

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

- 1. แผนงานวิจัย** : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืชในประเทศไทย
- 2. โครงการวิจัย** : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย
- กิจกรรมที่ 3** : การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
- 3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* และ *T. viride*
- ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : DNA barcoding for *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* and *T. viride* identification
- 4. คณะผู้ดำเนินงาน**
 - หัวหน้าการทดลอง** : นางสาวชนินทร ดวงสอาด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - ผู้ร่วมงาน** : นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวสุณีรัตน์ สิมะเตือ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวอมรรักษ์ คัดใจเดียว สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
 - นางสาวสุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1
- 5. บทคัดย่อ**

ปัจจุบันข้อมูลและวิธีการทางชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทมากในงานอนุกรมวิธานเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยเฉพาะกรณีที่ไม่สามารถชี้ขาดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานรับผิดชอบตรวจสอบความถูกต้องของชนิดสายพันธุ์เชื้อราที่ระบุในสารชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคพืช ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ที่สามารถใช้สารชีวภัณฑ์ได้ตรงชนิด การศึกษาครั้งนี้ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* และ *T. viride* เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Trichoderma* จากตัวอย่างดิน และจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช เมื่อจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้เชื้อรา *T. asperellum* และ *T. harzianum* แต่ไม่พบเชื้อรา *T. viride* เมื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction โดยเปรียบเทียบกับ type sequence ของเชื้อรา *Trichoderma* พบว่า topology ที่ได้จากการวิเคราะห์ยีนตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) และ the translation elongation factor 1-alpha (tef1) ด้วย Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic พบว่า ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่ม *T. asperellum* เป็น

complex species สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ส่วนเชื้อราในกลุ่ม *T. harzianum* ก็พบว่าเป็น complex species สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. lentiforme* และ *T. lexii* จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไอโซเลทของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme* และ *T. lexii* รวมถึงดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง ITS และ *tef1* ของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* จะเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา

The fungal identification based on genealogical concordance has been applied to classify and identify fungal, especially in many cryptic and complex species. The DNA data of genes obtained from fungi had been analyzed for the identification and also applied as barcodes of certain species of fungi. Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture is a responsible agency to verify the fungal species in the bioproduct, which to be registered. This will benefit users of biological control products. This study was conducted during October 2017 - September 2020 in order to obtain the DNA barcodes of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* and *T. viride*. The *Trichoderma* was isolated from soil and surround roots with additional isolates selected from culture collection of Plant Pathology Research Group. The morphological characters had been observed to identify the *Trichoderma* isolates, which could be identified into two group species namely, *T. asperellum* and *T. harzianum*. Whereas *T. viride* could not be found from any isolates. To confirm the identification, the phylogenetic reconstruction using molecular data of the Internal Transcribed Spacer (ITS) and the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) compared with the type sequences of the genus *Trichoderma*. The dataset obtained from Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) presented the monophyletic and congruent topology. The results showed that *T. asperellum* isolates presented as a complex species, which comprised of *T. asperellum* and *T. asperelloides*. The isolates of *T. harzianum* also presented in *Harzianum* complex and the identity to *T. lentiforme* and *T. lexii*. The isolates of *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme* and *T. lexii* have been curated in the culture collection of Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. The ITS and *tef1* barcodes of *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* and *T. viride* were also databased for the identification

6. คำนำ

เชื้อราหลายสปีชีส์ใน 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 รวมถึงยังสามารถใช้สารอาหาร และเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (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 หรือการผสมกันของเชื้อราปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด จะส่งผลกระทบต่อผล ประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Druzhinina *et al.*, 2010) ในปัจจุบันมีหลายบริษัทมาขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ของ เชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* แต่เนื่องจากลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเชื้อราใน genus *Trichoderma* นั้นมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ยากต่อการจำแนกในระดับสปีชีส์

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 แต่เป็นความแตกต่างที่คลุมเครือ 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) แต่พบว่า การจำแนกด้วย ITS เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างรา *Trichoderma* บางสปีชีส์ได้ เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เหล่านี้มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียง

กัน มักจะมีความคล้ายคลึงหรือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น มีรายงานว่า *T. asperellum* เป็น complex species (มีมากกว่า 1 สปีชีส์ภายใต้ชื่อ *T. asperellum*) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของ conidia ไม่สามารถใช้อ้างอิง หรือเปรียบเทียบเพื่อจำแนกชนิดได้ แต่เมื่อใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) 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 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)

ในปัจจุบันการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อราได้ในระดับ genus แต่ในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ต้องมีการพิจารณาลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) มาร่วมวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้อง กลุ่มวิจัยโรคพืชเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ที่ขอขึ้นทะเบียน ดังนั้นการศึกษารูปแบบการจัดจำแนกเชื้อรา *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 รวมถึงประสิทธิภาพและความยั่งยืนในการใช้เชื้อรา *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* มาตราฐาน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทาบตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ของกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- Microcentrifuge
- Thermal cyclers
- Vortex
- Tissue Lyser
- Gel electrophoresis
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- microwave
- micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound
- กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo
- Dry heat block

3. วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ไขมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

5. สารเคมี ได้แก่

- Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
- High fidelity Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)
- Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®)
- Lithium Borate buffer (LB)
- PureDireX Genomic DNA Isolation Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit
- SERVA HiSens Stain G
- Nuclease-Free Water
- ไพร์เมอร์ ได้แก่

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ rose bengal agar (RBA)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>, Kears et al., 2012)

- วิธีการ

1. ศึกษาข้อมูลของเชื้อรา *T. 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 รวมถึงไอโซเลตที่มีการส่งเสริมโดยหน่วยงานของภาครัฐ โดยตัวอย่างของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ทั้งหมดจากการเก็บตัวอย่าง จะนำมาแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการสกัด DNA และเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยจัดเก็บใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เพื่อใช้ในการศึกษาหรือเป็นตัวอย่างอ้างอิงต่อไป

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

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

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของรบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ได้แก่ 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

ตากหรือแช่เส้นใยรวมถึง conidia ของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell *et al.*, 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) the translation elongation factor 1-alpha (tef1) และ the Large Subunit (LSU, 28S) ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เตรียม 1% agarose gel และผสม SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสมผลิตภัณฑ์ PCR 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 และบันทึกข้อมูลในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence) แต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ร่วมกับ type sequences ของแต่ละตำแหน่งได้แก่ ITS และ tef1 จากรายงานศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Trichoderma* (Samuels et al., 2009; Li et al., 2012; Chaverri et al., 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015; Robbertse et al., 2017) และตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MAFFT X (Kumar et al., 2018) ใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) เพื่อกรองส่วนที่เป็น ambiguous sequence จากนั้นจัดทำ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง ITS และ tef1 บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของรา *Trichoderma* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ ITS และ tef1 วิเคราะห์ด้วย phylogenetic criteria 2 แบบคือ

1. Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ phy และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง
2. Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ nexus วิเคราะห์โดยโปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ กำหนด 4 runs แต่ละ run ประกอบด้วย 4 chains วิเคราะห์จำนวน 10 ล้าน generations ตั้งค่า cold chain ที่ temperature 0.25 สุ่มตัวอย่าง substitution model parameters และบันทึก trees ทุก 500 generations ตรวจสอบความเชื่อมั่นของ topology ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander et al., 2008)

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษา เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ

consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างดินมาแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ รวมถึงเชื้อราจาก culture collection เมื่อศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 74 ไอโซเลท (Table 1, Figure 1) จากการจำแนกชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ การเจริญของรากับอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี ด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope พบว่าเชื้อราทั้ง 74 ไอโซเลทสามารถจำแนกเบื้องต้นได้ เชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 72 ไอโซเลท และเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท แต่ไม่พบเชื้อรา *T. viride* (Table 1)

Table 1: List of specimens observed on this study

| Voucher No. | Complex | <i>Trichoderma</i> | Sources | Locations |
|-------------|----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|
| M0008 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Tak Fha, Nakhon Sawan |
| M0009 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Ban Rai, Uthai Thani |
| M0010 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Pak Chong, Nakhon Ratchasima |
| M0011 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Na Yaiarm, Chanthaburi |
| M0013 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil | Mae Tang, Chiangmai |
| M0097 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil | Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom |
| M0098 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil | San Sai, Chiangmai |
| M0099 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil | Tha Chana, Surat Thani |
| M0100 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0101 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0102 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil | Maejo, San Sai, Chiangmai |
| M0103 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0104 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Bang Yai, Nonthaburi |
| M0105 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0106 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0107 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |

| | | | | |
|-------|----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|
| M0108 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0109 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0110 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0111 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Koh Samui, Suratthani |
| M0112 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Pak Chong, Nakhon Ratchasima |
| M0113 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Mae Saluai, Chiangrai |
| M0114 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Lad Yao, Nakhon Sawan |
| M0115 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Na Yaiarm, Chanthaburi |
| M0197 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Na Yaiarm, Chanthaburi |
| M0198 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Nakhon Sawan |

Table 1: Continued

| Voucher No. | complex | <i>Trichoderma</i> | Sources | Locations |
|-------------|----------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| M0199 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0200 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0201 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0202 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0203 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0204 | <i>T. harzianum</i> | <i>T. lentiforme</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0205 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0227 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Thamai, Chanthaburi |
| M0228 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Na Yaiarm, Chanthaburi |
| M0229 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Na Yaiarm, Chanthaburi |
| M0230 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Tha Muang, Kanchanaburi |
| M0231 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Klongnoi, Surat Thani |
| M0232 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Klongnoi, Surat Thani |
| M0233 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | <i>Citrus aurantifolia</i> | Plant Pathology Research Group |
| M0279 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0280 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0281 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0282 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0366 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | San Kam Pang, Chiangmai |
| M0367 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Doi Sa Ket, Chiangmai |
| M0427 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Mueang, Nong Khai |
| M0428 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Mueang, Nong Khai |
| M0530 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0570 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |

| | | | | |
|-------|----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|
| M0571 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Chiang Khong, Chiangrai |
| M0572 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |
| M0573 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |
| M0574 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |
| M0575 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |
| M0576 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |
| M0577 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |
| M0578 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |
| M0579 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Phaya Mengrai, Chiangrai |
| M0651 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0673 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |

Table 1: Continued

| Voucher No. | complex | <i>Trichoderma</i> | Sources | Locations |
|-------------|----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|
| M0745 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0876 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0877 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0884 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0885 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0886 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0887 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0929 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> | soil surround roots | Pichai, Uttaradit |
| M0930 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Tha Muang, Kanchanaburi |
| M0931 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Tha Yang, Petchaburi |
| M0932 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | soil surround roots | Mueang, Chanthaburi |
| M0994 | <i>T. harzianum</i> | <i>T. lixii</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |
| M0995 | <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperelloides</i> | DOA culture collection | Plant Pathology Research Group |

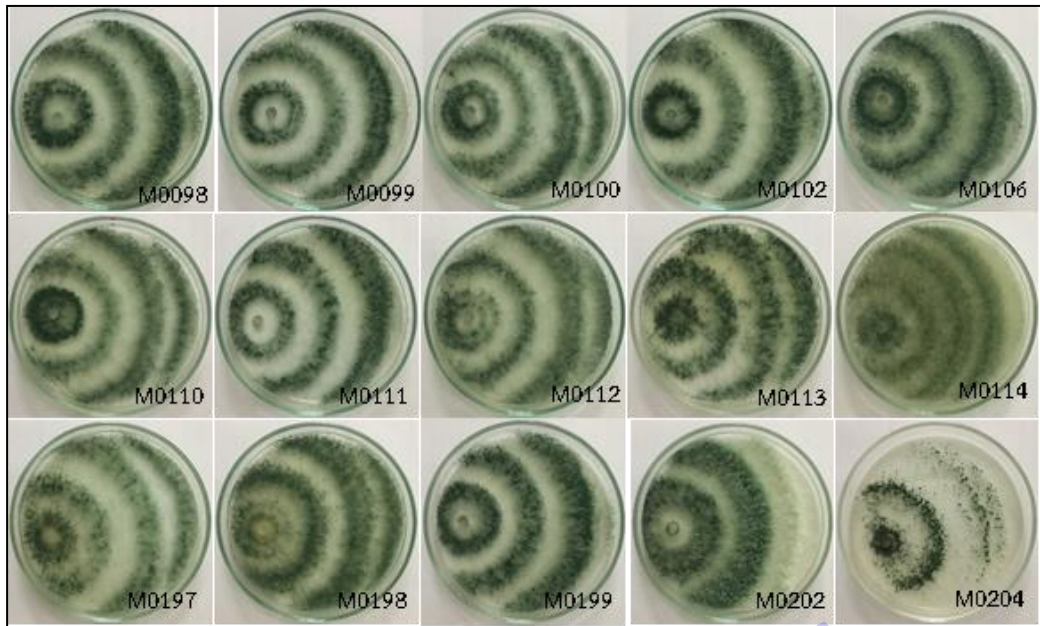


Figure 1: *Trichoderma* used in this study.

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

นำเชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 70 ไอโซเลท และเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation เมื่อเชื้อราเจริญจนมีขนาดโคโลนีประมาณ 6 เซนติเมตร จึงดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของยีนตำแหน่ง ITS, LSU และ *tef1* ด้วยไพรเมอร์ของแต่ละตำแหน่ง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และ sequencing

จัดทำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 จากนั้นจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ร่วมกับ type sequences โดยใช้ข้อมูลของยีนตำแหน่ง ITS และ *tef1* ในการวิเคราะห์เนื่องจากข้อมูลของตำแหน่ง LSU ของ type sequence มีข้อมูลจำกัด โดยข้อมูลที่ใช้มาจากรายงานศึกษานุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Trichoderma* (Samuels *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; Chaverri *et al.*, 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015; Robbertse *et al.*, 2017) (Table 2) จำแนกชนิดของรา *Trichoderma* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ ITS-*tef1* ของ 322 taxa โดยมี *Protocrea* เป็น outgroup ทำการวิเคราะห์รวม 1,814 bases/taxa มีข้อมูลของแต่ละ partition ดังนี้ ITS = 766 bases และ *tef1* = 1,048 bases

เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction พบว่า topology ที่ได้จาก ML และ BI มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic (Figure 2) โดย phylogram ที่ได้จาก ML พิจารณาค่า bootstrap support values ($\geq 70\%$) ที่วิเคราะห์จาก 1,000 ซ้ำ และ BI ได้จากค่าเฉลี่ยของ 20,000 converged trees ดังนั้นผลการจัดจำแนกด้วยข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อรากลุ่ม

T. asperellum ซึ่งมีรายงานว่าเป็น complex species (Samuels *et al.*, 2009; Jaklitsch and Voglmayr, 2015) จำนวน 72 ไอโซเลทสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 15 ไอโซเลท และจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperelloides* จำนวน 57 ไอโซเลท ซึ่งแต่ละชนิดจัดอยู่ใน clade เดียวกับ type sequences ของเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ตามลำดับ (Figure 1 และ Table 2)

ส่วนเชื้อรากลุ่ม *T. harzianum* ซึ่งมีรายงานว่าเป็น complex species (Chaverri *et al.*, 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015) จำนวน 2 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. lentiforme* (M0994) และ *T. lexii* (M0204) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเชื้อราทั้งสองชนิดเมื่อพิจารณาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *T. harzianum* จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราทั้งสองไอโซเลทสามารถจำแนกด้วยข้อมูลหรือลักษณะเดิมว่าเป็น *T. harzianum sensu lato* แต่หากพิจารณาจากการจำแนกด้วยข้อมูลเชิงลึกของข้อมูลพันธุกรรมพบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดคือ *T. lentiforme sensu stricto* และ *T. lexii sensu stricto* (Figure 2 และ Table 2) ทั้งนี้จากตัวอย่างที่ทำการศึกษาคั้งนี้ยังไม่พบไอโซเลทของเชื้อรา *T. harzianum sensu stricto* และเชื้อรา *T. viride sensu stricto*

Table 2: List of *Trichoderma* included in this study

| <i>Trichoderma</i> | Clade | Ex-type/Voucher | GenBank Number | |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|------------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>T. aeroaquaticum</i> | Viride | BCC 36135, NBRC 108034 | NR134333 | AB646530 |
| <i>T. aerugineum</i> | Green | CBS 120541 | NR134379 | FJ860608 |
| <i>T. aethiopicum</i> | Longibrachiatum | CBS 130628 | MH865819 | EU401616 |
| <i>T. afarasin</i> | Harzianum/H complex | CBS 130755 | NR137301 | AF348093 |
| | Harzianum/H complex | GJS 06-98 | FJ442630 | FJ463327 |
| <i>T. afroharzianum</i> | Harzianum/H complex | GJS 04-186, CBS 124620 | NR137304 | FJ463301 |
| <i>T. aggressivum f. aggressivum</i> | Harzianum | DAOM 222156, IMI 393971 | NR137299 | AF348098 |
| <i>T. aggressivum f. europaeum</i> | Harzianum | CBS 100526 | NR145035 | FJ467645 |
| <i>T. alni</i> | Harzianum | CBS 120623 | NR134375 | EU498312 |
| <i>T. alutaceum</i> | Polysporum | CBS 120535 | NR134382 | FJ179567 |
| <i>T. americanum</i> | Hypocreanum | GJS 96-191 | DQ835411 | DQ835435 |
| <i>T. andinense</i> | Longibrachiatum | CBS 345.97, GJS 90-140 | MH549084 | AY956321 |
| <i>T. appalachense</i> | Viride | GJS 97-243, CBS 133558 | NR134340 | DQ307502 |
| <i>T. applanatum</i> | Hypocreanum | CGMCC 3.17526, 7792 | KJ783291 | KJ634759 |
| <i>T. arundinaceum</i> | Brevicompectum | CBS 119575, ATCC 90237 | DQ080074 | EU338291 |
| <i>T. asperelloides</i> | Viride | CBS 125938, GJS 04-116 (pT) | GU198301 | GU248412 |
| | Viride | M0008 | this study | this study |
| | Viride | M0009 | this study | this study |
| | Viride | M0010 | this study | this study |
| | Viride | M0011 | this study | this study |
| | Viride | M0013 | this study | this study |

| | | | |
|--------|-------|------------|------------|
| Viride | M0097 | this study | this study |
| Viride | M0098 | this study | this study |
| Viride | M0099 | this study | this study |
| Viride | M0100 | this study | this study |
| Viride | M0101 | this study | this study |
| Viride | M0102 | this study | this study |
| Viride | M0103 | this study | this study |
| Viride | M0104 | this study | this study |
| Viride | M0105 | this study | this study |
| Viride | M0106 | this study | this study |
| Viride | M0107 | this study | this study |
| Viride | M0108 | this study | this study |
| Viride | M0109 | this study | this study |
| Viride | M0110 | this study | this study |
| Viride | M0111 | this study | this study |
| Viride | M0112 | this study | this study |
| Viride | M0113 | this study | this study |
| Viride | M0114 | this study | this study |
| Viride | M0115 | this study | this study |
| Viride | M0197 | this study | this study |
| Viride | M0198 | this study | this study |

Table 2: Continued

| <i>Trichoderma</i> | Clade | Ex-type/Voucher | GenBank Number | |
|-------------------------|--------|-----------------|----------------|------------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>T. asperelloides</i> | Viride | M0199 | this study | this study |
| | Viride | M0200 | this study | this study |
| | Viride | M0201 | this study | this study |
| | Viride | M0202 | this study | this study |
| | Viride | M0203 | this study | this study |
| | Viride | M0205 | this study | this study |
| | Viride | M0230 | this study | this study |
| | Viride | M0232 | this study | this study |
| | Viride | M0233 | this study | this study |
| | Viride | M0279 | this study | this study |
| | Viride | M0280 | this study | this study |
| | Viride | M0281 | this study | this study |
| | Viride | M0282 | this study | this study |
| | Viride | M0366 | this study | this study |
| | Viride | M0367 | this study | this study |
| | Viride | M0427 | this study | this study |
| | Viride | M0428 | this study | this study |
| | Viride | M0530 | this study | this study |
| | Viride | M0570 | this study | this study |

| | | | | |
|----------------------|--------|-------------------------|------------|------------|
| | Viride | M0571 | this study | this study |
| | Viride | M0574 | this study | this study |
| | Viride | M0576 | this study | this study |
| | Viride | M0673 | this study | this study |
| | Viride | M0745 | this study | this study |
| | Viride | M0884 | this study | this study |
| | Viride | M0887 | this study | this study |
| | Viride | M0930 | this study | this study |
| | Viride | M0931 | this study | this study |
| | Viride | M0932 | this study | this study |
| | Viride | M0995 | this study | this study |
| <i>T. asperellum</i> | Viride | CBS 433.97, ATCC 204424 | AY380912 | AF456907 |
| | Viride | CGMCC 6422 | KF425754 | KF425756 |
| | Viride | M0227 | this study | this study |
| | Viride | M0228 | this study | this study |
| | Viride | M0229 | this study | this study |
| | Viride | M0231 | this study | this study |
| | Viride | M0572 | this study | this study |
| | Viride | M0573 | this study | this study |
| | Viride | M0575 | this study | this study |
| | Viride | M0577 | this study | this study |
| | Viride | M0578 | this study | this study |
| | Viride | M0579 | this study | this study |

Table 2: Continued

| <i>Trichoderma</i> | Clade | Ex-type/Voucher | GenBank Number | |
|---------------------------|---------------------|----------------------------|----------------|------------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>T. asperellum</i> | Viride | M0876 | this study | this study |
| | Viride | M0877 | this study | this study |
| | Viride | M0885 | this study | this study |
| | Viride | M0929 | this study | this study |
| <i>T. atlanticum</i> | Polysporum | CBS 120632 | NR134397 | FJ860649 |
| <i>T. atrobrunneum</i> | Harzianum/H complex | GJS 92-110, CBS 548.92 | NR137298 | AF443942 |
| <i>T. atrogelatinosum</i> | Harzianum | CBS 237.63 | AF400751 | KJ871083 |
| <i>T. atroviride</i> | Viride | CBS 142.95 | MH862505 | AF456887 |
| <i>T. auranteffusum</i> | Brevicompectum | CBS 119284 | NR134383 | FJ860613 |
| <i>T. aureoviride</i> | Green | CBS 120536, C.P.K. 2848 | NR144877 | - |
| | Green | CBS 245.63 | MH858276 | AF534575 |
| <i>T. austriacum</i> | Hypocreanum | CBS 122494 | NR134384 | FJ860619 |
| <i>T. austrokonigii</i> | Viride | CBS 119092, BPI GJS 99-146 | NR134364 | DQ307561 |
| <i>T. avellaneum</i> | Basal | CBS 121667, CTR 77-155 | DQ020000 | AY225857 |
| <i>T. balearicum</i> | Psychrophilum | CBS 133222, S402, WU 33371 | - | KJ665434 |
| <i>T. bannaense</i> | Harzianum/H complex | HMAS 248840 | NR154570 | KY688037 |
| <i>T. barbatum</i> | Stromaticum | CBS 125733, BPI GJS 04-308 | NR134430 | HQ342223 |

| | | | | |
|---|---------------------|---|----------|----------|
| <i>T. bavaricum</i> | Polysporum | CBS 120538 | NR134385 | FJ860620 |
| <i>T. bissettii</i> | Longibrachiatum | CBS 137447, UTHSC 08-2443 | NR134442 | HG931266 |
| <i>T. brevicompactum</i> | Brevicompactum | CBS 109720, GJS 04-381 | DQ000635 | EU338299 |
| <i>T. britannicum</i> | Green | CBS 253.62, SB1 | NR160088 | KF134796 |
| <i>T. britdanaiae</i> | Longibrachiatum | WU 31610 | NR138454 | JQ685865 |
| <i>T. brunneoviride</i> | Harzianum | CBS 121130 | NR134376 | EU498316 |
| <i>T. caeruleascens</i> | Viride | CBS 130011, S195 | NR134432 | JN715621 |
| <i>T. caesareum</i> | Stromaticum | CBS 124369, BPI GJS 01-225 | NR134427 | HQ342216 |
| <i>T. calamagrostidis</i> | Psychrophilum | CBS 121133 | NR134386 | FJ860622 |
| <i>T. camerunense</i> | Harzianum/H complex | GJS 99-230, CBS 138272 | NR137300 | AF348107 |
| <i>T. capillare</i> | Longibrachiatum | CBS 130629 | - | JN182283 |
| | Longibrachiatum | SFC 101151 | MF185967 | MF185944 |
| <i>T. caribbaeum</i> var. <i>caribbaeum</i> | Viride | GJS 97-3, CBS 119093 | NR166015 | DQ284977 |
| <i>T. caribbaeum</i> var. <i>aequatoriale</i> | Viride | DIS 320c, CBS 119055 | DQ323436 | DQ289010 |
| <i>T. catoptron</i> | Harzianum | BPI 843645, CBS 114232 | NR134348 | AY737726 |
| <i>T. ceciliae</i> | Lone lineage | CBS 130010 | NR160253 | KJ665444 |
| <i>T. ceraceum</i> | Green | CBS 114245, DAOM 232831, ATCC MYA-3222, GJS 95-159 | EU330953 | AY937437 |
| <i>T. ceramicum</i> | Harzianum | GJS 88-70, CBS 114576 | NR134388 | FJ860628 |
| <i>T. cerebriforme</i> comb. nov | Viride | GJS85-245, CBS 139045 | NR134447 | KP109824 |
| <i>T. cerinum</i> | Harzianum | DAOM 230012 | NR111835 | AY605802 |
| <i>T. chlamydosporicum</i> | Green | HMAS 248850 | NR154577 | KY688052 |
| <i>T. chlorosporum</i> | Green | GJS 88-33, CBS 114231 | MH862958 | KJ871143 |
| <i>T. christiani</i> | Harzianum | CBS 132572 | - | KJ665438 |
| <i>T. chromospermum</i> | Green | CBS 114577, BPI 749362 | NR138432 | AY391974 |
| <i>T. cinnamomeum</i> | Harzianum | CBS 114235, BPI 745554 | NR144871 | KJ871252 |

Table 2: Continued

| <i>Trichoderma</i> | Clade | Ex-type/Voucher | GenBank Number | |
|--------------------------|-----------------|-------------------------|----------------|----------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>T. citrinoviride</i> | Longibrachiatum | DAOM 172792 | NR077178 | AY865637 |
| <i>T. citrinum</i> | Hypocreanum | CBS 894.85 | NR134368 | DQ835481 |
| <i>T. compactum</i> | Harzianum | CBS 121218 | NR138435 | KF134798 |
| <i>T. composticola</i> | Viride | CBS 133497 | - | KC285631 |
| | Viride | CBS 439.95 | DQ315439 | AY937413 |
| <i>T. costaricense</i> | Green | P.C. 21, INB 0003527695 | NR134345 | AY391980 |
| <i>T. crassum</i> | Green | DAOM 164916, CBS 336.93 | NR134370 | EU280048 |
| <i>T. cremeoides</i> | Green | CBS 131486, WU 33300 | - | KJ665456 |
| <i>T. cremeum</i> | Green | GJS 91-125, CBS 111146 | AY737760 | AY737736 |
| <i>T. croceum</i> | Polysporum | DAOM 167068, CBS 337.93 | DQ083026 | AY750879 |
| <i>T. crystalligenum</i> | Psychrophilum | CBS 118980 | NR134365 | DQ345342 |
| <i>T. dacrymycellum</i> | Harzianum | WU 29042, WU 29044 | FJ860749 | FJ860633 |
| <i>T. danicum</i> | Green | CBS 121273 | NR134389 | FJ860634 |
| <i>T. delicatulum</i> | Basal | CBS 120631 | FJ860751 | FJ860636 |

| | | | | |
|-------------------------|---------------------|------------------------------------|----------|----------|
| <i>T. deliquescens</i> | Deliquescens | CBS 121131 | NR134394 | FJ860644 |
| <i>T. dingleyae</i> | Viride | CBS 119056 | NR138443 | AF348117 |
| <i>T. dorotheae</i> | Viride | GJS 99-202, CBS 119089 | NR166014 | DQ307536 |
| <i>T. effusum</i> | Longibrachiatum | DAOM 230007 | DQ083008 | AY937419 |
| <i>T. eiji</i> | Viride | TUFC 100002, CBS 133190 | NR144879 | JX684011 |
| <i>T. endophyticum</i> | Harzianum/H complex | CBS 130729, DIS 217a | FJ442243 | FJ463319 |
| <i>T. epimyces</i> | Harzianum | CBS 120524 | NR134377 | EU498320 |
| <i>T. estonicum</i> | Green | GJS 96-129, CBS 111147 | AY737767 | AY737733 |
| <i>T. europaeum</i> | Polysporum | CBS 121276, WU 29250 | - | FJ179574 |
| <i>T. euskadiense</i> | Longibrachiatum | CBS 130013 | NR160254 | KJ665492 |
| <i>T. evansii</i> | Viride | CBS 123079, DIS 341HI | NR138449 | EU883566 |
| <i>T. fertile</i> | Semiorbis | DAOM 167161 | NR134336 | AY605801 |
| <i>T. flagellatum</i> | Longibrachiatum | CBS 130626 | MH865822 | FJ763149 |
| <i>T. flaviconidium</i> | Viride | Lost, GJS 99-51 | DQ023301 | AY665710 |
| <i>T. flavofuscum</i> | Green | CBS 248.59 | AF398492 | AF401020 |
| <i>T. floccosum</i> | Stromaticum | GJS 01-238, CBS 124372 | NR137306 | HQ342218 |
| <i>T. foliicola</i> | Polysporum | CBS 130008 | NR134434 | JQ685862 |
| <i>T. fomiticola</i> | Semiorbis | CBS 121136 | NR134391 | FJ860639 |
| <i>T. gamsii</i> | Viride | GJS 04-09, BPI 872183 | NR131317 | DQ307541 |
| <i>T. ghanense</i> | Longibrachiatum | ATCC 208858, IAM 13109 | NR120299 | AY937423 |
| <i>T. gillesii</i> | Longibrachiatum | CBS 130435 | - | JN175583 |
| <i>T. gliocladium</i> | Green | CBS 130009 | NR160252 | KJ665502 |
| <i>T. gracile</i> | Longibrachiatum | CBS 130714, GJS 10-263, BPI 882295 | - | JN175598 |
| <i>T. guizhouense</i> | Harzianum/H complex | HGUP 0038, CBS 131803 | JN191311 | JN215484 |
| <i>T. hainanense</i> | Green | HMAS 248837, CGMCC 3.18392 | NR154568 | KY688033 |
| <i>T. hamatum</i> | Viride | DAOM 167057 | NR134371 | AF456911 |
| <i>T. harzianum</i> | Harzianum/H complex | CBS 226.95 | AF057606 | AF348101 |
| | Harzianum/H complex | GJS 05-107 | FJ442679 | FJ463329 |

Table 2: Continued

| <i>Trichoderma</i> | Clade | Ex-type/Voucher | GenBank Number | |
|------------------------|---------------------|----------------------------|----------------|-----------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>T. hausknechtii</i> | Harzianum | CBS 133493 | - | KJ665515 |
| <i>T. hebeiense</i> | Stromaticum | HMAS 248743 | NR153278 | KX344434 |
| <i>T. helicelixii</i> | Green | CBS 133499 | - | KJ665517 |
| <i>T. helicum</i> | Helicum | ATCC MYA-4845 | NR153213 | EU280055 |
| <i>T. hispanicum</i> | Viride | CBS 130540, S453 | NR138451 | JN1715659 |
| <i>T. hunua</i> | Semiorbis | CBS 238.63 | NR160091 | KJ665519 |
| <i>T. hunanense</i> | Green | HMAS 248841, CGMCC 3.18395 | NR154571 | KY688039 |
| <i>T. inhamatum</i> | Harzianum/H complex | CBS 273.78 | NR134378 | AF348099 |
| <i>T. intricatum</i> | Viride | GJS 97-88, CBS 119059 | NR134343 | AY376060 |
| <i>T. istriatum</i> | Viride | CBS 130539 | - | KJ665522 |
| <i>T. italicum</i> | Harzianum | CBS 132567 | - | KJ665525 |

| | | | | |
|-----------------------------|----------------------|----------------------------|------------|------------|
| <i>T. ivoriense</i> | Stromaticum | CBS 125734 | NR134428 | HQ342217 |
| <i>T. junci</i> | Viride | CBS 120926 | NR134392 | FJ860641 |
| <i>T. konilangbra</i> | Longibrachiatum | GJS 96-145, CBS 100808 | MH862712 | JN258681 |
| <i>T. koningii</i> | Viride | CBS 457.96, ATCC 64262 | NR138456 | AY376046 |
| | Viride | GJS 90-18 | DQ323409 | DQ289007 |
| <i>T. koningiopsis</i> | Viride | CBS 119075 | NR131281 | AF456910 |
| <i>T. kunigamense</i> | Longibrachiatum | TAMA 0193, NBRC 109640 | NR134334 | AB807645 |
| <i>T. lacuwombatense</i> | Polysporum | CBS 122668, GJS 99-198 | NR134356 | KJ665547 |
| <i>T. lanuginosum</i> | Stromaticum | CBS 125718, GJS 01-176 | NR134429 | HQ342221 |
| <i>T. leguminosarum</i> | aff. Longibrachiatum | CBS 130014 | - | KJ665551 |
| <i>T. lentiforme</i> | Harzianum/H complex | GJS 98-6, CBS 100542 | NR144868 | AF469195 |
| | Harzianum/H complex | M0204 | this study | this study |
| <i>T. leucopus</i> | Polysporum | CBS 122499 | NR134393 | FJ179571 |
| <i>T. lieckfeldtia</i> | Viride | CBS 123049 | NR138438 | EU856326 |
| <i>T. lixii</i> | Harzianum/H complex | CBS 110080, ATCC MYA-2478 | NR131264 | AF443938 |
| | Harzianum/H complex | M0994 | this study | this study |
| <i>T. longibrachiatum</i> | Longibrachiatum | CBS 816.68, ATCC 18648 | NR120298 | AY865640 |
| <i>T. longipile</i> | Green | DAOM 177227-1a | NR134354 | AF534622 |
| <i>T. longisporum</i> | Green | HMAS 248843, CGMCC 3.18397 | NR154573 | KY688043 |
| <i>T. luteffusum</i> | Polysporum | CBS 120537 | NR134395 | FJ860645 |
| <i>T. luteocrystallinum</i> | Deliquescens | CBS 123828 | NR134396 | FJ860646 |
| <i>T. margaretense</i> | Brevicom pactum | CBS 120540 | NR134387 | FJ860625 |
| <i>T. martiale</i> | Viride | CBS 123052, GJS 04-40 | NR134363 | EU248618 |
| <i>T. mediterraneum</i> | Polysporum | CBS 136459 | - | KJ665568 |
| <i>T. medusae</i> | Stromaticum | CBS 125719, BPI GJS 01-171 | NR134426 | HQ342214 |
| <i>T. megalocitrinum</i> | Psychrophilum | B.E.O. 00-09 | DQ835511 | AY225855 |
| <i>T. melanomagnum</i> | Deliquescens | GJS 99-153, BPI 843663 | NR134351 | AY737751 |
| <i>T. microcitrinum</i> | Hypocreanum | BPI 1112833 | NR138445 | DQ835449 |
| <i>T. mienum</i> | Semiorbis | TUFC 61533, CBS 132690 | NR134433 | JQ621978 |
| <i>T. minutisporum</i> | Polysporum | DAOM 167069 | NR111192 | KJ665612 |
| <i>T. moravicum</i> | Semiorbis | CBS 120539 | NR134398 | FJ860651 |

Table 2: Continued

| <i>Trichoderma</i> | Clade | Ex-type/Voucher | GenBank Number | |
|---------------------------|---------------------|--------------------------|----------------|----------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>T. neocrassum</i> | Green | CBS 114230, GJS 01-227 | - | JN133572 |
| <i>T. neokoningii</i> | Viride | CBS 120070 | NR138446 | KJ665620 |
| <i>T. neorufoides</i> | Viride | CBS 119506 | NR134399 | FJ860553 |
| <i>T. neorufum</i> | Viride | CBS 111144 | NR077132 | FJ860653 |
| <i>T. neosinense</i> | Viride | CBS 134884, GJS 94-11 | NR134362 | KJ665624 |
| <i>T. neotropiale</i> | Harzianum/H complex | GJS 11-185, CBS 130633 | MH865818 | FJ967803 |
| <i>T. nothescens</i> | Viride | CBS 134882 | NR138440 | DQ307512 |
| <i>T. novae-zelandiae</i> | Longibrachiatum | CBS 639.92, G.J.S 81-265 | NR111193 | AY865639 |
| <i>T. nybergianum</i> | Polysporum | CBS 122500 | NR134400 | FJ179575 |

| | | | | |
|---------------------------|-----------------|----------------------------|----------|----------|
| <i>T. oblongisporum</i> | Semiorbis | DAOM 176226, CBS 343.93 | MH862412 | AY750884 |
| <i>T. ochroleucum</i> | Viride | CBS 119502 | NR134401 | FJ860659 |
| <i>T. olivascens</i> | Viride | CBS 132574, CBS 119322 | DQ677650 | KC285624 |
| <i>T. orientale</i> | Longibrachiatum | CBS 130428, GJS 88-81 | NR111317 | EU401581 |
| <i>T. oligosporum</i> | Psychrophilum | HMAS 245079, CGMCC 3.17527 | NR134444 | KJ634764 |
| <i>T. ovalisporum</i> | Viride | CBS 133299 | NR134342 | AY376037 |
| <i>T. pachypallidum</i> | Polysporum | CBS 122126 | NR134402 | FJ860662 |
| <i>T. parapiluliferum</i> | Polysporum | CBS 112771, BPI GJS 91-60 | NR134341 | FJ179578 |
| <i>T. parareesei</i> | Longibrachiatum | CBS 125925 | MH863773 | GQ354353 |
| <i>T. pararogersonii</i> | Viride | CBS 133496 | - | KJ665625 |
| | Viride | CTCCSJ-F-KZ40688 | KY750455 | KY978633 |
| <i>T. paratroviride</i> | Viride | CBS 136489 | - | KJ665627 |
| | Viride | CS107-5 | KT153590 | KT153586 |
| <i>T. paraviridescens</i> | Viride | CBS 119321 | NR134367 | DQ672610 |
| <i>T. parepimyces</i> | Harzianum | CBS 122769 | NR134403 | FJ860664 |
| <i>T. parestonicum</i> | Green | CBS 120636 | NR134404 | FJ860666 |
| <i>T. patella</i> | Longibrachiatum | CBS 110081, BPI GJS 91-141 | NR134338 | AY937427 |
| <i>T. paucisporum</i> | Viride | CBS 118645, BPI GJS 01-13 | NR134360 | DQ109540 |
| <i>T. peltatum</i> | Psychrophilum | BPI GJS08-207 | NR134422 | EF392731 |
| <i>T. petersenii</i> | Viride | CBS 119051 | NR138442 | DQ284979 |
| <i>T. pezizoides</i> | Viride | CBS 115283 | NR138436 | AY225859 |
| <i>T. phellinicola</i> | Hypocreanum | CBS 119283 | NR134406 | FJ860672 |
| <i>T. phyllostachydis</i> | Green | CBS 114071 | NR103608 | FJ860673 |
| <i>T. piluliferum</i> | Polysporum | CBS 120927 | NR134407 | FJ860674 |
| <i>T. pinnatum</i> | Longibrachiatum | CBS 131292, GJS 04-100 | - | JN175571 |
| <i>T. placentula</i> | Polysporum | CBS 120924 | NR134408 | FJ179580 |
| <i>T. pleuroti</i> | Harzianum | CBS 124387 | NR134421 | HM142382 |
| <i>T. pleurotica</i> | Harzianum | CBS 124383 | NR134420 | HM142381 |
| <i>T. polysporum</i> | Polysporum | CBS 820.68 | NR134448 | AY605810 |
| <i>T. poronioideum</i> | Polysporum | CBS 139046, BPI GJS 01-203 | NR134446 | KP109823 |
| <i>T. protopulvinatum</i> | Hypocreanum | CBS 739.83 | NR134409 | FJ860679 |
| <i>T. protrudens</i> | Brevicompectum | CBS 121320 | NR134373 | - |
| <i>T. pseudocandidum</i> | Green | BPI 843652, PC59 | AY737757 | AY737742 |

Table 2: Continued

| <i>Trichoderma</i> | Clade | Ex-type/Voucher | GenBank Number | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------|----------------|----------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>T. pseudogelatinosum</i> | Harzianum | TUFC 60186, CNUN309 | NR144878 | HM920202 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | Longibrachiatum | CBS 408.91 | NR120296 | AF400986 |
| <i>T. pseudolacteum</i> | Lone lineage | TMI 8484, CBS 133191 | NR134436 | JX238493 |
| <i>T. pseudonigrovirens</i> | Green | GJS 99-64, BPI 842416 | AY737777 | AF534582 |
| <i>T. pseudostramineum</i> | Hypocreanum | TUFC 60104, CNUN334 | HM769758 | HM920206 |
| <i>T. psychrophilum</i> | Psychrophilum | CBS 119129, Hy8 | JN133558 | AY737752 |
| <i>T. pubescens</i> | Viride | DAOM 166162 | NR077179 | AY750887 |

| | | | | |
|----------------------------|---------------------|---------------------------|----------|----------|
| <i>T. pyramidale</i> | Harzianum/H complex | CBS 135574 | - | KJ665699 |
| | Harzianum/H complex | SFC101249 | MF185991 | MF185943 |
| <i>T. reesei</i> | Longibrachiatum | QM 6a, CBS 383.79 | NR120297 | AF401004 |
| <i>T. rifaai</i> | Harzianum/H complex | DIS 355b, CBS 130746 | NR137305 | FJ463324 |
| <i>T. rossicum</i> | Stromaticum | DAOM 230011 | HQ342419 | AY937441 |
| <i>T. rosulatum</i> | Green | HMAS 252548 | NR134438 | KF729984 |
| <i>T. rubi</i> | Lone lineage | CBS 127380, WU 33316 | - | KJ665704 |
| <i>T. rufobrunneum</i> | Harzianum | HMAS 252547 | NR134439 | KF729992 |
| <i>T. samuelsii</i> | Viride | CBS 130537, S5 | NR138452 | JN715651 |
| <i>T. saturnisporopsis</i> | Longibrachiatum | CBS 128829 | NR138455 | JQ685869 |
| <i>T. saturnisporum</i> | Longibrachiatum | CBS 330.70, ATCC 18903 | NR103704 | EU280044 |
| <i>T. scalesiae</i> | Viride | CBS 120069 | NR144876 | DQ841726 |
| <i>T. sempervirentis</i> | Viride | CBS 133498, S599 | - | KC285755 |
| <i>T. seppoi</i> | Polysporum | C.P.K. 3161, CBS 122498 | NR134413 | FJ179581 |
| <i>T. silvae-virgineae</i> | Green | CBS 120922 | NR134414 | FJ860696 |
| <i>T. simmonsii</i> | Harzianum/H complex | GJS 91-138, CBS 130431 | NR137297 | AF443935 |
| <i>T. sinense</i> | Longibrachiatum | DAOM 230000 | NR134425 | AY750889 |
| <i>T. sinoluteum</i> | Polysporum | HMAS 252868 | NR134445 | KJ634777 |
| <i>T. sinuosum</i> | Green | CBS 114247 | NR144872 | AY737743 |
| <i>T. solani</i> | Longibrachiatum | CBS 130506, GJS 08-81 | - | JN175597 |
| <i>T. solum</i> | Harzianum | HMAS 248848 | NR154576 | KY688050 |
| <i>T. spinulosum</i> | Green | CBS 310.50, CBS 311.50 | NR134415 | FJ860701 |
| <i>T. spirale</i> | Green | DAOM 183974 | NR077177 | EU280049 |
| <i>T. stercorarium</i> | Hypocreanum | CBS 148.85, ATCC 62321 | NR134355 | FJ860607 |
| <i>T. stilbohypoxyli</i> | Viride | CBS 992.97, ATCC MYA 2970 | NR134361 | DQ109546 |
| <i>T. stipitatum</i> | Green | HMAS 266613 | NR134440 | KF729991 |
| <i>T. stramineum</i> | Harzianum | GJS 02-84, CBS 114248 | NR134347 | AY737746 |
| <i>T. strictipile</i> | Green | DAOM 172827, CBS 347.93 | NR134337 | AY865644 |
| <i>T. strigosellum</i> | Viride | CBS 102817, C.P.K. 3604 | NR134437 | EU248631 |
| <i>T. strigosum</i> | Viride | DAOM 1661214, CBS 348.93 | NR103571 | AY376057 |
| <i>T. stromaticum</i> | Stromaticum | CBS 101875, GJS 97-183 | NR077128 | AY937418 |
| <i>T. subalpinum</i> | Lone lineage | CBS 119128 | - | FJ860705 |
| <i>T. subeffusum</i> | Viride | CBS 120929 | NR134416 | FJ860707 |
| <i>T. surrotundum</i> | Green | GJS 88-73, CBS 111145 | NR134350 | AF534594 |
| <i>T. taiwanense</i> | Viride | GJS 95-93, CBS 119058 | NR144874 | DQ284973 |

Table 2: Continued

| <i>Trichoderma</i> | Clade | Ex-type/Voucher | GenBank Number | |
|--------------------------|--------------|------------------------|----------------|----------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>T. tawa</i> | Harzianum | GJS 97-174, CBS 114233 | NR138430 | FJ463313 |
| <i>T. taxi</i> | Lone lineage | ZJUF0986, CGMCC 1672 | NR134366 | DQ859029 |
| <i>T. texanum</i> | Viride | CBS 139784, LESF551 | NR137308 | KT278988 |
| <i>T. thailandicum</i> | Green | GJS 97-61, BPI 745832 | NR163514 | AY737748 |
| <i>T. thelephoricola</i> | Green | GJS 95-135, BPI 737702 | NR134352 | AY737735 |

| | | | | |
|----------------------------|----------------------|--------------------------|----------|----------|
| <i>T. theobromicola</i> | Viride | DIS 85f, CBS 119120 | NR134359 | EU856321 |
| <i>T. tomentosum</i> | Harzianum | CBS 349.93, DAOM 178713a | MH862417 | AY750882 |
| <i>T. tremelloides</i> | aff. Longibrachiatum | CBS 121140 | NR134417 | FJ860714 |
| <i>T. trixiae</i> | Viride | CBS 134702 | NR138444 | DQ307526 |
| <i>T. tropicosinense</i> | Green | HMAS 244983 | NR134441 | KF923286 |
| <i>T. tsugarens</i> | Longibrachiatum | TAMA 0203, NBRC 109641 | NR134335 | AB807647 |
| <i>T. turrialbense</i> | Brevicompectum | CBS 112445 | NR138448 | EU338284 |
| <i>T. valdunense</i> | Viride | CBS 120923 | NR134418 | FJ860717 |
| <i>T. velutinum</i> | Harzianum | DAOM 230013, TUB F-784 | - | AF510444 |
| <i>T. vermipilum</i> | Stromaticum | PPRI 3359, CBS 127103 | AF400268 | HQ342219 |
| <i>T. vinosum</i> | Viride | GJS 99-158, CBS 119087 | NR144870 | AY376047 |
| <i>T. virens</i> | Green | CBS 249.59, ATCC 13213 | MH857855 | AY750891 |
| <i>T. virescentiflavum</i> | Green | PC 278 | NR134349 | AY737749 |
| <i>T. viridarium</i> | Viride | CBS 132568, CBS 120065 | NR138439 | KC285658 |
| <i>T. viride</i> | Viride | CBS 119325 | NR138441 | DQ672615 |
| <i>T. viridescens</i> | Viride | CBS 433.34 | NR138429 | AF456905 |
| <i>T. viridialbum</i> | Viride | CBS 133495, S177 | - | KC285705 |
| <i>T. virilente</i> | Viride | CBS 132569, DAOM 234234 | NR138447 | KJ665772 |
| <i>T. voglmayrii</i> | Lone lineage | CBS 117711 | NR134358 | DQ086146 |
| <i>T. yunnanense</i> | Viride | CBS 121219 | NR134419 | GU198243 |
| <i>T. yunnanense</i> | Viride | YMF1.01694 | AY941823 | AY941825 |
| <i>Protocrea pallida</i> | - | CBS 299.78 | NR111329 | EU703900 |
| <i>Protocrea farinosa</i> | - | CBS 121551 | NR119700 | EU703889 |

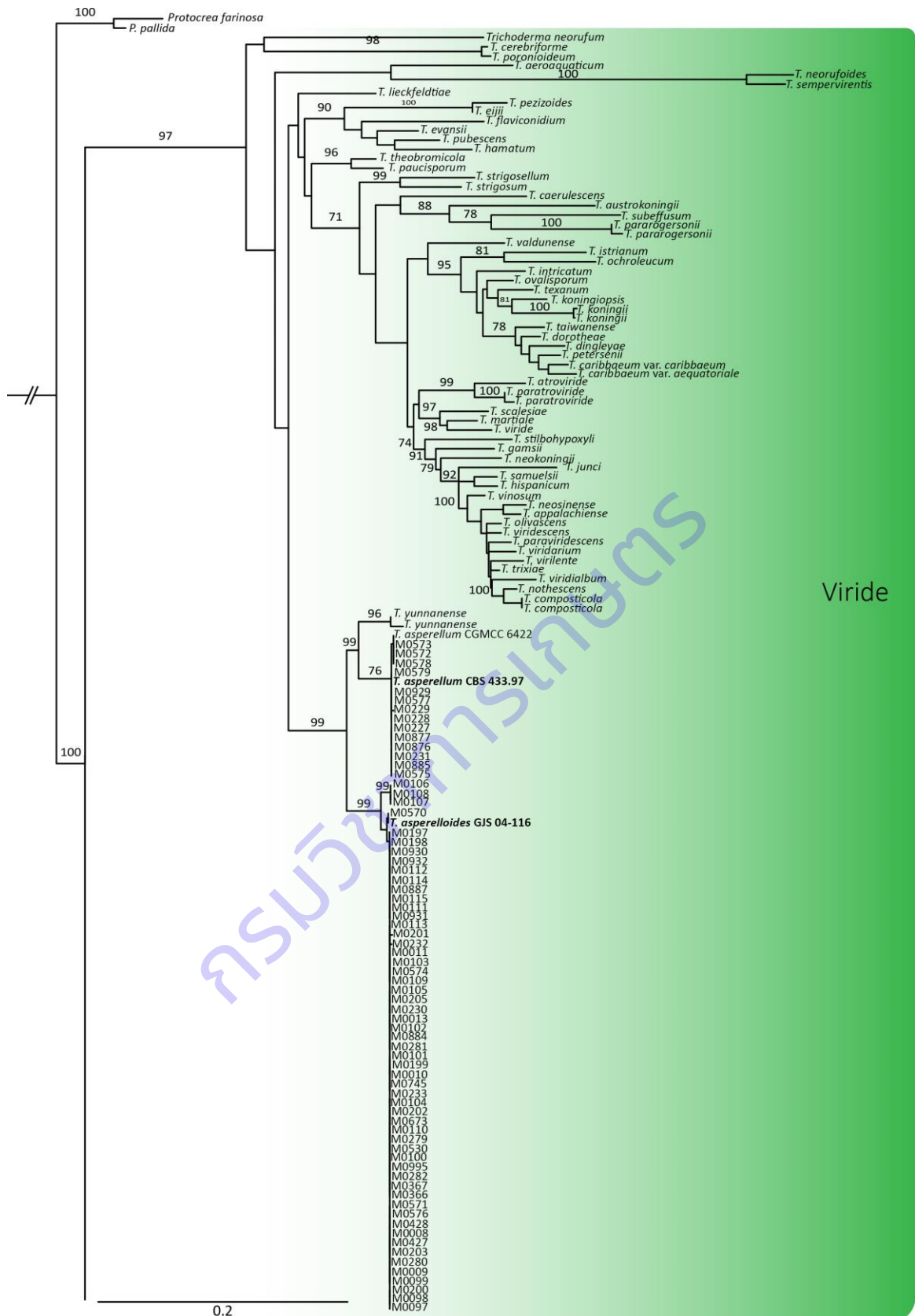


Figure 2: Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAXML of dataset of ITS and *tef1* gene regions. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates above nodes.

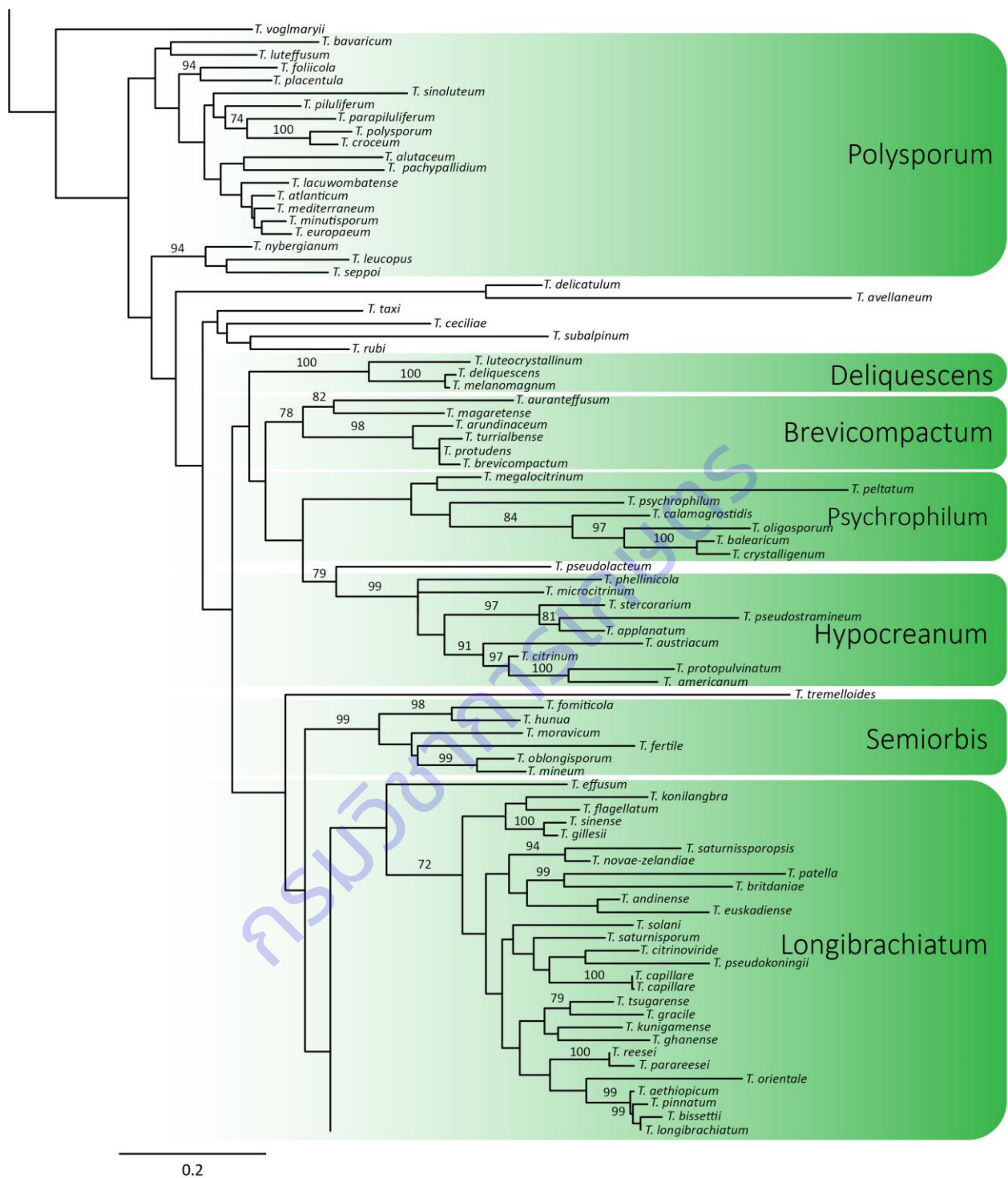


Figure 2: Continued

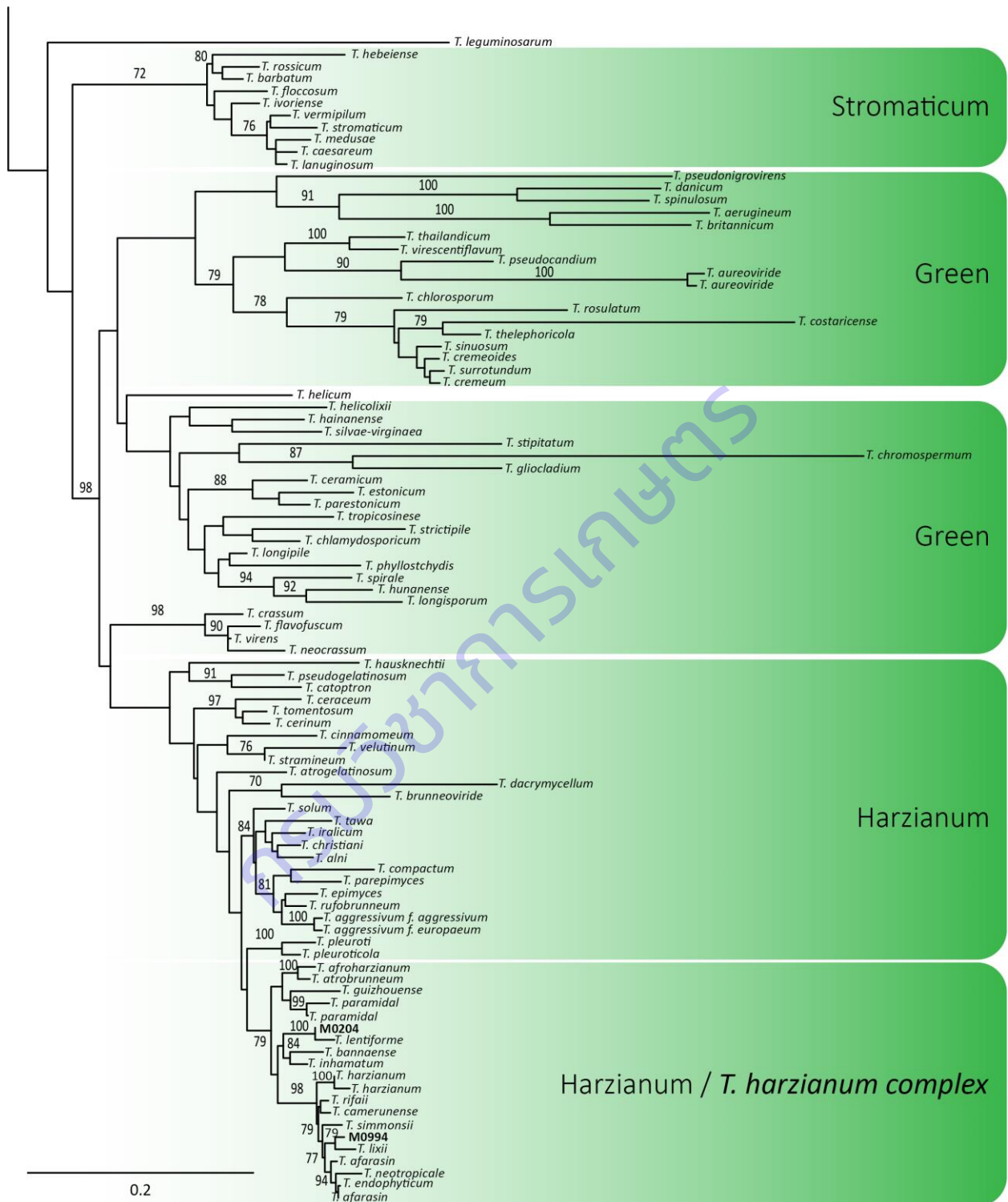


Figure 2: Continued

อนุกรมวิธานและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Trichoderma* มีดังนี้

Harzianum Clade

Trichoderma lentiforme (Rehm) P. Chaverri, Samuels & F.B. Rocha, Mycologia 107 (3): 577 (2015)

Synonymy:

≡ *Hypocrea lentiformis* Rehm, Hedwigia 37: 193 (1898)

Classification

| | |
|-----------|--------------------------|
| Kingdom | <i>Fungi</i> |
| Phylum | <i>Ascomycota</i> |
| Subphylum | <i>Pezizomycotina</i> |
| Class | <i>Sordariomycetes</i> |
| Subclass | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| Order | <i>Hypocreales</i> |
| Family | <i>Hypocreaceae</i> |
| Genus | <i>Trichoderma</i> |
| Species | <i>lentiforme</i> |

Optimum Growth Temperature 25-30 °C

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียว (Figure 3) เป็นวงชั้น ๆ 1-2 วง บางครั้งพบสปอร์สีเขียวเหลืองบริเวณขอบวงแต่ละชั้น อาจได้กลิ่นหอมหวานอ่อนๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และสปอร์จะมีสีเข้มขึ้น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ lageniform, obpyriform หรือ obclavate, ความยาวประมาณ (0.9-)1.3-1.9(-3.7) µm กว้างประมาณ 1.0-3.5 µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน (2.0-)2.5-3.2 (-3.7) × (1.7-)2.5-2.7(-3.2) µm ผนังสปอร์ผนังเรียบ ใส

Accession No.: M0204

หมายเหตุ – เดิมเชื้อรา *T. lentiforme* มีการจำแนกเป็นเชื้อรา *T. harzianum* มาก่อน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคทางดินโดยชีววิธี (González *et al.*, 2020) โดยเฉพาะโรคทางดิน (Chaverri and Samuels, 2002) และเชื้อรานชนิดนี้เป็น telemorph ของเชื้อรา *T. harzianum*

(Chaverri and Samuels, 2002) และ มีรายงานว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบได้ในประเทศไทย (Chaverri *et al.*, 2015)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

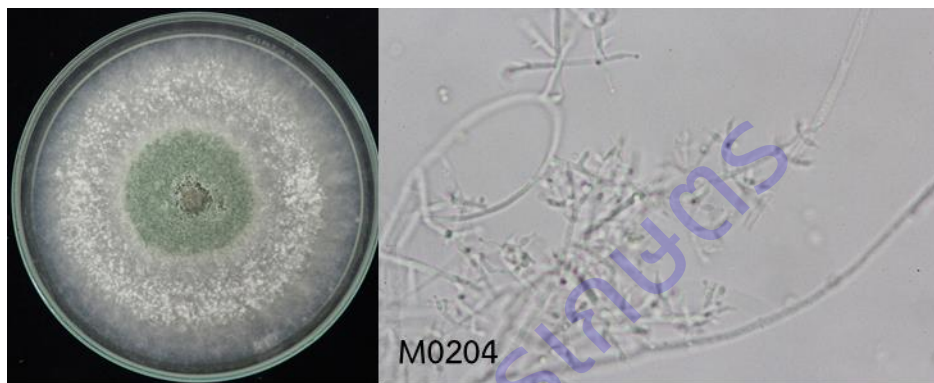


Figure 3: Colony and conidiophores with phialides (40x) of *Trichoderma lentiforme* (M0204)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>GAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGC  
GTCGCAGCCCCGGACCAAGCGCCCCCGGAGGACCAACAAAACCTTTATTGTATACCCCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGC  
GCCTCTCGTAGGCGTTTTGAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT  
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACC  
CTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCC  
TGCGCAGTAGTTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>AACGTGGTTCGTTATCGTACGTATCATCTGTTCCCTCACGTCCGCATCATTGCGCGCTTTGATCCTCAAACACTTGTGCTAACTACCGTCTTCTAG  
GGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAAGAGATCGATCGAACACAGTACTGACTTGCTACAACAGCCACGTCGACTCCGGAAGTGCACCACCGT  
GAGTTACACCCTCTTCTTCGCTCCGACATCAGACATCATTTGGTGCGGGACATCTCTTGAATACAGGGCTAACCATTCATCATAAGACCGGTCAC  
TTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACTGATTTTTGCGCTCGATTCTCCCTCCAAATTC  
AATTGTGCCCGACGATTCTGAAGAGAATTTTCGTGTGCACAATTTTTTCGTACCCCGCTTCCATTACCCCTCTTTGACGCGACGCAAAATTTTTT  
TGCTGTCTTTTGGTTTTAGTGGGGTTTTCTGTGACCCCACTAGCTACTGCTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTCACTCTCACTTCCCCGCCATTCAACGT  
ACTCTGTGCTTTGGTCATTCAGCGATGCTAACCACCTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCT
```

TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTAT
GTCTTCTTCATCAACTTCATGCTTCAATTGCAAGCCAGTGCTAACAGGCAATCACAGACG

Trichoderma lixii (Pat.) P. Chaverri, Mycologia 107 (3): 578 (2015)

Synonymy:

≡ *Hypocrea lixii* Pat., Revue Mycologique Toulouse 13 (51): 138 (1891)

Classification

| | |
|-----------|--------------------------|
| Kingdom | <i>Fungi</i> |
| Phylum | <i>Ascomycota</i> |
| Subphylum | <i>Pezizomycotina</i> |
| Class | <i>Sordariomycetes</i> |
| Subclass | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| Order | <i>Hypocreales</i> |
| Family | <i>Hypocreaceae</i> |
| Genus | <i>Trichoderma</i> |
| Species | <i>lixii</i> |

Optimum Growth Temperature 25-35 °C

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียวอ่อน (Figure 4) ตรงกลางโคโลนี เส้นใยรอบนอกสีใส ไม่มีกลิ่น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ ampulliform หรือ lageniform ความยาวประมาณ 1.0-2.7 µm กว้างประมาณ 2 µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด (2.5-)3.0-3.5 (-3.7) x (2.2-)2.5-3.2(-3.5) µm ผนังสปอร์ผนังเรียบ เมื่อแก่สปอร์จะมีสีเข้ม

Accession No.: M0994

หมายเหตุ - เดิมเชื้อรา *T. lixii* มีการจำแนกเป็นเชื้อรา *T. harzianum* มาก่อน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน ลักษณะของเชื้อรา *T. lixii* จะคล้ายกับ *T. harzianum* และ *T. lentiforme* เชื้อรา *T. lixii* มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Chaverri and Samuels, 2002) และ เชื้อราชนิดนี้สามารถพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Chaverri *et al.*, 2015)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

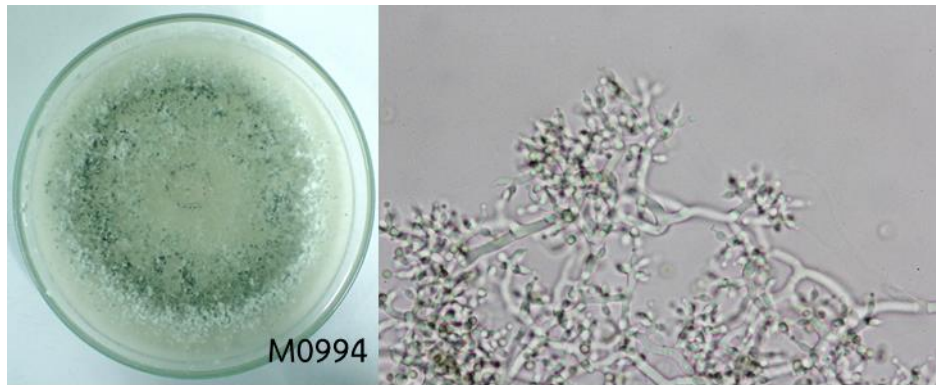


Figure 4: Colony and conidiophores with phialides (40x) of *Trichoderma lixii* (M0994)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCG
GGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTA
TAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTG
TCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTGCGGCTTGGGGATCGGCCCTGCCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCG
GTCTCGCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACTCGCATCGGGAGCGCGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTCTGAAATGTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAA
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>CATGTTCTTGATGAAATCACGGTGGCCGGGAGCGTCTGTGAATTGCTTGTAGACTGGCTTGTAAATCGCTGTGTGAAGTTGATGGAAAGAACAT
ACCAATGACGGTGACATAGTACTTGGGAGTCTCGAACTCCACAGAGCAATGTGCATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAG
AACCAAGCATACTTGAAGGAACCTTGCCGAGTTCGGCGGCTTCTATTGATGGAAAAGTGTTAGCATCGCTGAAAGTGACGAGACACAGAACA
CGTTGAATGATGGCTGGGAAGTGAGAGCGAAGCAGAAAAAAGCAGTGAGCTAGTGGGGTGCAAGAAACCCCACTAAAACCAACGACAGC
AAAAAATTTTGCCTGCTGCAAAGGAGGGTAATGCAAAGCGGGTGATGAAAAATTGTTGACACGAAAATCTCTGCAGAATTGTCGGGCACAA
TTGAATGTGGAGGGAGAGTTGGGGCGAAAATGAGTTGAAGCTTACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTACGACGGTCGATACCACCGCACTGGTAGAT
CAAGTGACCGGTCTGTATGATAACTGGTTAGCCCTGTGTTCAAAGAGTAGATGTCCCGTATCAAACGACGTTTGATATCGGAGCAGGAGAAGAGGG
TGCAACTCACGGTGGTCGACTTCCGGAGTCGACGTGGCTGTTGTAGCAAGTCAGTACTGTGTTGATCGATCTCATTCAAGATGATTGATGGAAT
ACGCACCCCTAGAAGATGGTAGTTAGCACAAGTGTGAGAATCAGAGCGCGACTGATGCCGACGTGAAAGGATAATACGTACGATAACGACCAC
GTTGATGTGAGTCT
```

Trichoderma harzianum Rifai, Mycological Papers 116: 38 (1969)

Synonymy:

=*Sporotrichum narcissi* Tochinai & Shimada, Trans. Sapporo nat. Hist. Soc.: 124 (1930)

=*Trichoderma nunbergii* Svilv., ZentBl. Bakt. ParasitKde, Abt. 2: 135 (1932)

Classification

| | |
|-----------|--------------------------|
| Kingdom | <i>Fungi</i> |
| Phylum | <i>Ascomycota</i> |
| Subphylum | <i>Pezizomycotina</i> |
| Class | <i>Sordariomycetes</i> |
| Subclass | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| Order | <i>Hypocreales</i> |
| Family | <i>Hypocreaceae</i> |
| Genus | <i>Trichoderma</i> |
| Species | <i>harzianum</i> |

Optimum Growth Temperature 30-35 °C

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียว (Figure 2) เป็นวงชั้น ๆ บางครั้งพบสปอร์สีเขียวเหลืองบริเวณขอบวงแต่ละชั้น ไม่มีกิลิน ลักษณะของ phialides เป็นแบบ ampulliform ตรงปลายแคบ ความยาวประมาณ 6.2-7.5 μm กว้างประมาณ 3.2-3.5 μm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด (2.0-)2.5-3.0(-3.7) \times (2.2-)2.7-3.5(-4.2) μm ผนังสปอร์ผนังเรียบ

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-gluconase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: neotype CBS 226.95

หมายเหตุ - อ้างอิงจาก type sequence (Mycobank, 2020)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>AF057606_ACCGAATTTAAACTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTNGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGG  
ACCAAGGCGCCCGCCGGAAGACCAACCTAAAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAG  
GCGTTTTGAAAATGAATCAAACCTTTCCAACAACGGAATCTCTTGTTCTGGCATCGATAAAGAACCACCAAAATGCAATAAATAATGTGAATTGC  
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCC  
CTCCGGGGGGTGGCGGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTA  
GTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGAT
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>AF348101_CTACCAGTGC GG TGGTATCGACCGTGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACTCATTTTCGCCTCGATTCTCCCTCCA
CATTTAATTGTGCCCGATAAATCTGCAGAGAATTTTCGTGTCGACAATTTTCATCACCCGATTTGCATTACCCCTCCTTTGAGCGACGCAAATT
TTTTTGGCTGTGCTTTGGTTTTAGTGGGGTTTCTCGTGCACCCCACTAGGTCACTGCTTTTTTTCTGCTTCGCTCTTACTGCCAGCCATCATTCAA
CGTGCTCTGCGTCTCATCACTTTTCAGCGATGCTAACCACTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAAGTTCGGAAGGGTTCTTCAAGTACGCTTGGG
TTCTTGACAAGCTCAAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTG
GTATGTTCTTTCCATCAACTTCACACAGCGATTACAAGCCAGTGTACAAGCAATTACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATG
ATCACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATATTGCCCGGTAAGTGGTGGAG

the Large Subunit (LSU, 28S)

>MH874152_GC ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCGAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCT
GGTCCCTAGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGGAGTGC CGCCCGAGTTCCTTGGAAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCC
CGTCTGGCTGGCCGCCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTATATGCTCTTCAAAGCT
AAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAGAGGGTTAAATAGTACGTGAAATTTGTTGAAA
GGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGCGGATCATCCGGGGTTCTCTCCGGTGCACCTTCGCCGCTTAGGCCAGCATCAGTTCGTGCGGG
GGGAAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAGTGTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATG
CTGGCGTAATGGTACCAGCGACCCGCTTGAACACGGACCAAGGAGTCGCTTCGTATGCGAGTGTTCGGGTGTCAAACCCCTACCGGTAATGA
AAGTGAACGCAGGTGAGAGCTTCGGCGCATCATCGACCGATCCTGATGTTCTCGGATGGATTGAGTAAGAGCATAACGGGGCCGACCCGAAAGAA
GGTGAACATATGCCTGTATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGCAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATATGGGCATGG
GGGGCGAAAGACTAATCGAACCTTCTAGTAGCTGGTTCGCG

Viridae Clade

Trichoderma asperellum Samuels, Lieckf. & Nirenberg, Sydowia 51: 81 (1999)

Classification

| | |
|-----------|--------------------------|
| Kingdom | <i>Fungi</i> |
| Phylum | <i>Ascomycota</i> |
| Subphylum | <i>Pezizomycotina</i> |
| Class | <i>Sordariomycetes</i> |
| Subclass | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| Order | <i>Hypocreales</i> |
| Family | <i>Hypocreaceae</i> |
| Genus | <i>Trichoderma</i> |
| Species | <i>asperellum</i> |

Optimum Growth Temperature 30-35 °C

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว (Figure 5) เป็นวงชั้น ๆ บริเวณวงแต่ละชั้นจะไม่พบ
การสร้างสปอร์ ไม่มีกลิ่น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ terminated branches และ lageniform ยาว (4.0-
)6.2-9.7(-15.2) µm กว้าง (2.5-)3.0-3.5(-5.0) µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน หรือกลมรี ขนาด (2.2-)3.0-3.5(-

4.7) × (3.0-)3.5-4.0(-4.7) μm สีเขียว ผนังปอร์ลักษณะแบบ warty ไม่พบการสร้าง chlamydospores บนอาหาร

Enzyme Production protease chitinase β-1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: M0227, M0228, M0229, M0231, M0572, M0573, M0577, M0578, M0579, M0876, M0877, M0885, M0886, M0929

หมายเหตุ - การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

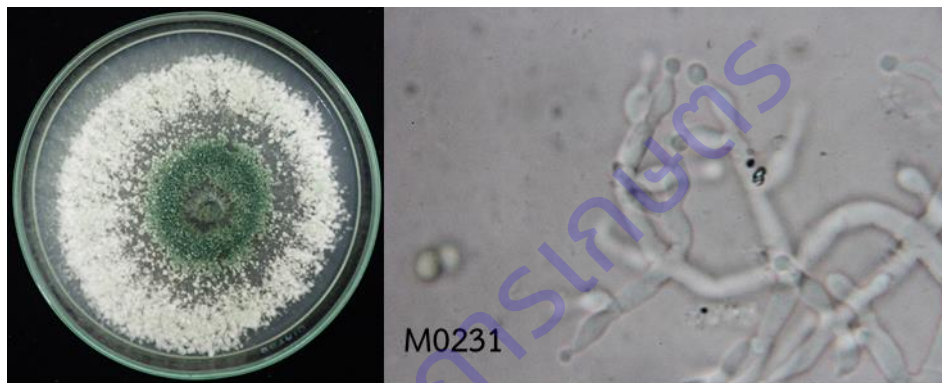


Figure 5: Colony and conidiophores with phialides (100x) of *Trichoderma asperellum* (M0108)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>GAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAAGGCGCC  
CGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACCTTTCAAC  
AACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  
CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACC  
CCTCACACGGGTGCCGGCCCTAAATACAGTGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCG  
TCCACGTCGGTAAACACCCAACCTTTCTGAAA
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>ATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTCATTTCACTGCTTTTCCATCAATTTTTGGCACAATCATATGCCCGACAATTCTGCTCTCAGTTTTTGTCT  
TTTTTTTCCAGCGTACCCCGCTTTGCCAGTCTACCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAATTTCTGGCTGCCTTGTGGCTTTTAGTGGGGTGT  
CAAATTTTTTGGCAGCAACCCGCTATCGCACTGCACCTCTCCATCACCCACCACATGCTATTTGCTCAATCGCGTCGCTTTTTTTGTTTCATTA  
TGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAG
```

CGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGACTCTTCTCTAGCTATC
GACATTCCAAGTCCGCCATTCTAACATGCTCTTCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCAT

the Large Subunit (LSU, 28S)

CGACCTCCACGTCCGCCTACTCCTCGGGGCATCGTTTCTAGACCGAGGGCGAGGTATGGGTGAGACGCTTGAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGT
ACATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCTGTGCAAGATGTACTAACGCCTTTTGTGGTGTC
TGATGAGCGTCTACTCTGGCACCTAACCTCGCGTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACAAAAATGGCCCACTAGTGTGATACATTC
GAATGCCACGTTCAACTAAGTAACAAGGGCTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATGGATGAAGGCAATATAGCGCCCCGAGTCCCTAATCATT
GCTTTACCTCATAAACTGAGCTCAACTGCTATCCTGAGGGAACTTCGGCGGAAACCAGCTACTAGAAGGTTGATTAGTCTTTGCCCCCATG
CCCATATTTGACGATCGATTTGCACGTGAGAACCCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCTCTGGCTTACCCTATACAGGCATAGTTCACCTTCTTT
CGGGTCCGGCCCCGATGCTCTTACTCAAATCCATCCGAGAACATCAGGATCGGTGATGATGCGCCGAAGCTCTACCTGCGTTCACCTTCATTA
CGCGTAGGGGTTTGACCCCGAACACTCGCATACGAAGACGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTGCTGGTGACCATTACGCCAGCATCCT
TGCAGATGCGCGGTCTCAGTCCACCGCAGGGTATTATGCAACGGGCTATAAACTCCCGGAGGAGCCAGTTCGCCGAAGCCTTTTCCCCCGCGA
CGAACTGATGCTGGCCTGAACGCGGCGAAGTGCACCGGAGAGAACCCCGGATGATCCGCGCGCCCAAGTCTGGTACAAGCGCTTCCCTTTAAC
AATTTACGTAAGTGTAAACCTCTTTTCAAGGTGCTTTTTCATCTTTCGATCACTTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCAATATTAGCTTTAGA
AGACATATACCTCCATTTTGGAGCAGATTCCCAAACACTCGACTCGTGAAGGAGCTTACAGAGGCTCGGTGGCCAGCCAGACGGGGCTCTCA
CCCTCTGTGGCGTCCCGTCCAGGGAACCTCGGGCGGCACCTACCAAAGCATCCTCTACAAATTACAACCTCGGACCCGGAGGGGCCAGATTTCAA
ATTTGAGCTGTTGCCGCTTCC

Trichoderma asperelloides Samuels, Mycologia 102 (4): 961 (2010)

Classification

| | |
|-----------|--------------------------|
| Kingdom | <i>Fungi</i> |
| Phylum | <i>Ascomycota</i> |
| Subphylum | <i>Pezizomycotina</i> |
| Class | <i>Sordariomycetes</i> |
| Subclass | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| Order | <i>Hypocreales</i> |
| Family | <i>Hypocreaceae</i> |
| Genus | <i>Trichoderma</i> |
| Species | <i>asperelloides</i> |

Optimum Growth Temperature 25-30 °C

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว (Figure 6) เป็นวงชั้น ๆ บริเวณวงแต่ละชั้นจะไม่พบ
การสร้างสปอร์ ไม่มีกลิ่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะคล้ายคลึงกับ *T. asperellum* conidiophore ลักษณะยาว
ตรงปลายก้านเป็น single phialide หรือเป็นกลุ่มของ phialides 2-4 ที่แยกกันอย่างชัดเจน ลักษณะของ
phialides เป็นแบบ flask-shaped และมีลักษณะโป่งพองตรงกลาง ยาว (4.0)-6.2-9.7(-15.2) μm กว้าง (2.5-
)3.0-3.5(-5.0) μm สปอร์มีลักษณะกลมแบน หรือกลมรี ขนาด (2.2)-3.0-3.5(-4.7) x (3.0)-3.5-4.0(-4.7) μm สี

เชื้อยว ผนังปอร์ลักษณะแบบ warty chlamydospores แบบ subglobose มีขนาด (4.5-)7.2-11.2(-15.0) x (5.0-) 6.5-9.5(-11.0) μm

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: M0008, M0009, M0010, M0011, M0013, M0097, M0098, M0099, M0100, M0101, M0102, M0103, M0104, M0105, M0106, M0107, M0108, M0109, M0110, M0111, M0112, M0113, M0114, M0115, M0197, M0198, M0199, M0200, M0201, M0202, M0203, M0205, M0230, M0232, M0233, M0279, M0280, M0281, M0282, M0366, M0367, M0427, M0428, M0530, M0570, M0571, M0574, M0576, M0651, M0673, M0745, M0884, M0887, M0930, M0931, M0932, M0995

หมายเหตุ การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อเสนอแนะที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

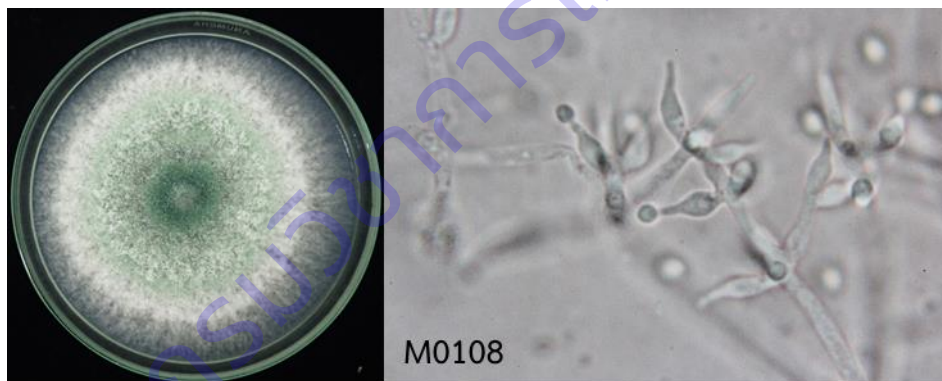


Figure 6: Colony and conidiophores with phialides (100x) of *Trichoderma asperelloides* (M0108)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>GTCTCCGTTGGTGAACCAAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGTCAAC  
GCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAAGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTC  
TGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT  
TGAGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAA  
CCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAG
```

TAGTTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGCGCGCTCCACGTCCGTA AACACCCAACCTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG
CTGAACTTAAGCA

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>TAAGCTAATTTCACTGCTTTTCCCATCAATTTTTGGCACAATTATATGCCGACAATTCTGTTCTCAGTTTTGTCTCTTTTTTTTTCAGCATCACCC
CGCTTTGCCAGCCTACCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAAATTTTCTCGCTGCCTTGTGGCTTTTAGTGGGGTGTCAATTTTTTTGACGGCAA
CCCCACTATCGCCACTGTACCTCTTTCCATCATCCACCACATGCTATTTGTTCAATCGCATCGTCTATTTTCAATATCTCTTGTTCATTATGCTGATC
ATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTAT
CACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGT
CATTCTAACATACTCTCCCCACAGACGCTCCCGGTACCGTGATTT

the Large Subunit (LSU, 28S)

>CTTCGTACGACCTCCACGTCCGCCTACTCCTCGGGGCATCGTTTCTACCCCGAGGGCGAGGTATGGGTGAGACGCTTGAGCGCCATCCATTTTC
AGGGCTAGTACATTCCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCTTAGCGGATTCGACTTCCATGGCCACCGTCTCTGTCAAGATGTAACGCCTT
TTGTGGTGTCTGATGAGCGTCTACTCTGGCACCTTAACCTCGCGTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACAAAAATGGCCACTAGTGT
TGATACATTCGAATGCCACGTTCAACTAAGTAACAAGGGCTTTACATATTTAAAGTTTGAGAATGGATGAAGGCAATATAGCGCCCCGAGTCC
CTAATCATTGCTTTACCTCATAAACTGAGCTCAACTGCTATCCTGAGGGAACTTCGGCGGAAACCAGCTACTAGAAGGTTTCGATTAGTCTTT
CGCCCCATGCCATATTTGACGATCGATTTGCACGTGAGAACCCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCTCTGGCTTACCCTATACAGGCATAGTT
CACCTTCTTTCCGGTCCGGCCCCGATGCTCTTACTCAAATCCATCCGAGAACATCAGGATCGGTGATGATGCGCCGAAGCTCTCACCTGCGTTC
ACTTTCATTACCGGTAGGGGTTTGACACCCGAACACTCGCATAAGAACGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTGCTGTTGACCATACG
CCAGCATCCTTGAGATGCGCGTCTCAGTCCACCGCAGGGTATTATGCAACGGGTATAAACAATCCCGGAGGAGCCAGTTCGCAAGCCTTTT
TCCCCCGCAGCAACTGATGCTGGCCTGAACGCGCGAAGTGCACCGGAGAGAACCCCGGATGATCCGCGCGCCCAAGTCTGGTCAACAAGCGCT
TCCTTTCAACAATTTACGTAATGTTAACCTCTTTTCAAGGTGCTTTTTCATCTTTGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCAATAT
TTAGCTTTAGAAGACATATACTCCCATTTTGGAGCAGATTCCCAAATACTCGACTCGTCAAGGAGCTTTACAGAGGCTCGGTGGCCAGCCAGA
CGGGGCTCTACCCCTCTGTGGCGTCCCGTCCAGGGAACCTCGGGCGCACCTCACAAAAGCATCCTCTACAATTACAACCTCGGACCCGGAGGGG
CCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGTTCACTCGCGTACTGCGGCA

Trichoderma viride Pers., Neues Magazin für die Botanik 1: 92 (1794)

Synonymy:

=*Pyrenium lignorum* Tode, Fungi Mecklenburgenses Selecti 1: 33, tab. 3, fig. 29 (1790)

=*Trichoderma glaucum* E.V. Abbott, Iowa State College Journal of Science: 27 (1927)

=*Hypocrea rufa* (Pers.) Fr., Summa vegetabilium Scandinaviae 2: 383 (1849)

Classification

| | |
|-----------|--------------------------|
| Kingdom | <i>Fungi</i> |
| Phylum | <i>Ascomycota</i> |
| Subphylum | <i>Pezizomycotina</i> |
| Class | <i>Sordariomycetes</i> |
| Subclass | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| Order | <i>Hypocreales</i> |

Family *Hypocreaceae*
Genus *Trichoderma*
Species *viride*

Optimum Growth Temperature 25-30 °C

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว บางครั้งพบว่าเชื้อสร้างกลั่นคล้ายกลั่นของมะพร้าว สปอร์มักพบสร้างกระจุกอยู่ตรงกลางโคโลนี ขนาดประมาณ 1-4 mm (Figure 4) ลักษณะของ phialides เป็นแบบ lageniform มักพบตรงกลาง ลักษณะตรง ปลายแบบตะขอ ยาว (5.0-)6.5-11(-18) µm กว้าง (1.5-)2.5-3.5(-4.0) µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด (2.7-)3.2-4.2(-5.0) x (3.0-)3.5-4.5(-5.5) µm สีเขียว ผนังสปอร์ลักษณะแบบ warted

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: epitype CBS 119325

หมายเหตุ - อ้างอิงจาก type sequence (Mycobank, 2020)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>NR138441_GAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCGGAGGGACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTTATTTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCGGCGTTGGGGACTTCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGCGGCTCGCCGCGACCTCTCATGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCCGGGAGCGCGCGCTCCACGTCCGTAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>DQ672615_CATTTCTGCTTTTTCACTACGCGTTCCTGGCCCAATCGTGCCCGACAATTCTGTTCTCAGTCTTGCAACTTTGCCCTCGCAGCATCACACCCCGCTTTGCTGCTCTACCCCTCATTTTGACAGCAAAAATTTCTGGCTGTCTATTTGGCTCTGAGTGGGGTGCCAACCTTTGTTGGCAGCGACCCCGCTATCGCCACTGTCCCTCATCCATCGTCCCAACACATTGTGCTCATTCAATCGCATCGTCTTTTGCCTCAATTCCTTTGGGGTTTATTGTGCTGATCATGTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGCAAGGGTCTTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCAGATACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGTTCCCTCAATGACATTTCCGCCATCATCTAAGTGCCACTCTGCAGACGCTCCCGCCACCGTGATTTCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGTAAGTGGTGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACACTGCCAACTGGGCCGAGGCTCGTTACCTTGAGATCATCAAGGAGACCTCCAACCTTCATCAAGAAGTTCGGCTTCAACCCCAAGACCGTTGCCTTCGTCCTCCATCTCCGGCTTCAACGGCGACAACATGTTGGCCGCTCTCCAACCTGCCCTGG
```

TACAAGGGCTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTCCACCGCAAGACCCCTTCTCGAGGCCATTGACGCCATTGAGCCCCCAAGCGTCCCAC
AGACAAGCCCCTCCGTCTGCCCTTCAGGATGTTTACAAGATCGGTGGTATTGGAACAGTCCCTGTGCGCCGTATCGAGACTGGTATCCTCAAGCC
CGGTATGGTGTACCTTCGCTCCCGCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTCGTTGAGGGTGTCCCCGGTGA
CAACGTTGGATTCAACGTCAAGAAGCTCTCCGTCAAGGATATCCGCCGTGGAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCTCCCATGGCTGCCGC
TTCTTTCAACGCCAGGTCATTGTATGAACCACCCTGGCCAGGTGCGGTGCCGGATACGCTCCCTGCTCA

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* และยังได้ไอโซลทของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme* และ *T. lexii* โดยได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (tef1) และ the Large Subunit (LSU, 28S) เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีการขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma* โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในหน่วยงานราชการ เช่น กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถาบันการศึกษา และหน่วยงานเอกชน โดยสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* ในประเทศไทย รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลและองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัยวิจัย เช่น การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะเพื่อการตรวจสอบชนิดที่แม่นยำและรวดเร็ว

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* เพื่อใช้เปรียบเทียบและตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อราในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร โดยจะช่วยลดความเสี่ยงในการใช้ชนิดของสารชีวภัณฑ์ที่ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช

10.2 สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิก กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

12. 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., F. Branco-Rocha, W. Jaklitsch, R. Gazis, T. Degenkolb and G.J. Samuels. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107: 558-590.
- 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.
- Chaverri, P. and G.J. Samuels. 2002. *Hypocrea lixii*. Pat., the teleomorph of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Mycological Progress* 1: 283-286.
- 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.

- 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.
- González, V., E. Armijos and A. Garcés-Claver. 2020. Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne. *Agronomy* 10: 1-20. doi.org/10.3390/agronomy10060820.
- Hermosa, M.R., I. Grondona, E.A. Iturriaga, J.M. Diaz-Minguez, C. Castro, E. Monte and I. Garcia-Acha. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1890-1898.
- de Hoog, G.S. and A.H.G. Gerrits van den Ende. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycosciences* 41: 183-189.
- Jaklitsch, W.M. and H. Voglmayr. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80: 1-87.
- John, R.P., R.D. Tyagi, D. Prévost, S.K. Brar, S. Pouleur 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.
- 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(12): 1647-1649.
- Kamala, Th., S.I. Devi, K.C. Sharma and K. Kennedy. 2015. Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to manipur. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 285261, 21 pages.
- 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.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Li, Q., P. Tan, Y. Jiang, K.D. Hyde, E.H.C. McKenzie, A.H. Bahkali, J. Kang and Y. Wanf. 2013. A novel *Trichoderma* species isolated from soil in Guizhou, *T. guizhouense*. *Mycological Progress* 12: 167-172.

- Liu, K.L., A. Porras-Alfaro, C.R. Kuske, S.A. Eichorst and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.
- 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.
- Muthumeenakshi, S., P.R. Mills, A.E. Brownd and D.A. Seaby. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* 140: 769-777.
- Mycobank. 2020. *Hypocercaceae*. (online data). source: <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search> (18 February 2564).
- Nylander, J.A., J.C. Wilgenbusch, D.L. Warren 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.
- O'Donnell, K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044-2049.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-116.
- Robbertse, B. P.K. Strope, P. Chaverri, R. Gazis, S. Ciufu, M. Domrachev and C.L. Schoch. 2017. Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying 'one name one species' in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea* as a test case. *Database* 1-14. doi:10.1093/database/bax072.
- Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Samuels, G.J., S.L. Dodd, W. Gams, L.A. Castlebury and O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170.
- Samuels, G.J., S.L. Dodd, B. Lu, O. Petrini, H.J. Schroers 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. lieckfeldtia*: Two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia* 101: 142-156.

- 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.
- 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) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control* 64: 37-44.
- 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.
- 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.
- Thines, M., T. Aoki, P.W. Crous, K.D. Hyde, R. Lücking, E. Malosso, T. W. May, A.N. Miller, S.A. Redhead, A.M. Yurkov and D.L. Hawksworth. 2020. Setting scientific names at all taxonomic ranks in italics facilitates their quick recognition in scientific papers. *IMA Fungus* 11: 1-5.
- 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., K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, S.L. Woo and M. Lorito. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee 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.), Academic Press. 315-322 pp.
- Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet and S. Manulis. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research* 98: 531-534.