

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อราปฏิปักษ์โรคพืช

Trichoderma asperelloides TDOAE002

Morphological and Molecular Characterization of an Antagonistic Fungus

Trichoderma asperelloides TDOAE002

อริษา จิตกรกุล¹⁾ พยอมน โคเบลลี²⁾ ไอลดา ชูมแสง²⁾ สุณิสา ผิวร่ำไพ³⁾ ชีรดา หวังสมบุญดี⁴⁾

Arisa Jittikornkul¹⁾ Payorm Cobelli²⁾ Ilada Choomsang²⁾ Sunisa Pewrumpai³⁾

Teerada Wangsomboondee⁴⁾

Abstract

Trichoderma spp. are potential fungal biocontrol agents for plant disease control and plant growth promotion. An antagonistic fungus *Trichoderma* sp. TDOAE002 isolate has been promoted to control several plant diseases in Thailand, including rice diseases by the Department of Agricultural Extension (DOAE). Nevertheless, *Trichoderma* sp. TDOAE002 has not been classified into the current taxonomy of *Trichoderma* spp. This study contributed to the taxonomy of *Trichoderma* sp. TDOAE002 based on morphological characteristics and molecular analysis. The fungus grew rapidly on potato dextrose agar (PDA) at 25±2 °C, with white, fluffy mycelia, and pale green to dark green conidial masses forming within 48 hours. Conidiophores branched, central axis from which secondary branches arose, the branches terminating in a single ampulliform phialide or a whorl of 2-4 divergent phialides. Conidia were subglobose, 1.74-3.11 x 2.20-3.84 µm in size, with irregular warts on the conidial surface, and pale green in masses. Chlamydo spores were globose to subglobose, surface smooth, and solitary. In addition, to confirm the species identification of *Trichoderma* sp. TDOAE002, the molecular analysis was conducted on Multilocus Identification System for *Trichoderma* (MIST) program based on the internal transcribed spacer (ITS) regions of the rDNA cluster (ITS1 and ITS2), partial sequences of the translation elongation factor 1 alpha (*tef-1α*), and the RNA polymerase II subunit (*rpb2*) nucleotide sequences. The phylogenetic tree from the combined three loci revealed the *Trichoderma* sp. TDOAE002 was grouped into the *T. asperelloides* group. Consequently, we identified the antagonistic fungus TDOAE002 isolate as *T. asperelloides*.

Keywords: *Trichoderma asperelloides*, antagonistic fungus, morphological characteristic, molecular, phylogenetic analysis

Received: January 20, 2023/ Revised: February 21, 2023/ Accepted: February 25, 2023

¹⁾ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000 โทร. 0-4534-4104

Ubon Ratchathani Rice Research Center, Mueang, Ubon Ratchathani 34000 Tel. 0-4534-4104

²⁾ กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 0-2579-7892

Division of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2579-7892

³⁾ กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 0-2940-6190

Plant Protection Promotion and Soil-Fertilizer Management Division, Department of Agricultural Extension, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2940-6190

⁴⁾ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2218-5476

Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330 Tel. 0-2218-5476

บทคัดย่อ

Trichoderma spp. เป็นเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำให้ใช้ควบคุมโรคพืชในประเทศไทย รวมทั้งโรคข้าว อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 ตามหลักอนุกรมวิธานในปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงได้จำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุล พบว่า เชื้อราไอโซเลท TDOAE002 เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยเชื้อรามีลักษณะเส้นใยสีขาว พูเป็นปุย พบกลุ่มของโคนิเดียสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้มภายใน 48 ชั่วโมง ก้านชูโคนิเดียแตกกิ่งก้านออกด้านข้าง ส่วนปลายของแต่ละก้านจะมี phialide รูปร่างทรง ampulliform แบบเดี่ยวหรือแตกแขนงออกจากจุดเดียวกัน จำนวน 2-4 phialides โคนิเดียรูปทรงค่อนข้างกลม ขนาด 1.74-3.11 x 2.20-3.84 ไมครอน ผิวขรุขระ มีตุ่มนูนรูปทรงไม่แน่นอน และโคนิเดียสีเขียวอ่อนเกิดเป็นกระจุก chlamydospore ทรงกลมถึงค่อนข้างกลม ผิวเรียบ แบบเดี่ยว การจำแนกชนิดของ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS บางส่วนของยีน *tef-1α* และ *rpb2* ด้วยโปรแกรม MIST และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 ตำแหน่ง พบว่า *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 อยู่ในกลุ่มของ *T. asperelloides* ดังนั้น จึงจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์โรคพืชไอโซเลท TDOAE002 เป็น *T. asperelloides*

คำสำคัญ: *Trichoderma asperelloides* เชื้อราปฏิปักษ์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวโมเลกุล การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ

คำนำ

เชื้อราสกุล *Trichoderma* (Hypocreales; Ascomycota) เป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Hypocrea* (Druzhinina and Kubicek, 2005) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะในดินและบนเศษซากพืชที่กำลังเน่าเปื่อยผุพัง บางครั้งพบบนเชื้อราในกลุ่มเห็ดรวมทั้งเป็นราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) นอกจากนี้ยังพบได้ในสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับน้ำ เช่น ปะการัง กัลปังหา ฟองน้ำ ตะกอนทราย เป็นต้น (Chamswarn, 2017; Wongcharoen, 2014) มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านอุตสาหกรรม การเกษตร และสิ่งแวดล้อม โดยด้านการเกษตรนั้น เนื่องจาก *Trichoderma* spp. มีความสามารถสูงในการแข่งขันกับจุลินทรีย์ต่างๆ ตามธรรมชาติ ทั้งเชื้อราแบคทีเรีย รวมถึงไส้เดือนฝอยศัตรูพืช จึงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนา *Trichoderma* spp. เป็นชีวภัณฑ์สำหรับใช้ควบคุมโรคพืชอย่างกว้างขวาง (Chamswarn, 2020; Kumar, 2013; Zheng *et al.*, 2021) ซึ่งปัจจุบันชีวภัณฑ์กำจัดโรคพืช (bio-fungicide) ที่ใช้ทั่วโลกมากกว่าร้อยละ 60 เป็นสารที่ได้มาจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (Abbey *et al.*, 2019)

ประเทศไทย มีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้เชื้อสดและ

ชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ โรงเรือนทดลอง และสภาพแปลง ดังเช่น Chamswarn *et al.* (2012) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *T. asperellum* 01-52 ในการควบคุมโรคเมล็ดต่างของข้าว พบว่า การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในสารแขวนลอยสปอร์ และใช้พ่นข้าวระยะออกรวงสามารถลดการเกิดโรคเมล็ดต่างได้ร้อยละ 3.42-25.97 สอดคล้องกับการศึกษาของ Charoenrak and Chamswarn (2015) พบว่าชีวภัณฑ์เชื้อสด *T. asperellum* ไอโซเลท 01-52 และ CB-Pin-01 ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตข้าว รวมทั้งลดการเกิดโรคเมล็ดต่าง โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคใบขีดสีน้ำตาล นอกจากนี้ Karnpakdee *et al.* (2021) พบว่า *T. asperellum* MC2560 สามารถลดการเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวในโรงเรือนทดลองได้ร้อยละ 42.01 และ 37.31 หลังพ่น 14 และ 21 วัน ตามลำดับ สำหรับการใช้ *Trichoderma* spp. ในนาข้าว นั้น Chamswarn (2006) และ Department of Agricultural Extension (2020) แนะนำให้ใช้เชื้อสด *Trichoderma* spp. แบบผสมกับรำข้าวละเอียด และปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพ หว่านในแปลงนาก่อนการหว่านเมล็ดข้าวหรือตกลำข้าว การคลุกหรือแช่เมล็ดพันธุ์ในเชื้อสด *Trichoderma* spp. ก่อนนำไปหว่าน ช่วยควบคุมเชื้อ

ราสาเหตุโรคไหม้คอรวงที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และกระตุ้นให้ระบบรากข้าวแข็งแรง

สิ่งสำคัญที่ควรทราบเมื่อต้องใช้เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช คือ ข้อมูลอนุกรมวิธานของเชื้อรา นั้นๆ เพื่อใช้ตรวจสอบชนิด (species) เชื้อรา เนื่องจากหากมีการใช้เชื้อรา *Trichoderma* ไม่ถูกชนิด หรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น เกิดการปนเปื้อน (contamination) หรือการผสมกัน (recombination) ของเชื้อราปฏิปักษ์มากกว่า 1 ชนิด อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ ข้อมูลทางอนุกรมวิธานยังใช้ประโยชน์ในการศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลาย และวิวัฒนาการของเชื้อ (Druzhinina *et al.*, 2010) เชื้อราปฏิปักษ์โรคพืช *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 ที่กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำให้เพื่อป้องกันกำจัดโรคพืชในประเทศไทยมาเป็นเวลานานนั้น ได้มีการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปบนอาหารหรือวัสดุเลี้ยงเชื้อด้วยตาเปล่าหรือตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Department of Agricultural Extension, 2020) ซึ่งยังไม่สามารถระบุชนิดที่แม่นยำได้ การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในอดีตใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก แต่มีข้อจำกัด เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไม่แตกต่างกันมากนัก จึงยากที่จะใช้จำแนกชนิดของ *Trichoderma* ได้อย่างแม่นยำ (Kumar, 2013) ปัจจุบันการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ช่วยให้จำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ได้แม่นยำขึ้น (Dou *et al.*, 2020)

งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) บางส่วนของยีน translation elongation 1 alpha (*tef-1 α*) และ RNA polymerase β subunit II (*rpb2*) ซึ่งเป็นตำแหน่งยีนที่แปรหลัเป็นโปรตีน translation elongation factor 1 α และเอนไซม์ RNA polymerase β subunit II ตามลำดับ (Cai and Druzhinina, 2021) เพื่อความถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Trichoderma* ในปัจจุบัน โดยทำการเปรียบเทียบกับเชื้อรา *T. asperellum* CB-Pin-01 ไอโซเลท

ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งมีงานวิจัยใช้ควบคุมโรคพืชเป็นจำนวนมาก Chamswang (2020) จนพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ให้บริการแก่เกษตรกรสำหรับใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในประเทศไทย นอกเหนือจากไอโซเลท TDOAE002 ของกรมส่งเสริมการเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อราปฏิปักษ์โรคพืช *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 ที่เป็น stock culture จากห้องปฏิบัติการของกลุ่มส่งเสริมการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี กองส่งเสริมการอารักขาพืช และจัดการดินปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และเชื้อรา *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 จากงานบริการวิชาการของห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เป็นหัวเชื้อในรูปผงนำมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ดำเนินการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย (hypha) การแตกกิ่งของก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) รูปร่างและการจัดเรียงตัวของ phialide รูปร่าง ขนาด และสีของโคนิเดีย (conidia) ลักษณะพิเศษเฉพาะอื่นๆ เช่น การสร้างกลีนิสสารสี (pigment) chlamydo-spore เป็นต้น และนำส่งวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคนิเดียอย่างละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดฟิลด์อิมิสชันและอุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุ (Field Emission Scanning Electron Microscope and Energy Dispersive X-ray Spectrometer: FESEM-EDS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ ดำเนินการตรวจสอบลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TDOAE002

Table 1 Primers and PCR conditions used in this study

Loci	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	PCR cycling condition	Reference
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCG G	710	3 min 94 °C, 35x (30 sec 94 °C, 45 sec 54 °C, 1 min 72 °C), 15 min 72 °C	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
<i>tef-1α</i>	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	1,300	5 min 95 °C, 30x (1 min 95 °C, 2 min 55 °C, 2 min 72 °C), 10 min 72 °C	Carbone and Kohn (1999); Jaklitsch <i>et al.</i> (2005)
	TEF1LLErev	AACTTGCAGGCAATGTGG			
<i>rpb2</i>	fRPB2-5F	GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)	903	5 min 95 °C, 30x (1 min 95 °C, 2 min 53 °C, 2 min 72 °C), 10 min 72 °C	Liu <i>et al.</i> (1999)
		GATCA(T/C)TT(T/C)GG			
	fRPB2-7cR	CCCAT(A/T)GC(C/T)TGCTT (C/A)CCCAT			

Remark: Annealing temperature was developed in this study

Table 2 Nucleotide sequences in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database

Species name	Strain	Isolation source/ Host	Location	Accession number	
				ITS	<i>tef-1α</i> <i>rpb2</i>
<i>T. asperelloides</i>	GJS 04-116 ^P	soil	Viet Nam	GU198301	GU248412 GU248411
	GJS 04-187	<i>Moniliophthora roreri</i>	Peru	JN133553	JN133571 JN133560
	GJS 99-6	wood	USA	DQ315464	GU198240 GU198271
<i>T. asperellum</i>	TDOAE002	-	Thailand	OQ909079*	This study This study
	GJS 04-15	coffee seedling	USA	GU198311	GU198290 GU198276
	GJS 06-294	soil	Nigeria	GU198307	GU198235 GU198266
<i>T. atroviridis</i>	T1 (CB-Pin-01)	soil and pineapple crop	Thailand	LC123601	LC155108 This study
	CBS 119499	-	-	FJ860726	FJ860611 FJ860518
	DAOM 167057 ^E	-	Canada	EU280124	EU279965 AF545548
<i>T. harzianum</i>	CBS 226.95 ^N	-	-	AY605713	AF348101 AF545549
<i>T. junci</i>	CBS 120926 ^H	dead standing stems of <i>Juncus effusus</i>	Denmark	FJ860761	FJ860641 FJ860540
<i>T. kunmingense</i>	YMF 1.02659 ^H	soil	China	KJ742800.1	KJ742802 KJ742801
<i>T. neokoningii</i>	G.J.S. 04-216 ^H	-	Peru	MH863076	KJ665620 KJ665318
<i>T. neosinense</i>	G.J.S. 94-11 ^H	-	Taiwan	DQ315422	KJ665624 KC285777
<i>T. ochroleucum</i>	CBS 119502 ^R	corticated log of <i>Betula pendula</i>	United Kingdom	FJ860793	FJ860659 FJ860556
<i>T. pseudoasperelloides</i>	YMF1.04629 ^H	-	China	MH383059	MK775504 MK775509
<i>T. samuelsii</i>	S5 ^T	-	Italy	JN715596	JN715651 JN715599
<i>T. valdunense</i>	CBS 120923 ^H	-	Austria	FJ860863	FJ860717 FJ860605
<i>T. viride</i>	CBS 119325 ^E	-	Czech	DQ677655	DQ672615 EU711362
<i>T. yunnanense</i>	CBS 121219 ^H	soil	China	GU198302	GU198243 GU198274
<i>Cladobotryum tenue</i>	CBS 152.92 ^R	<i>Cladobotryum tenu</i>	-	FN859420	HF911829 FN868674

Remark: E = epitype of species, H = holotype of species, N = neotype of species, R = reference material of species, P = paratype of species.

* = this study

และ *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 นำมาศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรม ดังนี้

2.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ดำเนินการโดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ไอโซเลทละ 3 ขั้ว เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน กรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 และบดเส้นใยเชื้อราประมาณ 0.5 กรัม ให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วย 1x CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) ผสม β -mercaptoethanol ดัดแปลงจากวิธีการของ Safavi (2010) ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer และเก็บรักษา ดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ยีน *tef-1 α* และ *rpb2* ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณ ITS ยีน *tef-1 α* และ *rpb2* (Carbone and Kohn, 1999; Jaklitsch *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1999; White *et al.*, 1990) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction (PCR)) ที่ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 5 นาโนกรัม ไพรเมอร์ชนิดละ 1 ไมโครโมล และ 1x GoTaq[®] colorless master mix (Promega, USA) ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Thermal cycler (Biometra[®], Germany) ของแต่ละปฏิกิริยา (Table 1) นำมาแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธี electrophoresis ด้วย 1.5% agarose gel ใน 1x TBE buffer ตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Bio-Print-Gel Documentation Imaging (Vilber, Korea) และนำส่ง วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ไอโซเลทละ 3 ขั้ว ทั้งเส้น forward และ reverse ด้วยวิธี Sanger DNA sequencing

2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ เชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST และ Multilocus Identification System for *Trichoderma* (MIST) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 และ *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 เปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information; Madison, USA) ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และฐาน ข้อมูล International Commission of *Trichoderma* Taxonomy (ICTT) ด้วยโปรแกรม MIST (<http://mmit.china-cctc.org/>) ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต สำหรับ โปรแกรม MIST นั้น กำหนดค่า identity ของบริเวณ ITS ที่ 76 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจำแนกเชื้อราระดับสกุล และกำหนด ค่า identity ของยีน *tef-1 α* และ *rpb2* ที่ 97 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพื่อจำแนกเชื้อราระดับชนิด (species) (Cai and Druzhinina, 2021)

2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง สายวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 ร่วมกับเชื้อรา *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 และ *Trichoderma* spp. ที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI (Table 2) เลือกเชื้อรา *Cladobotryum tenue* เป็น outgroup โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS บางส่วนของยีน *tef-1 α* และ *rpb2* มาเชื่อมต่อกัน (concatenate) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์หลาย ตำแหน่งหรือหลายยีนร่วมกัน (multilocus sequence analysis (MLSA)) แบบ multiple alignment ด้วย โปรแกรม ClustalW และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทาง สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยวิธี neighbor-joining ด้วยโมเดล maximum composite likelihood ใน โปรแกรม MEGA11 (Saitou and Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2021)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 และ *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 มีลักษณะโคโลนี เหมือนกัน คือ เจริญได้ดีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 \pm 2 องศาเซลเซียส สร้างเส้นใยสีขาว เจริญฟูจากผิวหน้า อาหาร บริเวณกลางโคโลนีพบกลุ่มของสปอร์หรือโคนิเดีย อัดแน่นสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม ภายใน 48 ชั่วโมง เชื้อรา เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่ออายุ 5 วัน (Fig. 1A, 2A) ไม่พบการสร้างกลิ่นและสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อรารายใต้ กล้องจุลทรรศน์ให้แสงแบบเลนส์ประกอบ พบว่า ทั้งเชื้อรา

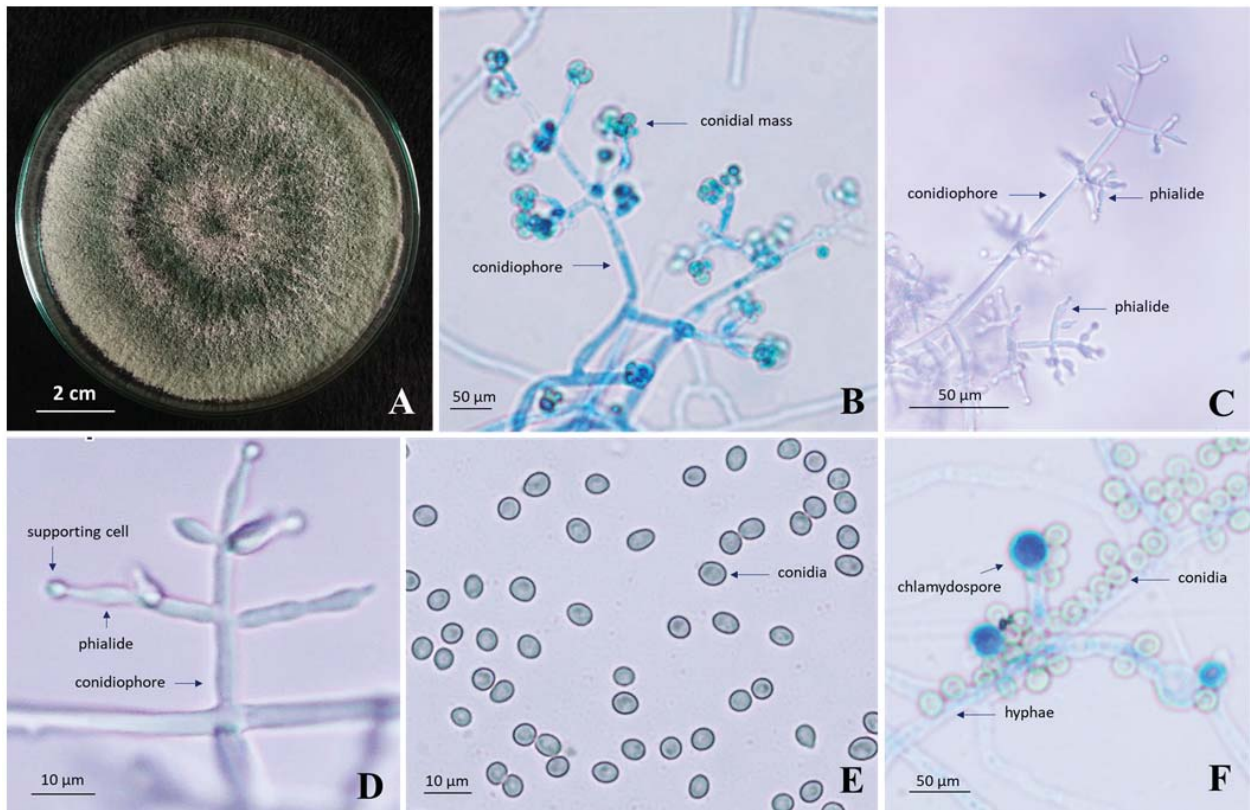


Fig. 1 Morphological characteristics of *Trichoderma asperelloides* TDOAE002, a colony on PDA under $25\pm 2^\circ\text{C}$ at 5 days old (A), conidia grouped in bunches (B), conidiophores and phialides (C, D), pale green conidia (E), and chlamydospores (F), B and F stained with lactophenol cotton blue solution, B-F was observed under the compound microscope, scale bars 10-50 μm

Trichoderma sp. ไอโซเลท TDOAE002 และ *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 สร้างเส้นใยสี แบบมีผนังกัน ก้านชูโคนินเดียหลัก (primary conidiophore) แตกกิ่งก้านออกด้านข้างของเส้นใย (somatic hyphae) และมีการแตกกิ่งก้านออกเป็นก้านชูโคนินเดียรอง (secondary conidiophore) แบบคู่ตรงข้ามกันจากบริเวณใต้ผนังกันของก้านชูโคนินเดียหลัก เชื้อราสร้าง phialide รูปทรง ampulliform คือ มีลักษณะฐานกว้างส่วนปลายเรียวคล้ายขวด เจริญออกมาจากปลายก้านชูโคนินเดียแบบเดี่ยวหรือแตกแขนงแบบ verticillate ออกจากจุดเดียวกันจำนวน 2-4 phialides ส่วนปลายสุดของ phialide ขยายออกเป็นส่วนที่ให้กำเนิดโคนินเดีย มีลักษณะโป่ง (Fig. 1C-1D, 2C-2D) โคนินเดีย หรือที่เรียกว่า phialospore เกิดเป็นกระจุกที่ปลาย phialide (Fig. 1B, 2B) มีรูปทรงค่อนข้างกลม เซลล์เดี่ยว สีเขียวอ่อน (Fig. 1E, 2E) พบการสร้าง chlamydospore รูปทรงกลมถึงค่อนข้างกลม (Fig. 1F, 2F) เชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท มีโคนินเดียขนาดใกล้เคียงกัน คือ

โคนินเดียของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 กว้าง 1.74-3.11 ไมครอน ยาว 2.20-3.84 ไมครอน ในขณะที่โคนินเดียของเชื้อรา *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 กว้าง 1.95-2.98 ไมครอน ยาว 2.59-3.80 ไมครอน (Table 3) จากลักษณะสัณฐานวิทยาดังกล่าว พบว่า มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *T. asperellum* species complex ซึ่งมี 5 ชนิด ได้แก่ *T. asperellum*, *T. yunnanense*, *T. asperelloides*, *T. kunmingnense* และ *T. pseudoasperelloides* (Samuels et al., 1999; Zheng et al., 2021)

เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อราอย่างละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า โคนินเดียของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 และ *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 มีผิวโคนินเดียขรุขระ มีตุ่มนูนรูปทรงไม่แน่นอนกระจายอยู่ทั่วไป (Fig. 3A-3B, 3D-3E) สอดคล้องกับลักษณะผิวโคนินเดียของเชื้อรา *T. asperellum* T1 (CB-Pin-01) ตามรายงานของ Unartngam et al. (2020) อย่างไรก็ตาม พบว่า บาง

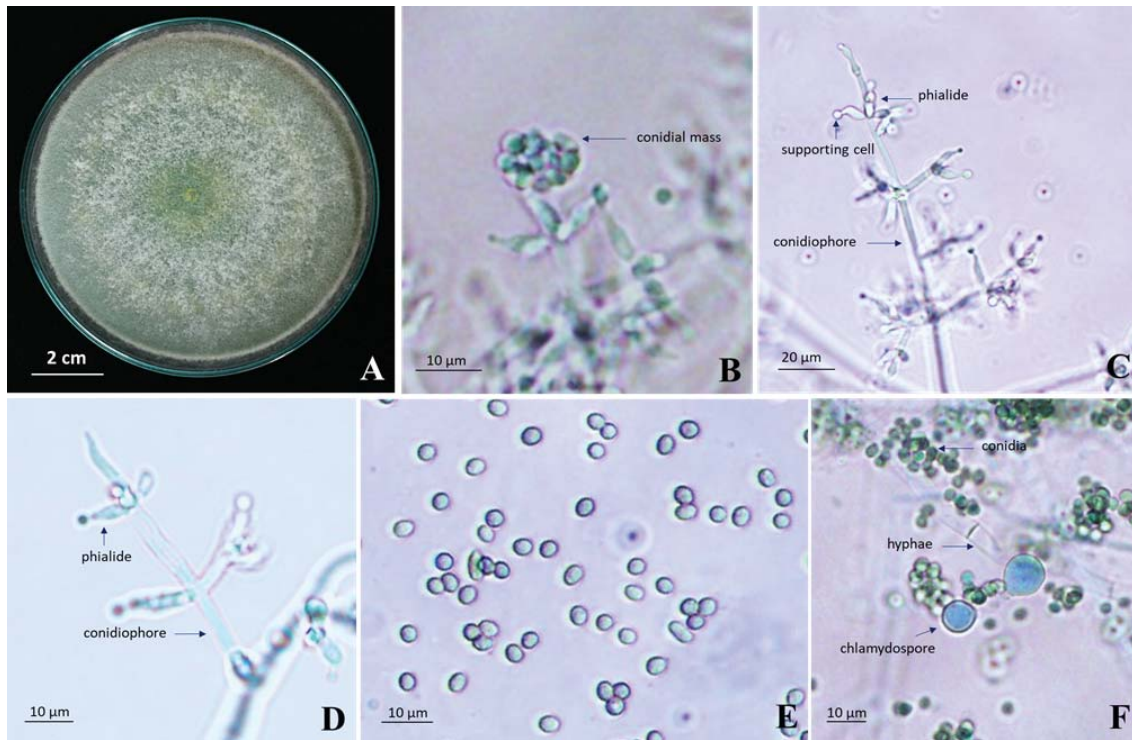


Fig. 2 Morphological characteristics of *Trichoderma asperellum* CB-Pin-01, a colony on PDA under $25\pm 2^\circ\text{C}$ at 5 days old (A), conidia grouped in bunches (B), conidiophores and phialides (C, D), pale green conidia (E), and chlamydospores (F), B and F stained with lactophenol cotton blue solution, B-F observed under the compound microscope, scale bars 10-20 μm

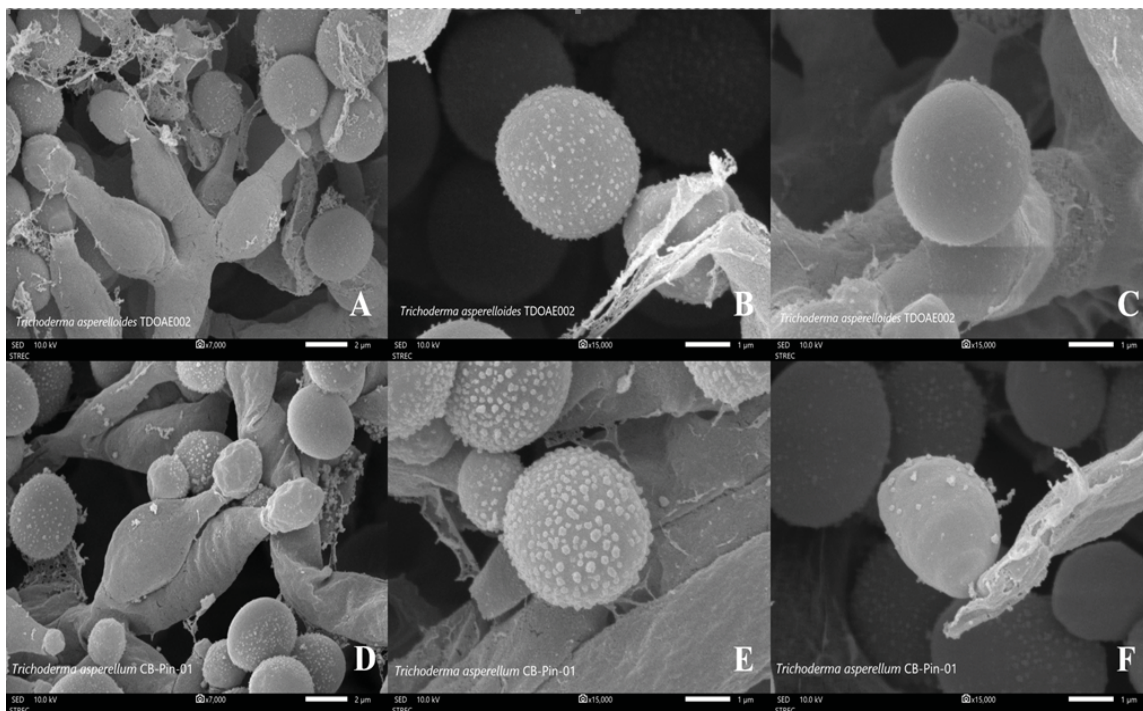


Fig. 3 Morphological characteristics of *Trichoderma asperelloides* TDOEA002 (A, B, C) and *Trichoderma asperellum* CB-Pin-01 (D, E, F) was observed in FESEM-EDS (IT-500HR), conidia and phialides (A, D), and conidial surface (B, C, E, F), scale bars 1-2 μm

Table 3 Morphological characteristics of *Trichoderma* spp.

Parameters	Fungi	
	<i>T. asperelloides</i> TDOAE002	<i>T. asperellum</i> CB-Pin-01
Conidia (N = 21)		
Length (µm)	2.20-3.84	2.59-3.80
Width (µm)	1.74-3.11	1.95-2.98
L/W	1.06-1.61	1.19-1.33
Phialides (N = 13)		
Length (µm)	3.97-6.68	4.09-8.08
Width point (µm)	1.56-2.63	1.42-2.67
Base (µm)	1.23-1.65	1.08-1.81
L/W	1.94-2.98	2.38-4.60
Supporting cell (µm)	1.34-2.37	1.17-2.11

โคนินเดียจะปรากฏตุ่มนูนเพียงบางส่วน ไม่กระจายทั่วทั้งโคนินเดีย อาจขึ้นอยู่กับอายุของโคนินเดีย (Fig. 3C, 3F) ซึ่งลักษณะที่โคนินเดียมีผิวขรุขระ และมีตุ่มนูนนี้ พบได้ทั้งในเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides* และ *T. pseudoasperelloides* ในขณะที่โคนินเดียของเชื้อรา *T. yunnanense* และ *T. kunmingense* มีลักษณะผิวเรียบ (Qiao et al., 2018; Samuels et al., 2010; Zheng et al., 2021)

2. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST และ Multilocus Identification System for *Trichoderma* (MIST) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 และไอโซเลท CB-Pin-01 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS บางส่วนของยีน *tef-1α* และ *rpb2* เหมือนเชื้อรา *Trichoderma* spp. ร้อยละ 91.12-100 การจำแนกด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST จึงไม่สามารถระบุชนิดของ *Trichoderma* ได้ชัดเจน แต่สามารถจำแนกได้เบื้องต้นว่าเชื้อราดังกล่าวเป็นเชื้อราในสกุล *Trichoderma* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาที่พบ (Table 4)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MIST

ในฐานข้อมูล ICTT ด้วยบริเวณ ITS ให้ผลการจำแนกเชื้อราไอโซเลท TDOAE002 และ CB-Pin-01 อยู่ในสกุล *Trichoderma* สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลวิเคราะห์จากโปรแกรม nucleotide BLAST จากนั้นจำแนกระดับชนิดด้วยยีน *tef-1α* และ *rpb2* ซึ่งให้ผลการจำแนกเชื้อที่สอดคล้องกัน คือ จำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 และไอโซเลท CB-Pin-01 เป็น *T. asperelloides* (Table 4) จะเห็นได้ว่าการจำแนกเชื้อราสกุล *Trichoderma* เบื้องต้นด้วยโปรแกรม MIST ให้ผลการจำแนกที่ชัดเจนมากกว่าโปรแกรม nucleotide BLAST เนื่องจาก MIST เป็นโปรแกรมที่พัฒนาโดยกลุ่มนักวิจัยที่ศึกษาเชื้อราในสกุล *Trichoderma* โดยเฉพาะ โดยการตรวจสอบและจัดจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* spp. ใหม่ให้ถูกต้องตามอนุกรมวิธานของ *Trichoderma* ในปัจจุบัน (Dou et al., 2020) ซึ่งปัจจุบัน (กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2566) มีเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้รับการตรวจสอบและจัดจำแนกไว้ในฐานข้อมูล ICTT แล้ว จำนวน 460 ชนิด (ICTT, 2022)

2.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* spp. การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการแบบ multilocus sequence ด้วยบริเวณ ITS (571 คู่เบส) ยีน *tef-1α* (607 คู่เบส) และยีน *rpb2* (1,082 คู่เบส) (Fig. 4) พบว่า *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 จัดอยู่ในกลุ่มของ *T. asperelloides*

Table 4 Percent identities of *Trichoderma asperelloides* TDOAE002 and *T. asperellum* CB-Pin-01 are identical to the reference genome in nucleotide BLAST and MIST database

	nucleotide BLAST		MIST	
	% identity	Species	% identity cut-off	Species
<i>T. asperelloides</i> TDOAE002				
ITS (537 bp)	100	<i>T. asperellum</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. yunnanense</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. asperelloides</i> , <i>T. pubescens</i>	76	<i>Trichoderma</i> spp.
<i>tef-1α</i> (1,631 bp)	99.59-100	<i>T. pseudoasperelloides</i>	97	<i>T. asperelloides</i>
	99.58-100	<i>T. asperelloides</i>		
	94.95-100	<i>T. asperellum</i>		
	99.69	<i>T. orientale</i>		
<i>rpb2</i> (1,128 bp)	98.48-100	<i>T. asperelloides</i>	99	<i>T. asperelloides</i>
	96.94-99.91	<i>T. asperellum</i>		
	99.90	<i>T. pseudoasperelloides</i>		
	99.56	<i>T. gamsii</i>		
	98.47	<i>T. spirale</i>		
	98.29	<i>T. yunnanense</i>		
	97.51	<i>T. kunmingense</i>		
	95.16-95.68	<i>T. hamatum</i>		
<i>T. asperellum</i> CB-Pin-01				
ITS (535 bp)	99.63-100	<i>T. asperellum</i>	76	<i>Trichoderma</i> spp.
	99.81	<i>T. hamatum</i> , <i>T. yunnanense</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. asperelloides</i> , <i>T. pubescens</i>		
<i>tef-1α</i> (844 bp)	95.50-100	<i>T. asperelloides</i>	97	<i>T. asperelloides</i>
	91.12-100	<i>T. asperellum</i>		
<i>rpb2</i> (1,087 bp)	99.90-100	<i>T. pseudoasperelloides</i>	99	<i>T. asperelloides</i>
	98.59-100	<i>T. asperelloides</i>		
	97.15-99.91	<i>T. asperellum</i>		
	99.56	<i>T. gamsii</i>		
	98.47	<i>T. spirale</i>		
	98.29	<i>T. yunnanense</i>		
	97.51	<i>T. kunmingense</i>		
95.11-95.68	<i>T. hamatum</i>			

Table 5 Pairwise distance showing nucleotide sequence similarity between 11 isolates/strains of *Trichoderma* spp. and *Cladobotryum tenue*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. <i>T. asperelloides</i> TDOAE002											
2. <i>T. asperellum</i> T1 (CB-Pin-01)	0.0000										
3. <i>T. asperelloides</i> GJS 04-116P	0.0014	0.0014									
4. <i>T. asperelloides</i> GJS 04-187	0.0000	0.0000	0.0014								
5. <i>T. asperelloides</i> GJS 99-6	0.0019	0.0019	0.0033	0.0019							
6. <i>T. asperellum</i> GJS 04-15	0.0235	0.0239	0.0235	0.0240	0.0257						
7. <i>T. asperellum</i> GJS 06-294	0.0235	0.0239	0.0235	0.0240	0.0257	0.0000					
8. <i>T. kunmingense</i> YMF 1.02659 ^H	0.0389	0.0389	0.0388	0.0396	0.0395	0.0164	0.0164				
9. <i>T. pseudoasperelloides</i> YMF1.04629 ^H	0.0005	0.0005	0.0010	0.0005	0.0020	0.0229	0.0229	0.0390			
10. <i>T. yunnanense</i> CBS 121219 ^H	0.0208	0.0211	0.0208	0.0209	0.0229	0.0164	0.0164	0.0325	0.0202		
11. <i>C. tenue</i> CBS 152.92 ^R	0.3150	0.3215	0.3169	0.3170	0.3162	0.3134	0.3123	0.3358	0.3100	0.3120	

Remark: The number of base differences per site from between sequences is shown. There were a total of 2,255 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 software.

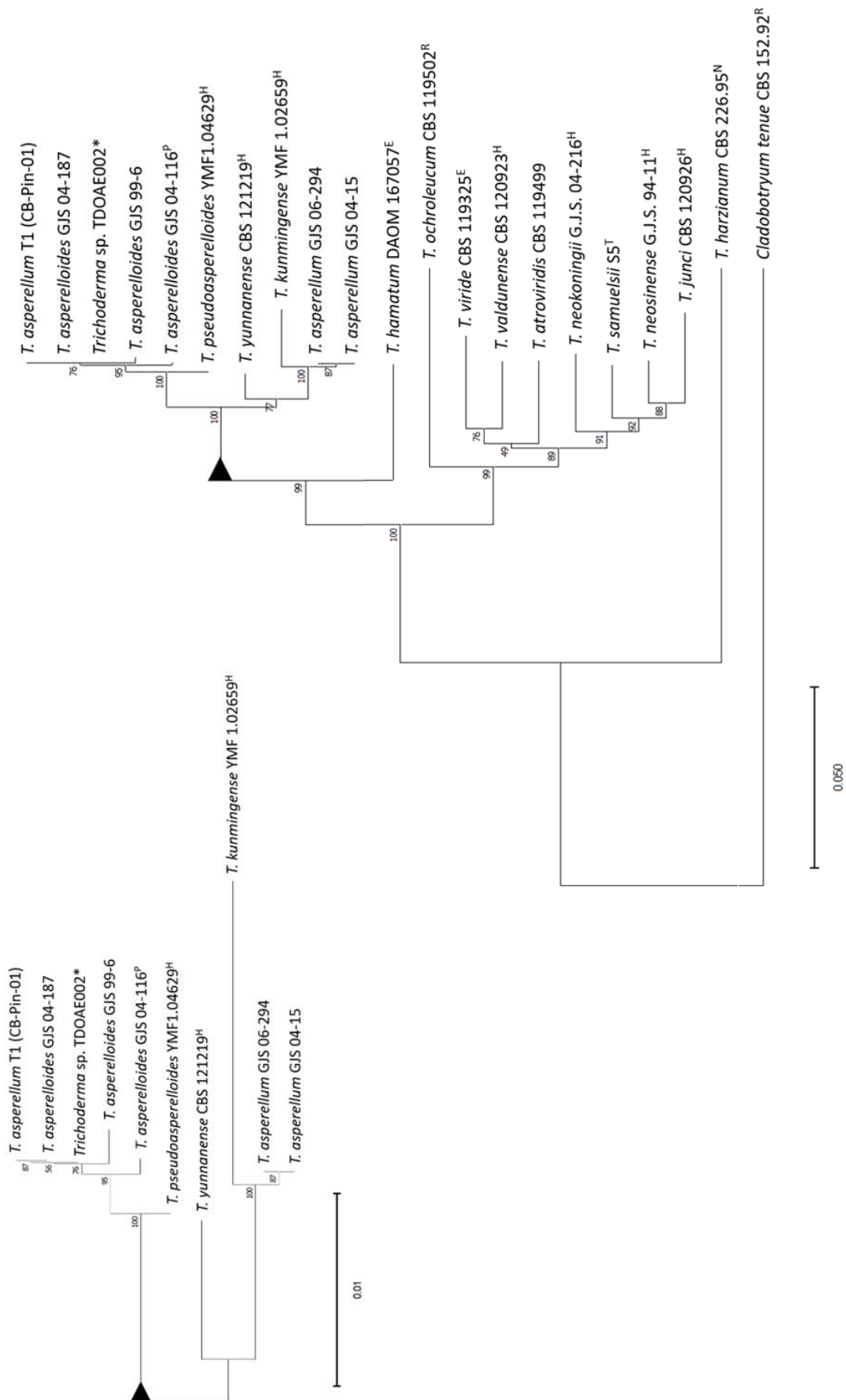


Fig. 4 Phylogenetic tree of *Trichoderma* spp. and *Cladobotryum tenue* (out-group) based on comparative analysis with multilocus sequences of the concatenated sequences of ITS, partial sequences of *tef-1 α* , and *rpb2* (2,255 nucleotides) by the neighbor-joining method. The numbers above lines represent bootstrap values from 1,000 replicates with MEGA11 software. *Trichoderma* sp. TDOAE002 (*) and *T. asperellum* T1 (CB-Pin-01) were grouped into *T. asperelloides* group, they were close to *T. asperelloides* GJS 04-187 and GJS 99-6.

แยกออกจาก *T. yunanense*, *T. asperellum* และ *T. kunmingense* อย่างชัดเจน และแยกกลุ่มออกจาก *T. pseudoasperelloides* เล็กน้อย ด้วยค่า bootstrap 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 และ *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *T. asperelloides* สายพันธุ์ไอโซเลทอื่นๆ ที่นำมาเปรียบเทียบ 98.12-100 เปอร์เซ็นต์ โดยเหมือนเชื้อรา *T. asperelloides* GJS 04-187 สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 5)

จากการจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS บางส่วนของยีน *tef-1 α* และ *rpb2* จึงจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์โรคพืช *Trichoderma* sp. TDOAE002 ไอโซเลทที่กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำให้ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชในประเทศไทย เป็น *T. asperelloides* ซึ่งมีลักษณะการเจริญได้ดีบนอาหาร PDA เชื้อราไม่สร้างกลิ่น และสีบนอาหาร การแตกกิ่งของก้านชูโคนินเดี่ยวและ phialide สัณฐานของโคนินเดี่ยว และการสร้าง chlamyospore สอดคล้องกับลักษณะของเชื้อรา *T. asperelloides* ตามการจัดจำแนกของ Samuels *et al.* (2010)

อย่างไรก็ตาม เชื้อราปฏิปักษ์โรคพืชไอโซเลท CB-Pin-01 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งเดิมถูกจำแนกเป็น *T. harzianum* ต่อมาเมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะบริเวณผิวโคนินเดี่ยวร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และบางส่วนของยีน *tef-1 α* ได้มีการจำแนกใหม่เป็นเชื้อรา *T. asperellum* (Unartngam *et al.*, 2020) นั้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้เพิ่มการวิเคราะห์ยีน *rpb2* และวิเคราะห์แบบ multilocus sequence พบว่าเชื้อราไอโซเลทดังกล่าว ถูกจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มของ *T. asperelloides* โดยแยกกลุ่มออกจาก *T. asperellum* สายพันธุ์อื่นๆ อย่างชัดเจน

เชื้อรา *T. asperellum* species complex ในอดีตจำแนกเป็นชนิดเดียว คือ *T. asperellum* ปัจจุบันจำแนกเป็นเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ *T. asperellum*, *T. yunanense*, *T. asperelloides*, *T. kunmingense* และ *T. pseudoasperelloides* โดยลักษณะสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก แต่สามารถจำแนกความแตกต่างของแต่ละชนิดได้ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล (Qiao *et al.*, 2018; Samuels *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2007) เชื้อรา

T. asperelloides สามารถแยกได้จากดิน หรือเป็นราเอนโดไฟต์ ส่วนมากพบในเอเชีย แอฟริกา อเมริกา และอเมริกาใต้ แต่พบค่อนข้างน้อยในยุโรป เป็นเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคพืช เช่น ราเอนโดไฟต์ *T. asperelloides* PSU-P1 ไอโซเลทจากประเทศไทย สามารถสร้างเอนไซม์ peroxidase polyphenol oxidase chitinase และ β -1,3-glucanase ยับยั้งเชื้อรา *Stagonosporopsis cucurbitacearum* สาเหตุโรคต้นแตกยางไหล (gummy stem blight) ของแคนตาลูป ในห้องปฏิบัติการ (Ruangwong *et al.*, 2021) เชื้อรา *T. asperelloides* T-19 T4 และ T-109 ไอโซเลทของโคลัมเบีย นอกจากควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* ได้ในห้องปฏิบัติการแล้วยังทนทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช Captan (1,132.5 ppm) (Chaparro *et al.*, 2021) ดังนั้น นอกจากแนวทางในการใช้ *T. asperelloides* ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีแล้ว ยังอาจใช้ในแปลงเกษตรที่มีการใช้สารเคมีได้

อย่างไรก็ตาม การจำแนกชนิดเชื้อราโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ หนึ่งในปัญหาที่อาจทำให้การค้นจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. เกิดความผิดพลาดได้ คือ การเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง ซึ่งเป็นเรื่องที่ต้องระมัดระวังอย่างยิ่ง เนื่องจากเมื่อมีการนำวิธีการศึกษาทางชีวโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนกชนิดเชื้อรา ทำให้มีการพบเชื้อรา *Trichoderma* ชนิดใหม่เพิ่มขึ้นจำนวนมาก อีกทั้งเชื้อรา *Trichoderma* หลายสายพันธุ์ไอโซเลทได้รับการจำแนกชนิดใหม่เพื่อให้ถูกต้อง และเป็นปัจจุบันตามหลักอนุกรมวิธาน แต่ *Trichoderma* บางสายพันธุ์ไอโซเลทที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล ยังไม่ได้รับการจำแนกชนิดใหม่ และยังใช้ชื่อเดิม (Samuels *et al.*, 2010) ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงพิจารณาเลือกเฉพาะสายพันธุ์อ้างอิงที่มีข้อมูลการจำแนกที่นำเชื่อถือและเป็นปัจจุบัน โดยเลือกสายพันธุ์ที่เป็น holotype neotype paratype epitype หรือ reference material ของแต่ละชนิด และสายพันธุ์ที่ได้รับการจำแนกจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบกันทั้ง *T. asperellum* และ *T. asperelloides* เพื่อหลีกเลี่ยงข้อมูลที่ผิดพลาด เนื่องจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน และมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมสูง

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อราปฏิปักษ์โรคพืช *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 พบว่ามีลักษณะเหมือนเชื้อรา *T. asperellum* ไอโซเลท CB-Pin-01 ทั้งลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA ลักษณะของเส้นใย ก้านชูโคโคนิเดีย phialide และ chlamydospore ส่วนโคโคนิเดียมีขนาดใกล้เคียงกัน และมีผิวโคโคนิเดียขรุขระ สอดคล้องกับลักษณะของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides* และ *T. pseudoasperelloides* การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบริเวณ ITS บางส่วนของยีน *tef-1 α* และ *rpb2* ด้วยโปรแกรม nucleotide BLAST จำแนกเชื้อรา ไอโซเลท TDOAE002 และ ไอโซเลท CB-Pin-01 อยู่ในสกุล *Trichoderma* ในขณะที่โปรแกรม MIST จำแนกเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท เป็น *T. asperelloides* สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการแบบ multilocus sequence พบว่า *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TDOAE002 และ ไอโซเลท CB-Pin-01 อยู่ในกลุ่มของเชื้อรา *T. asperelloides* แยกออกจากเชื้อราอื่นๆ ในกลุ่มของ *T. asperellum* species complex ดังนั้น จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางพันธุกรรม จึงจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* ไอโซเลท TDOAE002 เป็น *T. asperelloides* ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ช่วยให้สามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อรา *T. asperelloides* ไอโซเลท TDOAE002 ได้ถูกต้องตามหลักการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเป็นฐานข้อมูลเพื่อศึกษาความหลากหลาย วิวัฒนาการ และตรวจสอบความถูกต้องของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์/ไอโซเลทอื่นๆ ที่จะนำมาเป็นเชื้อปฏิปักษ์โรคพืชในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Abbey, J.A., D. Percival, L. Abbey, S.K. Asiedu, B. Prithiviraj and A. Schilder. 2019. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)-prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology* 29: 207-228.

Cai, F. and I.S. Druzhinina. 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity* 107: 1-69.

Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing

primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3): 553-556.

- Chamswang, C. 2006. Biological Control of Plant Diseases. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom province. 323 p. (in Thai)
- Chamswang, C. 2017. *Trichoderma*, the fungus play a roles in future crop production. pp. 14-17. *In: Kasetapirom* 4(9). Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom province. (in Thai)
- Chamswang, C. 2020. *Trichoderma*: Antagonistic Fungus for Plant Disease Control. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom province. 566 p. (in Thai)
- Chamswang, C., W. Intanoo, R. Dhitikiattipong and P. Charoenrak. 2012. The use of *Trichoderma* powder formulation isolate 01-52 for reducing dirty panicle disease and increasing yield of rice in paddy fields. pp. 460-464. *In: The 2nd National Conference on Rice "a new dimension of Thai rice research, ready to take action on climate changes and open Asian free markets"*. December 21-23, 2012. Swissotel Le Concorde, Bangkok. (in Thai)
- Chaparro, A.P., L.H. Carvajal and S. Orduz. 2021. Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agricultural Sciences* 2 (3): 301-307.
- Charoenrak, P. and C. Chamswang. 2015. Application of *Trichoderma asperellum* fresh culture bioproduct as potential biological control agent of fungal diseases to increase yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 12(2): 67-85.
- Department of Agricultural Extension. 2020. Application of Microorganisms (Biopesticides) for Plant Pest Control. 2nd ed. Bureau of Technology Transfer Development, Bangkok. 31 p. (in Thai)
- Dou, K., Z. Lu, Q. Wu, M. Ni, C. Yu, M. Wang, Y. Li, X. Wang, H. Xie, J. Chen and C. Zhang. 2020. MIST: a Multilocus Identification System for *Trichoderma*.

- Applied and Environmental Microbiology 86(18): 1-13.
- Druzhinina, I.S. and C.P. Kubicek. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. Journal of Zhejiang University SCIENCE 6B(2): 100-112.
- Druzhinina, I.S., C.P. Kubicek, M. Komoń-Zelazowska, T.B. Mulaw and J. Bissett. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. BMC Evolutionary Biology 10: 1-14.
- ICTT. 2022. Taxonomy 2022. Available source: <https://trichoderma.info/trichoderma-taxonomy-2020/>. (February 21, 2003)
- Jaklitsch, W.M., M. Komon, C.P. Kubicek and I.S. Druzhinina. 2005. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. Mycologia 97: 1365-1378.
- Karnpakdee, S., O. Piasai, W. Serewan, P. Karnpakdee and N. Khewkhom. 2021. The application of *Trichoderma asperellum* powder to control sheath blight disease of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Khon Kaen Agriculture Journal 49(1): 155-166. (in Thai)
- Kumar, S. 2013. *Trichoderma*: a biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary 1: 106-121.
- Liu, Y.J., S. Whelen and B.D. Hall. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. Molecular Biology and Evolution 16(12): 1799-1808.
- Qiao, M., X. Du, Z. Zhang, J.P. Xu and Z.F. Yu. 2018. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. MycoKeys 44: 63-80.
- Ruangwong, O., P. Wonglom, N. Phoka, N. Suwannarach, S. Lumyong, S. Ito and A. Sunpapao. 2021. Biological control activity of *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 against gummy stem blight in muskmelon (*Cucumis melo*). Physiological and Molecular Plant Pathology 115: 101663.
- Safavi, S.A. 2010. Isolation, identification and pathogenicity assessment of a new isolate of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in Iran. Journal of Plant Protection Research 50(2): 157-163.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.
- Samuels, G.J., A. Ismaiel, M.C. Bonn, R. De Respini and O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. Mycologia 102(4): 944-966.
- Samuels, G.J., E. Lieckfeldt and H.I. Nirenberg. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. Sydowia 51: 71-88.
- Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution 38(7): 3022-3027.
- Unartngam, J., B. Srithongkum, W. Intanoo, P. Charoenrak and C. Chamswang. 2020. Morphological and molecular based identification of *Trichoderma* CB-Pin-01 biological control agent of plant pathogenic fungi in Thailand. International Journal of Agricultural Technology 16(1): 175-188.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Talor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Gelfand MAIDH, Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York.
- Wongcharoen, A. 2014. Screening of endophytic fungi from rice (*Oryza sativa* L.) against rice pathogenic fungi. Khon Kaen Agriculture Journal 42(3): 385-396. (in Thai)
- Yu, Z.F., M. Qiao, Y. Zhang and K.Q. Zhang. 2007. Two new species of *Trichoderma* from Yunnan, China. Antonie van Leeuwenhoek 92: 101-108.
- Zheng, H., M. Qiao, Y. Lv, X. Du, K.Q. Zhang and Z. Yu. 2021. New Species of *Trichoderma* isolated as endophytes and saprobes from southwest China. Journal of Fungi 7: 467.