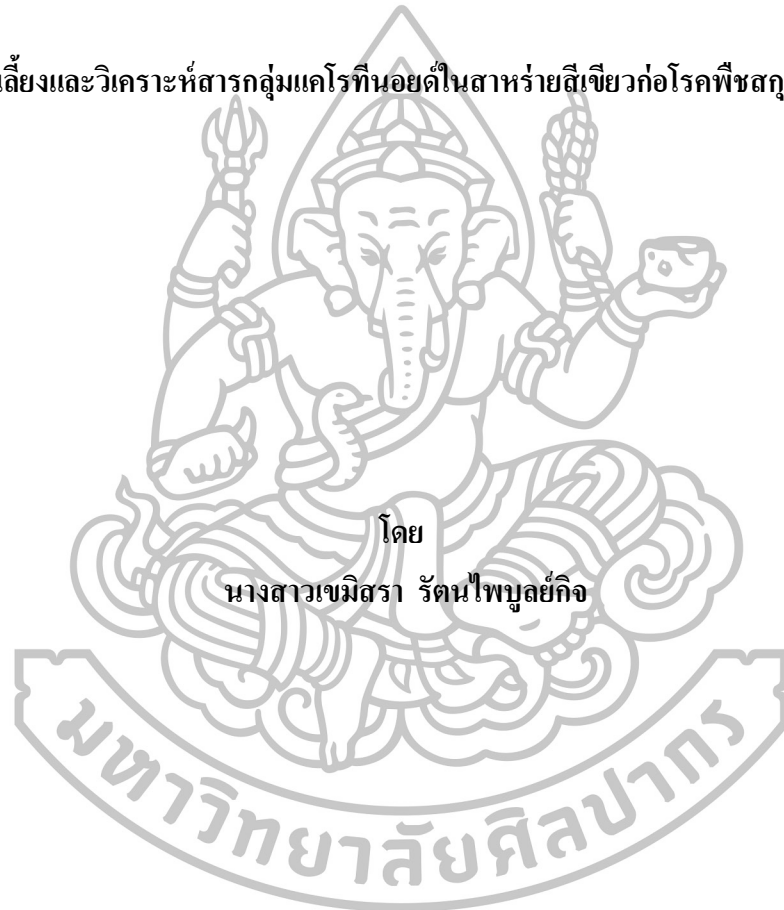




การแยกเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวแก่อโรคพืชสกุล *Cephaleuros*



โดย
นางสาวเขมิศรา รตนไพบุลย์กิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การแยกเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวแก่อโรคพืชสกุล *Cephaleuros*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**ISOLATION AND CAROTENOID INVESTIGATION OF THE PLANT PATHOGENIC
ALGA, *CEPHALEUROS***

**By
Miss Kemissara Rattanapaiboonkit**



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Science Program in Biology

Department of Biology

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การแยกเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวแก่อโครคพีชสกุล *Cephaleuros*” เสนอโดย นางสาวเข็มสรารัตน์ไพบูลย์กิจ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศน์วงศ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
อาจารย์ ดร.ธัญนันท์ วรรณธง

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ ออบสุวรรณ)

...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรพร เพกเกาะ)

...../...../.....

..... กรรมการ กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ์า) (อาจารย์ ดร.ธัญนันท์ วรรณธง)

...../...../...../...../.....

55303205 : สาขาวิชาชีววิทยา

คำสำคัญ : เชฟาลิวโรส / โรคใบจุดสาหร่าย / สาหร่ายสีเขียวก่อโรคพืช / การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่าย / เบต้าแคโรทีน

เขมิสรา รัตนไพบูลย์กิจ: การแยกเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวก่อโรคพืชสกุล *Cephaleuros*. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อ.ดร. ธีรพันธ์ วรณธง. 116 หน้า

Cephaleuros เป็นสกุลหนึ่งของสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดสาหร่าย (algal leaf spot) หรือ โรคจุดสนิม (algal red rust) ในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตามรายงานและการศึกษาถึงสาหร่ายก่อโรคชนิดนี้ในประเทศไทยยังมีน้อยมาก งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะเริ่มต้นการศึกษาโดยทำการสำรวจ จัดจำแนกชนิดและแยกเพาะเลี้ยง รวมไปถึงการศึกษารังควาญโดยเฉพาะเบต้าแคโรทีน (β -carotene) ในสาหร่ายก่อโรคนี้นอกจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่บางส่วนของจังหวัดนครปฐมและสมุทรสาคร พบอาการของโรคจุดสาหร่ายในพืช 6 ชนิด ได้แก่ ส้มโอ มะนาว ฝรั่ง เพนซายผ้าสีดา อกกอินเดียน และชมพู่มะเหมียว โดยพบรอยโรคบนส่วนใบของพืชเท่านั้นและมีลักษณะคล้ายคลึงกันในทุกตัวอย่างพืช กล่าวคือ โคนใบของสาหร่ายก่อโรคมียูปร่างค่อนข้างกลม ผิวหน้าฟูคล้ายกัมมะหยี่ และมีสีส้มแดงคล้ายสีสนิมเหล็ก ซึ่งเมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายใต้กล้องจุลทรรศน์ อันได้แก่ ทาลัส โครงสร้างสปอร์ และระดับการเข้าทำลายบริเวณของชั้นใบพืช พบว่า ตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมดมีลักษณะตรงกับคำบรรยายของสาหร่าย *Cephaleuros virescens* ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน 18S rRNA ที่ระบุว่าสาหร่ายทั้ง 6 ไอโซเลทที่สามารถแยกเพาะเลี้ยงให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ในห้องปฏิบัติการนั้นเป็นสาหร่ายสีเขียวในสกุล *Cephaleuros*

ตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมดได้รับการแยกเพาะเลี้ยงจากใบไม้ที่ติดเชื้อภายใต้สภาวะ autotroph ด้วยอาหารสูตร HSM จนได้เป็นสายพันธุ์สาหร่ายบริสุทธิ์ ปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อราเป็นอุปสรรคสำคัญในการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุลนี้ซึ่งแก้ไขได้ด้วยการถ่ายเชื้อซ้ำหลายๆ ครั้ง และเมื่อทดลองเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BBM และ Bristol ปรากฏว่า เส้นสายของ *Cephaleuros* มีการเจริญเติบโตและพัฒนาจากสีเขียวเป็นสีส้มแดง ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสาหร่ายที่เปลี่ยนสีด้วยเครื่อง HPLC ระบุว่า สาหร่ายสังเคราะห์และสะสมเบต้าแคโรทีน เป็นสารสีชนิดเด่นเพียงชนิดเดียว พบปริมาณ β -carotene content สูงสุด 26.40 $\mu\text{g/gDW}$ จากตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM ซึ่งมากกว่าอาหารสูตร HSM ถึง 9 เท่า จากการทดลองเพิ่มเติมทำให้ทราบว่า การเปลี่ยนสีของเส้นสายสาหร่ายที่เกิดขึ้นมีสาเหตุมาจากการที่อาหารสูตร BBM และ Bristol นั้นมีโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) เป็นแหล่งของไนโตรเจนซึ่งต่างไปจากอาหารสูตร HSM ที่มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ซึ่งเส้นสายสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรนี้จะมีสีเขียวเสมอ ประกอบกับเมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพของสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน พบว่า HSM ส่งเสริมให้เกิดมวลชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros* ได้มากกว่าอาหารสูตร BBM และ Bristol ถึง 6 และ 7 เท่าตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าว เป็นไปได้ว่าสาหร่าย *Cephaleuros* สามารถใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าโซเดียมไนเตรท และเมื่อสาหร่ายขาดแคลนไนโตรเจนจึงตอบสนองสภาวะเครียดด้วยการสร้างและสะสมเบต้าแคโรทีน เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM มีค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่าที่แสดงในรูปของ EC_{50} อยู่ที่ 1.40 mg/ml ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลยืนยันถึงการปรากฏของโรคพืชที่เกิดจากสาหร่าย *Cephaleuros* ในประเทศไทยอย่างเป็นทางการ อีกทั้งนำเสนอข้อมูลทางชีววิทยาหลายประการที่สามารถใช้ในการระบุถึงสาหร่ายก่อโรคนี้นี้เบื้องต้นได้ รวมถึงข้อมูลวิธีการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายจากตัวอย่างพืชติดเชื้อ และการศึกษาในครั้งนี้นับเป็นการค้นพบแหล่งเบต้าแคโรทีนแหล่งใหม่จากธรรมชาติพร้อมกับพบว่าสารสีชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นด้วยความเครียดจากการขาดไนโตรเจน

ภาควิชาชีววิทยา

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

55303205: MAJOR: BIOLOGY

KEY WORD: *CEPHALEUROS* / ALGAL LEAF SPOT / PARASITIC GREEN ALGAE / ALGAL ISOLATION /
 β -CAROTENE

KEMISSARA RATTANAPAIBOONKIT: ISOLATION AND CAROTENOID INVESTIGATION OF THE
PLANT PATHOGENIC ALGA, *CEPHALEUROS*. THESIS ADVISOR: THANYANAN WANNATHONG, Ph.D. 116
PP.

Cephaleuros is a genus of green algae (Trentepohliaceae, Chlorophyta) that causes algal leaf spots or algal red rust disease in several higher plants. In Thailand, however, there are very few reports or studies about this alga. This research aimed to start the investigation of plant pathogenic algae by isolation, identification and cultivation including pigment analysis particularly β -carotene. Algal samples were obtained from Nakhon Pathom province and Samut Sakhon province. Symptoms of algal spots were found in 6 host plants namely; pomelo, lime, and guava, as well as disk staghorn, mast tree and pomerac. The lesions found only on the surface of all infected leaves appeared to have similar characteristics, which are usually circular, raised and velvet colonies. These algal infections were visible as orange-rusty coloured patches. In addition, microscopic morphologies i.e. thallus, reproductive structure and degree of tissue damage, identified all samples as *Cephaleuros virescens*. Partial analysis of 18S rRNA gene sequences also indicated that all 6 unialgal isolates attained under laboratory condition are the green algae genus *Cephaleuros*.

Algal isolation of infected leaf samples was initially performed in autotrophic condition using HSM medium to obtain unialgal cultures. During the isolation process, the algal cultures had mainly been hindered by fungal contamination. This problem was solved by repeated subculturing. Subsequently, after transferring all *Cephaleuros* isolates to BBM and Bristol liquid medium, the growing algal filaments were found to develop into a deep orange colour. Algal pigment analysis using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) revealed that all the orange-coloured algal samples synthesized and accumulated only β -carotene as the main pigment. The BBM culture revealed the highest β -carotene content up to 26.40 $\mu\text{g/gDW}$, 9-fold higher than HSM cultures. Further investigation uncovered that the orange algal filament resulted from sodium nitrate (NaNO_3), a nitrogen source in BBM and Bristol medium whereas the HSM medium containing ammonium chloride (NH_4Cl) generally gives a green filament algal culture. A comparison of biomass production showed that the highest biomass was achieved from the HSM culture; they were 6 and 7-fold higher than those obtained from BBM and Bristol mediums, respectively. It is, therefore, assumed that *Cephaleuros* can utilize NH_4Cl as a nitrogen source better than NaNO_3 . On the other hand, a limitation of nitrogen source triggered the alga to accumulate β -carotene in response to the nitrogen starvation stress. Antioxidant activity of algal crude extracts was determined by DPPH assay. The results indicated that BBM cultures had the highest antioxidant activities, expressed as EC_{50} 1.40 mg/ml. This research confirmed the existence of plant diseases caused by parasitic alga *Cephaleuros* in Thailand and offered the biological information for its identification including basic information for the isolation and cultivation of this parasitic alga from infected plant samples. This study also discovered a new natural β -carotene source and that nitrogen starvation stress enhances β -carotene production in the algal culture.

Department of Biology

Student's signature

Thesis Advisor's signature

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ซึ่งไม่อาจจะนำมา กล่าวได้ทั้งหมด ผู้มีพระคุณท่านแรกและผู้วิจัยขอกล่าวถึงคือ อาจารย์ ดร. ธีรวัฒน์ วรรณจง ตลอด ระยะเวลาที่ได้รู้จักและร่วมงานกับอาจารย์เป็นระยะเวลา 5 ปี อาจารย์ได้ให้ความรู้ คำแนะนำในเรื่อง ของการทำวิจัยด้วยความเต็มใจ และกรุณาเสมอมา เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ออกมาประสบผลสำเร็จ ลุล่วง อีกทั้งยังช่วยปรับปรุง แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน อย่างดียิ่ง เพื่อให้การเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ออกมาสมบูรณ์ที่สุด นอกจากนี้อาจารย์ยังสั่งสอนและให้ ข้อคิดเกี่ยวกับการใช้ชีวิตประจำวัน รวมไปถึงประสบการณ์ในการทำงานที่ไม่เคยมีมาก่อนใน ห้องเรียน มีหลายครั้งที่ลูกศิษย์มักตัดสินใจทำอะไรด้วยตนเอง แล้วเกิดความผิดพลาด อาจารย์ก็ได้ กรุณาสั่งสอน และให้โอกาสแก้ตัวเสมอมา ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของ อาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. คมศร ลมไธสง นส. จิราภรณ์ พิมพิภุมิ และศูนย์เครื่องมือ กลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความกรุณาในการใช้เครื่อง HPLC ในการตรวจ วิเคราะห์รังควัตถุ และให้ความดูแลช่วยเหลือจนส่วนหนึ่งของงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย ได้อย่างราบรื่น นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. กุลนาถ อบสุวรรณ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธาน ในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. จิรพร เพกเกาะ ที่ให้ความกรุณาเดินทางมาเป็น ผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพลีธา ผู้เป็น กรรมการในการสอบอนุมัติหัวข้องานวิจัย อีกทั้งยังให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคของการแยกเชื้อ สาหร่ายก่อโรคออกจากใบพืชเป็นอย่างดี และขอขอบคุณ คุณณรงค์ สามงามนิม ที่คอยช่วยจัดหา และอำนวยความสะดวกในการใช้สารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการด้วยความเต็มใจ

ขอขอบคุณ นางสาวปีลดา เชิดชูเกียรติศักดิ์ ที่เป็นเพื่อนร่วมทำงานวิจัยและที่คอยพินฉ่า อุปสรรค รับฟังและให้กำลังใจในการทำงาน ตลอดจนแลกเปลี่ยนความรู้ คำปรึกษา และมีส่วน ช่วยเหลือในการตรวจทานวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนโบราณคดีที่ศนาจรของบัณฑิตวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากเงินงบประมาณแผ่นดิน ที่ให้โอกาสพร้อมทั้งทุนการศึกษา สำหรับการศึกษาวิจัยจนผลงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์สำหรับผู้สนใจอยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดี ทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ เกี่ยวข้อง และขอมอบความกตัญญูกตเวทิตาคุณ แต่บิดา มารดา ที่อยู่เบื้องหลังในความสำเร็จ ที่ได้ให้ ความช่วยเหลือสนับสนุนในเรื่องของทุนทรัพย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่อาจกล่าวได้ทั้งหมด สำหรับข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดแต่เพียงผู้เดียว และยินดีรับฟังคำแนะนำ เพื่อที่จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
ขอบเขตการศึกษา.....	2
การใช้อักษรย่อ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ปัญหาโรคพิษในประเทศไทย.....	4
โรคใบจุดสาหร่าย.....	7
แคโรทีนอยด์.....	21
บทที่ 3 วิธีการศึกษา.....	28
วัสดุและอุปกรณ์.....	28
สารเคมี.....	29
วิธีทดลอง.....	31
การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย.....	31
การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล <i>Cephaleuros</i> และอาหารที่เหมาะสมในการสร้างมวลชีวภาพ.....	33
การศึกษาชนิดและปริมาณของรงควัตถุที่สะสมในสาหร่าย <i>Cephaleuros</i>	36
การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน กลีโกลไธด์ และ trace element ต่อการสะสมรงควัตถุ.....	39
วิธีการวิเคราะห์ค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay.....	40
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	41
การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย.....	41
การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล <i>Cephaleuros</i> และอาหารที่เหมาะสมในการสร้างมวลชีวภาพ.....	64
การศึกษาชนิดและปริมาณของรงควัตถุที่สะสมในสาหร่าย <i>Cephaleuros</i>	76
ผลของแหล่งไนโตรเจน กลีโกลไธด์ และ trace element ต่อการสะสมรงควัตถุของสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> Cp.1.....	83
การศึกษาค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของรงควัตถุด้วยวิธี DPPH assay.....	90
5 สรุปผลการศึกษา.....	95
รายการอ้างอิง.....	97

ภาคผนวก.....	110
ภาคผนวก ก.....	111
ภาคผนวก ข.....	114
ประวัติผู้วิจัย.....	118



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 วงศ์และชนิดของพืชเจ้าบ้านที่พบรายงานการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายในประเทศไทย	11
2-2 วงศ์และชนิดของพืชเจ้าบ้านที่พบรายงานการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายในต่างประเทศ.....	12
2-3 ชนิดของสาหร่ายก่อโรคสกุล <i>Cephaleuros</i> ที่มีการบันทึกในฐานข้อมูล Algaebase.....	15
2-4 ปัจจัยทางเคมีที่มีผลในการกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น.....	25
3-1 โพรเมออร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3-2 ชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาของการใช้สารกำจัดเชื้อจุลชีพ	34
3-3 โปรแกรมในการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC	38
4-1 จุดเก็บตัวอย่างและพืชที่พบโรคใบจุดสาหร่าย.....	43
4-2 จุดเก็บตัวอย่าง พืชที่พบโรคใบจุดสาหร่าย และรายชื่อตัวอย่างสาหร่าย	46
4-3 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคทั้ง 6 ตัวอย่าง.....	58
4-4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA กับฐานข้อมูล NCBI GenBank.....	61
4-5 ผลวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างสาหร่าย	63
4-6 ผลของชนิดอาหารต่อมวลชีวภาพของ <i>Cephaleuros</i> Cp.1 ในการเก็บตัวอย่างทุก 30 วัน	71
4-7 ส่วนประกอบ และปริมาณของแร่ธาตุใน trace element 2 ชนิด	89
4-8 ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox.....	90
4-9 ค่า EC_{50} ของสารสกัดสาหร่ายเมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด	92



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1 อาการของโรคใบจุดสาหร่ายบนพืชเจ้าบ้าน.....	7
2-2 แผนที่โลกแสดงบริเวณที่มีการรายงานการเกิดโรคใบจุดสาหร่าย	8
2-3 วงจรการแพร่กระจายของสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> ในธรรมชาติ.....	9
2-4 โครงสร้างของสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> spp.	16
2-5 ตำแหน่งการเข้าทำลายใบพืชของสาหร่ายก่อโรค <i>C. virescens</i> และ <i>C. parasiticus</i>	17
2-6 โครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ของสาหร่ายก่อโรค <i>Cephaleuros</i>	18
2-7 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการจากข้อมูลทางอนุชีวิวิทยาของสาหร่ายในอันดับ Trentepohliales จากข้อมูลที่ตำแหน่งยีน 18S rDNA.....	19
2-8 การศึกษาและเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่ายก่อโรคจากใบชา	20
2-9 โครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์	22
2-10 ความสามารถในการดูดซึมของแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์	26
2-11 กลไกการถ่ายทอดดีเอ็นเอจากแคโรทีนอยด์สู่เซลล์	27
3-1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่าง	31
3-2 การเตรียมเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นเพื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว.....	35
3-3 การคำนวณค่า R_f ของสารที่แยกได้	37
3-4 แผนการทดลองผลของแหล่งไนโตรเจน เกลือคลอไรด์ (NaCl) และ trace element ต่อการ สะสมรงควัตถุของ <i>Cephaleuros</i> Cp.1	39
4-1 การติดเชื้อใบจุดสาหร่ายอย่างรุนแรงของใบส้มโอ	42
4-2 ลักษณะสภาพแวดล้อมของพื้นที่จุดเก็บตัวอย่างพืชที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย.....	44
4-3 ลักษณะการปลูกพืชแบบยกร่อง	45
4-4 โรคใบจุดสาหร่ายบนต้นแก้วหิมาลัย ตลาดต้นไม้ อ.บางบัวทอง จ.นนทบุรี.....	46
4-5 ตัวอย่างสาหร่าย Cp.1 จากโรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนใบมะนาว.....	50
4-6 ตัวอย่าง Cp. 2 โรคใบจุดสาหร่ายบนใบชมพูมะเหมี่ยว	51
4-7 ตัวอย่าง Cp.3 โรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนพืชมะเขือเทศ.....	52
4-8 ตัวอย่าง Cp.4 โรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนใบส้มโอ	53
4-9 ตัวอย่าง Cp.5 โรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนใบฝรั่ง	54
4-10 ตัวอย่าง Cp.6 โรคใบจุดสาหร่ายบนพืชมะเขือเทศ	55
4-11 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA ของตัวอย่าง Cp. 1 ถึง Cp.6.....	61
4-12 การเจริญของเส้นสายสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> ในอาหารเหลวสูตร HSM	65
4-13 ลักษณะการเจริญของสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> ในอาหารเหลวสูตร HSM.....	66
4-14 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งหลังจากแช่ชิ้นส่วนใบพืชด้วยสารละลายคลอโรกซ์.....	67
4-15 การปนเปื้อนของเชื้อราอย่างรุนแรงเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> ร่วมกับยา benzimidazole.....	68

4-16 ผลของชนิดอาหารต่อการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> Cp.1	69
4-17 การเปลี่ยนแปลงสีและการเจริญของ <i>Cephaleuros</i> Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด	73
4-18 สีของทลัสส์และเส้นสายของ <i>Cephaleuros</i> Cp.1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร HSM และ BBM.....	74
4-19 รงควัสดุที่พบในสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> Cp.1 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ TLC.....	76
4-20 โครมาโตแกรมและสเปกตรัมของสารสกัดจากสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด	79
4-21 β -carotene content ของ <i>Cephaleuros</i> Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด.....	80
4-22 β -carotene production ของ <i>Cephaleuros</i> Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด.....	81
4-23 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> Cp.1 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน	84
4-24 ผลของการเติมเกลือคลอไรด์ต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน	86
4-25 ผลของ trace element ต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่าย <i>Cephaleuros</i> ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน	88
4-26 เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ Trolox เมื่อทดสอบด้วย DPPH assay.....	91
4-27 ค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสาหร่ายด้วยวิธี DPPH assay.....	93



บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ปัญหาหนึ่งที่สำคัญสำหรับเกษตรกรผู้เพาะปลูกพืช นอกจากปัญหาจากต้นทุนทางการเกษตรที่เกิดจาก ปุ๋ย ยากำจัดวัชพืช และแมลงศัตรูพืช ที่มีราคาสูงขึ้นแล้ว โรคพืชก็ยังเป็นอีกหนึ่งปัญหาสำคัญสำหรับเกษตรกร เนื่องจากโรคพืชนั้นสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ ยิ่งไปกว่านั้นหากพืชมีการติดเชื้ออย่างรุนแรงย่อมส่งผลกระทบต่อต้นพืชโดยตรง อาจทำให้ต้นพืชอ่อนแอและตายได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกษตรกรผู้เพาะปลูกจำเป็นต้องหาวิธีการในการป้องกันและกำจัดโรคพืชเพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตควบคู่ไปกับการเพาะปลูกพืชตามปกติ โดยเชื้อสาเหตุของโรคพืชที่พบได้ทั่วไปมักเกิดจากเชื้อราและแบคทีเรีย เช่น โรคราสนิม ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Puccinia sorghi* (Stein, 2011, Zitter, 1987) หรือโรคแคงเกอร์ (canker) ที่มีเชื้อสาเหตุเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* (Bashan et al., 1985) โดยโรคพืชที่กล่าวมานี้มีรายงานการแพร่ระบาดของโรคไปมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก การติดเชื้อทั้งสองโรคนี้นี้มักก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงแก่ต้นพืช อีกทั้งยังสามารถเกิดโรคได้กับทุกส่วนของต้นพืช ทำให้ต้นพืชทรุดโทรม ใบร่วง ผิวของผลผลิตไม่สวยงาม

สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคแก่พืชได้เช่นกัน โรคพืชที่เกิดจากสาหร่ายที่พบได้บ่อยได้แก่ โรคที่เกิดจากสาหร่ายก่อโรคในสกุล (genus) *Cephaleuros* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดสาหร่าย หรือบางครั้งเรียก โรคจุดสาหร่าย โรคจุดสาหร่ายสนิม โรคใบจุด (พรพิมล, 2549, ขจรศักดิ์, 2554) ซึ่งโรคที่กล่าวมานี้ตรงกับชื่อโรคภาษาอังกฤษที่เรียกว่า Algal leaf spot (Han et al., 2008) หรือ Algal red rust disease (Nelson, 2008) โดยส่วนใหญ่มักพบการติดเชื้อของโรคใบจุดสาหร่ายที่บริเวณใบมากกว่าบริเวณอื่นๆ ของพืช ซึ่งการติดเชื้อที่ใบจะส่งผลโดยตรงทำให้ลดพื้นที่ในการสังเคราะห์แสงของพืช หรือในกรณีที่เกิดการติดเชื้อรุนแรงเป็นระยะเวลานาน ต้นพืชจะแสดงอาการทรุดโทรม เปลือกแตกกร่อน ต้นแคระแกร็น ใบร่วง การเจริญเติบโตชะงัก และผลผลิตลดลง (Brown, 2013) ทั้งนี้มีรายงานว่าสาหร่ายสกุลนี้สามารถก่อโรคได้กับพืชได้หลากหลายเกือบ 300 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานการพบโรคใบจุดสาหร่ายในพืชเศรษฐกิจ เช่น ส้มโอ มะนาว ขามมะม่วง พุทรา ลำไย และลิ้นจี่ (พรพิมล, 2549, ขจรศักดิ์, 2554, บุรณี, 2550, วิชชา, 2543, นิพนธ์, 2553) จากการสืบค้นทั้งเว็บไซต์ของส่วนราชการทางการเกษตรโดยตรง เช่น เว็บไซต์กรมส่งเสริมการเกษตร พบรายงานอุบัติการณ์ของโรคใบจุดสาหร่าย (disease incidence) ในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามจากการติดตามค้นคว้าข้อมูลจากแหล่งข้อมูลเหล่านั้น ผู้วิจัยพบว่ามีเพียงการรายงานข้อมูลเบื้องต้นของโรคใบจุดสาหร่าย โดยมีการกล่าวถึงพืชเจ้าบ้าน (host plant)

อาการคร่าวๆของโรค พื้นที่ที่พบการระบาดของโรค และวิธีการแก้ไขหรือกำจัดโรคแบบต่างๆ ไปเท่านั้น แต่ไม่ปรากฏรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคหรือเชื้อก่อโรคกลุ่มนี้อย่างเป็นทางการในประเทศไทยแต่อย่างใด ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาของสาหร่ายที่เป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคใบจุดสาหร่าย โดยวางแผนที่จะทำการวิเคราะห์ชนิดของสาหร่ายก่อโรคที่พบจากการสำรวจพื้นที่การเกษตรในจังหวัดนครปฐมและสมุทรสาคร ผ่านการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลทางอนุชีววิทยา รวมไปถึงการแยกเพาะเลี้ยง และศึกษารังควัตถุที่พบในสาหร่ายก่อโรค โดยคาดหวังว่าผลการศึกษาที่ได้รับจะสามารถเป็นข้อมูลทางวิชาการให้กับเกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับด้านนี้นำไปใช้ประโยชน์ในส่วนที่เกี่ยวข้องได้อย่างถูกต้อง รวมไปถึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาวิจัยสาหร่ายก่อโรคพืชในประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย
2. เพื่อบ่งชี้และจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros*
3. เพื่อแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* จากตัวอย่างพืชที่ติดโรคใบจุดสาหร่าย
4. เพื่อศึกษารังควัตถุ โดยเฉพาะเบต้าแคโรทีนในสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros*

ขอบเขตการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างใบพืชที่พบการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายในจังหวัดนครปฐมและจังหวัดสมุทรสาคร อย่างน้อย 5 สกุลของพืช จากนั้นทำการแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* จากตัวอย่างใบพืชติดเชื้อดังกล่าวให้ได้เป็นชนิดเดี่ยว (unialgal culture) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 ชนิด ที่เหมาะสมกับการเจริญและการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 ชนิด รวมไปถึงศึกษารังควัตถุชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

การใช้ตัวย่อ

คำศัพท์	ตัวย่อ
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	DPPH
basic local alignment search tool	BLAST
bold's basal medium	BBM
concentration	conc
dry weight	DW
gram	g
half maximal effective concentration	EC ₅₀
high salt medium	HSM
high performance liquid chromatography	HPLC
internal transcribed spacer	ITS
liter	L
microgram	μg
micrometer	μm
microliter	μL
milligram	mg
millimeter	mm
milliliter	ml
nanometer	nm
national center for biotechnology information	NCBI
polymerase chain reaction	PCR
ribosomal RNA	rRNA
ribulose-bisphosphate carboxylase gene	<i>rbcL</i>
thin layer chromatography	TLC

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ปัญหาโรคพืชในประเทศไทย

มนุษย์นำพืชผลทางการเกษตรมาใช้ในการดำรงชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น นำมาใช้เป็นอาหาร เครื่องนุ่งห่ม ที่พักอาศัย ยารักษาโรค หรือนำมาเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการทำเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เชื้อเพลิงชีวภาพ (Burton and Fincher, 2014) ในขณะเดียวกันนับจากอดีตจนถึงปัจจุบัน พืชผลทางการเกษตรมักประสบปัญหาผลผลิตตกต่ำเนื่องจาก แมลงศัตรูพืช วัชพืช และจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ไม่ว่าจะเป็นเชื้อรา หรือแบคทีเรีย (Campbell and Madden, 1990) ที่เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ กับพืช โดยจะเรียกลักษณะอาการของพืชที่ผิดปกติไปจากปกติว่า “โรคพืช”

จากคำนิยามของ Pal และ Gardener (2006) โรคพืช หมายถึง สภาวะที่ต้นพืชมีการทำงานที่ผิดปกติจนมีผลเสียหายต่อพืช โดยทั่วไป โรคพืชแบ่งได้ 2 ประเภทตามสาเหตุหลักของการเกิดโรค ได้แก่ โรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต (Biotic pathogen) และโรคที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต (Abiotic pathogen) โดยโรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตนั้นจะถูกเรียกว่า โรคติดเชื้อ เกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กเข้าสู่พืช และทำลายเนื้อเยื่อพืช เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ซึ่งเชื้อก่อโรคพืชเหล่านี้สามารถแพร่กระจายติดต่อจากพืชสู่พืชได้คล้ายกับเชื้อก่อโรคของคนและสัตว์ การมีชีวิตของเชื้อสาเหตุของโรคเหล่านี้บนต้นพืชทำให้อาการผิดปกติทางสรีระของต้นพืช อาทิ ใบจุด ต้นเหี่ยว ใบด่าง ผลเน่า ต้นพืชตาย แคระแกร็น รากเน่า เป็นต้น

สิ่งมีชีวิตที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคพืช ได้แก่ แมลงศัตรูพืช ไร้เดือนฝอย และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Vanderplank, 2012) ซึ่งสิ่งมีชีวิตกลุ่มหลังนี้เองที่นับได้ว่าเป็นสาเหตุสำคัญของโรคพืชที่สร้างความกังวลให้แก่เกษตรกรค่อนข้างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว รุนแรง และสร้างความเสียหายได้เป็นบริเวณกว้าง (Fry, 2012) ตัวอย่างจากประวัติศาสตร์ที่มีการบันทึกไว้ อาทิ ความอดอยากครั้งใหญ่ในประเทศไอร์แลนด์ในปี ค.ศ. 1845 (O'Neill, 2010) ที่เกิดขึ้นเมื่อเชื้อรา *Phytophthora infestans* ก่อโรคใบไหม้ในมันฝรั่ง (Potato blight หรือ late blight) นอกจากนี้แล้ววิกฤติการณ์การสูญเสียผลผลิตมันฝรั่งจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันยังได้พบการบันทึกอีกครั้งในประวัติศาสตร์ของยุโรปในปี ค.ศ. 1846 ในประเทศสกอตแลนด์ก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงส่งผลกระทบต่อคนทั้งประเทศเช่นเดียวกัน

Vidaver และ Lambrecht (2004) ได้กล่าวไว้ว่า เชื้อจุลินทรีย์นับได้ว่าเป็นสาเหตุของโรคพืชที่สร้างความเสียหายให้แก่พืชผลมากที่สุด เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถแพร่ระบาดจากจุดหนึ่งไปอีกจุดหนึ่งและจุดอื่นๆ ต่อไปได้ดี ไม่ว่าจะเป็นการติดไปกับซากพืชที่เป็นโรค เมล็ด ท่อนพันธุ์ ดิน ปุ๋ยคอก วัสดุปลูกต่างๆ หรือแมลงพาหะ รวมไปถึงอับสปอร์ของจุลินทรีย์ที่สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำและปลิวไปกับลมได้ดี จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคพืชแบบโรคติดเชื้อซ้ำและระบาดขึ้นภายหลังได้ ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่พบได้บ่อย ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรคราแป้ง โรคราเขม่าดำ โรคใบไหม้มันฝรั่ง โรคแอนแทรคโนส (Arauz, 2000) โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น โรคใบด่างอ้อย (García-Arenal et al., 2001) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชเหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายที่รุนแรง จึงทำให้เกษตรกรผู้เพาะปลูกจำเป็นต้องหาวิธีการในการป้องกันและกำจัดเชื้อก่อโรคที่จะเกิดขึ้น เพื่อลดการสูญเสียอันเกิดจากโรคพืชก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิต

จากที่กล่าวมาข้างต้นเกี่ยวกับโรคพืช จะเห็นได้ว่าเป็นการแบ่งผลกระทบที่เกิดขึ้นจากโรคพืชออกเป็น 2 ส่วน คือผลกระทบที่เกิดขึ้นโดยตรงต่อพืชและผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อเกษตรกรผู้เพาะปลูก โดยผลกระทบทางตรงต่อพืชดังจะเห็นได้จากการที่โครงสร้างและหน้าที่ต่างๆ ของเนื้อเยื่อพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงอันเกิดจากการติดเชื้อของโรค เช่น การที่มีรอยโรคพืชเกิดขึ้นบนส่วนต่างๆ ของพืชเจ้าบ้านแล้วบดบังพื้นที่ในการสังเคราะห์แสง การลำเลียงน้ำและอาหารของพืชถูกขัดขวาง หรือการที่ส่วนต่างๆ ของพืชถูกเชื้อจุลินทรีย์ทำลายอย่างต่อเนื่อง (Homdork and Beck, 2000) ยิ่งไปกว่านั้น หากอาการของโรคมีความรุนแรงมากขึ้นมักส่งผลให้พืชแสดงความผิดปกติให้เห็นภายนอกได้ เช่น ลำต้นเกิดการแคระแกร็น ใบหงิก ใบมีจุด ขอบใบไหม้ มีบาดแผลที่เกิดจากการติดเชื้อซึ่งอาจเป็นจุดที่ทำให้เกิดการติดเชืชนิดอื่นได้ง่ายขึ้น/เพิ่มมากขึ้น และอาจทำให้ต้นพืชตายในที่สุด

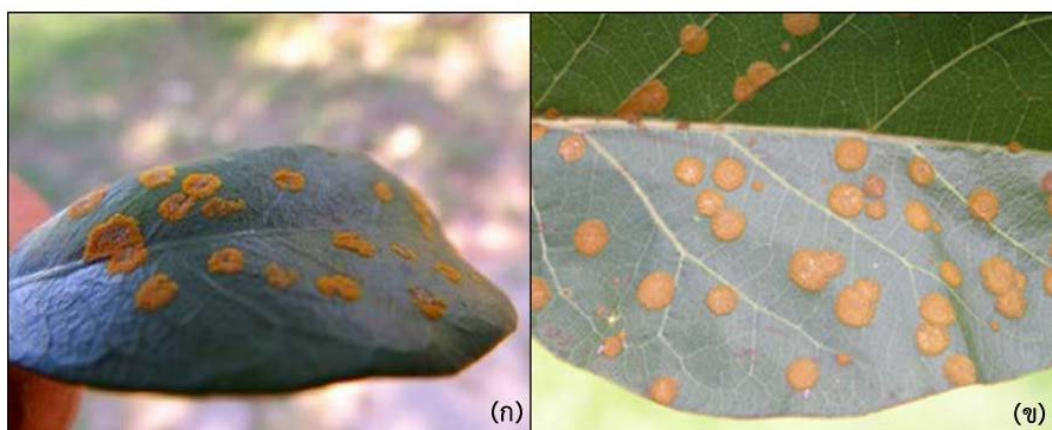
นอกจากที่กล่าวมาแล้ว โรคพืช ยังส่งผลกระทบทางอ้อมต่อเกษตรกรผู้เพาะปลูก โดยเมื่อพืชได้รับความเสียหายจากโรคพืชที่เกิดขึ้น ทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องใช้สารกำจัดศัตรูพืชเพื่อลดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างเนื่องจากการใช้สารกำจัดแมลงศัตรูพืชในปริมาณเกินกำหนด เป็นเหตุให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดการดื้อยา มีการรุกรานของศัตรูพืช หรือเชื้อโรคพืชชนิดใหม่ปรากฏอยู่บ่อยครั้ง (Chakraborty and Newton, 2011) ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบของโรคพืชต่อปัญหาในด้านการค้าและการส่งออกจะพบว่า พืชที่มีการติดโรคจะได้รับผลกระทบต่อราคาของผลผลิตทางการเกษตรให้ต่ำลงตามระดับของคุณภาพผลผลิตที่ไม่ได้ตามมาตรฐานและส่งผลกระทบต่อปริมาณการผลิตโดยรวมของสินค้าลดลงตามไปด้วย ซึ่งจากปัญหาที่กล่าวมานี้ย่อมทำให้เกษตรกรมีรายได้ที่น้อยลง หากผลผลิตทางการเกษตรนั้นเป็นสินค้าที่มีการซื้อขายกันระหว่างประเทศ ซึ่งการที่คุณภาพและปริมาณการผลิตที่ลดลงย่อมส่งผลในทางลบในระดับกว้าง รวมไปถึงอาจส่งผลให้โรคพืชที่ติดไปกับสินค้าสามารถแพร่ระบาดไปสู่สถานที่แห่งใหม่ในต่างประเทศได้ (Fry, 2012) นอกจากนี้ในบางประเทศอาจถือโอกาสใช้เป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้ารูปแบบใหม่ด้วยการกำหนดมาตรฐานคุณภาพ มาตรฐานสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช ดังนั้นจะเป็นการดีหากมีการศึกษาถึงเชื้อสาเหตุของโรคโดยตรง เพื่อที่จะสามารถนำมาใช้แก้ไขปัญหาในด้านของโรคพืชที่เกิดขึ้นเพื่อลดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นต่อเกษตรกรและผลผลิตทางการเกษตร (McMaugh, 2008)

จากรายงานการสำรวจโรคพืชภายในประเทศไทยที่ผ่านมา พบข้อมูลที่น่าสนใจว่า นอกจากจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นที่รู้จักกันอย่างดีที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้แล้ว สาหร่ายนับเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอีกกลุ่มที่สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ หากแต่ได้รับการกล่าวถึงน้อยมาก สาหร่ายหลายชนิดมีการดำรงชีวิตแบบปรสิต มีชีวิตและเพิ่มจำนวนบนพืชจนกระทั่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชและเนื้อเยื่อของพืช โดยสามารถพบรายงานของการแพร่ระบาดของโรคพืชและความเสียหายที่เกิดจากสาหร่ายได้ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด โรคพืชที่เกิดจากสาหร่ายและได้รับการกล่าวถึงบ่อยครั้ง ได้แก่ โรคใบจุดสาหร่าย โรคสาหร่ายจุดสนิม โรคจุดสนิม ซึ่งชื่อเรียกในภาษาไทยที่แตกต่างกันนี้ เมื่อสืบค้นถึงสาหร่ายที่เป็นเชื้อสาเหตุพบว่าเกิดจากสาหร่ายก่อโรคชนิดเดียวกันคือ *Cephaleuros* spp. (Mutiaru et al., 2015, Sunpapao et al., 2015a)

อย่างไรก็ตาม จากการค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลพบว่า การศึกษาสาหร่ายก่อโรคชนิดนี้ยังเป็นทางการในประเทศไทยยังมีน้อยมากและขาดการรายงานอย่างต่อเนื่อง (Mutiaru et al., 2015, Sunpapao et al., 2015a) โดยเอกสารที่พบส่วนมากเป็นการรายงานลักษณะของโรคจากนักวิชาการท้องถิ่นตามเว็บไซต์ที่เกี่ยวข้องกับกรมวิชาการเกษตรซึ่งไม่ได้รับการตีพิมพ์อย่างเป็นทางการ อย่างไรก็ตาม ความถี่ของการสำรวจพบโรคใบจุดสาหร่ายและความเสียหายที่เกิดโรคแก่พืชผลทางการเกษตรนั้นนับได้ว่าอยู่ระดับที่น่ากังวล อีกทั้งยังสามารถพบกระจายได้ในทุกภาคของประเทศไทย (คณินนิตย์ และคณะ, 2527, นิพนธ์, 2531, พรพิมล และคณะ, 2550, อุดร และคณะ, 2550) ประกอบกับข้อมูลที่ผู้วิจัยได้ประสบด้วยตัวเองเมื่อครั้งทำการสำรวจเบื้องต้นในพื้นที่การเกษตรจังหวัดนครปฐม ผู้วิจัยพบอาการของโรคที่มีลักษณะมีจุดขึ้นบนใบพืชและกิ่ง สีส้มคล้ายสีสนิม ลักษณะฉิวรอยโรคพู่ ซึ่งอาการของโรคตรงกับรายละเอียดของโรคใบจุดสาหร่ายที่ได้บรรยายไว้ในเอกสารจากนักวิชาการเกษตรของไทยและวารสารของต่างประเทศ และเมื่อสอบถามรายละเอียดเพิ่มเติมกับเกษตรกรที่เป็นเจ้าของพื้นที่เกษตรได้รับข้อมูลว่า เกษตรกรพบอาการของโรคดังกล่าวได้บ่อยครั้ง แต่เนื่องจากอาการของโรคที่ปรากฏไม่รุนแรงจึงไม่ได้ให้ความสำคัญ ยิ่งไปกว่านั้นเกษตรกรส่วนมากไม่แน่ใจถึงสาเหตุของอาการดังกล่าวที่พบในพืชและไม่ทราบว่าสาหร่ายสามารถก่อโรคกับพืชได้ โดยส่วนใหญ่คาดเดาด้วยความเข้าใจที่ผิดว่าโรคใบจุดสาหร่ายนี้มีเชื้อสาเหตุมาจากเชื้อรา เนื่องด้วยลักษณะของรอยโรคและชื่อเรียกของโรคที่มีความคล้ายคลึงกับโรคราสนิมที่มีเชื้อสาเหตุคือเชื้อรา จากการสำรวจจึงพบอีกว่า เกษตรกรหลายรายที่ประสบปัญหาการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายอย่างรุนแรง อันได้แก่ พบรอยโรคกระจายทั่วพืช ทั้งส่วนของใบและกิ่ง ในปัจจุบันวิธีการกำจัดโรคใบจุดสาหร่ายที่มีการรายงานคือการใช้ยากำจัดรา carbendazim (Ramya et al., 2013) ในขณะที่ข้อมูลที่มีในประเทศไทย เช่น จากเว็บไซต์กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์ กล่าวถึงการใช้ copper oxychloride ฉีดพ่นให้ทั่ว หรือการพ่นยากำจัดเชื้อรา contaf ที่พบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายได้ประมาณ 59.6- 63.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการใช้สารเคมีที่ผิดต่อการกำจัดเชื้อก่อโรคและนำไปสู่การใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินไปและผิดจุดประสงค์

2. โรคใบจุดสาหร่าย

โรคใบจุดสาหร่าย คือ โรคพืชที่เกิดจากสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* ซึ่งมีรายงานการพบโรคชนิดนี้ได้พบในหลายภูมิภาคของโลกรวมถึงประเทศไทยภายใต้ชื่อเรียกที่แตกต่างกัน เช่น โรคจุดสนิม โรคใบจุดสนิม โรคใบจุดสาหร่าย (ตารางที่ 2-1) โดยส่วนมากในประเทศไทยสามารถพบโรคใบจุดสาหร่ายในพืชที่ปลูกในพื้นที่ที่มีความชื้นสูงทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศ เช่น ทุเรียน ลำไย ปาล์มน้ำมัน (บุรณี, 2550, วิชชา, 2543) รวมไปถึงพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดอื่น เช่น พุทรา มังคุด มะม่วง ฝรั่ง ลิ้นจี่ ส้มโอ และมะนาว (บุรณี, 2011, พรพิมล, 2549) และจากประสบการณ์ตรงของผู้วิจัยยังพบอีกว่า สาหร่ายชนิดนี้ยังสามารถก่อโรคได้กับชมพู่มะเหมี่ยว เฟินชายผ้าสีดา และโอศอกอินเดียอีกด้วย จากที่กล่าวมาข้างต้นนี้จะเห็นได้ว่า พบการแพร่ระบาดของโรคนี้ได้ในพื้นที่เพาะปลูกหลายภาคส่วนของประเทศไทย อีกทั้งยังสามารถก่อโรคได้กับพืชหลายหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ และเมื่อเทียบกับการศึกษาสาหร่ายในด้านของการนำมาใช้ประโยชน์แล้วนั้น การศึกษาสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ได้รับความสนใจน้อยมาก



รูปที่ 2-1 อาการของโรคใบจุดสาหร่ายบนพืชเจ้าบ้าน
ก) ไบแมกโนเลีย (Tmethyl, 2013); ข) ไบอะโวคาโด (Nelson, 2012)

อาการของโรคใบจุดสาหร่ายในระยะเริ่มแรกจะมองเห็นลักษณะการติดเชื้อเป็นจุดขนาดเล็กสีเทาอ่อนปนเขียว ซึ่งต่อมาจุดที่เป็นโคโลนีของสาหร่ายนี้จะขยายขนาดขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีส้ม หรือ ส้มแดงที่คล้ายสีของสนิมเหล็ก ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะฟู นุ่มมีกลิ่นกำมะหยี่ (Nelson, 2008) ที่จะได้ชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 2-1 โดยเส้นสายของสาหร่ายจะเจริญเติบโตผ่านชั้นผิวนอกสุดของใบพืช (cuticle) ลงไปสู่ชั้น epidermis ของพืชเจ้าบ้าน (Brooks, 2004) การติดเชื้อที่บริเวณใบพืชจะส่งผลโดยตรงทำให้พืชมีพื้นที่ในการสังเคราะห์แสงลดลงและอาจทำให้เซลล์ของพืชในชั้น epidermis ตายในที่สุด (Brooks, 2004) และจากการรวบรวมข้อมูลพบว่าส่วนของพืชที่มักพบอาการของโรคใบจุดสาหร่ายได้บ่อยที่สุด คือ บริเวณใบ

จากการสืบค้นรายงานการอุบัติของโรค (Disease incidence) Holcomb (1986) ได้รายงานไว้ว่าสามารถพบการแพร่ระบาดของโรคใบจุดสาหร่ายได้ในพื้นที่ที่มีสภาพอากาศแบบเขตร้อนและร้อนชื้น (Tropical & Subtropical) โดยพบข้อสังเกตที่น่าสนใจ คือ มักมีรายงานการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายในพื้นที่ที่มีแสงแดดจัด ดังจะเห็นได้จากจากรายงานของ Nelson (Nelson, 2008) ที่กล่าวถึงการพบสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* ในหมู่เกาะฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยพบการติดเชืบบนต้นแมคโนเลีย (รูปที่ 2-1ก) อะโวคาโด (รูปที่ 2-1ข) และฝรั่ง ซึ่งการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคนี้นี้มีความสำคัญต่อการสูญเสียผลิตผลของพืชเศรษฐกิจสำคัญในเขตร้อนและเขตอบอุ่นเป็นอย่างมาก อาทิเช่น อะโวคาโด ปาล์มน้ำมัน มะม่วง ทูเรียน ส้มโอ เป็นต้น (Gokhale, 2012) นอกจากนี้ยังพบรายงานการเกิดโรคนี้นี้ในรัฐลุยเซียนา ประเทศสหรัฐอเมริกา (Holcomb, 1986) เฟรนช์เกียนา ประเทศฝรั่งเศส ทวีปอเมริกาใต้ (Rindi and López-Bautista, 2008) ทวีปแอฟริกา ตะวันตก (Deighton, 1936) แคริบเบียน (Phelps, 1986) บราซิล และฟลอริดาอีกด้วย (Marlatt and Alfieri, 1981)



รูปที่ 2-2 แผนที่โลกแสดงบริเวณที่มีการรายงานการเกิดโรคใบจุดสาหร่าย

นอกจากจะพบการกระจายของโรคใบจุดสาหร่ายในแถบทวีปอเมริกาและแอฟริกาแล้ว ยังปรากฏการแพร่ระบาดของโรคใบจุดสาหร่ายในทวีปเอเชียในหลายประเทศเช่นกัน ได้แก่ จีน (Liu et al., 2012) ญี่ปุ่น (Suto and Ohtani, 2009) เกาหลี (Han et al., 2008) อินเดีย (Ponmurugan et al., 2010) อินโดนีเซีย (Shivas et al., 1996) ลาว และเวียดนาม (Dell and Thu, 2008) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบโรคใบจุดสาหร่ายอยู่ในหลายพื้นที่ทั่วประเทศ โดยพื้นที่ที่พบรายงาน ได้แก่ ภาคใต้ เช่น จังหวัด พัทลุง ตรัง สตูล และสงขลา (อนุรักษ์ และคณะ, 2558) นอกจากนี้ยังพบการแพร่ระบาดของโรคดังกล่าวในแปลงปลูกของเกษตรกรจังหวัด ศรีสะเกษ นครนายก ปราจีนบุรี ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร นครปฐม สมุทรสงคราม กาญจนบุรี สุราษฎร์ธานี และสงขลาอีกด้วย (อุตร และคณะ, 2550)

สาหร่ายก่อโรคชนิดนี้มีพืชเจ้าบ้าน หรือ host ที่หลากหลาย ผลจากการรวบรวมข้อมูลชนิดพืชเจ้าบ้านของสาหร่ายก่อโรคพบว่า มีพืชเจ้าบ้านของสาหร่าย *Cephaleuros* รวมกันมากกว่า 128 สกุล 287 ชนิด (ตารางที่ 2-1) ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ อาทิเช่น รัฐฟลอริดาและรัฐลุยเซียนา ประเทศอเมริกา พบพืชที่มีการติดเชื้อสาหร่าย *Cephaleuros* ทั้งหมด 157 และ 145 ชนิดตามลำดับ (Marlatt and Alfieri, 1981, Holcomb, 1986) รัฐเปอร์นัมบูกู ประเทศบราซิล พบพืชเจ้าบ้านทั้งหมด 214 ชนิด (Batista and Lima, 1949) กลุ่มของพืชเจ้าบ้านที่พบการติดเชื้อใบจุดสาหร่ายนั้นพบตั้งแต่ เฟิน ปรง ปาล์ม รวมไปถึงวัชพืชหลายชนิด แต่พบการแพร่ระบาดของโรคในกลุ่มพืชที่มีท่อลำเลียงมากที่สุด เช่น มะม่วง อะโวคาโด แมกโนเลีย ฝรั่ง ส้ม (Holcomb, 1986, Chapman and Good, 1983) รวมถึงพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ชา อย่างไรก็ตามความถี่ของการเกิดอุบัติการณ์ของโรคนั้นแตกต่างกันตามชนิดของพืช (Ramya et al., 2013, Hsieh, 1983, Joubert and Rijkenberg, 1971)



รูปที่ 2-3 วงจรการแพร่กระจายของสาหร่าย *Cephaleuros* ในธรรมชาติ

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* นั้นมีการแพร่ระบาดได้ในหลายทวีปทั่วโลก และจากการค้นคว้าพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของโรคโดยตรงคือ น้ำและลม ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ ที่ช่วยในการแพร่กระจายอับสปอร์ที่ภายในมี zoospores ไปกับลม หรือน้ำฝนในฤดูฝน (เช่นเดียวกับการใช้น้ำที่มี zoospore ปะปนรดไปยังบริเวณอื่นบนใบเดียวกันหรือบนใบอื่น) เนื่องจากวงจรชีวิตของสาหร่ายก่อโรคชนิดนี้มีการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ตามช่วงฤดูกาล โดยจะเริ่มต้นการแพร่กระจายของโรคในช่วงฤดูฝนเมื่ออับสปอร์ถูกพัดพาปลิวไปตามลม และน้ำฝนไปยังพืชต้นอื่น (Suto and Ohtani, 2009, Nelson, 2008) ตกลงบนพืชที่มีบาดแผล ก็จะทำให้ zoospore ที่อยู่ภายในอับสปอร์เข้าสู่พืชได้ง่ายยิ่งขึ้น

หลังจากนั้น สาหร่ายจะเข้าเจริญลงสู่ชั้นใบพืชและเข้าสู่ระยะ active stage ยังไม่สามารถสังเกตเห็นรอยโรคได้ชัดเจน ต่อมาจะเข้าสู่ระยะ later stage ซึ่งจะมีการพัฒนาของทัลลัส (thallus) ในช่วงฤดูแล้ง ก่อนเข้าสู่ระยะ reproductive ในช่วงฤดูฝน โดยสร้างโครงสร้างของก้านชูอับสปอร์ ที่มีอับสปอร์ (sporangium) ภายในอับสปอร์บรรจุไปด้วยซุโอสปอร์ (zoospore) ชูขึ้นไปในอากาศ (Brooks et al., 2015) สาหร่ายก่อโรคสามารถสืบพันธุ์ได้ 2 แบบ คือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทำได้โดยการสร้าง gametes จากโครงสร้างสืบพันธุ์ที่สร้างบริเวณปลายของเส้นใย และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือเริ่มจากการพัฒนาก้านชูอับสปอร์ (sporangioophore) ที่บริเวณทัลลัส และสร้าง zoospores ที่มีแฟลกเจลลารวายน้ำได้ หลังจากนั้นก็จะมีการปลดปล่อย zoospores อีกครั้งในช่วงหน้าฝน ดังแสดงในรูปที่ 2-3 จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงพบว่าโรคนี้นักมีการแพร่ระบาดมากในช่วงฤดูฝน (Thompson and Wujek, 1997) หรือในแหล่งที่มีความชื้นสูงและมีการปลูกพืชอยู่หนาแน่น รวมถึงในบริเวณพื้นที่การเกษตรที่ไม่ได้รับการดูแลรักษาอย่างต่อเนื่อง (Han et al., 2008)

เมื่อรวบรวมข้อมูลของโรคใบจุดสาหร่ายจากหลายแหล่งทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทั้งข้อมูลที่เป็นทางการและไม่เป็นทางการ พบชื่อโรคและชนิดของพืชเจ้าบ้านดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2-1 และ 2-2 จากข้อมูลจะเห็นได้ว่าพบพืชที่สามารถติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายได้มากมายหลายชนิด แต่ในประเทศไทยยังมีรายงานการพบชนิดพืชที่เกิดการติดโรคใบจุดสาหร่ายไม่มากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคใบจุดอย่างสาหร่ายเป็นจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ อีกทั้งรายงานส่วนมากจะเป็นการกล่าวถึงโรคนี้อย่างสั้นๆ ตามเว็บไซต์ที่เกี่ยวข้องกับข้อมูลทางการเกษตรและโรคพืชเท่านั้น



ตารางที่ 2-1 วงศ์และชนิดของพืชเจ้าบ้านที่พบรายงานการเกิดโรคใบจุดสำหรับในประเทศไทย

วงศ์ (Family)	ชนิด (Species)	ชื่อโรค	เอกสารอ้างอิง
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> (มะม่วง)	ใบจุดสนิม	ขจรศักดิ์ (2554)
Calophyllaceae	<i>Calophyllum inophyllum</i> (กระทิง)	จุดสำหรับ	นิพนธ์ (2553)
Fabaceae	<i>Acacia auriculiformis</i> (อะคาเซีย)	จุดสำหรับ	อนุรักษ์ และคณะ (2558)
Gentianaceae	<i>Fagraea fragrans</i> (กันเกรา) <i>Cananga odorata</i> (กระดังงา)	จุดสำหรับ	นิพนธ์ (2553)
Rhamnaceae	<i>Ziziphus jujuba</i> (พุทรา)	ใบจุดสำหรับ	พรพิมล (2549)
Malvaceae	<i>Durio</i> sp. (ทุเรียน) <i>Theobroma cacao</i> (โกโก้)	จุดสนิม จุดสำหรับ	บูรณี (2550) อนุรักษ์ และคณะ (2558)
Rutaceae	<i>Citrus maxima</i> (ส้มโอ) <i>C. aurantifolia</i> <i>C. sinensis</i> (ส้ม)	จุดสนิม จุดสำหรับ ใบจุดสำหรับ	คณินนิตย์ (2527) อนุรักษ์ และคณะ (2558) บูรณี (2550)
Sapindaceae	<i>Dimocarpus longan</i> (ลำไย)	จุดสำหรับสนิม	วิชา (2543)
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i> (ฝรั่ง)	ใบจุดสำหรับ จุดสำหรับ	ฉัญฉุติ (ไม่ระบุปีที่เขียน) อนุรักษ์ และคณะ (2558)

ตารางที่ 2-2 วงศ์และชนิดของพืชเจ้าบ้านที่พบรายงานการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายในต่างประเทศ

วงศ์ (Family)	ชนิด (Species)	ชื่อโรค	เอกสารอ้างอิง
Acanthaceae	<i>Petalidium barlerioides</i>		
	<i>Thunburgia grandiflora</i>		
Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i>		
	<i>Mangifera indica</i>		
	<i>Metopium toxiferum</i>		
	<i>Semecarpus anacardium</i>		
Annonaceae	<i>Artabotrys hexapetalous</i>		
Apocynaceae	<i>Carissa carandus</i>		
	<i>Nerium oleander</i>		
Aracaceae	<i>Aglaonema sp.</i>	Algal leaf spot	Marlatt และ Alfieri (1981) และ Gokhale และคณะ (2012)
	<i>Caryota urens</i>		
	<i>Philodendron radiatum</i>		
Bignoniaceae	<i>Dolichandrone spathacea</i>		
	<i>Tabebuia pentaphylla</i>		
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i>		
Caesalpiniaceae	<i>Saraca asoca</i>		
Euphorbiaceae	<i>Excoecaria agallocha</i>		
	<i>Bishofia javanica</i>		

ตารางที่ 2-2 วงศ์และชนิดของพืชเจ้าบ้านที่พบรายงานการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายในต่างประเทศ (ต่อ)

วงศ์ (Family)	ชนิด (Species)	ชื่อโรค	เอกสารอ้างอิง
Fagaceae	<i>Quercus glauca</i>		
	<i>Q. virginiana</i>		
Gnetaceae	<i>Gnetum ula</i>		
Lauraceae	<i>Cinnamomum camphora</i>		
	<i>Persea americana</i>		
	<i>P. americana</i>		
Magnoliaceae	<i>Michelia champaca</i>		
	<i>Magnolia pumila</i>		
	<i>M. grandiflora</i>	Algal leaf spot	Marlatt และ Alfieri (1981) และ Gokhale และคณะ (2012)
	<i>Michelia figo</i>		
Malvaceae	<i>Hibiscus tiliaceus</i>		
Palmaceae	<i>Butia capitata</i>		
	<i>Sabal palmetto</i>		
Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i>		
Polypodiaceae	<i>Cyrtomium falcatum</i>		
	<i>Platynerium bifurcatum</i>		
	<i>P. hillii</i>		
	<i>P. vassei</i>		

จากการสืบค้นโรคพืชที่มีเชื้อสาหร่ายเป็นสาเหตุของโรคใบจุดสาหร่ายในประเทศไทย พบอาการของโรคที่สามารถสังเกตเห็นได้เด่นชัดคือ การที่สาหร่ายก่อโรคสร้างโคโลนีที่มีลักษณะเป็นจุด และมีสีส้มคล้ายสีของสนิมบนพืชเจ้าบ้าน (รูปที่ 2-2) และคาดว่าลักษณะดังกล่าวนี้เองที่สัมพันธ์กับชื่อโรคในภาษาไทยว่า โรคใบจุดสาหร่าย (พรพิมล, 2549) หรือ โรคจุดสาหร่ายสนิม (วิชา, 2543) ซึ่งลักษณะอาการมีความคล้ายคลึงกับชื่อโรคในภาษาอังกฤษที่เรียกว่า algal leaf spot หรือ algal red rust disease (Nelson, 2008) โดยมีการระบุว่าเชื้อสาหร่ายที่เป็นสาเหตุหลักของโรค คือ สาหร่ายสีเขียวในสกุล *Cephaleuros* ที่มีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้ (Juan M. López-Bautista, 2002)

ดิวิชัน (Division) Chlorophyta

ชั้น (Class) Ulvophyceae

อันดับ (Order) Trentepohliales

วงศ์ (Family) Trentepohliaceae

สกุล (Genus) *Cephaleuros*

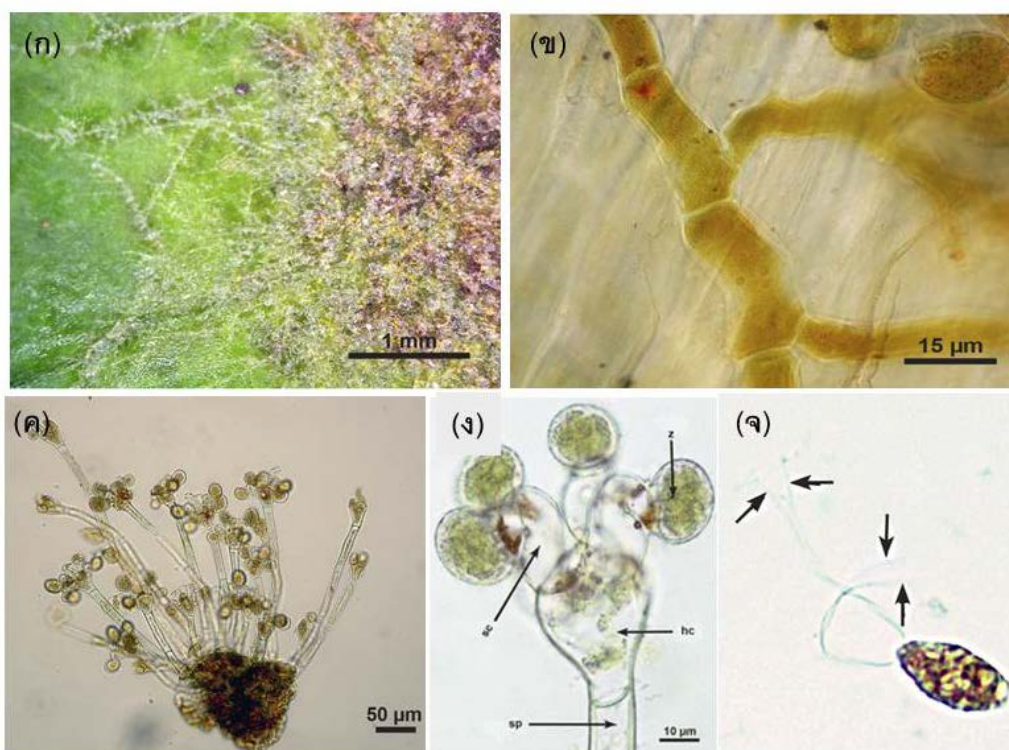
การศึกษาเกี่ยวกับโรคใบจุดสาหร่ายเริ่มต้นในประเทศแถบยุโรป (Thompson and Wujek, 1997, Juan M. López-Bautista, 2002) จากนั้นจึงกระจายมายังประเทศแถบเอเชีย ผลการสำรวจตัวอย่างพืชที่เกิดโรคใบจุดสาหร่ายจากหลายทวีป พบว่ามีสาหร่าย *Cephaleuros* 2 ชนิดหลักที่ก่อปัญหาโรคพืช ได้แก่ *Cephaleuros virescens* และ *Cephaleuros parasiticus* (Marlatt and Alfieri, 1981, Rindi and López-Bautista, 2008, Phelps, 1986, Liu et al., 2012, Shivas et al., 1996, Han et al., 2008, Ponmurugan et al., 2010) ทั้งนี้มีรายงานการพบสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ทั้งหมด 28 ชนิด ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล Algaebase แต่มีเพียง 17 ชนิด เท่านั้นที่ได้รับการยืนยันด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Guiry and Guiry, 2015) ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนในประเทศไทยเท่าที่มีเอกสารปรากฏนั้นมีการกล่าวถึงสาหร่ายก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *Cephaleuros diffusus*, *C. expansa*, *C. karstenii*, *C. solutus* และ *C. virescens* (อนุรักษ์ และ คณะ, 2558) โดยชนิดที่มีการกล่าวถึงบ่อยครั้งที่สุดคือ *C. virescens* (บุรณี, 2550, พรพิมล, 2549)

ตารางที่ 2-3 ชนิดของสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* ที่มีการบันทึกในฐานข้อมูล Algaebase

ชื่อชนิด	เอกสารอ้างอิง
<i>Cephaleuros albidus</i>	Karsten (1891)
<i>Cephaleuros minimus</i>	
<i>Cephaleuros mycoidea</i>	
<i>Cephaleuros laevis</i>	
<i>Cephaleuros parasiticus</i>	
<i>Cephaleuros solutus</i>	
<i>Cephaleuros aucubae</i>	Suto และ Ohtani (Suto and Ohtani, 2009)
<i>Cephaleuros japonicus</i>	
<i>Cephaleuros microcellularis</i>	
<i>Cephaleuros biolophus</i>	Thompson และ Wujek (1997)
<i>Cephaleuros diffusus</i>	
<i>Cephaleuros drouetii</i>	
<i>Cephaleuros expansa</i>	
<i>Cephaleuros expansus</i>	
<i>Cephaleuros parasiticus var. nana</i>	
<i>Cephaleuros pilosa</i>	
<i>Cephaleuros pilosus</i>	
<i>Cephaleuros tumidae-setae</i>	
<i>Cephaleuros villosus</i> (D.L.Dilcher)	
<i>Cephaleuros candelabrum</i>	Schmidle (1897)
<i>Cephaleuros henningsii</i>	
<i>Cephaleuros karstenii</i>	
<i>Cephaleuros lagerheimii</i>	
<i>Cephaleuros pulvinatus</i>	
<i>Cephaleuros coffeae</i>	Went (1895)
<i>Cephaleuros densus</i> Kunze	Fries (1823)
<i>Cephaleuros virescens</i> Kunze	
<i>Cephaleuros endophyticus</i> (F.E.Fritsch)	Printz (1964)
<i>Cephaleuros virescens</i> f. <i>sessilis</i>	Islam (1972)

* หมายเหตุ ตัวอักษรหนา หมายถึง ชนิดของสาหร่ายที่ได้รับการยืนยันด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา
ทำการสืบค้นเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2559

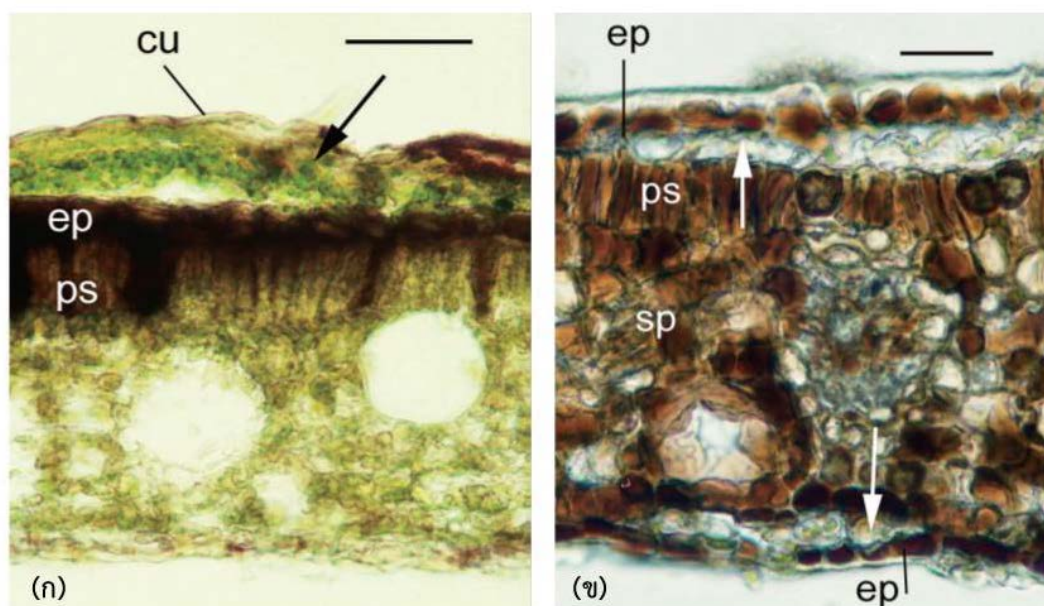
ชีววิทยาของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* เป็นสาหร่ายในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว หรือ Chlorophyta ที่จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายกึ่งบนบก หรือ subaerial algae ดำรงชีวิตในลักษณะปรสิตบนส่วนต่างๆ ของพืช โดยมักพบสาหร่ายสกุลนี้ปรากฏบ่อยที่สุดในบริเวณใบพืช สามารถสังเกตเห็นรอยโรคได้ด้วยตาเปล่าจากจุดโคโลนีของเส้นใยสาหร่ายที่มักมีสีส้มจนถึงสีน้ำตาลแดง สีที่มองเห็นนั้นเกิดจากเซลล์ของสาหร่ายมีรงควัตถุคือ hematochrome ที่เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์และอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์ (Brooks et al., 2015) การเจริญของสาหร่ายก่อโรคบนพืชเจ้าบ้านนั้นเริ่มเจริญจากศูนย์กลางแล้วแผ่ออกรอบข้างจนทำให้เห็นรอยโรค (lesion) มีลักษณะค่อนข้างกลม ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรอยโรคชนิดนี้ อาทิ สี ขนาด ลักษณะขอบ ตำแหน่งของรอยโรคบนพืช ลักษณะของรอยแผล การเปลี่ยนแปลงสีของแผล (discoloration) เกิดจากการที่สาหร่ายเข้าไปทำลายชั้นใบพืช ส่งผลให้มีการเสื่อมสลายของ protoplast และมีผลทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชตาย (necrosis) ในบริเวณที่สาหร่ายเข้าทำลาย โดยการศึกษาสาหร่ายก่อโรคชนิดนี้สามารถตรวจสอบการเข้าทำลายของโรคได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั้งชนิดสเตอริโอและแบบเลนส์ประกอบ ด้วยลักษณะที่กล่าวมาแล้วนี้ Thomson และ Wukek (1997) ได้รายงานไว้ว่า ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของสาหร่ายสกุลนี้ได้



รูปที่ 2-4 โครงสร้างของสาหร่าย *Cephaleuros* spp.

ก) ทลล์สของสาหร่าย *C. minimus* ที่เจริญบนผิวใบของพืชเจ้าบ้าน, ข) เส้นสายของสาหร่าย *C. minimus* ภายในชั้น intercellular, ค-ง) กลุ่มโครงสร้างสืบพันธุ์ของ *C. parasiticus* ที่เจริญก้านชูอับสปอร์ออกมาจากผิวใบพืชด้านล่าง, จ) zoospore ของสาหร่าย *C. japonicas* ที่มี flagella 4 เส้น (ลูกศรชี้) ช่วยในการเคลื่อนที่

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทำให้สามารถแบ่งโครงสร้างของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ได้เป็น 2 ส่วน คือ 1) ส่วนที่ขนานราบติดผิวพืช (prostrate system) และ 2) ส่วนที่ชูออกมาจากพื้นผิวพืช (erect system) ส่วนที่ขนานราบติดกับผิวพืชประกอบไปด้วยทลัสส์ ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นเส้นใยเดี่ยวจำนวนมากเรียงต่อกัน หรือเกิดจากการแตกแขนง (ramulus) ของเส้นใยจนเจริญกลายเป็นทลัสส์ (รูปที่ 2-4ก) ทั้งนี้ Suto และคณะวิจัย (2009) กล่าวว่า ตำแหน่งการเข้าเจริญของทลัสส์บนชั้นใบพืช (thallus growth habit) สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคได้ โดยผลจากการค้นคว้าพบว่า สาหร่าย *C. virescens* *C. microcellularis* *C. aucubae* จะพบการเจริญของทลัสส์ในชั้น subcuticular ของพืชเจ้าบ้าน (รูปที่ 2-5ก) ในขณะที่สาหร่าย *C. parasiticus* นั้นจะพบการเจริญที่ลึกเข้าไปในชั้น palisade tissue spongy tissue และ vascular bundles (รูปที่ 2-5ข) ถือได้ว่า การเจริญของเส้นใยสาหร่ายชนิดหลังนี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายที่รุนแรงกับพืชเจ้าบ้านได้มากกว่า *Cephaleuros* ชนิดอื่น (Suto et al., 2014, Suto, 2009)



รูปที่ 2-5 ตำแหน่งการเข้าทำลายใบพืชของสาหร่ายก่อโรค *C. virescens* และ *C. parasiticus*

ก) การเข้าทำลายของเชื้อสาหร่ายก่อโรค *C. virescens* (ลูกศรชี้)

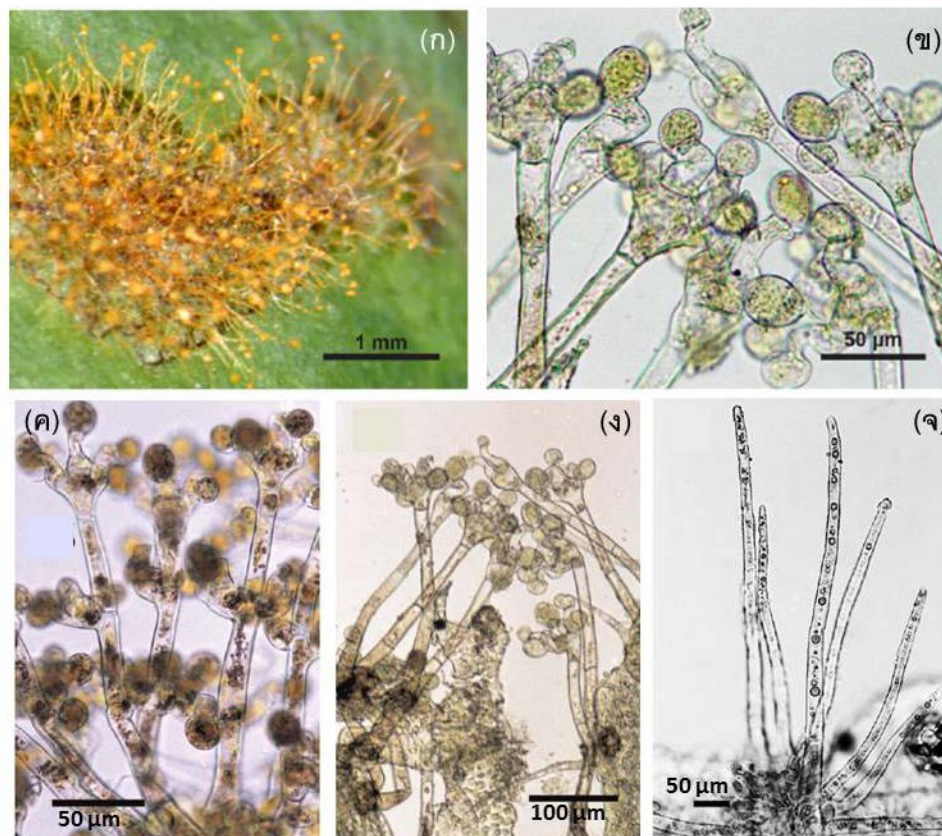
ข) การเข้าทำลายของเชื้อสาหร่ายก่อโรค *C. parasiticus* (ลูกศรชี้) ทั้งใบพืชด้านบนและด้านล่าง

*หมายเหตุ จากรูป cu แทน cuticle; ep แทน epidermal cells; ps แทน palisade cells; sp แทน spongy cells (scale bar=5 μ m)

ที่มา: Suto และคณะ (2014)

ตำแหน่งของรอยโรคบริเวณผิวใบพืชก็สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคเบื้องต้นได้เช่นกัน โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 ตำแหน่ง คือ 1) ตำแหน่งการพบรอยโรคบริเวณผิวใบพืชด้านบน ซึ่งสาหร่ายก่อโรคที่พบลักษณะดังกล่าวได้แก่ *C. microcellularis* *C. virescens* *C. aucubae* และ 2.) ตำแหน่งการพบรอยโรคบริเวณผิวใบพืชด้านบนและด้านล่าง ได้แก่

C. parasiticus อย่างไรก็ตามในบางกรณีพบว่าไม่สามารถจำแนกชนิดสาหร่ายก่อโรคด้วยตำแหน่งการเกิดรอยโรคบนผิวใบพืชเจ้าบ้านได้ เนื่องจากมีสาหร่ายก่อโรคบางชนิดที่มีตำแหน่งการเกิดรอยโรคไม่แน่นอน นั่นคือสามารถพบตำแหน่งการเกิดรอยโรคได้ทั้งผิวใบพืชด้านบนเพียงอย่างเดียว หรือพบได้ทั้งผิวใบพืชด้านบนและด้านล่าง อาทิเช่น *C. japonicus* และ *C. biolophus* ดังนั้นการที่จะจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคจึงจำเป็นต้องใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ในการพิจารณาร่วมด้วย

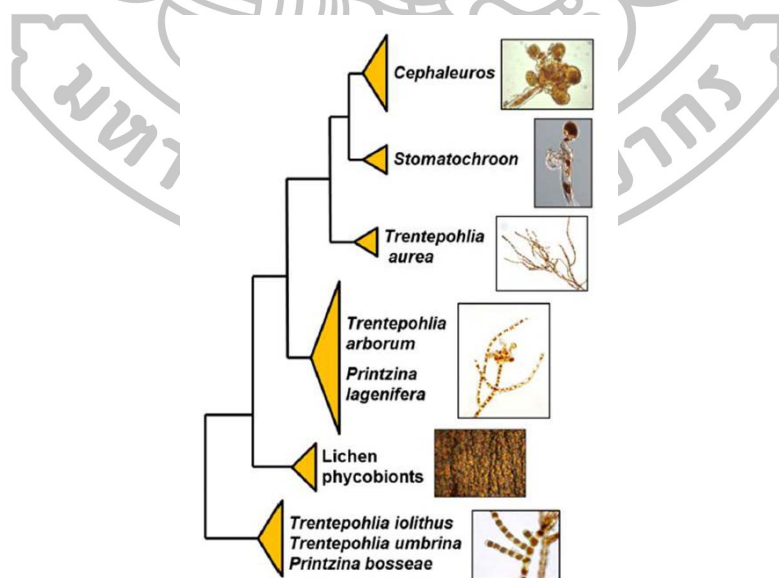


รูปที่ 2-6 โครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ของสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ก.) ลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า, ข.) ลักษณะของก้านชูอับสปอร์ของสาหร่าย *C. virescens*, ค) ก้านชูอับสปอร์ของสาหร่าย *C. biolophus*, ง.) ก้านชูอับสปอร์ของสาหร่าย *C. japonicas*, จ.) ก้านชูอับสปอร์ของสาหร่าย *C. microcellularis*
ที่มา: Brook และคณะ (2015) และ Suto และคณะ (2009)

นอกจากส่วนที่ขนานราบติดผิวพืชที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมีลักษณะที่ต้องพิจารณาอีกประการคือ ส่วนที่ชูออกมาจากพื้นผิวของสาหร่าย *Cephaleuros* หมายถึง โครงสร้างที่ช่วยในการสืบพันธุ์ ซึ่งประกอบไปด้วย ก้านชูอับสปอร์ที่ยื่นชูออกมาจากพื้นผิวพืช ประกอบไปด้วยอับสปอร์จำนวน 3-8 เซลล์ (รูปที่ 2-6ก) และลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์นี้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้ง่าย เนื่องจากก้านชูอับสปอร์มีอยู่หนาแน่นเฉลี่ยมากถึง 250 ก้าน ต่อพื้นที่ที่ลึกลง 2 มิลลิเมตร อีกทั้งมีสีส้มคล้ายกำมะหยี่ที่เห็นได้ชัด (รูปที่ 2-6ก) ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถนำมาพิจารณาใน

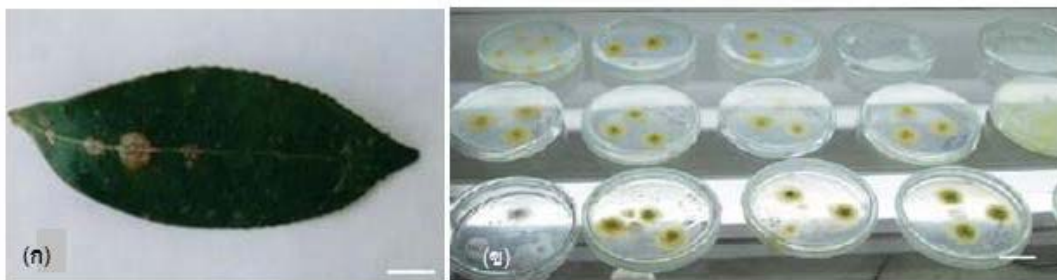
การจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ได้เช่นเดียวกัน เช่น ขนาดความกว้างและยาวของ ก้านชูอับสปอร์ (sporangiophores) และอับสปอร์ (sporangia) รวมไปถึงตำแหน่งการวางตัวของอับสปอร์ ได้แก่ 1.) ตำแหน่งอับสปอร์ที่บริเวณส่วนปลายก้านชู (terminal) ซึ่งสาหร่ายก่อโรคที่พบ ลักษณะดังกล่าว ได้แก่ *C. virescens*, *C. parasiticus*, *C. aucubae* และ *C. japonicas* (รูปที่ 2-6 ข,ง) หรือ 2.) ตำแหน่งอับสปอร์ที่บริเวณส่วนข้างก้านชู (lateral) เช่น สาหร่าย *C. biolophus* (รูปที่ 2-6ค) เป็นต้น

นอกจากการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* แล้ว ยังปรากฏงานวิจัยที่ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) เพื่อระบุ ชนิดรวมถึงสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) ผ่านการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีนต่างๆ มาใช้เพื่อจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของ สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ (Juan M. López-Bautista, 2002) จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่า แรกเริ่มของการศึกษาข้อมูลทางอณูชีววิทยาของสาหร่ายในอันดับ Trentipohliales นั้นเป็นการศึกษาข้อมูล ที่ตำแหน่งยีน SSU rRNA (Zechman et al., 1990) ในสาหร่ายสกุล *Trentepohlia* ต่อมาจึงพบการ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *rbcl* (Rindi et al., 2009) และ 18S rRNA มาใช้กับการ จัดจำแนกสาหร่าย *Cephaleuros* และพบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าว สามารถ บอกความแตกต่างของชนิดสาหร่ายก่อโรคสกุลนี้ได้ดี นอกเหนือไปจากการบ่งชี้ชนิดของสาหร่ายก่อ โรคแล้ว (Moro et al., 2009, Liu et al., 2012) ยังมีการใช้ลักษณะทางอณูชีววิทยาเพื่อการศึกษา ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ดังเช่นในงานวิจัยของ López-Bautista และคณะ (2006) ที่กล่าวว่าสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* นั้นมีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการที่มี บรรพบุรุษร่วมกันกับสาหร่ายสกุล *Trentepohlia* ดังแสดงในรูปที่ 2-7



รูปที่ 2-7 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการจากข้อมูลทางอณูชีววิทยาของสาหร่ายในอันดับ Trentipohliales จากข้อมูลตำแหน่งยีน 18S rDNA
ที่มา: Brook และคณะ (2015)

นอกจากการศึกษาและสำรวจสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* แล้ว ในปัจจุบันยังมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* เพื่อการศึกษาวิจัยไม่ว่าจะเป็นการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ชนิด และปริมาณของกรดอะมิโนของสาหร่าย *Cephaleuros* (Ponmurugan et al., 2010) อย่างไรก็ตามจากรายงานผลการวิจัยพบว่าอุปสรรคสำคัญในการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* จากธรรมชาติ คือ การปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ จากธรรมชาติ เช่น รา และแบคทีเรียเป็นจำนวนมากขณะที่ทำการเพาะเลี้ยง เนื่องจากในธรรมชาตินั้นสามารถพบการเจริญของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* อยู่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จำพวกราและไลเคนได้บ่อยครั้ง (Thompson and Wujek, 1997) ดังนั้นการที่จะแยกสาหร่ายให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์นั้นจึงทำได้ยาก ได้มีการทดลองและแนะนำวิธีการแก้ไขปัญหาดังกล่าวด้วยการเติมยาปฏิชีวนะชนิด benzimidazole และ streptomycin ที่ความเข้มข้น 10 ppm และ 50 ppm ตามลำดับ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจากการเพาะเลี้ยงพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญได้ดีและกำจัดกาปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (Suto and Ohtani, 2011)



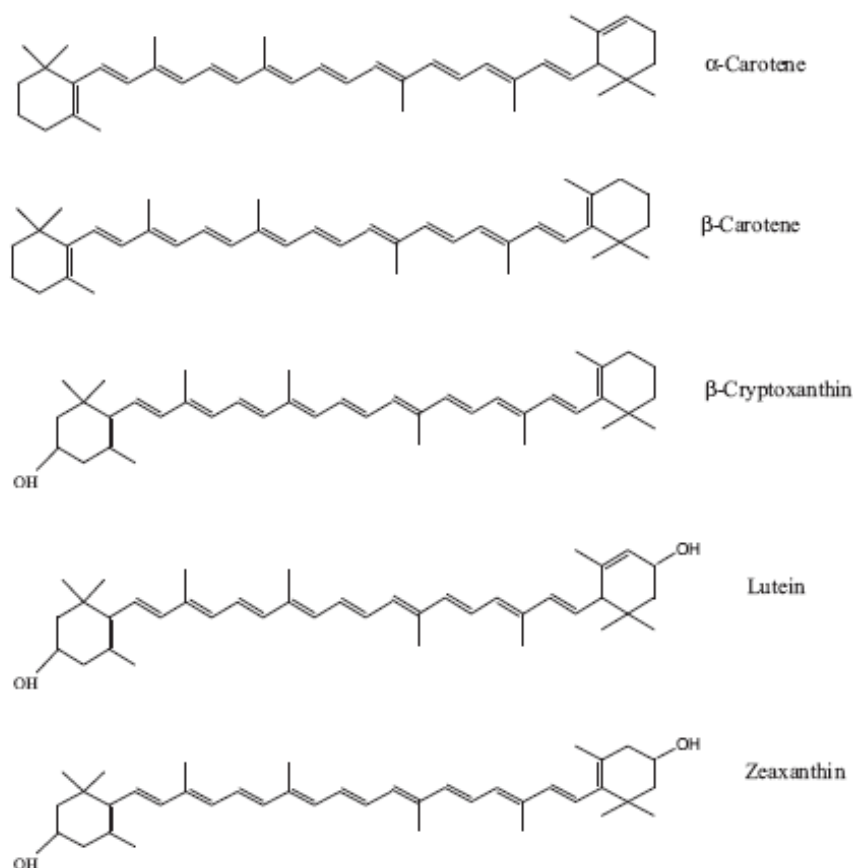
รูปที่ 2-8 การศึกษาและเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่ายก่อโรคจากใบชา
ก) ใบชาที่ติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่าย; ข) การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. parasiticus* บนอาหารแข็ง
ที่มา: Ponmurugan (2010)

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. parasiticus* ในห้องปฏิบัติการทำให้พบว่าสาหร่ายสกุลนี้มีการเจริญเติบโตที่ช้าและให้มวลชีวภาพในปริมาณที่น้อย จึงทำให้มีการศึกษาหาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยการทดสอบชนิดอาหารจำนวน 10 ชนิด พบว่า สาหร่าย *C. parasiticus* มีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Bristol, Trebouxia และ Tea leaf extract ตามลำดับ (รูปที่ 2-8) และจากการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่า การเจริญของสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* นั้นขึ้นกับหลากหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทางกายภาพ อาทิ อุณหภูมิเพาะเลี้ยง สภาวะการให้แสง หรือองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไนโตรเจน คาร์บอน ฟอสฟอรัส และ Trace element ก็นับได้ว่ามีส่วนช่วยในการเจริญและพัฒนาของสาหร่ายก่อโรค *C. parasiticus* ในห้องปฏิบัติการเช่นกัน (Peterson and R.H.Burris, 1978) ผู้วิจัยจึงเห็นถึงความสำคัญของการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคพืชจึงได้เพิ่มทีมงานส่วนนี้ลงในวิทยานิพนธ์เพื่อนำไปสู่การศึกษาด้านอื่นๆ ของสาหร่ายสกุลนี้ต่อไป

3. แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ คือ รงควัตถุอินทรีย์ (organic pigment) ที่มีสีตั้งแต่ สีเหลือง ส้ม ไปจนถึงสีแดง สามารถพบทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ รวมไปถึง รา ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิด โดยหน้าที่หลักของแคโรทีนอยด์คือ การทำงานร่วมกับคลอโรฟิลล์ในการช่วยดูดซับพลังงานจากแสงอาทิตย์เพื่อให้การสังเคราะห์แสงมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Sun et al., 2015) แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเอกลักษณ์เฉพาะกลุ่ม โดยโมเลกุลของแคโรทีนอยด์จะมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วย คาร์บอน (carbon) 40 อะตอม และภายในโมเลกุลจะมีพันธะคู่ (double bond) อยู่มาก นอกจากนี้แล้วจะพบโครงสร้างที่เป็นวงแหวนที่ส่วนปลายของโมเลกุล ซึ่งบริเวณนี้จะเป็นตำแหน่งที่สามารถเติมหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่มีออกซิเจนได้ด้วย โดยสามารถจำแนกแคโรทีนอยด์จากส่วนประกอบของธาตุต่างๆ ในโมเลกุลได้เป็นสองกลุ่ม ได้แก่ แคโรทีน (carotene) หมายถึงกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีเพียงคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้นอยู่ในโมเลกุล และกลุ่มที่สองคือแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) หมายถึงกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีทั้ง คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนอยู่ภายในโมเลกุล โดยรูปแบบของการเชื่อมต่อกันระหว่างอะตอมของคาร์บอนด้วยพันธะคู่ภายในสายโครงสร้างพอลิอินแบคโบน (polyene backbone) ของแคโรทีนอยด์จะเป็นตัวกำหนดความสามารถของแคโรทีนอยด์ในการดูดกลืนแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสง อีกทั้งส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของแคโรทีนอยด์ ปัจจุบันพบโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ที่มีรายงานแล้วกว่า 750 รูปแบบ (Britton et al., 2004) โดยแคโรทีนอยด์ที่มักพบทั่วไปในสิ่งมีชีวิต มีอยู่ 6 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ แอลฟา-แคโรทีน (alpha-carotene) เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) เบต้า-คริปโตแซนทิน (β -cryptoxanthin) ไลโคพีน (lycopene) ลูทีน (lutein) และซีแซนทิน (zeaxanthin)





รูปที่ 2-9 โครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์
ที่มา: Liu และคณะ (2014)

แคโรทีนอยด์เป็นสารประกอบทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากคุณสมบัติของแคโรทีนอยด์ที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี (lipid soluble) จึงทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ง่าย ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ที่รู้จักกันเป็นอย่างดี ได้แก่ การเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (provitamin A) ซึ่งมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อคิวติเคิล (cuticle) เช่น ฟัน เล็บ เส้นผม รวมไปถึงบำรุงสายตาและการมองเห็น (Tang, 2010) นอกจากนี้ แคโรทีนอยด์ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของโมเลกุลอื่น อีกทั้งยังมีความสามารถในการต่อต้านโรคมะเร็ง (Nishino et al., 1999) เพิ่มภูมิคุ้มกัน (Hughes, 1999) ยับยั้งโรคหัวใจ (Kritchevsky, 1999) และโรคเกี่ยวกับโลหิตได้อีกด้วย (Lorenz and Cysewsk, 2000) ด้วยประโยชน์ที่กล่าวมานี้เองจึงมักพบว่า แคโรทีนอยด์ถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในระดับอุตสาหกรรม ทั้งในด้านโภชนาการ เกษษศาสตร์ และอุตสาหกรรมความงาม โดยพบว่า เบต้าแคโรทีนจัดอยู่ในตระกูลแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง (Paiva and Russell, 1999) ในธรรมชาติจะสามารถพบเบต้าแคโรทีนได้ใน แครอท ฟักทอง และสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้มีการศึกษาถึงการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์และสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวกัน อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเพาะเลี้ยงง่ายและสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะสาหร่ายสี

เขียว *Dunaliella* spp. ที่อุดมไปด้วยแคโรทีนอยด์ชนิดเบต้าแคโรทีน ซึ่งผลการวิจัยพบว่าสามารถสะสมเบต้าแคโรทีนได้มากถึง 14% ของน้ำหนักแห้ง และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงตามธรรมชาติ (Borowitzka et al., 1984, Aasen et al., 1969)

3.1 แคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (green algae) เป็นสาหร่ายที่จัดอยู่ในดิวิชัน Chlorophyta ซึ่งสาหร่ายกลุ่มนี้มีรงควัตถุชนิดหลัก คือ คลอโรฟิลล์ a และ b (chlorophyll a, b) และแคโรทีนอยด์ สาหร่ายสีเขียวที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการผลิตแคโรทีนอยด์ อาทิเช่น สาหร่าย *Dunaliella salina* เพื่อการผลิตเบต้าแคโรทีน (Pick, 2002) สาหร่าย *Chlorella protothecoides* เพื่อการผลิตลูทีน และสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เพื่อการผลิตแอสตาแซนธิน (Grung et al., 1992) หน้าที่สำคัญการของแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์สาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 ประการ ได้แก่ 1.) เป็นรงควัตถุเสริม (auxiliary pigment) ช่วยดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 420 nm 470 nm และ 500 nm ซึ่งเป็นช่วงแสงที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถดูดกลืนได้ (Sakshaug et al., 2009) 2.) ช่วยปกป้องเซลล์จากอันตรายที่อาจเกิดจากการได้รับแสงหรือรังสีที่มากเกินไป เช่น สาหร่าย *Tretepohlia gobii* Meyer บริเวณหุบเขา Yajiangeng ประเทศจีน ที่มีการสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดเบต้าแคโรทีน และแอสตาแซนธินภายในเซลล์เป็นจำนวนมากจนกระทั่งมองเห็นทลัสเป็นสีแดงเข้ม ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันเซลล์จากรังสี UV ที่มีความเข้มข้นสูงบริเวณยอดเขา อีกทั้งยังช่วยรักษาเซลล์ให้ทนต่อสภาวะที่อุณหภูมิแห้งและเย็นจัดอีกด้วย (Liu et al., 2012)

แคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่ายสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ แคโรทีนอยด์ปฐมภูมิ (primary carotenoids) และแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoids) โดยในสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้จะมีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ปฐมภูมิอยู่ตลอดเวลาและสะสมอยู่ในคลอโรพลาสต์ ในขณะที่แคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ อาทิ แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) และแอสตาแซนธิน (astaxanthin) จะมีการสร้างขึ้นเมื่อสาหร่ายอยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือได้รับการกระตุ้นจากสภาวะความเครียดต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ขาดอาหาร สภาวะแสง เป็นต้น แคโรทีนอยด์ชนิดนี้จะถูกเก็บสะสมไว้ในถุงไขมัน (lipid vesicle) ซึ่งมีหน้าที่หลักในการป้องกันความเสียหายและอันตรายที่อาจเกิดขึ้นต่อเซลล์ ซึ่งรวมไปถึงการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ภายในเซลล์อีกด้วย (Grünwald et al., 2001, Takaichi, 2011) จากรายงานการศึกษาสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* กล่าวว่า สาหร่ายชนิดนี้มีความสามารถในการสร้างสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน และแอสตาแซนธิน (Juan M. López-Bautista, 2002, Thompson and Wujek, 1997) ทั้งนี้การศึกษาแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายก่อโรคชนิดนี้ยังมีการศึกษาวิจัยอยู่น้อย ดังนั้นการศึกษาแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายโรคพืชที่แยกได้ครั้งนี้จึงเป็นโอกาสอันดีที่จะศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ที่สะสมในสาหร่ายชนิดนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาในระดับสูงต่อไป

3.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย

เบต้าแคโรทีนและแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิจะมีการสังเคราะห์และสะสมเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นเท่านั้น (Carvalho et al., 2012) จากค่ากล่าวนี้จึงทำให้มีนักวิจัยจำนวนมากสนใจศึกษาถึงปัจจัยหรือสิ่งเร้าที่เหมาะสมกับการกระตุ้นให้สาหร่ายสังเคราะห์สารดังกล่าวในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์นั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 ปัจจัยหลักด้วยกัน คือ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิสูง และปัจจัยทางเคมี เช่น การขาดแคลนธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสเฟต เป็นต้น

สาหร่ายสีเขียวที่ได้รับการศึกษาเรื่องการสะสมแคโรทีนอยด์เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียด ได้แก่ สาหร่าย *D. salina*, *H. pluvialis* และ *Chlorella zofingiensis* ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่ายเหล่านี้สามารถผลิตและสะสมแคโรทีนอยด์ได้อย่างโดดเด่นตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ยังคงมีความต้องการให้สาหร่ายทั้ง 3 สปีชีส์ สร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจให้มากขึ้นไปอีก จึงทำให้มีรายงานผลการวิจัยมากมายที่กล่าวถึงการกระตุ้นให้สาหร่ายด้วยปัจจัยทางกายภาพโดยเฉพาะการใช้แสงที่มีความเข้มสูง สืบเนื่องมาจากหน้าที่หลักอย่างหนึ่งของแคโรทีนอยด์ก็คือการปกป้องเซลล์จากการทำลายจากแสงที่มากเกินไป (photodamage/photooxidation) จึงทำให้มีการศึกษาทดลองจำนวนมากที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูง และ/หรือเป็นเวลานาน ซึ่งล้วนแต่ให้ผลไปในทางเดียวกัน คือสาหร่ายมีการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ในปริมาณที่มากขึ้นกว่าเดิม (Tran et al., 2009) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาถึงการกระตุ้นการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์เป็นระยะเวลานานระดับหนึ่งทำให้นักสาหร่ายได้พบแนวทางว่า การกระตุ้นสาหร่ายด้วยความเครียดจากแสงนั้นมีข้อจำกัด ต่างไปจากการกระตุ้นด้วยปัจจัยทางเคมีที่สามารถกระตุ้นสาหร่ายให้ผลิตแคโรทีนอยด์โดยเฉพาะกลุ่มแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิได้มากกว่าปัจจัยทางกายภาพดังที่กล่าวไว้ในย่อหน้าถัดไป

ปัจจัยทางเคมีที่ได้รับความสนใจนำมาศึกษาผลต่อการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ การลดปริมาณสารอาหารและการเพิ่มความระดับความเค็ม เนื่องจากสาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสง มักมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย จึงมีกลไกในการดูดซับ (assimilation) แร่ธาตุและสารอาหารต่างๆ อาทิ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสจากสิ่งแวดล้อมตลอดเวลาเพื่อนำเข้ามาใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหารภายในเซลล์ ดังนั้น เมื่อสาหร่ายถูกกำหนดให้อยู่ในภาวะขาดแคลนอาหาร หรือมีระดับความเค็มที่ไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดความเครียดขึ้นต่อเซลล์สาหร่ายโดยตรง ซึ่งสาหร่ายจะตอบสนองต่อความเครียดด้วยการลดขนาดของ chloroplast membranes เพื่อลดการผลิตแป้ง ในขณะที่เดียวกันจะเริ่มมีการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ซึ่งอยู่ในรูปของไขมันภายในเซลล์ปริมาณที่มากขึ้นแทน (Dipak and Lele, 2005) จากรายงานวิจัยพบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ในสภาวะที่มีไนโตรเจนอยู่อย่างจำกัด มีผลทำให้มีการสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดเบต้าแคโรทีนที่เพิ่มขึ้น (Enwereuzoh and Onyeagoro, 2014) เช่นเดียวกันกับการสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดแอสตาแซนธินในสาหร่าย *H. pluvialis* เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงที่ขาดไนโตรเจน (Hagen et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการ

กระตุ้นในรูปแบบอื่นๆ เช่น การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ที่ความเค็มสูง ซึ่งพบว่าสาหร่ายชนิดนี้ จะมีการสะสมเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้นถึง 14% ของน้ำหนักแห้ง (Sun et al., 2015) โดยตัวอย่างของสิ่งเร้าที่ได้มีการศึกษาวิจัยในสาหร่ายสีเขียวชนิดต่างๆ

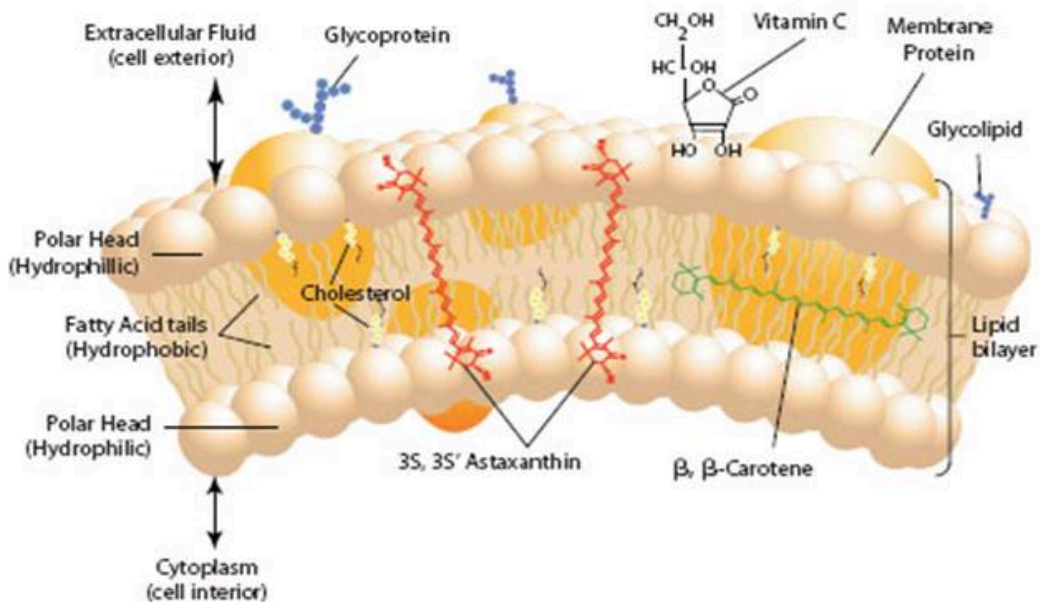
ตารางที่ 2-4 ปัจจัยทางเคมีที่มีผลในการกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

ชนิดสาหร่าย	สิ่งเร้า	เอกสารอ้างอิง
<i>D. salina</i>	เกลือ (NaCl)	Pick (2002)
	ไนโตรเจน	Lamers และคณะ (2012)
	ปริมาณฟอสเฟต	Phadwal และ Singh (2003)
<i>H. pluvialis</i>	ไนโตรเจน, แมกนีเซียม	Harker และคณะ (1996)
	อะซิเตท (acetate)	Kobayashi และคณะ (1993)
	เกลือ (NaCl)	Kobayashi และคณะ (1997)
<i>C. zofingiensis</i>	น้ำตาล	Sun และคณะ (2008)
	เกลือ (NaCl)	Del Campo และคณะ (2004)

การตรวจวัดชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสามารถใช้เทคนิคต่างๆ ทางเคมีวิเคราะห์ในการศึกษา เช่น การวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วย visible spectrophotometry (Carvalho et al., 2012) เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ซึ่งการทำ chromatography ด้วย TLC สามารถทำได้ง่ายและสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำแยกบริสุทธิ์ของแคโรทีนอยด์ในสารสกัดตัวอย่างได้ (Inoue et al., 2006) ส่วนเทคนิค ที่ได้รับความนิยมและยอมรับนำมาใช้ในการศึกษากันอย่างแพร่หลายเนื่องจากให้ผลการวัดชนิดและปริมาณที่แม่นยำและน่าเชื่อถือ (Mukherjee et al., 2010) ได้แก่ การใช้เครื่องมือที่เรียกว่า HPLC หรือ high performance liquid chromatography รวมไปถึงการใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) ด้วยเครื่อง mass spectrometer ซึ่งสามารถวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างได้อย่างแม่นยำมากยิ่งขึ้นด้วยการวิเคราะห์ผลการวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ของอนุภาคที่มีประจุ

3.3 อนุมูลอิสระ

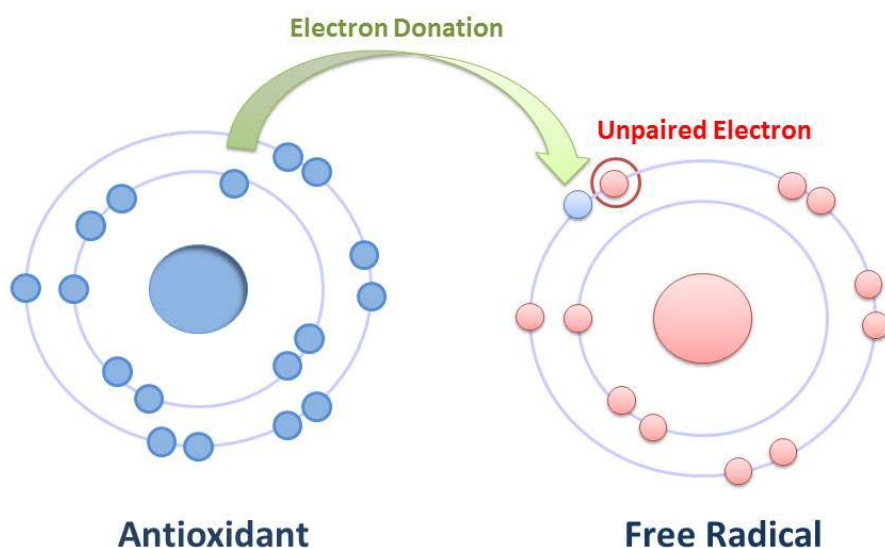
อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอม หรือโมเลกุล พบได้ในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์โดยเฉพาะในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ซึ่งจะเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ปรากฏการณ์นี้เองที่ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล และกลายเป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ทั้งนี้เพื่อที่จะดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปและเกิดความเสถียร ในขณะที่โมเลกุลที่เสียอิเล็กตรอนไปจะกลายเป็นอนุมูลอิสระแทน ทำให้ปฏิกิริยาดังกล่าวมาเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ในสิ่งมีชีวิตนั้น อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนั้นจะนำไปสู่ปัญหาทางด้านสุขภาพต่างๆ มากมาย เช่น การติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (autoimmune diseases) เป็นต้น (Rao and Rao, 2007) ข้อกังวลด้านสุขภาพจึงนำมาสู่กระแสความนิยมรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระกันมากขึ้น ซึ่งหนึ่งในสารที่มนุษย์นิยมนำมาบริโภคนั้นก็คือ แครอทินอยด์ เนื่องด้วยคุณสมบัติที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หรือละลายในไขมัน (lipid soluble) ร่างกายจึงสามารถดูดซึมนำไปใช้ได้ง่าย (รูปที่ 2-10)



รูปที่ 2-10 ความสามารถในการดูดซึมของแครอทินอยด์ภายในเซลล์
ที่มา: Goto และคณะ (2001)

แครอทินอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ที่ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระและมีความสามารถสูงในการต่อต้านอนุมูลอิสระออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (singlet oxygen) ที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต เนื่องจากแครอทินอยด์มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ซึ่งหมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้เองที่มีบทบาทสำคัญต่อการดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่

ออกซิเดชันได้ หรือในอีกแง่หนึ่งคือยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) นั่นเอง กลไกการทำงานของแคโรทีนอยด์คือ แคโรทีนอยด์จะทำหน้าที่ให้ H^+ แก่อนุมูลอิสระ (รูปที่ 2-11) ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดจะมีผลในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจนแต่ละรูปแบบแตกต่างกัน โดยพบว่าเบต้าแคโรทีนสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระรูปแบบไอออน peroxynitrite anion ($ONOO^-$) ได้ดีที่สุด และสามารถเปลี่ยนออกซิเจนอะตอมเดี่ยวที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาให้ไปอยู่ในรูปของ triplet oxygen (3O_2) ที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาน้อยกว่า (Herberg et al., 1998) ในขณะที่แคโรทีนอยด์ชนิดแอสตาแซนธินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระรูปแบบอนุมูล Hydroxyl radical ($HO\cdot$) และรูปแบบ hypochlorous acid ($HOCl$) ได้ดีที่สุด (Rodrigues et al., 2012)



รูปที่ 2-11 กลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ

ในปัจจุบันความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถทำการวัดได้โดยการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ อันเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH \cdot) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS $^{+\cdot}$) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยค่าที่ได้จะนำมาคำนวณเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (Alía et al., 2003, Ramamoorthy and Bono, 2007)

บทที่ 3 วิธีการศึกษา

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการ

Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 และ 2.0 ml
Centrifuge tube ขนาด 25 และ 50 ml
Plastic petri dish 90×15 mm (P0006, KIMA)
ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 0.1 µl- 1,000 ml (Sartorius, US)
คิวเวตต์ควอตซ์ (quartz cuvette) ขนาด 10 mm (Starna scientific, England)
กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์
กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Nikon SMZ-10)
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus CH30)
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Hiclave HVE-50, Hirayama, Japan)
เครื่องชั่งน้ำหนัก (PB303-S, Mettler Toledo)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Biofugepico, Sorvall[®], UK)
ชั้นวางสำหรับเพาะเลี้ยง
ชุดหลอดฟลูออเรสเซนซ์สำหรับให้แสงสว่าง 1300 ลักซ์

1.2 อุปกรณ์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เครื่องเทอร์โมไซเคิลอร์ (FlexCycler, Analytikjena, Germany)
เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (MiniRun GE – 100, Hangzhou Bioer Technology, China)
เครื่องส่องเจลด้วยรังสียูวี (InGenius 3, UK)

1.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์รงควัตถุ

1.3.1 อุปกรณ์สำหรับสกัดรงควัตถุ

Polypropylene micro pestle (3411D68, Thomas scientific)

1.3.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์รงควัตถุด้วยวิธี TLC ประกอบด้วย

แผ่นซิลิกาเจลขนาด 0.2 mm. (DC-Fertigfolien ALUGRAM[®] XtraSILG/UV₂₅₄)
Capillary tube (micro-hematocrit tubes, Vitrex, Denmark)
Thin layer chromatography tank

1.3.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์รังควัตถุด้วยเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

Nylon syringe filter 0.45 μm , 13 mm (N01345, Fortune sci)
 Glass vial amber สีชา 2 ml ขนาด 12×32 mm (V0104100, Fortune sci)
 Cap blue for 9-425 screw vial with 9 mm PTFE (V0114100, Fortune sci)
 เครื่อง HPLC (SIL-20A HT, Shimadzu, Japan)
 เครื่อง HPLC detector (LC-20A, Shimadzu, Japan)
 คอลัมน์ HPLC dimension 250×4.6 mm id (ACE[®] 5 C18-AR, Scotland)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สูตร HSM (ภาคผนวก ก)
 สูตร BBM (ภาคผนวก ก)
 สูตร Bristol (ภาคผนวก ก)
 Ampicillin (59349, Sigma-Aldrich)

2.2 สารเคมีสำหรับทดสอบการลดการปนเปื้อนของเชื้อราในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

Clorox[®]
 Haiter[®]
 Mercuric Chloride (215465, Sigma-Aldrich)
 Ethanol -analytical grade (20821.321, VWR chemicals)
 50% Hydrogen peroxide (Thai peroxide, Thailand)
 Benzimidazole (194123, Sigma-Aldrich)

2.3 สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

2.3.1 สารเคมีสำหรับสกัดสารพันธุกรรม

TEN buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl)
 SDS-EB buffer (2% SDS; 400 mM NaCl; 40 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)
 Phenol (P1037, Sigma-Aldrich)
 Chloroform: Isoamyl alcohol 24:1 (C0549-1PT, Sigma-Aldrich)
 Ethanol absolute -analytical grade (20821.321, VWR chemicals)

2.3.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย

PCR buffer (Bio-rad, CA, USA)
 KAPA dNTP mix (KAPA Biosystem, USA)
 iTaq DNA polymerase (Bio-Rad, CA, USA)
 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany)

ตารางที่ 3-1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
107F	5'-CGAATGGCTCATTAAT-3'	Suutati และคณะ (2010)
ChloroR	5'-GAATCAACCTGACAAGGCAAC-3'	Moro และคณะ (2009)
TrerbcL_mos_for	5'-GAAGCWATTCTTGAGWGAA- 3'	Hametner และคณะ (2014)
TrerbcL_mos_rev	5'CATCCATTCTTGAGWAAAGAATAC- 3'	Hametner และคณะ (2014)

2.3.3 สารสำหรับแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

DNA dye (UltrapowerTM Nucleic acid stain, Singapore)

Loading dye (RBC bioscience, Taiwan)

TAE buffer (ภาคผนวก ก)

2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์รงควัตถุ

2.4.1 สารเคมีสำหรับสกัดรงควัตถุ

Seasand (Nr.41 845, Ferak laborat)

Methanol -analytical grade (20847.307, VWR chemicals)

Chloroform -analytical grade (22711.324, VWR chemicals)

2.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์รงควัตถุด้วยวิธี TLC

75% Hexane -analytical grade (AR1090, RCI labscan)

25% Acetone -analytical grade (20066.321, VWR chemicals)

β-carotene standard Type I (C9750-5G, Sigma-Aldrich)

2.4.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์รงควัตถุด้วยเครื่อง HPLC

สารชนิด A: Methanol -HPLC grade (LC1115, RCI labscan)

สารชนิด B: Acetonitrile -HPLC grade (LC1005, RCI labscan)

สารชนิด C: Dichloromethane -HPLC grade (LC1040A, RCI labscan)

β-carotene standard type II (C4582-5MG, Sigma-Aldrich)

2.5 สารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

Methanol -analytical grade (20847.307, VWR chemicals)

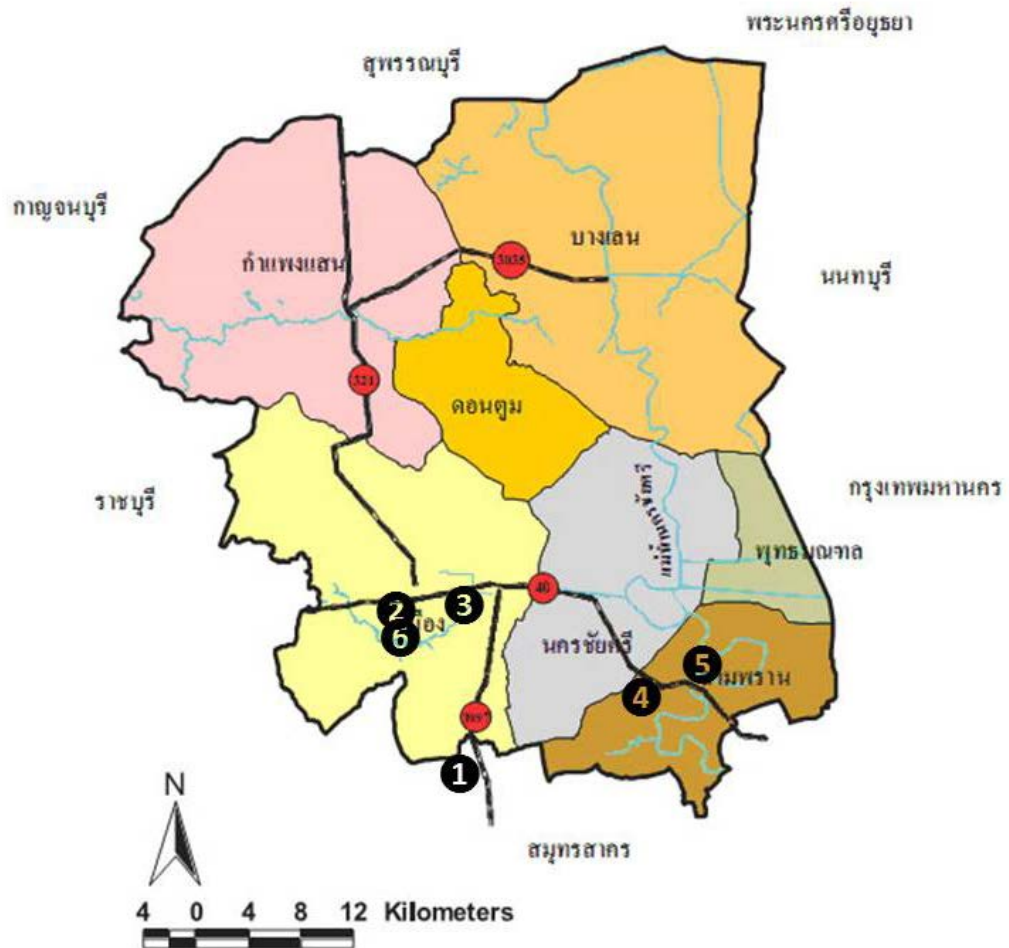
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (D9132-1G, Sigma-Aldrich)

Trolox (238813-5G, Sigma-Aldrich)

3.วิธีทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง



รูปที่ 3-1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่าง

โดยหมายเลขที่แสดง คือบริเวณพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 จุด

การเก็บตัวอย่างพืชที่พบโรคใบจุดสาหร่ายอาศัยวิธีการสุ่มเก็บจากทั้งพื้นที่เกษตรกรรมและบ้านเรือนที่พักอาศัย ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างใบพืชที่เกิดโรคในบริเวณพื้นที่ทั้งหมด 6 จุด (รูปที่ 3-1) ได้แก่

พื้นที่สวนมะนาว อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร 1 จุด ได้แก่หมายเลข 1

พื้นที่บ้านพักอาศัย อ.เมือง จ.นครปฐม 3 จุด ได้แก่หมายเลข 2-6

พื้นที่สวนส้มโอและมะนาว อ.สามพราน จ.นครปฐม 2 จุด ได้แก่หมายเลข 4 และ 5

ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างพืชที่คาดว่าติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายจากการสังเกตลักษณะรอยโรคบนพืชด้วยตาเปล่า ซึ่งลักษณะการเกิดโรคชนิดนี้ผู้วิจัยได้ทำการสืบค้นและรวบรวมมาจากเอกสารที่มีรายงานในต่างประเทศ เช่น Brown (2013) Brooks (2015) และ Nelson (2008) จากการสังเกตพบว่า ลักษณะบ่งชี้การเกิดโรคใบจุดสาหร่ายบนพืชที่พบในรายงานล้วนเป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ตำแหน่งการเกิดโรคที่บริเวณผิวใบพืช โคลนินที่มีลักษณะกลม สีส้มแดงคล้ายสีสนิมเหล็ก ผิวหน้าโคลนินฟูคล้ายกำมะหยี่นูนขึ้นมาจากพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืชอย่างชัดเจน เมื่อทำการเก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ตัวอย่างชิ้นส่วนพืชที่มีลักษณะการติดเชื้อโรคจุดสาหร่ายดังที่กล่าวข้างต้นจะถูกบรรจุลงถุงเก็บตัวอย่าง และนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและแบบใช้แสงเลนส์ประกอบ พร้อมทั้งแยกเพาะเลี้ยงในวันเดียวกัน ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม

3.1.2 การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคด้วยข้อมูลสัณฐานวิทยา

การจำแนกสายพันธุ์เบื้องต้นของสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ทำได้โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่มองเห็น รวมไปถึงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเลนส์ประกอบ การอ้างอิงลักษณะต่างๆ ของสาหร่ายอาศัยคู่มือการจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย *Cephaleuros* ของ Thompson และ Wujek (1997) พิจารณาร่วมกับงานวิจัยของ Suto และคณะ (2011, 2009) ซึ่งลักษณะที่สำคัญนำมาพิจารณาในการจำแนกชนิดของสาหร่ายได้แก่

1. ลักษณะและสีของโคลนิน (รูปที่ 2-1)
2. ตำแหน่งการเกิดรอยโรค (lesion) บนใบพืช ได้แก่ บริเวณผิวใบพืชด้านบน และด้านล่าง
3. ลักษณะรูปร่าง ความกว้าง และความยาวของก้านชูอับสปอร์ (รูปที่ 2-6)
4. ตำแหน่งการเข้าทำลายของโรคบนชั้นเนื้อเยื่อพืช (รูปที่ 2-5)
5. ลักษณะที่ลึกลับของสาหร่ายที่แทรกภายในเนื้อเยื่อพืช
6. ความกว้างและความยาวของ filament สาหร่ายที่แยกเพาะเลี้ยงได้

3.1.3 จำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคด้วยข้อมูลอนุชีววิทยา

การยืนยันชนิดของสาหร่ายก่อโรคด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA (18S ribosomal RNA) จากตัวอย่างสาหร่ายที่แยกเพาะเลี้ยงเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ ซึ่งอ้างอิงวิธีการวิเคราะห์จาก Rindi และคณะ (2009) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

3.1.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม

การสกัดสารพันธุกรรมของสาหร่ายดำเนินการตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (2001) ทำได้โดยนำสาหร่ายที่แยกเพาะเลี้ยงให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์มาประมาณ 50 mg มาบดด้วย micro pestle ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย TEN buffer ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/วินาที นาน 1 นาที ย้ายสารละลายทั้งหมดทิ้งไป แล้วจึงนำมาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 150 μ l พร้อมกับเติม SDS-EB buffer ปริมาตร 300 μ l และ phenol: chloroform: isoamyl alcohol ปริมาตร 350 μ l เขย่าอย่างแรงให้

เข้ากัน จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/วินาที นาน 5 นาที ย้ายสารละลายส่วนใสขึ้นบนใส่ลงในหลอด 1.5 ml หลอดใหม่และเติม 95% ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้มา ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไป-มา และบ่มที่อุณหภูมิ -20°C อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำออกมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/วินาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดทิ้งแล้วเติม 70% ethanol ปริมาตร 800 μ L เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งโดยการปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม นาน 10 นาที เทสารละลายทั้งหมดทิ้งและปล่อยให้ดีเอ็นเอซึ่งจะตกตะกอนที่ก้นหลอดแห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 15-20 นาที จากนั้นละลายตัวอย่าง DNA ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

3.1.3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค PCR ทำได้โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3-1 ซึ่งปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 50 μ L ประกอบไปด้วย 1) น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 40.5 μ L 2) PCR buffer 2.5 μ L 3) dNTP mix ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 1 μ L 4) ไพรเมอร์ Forward ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 1 μ L 5) ไพรเมอร์ Reward ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 1 μ L 6) จีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของสาหร่าย 2 μ L 7) *Taq* DNA polymerase 0.25 μ L จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิดังนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที
2. denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที
3. annealing ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 30 วินาที
4. extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 20 วินาที

โดยทำปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 7 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปทำการตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (1st BASE, SG) เพื่อนำข้อมูลมาทำการจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูล NCBI เพื่อยืนยันชนิดของสาหร่ายก่อโรค (Altschul et al., 1997)

3.2. การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* และอาหารที่เหมาะสมในการสร้างมวลชีวภาพ

3.2.1 การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างชิ้นส่วนพืชที่มีการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายมาทำความสะอาดเบื้องต้นตามวิธีของ Suto และ Ohtani (2009) โดยนำตัวอย่างชิ้นส่วนพืชที่ติดเชื้อไปผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 1 ชั่วโมงตามด้วยการทำความสะอาดบริเวณรอยโรคด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% และตัดชิ้นส่วนบริเวณดังกล่าวด้วยใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ก่อนนำชิ้นส่วนพืชที่ตัดได้ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร High salt medium หรือ HSM (Sueoka et al., 1967) ซึ่งเป็นสูตรอาหารจำเพาะสำหรับการคัดเลือกเพื่อ

เพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตจำพวก photoautotroph จากนั้นทำการถ่ายเส้นสายสาหร่าย (algal filament) ลงอาหารขวดใหม่เมื่อพบการเจริญเติบโต และทำการถ่ายเส้นสายซ้ำจนกว่าจะได้เชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์ ทั้งนี้อาจมีการเติมสารปฏิชีวนะเพื่อฆ่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามความเหมาะสม เช่น streptomycin เป็นต้น (Suto and Ohtani, 2011) โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ในแสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1300 ลักซ์

3.2.2 การลดการปนเปื้อนของเชื้อราในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros*

การทดลองใช้สารกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีรายงานถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ระหว่างการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย โดยนำตัวอย่างชิ้นส่วนพืชที่มีการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายมาทำความสะอาดเบื้องต้นตามวิธีของ Suto และ Ohtani (2009) คือนำตัวอย่างชิ้นส่วนพืชที่ติดเชื้อไปผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการทำความสะอาดบริเวณรอยโรคด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วนบริเวณดังกล่าวด้วยใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ก่อนนำชิ้นส่วนพืชที่ตัดได้แช่ลงในสารกำจัดเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ดังแสดงในตารางที่ 3-2 หลังจากนั้นเมื่อครบระยะเวลาตามกำหนด ตัวอย่างชิ้นส่วนดังกล่าวจะนำไปทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีกครั้งก่อนนำลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร HSM

ตารางที่ 3-2 ชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาของการใช้สารกำจัดเชื้อจุลินทรีย์

Disinfectant	ความเข้มข้น	ระยะเวลาแช่ชิ้นส่วนพืช (นาที)
Clorox [®]	15% 20% 30%	2, 5 และ 10
Haiter [®]	15% 20% 30%	2, 5 และ 10
Mercuric chloride	0.01% 0.05% 0.1%	2, 5 และ 10
Ethanol	50% 70% 85%	2, 5 และ 10
Hydrogen peroxide	3% 5% 10%	2, 5 และ 10

3.2.3 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสะสมมวลชีวภาพในสาหร่าย *Cephaleuros*

การทดสอบผลของอาหารต่อการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros* โดยเลือกตัวอย่างสาหร่าย Cp.1 ที่แยกได้จากข้อ 3.2 มาเป็นตัวแทนในการศึกษา โดยนำเชื้อสาหร่ายที่มีอายุประมาณ 4-5 เดือน มาชั่งน้ำหนักสดเท่ากับ 50 mg/ml จากนั้นนำมาทำการบดด้วย micro pestle ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (รูปที่ 3-2ก) แล้วจึงนำไปละลายผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HSM ปริมาตร 50 ml ให้เข้ากันก่อนแบ่งลงเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ HSM BBM และ Bristol ปริมาตร 100 ml โดยใช้สารละลายสาหร่ายปริมาตร 1 ml/100 ml ของอาหารแต่ละชนิด เพื่อให้แต่ละการทดลองมีน้ำหนักสดเริ่มต้นเท่ากัน ทำการทดลองเลี้ยงในอาหารชนิดละ 4 ข้าง ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 °C และให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ ทำการเก็บมวลชีวภาพของตัวอย่าง ทุก 30 วัน จำนวน 4 ครั้ง รวมเป็นระยะเวลาเพาะเลี้ยงทั้งหมด 120 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดโดยการถ่ายรูปทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง และนำตัวอย่างมวลชีวภาพของสาหร่ายที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry เพื่อวัดน้ำหนักแห้ง (dry weight)



รูปที่ 3-2 การเตรียมเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นเพื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

- ก) นำสาหร่ายมาทำการบดด้วย micro pestle
- ข) ผสมสาหร่ายที่บดแล้วกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HSM
- ค) เติมสารละลายสาหร่ายที่ได้ลงเลี้ยงใน flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3. การศึกษาชนิดและปริมาณของรงควัตถุที่สะสมในสาหร่าย *Cephaleuros*

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายรวมไปถึงการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์ในการทดลองนี้ ตัวอย่างสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวมวลชีวภาพจากวิธีการในข้อ 3.2.2 และผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งแล้วจะถูกนำมาสกัดและวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดังวิธีการต่อไปนี้

3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากสาหร่าย

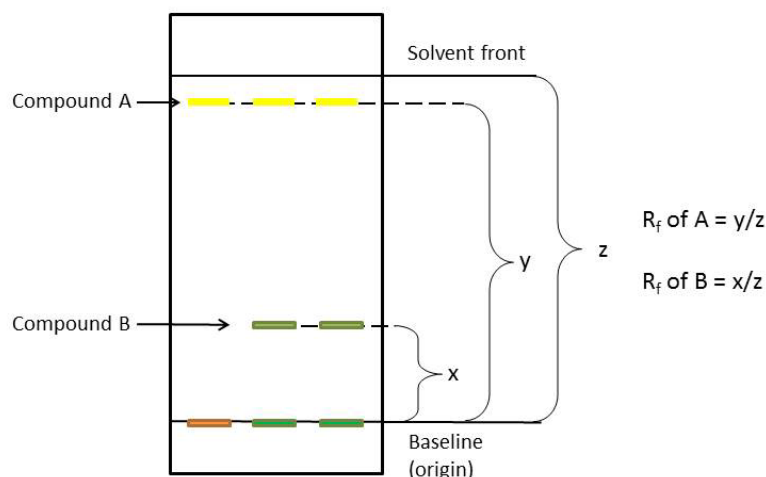
นำตัวอย่างแห้งของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 น้ำหนัก 10 mg มาทำการบดด้วย micro pestle ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จนเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งนี้จะทำการเติม sea sand (Nr.41 845, Ferak laborat) เพื่อช่วยในการทำให้เซลล์แตกได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 400 μ l และ methanol 400 μ l ลงในหลอด ผสมตัวอย่างให้เข้ากันอย่างแรงเพื่อให้สารละลายและเซลล์สาหร่ายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มสารสกัดไว้ที่มีด/อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 800 μ l ลงในหลอดและผสมสารสกัดอย่างแรงอีกครั้ง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนล่างของหลอดที่มีสี ย้ายใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ และนำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยการทำให้ระเหย โดยตั้งสารสกัดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและหลีกเลี่ยงไม่ให้สารสกัดที่ได้โดนแสง

3.3.2 การศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยวิธี Thin layer Chromatography

ละลายสารสกัดจากข้อ 3.2 ด้วย petroleum ether ตามวิธีของ Grung และคณะ (1992) และจุดสารสกัดลงบนแผ่น silica gel ให้แต่ละจุดมีระยะห่าง 0.5 ซม. สูงจากขอบล่าง 2 ซม. และอยู่ห่างจากขอบข้าง 1.5 ซม. จากนั้นนำแผ่น silica gel แฉ่ลงในแท่งที่มี hexane และ acetone ในสัดส่วน 3:1 ที่ทำหน้าที่เป็นสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 10 นาที และสังเกตจากการเคลื่อนที่ของสาร นำแผ่น silica gel ออกจากแท่งเมื่อสารละลายเคลื่อนที่มาถึงจุดที่ต้องการ พร้อมทั้งบันทึกระยะทางที่สารละลายเคลื่อนที่มาถึงโดยหลีกเลี่ยงแสง ทำการเปรียบเทียบสารสกัดสาหร่ายกับสารมาตรฐาน β -carotene สารสกัดหยาบจากผักโขม เพื่อเปรียบเทียบชนิดของแคโรทีนอยด์และทำการคำนวณหาค่า R_f หรืออัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางจากจุดตั้งต้นถึงจุดกึ่งกลางของแถบสารที่แยกได้}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ตัวอย่างการหาค่า R_f ของสารแต่ละตัว แสดงดังรูปที่ 3-3



รูปที่ 3-3 การคำนวณค่า R_f ของสารที่แยกได้

3.3.3 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC

3.3.3.1 การเตรียมสารมาตรฐาน β -carotene เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมทำได้โดยตะ β -carotene standard type II ปริมาณเล็กน้อยจากขวดด้วยปลายปิเปตทิปขนาด 200 μ l ละลายสารดังกล่าวด้วย chloroform ปริมาตร 1 ml เพื่อให้สารมาตรฐานละลายได้ง่ายขึ้น และปรับปริมาตรให้เป็น 5 ml ด้วย petroleum ether สารละลายข้างต้นจะถูกนำมาใช้เป็น stock solutions จากนั้นนำไปวัดด้วย spectrophotometer ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 454 nm เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (C ซึ่งมีหน่วยเป็น μ g/ml) โดยมีสูตรของ Beer- Lambert Law (Calloway, 1997) ในการคำนวณดังนี้

$$A = \epsilon CL$$

เมื่อ

A = ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้

ϵ = ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน β -carotene คือ 0.25 μ g/ml

C = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ต้องการทราบ มีหน่วยเป็น μ g/ml

L = ความหนาของ cuvette ที่ใช้วัดเท่ากับ 1 เซนติเมตร

จากนั้นนำสารละลายมาตรฐาน β -carotene stock solution ที่ทราบความเข้มข้นแล้วมาเจือจางครึ่งละ 1/2 เท่า จำนวน 6 ครั้งด้วย chloroform และนำสารที่เจือจางแล้วแต่ละระดับไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานด้วยการคำนวณตามสมการข้างต้นก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟด้วยเครื่อง HPLC หลังจากนั้น จะนำค่าความเข้มข้นของ β -carotene stock solution มาสร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน x เป็น ความ

เข้มข้นของสาร ($\mu\text{g/ml}$) และแกน y เป็น ค่าพื้นที่ใต้กราฟของ β -carotene stock solution จากนั้นทำการคำนวณเพื่อสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) เพื่อจะนำสมการที่ได้ไปใช้ในการคำนวณหาค่า β -carotene content ของตัวอย่างสาหร่ายต่อไป

3.3.3.2.) การเตรียมสารสกัดสาหร่ายเพื่อการตรวจวิเคราะห์

นำสารสกัดสาหร่ายที่สกัดตามวิธีในข้อ 3.2 มาละลายด้วย petroleum ether ปริมาตร 1 mL และกรองสารละลายด้วย syringe filter ขนาด $0.45 \mu\text{m}$ ลงในขวด vial สีชาขนาด 2 mL ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3.3.3.3.) ระบบการตรวจวิเคราะห์

ระบบการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ในสารสกัดของ *Cephaleuros* Cp.1 ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ mobile phase แบบ linear gradient time program ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

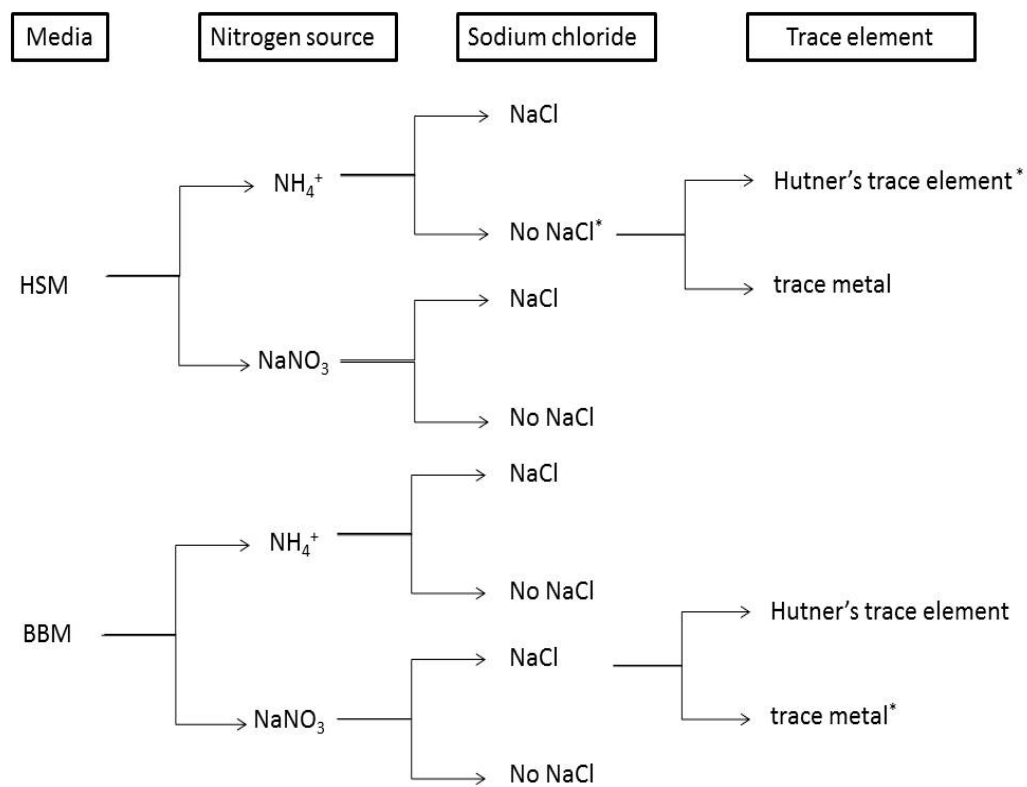
ตารางที่ 3-3 โปรแกรมในการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC

นาทีที่	% methanol (A)	% acetonitrile (B)	% dichloromethane (C)
0	0	100	0
5	20	60	20
10	20	60	20
15	40	0	60
20	40	0	60
25	0	100	0
30	0	100	0

Injection volume : 10 μL

3.4 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน เกลือคโลไรด์ และ Trace element ต่อการสะสม รังควัตถุ

การทดลองนี้ได้เลือกตัวอย่างสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 มาเป็นตัวแทนในการศึกษา โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HSM และ BBM เป็นระยะเวลาทั้งหมด 60 วัน จากนั้นสังเกตสีของเส้นสายสาหร่ายที่เปลี่ยนไป และบันทึกระยะเวลาที่สาหร่ายเปลี่ยนสี เพื่อระบุปัจจัยของสารอาหารที่กระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมแคโรทีนอยด์โดยมีแผนการทดลองดังรูปที่ 3-4



รูปที่ 3-4 แผนการทดลองผลของแหล่งไนโตรเจน เกลือคโลไรด์ (NaCl) และ trace element ต่อการสะสมรงควัตถุของ *Cephaleuros* Cp.1

หมายเหตุ * หมายถึง ชุดควบคุม (control)

เมื่อครบ 60 วันของการเพาะเลี้ยง ทำการถ่ายรูปมวลชีวภาพของสาหร่ายเพื่อบันทึกเปลี่ยนแปลงของสี

3.5 วิธีการวิเคราะห์ค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* ตัวอย่าง Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ HSM BBM และ Bristol เป็นระยะเวลา 60 วัน จากนั้นจะทำการเก็บมวลชีวภาพและนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งก่อนนำไปสกัดเพื่อหาค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ชั่งน้ำหนักสาหร่ายที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry น้ำหนัก 15 mg และสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการในข้อ 3.2 เมื่อได้สารสกัดที่แห้งแล้วนำมาละลายด้วย methanol ปริมาตร 1 ml จากนั้นทำการเติมสารสกัดปริมาตร 25 50 75 100 และ 125 μ l ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 ml ที่ภายในมีสารละลาย DPPH ปริมาณ 0.5 ml ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm ทันที โดยบันทึกผลเป็นค่า A_{t0} หลังจากนั้นทิ้งสารละลายไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำออกมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm อีกครั้งและบันทึกเป็นค่า A_{t30} ทั้งนี้ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% inhibition) ตามสมการของ Cepoi และคณะ (2009)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_{t0} - A_{t30})}{A_{t0}} \times 100$$

โดยที่ A_0 คือ absorbance ของสารสกัดที่ 0 นาทีของปฏิกิริยา

A_{30} คือ absorbance ของสารสกัดที่ 30 นาทีของปฏิกิริยา

ผลการทดลองนี้รายงานในรูปแบบของค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชัน (ในสารตัวอย่าง) ที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50%

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย

1.1 การเก็บตัวอย่างพืชที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบพืชที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่ายในบริเวณพื้นที่จังหวัดนครปฐมและจังหวัดสมุทรสาครทั้งหมด 6 จุดเก็บตัวอย่าง พบพืชติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายทั้งหมด 6 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4-1 เมื่อสำรวจบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมและทำการพูดคุยสอบถามกับเกษตรกร พบว่า มีเกษตรกรสวนส้มโอเพียงสวนเดียวที่รู้จักโรคใบจุดสาหร่าย ในขณะที่เกษตรกรอื่นๆ ไม่เคยได้ยิน หรือไม่รู้จักโรคใบจุดสาหร่ายแต่อย่างใด ถึงแม้ผู้วิจัยจะทำการอธิบายลักษณะของรอยโรคตามที่ได้มีรายงานไว้ อันได้แก่ ลักษณะของรอยโรคที่กลมฟู มีสีส้มคล้ายสีสนิม มักพบการติดเชื้อบริเวณใบพืชเป็นส่วนมาก (Mutlara et al., 2015, Han et al., 2011, Brown, 2013) เกษตรกรส่วนมากไม่เคยรู้จักและไม่เคยประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคพืชที่มีชื่อว่าใบจุดสาหร่ายนี้มาก่อน แต่เมื่อทำการสำรวจบริเวณต่างๆ ของพื้นที่สวนทั้ง 3 สวน ได้แก่ สวนส้มโอ 1 แห่ง และสวนมะนาว 2 แห่ง พบว่ามีการปรากฏของโรคใบจุดสาหร่ายบนใบพืชที่ปลูกในทุกสวนที่ทำการเก็บตัวอย่าง และสังเกตพบวาระดับความรุนแรงของการติดเชื้อแตกต่างกันไปตามระดับการดูแลเอาใจใส่ของเจ้าของสวน กล่าวคือ พบการติดเชื้อของพืชน้อยเมื่อเกษตรกรเจ้าของสวนดูแลเอาใจใส่พืชที่ปลูกเป็นอย่างดี จากข้อมูลทีกล่าวมาข้างต้นอาจกล่าวได้ว่า โรคใบจุดสาหร่ายเป็นโรคที่ชาวสวนไม่คุ้นเคยนัก โดยจากการลงพื้นที่สำรวจสวนผลไม้ 3 แห่ง พบว่า มีเกษตรกรเพียงสวนเดียวที่รู้จักโรคใบจุดสาหร่าย คือ จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 สวนส้มโอ อ.สามพราน จ.นครปฐม โดยสวนดังกล่าวเป็นสวนที่พบการแพร่ระบาดของโรคใบจุดสาหร่ายมากที่สุดจากสวนทั้งหมดที่ทำการสำรวจดังแสดงในรูปที่ 4-1 นอกจากสวนผลไม้แล้ว ผู้วิจัยยังสำรวจพบการติดโรคใบจุดสาหร่ายในพืชจากแหล่งพื้นที่บ้านพักอาศัยอีก 2 จุดเก็บตัวอย่าง ซึ่งจากการสอบถามเจ้าของบ้าน ปรากฏว่าพบการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายมาตั้งแต่ซื้อมาจากร้านขายต้นไม้ทั้งสิ้น



รูปที่ 4-1 การติดเชื้อใบจุดสาหร่ายอย่างรุนแรงของใบส้มโอ ภาพจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างของพื้นที่เกษตรประเภทสวนผลไม้จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 สวนส้มโอ อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชที่มีการติดโรคใบจุดสาหร่ายในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างที่เป็นสวนผลไม้ พบว่า ในพื้นที่สวนผลไม้ที่เกษตรกรมีระดับการดูแลรักษาค่อนข้างดี อาทิ มีการใช้ยากำจัดแมลงและศัตรูพืชชนิดพ่นพืชมผลทางการเกษตร และ/หรือมีการตัดแต่งกิ่งพืชมผลเป็นประจำ มักไม่พบการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายบนพืชมผลทางการเกษตรหรือพบโรคในปริมาณที่น้อยมาก ในทางตรงกันข้ามพื้นที่สวนผลไม้ที่มีระดับการดูแลรักษาค่อนข้างต่ำ ปล่อยให้พืชมผลเจริญเติบโตตามธรรมชาติ ไม่มีการใช้ยากำจัดแมลงและศัตรูพืชหรือมีการใช้ในปริมาณน้อย มักพบว่าการแพร่ระบาดของโรคใบจุดสาหร่ายในอัตราที่สูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้ผู้วิจัยได้สังเกตพบ ลักษณะการติดเชื้อของโรคใบจุดสาหร่ายในตัวอย่างพืชจากบริเวณพื้นที่จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 สวนส้มโอ อ.สามพราน จ.นครปฐม ร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ อาทิ รา ไส้คน และแบคทีเรีย เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4-1) ข้อสังเกตอีกประการที่ได้รับการสำรวจโรคใบจุดสาหร่ายในสวนผลไม้พื้นที่จังหวัดนครปฐม คือ สวนผลไม้ที่พบตัวอย่างโรคใบจุดสาหร่ายมักเป็นสวนที่มีการปลูกพืชแบบยกร่อง ซึ่งเป็นการปลูกพืชด้วยการขุดคันดินล้อมรอบแปลงเกษตร และขุดร่องเป็นร่างแหเพื่อแยกแปลงด้านในให้สูงเพื่อปลูกพืชบนสันร่องดังกล่าว โดยร่องที่ขุดจะใช้สำหรับกักเก็บน้ำเพื่อใช้เป็นแหล่งน้ำแก่พืช จากการซักถามพบว่า ส่วนมากเกษตรกรจะใช้น้ำที่ขังอยู่ในท้องร่องนำมารดน้ำต้นไม้ด้วยการใช้แรงคนหรือเรือดน้ำ ซึ่งเท่ากับเป็นการใช้น้ำหมุนเวียนภายในสวนอีกด้วย

ตารางที่ 4-1 จุดเก็บตัวอย่างและพืชที่พบโรคใบจุดสาหร่าย

จุดเก็บตัวอย่าง	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	พืชที่พบโรคใบจุดสาหร่าย	ข้อมูลเพิ่มเติม
1	สวนมะนาว อ.บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร	มะนาว (<i>Citrus aurantifolia</i>)	สวนมะนาวมีการเก็บผลผลิตขายเป็นประจำ สวนได้รับการดูแลรักษาเป็นอย่างดี และมีการฉีดยากำจัดศัตรูพืช
2	บ้านพักอาศัย 1 ต.บางแอม อ.เมือง จ.นครปฐม	ชมพู่มะเหมี่ยว (<i>Syzygium malaccense</i>)	ที่อยู่อาศัย เจ้าของบ้านได้ซื้อต้นชมพู่มะเหมี่ยวจากร้านขายต้นไม้ โดยพบอาการของโรคตั้งแต่ซื้อและเริ่มปลูก แต่อาการของโรคหายไปเมื่อใบที่ติดโรคร่วงหล่น
3	บ้านพักอาศัย 2 ต. โพรงมะเดื่อ อ.เมือง จ.นครปฐม	เฟินชายผ้าสีดา (<i>Platynerium</i> sp.)	ที่อยู่อาศัย เจ้าของบ้านซื้อเฟินชายผ้าสีดาจากร้านขายต้นไม้ โดยพบอาการของโรคตั้งแต่ซื้อและเริ่มปลูก แต่อาการของโรคหายไปเมื่อใบที่ติดโรคร่วงหล่น
4	สวนส้มโอ อ.สามพราน จ.นครปฐม	ส้มโอ (<i>Citrus maxima</i>)	สวนส้มโอพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ มีการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อขายภายในประเทศ พบการระบาดของโรคทั่วพื้นที่ และไม่มีการฉีดยากำจัดศัตรูพืช
5	สวนมะนาว อ. สามพราน จ.นครปฐม	ฝรั่ง (<i>Psidium guajava</i>)	พบต้นฝรั่งที่ติดโรคใบจุดสาหร่ายขึ้นตามร่องสวนฝรั่ง มีการระบาดของโรค ไม่มีการฉีดยากำจัดศัตรูพืช
6	บ้านพักอาศัย 1 ต. บางแอม อ.เมือง จ.นครปฐม	อโศกอินเดีย (<i>Polyalthia longifolia</i>)	ที่อยู่อาศัย เจ้าของบ้านซื้อต้นอโศกจากร้านขายต้นไม้ โดยพบอาการของโรคตั้งแต่ซื้อและเริ่มปลูก แต่อาการของโรคหายไปเมื่อใบที่ติดโรคร่วงหล่น



จุดเก็บตัวอย่างที่ 1



จุดเก็บตัวอย่างที่ 2



จุดเก็บตัวอย่างที่ 3



จุดเก็บตัวอย่างที่ 4



จุดเก็บตัวอย่างที่ 5



จุดเก็บตัวอย่างที่ 6

รูปที่ 4-2 ลักษณะสภาพแวดล้อมของพื้นที่จุดเก็บตัวอย่างพืชที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย



รูปที่ 4-3 ลักษณะการปลูกพืชแบบยกร่อง
จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 สวนมะนาว อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

นอกจากพื้นที่เกษตรกรรมแล้ว ผู้วิจัยสำรวจพบตัวอย่างโรคใบจุดสาหร่ายจากต้นชมพูมะเหมี่ยว เฟินชายผ้าสีดา และอโศก ในบริเวณพื้นที่บ้านพักอาศัย ซึ่งพืชที่กล่าวมาทั้ง 3 ชนิดนี้ เจ้าของที่พักทุกแห่งได้ให้ข้อมูลว่า พืชแสดงอาการของโรคใบจุดสาหร่ายตั้งแต่เจ้าของบ้านได้ซื้อมาจากร้านขายต้นไม้ อย่างไรก็ตามเมื่อผู้วิจัยได้ติดตามอาการของต้นไม้ที่มีการติดโรคเมื่อนำมาปลูกในพื้นที่พักอาศัยในระยะสั้นก็พบว่า อาการของโรคบนใบพืชที่มีการติดเชื้อก็ไม่ได้หายไป เพียงแต่ไม่มีการติดโรคเพิ่มขึ้นเท่านั้น และเมื่อเวลาผ่านไป ใบพืชที่ติดเชื้อใบจุดสาหร่ายแก่และหลุดร่วงลงพื้นไปก็ไม่พบว่าต้นไม้ทั้ง 3 ชนิดมีการติดโรคใบจุดสาหร่ายเพิ่มเติมอีก และนอกจากพืชที่กล่าวมาแล้ว ผู้วิจัยยังพบโรคใบจุดสาหร่ายบนต้นแก้วหิมาลัยหรือแก้วแคะ (*Murraya paniculata* (L.) Jack.) บนตัวอย่างพืชที่พบวางขายในตลาดต้นไม้ อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี (รูปที่ 4-4) ที่พบว่ามีลักษณะรอยโรคที่คล้ายคลึงกับรอยโรคใบจุดสาหร่าย หากแต่ไม่ได้นำมาศึกษาต่อ คาดว่าหากทำการสำรวจในตลาดขายต้นไม้เพิ่มเติม น่าจะสามารถพบพืชที่ติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายในร้านค้าต้นไม้ในตลาดต้นไม้อีกไม่น้อย เนื่องจากลักษณะการจัดร้านค้าที่มีต้นไม้หนาแน่น และความชื้นสูงจากการดูแลรดน้ำสม่ำเสมอเป็นปัจจัยที่เอื้อต่อการกระจายของโรคใบจุดสาหร่ายเป็นอย่างดี (Agrawal, 2012)



รูปที่ 4-4 โรคใบจุดสาหร่ายบนต้นแก้วทิมาลัย ตลาดต้นไม้ อ.บางบัวทอง จ.นนทบุรี

หลังจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างข้างต้น ผู้วิจัยได้ทำการแยกตัวอย่างสาหร่ายที่พบทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ออกตามชนิดของพืชที่พบอาการของโรค (ตารางที่ 4-2) เพื่อที่จะนำมาใช้ในการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไปในการทดลองที่ 4.1.2

ตารางที่ 4-2 จุดเก็บตัวอย่าง พืชที่พบโรคใบจุดสาหร่าย และรายชื่อตัวอย่างสาหร่าย

จุดเก็บตัวอย่าง	พืชที่พบโรคใบจุดสาหร่าย	ชื่อตัวอย่างสาหร่าย
1	มะนาว	Cp.1
2	ชมพู่มะเหมียว	Cp.2
3	เฟินชายผ้าสีดา	Cp.3
4	ส้มโอ	Cp.4
5	ฝรั่ง	Cp.5
6	อโศก	Cp.6

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในครั้งนี้ ผู้วิจัยคาดว่า การที่ชาวสวนไม่รู้จักรักและไม่คุ้นเคยต่อโรคใบจุดสาหร่าย อาจมีสาเหตุจากการที่โรคนี้ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อที่ร้ายแรงต่อพืช และไม่มีบันทึกการระบาดในวงกว้างมาก่อน (Brown, 2013, Han et al., 2011, Nelson, 2008) ประกอบกับสวนที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นธุรกิจขนาดเล็ก จึงทำให้ชาวสวนไม่ได้ใส่ใจหรือกังวลกับการที่ผลผลิตในสวนติดเชื้อโรคนี้แต่อย่างใด เมื่อพิจารณาพร้อมกับเหตุผลที่หน่วยงานของภาครัฐที่เกี่ยวข้อง เช่น สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ไม่ได้มีการสำรวจอย่างจริงจังและไม่มีข้อมูลของโรคนี้ที่

ชัดเจน จึงทำให้ไม่ปรากฏการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับโรคใบจุดสาหร่ายจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องดังกล่าว นอกจากนี้จากการพูดคุยกับเกษตรกรก็พบว่า เกษตรกรมักมีความเข้าใจสับสนกันระหว่างโรคใบจุดสาหร่ายกับโรคแคงเกอร์ (canker) ที่มักพบการแพร่ระบาดกับพืชจำพวกมะนาวเช่นกัน (Leksomboon et al., 2001) ทั้งนี้เนื่องจากโรคใบจุดสาหร่ายและโรคแคงเกอร์มีลักษณะรอยโรคที่เมื่อมองผิวเผินมีความคล้ายคลึงกัน อาทิ สีและขนาดของรอยโรคที่มีสีเหลือง ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม รวมไปถึงลักษณะของการเกิดโรคที่พบบนพืช คือมักพบรอยโรคที่บริเวณใบเป็นส่วนมาก หากแต่เมื่อสังเกตใกล้ๆ และสัมผัสก็จะพบว่ารอยโรคที่เกิดจากโรคแคงเกอร์นั้นเริ่มแรกจะมีลักษณะแผลฟูนูน ต่อมาแผลจะแตกแห้งเป็นสะเก็ด (Gottwald et al., 2002) ซึ่งแตกต่างจากรอยโรคใบจุดสาหร่ายที่จะมีลักษณะที่ฟู นุ่มมือ คล้ายกำมะหยี่ (Brown, 2013)

เมื่อสืบค้นจากงานวิจัยที่มีการสำรวจโรคใบจุดสาหร่ายทั้งในและต่างประเทศ ผลจากการค้นคว้าพบว่า มีการแพร่ระบาดของเชื้อสาหร่ายก่อโรคบนพืชหลากหลายชนิด รวมถึงพืชเศรษฐกิจสกุล *Citrus* ได้แก่ ส้ม ส้มโอ และมะนาว (Juan M. López-Bautista, 2002, Winston, 1938) ซึ่งพบรายงานการระบาดของโรคบริเวณหลายพื้นที่ในต่างประเทศ อาทิเช่น เกาะ Tutuila ประเทศ American Samoa (Brooks, 2004) เมือง Maharashtra ประเทศอินเดียตอนใต้ (Gokhale, 2012) รัฐ Florida ประเทศสหรัฐอเมริกา (Marlatt and Alfieri, 1981) เกาะ Hawaii ประเทศสหรัฐอเมริกา (Nelson, 2008) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการเกิดโรคในพืชสกุลอื่นอีกด้วย ได้แก่ สกุล *Syzygium* สกุล *Polyalthia* สกุล *Psidium* เป็นต้น (Muthukumar et al., 2014)

ในขณะที่ประเทศไทยมีรายงานการศึกษาที่เป็นทางการถึงสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายอยู่น้อยมาก แต่ไม่นานมานี้เองได้มีการตีพิมพ์ถึงผลการสำรวจความหลากหลายของเชื้อสาหร่ายก่อโรคจากบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพัทลุง ตรัง สตูล และสงขลา รายงานข้างต้นกล่าวถึงการพบพืชที่ติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายทั้งหมด 14 วงศ์ 14 สกุล 16 ชนิด ในทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจ (อนรรักษ์ และคณะ, 2558) ซึ่งชนิดพืชที่พบการติดเชื้อจากรายงานนี้สอดคล้องกับสกุลของพืชที่ผู้วิจัยสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบจุดสาหร่ายมา 4 สกุล จากทั้งหมด 5 สกุลด้วยกัน ได้แก่ สกุล *Citrus* สกุล *Syzygium* สกุล *Polyalthia* และสกุล *Psidium* ยกเว้นสกุล *Platyserium* ที่ยังไม่พบรายงานการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายในประเทศไทย ซึ่งเป็นไปได้ว่ายังไม่มีการสำรวจโรคชนิดนี้อย่างจริงจังเนื่องจากพืชในสกุล *Platyserium* หรือเฟินชายผ้าสีดาไม่ใช่พืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ จึงอาจทำให้ผู้ที่สนใจศึกษาโรคในพืชชนิดนี้ไม่มากนัก

เมื่อพิจารณาถึงการแพร่กระจายของเชื้อสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายจะเห็นได้ว่า จากจุดเก็บตัวอย่างที่เป็นสวนผลไม้ที่มีการใช้น้ำจากท้องร่องนำมารดน้ำต้นไม้ด้วยการใช้แรงคนหรือเรือดน้ำ จึงเท่ากับเป็นการใช้น้ำหมุนเวียนภายในสวน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่เมื่อพืชมีอาการของโรคใบจุดสาหร่ายจะมีการพัดพาของอับสปอร์ หรือมีการชะอับสปอร์ที่อยู่บนพืชตกลงสู่ร่องน้ำภายในสวน และเมื่อมีการนำน้ำจากท้องร่องนั้นกลับมาใช้รดน้ำต้นไม้อีกครั้งจึงเท่ากับเป็นการเพิ่มโอกาสในการแพร่ระบาดของโรค เนื่องจากต้นพืชปกติมีโอกาสได้รับอับสปอร์ของสาหร่ายก่อโรคและติดโรคเพิ่มขึ้นจากน้ำในท้องร่องนั่นเอง ผู้วิจัยคาดว่า การแพร่กระจายของโรคใบจุดสาหร่ายผ่านสปอร์ลักษณะคล้ายกัน

นี้เกิดกับต้นไม้ในตลาดต้นไม้ เนื่องจากลักษณะการจัดวางต้นไม้ในร้านขายต้นไม้ซึ่งมักมีการวางต้นไม้
 อย่างแออัดเพราะพื้นที่ในการวางขายที่จำกัด จึงเท่ากับเป็นการเพิ่มโอกาสให้โรคใบจุดสาหร่ายมีการ
 แพร่กระจายระหว่างต้นไม้ชนิดต่างๆ ที่นำมาวางจำหน่ายได้ง่ายด้วยอับสปอร์ผ่านการรดน้ำต้นไม้
 จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า พืชที่มีการติดเชื้อของโรคใบจุดสาหร่ายอย่างหนักรุนนั้นมีจำนวนของโคโลนี
 ของ *Cephaleuros* โดยเฉลี่ย 9 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร และสามารถผลิตสปอร์ได้มากถึง 7,200
 สปอร์ต่อตารางเซนติเมตร (Thompson and Wujek, 1997) ยิ่งไปกว่านั้นจากการสำรวจพื้นที่สวน
 ผลไม้ของผู้วิจัยส่วนใหญ่พบว่า เจ้าของสวนมักจะมีการปลูกพืชค่อนข้างหนาแน่น อีกทั้งระยะห่าง
 ระหว่างต้นพืชค่อนข้างถี่ จึงส่งผลให้แสงแดดสามารถส่องกระจายถึงโคนต้นไม้ได้น้อย รวมไปถึงระดับ
 ความชื้นในอากาศที่สูงเนื่องจากมีร่องน้ำล้อมรอบแปลงปลูก (รูปที่ 4-3) และเมื่อประกอบกับการที่
 ประเทศไทยตั้งอยู่ในบริเวณที่มีลักษณะอากาศแบบร้อนชื้น ซึ่งเป็นลักษณะอากาศที่เอื้อต่อการ
 เจริญเติบโตของสาหร่ายกลุ่มนี้ สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้มีการรายงานไว้กล่าวถึงปัจจัยที่ส่งผลให้
 สาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายมีการแพร่ระบาดได้ดี ได้แก่ ความชื้นและปริมาณแสงที่สูง
 (Muthukumar et al., 2014, Brooks, 2004, Agrawal, 2012, Nelson, 2008) ดังนั้นเมื่อพิจารณา
 ต่อไปถึงการป้องกันและกำจัดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายในพืช นอกจากวิธีการใช้สารเคมีแล้ว วิธีการลด
 การแพร่ระบาดอีกวิธีหนึ่งคือ การตัดแต่งกิ่งเพื่อเพิ่มพื้นที่ไหลเวียนของอากาศและแสงแดด การปลูก
 พืชโดยเว้นระยะห่าง อีกทั้งยังต้องมีการจัดการเกี่ยวกับระบบไหลเวียนน้ำภายในแปลงปลูกที่
 เหมาะสมอีกด้วย (Brooks, 2004)

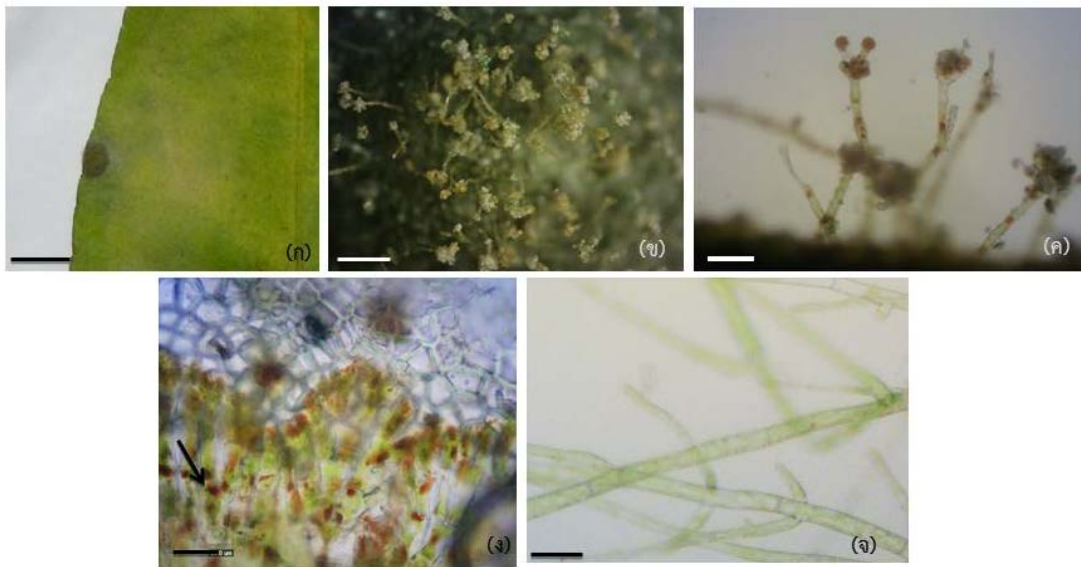
จากข้อสังเกตที่ได้รับจากงานวิจัยนี้ เป็นไปได้ว่าปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการแพร่ระบาดของโรค
 ใบจุดสาหร่ายในสวนผลไม้คือ วิธีการในการดูแลรักษาพืชผลทางการเกษตร และระดับความหนาแน่น
 ของต้นไม้ต่อพื้นที่ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นเป็นเพียงข้อสังเกตเบื้องต้นเท่านั้น หาก
 ต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่ชัดเจน ผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่า ควรมีการสำรวจการแพร่กระจายของโรคใบจุด
 สาหร่ายในพื้นที่เกษตรกรรมให้มากขึ้นทั้งในแง่ของความกว้างของพื้นที่และลักษณะของการใช้
 ประโยชน์ที่หลากหลายมากกว่านี้ โดยเฉพาะกับกลุ่มพืชในท้องถิ่นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น
 ฝรั่ง ส้มโอ หรือชมพู รวมไปถึงพื้นที่ที่มีการค้าขายต้นไม้อีกด้วย นอกจากนี้หากเป็นไปได้ควร
 ทำการศึกษาชีววิทยาการก่อโรคของสาหร่ายกลุ่มนี้เพิ่มเติม เพื่อเป็นแนวทางในด้านการป้องกันและ
 กำจัดโรคพืชชนิดนี้ในประเทศไทยต่อไป

1.2 การจัดจำแนกชนิดสาหร่ายก่อโรคด้วยการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา

ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายก่อโรคจากพืชตัวอย่างทั้งหมด 6 ชนิด ทำได้โดยศึกษาจากลักษณะภายนอกของรอยโรคใบจุดสาหร่ายที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ได้แก่ ลักษณะต่างๆ ของโคโลนี และตำแหน่งการเกิดรอยโรคบนใบพืช รวมไปถึงลักษณะที่สังเกตเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ รูปร่างอับสปอร์ ตำแหน่งการเข้าทำลายของโรคบนชั้นเนื้อเยื่อพืช โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ทั้งแบบสเตอริโอและแบบเลนส์ประกอบเพื่อสังเกตและศึกษาลักษณะต่างๆ พบว่าตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมดมีรูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่คล้ายคลึงกัน ทั้งก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง โดยสาหร่ายแต่ละตัวอย่างมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยละเอียดดังต่อไปนี้

1.2.1 โรคใบจุดสาหร่ายบนใบมะนาว

ตัวอย่างใบมะนาวที่เกิดโรคใบจุดสาหร่าย พบว่า มีตำแหน่งการเกิดรอยโรคที่บริเวณผิวใบพืชด้านบน สามารถมองเห็นรอยโรคได้ด้วยตาเปล่า ขนาดโคโลนีประมาณ 3 มม. โคโลนีของเชื้อก่อโรคมีสีส้มคล้ายสีสนิม สังเกตเห็นขอบของโคโลนีชัดเจน โคโลนีของโรคมีลักษณะฟูคล้ายกำมะหยี่ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบโครงสร้างสำหรับสืบพันธุ์ (รูปที่ 4-5ข) ที่บริเวณปลายก้านชูอับสปอร์ (sporangium) พบอับสปอร์ 3-4 อับสปอร์ (รูปที่ 4-5ค) เมื่อทำการตัดใบพืชตามขวาง (cross section) จะพบว่าเส้นสายของสาหร่ายขนานเข้าไปถึงบริเวณใบพืชชั้น subcuticular นอกจากนี้ยังพบว่า filamentous cells ของสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นสีเหลี่ยมผืนผ้า (cylindrical) ซึ่งมีการเรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma ที่มีลักษณะคล้ายพืดและยังพบเม็ดสีแดงอมส้มที่เรียกว่า haematochrome ภายในเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 4-5ง (ลูกศรชี้) เมื่อทำการแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร HSM พบว่าเซลล์สาหร่ายมีความยาวประมาณ 62.7 μm กว้างประมาณ 7.8 μm โดยเซลล์สาหร่ายมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นสาย (filament) และมีการแตกแขนงย่อยแตกออกจากแขนงหลักในแนวรัศมี

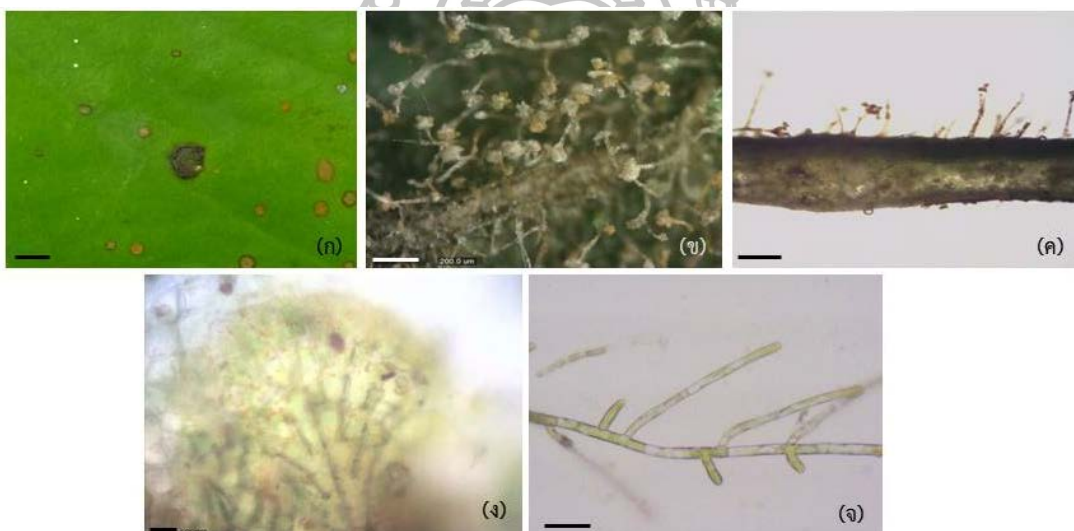


- รูปที่ 4-5 ตัวอย่างสาหร่าย Cp.1 จากโรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนใบมะนาว.
- ก) ใบมะนาวตัวอย่าง Cp.1 ที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย (scale bar 0.5 cm.)
- ข) โครงสร้างสืบพันธุ์เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตรียโอ (scale bar 200 μ m)
- ค) ก้านชูอับสปอร์ที่บริเวณปลายมีอับสปอร์ (scale bar 10 μ m)
- ง) ภาพตัดขวาง pseudoparenchyma และเม็ดสี heamatochrome ภายในเซลล์ (ลูกศรชี้) (scale bar 20 μ m)
- จ) สาหร่ายตัวอย่าง Cp.1 จากการแยกและเพาะเลี้ยง (scale bar 20 μ m)



1.2.2 โรคใบจุดสาหร่ายบนใบชมพูมะเหมี่ยว

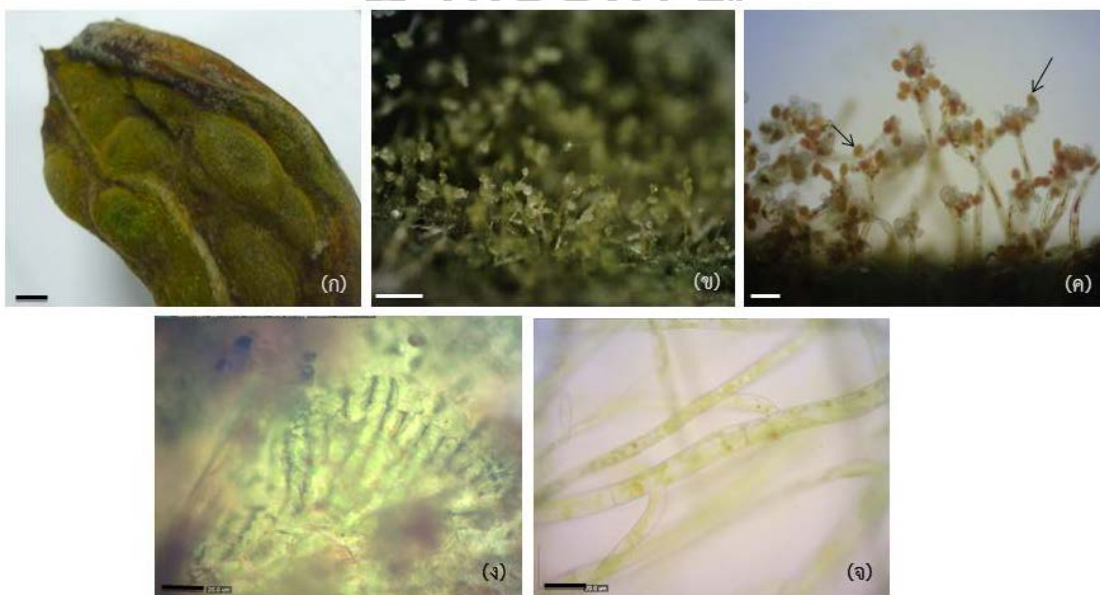
ตัวอย่างใบชมพูมะเหมี่ยวที่เกิดโรค พบว่า มีตำแหน่งการเกิดโรคที่บริเวณผิวใบพืชด้านบน สามารถสังเกตเห็นรอยโรคได้ชัดเจน โคลโรนเดียมีสีคล้ำคล้ายสนิมเหล็กขนาดโคลโรนเดียประมาณ 5 มม. สามารถสังเกตเห็นขอบโคลโรนเดียได้ชัดเจน เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอพบโครงสร้างสืบพันธุ์ (รูปที่ 4-6ข) ที่บริเวณส่วนปลายของก้านชูอับสปอร์พบอับสปอร์ 3-5 อับสปอร์ เมื่อทำการตัดใบพืชตามขวางพบว่า เส้นใยของสาหร่ายซอนไซเข้าถึงบริเวณใบพืชชั้น subcuticular (รูปที่ 4-6ค) นอกจากนี้ พบ filamentous cells ที่เรียงตัวกันเป็น pseudoparenchyma ที่มีลักษณะเป็นสีเหลี่ยมผืนผ้า (รูปที่ 4-6ง) เมื่อนำตัวอย่างสาหร่ายมาแยกและเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลว HSM มีความยาวประมาณ 60.2 μm กว้างประมาณ 8.4 μm เซลล์สาหร่ายมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นสาย และมีการแตกแขนงย่อยแยกออกจากแขนงหลัก โดยพบการเจริญเติบโตของเส้นสายในแนวรัศมี



- รูปที่ 4-6 ตัวอย่าง Cp. 2 โรคใบจุดสาหร่ายบนใบชมพูมะเหมี่ยว
 ก) ใบชมพูมะเหมี่ยวตัวอย่าง Cp.2 ที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย (scale bar 0.5 cm)
 ข) โครงสร้างสืบพันธุ์เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอ (scale bar 200 μm)
 ค) ภาพตัดขวางใบพืชที่กำลังขยาย 4 เท่า (scale bar 200 μm)
 ง) Pseudoparenchyma ที่มีลักษณะการเรียงตัวคล้ายพัด (scale bar 20 μm)
 จ) สาหร่ายตัวอย่าง Cp.2 ที่ได้จากการแยกและเพาะเลี้ยง (scale bar 20 μm)

1.2.3 โรคใบจุดสาหร่ายบนใบเฟินชายผ้าสีดา

ตัวอย่างใบเฟินชายผ้าสีดาที่เกิดโรคใบจุดสาหร่าย พบว่า มีตำแหน่งการเกิดรอยโรคที่บริเวณผิวใบพืชด้านบนโคโลนี โรคของเชื้อก่อโรคมีสีเขียว ไม่สามารถระบุลักษณะของโคโลนีได้ พบโรคเจริญปกคลุมทั่วใบ เมื่อนำใบพืชมาศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอพบโครงสร้างสืบพันธุ์ (รูปที่ 4-7ข) และที่ส่วนปลายของก้านชูอับสปอร์ พบอับสปอร์ 3-4 อับสปอร์ พบว่าภายในก้านชูอับสปอร์และอับสปอร์มีเม็ดสี heamatochrome อยู่ภายใน (รูปที่ 4-7ข ลูกศรชี้) เมื่อทำการตัดใบพืชตามยาว จะพบ filamentous cells ที่มีเซลล์เป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าเรียงตัวกันเป็น pseudoparenchyma เมื่อนำมาแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลว HSM พบว่ามีความยาวประมาณ 66.7 μm กว้างประมาณ 8.2 μm เซลล์สาหร่ายมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นสายและมีการแตกแขนงย่อยแตกออกจากแขนงหลัก (รูปที่ 4-7จ)



รูปที่ 4-7 ตัวอย่าง Cp.3 โรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนเฟินชายผ้าสีดา
 ก) ใบเฟินชายผ้าสีดาตัวอย่าง Cp.3 ที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย (scale bar 1 cm)
 ข) โครงสร้างสืบพันธุ์เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอ (scale bar 200 μm)
 ค) ภาพตัดขวางใบพืชแสดงให้เห็นก้านชูอับสปอร์ (scale bar 50 μm) และเม็ดสี heamatochrome ภายในเซลล์ (ลูกศรชี้)
 ง) Pseudoparenchyma มีลักษณะการเรียงตัวคล้ายพัด (scale bar 20 μm)
 จ) สาหร่ายตัวอย่าง Cp.3 จากการแยกและเพาะเลี้ยง (scale bar 20 μm)

1.2.4 โรคใบจุดสาหร่ายบนใบส้มโอ

จากตัวอย่างใบส้มโอที่เกิดโรค พบตำแหน่งการเกิดรอยโรคที่บริเวณผิวใบพืชด้านบน โคลโรนีของเชื้อก่อโรคมียีสต์แดงคล้ายสีสนิมเหล็ก (รูปที่ 4-8ก) โคลโรนีมีขนาดประมาณ 6-8 มม. เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอพบโครงสร้างสืบพันธุ์ชูขึ้นมาบนอากาศ (รูปที่ 4-8ข) นอกจากนี้เมื่อทำการตัดใบพืชตามยาวจะพบ filamentous cells ที่เรียงตัวกันเป็น pseudoparenchyma เซลล์สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นสีเขียวปนฟ้า นอกจากนี้ยังพบเม็ดสีแดงของ hematochrome ภายในเซลล์อีกด้วย (รูปที่ 4-8ง ลูกศรชี้) เมื่อนำมาแยกและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร HSM จะพบเซลล์สาหร่ายมีความยาวประมาณ 65.2 μm กว้างประมาณ 7.4 μm เซลล์สาหร่ายมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นสาย และมีการแตกแขนงย่อยแตกออกจากแขนงหลัก (รูปที่ 4-8จ)



รูปที่ 4-8 ตัวอย่าง Cp.4 โรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนใบส้มโอ

ก) ตัวอย่างใบส้มโอ ตัวอย่าง Cp.4 ที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย (scale bar 0.5 cm)

ข) โครงสร้างสืบพันธุ์เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอ (scale bar 200 μm)

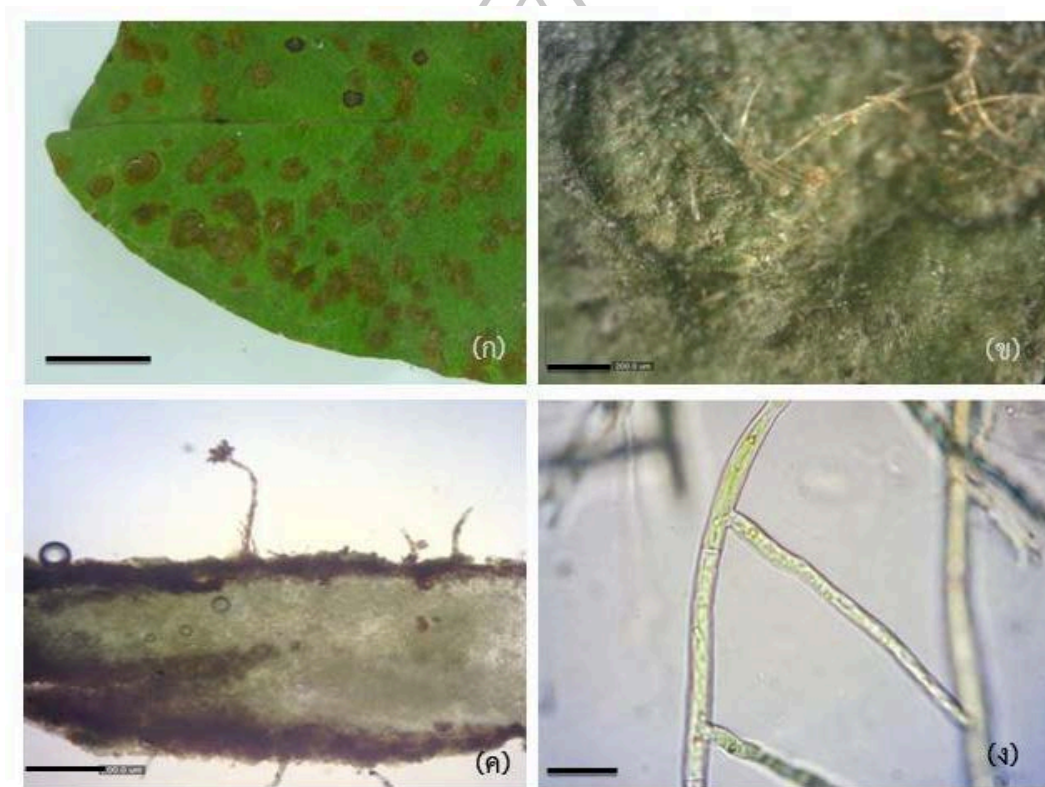
ค) ภาพตัดขวางใบพืช (scale bar 200 μm)

ง) ภาพตัดตามยาวของ pseudoparenchyma (scale bar 20 μm) และเม็ดสี hematochrome ภายในเซลล์ (ลูกศรชี้)

จ) สาหร่ายตัวอย่าง Cp.4 จากการแยกและเพาะเลี้ยง (scale bar 20 μm)

1.2.5 โรคใบจุดสาหร่ายบนใบฝรั่ง

จากตัวอย่างใบฝรั่งที่เก็บมา พบตำแหน่งการเกิดรอยโรคที่บริเวณผิวใบพืชด้านบน โคลโคนีของโรคมีสีสแดงคล้ายสีสนิมเหล็ก ไม่มีขอบเขตชัดเจน (รูปที่ 4-9ก) เมื่อส่องภายใต้กล้องสเตอริโอพบโครงสร้างสีปนธูซึ่งขึ้นมาบนอากาศเป็นบางส่วนของโคลโคนี (รูปที่ 4-9ข) เมื่อทำการตัดใบพืชตามขวางพบว่าเส้นสายของสาหร่ายขนไชเข้าสู่ใบพืชในชั้น subcuticular (รูปที่ 4-9ค) เมื่อนำสาหร่ายมาแยกและเพาะเลี้ยงพบว่าเซลล์สาหร่ายมีความยาวประมาณ 57.3 μm กว้างประมาณ 7.4 μm เซลล์สาหร่ายมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นสาย และมีการแตกแขนงย่อยแตกออกจากแขนงหลัก (รูปที่ 4-9ง)



รูปที่ 4-9 ตัวอย่าง Cp.5 โรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนใบฝรั่ง

ก) ใบฝรั่งตัวอย่าง Cp.5 ที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย (scale bar 1 cm)

ข) โครงสร้างสีปนธูเมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอ (scale bar 200 μm)

ค) ภาพตัดขวางใบพืช (scale bar 200 μm)

ง) สาหร่ายตัวอย่าง Cp.5 ที่ได้จากการแยกและเพาะเลี้ยง (scale bar 20 μm)

1.2.6 โรคใบจุดสาหร่ายบนใบโศกอินเดีย

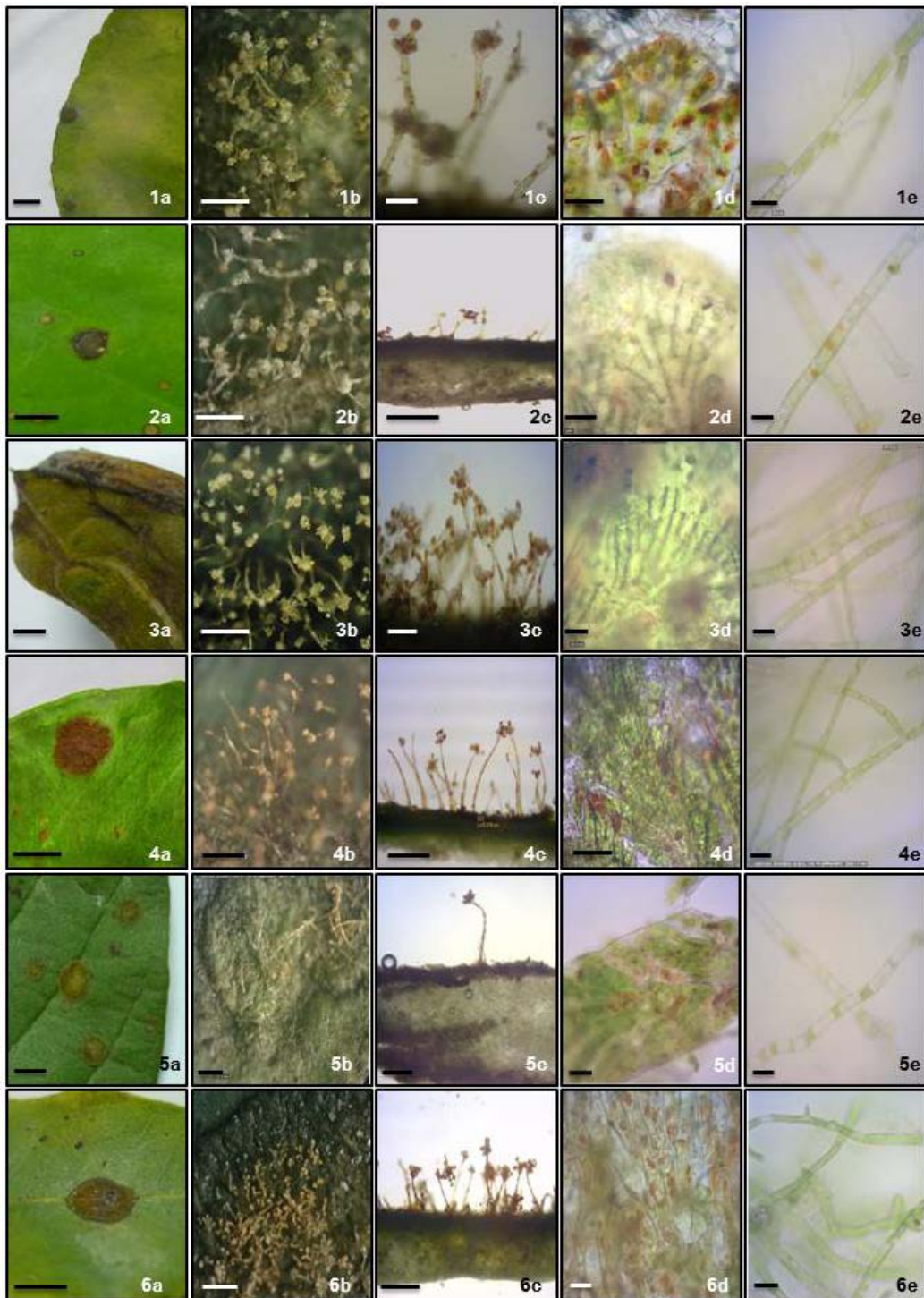
จากตัวอย่างใบโศกที่เกิดโรคพบตำแหน่งการเกิดรอยโรคที่บริเวณผิวใบพืชด้านบน โคลนีของโรคมีสีสแดงคล้ายสีสนิมเหล็ก บริเวณขอบโคลนีมีสีเขียว ขอบเรียบ กลางโคลนีมีสีเขียว (รูปที่ 4-10ก) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอพบโครงสร้างสืบพันธุ์ขึ้นมาจากอากาศ (รูปที่ 4-10ข) เมื่อทำการตัดใบพืชตามขวาง เห็นว่าสาหร่ายเข้าซอนไซเข้าสู่ใบพืชที่บริเวณชั้น subcuticular และมีก้านชูอับสปอร์ชูขึ้นมาเหนือพื้นผิวใบ นอกจากนี้เมื่อทำการตัดใบพืชตามยาวพบ thallus ของสาหร่ายแทรกอยู่ในชั้นใบพืช มีลักษณะเป็นสีเหลี่ยมผืนผ้า อีกทั้งพบว่ามีเม็ดสีแดงที่เรียกว่า heamatochrome ภายในเซลล์ (รูปที่ 4-10ง ลูกศรชี้) เมื่อนำสาหร่ายมาแยกและเพาะเลี้ยงได้สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย มีการเจริญเติบโตในแนวรัศมี เซลล์สาหร่ายมีความยาวประมาณ 63.1 μm กว้างประมาณ 7.2 μm



- รูปที่ 4-10 ตัวอย่าง Cp.6 โรคใบจุดสาหร่ายบนเฟินชายผ้าสีดา
- ก) ใบโศกอินเดียตัวอย่าง Cp.6 ที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่าย (scale bar 0.5 cm)
- ข) โครงสร้างสืบพันธุ์เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอที่กำลังขยาย 4 เท่า (scale bar 200 μm)
- ค) ภาพตัดใบตามขวางของใบพืชที่กำลังขยาย 4 เท่า (scale bar 200 μm)
- ง) ภาพตัดใบตามยาว thallus ของสาหร่ายที่กำลังขยาย 40 เท่า (scale bar 20 μm) และเม็ดสี heamatochrome ภายในเซลล์ (ลูกศรชี้)
- จ) สาหร่ายตัวอย่าง Cp.6 จากการแยกและเพาะเลี้ยงที่กำลังขยาย 40 เท่า (scale bar 20 μm)

จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างโรคใบจุดสาหร่ายด้วยตาเปล่าและแว่นขยาย เมื่อรวบรวมและนำมาเปรียบเทียบกันพบว่าทุกตัวอย่างมีตำแหน่งการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายที่ผิวใบพืชด้านบน ซึ่งเป็นบริเวณที่ไปได้รับแสงแดด อีกทั้งยังมีสีโคโลนีของโรคที่ใกล้เคียงกัน คือ สีส้มหรือ ส้มคล้ายสีสนิมเหล็ก โดยส่วนมากมีรูปร่างลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว ยกเว้นตัวอย่าง Cp.3 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากเฟินชายผ้าสีดา ที่พบว่ามีลักษณะโคโลนีที่ไม่แน่นอน กล่าวคือพบสาหร่ายก่อโรคได้เกือบทั่วบริเวณผิวใบ นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ทุกตัวอย่างมีรูปแบบการเจริญ รูปร่างของ filament cell อับสปอร์ ก้านชูอับสปอร์ที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงและรวบรวมในตารางที่ 4-3 ทั้งนี้เมื่อผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบกับเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายที่พบจากการเก็บตัวอย่างครั้งนี้ล้วนตรงกับลักษณะของสาหร่ายก่อโรคชนิด *Cephaleuros virescens* Kunze ex E.M. Fries (Suto and Ohtani, 2011, Suto and Ohtani, 2009, Thompson and Wujek, 1997)





รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย

รูปที่ 1a-6a; ลักษณะรอยโรค (โคโลนี) ของสาหร่ายทั้ง 6 ตัวอย่าง (Scale bar = 1cm.) บนใบพืชที่ พบโรคใบจุดสาหร่าย ได้แก่ ใบมะนาว (1a) ใบชมพูมะเหมี่ยว (2a) ใบเฟินชายผ้าสีดา (3a) ใบส้มโอ (4a) ใบฝรั่ง (5a) และใบโศกอินเดีย (6a) รูปที่ 1b-6b; ลักษณะรอยโรคและอับสปอร์ของสาหร่ายก่อโรค (Scale bar = 200 μ m.) รูปที่ 1c-6c; ตำแหน่งของรอยโรคบนใบพืชและลักษณะอับสปอร์ (Scale bar = 200 μ m.) รูปที่ 1d-6d; ลักษณะทึลลัสของสาหร่ายแบบ Pseudoparenchymatous ramuli (Scale bar = 50 μ m.) รูปที่ 1e-6e; ลักษณะของเส้นสายของตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคเมื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Scale bar = 20 μ m.)

ตารางที่ 4-3 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคทั้ง 6 ตัวอย่าง

ลักษณะตัวอย่าง	Cp.1	Cp.2	Cp.3	Cp.4	Cp.5	Cp.6
พืชเจ้าบ้าน	มะนาว (<i>Citrus aurantifolia</i>)	ชมพู่มะเหมี่ยว (<i>Syzygium alacense</i>)	เฟินชายผ้าสีดา (<i>Platycerium holtumii</i>)	ส้มโอ (<i>Citrus maxima</i>)	ฝรั่ง (<i>Psidium guajava</i>)	อโศกอินเดีย (<i>Polyalthia longifolia</i>)
สีโคโลนี	สีส้มสนิมอมเขียว	สีคล้ำน้ำตาลแดง	สีส้มคล้ายสนิมเหล็ก	สีส้มแดงคล้ายสนิมเหล็ก	สีส้มคล้ายสนิมเหล็ก	สีส้มคล้ายสนิมเหล็กขอบ โคโลนีสีเขียว
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วไป	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วไป	ไม่มีรูปร่างที่แน่นอน	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วไป	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วไป	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วไป
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm.)	3 - 4	3 - 5	-	6 - 8	7 - 12	3 - 8
ตำแหน่งการเข้าทำลาย บริเวณชั้นใบพืช	ตำแหน่ง cuticular - subcuticular บริเวณใบพืชด้านบน					
ขอบโคโลนี	ขอบโคโลนีเรียบ เห็นขอบได้ชัดเจน	ขอบโคโลนีเรียบ เห็นขอบไม่ชัดเจน	ไม่สามารถระบุได้	ขอบโคโลนีหยัก เห็นขอบชัดเจน	ขอบโคโลนีหยัก เห็นขอบไม่ชัดเจน	ขอบโคโลนีเรียบ เห็นขอบชัดเจน
ขนาดเซลล์สาหร่าย* (กว้าง × ยาว, μm)	6.59 ± 0.35 $\times 67.01 \pm 8.25$	7.86 ± 0.82 $\times 69.02 \pm 5.88$	8.82 ± 1.22 $\times 68.24 \pm 4.25$	7.11 ± 1.43 $\times 68.91 \pm 5.19$	7.49 ± 0.65 $\times 68.50 \pm 12.51$	7.86 ± 0.57 $\times 64.54 \pm 5.71$
สปอร์	สปอร์สี่เหลี่ยม	สปอร์สี่เหลี่ยม	สปอร์สี่เหลี่ยม	สปอร์สี่เหลี่ยม	สปอร์สี่เหลี่ยม	สปอร์สี่เหลี่ยม
ขนาดสปอร์* (กว้าง × ยาว, μm)	25.86 ± 1.77 $\times 15.6 \pm 1.04$	25.02 ± 1.83 $\times 14.00 \pm 1.21$	24.61 ± 1.68 $\times 15.55 \pm 1.32$	24.64 ± 1.90 $\times 16.17 \pm 1.58$	24.53 ± 1.43 $\times 16.39 \pm 2.80$	25.46 ± 3.74 $\times 15.11 \pm 2.03$
ขนาดก้านชูสปอร์* (กว้าง × ยาว, μm)	17.96 ± 1.63 $\times 310.63 \pm 30.43$	18.50 ± 0.93 $\times 313.98 \pm 55.97$	16.604 ± 1.62 $\times 257.74 \pm 29.31$	19.54 ± 2.56 $\times 327.70 \pm 48.42$	17.30 ± 2.22 $\times 302.68 \pm 26.83$	17.91 ± 1.02 $\times 282.16 \pm 40.45$

* ข้อมูลที่ได้วัดจากตัวอย่างแบบสุ่มทั้งหมด 30 ครั้ง

จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายที่ได้กล่าวมาข้างต้น เมื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเอกสารงานวิจัยที่มีการกล่าวถึงข้อมูลของสาหร่ายในกลุ่มนี้ จะพบว่า สาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันกับสาหร่ายสกุล *Trentepohlia* อาทิ ลักษณะของโคโลนีที่ฟูคล้ายกำมะหยี่ (Thompson and Wujek, 1997) มีสีของโคโลนีที่ค่อนข้างเด่นชัด คือมีสีส้มไปจนถึงแดง (Liu et al., 2012) หากแต่เมื่อพิจารณาถึงแหล่งที่อาศัยที่พบ จะเห็นได้ว่าทั้ง 2 สกุล มีความแตกต่างกัน โดยสาหร่ายในสกุล *Trentepohlia* มักจะพบการเจริญบริเวณพื้นผิวของสิ่งก่อสร้างที่มีความชื้นและบริเวณที่มีแสงแดดส่องถึง เช่น ผนังปูนเก่า โบราณสถาน หรือเปลือกไม้ (Rindi et al., 2008, Thompson and Wujek, 1997, Juan M. López-Bautista, 2002) ในขณะที่สาหร่ายสกุล *Cephaleuros* มักมีการเจริญแบบปรสิต (parasite) บนส่วนต่างๆ ของพืช อาทิ ใบ ลำต้น และผล เป็นต้น (Sunpapao et al., 2015a, Thompson and Wujek, 1997) นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาลักษณะอื่นๆ ของสาหร่ายทั้ง 2 สกุล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นได้ว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถแยกสาหร่ายทั้ง 2 ออกจากกันได้ อาทิ โครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ โดยพบว่าสาหร่ายในสกุล *Trentepohlia* ไม่มีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ อันได้แก่ sporangiophores (Rindi et al., 2008) ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* (Thompson and Wujek, 1997, Suto and Ohtani, 2011) และจากข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้น สอดคล้องกับผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายที่ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างในงานวิจัยนี้ ที่พบว่าตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคที่มีการเจริญแบบปรสิตบนส่วนต่างๆ ของพืช โดยพบที่บริเวณใบพืชเป็นหลัก ลักษณะโคโลนีที่เห็นภายนอกมีสีส้มคล้ายสีสนิมเหล็ก และเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก็พบว่ามีโครงสร้างสืบพันธุ์ชูขึ้นบนอากาศ ซึ่งจากข้อมูลสามารถบ่งชี้ว่าตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคที่ได้จัดเป็นสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros*

เมื่อทำการสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* พบว่า โรคใบจุดสาหร่ายส่วนมากมักเกิดจากเชื้อสาหร่ายก่อโรค 2 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ *Cephaleuros virescens* และ *Cephaleuros parasiticus* (Suto et al., 2014) ทั้งนี้เมื่อค้นคว้าข้อมูลถึงการบ่งชี้ชนิดของเชื้อสาหร่ายก่อโรคทั้ง 2 ชนิด อนุรักษ์ และคณะ (2558) กล่าวว่า สามารถจัดจำแนกสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้ด้วยความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา อันได้แก่ ตำแหน่งการเกิดรอยโรคบนใบพืช ตำแหน่งการเจริญ (growth habit) ของทลัสภายในพืชเจ้าบ้าน เช่น ชั้นคิวติเคิล ชั้นอีพิเดอมิส (subepidermal) หรือเจริญเข้าไปในเซลล์ (intramatrical) และจากข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้นนี้บ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคที่ผู้วิจัยได้นำมาศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ตรงกับสาหร่ายชนิด *C. virescens* ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่มีการกล่าวไว้ว่า สาหร่ายก่อโรคชนิด *C. virescens* เป็นชนิดที่มีการแพร่ระบาดและเป็นสาเหตุของโรคมามากที่สุด โดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อน (Rindi et al., 2008, Rindi and López-Bautista, 2008) อีกทั้งเมื่อสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแพร่ระบาดของโรคใบจุดสาหร่ายในประเทศไทย ก็พบรายงานว่า มีการแพร่ระบาดของเชื้อสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* บริเวณพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ในจังหวัดพัทลุง ตรัง สตูล และสงขลา โดยพบความหลากหลายของเชื้อสาหร่ายก่อโรคทั้งหมด 5 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ *C. diffusus*, *C. expansa*, *C. karstenii*, *C. solutus* และ *C. virescens* โดยพบสาหร่าย

C. virescens ในทุกพื้นที่ของการศึกษาวิจัย และพบว่ามีพืชเจ้าบ้านหลากหลายที่สุดคือ 14 วงศ์ 14 สกุล 16 ชนิด (อนุรักษ์ และคณะ, 2015) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคที่ผู้วิจัยกำลังศึกษา พบว่ามีความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคทั้ง 6 ตัวอย่าง เป็นสาหร่ายก่อโรคชนิด *C. virescens* ซึ่งเป็นชนิดที่มีการแพร่ระบาดมากที่สุด (Suto and Ohtani, 2013, Holcomb, 1986, Han et al., 2011, Mutiara et al., 2015, Brown, 2013) อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* มีความคล้ายคลึงและใกล้เคียงกันมาก อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการก็สามารถใช้จัดจำแนกสาหร่ายกลุ่มนี้ได้เพียงบางชนิดเท่านั้น อาทิ ลักษณะของรอยโรคแบบเรียบหรือแบบนูน (อนุรักษ์ และคณะ, 2558) ซึ่งการที่จะจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ความเชี่ยวชาญในการจำแนกเป็นอย่างมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกที่จะใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการจัดจำแนกสาหร่ายก่อโรคเพิ่มเติม เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวใช้ความเชี่ยวชาญที่น้อยกว่า อีกทั้งมีความสะดวกและรวดเร็วมากกว่า

1.3 การจัดจำแนกชนิดสาหร่ายก่อโรคด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA จากตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงได้

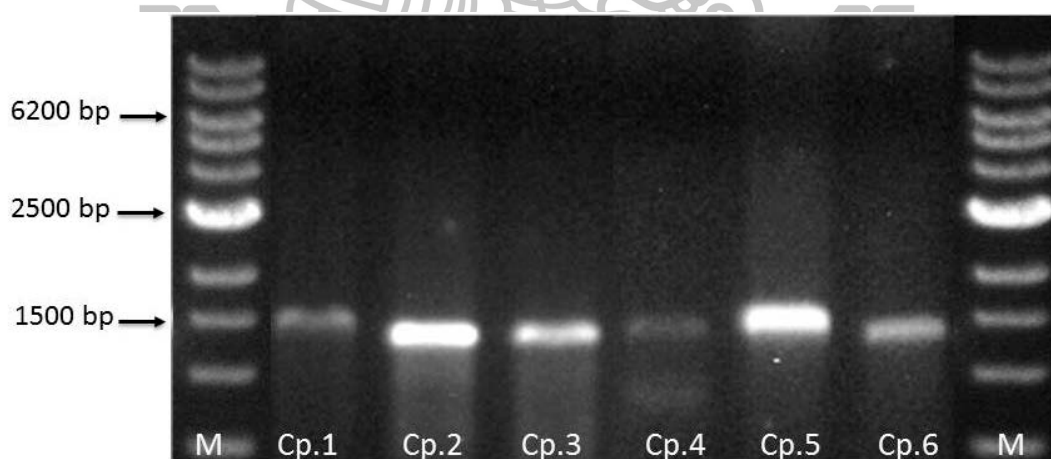
เพื่อเพิ่มเติมข้อมูลสำหรับการจัดจำแนกสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันชนิดของสาหร่ายก่อโรคที่แยกเพาะเลี้ยงได้ด้วยข้อมูลทางอณูชีววิทยา โดยเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ตำแหน่ง 18S rRNA จากการใช้ไพรเมอร์ 107F และ ChloroR เพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นส่งตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำข้อมูลมาทำการจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูล NCBI GenBank เพื่อระบุชนิดของสาหร่ายก่อโรค

ผลจากการเพิ่มจำนวน DNA ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA พบว่า เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1500 bp ดังแสดงในรูปที่ 4-11 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI GenBank ณ วันที่ 29 กรกฎาคม 2559 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างทั้งหมดบ่งชี้ว่า สาหร่ายก่อโรคใบจุดสนิมที่แยกได้มาทั้ง 6 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Cephaleuros* โดยมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (percentage of similarity) อยู่ที่ระหว่าง 95-99% โดยชนิดสาหร่ายที่มีความเหมือนสูงสุดจากฐานข้อมูลคือสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

ตารางที่ 4-4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA กับฐานข้อมูล NCBI GenBank

isolate	ชนิดสาหร่ายที่มีความเหมือนสูงสุด จากฐานข้อมูล	18S rRNA %Similarity	Accession numbers
Cp.1	<i>Cephaleuros virescens</i> strain SAG 119.80	98%	DQ399594.1
Cp.2	<i>Cephaleuros virescens</i> strain SAG 25.83	97%	DQ399595.1
Cp.3	<i>Cephaleuros virescens</i> strain SAG 119.80	99%	DQ399594.1
Cp.4	<i>Cephaleuros virescens</i> strain SAG 25.83	99%	DQ399595.1
Cp.5	<i>Cephaleuros virescens</i> strain SAG 25.83	95%	DQ399595.1
Cp.6	<i>Cephaleuros parasiticus</i> strain UTEX 2412	98%	DQ399583.1
	<i>Cephaleuros virescens</i> strain SAG 42.85	98%	DQ399585.1

หมายเหตุ * ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ ณ วันที่ 29 กรกฎาคม 2559



รูปที่ 4-11 ผลลัพธ์ PCR ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA ของตัวอย่าง Cp. 1 ถึง Cp.6
ผลลัพธ์ PCR ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA จากการใช้ไพรเมอร์ 107F และ ChloroR มีขนาด 1500 bp โดย lane 1 และ 8 = 1 kb DNA ladder, lane 2-7 ตัวอย่าง Cp.1 ถึง 6 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน 18S rRNA ด้วยเทคนิค BLAST ได้บ่งชี้ว่าตัวอย่างเชื้อสาหร่ายก่อโรคทั้งหมด 6 ตัวอย่างที่แยกเพาะเลี้ยงได้ เป็นเชื้อสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* โดยผลที่ได้รับนี้สอดคล้องกับการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้ดำเนินการไปก่อนหน้านี้

เมื่อผู้วิจัยนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA ของสาหร่ายทั้ง 6 ไอโซเลท มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) โดยการเปรียบเทียบที่ละคู่ หลังจากการจัดเรียง ปรับแต่งและแก้ไขด้วยโปรแกรม BioEdit vers. 7.2.5 (Hall, 1999) โดยการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีความชัดเจนบริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายของลำดับ พบว่า ตัวอย่างสาหร่ายส่วนมากมีค่าดังกล่าวอยู่ในช่วงตั้งแต่ 97- 99% โดยตัวอย่างที่มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงถึง 99% ได้แก่ Cp.1 Cp.2 Cp.3 Cp.4 และ Cp.6 ซึ่งถือว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างสูง เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วในการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น จะยอมรับว่าสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษาคือเป็นชนิดเดียวกันก็ต่อเมื่อมีค่าดังกล่าวตั้งแต่ 97% ขึ้นไป (Portillo et al., 2009) นั่นก็หมายความว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของตำแหน่งยีน 18S rRNA นั้น เป็นข้อมูลที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสาหร่ายระหว่าง Cp.1 Cp.2 Cp.3 Cp.4 และ Cp.6 ได้ในระดับชนิด (species) ยกเว้นสาหร่าย Cp.5 ที่มีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำกว่า 97% คืออยู่ในช่วง 92-94% อย่างไรก็ตามเมื่อผู้วิจัยทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีนดังกล่าวเพื่อที่จะจัดจำแนกสาหร่ายทั้ง 6 ตัวอย่างต่อไปในระดับชนิดกับข้อมูลสาหร่ายชนิด *C. virescens* (accession: DQ399585.1) และ *C. parasiticus* (accession: DQ399583.1) ซึ่งเป็นผลจากงานวิจัยของ Lopez-Bautista และคณะที่ตีพิมพ์ในปี 2006 ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (ตารางที่ 4-4) โดยผู้วิจัยได้เลือกที่จะเปรียบเทียบกับผลจากงานวิจัยนี้ เนื่องจากคณะวิจัยดังกล่าวได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายก่อโรคร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายที่พบได้บ่อยทั้ง 2 ชนิด (Lopez-Bautista et al., 2006) จากผลการเปรียบเทียบจะเห็นได้ว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันการจำแนกสาหร่ายก่อโรคในระดับสกุลได้ว่า ตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคทั้ง 6 ตัวอย่าง เป็นสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่าย 3 ตัวอย่างที่ได้รับจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ได้แก่ ตัวอย่าง Cp.1 Cp.3 และ Cp.4 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาหร่าย *C. virescens* มากกว่า *C. parasiticus* ตัวอย่าง Cp.2 และ Cp.5 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับสาหร่าย *C. virescens* และ *C. parasiticus* ยกเว้นตัวอย่าง cp. 6 ที่พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสาหร่าย *C. parasiticus* มากกว่าสาหร่าย *C. virescens* อยู่ 1% แสดงให้เห็นว่า การที่จะจัดจำแนกสาหร่ายก่อโรคชนิด *C. virescens* และ *C. parasiticus* ออกจากกันด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA นั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากระดับความเหมือนที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ระหว่างสาหร่าย *C. virescens* และ *C. parasiticus* มีค่าสูงถึง 99%

ตารางที่ 4-5 ผลวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างสาหร่าย กับสาหร่ายชนิด *C. virescens* และ *C. parasiticus* ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA จากฐานข้อมูล NCBI (สืบค้น ณ วันที่ 16 มิถุนายน 2559) และนำมาคำนวณด้วยโปรแกรม BioEdit vers. 7.2.5

Taxa	Cp.1	Cp.2	Cp.3	Cp.4	Cp.5	Cp.6	<i>C. virescens</i>	<i>C. parasiticus</i>
Cp.1	100%							
Cp.2	98%	100%						
Cp.3	99%	98%	100%					
Cp.4	99%	97%	99%	100%				
Cp.5	94%	92%	94%	94%	100%			
Cp.6	98%	99%	98%	98%	93%	100%		
<i>C. virescens</i>	99%	98%	99%	99%	93%	98%	100%	
<i>C. parasiticus</i>	98%	98%	98%	98%	93%	99%	99%	100%

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความคิดเห็นว่าการที่จะจัดจำแนกชนิดของเชื้อสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA สามารถยืนยันได้เพียงระดับสกุลเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rindi และคณะ (2009) ที่มีกล่าวว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA สามารถจำแนกสาหร่ายในวงศ์ Trentepohliaceae อันได้แก่ สาหร่ายสกุล *Trentepohlia*, *Printzina* และ *Cephaleuros* ทั้ง 3 สกุลออกจากกันได้ดี แต่ในงานวิจัยกลับได้ผลต่างไป เนื่องจากข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถบ่งชี้ถึงระดับชนิดของเชื้อสาหร่ายก่อโรคได้ และจากการสืบค้นในฐานข้อมูล NCBI (สืบค้น ณ วันที่ 16 มิถุนายน 2559) พบว่า มีชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ที่บริเวณตำแหน่งยีน 18S rRNA จำนวน 25 ชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ และมีเพียง 10 ชุดลำดับนิวคลีโอไทด์เท่านั้นที่มีรายงานการตีพิมพ์ โดยแบ่งเป็นข้อมูลของสาหร่าย *C. virescens* 6 ชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ *C. parasiticus* 3 ชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ และ *C. diffuses* 1 ชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งกล่าวได้ว่า ข้อมูล 10 ชุดนี้เป็นจำนวนที่น้อยมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า การที่จะยืนยันชนิดของสาหร่ายในสกุลนี้โดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA จึงอาจจะยังไม่น่าเชื่อถือมากนัก หากเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกด้วยเทคนิคทางสัณฐานวิทยา ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีนดังกล่าวมีความอนุรักษ์สูง (conserved sequence) หรือบริเวณของตำแหน่งยีนที่นำมาศึกษาอาจยังไม่ใช่ตำแหน่งที่เหมาะสมในการจำแนกในระดับถึงระดับชนิด อย่างไรก็ตามผลการศึกษาพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ López-Bautista และคณะ (2006) ที่กล่าวไว้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA สามารถจัดจำแนกสาหร่ายในอันดับ (order) Trentepohliales ได้ดี ทั้งนี้จากการสืบค้นเพิ่มเติมมีการรายงานไว้ว่า นอกจากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA แล้ว ยังสามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน *rbcl* ในการบอกความแตกต่างในระดับสกุลและชนิดของสาหร่ายในอันดับ

Trentepohliales ได้อีกด้วย (Rindi et al., 2009) แต่เมื่อสืบค้นต่อไปกลับพบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน *rbcl* ในฐานข้อมูล NCBI ยังมีเพียง 8 ชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยมีสาหร่าย *Cephaleuros* เพียง 1 ชนิด เท่านั้นที่มีการตีพิมพ์ (สืบค้น ณ วันที่ 17 มิถุนายน 2559) นับได้ว่าเป็นข้อมูลที่ค่อนข้างน้อยเช่นกัน ซึ่งทำให้การจัดจำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณสองยีนนี้ยังไม่น่าเชื่อถือ (Sunpapao et al., 2015a) ผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งอื่น ๆ อาทิเช่น ตำแหน่ง *photosystem II reaction center (psb) gene* (Fucikova et al., 2014) และตำแหน่งยีน ITS ซึ่งมีการกล่าวไว้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนั้นมีความแตกต่างระหว่างสปีชีส์สูง (Rindi et al., 2009) อาจจะสามารถนำมาใช้เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อสาหร่ายก่อโรคที่แม่นยำและน่าเชื่อถือในอนาคตได้

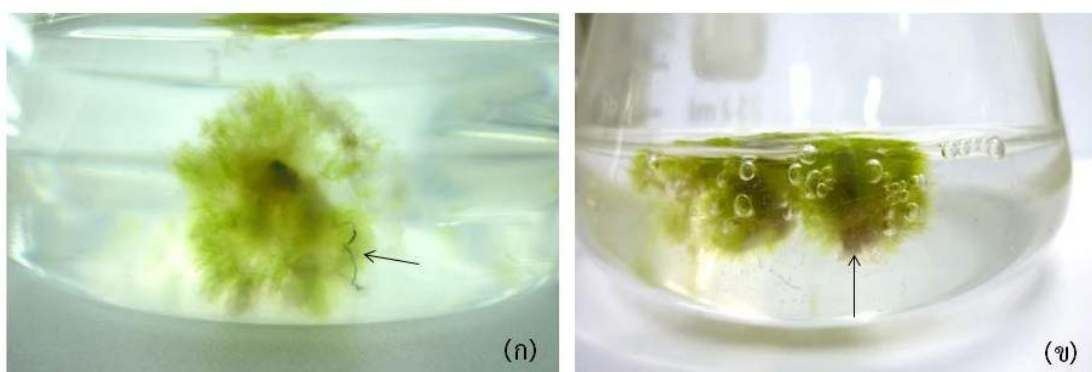
จากการสืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกของสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* พบว่า รายงานส่วนใหญ่จะจัดจำแนกชนิด (species) โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย เนื่องจากมีปริมาณข้อมูลมากจึงเป็นที่ยอมรับมากกว่า ในขณะที่ข้อมูลทางอณูชีววิทยาที่มีอยู่อย่างจำกัดในขณะนี้ เช่นในกรณีของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* นั้นมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายเพียง 3 ชนิด เท่านั้น ได้แก่ *C. virescens*, *C. parasiticus* และ *C. diffusus* หากแต่มีรายงานการพบสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ทั้งหมดนั้นมีมากถึง 28 ชนิด ตามที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล Algaebase (ตารางที่ 2-3) อีกทั้งยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA ของสาหร่ายแต่ละชนิดในสกุล *Cephaleuros* มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงมาก จึงยิ่งทำให้การจัดจำแนกโดยใช้ข้อมูลทางอณูชีววิทยายังไม่ชัดเจนพอ ในขณะที่การจัดจำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา มีงานวิจัยและข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นจำนวนมาก (Sunpapao et al., 2015b, Suto et al., 2014, Suto and Ohtani, 2011, Suto and Ohtani, 2009, CHAPMAN, 1978) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าการจัดจำแนกสาหร่ายสกุลนี้ในระดับชนิดควรที่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลักในการบ่งชี้ชนิดของสาหร่ายก่อโรค แต่อย่างไรก็ตามการที่จะจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำเป็นที่จะต้องใช้ความเชี่ยวชาญในการจำแนก ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาวิจัยในด้านอณูชีววิทยาของสาหร่ายกลุ่มนี้ เพื่อเพิ่มข้อมูลด้านลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายก่อโรคกลุ่มนี้เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป

2 การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* และอาหารที่เหมาะสมในการสร้างมวลชีวภาพ

2.1 การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* ให้บริสุทธิ์

การเจริญของสาหร่าย *Cephaleuros* สามารถตรวจพบได้หลังจากที่ทำการใส่ชิ้นส่วนรอยโรคลงในอาหารเป็นเวลาประมาณ 4-5 สัปดาห์ โดยจะสังเกตเห็นได้จากเส้นสายสีเขียวอ่อนของสาหร่าย *Cephaleuros* ที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนรอยโรคและยึดยาวออกในแนวรัศมี (radial growth) อย่างช้าๆ ดังแสดงในรูปที่ 4-12 ก จนเกิดเป็นลักษณะก้อนกลมสีเขียวในเวลาต่อมา ซึ่งก้อนของเส้นสายสาหร่ายดังกล่าวจะค่อยๆ เพิ่มจำนวนและหนาแน่นขึ้นตามลำดับ และหากมีเส้นสายบางส่วนหลุดออกมาจากกลุ่มก้อนสาหร่ายหลัก ก็พบว่าสามารถเจริญต่อเป็นกลุ่มเส้นสายใหม่ได้เช่นกัน โดยเริ่ม

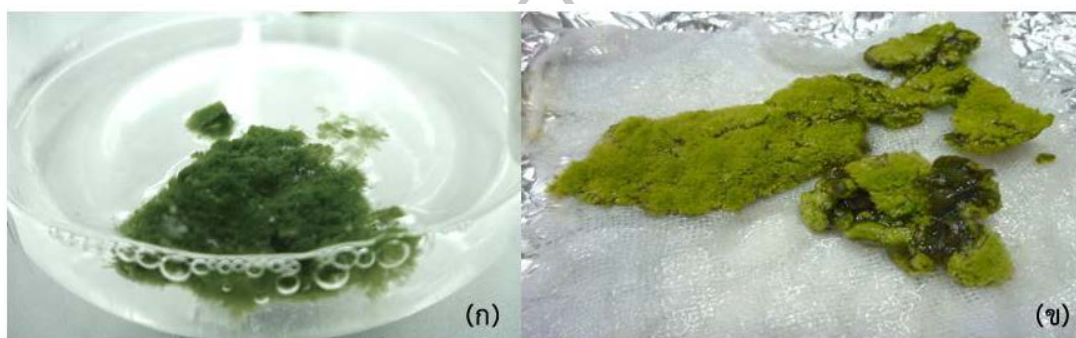
จากการแตกแขนงในแนวรัศมีลักษณะเดียวกับที่เส้นสายเจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืชที่ติดเชื้อ ทั้งนี้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงผู้วิจัยพบว่าอุปสรรคที่สำคัญของการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ คือ การปนเปื้อนของสาหร่ายจากเชื้อรา โดยเส้นสายของเชื้อราจะสังเกตเห็นได้ง่ายจากลักษณะของกลุ่มเส้นสายสีดำที่แทรกอยู่กับเส้นสายของสาหร่ายที่มีสีเขียวอ่อน (รูปที่ 4-12ข) ซึ่งหากไม่ทำการย้ายเส้นสายของสาหร่ายลงอาหารชนิดใหม่ (subculture) เชื้อราจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วปกคลุมเส้นสายของสาหร่าย จากนั้นสาหร่ายเริ่มมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวสดเป็นสีเขียวซีดและตายในที่สุด อาจเนื่องมาจากเชื้อราที่มีการอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่าสาหร่ายมาก



รูปที่ 4-12 การเจริญของเส้นสายสาหร่าย *Cephaleuros* ในอาหารเหลวสูตร HSM
 ก) เส้นสายของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 ที่เจริญออกมานอกชิ้นส่วนรอยโรคของใบพืชที่ติดเชื้อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร HSM อายุ 60 วัน ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อรา (ลูกศรชี้) โดยสังเกตได้จากกลุ่มของเส้นสายสีดำ; ข) สาหร่ายเกาะกันแน่นเป็นแพลอยอยู่บริเวณผิวหน้าอาหารเมื่อมีการเจริญมากขึ้น



สาหร่ายก่อโรคที่แยกเพาะเลี้ยงได้เมื่อเจริญในอาหารเหลวสูตร BBM จนถึงอายุประมาณ 36 สัปดาห์ หรือ 9 เดือน โดยไม่มีการเติมอาหารหรือถ่ายเชื้อ สาหร่ายจะเริ่มทยอยตายอย่างช้าๆ อย่างไรก็ตามหากมีการย้ายสาหร่ายลงเลี้ยงในอาหารใหม่อย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอก็จะพบว่าสาหร่ายสามารถมีชีวิตอยู่ได้ต่อไปเรื่อยๆ และมีการเจริญเพิ่มมวลชีวภาพมากขึ้น ลักษณะเด่นอีกประการที่ผู้วิจัยได้สังเกตเห็นเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* ในขวดรูปชมพู่โดยไม่มีการเขย่า เป็นระยะเวลาประมาณ 12 สัปดาห์ ในอาหารสูตร HSM คือ สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนว่าสาหร่ายมีการเจริญและเกาะกันแน่นเป็นแพ มองคล้ายแผ่นมอสที่พบได้ตามธรรมชาติ สีเขียวสดใสคล้ายหญ้าลอยอยู่บริเวณผิวน้ำอาหาร (รูปที่ 4-13)



รูปที่ 4-13 ลักษณะการเจริญของสาหร่าย *Cephaleuros* ในอาหารเหลวสูตร HSM
 ก) การเจริญของสาหร่ายที่ลอยอยู่บริเวณผิวน้ำอาหารเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร HSM
 ข) กลุ่มเส้นสายของสาหร่ายที่นำขึ้นมาจากอาหารจะมีลักษณะที่เกาะกันแน่นเป็นแพหนา

2.2 การลดการปนเปื้อนของเชื้อราในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros*

ระหว่างขั้นตอนการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นสายสีดำเกาะอยู่ร่วมกับเส้นสายของสาหร่ายบ่อยครั้ง อีกทั้งพบว่า เส้นสายของเชื้อรานั้นเพิ่มปริมาณและกระจายในอาหารเหลวสูตร HSM ที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายได้อย่างรวดเร็ว จนเกิดเป็นกลุ่มเส้นสายเชื้อราขนาดใหญ่ และส่งผลในทางลบต่อการเจริญของสาหร่าย ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องหาวิธีการที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อราดังกล่าว โดยเริ่มต้นจากการทำความสะอาดชิ้นส่วนพีชติดเชื้อที่จะนำมาแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยสารละลายคลอโรกซ์ (Clorox®) ซึ่งผู้วิจัยพบว่า สารละลายคลอโรกซ์ที่แช่ชิ้นส่วนใบพีชระดับความเข้มข้น 15% และ 20% ยังสามารถพบการเจริญของเชื้อราภายหลัง มีเพียงที่ระดับความเข้มข้น 30% เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (รูปที่ 4-14) หากแต่ว่าทุกความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์นั้นไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อสาหร่ายออกจากชิ้นส่วนพีชติดเชื้อใบจุดสาหร่ายเลย จึงสรุปได้ว่า สารละลายคลอโรกซ์ ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการลดการปนเปื้อนของเชื้อรา



รูปที่ 4-14 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารแข็งหลังจากแช่ชิ้นส่วนใบพืชด้วยสารละลายคลอโรกซ์

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดลองใช้สารกำจัดเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีรายงานถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย อันได้แก่ Haiter[®], mercuric chloride, ethanol และ hydrogen peroxide โดยหลังจากการทดลองแช่ตัวอย่างชิ้นส่วนรอยโรคในสารละลายตามสภาวะที่ดังกล่าวแล้วดังแสดงในตารางที่ 3-2 ชิ้นส่วนใบพืชที่ติดโรคข้างต้นจะถูกนำมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ก่อนนำลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร HSM จากผลการทดลองทั้งหมดให้ผลเช่นเดียวกันกับการแช่ตัวอย่างใบพืชด้วยสารละลายคลอโรกซ์ คือ สารละลาย disinfectant ต่างๆ ไม่สามารถที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียได้ ในขณะที่เดียวกันกลับส่งผลทำให้สาหร่ายตายอีกด้วย เนื่องจากไม่พบการเจริญของเส้นสายสาหร่ายภายหลังได้เลย

จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงทำการสอบถาม Dr. Yasuo Suto แห่งมหาวิทยาลัย Shimane ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญการศึกษาและแยกเชื้อสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ในประเทศญี่ปุ่น เพื่อขอคำแนะนำในการแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่ายชนิดนี้ และได้รับคำแนะนำให้ใช้สารที่มีชื่อว่า benzimidazole (methyl-1(butylcarbamoyl)-2-benzimidazole carbamate) ในการกำจัดเชื้อราที่มีการปนเปื้อนกับสาหร่าย *Cephaleuros* โดยผสมสารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10 ppm ร่วมกับ streptomycin ที่ความเข้มข้น 50 ppm (เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย) ลงในอาหารชนิดแข็ง สูตร BBM ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ผลปรากฏว่า ส่วนผสมดังกล่าวไม่สามารถที่จะกำจัดเชื้อราได้ อีกทั้งกลับพบการปนเปื้อนอย่างรุนแรงของเชื้อราที่มีโคลนีสสีขาวเจริญอยู่บนกลุ่มทลัสของสาหร่าย *Cephaleuros* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร HSM (รูปที่ 4-15) จากเหตุการณ์ดังกล่าวจึงทำให้ผู้วิจัยเลือกที่จะไม่ใช้สารกำจัดจุลินทรีย์ใดผสมลงในอาหาร หากแต่ใช้วิธีแยกสาหร่ายลงเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ (subculture) อย่างต่อเนื่องแทน โดยจะทำการ subculture ทันทีเมื่อพบการปนเปื้อนของเชื้อราในขวดเพาะเลี้ยงที่มีสาหร่ายเจริญ และทำซ้ำอีกหลายๆ ครั้ง ซึ่งผู้วิจัยพบว่าสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี ถึงแม้ว่ากระบวนการแยกเชื้อจะใช้เวลานานและใช้แรงงานมากกว่า อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการใช้วิธีแยกสาหร่ายลงเลี้ยงในอาหารขวดใหม่จะสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จนไม่สามารถมองเห็นการปนเปื้อนของเชื้อราได้ด้วยตาเปล่า แต่เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายไปได้ช่วงระยะเวลาหนึ่ง (ประมาณ 2-3 เดือน) บางครั้งพบเชื้อราที่มีเส้นสายเจริญ

ปะปนกับเส้นสายของสาหร่ายในอาหารเหลว และบ่อยครั้งที่พบว่าเชื้อเจริญอย่างเบาบาง (สังเกตเห็นได้ยาก) อยู่บริเวณรอบๆ ภาชนะด้านในเหนือผิวหน้าอาหารเหลว และเจริญต่อเนื่องจนถึงบริเวณคอขวดรูปชมพู่

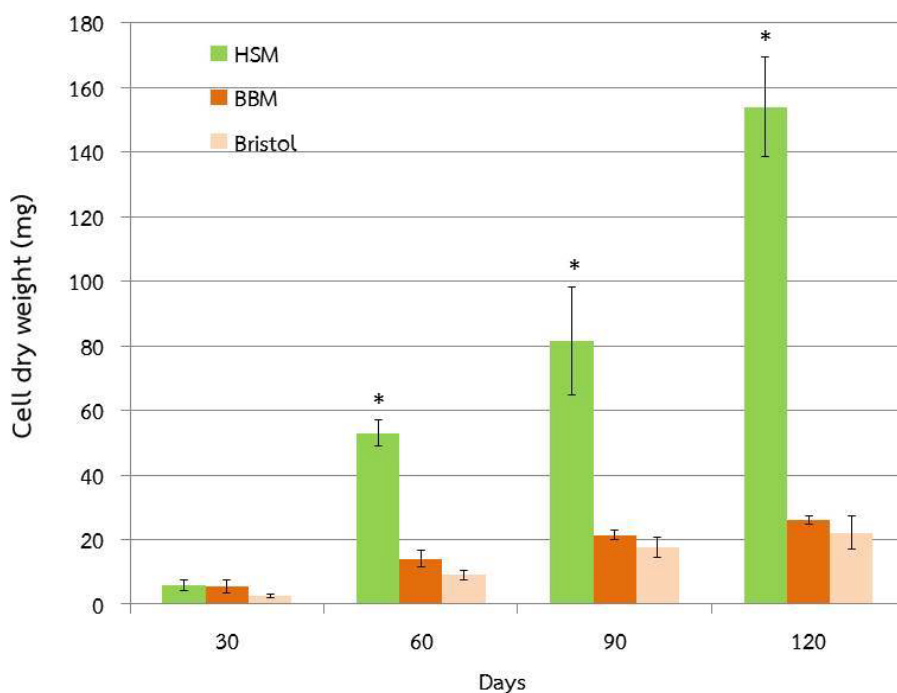


รูปที่ 4-15 การปนเปื้อนของเชื้อราอย่างรุนแรงเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* ร่วมกับยา benzimidazole

เนื่องจากสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* เป็นสาหร่ายในกลุ่ม subaerial มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous alga) ดังนั้นการที่จะแยกสาหร่ายให้ได้เชื้อบริสุทธิ์จึงไม่สามารถใช้วิธี re-streak ได้เพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยวได้เหมือนกับสาหร่ายเซลล์เดี่ยว (single cell alga) ผู้วิจัยจึงใช้วิธีการ subculture เชื้อสาหร่ายโดยการใช้เข็มเขี่ยแยกสาหร่ายออกจากเส้นสายของเชื้อราและถ่ายลงเลี้ยงในอาหารขวดใหม่เมื่อพบว่าการปนเปื้อน ซึ่งการปนเปื้อนนี้เองที่กล่าวได้ว่าเป็นอุปสรรคสำคัญในการแยกเชื้อสาหร่ายก่อโรคนี้ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ดังนั้นการใช้เข็มเขี่ยแยกสาหร่ายลงเลี้ยงในอาหารใหม่หลายๆครั้ง จึงเป็นวิธีที่ลดการปนเปื้อนของเชื้อราที่มีสีดำได้ดีที่สุดในขณะที่เชื้อราสีขาวที่เกิดขึ้นหลังจากการเติมยา benzimidazole ผู้วิจัยจึงไม่ได้นำสาหร่ายส่วนที่ติดเชื้อราสีขาวนั้นมาแยกเพาะเลี้ยงต่อ ดังนั้นกล่าวได้ว่า การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายครั้งนี้ สามารถแยกให้ได้เชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวได้ (unialgal culture) หากแต่ยังมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (เชื้อรา) ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อราระหว่างการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคกลุ่ม *Cephaleuros* นี้เป็นปัญหาที่มีรายงานบ่อยครั้งในกลุ่มผู้วิจัยที่ทำงานคล้ายคลึงกัน (Ponmurugan et al., 2010, Suto and Ohtani, 2011)

2.3 การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros*

เนื่องจากสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ที่แยกได้มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้า ดังนั้น การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมเพื่อการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros* จึงเป็นหัวข้ออยู่ในความสนใจของผู้วิจัย ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยได้เลือกตัวอย่างสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 มาเป็นตัวแทนในการศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ HSM BBM และ Bristol ปริมาตร 100 ml ทำการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง ทุก 30 วัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 120 วัน ผลการทดลองพบว่า สาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มมวลชีวภาพได้ในอาหารทั้ง 3 สูตรตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยมีข้อสังเกตว่า สาหร่ายสามารถเจริญได้ดีและสร้างมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในอาหารสูตร HSM ในขณะที่สร้างมวลชีวภาพได้น้อยกว่าในอาหารสูตร BBM และ Bristol



รูปที่ 4-16 ผลของชนิดอาหารต่อการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบในระยะเวลาเพาะเลี้ยงเดียวกัน

เมื่อสังเกตการเจริญของ *Cephaleuros* Cp.1 โดยละเอียดในแต่ละชนิดอาหารตามช่วงเวลา ที่เก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง 4 ครั้ง ทุก 30 วัน จะพบว่า สาหร่ายมีการสร้างมวลชีวภาพในทุกชนิดอาหาร เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในระยะ 30 วันแรกของการเพาะเลี้ยงนั้น มวลของสาหร่ายเพิ่มขึ้น จากน้ำหนักเริ่มต้น 0.024 mg (แห้ง) ไปเป็น 5.8 5.4 และ 2.4 mg ในอาหารสูตร HSM BBM และ Bristol ตามลำดับ โดยมวลชีวภาพที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร HSM และ BBM นั้นไม่แตกต่างกันทาง สถิติ ส่วนมวลชีวภาพที่วัดได้จากอาหารสูตร Bristol นั้นน้อยกว่าอาหารชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในการเก็บตัวอย่างครั้งต่อมาพบว่า อาหารสูตร HSM ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพที่ สูงกว่าอาหารอีก 2 สูตรอย่างเห็นได้ชัด และมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมวลชีวภาพสูงสุดถึง 9 เท่า ใน เดือนที่ 2 หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่เดือนที่ 3 พบว่า สาหร่ายมีการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพลดลงอยู่ที่ ประมาณ 1.5 เท่า โดยสาหร่ายทั้งหมดมีมวลชีวภาพสูงสุดในเดือนที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (120 วัน) ถึงแม้ผู้วิจัยจะสามารถสังเกตเห็นและบันทึกการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 ในอาหารสูตร BBM และ Bristol ได้ในทุกครั้งของการเก็บตัวอย่าง และพบมวลชีวภาพเพิ่มสูงสุดใน การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 เช่นกัน แต่ยังคงพบว่ามวลชีวภาพของสาหร่ายที่วัดได้จากอาหารสูตร BBM และ Bristol ในวันสุดท้ายที่บันทึกผลนั้น ยังคงมีค่าน้อยกว่ามวลชีวภาพที่ได้จากอาหารสูตร HSM ถึง 6 และ 7 เท่า ตามลำดับ

จากผลการทดลองในตารางที่ 4-5 จะเห็นได้ชัดเจนว่า ชนิดของอาหารมีผลต่อการสร้างมวล ชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 เป็นอย่างมาก โดยมวลชีวภาพของสาหร่ายที่ได้จากอาหาร ทั้ง 3 ชนิด ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเมื่อ พิจารณาที่การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 120 วัน พบว่า อาหารสูตร HSM ทำให้เกิดมวลชีวภาพและน้ำหนักของมวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 154.55 ± 15.55 mg ในขณะที่ ค่าน้ำหนักแห้งที่ซึ่งได้จากอาหารสูตร BBM และ Bristol นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 26 ± 1.22 และ 22.2 ± 5.06 mg ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าอาหารอีก 2 สูตร ถึงประมาณ 6 และ 7 เท่า จากการทดลองข้างต้นจึงกล่าวได้ว่า HSM จึงเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงเพื่อการสร้าง มวลชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 มากที่สุด อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาก็จะเห็นได้ว่า สาหร่ายยังคงมีแนวโน้มที่จะเจริญและเพิ่มมวลชีวภาพหากทำการเพาะเลี้ยงต่อ ดังนั้นหากเป็นไปได้ จึงควรที่จะทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึงระยะเวลาที่สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโต

ตารางที่ 4-6 ผลของชนิดอาหารต่อมวลชีวภาพของ *Cephaleuros* Cp.1 ในการเก็บตัวอย่างทุก 30 วัน

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน) /อาหาร	มวลชีวภาพ (mg)
30 วัน	
HSM	5.8 ±1.6 ^b
BBM	5.4 ±1.94 ^b
Bristol	2.4 ±0.55 ^a
60 วัน	
HSM	53 ±4 ^c
BBM	14 ±2.55 ^b
Bristol	9 ±1.58 ^a
90 วัน	
HSM	81.4 ±16.63 ^b
BBM	21.4 ±1.52 ^a
Bristol	17.6 ±3.04 ^a
120 วัน	
HSM	154.55 ± 15.55 ^b
BBM	26 ±1.22 ^a
Bristol	22.2 ± 5.06 ^a

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวยกที่กำกับที่แตกต่างกันในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อทำการวิเคราะห์ถึงความแตกต่างของธาตุอาหารที่มีอยู่ในสูตรอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่าอาหารสูตร HSM มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย (-NH_4^+) ซึ่งแตกต่างจากอาหารสูตร BBM และ Bristol ที่มีไนเตรต (-NO_3) เป็นแหล่งของไนโตรเจน จากการค้นคว้าข้อมูลเพิ่มเติมพบรายงานที่กล่าวว่า ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว (Arumugam et al., 2013) ซึ่งโดยปกติสาหร่ายจะนำไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Round, 1973) นอกจากนี้ไนโตรเจนยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารประกอบหลายชนิดภายในเซลล์ เช่น โปรตีน คลอโรฟิลล์ กรดนิวคลีอิก (Andersen, 2005) อีกทั้งปริมาณของไนโตรเจนที่สาหร่ายได้รับยังมีผลต่อการสร้างและสะสมพลังงานของสาหร่ายเพื่อเปลี่ยนไปเป็นพลังงานชีวภาพ เช่น น้ำมัน (Lin and Lin, 2011) โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมักจะใช้แหล่งของไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียม ไนเตรต และยูเรีย โดยอัตราการดูดซึมสารประกอบไนโตรเจนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ของสาหร่ายทั่วไปจะเป็นดังนี้ แอมโมเนีย > ยูเรีย > ไนเตรต > ไนไตรท์ (Zhu et al., 2013) ทั้งนี้ปริมาณไนโตรเจนที่สาหร่ายได้รับจะมีผลต่อมวลชีวภาพของเซลล์สาหร่าย ดังที่กล่าวไว้ในงานวิจัยของ Enwereuzoh และ Onyeagoro (2014) และ Giordano (2001) ว่า เมื่อเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว *Dunaliella salina* ในอาหารที่มีแอมโมเนียเป็นแหล่งของไนโตรเจน สาหร่ายมีการ

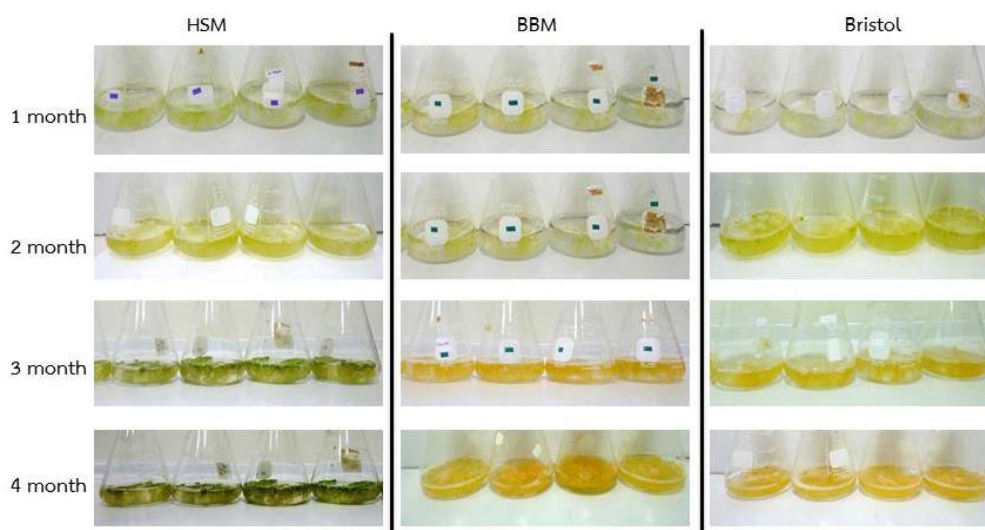
เจริญเติบโตได้เร็วและให้มวลชีวภาพมากกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบถึง 50% ข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่า อาหารสูตร HSM ทำให้สาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 สร้างมวลชีวภาพและเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารสูตร BBM และ Bristol เนื่องจากอาหารสูตร HSM มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ในกระบวนการทางชีววิทยาได้ง่ายและรวดเร็วกว่า โดยส่วนหนึ่งจะนำไปใช้ในกระบวนการสร้างสารอินทรีย์ อาทิเช่น กรดอะมิโน ส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์และไนเตรทเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการอื่นๆ ต่อไป (นุชนาถ, 2557) ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงอาหารสูตร BBM และ Bristol มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นไนเตรทจึงทำให้การนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ยากและซับซ้อนกว่า

เมื่อพิจารณาสูตรอาหารเพิ่มเติมยังพบอีกว่า อาหารทั้ง 3 ชนิด คือ HSM BBM และ Bristol ยังมีความแตกต่างกันในส่วนของการ มี/ ไม่มี เกลือคลอไรด์ (NaCl) อีกด้วย โดยอาหารชนิด HSM ไม่มีส่วนประกอบของเกลือคลอไรด์ ในขณะที่อาหารสูตร BBM และ Bristol มีส่วนประกอบของเกลือคลอไรด์เท่ากับ 25 mg/L ทั้งนี้ การที่สาหร่ายอยู่ในสภาวะที่มีความเค็มเกินความต้องการของสาหร่ายจะมีผลกระทบต่อระบบ metabolism ทำให้สาหร่ายมีการสร้างมวลชีวภาพที่ลดลง อาทิสาหร่าย *Arthrospira platensis* ที่มีมวลชีวภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเค็มเกลือ (Almahrouqi et al., 2015) ขณะที่สาหร่าย *Chlorella sorokiniana* และสาหร่าย *Chaetoceros mulleri* ระดับความเค็มนั้นยับยั้งการเจริญเติบโต (Moronta et al., 2006, Araujo et al., 2011) โดยทั่วไปสาหร่ายน้ำจืดจะสามารถเจริญได้ดีในความเค็มเกลือที่ความเข้มข้น 20-24 g/L (Lavens and Sorgeloos, 1996) ทั้งนี้ระดับของความทนเค็มนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย นอกจากผลของความเค็มเกลือต่อการสะสมของมวลชีวภาพแล้ว ยังพบรายงานว่า ความเค็มยังส่งผลให้สาหร่ายมีกระบวนการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่จะทำให้สาหร่ายเปลี่ยนจากการสะสมแป้งไปสะสมสารอาหารในรูปของไขมัน และ/หรือ รังควัตถุแทน (Ramos et al., 2011) ปรากฏการณ์นี้สามารถพบได้ในสาหร่าย *D. salina* ที่พบว่าจะมีการสะสมแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นถึง 175 µg/mg เมื่อเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่มีเกลือคลอไรด์เพิ่มขึ้น 20% (Borowitzka et al., 1990) สาหร่ายสีเขียว *Botryococcus braunii* ในอาหารสูตร BBM ที่มีการเพิ่มเกลือคลอไรด์ 0.1% และเกลือคาร์บอเนต 0.1% พบว่าสาหร่ายมีการสะสมแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 0.22% ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Ambati et al., 2010) รวมไปถึงสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น 21.24% เมื่ออยู่ในสภาวะความเค็ม (Rai et al., 2015)

trace element ในแต่ละสูตรอาหารก็เป็นอีกปัจจัยที่ผู้วิจัยนำมาพิจารณา เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารในรายละเอียด พบว่า อาหารสูตร BBM ใช้ trace element ที่ชื่อว่า trace metals solution (Bischoff and Bold, 1963) ส่วนในสูตร HSM นั้น trace element ที่ใส่ลงไปมีชื่อว่า Hutner's trace elements (Sueoka et al., 1967) ในขณะที่สูตร Bristol นั้นไม่มีการเติม trace element ทั้งนี้ trace element ทั้ง 2 สูตรนั้นมีความแตกต่างกันในส่วนของแร่ธาตุเพียงเล็กน้อย เช่น ส่วนประกอบโลหะ (Fe Zn Cu Co) และกรดบางชนิด (H_3BO_3 และ EDTA) เนื่องจาก

อาหารสูตร BBM เป็นสูตรอาหารที่มีการปรับเปลี่ยนสารเคมีมาจากอาหารสูตร Bristol (Bold, 1949) นั้นเอง

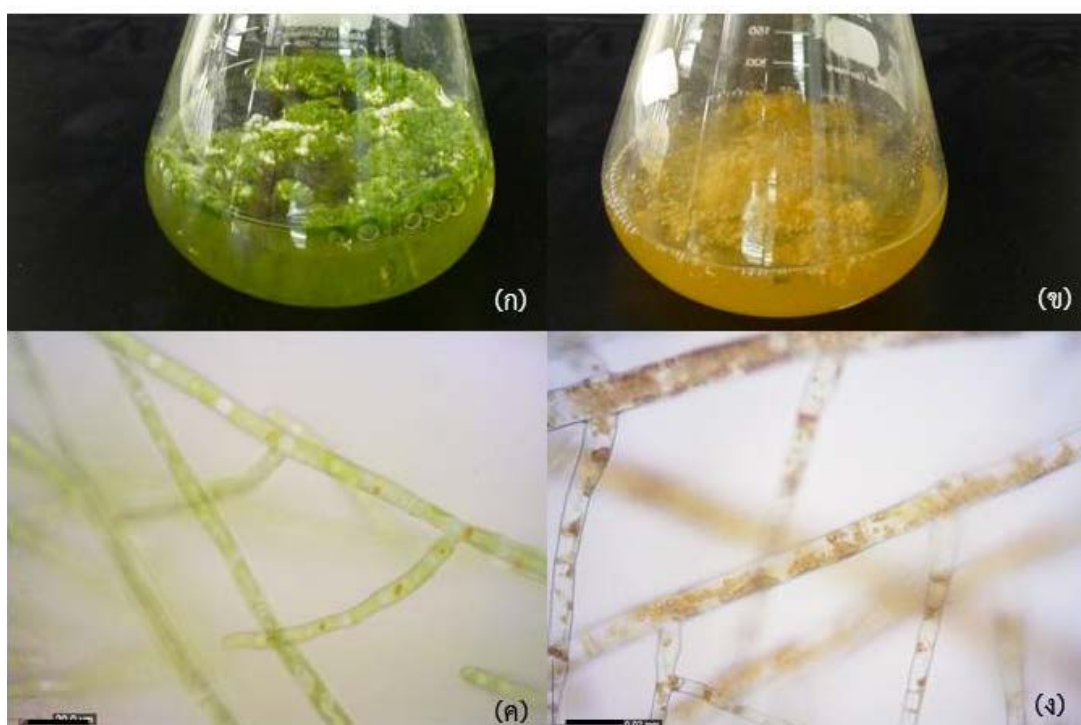
นอกจากนี้ผู้วิจัยสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่น่าสนใจของสาหร่าย *Cephaleuros* กล่าวคือ เมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BBM และ Bristol เป็นระยะเวลา นานประมาณ 2 เดือน สังเกตเห็นได้ว่าสาหร่ายเริ่มมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง จากนั้นจะ ค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีส้มเห็นได้ชัดเจนในเดือนที่ 3 (รูปที่ 4-17)



รูปที่ 4-17 การเปลี่ยนแปลงสีและการเจริญของ *Cephaleuros* Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด

จากผลการทดลองในรูปที่ 4-17 จะเห็นได้ว่า สาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 มีการเปลี่ยนสีของทลัสในอาหารชนิด BBM และ Bristol ที่ชัดเจนมาก การเปลี่ยนแปลงนี้คาดว่ามีสาเหตุมาจาก องค์ประกอบของสารอาหารที่ต่างกันตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น อันได้แก่ ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ($-NH_4$ และ $-NaNO_3$) ปริมาณเกลือคลอไรด์ และ trace element ทั้งนี้เมื่อเทียบกับสาหร่ายที่เลี้ยงใน อาหารสูตร HSM ซึ่งไม่พบว่าการเปลี่ยนสีของเส้นสายเลย ผลการทดลองที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องกับผล จากการค้นคว้าข้อมูลเพิ่มเติมว่า ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่ออัตราการสังเคราะห์ด้วย แสง เนื่องจากธาตุดังกล่าวเป็นองค์ประกอบภายในคลอโรฟิลล์ ดังนั้นเมื่อสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วย แสงต้องเผชิญกับสถานะที่มีการขาดไนโตรเจน หรือมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะส่งผลให้สิ่งมีชีวิต ดังกล่าวไม่สามารถสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ตามไปด้วย ซึ่งย่อมส่งผลโดยตรงต่อปริมาณรงควัตถุของ เซลล์กล่าวคือ ทำให้สาหร่ายมีสีที่เปลี่ยนไปโดยมีสีเขียวอ่อนลง จึงทำให้มองเห็นสีโทนเหลืองส้มของ แคโรทีนอยด์แทน (Hammond and Glatz, 1988) และสถานะนี้เองที่ทำให้ประสิทธิภาพการ สังเคราะห์ด้วยแสงลดน้อยลงไปด้วย (Arumugam et al., 2013) จากหลักการดังกล่าว เป็นไปได้ว่า สาเหตุของการที่สาหร่ายเป็นเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีส้มเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BBM และ Bristol เกิดจากการที่อาหารทั้ง 2 สูตร มีแหล่งไนโตรเจนเป็นไนเตรทซึ่งยากต่อการที่สาหร่าย *Cephaleuros*

จะนำเข้ามาใช้ในการสังเคราะห์แสง อีกทั้งสภาพดังกล่าวก่อให้เกิดความเครียดที่กระตุ้นให้เซลล์มีการสะสมคาร์โบไฮเดรตจำพวกแคโรทีนอยด์ ซึ่งสังเกตได้จากการที่ทลัสของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM มีสีเป็นสีส้มอย่างชัดเจน (รูปที่ 4-18ข) โดยเมื่อนำตัวอย่างสาหร่ายที่เปลี่ยนสีมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเม็ดสีที่มีสีส้มแดงที่เรียกว่า heamatochrome จำนวนมากภายในเซลล์ของสาหร่าย (รูปที่ 4-18ง) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM พบว่าเซลล์สาหร่ายมีสีเขียว (รูปที่ 4-18ค) ปรากฏเม็ดสีดังกล่าวเลยอยู่น้อยมาก (รูปที่ 4-18ค)



รูปที่ 4-18 สีของทลัสและเส้นสายของ *Cephaleuros* Cp.1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร HSM และ BBM ก-ข) ทลัสสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM และ BBM ตามลำดับ ค-ง) เส้นสายของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM และ BBM ตามลำดับ (scale bar 20 μ m)

จากผลการทดลองเพื่อระบุทดสอบผลของอาหาร 3 สูตรต่อการสร้างมวลชีวภาพ ผู้วิจัยมีความเห็นว่า หากต้องการที่จะเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* เพื่อการสร้างมวลชีวภาพ ควรที่จะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HSM เนื่องจากเป็นสูตรอาหารที่ทำให้สาหร่ายมีการสร้างมวลชีวภาพสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 2 สูตร อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาสูงสุดเพียง 120 วันเท่านั้น ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ามวลชีวภาพที่ได้ยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยจากการสังเกตพบว่า สาหร่ายยังสามารถเจริญต่อไปได้มากกว่า 10 เดือน หากมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามเนื่องมาจากระยะเวลาของการศึกษาวิจัยที่มีอยู่อย่างจำกัด จึงไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงและเก็บมวลชีวภาพของสาหร่ายต่อไป

ได้ ดังนั้นหากมีเวลาศึกษาเพิ่มเติม ควรที่จะทำการเลี้ยงและเก็บมวลชีวภาพต่อไปจนกระทั่งสาหร่ายให้มวลชีวภาพที่คงที่

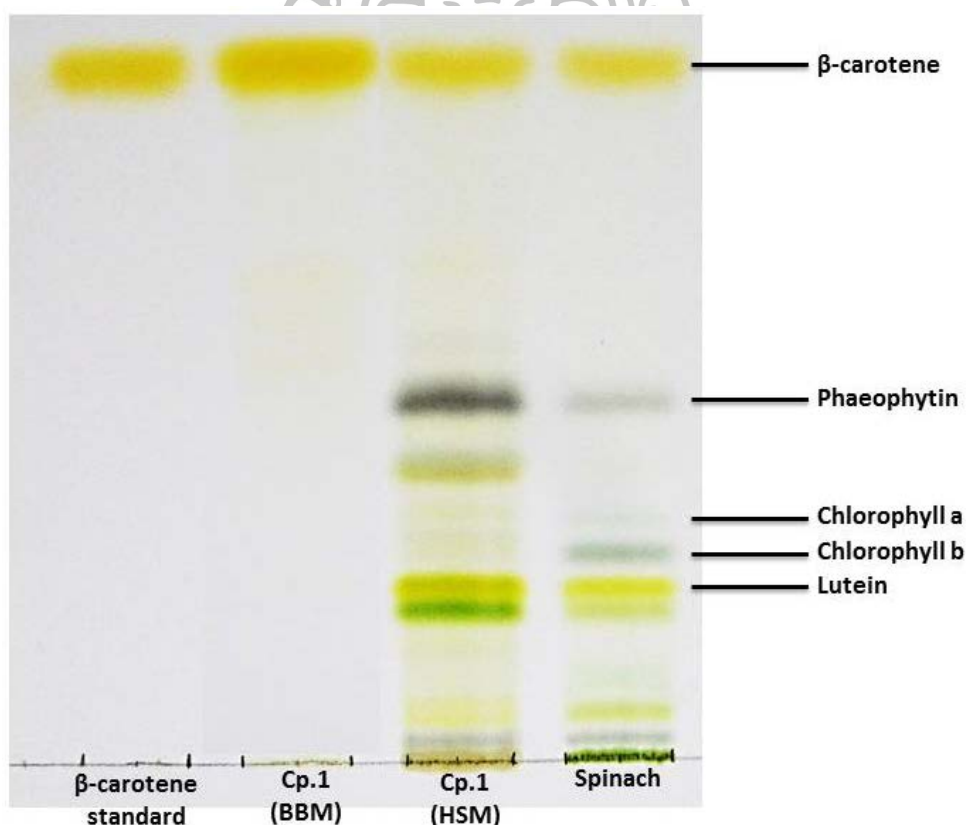
นอกจากนี้ยังมีข้อสังเกตอีกประการที่น่าสนใจคือ พบงานวิจัยหลายแห่งที่ได้มีการรายงานไว้ว่า สาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* มีความสามารถในการสร้างสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ชนิด β -carotene อย่างโดดเด่น (Thompson and Wujek, 1997, Brooks, 2004) หากแต่รายงานดังกล่าวไม่ได้กล่าวถึงการเปลี่ยนสีที่ลึกลับของสาหร่ายแต่อย่างใด จากการทดลองนี้ทำให้ได้รับข้อมูลเพิ่มเติมว่า หากต้องการที่จะกระตุ้นให้สาหร่าย *Cephaleuros* สร้างแคโรทีนอยด์มากขึ้น ควรที่จะเลี้ยงในอาหารสูตร BBM หรือ Bristol ในขณะที่อาหารสูตร HSM เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อการสร้างมวลชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM และ Bristol จะทำให้สาหร่ายมีการสร้างแคโรทีนอยด์ในปริมาณที่มากขึ้น แต่กลับพบว่าสูตรอาหารดังกล่าวทำให้สาหร่ายสร้างมวลชีวภาพได้น้อยมาก อาจเป็นผลมาจากการที่สาหร่ายมีความเครียดจากสารประกอบภายในสูตรอาหาร อันได้แก่ ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ความเค็มเกลือ เป็นต้น จึงทำให้ใช้พลังงานเพื่อการสะสมสารกลุ่มแคโรทีนอยด์แทนการเพิ่มมวลชีวภาพ (Darley et al., 1981) ดังนั้นหากเป็นไปได้ ผู้วิจัยมีความเห็นว่า ควรที่จะทำการศึกษาปัจจัยหลักที่ทำให้สาหร่ายมีการสะสมแคโรทีนอยด์ โดยที่ไม่ส่งผลในด้านลบกับการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่าย หรือ อาจจะใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-steps cultivation) กล่าวคือ ระยะเวลาแรกเลี้ยงสาหร่ายใน HSM เพื่อให้สาหร่ายสร้างมวลชีวภาพให้เพียงพอก่อน แล้วจึงย้ายสาหร่ายไปเพาะเลี้ยงเพื่อกระตุ้นการสร้างแคโรทีนอยด์ในอาหารชนิดที่มีการลดไนโตรเจน เช่น BBM หรือ Bristol ภายหลัง เช่น งานวิจัยของ Vidhyavathi และคณะ (2008) ที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* และพบว่าสาหร่ายสามารถให้ปริมาณของแคโรทีนอยด์มากกว่าการเลี้ยงในสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ เป็นต้น



3 การศึกษาชนิดและปริมาณของรงควัตถุที่สะสมในสาหร่าย *Cephaleuros*

3.1.การศึกษาชนิดของรงควัตถุในสาหร่าย *Cephaleuros* ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography

สืบเนื่องจากการสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงสีของเส้นสายสาหร่าย *Cephaleuros* ที่เลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด ในการทดลองในหัวข้อ 2.3 ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ชนิดรงควัตถุที่ได้จากสาหร่าย *Cephaleuros* สายพันธุ์ Cp.1 อายุประมาณ 120 วัน ที่เลี้ยงในอาหาร HSM ซึ่งมีเส้นสายสีเขียวเปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดเดียวกันที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM แต่พบว่าเส้นสายมีสีส้ม โดยการสกัดสารสีจากสาหร่ายที่ทำให้แห้งแล้วด้วยเมทานอล ตามวิธีการของ Grung และคณะ (1992) และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยมีสารมาตรฐาน β -carotene และสารสกัดจากใบผักโขม (spinach) มาใช้ร่วมเปรียบเทียบ



รูปที่ 4-19 รงควัตถุที่พบในสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ TLC โดยเลขที่ 1 : สารมาตรฐาน β -carotene เลขที่ 2-3: สารสกัดสาหร่าย *Cephaleuros* ตัวอย่าง Cp.1 ที่เลี้ยงในอาหาร BBM และ HSM ตามลำดับ และเลขที่ 4: สารสกัดจากใบผักโขม

ผลการศึกษาชนิดรงควัตถุที่พบในสาหร่าย *Cephaleuros* ตัวอย่าง Cp.1 ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ TLC (รูปที่ 4-19) โดยเปรียบเทียบค่า R_f กับสารมาตรฐาน β -carotene และรูปแบบของรงควัตถุจากสารสกัดใบผักโขม (Quach et al., 2004) จากการทดลองพบว่า สารสกัด

จากสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 ที่เลี้ยงจากทั้งสองสูตรอาหารมีองค์ประกอบของรงควัตถุต่างกันอย่างชัดเจน โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ประกอบด้วยรงควัตถุชนิดย่อยทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ lutein, chlorophyll a, chlorophyll b, pheophytin และ β -carotene คล้ายกับสารสกัดของผักโขม ในขณะที่สารสกัดสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM พบรงควัตถุเพียงชนิดเดียวคือ β -carotene

จากผลการทดลองข้างต้นผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่า ชนิดของสูตรอาหารมีผลต่อการสะสมของรงควัตถุโดยเฉพาะ β -carotene ดังจะเห็นได้จากการที่ไม่พบรงควัตถุชนิดอื่นในสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM (รูปที่ 4-19, เลนที่ 2) ซึ่งแตกต่างจากรงควัตถุที่พบในสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM (รูปที่ 4-19, เลนที่ 3) ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ชนิดด้วยการใช้เทคนิค TLC เป็นการศึกษาถึงชนิดของรงควัตถุที่พบเบื้องต้นเท่านั้นและยังไม่ละเอียดมากพอ ดังนั้นเพื่อให้ผลการทดลองมีความชัดเจนและน่าเชื่อถือผู้วิจัยจึงทำการทดลองซ้ำและตรวจวัดปริมาณของ β -carotene ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง (high performance liquid chromatography) โดยมีรายละเอียดดังแสดงในหัวข้อถัดไป (การทดลองที่ 3.1.2)

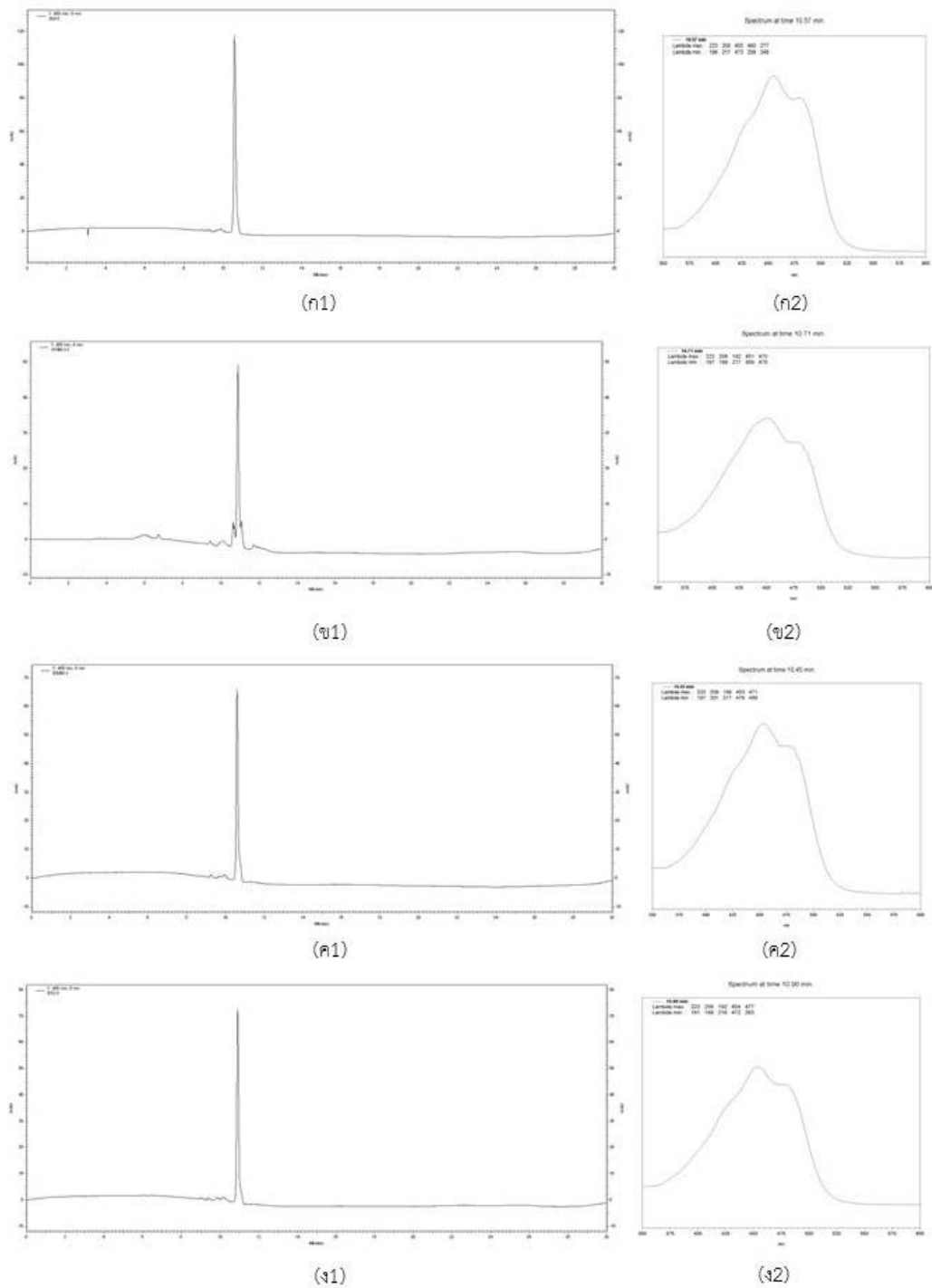
3.2 การศึกษาชนิดและปริมาณของรงควัตถุในสาหร่าย *Cephaleuros* ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง

เนื่องจากผลที่ได้จากการศึกษาชนิดของรงควัตถุเบื้องต้นด้วยวิธี TLC ตามการทดลองที่ 3.1 ทำให้ทราบชนิดของรงควัตถุที่พบในสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Cephaleuros* ตัวอย่าง Cp.1 เพียงคร่าวๆ เท่านั้น เทคนิคดังกล่าวไม่สามารถระบุถึงปริมาณของ β -carotene ที่สะสมอยู่ในเซลล์ได้ ผู้วิจัยจึงนำสารสกัดจากสาหร่าย *Cephaleuros* ตัวอย่าง Cp.1 ที่เลี้ยงในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ HSM BBM และ Bristol จากการทดลองในข้อ 2.3 ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของรงควัตถุที่สะสมในสาหร่ายด้วยเครื่อง HPLC เพิ่มเติม โดยเปรียบเทียบค่า retention time และพื้นที่ใต้กราฟระหว่างสารสกัดจากสาหร่ายกับสารตัวอย่างสารมาตรฐาน β -carotene

ผลการวิเคราะห์สารสกัดสาหร่าย *Cephaleuros* ที่เลี้ยงในอาหารต่างชนิดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β -carotene ที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ β -carotene ดูดกลืนได้สูงสุด พบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 3 สูตร ให้รูปแบบโครมาโตแกรมที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ ทุกตัวอย่างตรวจพบ β -carotene เป็นรงควัตถุหลัก สังเกตได้จากโครมาโตแกรมที่ปรากฏในช่วงนาที่ที่ 10 -11 ซึ่งตรงกับค่า retention time ของสารมาตรฐาน β -carotene และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะสเปกตรัมของโครมาโตแกรมดังกล่าวกับสารมาตรฐานก็พบว่ามีลักษณะเช่นเดียวกับสเปกตรัมของ β -carotene อย่างไรก็ตาม จากการพิจารณาโครมาโตแกรมด้วยการขยายภาพ (zoom) ทำให้พบพีคขนาดเล็กอื่นๆ ในตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ซึ่งคาดว่าเป็นพีคของคลอโรฟิลล์รงควัตถุชนิดอื่นที่ไม่สามารถระบุได้ สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC (รูปที่ 4-19) แต่เนื่องจากในสารสกัดดังกล่าวมีปริมาณ β -carotene ที่สูงอย่างโดดเด่น จึงทำให้โปรแกรมการวิเคราะห์ทำการปรับระดับความสูงของพีคตามอัตราส่วนของ

ปริมาณสารที่พบมากที่สุด (auto scale) ส่งผลให้ไม่สามารถมองเห็นพีคขนาดเล็กในรูปที่ 4-20ข1 ซึ่งการระบุชนิดของรงควัตถุเหล่านี้จำเป็นต้องทำการเทียบกับสารมาตรฐานด้วยระบบ/วิธีการวิเคราะห์และเครื่องมือชิ้นเดียวกัน

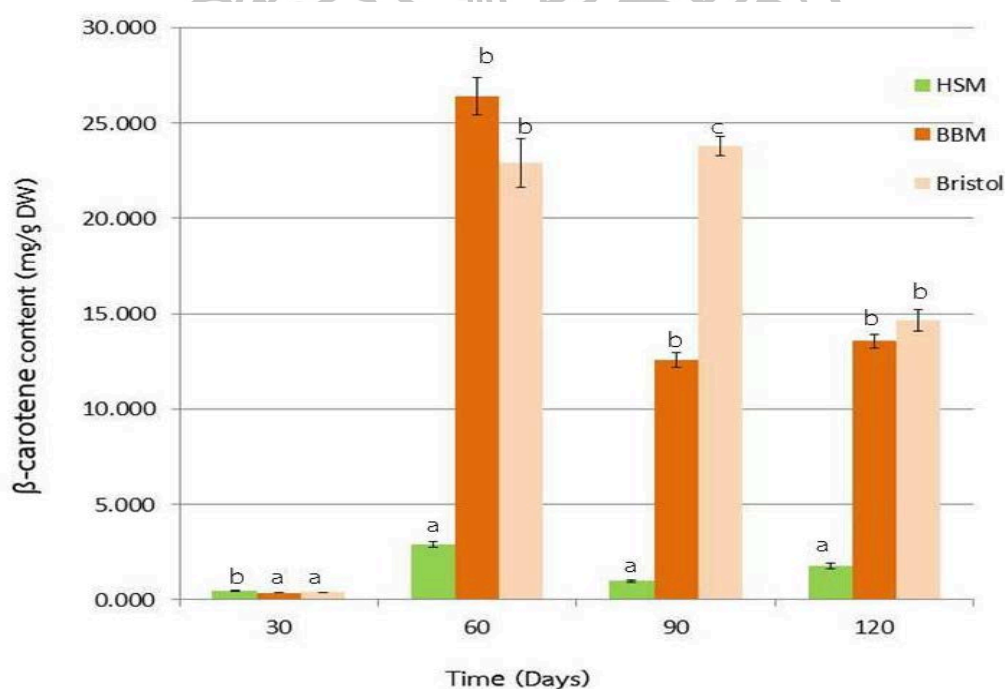




รูปที่ 4-20 โครมาโตแกรมและสเปกตรัมของสารสกัดจากสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด

ก1-2) โครมาโตแกรมและสเปกตรัมของสารมาตรฐาน β -carotene; ข1-2) โครมาโตแกรมและสเปกตรัมของสารสกัดจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM; ค1-2) โครมาโตแกรมและสเปกตรัมของสารสกัดจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM; ง1-2) โครมาโตแกรมและสเปกตรัมของสารสกัดจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร Bristol เมื่อเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 120 วัน

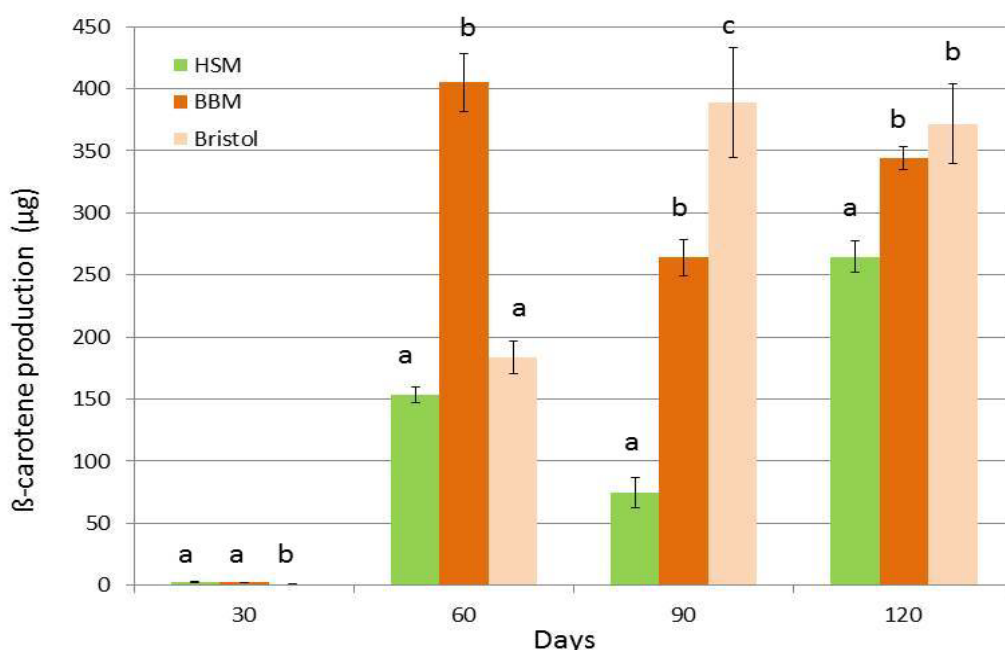
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการสะสม β -carotene จากพื้นที่ใต้กราฟของ *Cephaleuros* Cp.1 พบว่า สาหร่ายมีการสะสม β -carotene เพิ่มขึ้นในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลการวิเคราะห์ปริมาณของ β -carotene ที่สะสมภายในเซลล์ (β -carotene content) ที่ระยะเวลา 30 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ดังข้อมูลที่แสดงในกราฟแท่งในรูปที่ 4-21 สาหร่าย *Cephaleuros* ตัวอย่าง Cp.1 ที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BBM และ Bristol มีปริมาณ β -carotene สะสมภายในเซลล์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ค่า β -carotene content ที่วัดได้จากตัวอย่างที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM นั้นมีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ข้อมูลดังกล่าวแตกต่างจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 (60 วัน) ที่พบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM และ Bristol กลับมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ β -carotene content มากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ถึง 10 เท่า คือ 26.40 และ 22.91 mg/gDW ซึ่งค่าดังกล่าวแตกต่างจากการเก็บตัวอย่างครั้งแรกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และคงปรากฏผลในทำนองเดียวกันนี้ในการเก็บตัวอย่างอีก 2 ครั้งต่อมา (90 และ 120 วัน) โดยปริมาณ β -carotene content สูงสุดพบในตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน ส่วนในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 90 วัน พบว่า ตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM และ BBM มีปริมาณค่า β -carotene content ลดลงเล็กน้อย หากแต่ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 60 วัน ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร Bristol ยังตรวจพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของปริมาณ β -carotene content อย่างต่อเนื่องและสูงสุดที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 90 วัน ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ β -carotene content ของสารสกัดสาหร่ายแสดงในรูปที่ 4-21



รูปที่ 4-21 β -carotene content ของ *Cephaleuros* Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด

*หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง ($p < 0.05$, $n = 3$, S.D. $\leq 8\%$)

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการผลิต β -carotene (β -carotene production) ซึ่งหมายถึง ปริมาณ β -carotene ทั้งหมดเมื่อคำนวณจากมวลชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros* ตัวอย่าง Cp.1 ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด ปริมาตร 100 ml พบว่า อาหารแต่ละชนิดส่งผลต่อความสามารถในการผลิต β -carotene ของสาหร่ายทั้งในเรื่องของปริมาณ β -carotene และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต โดยอาหารสูตร BBM ส่งผลให้สาหร่ายมีความสามารถในการผลิต β -carotene ในปริมาณสูงสุด เท่ากับ $404.87 \pm 23.28 \mu\text{g}$ ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM มีค่า $388.65 \pm 44.16 \mu\text{g}$ ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 90 วัน และสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM มีค่า $344.01 \pm 9.05 \mu\text{g}$ ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 120 วัน (รูปที่ 4-22)



รูปที่ 4-22 β -carotene production ของ *Cephaleuros* Cp.1 ในอาหาร 3 ชนิด
 หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวกึ่งที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบในระยะเวลาเพาะเลี้ยงเดียวกัน

จากผลการทดลองผู้วิจัยสังเกตพบว่า ถึงแม้สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM จะมีปริมาณมวลชีวภาพมากกว่าอาหารชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลับตรวจพบว่ามี β -carotene content สูงสุดเพียง 2.890 mg/gDW ซึ่งน้อยกว่าค่าที่ตรวจวัดได้จากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM และ Bristol ที่พบการสะสมของรงควัตถุนี้ภายในเซลล์มากถึง 26.405 mg/gDW และ 23.795 mg/gDW ซึ่งคิดเป็น 9 เท่าและ 8 เท่า ตามลำดับ เมื่อพิจารณามวลชีวภาพและ β -carotene content ร่วมกัน ในรูปของค่าความสามารถในการผลิต β -carotene หรือค่า β -carotene production จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM Bristol และ HSM มีค่า β -carotene production ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 404.87 , 388.65 และ $344.01 \mu\text{g}$ ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 90 และ 120 วัน ตามลำดับ ซึ่งกล่าวได้ว่า ปริมาณของ β -carotene ที่ได้ใน

อาหารทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ หากแต่เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงอาหารสูตร BBM ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพียง 60 วัน รองลงมาคือ Bristol ที่ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 90 วัน ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ที่ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานถึง 120 วัน (4 เดือน) เพื่อที่จะได้ปริมาณของ β -carotene production ที่ไม่แตกต่างกับอาหารทั้ง 2 สูตร อย่างไรก็ตามผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่า หากมีเวลาในการศึกษาเพิ่มเติม ก็ควรที่จะทำการศึกษาและเก็บตัวอย่างต่อไปถึง 180-210 วัน (6-7เดือน) เพื่อต้องการที่จะทราบถึงความสามารถในการผลิต β -carotene ของสาหร่ายในระยะยาว เนื่องจากการสังเกตและการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่าสาหร่าย *Cephaleuros* สามารถมีชีวิตและเจริญอยู่ได้นานถึง 7-8 เดือน หากมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงเพิ่ม

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาในหัวข้อ 3.1 ผู้วิจัยมีความเห็นว่าหากต้องการที่จะใช้ประโยชน์จากสาหร่าย *Cephaleuros* ในแง่ของการผลิต β -carotene ควรที่จะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร HSM ก่อนเนื่องจากอาหารสูตรนี้ช่วยเพิ่มมวลชีวภาพสาหร่ายได้ดี และเมื่อได้มวลชีวภาพได้มากพอจึงย้ายสาหร่ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร BBM หรือ Bristol เพื่อกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสร้างและสะสม β -carotene ด้วยวิธีการนี้น่าจะทำให้ได้ปริมาณของ β -carotene สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิต β -carotene ของสาหร่าย *Cephaleuros* ที่ได้จากผลการวิจัยครั้งนี้กับสาหร่ายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการผลิต β -carotene ได้แก่ สาหร่ายน้ำเค็ม *D. salina* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้สามารถสะสม β -carotene ได้มากถึง 14% ของน้ำหนักแห้ง (Borowitzka et al., 1984, Aasen et al., 1969) และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ β -carotene content ที่ได้สูงสุดจากสาหร่าย *Cephaleuros* ในงานวิจัยครั้งนี้จากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน พบว่ามีปริมาณ β -carotene สะสมอยู่เท่ากับ 2.63% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งยังน้อยกว่าสาหร่าย *D. salina* ถึง 5 เท่า อีกทั้งยังพบว่าสาหร่าย *D. salina* ยังใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่น้อยกว่าอีกด้วย

ถึงแม้ผลการทดลองครั้งนี้จะพบว่า สาหร่าย *Cephaleuros* มีความสามารถในการผลิต β -carotene ได้น้อยกว่าสาหร่าย *D. salina* ถึง 5 เท่า ผู้วิจัยเห็นว่าหากมีการศึกษาต่อไปเพื่อพัฒนาและปรับปรุงระบบการเลี้ยง รวมไปถึงปัจจัยที่กระตุ้นให้สาหร่าย *Cephaleuros* เจริญเติบโตได้ดีขึ้นและสะสม β -carotene ในปริมาณที่มากขึ้น ก็อาจเป็นไปได้ที่สาหร่าย *Cephaleuros* จะสามารถสะสมรงควัตถุได้ปริมาณมากขึ้น และเป็นทางเลือกใหม่ของการนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากข้อดีของสาหร่ายชนิดนี้ที่โดดเด่นคือ เจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน ราคาไม่แพง อีกทั้งการเพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวสาหร่ายทำได้ง่าย รวมไปถึงการกระตุ้นให้มีการสะสม β -carotene ได้โดยใช้การเปลี่ยนชนิดของอาหารเท่านั้น ซึ่งข้อดีที่กล่าวมาล้วนแต่ส่งผลให้ลดต้นทุนการผลิตไปได้มาก ในขณะที่สาหร่าย *D. salina* นั้นเป็นสาหร่ายที่จะจำเป็นต้องมีการกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสม β -carotene ในสถานะที่เค็มจัด (3-31% NaCl) ส่วนมากจึงต้องเพาะเลี้ยงในบริเวณที่ติดทะเล อีกทั้งยังเป็นสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งทำให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตจำเป็นต้องใช้ต้นทุนสูง (Pick, 2002) จึงเป็นข้อจำกัดที่สำคัญ ผู้วิจัยจึงเห็นว่าหากในอนาคตต้องการที่จะศึกษาต่อถึงวิธีการเพาะเลี้ยงที่จะกระตุ้น

ให้สาหร่าย *Cephaleuros* มีความสามารถในการผลิต β -carotene ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นกว่าเดิม ก็ควรที่จะศึกษาถึงสาเหตุของสิ่งเร้าที่ชัดเจนที่มีผลในการกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสร้างและสะสม β -carotene ในปริมาณที่มากขึ้น ในการนี้ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบและทำการทดลองถึงผลของแหล่งไนโตรเจน กลีโกลไรต์ และ trace element ต่อการเปลี่ยนและสะสมสารสีของสาหร่าย *Cephaleuros* ในการทดลองถัดไป

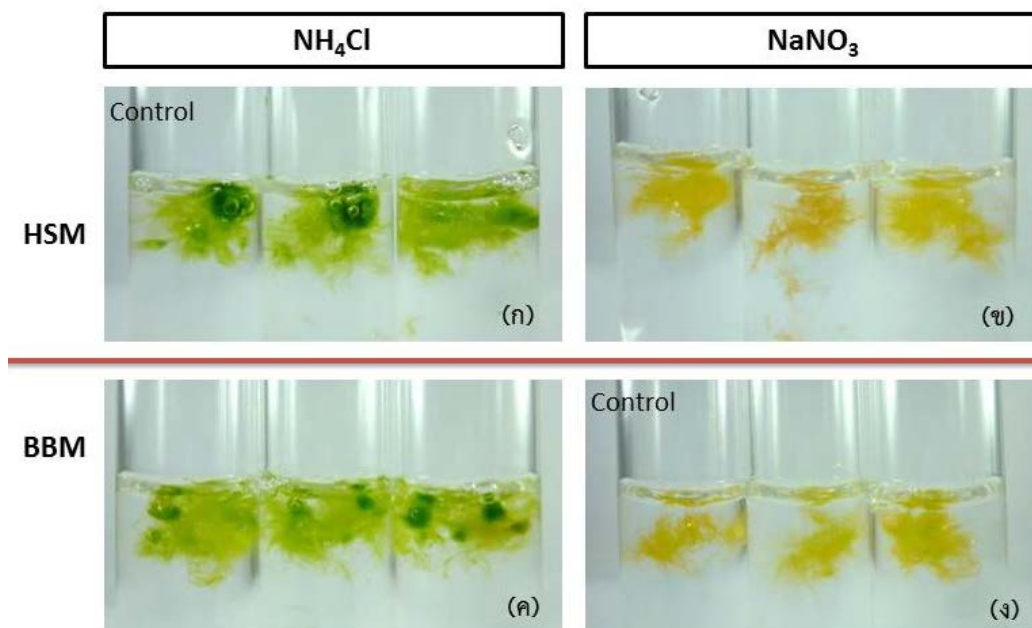
4. ผลของแหล่งไนโตรเจน กลีโกลไรต์ และ trace element ต่อการสะสมรงควัตถุของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1

จากการวิเคราะห์สูตรอาหาร HSM BBM และ Bristol พบว่า มีข้อแตกต่างกัน 3 ประการ คือ ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ปริมาณกลีโกลไรต์ และองค์ประกอบของ trace element ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 ในอาหารที่มีการดัดแปลงโดยมีจุดประสงค์เพื่อที่จะระบุผลของปัจจัยทั้ง 3 ชนิดที่มีต่อการสะสม β -carotene โดยให้อาหารสูตร BBM เป็นตัวแทนของอาหารสูตร Bristol เนื่องจากอาหารทั้ง 2 สูตรนี้มีแหล่งไนโตรเจน กลีโกลไรต์ และ trace element ที่เหมือนกัน

4.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสะสมรงควัตถุ

เนื่องจากแหล่งของไนโตรเจนของอาหารสูตร HSM คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ในขณะที่ BBM (และ Bristol) นั้นมีแหล่งไนโตรเจนที่ต่างไปเป็นโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) ดังนั้นเพื่อที่จะทดสอบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสะสมรงควัตถุ ผู้วิจัยจึงทำการสลับแหล่งของไนโตรเจนในสูตรอาหารของ HSM และ BBM ผลการทดลองเป็นเวลา 60 วันปรากฏดังรูปที่ 4-23

ผลทดลองพบว่า อาหารสูตร HSM ที่มีการเปลี่ยนแหล่งของไนโตรเจนจาก NH_4Cl เป็น NaNO_3 ทำให้เส้นสายของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 เปลี่ยนสีจากสีเขียว (รูปที่ 4-23ก) ไปเป็นสีเหลือง (รูปที่ 4-23ข) ขณะเดียวกันสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM ที่มีการเปลี่ยนแหล่งของไนโตรเจนจาก NaNO_3 เป็น NH_4Cl พบว่าเส้นสายของสาหร่ายมีการเปลี่ยนสีจากสีเหลือง (รูปที่ 4-23ค) ไปเป็นสีเขียว (รูปที่ 4-23ง) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ชนิดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสะสม β -carotene ในสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 อย่างชัดเจน กล่าวคือ สารประกอบ NaNO_3 นั้นกระตุ้นให้เกิดการสะสม β -carotene มากขึ้นภายในเส้นสายของสาหร่าย ผลดังกล่าวยืนยันได้ด้วยสีที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจาก NaNO_3 เป็น NH_4Cl ในอาหารสูตร BBM ที่พบว่า จากสาหร่ายที่เริ่มต้นเพาะเลี้ยงจากเดิมมีเส้นสายสีเหลือง (รูปที่ 4-23ง) กลับมีเส้นสายที่เปลี่ยนเป็นสีเขียวและยังสามารถเจริญเติบโตมากขึ้น (รูปที่ 4-23ค)



รูปที่ 4-23 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน

ก) อาหารสูตร HSM ปกติซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control)

ข) อาหารสูตร HSM ที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งไนโตรเจนเป็น NaNO_3

ค) อาหารสูตร BBM ที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งไนโตรเจนเป็น NH_4Cl

ง) อาหารสูตร BBM ปกติซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control)

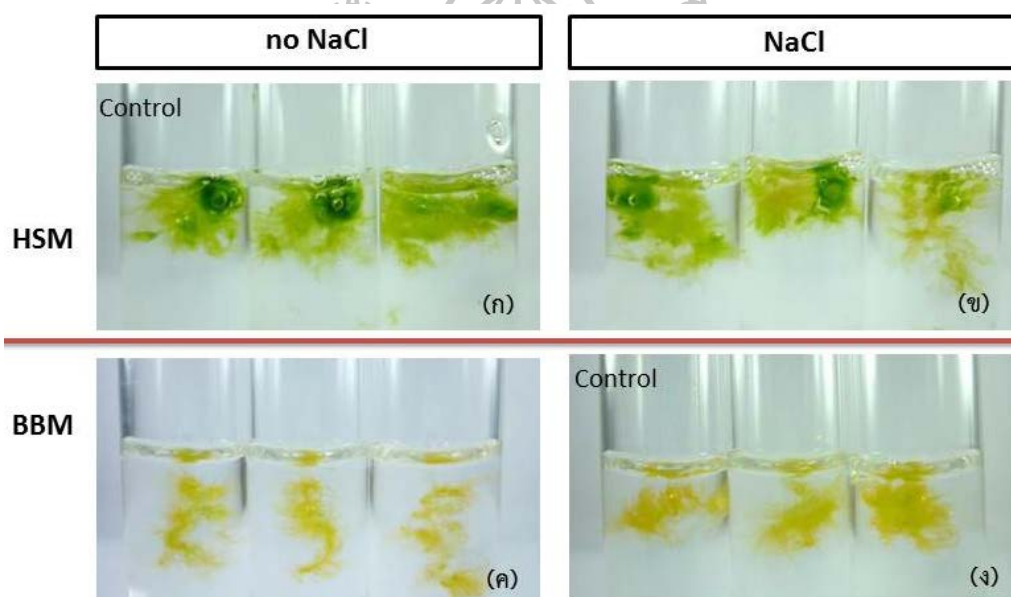
จากการค้นคว้าพบว่า สาหร่ายมีความสามารถในการผลิตสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์มักถูกนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตตรงควัตถุ (Guedes et al., 2011) เช่น สาหร่าย *D. salina* ที่นำมาใช้ในการผลิตสารสีกลุ่ม β -carotene (Dipak and Lele, 2005) *Muriellopsis* sp. ที่นำมาใช้ในการผลิตสารสีกลุ่ม lutein (Del Campo et al., 2000) หรือสาหร่ายที่สร้างสารสีกลุ่ม แอสตาแซนธิน (astaxanthin) ที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพและมีมูลค่าสูง นั่นคือสาหร่าย *H. pluvialis* (Guerin et al., 2003) ในกระบวนการผลิตจำเป็นที่จะต้องทำการกระตุ้นให้สาหร่ายเกิดความเครียดเพื่อทำให้สาหร่ายผลิตตรงควัตถุมากขึ้นกว่าปกติ มีการวิจัยมากมายในสาหร่ายเหล่านั้นเพื่อศึกษาถึงปัจจัยแวดล้อมหลากหลายประการในการเพาะเลี้ยงที่สามารถกระตุ้นการสะสมสารสี โดยปัจจัยที่ได้รับการศึกษาและกล่าวถึงมากได้แก่ ความเค็ม (Borowitzka et al., 1990) อุณหภูมิ (Garbayo et al., 2008) แสง (Haghjou and Shariati, 2007) รวมไปถึงชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายโดยตรง เห็นได้จากรายงานของ Li และคณะ (1998) พบว่า การให้ไนเตรทเป็นแหล่งของไนโตรเจน (KNO_3) ร่วมกับการลดปริมาณของไนโตรเจน หรือการให้สภาวะที่มีแหล่งของไนโตรเจนอย่างจำกัดในสาหร่าย *D. salina* ส่งผลต่อการสะสมรงควัตถุของสาหร่ายให้มีการสร้างและสะสม β -carotene ได้มากกว่าสภาวะปกติ (Dipak and Lele, 2005) ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่ายจะมีความสามารถในการดูดซับ (assimilation) สารประกอบไนโตรเจนแต่ละชนิดเพื่อนำเข้ามาใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหาร (metabolism) ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปพบว่าสาหร่ายจะสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียได้ดีกว่ายูเรีย ไนเตรท ไนไตรท์ ตามลำดับ (Zhu et al., 2013) ดังนั้นในงานวิจัยส่วนนี้ผู้วิจัยคาดว่า การที่สาหร่ายอยู่ในอาหารที่มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นชนิดไนเตรต ทำให้สาหร่ายดูดซึมและนำไนโตรเจนไปใช้ได้ยากกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดแอมโมเนีย ทำให้เกิดสภาวะความเครียด สาหร่ายจึงตอบสนองด้วยการการสะสมรงควัตถุในปริมาณที่มากขึ้น ดังเช่นงานวิจัยที่พบว่าการใช้ไนเตรทและยูเรียเป็นแหล่งของไนโตรเจนสามารถให้ปริมาณของ β -carotene ที่สะสมภายในเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* ในปริมาณที่มากกว่าการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Herrero et al., 1991) อีกทั้งการลดปริมาณของไนเตรต (NaNO_3) หรือการที่มีแหล่งไนโตรเจนอยู่อย่างจำกัด มีผลทำให้สาหร่าย *D. salina* มีการสะสมรงควัตถุที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะ β -carotene (Muthukannan et al., 2010) เช่นเดียวกับกับสาหร่าย *H. pluvialis* ที่มีความสามารถในการผลิต astaxanthin (astaxanthin production) เพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณของไนเตรทที่ลดลง (Wang et al., 2013) นอกจากสาหร่ายชนิดนี้แล้วยังพบว่ามีสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นที่ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการสะสมรงควัตถุ อาทิ สาหร่าย *Muriellopsis* sp. ที่สามารถสร้างสารสีกลุ่ม lutein ในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไนเตรท (NaNO_3) ร่วมกับการลดความเข้มข้นของไนโตรเจน (Del Campo et al., 2000)

อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยมีความเห็นว่า เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดจะเกิดความเครียดเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าที่แตกต่างกัน (Guedes et al., 2011) รวมไปถึงชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ซึ่งผลที่เกิดตามมาของการเกิดความเครียดก็คือการที่สาหร่ายจะมีผลผลิตของมวลชีวภาพที่ลดลง ดังนั้นหากต้องการที่จะศึกษาถึงวิธีการที่จะกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมรงควัตถุในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ก็ควรจะศึกษาถึงผลกระทบที่มีต่อการผลิตมวลชีวภาพไปพร้อมกันด้วย เพื่อให้ได้ผลผลิตของ β -carotene สูงสุด ซึ่งเป็นไปได้ว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ อาจจะส่งผลต่อมวลชีวภาพและการสะสมสารสีของของสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 ในระดับที่แตกต่างไป

4.2 ผลของเกลือคลอไรด์ต่อการสะสมควัตถุ

นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้ว ปริมาณเกลือคลอไรด์ในอาหารทั้ง 2 สูตร มีความแตกต่างกัน โดยอาหารสูตร BBM (และ Bristol) มีการเติมเกลือคลอไรด์ (NaCl) ปริมาณ 25 mg/L ในขณะที่อาหารสูตร HSM ที่ไม่มีการเติมเกลือคลอไรด์ ซึ่งความแตกต่างที่พบเมื่อเลี้ยงเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 ด้วยอาหารทั้ง 3 สูตร คือ เส้นสายของสาหร่ายมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีส้มเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดที่มีเกลือ ดังนั้นเพื่อที่จะทดสอบผลที่แน่ชัดของการมีเกลือคลอไรด์ในอาหารต่อการสะสมควัตถุในสาหร่าย โดยการเติมเกลือคลอไรด์ในสูตรอาหารของ HSM และงดการเติมเกลือลงในอาหารสูตร BBM



รูปที่ 4-24 ผลของการเติมเกลือคลอไรด์ต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่าย *Cephaleuros* ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน

- ก) อาหารสูตร HSM ปกติซึ่งไม่มีการเติมเกลือคลอไรด์เป็นกลุ่มควบคุม (control)
- ข) อาหารสูตร HSM ที่มีเติมเกลือคลอไรด์
- ค) อาหารสูตร BBM ที่ไม่มีการเติมเกลือคลอไรด์
- ง) อาหารสูตร BBM ปกติซึ่งมีเกลือคลอไรด์เป็นกลุ่มควบคุม (control)

จากการทดลองพบว่า อาหารสูตร HSM ปกติที่ไม่มีการเติมเกลือคลอไรด์นั้นให้เส้นสายของสาหร่ายมีสีเขียว (รูปที่ 4-24ก) และเมื่อทำการทดลองเติมเกลือคลอไรด์ลงในอาหาร (ความเข้มข้นเท่ากับที่เติมในอาหาร BBM) เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า สีของเส้นสายสาหร่ายไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังจะเห็นได้จากการที่มีเส้นสายบางส่วนมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองอมเขียว (รูปที่ 4-24ข) หากแต่ไม่ชัดเจนเท่ากับสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM ปกติ เช่นเดียวกันกับการทดลองในอาหารสูตร BBM ที่สูตรปกติมีการเติมเกลือคลอไรด์ให้เส้นสายของสาหร่ายมีสีส้ม (รูปที่ 4-24ง) และเมื่อทดลองโดยการงดเติมเกลือคลอไรด์ลงในอาหาร ก็พบว่าสีของ

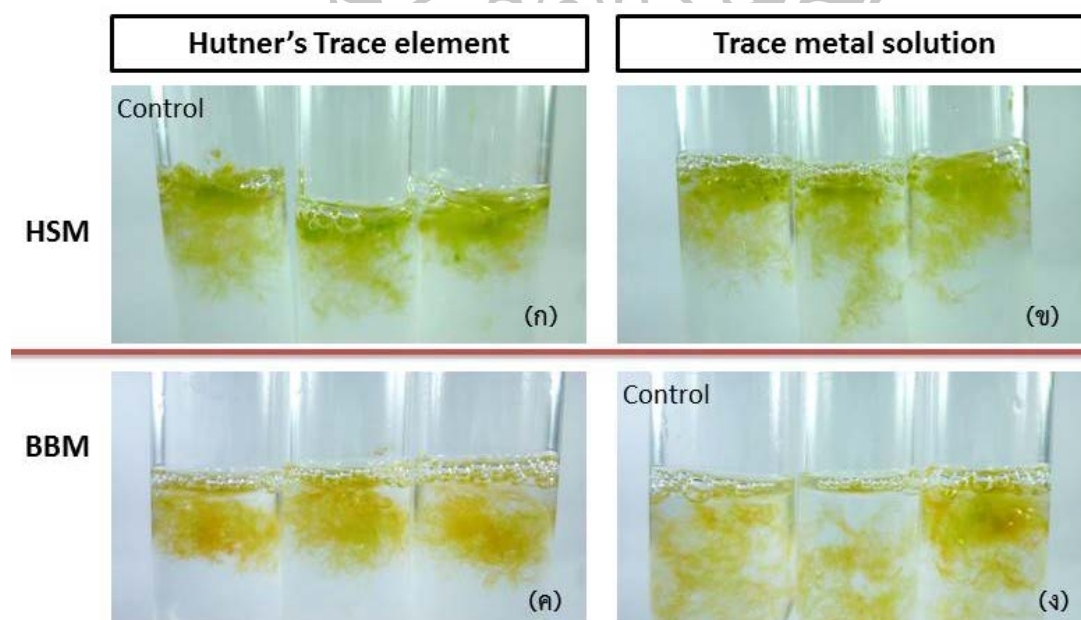
เส้นสายสาหร่ายยังคงเป็นสีส้มเช่นเดิม (รูปที่ 4-24ค) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การเติมเกลือคลอไรด์ในอาหารสูตร HSM นั้นไม่มีผลทำให้เส้นสายสาหร่าย *Cephaleuros* นั้นมีการเปลี่ยนสี และการมี/ไม่มีเกลือในอาหาร BBM ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่ายแต่อย่างใด จากการทดลองข้างต้นเมื่อสืบค้นจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า การมีเกลือคลอไรด์ (NaCl) ในอาหารเพาะเลี้ยง มีผลส่งเสริมการสะสมสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในปริมาณที่มากขึ้น อาทิ สาหร่าย *C. zofingiensis* ที่เมื่อมีการเติมเกลือคลอไรด์ 2% ลงในอาหารเพาะเลี้ยงพบว่า สามารถตรวจพบปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoids) สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรปกติ 8 เท่า (Pelah et al., 2004) สาหร่าย *D. salina* ที่มีการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเค็มสูง มีผลทำให้สาหร่ายชนิดนี้มีความสามารถในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 10% ของน้ำหนักแห้ง (Sun et al., 2015, Borowitzka et al., 1984) สาหร่าย *Muriellopsis* sp. ที่พบว่ามีสารสะสม lutein ได้ในปริมาณที่มากขึ้นเมื่อมีเกลือคลอไรด์เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน โดยช่วงความเข้มข้นของเกลือที่กระตุ้นการสะสม lutein ได้ดี คือ 2- 100 mM (Del Campo et al., 2000) และผลการทดลองดังกล่าวก็มีรายงานเช่นเดียวกันในสาหร่าย *Botryococcus braunii* (Ambati et al., 2010) ผลจากงานวิจัยที่กล่าวมาเหล่านี้ขัดแย้งกับงานวิจัยนี้ที่พบว่า การที่มีเกลือคลอไรด์เป็นส่วนประกอบในอาหารไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีเส้นสายสาหร่าย *Cephaleuros* ซึ่งเกิดจากการสะสมรงควัตถุในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามผู้วิจัยมีความเห็นว่า ความเข้มข้นเกลือที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความเข้มข้นของเกลือคลอไรด์เพียงความเข้มข้นเดียวคือ ความเข้มข้นของเกลือ 25 mg/L ที่มีในอาหารสูตร BBM ทั้งนี้ถึงแม้จะไม่ปรากฏการเปลี่ยนสีของเส้นสายสาหร่าย แต่ผู้วิจัยคาดว่าหากมีการทดลองใช้ความเข้มข้นเกลือที่มากขึ้น ก็มีความเป็นไปได้ที่สาหร่ายจะมีการสะสมแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น และแสดงการเปลี่ยนแปลงสีของเส้นสายอย่างชัดเจน



4.3 ผลของ trace element ต่อการสะสมรงควัตถุ

จากการวิเคราะห์สูตรอาหารทั้ง 3 สูตร ยังทำให้พบว่ามีอีกหนึ่งปัจจัยที่แตกต่างกันนั่นคือ ชนิดของธาตุอาหารเสริม หรือ trace element ที่ใช้ในสูตรอาหารแต่ละชนิด โดยอาหารสูตร HSM ใช้ trace element ชนิด Hutner's trace element ในขณะที่ BBM และ Bristol นั้นใช้ trace element ชนิด trace metal solution และเพื่อที่จะพิสูจน์ว่าชนิดของ trace element มีผลต่อการเปลี่ยนสีของเส้นสายสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 หรือไม่ ผู้วิจัยจึงทำการทดลองสลับชนิดของ trace element และให้อาหารสูตร BBM เป็นตัวแทนของอาหารสูตร Bristol

จากการทดลองพบว่า สีของเส้นสายสาหร่ายในอาหารสูตร HSM ที่สลับชนิดของ trace element (รูปที่ 4-25ก) ให้สีของเส้นสายสาหร่ายไม่ต่างกับสาหร่ายในอาหารสูตร HSM ปกติ (รูปที่ 4-25ข) เช่นเดียวกันกับการทดลองในอาหารสูตร BBM ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของเส้นสายสาหร่าย (รูปที่ 4-25ค) จากผลการทดลองที่กล่าวมานี้ จึงทำให้สามารถสรุปได้ว่าชนิดของแร่ธาตุอาหารนั้นไม่มีผลต่อการสะสมรงควัตถุในสาหร่าย *Cephaleuros*



รูปที่ 4-25 ผลของ trace element ต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่าย *Cephaleuros* ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 60 วัน

- ก) อาหารสูตร HSM ปกติที่ใช้ธาตุอาหารเสริมชนิด Hutner's trace element
- ข) อาหารสูตร HSM ที่ใช้ธาตุอาหารเสริมชนิด Trace metal solution
- ค) อาหารสูตร BBM ที่ใช้ธาตุอาหารเสริมชนิด Hutner's trace element
- ง) อาหารสูตร BBM ปกติที่ใช้ธาตุอาหารเสริมชนิด Trace metal solution

เมื่อสืบค้นจากงานวิจัย Lobban และ Wynne (1981) ได้กล่าวไว้ว่า trace element นั้นเป็นแหล่งของแร่ธาตุอาหารรอง (secondary macronutrients) ซึ่งได้แก่ Fe Cu Zn Mn Si Co Mo และ Br โดยให้คำนิยามไว้ว่าเป็นแร่ธาตุที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณน้อย แต่ก็มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ซึ่งแร่ธาตุบางชนิดใน trace element ยังเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการทำงานของแร่ธาตุอาหารหลักอีกด้วย (primary macronutrients) เมื่อผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์สูตรของ trace element ทั้ง 2 สูตร พบว่า ส่วนประกอบของ trace element ทั้ง 2 ชนิดมีส่วนประกอบของแร่ธาตุอาหารที่คล้ายคลึงกัน หากแต่ Hutner's trace element มีปริมาณของแร่ธาตุที่มากกว่า Trace metal solution ดังแสดงตามตารางที่ 4-6 อันได้แก่ ส่วนประกอบโลหะ (Fe และ Zn) และกรด (H_3BO_3 และ EDTA) เมื่อสืบค้นจากงานวิจัยพบว่า trace elements ที่ประกอบไปด้วยโคบอลต์ (Co^{2+}) เหล็ก (Fe^{3+}) โมลิบดีนัม (Mo^{2+}) และแมงกานีส (Mn^{2+}) ซึ่งมีความสำคัญในแง่ของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Likens, 2010)

ตารางที่ 4-7 ส่วนประกอบและปริมาณของแร่ธาตุใน trace element 2 ชนิด

ชนิดธาตุอาหาร	ความเข้มข้น (g/L)	
	Hutner's trace element	trace metals solution
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22	8.82
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5.06	1.44
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.61	0.49
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57	1.57
MoO ₃	-	0.71
EDTA disodium salt	50	-
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.10	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.99	0.0498
H ₃ BO ₃	11.4	-

อย่างไรก็ตามจากการสืบค้นงานวิจัยพบว่า Chen และคณะ (2011) ได้กล่าวไว้ว่าสาหร่าย *D. tertiolecta* จะเกิดความเครียดและมีการสะสมไขมัน (neutral lipid content) ในปริมาณที่มากขึ้นในอาหารที่ขาดไนโตรเจน ($NaNO_3$) รองลงมาก็คือ อาหารที่ขาดธาตุเหล็ก ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) และโคบอลต์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแร่ธาตุในกลุ่มธาตุอาหารเสริม ทั้งนี้ขัดแย้งกับการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่า trace element ทั้ง 2 ชนิดนั้นไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนสีของเส้นสายสาหร่าย ผู้วิจัยจึงมีความคิดเห็นว่าควรที่จะศึกษาผลของแร่ธาตุแต่ละชนิดโดยตรงด้วยการแยกชนิดของแร่ธาตุในการทดลองเพื่อที่จะได้ทราบอย่างแน่ชัดว่าแร่ธาตุชนิดใดใน trace element นั้นมีผลหรือไม่มีผลต่อสาหร่าย *Cephaleuros* เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน

จากการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า การให้ไนเตรท (NaNO_3) เป็นแหล่งของไนโตรเจน ในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 0.5 g/L จะส่งผลให้ตัวอย่างสาหร่าย *Cephaleuros* Cp.1 นั้นมีการเปลี่ยนสีของเส้นสายจากสีเขียวเป็นสีเหลืองจากการสะสมของรงควัตถุชนิด β -carotene ที่เพิ่มขึ้นดัง จะเห็นได้จากการทดลองที่ 4.3.1 อย่างไรก็ตามเนื่องจากสาหร่าย *Cephaleuros* ยังไม่เคยมีรายงาน ถึงการกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสมรงควัตถุมาก่อน ผู้วิจัยจึงมีความคิดเห็นว่าการศึกษาในครั้งนี้ยัง เป็นจุดเริ่มต้นของการค้นพบแหล่ง β -carotene แหล่งใหม่จากธรรมชาติ รวมไปถึงปัจจัยที่สามารถ กระตุ้นให้มีการสะสมรงควัตถุ β -carotene ในปริมาณที่สูงขึ้น เพื่อที่ในอนาคตจะสามารถนำสาหร่าย ชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ต่อไป ผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรที่จะทำการศึกษาถึงความสามารถของ β -carotene ในการนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมดังการทดลองต่อไป

5. การศึกษาค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของรงควัตถุด้วยวิธี DPPH assay

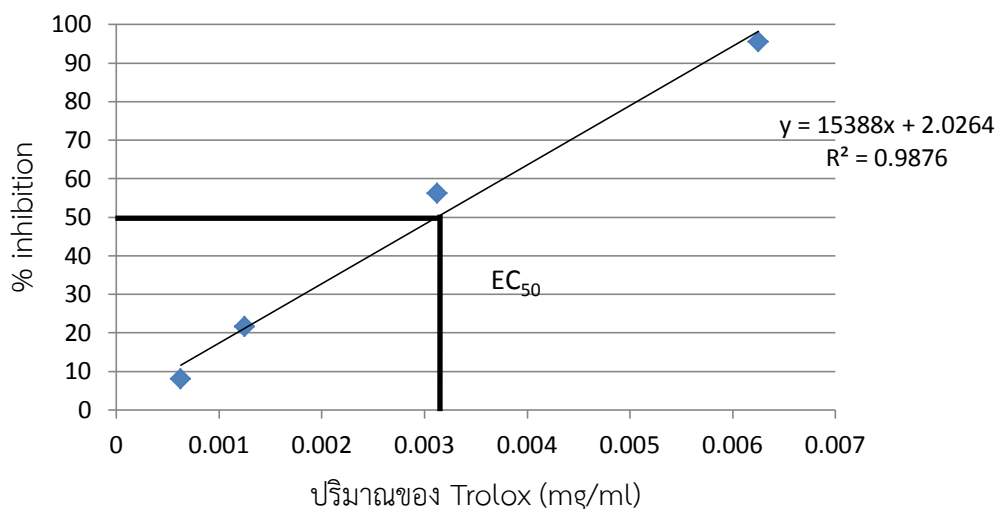
การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *Cephaleuros* sp. Cp.1 ที่เพาะเลี้ยง ในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ HSM BBM และ Bristol และทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้าน ปฏิกริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay

การทดสอบค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ทำได้โดยศึกษา spectrophotometric behavior ของ DPPH radical ซึ่งเป็นสารสี ม่วงเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่ค่าดูดกลืนแสง 515 nm การทดลองนี้จะรายงานผลเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชัน (ในสารตัวอย่าง) ที่ ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50% โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง 2 ครั้ง ที่สารละลายความ เข้มข้นต่างกัน จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยและนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเกิด ออกซิเดชัน (%inhibition) ผลการวิเคราะห์ที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4-7

ตารางที่ 4-8 ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox

Conc. Trolox (mg/ml)	Absorbance				%inhibition
	0 นาที		30 นาที		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
0.00063	0.262	0.261	0.239	0.242	8.030 \pm 1.05
0.00125	0.251	0.250	0.198	0.195	21.56 \pm 0.63
0.00313	0.242	0.230	0.107	0.102	56.14 \pm 0.52
0.00625	0.276	0.278	0.013	0.012	95.48 \pm 0.23

เมื่อนำข้อมูลจากตารางที่ 4-7 มาจัดทำกราฟเส้นตรงระหว่างเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันกับความเข้มข้นของ Trolox เพื่อหาค่า EC_{50} พบว่า ค่า %inhibition มีค่าที่สูงขึ้นเมื่อสารละลาย Trolox มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยพบว่าสารมาตรฐาน Trolox มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.00303 mg/ml ซึ่งหมายความว่า สารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 0.00303 mg/ml สามารถออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DPPH ให้มีค่าลดลง 50% ดังแสดงในรูปที่ 4-26



รูปที่ 4-26 เปอร์เซนต์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ Trolox เมื่อทดสอบด้วย DPPH assay

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *Cephaleuros* น้ำหนักแห้ง 15 mg ที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM BBM และ Bristol เป็นเวลา 60 วัน โดยนำสารสกัดมาเจือจางและนำมาวัดหา %inhibition จากการคำนวณพบว่า %inhibition ของสารสกัดสาหร่ายทั้ง 3 แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย และเมื่อนำสมการเส้นตรงของกราฟดังกล่าวมาคำนวณหาค่า EC_{50} พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรอาหาร HSM มีค่า EC_{50} เท่ากับ 2.39 ± 0.07 mg/ml ในขณะที่สารสกัดสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรอาหาร BBM และ Bristol มีค่า EC_{50} เป็น 1.44 ± 0.02 mg/ml และ 1.46 ± 0.15 mg/ml ตามลำดับ

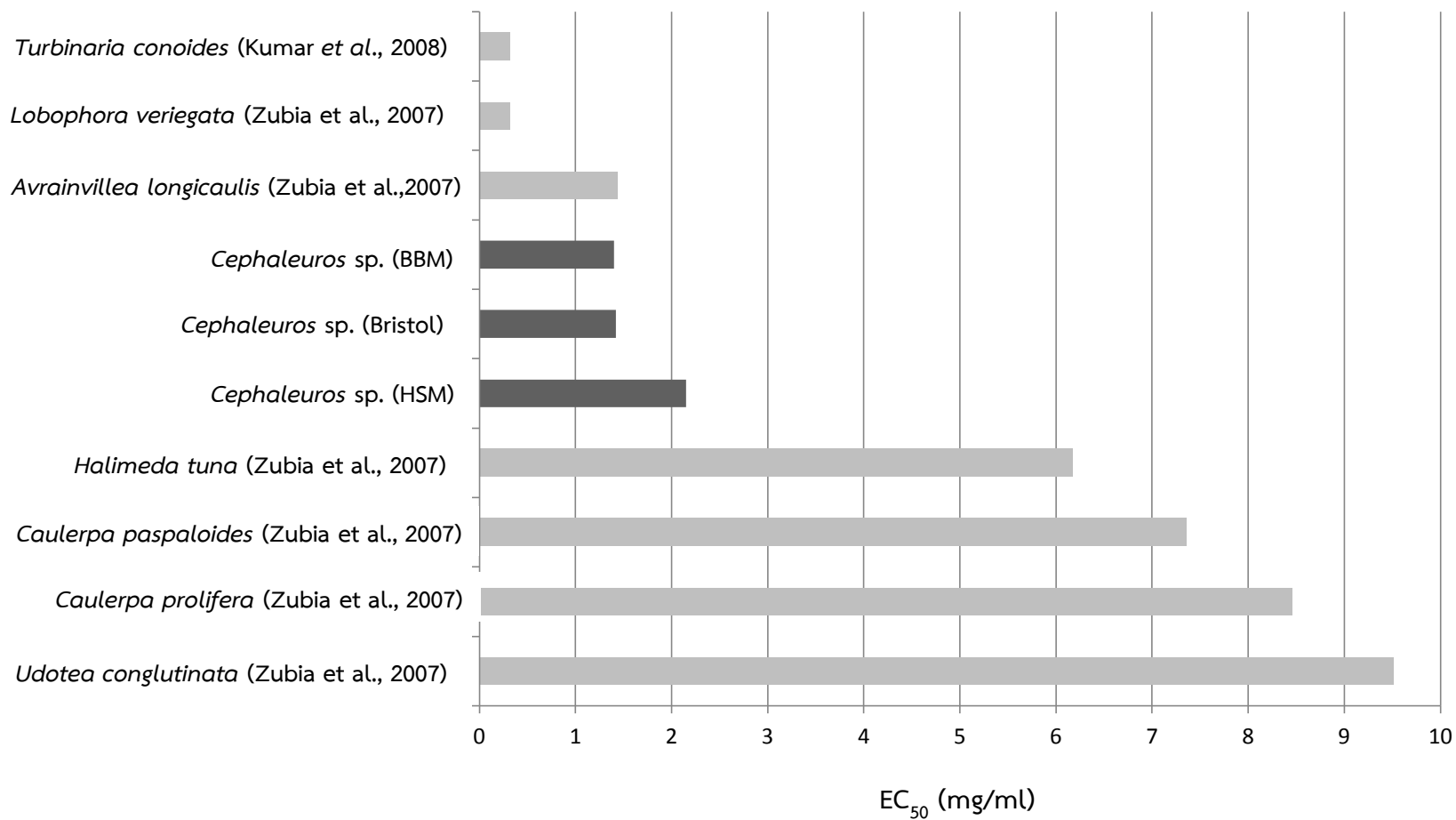
จากข้อมูลจะเห็นว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM และ Bristol นั้นมีค่า EC_{50} ที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับค่า EC_{50} ของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ที่มีค่าเท่ากับ 2.39 mg/ml จะเห็นว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM และ Bristol มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ถึง 1.5 เท่า อีกทั้งพบว่าค่า EC_{50} ที่ได้สอดคล้องกับผลปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่สะสมภายในเซลล์จากการทดลองที่ 3.2 ที่พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM และ Bristol นั้นมีปริมาณของ β -carotene content มากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ถึง 9 เท่า

ตารางที่ 4-9 ค่า EC₅₀ ของสารสกัดสาหร่ายเมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด

Algal extract	EC ₅₀ (mg)
HSM	2.12 ± 0.14 ^a
BBM	1.47 ± 0.05 ^b
Bristol	1.45 ± 0.05 ^b

n= 3

เมื่อสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่านิยมทำการศึกษาในสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลเป็นส่วนมาก ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่ายสีน้ำตาลมีสารประกอบจำพวก xanthophyll ซึ่งเป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์กลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Lee et al., 2013) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสีน้ำตาลกับสาหร่ายสีเขียว *Cephaleuros* Cp.1 ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า สาหร่าย *Cephaleuros* มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสาหร่ายสีน้ำตาลหลายชนิด เช่น สาหร่าย *Sargassum polycystum* ที่มีค่า EC₅₀ อยู่ที่ 3.62 mg/ml รวมไปถึงสาหร่ายทะเลในกลุ่ม Chlorophyta อีกหลายชนิด (Zubia et al., 2007) แต่พบว่าสาหร่าย *Cephaleuros* ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสาหร่ายทะเล *Turbinaria conoides*, *Lobophora variegata* และ *Avrainvillea longicaulis* ที่มีค่า EC₅₀ อยู่ที่ 0.29 0.32 และ 1.44 ตามลำดับ (Mishra et al., 2012, Zubia et al., 2007) ดังแสดงในรูปที่ 4-28 แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยมีความเห็นว่าวิธีการสกัด ระยะเวลาสกัด รวมไปถึงเทคนิคต่างๆ ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อชนิดและความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายเช่นกัน (Henriques et al., 2007) ดังที่ Kokabi และคณะ (2013) ได้รายงานไว้ว่าการใช้สารสกัดที่แตกต่างกันส่งผลถึงระดับความสามารถในการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระนั้นๆ ด้วย ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการสกัดสาหร่าย *Cephaleuros* Cp. 1 ด้วยเมทานอล ในขณะที่งานวิจัยอื่นใช้วิธีการสกัดที่หลากหลาย อาทิ น้ำ hexane (Hajimahmoodi et al., 2010) dichloromethanol:methanol (Zubia et al., 2007) methanol:chloroform (Zhang et al., 2007) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า อาจทำการเปรียบเทียบผลของความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เพียงคร่าวๆ เท่านั้น หากต้องการที่จะเปรียบเทียบผลดังกล่าวอย่างแม่นยำจึงควรที่จะทำการสกัดสาหร่ายด้วยวิธีการเดียวกันและทำการทดสอบพร้อมกัน



รูปที่ 4-27 ค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสาหร่ายด้วยวิธี DPPH assay

จากการทดลองข้างต้นจึงอาจสรุปได้ว่า สหาร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM และ Bristol นั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้ไฮโดรเจนอะตอมมากกว่าสหาร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM จากการทดสอบด้วย DPPH assay โดยมี β -carotene เป็นรงควัตถุหลักในปฏิกิริยา ถึงแม้การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH จะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ เนื่องจากสาร DPPH เป็นสารที่ค่อนข้างเสถียรไม่วิวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจริงภายในร่างกาย จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ส่งผลให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้บางครั้งน้อยกว่าความเป็นจริง ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าเป็นไปได้ควรทำการวิเคราะห์ความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มเติมด้วยวิธีอื่นๆ นอกเหนือจากวิธี DPPH assay (Kokabi et al., 2013, Antolovich et al., 2002) โดยวิธีการทดสอบอื่นๆ ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกับสารสกัดจากสหาร่าย เช่น วิธี ABTS assay (Shanab et al., 2011) Total antioxidant activity (Hemalatha et al., 2013) ซึ่งแต่ละวิธีที่กล่าวข้างต้นมีกลไกการทำงาน และความจำเพาะที่แตกต่างกัน อาทิ วิธี ABTS assay ที่เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันทางอ้อม โดยใช้สาร 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ด้วยการออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตแล้วจึงนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย อนุมูล $ABTS^+$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านออกซิเดชันอนุมูล $ABTS^+$ ละลายได้ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำหรือละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ หากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับ $ABTS^+$ เกิดได้ไม่สมบูรณ์ภายในช่วงเวลาที่วัด (ภายใน 6 นาที) จะทำให้ประเมินค่า TAEC ได้ต่ำกว่าที่เป็นจริง (Arts et al., 2004) ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการทดสอบให้เหมาะสมกับคุณลักษณะของตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารสกัดจากพืช สารสังเคราะห์ ยา ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความไว ถูกต้องเที่ยงตรง และแม่นยำ ในกรณีของ *Cephaleuros* Cp.1 หากเป็นไปได้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยวิธีการทดสอบอื่นๆ ที่หลากหลาย เพื่อให้ทราบกลไกในการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แท้จริง ดังที่กล่าวมาข้างต้น

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะทำการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* จากตัวอย่างพืชที่ติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่าย และศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมเพื่อการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่ายก่อโรค รวมไปถึงชนิดของอาหารที่กระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมแคโรทีนอยด์ จากการเก็บตัวอย่างในพื้นที่บางส่วนของจังหวัดนครปฐมและสมุทรสาคร สามารถตรวจพบพืชที่มีการติดเชื้อของโรคใบจุดสาหร่ายได้ทั้งหมด 6 ชนิด เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลทางอณูชีววิทยาสามารถยืนยันได้ว่าสาหร่ายที่สำรวจพบและแยกเพาะเลี้ยงได้ทั้ง 6 ไอโซเลทเป็นสาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros virescens* โดยชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างมวลชีวภาพของสาหร่าย *Cephaleuros* คือ อาหารสูตร HSM เนื่องจากตรวจพบมวลชีวภาพมากกว่าอาหารสูตร BBM และ Bristol ถึง 7 เท่า ในขณะที่อาหาร 2 ชนิดหลังสามารถกระตุ้นให้สาหร่าย *Cephaleuros* ทุกไอโซเลท ผลิตและสะสม β -carotene มากกว่า อีกทั้งยังพบว่า สารสกัดจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BBM แสดงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ถึง 1.5 เท่า

เนื่องจากการศึกษาและงานวิจัยที่ตีพิมพ์เกี่ยวกับสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* ในประเทศไทยนั้นยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในต่างประเทศ ข้อมูลและผลจากงานวิจัยนี้จึงถือว่าเป็นจุดเริ่มต้นจุดหนึ่งของการศึกษาสาหร่ายก่อโรคในประเทศไทยในบริเวณพื้นที่ภาคกลาง ผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยนี้จะสามารถนำไปสู่การเพิ่มความตระหนักถึงปัญหารวมและการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นจากโรคใบจุดสาหร่ายบนผลผลิตทางการเกษตรได้อย่างถูกต้อง ซึ่งในอนาคตหากจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในหัวข้อที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยคิดว่า ควรเพิ่มขนาดของพื้นที่ในการสำรวจ และคงจะเป็นการดีหากให้ความสำคัญในการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบกับพืชเศรษฐกิจ โดยเฉพาะชนิดที่เคยมีรายงานการติดเชื้อจากพื้นที่อื่นๆ มาก่อน ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่องค์ความรู้ที่ถูกต้องรวมถึงการศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาหร่ายก่อโรคชนิดอื่นๆ ที่อาจปรากฏในพื้นที่เขตร้อนชื้นแถบศูนย์สูตร

นอกจากนี้ผู้วิจัยมีความคิดเห็นเพิ่มเติมว่า การจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยานั้นให้ข้อมูลที่แม่นยำและน่าเชื่อถือมากกว่าการใช้ข้อมูลทางอณูชีววิทยาที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA เนื่องจากพบว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* ที่มีอยู่ปัจจุบันยังมีอยู่อย่างจำกัด อีกทั้งยังให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงถึง 99% อย่างไรก็ตาม จะเป็นการดีหากในอนาคตสามารถค้นหาตำแหน่งของยีนที่เหมาะสมในการจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคเพื่อเป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมของสาหร่ายกลุ่มนี้ เนื่องจากการศึกษาทางอณูชีววิทยานั้นจำเป็นต้องใช้ประสบการณ์และความเชี่ยวชาญเกี่ยวกับสาหร่ายที่น้อยกว่าการจัดจำแนกโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา อีกทั้งยังสะดวกและใช้เวลาที่น้อยกว่าอีกด้วย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังเห็นอีกว่า ศักยภาพในการผลิต β -carotene ของสาหร่าย

ก่อโรคชนิดนี้เป็นประเด็นที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก อาจกล่าวได้ว่างานวิจัยชิ้นนี้เป็นงานชิ้นแรกที่มีการศึกษาและตีพิมพ์อย่างเป็นทางการถึงแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายชนิดนี้สร้างและสะสม เนื่องจากที่ผ่านมายังไม่พบรายงานวิจัยหรือการตีพิมพ์ที่กล่าวถึงการศึกษาปัจจัยที่กระตุ้นการสะสม β -carotene ในสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* เลย อาจเป็นเพราะการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ยังมีอยู่น้อยมากทั้งในและต่างประเทศ ดังนั้นในอนาคตหากสามารถค้นคว้าพัฒนาให้สาหร่ายก่อโรคชนิดนี้มีศักยภาพในการผลิต β -carotene และความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมากขึ้น สาหร่ายกลุ่มนี้อาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเพิ่มมูลค่าในระดับที่สูงขึ้นต่อไป



รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมส่งเสริมการเกษตร, ส. คลินิกพืช [Online]. Available: <http://www.agriqua.doae.go.th/plantclinic/Clinic/plant/index.html>.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ศูนย์ข้อมูลผลไม้ มังคุด [Online]. Available: <http://www.oae.go.th/fruits/index.php/protect?id=105>

ขจรศักดิ์ ภาวกุล. 2554. โรคของมะม่วง [Online]. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. Available: <http://www.thaikasetsart.com>.

คณินนิตย์ เจริญวรารากร, สุปัทน์ อรรถธรรม และอำไพวรรณ ภราดรนุวัฒน์. 2527. โรคของส้มโอและการผลิตพันธุ์ส้มโอให้ปราศจากโรค, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักหอสมุด.

จารุพันธ์ ทองแถม, ม.ล. 2536. เพิน สำหรับคนรักเพินและผู้ปลูกมี้ออาชีพ. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่งจำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ.

ฉัญฉฐิติ มาแสง. ไม่ระบุปีที่เขียน. โรคและแมลงของฝรั่งไร้เมล็ด (ออนไลน์). ที่มา: <http://www.doae.go.th/library/html/detail/guava1/protect.html>

นิพนธ์ ทวีชัย. การควบคุมโรคพืชโดยวิธีธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ๒๕๕๐.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2531. การสำรวจโรคของไม้ผลเขตหนาวบางชนิดในสภาพต่างฤดูกาลในภาคเหนือของประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุรณี พัววงศ์แพทย์. 2550. การศึกษาชนิดของโรคทุเรียนและส้มโอเพื่อการส่งออก. รายงานผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พรพิมล อธิปัญญาคม, ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช และพวงมา ตระกูลสุรัตน์. 2550. การศึกษาชนิดของโรคทุเรียนและส้มโอเพื่อการส่งออก, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

วิชาชา ชาลีพรหม. 2543. การผลิตลำไย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ศูนย์วิจัย และพัฒนาลำไยและลื่นจี๋ โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตลำไยและลื่นจี๋

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. ไม่ระบุปีที่เขียน. วิชาการปาล์มน้ำมัน (ออนไลน์). ที่มา: <http://www.doa.go.th/palm/>.

สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร, กรมส่งเสริมการเกษตร. โรคจุดสาหร่าย (Algal Spot) (ออนไลน์). ที่มา http://www.agriqua.doae.go.th/plantclinic/Clinic/plant/durian/algal_spot.html

สมศิริ แสงโชติ, ชลิตา เล็กสมบูรณ์. 2552. คู่มือการวินิจฉัยโรคพืช: โรคพืชที่พบบ่อย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2526. แมลงศัตรูพืชทางการเกษตรของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

อนรรักษ์ สันป่าเป้า, Mutiara K. Pitaloka, วสันต์ เพชรรัตน์. 2558ก. พืชอาศัย การแพร่กระจายและความหลากหลายของสาหร่ายปรสิตรูป Cephaleuros Kunze ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย. แก่นเกษตร 43 ฉบับพิเศษ 1. 928-932.

อนรรักษ์ สันป่าเป้า, Mutiara K. Pitaloka, นราสินี ถีถ้วน, อรณิชา ตันติพลานนท์, วสันต์ เพชรรัตน์. 2558ข. สันฐานวิทยาและความรุนแรงของสาหร่ายปรสิตรูป Cephaleuros Kunze. แก่นเกษตร 43 ฉบับพิเศษ 1. 190-194.

อุดร อุณหวุฒิ, บูรณ์ พัวพงษ์แพทย์, ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช, พจนา ตระกูลสุวรรณ์, พรพิมล อธิปัญญาคม, นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, ณิชฎิมา โฆษิตเจริญกุล, ดารุณี ปุญญพิทักษ์, อมรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2550. การจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของพืชส่งออก. แผนพัฒนาการอารักขาพืช อนันต์ สกลกิม. 2551. อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. ก้าวทันโลก วิทยาศาสตร์ ปีที่ 8 ฉบับที่ 1

MCMAUGH, T. 2008. คำแนะนำในการสำรวจศัตรูพืชในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก (ออนไลน์). *ACIAR Monograph*, 119c, 199.

ภาษาต่างประเทศ

AASEN, A. J., EIMHJELLEN, K. E. & LIAAEN-JENSEN, S. 1969. An extreme source of beta-carotene. *Acta Chem Scand*, 23, 2544-5.

AGRAWAL, S. C. 2012. Factors controlling induction of reproduction in algae—review: the text. *Springer*.

ALÍA, M., HORCAJO, C., BRAVO, L. & GOYA, L. 2003. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutrition Research*, 23, 1251-1267.

ALMAHROUQI, H., NAQQIYUDDIN, M. A., ACHANKUNJU, J., OMAR, H. & ISMAIL, A. 2015. Different salinity effects on the mass cultivation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* under sheltered outdoor conditions in Oman and Malaysia. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 6, 1-14.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402.

AMBATI, R. R., RAVI, S. & ASWATHANARAYANA, R. G. 2010. Enhancement of carotenoids in green alga-*Botryococcus braunii* in various autotrophic media under stress conditions. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4, 87-92.

ANDERSEN, R. A. 2005. *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press.

ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P. D., PATSALIDES, E., MCDONALD, S. & ROBARDS, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.

- ARAUJO, G. S., MATOS, L. J. B. L., GONÇALVES, L. R. B., FERNANDES, F. A. N. & FARIAS, W. R. L. 2011. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, 102, 5248-5250.
- ARAUZ, L. F. 2000. Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease*, 84, 600-611.
- ARTS, M. J. T. J., HAENEN, G. R. M. M., VOSS, H.-P. & BAST, A. 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 45-49.
- ARUMUGAM, M., AGARWAL, A., ARYA, M. C. & AHMED, Z. 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresour Technol*, 131, 246-9.
- BASHAN, Y., AZAIZEH, M., DIAB, S., YUNIS, H. & OKON, Y. 1985. Crop loss of pepper plants artificially infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in relation to symptom expression. *Crop protection*, 4, 77-84.
- BATISTA, A. & LIMA, D. A. 1949. Lista de suscetíveis de alga *Cephaleuros mycoidea* Karst. em Pernambuco. *Boletim da Secretaria de Agricultura, Industria e Comercio do Estado de Pernambuco*, 16, 32-46.
- BISCHOFF, H. W. & BOLD, H. C. 1963. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *University of Texas Publications* 1-95.
- BOLD, H. C. 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, sp. nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 101-108.
- BOROWITZKA, L. J., BOROWITZKA, M. A. & MOULTON, T. P. 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: From laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia*, 116-117, 115-121.
- BOROWITZKA, M., BOROWITZKA, L. & KESSLY, D. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 2, 111-119.
- BRITTON, G., LIAAEN-JENSON, S. & H.PFANDER 2004. Carotenoids Handbook. *Free Radical Research*, 38, 885-885.
- BROOKS, F., RINDI, F., SUTO, Y., OHTANI, S. & GREEN, M. 2015. The Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta): An Unusual Algal Order with a Novel Plant Pathogen, *Cephaleuros*. *Plant Disease*.
- BROOKS, F. E. 2004. Plant-parasitic algae (Chlorophyta: Trentepohliales) in American Samoa. *Pacific Science Journal*, 58, 419-428.

- BROWN, S. H. 2013. Algal Leaf Spot (*Cephaleuros virescens*) of Cocoplum. *Lee County Extension*, 239, 533-7513.
- BURTON, R. A. & FINCHER, G. B. 2014. Plant cell wall engineering: applications in biofuel production and improved human health. *Current opinion in biotechnology*, 26, 79-84.
- CALLOWAY, D. 1997. Beer-lambert law. *Journal of Chemical Education*, 74, 744.
- CAMPBELL, C. L. & MADDEN, L. V. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*, John Wiley & Sons.
- CARVALHOA, L. M. J. D., GOMES, P. B., GODOY, R. L. D. O., PACHECO, S., MONTE, P. H. F. D., CARVALHO, J. L. V. D., NUTTI, M. R., NEVES, A. C. L., VIEIRA, A. C. R. A. & RAMOS, S. R. R. 2012. Total carotenoid content, a-carotene and b-carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 47, 337-340.
- CEPOI, L., RUDI, L., MISCU, V., COJOCARI, A., CHIRIAC, T. & SADOVNIC, D. 2009. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Fascicula Biologie*, 16, 43-48.
- CHAKRABORTY, S. & NEWTON, A. C. 2011. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology*, 60, 2-14.
- CHAPMAN, R. L., AND GOOD, B. H 1978. Ultrastructure of plasmodesmata and cross walls in cephaleuros, phycopeltis and trentepohlia (chroolepidaceae ; chlorophyta) *British Phycological Society*, 13, 241-246
- CHAPMAN, R. L. & GOOD, B. H. 1983. Subaerial symbiotic green algae: Interactions with vascular plant hosts. L. J. Goff, ed. *Algal symbiosis: A continuum of interaction strategies*, 173-204.
- CHEN, M., TANG, H., MA, H., HOLLAND, T. C., NG, K. Y. S. & SALLEY, S. O. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102, 1649-1655.
- DARLEY, W. M., MONTAGUE, C. L., PLUMLEY, F. G., SAGE, W. W. & PSALIDAS, A. T. 1981. Factors limiting edaphic algal biomass and productivity in a georgia salt marsh^{1,2}. *Journal of Phycology*, 17, 122-128.
- DEIGHTON, F. 1936. Preliminary list of fungi and diseases of plants in Sierra Leone. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew)*, 1936, 397-424.
- DEL CAMPO, J., RODRIGUEZ, H., MORENO, J., VARGAS, M., RIVAS, J. & GUERRERO, M. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied microbiology and biotechnology*, 64, 848-854.

- DEL CAMPO, J. A., MORENO, J., RODRIGUEZ, H., VARGAS, M. A., RIVAS, J. N. & GUERRERO, M. G. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp.(Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, 76, 51-59.
- DELL, B. & THU, P. 2008. Sustainable management of plantation eucalypts and acacias in Asia.
- DIPAK, P. & LELE, S. 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 476-483.
- ENWEREUZOH, U. & ONYEAGORO, G. 2014. A Novel Aeration Method for the Preparation of Algae (*Dunaliella Salina*) Biomass for Biofuel Production.
- FRIES, E. M. 1823. *Systema Mycologicum, sistens fungorum ordines, genera et species*, Sumtibus Ernesti Mauritti.
- FRY, W. E. 2012. *Principles of plant disease management*, Academic Press.
- FUCIKOVA, K., LELIAERT, F., COOPER, E. D., SKALOUD, P., D'HONDT, S., DE CLERCK, O., GURGEL, F., LEWIS, L. A., LEWIS, P. O., LOPEZ-BAUTISTA, J., DELWICHE, C. F. & VERBRUGGEN, H. 2014. New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2.
- GARBAYO, I., CUARESMA, M., VÍLCHEZ, C. & VEGA, J. M. 2008. Effect of abiotic stress on the production of lutein and b-carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process Biochemistry*, 43, 1158-1161.
- GARCÍA-ARENAL, F., FRAILE, A. & MALPICA, J. M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual review of phytopathology*, 39, 157-186.
- GIORDANO, M. 2001. Interactions between C and N metabolism in *Dunaliella salina* cells cultured at elevated CO₂ and high N concentrations. *Journal of Plant Physiology*, 158, 577-581.
- GOKHALE, M. V. A. S., SAJEED S 2012. Host range of a parasitic alga *cephaleuros virescens* kunz. Ex fri. From maharashtra state, india. *PLANT SCIENCES FEED*, 2, 1-4.
- GOTO, S., KOGURE, K., ABE, K., KIMATA, Y., KITAHAMA, K., YAMASHITA, E. & TERADA, H. 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta*, 1512, 251-8.
- GOTTWALD, T. R., GRAHAM, J. H. & SCHUBERT, T. S. 2002. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 10.

- GRÜNEWALD, K., HIRSCHBERG, J. & HAGEN, C. 2001. *Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga Haematococcus pluvialis* [Online]. [Accessed].
- GRUNG, M., D'SOUZA, F. L., BOROWITZKA, M. & LIAAEN-JENSEN, S. 1992. Algal Carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *Journal of Applied Phycology*, 4, 165-171.
- GUEDES, A. C., AMARO, H. M. & MALCATA, F. X. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs*, 9, 625-644.
- GUERIN, M., HUNTLEY, M. E. & OLAIZOLA, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21, 210-216.
- GUIRY, M. D. & GUIRY, G. M. 2015. AlgaeBase. <http://www.algaebase.org>: World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- HAGEN, C., GRÜNEWALD, K., SCHMIDT, S. & MÜLLER, J. 2000. Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *European Journal of Phycology*, 35, 75-82.
- HAGHJOU, M. M. & SHARIATI, M. 2007. Photosynthesis and respiration under low temperature stress in two *Dunaliella* strains. *World Applied Sciences Journal*, 2, 276-282.
- HALL, T. 1999. A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 95-98.
- HAMETNER, C., STOCKER-WÖRGÖTTER, E. & GRUBE, M. 2014. New insights into diversity and selectivity of trentepohlialean lichen photobionts from the extratropics. *Symbiosis*, 63, 31-40.
- HAMMOND, E. G. & GLATZ, B. A. 1988. Biotechnology Applied to Fats and Oils. In: Food Biotechnology (Eds.: King, R.D./Cheetham, P.S.J.). *Elsevier Applied Science*, 173-216.
- HAN, K.-S., PARK, M.-J., PARK, J.-H. & SHIN, H.-D. 2011. First report of algal leaf spot associated with *Cephaleuros virescens* on greenhouse-grown *Ficus benghalensis* in Korea. *Australasian Plant Dis.*, 6, 72-73.
- HAN, S., HU, Z. & LEI, A. 2008. Expression and function analysis of the metallothionein-like (MT-like) gene from *Festuca rubra* in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Sci China C Life Sci*, 51, 1076-81.

- HARKER, M., TSAVALOS, A. J. & YOUNG, A. J. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 55, 207-214.
- HEMALATHA, A., GIRIJA, K., PARTHIBAN, C., SARANYA, C. & ANANTHARAMAN, P. 2013. Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Adv. Appl. Sci. Res*, 4, 151-157.
- HERCBERG, S., GALAN, P., PREZIOSI, P., ALFAREZ, M.-J. & VAZQUEZ, C. 1998. The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. *Nutrition*, 14, 513-520.
- HERRERO, C., ABALDE, J. & FABREGAS, J. 1991. b-carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources *Bioresource Technology Volume Issue , Pages*
- HOLCOMB, G. E. 1986. Hosts of the Parasitic Alga *Cephaleuros virescens* in Louisiana and New Host Records for the Continental United States. *Plant Disease*, 70, 1080.
- HOMDORK, S. & BECK, R. 2000. Influence of Different Storage Conditions on the Mycotoxin Production and Quality of Fusarium-Infected Wheat Grain. *Journal of Phytopathology*, 148, 7-15.
- HSIEH, H. 1983. Notes on host plants of *Cephaleuros virescens* new for Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 24, 89-96.
- HUGHES, D. A. 1999. Effects of carotenoids on human immune function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 713-718.
- INOUE, K., FURBEE, K. J., URATSU, S., KATO, M., DANDEKAR, A. M. & IKOMA, Y. 2006. Catalytic activities and chloroplast import of carotenogenic enzymes from citrus. *Physiologia Plantarum*, 127, 561-570.
- ISLAM, A. 1972. Subaerial algae of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany*, 1, 13-64.
- JOUBERT, J. & RIJKENBERG, F. 1971. Parasitic green algae. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 45-64.
- JUAN M. LÓPEZ-BAUTISTA, D. A. W., AND RUSSELL L. CHAPMAN 2002. The Trentepohliales Revisited. *Constancea*, 83.
- KARSTEN, G. 1891. *Untersuchungen über die Familie der Chroolepideen*, EJ Brill.
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T. & NAGAI, S. 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga,

- Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 867-873.
- KOBAYASHI, M., KURIMURA, Y. & TSUJI, Y. 1997. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology letters*, 19, 507-509.
- KOKABI, M., YOUSEFZADI, M., FEGHHI, M. A. & KESHAVARZ, M. 2013. Antioxidant activity of extracts of selected algae from the Persian Gulf, Iran. *Journal of the Persian Gulf*, 4, 45-50.
- KRITCHEVSKY, S. B. 1999. b-Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *The Journal of nutrition*, 129, 5-8.
- LAMERS, P. P., JANSSEN, M., DE VOS, R. C., BINO, R. J. & WIJFFELS, R. H. 2012. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of biotechnology*, 162, 21-27.
- LAVENS, P. & SORGELOOS, P. 1996. Manual on the productions and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, 361, 295.
- LEE, J.-C., HOU, M.-F., HUANG, H.-W., CHANG, F.-R., YEH, C.-C., TANG, J.-Y. & CHANG, H.-W. 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int*, 13, 55.
- LEKSOMBOON, C., THAVEECHAI, N., KOSITRATANA, W., CHALIDA, L., NIPHONE, T. & WICHAI, K. 2001. Potential of plant extracts for controlling citrus canker of lime. *Kasetsart J (Nat Sci)*, 35, 392-396.
- LI, J., WENG, Y., HU, H., PAN, X. & SUN, X. 1998. Effects of three nitrogen sources on the growth and beta-carotene accumulation in *Dunaliella salina*. *Nanjing shida xuebao*, 22, 73-76.
- LIKENS, G. E. 2010. *Biogeochemistry of inland waters*, Academic Press.
- LIN, Q. & LIN, J. 2011. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresour Technol*, 102, 1615-21.
- LIU, G., ZHANG, Q., ZHU, H. & HU, Z. 2012. Massive *trentepohlia*-bloom in a glacier valley of mt. Gongga, China, and a new variety of *Trentepohlia* (Chlorophyta). *PLoS ONE* 7, 7.
- LIU, J., SUN, Z., GERKEN, H., LIU, Z., JIANG, Y. & CHEN, F. 2014. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential. *Mar Drugs*, 12, 3487-515.
- LOBBAN, C. S. & WYNNE, M. J. 1981. *The biology of seaweeds*, Univ of California Press.

- LOPEZ-BAUTISTA, J. M., RINDI, F. & GUIRY, M. D. 2006. Molecular systematics of the subaerial green algal order Trentepohliales: an assessment based on morphological and molecular data. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 1709-15.
- LORENZ, R. T. & CYSEWSK, G. R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18, 160-167.
- MARLATT, R. B. & ALFFIERI, J. 1981. Host of a parasitic alga, *Cephaleuros* Kunze, in Florida. *Plant Disease*, 65, 520-522.
- MISHRA, K., OJHA, H. & CHAUDHURY, N. K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.
- MORO, C. V., OLIVIER, C., SÉRÉNA, R., ANTOINE, T., GÉRARD, C., ISABELLE, B. & BOHATIER, J. 2009. New Design Strategy for Development of Samples *Bacillariophyceae* in Environmental Detection of *Chlorophyceae* and Specific Primer Sets for PCR-Based. *Applied and environmental microbiology*, 75, 5729-5733.
- MORONTA, R., MORA, R. & MORALES, E. 2006. Response of the microalga *Chlorella sorokiniana* to pH, salinity and temperature in axenic and non axenic conditions. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23, 27-41.
- MUKHERJEE, R., BORAH, S. P. & GOSWAMI, B. C. 2010. Biochemical characterization of carotenoids in two species of *Trentepohlia* (Trentepohliales, Chlorophyta). *Journal of applied phycology*, 22, 569-571.
- MUTHUKANNAN, P., JAYAPRIYAN, K. & RENGASAMY, R. 2010. In vitro evaluation of b-carotene production in two different strains of *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *J Biosci Res*, 1, 83-87.
- MUTHUKUMAR, T., UMA, E. & PRIYADHARSINI, P. 2014. Occurrence of foliicolous parasitic alga *Cephaleuros virescens* on cultivated ornamental plants in southern India. *Botanica Lithuanica*, 20, 87-98.
- MUTIARA, P. K., VASUN, P., SIWARET, A. & ANURAG, S. 2015. *Cephaleuros virescens*, the cause of an algal leaf spot on Para rubber in Thailand. *Australasian Plant Disease Notes*, 10, 1-4.
- NELSON, S. 2012. Algal leaf spot In: AVOCADO, A. L. S. O. (ed.). Aloha Arborist Association.
- NELSON, S. C. 2008. *Cephaleuros* species, the plant-parasitic green algae. *Plant Disease*, 6.

- NISHINO, H., TOKUDA, H., SATOMI, Y., MASUDA, M., BU, P., ONOZUKA, M., YAMAGUCHI, S., OKUDA, Y., TAKAYASU, J., TSURUTA, J., OKUDA, M., ICHIISHI, E., MURAKOSHI, M., KATO, T., MISAWA, N., NARISAWA, T., TAKASUKA, N. & YANO, M. 1999. Cancer prevention by carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 71, 2273-2278.
- O'NEILL, J. R. 2010. *Irish Potato Famine*, ABDO.
- PAIVA, S. A. R. & RUSSELL, R. M. 1999. b-Carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr*, 18, 426-433.
- PAL, K. K. & GARDENER, B. M. 2006. Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, 1117-1142.
- PELAH, D., SINTOV, A. & COHEN, E. 2004. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 483-486.
- PETERSON, R. B. & R.H.BURRIS 1978. Hydrogen metabolism in isolated heterocysts of *Anabaena* 7120. *Archives of Microbiology*, 116, 125-132.
- PHADWAL, K. & SINGH, P. 2003. Effect of nutrient depletion on b-carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresource technology*, 90, 55-58.
- PHELPS, R. 1986. Diseases as constraints in the production of fruit crops in the Caribbean. *Pests and Diseases as Constraints in the Production and Marketing of Fruits in the Caribbean*, 62.
- PICK, U. 2002. Adaptation of the Halotolerant Alga *Dunaliella* to High Salinity. In: LÄUCHLI, A. & LÜTTGE, U. (eds.) *Salinity: Environment - Plants - Molecules*. Springer Netherlands.
- PONMURUGAN, P., SARAVANAN, D. & RAMYA, M. 2010. Culture and biochemical analysis of a tea algal pathogen, *cephaleuros parasiticus*. *Phycological Society of America*, 46, 1017-1023.
- PORTILLO, M. C., SRIRIN, V., KANOKSILAPATHAM, W. & GONZALEZ, J. M. 2009. Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles*, 13, 321-31.
- PRINTZ, H. 1964. Die Chaetophorales der Binnengewässer. *Hydrobiologia*, 24, 1-376.
- QUACH, H. T., STEEPER, R. L. & GRIFFIN, G. W. 2004. An Improved Method for the Extraction and Thin-Layer Chromatography of Chlorophyll a and b from Spinach. *Journal of Chemical Education*, 81, 385.

- RAI, M. P., GAUTOM, T. & SHARMA, N. 2015. Effect of Salinity, pH, Light Intensity on Growth and Lipid Production of Microalgae for Bioenergy Application. *Online Journal of Biological Sciences*, 15, 260.
- RAMAMOORTHY, P. K. & BONO, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2, 70-80.
- RAMOS, A. A., POLLE, J., TRAN, D., CUSHMAN, J. C., JIN, E. & VARELA, J. C. 2011. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26, 3.
- RAMYA, M., PONMURUGAN, P. & SARAVANAN, D. 2013. Management of *Cephaleuros parasitica* Karst (Trentepohliales: Trentepohliaceae), an algal pathogen of tea plant, *Camellia sinensis* (L) (O. Kuntze). *Crop Protection*, 44, 66-74.
- RAO, A. V. & RAO, L. G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res*, 55, 207-16.
- RINDI, F., LAM, D. W. & LÓPEZ-BAUTISTA, J. M. 2008. Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) from Panama. *Nova Hedwigia*, 87, 421-444.
- RINDI, F., LAM, D. W. & LÓPEZ-BAUTISTA, J. M. 2009. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52, 329-339.
- RINDI, F. & LÓPEZ-BAUTISTA, J. M. 2008. Diversity and ecology of Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) in French Guiana. *Cryptogamie, Algol*, 29, 13-43.
- RODRIGUES, E., MARIUTTI, L. R. B. & MERCADANTE, A. Z. 2012. Scavenging Capacity of Marine Carotenoids against Reactive Oxygen and Nitrogen Species in a Membrane-Mimicking System. *Marine Drugs*, 10, 1784.
- ROUND, F. 1973. *The biology of the algae*, London, Edward Arnold.
- SAKSHAUG, E., JOHNSEN, G. H. & KOVACS, K. M. 2009. *Ecosystem Barents Sea*, Tapir Academic Press.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHMIDLE, W. 1897. *Einige Baumlagen aus Samoa*, C. Heinrich.
- SHANAB, S. M., SHALABY, E. A. & EL-FAYOUMY, E. A. 2011. *Enteromorpha compressa* exhibits potent antioxidant activity. *BioMed Research International*, 2011.
- SHIVAS, R., SUYOKO, S., RAGA, N. & HYDE, K. 1996. Some disease-associated microorganisms on plants in Irian Jaya, Indonesia. *Australasian Plant Pathology*, 25, 36-49.

- STEIN, P. G. A. J. 2011. Induction of Systemic Acquired Resistance to *Puccinia sorghi* in Corn. *International Journal of Plant Pathology*, 2, 43-50.
- SUEOKA, N., CHIANG, K. S. & KATES, J. R. 1967. Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 46, 83-91.
- SUN, N., WANG, Y., LI, Y.-T., HUANG, J.-C. & CHEN, F. 2008. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochemistry*, 43, 1288-1292.
- SUN, Z., LIU, J., BI, Y.-H. & ZHOU, Z.-G. 2015. Microalgae as the Production Platform for Carotenoids. *omic eBook*.
- SUNPAPAO, A., PITALOKA, M. K. & PETCHARAT, V. 2015a. Host range, distribution and diversity of plant parasitic algae *Cephaleuros* Kunze in southern Thailand. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 43, 928-932.
- SUNPAPAO, A., PITALOKA, M. K., THITHUAN, N., TANTIPALANON, O. & PETCHARAT, V. 2015b. Morphology and disease severity of plant parasitic algae *Cephaleuros* Kunze. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 43, 189-194.
- SUTO, Y., GANESAN, E. K. & WEST, J. A. 2014. Comparative observations on *Cephaleuros parasiticus* and *C. virescens* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from India. *Korean Journal of Phycology Algae*, 29, 121-126.
- SUTO, Y. & OHTANI, S. 2009. Morphology and Taxonomy of Five *Cephaleuros* Species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan, Including Three New Species. *Phycologia*, 48, 213-236.
- SUTO, Y. & OHTANI, S. 2011. Morphological features and chromosome numbers in cultures of five *Cephaleuros* species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan. *Phycological Research*, 59, 42-51.
- SUTO, Y. & OHTANI, S. 2013. Seasonal development of five *Cephaleuros* species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) on the leaves of woody plants and the behaviors of their gametes and zoospores. *Phycological Research*, 61, 105-115.
- SUUTARI, M., MAJANEVA, M., FEWER, D. P., VOIRIN, B., AIELLO, A., FRIEDL, T., CHIARELLO, A. G. & BLOMSTER, J. 2010. Molecular evidence for a diverse green algal community growing in the hair of sloths and a specific association with *Trichophilus welckeri* (Chlorophyta, Ulvophyceae). *BMC evolutionary biology*, 10, 1.
- TAKAICHI, S. 2011. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs*, 9, 1101-1118.

- TANG, G. 2010. Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. *American Society for Nutritional Services*, 91, 14685-14735.
- THOMPSON, R. H. & WUJEK, D. E. 1997. Trentepohliales: *Cephaleuros*, *Phycopeltis* and *Stomatochroon*. Morphology, taxonomy and ecology. *Science Publishers, Inc.*, 149.
- TMETHYL, J. 2013. *Cephaleuros virescens* Kunze ex E.M.Fries. In: *VIRESCENS*, C. (ed.). Mushroom Observer.
- TRAN, D., HAVEN, J., QIU, W.-G. & POLLE, J. 2009. An update on carotenoid biosynthesis in algae: Phylogenetic evidence for the existence of two classes of phytoene synthase. *Planta*, 229, 723-729.
- VANDERPLANK, J. E. 2012. *Host-pathogen interactions in plant disease*, Elsevier.
- VIDAVER, A. K. & LAMBRECHT, P. A. 2004. Bacteria as plant pathogens. *The plant health Instructor*.
- VIDHYAVATHI, R., VENKATACHALAM, L., SARADA, R. & RAVISHANKAR, G. A. 2008. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *J Exp Bot*, 59, 1409-18.
- WANG, J., SOMMERFELD, M. R., LU, C. & HU, Q. 2013. Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae*, 28, 193-202.
- WENT, F. A. F. C. 1895. *Cephaleuros coffeae*, eine neue parasitische Chroolepidee, Fischer.
- WINSTON, J. R. 1938. Algal fruit spot of orange. *Phytopathology*, 28, 283-286.
- ZECHMAN, F. W., THERIOT, E. C., ZIMMER, E. A. & CHAPMAN, R. L. 1990. Phylogeny of the ulvophyceae (chlorophyta): Cladistic analysis of nuclear-encoded rna sequence data. *Journal of Phycology*, 26, 700-710.
- ZHU, J., RONG, J. & ZONG, B. 2013. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis*, 34, 80-100.
- ZITTER, H. R. D. A. T. A. 1987. Common Rust of Sweet Corn. *Vegetable MD Online*.
- ZUBIA, M., ROBLEDO, D. & FREILE-PELEGRIN, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of applied phycology*, 19, 449-458.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร HSM

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ Sueoka และคณะ (1967)

1.1. salts solution (Beijerinck's solution)

NH_4Cl 100.0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.0 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

1.2. phosphate solution

K_2HPO_4 288.0 g

KH_2PO_4 144.0 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

1.3. Hutner's trace elements

สารเคมี	น้ำหนัก	ปริมาตรน้ำ
EDTA disodium salt	50 g	250 ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22 g	100 ml
H_3BO_3	11.4 g	200 ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.06 g	50 ml
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.61 g	50 ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.57 g	50 ml
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.10 g	50 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.99 g	50 ml

เมื่อเตรียมสารแล้วทำการผสมสารดังนี้

5 ml salts solution #1

5 ml phosphate solution #2

1.0 ml trace elements solution #3

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BBM

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ Bischoff และ Bold (1963)

สารเคมี	stock solution (g/L H ₂ O)	ปริมาตรน้ำ (ต่อ 1 ลิตร)
NaNO ₃	25.00	10 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50	10 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50	10 ml
K ₂ HPO ₄	7.50	10 ml
KH ₂ PO ₄	17.50	10 ml
NaCl	2.50	10 ml
EDTA solution		1 ml
iron solution		1 ml
H ₃ BO ₃	11.42 g	1 ml
Trace metals solution		1 ml

2.2 EDTA solution

EDTA	50.00 g
KOH	31.00 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

2.3 Iron Solution

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.498 g
H ₂ SO ₄ (96%)	0.1 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

2.4 Trace metals solution

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44 g
MoO ₃	0.71 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Bristol

ตามวิธีของ Bold (1949)

สารเคมี	stock solution (g/400 ml H ₂ O)	ปริมาตรน้ำ (ต่อ 1 ลิตร)
NaNO ₃	10	10 mL/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1	10 mL/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3	10 mL/L
K ₂ HPO ₄	3	10 mL/L
KH ₂ PO ₄	7	10 mL/L
NaCl	1	10 mL/L

4. การเตรียม TAE buffer

Tris Base	24 g
Glacial acetic acid	57.1 ml
500 mM EDTA, pH 8.0 (EDTA 18.612 g/100 ml H ₂ O)	100 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

5. การเตรียมสารละลาย DPPH

5.1 การเตรียมสารละลาย DPPH สำหรับเป็น stock solution

DPPH	0.01 g
------	--------

ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ปริมาตรรวม 200 ml เก็บที่ 4°C

5.2 การเตรียมสารสำหรับทดลอง ความเข้มข้น 0.0025 g/L

ทำการปิเปตสารจาก stock solution ปริมาตร 50 ml
จากนั้นปรับปริมาตรด้วย 80% methanol ให้ได้ปริมาตรรวม 500 ml

* ทำการเตรียมใหม่ทุกครั้ง

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณยีน 18S rRNA ของสาหร่ายตัวอย่าง

Sample	Nucleotide
Cp.1	ATAATCAGTTAAAGTTATTTGAAGGGTTTTCTTATTCCGGATAACCGTAGGAAACTAGAG CTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAGAGGCCGACC GGGCTTGTCGCCGACCTTCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGTCCAGAACCG GCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGACGGTAGGGTAGTGGCCTACCG TGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG CTACCACATCCAAGGAAGGCAGCGCGCAAATTACCCAAATCCCAATTCGGGGAGGT AGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCTCTGGTCGGTAATCGGAATGAGAACAATTTA AATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCA GCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTCGGATTTCCGGTG GCGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGAGTACTGGTAGGTACCACCTTTCTGCCGAGGACGGG GTTCTGGGCTTAGTTGCTGGGCCCGGAGTCGGCGATGTCACCTTTGAGTAAATTAGGGT GTTCAAAGCAGGCTTATGCTCTGTATACACTAGCATGGGATGACACGATAGGACTTCGGT TTATCTTGTCGGTCTGTAATCGGAGTAATGATGAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTGTA TTTCGTAGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATT GCCAAGGATGTTTTATTGATCAAGAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACC GTCGTAGTCTCGACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGAGGTGGTTTTTTATGACCT CTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGC TGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCACCACGGGAACTTACCAGGTCCAGACATGGGTAGGATTGACAGATTGAAAGCTC TTTTCTGATTCATTGGGTGGGTGGTCTAGGCCGTTCTTAATTGGGGTTGCTTTGGCCG
Cp.2	CTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTAGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAGAGG CCGACCGGGGCTCCGGCCCCGACCTTCGGTGAATCATGATAACTCAACGAATCGCATGGT CCTGAACCGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGACGGTAGGGTAGT GGCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT GAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAACCAAATCCCACT CGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCTCTGGTCGGTAATCGGAATGAG AACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTCGGA TTTTGGGTGGCGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGAGTACTGGTAGGTACTCTTTCTGCC GAGGACGTGGTTCTGGGCTTGATTGCTGGGCCCGGAGTCGGCGATGTCACCTTTGAGTA AATTAGGGTGTCAAAGCAGGCTTATGCTCTGTATACACTAGCATGGGATGACACGATAG GACTTCGGTTTATCTTGTGGTCTGTAGGTCGGAGTAATGATGAAGAGGGACAGTCGGGG GCATTCGTATTTCTGATGACAGGTTGAAATTTCTGGATTTACGGAAGACGAACTTCTGCC AAAGCATTGCCAAGGATGTTTTATTGATCAAGAACGAAAGTCGGGGGCTCGAAAAACG ATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAACGAATGCCAACTAAGGGATCGGAAGGTGG TTTTTTTTATGAACCTCTCCGGCACCTTACGAAAAAATTTCTGGGTTCCGGGGGAGT ATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCT GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAACTTACCAGGTCCAGACATGGGTAGGATTGAC AGATTGATAG
Cp.3	ATACCGTAGGAAACTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCGGAAGGGACGTATTT ATTAGATAAGAGGCCGACCGGGCTTGTCCCGACCTTCGGTGAATCATGATAACTTCACGA ATCGCATGGTCCAGAACCGGCATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGACG GTAGGGTAGTGGCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCGGGA

	<p>GAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCA AATCCCAATTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCTCTGGTCGGGTAA TCGGAATGAGAACAAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAAAAGCT CGTAGTCGGATTTCCGGTGGCGCTACCGGTCCGCCTTTGGTGAGTACTGGTAGGTACCA CCTTTCTGCCGAGGACGGGGTTCTGGGCTTAGTTGTCTGGGCCCGGAGTCGGCGATGTC ACTTTGAGTAAATTAGGGTGTCAAAGCAGGCTTATGCTCTGTATACACTAGCATGGGAT GACACGATAGGACTTCGGTTTATCTTGTCTGGTCTGTAATCGGAGTAATGATGAAGAGGG ACAGTCGGGGCATTTCGTATTTTCGTAGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTACGGAAGACG AACTTCTGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTCGGGGGC TCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGA GGTGGTTTTTTATGACCTCTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGG GGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTG GAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATGGGTAGG ATTGACAGAT</p>
Cp.4	<p>TTCTCGGATACCGTAGGAACTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCGGAAGGGA CGTATTTATTAGATAAGAGGCCGACCGGGCTTGTCCCGACCTTCGGTGAATCATGATAAC TTCACGAATCGCATGGTCCAGAACCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACT TTCGACGGTAGGGTAGTGGCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTTCGA TTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA TTACCCAAATCCCAATTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCTCTGGT CGGGTAATCGGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTC TGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTA AAAAGCTCGTAGTCGGATTCGGGTGGCGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGAGTACTGGTA GGTACCACCTTCTGCCGAGGACGGGGTTCTGGGCTTAGTTGTCTGGGCCCGGAGTCGG CGATGTCACITTTAGTAAATTAGGGTGTCAAAGCAGGCTTATGCTCTGTATACACTAGC ATGGGATGACACGATAGGACTTCGGTTTATCTTGTCTGGTCTGTAATCGGAGTAATGATG AAGAGGGACAGTCGGGGCATTTCGTATTTTCGTAGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTACG GAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCAAGGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAAAGT CGGGGGCTCGAAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCGACCATAAACGAAAGGCCGACTA GGGATCGGAAGTGGTTTTTTTATGACCTCTCCGGCACCTTACGAAAGAAATCAAAA GTTTTCTGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG GGCACCACCAGGCGTGGAGCCTCGGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTTACCAGG TCCAGACATGGTAGGATTGACAGATTGATAGCTTCTTCTTGATTCTATGG</p>
Cp.5	<p>TTTCGGAAGGGGCCCCCAATAATCAGTTAAAGTTTATTGGAAGGGGTTTTCTTACTT GGGATTACCGTAGCCAAACTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCGGAAGGGACG TATTTATTAGATAAGAGGCCGACCGGGCTTGTCCCGACCTTCGGTGAATCATGATAACTT CACGAATCGCATGGTCCAGAACCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTT CGACGGTAGGGTAGTGGCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATT CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATT ACCCAAATCCCAATTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCTCTGGTCG GGTAATCGGAATGAGAACAAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTG GTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAA AAGCTCGTAGTCGGATTTCCGGTGGCGCTACCGGTCCGCCTTTGGTGAGTACTGGTAGG TACCACCTTTCTGCCGAGGACGGGGTTCTGGGCTTAGTTGTCTGGGCCCGGAGTCGGCG ATGTCACITTTAGTAAATTAGGGTGTCAAAGCAGGCTTATGCTCTGTATACACTAGCAT GGGATGACACGATAGGACTTCGGTTTATCTTGTCTGGTCTGTAATCGGAGTAATGATGAA GAGGGACAGTCGGGGCATTTCGTATTTTCGTAGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTACGGA</p>

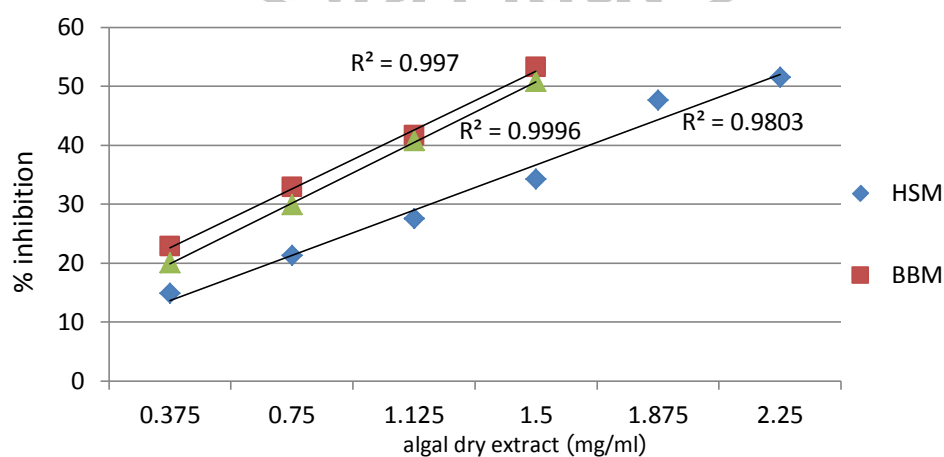
	<p>AGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTCG GGGGCTTCGAAGACGATTAGATACCGTCCGAAGTCCGACCATAAACCGATCCCGACTAG GGGATCGGAAGGTGGTTTTTTTTATGACCTCCTCCGGGCCCTTACGAAAAATCAAAGT TTTTCTGGGGTTCCGGGGGGGAAGTATGGGTCCCAAGGGCTCGAAACCTTTAAAGGGAA TTTGACGGGAAAGGGGCACCACCCAGGGGGTGGGAGCCCTGGCGGCTTTAATTTGGACT TCAACCCCGGGGAAAATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTG</p>
<p>Cp.6</p>	<p>TTCGAAAGGGCCAAAAAATCAGTTAAGTTTATTGAAGGGTTTCTTACTCGGATAACC GTAGGGAAACTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTAGGAAGGGACGTATTTATTA GATAAGAGGCCGACCGGGGCTCCGGCCCCGACCTTCGGTGAATCATGATAACTCAACGAA TCGCATGGTCTGAACCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGACGG TAGGGTAGTGGCCTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAG AGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAA ATCCCAACTCGGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATGCTCCGGCCTCTGGTCCGGTAAT CGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA GCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCGGTTAAAAAGCTC GTAGTCGGATTCGGGTGGCGCCTACCGGTCCGCCTTTGGTGAGTACTGGTAGGTACCTC CTTTCTGCCGAGGACGTGGTTCTGGGCTTGATTGTCTGGGCCCGGAGTCGGCGATGTCA CTTTGAGTAAATTAGGGTGTCAAAGCAGGCTTATGCTCTGTATACTAGCATGGGATG ACACGATAGGACTTCGGTTTATCTTGTCCGTCTGTAGGTCGGAGTAATGATGAAGAGGGA CAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTCGTAGTCAGAGGTGAAATCTTTGGATTTACGGAAAGCA ACTTCTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTCGGGGGCT CGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCGACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGAG GTGGTTTTTTATGACCTCCTCCGGCACCTACGAGAAATCAAAGTTTCTGGGTTCCGGGG GGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGG AGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGACATGGGTAGGA TTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTGGGGGTGCATGGCCCCGTTCTTAG TTGGNNGGTTGCTGGTTGCAGGGTTGATTCAAA</p>



ตารางที่ 2 ปริมาณของมวลชีวภาพ β -carotene content และ β -carotene production เมื่อเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 3 ชนิด

ชนิดอาหาร/ ระยะเวลา เพาะเลี้ยง(วัน)	มวลชีวภาพ	β -carotene content (mg/gDW ⁻¹)	β -carotene production (μ g)
HSM			
30	5.8 \pm 1.6 ^a	0.463 \pm 15.0 ^a	2.78 \pm 0.46
60	53 \pm 4 ^b	2.890 \pm 143.39 ^c	153.18 \pm 6.67
90	81.4 \pm 16.63 ^c	0.981 \pm 64.44 ^{ab}	74.61 \pm 11.9
120	154.55 \pm 15.55 ^d	1.786 \pm 158.68 ^{bc}	264.44 \pm 12.50
BBM			
30	5.4 \pm 1.94 ^a	0.371 \pm 14.96 ^a	2.35 \pm 0.12
60	14 \pm 2.55 ^b	26.405 \pm 973.61 ^c	404.87 \pm 23.28
90	21.4 \pm 1.52 ^c	12.571 \pm 408.55 ^b	263.99 \pm 14.5
120	26 \pm 1.22 ^d	13.579 \pm 356.99 ^b	344.01 \pm 9.05
Bristol			
30	2.4 \pm 0.55 ^a	0.375 \pm 7.92 ^a	0.87 \pm 0.13
60	9 \pm 1.58 ^b	22.914 \pm 1258.55 ^c	183.31 \pm 13.22
90	17.6 \pm 3.04 ^c	23.795 \pm 1347.21 ^c	388.65 \pm 44.16
120	22.2 \pm 5.06 ^d	14.663 \pm 566.51 ^b	371.47 \pm 32.05

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวยักที่กำกับที่แตกต่างกันแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลในแต่ละชนิดอาหาร ($P < 0.05$, $n = 3$, S.D. $\leq 8\%$)



รูปที่ 2 %inhibition ของสารสกัดสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล เคมีสรา รัตน์ไพบุลย์กิจ
 วัน เดือน ปีเกิด 27 มิถุนายน พ.ศ. 2534
 ที่อยู่ 172/18 หมู่ที่ 4 ต.ธรรมศาลา
 อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
 อีเมลล์ kemissara@hotmail.com
 เบอร์โทรศัพท์ 087-5635828



ประวัติการศึกษา

- 2546-2552 โรงเรียนราชินีบูรณะ จ.นครปฐม
- 2552- 2556 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม
- 2556- 2259 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม

ทุน /รางวัล

- 2556 - ทุนช่วยเหลืองานวิจัยสำหรับนักศึกษาบัณฑิตที่ผ่านการสอบโครงร่าง
งานวิจัยภายใน 1 ปีการศึกษา
- 2558 - รางวัลนักศึกษาที่ทำชื่อเสียงให้แก่คณะวิทยาศาสตร์
- รางวัลชนะเลิศอันดับที่ 3 การประกวดภาพสหายและเพลงก่ตอน ในงาน
ประชุมวิชาการสหายและเพลงก่ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 โรงแรมนารายณ์
กรุงเทพฯ
- ทุนการศึกษา “โบราณคดีทัศนาวจร”

การตีพิมพ์ผลงาน

เคมีสรา รัตน์ไพบุลย์กิจ และ ธัญนันท์ วรรณธง. 2558. การแยกเพาะเลี้ยงและการศึกษา
 รงควัสดุของสาหร่ายก่อโรคพืชสกุล *Cephaleuros*. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. ปีที่ 38 ฉบับที่ 4
 ตุลาคม – ธันวาคม. หน้า 367-382.

งานประชุมวิชาการ

นำเสนอผลงานแบบบรรยาย หัวข้อเรื่อง “การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคสกุล
Cephaleuros เพื่อการผลิตเบต้าแคโรทีน” งานประชุมวิชาการสหายและเพลงก่ตอนแห่งชาติ
 ครั้งที่ 7 วันที่ 25- 27 มีนาคม 2558 โรงแรมนารายณ์ กรุงเทพมหานคร