

#### บทที่ 4

##### ผลการทดลอง

- เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันต่างประเทศ ทั้งหมดมี 11 formae speciales ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Formae speciales ของเชื้อรา *F. oxysporum* และพืชอาศัยที่ใช้ในการทดลอง

| Formae speciales             | พืชอาศัย                                                             |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <i>adzukicola</i>            | ถั่วอะซูกิ ( <i>Vigna agularis</i> )                                 |
| <i>asparagi</i>              | หน่อไม้ฝรั่ง ( <i>Asparagus officinalis</i> L.)                      |
| <i>cucumerinum</i>           | แตงแคนตาลูป ( <i>Cucumis melo</i> L.var. <i>Camtalupensis</i> )      |
| <i>cyclaminis</i>            | ไซคลาเมน ( <i>Cyclamen</i> sp.)                                      |
| <i>gladioli</i>              | แกลดิโอลัส ( <i>Gladiolus hybrida</i> )                              |
| <i>lycopersici</i> race 1    | มะเขือเทศ ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill)                     |
| <i>lycopersici</i> race 2    | มะเขือเทศ ( <i>L. esculentum</i> Mill)                               |
| <i>radicis - lycopersici</i> | มะเขือเทศ ( <i>L. esculentum</i> Mill)                               |
| <i>nicotianae</i>            | ยาสูบ ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)                                 |
| <i>phaseoli</i>              | ถั่วแขก ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)                              |
| <i>raphani</i>               | ผักกาดหัวจีน ( <i>Raphanus sativus</i> L.var. <i>longipinnatus</i> ) |

หมายเหตุ : เชื้อรา formae speciales *lycopersici* race 1, *lycopersici* race 2 และ *radicis - lycopersici* เป็นเชื้อราที่ได้รับมาจาก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย Kinki ประเทศญี่ปุ่น ส่วนเชื้อที่เหลือได้รับมาจากคณะ Bioresources มหาวิทยาลัย Mie ประเทศญี่ปุ่น

## 2. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา

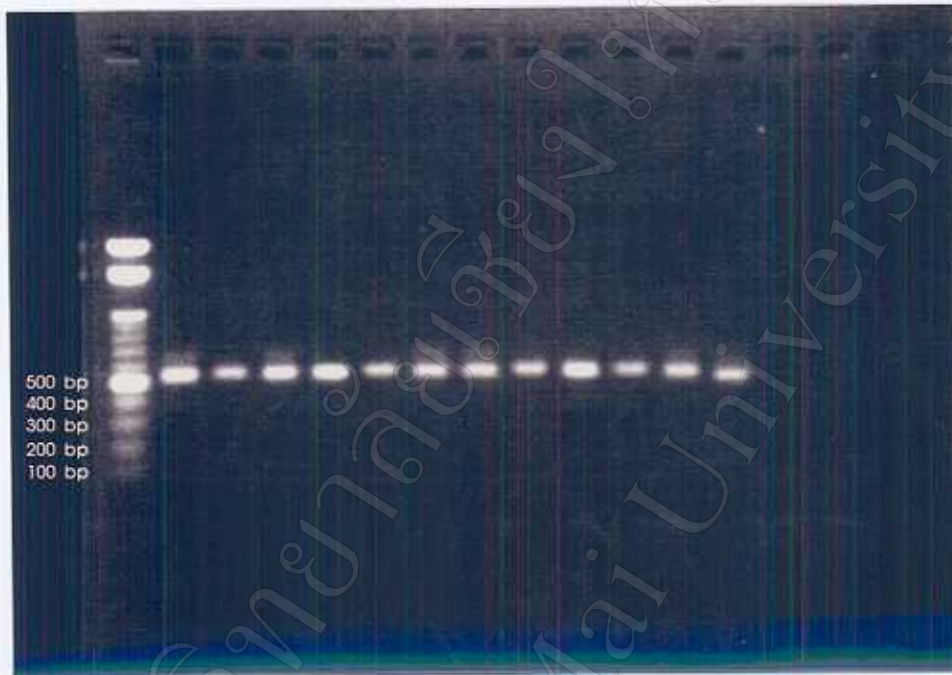
จากการนำเส้นใยของเชื้อราทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Roger และ Bendich(1988) เมื่อได้ทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่าในทุกตัวอย่างของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ชัดเจน โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนั้นมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของแถบที่ใหญ่ที่สุดของดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ Hind III

## 3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR พบว่าทุกตัวอย่างสามารถให้ผลผลิต PCR ได้ โดยดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 3

## 4. การวิเคราะห์ลำดับเบส

จากลำดับเบสที่ได้มากกว่า 500 คู่เบส ของเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 11 formae spaciales เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อรา *F. solani* พบว่า ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS1 มีขนาด 147 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง ยกเว้น *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ที่มีขนาด 148 คู่เบส ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS2 มีขนาด 151 คู่เบส และลำดับเบสในตำแหน่ง 5.8S rDNA มีขนาด 158 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 2) สำหรับเชื้อรา *F. solani* พบว่า ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS1 และ 5.8S rDNA มีขนาดเท่ากัน คือ 147 และ 158 คู่เบส ตามลำดับ ยกเว้น ในตำแหน่ง ITS2 ของเชื้อรา *F. solani* พบว่ามีขนาด 165 คู่เบส



ภาพที่ 3 PCR product ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณ rDNA ของเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 11 formae speciales และ *F. solani* ช่องที่ 1 คือ maker DNA ช่องที่ 2 คือ *F. oxysporum* f. sp. *adzukiicola* ช่องที่ 3 คือ *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* ช่องที่ 4 คือ *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ช่องที่ 5 คือ *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* ช่องที่ 6 คือ *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* ช่องที่ 7 คือ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 ช่องที่ 8 คือ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 ช่องที่ 9 คือ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersic* ช่องที่ 10 คือ *F. oxysporum* f. sp. *nicotiana* ช่องที่ 11 คือ *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ช่องที่ 12 คือ *F. oxysporum* f. sp. *raphani* ช่องที่ 13 คือ *F. solani*

ตารางที่ 2 ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง internal transcribed spacer และ 5.8S rDNA ของเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 11 formae speciales

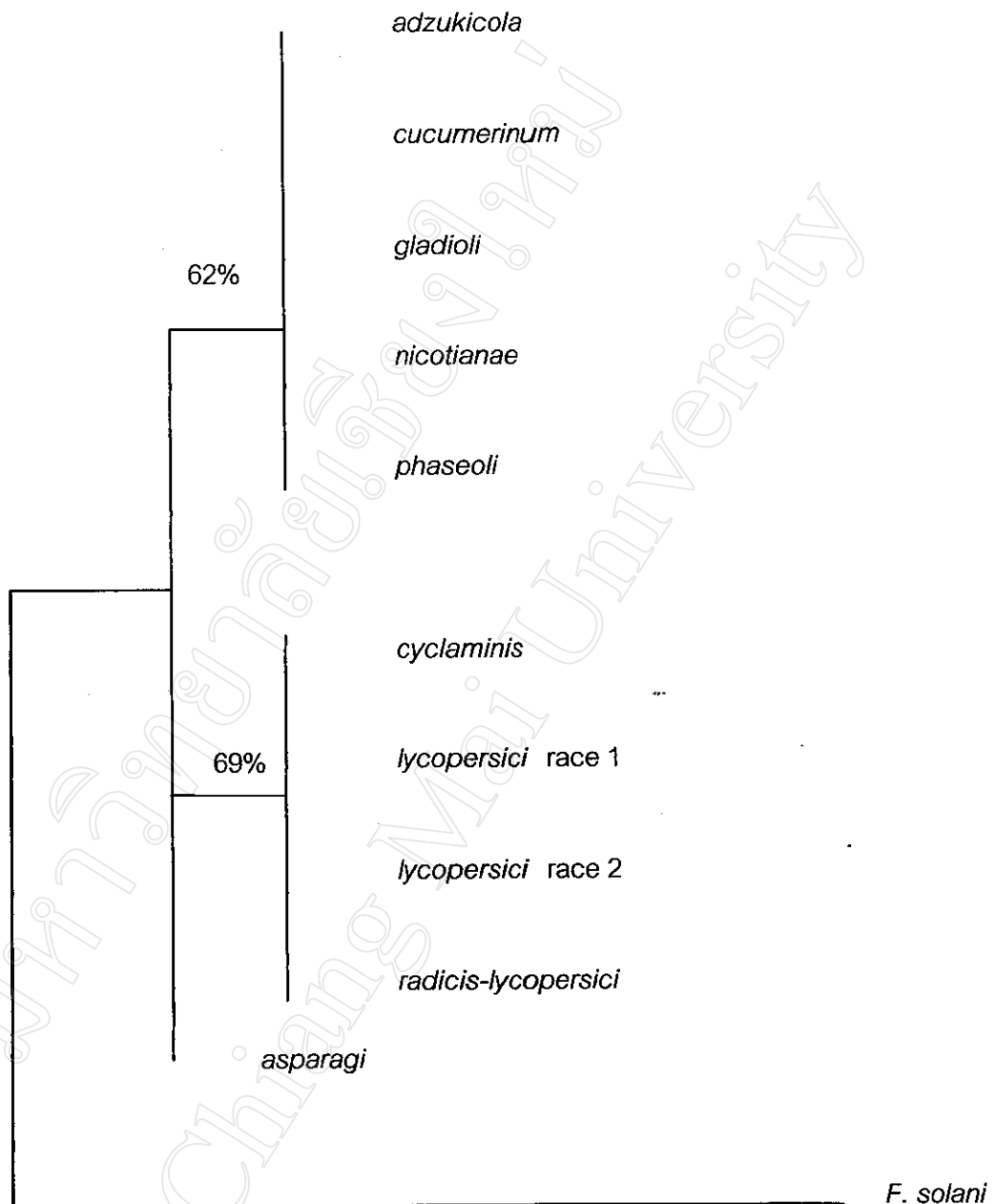
| Taxon                                   | Nucleotide length (nt) |           |      |       |
|-----------------------------------------|------------------------|-----------|------|-------|
|                                         | ITS1                   | 5.8S rDNA | ITS2 | Total |
| <i>F. o. f. sp. adzukicola</i>          | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. asparagi</i>            | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. cucumerinum</i>         | 148                    | 158       | 151  | 457   |
| <i>F. o. f. sp. cyclaminis</i>          | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. gladioli</i>            | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> race 1  | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> race 2  | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. radicle-lycopersici</i> | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. nicotianae</i>          | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. phaseoli</i>            | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. o. f. sp. raphani</i>             | 147                    | 158       | 151  | 456   |
| <i>F. solani</i>                        | 147                    | 158       | 165  | 470   |

##### 5. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการจากลำดับเบส

จากลำดับเบสที่ได้ของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 11 formae speciales เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและค่า genetic distance (ตารางที่ 3) โดยใช้ลำดับเบสตำแหน่ง ITS1, 5.8S rDNA และ ITS2 ของเชื้อรา *F. solani* เป็น out group โดยวิธี Parsimony ผลที่ได้พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราทั้ง 11 formae speciales ออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *adzukicola*, *gladioli*, *raphani*, *cucumerinum*, *phaseoli*, *nicotianae* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *cyclaminis*, *lycopersici* race 1, *lycopersici* race2, *radicle-lycopersici* และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *asparagi* เมื่อพิจารณาค่า genetic distance ของลำดับเบส ( ตารางที่ 3) พบว่ามีค่าระหว่าง 0 – 4.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระหว่างเชื้อรา formae speciales *asparagi* กับเชื้อราใน formae speciales อื่นๆ และ out group พบว่ามีค่า genetic distance เป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราทั้ง 10 formae speciales และเป็น 4.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ out group นอกจากนี้ยังพบว่าไม่สามารถใช้ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS1, 5.8S rDNA และ ITS2 ในการจัดจำแนกเชื้อราภายในกลุ่มที่ 1 (*adzukicola*, *gladioli*, *raphani*, *cucumerinum*, *phaseoli*, *nicotianae*) ได้เนื่องจากมีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า genetic distance เท่ากับ 0.0 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบสในตำแหน่งดังกล่าวก็ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อราภายในกลุ่มที่ 2 (*cyclaminis*, *lycopersici* race 1, *lycopersici* race 2, *radicis-lycopersici*) ได้เนื่องจากมีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า genetic distance เท่ากับ 0.0 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน





ภาพที่ 4 phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS1, 5.8S rDNA และ ITS2 ของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 11 formae speciales โดยมีรา *F. solani* เป็น out group (bootstrapping จำนวน 1000 ซ้ำ)