



Original Article

Isolation and Characterization of *Trichoderma* Strains Antagonistic Against Pathogenic Fungi on Orange Crops

Vu Xuan Tao¹, Tran Van Tuan^{2,*}

¹National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology,
C6 Thanh Xuan Bac, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

²VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Received 29 May 2020

Revised 24 June 2020; Accepted 29 June 2020

Abstract: Agricultural production is greatly influenced by diseases caused by fungi. *Penicillium digitatum* is a common fungus that causes blue mold in citrus fruits. In addition, *Fusarium* and *Phytophthora* species are also recognized as citrus pathogens, involving in root rot and fruit rot. Currently, the use of microbial bio-products to control fungal pathogens is always prioritized for an organic, and sustainable agriculture. *Trichoderma* species are considered as safe filamentous fungi that antagonize against many fungal plant pathogens. In this study, 10 strains of *Trichoderma* were isolated and monitored for their antagonistic capacity towards the citrus pathogen *P. digitatum*. The strains *Trichoderma* Tr.6, Tr.7 and Tr.8 exhibited inhibitory efficacy of 95–100% against *P. digitatum*. Additionally, these three strains also strongly suppressed the growth of two other common plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici*. Based on the morphological characteristics and the sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA, all three strains Tr.6, Tr.7 and Tr.8 were identified as *Trichoderma asperellum*. These *Trichoderma* strains represent promising potentials for applications in the production of bio-products for the control of pathogenic fungi infecting citrus and other crops.

Keywords: Orange crops, fungal antagonism, *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Trichoderma asperellum*.

* Corresponding author.

Email address: tuantran@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5086>

Phân lập và tuyển chọn các chủng *Trichoderma* có khả năng đối kháng vi nấm gây bệnh trên cây cam

Vu Xuan Tao¹, Tran Van Tuan^{2,*}

¹Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ,
C6 Thanh Xuân Bắc, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 5 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 24 tháng 6 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 29 tháng 6 năm 2020

Tóm tắt: Sản xuất nông nghiệp chịu ảnh hưởng rất lớn bởi các bệnh hại cây trồng do vi nấm gây ra. Nấm *Penicillium digitatum* là vi nấm phổ biến gây bệnh thối mốc xanh ở quả có múi. Ngoài ra, nấm *Fusarium* và *Phytophthora* cũng được ghi nhận là vi nấm bệnh trên cây có múi, như bệnh thối rễ và thối quả. Hiện nay, việc kiểm soát các vi nấm gây bệnh cây trồng sử dụng các chế phẩm sinh học nhằm hướng tới một nền nông nghiệp sạch và bền vững đang ngày càng được chú ý. Nấm *Trichoderma* được đánh giá là chi nấm an toàn, có khả năng đối kháng chống lại nhiều loài nấm gây bệnh ở cây trồng. Trong nghiên cứu này, 10 chủng nấm *Trichoderma* đã được phân lập và đánh giá khả năng đối kháng chống lại nấm *P. digitatum* gây hỏng cam. Các chủng *Trichoderma* Tr.6, Tr.7 và Tr.8 có hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* vượt trội, đạt 95 – 100%. Đồng thời, ba chủng nấm này cũng có khả năng kháng mạnh với hai loài nấm bệnh phổ biến khác là *Fusarium oxysporum* và *Phytophthora capsici*. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA, cả ba chủng Tr.6, Tr.7 và Tr.8 được xác định thuộc loài *Trichoderma asperellum*. Ba chủng nấm *Trichoderma* tuyển chọn này có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học dùng cho phòng trừ vi nấm gây bệnh trên cây cam và các cây trồng khác.

Từ khóa: Cây cam, đối kháng nấm bệnh, *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Trichoderma asperellum*.

1. Mở đầu

Hiện nay ở gần 90 nước trên thế giới thuộc vùng nhiệt đới và á nhiệt đới, ngành trồng cây ăn quả có múi đang rất phát triển, trong đó cam là đối tượng chính. Đặc trưng đối với cây cam là loại cây ăn quả lâu năm, quả có hàm lượng nước và dinh dưỡng cao, đây cũng là điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của một số loại vi sinh vật, đặc biệt là vi nấm gây bệnh. Nấm *Penicillium digitatum* là nguyên nhân gây bệnh thối mốc

xanh và rụng quả ở cây có múi. *P. digitatum* có khả năng sinh trưởng ở phổ nhiệt độ khá rộng từ 4–30°C, tối ưu ở nhiệt độ 25–30°C, không sinh trưởng được ở trên 37°C. *P. digitatum* lây nhiễm qua vết xước của quả có múi. Các vết xước, tổn thương trên vỏ quả có thể do côn trùng hoặc tác nhân vật lý gây ra. Nếu nấm nhiễm vào quả ở giai đoạn trước khi thu hoạch thì sẽ gây hiện tượng rụng quả. Bào tử nấm từ quả thối hỏng có thể xâm nhập vào đất hoặc phát tán theo gió di chuyển đến nhiều địa điểm khác nhau [1]. Nấm

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: tuantran@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5086>

Fusarium và *Phytophthora* được ghi nhận là tác nhân gây bệnh thối rễ, thối quả ở cây có múi, đặc biệt trên cây cam [2]. Hiện nay, để kiểm soát các loài nấm gây hại này, biện pháp phổ biến là sử dụng các loại thuốc có nguồn gốc hóa học, độc hại cho con người và gây ô nhiễm môi trường.

Áp dụng biện pháp kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng phân bón hữu cơ hoặc chế phẩm sinh học có chứa các vi sinh vật đối kháng là một trong những ưu tiên hàng đầu trong sản xuất nông nghiệp sạch và bền vững. Vi nấm *Trichoderma* được đánh giá là chi nấm an toàn và có hoạt tính đối kháng chống lại một số nấm gây bệnh cây trồng nhờ các cơ chế sinh kháng sinh, ký sinh và cạnh tranh [3]. Ngoài ra, *Trichoderma* còn có khả năng kích thích sinh trưởng ở cây trồng, sinh enzyme phân giải các chất hữu cơ giúp cải tạo đất. Tại Việt Nam, các chế phẩm phòng trừ nấm bệnh cho cây trồng còn chưa nhiều. Một số chế phẩm sinh học hiện nay (như chế phẩm BIMA của Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh) vẫn tập trung chủ yếu vào phòng trừ nấm bệnh trong đất trồng các cây như hồ tiêu, cà phê và ca cao.

Việc nghiên cứu, tuyển chọn thêm các chủng *Trichoderma* có hoạt tính đối kháng mạnh sẽ góp phần hỗ trợ thiết thực cho việc sản xuất các chế phẩm sinh học để phòng trừ nấm gây bệnh trên cây có múi và một số cây trồng quan trọng khác ở nước ta.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Chủng nấm *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* do Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

Chủng nấm *Trichoderma harzianum* KS3 là chủng đang được dùng để sản xuất chế phẩm Mocabi đối kháng một số nấm gây bệnh cây trồng, được dùng làm đối chứng so sánh với các chủng nấm phân lập được trong nghiên cứu này. Chủng *T. harzianum* KS3 được chuyển giao bởi giáo sư Kasem Soyong (Đại học King Mongkut,

Thái Lan) và được cung cấp bởi Công ty TNHH Nông Sinh (Đan Phượng, Hà Nội).

Các mẫu đất vùng rễ một số cây trồng được thu thập từ một số tỉnh miền Bắc (Nam Định, Thanh Hóa, Thái Bình, Hà Nội, Hà Giang) để phân lập các chủng *Trichoderma*.

2.2. Phương pháp

Thu mẫu đất: Mẫu đất vùng rễ của các cây khỏe mạnh, phát triển tốt được lấy bằng dụng cụ inox vô trùng được bọc trong giấy bạc. Mỗi điểm thu đào xuống từ mặt đất 10-15cm và lấy khoảng 100g đất xung quanh vùng rễ của cây. Mẫu được đựng trong túi polyetylen chịu nhiệt đã được vô trùng trước khi sử dụng. Thời gian và địa điểm thu mẫu được ghi trực tiếp trên vỏ túi bằng bút chống xóa. Mẫu được bảo quản mát trong vòng 24-48 giờ và được sử dụng để phân lập nấm *Trichoderma* ngay khi chuyển về phòng thí nghiệm.

Phân lập và xác định đặc điểm hình thái các chủng nấm *Trichoderma*: Môi trường được sử dụng để phân lập là PDA có bổ sung kháng sinh chloramphenicol (100 µg/ml). Kháng sinh chloramphenicol có tác dụng kháng khuẩn, ngăn không cho vi khuẩn sinh trưởng. Các mẫu đất được pha loãng bằng nước cất vô trùng đến các nồng độ khác nhau từ 10^{-1} đến 10^{-5} . Cây trái mẫu ở các nồng độ pha loãng này lên môi trường PDA có bổ sung kháng sinh chloramphenicol. Các đĩa được ủ ở 28°C cho đến khi thu nhận được các khuẩn lạc nấm riêng rẽ. Các khuẩn lạc có sợi trắng, bào tử màu xanh hoặc xanh vàng được tách riêng, làm thuần và giữ trong ống nghiệm để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Các chủng nấm sau thuần khiết được nuôi cấy trực tiếp trên tiêu bản kính hiển vi vô trùng có chứa môi trường PDA. Tiêu bản được giữ trong hộp nhựa vô trùng có bổ sung giấy thấm và nước vô trùng để duy trì độ ẩm. Mẫu được ủ ở 28°C trong 4-5 ngày. Hình thái của hệ sợi nấm và cuống sinh bào tử được quan sát dưới kính hiển vi [4].

Tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* có hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh: Môi trường PDA được sử dụng để đánh giá hoạt tính đối kháng của các chủng *Trichoderma* chống lại

nấm gây bệnh. Trên mỗi đĩa môi trường PDA đặt hai miếng thạch có đường kính 5 mm đối diện nhau. Một phía đặt miếng thạch chứa hệ sợi nấm bệnh, phía đối diện đặt miếng thạch chứa hệ sợi của chủng *Trichoderma*. Đĩa đối chứng chỉ cấy nấm bệnh. Các đĩa được giữ ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 5–7 ngày. Sau đó, tiến hành đo đường kính của nấm gây bệnh trên đĩa đối kháng, tính phần trăm đối kháng bằng công thức: $I = (C-T)/C \times 100$ trong đó I = phần trăm đối kháng, C = đường kính của nấm bệnh khi được cấy trên đĩa môi trường, T = đường kính của nấm bệnh trên đĩa đối kháng [5].

Định danh nấm *Trichoderma* dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA: Bào tử nấm được thu từ đĩa nuôi cấy sử dụng nước vô trùng và màng lọc Mira cloth. DNA tổng số được chiết từ hệ sợi nấm theo quy trình nhóm nghiên cứu đã công bố [6]. Vùng ITS của rDNA được khuếch đại từ mẫu DNA tổng số bằng PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC) đặc hiệu cho nấm [7]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,7% và tinh sạch bằng kit của hãng Promega. Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi công ty 1st BASE (Singapore). Trình tự ITS được so sánh với dữ liệu trong Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank) sử dụng chương trình BLAST và phân tích vẽ cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA7.

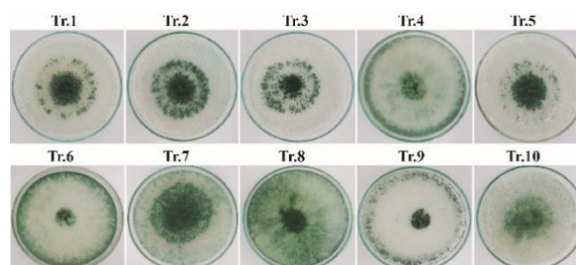
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và đặc điểm hình thái của các chủng *Trichoderma*

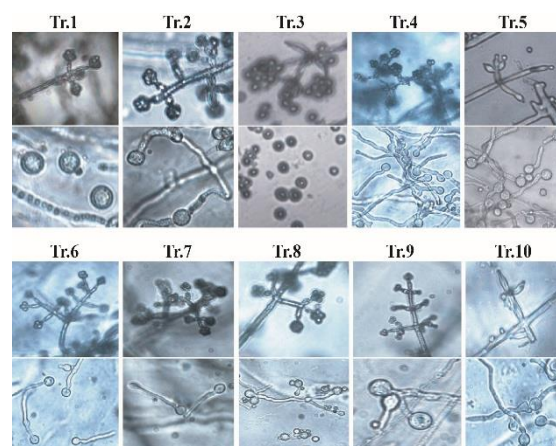
Từ các mẫu đất thu thập, bằng phương pháp pha loãng mẫu và cấy trải trên môi trường PDA, chúng tôi phân lập và thuần khiết được 10 chủng *Trichoderma*. Sau 3–5 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA ở 28°C , các chủng nấm hình thành hệ sợi màu trắng mang bào tử màu xanh nhạt tới đậm hoặc màu vàng nhạt lan phủ trên bề mặt đĩa thạch tạo thành các vòng tròn đồng tâm (Hình 1).

Khi quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần cho thấy hình dạng sợi nấm, cấu trúc sinh bào tử có cấu trúc phân nhánh và có hình

chai. Bào tử đỉnh (conidia) có dạng hình trứng, ovan. Hệ sợi nấm còn hình thành thêm bào tử vách dày (chlamydo spore). Đây là những đặc điểm đặc trưng của các loài thuộc chi nấm *Trichoderma* [8] (Hình 2).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của các chủng *Trichoderma* trên môi trường PDA.

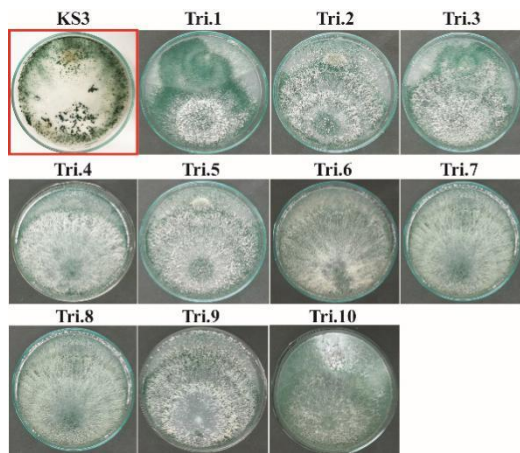


Hình 2. Cấu trúc cuống sinh bào tử đỉnh và hệ sợi mang bào tử vách dày của các chủng *Trichoderma*.

3.2. Khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma*

Nấm *Trichoderma* đã được công nhận là vi nấm có khả năng đối kháng chống lại nhiều nấm gây bệnh cây trồng [9]. Trong nghiên cứu này, tất cả 10 chủng *Trichoderma* được tiến hành kiểm tra khả năng đối kháng với nấm *P. digitatum* gây bệnh thối mốc xanh, rụng cam và so sánh với chủng *T. harzianum* KS3 đang được dùng cho sản xuất chế phẩm thương mại Mocabi của Công ty TNHH Nông Sinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng đối kháng với nấm *P. digitatum* tùy vào từng chủng sẽ cho mức độ đối kháng khác nhau. Ba chủng *Trichoderma* Tr.6,

Tr.7 và Tr.8 có hoạt tính đối kháng tốt nhất với *P. digitatum* đạt 95–100%, cao hơn nhiều so với chủng *T. harzianum* KS3 chỉ đạt 64% (Hình 3). Đáng chú ý là ba chủng này cũng có khả năng sinh trưởng mạnh nhất trong số 10 chủng phân lập được (Hình 1). Theo nghiên cứu của Kotasthane và cộng sự [10] về khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* với nấm bệnh *Sclerotium* cho thấy kết quả về mức độ đối kháng nằm trong khoảng 49,5 – 81% [10].

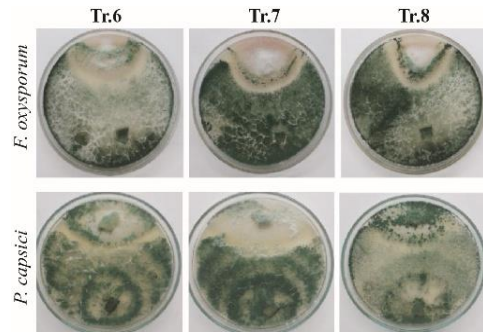


Hình 3. Khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* với nấm *P. digitatum*. Chủng thương mại KS3 được sử dụng làm đối chứng để so sánh.

Ba chủng *Trichoderma* Tr.6, Tr.7 và Tr.8 tiếp tục được kiểm tra khả năng ức chế sinh trưởng với hai loài nấm bệnh khác là *F. oxysporum* và *P. capsici* gây thối rễ và thối quả ở cây trồng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chủng nấm *Trichoderma* đều đối kháng mạnh với *F. oxysporum* và *P. capsici*, đặc biệt chủng Tr.6 có hiệu quả kháng cả hai loài nấm nêu trên lên tới 90% (Hình 4).

Theo nghiên cứu của ElKomy và cộng sự [5], hiệu quả đối kháng của *Trichoderma* với nấm *F. oxysporum* nằm trong khoảng 68 – 71%. Ngoài cơ chế ký sinh và cạnh tranh giúp cho nấm *Trichoderma* có khả năng kháng lại một số nấm gây bệnh trên cây trồng thì các loài *Trichoderma* còn có khả năng sinh các chất kháng nấm dưới dạng các chất bay hơi, enzyme ngoại bào và các chất kháng sinh. Các chất này có tác dụng phá vỡ

màng lipid, tham gia vào hoạt động đối kháng trực tiếp và cảm ứng khả năng đề kháng với các tác nhân gây bệnh ở cây trồng [11].

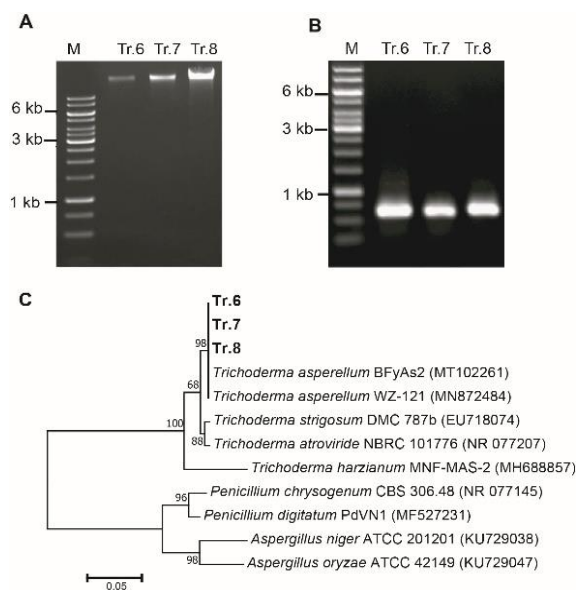


Hình 4. Khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* với nấm *F. oxysporum* và *P. capsici*.

Trên thế giới, nấm *T. asperellum* và *T. harzianum* được xác nhận là an toàn và đã được sử dụng để sản xuất chế phẩm sinh học thương mại như Mycostop, Tenet, Trianum P dùng trong phòng trừ nấm bệnh trong đất cho cây trồng [12]. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện nay vẫn chưa có nhiều chế phẩm sử dụng *Trichoderma* trong phòng trừ nấm bệnh một cách hiệu quả, đặc biệt là đối với vi nấm gây bệnh trên cây có múi. Với hoạt tính kháng nấm vượt trội, các chủng *Trichoderma* phân lập được trong nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ nấm gây bệnh trên cây trồng và có thể sử dụng cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn về cơ chế sinh chất kháng nấm, cơ chế cạnh tranh.

3.3. Định danh các chủng nấm *Trichoderma* bằng giải trình tự vùng ITS của rDNA

Để xác định chính xác đến loài cho ba chủng *Trichoderma* Tr.6, Tr.7 và Tr.8, chúng tôi tiến hành giải trình tự vùng ITS của rDNA. So với các gen 18S rRNA và 28S rRNA của rDNA, vùng ITS (gồm ITS1; 5,8S rRNA; ITS2) có mức độ biến đổi cao hơn giữa các loài gần gũi. Do đó trình tự vùng ITS đã được sử dụng như một chỉ thị mã vạch trong nghiên cứu phân loại nấm, bao gồm cả những loài thuộc chi *Trichoderma* [13-16].



Hình 5. Định danh chủng *Trichoderma* Tr.6, Tr.7 và Tr.8 dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA. (A, B) DNA và sản phẩm PCR vùng ITS trên gel agarose 0,7%, (C) Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự ITS của rDNA.

DNA tổng số của ba chủng *Trichoderma* Tr.6, Tr.7 và Tr.8 được tách chiết và kiểm tra trên gel agarose 0,7%. Kết quả cho thấy chất lượng DNA đủ tốt cho các nghiên cứu tiếp theo (Hình 5A). Vùng ITS được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4. Kết quả cho thấy một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng hơn 500 bp (Hình 5B). Kết quả so sánh trình tự ITS với dữ liệu có trong GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA7 cho thấy ba chủng *Trichoderma* Tr.6, Tr.7 và Tr.8 đều thuộc loài *Trichoderma asperellum* với mức độ tương đồng về trình tự ITS đạt từ 99% đến 100% (Hình 5C).

4. Kết luận

Đã phân lập và đánh giá được khả năng đối kháng của 10 chủng *Trichoderma* từ các mẫu đất với nấm *P. digitatum* gây bệnh ở cam. Các chủng Tr.6, Tr.7 và Tr.8 có hiệu quả kháng nấm *P. digitatum* vượt trội, đạt 95–100%. Đồng thời, ba chủng *Trichoderma* này cũng thể hiện khả năng

kháng mạnh với hai loài nấm bệnh khác là *F. oxysporum* và *P. capsici*. Ba chủng *Trichoderma* Tr.6, Tr.7 và Tr.8 được định danh thuộc loài *Trichoderma asperellum* dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA.

Lời cảm ơn

Các tác giả xin cảm ơn CN. Trần Thị Thanh Huyền đã hỗ trợ kỹ thuật cho một số thí nghiệm. Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Bộ Khoa học và Công nghệ “Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học kháng vi nấm gây bệnh trên cây cam ở một số tỉnh phía Bắc”

Tài liệu tham khảo

- [1] S. Bautista-Baños, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (green mold, blue mold), in: L. Palou (ed.), Postharvest Decay, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 45-102.
- [2] M.W. Olsen, Diseases of citrus in Arizona, University of Aiona, College of Agriculture and Life Sciences, Tucson, 2000.
- [3] M. Verma, S.K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, J.R. Valero, Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panopoly of biological control, *Biochemical Engineering Journal* 37 (2007) 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>.
- [4] X.T. Vu, T.T. Ngo, T.D.L. Mai, T.T. Bui, H.D. Le, T.V.H. Bui, Q.H. Nguyen, X.B. Ngo, V.T. Tran, A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization, *Journal of Microbiological Methods* 144 (2018) 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.019>.
- [5] M.H. ElKomy, A.A. Saleh, A. Eranthodi, Y.Y. Molan, Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato Fusarium wilt, *The Plant Pathology Journal* 31 (2015) 50-60. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087>.
- [6] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, X.T. Vu, B.N. Dao, H.H. Nguyen, A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications, Vietnam

- Journal of Science, Technology and Engineering 59 4 (2017) 66-74. [https://doi.org/10.31276/VJS TE.59\(4\).66](https://doi.org/10.31276/VJS TE.59(4).66).
- [7] M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: T.J. White, T.D. Bruns, S.B. Lee, J.W. Taylor (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic press, Massachusetts, 1990, pp. 315-322.
- [8] L. Li, Q. Qu, B. Tian, K.Q. Zhang, Induction of chlamydospores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* C2, Journal of Phytopathology 153 (2005) 686-693. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01038.x>.
- [9] F.A.C. Lopes, A.S. Steindorff, A.M. Geraldine, R.S. Brandão, V.N. Monteiro, M.L. Júnior, R.N. Silva, Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*, Fungal Biology 116 (2012) 815-824. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.015>.
- [10] A. Kotasthane, T. Agrawal, R. Kushwah, O.V. Rahatkar, In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd, European Journal of Plant Pathology 141 (2015) 523-543. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0560-0>.
- [11] H. Saba, D. Vibhash, M. Manisha, K.S. Prashant, H. Farhan, A. Tauseef, *Trichoderma* a promising plant growth stimulator and biocontrol agent, Mycosphere 3 (2012) 524-531. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/3/4/14>.
- [12] R. Bhattacharjee, U. Dey, An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases, African Journal of Microbiology Research 8 (2014) 1749-1762. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6356>.
- [13] J. Curran, F. Driver, J.W.O. Ballard, R.J. Milner, Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data, Mycological Research 98 (1994) 547-552. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80478-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80478-4).
- [14] C.L. Schoch, K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen, F.B. Consortium, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (2012) 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- [15] C. Kullnig, G. Szakacs, C.P. Kubicek, Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya, Mycological Research 104 (2000) 1117-1125. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002604>.
- [16] A. Hagn, S. Wallisch, V. Radl, J.C. Munch, M. Schloter, A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soils, Journal of Microbiological Methods 69 (2007) 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.12.004>.