

พัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction เพื่อการตรวจวินิจฉัย
เชื้อรา *Trichoderma asperellum*

Development Polymerase Chain Reaction technique for detection
of *Trichoderma asperellum*

ชานินทร์ ดวงสะอาด^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} วันวิสาข์ เพ็ชรอำไพ^{1/}
สุนิรัตน์ สีมะเตือ^{1/} อมรรชัญญ์ คัดใจเดียว^{1/} สุธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{2/}
Chanintorn Doungsa-ard^{1/} Manorat Sudsanguan^{1/} Wanwisa Pet - amphai^{1/}
Suneerat Seemadua^{1/} Amonrat Kitjaideaw^{1/} Suttinee Likhitrakulrung^{2/}

ABSTRACT

The analysis and verification of *Trichoderma* biological products is a mission of the Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. This task is part of the process for registering hazardous substances for agricultural use and includes verifying the species identity of samples collected by departmental officials. However, verifying the species using phylogenetic analysis is time - consuming and expensive. Therefore, a preliminary screening method is needed to reduce both the time and cost involved. This study was conducted to develop a rapid and accurate technique for detecting *Trichoderma* species using Polymerase Chain Reaction (PCR) - based technique and specific primers. The specific primers were designed based on the ITS and *tef1* gene loci. The primers were tested against the *Trichoderma* type sequences database. It was found that two pairs of primers based on the ITS region were found to be specific to the *T. asperellum* complex, as well as one pair of primers for the *tef1* region, which also presented specificity to the *T. asperellum* complex. All primers had the optimum annealing temperature at 60 °C. The results of testing the designed primers on the ITS locus with various DNA of fungal species showed that the primers were specific

Keywords: *Trichoderma asperellum*, detection

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

^{2/} กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

^{2/} Division of Development of Inspection for Crops and Production Resources, Office of Agricultural Research and Development Region 1, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives

* Corresponding author: Chanintorn Doungsa - ard; e - mail: chanintorn.dd@gmail.com

บทนำ

เชื้อราหลายสปีชีส์ในสกุล *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะทางด้านการเกษตรที่มีการใช้เชื้อรา ในสกุล *Trichoderma* เป็นสารชีวภัณฑ์ (biocontrol agent) (de los Santos-Villalobos et al., 2013; Kindermann et al., 1998; Mbaraga et al., 2012) อันเนื่องมาจากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแย่งใช้สารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ รวมถึงยังสามารถใช้สารอาหาร และเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) นอกจากนี้ เชื้อรา *Trichoderma* ยังสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด และสารที่เชื้อรา *Trichoderma* สร้างขึ้นยังส่งผลดีต่อพืช โดยช่วยในการเจริญเติบโต (plant growth) รวมถึงกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant defence responses) ดังนั้น เชื้อรา *Trichoderma* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่พืชและสิ่งแวดล้อม และช่วยลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช

Trichoderma asperellum เป็นเชื้อราที่เป็นที่รู้จักในสกุล *Trichoderma* และมีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีการส่งเสริมให้ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยทั้งทางภาครัฐและเอกชน รวมถึงมีการผลิตในเชิงการค้า การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *T. asperellum* จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง หากมีการใช้ชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น เกิดการปนเปื้อนหรือการผสมกันของเชื้อราปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด จะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Druzhinina et al., 2010) ในปัจจุบันมีหลายบริษัทมาขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์แต่เนื่องจากลักษณะความ

แตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* นั้นมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ยากต่อการจำแนกในระดับสปีชีส์

การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* สามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา (Rifai, 1969; Bissett, 1984; Bissett, 1991a-c; Bissett, 1992) เช่น รูปร่างลักษณะและขนาดของ conidia สี ลักษณะผิว conidia (ornamentation) ลักษณะการแตกกิ่งก้าน การฟอร์มเส้นใยแบบ sterile หรือ fertile ความยาวที่ยื่นออกมาจากก้านชูสปอร์ แต่ทั้งนี้ ลักษณะความแตกต่างที่มีการรายงานหรือบันทึกไว้ดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนสำหรับบางสปีชีส์ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้หรือมีความคลุมเครือระหว่าง strain ของบางสปีชีส์ (Singh et al., 2014)

การจัดจำแนกและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) มีการศึกษากันมากขึ้น โดยส่วนใหญ่ใช้ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) (Dodd et al., 2000; Kindermann et al., 1998) แต่พบว่าการจำแนกด้วย ITS เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* บางสปีชีส์ได้ เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เหล่านี้มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน มักจะมีความคล้ายคลึงหรือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น มีรายงานว่า *T. asperellum* เป็น complex species (มีมากกว่า 1 สปีชีส์ภายใต้ชื่อ *T. asperellum*) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของ conidia ไม่สามารถใช้อ้างอิง หรือเปรียบเทียบเพื่อจำแนกชนิดได้ แต่เมื่อใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) translation elongation factor 1 (*tef1*) RNA polymerase subunit 2 (*rpb2*) และ actin (ACT) ในการจัดจำแนก (Samuels and Ismaiel, 2009) พบว่าเชื้อราชนิดนี้ประกอบไปด้วย *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ซึ่งได้รับการบันทึกเป็นอีกสปีชีส์ของเชื้อรา *Trichoderma* (Samuels et al., 2010)

นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้งสองสปีชีส์นี้ มีความใกล้เคียงอย่างมากกับเชื้อรา *T. yunnanense* โดยสามารถแยกความแตกต่างได้โดยเปรียบเทียบข้อมูลของดีเอ็นเอเท่านั้น (Samuels et al., 2010) สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* นั้น Chaverri et al. (2003) ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางด้านพันธุกรรมจาก 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS *tef1* calmodulin และ actin เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบในประเทศอินเดียจำนวนหลายไอโซเลทที่จัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น *T. viride* แต่เมื่อใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากตำแหน่ง ITS และ elongation factor พบว่าเชื้อราเหล่านี้คือเชื้อรา *T. asperellum* หรือ *T. asperelloides* (Sriram et al., 2013) จากการศึกษาลักษณะของ conidia ของเชื้อรา *T. harzianum* พบว่ามีความใกล้เคียงกับ conidia ของเชื้อรา *T. viride* โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของลักษณะ ความหนาแน่น และเฉดสีของ conidia อีกทั้ง เชื้อรา *T. viride* ยังมีความใกล้เคียงกับ *T. asperellum* ดังนั้น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไม่สามารถใช้อ้างอิงเพื่อจัดจำแนกอย่างชัดเจนได้ (Singh et al., 2014)

ปัจจุบันได้มีความพยายามพัฒนาเทคนิคที่มีความแม่นยำและรวดเร็วเพื่อตรวจสอบชนิดของ *Trichoderma* เช่น การใช้ isozymes การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Zamir and Chet, 1985; Grondona et al., 1997; Miyazaki and Tsunoda, 2003) ทั้งนี้การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)-based และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะมีการนำมาใช้ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคพืชมากขึ้น (Devi et al., 2017; Mazzaglia et al., 2001; Konstantinova et al., 2002) ดังนั้นในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *T. asperellum* ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Trichoderma*

1.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อรา *T. asperellum* ที่ได้รับมาจากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชให้บริสุทธิ์ โดยวิธี single spore isolation ย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา *T. asperellum* เลี้ยงลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 - 21 วัน หากไม่มีการปนเปื้อนสามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ เชื้อที่เจริญจากสปอร์เดี่ยว จะทำการแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°C. เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

สกัดดีเอ็นเอ

เขียนเส้นใยของเชื้อรา *T. asperellum* ที่เจริญบนอาหาร PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer et al. (2012) และ Doungsa-ard et al. (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40°C.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) และ the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature 56°C. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ

ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อส่งเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (Kearse et al., 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

1.2 รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จาก GenBank รวบรวมข้อมูลนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS และ *tef1* ของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* โดยเฉพาะกลุ่มของเชื้อรา *T. asperellum* complex ที่มีในฐานข้อมูล GenBank รวมถึง type sequence เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 1.1

1.3 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS และ *tef1* ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูลมาจัดเรียงด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Kato and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA12: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 (Kumar et al., 2024)

2. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* และ ใช้โปรแกรม GPRIME ในการออกแบบ โดยออกแบบตำแหน่งจับอยู่ภายในตำแหน่ง ITS และ *tef1*

3. ทดสอบไพรเมอร์

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล เช่น GenBank

3.2 ทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อรา *T. asperellum* และเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยดำเนินการ ดังนี้

Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง ITS และ *tef1* ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 (White et al., 1990) และ EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999)/EF-2 (O'Donnell et al., 1998) และไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบบนตำแหน่ง ITS และ *tef1* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Taq DNA Polymerase (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามของผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 56°C.

Nested Polymerase Chain Reaction

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำ PCR ตำแหน่ง ITS ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ ตำแหน่ง *tef1* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ EF1-728F/EF1-986R และ EF1-728F/EF-2 มาทำ Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบโดยใช้ Taq DNA Polymerase (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามของผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature 56°C. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ไพรเมอร์จำเพาะตรวจจับได้

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจาก clean culture ที่ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อรา *T. Asperellum* มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (Kearse et al., 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบชนิด โดยวิธี phylogenetic reconstruction ของ combined dataset ที่ได้จากตำแหน่ง ITS และ *tef1* ด้วยเกณฑ์ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .phy ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) ในการวิเคราะห์ กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) เริ่มวิเคราะห์จาก random starting tree และ กำหนดค่า 1000 ซ้ำ สำหรับ maximum likelihood bootstrap วิเคราะห์ผลเพื่อตรวจสอบชนิดที่ถูกต้องที่ไพรเมอร์จำเพาะตรวจจับได้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Trichoderma*

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *T. asperellum* ดำเนินการรวบรวมเชื้อรา *Trichoderma* มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ได้จำนวน 115 ไอโซเลท สกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ตำแหน่ง ITS, *tef1* และ *rpb2* หลังจาก sequencing ได้ข้อมูล sequence ของเชื้อรา *T. asperellum* ทั้ง 115 ไอโซเลท จำนวน 3 ตำแหน่ง มาทำการตรวจสอบเพื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction เปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ต้นแบบ (type sequence) ของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้มาตรฐานและมีความแม่นยำสูง

ผลการจำแนกชนิด พบว่าได้ตัวอย่างของเชื้อราที่อยู่กลุ่มของ *T. harzianum* complex

T. asperellum complex และในกลุ่มของ Longibrachiatum ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างกลุ่มนี้มีความหลากหลายและเหมาะสมที่จะนำมาทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบ เพื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อ DNA ของเชื้อราเป้าหมาย

2. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum*

ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะบนยีนตำแหน่ง ITS และ *tef1* ของเชื้อรา *T. asperellum* voucher CBS 433.97 ซึ่งเป็น type isolate ของเชื้อรา *T. asperellum* ซึ่งการใช้ type isolate ที่เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์เป็นวิธีการที่ถูกต้องตามหลักการทางอนุกรมวิธาน ทำให้มั่นใจได้ว่าไพรเมอร์ที่ได้จะจำเพาะเจาะจงกับเชื้อราเป้าหมาย ได้ไพรเมอร์จากตำแหน่ง ITS จำนวน 10 คู่ และตำแหน่ง *tef1* ได้จำนวน 6 คู่ (Table 1) จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่ได้ทำให้มีตัวเลือกในการนำไปทดสอบประสิทธิภาพและเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดสำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบต่อไป

Table 1 List of primers specific to *Trichoderma asperellum*/ *T. asperelloides*, designed based on the ITS and *tef1* gene region.

ITS				<i>tef1</i>				
		Sequence (5' - >3')	Tm	size		Sequence (5' - >3')	Tm	size
1	F	ACGTTACNNNCTGTTGCCT	57.95	269	1*	GGCTTTTAGTNNNGTGCAA	58.01	319
	R	CGCAATGTGCGTTCNNGAT	58.03		R	TGCAATGTNNNCTGAAGTGT	57.76	
2	F	TCTGGCANNNATGAAGAACG	58.07	215	2	TTGGCTNNNAGTGGGGTGTC	58.01	320
	R	GACCGCCNNNGTATTTAGGG	58.05		R	GCAATGTCNNNTGAAGTGTC	57.14	
3	F	ACAACCCCNNNCCAATGT	57.53	214	3	GCCCGANNNTTCTGTTCTCA	58.19	426
	R	CATCGATGCCAGAACCAAGA	57.97		R	TGTCGACTNNNGTGCCAAA	57.03	
4*	F	CCTCGCANNNGTATTTCTTT	58.36	223	4	TGCCCGACNNNTCTGTTCTC	58.19	428
	R	GGGTTGNNNGTTGAAATGA	57.81		R	ATGTCGNNNGAAGTGCCAA	56.8	
5	F	ATCTCTNNNTCTGGCATCG	57.68	263	5	TTCCATNNNCCACCACATGC	58.23	257
	R	GAGTTGTGCNNNCTACTGCG	57.7		R	AATGTCGACTNNNGTGCCA	56.8	
6	F	TTACNNNCTGTTGCCTCGG	58.4	430	6	TGTTTGCTNNNAGTGGGGT	57.54	319
	R	CGAGTTGTGCNNNCTACTGC	57.7		R	TGTCGACTGAANNNTCCAAA	57.75	
7	F	TCCNNNCCAATGTGAACG	58.68	210				
	R	TCATCGATGNNNGAACCAAG	57.97					
8	F	ACTCCNNNCCAATGTGAA	57.23	214				
	R	CTTCATCGATNNNAGAACCA	57.97					
9	F	ATGAAGANNNCAGCGAAATG	57.47	286				
	R	AGTTGGGTGNNNTACGGACG	58.41					
10	F	AACTCCNNNCCAATGTGA	57.23	216				
	R	TCTTCATCANNNGCCAGAACC	57.68					

ITS: *4: Trias3 - F/Trias4R, *tef1*: Tritef1F/EF2

3. ทดสอบไพรเมอร์

ทำการทดสอบไพรเมอร์กับฐานข้อมูลเชื้อรา *Trichoderma* ในระดับของ type sequences ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* ระดับของกลุ่ม complex บนตำแหน่ง ITS จำนวน 2 คู่ ได้แก่ Trias3-F/Trias4-R และ Trias3-F/ITS4 (Figure 1) และมีตำแหน่งจับของไพรเมอร์ Trias1-F Trias2-R Trias3-F และ Trias4-R บนตำแหน่ง ITS ของเชื้อรา *T. asperellum* CBS 433.97 (Figure 2) โดยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ มี annealing temperature ที่เหมาะสมคือ 56 - 60°C. และตำแหน่ง *tef1* จำนวน 1 คู่ คือ Tritef1F/EF2 เมื่อทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบบนตำแหน่ง ITS และ *tef1* กับดีเอ็นเอของเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จำนวน 20 µL ประกอบด้วย Taq DNA Polymerase (biotech rabbit™) จำนวน 10 µL ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 µM ทั้ง forward และ reverse อย่างละ

1 µL dH₂O จำนวน 7 µL และ DNA ทดสอบจำนวน 1 µL พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่ง ITS มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 56°C. และตำแหน่ง *tef1* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 60°C. อย่างไรก็ตามไพรเมอร์จากตำแหน่ง *tef1* มีความจำเพาะต่อ *T. asperellum* ระดับของกลุ่ม complex น้อยกว่าไพรเมอร์ออกแบบที่ได้จากตำแหน่ง ITS ซึ่งไม่สามารถแยกตรวจเชื้อรา *T. pseudoasperelloides* และ *T. yunnanense* ได้ ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากตำแหน่ง ITS สามารถตรวจจับเชื้อรา *T. asperellum* ระดับของกลุ่ม complex ได้เฉพาะเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* งานวิจัยนี้สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงกับเชื้อรา *T. asperellum* ในระดับกลุ่ม complex ได้สำเร็จและได้ระยะเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR (Table 2) ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญเพื่อช่วยในการตรวจหาเชื้อชนิดนี้โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อราชนิดอื่น ๆ

ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งผลจากการใช้ฐานข้อมูล type sequences ของเชื้อรา *Trichoderma* เป็นพื้นฐานในการออกแบบ

ไพรเมอร์ ทำให้เกิดความเชื่อมั่นของความแม่นยำต่อเชื้อราเป้าหมายที่ต้องการตรวจสอบ

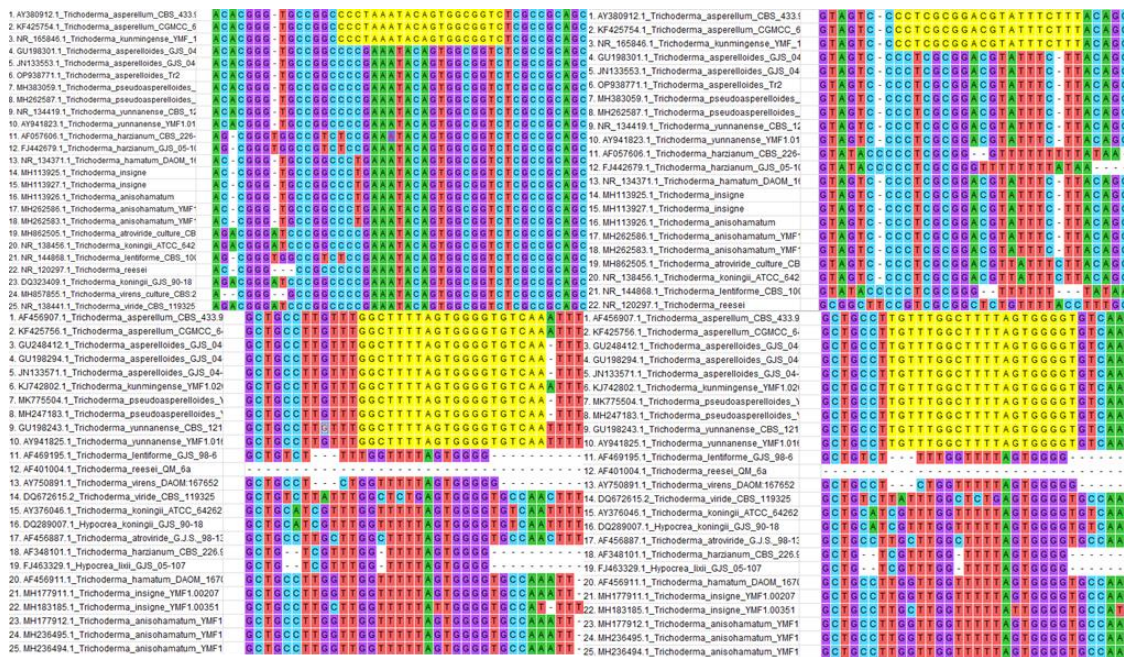


Figure 1 The specificity of the designed primers against *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 (type)

Table 2 Thermocycle for Polymerase Chain Reaction (PCR) for specific primers to *Trichoderma asperellum/ T. asperelloides*

PCR steps	Temperature °C	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5 mins	1 cycle
Denaturation	95	1 min	
Annealing (ITS/ <i>tef1</i>)	56/60	1 min	30 cycles
Extension	72	3 mins	
Final extension	72	5 mins	1 cycle



Figure 2 Binding sites of the Trias1 - F, Trias2 - R, Trias3 - F, and Trias4 - R primers on the ITS gene sequence of *Trichoderma asperellum* (CBS 433.97, type)

ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบบนตำแหน่ง ITS และ *tef1* กับดีเอ็นเอของเชื้อราที่รวบรวมเพื่อการทดสอบ ได้แก่ เชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 50 ไอโซเลท เชื้อรา *T. asperelloides* จำนวน 48 ไอโซเลท เชื้อรา *T. parareesei* จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรา *T. longibrachiatum* จำนวน 1 ไอโซเลท เชื้อรา *T. viride* complex จำนวน 5 ไอโซเลท เชื้อรา *T. lixii* จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรา *T. lentiforme* จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรา *T. afroharzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท และเชื้อรา *Gliocladium* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท พบว่า ไพรเมอร์ Trias3 - F/Trias4 - R และ Trias3 - F/ITS4 มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* (Figure 3) ทั้งนี้เชื้อราทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันมากโดยเป็น sister group ในการจำแนกระหว่างเชื้อราสองชนิดนี้ยังคงต้องใช้วิธี phylogenetic reconstruction ถึงแม้ว่าไพรเมอร์ที่ได้ จะมีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* ในระดับกลุ่ม complex แต่ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถระบุชนิดหรือใช้แยกเชื้อรา

T. asperellum และ *T. asperelloides* ออกจากเชื้อรา *Trichoderma* กลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน พบว่ามีความพยายามในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* ซึ่งมีการออกแบบบนตำแหน่ง *rpb2* อย่างไรก็ตามจากรายงานไม่ได้บ่งชี้ว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถแยกเชื้อรา *T. asperellum* จาก *T. asperelloides* ได้ (Devi et al., 2017) ซึ่งอาจต้องพิจารณาการออกแบบไพรเมอร์ด้วยตำแหน่ง *rpb2* หรือตำแหน่งอื่นเพิ่มเติม เช่น *tub2* โดยใช้วิธีการจากการศึกษาครั้งนี้ เพื่อพัฒนาให้ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อรา *T. asperellum* มากขึ้น และผลจากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ในการคัดกรองหรือตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ในตัวอย่างชีวภัณฑ์ สามารถลดระยะเวลาและงบประมาณในการดำเนินได้มากกว่า 5 เท่า คือสามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบชนิดจาก 15 วัน เหลือระยะเวลาเพียง 3 วัน

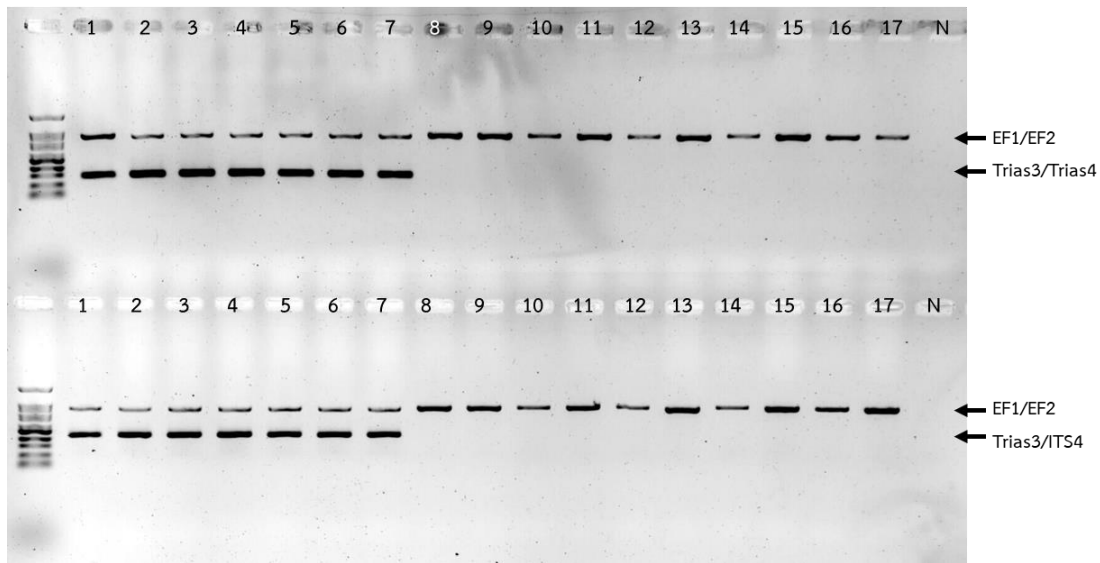


Figure 3 The results of specific primers tested with DNA templates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* sp. The lower bands showed that Trias3/Trias4 and Trias3/ITS4 detected only *T. asperellum* and *T. asperelloides*. (Lane no.1 - 4= *T. asperellum*; 5 - 7= *T. asperelloides*; 8 - 9= *T. parareesei*; 10= *T. longibrachiatum*; 11 - 12= *T. viride* complex; 13= *T. lixii*; 14= *T. harzianum*; 15= *T. lentiforme*; 16= *T. afroharzianum*; 17= *Gliocladium* sp.)

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction เพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความซับซ้อน (complex) ผลการดำเนินงานได้ไพรเมอร์ที่ออกแบบบนตำแหน่ง ITS ของเชื้อรา *T. asperellum* voucher CBS 433.97 ซึ่งเป็น type isolate โดยมีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ได้แก่ Trias3 - F/Trias4 - R และ Trias3 - F/ITS4 รวมถึงได้อุณหภูมิระยะเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR จากขั้นตอนการดำเนินงานสามารถนำมาจัดทำเป็นเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัย อย่างไรก็ตามจากผลการดำเนินงานพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่สามารถแยก *T. asperelloides* จาก *T. asperellum* ได้ เนื่องจากทั้งสองชนิดมีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบจึงสามารถตรวจจับได้ทั้งเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* โดยไม่จับกับกลุ่มอื่นของเชื้อรา *Trichoderma* เช่น เชื้อรา

T. harzianum, *T. parareesei*, *T. lixii* วิธีการตรวจสอบเชื้อรา *T. asperellum* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร หรือในกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของชีวภัณฑ์ สามารถคัดกรองเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ออกจาก *T. harzianum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง สามารถประหยัดเวลาและงบประมาณในการดำเนินการได้

เอกสารอ้างอิง

- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany. 62: 924-931.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany. 69: 2357-2372.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany. 69: 2373-2417.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany. 69: 2418-2420.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany. 70: 639-641.
- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia. 91: 553-556.
- Chaverri, P., L.A. Castlebury, G.J. Samuels and D.M. Geiser. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. Molecular Phylogenetics and Evolution. 27: 302-313.
- de los Santos-Villalobos, S., D.A. Guzmán-Ortiz, M.A. Gómez-Lim, J.P. Délano-Frier, S. de-Folter, P. Sánchez-García and J.J. Peña-Cabriales. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8 a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). Biological Control. 64: 37-44.
- Devi, T.P., N. Prabhakaran and D. Kamil. 2017. Development of Species Specific Markers for the identification of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum*. Vegetos. 30: 94-100. Doi: 10.5958/2229-4473.2017.00177.X.
- Dodd, S.L., R.N. Crowhurst, A.G. Rodrigo, G.J. Samuels, R.A. Hill and A. Stewart. 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. Mycological Research. 104: 23-34.
- Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D.W. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. Australasian Plant Pathology. 44: 25-30.
- Druzhinina, I.S., C.P. Kubicek, M. Komon-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.
- Grondona, R., R. Hermosa, M. Tejada, M.D. Gomis, P.D. Bridge, E. Monte and I. Garcia-Acha. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Applied Environmental Microbiology. 63: 3189-3198.

- Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*. 9: 286-298.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28: 1647-1649.
- Kindermann, J., Y. El-Ayouti, G.J. Samuels and C.P. Kubicek. 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology*. 24: 298-309.
- Konstantinova, P., P. Bonants, M. Gent-Pelzer, P. Zouwen and R. Bulk. 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assay. *Mycological Research*. 106: 23-33.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Mazzaglia, A., N. Anselmi, A. Gasbarri and A. Vannini. 2001. Development of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissues. *Mycological Research*. 105: 952-956.
- Mbarga, J.B., G.M. Ten Hoopen, J. Kuate, A. Adiobo, M.E.L. Ngonkeu, Z. Ambang, A. Akoa, P.R. Tondje and B.A.D. Begoude. 2012. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*. 36: 18-22.
- Miyazaki, K and M. Tsunoda. 2003. Application of DNA markers to research on *Trichoderma* in mushroom facilities of Japan (1): RAPD, SSCP marker. *Mushroom Science Biotechnology*. 11: 65-70.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 116: 1-116.
- Samuels, G.J., A. Ismaiel, M. Bon, S.D. Respinis, and O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*. 102: 944 - 966.
- Singh, A., M. Shahid and M. Srivastava. 2014. Phylogenetic relationship of *Trichoderma asperellum* Tasp/8940 using Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *International Journal of Advanced Research*. 2: 979 - 986.
- Sriram, S., M.J. Savitha, H.S. Rohini and S.K. Jalali. 2013. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oligonucleotide barcode and morphological characters. *Current Science*. 104: 1332 - 1340.

- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post - analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30: 1312 - 1313.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315 - 322. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), Academic Press.
- Zamir, D. and I. Chet. 1985. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal Microbiology*. 31:578–580.