

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. สันฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราทั้งหมดบนอาหาร PDA เพื่อบันทึกลักษณะโคโลนี และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน พร้อมทั้งตรวจดูโครงสร้างและขนาดของ microconidia และ macroconidia จากการทำ slide culture ซึ่งผลจากการศึกษาลักษณะดังกล่าว พบว่า เส้นใยมีความละเอียด พู และหนา ส่วนสีของโคโลนีที่พบคือ สีขาว ชมพู และม่วง เมื่อพลิกดูได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จะยังคงให้สีของโคโลนีเหมือนเดิม อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน คือ 2.93 เซนติเมตร ใช้เวลาในการเจริญเต็มจานอาหาร 8-10 วัน สำหรับลักษณะโครงสร้างของ microconidia พบทั้งแบบทรงรี และทรงกระบอก มี 1-2 เซลล์ ขนาดอยู่ในช่วง 5.91-10.05 ไมครอน ส่วน macroconidia มีเพียงลักษณะเดียวคือ ทรงเลี้ยวพระจันทร์ซึ่งมีหัวท้ายเรียวแหลม พบ 1-3 septate ซึ่งมีขนาด 22.18-33.15 ไมครอน รายละเอียดของแต่ละ forma specialis แสดงไว้ในตารางที่ 3 และภาพที่ 1-2

2. ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales

2.1 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

เมื่อนำ DNA ของเชื้อราจำนวน 15 formae speciales ที่สกัดได้แต่ละชนิดมาตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน (Lambda DNA) ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร พบว่า ให้ปริมาณ DNA อยู่ในช่วง ต่ำกว่า 25-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร กล่าวคือ formae speciales ที่มีความเข้มข้นของ DNA ต่ำกว่า 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร คือ *conglutinans*, *cucumerinum*, *lagenariae*, *luffae* และ *pini* ความเข้มข้นของ DNA 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร คือ *apii*, *fragariae*, *melonis* ความเข้มข้นของ DNA 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร คือ *adzukicola*, *asparagi*, *cepae*, *lini*, *narcissi*, *phaseoli*, *vasinfectum* รวมทั้ง *F. moniliforme* กับ *F. solani* (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ	ลักษณะโคโลนี	สีโคโลนี	microconidia			macroconidia			อัตราการเจริญ/วัน (cm)
			รูปร่าง	ขนาด (µ)	จำนวน septa	รูปร่าง	ขนาด (µ)	จำนวน septa	
<i>adzukicola</i>	ฟู ละเอียดหนา	ม่วงเข้ม	ทรงกระบอก	7.97*	1	เดี่ยวพระจันทร์	29.63*	1-3	2.98**
<i>apil</i>	ฟู ละเอียดหนา	ขาว	ทรงรี	9.42	-	เดี่ยวพระจันทร์	27.71	1-3	2.82
<i>asparagi</i>	ฟู หยาบบาง	ขาวปนม่วง	ทรงรี	6.22	-	เดี่ยวพระจันทร์	32.61	2-3	3.14
<i>cepae</i>	ฟู ละเอียดหนา	ขาว	ทรงรี	9.25	-	เดี่ยวพระจันทร์	26.99	1-3	3.14
<i>conglutinans</i>	ฟู ละเอียดหนา	ม่วงเข้ม	ทรงรี	6.54	-	เดี่ยวพระจันทร์	27.74	2-3	2.91
<i>cucumerinum</i>	ฟู ละเอียดหนา	ม่วงอ่อน	ทรงกระบอก	10.02	1	เดี่ยวพระจันทร์	26.73	1-3	2.91
<i>fragariae</i>	ฟู ละเอียดหนา	ขาวปนม่วง	ทรงรี	10.05	-	เดี่ยวพระจันทร์	26.47	2-3	2.91
<i>lagenariae</i>	ฟู ละเอียดหนา	ม่วงอ่อน	ทรงกระบอก	9.45	-	เดี่ยวพระจันทร์	27.44	2-3	3.13
<i>lini</i>	ฟู ละเอียดบาง	ขาว	ทรงรี	9.68	-	เดี่ยวพระจันทร์	26.98	1-3	2.67
<i>luffae</i>	ฟู ละเอียดหนา	ม่วงอ่อน	ทรงรี	5.91	-	เดี่ยวพระจันทร์	28.46	2-3	2.82
<i>melonis</i>	ฟู ละเอียดหนา	ม่วงเข้ม	ทรงกระบอก	9.55	-	เดี่ยวพระจันทร์	27.24	1-3	2.82
<i>narcissi</i>	ฟู ละเอียดบาง	ขาวปนม่วง	ทรงกระบอก	9.77	1	เดี่ยวพระจันทร์	30.07	2-3	3.15
<i>pini</i>	ฟู ละเอียดหนา	ขาว	ทรงรี	9.42	-	เดี่ยวพระจันทร์	29.46	2-3	2.68
<i>phaseoli</i>	ฟู ละเอียดหนา	ขาวปนม่วง	ทรงกระบอก	9.77	-	เดี่ยวพระจันทร์	22.1	1-3	2.91
<i>vasinfectum</i>	ฟู ละเอียดหนา	ม่วงอ่อน	ทรงกระบอก	9.25	-	เดี่ยวพระจันทร์	33.15	2-3	2.67
<i>F.moniliforme</i>	ฟู ละเอียดหนา	ม่วง	ทรงกระบอก	9.51	1	เดี่ยวพระจันทร์	27.36	2-3	2.52
<i>F.solani</i>	ฟู ละเอียดหนา	ชมพู	ทรงกระบอก	8.79	-	เดี่ยวพระจันทร์	41.98	2-3	2.78

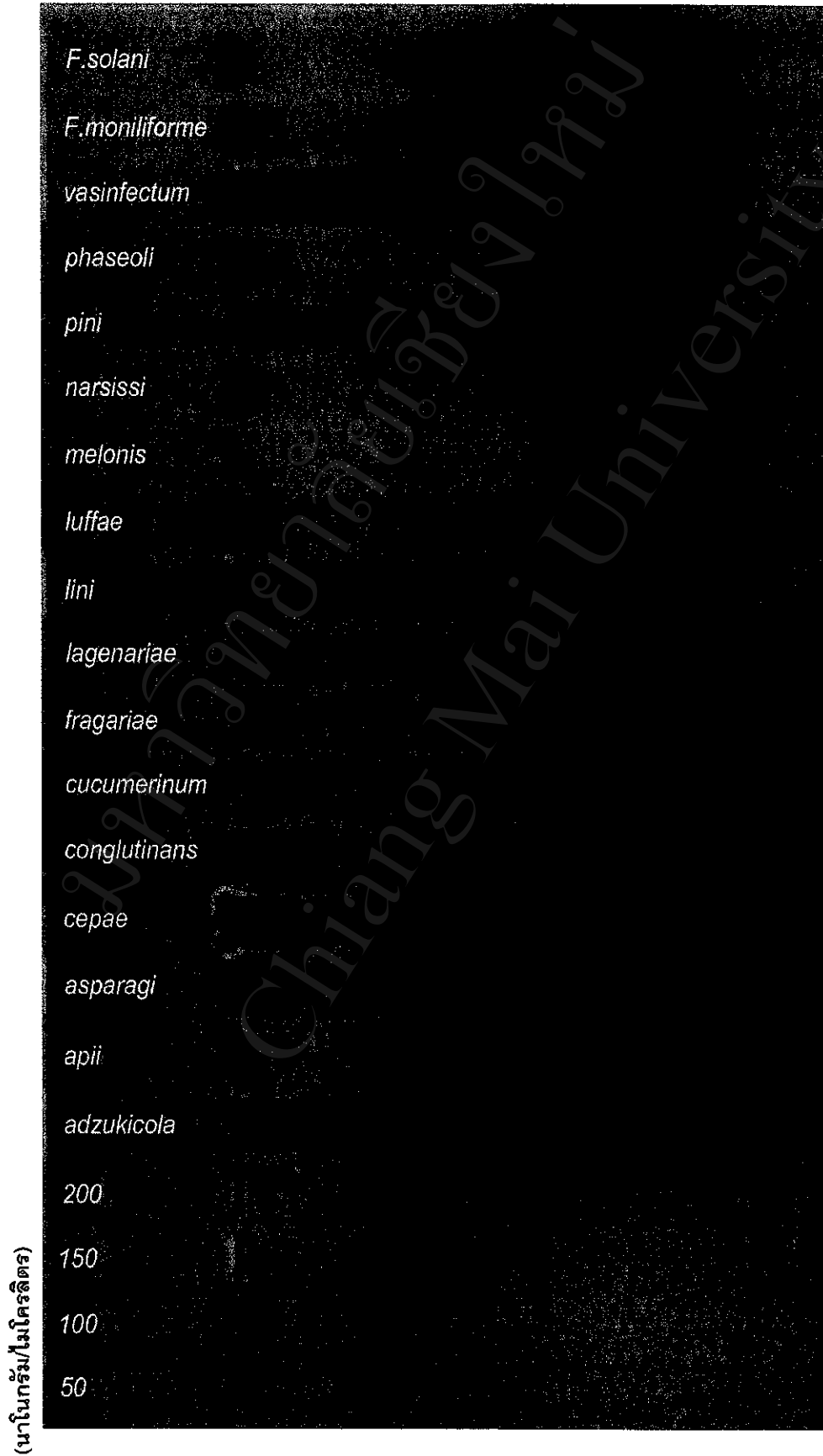
* ค่าเฉลี่ยจาก 50 ซ้ำ, ** ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales บนอาหาร PDA อายุ 8 วัน



ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales
 ที่กำลังขยาย 100X



ภาพที่ 3 ปริมาณ DNA ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ภายหลังจากตรวจสอบด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

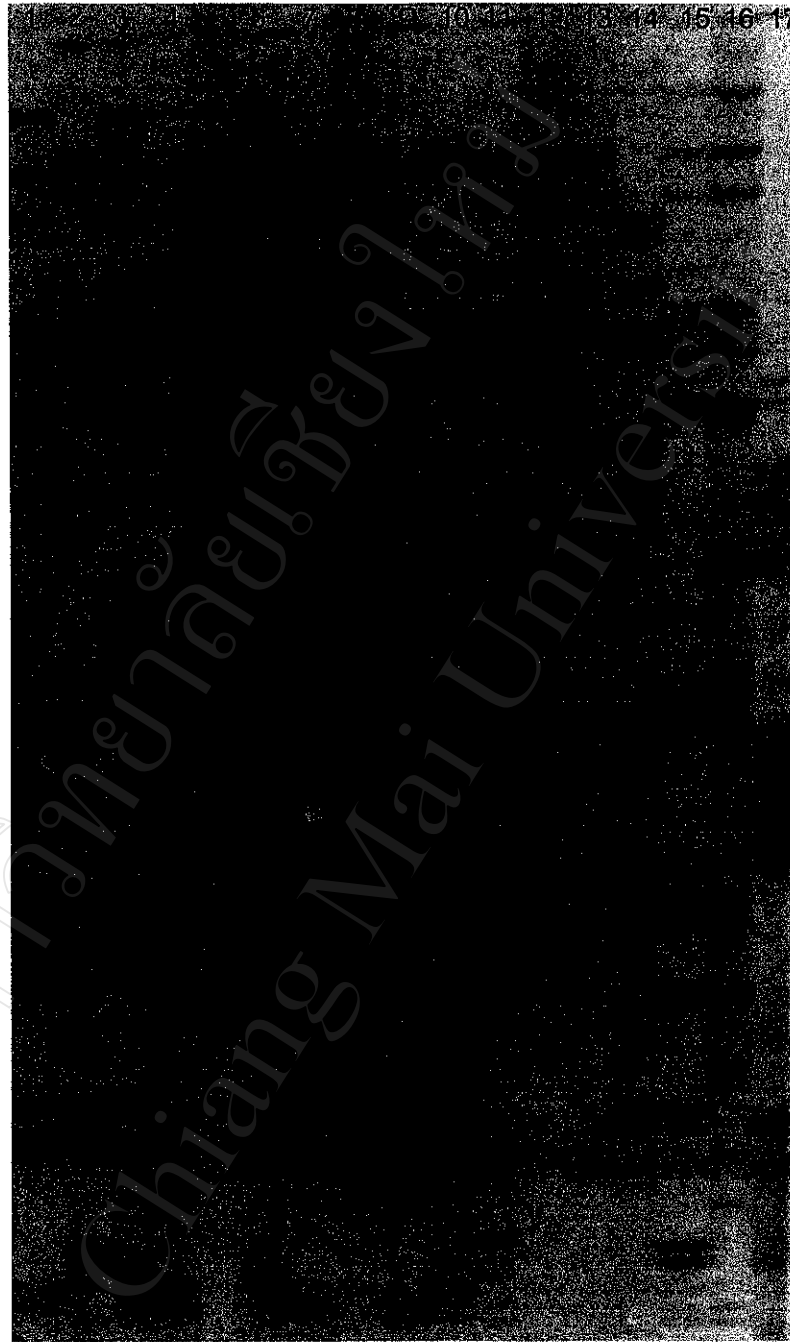
Agarose Gel Electrophoresis เทียบกับบีบีดีเอ็นเอมาตรฐาน (lambda DNA)

สำหรับค่า DNA มาตรฐานในภาพคือ lambda DNA ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ

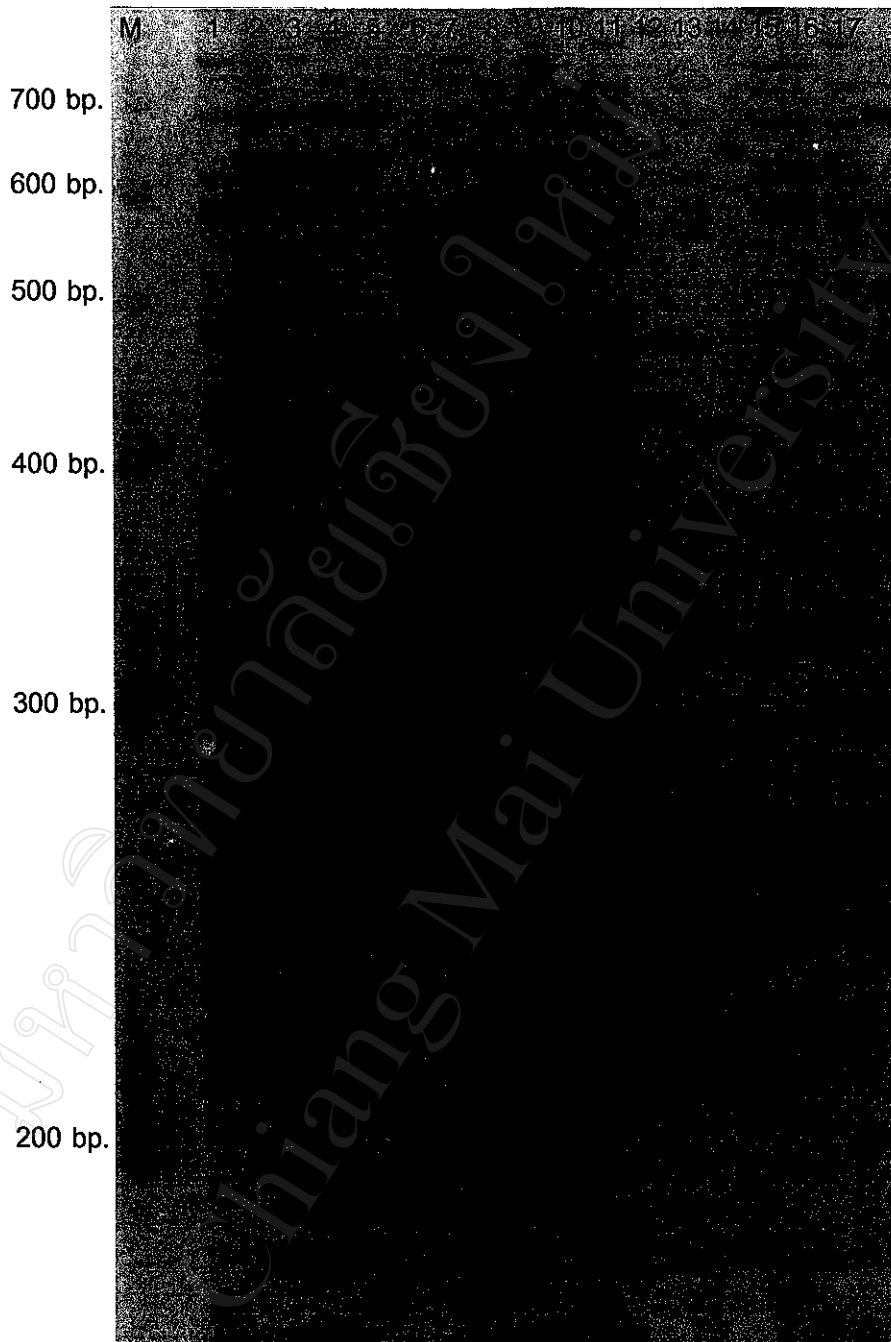
2.2 การวิเคราะห์หลายพหุติเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

เมื่อนำ DNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร มาย่อยด้วย เอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* (10 ยูนิต/ไมโครลิตร) โดยการตรวจสอบบน agarose gel electrophoresis ซึ่งพบว่าสามารถย่อยได้อย่างสมบูรณ์ สังเกตจากการไม่ปรากฏแถบ DNA บน เจล หลังจากเชื่อมต่อกับ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter พบว่า DNA ที่ถูกย่อยจะเคลื่อน ผ่านเจลในลักษณะเป็นปื้น (smear) เมื่อนำไปทำ PCR 2 ครั้งพบว่า primer ทั้ง 4 คู่ ได้แก่ ER-A/MS-CAG (ภาพที่ 4) และ ER-C/MS-CAC (ภาพที่ 5) ER-A/MS-CAT (ภาพที่ 6), และ ER-AC/MS-C (ภาพที่ 7) สามารถให้จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 323 แถบ ซึ่งมีแถบ DNA ที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) 155 แถบ หรือ 47.99% โดยขนาดของแถบ DNA ที่เหมาะสมและมีความ ชัดเจนสำหรับบันทึกข้อมูลในการเกิด polymorphic band ของ primer ทั้ง 4 คู่ จะมีขนาดอยู่ใน ช่วง 200-600 base pair สำหรับข้อมูลที่บันทึกการเกิด polymorphic band บนตาราง matrix ที่ จะนำไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อไปนั้น แสดงไว้ในตารางภาคผนวกที่ 1-4 นอกจากนี้แต่ละคู่ primer ยังสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้ ซึ่งแสดงลายพิมพ์ DNA ที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละสปีชีส์ แต่ก็พบว่าภายในสปีชีส์เดียวกันยังมีแถบ DNA ที่แตกต่างกันอยู่ บางส่วน ดังนั้น แต่ละคู่ primer มีจำนวนรูปแบบ (pattern) ของแถบ DNA ที่ต่างกัน โดย primer คู่ ER-A/MS-CAG บอกความแตกต่างได้ 40 pattern, ER-A/MS-CAC 45 pattern, ER-A/MS-CAT 35 pattern และ ER-AC/MS-C 35 pattern (ตารางที่ 4)

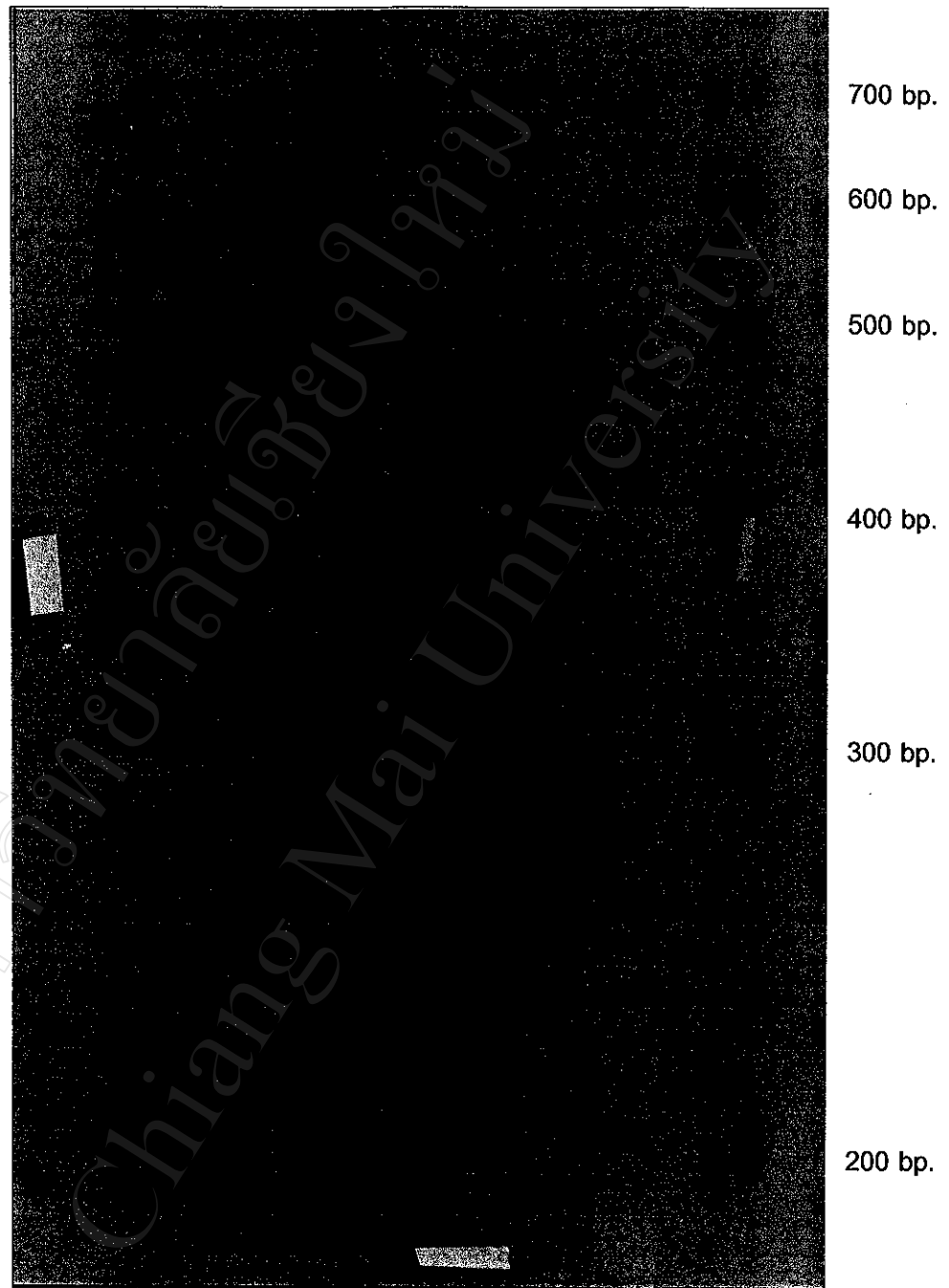
เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc เพื่อจัดกลุ่มเชื้อราทั้งหมด ซึ่ง สามารถแบ่งได้ 9 กลุ่ม ที่ค่า similarity 0.70 โดยกลุ่มที่ 1 คือ *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *F. o.* f.sp. *phaseoli*, *F. o.* f.sp. *adzukicola*, *F. o.* f.sp. *cucumerinum*, *F. o.* f.sp. *melonis*, *F. o.* f.sp. *luffae* และ *F. o.* f.sp. *lagenaria* กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *F. o.* f.sp. *narscissi*, *F. o.* f.sp. *cepae* และ *F. o.* f.sp. *asparagi* กลุ่มที่ 4 คือ *F. o.* f.sp. *lini* กลุ่มที่ 5 คือ *F. o.* f.sp. *fragariae* กลุ่มที่ 6 คือ *F. o.* f.sp. *vasinfectum* กลุ่มที่ 7 คือ *F. o.* f.sp. *apii* กลุ่มที่ 8 คือ *F. o.* f.sp. *pini* และกลุ่มที่ 9 ประกอบด้วย *F. monilliformei* และ *F. solani* (ภาพที่ 8) หลังจากการทำ cluster analysis ตรวจสอบ goodness of fit โดยใช้โปรแกรม COPH และ MXCOMP ได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95336 ซึ่งแปลความได้ว่า cluster นี้มี goodness of fit ดีมาก



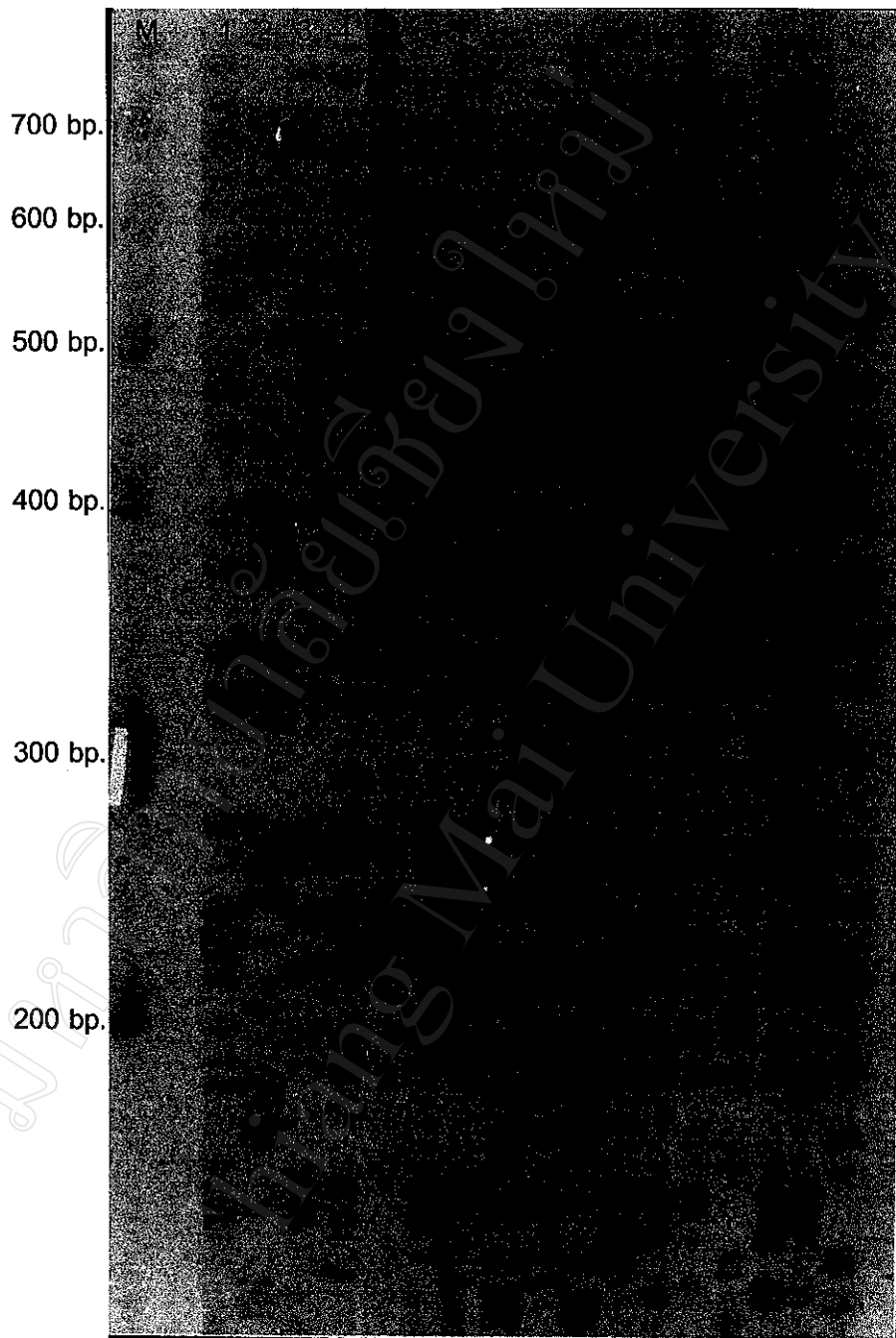
ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer ER-A/MS-CAC
 ช่องที่ 1-15 คือ *adzukicola*, *apii*, *asparagi*, *cepae*, *conglutinans*, *cucumerinum*, *fragariae*, *lagenariae*, *lini*, *luffae*, *melonis*, *narcissi*, *pini*, *phaseoli*, *vasinfectum*,
 ช่องที่ 16-17 คือ *F. moniliforme* และ *F. solani* ตามลำดับ



ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer ER-AMS-CAG ช่องที่ 1-15 คือ *adzukicola*, *apii*, *asparagi*, *cepa*, *conglutinans*, *cucumerinum*, *fragariae*, *lagenariae*, *lini*, *luffae*, *melonis*, *narcissi*, *pini*, *phaseoli*, *vasinfectum*, ช่องที่ 16-17 คือ *F. moniliforme* และ *F. solani* ตามลำดับ (M คือ 100 base pair marker)



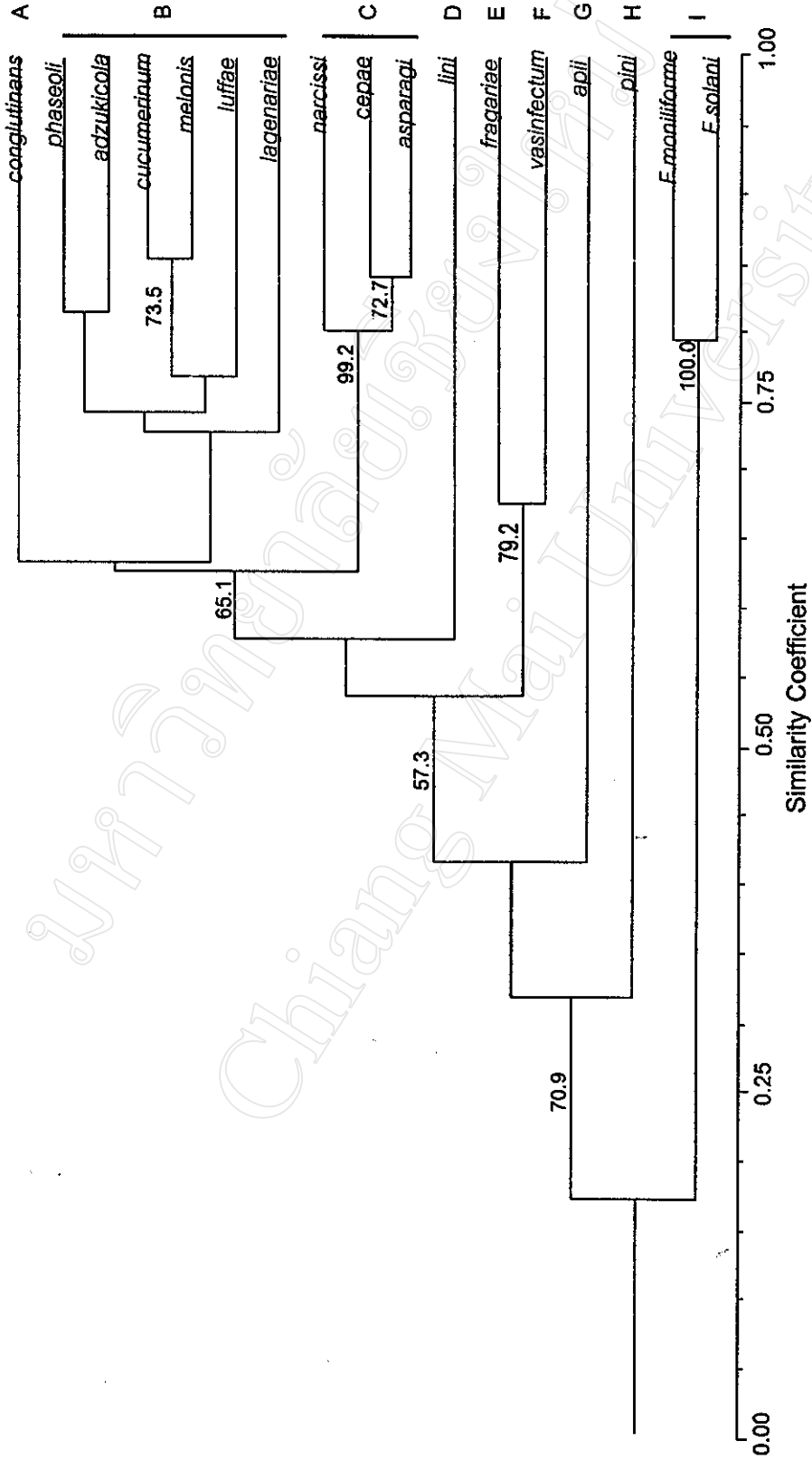
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer ER-AMS-CAT ช่องที่ 1-15 คือ *adzukicola*, *apii*, *asparagi*, *cepaie*, *conglutinans*, *cucumerinum*, *fragariae*, *lagenariae*, *lini*, *luffae*, *melonis*, *narcissi*, *pini*, *phaseoli*, *vasinfectum*, ช่องที่ 16-17 คือ *F. moniliforme* และ *F. solani* ตามลำดับ (M คือ 100 base pair marker)



ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer ER-AC/MS-C ช่องที่ 1-15 คือ *adzukicola*, *apii*, *asparagi*, *cepae*, *conglutinans*, *cucumerinum*, *fragariae*, *lagenariae*, *lini*, *luffae*, *melonis*, *narcissi*, *pini*, *phaseoli*, *vasinfectum*, ช่องที่ 16-17 คือ *F. moniliforme* และ *F. solani* ตามลำดับ (M คือ 100 base pair marker)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวน polymorphic band ที่เกิดขึ้นจากการใช้ primer จำนวน 4 คู่

primer	polymorphic band	Total bands
A/CAC	40	85
A/CAG	45	85
A/CAT	35	63
AC/C	35	90
Total	155	323



ภาพที่ 8 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales จากการวิเคราะห์หลายมิติด้วยวิธี UPGMA (polymorphic band) โดยวิธี UPGMA

ค่า Dice's similarity coefficient สามารถแบ่งเชื้อราเป็น 9 กลุ่ม ที่ค่า similarity เท่ากับ 0.70 ตัวเลขที่แสดงบน dendrogram คือค่า Bootstrap ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Winboot (1000 ซ้ำ) r=0.95