บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

เก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในพืชอาศัยชนิดต่างๆ ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ (*ตารางที่ 1*) ทำการตรวจสอบเชื้อราจากเนื้อเยื่อพืชโดยใช้วิธีการ free hand section และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นทำการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราที่เก็บรวบรวมได้

ตารางที่ 1 เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในพืชอาศัยชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ไอโซเลท	พืชอาศัย	สถานที่เก็บ
1	มะเขือเทศ [a]	*Lycopersicon esculentum*	Japan
2	บีโกเนีย	*Begonia* sp.	Thailand
3	กาแฟ	*Coffea arabica*	Thailand
4	บอนสี (สปอร์รูปเดียว)	*Caladium bicolar*	Thailand
5	บอนสี (สปอร์รูปทรงกระบอก)	*Caladium bicolar*	Thailand
6	ส้ม	*Citrus reticulata*	Thailand
7	กระเจียว	*Curcuma sessilis*	Thailand
8	โกสน	*Codiaeum variegatum*	Thailand
9	พลับ	*Diospyros kaki*	Thailand
10	ลำไย	*Euphoria longana*	Thailand
11	สแตติส	*Limonium* sp.	Thailand
12	กล้วยน้ำว้า	*Musa sapientum*	Thailand
13	ข้าวฟ่าง	*Sorghum bicolor*	Thailand

[a] ตัวอย่างจาก Mie University, Japan

2. การเตรียมดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา

2.1 การเตรียมเส้นใยของเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราที่แยกได้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (potato dextrose broth) เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเก็บรวบรวมเส้นใยเชื้อรา โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วย buchner funnel และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลายๆ ครั้ง ทิ้งไว้จนเส้นใยแห้งติดกระดาษกรอง ใช้คีมที่ผ่านการฆ่าเชื้อเก็บรวบรวมเส้นใยเชื้อราเก็บในถุงพลาสติกที่สะอาด เมื่อได้เส้นใยมากพอ สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ทันที หรืออาจเก็บเส้นใยที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส (°C) จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจะอาศัยหลักการสำคัญซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Roger and Bendich (1988) โดยใช้ buffer 2X CTAB (1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0) ในการสกัด กล่าวคือในขั้นแรกจะต้องทำให้เซลล์เชื้อราแตก เพื่อให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ออกมา ซึ่งขั้นตอนนี้ทำได้โดยการบดร่วมกับไนโตรเจนเหลว หรือน้ำแข็งแห้ง หลังจากนั้นจะทำการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยสารซักฟอก CTAB เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสารละลาย buffer ที่มีสาร EDTA ช่วยป้องกันดีเอ็นเอไม่ให้ถูกทำลายด้วย endogenous nucleus ซึ่ง EDTA นี้เป็นสาร chelating agent ที่จะเข้าจับกับ Mg^{2+} ซึ่งเป็น cofactor ของ เอนไซม์ nuclease และมีผลทำให้เอนไซม์นี้ไม่สามารถทำงานได้ จากนั้นจึงสกัดโปรตีนออกจากสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้ chloroform หรือ phenol จากหลักการดังกล่าวนี้ สามารถสรุปขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอได้ดังต่อไปนี้

2.2.1 ชั่งน้ำหนักของเส้นใยเชื้อราที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ ,

2.2.2 นำเส้นใยใส่โกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติม liquid nitrogen เพื่อให้เซลล์ของเส้นใยแข็งตัว จากนั้นบดให้เป็นผง

2.2.3 ตั้งโกร่งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งตัวอย่างเริ่มหลอมละลาย เติม 2x CTAB buffer

2.2.4 คนสารละลายให้เข้ากัน (เส้นใยของเชื้อราที่บดละเอียดแล้วกับ buffer) ถ่ายใส่หลอด centrifuge นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-30 นาที

2.2.5 เติม Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.2.6 นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.7 ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติม 10% CTAB buffer ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นเติม Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.2.8 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมของเหลวส่วนบนถ่ายใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol (อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน ซึ่งขั้นนี้ดีเอ็นเอจะตกตะกอน

2.2.9 นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2.10 เทของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติม 70% ETOH (อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส)

2.2.11 นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.2.12 เทของเหลวส่วนบนทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูทิ้งไว้ให้แห้ง

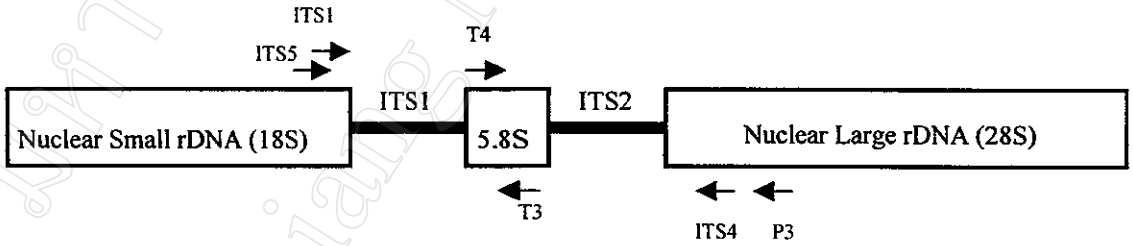
2.2.13 เติม TE buffer เพื่อละลายตะกอน ถ้าตะกอนละลายยาก หรือ ไม่ละลายให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ใส่หลอด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปตรวจสอบต่อไป

2.3 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose gel 1% ใน Tris acetate buffer (TAE buffer) และใช้ 1X TAE buffer เป็น buffer ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้นหยอดลงในเจล ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางโดยอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที หรือสังเกตจากสีของ loading buffer ให้เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่น agarose gel แล้วจึงปิดสวิทซ์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จึงนำไปตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ ITS1 ITS2 และ 5.8S โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ITS5 (5′GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3′) และ P3 (5′GCCGCTTCATCGCCGTTAC3′) (White, 1990) ดังแสดงใน *ภาพที่ 2*



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงตำแหน่งของ ribosomal DNA ที่ประกอบด้วย ITS1 ITS2 และ 5.8S rDNA ซึ่งแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR (Hirata and Takamatsu, 1996)

Primer TIS1 (forward 19 mer)

5′ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3′

Primer ITS4 (backward 20 mer)

5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′

Primer ITS5 (forward 22 mer)

5′ GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3′

Primer P3 (backward 20 mer)

5′ GCCGCTTCACTCGCCGTTAC 3′

Primer T3 (backward 20 mer)

5′ ACGCTCGAACAGGCATGCCC 3′

Primer T4 (forward 20 mer)

5′ TCAACAACGGATCTCTTGGC 3′

3.1 องค์ประกอบปฏิกิริยา PCR

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด PCR tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับต่อไปนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	37.8
10X PCR buffer	5
dNTP mix (2.5 mM)	4
Primer ITS5 (20 pmol/µl)	1
Primer P3 (20 pmol/µl)	1
DNA template	1
Taq DNA polymerase	0.2
ปริมาตรรวม	**50**

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว เติม light mineral oil ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิดทับส่วนบนของสารละลายเพื่อป้องกันการระเหยของ reaction mixture นำหลอด PCR ที่เตรียมพร้อมแล้วไป incubate ในเครื่อง thermal cycler รุ่น PC-700 (ASTEC) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ

2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
   ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ
   หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ต่อไป

3.2 ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอนในการตรวจสอบทำเหมือนกับในข้อ 2.2 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของเจลเป็น 1.5% เตรียมโดยชั่ง agarose 0.75 กรัม ผสม 1X TAE buffer 50 มิลลิลิตร นำไปหลอมละลายและตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม ethidium bromide 50 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นจึงนำไปเทลงถาดเจลต่อไป

3.3 การแยกผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำผลิตผลจากการทำ PCR มาแยกโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส จากนั้นจึงทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่มีการเรืองแสง แล้วนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ JETSORB kit (Genomed) โดยดำเนินการตามคู่มือที่แนบมากับ kit ดังต่อไปนี้

3.3.1 การเตรียมเจล

ชั่งน้ำหนักเจล และสารละลาย A1 buffer (ภาคผนวก) อัตราส่วน 1:3 (w/v) จากนั้นผสม Jetsorb ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายเจลออก และให้ดีเอ็นเอมาเกาะติดกับอนุภาคของ Jetsorb แล้วปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไป จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยสารละลาย A1 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้ง

3.3.2 ล้างตะกอนด้วย low salt buffer

เติมสารละลาย A2 buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อได้ตะกอนแล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วทำการล้างตะกอนอีกครั้งด้วย A2 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วปั่นแยกให้ตกตะกอนอีกครั้ง เทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง

3.3.3 การแยกดีเอ็นเอออกจาก Jetsorb

เติมสารละลาย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แยกสารละลายส่วนบน (สารละลายดีเอ็นเอ) ไว้ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแม่พิมพ์ในการหาลำดับเบสในขั้นต่อไป

4. วิเคราะห์หาลำดับเบส

หาลำดับการเรียงตัวของเบส ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ PRISM Dye Terminator cycle sequencing kit ที่ผลิตโดยบริษัท Applied Biosystems Inc., Japan ซึ่งใช้ primer 4 ชนิดคือ ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') P3, T3 (5'ACGCTCGAACAGGCATGCCG3') และ T4 (5'TCAACAACGGATCTCTTGGC3') ซึ่ง primer ทั้ง 4 จะใช้หาลำดับการเรียงตัวของเบสตามตำแหน่งต่างๆ ดังแสดงใน *ภาพที่ 2*

4.1 สารละลายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ตรวจหาลำดับเบส

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด PCR tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับต่อไปนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Reagent Mix A	2
Reagant Mix B	2
DNA (0.2-2.0 μg)	(15)[a]
Primer (5 pmol)	(1)[b]
H_2O	(0)[c]
ปริมาตรรวม	**20**

หมายเหตุ : a คือ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 150 นาโนกรัม ต่อ 1 ไมโครลิตร

b คือ ความเข้มข้นของ primer ที่ใช้ ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับ 5 พิโครโมล ต่อ 1 ไมโครลิตร

c คือ ปริมาตรของน้ำที่ใช้ หลังจากเติมส่วนผสมอื่นๆ ทั้งหมดแล้วเพื่อปรับปริมาตรให้ครบ 20 ไมโครลิตร

โดยเริ่มจากการผสมส่วนผสมทุกอย่างแล้วเติม light mineral oil ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิดทับส่วนบนของสารละลายเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไป incubate เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับทำปฏิกิริยา โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
   extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที
   ในขั้นตอนที่ 2 นี้ ทำซ้ำจำนวน 25 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วดูดสารละลายทั้งหมด (ปริมาตร 20ไมโครลิตร) ย้ายไปใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วทำการตกตะกอนด้วย 70% EtOH (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวบนทิ้งนำตะกอนไป dry-up ใน vacuum จนกระทั่งตะกอนแห้ง แล้วเก็บตะกอนเพื่อนำไปตรวจหาลำดับเบสต่อไป

4.2 การเตรียมโพลีอะคีลามายด์เจล (polyacrylamide gel)

ทำการประกอบชุดแผ่นกระจกเตรียมไว้ แล้วเตรียมสารละลายโพลีอะคีลามายด์ โดยเริ่มจากการชั่ง urea 25 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเจล Long Ranger ® (polyacrylamide gel) ปริมาตร 5.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (อาจใช้ hot plate ช่วยในการละลาย) หลังจากนั้นเติม 10X TBE (ภาคผนวก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำสารละลายไป incubate ในเครื่อง vacuum ประมาณ 17 นาที เพื่อไล่ฟองอากาศในสารละลายเจล จากนั้นเติม 10% ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติม *N, N, N′, N′* tetramethylethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 21.5 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำสารละลายที่ได้เทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นกระจกนี้ไปประกอบเข้าเครื่อง Applied Biosystem 373A sequencer เติม running buffer (1X TBE) ลงใน chamber เตรียมพร้อมเพื่อตรวจหาลำดับเบส

4.2 ตรวจหาลำดับเบส

นำตะกอนดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 มาละลายด้วย loading dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไป incubate ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2-5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับเบสโดยการหยอดลงในเจลที่เตรียมไว้สำหรับการตรวจหาลำดับเบส ปิดฝาครอบแล้วเปิดสวิทซ์เครื่องเพื่อให้เครื่องทำงาน โดยเครื่องจะทำงานประมาณ 14 ชั่วโมง การทำงานของเครื่องจะเป็นไปแบบอัตโนมัติ โดยตั้งข้อมูลเครื่องตามคู่มือที่ติดมากับเครื่อง และข้อมูลลำดับเบสที่ได้จะถูกบันทึกไว้ในคอมพิวเตอร์

5. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม GENETYX-MAC (Software Development) ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลจาก the DNA databank of Japan (DDBJ) (*ตารางที่ 2*) ด้วยโปรแกรม Clustal V

(Higgins *et al.*, 1992) จากนั้นทำการสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยโปรแกรม PAUP version 4.0 (D. Swofford, Smithsonian Institution, Washington D.C.) ซึ่งการวิเคราะห์หา tree จะใช้หลักการของ Distance method โดยวิธีการ neighbor-joining และหาค่าความเชื่อมั่นโดยคำนวณค่า bootstrap จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง หลังจากนั้นทำการคำนวณค่า distance coefficient โดยใช้โปรแกรม PAUP version 3.1 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ภายในตัวอย่างเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 13 ไอโซเลท

ตารางที่ 2 เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ใช้ในการศึกษา

สปีชีส์	ไอโซเลท	พืชอาศัย	สถานที่เก็บ	Accession [c]
C. acutatum	397 [a]	*Fragaria x ananassa*	U.S.A.	Z 32915
C. capsici	223 [b]	*Vigna unguiculata*	Nigeria	Z 32934
C. coccodes	527.77 [c]	*Lycopersion esculentum*	Bulgaria	Z 32930
C. dematium	288810 [c]	*Dianthus sp.*	U.K.	Z 32938
C. destructivum	157.83 [c]	*Medicago sativa*	Yugoslavia	Z 32939
C. fragariae	63-1 [a]	*Fragaria x ananassa*	U.S.A.	Z 32943
C. fuscum	120 [b]	*Digitalis lanata*	Cuba	Z 32944
C. gloeosporioides	SAS 1 [c]	*Citrus paradisi*	Barbados	Z 32945
C. gloeosporioides	SAS 8 [c]	*Diorcorea sp.*	Barbados	Z 32963
C. gloeosporioides	203 [b]	*Aeschynomene virginica*	U.S.A.	Z 32947
C. gloeosporioides	NT 44 [c]	*Stylosanthes sp.*	Australia	Z 32951
C. gloeosporioides	498/150.28 [c]	*Zizyphus jujuba*	_	Z 32955
C. gloeosporioides	501 [c]	*Mangifera indica*	Malaysia	Z 32957
C. gloeosporioides	502 [c]	*Hevea brasiliensis*	Indonesia	Z 32958
C. gloeosporioides	503 [c]	*Malus domestica*	New Zealand	Z 32959
C. gloeosporioides	AV3/1 [c]	*Persea americana*	Sri Lanka	Z 32965
C. gloeosporioides	CG cof C [a]	*Coffea arabica*	Sri Lanka	Z 32966
C. gloeosporioides	P2/10 [c]	*Carica papaya*	Sri Lanka	Z 32970
C. graminicola	84032 [c]	*Zea mays*	Zimbabwe	Z 32981
C. kahawae	319406 [a]	*Coffea arabica*	Kenya	Z 32983

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สปีชีส์	ไอโซเลท	พืชอาศัย	สถานที่เก็บ	Accession [e]
C. lindemuthianum	559 [b]	*Phaseolus vulgaris*	Brazil	Z 32989
C. linicola	172.51 [c]	*Linum usitatissimum*	The Netherlands	Z 32985
C. musae	CMG [c]	*Musa sp.*	Australia	Z 32995
C. orbiculare	172.59 [c]	*Cucumis sativus*	The Netherlands	Z 33379
C. sublineolum	790416 [c]	*Sorghum sp.*	Nigeria	Z 33380
C. trichellum	84989 [c]	*Hedera helix*	U.K.	Z 33003
C. trifolii	164 [b]	*Medicago* sp.	U.S.A.	Z 33004
Nurospora crassa	- [d]	-	-	M 13906

[a] รายงานโดย Sreenivasaprasad *et al.* 1992, 1993, 1994.

[b] รายงานโดย Sherriff *et al.* 1994.

[c] รายงานโดย Sreenivasaprasad *et al.* 1996.

[d] รายงานโดย Chambers *et al.* 1986.

[e] รหัสแสดงลำดับเบสที่รวบรวมข้อมูลไว้โดย the DNA databank of Japan (DDBJ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University