb2*) เป็นต้น (Oskiera et al., 2015; Haouhach et al., 2020) ร่วมกันแบบ mutigene/multiloci เพื่อทำให้ข้อมูลมีความแม่นยำสูงขึ้นแล้วก็ตาม

การทดสอบความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture

จากผลการทดสอบความสามารถของเชื้อรา *T. asperellum* (DCHA2005) *T. harzianum* (DCHU1603) *T. koningiopsis* (DCHA602) และ *T. virens* (DCHU1101) ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน พบว่าทั้ง 4 สปีชีส์ สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคที่นำมาศึกษาได้มากน้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ได้ เพียงสปีชีส์เดียว **(Table 2)**

หากเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละสปีชีส์ ที่สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคได้มากกว่า 35% ขึ้นไป พบว่าเชื้อรา *T. asperellum* (DCHA2005) ควบคุมเชื้อรา *P. splendens* (DCHU1301) และ *P. cucurbitacearum* (DCHU1003) ได้ เท่ากับ 37.78 และ 37.04% ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา *T. harzianum* (DCHU1603) ควบคุมเชื้อรา *P. inflatum* (DCHU301) และ *P. splendens* (DCHU1301) ได้ เท่ากับ 41.11 และ 38.52% ตามลำดับ ขณะที่เชื้อรา *T. koningiopsis* (DCHA602) ควบคุมเชื้อรา *P.*

splendens (DCHU1301) ได้เท่ากับ 36.67% อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อรา *T. virens* (DCHU1101) สามารถควบคุมเชื้อรา *P. inflatum* (DCHU301) *P. cucurbitacearum* (DCHU1003) และ *P. splendens* (DCHU1301) ได้ เท่ากับ 44.81, 41.85 และ 37.78% ตามลำดับ **(Table 2)**

Table 2 Efficiency of *Trichoderma* 4 species to inhibit fungal mycelia of 6 species of plant pathogenic fungi

Pathogen	% Inhibition			
	T. asperellum (DCHA2005)	*T. harzianum* (DCHU1603)	*T. koningiopsis* (DCHA602)	*T. virens* (DCHU1101)
P. cucurbitacearum (DCHU1003)	37.04a	31.11ab	31.85a	41.85a
P. deliense (DCHA101)	30.79ab	28.69ab	27.02ab	30.88a
P. inflatum (DCHU301)	32.59ab	41.11a	32.22a	44.81a
P. palmivora (DTRA212)	-10.80c	-5.52c	-12.79c	-11.91b
P. splendens (DCHU1301)	37.78a	38.52a	36.67a	37.78a
P. vexans (DCHA207)	13.15b	14.38bc	6.09bc	8.65b
C. V. (%)	25.22	23.34	30.62	23.44

[1]/ Column values followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)

จากข้อมูลงานวิจัยโดยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อราสกุล *Trichoderma* ที่พบจากธรรมชาติ โดยเฉพาะในดินและเศษซากพืช มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดและถูกนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำหรับการควบคุมโรคพืช (กาญจนา, 2557; จิระเดช, 2563; โสภา และคณะ, 2564; Bunbury-Blanchette and Walker, 2019) สำหรับผลการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ศึกษานั้น พบว่าที่เชื้อรา *Trichoderma* ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแต่ละสปีชีส์ได้แตกต่างกันนั้น เกิดจากภาวะปรสิต (mycoparasitism) ซึ่งอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยาของเส้นใยหรือสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค โดยที่เชื้อรา *Trichoderma* สร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (Sonka et al., 2018; Mukherjee et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของเชื้อรา *Trichoderma* ขึ้นอยู่กับกลไกทางตรงและทางอ้อม โดยกลไกทางตรงระหว่างเชื้อราปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรค เกี่ยวข้องกับกลไกการเป็นปรสิต การสัมผัสทางกายภาพและการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย (hydrolytic enzyme) สารประกอบที่เป็นพิษ และ/หรือสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์เพื่อทำลายเชื้อราสาเหตุโรค ส่วนกลไกทางอ้อมนั้นเกี่ยวข้องกับการครอบครองพื้นที่และแย่งชิงอาหารเชื้อราสาเหตุโรค ความสามารถในการผลิตสารที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ และทำลายเซลล์ (antibiosis) หรือในกรณีที่มีการศึกษาในสภาพแปลงปลูกพืช อาจเกิดการปรับเปลี่ยน pH บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ส่วน (Benítez et al., 2004) จากการรายงานของ Bae et al. (2016) พบว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อรา *Trichoderma spp* สร้างขึ้นมานั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Phytophthora capsici* ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนพืชและการเหนี่ยวนำยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเข้าทำลายในเนื้อเยื่อพืช แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะของเชื้อรา *Trichoderma* spp. อาจจะไม่ได้ยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคโดยตรง แต่ไปกระตุ้นให้พืชอาศัยเกิดความต้านทานและสร้างกลไกการป้องกันตัวนั่นเอง (Sood et al., 2020)

ในงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* (DTRA212) ได้นั้น อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อรา *P. palmivora* (DTRA212) ที่คัดเลือกมาศึกษานั้นเป็นไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรคที่รุนแรง มี aggressiveness ค่อนข้างสูง คุณสมบัตินี้หากเข้าทำลายพืชก็จะก่อให้เกิดโรคได้รุนแรง (ข้อมูลไม่ได้แสดง) แม้ว่าการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ จะรวดเร็วกว่าเชื้อรา *P. palmivora* (DTRA212) ก็ตาม แต่พบว่าเชื้อรา *P. palmivora* (DTRA212) นั้นเจริญเข้าไปในโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* ได้ ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Sriwati et al. (2015) ที่ทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* ไอโซเลท T15 และ T16 ในการควบคุมเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคผลเน่าของโกโก้ ด้วยวิธี

dual culture โดยเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ก่อนการวางชิ้นวุ้นเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ อย่างไรก็ตามพบว่า ไอโซเลท T15 และ T16 นั้น ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ได้แต่อย่างใด ทั้งนี้เนื่องจากเจริญเติบโตได้ช้านั่นเอง ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรค เช่น *P. vexans* (DCHA207), *P. cucurbitacearum* (DCHU1003), *P. deliense* (DCHA101), *P. inflatum* (DCHU301) และ *P. splendens* (DCHU1301) นั้น อาจมี aggressiveness ที่น้อยกว่า เชื้อรา *Trichoderma* ที่นำมาศึกษา จึงยังคงควบคุมได้บ้าง นอกไปจากนี้แล้วอาจเกี่ยวข้องกับปริมาณของเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ (cell wall) ของเชื้อรากลุ่ม oomycetes (Webster and Weber, 2007) อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณหรือความหนาของเซลลูโลสในเชื้อรา *P. palmivora* มีมากกว่าเชื้อราสาเหตุโรคอีก 5 สปีชีส์ จากการศึกษาของ Khairum et al. (2018) พบว่าเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำของกล้วยไม้นั้น สร้างสารพิษ α-elicitin ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ นอกไปจากนี้การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์โดยวิธี dual culture เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอหรือได้ข้อมูลที่อาจคลาดเคลื่อนได้ อาจต้องเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* เพื่อทำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่กรองสปอร์ออก (culture filtrate) ซึ่งจะมีสารยับยั้งเชื้อราหลายชนิดที่ *Trichoderma* สร้างขึ้น แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Howell, 2006) ซึ่งเคยมีรายงานว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่กรองสปอร์ออกของเชื้อรา *T. virens* ยับยั้ง *Phytophthora erythroseptica* สาเหตุโรคของพืชวงศ์มะเขือ (Etebarian et al., 2000), *Phytophthora ramorum* สาเหตุโรคของไม้ป่า (Baker et al., 2011, *Phytophthora sojae* สาเหตุโรคของถั่วเหลือง (Ayoubi et al., 2012) ซึ่ง *T. virens* บางสายพันธุ์สร้าง gliotoxin ยับยั้งได้ทั้งเชื้อรา *Phytophthora* และ *Pythium* ได้ อย่างน้อยที่สุดผลของการวิจัยนี้จะเป็นจุดที่ต้องเฝ้าระวังการนำเชื้อรา *Trichoderma* เพื่อการควบคุมเชื้อราเป้าหมาย เช่น *P. palmivora* นั้น อาจจำเป็นที่ต้องกลับมาพินิจพิเคราะห์กันใหม่ซึ่งอาจไม่เหมือนข้อมูลที่ได้รับที่ผ่านมา

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma*

อุณหภูมิ

เชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ มีการเจริญของเส้นใยได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 10 – 35°C โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 25°C สามารถเจริญได้ดีที่สุด โดยที่ *T. virens* (DCHU1101), *T. harzianum* (DCHU1603), *T. asperellum* (DCHA2005) และ *T. koningiopsis* (DCHA602) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เท่ากับ 9.00, 8.83, 8.27 และ 6.70 ซม. ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราทั้ง 4 สปีชีส์ ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิที่ 5 และ 45°C โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มในอุณหภูมิดังกล่าว **(Table 3)**

ความเป็นกรด-ด่าง

พบว่าเชื้อราทั้ง 4 สปีชีส์ สามารถเจริญได้ในทุกสภาพความเป็นกรด-ด่าง โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเจริญได้ดีที่สุดที่ค่า pH 5 และ 7 โดยที่เชื้อรา *T. virens* (DCHU1101) และ *T. harzianum* (DCHU1603) มีเส้นผ่านศูนย์กลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 5 และ 7 เท่ากับ 9.00 ซม. ส่วนเชื้อรา *T. asperellum* (DCHA2005) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 9.00 และ 8.68 ซม. ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อรา *T. koningiopsis* (DCHA602) ที่ pH 5 และ 7 มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 8.33 และ 6.42 ซม. ตามลำดับ) **(Table 3)**

Table 3 Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma* 4 species after 5 days of incubation period

Characteristics	*Trichoderma* species			
	T. asperellum	*T. harzianum*	*T. koningiopsis*	*T. virens*
Colony diameter on PDA (cm)	7.38c	8.47ab	7.58bc	9.00a
Mean spore wide (µm)	3.66 - 4.34	2.85 - 3.82	3.47 - 4.41	2.74 - 3.63
Mean spore length (µm)	4.17 - 4.76	3.07 - 3.7	4.49 - 6.94	2.74 - 4.17
Colony diameter at 5° C (cm)	0.60e	0.60d	0.60e	0.60e
Colony diameter at 10° C (cm)	0.80d	0.88d	1.30c	1.23d
Colony diameter at 15° C (cm)	2.32c	1.68c	2.33b	2.28b
Colony diameter at 25° C (cm)	8.27a	8.83a	6.70a	9.00a
Colony diameter at 35° C (cm)	2.95b	3.48b	0.93d	2.10c
Colony diameter at 45° C (cm)	0.60e	0.60d	0.60e	0.60e
C.V. (%)	**2.81**	**6.78**	**4.88**	**2.76**
Colony diameter on pH 3 (cm)	6.87b	6.68b	5.33d	7.23b
Colony diameter on pH 5 (cm)	9.00a	9.00a	8.33a	9.00a
Colony diameter on pH 7 (cm)	8.68a	9.00a	6.42b	9.00a
Colony diameter on pH 9 (cm)	6.48b	6.73b	5.90c	7.25b
C.V. (%)	**3.60**	**1.22**	**3.31**	**1.61**
Colony diameter on glucose (cm)	7.73a	8.05a	8.33a	9.00a
Colony diameter on sucrose (cm)	6.77b	6.65b	7.90b	7.90b
Colony diameter on cellulose (cm)	7.10b	7.60ab	7.66b	7.63b
C.V. (%)	**2.36**	**8.03**	**1.58**	**2.38**
Colony diameter on (NH_4Cl) (cm)	6.65b	8.77a	8.20b	8.07a
Colony diameter on (KNO_3) (cm)	6.48b	8.20b	6.18c	7.50b
Colony diameter on peptone (cm)	8.12a	9.00a	8.70a	8.00a
C.V. (%)	**2.81**	**1.68**	**1.47**	**2.39**

[1]/ Column values followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)

การตอบสนองต่อแหล่งคาร์บอน

พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแหล่งคาร์บอนที่นำมาทดสอบ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าบนอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา *T. virens* (DCHU1101), *T. koningiopsis* (DCHA602), *T. harzianum* (DCHU1603) และ *T. asperellum* (DCHA2005) ได้เท่ากับ 9.00, 8.33, 8.05 และ 7.73 ซม. ตามลำดับ (**Table 3**)

การตอบสนองต่อแหล่งไนโตรเจน

เชื้อรา *Trichoderma* สามารถเจริญบนอาหารที่ผสมแหล่งไนโตรเจนที่นำมาทดสอบได้ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* (DCHU1603) และ *T. virens* (DCHU1101) เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และเปปโตน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 8.77/9.00 และ 8.07/8.00 ซม. ตามลำดับ

ในขณะที่เชื้อรา *T. asperellum* (DCHA2005) และ *T. koningiopsis* (DCHA602) เจริญได้ดีบนอาหารที่มีเปปโตน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 8.12 และ 8.70 ซม. ตามลำดับ (**Table 3**)

เชื้อราในสกุล *Trichoderma* ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่เจริญและสร้างเส้นใยได้ค่อนข้างรวดเร็ว ทำให้พบเชื้อราสกุลนี้เจริญได้ทั่วไป โดยเฉพาะในบริเวณที่เป็นพื้นที่การเกษตร พื้นที่ดินป่า รวมไปถึงทะเลทราย (Danielson and Davey, 1973b; Wardle et al., 1993) ปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความแห้งแล้ง ความเค็ม ความชื้น อุณหภูมิ เชื้อสาเหตุโรค และประเภทของดิน มีอิทธิพลต่อประชากรจุลินทรีย์และการทำงานในพืช (Adeleke and Babalola, 2020; Igiehon et al., 2021) เชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละสปีชีส์ มีสภาพแวดล้อมในการเจริญที่แตกต่างกัน การศึกษาปัจจัยทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต ทำให้ทราบถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญ การเพิ่มปริมาณ และสามารถนำข้อมูลนี้ไปปรับใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อประโยชน์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Bruehl, 1975) สำหรับกระบวนการเมทาบอลิซึมของเชื้อราสกุลนี้ค่อนข้างมีความหลากหลาย สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่มาจากรูปของแอมโมเนีย (NH_3) ได้ค่อนข้างดี แต่ใช้สารไนเตรทได้ไม่ดีนัก (Danielson and Davey, 1973a) สำหรับแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$, เปปโตน (peptone) และ โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) โดยเฉพาะเปปโตน ซึ่ง Sun et al. (2021) รายงานว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เชื้อรา *Trichoderma reesei* เจริญได้ดี และสามารถกระตุ้นให้เชื้อราผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ เจริญได้ดีในอาหารที่มีเปปโตนเป็นส่วนผสม สำหรับแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่าเชื้อราสกุลนี้สามารถย่อยสารประกอบแหล่งคาร์บอน C_1 ไฮโดรคาร์บอน รวมถึงน้ำตาลโมเลกุลต่าง ๆ เช่น อินซูลิน (insulin), น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคสรูปแบบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (D-glucose) เป็นต้น (Davies and Westlake, 1979)

ความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* ในการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ

การวิเคราะห์การผลิต chitinase

ผลการวิเคราะห์การผลิตไคติเนส **(**chitinase) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เชื้อรา *T. harzianum* (DCHU1603) มีการผลิตได้มากที่สุด โดยมีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.3630 มก./มล. รองลงมาคือ *T. koningiopsis* (DCHA602), *T. virens* (DCHU1101) และ *T. asperellum* (DCHA2005) มีค่าเท่ากับ 0.2400, 0.2333 และ 0.2250 มก./มล. ตามลำดับ (**Table 4**)

การวิเคราะห์การผลิต cellulase

จากการวิเคราะห์การผลิตเซลลูเลส **(**cellulase) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เชื้อรา *T. koningiopsis* (DCHA602) มีการผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดเท่ากับ 19.0272 หน่วย/ลิตร รองลงมาคือ *T. virens* (DCHU1101), *T. harzianum* (DCHU1603) และ *T. asperellum* (DCHA2005) มีค่าเท่ากับ 12.4608, 12.2581 และ 11.4677 หน่วย/ลิตร ตามลำดับ (**Table 4**)

มีรายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เบตา 1, 3 กลูคาเนส (β-1, 3 glucanases) เซลลูเลส ไคติเนส และโปรตีเอส (proteases) เป็นต้น (Tang et al*.,* 2001; Whipps, 2001) ซึ่งความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ ถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อใช้ประโยชน์จากการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเอนไซม์จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยาและการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Kim et al., 2002) ซึ่งจะเกิดต่อเมื่อเชื้อรา *Trichoderma* มีการเจริญและพันรัดเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ในกระบวนการนี้จะมีการสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า appressorium-like structures ทำหน้าที่ในการแทงเข้าสู่เชื้อราสาเหตุโรค จากนั้นจะผลิตสารทุติยภูมิและหลั่งเอนไซม์ ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นการเจริญของเส้นใยเชื้อราสกุลนี้ให้เข้าสู่ช่องว่างของผนังเซลล์ของเส้นใย (lumen) ของเชื้อราสาเหตุโรค และย่อยสลายส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคได้ (Viterbo et al., 2002; Mukherjee et al., 2012) โดยเฉพาะเอนไซม์ไคติเนสมีความเกี่ยวข้องมากที่สุดในกลไกการเป็นปรสิตของเชื้อรา *Trichoderma* (Carsolio et al., 1994) เอนไซม์เหล่านี้ผลิตโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความสัมพันธ์เชิงบวกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Osorio-Hernández et al., 2016) สำหรับ

เอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อรา *Trichoderma* ผลิตได้มากกว่าเอนไซม์ไคติเนสนั้น น่าจะเหมาะสมต่อการนำไปควบคุมเชื้อรากลุ่ม oomycetes ซึ่งผนังเซลล์มีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่

จากงานวิจัยของ Mclntyre et al. (2004) พบว่าการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *Trichoderma* มีประโยชน์ต่อการใช้เชื้อราเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแบบชีววิธี โดยในการศึกษาการแสดงออกของยีนในระหว่างการเกิดภาวะปรสิตของเชื้อรา *T. atroviride* พบว่าเชื้อรามีการส่งสัญญาณ cAMP (cyclic adenosine monophosphate) และ MAP kinase (mitogen-activated protein kinase, MAPK) เพิ่มมากขึ้น เพื่อควบคุมการสร้างเอนไซม์ และการพันรัดเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนี้ในเชื้อรา *T. harzianum* พบว่ายีน *tga1* มีความเกี่ยวข้องกับการพันรัด และกระตุ้นการสร้าง G-protein (mastoparan-fluoroaluminate) เพื่อใช้ในการเข้าทำลายและเกิดภาวะปรสิตกับเชื้อราสาเหตุโรคเช่นกัน (Omero et al., 1999)

Table 4 Enzyme activities of *Trichoderma* 4 species

Species	Enzyme activity	
	Chitinase enzyme (mg/ml)	Cellulase enzyme (U/L)
Trichoderma asperellum (DCHA2005)	0.2250c	11.4677c
T. harzianum (DCHU1603)	0.3630a	12.2581b
T. koningiopsis (DCHA602)	0.2400b	19.0272a
T. virens (DCHU1101)	0.2333b	12.4608b
C.V. (%)	1.4221	1.6021

[1]/ Column values followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)

สรุป

เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบจากแปลงปลูกทุเรียนในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี และชุมพร ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น 4 สปีชีส์ คือ *T. asperellum* (DCHA2005), *T. harzianum* (DCHU1603), *T. koningiopsis* (DCHA602) และ *T. virens* (DCHU1101) ในการศึกษาความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 4 สปีชีส์ พบว่าความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *Pythium cucurbitacearum* (DCHU1003), *P. deliense* (DCHA101), *P. inflatum* (DCHU301), *P. splendens* (DCHU1301)และ *Phytopythium vexans* (DCHA207) ได้ มากน้อยแตกต่างกัน แต่ไม่สามารถควบคุมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ได้ แต่ละสปีชีส์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์เจริญได้ดี เท่ากับ 25°C สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเปบโตนแหล่งไนโตรเจนนั้น เป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย ส่วนความสามารถในการสร้างไคติเนสและเซลลูเลสนั้น พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ สร้างได้มากน้อยแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค กลับพบว่าไม่มี correlation กันแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นการเปิดเผยว่า อย่างน้อยที่สุดเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 4 สปีชีส์ แม้ไม่สามารถควบคุม *P. palmivora* ได้ แต่ก็ยังสามารถควบคุมเชื้อราในสกุล *Pythium* และ *Phytopythium* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนที่พบในปัจจุบันได้ด้วยเช่นกัน อย่างน้อยที่สุดก็ยังสามารถหยุดการแพร่ระบาดของเชื้อราสาเหตุโรคในแปลงได้ การจัดการโรคในสวนทุเรียนนอกจากการควบคุมการระบาดของโรคแล้ว ควรต้องคำนึงถึงจุลินทรีย์ในท้องถิ่น ซึ่งอาจมีประโยชน์และมีความสำคัญทั้งต่อระบบนิเวศ ความหลากหลายทางชีวภาพ และการครอบครองพื้นที่ด้วยเช่นกัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา มณีศรี. 2557. การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากเนื้อไม้ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Mull Arg) สำหรับควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* (Butler) และ *P. botryose* (Chee) โดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2563. ไตรโคเดอร์มา: เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช. เพชรเกษมการพิมพ์, นครปฐม.

โสภา จอมอิ่น, อังสนา อัครพิศาล, ชาตรี สิทธิกุล และชาญณรงค์ ดวงสอาด. 2564. ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่รวบรวมได้จากจังหวัดเชียงใหม่ ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*. วารสารเกษตร. 25(1): 21-29.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. การผลิตทุเรียนย้อนหลัง 5 ปีล่าสุด. แหล่งข้อมูล: http://mis-app.oae.go.th/product/ทุเรียน. ค้นเมื่อ 31 มกราคม 2565.

Adeleke, B.S., A.S. Ayangbenro, and O.O. Babalola. 2021. Genomic analysis of endophytic *Bacillus cereus* T4S and its plant growth-promoting traits. Plants. 10: 1776.

Ayoubi, N., D. Zafari, and M. Mirabolfathy. 2012. Combination of *Trichoderma* species and *Bradyrhizobium japonicum* in control of *Phytophthora sojae* and soybean growth. Journal of Crop Protection. 1(1): 0-0.

Bae, S.-J., T.K. Mohanta, J.Y. Chung, M. Ryu, G. Park, S. Shim, H. Seo, D.-W. Bae, I. Bae, J.-J. Kim, and H. Bae. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. Biological Control. 92: 128-138.

Becker, E., N. Rajakulendran, and S. Shamoun. 2011. *Trichoderma* spp.: antagonistic effects to *Phytophthora ramorum* growth and spore germination in vitro. Proceedings of the Plant Canada, Halifax, Nova Scotia: Plant Canada. 34: 173-174.

Benítez, T., A.M. Rincón, M.C. Limón, and A.C. Codon. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International microbiology. 7(4): 249-260.

Bruehl, G.W. 1997. Systems and mechanisms of residue possession by pioneer fungal colonists. pp. 77-83 In Bruehl, G. W. (ed.) Biology and control of soil-borne plant pathogems. The American Phytopathological Society, St. Paul's University**.**

Bunbury-Blanchette, A.L., and A.K. Walker. 2019. Trichoderma species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion. Biological Control. 130: 127-135.

Carsolio, C., A. Gutiérrez, B. Jiménez, M. Van Montagu, and A. Herrera-Estrella. 1994. Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. Proceedings of the National Academy of Sciences. 91(23): 10903-10907.

Cuadros-Orellana, S., L.R. Leite, A. Smith, J.D. Medeiros, F. Badotti, P.L. Fonseca, and A. Góes-Neto. 2013. Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. Fungal Genomics and Biology. 3(2): 1.

Danielson, R.M., and C.B. Davey. 1973a. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. Soil Biology and Biochemistry. 5(5): 505-515.

Danielson, R.M., and C.B. Davey. 1973b. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma* in vitro. Soil Biology and Biochemistry. 5(5): 517-524.

Davies, J.S., and D.W.S. Westlake. 1979. Crude oil utilization by fungi. Canadian Journal of Microbiology. 25(2): 146-156.

Etebarian, H.R., E.S. Scott, and T.J. Wicks. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. European Journal of Plant Pathology. 106(4): 329-337.

Garo, E., C.M. Starks, P.R. Jensen, W. Fenical, E. Lobkovsky, and J. Clardy. 2003. Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus T*richoderma virens*. Journal of Natural Products. 66: 423-426.

Ghazanfar, M.U., W. Raza, and M.I. Qamar. 2018. *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: A review. Plant Protect. 2(3): 109-135.

Haouhach, S., N. Karkachi, B. Oguiba, A. Sidaoui, I. Chamorro, M. Kihal, and E. Monte. 2020. Three new reports of *Trichoderma* in Algeria: *T. atrobrunneum* (South) *T. longibrachiatum* (South), and *T. afroharzianum* (Northwest). Microorganisms. 8(10): 1455.

Harman, G.E., M. Lorito, and J.M. Lynch. 2004. Uses of *Trichoderma* spp. to remediate soil and water pollution. Advances in Applied Microbiology. 56: 313-330.

Howell, C.R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathology. 96(2): 178-180.

Igiehon, N.O., O.O. Babalola, X. Cheseto, and B. Torto. 2021. Effects of rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi on yield, size distribution and fatty acid of soybean seeds grown under drought stress. Microbiological Research. 242: 126640.

Intana, W. 2003. Selection and development of *Trichoderma* spp. for high glucanase, antifungal metabolites producing and plant growth promoting isolates for biological control of cucumber damping-off caused by *Pythium* spp. Ph.D. Dissertation. Kasetsart University, Bangkok.

Khairum, A., O. Poolsawat, P. Pornbungkerd, A. Tharapreuksapong, S. Wongkaew, and P. Tantasawat. 2018. Effects of culture media on *Phytophthora palmivora* growth, α-elicitin production and toxicity to *Dendrobium*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 46(2): 630-638.

Kim, D.J., J.M. Baek, P. Uribe, C.M. Kenerley, and D.R. Cook. 2002. Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. Current genetics. 40(6): 374-384.

Kullnig-Gradinger, C.M., G. Szakacs, and C.P. Kubicek. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: A multigene approach. Mycological Research. 106: 757-767.

Lieckfeldt, E., G.J. Samuels, T. Börner, and W. Gams. 1998. Neotypification of *Trichiderma koningii* and its *Hypocrea muroicina* teleomorph. Canadian Journal of Botany. 76: 1507-1522.

Mayo-Prieto, S., M. Campelo, A. Lorenzana, A. Rodríguez-González, B. Reinoso, S. Gutiérrez, and P.J.E.J.o.P.P. Casquero. 2020. Antifungal activity and bean growth promotion of *Trichoderma* strains isolated from seed vs soil. European Journal of Plant Pathology. 158(4): 817-828.

McIntyre, M., J. Nielsen, J. Arnau, H. van der Brink, K. Hansen, and S. Madrid. 2004. Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark.

Mistry, H., and H. Bariya. 2022. Isolation and Identification of *Trichoderma* spp. from Different Agricultural Samples. In: Amaresan N., P. Patel, and D. Amin. (eds.) Practical Handbook on Agricultural Microbiology. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York.

Mukherjee, P.K., B.A. Horwitz, and C.M. Kenerley. 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* a genomic perspective. Microbiology. 158(1): 35-45.

Nelson, N. 1994. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry. 153: 375-380.

Omero, C., J. Inbar, V. Rocha-Ramirez, A. Herrera-Estrella, I. Chet, and B.A. Horwitz. 1999. G protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. Mycological Research. 103: 1637–1642.

Oskiera, M., M. Szczech, and G. Bartoszewski. 2015. Molecular identification of *Trichoderma* strains collected to develop plant growth-promoting and biocontrol agents. Journal of Horticultural Research. 23(1): 75-86.

Osorio-HernÃ, E., V. Conde-MartÃnez, A.C. Michel-Aceves, J.A. Lopez-Santillan, and J.A. Torres-Castillo. 2016. In vitro activities of *Trichoderma* species against *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. African Journal of Microbiology Research. 10(15): 521-527.

Polizzi, V., A. Adams, A.M. Picco, E. Adriaens, J. Lenoir, C. Van Peteghem, S. De Saeger, and N. De Kimpe. 2011. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. Building and Environment. 46: 945-954.

Pongpisutta, R., W. Winyarat, and C. Rattanakreetakul. 2013. RFLP identification of *Colletotrichum* species isolated from chilli in Thailand. Acta Horticulturae. 973: 181-186.

Rehner, S.A., and G.J. Samuels. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit rDNA sequences. Mycological Research. 98: 625-634.

Samuel, G.J., and P.K. Hebbar. 2015. *Trichoderma* Identification and Agricultural Applications. The APS Press, Minnesota, U.S.A.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry. 195: 19-23.

Sood, M., D. Kapoor, V. Kumar, M.S. Sheteiwy, M. Ramakrishnan, M. Landi, F. Araniti, and A. Sharma. 2020. *Trichoderma*: the “secrets” of a multitalented biocontrol agent. Plants. 9(6): 762.

Sun Y., Y. Qian, J. Zhang, Y. Wang, X. Li, W. Zhang, L. Wang, H. Liu, and Y. Zhong. 2021. Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. Journal of Basic Microbiology. 61(2): 122-132.

Suwan, S., M. Isobe, S. Kanokmedhakul, N. Lourit, K. Kanokmedhakul, K. Soytong, and K. Koga. 2000. Elucidation of high micro-heterogencity of an acidic-neutral trichotoxin mixture from *Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry. 35: 1438-1451.

Tang, W., H. Yang, and M. Ryder. 2001. Research and application of *Trichoderma* spp. in biological control of plant pathogens. In: Pointing, S.B., and K.D. Hyde (eds.) bio-exploitation of filamentous fungi. Fungal Diversity Research Series. 6: 403-435.

Thrane, U., S.B. Poulsen, H.I. Nirenberg, and E. Lieckfeldt. 2001. Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. FEMS Microbiology Letters. 203: 249-255.

Viterbo, A., O. Ramot, L. Chernin, and I. Chet. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie Van Leeuwenhoek. 81(1): 549-556.

Wardle, D.A., D. Parkinson, and J.E. Waller. 1993. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. Oecologia. 94(2): 165-172.

Webster, J., and R.W.S. Weber. 2007. Introduction to Fungi. Cambridge, Cambridge University Press, UK. 841.

Weindling, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology. 24: 1153-1179.

Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. 52: 487-511.

White, T.J., T. Bruns, S.J.W.T. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 18(1): 315-322.