บทความวิจัย (Research Article)

การพัฒนาชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด เพื่อการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ

Development of Encapsulated Granule of *Trichoderma*-based Bioproduct for Tomato Fusarium Wilt Disease Control

ประภาษ กาวิชา*, วนารัตน์ นาติโน และวิไลวรรณ พัฒนาสันต์

หน่วยวิจัยศัตรูพืชและการควบคุมโดยชีววิธี คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมการเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร
ตำบลเชียงเครือ อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000

อภิเดช แสงดี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

Praphat Kawicha*, Wanarat Natino and Wilaiwan Phatthanasan

Plant Pest and Biocontrol Research Unit, Faculty of Natural Resources and Agro-Industry,
Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus,
Chiangkrua, Muang, Sakon Nakhon 47000

Aphidech Sangdee

Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University,
Khamriang, Kantharawichai, Mahasarakham 44150

Received: June 26, 2020; Accepted: July 15, 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด เพื่อยืดอายุการเก็บของราไตรโคเดอร์มาและใช้ควบคุมรา *Fusarium oxysoprum* f.sp. *lycopersici* (*Fol*) วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD มี 3 ปัจจัย ได้แก่ สูตรห่อหุ้ม อุณหภูมิในการเก็บ และระยะเวลาเก็บ แต่ละสูตรมีโคนิเดียของรา *Trichoderma* sp. และ sodium alginate เท่ากัน แต่มีความเข้มข้นของ glycerol และแป้งมันสำปะหลังต่างกัน เก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง และ 4 ºC เก็บรักษา 1-9 เดือน ผลการศึกษาพบว่ารา *Trichoderma* sp. ในชีวภัณฑ์แต่ละสูตรมีชีวิตรอดและระยะเวลาเก็บต่างกัน การเก็บที่ 4 ºC ทำให้รามีชีวิตรอดสูงกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง ชีวภัณฑ์สูตร F1 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 %) เหมาะสมต่อการเก็บที่อุณหภูมิห้อง มีจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตสูงที่สุดและคงที่นาน 5 เดือน ส่วนการเก็บที่ 4 ºC พบว่าสูตร F3

**Corresponding author: csnppkc@ku.ac.th*
DOI: 10.14456/tjst.2020.85

(sodium alginate 0.88 % + tapioca starch 1.5 %), F4 (sodium alginate 0.88% + glycerol 1.5 % + tapioca starch 1.5 %), F5 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 3.7 %) และ F6 (sodium alginate 0.88 %) มีจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตสูงที่สุดและคงที่นาน 9 เดือน ราที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์แต่ละสูตรยังคงความสามารถในการควบคุมการเจริญของรา *Fol*

คำสำคัญ : ไตรโคเดอร์มา; ชีวภัณฑ์; โรคเหี่ยวเหลือง; มะเขือเทศ

Abstract

This research aimed to develop a *Trichoderma*- based granular bioproduct to extend the product's shelf life and control *Fusarium oxysoprum* f.sp. *lycopersici* (*Fol*). Factorial in CRD was used for experimental design. There were three factors, including encapsulated granule formulations, storage temperature, and storage time. Each formulation contained conidia of *Trichoderma* sp. and sodium alginate, but the concentration of glycerol and tapioca starch was varied. The products were stored at room temperature and 4 ºC from 1 to 9 months. The results showed that the viability of *Trichoderma* sp. from each formulation was significantly different. Storage temperature at 4 ºC provided higher viability than room temperature. The F1 formulation (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 %) provided the best result, the highest quantity of survived conidia, at room temperature storage. The amount of survived conidia was stable for 5 months of storage. F3 (sodium alginate 0.88 % + tapioca starch 1.5 %), F4 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 1.5 %), F5 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 3.7 %), and F6 (sodium alginate 0.88 %) formulations provided the highest number and stable of survived conidia at 4 ºC up to 9 months. The survived *Trichoderma* sp. from all formulations maintained the *Fol* inhibitory ability.

Keywords: *Trichoderma*; bioproduct; fusarium wilt, tomato

1. คำนำ

ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากรานิยมใช้ชีวภัณฑ์ที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์มากขึ้น เนื่องจากเชื้อปฏิปักษ์ที่นำมาใช้เป็นชีวภัณฑ์มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีความเป็นพิษน้อยกว่าการใช้สารเคมี (Singh *et al*., 2016) ขณะเดียวกันพบว่าเชื้อปฏิปักษ์บางชนิดยังมีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีได้อีกด้วย โดยจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเป็นชีวภัณฑ์มีหลายชนิด ทั้งรา แบคทีเรีย รวมถึงไวรัสบางชนิด ซึ่งหนึ่งในเชื้อที่ประยุกต์ใช้ได้ดี คือ ราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) โดยราไตรโคเดอร์มาเป็นราชั้นสูงที่อาศัยอยู่ในดิน เจริญได้ดีและมีการสร้างโคนิเดียจำนวนมาก ราไตรโคเดอร์มามีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของสาเหตุโรคพืชหลายชนิด (Benitez *et al*., 2004; Ha, 2010; Navaneetha *et al*., 2015) มีกลไกในการเป็นปฏิปักษ์ได้หลายรูปแบบ ได้แก่ การเข้าไปเบียดเบียนแย่งอาหารจากเชื้อสาเหตุโรคพืช สามารถผลิตปฏิชีวนะสารและสารพิษทำลายผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นต้น ราไตรโคเดอร์มาถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืช

หลายชนิด โดยเฉพาะโรคพืชที่มีการแพร่ระบาดได้ในดิน (Manandhar *et al*., 2019) เช่น ราสาเหตุของโรคเหี่ยวเหลืองมะเขือเทศ ซึ่งเป็นราที่สามารถเข้าทำลายมะเขือเทศได้ทุกระยะการเจริญเติบโตและมีผลทำให้ผลผลิตลดลง

โรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจาก *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* (*Fol*) จัดอยู่ในกลุ่มของโรคสำคัญของมะเขือเทศ เป็นโรคที่ระบาดแพร่หลายและทำความเสียหายให้กับการปลูกมะเขือเทศทั่วไปในเกือบทุกท้องถิ่นที่มีการปลูก โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและบางจังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย การควบคุมโรคส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมใช้สารเคมี เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีในการกำจัดราก็มีผลเสียดังที่กล่าวมา นอกจากนี้การใช้สารเคมีชนิดเดิมซ้ำ ๆ อาจก่อให้เกิดการดื้อต่อสารเคมีของเชื้อสาเหตุโรค ดังนั้นเพื่อเป็นการลดปัญหาดังกล่าวข้างต้น การเลือกใช้ราไตรโคเดอร์มาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากรา *Fol* อย่างไรก็ตาม ในการประยุกต์ใช้ราไตรโคเดอร์มาแบบชนิดสดที่เกษตรกรใช้กันอยู่ในปัจจุบัน อาจไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเชื้อสดเป็นเชื้อที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะเจริญอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาเมื่ออยู่ในสภาพอุณหภูมิปกติ ซึ่งต้องใช้ทันทีขณะที่เชื้อกำลังเจริญ แต่หากเกษตรกรยังไม่พร้อมที่จะใช้เชื้อสดทันที อาจต้องมีวิธีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อสด เช่น การเก็บในตู้เย็น แต่มีอายุการเก็บรักษาเพียง 1-2 เดือน (Charoenrak and Chamswarng, 2016) ดังนั้นจึงทำให้การนำไปใช้ค่อนข้างมีข้อจำกัด และเชื้อที่เก็บไว้ในระยะเวลานานอาจทำให้จำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคลดลงด้วย

ดังนั้นถ้าหากต้องการคงประสิทธิภาพของราไตรโคเดอร์มาให้สามารถใช้ได้เป็นเวลานาน จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาและรูปแบบการนำไปใช้ให้เหมาะสม โดยวิธีการเก็บรักษาที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับราไตรโคเดอร์มา ได้แก่ การนำเทคนิคการห่อหุ้ม (encapsulation) โคนิเดียของจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้เพื่อการป้องกันจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยการพัฒนาชีวภัณฑ์ให้อยู่ในรูปแบบเม็ด ซึ่งจะทำให้ชีวภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น รวมถึงยังคงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดจาก *Trichoderma asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ด้วยเทคนิคการห่อหุ้ม เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและคงประสิทธิภาพของราไตรโคเดอร์มาในการยับยั้งการเจริญของรา *Fol* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะเขือเทศ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การทดสอบความสามารถของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ในการควบคุมรา *Fol*

นำรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ที่คัดแยกได้จากดินในแปลงปลูกพืชในจังหวัดสกลนคร มาทดสอบความสามารถในการควบคุมรา *Fol* ที่คัดแยกได้จากมะเขือเทศแสดงอาการโรคเหี่ยวเหลืองในจังหวัดสกลนคร จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ TFPK101, TFPK201, TFPK301, TFPK401 และ TFPK501 โดยเลี้ยงราทั้งหมดบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 28 ºC เวลา 7 วัน จึงเจาะบริเวณขอบเส้นใยของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 และรา *Fol* ด้วย cork borer นำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (dual culture) ให้ส่วนของเชื้อทดสอบทั้งสองชนิดห่างกัน 4 cm วางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 cm ทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดรัศมีของรา *Fol*

บันทึกผลและคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญ (percentage growth inhibition, PGI) ตามสูตรของ Skidmore และ Dickinson (1976) จากสูตร PGI (%) = {(Kr - r1) ÷ Kr} x 100 โดย Kr คือ รัศมีของโคโลนีรา (mm) ในชุดควบคุม และ r1 คือ รัศมีของโคโลนีรา (mm) ในชุดทดสอบ (ที่เลี้ยงคู่กับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์)

2.2 การผลิตชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดด้วยการห่อหุ้มรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1

นำรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 28 ºC เป็นเวลา 7 วัน เก็บรวบรวมโคนิเดีย (conidia) โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งเทลงบนผิวหน้าโคโลนี ใช้ spreader ขูดผิวหน้าเส้นใยราเพื่อให้โคนิเดียหลุดออกมา จากนั้นปรับความเข้มข้นของโคนิเดียให้ได้ 5×10^7 conidia mL^{-1} (7.7 Log10 conidia mL^{-1}) จึงนำโคนิเดียมาห่อหุ้มด้วยพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ โดยแต่ละสูตรมีส่วนประกอบของ sodium alginate ที่ความเข้มข้น 0.88 % แต่มีความเข้มข้นของ glycerol และแป้งมันสำปะหลังต่างกัน รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1 ห่อหุ้มโคนิเนียด้วยเทคนิคการเกิดเจลแบบไอออนิก (ionic gelation) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Locatelli และคณะ (2018) โดยนำพอลิเมอร์มาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กบนเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) เติมโคนิเดียของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 และกวนต่อไปเป็นเวลา 15 นาที แล้วใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลายในแต่ละสูตรและปล่อยสารละลายให้เป็นหยดลงในสารละลาย 2.0 M $CaCl_2$ พร้อมกับกวนด้วยแท่งแม่เหล็กบนเครื่องกวนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเม็ดชีวภัณฑ์ที่ได้มาล้างน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดแคลเซียมอิออนที่เหลือบนผิวเม็ดชีวภัณฑ์ออกไป แล้วผึ่งเม็ดชีวภัณฑ์ให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ (biological safety cabinet, BSC) เป็นเวลา 40 ชม. แล้วนำเม็ดชีวภัณฑ์เก็บที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 ºC เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

2.3 การศึกษาลักษณะทั่วไปของชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดที่บรรจุรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1

2.3.1 ลักษณะและขนาดของชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด

สุ่มเม็ดชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดจากแต่ละชุดการทดลอง ชุดละ 10 เม็ด มาวัดขนาดความกว้าง และความยาวโดยใช้เวอร์เนียร์ แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ย ขณะเดียวกันนำเม็ดชีวภัณฑ์จากแต่ละชุด

Table 1 Polymers and concentration in *Trichoderma*-based granular formulations

Formulations	Type of polymers and concentration			
	Sodium alginate (%)	Glycerol (%)	Tapioca starch (%)	*Trichoderma* sp. (Log10 conidia mL^{-1})
F1	0.88	1.5	0	7.7
F2	0.88	0	3.7	7.7
F3	0.88	0	1.5	7.7
F4	0.88	1.5	1.5	7.7
F5	0.88	1.5	3.7	7.7
F6	0.88	0	0	7.7

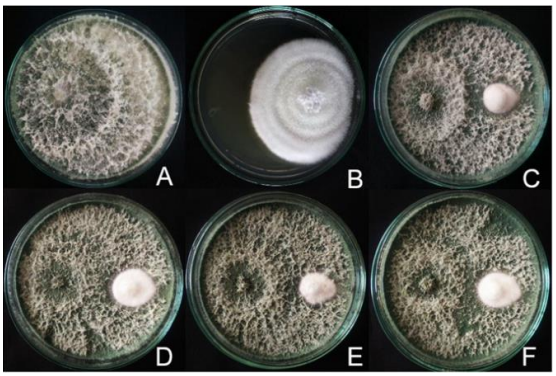

Figure 1 Mycelial inhibition of *Fol* by *T. asperellum* isolate TPK01-1. A: *T. asperellum* isolate TPK01-1, B: *Fol*, C-F: Dual culture between *T. asperellum* isolate TPK01-1 (left), and *Fol* (right), C: *Fol* isolate TFPK101, D: *Fol* isolate TFPK201, E: *Fol* isolate TFPK301, and *Fol* isolate TFPK401

การทดลองที่ได้มาบันทึกลักษณะพื้นผิวภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอที่กำลังขยาย 20X

2.3.2 การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความสามารถในการนำไฟฟ้า

นำชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดจากแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 0.5 g มาละลายใน sodium citrate 2 % ปริมาตร 49.5 mL จากนั้นกวนให้ชีวภัณฑ์ละลาย นำไปวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter และวัดความสามารถในการนำไฟฟ้า ด้วยเครื่อง Handhelds conductivity meter โดยแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

2.4 ทดสอบการมีชีวิตรอดของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ในชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ สูตรห่อหุ้มที่นำมาห่อหุ้มเชื้อ (6 สูตร) อุณหภูมิที่เก็บ (2 อุณหภูมิ) และเวลาเก็บรักษา (9 เดือน) เก็บชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้ด้วยสูตรต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 ºC เป็นเวลา 9 เดือน จากนั้นนำชีวภัณฑ์มาตรวจนับจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตทุกเดือน ด้วยการนำชีวภัณฑ์ 0.5 g มาละลายใน sodium citrate 2 % ปริมาตร 49.5 mL แล้วนำมาเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} ถึง 10^{-5} นำโคนิเดียที่เจือจางได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 28 ºC เป็นเวลา 20-24 ชม. จึงนับจำนวนโคนิเดียที่งอกและเจริญบนอาหาร

2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ในชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดในการควบคุมรา *Fol*

ตัดปลายเส้นใยของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ที่งอกออกมาจากโคนิเดียจากวิธีการทดลอง 2.4 ด้วย cork borer นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ขณะเดียวกันเลี้ยงรา *Fol* ไอโซเลต TFPK 101 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน จึงเจาะบริเวณขอบเส้นใยของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 และรา *Fol* ไอโซเลต TFPK 101 ด้วย cork borer นำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธี dual culture รายละเอียดตามวิธีการทดลอง 2.1 บันทึกผลและคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญรา *Fol*

3. ผลการวิจัย

3.1 ความสามารถของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ในการควบคุมรา *Fol*

รา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Fol* ทั้ง 5 ไอโซเลต (รูปที่ 1) ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งของราแต่ละไอโซเลต คือ 69-73.68 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งรา *Fol* ไอโซเลต TFPK101 มากที่สุด 73.68 รองลงมา คือ TFPK301, TFPK401, TFPK201 และ

TFPK501 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

Table 2 Percentage growth inhibition of *Fol* isolates by *T. asperellum* isolate TPK01-1

Fol isolates	Percentage growth inhibition (%)[1]
TFPK 101	73.68[a]
TFPK 201	69.00[c]
TFPK 301	73.00[ab]
TFPK 401	70.00[bc]
TFPK 501	69.00[c]

[1] Means labeled with the same letter in a column are not significantly different according to Tukey test at $p<0.01$.

3.2 ลักษณะทั่วไปของชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดที่บรรจุรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1

การใช้พอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ในการผลิตชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดของ *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 พบว่าชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้สามารถจำแนกออกตามลักษณะที่เห็นภายนอก จำนวน 3 ลักษณะ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ชีวภัณฑ์มีลักษณะเป็นเม็ดกลม มีขนาดเล็ก พื้นผิวเรียบ มีสีขาว (สูตร F1) ส่วนกลุ่มที่ 2 ชีวภัณฑ์มีลักษณะคล้ายกับลูกอ๊อดประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรกมีลักษณะกลมหรือเรียกว่าส่วนหัว ส่วนที่สองยืดยาวออกมาจากส่วนหัวหรือเรียกว่าส่วนปลาย พื้นผิวเรียบ หรือขรุขระ (สูตร F2-F5) ขณะที่กลุ่มที่ 3 ชีวภัณฑ์มีลักษณะเป็นเม็ดกลม มีขนาดเล็ก พื้นผิวขรุขระ มีสีขาว (สูตร F6) (รูปที่ 2) และเมื่อนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าการนำไฟฟ้า พบว่าชีวภัณฑ์จากทุกสูตรมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าการนำไฟฟ้าใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 7.35-7.89 และ 9.79-10.65 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เวลาที่ใช้ในการละลายเม็ดชีวภัณฑ์ในสารละลาย sodium citrate มีความแตกต่างกันโดยชีวภัณฑ์จากสูตรที่ใช้ sodium alginate อย่างเดียวและร่วมกับ glycerol เป็นพอลิเมอร์ ใช้เวลา 1 ชม. ในการละลาย ขณะที่สูตรที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบใช้เวลาในการละลายมากขึ้น โดยเฉพาะสูตร F2 และ F5 มีแป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบ 3.7 % ใช้เวลาในการละลายมากกว่า 13 ชม.

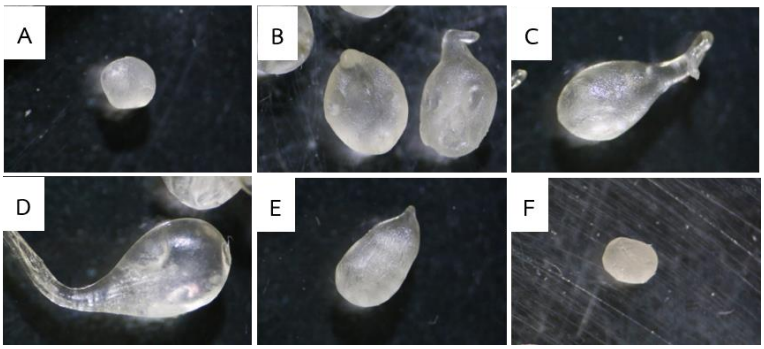

Figure 2 Appearance of the *Trichoderma*-based granules derived from different formulations. A: F1 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 %), B: F2 (sodium alginate 0.88 % + tapioca starch 3.7 %), C: F3 (sodium alginate 0.88 % + tapioca starch 1.5 %), D: F4 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 1.5 %), E: F5 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 3.7 %), and F: F6 (sodium alginate 0.88 %)

Table 3 Some properties of *Trichoderma*-based encapsulated granules.

Formulations	pH value	EC value	Suspension time (h)	Granule size (mm)	
				Width	Length
F1: sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 %	7.35	9.79	1	0.11	0.15
F2: sodium alginate 0.88 % + tapioca starch 3.7 %	7.37	10.43	>13	0.31	0.75
F3: sodium alginate 0.88 % + tapioca starch 1.5 %	7.78	10.34	2	0.22	0.43
F4: sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 1.5 %	7.38	10.54	3.50	0.20	0.30
F5: sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 3.7 %	7.89	10.65	>13	0.31	0.59
F6: Sodium alginate 0.88 %	7.70	10.13	1	0.11	0.65

Table 4 Quantity of survived *T. asperellum* isolate TPK01-1 (Log10 conidia g^{-1}) exposed different granule formulations stored at room temperature and 4 ºC.

Storage temperature	Formulations	Quantity of *T. asperellum* isolate TPK01-1 at different storage time (Log10 conidia g^{-1})[1]				
		1 moth	3 moths	5 moths	7 moths	9 moths
Room temperature	F1	7.48^{a-c}	7.52^{a-c}	6.99^{a-g}	5.28^{k-m}	3.39^{qr}
	F2	6.62^{c-h}	6.38^{f-j}	3.50^{p-r}	3.17^{r}	0.00^{s}
	F3	6.90^{a-g}	6.45^{e-j}	3.97^{p-r}	0.00^{s}	0.00^{s}
	F4	6.17^{g-k}	5.65^{i-l}	0.00^{s}	0.00^{s}	0.00^{s}
	F5	6.64^{b-h}	5.62^{j-l}	0.00^{s}	0.00^{s}	0.00^{s}
	F6	7.38^{a-e}	6.72^{a-h}	3.68^{p-r}	0.90^{s}	0.00^{s}
4 ºC	F1	7.58^{ab}	6.92^{a-g}	5.86^{h-l}	5.18^{ln}	4.39^{m-p}
	F2	6.64^{b-h}	6.47^{e-j}	5.02^{l-o}	4.28^{n-q}	4.22^{o-q}
	F3	7.08^{a-g}	6.94^{a-g}	6.84^{a-g}	7.00^{a-g}	7.03^{a-g}
	F4	6.84^{a-g}	6.89^{a-g}	6.88^{a-g}	6.99^{a-g}	6.71^{a-g}
	F5	7.09^{a-g}	6.72^{a-h}	6.58^{c-i}	6.51^{d-j}	6.25^{g-j}
	F6	7.67^{a}	7.46^{a-d}	7.43^{a-d}	7.30^{a-f}	7.10^{a-g}

3.3 การมีชีวิตรอดของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ที่บรรจุในชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ในชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด พบว่าสูตรผลิตชีวภัณฑ์ อุณหภูมิที่เก็บรักษา และระยะเวลาเก็บรักษามีผลต่อจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตหรือความมีชีวิตรอดของรา *T. asperellum* อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อพิจารณาจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตของรา พบว่าชีวภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ºC สามารถคงชีวิตของราได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยเมื่อเปรียบเทียบการเก็บรักษาที่ 4 ºC พบว่าโคนิเดียของรามีชีวิตรอดจนถึงเดือนที่ 9 โดยสูตร F6, F3, F4 และ F5 มีจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตสูงที่สุด

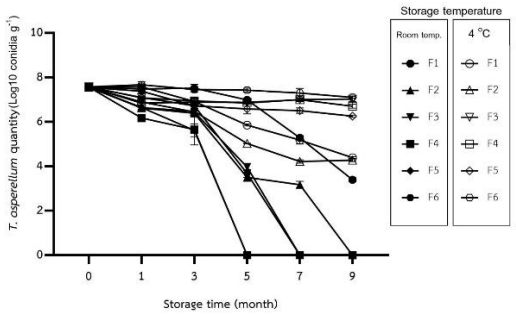

Figure 3 Quantity of survived *T. asperellum* isolate TPK01-1 (Log10 conidia g^{-1}) exposed different granule formulations stored at room temperature and 4 ºC.

ที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิต 7.10, 7.03, 6.71 และ 6.25 Log10 conidia g^{-1} ตามลำดับ และไม่ต่างจากเดือนแรกที่เก็บรักษาชีวภัณฑ์ รองลงมา คือ สูตร F1 และ F2 มีค่าเฉลี่ยจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิต 4.39 และ 4.22 Log10 conidia g^{-1} ตามลำดับ และสูตร F1 และ F2 มีค่าเฉลี่ยจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตลดลงจากเดือนแรกที่เก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4 และรูปที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้องพบว่าสูตร F1 สามารถคงชีวิตของราได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตคงที่ตั้งแต่เดือนแรกจนถึงเดือนที่ 5 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นค่าเฉลี่ยจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตลดลงจนเหลือ 3.39 Log10 conidia g^{-1} ส่วนสูตรอื่น ๆ สามารถคงชีวิตของราเพียง 3 เดือน หลังจากนั้นการมีชีวิตของราลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4 และรูปที่ 3)

Table 5 Inhibitory efficacy of *T. asperellum* isolate TPK01-1 from different formulations against the mycelial growth of *Fol* isolate TFPK 101.

Storage temperature	Formulations	Inhibitory Efficacy of *T. asperellum* at different storage time (% inhibition)[1]				
		1 moth	3 moths	5 moths	7 moths	9 moths
Room temperature	F1	73.33[a]*	71.67[a]	72.50[a]	71.67[a]	72.50[a]
	F2	73.33[a]	72.50[a]	70.83[a]	71.67[a]	0.00[a]
	F3	70.83[a]	72.50[a]	72.50[a]	0.00[b]	0.00[b]
	F4	73.33[a]	73.33[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]
	F5	73.33[a]	70.83[a]	70.83[a]	0.00[b]	0.00[b]
	F6	71.67[a]	70.83[a]	71.67[a]	73.33[a]	0.00[b]
4 ºC	F1	70.83[a]	73.33[a]	70.83[a]	71.67[a]	73.33[a]
	F2	73.33[a]	71.67[a]	72.50[a]	72.50[a]	71.67[a]
	F3	73.33[a]	71.67[a]	70.83[a]	70.83[a]	71.67[a]
	F4	70.83[a]	70.83[a]	72.50[a]	70.83[a]	71.67[a]
	F5	71.67[a]	70.83[a]	71.67[a]	71.67[a]	71.67[a]
	F6	72.50[a]	70.83[a]	71.67[a]	72.50[a]	71.67[a]

[1] Means labeled with the same letter in a column are not significantly different according to Tukey test at $p < 0.01$.

3.4 ความสามารถของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ที่บรรจุในชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด ในการควบคุมรา *Fol* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ

การวัดค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของรา *Fol* ไอโซเลต TFPK101 ด้วยรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ที่แยกเชื้อจากเม็ดชีวภัณฑ์สูตรต่าง ๆ ที่เก็บรักษาเป็นเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture plate พบว่าโคนิเดียที่มีชีวิตยังคงความสามารถในการยับยั้งรา *Fol* ได้ดี โดยเชื้อที่รอดชีวิตจากทุกสูตรสามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fol* และมีค่าร้อยละการยับยั้ง 70-73 (ตารางที่ 5)

4. วิจารณ์

การควบคุมโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น โรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ เป็นปัจจัยหลักที่สำคัญในการรักษาปริมาณและคุณภาพของผลผลิต โดยการใช้กลยุทธ์ที่ต่างกันก็มีผลโดยตรงต่อความสำเร็จในการควบคุมโรค กลยุทธ์ที่ได้ผลรวดเร็วอย่างการใช้สารเคมีมักส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของเกษตรกร (Czene *et al*., 2002; Sharpe and Irvine, 2004) ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการหันมาใช้จุลินทรีย์ไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศโดยวิธีการทางชีววิธี (biocontrol) มากขึ้น แต่การใช้วิธีการควบคุมทางชีววิธีจะประสบความสำเร็จมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ ได้แก่ การเจริญและสร้างโคนิเดียของราไตรโคเดอร์มาจะขึ้นอยู่กับปัจจัยด้านอุณหภูมิ แสง องค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Mishra and Khan, 2015) รวมถึงยังขึ้นกับสายพันธุ์ของราด้วย (Adan *et al*., 2015) ส่วนอีกปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลต่อความสำเร็จในการควบคุมโรคในสภาพแปลงปลูก ได้แก่ รูปแบบการนำราไตรโคเดอร์มามาประยุกต์ใช้เพื่อให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตและสามารถคงอยู่ในสภาพธรรมชาติได้นานตลอดฤดูปลูก โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่ารูปแบบชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดจากรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ที่เตรียมด้วยสูตรต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคการห่อหุ้ม (encapsulation) ด้วยโซเดียมอัลจิเนต กลีเซอรอล และแป้งมันสำปะหลัง อุณหภูมิเก็บรักษาชีวภัณฑ์ และระยะเวลาการเก็บชีวภัณฑ์ มีผลต่อการมีชีวิตของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1

การเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้องมีผลต่อการมีชีวิตของราอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง มีเพียงชีวภัณฑ์ที่ผลิตด้วยสูตร F1 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 %) ที่สามารถคงการมีชีวิตรอดของราได้จนถึงเดือนที่ 9 อย่างไรก็ตาม การคงที่ของจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตพบได้เพียง 5 เดือนหลังการเก็บรักษา จากนั้นจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่สูตรการผลิตชีวภัณฑ์ที่เหลือมีความคงที่ของจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตเพียง 3 เดือน หลังจากนั้นจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตลงลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จนไม่พบโคนิเดียที่มีชีวิต ทั้งนี้อาจเนื่องจากชีวภัณฑ์จากสูตร F1 มีผิวของเม็ดเรียบและเป็นเนื้อเดียวกัน อาจส่งผลให้ความชื้นในเม็ดชีวภัณฑ์ค่อนข้างคงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์จากสูตร F6 ผิวขรุขระ อาจทำให้ความชื้นสูงขึ้นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Locatelli และคณะ (2018) ที่พบว่าผิวของเม็ดชีวภัณฑ์ที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีความขรุขระ และไม่เป็นรูพรุนส่งผลดีต่อการมีชีวิตของโคนิเดีย ขณะที่ชีวภัณฑ์สูตร F2, F3, F4 และ F5 มีขนาดของเม็ดใหญ่กว่า ซึ่งขนาดเม็ดชีวภัณฑ์อาจมีผลต่อการกักเก็บความชื้นในเม็ดชีวภัณฑ์และความชื้นของโคนิเดียเมื่อเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 28±2 ºC ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mishra and Khan (2015) ที่พบว่าปริมาณน้ำและความชื้น (moisture content) มีผลต่อการเจริญและการรอดชีวิตของราไตรโคเดอร์มา

เช่นเดียวกับรายงานของ Moore และคณะ (1996) ที่พบว่าความชื้นของโคนิเดียควรมีค่าคงที่ประมาณร้อยละ 4-5 เพื่อให้ยืดอายุการเก็บรักษาราในชีวภัณฑ์ นอกจากนี้สารห่อหุ้มชีวภัณฑ์ที่มีประจุบวก เช่น calcium alginate มีผลในการยืดอายุและสนับสนุนการเจริญและการงอกของสปอร์ของรา *T. viride* ได้อีกด้วย ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากประจุบวกของสารห่อหุ้มชีวภัณฑ์เกิดปฏิกิริยากับประจุลบบนผนังเซลล์หรือสปอร์ของเชื้อรา ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเจริญและสร้างสปอร์ขณะที่มีการเก็บรักษา (Jurić *et al*., 2019) และ Sousa และคณะ (2014) พบว่า glycerol ที่ใช้เป็นสารห่อหุ้มชีวภัณฑ์สามารถเป็นแหล่งของคาร์บอนที่ดีสำหรับผลผลิตสารชีวภัณฑ์รา *T. reesei* QM9414 อีกด้วย

การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดและความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมเม็ดชีวภัณฑ์ส่งผลโดยตรงต่อการรอดชีวิตของราไตรโคเดอร์มาเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Locatelli และคณะ (2018) ที่พบว่าการใช้พอลิเมอร์ที่ต่างชนิดกันในการเตรียมชีวภัณฑ์ของรา *Trichoderma* sp. มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดระหว่างการเก็บรักษาโดยตรง และสอดคล้องกับการศึกษาของ Adan และคณะ (2015) ที่แสดงให้เห็นว่าชนิดของธัญพืชที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อสำหรับใช้ในการเก็บรักษาราไตรโคเดอร์มามีผลโดยตรงต่อการรอดชีวิตของเชื้อเช่นกัน

การเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 ºC ส่งผลดีต่อการมีชีวิตของราในชีวภัณฑ์ทุกสูตร สูตรที่โคนิเดียของรามีชีวิตรอดคงที่ตลอดการเก็บรักษา 9 เดือน คือ สูตร F6 (sodium alginate 0.88 %), F3 (sodium alginate 0.88 % + tapioca starch 1.5 %), F4 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 1.5 %) และ F5 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 % + tapioca starch 3.7 %) ตามลำดับ ส่วนสูตร F1 (sodium alginate 0.88 % + glycerol 1.5 %) และ F2 (sodium alginate 0.88 % + tapioca starch 3.7 %) สามารถคงชีวิตของราได้จนถึงเดือนที่ 9 แต่มีจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตลดลงหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 เดือน อย่างไรก็ตาม จำนวนโคนิเดียที่รอดชีวิตของทั้งสองสูตรสูงกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งการศึกษาของ Munoz-Celaya และคณะ (2012) ได้อธิบายว่าการเกิดปฏิกิริยาและการแพร่ (reactivity and diffusivity) ของสารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุล (reactive oxygen species, ROS) ลดต่ำลงระหว่างการเก็บรักษาเม็ดชีวภัณฑ์ (microcapsule) ที่อุณหภูมิ 4 ºC ทำให้กิจกรรมเมแทบอลิซึม(metabolic activity) รา *T. harzianum* ในเม็ดชีวภัณฑ์อาจลดลงและส่งผลการยืดระยะเวลาการคงอยู่ของโคนิเดียได้ เช่นเดียวกันกับที่ Küçük and Kivanç (2005) ที่พบว่าการเก็บรักษารา *T. harzianum* ที่อุณหภูมิ 30 ºC มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC

โคนิเดียที่ยังคงมีชีวิตอยู่จากเม็ดชีวภัณฑ์สูตรต่าง ๆ ทั้งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 4 ºC เมื่อนำมาเลี้ยงใหม่และนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของรา *Fol* ยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีและไม่ต่างกับการใช้เชื้อสดที่เตรียมใหม่ ๆ (ประสิทธิภาพ 70-73 %) แสดงให้เห็นว่าโพลิเมอร์ต่าง ๆ ที่นำมาเป็นส่วนผสมของเม็ดชีวภัณฑ์นั้นไม่ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการยับยั้งของรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 แต่อาจส่งผลดีต่อการเจริญและการงอกของสปอร์ออกจากสารห่อหุ้มชีวภัณฑ์ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น (Jurić *et al*., 2019)

ผลการทดลองครั้งนี้และรายงานการศึกษาที่เคยมีรายงานมาก่อนชี้ให้เห็นว่าการจะประสบความสำเร็จในการใช้ราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืชประกอบด้วยหลายปัจจัยที่ต้อง

คำนึงถึงร่วมกัน ได้แก่ สูตรในการเพาะเลี้ยง สูตรในการเตรียมผลิตภัณฑ์หรือชีวภัณฑ์ หัวเชื้อ อุณหภูมิ ความชื้น แสง สภาพการเก็บรักษาเชื้อ รวมถึงการคงอยู่และจำนวนครั้งของการใช้ราไตรโคเดอร์มาในสภาพธรรมชาติ ชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มาสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งให้กับเกษตรกรในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศและโรคพืชอีกหลายชนิด เพื่อลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์และลดปัญหาการมีชีวิตรอดต่ำของราไตรโคเดอร์มาชนิดสด

5. สรุป

การทดลองสรุปได้ว่าการพัฒนารูปแบบชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดที่บรรจุโคนิเดียรา *T. asperellum* ไอโซเลต TPK01-1 ชีวภัณฑ์สูตร F1 เหมาะสำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยมีจำนวนของโคนิเดียที่มีชีวิตคงที่ถึง 5 เดือน จากนั้นจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ชีวภัณฑ์สูตร F3, F4, F5 และ F6 เหมาะกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นสูตรที่ทำให้โคนิเดียมีชีวิตคงที่ถึง 9 เดือน สำหรับการนำผลการวิจัยไปปรับใช้ ผู้วิจัยแนะนำให้ใช้ชีวภัณฑ์สูตร F6 (sodium alginate 0.88 %) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ºC

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร สำหรับการสนับสนุนทุนวิจัย

7. References

Adan, J., Baque, A., Rahman, M., Islam, R. and Jahan, A., 2015, Formulation of *Trichoderma* based biopesticide for controlling damping off pathogen of eggplant seedling, Univ. J. Agric. Res. 3: 106-113.

Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. and Codon, A.C., 2004, Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains, Int. J. Microbiol. 7: 249-260.

Charoenrak, P. and Chamswarng, C., 2016, Efficacies of wettable pellet and fresh culture of *Trichoderma asperellum* biocontrol products in growth promoting and reducing dirty panicles of rice, Agric. Nat. Resour. 50: 243-249.

Czene, K., Lichtenstein, P. and Hemminki, K., 2002, Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family-cancer database, Int. J. Cancer 99: 260-266.

Ha, T.N., 2010, Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam, J. ISSAAS 16: 17-21.

Jurić, S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., Bedek, M. and Vinceković, M., 2019, Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores, J. Integr. Agric. 18: 2534-2548.

Küçük, Ç. and Kıvanç, M., 2005, Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, *Trıchoderma harzıanum* conidia, Afr. J. Biotechnol. 4: 483-486.

Locatelli, G.O., Santos, G.F., Priscila, S. Botelho, P.S., Finkler, C.L.L. and Bueno, L.A., 2018, Development of *Trichoderma* sp. Formula tions in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life, Biol. Control

117: 21-29.

Manandhar, S., Pant, B., Manandhar, C. and Baidya, S., 2019, *In vitro* evaluation of bio-control agents against soil borne plant pathogens, J. Nepal Agric. Res. Counc. 5: 68-72.

Mishra, P.K. and Khan, F.N., 2015, Effect of different growth media and physical factors on biomass production of *Trichoderma viride*, People's J. Sci. Res. 8: 11-16.

Munoz-Celayaa, A.L., Ortiz-García, M., Vernon-Carter, E.J., Jauregui-Rincón, J., Galindo, E. and Serrano-Carreón, L., 2012, Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices, Carbohydr. Polym. 88: 1141-1148.

Navaneetha, T., Prasad, R.D. and Venkateswar, R.L., 2015, Liquid formulation of *Trichoderma* species for management of gray mold in castor (*Ricinus communis* L.) and alternariaster leaf blight in sunflower (*Helianthus annuus* L.), J. Biofertil. Biopestici. 2015: 6.

Sharpe, R.M. and Irvine, D.S., 2004, How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health, BMJ 328: 447-451.

Singh, V., Upadhyay, R.S., Sarma, B.K. and Singh, H.B., 2016, *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops, Microbiol. Res. 193: 74-86.

Skidmore, A.M. and Dickinson, C.H., 1976, Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodurum* and phylloplane fungi, T. Brit. Mycol. Soc. 66: 57-64.

Sousa, K.A., Junior, G.S.F., Lima, K.T.L., Pinto, G.A.S., Aguiar, R.S.S. and Azevedo, D.C.S., 2014, Evaluation of the use of raw glycerol in biomass production by *Trichoderma reesei* QM9414, BMC Proc. 8(Suppl 4): P173.