วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

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

การประยุกต์ใช้ผงเชื้อ *Trichoderma asperellum* ต่อการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani*

The Application of *Trichoderma asperellum* Powder to Control Sheath Blight Disease of Rice Caused by *Rhizoctonia solani*

เสริมวิทย์ กาฬภักดี[1,2], อรอุมา เพียซ้าย[1], วันวิสา ศิริวรรณ์[1], พิมใจ กาฬภักดี[3] และ เนตรนภิส เขียวขำ[1]*

Sermwit Karnpakdee[1,2], Onuma Piasai[1], Wanwisa Serewan[1], Pimjai Karnpakdee[3] and Netnapis Khewkhom[1]*

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2] ส่วนการใช้น้ำชลประทาน สำนักบริหารจัดการน้ำและอุทกวิทยา กรมชลประทาน กรุงเทพมหานคร 10300

[2] Irrigation Water Management Division, Bureau of Water Management and Hydrology, Royal Irrigation Department, Bangkok 10300

[3] ฝ่ายวิเคราะห์โครงการและหลักสูตรการฝึกอบรม สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

[3] Extension and Training Office, Kasetsart University, Bangkok 10900

* Corresponding author: agrnpk@ku.ac.ch

Received: date; May 6, 2020 Accepted: date; July 23, 2020 Published: date February 15, 2021

บทคัดย่อ: การใช้ผงเชื้อรา *Trichoderma* เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว สาเหตุจากเชื้อรา *R. solani* เชื้อรา *Trichoderma* sp. แยกจากดินที่เพาะปลูกไม้ผล จ.จันทบุรี จำแนกเชื้อรา *Trichoderma* (MC2560) ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล เปรียบเทียบลักษณะนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ ITS 4 และ ITS 5 จำแนกลักษณะที่คล้ายคลึงกันตรวจด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าเชื้อราดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Trichoderma asperellum* QT22046 accession number KY225608 ที่ 98.58% การทดสอบการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อรา *T. asperellum* ต่อเชื้อรา *R. solani* ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่าเชื้อรา *T. asperellum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* เท่ากับ 42.10% และเส้นใยของเชื้อรา *T. asperellum* เจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *R. solani* เท่ากับ 0.56 เซนติเมตรต่อวัน การเจริญของเชื้อรา *T. asperellum* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิ 25-30°C เชื้อราเจริญรวดเร็วเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายใน 3 วัน แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40°C ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อรา *T. asperellum* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในโรงเรือน เตรียมจากสารแขวนลอยสปอร์ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2% carboxyl methyl cellulose 0.5% ไคโตซาน และ 1.0% tween80) ที่มี talcum เป็นสารพา การปลูกเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวพันธุ์ กข41 อายุ 50 วัน ในโรงเรือนปลูกพืชเตรียมโดยนำ mycelium disc ผสมข้าวเปลือกและแกลบที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่ในถุงกระดาษฟางห่อทับด้วยมุ้งลวดแล้ววางระหว่างลำต้นที่บริเวณระดับน้ำ นำผงเชื้อรา *T.*

asperellum ที่ผสม talcum มาพ่นลงบนต้นข้าว พบว่าการพ่นผงเชื้อรา *T. asperellum* ความเข้มข้น 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร สามารถลดการเกิดโรคได้ 42.01% และ 37.31% หลังจากฉีดพ่น 14 และ 21 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุม (ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว)

คำสำคัญ: *Trichoderma asperellum; Rhizoctonia solani*; โรคกาบใบแห้ง; ข้าว

ABSTRACT: The application of *Trichoderma* powder to control sheath blight disease of rice caused by *Rhizoctonia solani* was studied. *Trichoderma* sp. was isolated from soil samples in fruit crop cultivation area at Chanthaburi province. *Trichoderma* sp. (MC2560) was morphologically and molecularly identified. Molecular identification was carried out using ITS4 and ITS5 primers. The homology level of the isolate was checked using BLAST program. The isolate was identified as *Trichoderma asperellum* QT22046 accession number KY225608 with a homology level of 98.58%. *T. asperellum* was tested for antagonistic activities using dual culture method against *R. solani* on Potato Dextrose Agar (PDA). *T. asperellum* had shown a growth inhibition of *R. solani* at 42.10% and *T. asperellum* mycelium overgrown on *R. solani* colony at 0.56 cm per day. Growth of *T. asperellum* on PDA at 25-30°C had the fastest growth and colony full covering on culture media within 3 days, in contrast at 40°C showed non-growing. Efficacy of *T. asperellum* powder as biocontrol in controlling sheath blight disease of rice was examined under greenhouse condition. *T. asperellum* powder was suspended in buffer (0.2% carboxyl methyl cellulose, 0.5% chitosan and 1.0% tween80) with talcum as carrier. Inoculation with *R. solani* on rice plants variety RD41 at 50 days old in greenhouse was prepared by mix of mycelium disc with sterile paddy and husk, put in straw paper bag wrapping with aluminum net and placed between rice stems at water level. After that, *T. asperellum* with talcum was applied by spraying on the rice plants. Results showed that disease incidence of plants treated with *T. asperellum* powder at 40 g per 20 L was decrease at 42.01% and 37.31% after spraying 14 and 21 days, respectively, compared with control (inoculated rice plant without spraying).

Keywords: *Trichoderma asperellum; Rhizoctonia solani*; sheath blight disease; rice

บทนำ

ในปัจจุบันความต้องการบริโภคผลิตผลเกษตรอินทรีย์และการลดใช้สารเคมีในการเกษตรมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะข้าวซึ่งเป็นอาหารหลักของคนไทย และมีการผลิตเพื่อส่งออกเป็นอันดับต้นๆ ของโลก ในการผลิตข้าวมักพบปัญหาโรคพืช เช่น โรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคกาบใบแห้ง และโรคเมล็ดด่าง เป็นต้น ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตข้าว โดยเฉพาะโรคกาบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง 20-40% (วิชชุดา และคณะ, 2554; De Franca et al., 2015; Abbas et al., 2017) เริ่มพบในระยะข้าวแตกกอจนถึงระยะใกล้เก็บเกี่ยว ต้นข้าวที่มีการแตกกอมากจะเบียดเสียดกันทำให้การเกิดโรครุนแรง การป้องกันนิยมใช้สารเคมีวาลิดามัยซิน โพรพิโคนาโซลร่วมกับไดฟีโนโคนาโซล หรืออะซอกซีสโตรบินร่วมกับไดฟีโนโคนาโซล ฉีดพ่นตามอัตราที่ระบุ อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมโรคอาจมีการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตหรือก่อให้เกิดความต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อสาเหตุ ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวจึงเป็นทางเลือกที่ดี ซึ่ง นิพนธ์ (2550); Viterbo et al. (2007) รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นปรสิตของเชื้อรา *R. solani* และเชื้อราโรคพืชอีกหลายชนิด จิระเดช และคณะ (2548) ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในระดับ

ห้องปฏิบัติการและแปลงนาทดลอง พบว่าการเกิดโรคกาบใบแห้งและโรคเมล็ดด่างลดลง ลดเมล็ดลีบ และได้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ De Franca et al. (2015) ใช้เชื้อรา *T. asperellum* พ่นที่เมล็ดและใบข้าวในแปลง พบว่าการลุกลามของโรคกาบใบแห้งลดลง ความรุนแรงของโรคลดลง 19% น้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น 34% และผลผลิตเพิ่มขึ้น 41% เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีกลไกหลายอย่างในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่ การเป็นปรสิต การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขัน การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Samuels and Hebbar, 2015; Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004; Harman, 2006) งานวิจัยนี้มีสมมติฐานว่าเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชแตกต่างกัน จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แยกได้เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีการเจริญคลุมทับเชื้อรา *R. solani* และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้ดีกว่าสายพันธุ์ทางการค้า เชื้อราที่ศึกษาแยกจากดินจากแปลงไม้ผลซึ่งมีสภาพทางระบบนิเวศที่แตกต่างจากแปลงนาและมีเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่แตกต่างกัน จึงคาดว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* ที่แยกได้น่าจะมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ที่ดีในการควบคุมโรคในนาข้าว สำหรับวิธีการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* ใช้ 2 วิธีควบคู่กัน ได้แก่ การจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐานวิทยาและการจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (Samuels and Hebbar, 2015) ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. โดยจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค และทดสอบการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวด้วยชีววิธีด้วยผงเชื้อรา *T. asperellum* ในโรงเรือน

วิธีการศึกษา

1. แยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อใช้เป็นเชื้อราปฏิปักษ์

เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท MC2560 แยกเชื้อด้วยวิธี dilution plate จากดินในพืชที่เพาะปลูกไม้ผล จ. จันทบุรี เป็นตัวอย่างเชื้อจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เก็บเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ในหลอดอาหารเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อใช้ศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว และจำแนกชนิด (species) ของเชื้อราต่อไป

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

นำเชื้อรา *Trichoderma* sp. (MC2560) เลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเชื้อราโดยดูลักษณะสีโคโลนีของเชื้อรา การเจริญของเส้นใย และการสร้างสปอร์ของเชื้อรา การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธีการล้างสปอร์ ใช้เข็มเขี่ยเส้นใย ย้ายลงบนกระจกสไลด์ที่หยดน้ำสบู่ ใช้เข็มเขี่ยหมุนวนเส้นใยของเชื้อราในน้ำสบู่เพื่อชะล้างสปอร์ที่มีจำนวนมากให้หลุดออกแล้วเขี่ยเส้นใยย้ายลงบนกระจกสไลด์ที่หยดน้ำฆ่าเชื้อ หมุนวนเส้นใยของราในน้ำฆ่าเชื้ออีกครั้งแล้วเขี่ยเส้นใยย้ายลงบนกระจกสไลด์ที่หยดสารละลาย Shear's Mounting Solution รอไว้ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำตัวอย่างสไลด์ไปตรวจดูโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะเส้นใย ก้านชูสปอร์ (conidiophore) และไฟอะไลด์ (phialide) โคนิเดีย (conidia) คลามายโดสปอร์ (chlamydospore) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกผล และถ่ายภาพโคโลนีของเชื้อรา ตามวิธีการของ Samuels and Hebbar (2015)

3. ศึกษาทางชีวโมเลกุลในการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท MC2560

3.1 การสกัด DNA

การสกัด DNA ดัดแปลงตามวิธีการของ Gupta et al. (2011) โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นขูดเส้นใยใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาณ 20 มิลลิกรัม เติม CTAB buffer (2% Powder CTAB, 5 M NaCl, 0.5% EDTA, 1M Tris-HCl pH 8.0 และ 2% PVP) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วบดเส้นใยให้ละเอียด นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าทุก 10 นาที) เติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (chloroform : isoamyl alcohol) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง

Vortex เป็นเวลา 1-2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายเฉพาะส่วนใส ใส่หลอดใหม่ แล้วเติมด้วย isopropanol alcohol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วพลิกหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอน DNA เปิดฝาทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วละลายตะกอน DNA ด้วย RNase free water ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA

เพิ่มปริมาณชิ้น DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้สารละลายDNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ของเชื้อราเป็น DNA แม่แบบ (DNA template) ในลำดับเบสบริเวณ ITS rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (White et al., 1990) โดยใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA template เข้มข้น 10 มิลลิกรัม ไพรเมอร์ ITS5(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') และ ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') โดยแต่ละไพเมอร์มีความเข้มข้น 1 พิโคโมลาร์ และ 2X PCR Bio Taq Mix Red (PCR Biosystems, London)

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม คือ initial อุณหภูมิที่ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 52°C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที โดยให้ทำปฏิกิริยาจนครบ 35 รอบ แล้ว final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบชิ้น DNA ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1% อะกาโรส (gel electrophoresis 1% agarose) โดยนำผลผลิตปฏิกิริยา PCR ผสมกับ fluorescent dye (Novel Juice, BIO-HELIX) แล้วนำไปโหลดในอะกาโรสเจล 1% ใน 0.5 x TAE buffer เวลา 30 นาที กระแสไฟ 100 โวลต์ ตรวจผลด้วยเครื่อง gel documentation

3.3 วิเคราะห์ผล

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA เชื้อรา *Trichoderma* sp. (MC2560) โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ บริษัท Macrogen (South Korea) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ของ NCBI

4. ทดสอบการเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน แล้วใช้ cork borer ตัดปลายเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 25 30 35 และ 40°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยการวัดขนาดของโคโลนี

5. ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค

เชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ *T. asperellum* (MC2560) ชีวภัณฑ์ *T. asperellum* ไอโซเลท CB–Pin–01 และชีวภัณฑ์ทางการค้า *T. harzianum* (ได้รับการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย จากกรมวิชาการเกษตร) และเชื้อรา *R. solani* เลี้ยงเชื้อราที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง การทดสอบใช้วิธี dual culture เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *R. solani* ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อราวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 2 เซนติเมตร ในแนวตรงข้ามกัน ส่วนกรรมวิธีชุดควบคุมวางเชื้อรา *R. solani* ชนิดเดียว โดยให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ และอัตราการเจริญคลุมทับเส้นใยราสาเหตุโรคพืช ตามวิธีของ Boukaew and Prasertsan (2014) ดังสมการ

การยับยั้งการเจริญ (%) = [(R1-R2)/R1] x 100

R1 = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม (เซนติเมตร)

R2 = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ (เซนติเมตร)

อัตราการเจริญคลุมทับเส้นใยราสาเหตุโรค (เซนติเมตรต่อวัน) = (D x 1)/T

D = ความยาวของโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* เจริญคลุมทับเชื้อรา *R. solani* (เซนติเมตร)

T = ระยะเวลาที่เชื้อรา *Trichoderma* ใช้ในการเจริญคลุมทับเชื้อรา *R. solani* (วัน)

6. ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในโรงเรือนปลูกพืช

6.1 การเตรียมผงเชื้อรา *T. asperellum*

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์โดยการผสม 0.2% carboxyl methyl cellulose (CMC) และ 0.5% ไคโตซาน และ 1.0% Tween80 นำเซลแขวนลอยของเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) ที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหาร PDA และขูดเส้นใยผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมเซลเชื้อปฏิปักษ์ในสารละลายบัฟเฟอร์และสารพา (carrier) ผง talcum อัตราส่วน 1:1 (จำนวน 100 กรัม) คลุกเคล้าให้เข้ากัน ผึ่งให้แห้งในตู้เขี่ยเชื้อแล้วเก็บในถุงฟอยด์ (Rai and Tewari, 2016)

6.2 การเตรียมเชื้อรา *R. solani* และการปลูกเชื้อ

เตรียมข้าวเปลือกผสมแกลบ อัตราส่วน 50:50 แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน ล้างผ่านน้ำสะอาด 3 ครั้ง วางพักทิ้งไว้ ใส่ลงในถุงทนความร้อน ปริมาณ 150 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที เตรียม mycelium disc ของเชื้อรา *R. solani* ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน โดยเจาะบริเวณขอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร ใส่ mycelium disc จำนวน 5 ชิ้น ต่อ ข้าวเปลือก 150 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เตรียมก้อนเชื้อโดยบรรจุเมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อรา *R. solani* เจริญอยู่ ใส่ในกระดาษฟางแล้วห่อทับด้วยมุ่งลวด ปริมาตร 10 กรัมต่อก้อน (ดัดแปลงจาก พากเพียร และคณะ, 2544) แล้วนำไปปลูกเชื้อเมื่อต้นข้าวอายุ 50 วัน โดยวางก้อนเชื้อไว้ในกอข้าวบริเวณระดับน้ำ เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำก้อนเชื้อออก

6.3 การเตรียมต้นข้าว

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกพันธุ์ กข41 ห่อด้วยผ้าแล้วแช่ในน้ำสะอาด 12 ชั่วโมง ยกขึ้นให้สะเด็ดน้ำ บ่มเมล็ดข้าวในห่อผ้าชื้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะในกระบะเพาะ จำนวน 20 หลุม ซึ่งบรรจุวัสดุเพาะดินเหนียวนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121°C เวลา 30 นาที 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 24 ชั่วโมง โดยเพาะ 1 เมล็ดต่อหลุม ย้ายปลูกลงในกระถาง เมื่อกล้าข้าวมีอายุได้ 15 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 ปริมาณ 50 กรัมต่อกอ สูตร 46-0-0 ปริมาณ 12 กรัมต่อกอ และสูตร 0-0-21 ปริมาณ 3 กรัมต่อกอ (ปัณณวิชญ์ และคณะ, 2561) ดูแลจนต้นข้าวอายุ 50 วัน

6.4 ทดสอบการใช้ผงเชื้อรา *T. asperellum* ต่อการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในโรงเรือน

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 7 ซ้ำ กรรมวิธีที่ 1) พ่นผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) ปริมาตร 20 กรัมต่อ 20 ลิตร (ความเข้มข้น 2.05 x 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อกอ แล้วปลูกเชื้อรา *R. solani* กรรมวิธีที่ 2) พ่นผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) ปริมาตร 40 กรัมต่อ 20 ลิตร (ความเข้มข้น 2.05 x 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อกอ แล้วปลูกเชื้อรา *R. solani* กรรมวิธีที่ 3) ใช้ชีวภัณฑ์ทางการค้า *T. harzianum* (ความเข้มข้น 2 x 10^8 cfu ต่อกรัม) ปริมาตร 40 กรัมต่อ 20 ลิตร แล้วปลูกเชื้อ กรรมวิธีที่ 1 2 และ 3 พ่นสารชีวภัณฑ์บนต้นข้าว จำนวน 3 ครั้ง คือ ก่อนปลูกเชื้อรา *R. solani* 2 วัน และหลังปลูกเชื้อ 7 และ 14 กรรมวิธีที่ 4) ปลูกเชื้อก่อนแล้วพ่นด้วยผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) อัตรา 40 กรัมต่อ 20 ลิตร กรรมวิธีที่ 5) ปลูกเชื้อรา *R. solani* ก่อนแล้วพ่นด้วยสารเคมีวาลิดามัยซิน (validamycin) 3% W/V SL ความเข้มข้น 20 มิลลิลิตรต่อ 20 ลิตร กรรมวิธีที่ 6) ชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อรา *R. solani* และ กรรมวิธีที่ 7) ชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ

6.5 การประเมินความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งของข้าว

หลังการปลูกเชื้อรา *R. solani* บนต้นข้าวเป็นเวลา 14 และ 21 วัน นับจำนวนต้นที่เป็นโรคต่อกอและวัดความสูงของแผล โดยวัดจากโคนต้นที่ระดับความสูงของน้ำ (ระดับที่ปลูกเชื้อ) ถึงบริเวณสูงสุดที่แผลลุกลาม และวัดความสูงของต้นข้าวโดยวัดจากระดับของดินไปจนถึงปลายสุดของใบธง คำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (บังอร และคณะ 2561) และเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรค เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังสมการ

$$\text{ความรุนแรงของโรค (\%)} = \frac{\text{ความสูงของแผล} \times 100}{\text{ความสูงของต้นข้าว}}$$

$$\text{การควบคุมโรค (\%)} = \frac{(\text{ความรุนแรงโรคของชุดควบคุม} - \text{ความรุนแรงโรคของชุดกรรมวิธี}) \times 100}{\text{ความรุนแรงโรคของชุดควบคุม}}$$

วิเคราะห์ผลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสถิติ Sirichai_6

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทางสัณฐานวิทยาตาม Samuels and Hebbar (2015) พบว่ามีลักษณะตรงกับเชื้อรา *T. asperellum* มีการเจริญอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยในระยะแรกเจริญแบนราบติดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีการเจริญอย่างรวดเร็วภายใน 2 วัน ต่อมาเป็นปุยแบบปุยฝ้าย มีเส้นใยมีสีขาว หลังจากนั้นสร้างสปอร์สีเขียวจำนวนมากมายภายใน 4 วัน กลุ่มโคนิเดีย (conidia) มีสีเขียวอ่อนหรือใส (hyaline) ลักษณะค่อนข้างกลม ผิวเรียบ มีขนาด (1.8-) 2.9 (-4.1) x (2.0-) 3.0 (-4.3) ไมโครเมตร ไฟอะไลด์ (phialide) มีขนาด (1.9-) 2.8 (-3.9) x (4.4-) 6.4 (-10.7) ไมโครเมตร รูปแบบการแตกแขนงแบบพีระมิด กิ่งก้านด้านข้างจะจับคู่กันอย่างเด่นชัดแตกออกจากแกนหลัก (**Figure 1**) ไม่สร้าง pigment หรือกลิ่น บนอาหาร PDA

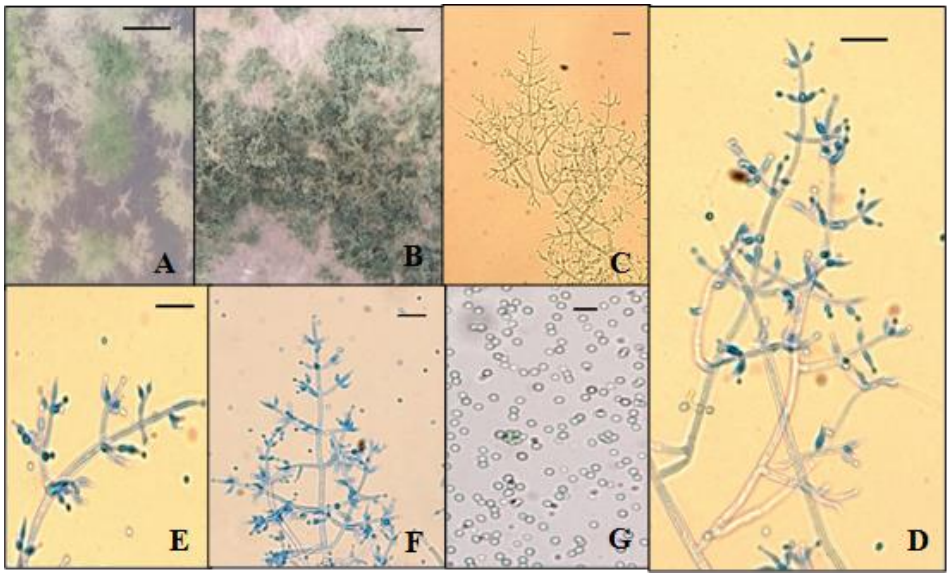

Figure 1 *Trichoderma asperellum* conidial pustules (A-B), conidiophores and phialide (C-F), conidia (G) culture on potato dextrose agar, Scale bars: A = 1 mm; B = 0.5 mm; C-F = 20 µm; G = 10 µm

2. จำแนกโดยใช้ลักษณะทางชีวโมเลกุล

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ในลำดับเบสบริเวณ ITS rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 และเมื่อตรวจสอบชิ้น DNA ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1% อะกาโรส (gel electrophoresis 1% agarose) ปรากฏแถบ DNA เป้าหมาย 1 แถบ (band) หลังจากนำส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ มีขนาด 606 คู่เบส (base pairs) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความคล้ายคลึง 98.58% เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *T. asperellum* ไอโซเลท QT22046 accession number KY225608 (**Figure 2**)

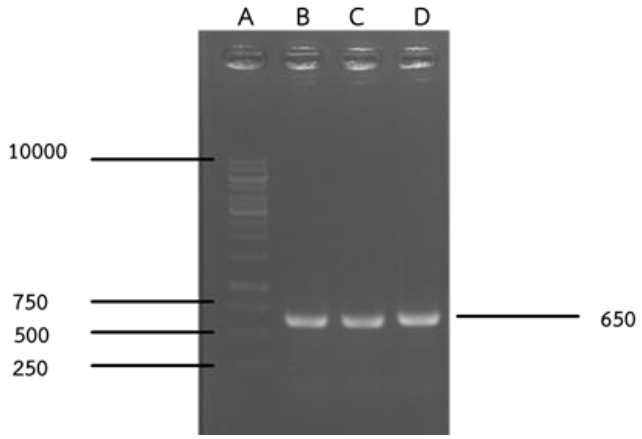

Figure 2 PCR products size: Markers 1 kb ladder (A), *T. asperellum* MC2560 (B), *T. asperellum* (commercial strain) (C) and *T. harzianum* (commercial strain) (D)

3. การเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 20 25 30 35 และ 40°C พบว่าการเจริญของเชื้อรา *T. asperellum* มีความแตกต่างทางสถิติ สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว ที่อุณหภูมิ 25-30°C เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 3 วัน เชื้อรามีการเจริญลดลงที่อุณหภูมิ 20 และ 35°C และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40°C (**Table 1 และ Figure 3**) โดย ณรงค์ (2558) และ Samuels and Hebbar (2015) กล่าวว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30°C และเจริญเติบโตช้าที่อุณหภูมิ 35°C หรือสูงกว่านี้ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ 15 25 30 และ 35°C ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma* พบว่าเชื้อราเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-35°C และมีการเจริญเติบโตช้าที่อุณหภูมิ 15°C (Singh et al., 2014; Petrisor et al., 2016) เช่นเดียวกับมีรายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. hamatum* คือ 25-35°C ส่วนเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. viride* มีการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ได้ดี ที่อุณหภูมิ 25-40°C (Zehra et al., 2017)

Table 1 Colony radial growth of *T. asperellum* incubated in different temperatures on PDA for 3 days

Incubation temperature (°C)	Colony radial growth of *T. asperellum* (cm)
20	6.135 ± 0.078[b]
25	9.000 ± 0.000 [a1/]
30	9.000 ± 0.000[a]
35	5.470 ± 0.032[c]
40	0.000 ± 0.000[d]
C.V. (%)	2.87

[1/] Mean values within the same columns followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's new multiple range test (P < 0.01)

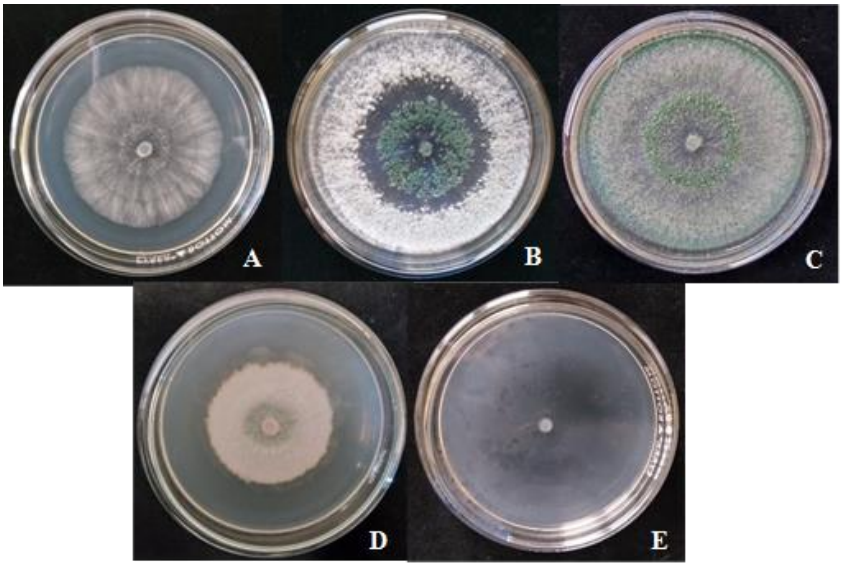

Figure 3 Colony characteristic of *T. asperellum* on PDA incubated for 3 days at 20 (A), 25 (B), 30 (C), 35 (D) and 40°C (E)

4. ประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* เท่ากับ 38.0-45.3% และเจริญคลุมทับโคโลนีเชื้อรา *R. solani* 0.49-0.62 มิลลิเมตรต่อวัน โดยชีวภัณฑ์ *T. asperellum* CB-Pin-01 (biopesticide) มีการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเจริญคลุมทับของเชื้อราสาเหตุโรคสูงที่สุด 45.30% และ 0.62 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ ในขณะที่ *T. asperellum* (MC2560) ยับยั้งการเจริญเติบโตและการเจริญคลุมทับของเชื้อรา *R. solani* 42.10% และ 0.56 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (Table 2) สอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศอินเดียที่พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ได้ 45-62% (Mousumi et al.,2019) ในประเทศไทย Manoch et al. (2009) ศึกษาการควบคุมเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา *R. solani* มากกว่า 50% Benítez et al. (2004) กล่าวว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. มีกลไกยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค

โดยพันรัดและเจาะเข้าไปทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความสามารถในการแข่งขันการใช้ธาตุอาหารได้ดีอีกด้วย

Table 2 Antagonistic efficiency of *T. asperellum* on mycelial growth inhibition and overgrown by mycelium against *R. solani* by dual culture tested on potato dextrose agar for 6 days

Treatments	Mycelial growth inhibition against *R. solani* (%)	Overgrown by mycelium (cm per day)
T. asperellum MC2560	42.10[b]	0.56[b]
T. asperellum CB–Pin–01 (biopesticide)	45.30[a]	0.62[a]
T. harzianum (commercial biopesticide)	38.00[c]	0.49[c]
C.V. (%)	4.97	6.13

1/ Mean values within the same columns followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's new multiple range test ($P < 0.01$)

5. ผลของผงเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืช

การประเมินความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งหลังจากปลูกเชื้อรา *R. solani* เป็นเวลา 14 วัน พบว่ากรรมวิธีที่พ่นผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) ชีวภัณฑ์ทางการค้า *T. harzianum* และกรรมวิธีพ่นสารเคมี validamycin ลดความรุนแรงของโรคได้ 29.10–42.01% เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค และมีความรุนแรงต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค (8.83%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้ผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) ที่ปริมาตร 40 กรัมต่อ 20 ลิตร มีความรุนแรงโรคต่ำที่สุด (5.12%) โดยมีค่าใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี validamycin (5.73%)

จากการประเมินความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งหลังจากปลูกเชื้อรา *R. solani* เป็นเวลา 21 วัน พบว่ากรรมวิธีที่พ่นผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560*)* และชีวภัณฑ์ทางการค้า *T. harzianum* รวมทั้งกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี validamycin ลดความรุนแรงของโรคได้ 27.37-37.31% เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค และมีความรุนแรงต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค (9.46%) อย่างมีนัยสำคัญ โดยการใช้ผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) 40 กรัมต่อ 20 ลิตร พบความรุนแรงโรคต่ำที่สุด (5.93%) และมีความรุนแรงโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมี (6.56%) เล็กน้อยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (**Table 3**) กรรมวิธีที่พ่นผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) ควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ใกล้เคียงการใช้สารเคมี validamycin เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีกลไกหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Harman et al., 2004; Harman, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Tamreihao et al. (2016) รายงานว่าการใช้ผงเชื้อรา *Trichoderma* สามารถยับยั้งการเจริญของ sclerotium ได้อย่างสมบูรณ์ และยังช่วยลดการเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ เช่นเดียวกับงานทดลองของ ปัณณวิชญ์ และคณะ (2561) ที่พบว่าการใช้ผงเชื้อรา *Trichoderma* ที่ความเข้มข้น $2x10^5$ cfu ต่อมิลลิลิตร ควบคุมโรคเมล็ดด่างในสภาพโรงเรือน 14 วันหลังการฉีดพ่นสามารถลดการเกิดโรคได้ 55.84% และ Jayaprakashvel et al. (2010) พบว่า เชื้อรา *T. roseum* มีประสิทธิภาพลดโรคกาบใบแห้งในข้าวได้ถึง 47.7%

Table 3 Antagonistic efficiency of *Trichoderma asperellum* (MC2560) powder on disease severity and reduce the occurrence of sheath blight on rice plant caused by *Rhizoctonia solani* in greenhouse

Treatments	After spraying 14 days		After spraying 21 days	
	Disease severity (%)	Reduce of sheath blight (%)	Disease severity (%)	Reduce of sheath blight (%)
1) *T. asperellum* powder (20g / 20L) + inoculated with *R. solani*	5.18^{bc}	41.33	6.71^{b}	29.06
2) *T. asperellum* powder (40g / 20L) + inoculated with *R. solani*	5.12^{c}	42.01	5.93^{b}	37.31
3) *T. harzianum* (40g / 20L, commercial biopesticide) + inoculated with *R. solani*	5.56^{bc}	37.03	6.68^{b}	29.39
4) inoculated with *R. solani + T. asperellum* powder (40g / 20L)	6.26^{b}	29.10	6.87^{b}	27.37
5) inoculated with *R. solani +* validamycin (20ml / 20L)	5.73^{bc}	35.10	6.56^{b}	30.65
6) Control (inoculated with *R. solani*)	8.83^{a}	0	9.46^{a}	0
7) Control (non-inoculate)	0	100	0	100

Data followed by same letter within each column are not significantly different using ANOVA after DMRT at $P < 0.05$

สรุป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แยกได้จากดินที่เพาะปลูกไม้ผล จ.จันทบุรี พบว่าเชื้อราจัดอยู่ในกลุ่ม *T. asperellum* และการทดสอบการความสามารถการเป็นเชื้อปฏิปักษ์โดยพ่นผงเชื้อรา *T. asperellum* (MC2560) เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในโรงเรือน สามารถลดความรุนแรงโรคกาบใบแห้งของข้าวได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค และสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ใกล้เคียงกับการใช้สารเคมี validamycin

เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินทนู และสริตา ภาคพิเศษ. 2548. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ *Bacillus* sp. เพื่อเพิ่มผลผลิตของข้าว และลดโรคกาบใบแห้ง และโรคเมล็ดด่างของข้าว, น. 292–304. ใน: ประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7 เรื่องอารักขาพืชเพื่อคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อม 2-4 พฤศจิกายน 2548. โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว, เชียงใหม่.

ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2558. การจัดการโรคพืช. พิมพ์ครั้งที่ 3. เอเชีย ดิจิทัล เพลส, กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2550. การควบคุมโรคพืชโดยวิธีธรรมชาติ. บริษัทเท็กซ์เจอร์นัลพับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

บังอร น้อยใสย์, จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2561. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus siamensis* RRK1–Rif สูตรผงเปียกน้ำ ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งและโรคเมล็ดด่างและการเพิ่มผลผลิตของข้าว. แก่นเกษตร. 46: 633–642.

ปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์, ธิดา เดชฮวบ และวาริน อินทนา. 2561. การประยุกต์ใช้ร่วมกันของผงเชื้อ *Trichoderma sp*. และ *Bacillus sp*. ต่อการควบคุมโรคเมล็ดด่างที่เกิดจาก *Bipolaris oryzae* ในข้าว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 49: 15–26.

พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และสมคิด ดิสถาพร. 2544. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. วารสารวิชาการเกษตร. 19: 4–12.

วิชชุดา รัตนากาญจน์, รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์, คะนึงนิจ ศรีวิไลย และสิทธ์ ใจสงฆ์. 2554. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

Abbas, A., D. Jiang, and Y. Fu. 2017. *Trichoderma* spp. as Antagonist of *Rhizoctonia sol*ani. Journal of Plant Pathology and Microbiology. 8: 1–9.

Benítez, T., M.A. Rincon, M.C. Limon, and C.A. Codon. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7: 249–260.

Boukaew, S. and P. Prasertsak. 2014. Suppression of rice sheath blight disease using a heat stable culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RM-1–138. Crop Protection. 61: 1–10.

De Franca, S.K.S., A.F. Cardoso, D.C. Lustosa, E.M.L.S. Romos, M.C.C. De Filippi, and G.B. Da Silva. 2015. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. Agronomy for Sustainable Development. 35: 317–324.

Gupta, A.K., M. Harish, M.K. Ria, M. Phulwaria and N.S. Shekhawat. 2011. Isolation of genomic DNA suitable for community analysis from mature trees adapted to arid environment. Gene. 487: 156–159.

Harman, G.E., C. R. Howell, A., Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2: 43–56.

Harman, G. E. 2006. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96: 190–194.

Jayaprakashvel, M., M. Selvakumar, K. Srinivasan, S. Ramesh, and N. Mathivanan. 2010. Control of sheath blight disease in rice by thermostable secondary metabolites of *Trichoderma roseum* MML003. European Journal of Plant Pathology. 126: 229–239.

Manoch, L., O. Piasai, T. Dethoup, J. Kokaew, and A. Eamcijan. 2009. Control of *Rhizoctonia* diseases of rice, corn and durian using soil and endophytic fungi in *vitro,* pp. 542-547. *In* Proceedings of the 47th Kasetsart University Annual Conference 17–20 March 2009. Bangkok, Thailand.

Mousumi, D M., M. Haridas, and A. Sabu. 2019. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 17: 177–183.

Petrisor, C., A. Paica, and F. Constantinescu. 2016. Influence of abiotic factors on *in vitro* growth of *Trichoderma* strains. Proceedings of the Romanian Academy. 18: 11–14.

Rai, D., and A. K. Tewari. 2016. Shelf life studies of different formulations based on *Trichoderma harzianum* (Th14). Annals of Biological Research. 7: 1–5.

Samuels, G.J. and P.K. Hebbar. 2015. *Trichoderma* identification and Agricultural Applications. The American Phytopathological Society. APS Press. Minnesota, U.S.A.

Singh, A., M.S.M. Srivastava, S. Pandey, A. Sharma, and V. Kumar. 2014. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. Virology & Mycology. 3: 1-7.

Tamreihao, K., D.S. Ningthoujam, S. Nimaichand, E. S. Singh, P. Reena, S.H. Salam, and N. Upendra. 2016. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3–16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. Microbiological Research. 192: 260–270.

Viterbo, A., A. Wiest, Y. Brotman, I. Chet, and C. Kenerley. 2007. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. Molecular Plant Pathology. 8: 737–746.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, U.S.A.

Zehra, A., M.K. Dubey, M. Meena, and R. S. Upadhyay. 2017. Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species. Journal of Environmental Biology. 38: 197–203.