การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride*

DNA Barcoding for *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* and *T. viride* Identification

ชนินทร ดวงสอาด[1/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1/]
อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว[1/] มะโนรัตน์ สุดสงวน[1/] สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง[3/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/]กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

รายงานความก้าวหน้า

รวบรวมข้อมูลและตัวอย่างของเชื้อรา *Trichoderma* ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2560 ได้ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์สารชีวภัณฑ์ 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างของรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท รวมเป็น 5 ไอโซเลท ทำสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมาย ตำแหน่ง LSU TEF1 และ ITS ของรา *Trichoderma* จำนวน 3 ไอโซเลท เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้น พบว่าทั้งสามไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่มของ *T. asperellum s.l.*

คำหลัก : *Trichoderma asperellum* *T. harzianum* *T. viride* barcoding

---

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-09-60

คำนำ

เชื้อราหลายสปีชีย์ใน genus *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะทางด้านการเกษตรที่มีการใช้เชื้อรา ใน genus *Trichoderma* เป็นสารชีวภัณฑ์ (biocontrol agent) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013; Kindermann *et al.*, 1998; Mbarga *et al.*, 2012) อันเนื่องมาจากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับ เชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแย่งใช้สารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ รวมถึงยังสามารถใช้สารอาหารและเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) นอกจากนี้ เชื้อรา *Trichoderma* ยังสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด และสารที่เชื้อรา *Trichoderma* สร้างขึ้นยังส่งผลดีต่อพืช โดยช่วยในการเจริญเติบโต (plant growth) รวมถึงกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต่อการเข้าทำลายของ เชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant defence responses) ดังนั้น เชื้อรา *Trichoderma* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่พืช เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และช่วยลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช

Trichoderma asperellum T. harzianum และ *T. viride* เป็นเชื้อราที่เป็นที่รู้จักใน genus *Trichoderma* และมีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีการส่งเสริมให้ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยทั้งทางภาครัฐและเอกชน รวมถึงมีการผลิตเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* ในเชิงการค้า การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง หากมีการใช้ชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น เกิดการปนเปื้อน หรือการผสมกันของเชื้อราปฏิปักษ์มากกว่า 1 ชนิด จะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Druzhinina et al., 2010) ในปัจจุบันมีหลายบริษัทมาขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ของ เชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* แต่เนื่องจากลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเชื้อราใน genus *Trichoderma* นั้นมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ยากต่อการจำแนกในระดับสปีชีย์

ในการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* สามารถทำได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Rifai, 1969; Bissett, 1984; Bissett, 1991a-c; Bissett, 1992) เช่น รูปร่างลักษณะและขนาดของ conidia สี ลักษณะผิว conidia (ornamentation) ลักษณะการแตกกิ่งก้าน การฟอร์มเส้นใยแบบ sterile หรือ fertile ความยาวที่ยื่นออกมาจากก้านชูสปอร์ แต่ทั้งนี้ ลักษณะความแตกต่างที่มีการรายงานหรือบันทึกไว้ดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างของได้อย่างชัดเจนสำหรับบางสปีชีส์ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ หรือมีความคลุมเครือระหว่าง strain ของบางสปีชีส์ (Singh *et al.*, 2014) เช่น ในเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งมีหลายการศึกษาพบว่า เชื้อราที่ถูกจัดจำแนกว่าเป็น *T. harzianum* มีมากกว่า 1 ชนิด ซึ่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงลักษณะของ cultures นั้นมีความแตกต่าง แต่

เป็นความแตกต่างที่คลุมเครือ และไม่เพียงพอหรือสามารถจัดจำแนก (Muthumeenakshi *et al.*, 1994; Fujimori and Okuda, 1994; Zimand *et al.*, 1994)

ปัจจุบันมีศึกษาการจัดจำแนกและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) กันมากขึ้น โดยส่วนใหญ่ ใช้ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) (Dodd *et al.*, 2000; Kindermann *et al.*, 1998) แต่พบว่าการจำแนกด้วย ITS เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างรา *Trichoderma* บางสปีชีส์ได้ เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เหล่านั้นมีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน 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) and actin (ACT) ในการจัดจำแนก (Samuels and Ismaiel, 2009) พบว่า เชื้อราชนิดนี้ประกอบไปด้วย *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ซึ่งได้รับการบันทึกเป็นอีกสปีชีส์ของเชื้อรา *Trichoderma* (Samuels *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้งสอง สปีชีส์นี้ 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* (Siram *et al.*, 2013) จากการศึกษาลักษณะของ conidia ของ เชื้อรา *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)

ในปัจจุบันการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อราได้ในระดับ genus แต่ในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ต้องมีการพิจารณาลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) มาร่วมวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้อง กลุ่มวิจัยโรคพืชเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ที่ขอขึ้นทะเบียน ดังนั้นการศึกษาการจัดจำแนกเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) จึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัยจะได้มาซึ่งวิธีการในการตรวจสอบชนิดเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ในการขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ที่มีความแม่นยำ และถูกต้อง ทั้งนี้การตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* จะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร รวมถึงประสิทธิภาพและ

ความยั่งยืนในการใช้เชื้อรา *Trichoderma* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช อีกทั้งข้อมูลของลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษา สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบหรือศึกษาความหลากหลายและการวิวัฒนาการของ เชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride*

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ถูกต้อง และเพื่อให้ได้เชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* มาตรฐาน เพื่อนำไปประยุกต์ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine) เครื่องเขย่า (vortex) เครื่อง tissue lyser gel tank เครื่องกำเนิดกระแสไฟ gel plate comb เครื่องถ่ายภาพเจล microwave micropipette ขนาด 10, 100, 200, และ 1,000 ไมโครลิตร กล้องจุลทรรศน์แบบ compound กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ water bath และ heat block
- วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10, 100, 200, และ 1,000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
- สารเคมี ได้แก่ เอนไซม์สำหรับทำปฏิกิริยา Taq DNA Polymerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Proteinase K enzyme Lithium Borate buffer (LB) ชุดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Microbial DNA Isolation Kit Power Plant Isolation Kit ชุดสำหรับการสกัดเจล ชุดสำหรับทำความสะอาดดีเอ็นเอ Stain G loading dye agarose gel (PCR grade) PCR water DNA ladder อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA) และ ไพร์เมอร์ ได้แก่

T. asperellum

- the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990)
- the translation elongation factor 1-α (EF1-α) EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999) / TEF1_R (Samuels *et al.*, 2002)
- calmodulin (CAL) CAL-228F/CAL-737R (Carbone and Kohn, 1999)
- the Actin (ACT) Triact1/Triact2 (Samuels *et al.*, 2006)
- the RNA polymerase subunit 2 (rpb2) fRPB2-5F/fRPB2-7cR (Liu *et al.*, 1999)
- the Large Subunit (LSU) LROR/LR6 (Vilgalys and Hester, 1990)

T. harzianum

- Internal Transcribed Spacer (ITS1) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990)

- translation elongation factor 1-α (EF1-α) EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999)

- calmodulin CAL-228F/CAL-737R (Carbone and Kohn, 1999)

- α -actin ACT-512F/ACT-783R (Carbone and Kohn, 1999)

- the Large Subunit 28S (LSU) LROR/LR6 (Vilgalys and Hester, 1990)

- โปรแกรมสำหรับ Sequence assemble เช่น Geneious, Sequencher หรือ Bioedit

T. viride

- the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990)

- the translation elongation factor 1-α (EF1-α) EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999) / TEF1_R (Samuels *et al.*, 2002)

- calmodulin (CAL) CAL-228F/CAL-737R (Carbone and Kohn, 1999)

- the Actin (ACT) Triact1/Triact2 (Samuels *et al.*, 2006)

- the RNA polymerase subunit 2 (rpb2) fRPB2-5F/fRPB2-7cR (Liu *et al.,* 1999)

- the Large Subunit (LSU) LROR/LR6 (Vilgalys and Hester, 1990)

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลของเชื้อรา *Trichoderma asperellum T. harzianum* และ *T. viride*

รวบรวมข้อมูลสถานะของอนุกรมวิธานของรา *Trichoderma* ให้เป็นปัจจุบัน ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง การจัดจำแนกชนิดของ *Trichoderma* โดยใช้ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล

2. เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride*

ตัวอย่างเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* ที่นำมาใช้ในการวิจัย นำมาจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ จากสารชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* ที่มีขายในท้องตลาดในปัจจุบัน รวมถึงไอโซเลทที่มีการส่งเสริมโดยหน่วยงานของภาครัฐ โดยตัวอย่างของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* ทั้งหมดจากการเก็บตัวอย่าง จะนำมาแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการสกัด DNA ต่อไป เชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* ที่ใช้ในการศึกษาจะจัดเก็บใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ สำหรับเป็นข้อมูลหรือตัวอย่างอ้างอิงต่อไป

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

ศึกษาลักษณะของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride*

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Trichoderma* ที่ศึกษากับคู่มือของ Rifai (1969) Bissett (1984) Bissett (1991a-c) และ Bissett (1992)

4. จำแนกชนิดของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตักหรือเขี่ยเส้นใยรวมถึง conidia ของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับการสกัด ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ *T. asperellum* ตำแหน่ง ITS TEF1-α Calmodulin Actin rpb2 และ LSU กำหนดใช้ค่า annealing temperature ของแต่ละตำแหน่งที่ 62 54 56 58 58 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ *T. harzianum* ตำแหน่ง ITS TEF1- α Calmodulin Actin และ LSU กำหนดใช้ค่า annealing temperature ของแต่ละตำแหน่งที่ 62 54 56 58 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ *T. viride* คือ ITS TEF1- α Calmodulin Actin rpb2 และ LSU กำหนดใช้ค่า annealing temperature ของแต่ละตำแหน่งที่ 62 54 56 58 58 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

- **การบันทึกข้อมูล**

1. บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. วิเคราะห์ผล สรุปและเขียนรายงานความก้าวหน้า

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของรา *T. asperellum* complex เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบเปรียบเทียบข้อมูลการจำแนกด้วยข้อมูลพันธุกรรม ได้ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์สารชีวภัณฑ์ 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างของรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท รวมเป็น 5 ไอโซเลท ทำสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมาย ตำแหน่ง LSU TEF1 และ ITS ของรา *Trichoderma* จำนวน 3 ไอโซเลท เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้นพบว่าทั้งสามไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา *T. asperellum s.l.*

Consensus sequence

Trichoderma asperellum senso lato

Isolate_M0008_ITS

GGGGGTTTCGTGTTAGTCTCCCCACCCATGTGACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGT
GCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGT
ATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA
TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATC
GGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCC

TGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAA
TGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAACCTTGTAAT
TTTTTTTATTTCCTAAAGGGGGAGAAAGAA

Isolate_M0009_ITS

GCGTTCGAGCTTCTCTCCCAACCCATGTGACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCG
TCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATT
TCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGG
CGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTG
CGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAACCGTTTAAATT
TTTTCTTCTCCAAAAGGGGGAGAGGGAAT

Isolate_M0009_ITS

TGGCCTTCGTGTTCCTCCCAACCCATGTGACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCG
TCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATT
TCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGG
CGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTG
CGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATTCTGGTTAATTTT
TTTTTTTCCTAAAAGGAAGAGAAGAGA

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

รวบรวมข้อมูลและตัวอย่างของเชื้อรา *Trichoderma* ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2560 ได้ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์สารชีวภัณฑ์ 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างของรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท รวมเป็น 5 ไอโซเลท ทำสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมาย ตำแหน่ง LSU TEF1 และ ITS ของรา *Trichoderma* จำนวน 3 ไอโซเลท เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้นพบว่าทั้งสามไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่มของ *T. asperellum s.l.* แต่จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าควรเพิ่มตำแหน่งของยีนเพื่อการจัดจำแนกที่ชัดเจน รวมถึงตัวอย่างอื่นๆ ที่ทำการเก็บตัวอย่างต่อไป

เมื่อสิ้นสุดงานวิจัย ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง จะใช้เป็นฐานข้อมูล และองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัยวิจัย โดยข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัย จะทำให้ได้วิธีการจัดจำแนก และชนิดที่ถูกต้อง รวมทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* เพื่อใช้เปรียบเทียบความเหมือนหรือแตกต่างของเชื้อรา เมื่อมีการขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับ

กรมวิชาการเกษตร โดยการตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิด ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma* โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษา สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านพันธุศาสตร์ เพื่อศึกษาความหลากหลาย และวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* ในประเทศไทย และข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในหน่วยงานราชการ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถาบันการศึกษาและหน่วยงานเอกชน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

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.

Brotman, Y., Kapuganti, J.G. and A. Viterbo. 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20: R390-R391.

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., Castlebury, L.A., Samuels, G.J. 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., Guzmán-Ortiz, D.A., Gómez-Lim, M.A., Délano-Frier, J.P., de-Folter, S., Sánchez-García, P. and J.J. Peña-Cabriales. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological

control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control* 64: 37-44.

Dodd, S.L., Crowhurst, R.N., Rodrigo, A.G., Samuels, G.J., Hill, R.A. and A. Stewart. 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 104**:** 23-34.

Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. 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., Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M., Mulaw, T.B. 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.

Fujiimori, F. and T. Okuda. 1994. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. I. Fungi. *Journal of antibiotics* 47: 173-182.

Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E. and I. Garcia-Acha. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1890-1898.

John, R.P., Tyagi, R.D., Prévost, D., Brar, S.K., Pouleur, S. and R.Y. Surampalli. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* 29: 1452-1459.

Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286-298.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.

Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G.J. 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.

Liu, K.L., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Eichorst, S.A. and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.

Mbarga, J.B., Ten Hoopen, G.M., Kuaté, J., Adiobo, A., Ngonkeu, M.E.L., Ambang, Z., Akoa, A., Tondje, P.R. 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.

Muthumeenakshi, S., Mills, P.R., Brownd, A.E. and D.A. Seaby. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* 140: 769-777.

Nylander, J.A., Wilgenbusch, J.C., Warren, D.L. and D.L. Swofford. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24: 581-583.

Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-116.

Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A. and O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170.

Samuels, G.J., Dodd, S.L., Lu, B., Petrini, O., Schroers, H.J. and I.S. Druzhinina. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology* 56: 67-133.

Samuels, G.J. and A. Ismaiel. 2009. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtiae*: Two new *T. hamatum-like* species. *Mycologia* 101: 142-156.

Samuels, G.J., Ismaiel, A., Bon, M., Respinis, S.D. and O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 102: 944-966.

Singh, A., Shahid, M. 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., Savitha, M.J., Rohini, H.S. 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.

Talavera, G. and J. Castresana. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56: 564-577.

Vilgalys, R. and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. and M. Lorito. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), pp. 315-322. Academic Press.

Zimand, G., Valinsky, L., Elad, Y., Chet, I. and S. Manulis. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research* 98: 531-534.