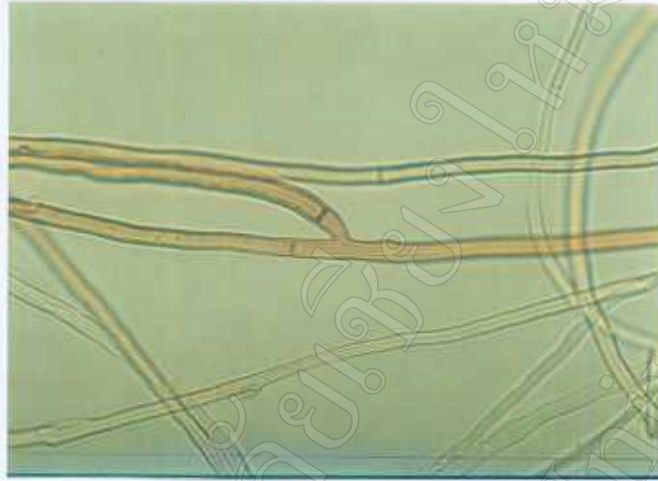


บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกและการจัดจำแนกเชื้อ *Rhizoctonia* spp. สาเหตุโรครากเน่าในสตรอเบอรี่

ผลการแยกเชื้อจากรากสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวใน 5 พื้นที่เพาะปลูกของจังหวัด เชียงใหม่ และเชียงราย ได้เชื้อราที่มีลักษณะเฉพาะของรา *Rhizoctonia* spp. คือ ไม่สร้างโคนิเดีย มีการแตกแขนงของเส้นใยใกล้ผนังกันด้านปลาย เส้นใยที่แตกแขนงมีรอยคอดและสร้างผนังกัน ใกล้จุดแตกแขนง (ภาพที่ 3) จำนวนทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท เมื่อทำการย้อมนิวเคลียสด้วยสี Geimsa และตรวจนับจำนวนพบ เชื้อราที่มีจำนวนนิวเคลียสในแต่ละเซลล์เท่ากับสอง (binucleate) จำนวน 68 ไอโซเลท (97%) ส่วนใหญ่มีโคโลนีเป็นสีขาวครีม ดังแสดงในภาพที่ 4 และพบเชื้อราที่มีจำนวน นิวเคลียสในแต่ละเซลล์มากกว่าสอง (multinucleate) จำนวน 2 ไอโซเลท (3%) มีโคโลนีสีน้ำตาล ดังแสดงในภาพที่ 5 หลังจากจำแนกออกเป็น anastomosis group (AG) จากความสามารถในการ รวมเส้นใยกับ tester strain พบ binucleate *Rhizoctonia* AG-A จำนวน 29 ไอโซเลท (41.5%) AG-G 26 ไอโซเลท (37.1%) AG-P 5 ไอโซเลท (7.1%) และที่ไม่สามารถจำแนกได้ (unknown) 10 ไอโซเลท (14.3%) แบ่งออกเป็น unknown binucleate 8 ไอโซเลท และ unknown multinucleate 2 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาตามพื้นที่เก็บตัวอย่างพบว่า เชื้อที่พบในตัวอย่างจาก สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์จำนวน 14 ไอโซเลท เป็น binucleate ทั้งหมด ประกอบด้วย AG-A 7 ไอโซเลท และ AG-G 7 ไอโซเลท เชื้อที่พบในตัวอย่างจากแปลงเกษตรกรบ้านบ่อแก้ว จำนวน 18 ไอโซเลท เป็น binucleate ทั้งหมดเช่นกัน ประกอบด้วย AG-A 8 ไอโซเลท AG-G 5 ไอโซเลท และ AG-P 5 ไอโซเลท เชื้อที่พบในตัวอย่างจากแปลงเกษตรกรอำเภอแม่ริมจำนวน 20 ไอโซเลทเป็น binucleate 18 ไอโซเลท ประกอบด้วย AG-A 4 ไอโซเลท AG-G 14 ไอโซเลท และเป็น multinucleate จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ ตัวอย่างจากสถานีวิจัยโครงการ หลวงอ่างช้างพบ binucleate *Rhizoctonia* AG-A เพียงอย่างเดียวจำนวน 9 ไอโซเลท และตัวอย่าง จากแปลงเกษตรกรบ้านห้วยน้ำรินพบจำนวน 9 ไอโซเลทเป็น binucleate *Rhizoctonia* AG-A 1 ไอโซเลท และที่ไม่สามารถจำแนกได้ 8 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 3 ลักษณะเส้นใยของราในสกุล *Rhizoctonia*



ก.

ข.

ภาพที่ 4 ลักษณะนิวเคลียส และ โคลนิจของรา binucleate *Rhizoctonia*

- ก. นิวเคลียสของรา binucleate *Rhizoctonia* คัดสีน้ำเงินเข้มหลังย้อมด้วย Geimsa stain
- ข. โคลนิจของเชื้อรา binucleate *Rhizoctonia* อายุ 7 วัน บนอาหาร PDA มีสีขาว



ก.

ข.

ภาพที่ 5 ลักษณะนิวเคลียสและ โคลินิของเชื้อรา multinucleate *Rhizoctonia*

ก. นิวเคลียสของรา multinucleate *Rhizoctonia* ติดสีน้ำเงินเข้มหลังย้อมด้วย Geimsa stain

ข. โคลินิของเชื้อรา multinucleate *Rhizoctonia* อายุ 7 วัน บนอาหาร PDA มีสีน้ำตาล

ตารางที่ 4 จำนวนนิวเคลียส และ anastomosis group (AG) ของเชื้อ *Rhizoctonia* spp. ที่แยกได้จาก แหล่งปลูกศรอกเขอรี 5 แห่ง

แหล่ง	จำนวน (ไอโซเลต)	จำนวนนิวเคลียส		Anastomosis group (AG)			
		binucleate	multinucleate	A	G	P	unknown
แม่ริม	20	18	2	4	14	-	2(multi)
บ่อแก้ว	18	18	-	8	5	5	-
อินทนนท์	14	14	-	7	7	-	-
อ่างขาง	9	9	-	9	-	-	-
ห้วยน้ำริน	9	9	-	1	-	-	8(bi)
รวม	70	68 (97%)	2 (3%)	29 (41.5%)	26 (37.1%)	5 (7.1%)	10 (14.3%)

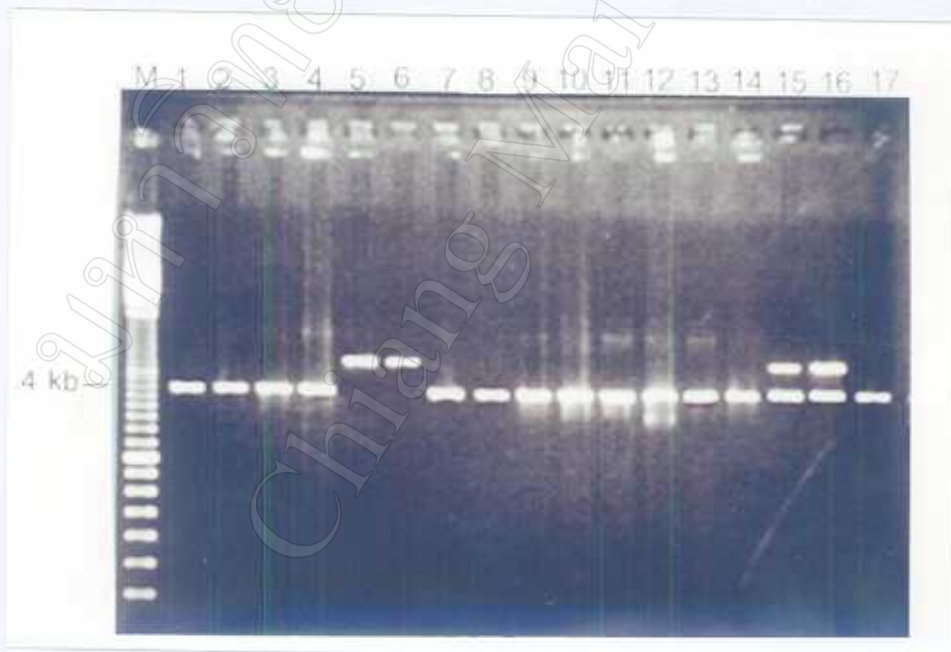
2. การแยกกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณในส่วนของ 28S rDNA และ ITS1-5.8S-ITS2 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 และ 8 ชนิดตามลำดับ ได้ผลดังต่อไปนี้

2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA

จากการใช้ primer LROR/LR7 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA ของตัวอย่างทั้ง 75 ไอโซเลท พบ PCR-product 2 ขนาดคือ 1.4 กิโลเบส และ 1.8 กิโลเบส (ภาพที่ 6) ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกตามขนาด PCR-product ได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มี PCR-product ขนาด 1.4 กิโลเบส มีจำนวนทั้งสิ้น 50 ไอโซเลท กลุ่มที่มี PCR-product ขนาด 1.8 กิโลเบส มีจำนวนทั้งสิ้น 19 ไอโซเลท และกลุ่มที่มี PCR-product ขนาด 1.4 และ 1.8 กิโลเบส มีจำนวนทั้งสิ้น 6 ไอโซเลท



ภาพที่ 6 PCR-product ของ *Rhizoctonia* spp. จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA ด้วย primer LROR/LR7

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Amersham Pharmacia, USA) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G, 3: MR04, 4: MR19, 5: BK01, 6: BK02, 7: AK03, 8: AK04, 9: AK05, 10: AK06, 11: AK07, 12: AK08, 13: AK09, 14: IN02, 15: IN11, 16: IN12, 17: IN14

2.1.2 การตัด PCR-product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

HhaI หลังจากนำดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* แล้วตรวจผลบน 1.5% agarose พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 8 แถบมีขนาดตั้งแต่ 140 – 1,040 คู่เบส (bp) และมีรูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมด 9 รูปแบบ (ภาพที่ 7) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 9 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 8 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกันทั้งหมดคือ กลุ่มที่ 2 – 9 และมีเพียงกลุ่มเดียวที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อต่าง AG กันคือ กลุ่มที่ 1 ซึ่งพบ AG-G จัดรวมอยู่กับ AG-P ดังแสดงในภาพที่ 9

TaqI หลังจากนำดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* แล้วตรวจผลบน 1.5% agarose พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 8 แถบมีขนาดตั้งแต่ 250 – 980 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 รูปแบบ (ภาพที่ 7) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 7 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 5 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกัน คือ กลุ่มที่ 1, 2, 3, 5 และ 7 และมี 2 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ต่าง AG กัน คือกลุ่มที่ 4 พบ AG-A จัดอยู่รวมกับเชื้อ multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้ (Unk-multi) และกลุ่มที่ 6 พบ AG-A และ AG-G จัดรวมอยู่กับเชื้อ binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้ (Unk-bi) ดังแสดงในภาพที่ 10

MspI หลังจากนำดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* แล้วตรวจผลบน 1.5% agarose พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 9 แถบมีขนาดตั้งแต่ 220 – 900 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 รูปแบบ (ภาพที่ 8) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 8 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 6 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกัน คือ กลุ่มที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 8 และมี 2 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ต่าง AG กัน คือกลุ่มที่ 1 พบ AG-G จัดรวมอยู่กับ AG-P และกลุ่มที่ 7 พบ AG-A จัดรวมอยู่กับ Unk-bi ดังแสดงในภาพที่ 11

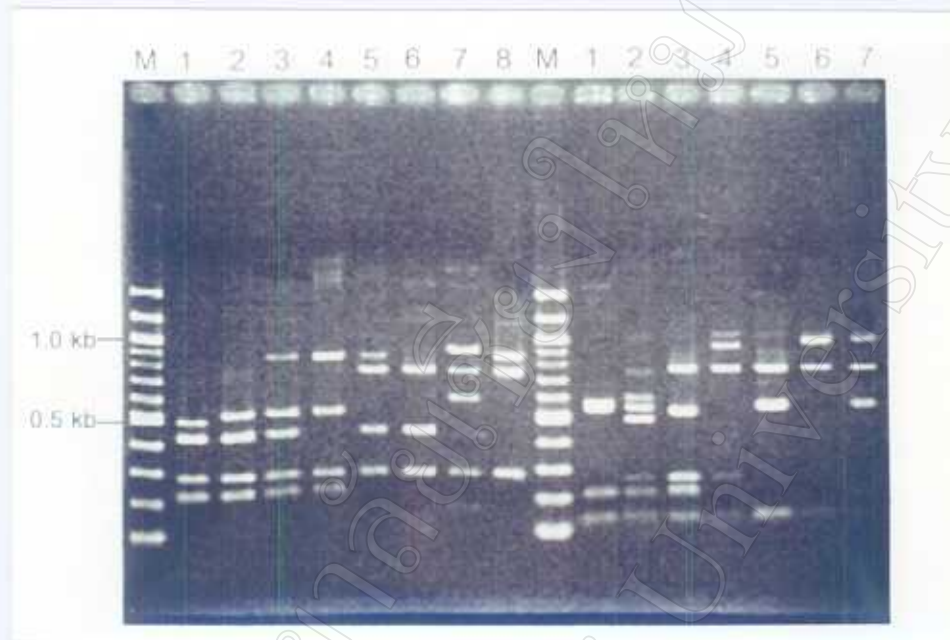
MboI หลังจากนำดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI* แล้วตรวจผลบน 1.5% agarose พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 7 แถบมีขนาดตั้งแต่ 120 – 1,000 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมด 7 รูปแบบ (ภาพที่ 7) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้ว แสดงผลในรูป dendrogram พบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 7 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 6 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกัน คือ กลุ่มที่ 2 – 7 และมีเพียงกลุ่มเดียวที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อต่าง AG กัน คือ กลุ่มที่ 1 พบ AG-A, AG-G, AG-P และ Unk-bi จัดรวมอยู่ด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 7 รูปแบบดีเอ็นเอหลังการตัดดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

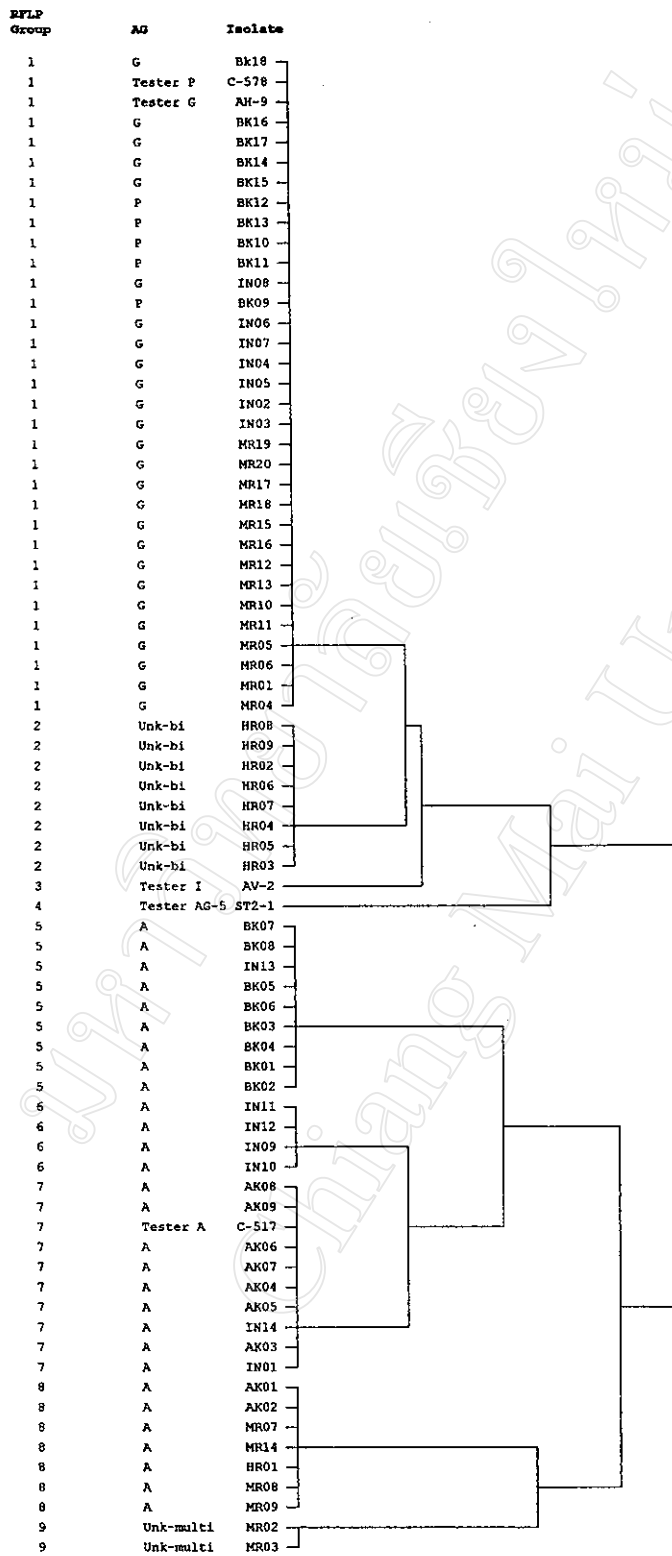
HhaI และ *TaqI*

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (NEB, UK) 1 – 9 รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* ไอโซเลท AK06, MR04, tester AG-I, IN11, HR05, BK07, MR07, MR02 และ tester AG-5 ตามลำดับ 10 – 16 รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* ไอโซเลท MR13, tester AG-I, BK13, MR04, IN09, BK02 และ tester AG-5 ตามลำดับ



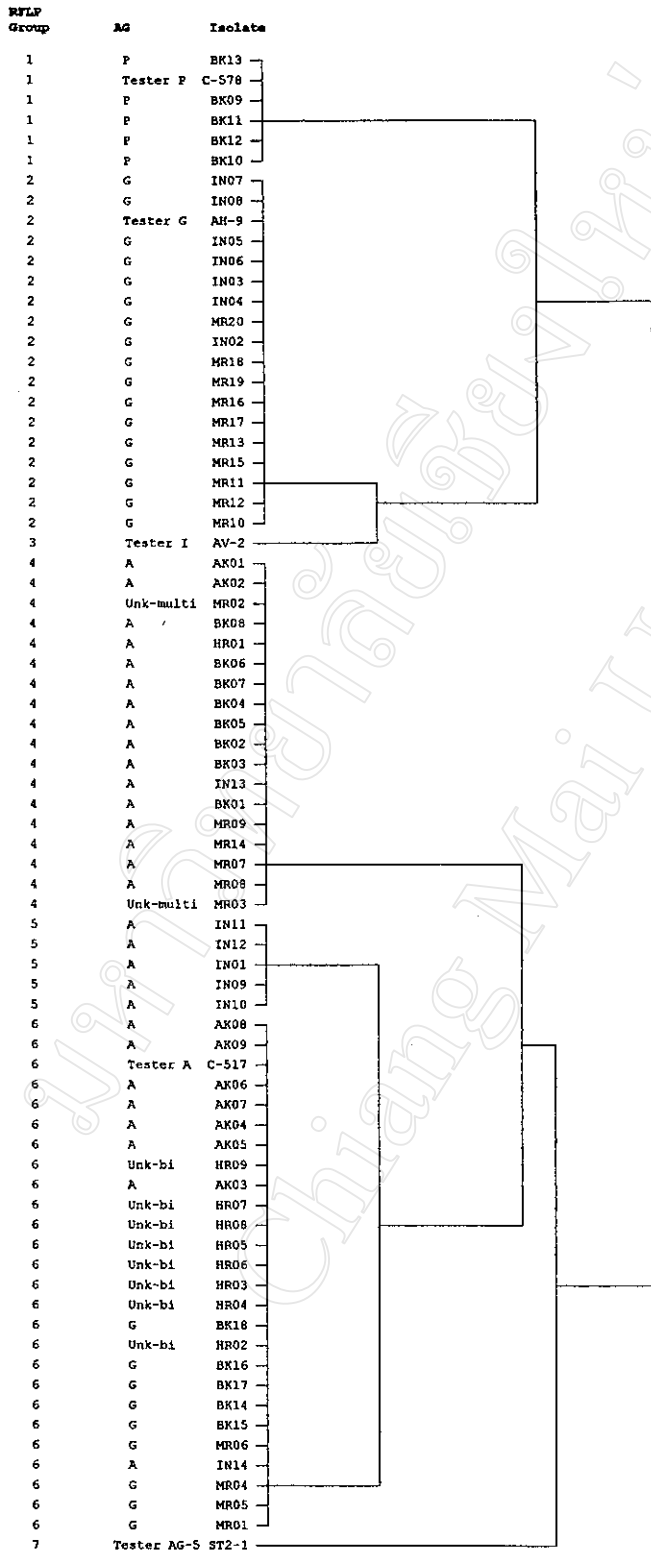
ภาพที่ 8 รูปแบบดีเอ็นเอหลังการตัดดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* และ *MboI*

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (NEB, UK) 1 – 8 รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* ไอโซเลท MR11, HR05, IN12, BK07, tester AG-I, BK13, tester AG-5 และ MR02 ตามลำดับ 9 – 15 รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI* ไอโซเลท MR10, tester AG-I, MR02, tester AG-5, MR04, BK04 และ IN12 ตามลำดับ



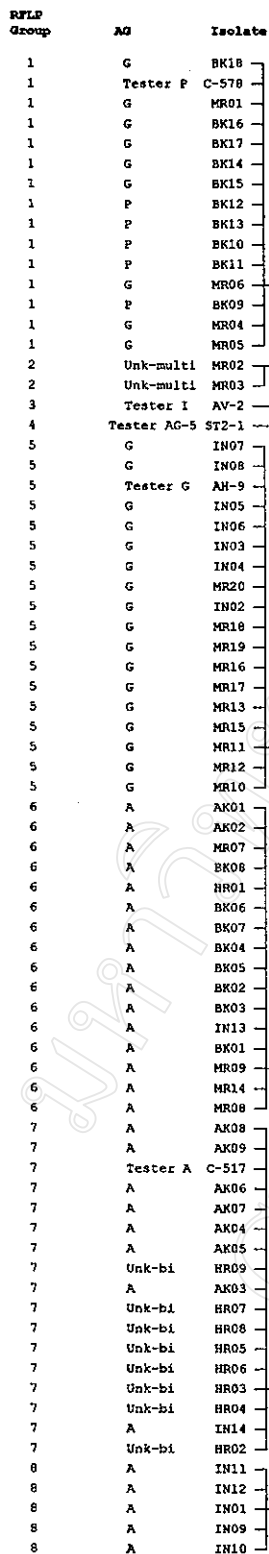
AK = อ่างซาง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวน้ำริน, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 9 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 75 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI*



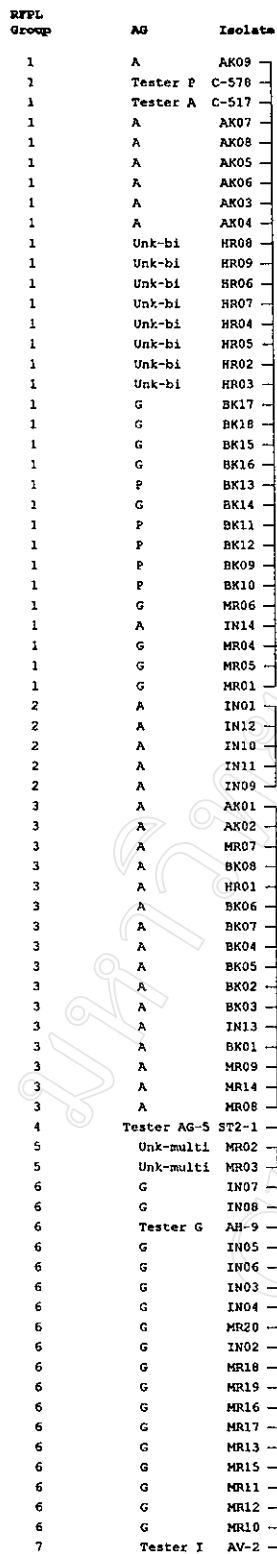
AK = อ่างขาง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวน้ำริน, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 10 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 75 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI*



AK = อ่างขาง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวน้าริน, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 11 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 75 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในส่วน 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI*

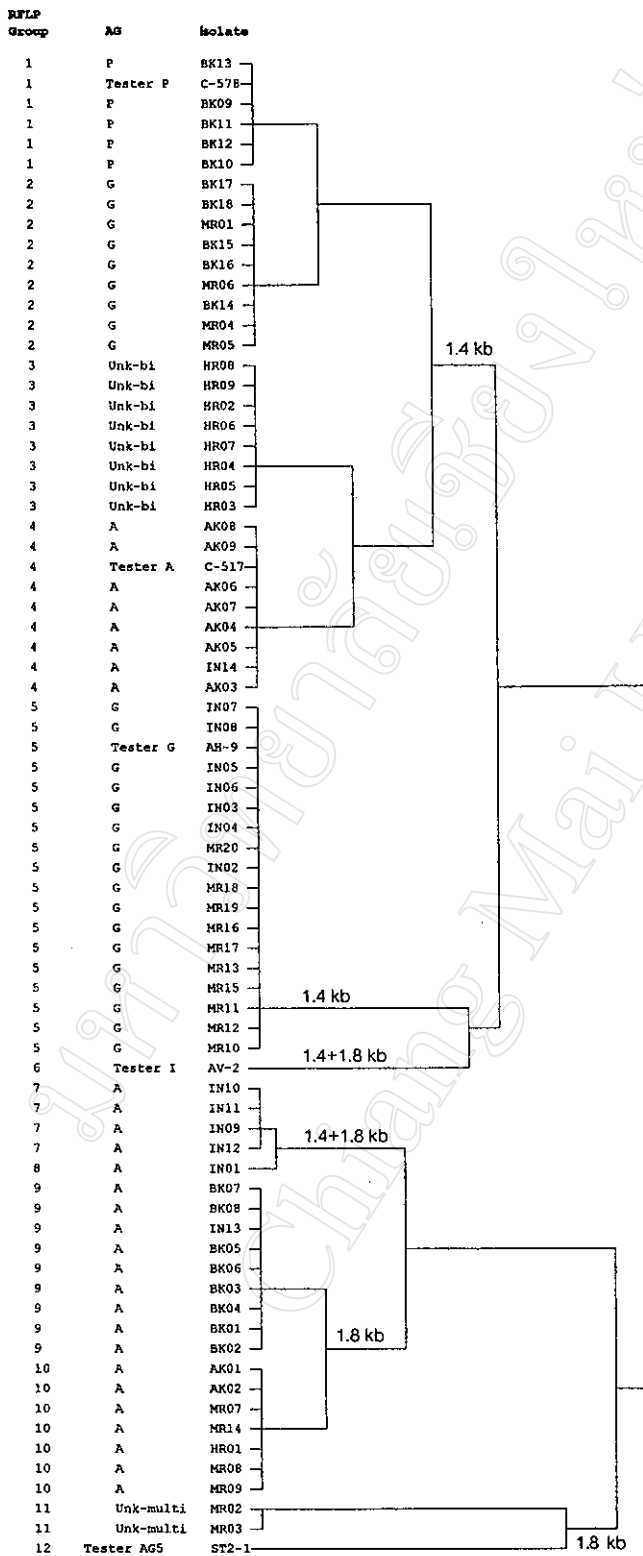


AK = อ่างขาว, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวนํ้าริน, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 12 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 75 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในส่วน

28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*I

เมื่อนำผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิดมาวิเคราะห์ร่วมกับขนาด PCR-product แล้วนำเสนอในรูปแบบ dendrogram พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดแบ่งออกเป็น 12 กลุ่มตามขนาด PCR-product และรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละเอนไซม์ โดยสมาชิกในแต่ละกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกันทั้งหมด กลุ่มที่ 1 มีสมาชิกจำนวน 6 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-P มีขนาด PCR-product 1.4 กิโลเบส กลุ่มที่ 2 มีสมาชิกจำนวน 9 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-G มี PCR-product ขนาด 1.4 กิโลเบส กลุ่มที่ 3 มีสมาชิกจำนวน 8 ไอโซเลท เป็นเชื้อ Unk-bi มี PCR-product ขนาด 1.4 กิโลเบส กลุ่มที่ 4 มีสมาชิกจำนวน 9 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-A มี PCR-product ขนาด 1.4 กิโลเบส กลุ่มที่ 5 มีสมาชิกจำนวน 18 ไอโซเลทเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-G มี PCR-product ขนาด 1.4 กิโลเบส กลุ่มที่ 6 มีสมาชิกเพียงไอโซเลทเดียวคือ tester AG-I มี PCR-product ขนาด 1.4 และ 1.8 กิโลเบส กลุ่มที่ 7 และ 8 มีสมาชิกเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-A มี PCR-product ขนาด 1.4 และ 1.8 กิโลเบสทั้ง 2 กลุ่ม และมีสมาชิกจำนวน 4 และ 1 ไอโซเลทตามลำดับ กลุ่มที่ 9 และ 10 มีสมาชิกเป็นเชื้อที่จัดอยู่ใน AG-A เช่นกัน มี PCR-product ขนาด 1.8 กิโลเบส และมีสมาชิกจำนวน 9 และ 7 ไอโซเลทตามลำดับ กลุ่มที่ 11 มีสมาชิกจำนวน 2 ไอโซเลทเป็น Unk-multi มี PCR-product ขนาด 1.8 กิโลเบส และกลุ่มที่ 12 มีเพียงไอโซเลทเดียว คือ tester AG-5 มี PCR-product ขนาด 1.8 กิโลเบส ดังแสดงในภาพที่ 13 และตารางที่ 5



AK = อ่างาง, BK = บ่อแก้ว, HR = ห้วยน้ำริน, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 13 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 75 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในส่วน

28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I, *Taq*I, *Msp*I และ *Mbo*

ตารางที่ 5 Anastomosis group, RFLP group, ขนาด PCR-product และขนาดแถบดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI*, *MboI*, *MspI* และ *TaqI* ของรา *Rhizoctonia* spp. ที่แยกได้จากโรคสตรอเบอร์รี่

Anastomosis Group (AG)	RFLP Group	ขนาด PCR-product		ขนาดแถบดีเอ็นเอโดยประมาณหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (คู่เบส)			
		1.8	1.4	<i>HhaI</i>	<i>MboI</i>	<i>MspI</i>	<i>TaqI</i>
AG-P	1	-	+	700, 370, 240, 140	760, 550, 120	730, 425, 270	520, 380, 250
AG-G	2	-	+	700, 370, 240, 140	760, 550, 120	730, 425, 270	620, 520, 250
Unknown-binucleate	3	-	+	1,040, 700, 370, 240, 140	760, 550, 120	520, 425, 270, 220	620, 520, 250
AG-A	4	-	+	550, 370, 240, 140	760, 550, 120	520, 425, 270, 220	620, 520, 250
AG-G	5	-	+	700, 370, 240, 140	520, 200, 120	500, 425, 270, 220	520, 330, 250
AG-I	6	+	+	700, 550, 370, 240, 140	550, 500, 200, 120	850, 730, 425, 270	660, 520, 330, 250
AG-A	7	+	+	840, 550, 370, 240, 140	1,000, 760, 550, 120	850, 520, 425, 270, 220	950, 620, 520, 250
AG-A	8	+	+	550, 370, 240, 140	1,000, 760, 550, 120	850, 520, 425, 270, 220	950, 620, 520, 250
AG-A	9	+	-	840, 550, 240, 140	1,000, 760, 120	850, 520, 270, 220	950, 620, 250
AG-A	10	+	-	780, 550, 240, 140	1,000, 760, 120	850, 520, 270, 220	950, 620, 250
Unknown-multinucleate	11	+	-	780, 700, 240, 140	760, 550, 250, 200, 120	850, 730, 270	950, 620, 250
AG-5	12	+	-	840, 700, 240, 140	1,000, 760, 250, 120	900, 730, 570, 270	980, 620, 250

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.2.1 หลังทราบผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มในการทดลองที่ 2.1 จึงทำการสุ่มตัวอย่างสมาชิกในแต่ละกลุ่มมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย primer ITS1F/Rhsp2 รวมทั้งสิ้น 23 ไอโซเลท พบ PCR-product มีขนาดอยู่ในช่วง 800 – 900 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 PCR-product ของ *Rhizoctonia* spp. จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย primer ITS1F/Rhsp2

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (NEB, UK) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G, 3: tester AG-I, 4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07, 11: IN08, 12: IN09, 13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10

2.2.2 การตัด PCR-product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Clal หลังจากนำดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Clal* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งหมด 7 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 180 – 590 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 4 รูปแบบ (ภาพที่ 15) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 3 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ต่าง AG กัน คือ กลุ่มที่ 1, 3 และ 4 ส่วนในกลุ่มที่ 2 มีสมาชิกเพียงไอโซเลทเดียวคือ tester AG-I กลุ่มที่ 1 พบ Unk-bi จัดรวมอยู่กับ AG-A และ AG-G กลุ่มที่ 3 พบ AG-G จัดรวมอยู่กับ AG-P และกลุ่มที่ 4 พบ Unk-multi จัดรวมอยู่กับ AG-5 ดังแสดงในภาพที่ 16

HhaI หลังจากนำดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งหมด 12 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 370 – 870 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 7 รูปแบบ (ภาพที่ 17) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 6 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกันทั้งหมด คือ กลุ่มที่ 1, 2, 3, 4, 6 และ 7 และมี 1 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อต่าง AG กัน คือ กลุ่มที่ 5 พบ Unk-multi, AG-P และ tester AG-5 จัดรวมอยู่ด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 18

MboI หลังจากนำดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งหมด 10 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 80 – 250 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 5 รูปแบบ (ภาพที่ 19) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 3 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกันทั้งหมด คือ กลุ่มที่ 2, 4, และ 5 และมี 2 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อต่าง AG กัน คือ กลุ่มที่ 1 และ 3 โดยในกลุ่มที่ 1 พบเชื้อ AG-A จัดรวมอยู่กับ AG-G และกลุ่มที่ 3 พบเชื้อ AG-G, tester AG-5 และ AG-P จัดอยู่รวมกัน ดังแสดงในภาพที่ 20

MseI หลังจากนำดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งหมด 13 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 60 – 500 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 6 รูปแบบ (ภาพที่ 21) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 3 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกันทั้งหมด คือ กลุ่มที่ 4, 5, และ 6 และมี 3 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อต่าง AG กัน คือ กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 โดยในกลุ่มที่ 1 พบ Unk-bi จัดรวมอยู่กับเชื้อ AG-A กลุ่มที่ 2 พบ Unk-multi จัดรวมอยู่กับ AG-G และกลุ่มที่ 3 พบเชื้อ AG-P, AG-G และ tester AG-5 จัดรวมอยู่ด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 22

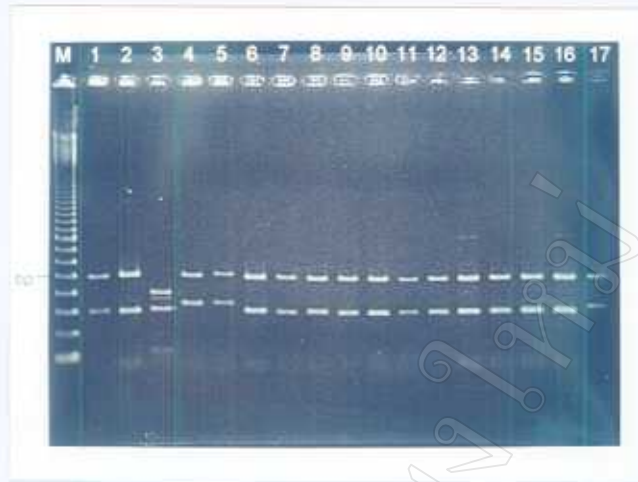
RsaI หลังจากนำดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* พบว่าสามารถตัดดีเอ็นเอตัวอย่างได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท คือ lane ที่ 1, 6, 8, 11-16, 18-20, 22 และ 23 มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งหมด 4 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 260 – 600 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 2 รูปแบบ (ภาพที่ 23) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 2 กลุ่มที่สมาชิกภายใน

กลุ่มเป็นเชื้อที่อยู่ใน AG เดียวกันทั้งหมด คือ กลุ่มที่ 1 และ 2 และมี 1 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อต่าง AG กัน คือ กลุ่มที่ 3 ที่ Unk-bi, Unk-multi, AG-G, AG-P, tester AG-I และ tester AG-5 ถูกจัดรวมอยู่ด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 24

TaqI หลังจากนำดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* พบว่า รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้ใกล้เคียงกับการตัดด้วยเอนไซม์ *ClaI* โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งหมด 8 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 130 – 520 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 4 รูปแบบ (ภาพที่ 25) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดถูกออกเป็น 4 กลุ่ม ในจำนวนนี้มี 3 กลุ่มที่สมาชิกภายในกลุ่มเป็นเชื้อต่าง AG กันคือ กลุ่มที่ 1, 2 และ 4 ส่วนในกลุ่มที่ 3 มีสมาชิกเพียงไอโซเลตเดียวคือ tester AG-I ในกลุ่มที่ 1 พบ AG-A, AG-G และ Unk-bi จัดรวมอยู่ด้วยกัน กลุ่มที่ 2 พบ AG-G และ AG-P 3 จัดรวมอยู่ด้วยกัน และในกลุ่มที่ 4 พบ AG-I, AG-5 และ Unk-multi จัดรวมอยู่ด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 26

XmnI หลังจากนำดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XmnI* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งหมด 3 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 240 – 660 คู่เบส และมีรูปแบบดีเอ็นเอ 2 รูปแบบ (ภาพที่ 27) เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มประกอบไปด้วยเชื้อที่อยู่ต่าง AG กัน กลุ่มที่ 1 พบ AG-A, AG-G, AG-I และ Unk-bi จัดรวมอยู่ด้วยกัน กลุ่มที่ 2 พบ AG-G, AG-5 AG-P และ Unk-multi จัดรวมอยู่ด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 28

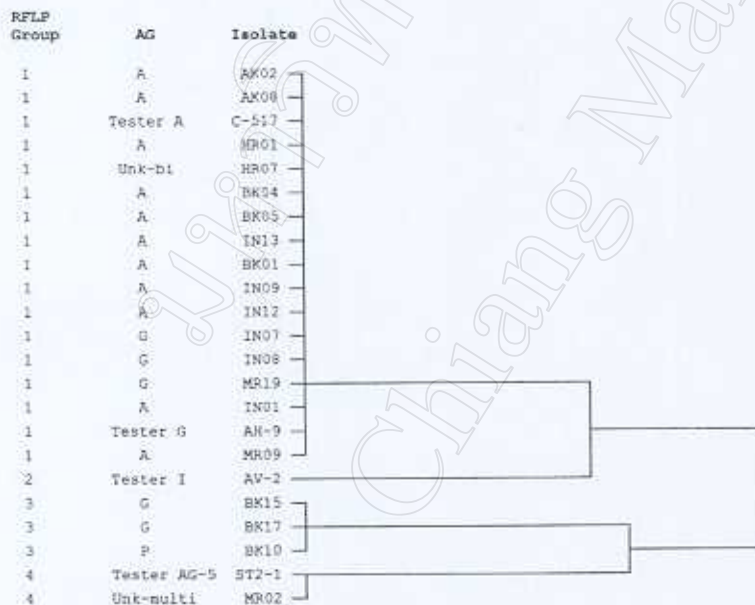
MspI หลังจากนำดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* พบว่า มีเพียงไอโซเลตเดียวที่เอนไซม์สามารถตัดได้คือ tester AG-I (ภาพที่ 29) จึงไม่นำไปวิเคราะห์จัดกลุ่ม



ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I

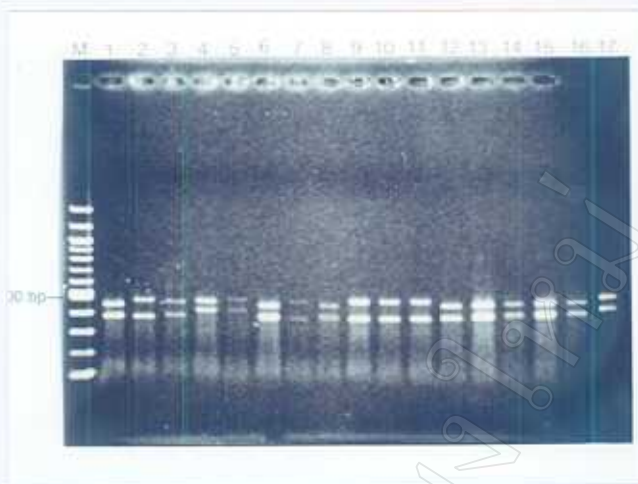
M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Amersham Pharmacia, USA) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G, 3: tester AG-I, 4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07, 11: IN08, 12: IN09, 13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10



AK = อ่างขวาง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวน้ำริน, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

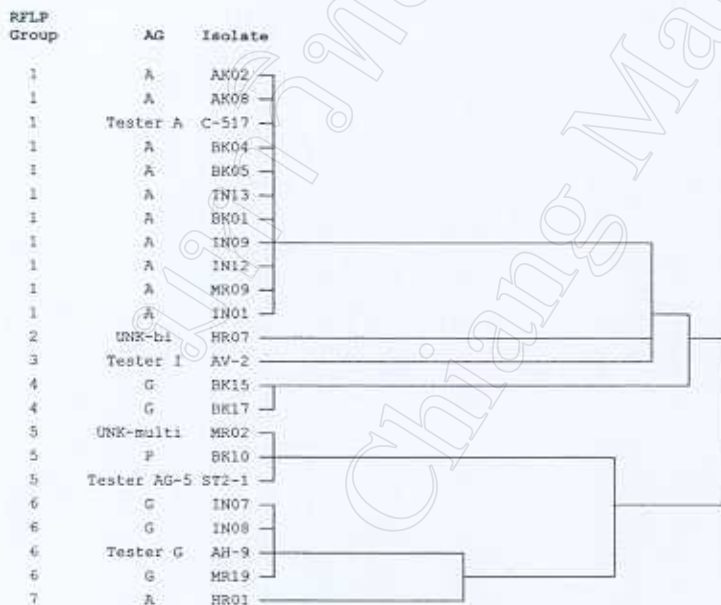
ภาพที่ 16 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 23 ไอโซเลทจากการตัด

ดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I



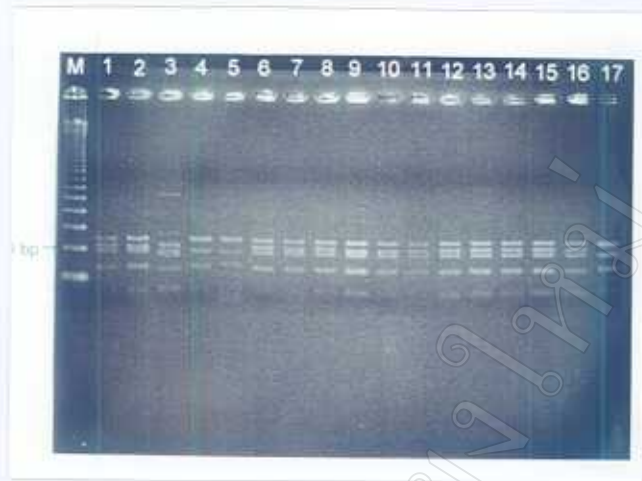
ภาพที่ 17 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI*

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (NEB, UK) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G, 3: tester AG-I, 4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07, 11: IN08, 12: IN09, 13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10



AK = อ่างช้าง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวน้ำริน, IN = อินทนนท์, MR = แมริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

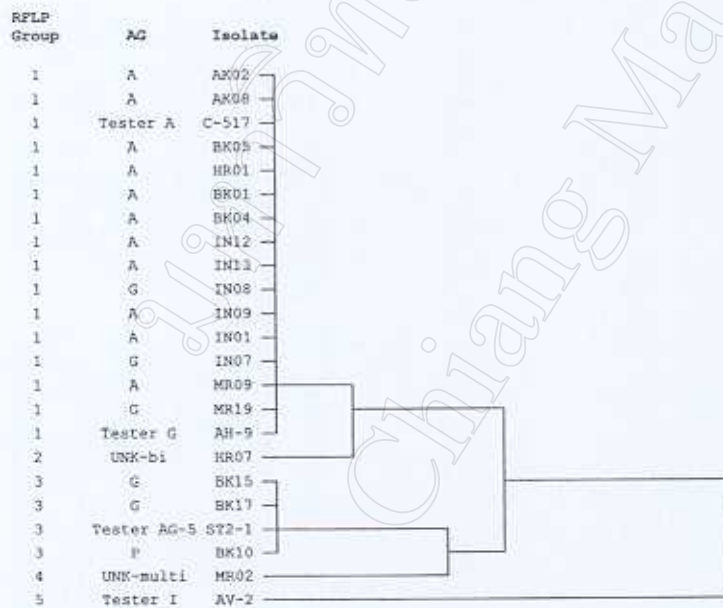
ภาพที่ 18 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 23 ไอโซเลทจากการตัด ดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI*



ภาพที่ 19 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย

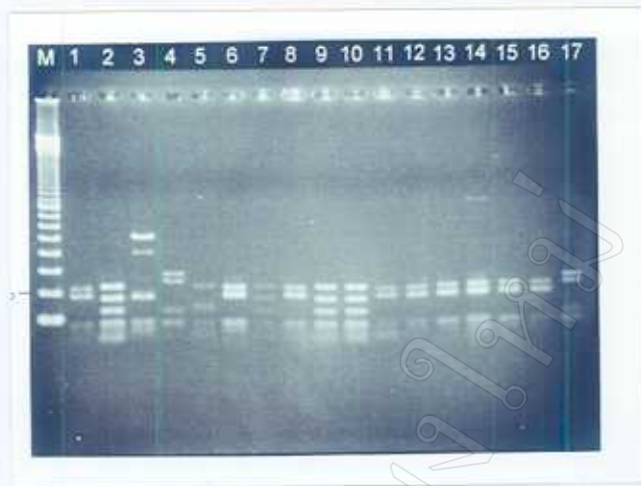
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*I

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Amersham Pharmacia, USA) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G, 3: tester AG-I, 4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07, 11: IN08, 12: IN09, 13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10



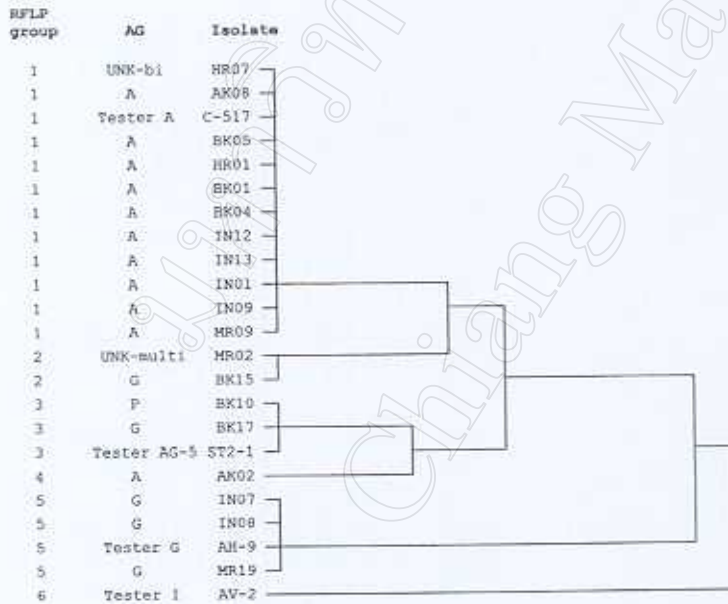
AK = อ่างช้าง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวน้าริน, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 20 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 23 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*I



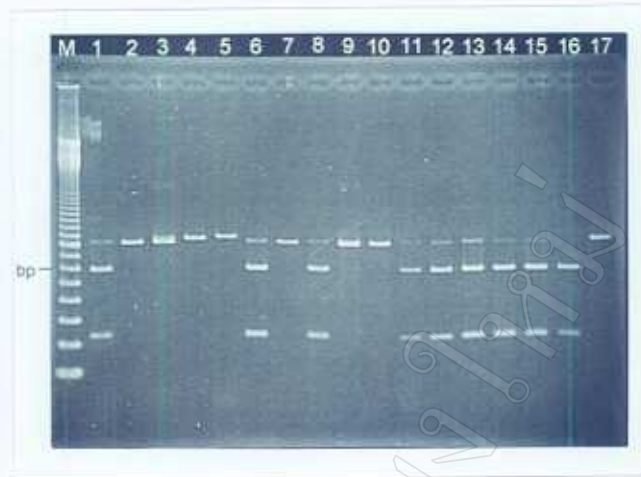
ภาพที่ 21 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI*

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Amersham Pharmacia, USA) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G,
3: tester AG-I, 4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07,
11: IN08, 12: IN09, 13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10



AK = อ่างช้าง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวนํ้าริน, IN = อินทนนท์, MR = แมริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 22 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 23 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI*



ภาพที่ 23 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย

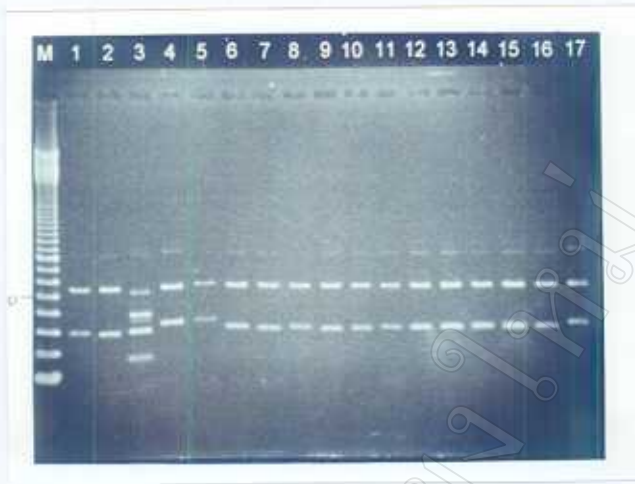
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Amersham Pharmacia, USA) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G,
3: tester AG-I, 4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07,
11: IN08, 12: IN09, 13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10

RFLP Group	AG	Isolate
1	A	AK02
1	A	AK08
1	Tester A C-517	
1	A	BK05
1	A	HR01
1	A	BK01
1	A	BK04
1	A	IN12
1	A	IN13
1	A	IN01
1	A	IN09
1	A	MR09
2	G	BK15
2	G	BK17
3	UNK-multi	MR02
3	P	BK10
3	Tester AG-5 ST2-1	
3	G	IN08
3	UNK-bi	HR07
3	Tester G	AH-9
3	G	MR19
3	G	IN07
3	Tester I	AV-2

AK = อ่างขาง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวขี้วัว, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 24 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 23 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*



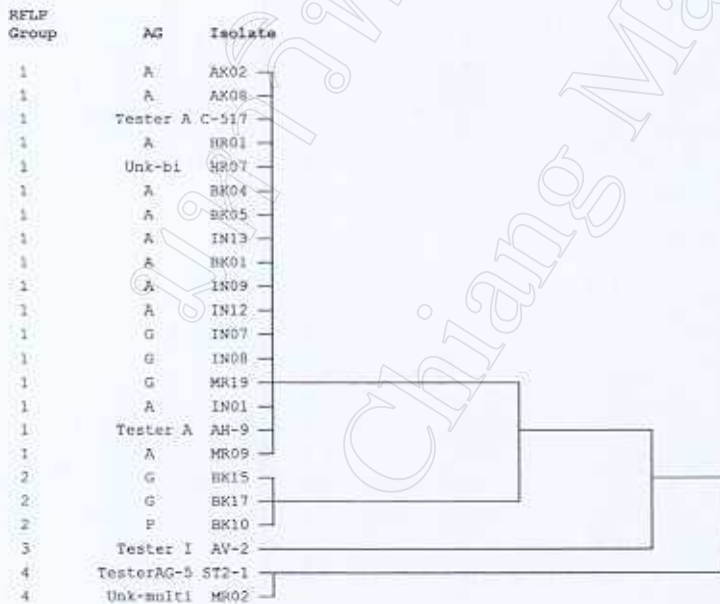
ภาพที่ 25 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI*

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Amersham Pharmacia, USA) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G,

3: tester AG-I, 4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07,

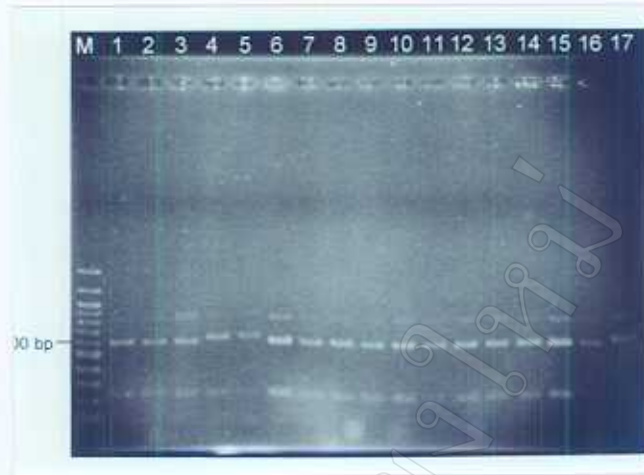
11: IN08, 12: IN09, 13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10



AK = อย่างขาว, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวขี้วัว, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 26 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 23 ไอโซเลตจากการตัด

ดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI*



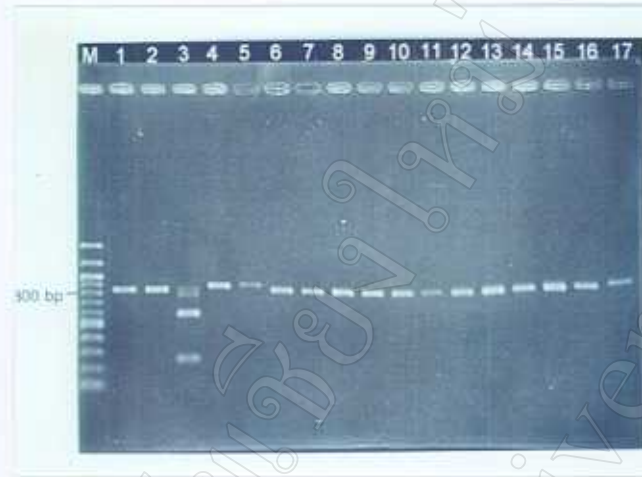
ภาพที่ 27 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xmn*I

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (NEB, UK) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G, 3: tester AG-I,
4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07, 11: IN08, 12: IN09,
13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10

RFLP Group	AG	Isolate
1	A	AK02
1	A	AK08
1	Tester A	C-517
1	A	HR01
1	Unk-bi	HR07
1	A	BK04
1	A	BK05
1	A	IN13
1	A	BK01
1	A	IN09
1	A	IN12
1	G	IN07
1	G	IN08
1	G	MR19
1	A	IN01
1	Tester I	AV-2
1	A	MR09
1	Tester G	AR-9
2	G	BK15
2	G	BK17
2	Tester AG-5	ST2-1
2	Unk-multi	MR02
2	F	BR10

AK = อ่างขาง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวน้ำริน, IN = อินทนนท์, MR = แมริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

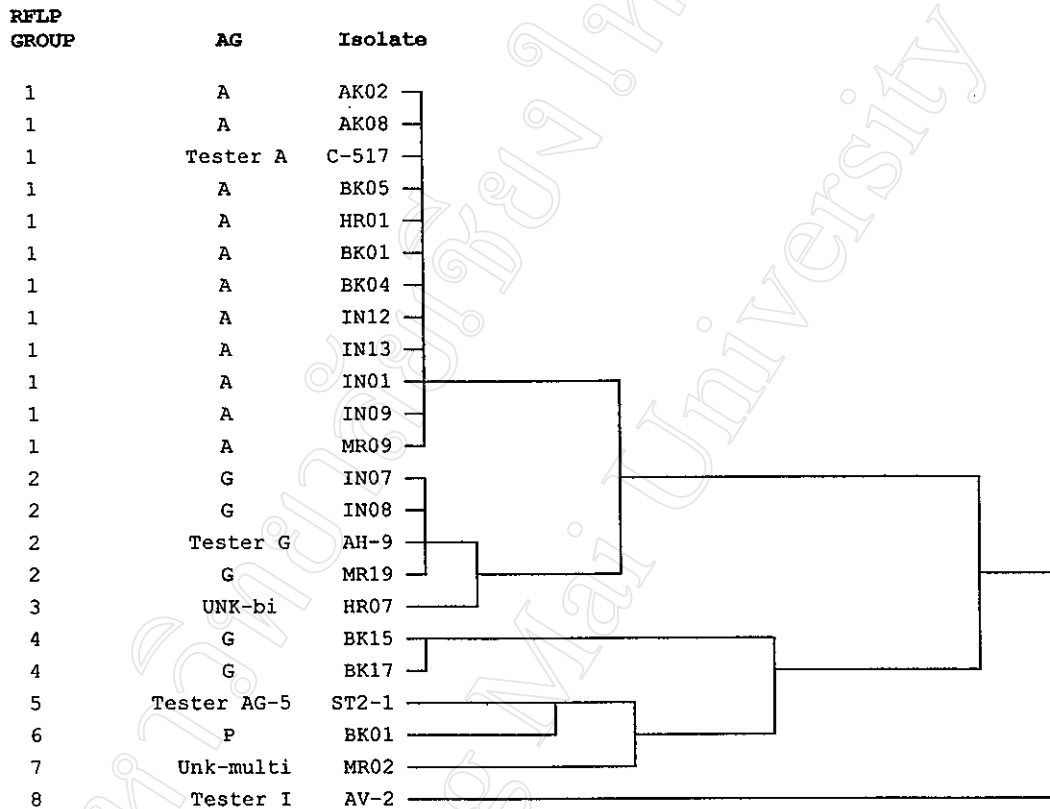
ภาพที่ 28 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 23 ไอโซเลทจากการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xmn*I



ภาพที่ 29 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลังการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI*

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (NEB, UK) 1: tester AG-A, 2: tester AG-G, 3: tester AG-I,
4: tester AG-5, 5: Unk-multi, 6: MR09, 7: MR19, 8: IN02, 9: IN01, 10: IN07, 11: IN08, 12: IN09,
13: IN12, 14: IN13, 15: BK01, 16: BK04, 17: BK05, 18: BK10

เมื่อนำรูปแบบดีเอ็นเอจากแต่ละเอนไซม์มาวิเคราะห์ร่วมกันแล้วแสดงผลในรูปแบบ dendrogram พบว่า การนำผลของเอนไซม์ *Clal*, *MboI* และ *RsaI* มาวิเคราะห์ร่วมกันสามารถให้ผลในการจัดกลุ่มได้ตรงกับการจัดจำแนกแบบ AG โดยตัวอย่างทั้ง 23 ไอโซเลท แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-A มีสมาชิกจำนวน 12 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-G มีสมาชิกจำนวน 4 ไอโซเลท กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อ binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้ (Unk-bi) กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-G จำนวน 2 ไอโซเลท กลุ่มที่ 5 เป็น tester AG-5 กลุ่มที่ 6 เป็นเชื้อที่อยู่ใน AG-P กลุ่มที่ 7 เป็นเชื้อ multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้ (Unk-multi) และกลุ่มที่ 8 เป็น tester AG-I ดังแสดงในภาพที่ 30 และตารางที่ 6



AK = อ่างขาง, BK = บ่อแก้ว, HR = หัวขี้วัว, IN = อินทนนท์, MR = แม่ริม, Unk-bi = binucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้, Unk-multi = multinucleate *Rhizoctonia* ที่ไม่สามารถจำแนกได้

ภาพที่ 30 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. จำนวน 23 ไอโซเลตจากการตัดดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I, *Mbo*I และ *Rsa*I

ตารางที่ 6 Anastomosis group, RFLP group และขนาดแถบดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Clal*, *MboI* และ *RsaI* ของรา *Rhizoctonia* spp. ที่แยกได้จากรากสตรอเบอร์รี่

Anastomosis group (AG)	RFLP group	ขนาดของแถบดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (คู่เบส)		
		<i>Clal</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaI</i>
AG-A	1	580, 300	250, 220, 200, 135, 80	600, 260
AG-G	2	580, 300	250, 220, 200, 135, 80	uncut*
Unknown-binucleate	3	580, 300	250, 200, 135, 80	uncut
AG-G	4	580, 300	250, 200, 145, 80	550, 340
AG-5	5	590, 330	250, 200, 145, 80	uncut
AG-P	6	580, 330	250, 200, 145, 80	uncut
Unknown-multinucleate	7	590, 330	250, 200, 160, 80	uncut
AG-I	8	550, 400, 300, 180	220, 190, 180, 125, 80	uncut

* ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ