การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายปรสิตพืชและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries

Selection of Plant Parasitic Algae Culture Media and Genetic Relationship among *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries

เพ็ญภัสสร บรรจงศิริ

Penpadsorn Bunjongsiri

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายปรสิตพืชและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries

Selection of Plant Parasitic Algae Culture Media and Genetic Relationship among *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries

เพ็ญภัสสร บรรจงศิริ

Penpadsorn Bunjongsiri

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายปรสิตพืชและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries

ผู้เขียน นางสาวเพ็ญภัสสร บรรจงศิริ

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……………………………...………………..

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า)

คณะกรรมการสอบ

……………………….………..ประธานกรรมการ

(ดร. ธนัญชนก ไชยรินทร์)

…………………….........................กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา)

…………………….........................กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สายทอง แก้วฉาย)

…………………….........................กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

…….………………………………..……..………

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ...

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ...

(นางสาวเพ็ญภัสสร บรรจงศิริ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ..

(นางสาวเพ็ญภัสสร บรรจงศิริ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายปรสิตพืชและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries
ผู้เขียน	นางสาวเพ็ญภัสสร บรรจงศิริ
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสูตรอาหาร ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย จากการเก็บตัวอย่างสาหร่ายในพืชอาศัย 22 ตัวอย่าง จำแนกสาหร่ายได้ 7 ชนิด คือ *C. diffusus, C. expansa, C. karstenii, C. solutus, C. virescens, C. parasiticus* และ *Cephaleuros* sp. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ 7 ชนิด ได้แก่ agal culture broth (ACB), Bold’s basal medium (BBM), bristol medium (BM), high salt medium (HSM), trebouxia medium (TM), trebouxia bristol medium (TBM) และ อาหารดัดแปลง BBM พบสาหร่ายสามารถเจริญดีในอาหาร 3 ชนิดเรียงตามลำดับ คือ BBM, HSM และ BM โดยอาหาร BBM เป็นอาหารที่สาหร่ายเจริญดี HSM เจริญปานกลาง และ BM เจริญต่ำ ในขณะที่อาหารชนิดอื่นไม่พบการเจริญของสาหร่าย และผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BBM เปรียบเทียบกับอาหาร BBM ผสมฮอร์โมน Indole-3-acetic acid (IAA) 2 mg/ml พบสาหร่ายเจริญในอาหาร BBM ผสมฮอร์โมนต่างกับอาหารสูตรไม่ผสมฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการทดสอบระยะเวลาในการให้แสง (6, 12 และ 24 ชั่วโมง) พบว่าสาหร่ายมีการเจริญได้ดีที่สุดเมื่อให้แสงนาน 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับอีก 2 ช่วงเวลาดังกล่าว เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายแต่ละชนิดที่เจริญในอาหาร พบว่าสาหร่ายแต่ละชนิดมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกัน โดยโคโลนีของสาหร่าย *C. virescens, C. expansa, C. karstenii* และ *C. solutus* มีสีเขียวฟูเจริญบนอาหารสังเคราะห์ ส่วนโคโลนีของ *C. diffusus* และ *C. pilosa* มีสีเขียวอ่อน เจริญเข้าไปในวุ้นของอาหารสังเคราะห์ ซึ่งเส้นใยของสาหร่าย *C. pilosa* และ *C. virescens* มีรูปร่างทรงกระบอกยาว ส่วนสาหร่าย *C. expansa, C. karstenii* และ *C. diffusus* มี

รูปร่างเส้นใยแบบและทรงกระบอกสั้น มีการสร้างโครงสร้างคล้ายแกมีแทนเจียม ไม่พบซูอสปอร์และแกมีทบนอาหารสังเคราะห์ และในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่าย *Cephaleuros* โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 18s rRNA ผลการศึกษาพบว่า การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายโดยยีนตำแหน่ง 18s rRNA ให้ผลไม่สอดคล้องกับการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า สาหร่าย *Cephaleuros* แยกออกจากสกุลอื่น ๆ ในวงศ์ Trentepohliaceae

Thesis Title	Selection of Plant Parasitic Algae Culture Media and Genetic Relationship among *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries
Author	Miss Penpadsorn Bunjongsiri
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	2017

ABSTRACT

The research aimed to select media, optimal conditions for culture algae and phylogenetic analysis of *Cephaleuros* spp. The algal were collected from 25 host plants and identified as *C. diffusus, C. expansa, C. karstenii, C. solutus, C. virescens, C. parasiticus* and *Cephaleuros* sp. based on morphology. Algae were cultured on 7 synthetic media including algal culture broth (ACB), Bold's basal medium (BBM), bristol medium (BM), high salt medium (HSM), trebouxia medium(TM), trebouxia bristol medium (TBM) and modified Bold's basal medium. The suitable media for culture algae with high growth rate were BBM, HSM and BM, respectively, whereas algae could not grow on ACB, TM, TBM, and modified Bold's basal medium. To test effect of growth hormone, *Cephaleuros* species were cultured on BBM and BBM + 2 mg/ml IAA. The result showed that the colony of *Cephaleuros* species cultured on BBM+ IAA was wider growing with significantly difference than cultured on BBM alone. To test effect of light exposure on algal growth, *Cephaleuros* species were cultured on BBM and incubated with different light exposure (6, 12 and 24 hours). The result showed light exposure for 24 hours stimulated the growth of *Cephaleuros* species. Colony of *Cephaleuros* species on BBM were cushing-like, subaerial filament for *C. virescens, C. expansa, C. karstenii* and *C. solutus*, whereas colony of *C. diffusus* and *C. pilosa* submerged in media. Flamentous cells *of C. pilosa* and *C. virescens* were long cylindrical, whereas *C. expansa, C. karstenii* and *C. diffusus* were short cylindrical. Gametangia-like body was observed on synthetic

media but zoospores and gamete were not. The phylogenetic trees of 18s rRNA were conducted by using Mega 6 program. The result showed 18s rRNA gene sequences of *Cephaleuros* were in conflicted with morphological characteristics. Phylogenetic analyses revealed that the genus *Cephaleuros* is one of member in family Trentepohliaceae. Based on phylogenetic analyses, the *Cephaleuros* spp. are separated from other genera in family Trentepohliaceae.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำสั่งสอน ทั้งด้านการเรียน การวิจัย ด้านคุณธรรม และทักษะในด้านต่าง ๆ ตลอดจนให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง และแก้ไขจุดบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร. ธนัญชนก ไชยรินทร์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร. สายทอง แก้วฉาย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยากรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ต่อการแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณปัทมาพร อินสุวรรณโณ คุณสิริพร ศรีเจริญ และบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่าน และโครงการห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการจัดการศัตรูพืชและสรีรวิทยาของพืช ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งด้านวัสดุ อุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์ และความช่วยเหลือทางด้านงานธุรการ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และทุกคนในครอบครัวผู้เป็นแรงผลักดันและเป็นกำลังใจสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุลวงไปได้ด้วยดี

เพ็ญภัสสร บรรจงศิริ

สารบัญ

ตาราง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการตารางภาคผนวก	(12)
รายการภาพ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(14)
บทที่ 1	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	12
บทที่ 2	13
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
บทที่ 3	22
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
บทที่ 4	40
สรุปผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	47
ภาคผนวก ก	48
ภาคผนวก ข	49
ประวัติผู้เขียน	57

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
1	ประวัติการศึกษาจำนวนพืชอาศัยของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*	7
2	การเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Cephaleuros* spp. บนอาหารสังเคราะห์	22
3	เปรียบเทียบการเจริญของสาหร่ายบน BBM และ BBM ผสมกับ IAA 2 mg / L	25
4	ขนาดโคโลนีของสาหร่ายที่เจริญในระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน	25
5	ลักษณะของเส้นใยสาหร่ายแต่ละชนิดบนอาหาร BBM	28
6	การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* spp. กับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank	33

รายการตารางภาคผนวก

ตาราง **หน้า**

1 ชนิดของสาหร่ายในพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ 48

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*	4
2	วงจรชีวิตของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze	5
3	ลักษณะทัลลัสของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze	6
4	ลักษณะสำหรับการจัดกลุ่มและจำแนกชนิดของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์	15
5	ลักษณะโคโลนีของสาหร่ายบนอาหาร BBM	24
6	โคโลนีของสาหร่าย *Cephaleuros* บน BBM	26
7	โคโลนีของสาหร่ายแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร BBM ผสม 2 mg/l IAA	28
8	เส้นใยของสาหร่ายแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร BBM ผสม 2 mg/l IAA	31
9	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 18s rRNA จากตัวอย่างสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* spp.	32
10	ผลิตภัณฑ์ของการโคลนนิ่งยีน 18s rRNA ของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* spp.	33
11	แผนภูมิวิวัฒนาการของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18s rRNA	35
12	แผนภูมิวิวัฒนาการของสาหร่ายวงศ์ Trentepohliaceae ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18s rRNA	36

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

%	=	เปอร์เซ็น
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2X YT	=	2x yeast extract tryptone
ACB	=	Algae culture broth
BBM	=	Bold’s basal medium
BM	=	Bristol medium
HSM	=	High salt medium
TM	=	Trebouxia medium
TBM	=	Trebouxia bristol medium
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
LB	=	Luria bertani
NAA	=	Napthalene acetic acid
PCR	=	Polymerase chain reaction
rRNA	=	Ribosomal ribonucleic acid

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

โรคใบจุดสาหร่าย (algal leaf spot) เกิดจากสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ดำรงชีวิแบบปรสิต (parasite) ด้วยการดูดกินน้ำเลี้ยงและธาตุอาหารจากพืชเพื่อใช้ในการเจริญ โดยส่วนใหญ่พบบริเวณใบของพืชอาศัย จะพบจุดเล็ก ๆ สีเหลือง สีส้ม หรือสีเขียวตามละชนิดของสาหร่าย ผิวของสาหร่ายมีลักษณะฟูคล้ายกำมะหยี่ เส้นใยของสาหร่ายเจริญจากเนื้อเยื่อชั้นนอก (cuticle) เข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) ของพืชอาศัย ส่งผลให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตายใต้ทัลลัสของสาหร่ายที่เจริญ (Brooks, 2004) การเจริญของสาหร่ายมีการเจริญขึ้นปกคลุมใบพืชอาศัย ส่งผลต่อการกระบวนการสังเคราะห์แสงทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต ลำต้นแคระแกร็นผลผลิตลดลง (Brown, 2013) ผลกระทบที่เกิดจากสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ลดกระบวนการชีวเคมีโดย ลดอัตราการคายน้ำ และระดับของกลูโคสกับกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อของของพืชอาศัยชาส่งผลให้คุณภาพของชาลดลง (Dasgupta and Bindra, 1992, Ponmurugan et al. 2009)

ในประเทศไทยพบโรคจุดสาหร่ายครั้งแรกในส้มโอและลำไย เรียกโรคที่เกิดจากสาหร่ายว่า โรคจุดตะไคร่ ต่อมานิพนธ์ (2553) รวบรวมพืชอาศัยของสาหร่ายทั่วประเทศไทย พบพืชอาศัยของสาหร่าย *C. virescens* 83 ชนิด และมีรายงานการพบโรคจุดสาหร่ายทั่วพื้นที่ในประเทศ การแพร่กระจายของสาหร่ายส่วนใหญ่พบในพื้นที่ที่มีความชื้นสูง เช่น ทางภาคใต้ของประเทศไทย (Sunpapao et al, 2015) นอกจากการศึกษาด้านความหลากหลายของสาหร่าย ยังมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ การแสดงออกของโปรตีน และส่วนประกอบของเซลล์ในเส้นใยสาหร่าย (Ponmurugan et al. 2009) แต่อย่างไรก็ตามในการการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้บนอาหารสังเคราะห์ยังมีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากในธรรมชาติสาหร่าย *Cephaleuros* เจริญร่วมกับจุลินทรีย์อื่น ๆ ดังนั้นในการแยกเลี้ยงให้เป็นเส้นใยของสาหร่ายที่บริสุทธิ์จึงทำได้ยาก และใช้ระยะเวลานานในการการเพาะเลี้ยง ไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์ ทำให้สาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ไม่สามารถนำทดสอบคุณสมบัติของการ

เป็นโรคตามสมมติฐานของ Koch (Koch's postulate) ต่อการเกิดโรคของพืชได้ งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างองค์ประกอบของสาหร่าย และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze

ตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

สาหร่ายสกุล *Cephaleuros* เป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ดำรงชีวิตแบบปรสิตและก่อให้เกิดโรคพืช โดยสาหร่ายสกุลนี้มีการเจริญของเซลล์แบบเจริญรวมกันหลายเซลล์ (multicellular) เรียงต่อกันเป็นกลุ่มเซลล์และพัฒนาเป็นโครงสร้าง มีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูงแต่ขาดคุณสมบัติในการทำงานร่วมกันของเนื้อเยื่อ ลักษณะที่พบจึงไม่จัดเป็นราก ลำต้นและใบที่แท้จริง และเซลล์ของสาหร่ายมีสารสี (pigments) ที่ช่วยตรึงพลังงานแสงมาใช้ในการสังเคราะห์แสง สาหร่ายสกุลนี้อาศัยอยู่ใต้ชั้นคิวติเคิล (subcuticular) ชั้นอิพิเดอร์มิส (subsepidermal) และแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของพืช (intercellular) สาหร่ายสกุล *Cephaleuros* Kunze อยู่ในอาณาจักร Viridiplantae ดิวิชั่น Chlorophyta เป็นกลุ่มของสาหร่ายสีเขียว (green algae) ลำดับชั้น Ulvophyceae จัดอยู่ในอันดับ Trentepohliales (Goebel and Kunze, 1827; Stewart and Mattox, 1978; Cavalier, 1981) สาหร่ายในอันดับนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเส้นสาย (filament) และแตกกิ่งก้านสาขา (branch) ลักษณะที่แตกต่างของสาหร่ายในอันดับนี้กับสาหร่ายอันดับต่าง ๆ ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวมี 2 ประการคือ สาหร่ายในกลุ่มนี้มีสีเหลือง ส้ม แดงเนื่องจากในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ไม่มีไพรีนอยด์ (pyrenoid) เป็นองค์ประกอบ และโครงสร้างของแฟลกเจลลา (flagella) ของเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายกลุ่มนี้ไม่ได้อาศัยอยู่ในน้ำแต่อาศัยแบบกึ่งบนบก (Chapman and Henk, 1985; Vanden et al., 1995; Lopez-Bautistaet et al., 2002) สาหร่ายในอันดับนี้ประกอบด้วย 1 วงศ์คือ Trentepohliaceae แบ่งออกเป็น 5 สกุล คือ *Cephaleuros* Kunze, *Phycopeltis* Millardet, *Printzina* Thompson and Wujek, *Stomatochroon* Palm และ *Trentepohlia* Mauritius (Thompson and Wujek, 1997) โดยลักษณะที่ใช้ในการจำแนกออกจากสกุลอื่น ๆ ในวงศ์นี้คือ ก้านซูสปอร์ (sporangiospore) และสปอแรงเจียม (sporangium)

สาหร่ายสกุล *Trentepohlia* มีสีแดง เส้นใยหลาย ๆ เส้นที่ถูกบีบอัดจนมีโครงสร้างเป็นแผ่นคล้ายเปลือกหุ้ม ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วน คือส่วนที่ขนาบติดราบกับพื้นผิวและส่วนที่ยื่นออกมาจากทัลลัส ซึ่งเป็นเส้นใยที่แตกแขนงเป็นเส้นตรงหลาย ๆ เส้นเจริญอยู่บนทัลลัส มีก้านซูสปอร์ซึ่งภายในมีซูโอสปอร์อยู่ พบทั่วไปตามแหล่งที่อยู่อาศัย หิน เปลือกไม้ ใบไม้ ดิน และพื้นผิวของคอนกรีต มีการแพร่กระจายตัวกว้าง พบบริเวณพื้นที่มีอากาศหนาวเย็น และบริเวณเขตอบอุ่น (Hametner et al., 2014) สาหร่ายสกุล *Phycopeltis* มีลักษณะของทัลลัสเป็นแบบวงกลมเนื่องจากมีการแตกกิ่งและแขนง (ramuli) ออกมาจากจุดศูนย์กลางเป็นชั้น ๆ ซ้อนกัน มีการสร้าง

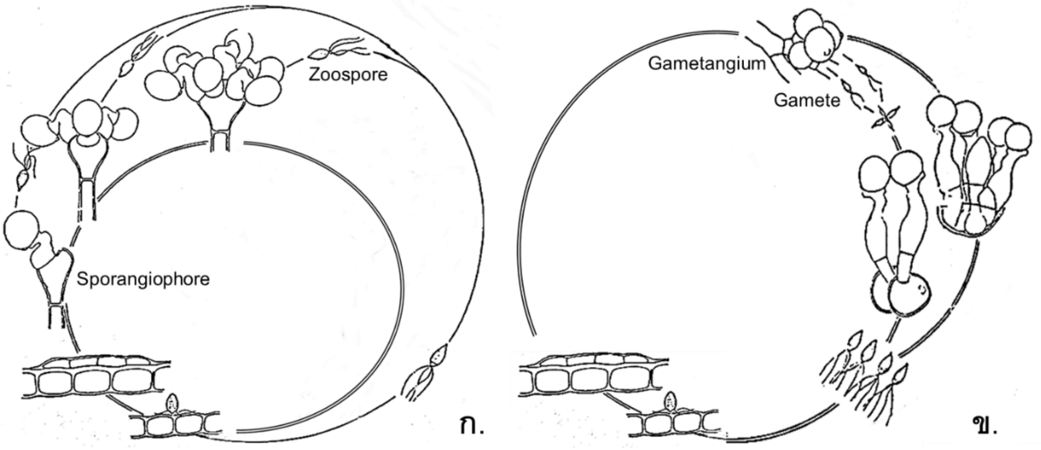
ก้านชูสปอร์ที่ใช้ในการสืบพันธุ์ยื่นออกมาจากทัลลัส พบบริเวณที่ร่มและมีความชื้นสูงเจริญบนผิวใบพืช สาหร่ายสกุล *Printzina* มีลักษณะใกล้เคียงกับ สาหร่ายสกุล *Trentepohlia* แต่แตกต่างกันที่ตำแหน่งของสปอแรงเจียมที่ยื่นออกมาด้านข้างทำให้ Thompson และ Wujek (1997) แยกสาหร่ายชนิดนี้ออกมาอยู่ในสกุลใหม่ สาหร่ายสกุล *Stomatochroon* พบบริเวณปากใบ (stomata) ของพืชอาศัยจัดเป็นปรสิตของพืชแต่ไม่พบการทำลายเนื้อเยื่อของพืชอาศัย (Liu and Hu, 2013; Zhu et al., 2014) มีแกมีแทนเจียมลักษณะเป็นรูปไข่ ทัลลัสมีขนาดใหญ่ เซลล์เดียว เจริญเข้าไปในปากใบของพืชและแผ่กระจายผ่านชั้นสปันจีมีโซฟิลล์ (spongy mesophyll) ของพืชอาศัยแล้วสร้างก้านชูสปอร์ยื่นออกมาจากปากใบ พบมากบริเวณสภาพอากาศแบบร้อนชื้น

สาหร่ายสกุล *Cephaleuros* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบด้วยเส้นใยที่รวมกลุ่มเป็นทัลลัส บนทัลลัสประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วน คือ ส่วนที่ราบไปกับพื้นผิวของพืช (prostrate system) ประกอบด้วย filamentous cells และโครงสร้างที่ชูจากทัลลัส (erect system) ประกอบด้วยก้านชูสปอร์ (sporangiophore) ซีเต้ (setae) และโครงสร้างคล้ายเส้นขน (sterile hair) จากส่วนปลายของเส้นใย (ภาพที่ 1)

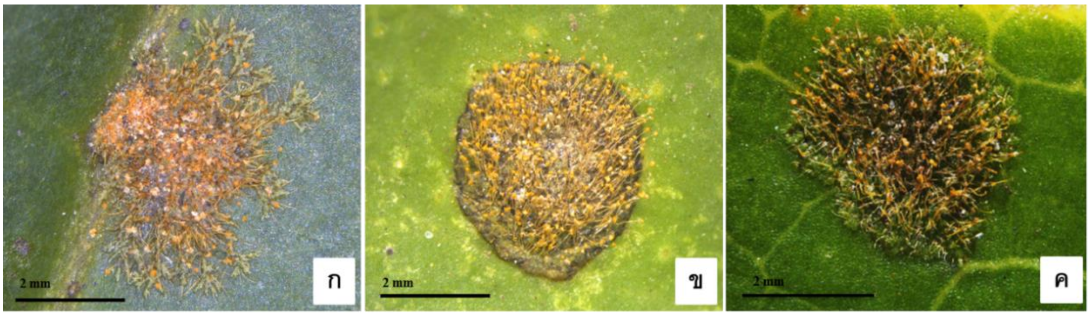
ภาพที่ 1 ลักษณะของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ก. ก้านชูสปอร์ ข. แกมีแทนเจียม (ลูกศร) และ ค. โครงสร้างคล้ายขนของสาหร่าย (ลูกศร)

สาหร่ายสกุลนี้มีการสืบพันธุ์ 2 แบบ คือ แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยสร้างซูโอสปอร์ (zoospore) มีแฟกเจลลาว่ายน้ำได้ และแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) โดยสร้างแกมีท (gamete) จากโครงสร้างแกมีแทนเจียม (gametangium) ที่เจริญอยู่บริเวณทัลลัส ชีพจักรของสาหร่ายแบบไม่อาศัยเพศคือ ซูโอสปอร์งอกเป็นเส้นใยเจริญขยายขนาดพัฒนาเป็นทัลลัส ส่วนปลายของทัลลัสมีการสร้างก้านชูสปอร์ และพัฒนาเป็น sporangiate laterals ภายในสปอแรงเจียมบรรจุซูโอสปอร์ประมาณ 8–64 ซูโอสปอร์ เมื่อมีฝนตกหรือได้รับความชื้นจากละอองน้ำที่เหมาะสมซูโอสปอร์จะถูกปล่อยเพื่อเจริญในเนื้อเยื่อพืชต่อไป (Chapman and Henk 1985; Thompson and Wujek 1997) ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

แกมีแทนเจียม พัฒนาจากส่วนปลายและด้านข้างของทัลลัส ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ที่มี 2 หาง (biflagellate gametes) มีขนาดใหญ่กว่าสองถึงสามเท่าของซูโอสปอร์ในสาหร่ายชนิดนั้น ๆ เรียกว่า แกมีท เมื่อสภาวะเหมาะสมแกมีทก็จะเข้าคู่กันแบบ isogamy คือเซลล์สืบพันธุ์รูปร่างและขนาดเหมือนกันจับคู่กัน รวมตัวกันเจริญเป็นไซโกตและสร้างสปอโรไฟท์ ภายในบรรจุไมโอสปอร์ เมื่อได้รับน้ำหรือความชื้นไมโอสปอร์จะถูกปลดปล่อยและว่ายน้ำเข้าสู่พืชอาศัยผ่านทางปากใบของพืช (Thompson and Wujek, 1997) การปลดปล่อยของแกมีทหรือซูโอสปอร์ พบมากในช่วงฤดูฝน เนื่องจากแกมีทและซูโอสปอร์อาศัยน้ำเป็นตัวพาไปยังพืชอาศัย (ภาพที่ 2) จากรายงานของ Suto และ Ohtani (2011) อธิบายว่า ทัลลัสของสาหร่ายมีการเจริญบนใบพืชอายุ 1–2 ปี โดยในช่วงฤดูใบไม้ผลิของประเทศญี่ปุ่นระหว่างเดือนมีนาคมถึงปลายเดือนพฤษภาคม เป็นช่วงที่สาหร่ายสร้างและปลดปล่อยแกมีทมาก เนื่องจากปัจจัยด้านอุณหภูมิและน้ำที่เป็นส่วนสำคัญในการเจริญของสาหร่าย แตกต่างจากช่วงฤดูร้อนในเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคมที่พบการแพร่กระจายของสาหร่ายน้อย โดยสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีลักษณะของทัลลัสที่แตกต่างกัน เช่น ทัลลัสรูปร่างกลม (circular thalli) หรือแตกแขนงแบบเปิด (open-ramulous thalli) ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายที่พบ (ภาพที่ 3) สาหร่าย *Cephaleuros* Kunze มีพืชอาศัยหลากหลายชนิด โดยมีระดับความรุนแรงแตกต่างกันตามชนิดการเข้าทำลายของสาหร่ายแบบไม่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัย



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ก. ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการสร้างซูโอสปอร์ปลดปล่อยออกจากสปอแรงเจียม และ ข. ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการสร้างแกมีแทนเจียมและในแกมีแทนเจียมมีการสร้างแกมีท อยู่ภายใน (ดัดแปลงจาก: Thompson and Wujek, 1997)



ภาพที่ 3 ลักษณะทัลลัสของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ก. ทัลลัสแตกแขนงแบบเปิด ข. ทัลลัสรูปร่างกลม และ ค. ทัลลัสรูปร่างไม่แน่นอน

ผลกระทบของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

สาหร่ายสกุล *Cephaleuros* พบในพืชอาศัยหลายชนิด อาการและความเสียหายที่เกิดกับพืชอาศัยมีความแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของสาหร่าย พืชอาศัย และสภาพแวดล้อม ผลกระทบของสาหร่ายมีสาเหตุจาก การดูดน้ำและแร่ธาตุจากพืชอาศัย ผลที่ตามมาคือทำให้เนื้อเยื่อพืชแห้งและตาย (Wolf, 1930) หลั่งสารพิษทุติยภูมิที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชอาศัย (Jourbert and Rijkenberge,1971) และบดบังการสังเคราะห์แสงของพืชทำให้ผลผลิตและคุณภาพของพืชลดลง (Safeeulla and Govindu, 1948) จากกรรมวิธีของ Brooks (2004) ประเมินความรุนแรงของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* บริเวณที่เจริญบนพืชและความเสียหายของสาหร่ายในพืชอาศัย ซึ่งสาหร่ายชนิดนี้อาศัยใต้ชั้นคิวติเคิล ชั้นอิพิเดอมิส และแทรกระหว่างเซลล์พืช ส่งผลให้พืชอาศัยสูญเสียพื้นที่ในการสังเคราะห์แสง สูญเสียแร่ธาตุอาหารในการดำรงชีวิต และทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่เข้าทำลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้งตาย

มีการศึกษาผลกระทบของโรคใบจุดสาหร่ายในฮาวาย พบว่า *C. parasiticus* สร้างความเสียหายให้แก่ฝรั่งอย่างรุนแรง โดยการเข้าทำลายผิวใบและผลของฝรั่งเกิดจุดและเนื้อเยื่อรอบ ๆ ตาย เกิดการยุบตัวของเนื้อเยื่อ ทำให้ผิวของผลฝรั่งแตก ไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ (Nelson, 2008) และจากรายงานของ Ponmurugan และคณะ (2009) ในประเทศอินเดียพบว่าสาหร่าย *C. parasiticus* สร้างความเสียหายต่อการปลูกชาในประเทศอินเดีย โดยเปรียบเทียบกับระดับความรุนแรงของสาหร่ายด้วย A four-point necrosis index (Brooks, 2004) ซึ่งการเข้าทำลายใบชาพบว่ามีความรุนแรงเท่ากับระดับ 3 ทำให้ใบชาเกิดความผิดปกติ เนื้อเยื่อ

ตาย ลดพื้นที่ในการสังเคราะห์แสง ต้นชาเสื่อมโทรม คุณภาพของชาลดลง และยังลดกระบวนการทางสรีระวิทยาและกระบวนการทางชีวเคมีในใบชาอีกด้วย

พืชอาศัยของสาหร่าย *Cephaleuros*

สาหร่ายสกุล *Cephaleuros* อาศัยอยู่บนพืชอาศัยหลากหลายชนิด พบบนพืชยืนต้นหลาย ๆ วงศ์ ดำรงชีวิตแบบปรสิตโดยการดูดกินน้ำและธาตุอาหารจากพืช อย่างไรก็ตามสาหร่ายชนิดนี้ไม่มีความเฉพาะเจาะจงของชนิดกับพืชอาศัย ซึ่งสรุปการศึกษาพืชอาศัยของสาหร่าย *Cephaleuros* ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประวัติการศึกษาจำนวนพืชอาศัยของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

จำนวนชนิดพืชอาศัย	อ้างอิง
สาหร่าย *Cephaleuros* สร้างความเสียหายในพืชอาศัย 448 ชนิด ในรัฐเปร์นัมบูกู ประเทศบราซิล	Batista and Lima, 1949
พบพืชอาศัยของสาหร่าย 35 ชนิด ในประเทศญี่ปุ่น	Ezuka and Kibushi, 1956
พบพืชอาศัย 165 ชนิด 56 วงศ์ แบ่งออกเป็นพืชใบกว้าง เฟิร์น ปาล์ม ปรง และไม้ผล	Marlatt and Alfieri, 1981
พบพืชอาศัยของสาหร่าย 69 ชนิด ในประเทศไต้หวัน	Hsieh, 1983
พบพืชอาศัย 44 ชนิด ในสมุนไพรของประเทศบลาซิล	Almeida et al, 1985
พบพืชอาศัย 167 ชนิด ในประเทศสหรัฐอเมริกา	Holcomb, 1986
พบพืชอาศัย 146 ชนิด และศึกษาการเกิดโรคของสาหร่ายปรสิตพืชและความสัมพันธ์ของ *Cephaleuros* กับเชื้อราในหมู่เกาะซามัว	Brooks, 2004
พบพืชอาศัย 37 ชนิด ในโคลัมเบียประเทศสหรัฐอเมริกา	Pardo, 2004
พบพืชอาศัยของสาหร่าย 3 ชนิดในฮาวาย และศึกษาวงจรชีวิตของสาหร่ายตลอดจนอิทธิพลของสาหร่ายต่อพืชอาศัย	Scot, 2008
พบโรคจุดสาหร่ายบนต้นไทร ในประเทศเกาหลี	Han et al, 2011
พบพืชอาศัย 38 วงศ์ และศึกษาพัฒนาการของสาหร่าย ในประเทศอินเดีย	Muthukumar et al, 2014

การศึกษาในประเทศไทยพบสาหร่าย *C. virescens* ในพืชอาศัย 74 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นพืชใบกว้างและไม้ผล (นิพนธ์, 2553) Pitaloka (2014) ศึกษาด้านอนุกรมวิธานและการจำแนกชนิดของสาหร่ายในทุเรียน Sunpapao และคณะ (2015) รายงานสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ที่พบในประเทศไทยเพิ่มเติม 5 ชนิด ได้แก่ *C. diffusus, C. expansa, C. karstenii, C. solutus* และ *C. virescens* ซึ่งสาหร่าย *C. virescens* มีพืชอาศัยกว้างที่สุด และพบแพร่กระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย บริเวณที่มีการแพร่กระจายตัวดีที่สุดอยู่ในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ระหว่างเส้นรุ้งที่ 32 องศาเหนือ ถึงเส้นรุ้งที่ 32 องศาใต้ (แอฟริกา อินเดีย จีน ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย ละตินอเมริกา และสหรัฐอเมริกา) และในบริเวณเขตอบอุ่นที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม ก็สามารถพบสาหร่ายสกุลนี้ได้เช่นกัน (Yadav, 1953; Joubert and Rijkenberg, 1971; Marlatt and Alfieri, 1981; Suto and Othani, 2009)

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros*

สาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ได้ Ponmurugan และคณะ (2009) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายปรสิตพืช *C. parasiticus* ในใบชา โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์ 10 ชนิด คือ 1) algal culture medium, 2) algal proteose medium, 3) blue green-11 medium, 4) bristol medium, 5) george medium, 6) go algal medium, 7) potato glucose medium, 8) trebouxia medium, 9) tea leaf extract medium และ10) tea stem extract medium พบว่าอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายมี 3 สูตรคือ อาหารสูตร bristol medium, trebouxia medium และ tea leaf extract medium (อาหารที่มีส่วนผสมของใบชา) โดยควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง สาหร่าย *C. parasiticus* มีการสร้างโครงสร้างของเส้นใย ก้านซูสปอร์ เหมือนในสภาพธรรมชาติ ไม่มีโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์ แต่เมื่อเติมฮอร์โมนออกซิน (auxin) ได้แก่ IAA, IBA, 2,4-D และ NAA ลงไปในอาหารสังเคราะห์ ส่งผลให้สาหร่ายสามารถเจริญได้รวดเร็ว และสร้างโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์หรือซูโอสปอร์ในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งข้อสังเกตนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Suto และ Ohtani (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* บนอาหารสังเคราะห์สูตร Bold's basal medium และ CA medium ใน

ระยะแรกไม่พบโครงสร้างในการสืบพันธุ์ แต่จะพบแกมีแทนเจียม และสปอแรงเจียมเมื่อมีการเติมฮอร์โมนออกซินลงในอาหารสังเคราะห์ นอกจากนี้ส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์ก็มีผลต่อการเจริญโดยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นส่วนสำคัญในการเจริญของสาหร่าย นอกจากนี้ธาตุอื่น ๆ เช่น ฟอตเฟส แคลเซียม แมงกานีส โบรอน ทองแดง และสังกะสี ต่างมีความสำคัญสำหรับการเจริญ และพัฒนาของสาหร่าย *C. parasiticus* แม้ต้องการเพียงปริมาณเล็กน้อย (Peterson and Barris, 1978)

Suto และ Ohtani (2011) เพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* บนอาหารสังเคราะห์ BBM พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย จึงได้เติมสารเคมีกลุ่ม benzimidazole ความเข้มข้น 20-50 ppm ผสมไปในอาหาร และทำการแยกสาหร่ายซ้ำ ๆ ลงอาหารใหม่ทุกครั้งที่มีการปนเปื้อน เพื่อให้ได้โคโลนีที่บริสุทธิ์

เขมิสรา และธัญนันท์ (2558) ศึกษาคุณสมบัติและรงควัตถุในสาหร่ายโดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 2 สูตร คือ HSM และ BM พบว่าสาหร่ายที่ทำการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ BM พบเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุหลักเพียงชนิดเดียว ต่างจากการเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร HSM ที่พบว่าสาหร่ายสร้างลูทีน (lutein) คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) และเบต้าแคโรทีน (β-carotein) อันเนื่องมาจากความเครียดของการได้รับแหล่งพลังงานต่างกัน โดยอาหาร BM มีแหล่งไนโตรเจนจากโซเดียมไนเตรต ขณะที่อาหาร HSM มีแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมคลอไรด์ ส่งผลให้การเผาผลาญอาหาร (metabolism) ของเซลล์สาหร่ายมีความต่างกัน โดยการเผาผลาญโซเดียมไนเตรตถูกนำไปใช้ได้ยากกว่าการเผาผลาญแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน สภาวะนี้ส่งผลให้สาหร่ายเกิดความเครียดและตอบสนองด้วยการสะสมรงควัตถุชนิดเบต้าแคโรทีนในปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา Ponmurugan และคณะ (2009) พบองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย *C. parasiticus* ประกอบด้วยแคโรทีนอยด์ (carotenoid) น้ำตาล (sugar) ไนโตรเจน (nitrogen) โปรตีน (protein) กรดอะมิโน (amino acids) โพลีฟีนอล (polyphenol) แคทีชิน (catechin) ไขมัน (lipid) จากองค์ประกอบทั้งหมด น้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่สำคัญโดยประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์และนอนรีดิวซ์ และพบกรดอะมิโนจำนวน 15 ชนิด ได้แก่ อาร์จีนีน แอสพาราจีน กรดแอสพาร์ติก กรดกลูตามิก กลูตามีน ไกลซีน ฮิสทิดีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน โพรลีน ซีรีน ธรีโอนีน ทริปโตเฟน ไทโรซีน และวาลีน การศึกษาองค์ประกอบของสาหร่าย

สกุล *Cephaleuros* พบว่าสาหร่ายมีการผลิตสารหลากหลายชนิดที่มีความน่าสนใจ โดยเฉพาะการผลิตแคโรทีนอยด์ชนิดที่มีมูลค่าสูงในทางเศรษฐกิจ ซึ่งในอนาคตอาจนำมาใช้ประโยชน์โดยเป็นแหล่งอาหารชนิดใหม่ (เขมิสรา และธัญนันท์, 2558; Cuellar et al., 2015)

การศึกษาด้านชีวโมเลกุลของสาหร่าย *Cephaleuros*

ในปัจจุบันมีการศึกษาระบุชนิดของสาหร่าย ได้มีการนำเทคนิคด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนก โดยนิยมใช้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของสาหร่ายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรส (Polymerase chain reaction) (Hebert et al., 2003) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการระบุชนิดของสาหร่ายส่วนใหญ่ คือ ตำแหน่ง 18s nuclear small subunit rRNA (18s SSU rRNA), ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbc*L) เป็นต้น (Lopez-Bautista et al., 2002, Rindi et al., 2009)

Zechmen และคณะ (1990) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายในดิวิชั่น Chlorophyta ที่ตำแหน่งยีน SSU rRNA สามารถแบ่งกลุ่มของสาหร่ายในอันดับ Charophyceae, Embryophytes และ Ulvophyceae ในดิวิชั่น Chlorophyta ออกจากกันได้ ต่อมา Lopez และ Chapman (2003) ศึกษาตำแหน่งยีน SSU rDNA ของสาหร่ายในลำดับชั้น Ulvophyceae พบว่าสาหร่ายวงศ์ Trentepohliaceae แยกกลุ่มออกจากสาหร่ายในวงศ์ Chlorophyceae และ Pleurastrophyceae ได้ชัดเจน และมีการแบ่งกลุ่มย่อยสาหร่าย *Cephaleuros* และ *Printzina* ในวงศ์ Trentepohliaceae ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน จากนั้นในปี 2006 Lopez-Bautista และคณะ ได้ศึกษาตำแหน่งยีน rDNA ของสาหร่ายในวงศ์ Trentepohliaceae เพิ่มเติม และสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ พบว่าสาหร่าย *Trentepohlia*, *Printzina*, *Phycopeltis* และ *Cephaleuros* จัดในกลุ่มเดียวกันและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน

Rindi และคณะ (2009) ได้จำแนกชนิดของสาหร่ายในวงศ์ Trentepohliaceae โดยเน้นสาหร่ายสกุล *Trentepohlia* และ *Printzina* ใช้ลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ศึกษาตำแหน่งยีน 18S rRNA และ *rbc*L พบว่าสามารถจำแนกสาหร่ายสกุล

Trentepohlia ออกจากสาหร่ายสกุลอื่นในวงศ์ Trentepohliaceae ได้ และเมื่อสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสกุล *Trentepohlia* มีความใกล้ชิดกับสาหร่ายสกุล *Printzina* ดังนั้นการศึกษายีนตำแหน่ง 18S rRNA และ *rbc*L สามารถใช้จัดกลุ่มหรือจำแนกสาหร่ายในวงศ์ Trentepohliaceae ได้

Suutari และคณะ (2010) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายในในดิวิชั่น Chlorophyta บริเวณ 18S rRNA จากตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมด 71 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าสามารถระบุชนิดของสาหร่ายได้ และจากการสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการสามารถแยกสาหร่ายในอันดับ Trentepohliales ออกจากสาหร่ายอันดับอื่น ๆ ในดิวิชั่น Chlorophyta

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทราบชนิดอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries

2. เพื่อทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสังเคราะห์และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์

เก็บตัวอย่างใบพืชที่มีจุดสีส้มฟูบนใบพืชชนิดต่าง ๆ บริเวณอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มาจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเปรียบเทียบกับคีย์ชนิดสาหร่ายของ Thompson and Wujek (1997) โดยนำตัวอย่างใบพืชที่เก็บมาส่องดูใต้กล้องสเตอริโอ (stereo microscope, SZ30, Olympus, Japan) เพื่อดูลักษณะและขนาดของแผล จากนั้นลอกบริเวณทัลลัสออก ด้วยใบมีดปลายแหลม วางบนสไลด์ หยด lactophenol และนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound microscope, CH30RF200, Olympus, Japan) เพื่อดูลักษณะของทัลลัส ตำแหน่งที่ทัลลัสเจริญบนของเนื้อเยื่อ ตำแหน่งของ สปอแรงเจียมที่สร้างบนก้านชูสปอร์ หลังจากนั้นบันทึกลักษณะและวัดขนาดของทัลลัส เซลล์เส้นใย ก้านชูสปอร์ แกมีแทนเจียม แกมีทซีเต้ และโครงสร้างคล้ายเส้นขน (sterile hair) จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาตัดตามขวางเพื่อดู thallus growth habit โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่างต่อ 1 ลักษณะ (n=30)

นำสาหร่ายไปคัดแยกให้บริสุทธิ์โดยขั้นตอนการเพาะเลี้ยงตามวิธีการของ Suto and Ohtani (2011) นำใบพืชที่มีสาหร่ายเจริญมาทำความสะอาดโดยล้างในน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำความสะอาดชิ้นส่วนใบพืชโดยเช็ดด้วยกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ล้างใบพืชที่มีสาหร่ายใน 70% แอลกอฮอล์ ที่เติม 1% Tween 80 เป็นเวลา 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ลอกชิ้นส่วนทัลลัสของสาหร่ายบนใบพืชอาศัยจนได้สาหร่ายที่บริสุทธิ์ นำชิ้นส่วนทัลลัสไปวางบนอาหาร ACB (Lembi and Waaland, 1988), BBM (Bischoff and Bold, 1963), BM (Bold, 1949), HSM (Sueoka et al., 1960), TM (Atlas and Parks, 1997), TBM (Keller and Guillard, 1985) และ อาหารดัดแปลง Bold's basal medium (ภาคผนวก ข) บ่มจานเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 25–32 องศาเซลเซียส โดยให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับบ่มในที่มืด

12 ชั่วโมง ระยะเวลา 3–6 เดือน สังเกตการเจริญของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์แต่ละชนิด วัดขนาดโคโลนี ขนาดเส้นใย และมุมแตกแขนงของเส้นใย เปรียบเทียบการเจริญ (growth) และไม่เจริญ (no growth) บนอาหารสังเคราะห์แต่ละชนิด

1.2 การศึกษาปัจจัยของฮอร์โมนและแสงที่ส่งเสริมการเจริญของสาหร่าย

เตรียมอาหารที่คัดเลือกจาก 1.1 โดยคัดเลือกอาหารที่สาหร่ายมีการเจริญเป็นอาหารพื้นฐาน จากนั้นผสม 2 mg/l IAA ทำการถ่ายเส้นใยของสาหร่าย 7 ชนิดลงในอาหาร บ่มจานเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส โดยให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับบ่มในที่มืด 12 ชั่วโมง ระยะเวลา 1 เดือน วัดขนาดโคโลนีของสาหร่ายที่เจริญบนอาหารสังเคราะห์ หลังจากนั้นนำสาหร่าย 7 ชนิดที่เจริญมาทำการทดสอบปัจจัยของแสงที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย โดยการให้แสงต่างกันในช่วง 3 เวลา คือ ช่วงเวลาที่ 1 คือ ให้แสง 6 ชั่วโมง สลับกับบ่มในที่มืด 18 ชั่วโมง ช่วงเวลาที่ 2 ให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับบ่มในที่มืด 12 ชั่วโมง และ ช่วงเวลาที่ 3 คือ ให้แสง 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสาหร่ายและวัดขนาดโคโลนีของสาหร่ายที่เจริญของสาหร่ายทุกสัปดาห์ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าสถิติโดยโปรแกรม SPSS version 16.0 เพื่อหาค่าความแตกต่างระหว่างฮอร์โมนและแสงที่ส่งผลต่อการเจริญของสาหร่าย โดยวัดขนาดโคโลนีของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์

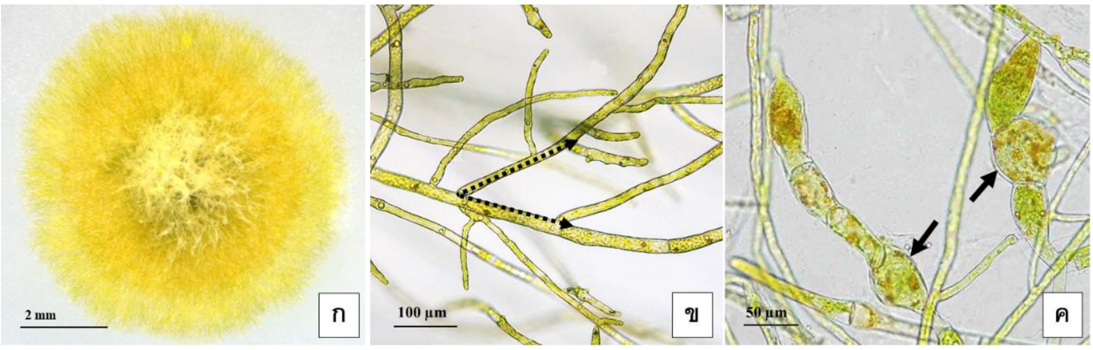
1.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Cephaleuros* บนอาหารสังเคราะห์

เลี้ยงสาหร่ายบนอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 1.1 นำสาหร่ายที่เจริญมาศึกษาลักษณะโครงสร้างเทียบเคียงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการทำสไลด์สด (wet mount) เพื่อนำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ดังแสดงในภาพที่ 4 ทำการวัดขนาดของเส้นใย วัดอัตราความกว้างต่อความยาวของเส้นใย และตรวจดูองค์ประกอบโครงสร้างคล้ายแกมีแทนเจีย (gametangia-like body) จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 30 ซ้ำต่อ 1 ลักษณะ (n = 30) ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าสถิติโดยโปรแกรม SPSS version 16.0 เพื่อหาค่าความแตกต่างระหว่างชนิดของสาหร่าย โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสังเคราะห์ ซึ่งลักษณะสำหรับการจัดกลุ่มและจำแนกชนิดของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์ ประกอบด้วย

1.3.1 ตำแหน่งการเจริญของโคโลนีสาหร่าย มีการเจริญบนอาหารหรือเจริญในอาหาร

1.3.2 เส้นใยสาหร่ายมีรูปร่างทรงกระบอกสั้น ทรงกระบอกยาว และการแตกแขนงของเส้นใยสาหร่าย วัดอัตราความกว้างต่อความยาวของเส้นใย และเก็บข้อมูลการแตกแขนงของเส้นใย

1.3.3 องค์ประกอบคล้ายโครงสร้างคล้ายแกมีแทนเจีย (gametangia-like body) ของสาหร่าย



ภาพที่ 4 ลักษณะสำหรับการจัดกลุ่มและจำแนกชนิดของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์ ก. การเจริญของโคโลนีสาหร่าย ข. มุมการแตกแขนงของสาหร่าย และ ค. ลักษณะโครงสร้างคล้ายแกมีแทนเจีย (gametangia-like body)

2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

2.1 การสกัดดีเอ็นเอของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) ในการสกัดดีเอ็นเอ ใช้แท่งปลายแหลมขูดเส้นใยของสาหร่ายที่เจริญบนอาหารสังเคราะห์ นำไปใส่หลอดเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บดโดยใช้แท่งพลาสติกขนาดเล็ก (micro pestle) ในหลอดเซนติฟิวก์ให้เซลล์แตก บ่มตัวอย่างไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าตัวอย่างไปมาทุก ๆ 10 นาที แล้วกำจัดโปรตีนปนเปื้อนต่าง ๆ โดยเติม CIA (chloroform isoamyl) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าให้เข้ากัน 2–3 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดเซนติฟิวก์หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนที่อยู่ก้นหลอดด้วย 75% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากก้นหลอด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ DNase และ RNase ตรวจการปรากฏของดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส (gel electrophoresis)

2.2 **เจลอิเล็กโตรโฟเรซีส** (gel electrophoresis)

ตรวจสอบดีเอ็นเอของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการเตรียมเจล ใช้อะกาโรส (agaros) ความเข้มข้น 1.0% เป็นตัวกลาง ชั่งอะกาโรส 0.5 กรัม ผสมลงใน 0.5% TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในเตาไมโครเวฟด้วยไฟอ่อน จนอะกาโรสละลาย เทลงในถาดเจล ทิ้งไว้ประมาณ 30–45 นาที ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยผสมดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ loading dye (GenedireX, China) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบนแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm)

เมื่อเตรียมเจลและตัวอย่างเสร็จแล้ว นำถาดเจลวางลงบน gel tank ที่บรรจุใน 0.5% TBE buffer ให้เจลจมอยู่ใต้ TBE buffer หยอด 1 kB DNA marker (GenedireX, China) 3 ไมโครลิตร และตัวอย่างที่เตรียมไว้ 6 ไมโครลิตร ลงในช่อง (well) ของเจลตามลำดับ ปิดถังเจลแล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 20 นาที เมื่อครบเวลานำเจลมาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator (GenedireX, Taiwan)

2.3 **ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Polymerase chain reaction; PCR)

เป็นกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในตำแหน่ง 18s rRNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PNS1 (F) (5’-CCAAGCTTGAATTCGTAGTCATATGCTTGTC-3’) และ NS41 (R) (5’-CCCGTGTTGAGTCAAATTA-3’) (Hamby et al, 1988) โดยใช้ในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร

ประกอบด้วย DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) 25 ไมโครลิตร (Thermo Scientific, USA) DNA template 2 ไมโครลิตร Forward Primers 1 ไมโครลิตร Reward Primers 1 ไมโครลิตร และ Nuclease-free water 21 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง Thermal Cycler รุ่น T100™ (Bio-Rad, USA) ตั้งค่าโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ
2) denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
3) annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2–4 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนที่ 5 จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1 % กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้ UV transilluminator (GenedireX, Taiwan)

2.4 การโคลนยีน (gene cloning)

2.4.1 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR มาผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร (อัตราส่วน loading dye: DNA, 2:4) จากนั้นนำมาแยกโดยกรรมวิธี agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปดูแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง UV transilluminator ตัดเจลบริเวณที่มีดีเอ็นเอใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ชั่งน้ำหนัก แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit ทำตามคำแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต (QIAGEN, USA) ดังนี้ เติม Buffer QC ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พลิกหลอดไปมา เมื่อเจลละลายหมด เติม sodium acetate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร vortex ทุก ๆ 2–3 นาที จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา ย้ายของเหลวลงหลอดคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ใส่ buffer QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใสด้านล่าง ใส่ buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่น

เหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ใส่ buffer EB 50 ไมโครลิตร ตรงกลางของเมมแบรน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที แล้วใส่ buffer EB 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1%

2.4.2 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสาหร่ายกับพลาสมิด (ligation)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.4.1 เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด RBC TA cloning kit (RBCBioscience, Taiwan) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase (RBCBioscience, Taiwan) โดยเตรียมสารละลายต่าง ๆ ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ligation buffer A ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ligation buffer B ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, RBC TA cloning Vector ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, PCR product 5 ไมโครลิตร และ T4 DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จะได้รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA)

2.4.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นคอมพีเทนต์เซลล์

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (หลอดตั้งต้น) นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เลือกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* เลี้ยงในอาหาร 2X YT ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียผสมที่ได้ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (METASH, China) ที่ช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density) ที่ 0.2–0.4 นำมาใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทส่วนสารละลายทิ้ง เติม RF1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง เติม RF2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ จากนั้นแบ่งส่วนผสมของคอมพีเทนต์เซลล์ใส่

หลอดไมโครไมโครเซนติฟิวก์ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.4.4 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย (Transformation)

การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock โดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook (2001) โดยนำคอมพิเทนต์เซลล์ (จากข้อ 2.4.3) วางบนน้ำแข็ง และรอคอมพิเทนต์เซลล์ เติมรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (จากข้อ 2.4.2) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้คอมพิเทนต์เซลล์และรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้ากัน บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที แล้วย้ายแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที เติมอาหารเหลว SOC (super optimal broth with catabolite repression) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำคอมพิเทนต์เซลล์ที่เขย่าครบ 1 ชั่วโมงมา spread เชื้อบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal (5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-d-galactopyranoside) เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (isopropylthiogalactoside) เข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว สีขาวขุ่น โดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ X-gal แสดงออก

2.4.5 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยวิธี colony PCR

เลือกโคโลนีสีขาวของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ประมาณ 5–7 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่างของสาหร่าย ใช้ทิปผ่านการฆ่าเชื้อแตะโคโลนีสีขาวผสมลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB 200 ไมโครลิตร ผสมแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนเชื้อที่เขย่าเลี้ยงมีสีขาวขุ่น หลังจากนั้นตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

2.4.6 การสกัดพลาสมิด

เพิ่มปริมาณ *E. coli* โดยดูดเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (จากข้อ 2.4.5) มาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ที่ผสมผสมแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใส่ทิ้งและเก็บตะกอนเพื่อสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด GeneJET TM Plasmid miniprep kit (Thermo scientific, USA) โดยเติม resuspension buffer 250 ไมโครลิตร lysis buffer 250 ไมโครลิตร neutralization 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายลงหลอด spin column โดยดูดส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำของเหลวด้านล่างทิ้ง เติม wash solution 500 ไมโครลิตร ทิ้งของเหลวในหลอดด้านล่าง ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้าย column ลงในหลอดไมโคร เซนติฟิวก์พลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผึ่งให้แห้ง เป็นเวลา 5 นาที เติม elution buffer 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำพลาสมิดที่ได้มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำพลาสมิดที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.5.1 การวิเคราะห์ Sequence

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนไปวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลีใต้) โดยใช้ไพรเมอร์ M13 ที่มีลำดับเบสดังนี้

M13 Forward primer (24mer): 5’-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3’

M13 Reverse primer (22mer): 5’-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3’

2.5.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลของสาหร่ายที่ฝากไว้ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อเทียบเคียงหาชนิดของสาหร่ายที่ค่าความเหมือน (identity and similarity) ที่ 97% (Suutari et al, 2010)

2.5.3 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่าย

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (จากข้อ 2.5.2) และ type strain จาก GenBank มาจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม ClustalW version 2.1 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) เพื่อปรับแต่งลำดับเบสโดยโปรแกรม BioEdit version 7.2.5 แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างแล้วสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม Mega vesion 7.0

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสังเคราะห์และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์

ผลจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายจากพืชอาศัย 22 ชนิด จำแนกชนิดของสาหร่ายโดยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 7 ชนิด คือ *C. diffusus*, *C. expansa*, *C. karstenii*, *C. solutus*, *C. pilosa*, *C. virescens* และ *Cephaleuros* sp. ซึ่งก่อให้เกิดโรคจุดสาหร่ายในพืช และผลจากการศึกษาการเจริญของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์ 7 ชนิด หลังจากบ่มสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 3–6 เดือน พบโคโลนีสีเขียวฟูของสาหร่ายทั้ง 22 ตัวอย่าง สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร BBM เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหารชนิดอื่น ๆ รองลงมาคือ อาหาร HSM เจริญในระดับกลาง และอาหาร BM เจริญในระดับต่ำ ในขณะที่อาหารสังเคราะห์สูตร ACB, TM, TBM และอาหารดัดแปลง BBM ไม่พบเส้นใยหรือการเจริญของสาหร่าย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Cephaleuros* spp. บนอาหารสังเคราะห์

ชนิดสาหร่าย	อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย[1/]						
	ACB	BBM	BM	HSM	TM	TBM	BBM[**]
C.diffusus							
จิก (C3)	-	+++	+	++	-	-	-
ผักเหมียง (C10)	-	+++	+	+	-	-	-
C. expansa							
แก้ว (C18)	-	+++	+	++	-	-	-
C. karstenii							
โกโก้ (C22)	-	+++	-	+	-	-	-
ตะแบกนา (C13)	-	+++	-	-	-	-	-

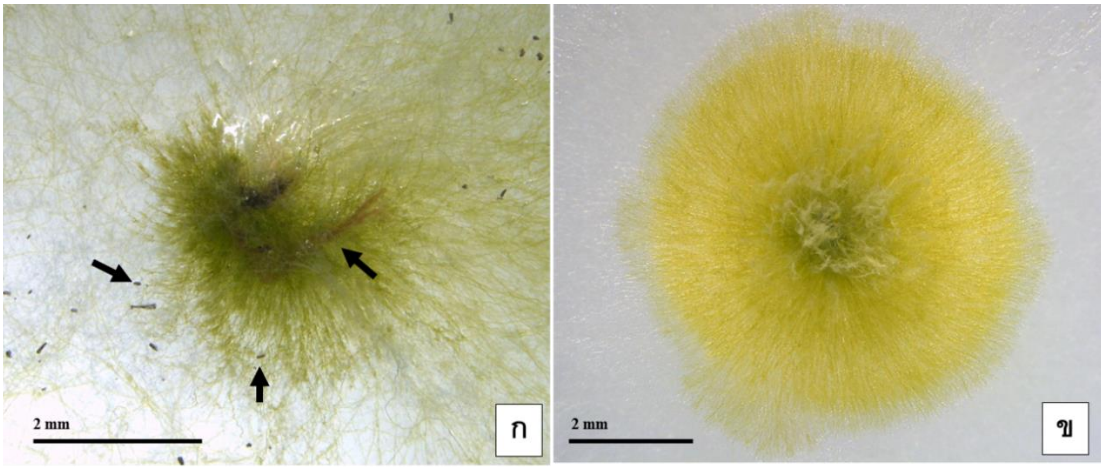
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Cephaleuros* spp. บนอาหารสังเคราะห์ (ต่อ)

ชนิดสาหร่าย	อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย[1/]						
	ACB	BBM	BM	HSM	TM	TBM	BBM[**]
C. parasiticus							
มังคุด (C9)	-	+++	+	++	-	-	-
C. solutus							
ทุเรียน (C7)	-	+++	+	++	-	-	-
C. virescens							
กระตังแดง (C14)	-	+++	+	++	-	-	-
เงาะ (C19)	-	+++	+	++	-	-	-
ข่อย (C21)							
จำปาดะ (C2)	-	+++	-	+	-	-	-
จำปี (C15)	-	+++	+	++	-	-	-
เชียด (C4)	-	+++	+	++	-	-	-
ทุเรียนเทศ (C1)	-	+++	-	+	-	-	-
พิกุล (C17)	-	+++	+	++	-	-	-
มะนาว (C6)	-	+++	-	-	-	-	-
มะม่วง (C16)	-	+++	+	++	-	-	-
ยางพารา (C11)	-	+++	-	-	-	-	-
ลูกฉิ่ง (C8)	-	+++	-	-	-	-	-
อบเชย (C5)	-	+++	-	-	-	-	-
Cephaleuros sp.							
พริกไทย (C20)	-	+++	+	++	-	-	-
ลองกอง (C13)	-	+++	+	++	-	-	-

[1/]+++ เจริญในระดับดี (ขนาดโคโลนี > 2 mm), ++ เจริญในระดับปานกลาง (ขนาดโคโลนี 1–2 mm), + เจริญในระดับต่ำ และ - ไม่มีการเจริญ

*algal culture broth (ACB), Bold's basal medium (BBM), bristol medium (BM), high salt medium (HSM), trebouxia medium(TM), trebouxia bristol medium (TBM) และ อาหารดัดแปลง Bold's basal medium (BBM[**])

สาหร่ายแต่ละชนิดมีการเจริญในอาหารที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายพบปัญหาที่สำคัญคือ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในช่วงแรกที่แยกจากพืชอาศัย พบกลุ่มเส้นใยของเชื้อราสีขาว หรือสีดำ หรือแบคทีเรีย แทรกในโคโลนีของสาหร่าย ซึ่งเชื้อรามีการเจริญรวดเร็วกว่าสาหร่ายทำให้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ (ภาพที่ 5ก) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ทำการถ่ายเส้นใยสาหร่ายซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ได้สาหร่ายที่บริสุทธิ์ โดยถ่ายลงอาหารใหม่ทุก ๆ 3 สัปดาห์ เพื่อให้ได้โคโลนีของสาหร่ายที่บริสุทธิ์ (ภาพที่ 5ข)



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของสาหร่ายบนอาหาร BBM ก. โคโลนีของสาหร่ายที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และเชื้อรา (ลูกศร) และ ข. โคโลนีของสาหร่ายที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

1.2 **การศึกษาปัจจัยของฮอร์โมนและแสงที่ส่งเสริมการเจริญของสาหร่าย**

การศึกษาปัจจัยของฮอร์โมนและแสงที่มีผลต่อการเจริญ โดยเพิ่มปริมาณสาหร่ายในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร BBM ผสม 2 mg/l IAA เปรียบเทียบกับอาหาร BBM สูตรปกติ พบว่าสาหร่ายมีขนาดโคโลนีที่โตกว่า (ตารางที่ 3) สาหร่ายทุกชนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ผสมฮอร์โมน IAA ไม่พบโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แต่มีการเจริญได้รวดเร็วเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ผสมฮอร์โมน

การทดลองปัจจัยของแสงที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายโดยการให้แสงกับสาหร่ายปรสิตพืชต่างกันในช่วง 3 เวลา คือ ช่วงเวลาที่ 1 คือ ให้แสง 6 ชั่วโมง สลับกับบ่มในที่มืด

18 ชั่วโมง ช่วงเวลาที่ 2 ให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับบ่มในที่มืด 12 ชั่วโมง และ ช่วงเวลาที่ 3 คือ ให้แสง 24 ชั่วโมง พบการให้แสงช่วงเวลาที่ 1 และ 2 สาหร่ายมีขนาดของโคโลนีไม่แตกต่างกัน คือมีขนาดระหว่าง 1.60–2.80 มิลลิเมตร แตกต่างกับช่วงเวลาที่ 3 คือการให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่โคโลนีของสาหร่ายมีขนาด 3.00–3.60 mm. (ตารางที่ 4, ภาพที่ 6)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญของสาหร่ายบน BBM และ BBM ผสมกับ IAA 2 mg / L

ชนิดสาหร่าย	ขนาดโคโลนีของสาหร่าย (mm)	
	BBM	BBM mixed 2 mg / L IAA
C. diffusus (C10)	2.33 ± 0.57a*	6.33 ±1.15b*
C. expansa (C18)	1.66 ± 1.15a*	6.00 ± 1.73b*
C. karstenii (C22)	2.66 ± 1.52a*	5.66 ± 2.08b*
C. virescens (C15)	2.33 ± 1.52a*	4.66 ±0.57b*
C. parasiticus (C9)	2.33 ± 1.15a*	6.00 ± 1.00b*

[a, b]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแถวเดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Tukey's range test ($p < 0.05$)

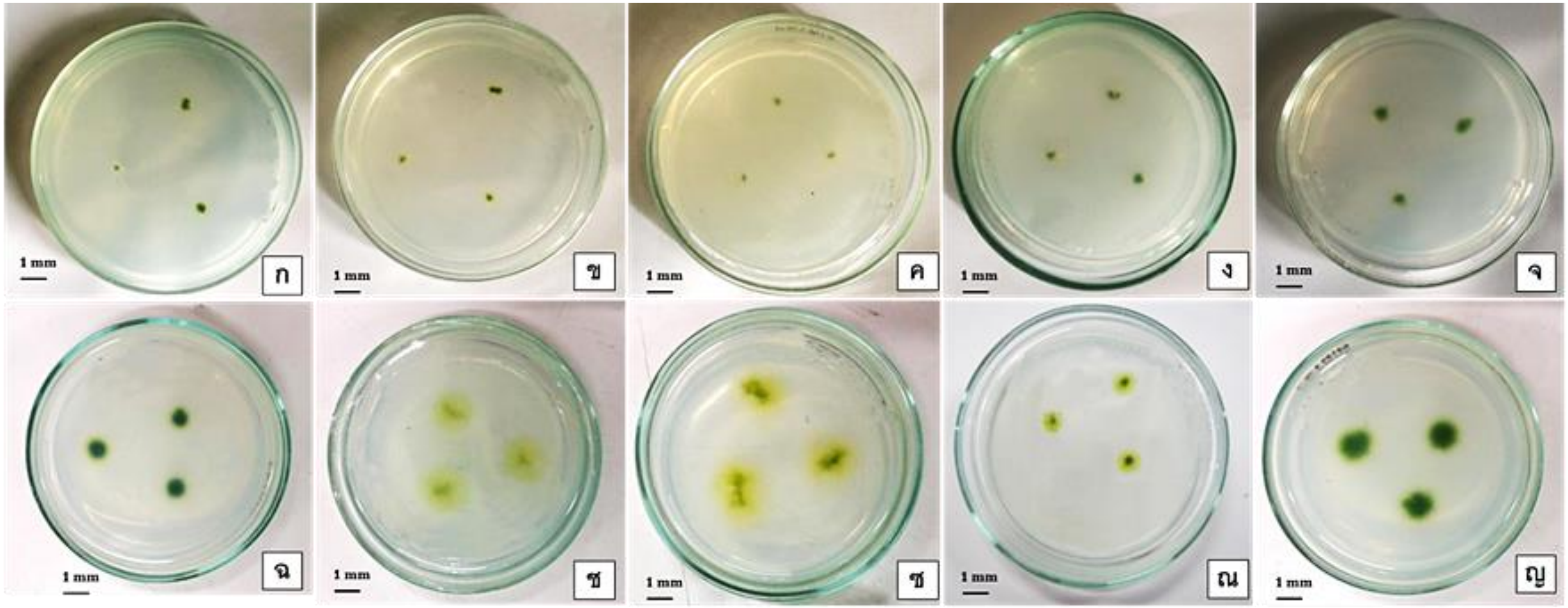
*ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยสัญลักษณ์เดียวกันในคอลัมน์เดียวกันไม่ต่างกันในทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Tukey's range test ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4 ขนาดโคโลนีของสาหร่ายที่เจริญในระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน

ชนิดสาหร่าย	ขนาดโคโลนีของสาหร่าย (mm)		
	ให้แสง 6 มืด 18	ให้แสง 12	ให้แสง 24
C. diffusus (C10)	1.60 ± 0.55a*	2.00 ± 0.00a*	3.40 ± 0.54b*
C. expansa (C18)	2.60 ± 0.54a*	2.20 ± 0.84a*	3.60 ± 0.54b*
C. karstenii (C22)	1.60 ± 0.00a*	2.80 ± 0.55a*	3.40 ± 0.89b*
C. virescens (C15)	2.20 ±0.44a*	2.40 ± 0.00a*	3.40 ± 0.54b*
C. parasiticus (C9)	1.80 ±0.45a*	2.0 ± 0.00a*	3.00 ± 1.00b*

[a, b]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแถวเดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Tukey's range test ($p < 0.05$).

*ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยสัญลักษณ์เดียวกันในคอลัมน์เดียวกันไม่ต่างกันในทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Tukey's range test ($p > 0.05$).

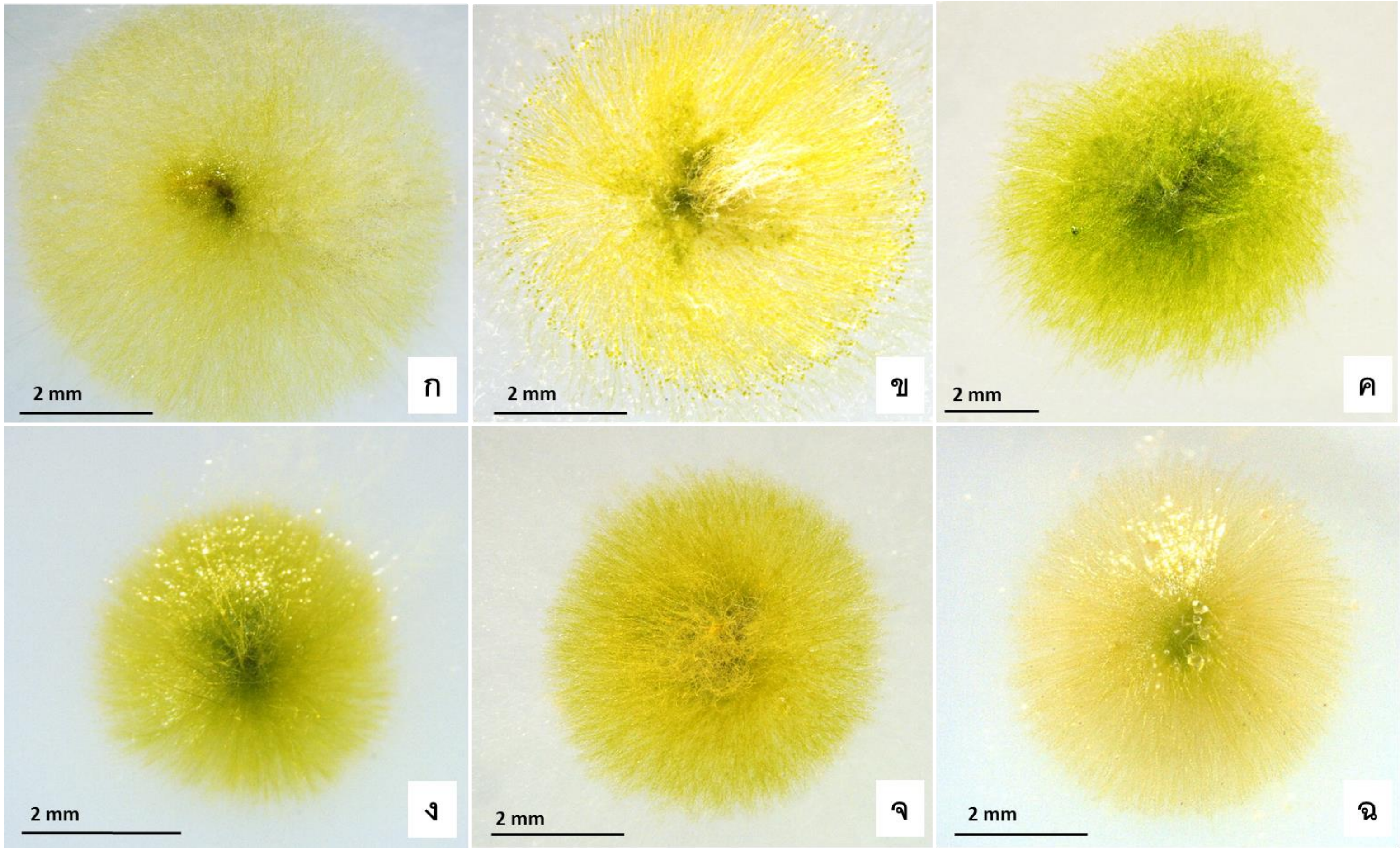


ภาพที่ 6 โคโลนีของสาหร่าย *Cephaleuros* บน BBM (ภาพ ก–จ) และ BBM ผสมกับ IAA 2 mg / L (ภาพ ฉ–ญ) ก, ฉ : *C. diffusus*, ข, ช: *C. expansa*, ค, ซ: *C. karstenii,* ง, ณ : *C. virescens*, จ, ญ: *C. parasiticus*

26

1.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Cephaleuros* บนอาหารสังเคราะห์

โคโลนีของสาหร่ายแต่ละชนิดที่เจริญมีสีที่แตกต่างกัน เช่น สีเขียว สีเหลือง และสีเหลือง อมเขียว ดังแสดงในภาพที่ 7 และตำแหน่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารแตกต่างกันในแต่ละชนิดของสาหร่าย ทัลลัสของสาหร่ายที่เจริญบนอาหารสังเคราะห์เป็นการเจริญแบบเปิด คือเส้นใยของสาหร่ายเจริญเป็นเส้นใยแบบเดี่ยว ๆ มีการแตกแขนงของเส้นใย ไม่รวมตัวเป็นเนื้อเยื่อเทียม ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารของสาหร่ายแต่ละสกุลมีความแตกต่างกันโดยโคโลนีของสาหร่าย *C. virescens, C. expansa, C. karstenii* และ *C. solutus* มีสีเขียวฟูเจริญบนอาหารสังเคราะห์ ส่วนโคโลนีของ *C. diffusus* และ *C. parasiticus* มีสีเขียวอ่อนเจริญเข้าไปในวุ้นของอาหารสังเคราะห์ เส้นใยของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน บนอาหาร รูปร่างเส้นใยของสาหร่าย *C. expansa, C. parasiticus* และ *C. virescens* เป็นแบบทรงกระบอกยาวมีขนาด 5.00 –7.50 x 50.00 –70.00 ไมโครเมตร 7.50 –10.00 x 127.50 – 187.50 ไมโครเมตร และ 5.00 – 7.50 x 70.00 – 87.50 ไมโครเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ส่วน *C. expansa, C. karstenii* และ *C. solutus* เป็นแบบทรงกระบอกสั้นมีขนาด 7.50 – 10.00 x 100.00 – 120.00 ไมโครเมตร 3.45 – 9.42 x 47.49 – 75.98 ไมโครเมตร และ 4.12 – 6.66 x 20.95 – 43.81 ไมโครเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ขนาดของมุมการแตกแขนงเส้นใยของสาหร่ายมีความแตกต่างกันตามชนิดที่พบ (ตารางที่ 5, ภาพที่ 8) สาหร่ายทุกชนิดที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการสร้างโครงสร้างคล้ายแกมีแทนเจีย แต่ไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศบนอาหารสังเคราะห์



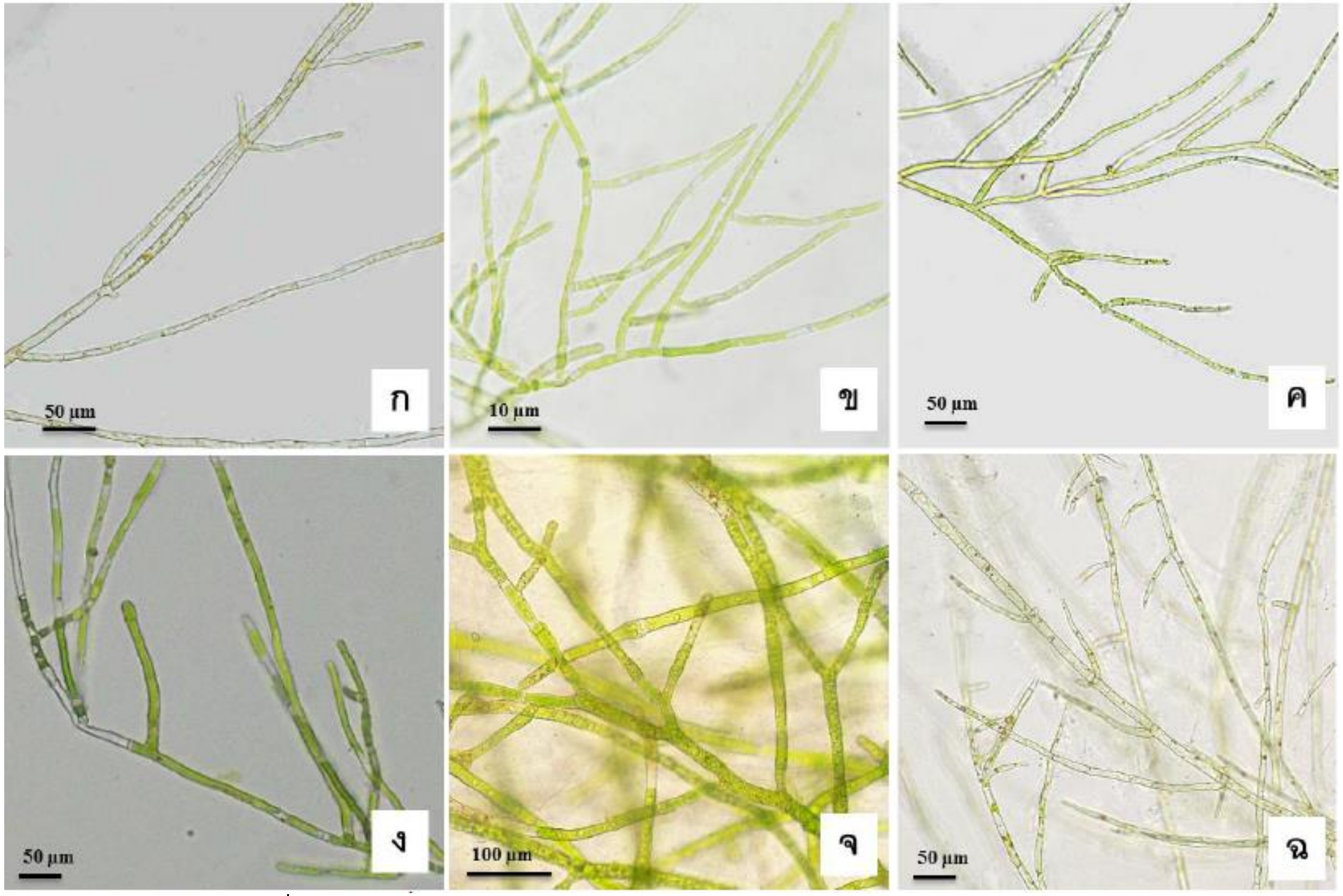
ภาพที่ 7 โคโลนีของสาหร่ายแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร BBM ผสม 2 mg/l IAA ก: *C. diffusus*, ข: *C. expansa* ค: *C. karstenii* , ง: *C. parasiticus* , จ: *C. solutus* และ ฉ: *C. virescens*

ตารางที่ 5 ลักษณะของเส้นใยสาหร่ายแต่ละชนิดบนอาหาร BBM

ชนิดของสาหร่าย	พืชอาศัย	ลักษณะของเส้นใย		
		ขนาดของเส้นใย (ไมโครเมตร)	อัตราส่วน W/L	มุมของแขนงเส้นใย (°)
C.diffusus	จิก	3.81 – 8.89 x 18.41 – 99.69	1: 7.37	36.40 – 71.56
	ผักเหลียง	5.00 – 7.50 x 50.00 – 70.00	1: 8.59	60.00 – 90.00
C. expansa	แก้ว	7.50 – 10.00 x 100.00–120.00	1: 13.71	62.00 – 75.00
C. karstenii	โกโก้	3.45 – 9.42 x 47.49 – 75.98	1: 10.68	30.70 – 88.96
	ตะแบกนา	4.12 – 9.89 x 44.52 – 80.00	1: 10.62	30.00 – 88.96
C. parasiticus	มังคุด	7.50 – 10.00 x 127.50 – 187.50	1: 8.59	54.00 – 92.00
C. solutus	ทุเรียน	4.12 – 6.66 x 20.95 – 43.81	1: 5.70	30.12 – 82.36
C. virescens	กระตังแดง	5.00 – 7.50 x 67.50 – 85.00	1:5.70	70.00 – 95.00
	จำปาดะ	5.00 – 7.50 x 70.00 – 87.50	1: 10.34	62.00 – 90.00
	จำปี	5.00 – 7.50 x 67.50 – 80.00	1: 10.19	95.00 – 70.00
	มะนาว	5.00 – 7.50 x 60.00 – 98.00	1: 9.54	65.00 – 90.00
	มะม่วง	5.00 –7.50 x 70.00 – 95.00	1: 10.98	65.00 – 95.00
	ยางพารา	5.00 – 7.50 x 85.00 – 112.50	1: 13.05	60.00 – 91.00
	เงาะ	5.00 – 10.00 x 57.50 – 125.00	1: 10.52	62.00 – 90.00

ตารางที่ 5 ลักษณะของเส้นใยสาหร่ายแต่ละชนิดบนอาหาร BBM (ต่อ)

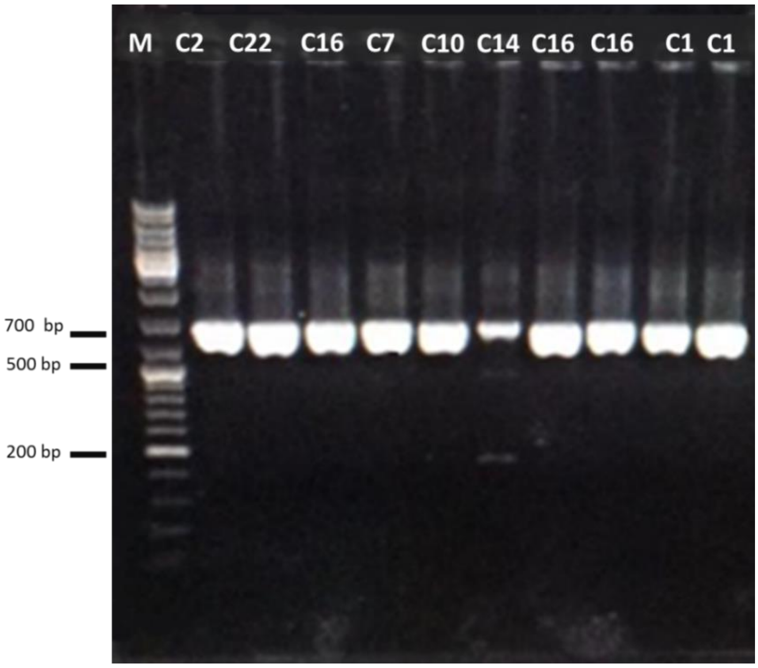
ชนิดของสาหร่าย	พืชอาศัย	ลักษณะของเส้นใย		
		ขนาดของเส้นใย (ไมโครเมตร)	อัตราส่วน W/L	มุมของแขนงเส้นใย (°)
C. virescens	ทุเรียนน้ำ	5.00 – 7.50 x 75.00 – 97.50	1: 12.25	60.00 – 90.00
	เชียด	7.5 – 10 x 70.50.00 – 100.00	1: 10.43	62.00 – 91.00
	พิกุล	5.00 – 7.50 x 70.00 – 97.50	1: 11.52	68.00 – 91.00
	ฉิ่ง	5.00 – 7.50 x 61.25 – 97.50	1: 11.90	65.00 – 91.00
	อบเชย	5.00 – 7.50 x 62.50 – 97.50	1: 13.18	65.00 – 90.00
Cephaleuros sp.	พริกไทย	4.00 – 8.12 x 62.50 – 95.00	1: 15.25	35.00 –92.56
	ลองกอง	5.00 – 7.50 x 72.00 – 95.00	1: 13.11	64.00 – 95.00



ภาพที่ 8 เส้นใยของสาหร่ายแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร BBM ผสม 2 mg/l IAA ก: *C. diffusus*, ข: *C. expansa* ค: *C. karstenii* ง: *C. parasiticus* จ: *C. solutus* และ ฉ: *C. virescens*

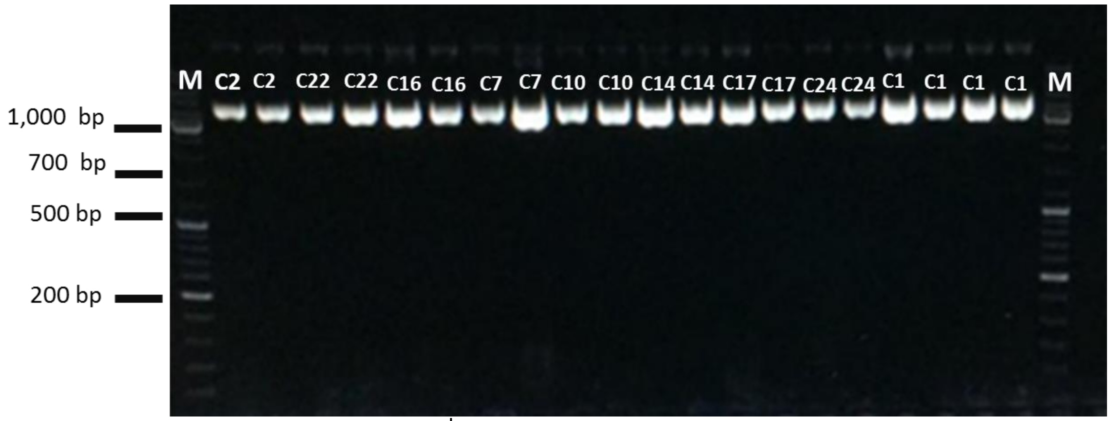
2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ตำแหน่ง 18s rRNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ PNS1 และ NS41 พบว่า ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเพิ่ม จำนวนดีเอ็นเอของสาหร่ายทั้งหมดมีขนาด 600–700 bp (ภาพที่ 9) หลังจากนั้นทำการโคลนนิ่งยีน 18s rRNA และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของการโคลนนิ่งยีนโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส พบมีขนาด 1,000–1,200 bp (ภาพที่ 10) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18s rRNA เปรียบเทียบกับลำดับเบสของสาหร่าย *Cephaleuros* ในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายทั้ง 9 ชนิดจัดอยู่ในสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ซึ่งสนับสนุนผลจากการศึกษาด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาบ่งชี้ว่าสาหร่ายทั้งหมดเป็นสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 9 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 18s rRNA จากตัวอย่างสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* spp.
M = 1 kb DNA ladder

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18s rRNA ของสาหร่ายโดย Blast search พบมีค่าความเหมือน (identity) อยู่ระหว่าง 92-99 % (ตารางที่ 7) ซึ่งค่าความเหมือนที่มากกว่า 97 % (Suutari et al, 2010) ขึ้นไปแสดงให้เห็นว่าเป็นชนิดเดียวกันกับสาหร่ายในฐานข้อมูลของ GenBank ในกรณีที่มีความเหมือนต่ำกว่า 97 % ยังไม่สามารถระบุชนิดได้แน่นอน จากผลการศึกษาในตารางที่ 6 สามารถแบ่งสาหร่ายออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้



ภาพที่ 10 ผลิตภัณฑ์ของการโคลนนิ่งยีน 18s rRNA ของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* spp.
M = 1 kb DNA ladder

ตารางที่ 6 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* spp. กับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายในฐานข้อมูล GenBank

พืชอาศัย	**ชนิดของสาหร่ายตามลักษณะทางสัณฐาน**	**ลักษณะทางชีวโมเลกุล**	
		% ความเหมือน	**ชนิดสาหร่าย**
Anacardium occidentale (มะม่วงหินมพานต์)	*C. virescens*	99	*C. virescens*
Artocarpus heterophyllus (ขนุน)	*C. virescens*	99	*C. virescens*
Artocarpus integer (จำปาดะ)	*Cephaleuros* sp.	99	*C. virescens*
Garcinia mangostana (มังคุด)	*C. parasiticus*	99	*C. parasiticus*
		99	*C. virescens*
Lansium domesticum (ลองกอง)	*Cephaleuros* sp.	99	*C. virescens*
Magnolia champaca (จำปา)	*C. virescens*	92	*Cephaleuros* sp.
Mangifera indica (มะม่วง)	*C. virescens*	99	*C. virescens*
Piper nigrum (พริกไทย)	*C. piperis*[1]	95	*C. virescens*
		95	*C. parasiticus*
Sauropus androgynous (ผักหวาน)	*C. virescens*	99	*C. virescens*

[1] Sunpapao and Pitaloka (2017)

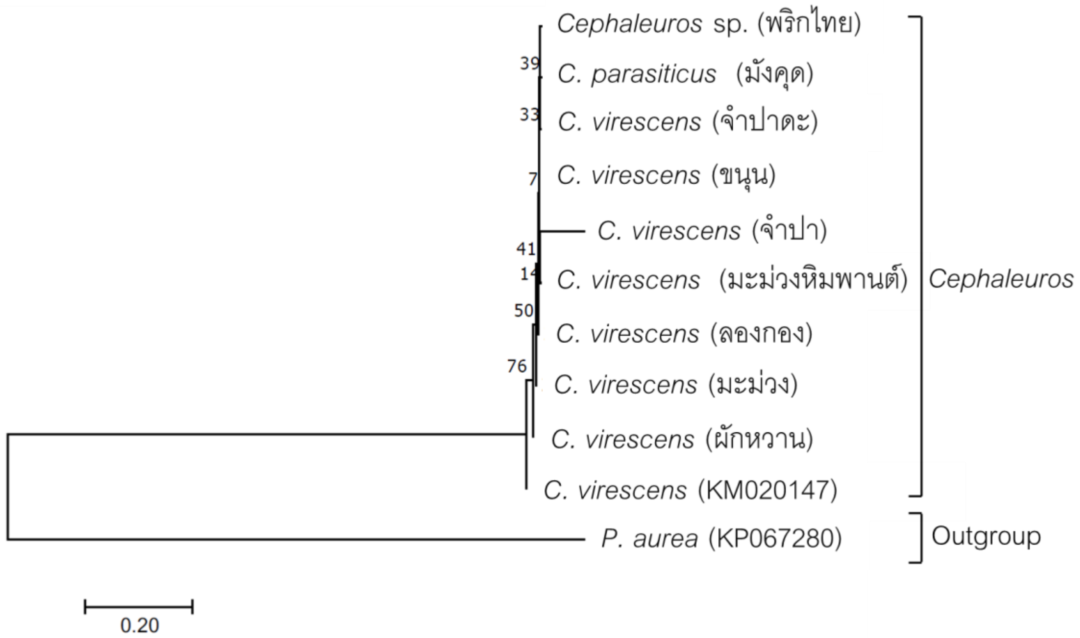
กลุ่มที่ 1 กลุ่มของสาหร่ายชนิดเดียวกัน ที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงกับลักษณะทางชีวโมเลกุล ได้แก่ สาหร่าย *C. virescens* บนพืชอาศัยผักหวาน (*Sauropus androgynus*) ขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) มะม่วง (*Mangifera indica*) และมะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale*) ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สนับสนุนลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *C. virescens* สามารถระบุชนิดของสาหร่ายที่พบได้เป็น *C. virescens*

กลุ่มที่ 2 กลุ่มของสาหร่ายที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แน่ชัด แต่ใช้ลักษณะทางชีวโมเลกุลช่วยในการระบุชนิด คือ จำปาดะ (*Artocarpus integer*) เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยามีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับสาหร่ายในสกุลอื่นจึงไม่สามารถระบุชนิดของสาหร่ายได้แน่ชัด เช่น ขนาดของเซลล์ที่มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายในกลุ่ม *C. virescens*, *C. expansa* และ *C. karstenii* แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนยีนไปวิเคราะห์พบว่ามีความเหมือนร้อยละ 99 กับสาหร่าย *C. virescens* จึงสามารถระบุชนิดของสาหร่ายเป็นสาหร่ายชนิด *C. virescens* เช่นเดียวกับสาหร่ายในพืชอาสัยลองกอง *Lansium domesticum* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แน่ชัด แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนร้อยละ 99 กับสาหร่าย *C. virescens* จึงสามารถระบุชนิดของสาหร่ายเป็นสาหร่ายชนิด *C. virescens*

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ลักษณะทางชีวโมเลกุลไม่แน่ชัด คือ มังคุด (*Garcinia mangostana*) จากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกชนิดสามารถระบุได้เป็นสาหร่าย *C. parasiticus* แต่เมื่อใช้ลักษณะทางชีวโมเลกุล โดยนำไปวิเคราะห์กับเทียบเคียงในฐานข้อมูล Genbank พบว่ามีความเหมือนร้อยละ 99 ตรงกับสาหร่าย 2 ชนิดคือ *C. virescens* และ *C. parasiticus* แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายที่มีความใกล้เคียงกับสาหร่าย *C. parasiticus* ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมากกับ *C. virescens* สาหร่ายชนิดนี้จึงใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้เพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ 4 กลุ่มของสาหร่ายที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์มีร้อยละความเหมือนต่ำ อยู่ที่ร้อยละ 95 ได้แก่สาหร่ายในพืชอาศัยพริกไทย (*Piper nigrum*) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็พบว่าไม่ตรงกับสาหร่ายชนิดใดในเอกสาร (Thompson and Wujek, 1997) จึงระบุว่าเป็นสาหร่ายชนิดใหม่ (new species) ซึ่งจากรายงานของ Sunpapao และ Pitaloka (2017) พบว่าสาหร่ายชนิดใหม่ มีชื่อว่า *C. piperis*

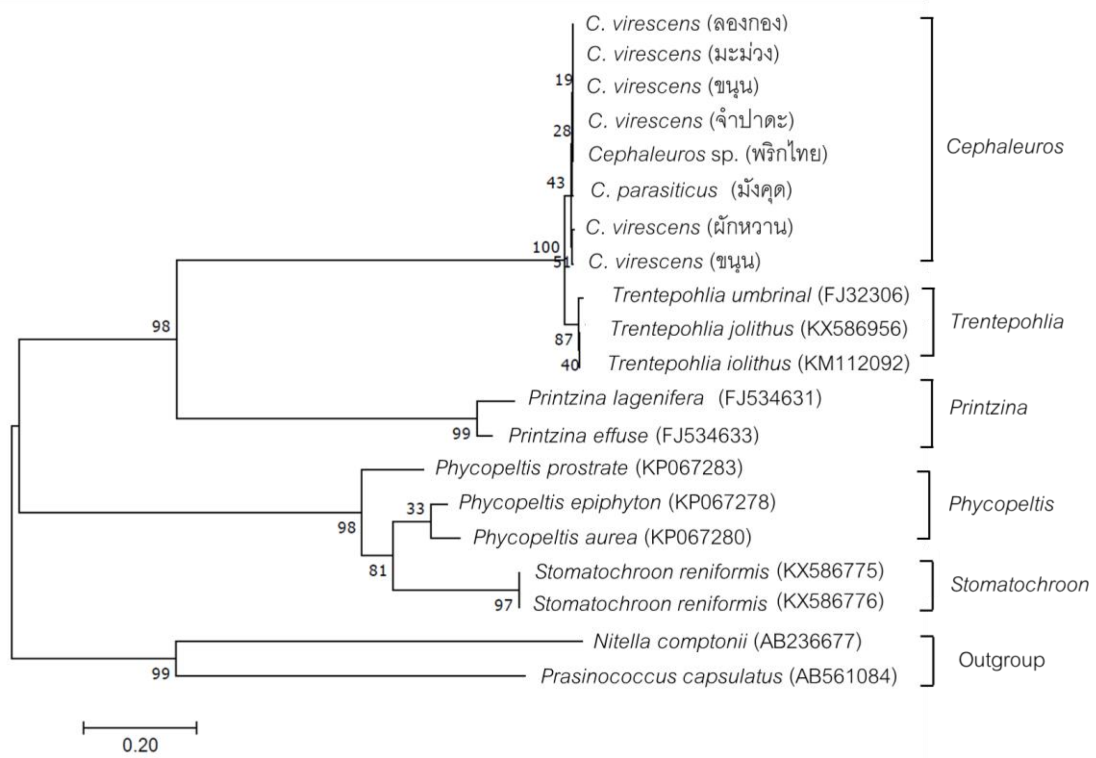
ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18s rRNA ของสาหร่าย *Cephaleuros* 9 ชนิด และสาหร่าย *C. virescens* (KM020147), *P. aurea* (KP067280) ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (Friedl et al., 2014; Zhu et al., 2015) วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพบสาหร่าย *Cephaleuros* 9 ชนิด ได้แก่ *C. virescens* ในพืชอาศัยขนุน จำปาดะ จำปา มะม่วงหินมพานต์ ลองกอง มะม่วง ผักหวาน *C. parasiticus* ในพืชอาศัยมังคุด *Cephaleuros* sp. ในพืชอาศัยพริกไทย และ *C. virescens* (KM020147) มีความใกล้ชิดกันสูงสุด ในขณะที่สาหร่าย *P. aurea* (KP067280) ถูกจัดแยกออกจากกลุ่มสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ได้อย่างชัดเจน ซึ่งจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18s rRNA พบว่าไม่เหมาะสมในการนำมาจำแนกสาหร่าย *Cephaleuros* ในระดับสปีชีส์ (species) (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แผนภูมิวิวัฒนาการของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18s rRNA (Bootstrap value: 1,000)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของยีน 18s rRNA โดยแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ในการศึกษาครั้งนี้กับสาหร่ายสกุลอื่นในวงศ์ Trentepohliaceae ที่ประกอบด้วย *Printzina*, *Trentepohlia*, *Stomatochroon* และ *Phycopeltis* พบว่าสาหร่าย *Cephaleuros* ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกัน (clade) ประกอบด้วยสาหร่าย *Cephaleuros*, *Printzina* และ *Trentepohlia* มีความใกล้ชิดกันสูงที่สุด ในขณะที่สาหร่าย *Stomatochroon* และ *Phycopeltis* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งแสดงถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

ของสาหร่ายในกลุ่มนี้ (ภาพที่ 12) แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18s rRNA นั้นสามารถใช้แยกความแตกต่างของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ออกจากสกุลอื่น ๆ ในวงศ์ Trentepohliaceae ได้ แต่ไม่สามารถใช้จำแนกในระดับสปีชีส์ได้



ภาพที่ 12 แผนภูมิวิวัฒนาการของสาหร่ายวงศ์ Trentepohliaceae ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18s rRNA (Bootstrap value: 1,000)

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสังเคราะห์และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

การเจริญของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์ 7 ชนิด หลังจากบ่มสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 3–6 เดือน พบโคโลนีสีเขียวฟูของสาหร่ายทั้ง 22 ตัวอย่าง สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร BBM เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหารชนิดอื่น ๆ รองลงมาคือ อาหาร HSM เจริญในระดับกลาง และอาหาร BM ในระดับดี ในขณะที่อาหารอื่น ๆ ไม่มีการเจริญของสาหร่าย ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Ponmurugan และคณะ (2009) ที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายปรสิตพืช *C. parasiticus* ในพืชอาศัยชาและเปรียบเทียบการเจริญบนอาหารสังเคราะห์ 10 ชนิด พบว่าอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของสาหร่ายมี 3 สูตรคือ อาหารสูตร BM, TM และ tea leaf extract medium เขมิสราและธัญนันท์ (2010) ได้ศึกษาคุณสมบัติและรงควัตถุในสาหร่ายในอาหาร 2 สูตร คือ HSM และ BM พบว่าสาหร่ายที่ทำการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ BM พบเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุหลักเพียงชนิดเดียว ต่างจากการเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร HSM มีการสร้างลูทีน คลอโรฟิลล์ บี และเบต้าแคโรทีนอันเนื่องมาจากความเครียดของการได้รับแหล่งพลังงานต่างกันโดยอาหาร BM มีแหล่งไนโตรเจนจากโซเดียมไนเตรต ขณะที่อาหาร HSM มีแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียคลอไรด์ ส่งผลให้การเผาผลาญอาหารหรือกระบวนการเปลี่ยนแปลงพลังงานของเซลล์สาหร่ายมีความต่างกัน

การศึกษาปัจจัยของฮอร์โมนและแสงที่มีผลต่อการเจริญ โดยนำอาหารสูตรที่สาหร่ายเจริญดี คือ อาหาร BBM ทำการเพิ่มปริมาณสาหร่ายในเบื้องต้นโดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร BBM ผสม 2 mg/l IAA เปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ พบว่าสาหร่ายมีขนาดโคโลนีที่โตกว่าเมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่ผสมฮอร์โมน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ponmurugan และคณะ (2009) ที่เติมฮอร์โมนออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, 2,4-D และ NAA ลงไปในอาหารสังเคราะห์ พบเส้นใยของสาหร่ายมีการเจริญได้ดีในอาหารที่ผสม IAA รองลงมาคือ และ IBA, 2,4-D ในขณะที่การเติม NAA ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสาหร่าย

สาหร่ายทุกชนิดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ผสมฮอร์โมน IAA ไม่พบโครงสร้างในการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แต่มีการเจริญได้รวดเร็วเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ผสมฮอร์โมน แตกต่างจากผลงานวิจัยของ Suto และ Ohtani (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* บนอาหารปกติไม่พบโครงสร้างในการสืบพันธุ์จะพบแกมีแทนเจียมและสปอแรงเจียมก็เมื่อมีการเติมฮอร์โมนออกซินลงในอาหารเลี้ยงสังเคราะห์

ในการศึกษาปัจจัยของแสงที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย ไม่พบข้อมูลจากงานวิจัยที่ศึกษาระยะเวลาการให้แสงกับการเจริญของสาหร่าย มีเพียงการศึกษาของ Ponmurugan และคณะ (2009) กับ Suto กับ Ohtani (2011) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง และให้แสง 12 ชั่วโมงและมืด 12 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่ไม่มีการศึกษาการเจริญในช่วงเวลาการให้แสงที่ต่างกัน รายงานของPonmurugan และคณะ (2009) กับ Suto กับ Ohtani (2011) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง และ ให้แสง 12 ชั่วโมงและมืด 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกในการศึกษาปัจจัยของแสงที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย โดยการศึกษาปัจจัยของแสงที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายโดยการให้แสงกับสาหร่ายปรสิตพืชต่างกันในช่วง 3 เวลา คือ ให้แสง 6 ชั่วโมง สลับกับบ่มในที่มืด 18 ชั่วโมง ให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับบ่มในที่มืด 12 ชั่วโมง และให้แสง 24 ชั่วโมง พบว่าการให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง โคโลนีของสาหร่ายมีการเจริญแตกต่างกับ 2 ช่วงเวลาที่กล่าวมา

2 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros*

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสามารถนำมาเป็นข้อมูลในการระบุชนิดของสาหร่ายได้ แต่มีข้อจำกัด เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน การจัดจำแนกต้องอาศัยความรู้ความชำนาญ ในการพิจารณาโครงสร้างและลักษณะต่าง ๆ ของสาหร่ายเพื่อการจำแนกชนิดของสาหร่ายที่ถูกต้อง การใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยามาประกอบกับข้อมูลทางพันธุกรรมช่วยในการระบุชนิดของสาหร่ายให้ถูกต้องมากขึ้น ซึ่งการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มา

ระบุชนิดควรใช้บริเวณที่มีคุณสมบัติที่สามารถแสดงถึงความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ และบริเวณดังกล่าวควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันสูง (Heberl et al., 2003) สอดคล้องกับการศึกษาของ Zechmen และคณะ (1990) ที่ทำการศึกษาตำแหน่งยีน SSU rRNA ของสาหร่ายในอันดับ Trentepohliales เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่าย ต่อมามี Lopez-Bactista และ Chapman (2003) ศึกษายีนตำแหน่ง SSU ซึ่งเป็นบริเวณผันแปร (variable region) เป็นส่วนที่มีวิวัฒนาการสูง สามารถวิเคราะห์ชนิดของสาหร่ายในอันดับนี้ได้ อาทิสาหร่าย *Cephaleuros, Trentepolia, Phycopeltis* และ *Physolinum* (Lopez-Bactista et al., 2002, Rindi et al., 2009)

ผลการศึกษาตำแหน่งยีน 18s rRNA ของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ในการทดลองนี้พบว่าสาหร่ายที่ศึกษามีค่าความเหมือนอยู่ในช่วง ร้อยละ 92–97 ถือว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายนั้น จะยอมรับว่าเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันก็ต่อเมื่อค่าดังกล่าว มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 97 (Lopez-Bautista et al., 2006, Portillo et al., 2009, Suutari et al, 2010) จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าสัณฐานวิทยาของสาหร่ายในพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ ไม่สอดคล้องกับข้อมูลทางพันธุกรรม (Lopez-Bautista et al., 2006) การศึกษาในปัจจุบันยังเน้นไปที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

อย่างไรก็ตามในการระบุชนิดของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* จากข้อมูลทางพันธุกรรมของสาหร่ายยังมีการศึกษาอย่างจำกัด จึงทำให้ข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบมีอยู่น้อย ดังนั้นในการจัดจำแนกและระบุชนิดสาหร่ายจึงใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวก็เพียงพอ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย รวมถึงความสัมพันธ์ของสาหร่ายแต่ละชนิดในระดับชีวโมเลกุล พบพืชที่แสดงอาการโรคใบจุดสาหร่าย 22 ชนิด จำแนกสาหร่ายจากพืชอาศัยได้ 7 ชนิด คือ *C. diffusus*, *C. expansa*, *C. karstenii*, *C. solutus*, *C. virescens*, *C. parasiticus* และ *Cephaleuros* sp. อาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* คือ BBM รองลงมาคือ อาหารสูตร HSM และ BM ซึ่งสาหร่ายเจริญในระดับดี ปานกลาง และต่ำ ตามลำดับ นอกจากนี้ฮอร์โมนและแสงมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายโดยพบว่าการผสมฮอร์โมนI IAA และการให้แสง 24 ชั่วโมง ช่วยส่งเสริมการเจริญของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์ และลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์แตกต่างจากการเจริญบนพืชอาศัย

การศึกษาความสัมพันธ์ของสาหร่ายแต่ละชนิดในระดับชีวโมเลกุลของสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* พบว่ามีความใกล้ชิดกันในวงศ์ Trentepohliaceae และสามารถใช้แยกความแตกต่างของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ออกจากสกุลอื่น ๆ ในวงศ์ Trentepohliaceae ได้ แต่ไม่สามารถใช้จำแนกในระดับสปีชีส์ได้

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2553. คู่มือวินิจฉัยโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา สาหร่าย และการให้คำแนะนำในการควบคุมโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 594 หน้า.

เขมิสรา รัตนไพบูลย์กิจ และ ธัญนันท์ วรรณธง. 2558. การแยกเพาะเลี้ยงและการศึกษารงควัตถุของสาหร่ายก่อ โรคพืชสกุล *Cephaleuros*. วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 38: 367-382.

Atlas, R.M. and Parks, L.C. 1997. Handbook of Microbiological Media, 2nd ed. CRC Press, London: 1706p.

Almeida, R.T., Vasconcelos, I. and Freire, V.F. 1985. Plantas hospedeiras da alga *Cephaleuros virescens* Kunze no estado do Ceará, Brasil. Revista Ciencia Agronomica 16: 53-55.

Baby, U.I. 2001. Diseases of tea and their management – a review. In Trivedi, P.C. Pointer Publication : 315-327.

Batista, A.C. and Lima, D.A. 1949. Lista de suscetíveis da alga *Cephaleuros mycoidea* Karsten em Pernambuco. Boletin da Secretaria, Industria e Comercio do Estado de Pernambuco 16: 32-46.

Bischoff, H.W. and Bold, H.C. 1963. Phycological studies iv. some soil algae from enchanted rock and related algal specie. The University of Texas at Austin. 1-95.

Bold, H.C. 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. Bull. bulletin of the torrey botanical club. 101-108.

Brooks, E.E. 2004. Plant parasitic algae (Chlorophyta, Trentepohliales) in American Samoa. Pacific Science 58: 419-428.

Brown, S.H. 2013. Algal Leaf Spot (*Cephaleuros virescens*) of Cocoplum. Lee County Extension, Lee County Extension. 239.

Cavalier, S.T. 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine. BioSystems 14: 461-481.

Chapman, R.L. and Henk, M.C. 1985. Observations on the habit, morphology and ultrastructure of *Cephaleuros parasiticus* (Chlorophyta) and a comparison with *C. virescens*. Journal of Phycology 21: 513-522.

Chapman, R.L. and Buchheim, M.A. 1991. Ribosomal RNA gene sequences: analysis and significance in the phylogeny and taxonomy of green algae. Critical Reviews in Plant Sciences 10: 343-368.

Cuellar, S.P., Hernandez, I., Cardenas, D.L., Soto, N., Ogawa, M.A. and Parra-Saldivar, R. 2015. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae : Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. Microbial Biotechnology 8: 190-209.

Dasgupta, W.S. and Bindra, A.S. 1992. Some biochemical changes induced in powdery mildew infected grape wine leaves. Plant Disease Research 7: 248–258.

Doyle, J.J. and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin 19: 11-15.

Ezuka, A. and Kibushi, H. 1956. Host rang of *Cephaleuros virescens* Kunze. Study of Tea 5: 11-12.

Goebel, F. and Kunze, G. 1827. Pharmaceutische Waarenkunde. Eisenach. 124.

Hamby, R.K., Sims, L., Issel, L. and Zimmer, E. 1988. Direct ribosomal RNA sequencing: optimization of extraction and sequencing methods for work with higher plants. Plant Molecular Biology Reporter 6: 175-192.

Hamby, R.K. and Zimmer, .E.A. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In: Molecular systematics of plants. Molecular Systematics of Plants. 50-91.

Hametner, C., Stocker-Worgotter, E. and Grube, M. 2014. New insights into diversity and selectivity of trentepohlialean lichen photobionts from the extratropics. Symbiosis 63: 31-40.

Han, K.S., Park, M.J., Park, J.H. and Shin, H.D. 2011. First report of algal leaf spot associated with *Cephaleuros virescens* on greenhouse-grown *Ficus benghalensis* in Korea. Australasian Plant Disease Notes 6: 72-73.

Hebert, P.D., Cywinska, A. and Ball, S.L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 270: 313-321.

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: 1080-1082.

Hsieh, H.J. 1983. Notes on host plant of *Cephaleuros virescens* new for Taiwan. Botanical Bulletin of Academia Sinica 24: 89-96.

Huq, M., Ali, M. AND Islam, M.S. 2010. Efficacy of muriate of potash and foliar spray with fungicides to control red rust disease (*Cephaleurous parasiticus*) of tea. Bangladesh Journal of Agricultural Research 35: 273-277.

Joubert, J.J. and Rijkenberg, F.H.I. 1971. Parasitic green algae. Annual Review of Phytopathology 9: 45-64.

Keller, M.D. and Guillard, R.R.L. 1985. Factors significant to marine diatom culture. in D.M. Anderson, A.W. White and D.G. Baden (eds). Toxic Dinoflagellates. 113-116.

Lembi, C.A. and Waaland, J.R. 1988. Algae and human affairs. Cambridge University Press. 590.

Liu, G.X. and Hu, Z.Y. 2013. New observations on a rare endobiotic green alga, *Stomatochroon lagerheimii*, from a tropical area in China. Nova Hedwigia 97: 429-436.

Lopez-Bautista, J.M., Waters, D.A. and Chapman, R.L. 2002. The Trentepohliales revisited. Constancea 83. [online] http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/lopez_etal/trentepohliales.html, retrieved (February 1, 2018).

Lopez-Bautista, J.M. and Chapman, R.L. 2003. Phylogenetic affinities of the Trentepohliales inferred from small-subunit rDNA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 2099–2106.

Lopez-Bautista, J.M., Rindi, F. and Guiry, M.D. 2006. Molecular systematics of the subaerial green algal order Trentepohliales: an assessment based on morphological and molecular data. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 1709–1715.

Marlatt, R.B. and AlfierI, S.A. 1981. Hosts of *Cephaleuros*, a parasitic alga in Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 94: 311-317.

Muthukumar, T., Uma, E. and Priyadharsini, P. 2014. Occurrence of foliicolous parasitic alge *Cephaleuros virescens,* on cultivated ornamental plant in southern India. Botanica Lithuanica 20: 87-98.

Nelson, S.C. 2008. *Cephaleuros* species, the plant-parasitic green algae. Plant Disease 43: 1-6.

Nelsen, M.P., Plata, E.R., Andrew, C.J., Lucking, R. and Lumbsch, H.T. 2011. Phylogenetic diversity of trentepohlialean algae associated with lichen-forming fungi. Journal of Phycology 47: 282-290.

Pardo-Cardona, V.M. 2004. Directorio de hospedantes de *Cephaleuros virescens* Kunze en Colombia y primer registro de *Tectona grandis* L. (Verbenaceae) como hospedante. Ascolfi Informa 30: 10-12.

Peterson, R.B. and Barris, R.H. 1978. Hydrogen metabolism in isolated heterocysts of *Anabaena*. Archives of Microbiology 116: 32-125.

Pitaloka, M.K., Petcharat, V. and Sunpapao, A. 2014. *Cephaleuros solutus* Karsten, as a causal agent of durian (*Durio zibethinus* Murray) algal leaf spot disease in Thailand. Khon Kaen Agriculture Journal 42: 644-648.

Ponmurugan, P., Saravanan, D., Ramya, M., Srinivasan, T.R., Baby, U.U. and Ajay, D. 2009. Studies on *Cephaleuros parasiticus* Karst, a pathogenic alga causing red rust disease in tea plantations. Journal of Plantation Crops 37: 3-70.

Portillo, M., Sririn, V., Kanoksilapatham, W. and Gonzalez, J. 2009. Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. Extremophiles 13: 321-331.

Rindi, F., Lam, D.W. and López-Bautista, J.M. 2009. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta). Molecular Phylogenetics and Evolution 52: 329–339.

Safeeulla, K.M. and Govindu, H.C. 1948. Some new host for *Cephaleuros*. Journal of Mysore University section B 11: 47-49.

Sambrook, J. Russell, D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3-17.

Scot, C.N. 2008. *Cephaleuros* Species, the plant-parasitic green algae. Plant Disease 43: 1-6.

Starr, R.C. 1964. The culture collection of algae at Indiana University. American Journal of Botany 51: 1013-1044.

Stewart, K.D. and Mattox, K.R. 1978. Structural evolution in the flagellated cells of green algae and land plants. Biosystems 10: 145-152.

Sueoka, N. 1960. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 46: 83-91.

Sunpapao, A., Pitaloka, M.K. and Arikit, S. 2015. The genus *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries (Trentepohliales, Ulvophyceae) from southern Thailand. Nova Hedwigia 101: 451-462.

Sunpapao, A. and Pitaloka, M.K. 2017. Two new species of *Cephaleuros* (Chlorophyta, Ulvophyceae) from southern Thailand. Phykos 47: 5-9.

Suto, Y. and Ohtani, S. 2009. Morphology and taxonomy of five *Cephaleuros* species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan, including three new species. Phycological Research 48: 213-236.

Suto, Y. and Ohtani, S. 2011. Morphological features and chromosome numbers in culture of five *Cephaleuros* species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan. Phycological Research 59: 42-51.

Suutari, M., Majaneva, M., Fewer, D.P., Voirin, B., Aiello, A., Fried, T., Chiarello, A.G. and 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 1-12.

Thompson, R.H. and Wujek, D.E. 1997. Trentepohlliales, *Cephaleuros*, *Phycopeltis* and *Stomatochroon*: Morphology, Taxonomy and Ecology. 1st Edition. Enfield Publishing and Distribution. United States of America. 149 pp.

Vanden, H.C., Mann, D.G. and Jahns, H.M. 1995. Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press. 623-627.

Wolf, F.A. 1930. A parasitic alga, *Cephaleuros virescens* Kunze, on citrus and certain other plants. Journal of the Elisha Mitchell Science Society 45: 187-205.

Yadav, A.S. 1953. Sorne new hosts of *Cephaleuros* from Bihar. Current Science 22: 280.

Zechman, F.W., Theriot, E.C., Zimmer, E.A., and Chapman, R.L. 1990. Phylogeny of the Ulvophyceae (Chlorophyta): cladistic analysis of nuclearencoded rRNA sequence data. Journal of Phycology 26: 700–710.

Zhu, H., Zhao, Z.J., Xia, S., Hu, Z.Y. and Liu, G.X. 2014. Morphology and phylogenetic position of *Stomatochroon reniformis* var. *chinensis* var. nov. (Trentepohliales, Ulvophyceae), a rare endobiotic alga from China. Phycologia 53: 493-501.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 ชนิดของสาหร่ายในพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

ชนิดพืชอาศัย	ชนิดสาหร่าย	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง
Annona muricata (ทุเรียนเทศ)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C1
Artocarpus integer (จำปาดะ)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C2
Barringtonia acutangula (จิก)	*C. diffusus*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C3
Cinnamomum iners (เชียด)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C4
Cinnamomum verum (อบเชย)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C5
Citrus aurantifolia (มะนาว)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C6
Durio zibethinus (ทุเรียน)	*C. solutus*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C7
Ficus botryocarpa (ลูกฉิ่ง)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C8
Garcinia mangostana (มังคุด)	*C. pilosa*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C9
Gnetum gnemon (ผักเหมียง)	*C. diffusus*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C10
Hevea brasiliensis (ยางพารา)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C11
Lagerstroemia floribunda (ตะแบกนา)	*Cephaleuros* sp.	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C12
Lansium domesticum (ลองกอง)	*Cephaleuros* sp.	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C13
Leea rubra (กระตังแดง)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C14
Magnolia alba (จำปี)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C15
Mangifera indica (มะม่วง)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C16
Mimusops elengi (พิกุล)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C17
Murraya paniculata (แก้ว)	*C. expansa*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C18
Nephelium lappaceum (เงาะ)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C19
Piper nigrum (พริกไทย)	*Cephaleuros* sp.	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C20
Streblus asper (ข่อย)	*C. virescens*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C21
Theobroma cacao (โกโก้)	*C. karstenii*	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	C22

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย

1. การเตรียมอาหารสูตร algae culture broth (Lembi and Waaland, 1988)

$NaNO_3$	1.000	กรัม
K_2HPO_4	0.250	กรัม
$MgSO_4·7H_2O$	0.513	กรัม
NH_4Cl	0.050	กรัม
$CaCl_2$	0.058	กรัม
Cl_3Fe	0.003	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร รวมทั้งผงวุ้น 1.0–1.3 % คนจนส่วนผสมละลายเข้ากันนำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารสูตร Bold's basal medium (Bischoff and Bold, 1963)

ทำการเตรียม stock solution ก่อนดังนี้

2.1 $NaNO_3$	2.50	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
2.2 $MgSO_4·7H_2O$	0.75	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
2.3 NaCl	0.25	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
2.4 K_2HPO_4	0.75	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรซ
2.5 KH_2PO_4	1.75	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
2.6 $CaCl_2·2H_2O$	0.25	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2.7 trace elements solution (autoclave to dissolve)

$ZnSO_4·7H_2O$	8.82	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2·4H_2O$	1.44	กรัมต่อลิตร
MoO_3	0.71	กรัมต่อลิตร

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.71	กรัมต่อลิตร
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.49	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

2.8 H_3BO_3 1.14 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2.9 EDTA-KOH solution

$EDTA \cdot Na_2$	5.0	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
KOH	3.1	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2.10 ferric solution

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.98 g + H_2SO_4 (conc) 1 กรัมต่อลิตร

2.11 soil extract 50 มิลลิลิตร

ทำการผสมสารดังนี้ นำสารละลายข้อ 2.1–2.6 อย่างละ 10 มิลลิลิตร สารละลายข้อ 2.7–2.10 อย่างละ 1 มิลลิลิตร และสารละลายข้อ 2.11 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร ผงวุ้น 1.0–1.3 % คนจนส่วนผสมละลายเข้ากันนำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมอาหารสูตร bristol's Solution (Bold, 1949)

ทำการเตรียม stock solution ก่อนดังนี้

3.1 $NaNO_3$	10	กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร
3.2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3	กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร
3.3 NaCl	10	กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร
3.4 K_2HPO_4	3	กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร
3.5 KH_2PO_4	7	กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร
3.6 $CaCl_2 \cdot 2H2O$	1	กรัมต่อ 400 มิลลิลิตร

นำสารละลายข้อ 3.1–3.6 อย่างละ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร ผงวุ้น 1.0-1.3 % คนจนส่วนผสมละลายเข้ากันนำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. การเตรียมอาหารสูตร high salt medium (Sueoka, 1960)

4.1 salts solution (beijerinck's solution)

NH_4Cl	100	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำากลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

4.2 phosphate solution

K_2HPO_4	288	กรัม
KH_2PO_4	144	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำากลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

4.3 hutner's trace elements

EDTA disodium salt	50	กรัมต่อ 250 มิลลิลิตร
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	22	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
H_3BO_3	11.4	กรัมต่อ 200 มิลลิลิตร
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	5.06	กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	1.61	กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	1.57	กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$	1.10	กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	4.99	กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร

ทำการผสมสารดังนี้ นำสารละลายข้อ 4.1 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร สารละลายข้อ 4.2 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ สารละลายข้อ 4.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร เติม Yeast extract 4 กรัม และผงวุ้น 1.0-1.3 % คนจนส่วนผสมละลายเข้ากันนำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียมอาหารสูตร trebouxia medium (Starr, 1964)

5.1 Bristol's Solution	850	มิลลิลิตร
5.2 Soil Extract	140	มิลลิลิตร
5.3 Proteose Peptone	10	กรัม
5.4 Glucose	20	กรัม
5.5 Agar	15	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร นำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารสูตร อาหารดัดแปลง Bold's basal medium

ทำการเตรียม stock solution ก่อนดังนี้

6.1 $NaNO_3$	2.50	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
6.2 $MgSO_4{\cdot}7H_2O$	0.75	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
6.3 NaCl	0.25	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
6.4 K_2HPO_4	0.75	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
6.5 KH_2PO_4	1.75	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
6.6 $CaCl_2{\cdot}2H_2O$	0.25	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

6.7 trace elements solution (autoclave to dissolve)

$ZnSO_4{\cdot}7H_2O$	8.82	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2{\cdot}4H_2O$	1.44	กรัมต่อลิตร
MoO_3	0.71	กรัมต่อลิตร
$CuSO_4{\cdot}5H_2O$	0.71	กรัมต่อลิตร
$Co(NO_3)_2{\cdot}6H_2O$	0.49	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร

6.8 H_3BO_3	1.14	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

6.9 EDTA-KOH solution

$EDTA \cdot Na_2$	5.0	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
KOH	3.1	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

6.10 ferric solution

$FeSO_4.7H_2O$ 4.98 g + H_2SO_4 (conc) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

6.11 soil extract 50 มิลลิลิตร

ทำการผสมสารดังนี้ นำสารละลายข้อ 6.1–6.6 อย่างละ 10 มิลลิลิตร สารละลายข้อ 6.7–6.10 อย่างละ 1 มิลลิลิตร และสารละลายข้อ 6.11 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร เติม Peptone 10 กรัม Glucose 20 กรัม และ ผงวุ้น 1.0–1.3 % คนจนส่วนผสมละลายเข้ากันนำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. การเตรียมอาหารเหลว LB (Luria-Bertani) ปริมาตร 1 ลิตร

Trytone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. การเตรียมอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) ปริมาตร 1 ลิตร

Trytone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Agar powder (1.5%)	15	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารแข็งที่เติม แอมพิ

ซิลลินเตรียมโดย ผสมสารละลายแอมพิซิลลินเตรียมลงในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ได้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร

9. การเตรียมอาหาร สูตรอาหาร 2X YT ปริมาตร 1 ลิตร

Trytone	16	กรัม
Yeast Extract	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar powder (1.5%)	15	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. การเตรียมอาหาร nutrient broth ปริมาตร 1 ลิตร

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar (1.5%)	15	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. การเตรียมอาหาร super optimal broth medium (SOB medium) ปริมาตร 1 ลิตร

Tryptone	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อทีที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Ampicillin solution

เตรียมโดยชั่ง แอมพิซิลลิน (ampicillin) 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่าน Nylon syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

IPTG solution

IPTG	2	กรัม
น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร

เขย่าให้สารละลายเข้ากันจากนั้นปรับปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่าน Nylon syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

X-gal solution

X-gal	20	กรัม
Dimethylformamide	1	มิลลิลิตร

เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นห่อหลอดที่เก็บสารด้วยฟรอย เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

RF1 solution

RbCl	1.21	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.99	กรัม
CH_3CO_2K	0.294	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.148	กรัม
Glycerol	15	กรัมต่อ 12 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 0.2 M acetic acid ให้ได้ 5.8 กรองผ่าน Nylon syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

RF2 solution

MOPS	0.105	กรัม
RbCl	0.06	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.55	กรัม
Glycerol	15	กรัมต่อ 12 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 1 M NaOH ให้ได้ 6.8 กรองผ่าน Nylon syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม TBE 5X pH 8 ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base (0.45M)	54	กรัม
Boric acid (0.45M)	27.5	กรัม
EDTA pH 8.0 (0.01M)	20	มิลลิลิตร (ของ 0.5M EDTA)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวเพ็ญภัสสร บรรจงศิริ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810620044

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2558

ทุนการศึกษา

- ทุนอุดหนุนเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสนับสนุนการทาวิจัย สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงาน

เพ็ญภัสสร บรรจงศิริ, Mutiara K. Pitaloka และ อนุรักษ์ สันป่าเป้า. 2559. การแยก การจัดจำแนกชนิดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ สาหร่ายปรสิตพืช *Cephaleuros* spp. บนอาหารสังเคราะห์. แก่นเกษตร 44(ฉบับพิเศษ 1): 918–923.

เพ็ญภัสสร บรรจงศิริ, นราสินี ถี่ถ้วน, นงนารถ พ่อค้า, ศิวเรศ อารีกิจ, และ อนุรักษ์ สันป่าเป้า. 2560. สาหร่ายสีเขียวอันดับ Trentepohliales (Chlorophyta, Ulvophyceae) และผลกระทบบนพืชอาศัยลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.). วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 3 (ฉบับพิเศษ 1): 24 – 30.

นราสินี ถี่ถ้วน, **เพ็ญภัสสร บรรจงศิริ**, นงนารถ พ่อค้า, ศิวเรศ อารีกิจ, และ อนุรักษ์ สันป่าเป้า. 2559. การพัฒนาโครงสร้างสืบพันธุ์ของสาหร่ายปรสิตพืช *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries บนพืชอาศัยลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.). วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 3 (ฉบับพิเศษ 1): 31– 35.

Bunjongsiri, P. and Sunpapao, A. 2018. Optimal growth condition for *in vitro* culture of plant parasitic algae *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries. The Philippine Agricultural Scientist. Web of Science (WoS), IF = 0.266.

Sunpapao, A., Thithuan, N., **Bunjongsiri, P**. and Arikit, S. 2016. *Cephaleuros parasiticus*, associated with algal spot disease on *Psidium guajava* in Thailand. Australasian Plant Disease Notes. 11(12): 1–4.

Sunpapao, A., **Bunjongsiri, P.**, Thithuan, N. and Arikit, S. 2017. First report of *Cephaleuros virescens* (Ulvophyceae, Chlorophyta) causing algal leaf spot of *Maniikara zapota* in Thailand. Plant Disease 101(4): 636. Web of Science (WoS), IF = 3.192.

Wonglom, P., Thithuan, N., **Bunjongsiri, P**. and Sunpapao, A. 2018. Plant-parasitic algae (*Cephaleuros* spp.) in Thailand, including four new records. Pacific Science. . Web of Science (WoS), IF = 0.90 (Revised)