การแยกเพาะเลี้ยงและการศึกษารงควัตถุของสาหร่ายก่อโรคพืชสกุล *Cephaleuros*

เขมิสรา รัตนไพบูลย์กิจ[1] และ ธัญนันท์ วรรณธง[*2]
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ เลขที่ 6 ถนนราชมรรคาใน
อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

บทคัดย่อ

โรคใบจุดสาหร่าย หรือ โรคใบจุดสนิม มีเชื้อก่อโรคเป็นสาหร่ายสีเขียวในสกุล *Cephaleuros* (สาหร่ายกึ่งบนบกดิวิชันคลอโรไฟตา) ลักษณะของรอยโรคใบจุดสาหร่ายบนพืชที่ติดเชื้อนั้นเกิดจากโคโลนีของสาหร่ายซึ่งมีลักษณะค่อนข้างกลมและฟูคล้ายกำมะหยี่เจริญอยู่ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเป็นวงขนาดเล็กสีส้มแดงคล้ายสีสนิมเหล็ก ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยสามารถแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท จากพืช 6 ชนิดได้แก่ ส้มโอ มะนาว ฝรั่ง ชายผ้าสีดา อโศกอินเดีย และชมพู่มะเหมี่ยว ผลการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S ribosomal RNA ในสาหร่ายทั้ง 6 ไอโซเลทบ่งชี้ว่าตัวอย่างที่แยกได้ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Cephaleuros* การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระยะแรกใช้อาหารสูตร HSM เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ และเมื่อทดลองเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร Bristol พบว่า เส้นสายของสาหร่ายมีการพัฒนาจากสีเขียวเป็นสีส้มอมแดง ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างสาหร่ายที่เปลี่ยนสีด้วยเครื่อง Ultra high Performance Liquid Chromatography พบว่า รงควัตถุในตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ประกอบด้วย ลูทีน คลอโรฟิลล์ บี และเบต้าแคโรทีน ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร Bristol พบเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุหลักเพียงชนิดเดียว

คำสำคัญ : การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่าย / สาหร่าย / *Cephaleuros* / สาหร่ายก่อโรคพืช / โรคใบจุดสาหร่าย / เบต้าแคโรทีน

* *Corresponding Author : wannathong__t@silpakorn.edu, wthanyanu@gmail.com*

1 *นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์*

2 *อาจารย์ประจำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์*

Isolation and Pigment Investigation of Plant Pathogenic Algae Genus *Cephalueros*

Kemissara Ratanapaiboonkit[1] and Thanyanan Wannathong[2*]

Silpakorn University, Sanam Chandra Palace Campus, 6 Rajamankha Nai Road, Amphoe Muang, Nakhon Pathom 73000.

Abstract

Algal leaf spot or red rust is a higher plant disease commonly caused by parasitic algae in the genus *Cephaleuros* (subaerial alga in the division Chlorophyta). The lesions found on the surface of infected plants result from algal colonies, which are usually rough, circular, raised and velvet in appearance. This algal infection is visible as an orange-rusty coloured patch. In this study, 6 isolates of pathogenic algae were obtained from 6 host plants, namely, pomelo, lime, disk staghorn, guava, mast tree and pomerac. A morphological investigation and partial analysis of 18S rRNA gene sequences indicated that all 6 algal isolates are members of the genus *Cephaleuros*. Isolation of those algae was initially performed on HSM to obtain pure cultures. Subsequently, all *Cephaleuros* isolates were transferred into Bristol medium. The growing algal filaments in the latter culture medium were found to have developed into a deep orange colour. The algal pigment investigation using ultra high performance liquid chromatography revealed that HSM culture contained lutein, chlorophyll b and ß-carotene, whereas Bristol culture contained only ß-carotene as the main pigment.

Keywords : Algal Isolation / Algae / *Cephaleuros* / Plant Parasitic Algae / Algal Leaf Spot / ß-carotene

* *Corresponding Author : wannathong__t@silpakorn.edu, wthanyanu@gmail.com*

1 *Master of Science Student, Department of Biology, Faculty of Science.*

2 *Lecturer, Department of Biology, Faculty of Science.*

1. บทนำ

ปัญหาหนึ่งที่สำคัญสำหรับเกษตรกรผู้เพาะปลูกพืช นอกจากต้นทุนทางการเกษตรที่เกิดจากปุ๋ย ยากำจัดวัชพืช และแมลงศัตรูพืชที่มีราคาสูงขึ้นแล้ว โรคพืชก็ยังเป็นอีกหนึ่งปัญหาสำคัญสำหรับเกษตรกร เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ ยิ่งไปกว่านั้นหากพืชมีการติดเชื้อที่รุนแรงย่อมส่งผลกระทบต่อต้นพืชโดยตรง อาจทำให้ต้นพืชอ่อนแอ ผลผลิตลดลงหรือตาย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกษตรกรผู้เพาะปลูกต้องหาวิถีทางในการป้องกันและกำจัดโรคพืชเพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตควบคู่ไปกับการเพาะปลูกพืชตามปกติ โดยเชื้อสาเหตุของโรคพืชที่พบได้ทั่วไปมักเกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มราและแบคทีเรีย เช่น โรคราสนิม ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Puccinia sorghi* หรือโรคแคงเกอร์ (Canker) ที่มีเชื้อสาเหตุเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* โรคติดเชื้อทั้งสองโรคที่กล่าวมา มักก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงแก่ต้นพืช อาทิ ทำให้ผิวของผลผลิตไม่สวยงาม ใบร่วง และต้นพืชทรุดโทรม [1]

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มที่สามารถก่อให้เกิดโรคแก่พืชได้ โดยจากการค้นคว้าเกี่ยวกับโรคพืชพบว่ามีรายงานการเกิดโรคจากสาหร่ายอยู่บ่อยครั้งและโรคที่พบได้บ่อยที่สุดก็คือ โรคใบจุดสาหร่าย หรือ โรคจุดสาหร่าย บางครั้งเรียก โรคจุดสาหร่ายสนิม หรือ โรคใบจุด [2] ซึ่งโรคที่กล่าวมานี้ตรงกับชื่อโรคภาษาอังกฤษว่า Algal leaf spot หรือ Algal red rust disease [3] โดยมีสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* เป็นเชื้อสาเหตุ การติดเชื้อของโรคใบจุดสาหร่ายมักพบรอยโรคบริเวณใบมากกว่าบริเวณอื่นของพืช ซึ่งการติดเชื้อที่ใบนั้นส่งผลโดยตรงทำให้พืชมีพื้นที่ในการสังเคราะห์แสงลดลง หรือในกรณีที่เกิดการติดเชื้อรุนแรงเป็นระยะเวลานาน ย่อมส่งผลให้ต้นพืชทรุดโทรม แคระแกร็น เปลือกแตกร่อน ใบร่วง การเจริญเติบโตชะงักและผลผลิตลดลง [4] ทั้งนี้มีรายงานว่า สาหร่ายสกุลนี้สามารถก่อโรคกับพืชได้หลากหลายเกือบ 300 ชนิด [1]

ในประเทศไทยมีรายงานอุบัติการณ์ของโรคใบจุดสาหร่าย (disease incidence) ในพืชเศรษฐกิจ เช่น ส้มโอ มะนาว ชา มะม่วง พุทรา ลำไย ลิ้นจี่ และยางพารา อย่างต่อเนื่อง [2, 5] อย่างไรก็ตาม จากการติดตามค้นคว้าข้อมูลพบเพียงการรายงานข้อมูลเบื้องต้นอย่างไม่เป็นทางการของโรคใบจุดสาหร่ายที่กล่าวถึงพืชเจ้าบ้าน อาการโดยทั่วไปของโรค พื้นที่ที่พบการติดเชื้อของโรค และวิธีการป้องกันและกำจัดโรคเท่านั้น ในขณะที่รายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสาหร่ายก่อโรคอย่างเป็นทางการกลับมีปรากฏอยู่น้อยมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดลองสุ่มสำรวจเก็บและคัดแยกตัวอย่างตัวอย่างพืชที่ติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายจากพื้นที่ 3 อำเภอ รอบมหาวิทยาลัยศิลปากร ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม และอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร เพื่อศึกษาถึงการปรากฏและสาเหตุของโรคดังกล่าว รวมไปถึงลักษณะ ชนิดของสาหร่าย วิธีการแยกเชื้อและอาหารที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคใบจุดสาหร่ายภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนคุณลักษณะต่างๆ ของเชื้อสาหร่ายที่แยกได้รวมทั้งชนิดของรงควัตถุ ทั้งนี้เนื่องจากพื้นที่บริเวณ 3 อำเภอดังกล่าวนั้นมีการใช้ประโยชน์สำหรับอยู่อาศัยควบคู่ไปกับการทำการเกษตรกระจายสลับกันอยู่ทั่วไป โดยมีพืชสวนเศรษฐกิจที่สำคัญของท้องที่ได้แก่ ส้มโอและมะนาว นับได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นที่น่าสนใจสำหรับการริเริ่มศึกษาโรคพืชมีเชื้อสาเหตุเป็นสาหร่ายสกุลนี้

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่างพืช

การเก็บตัวอย่างพืชที่พบโรคใบจุดสาหร่ายอาศัยวิธีการสุ่มเก็บจากทั้งพื้นที่เกษตรกรรมและบ้านเรือนที่พักอาศัย รวมทั้งหมด 5 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ พื้นที่สวนส้มโอและสวนฝรั่ง 2 จุด ใน อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม พื้นที่สวนมะนาว อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร 1 จุด และพื้นที่บ้านพักอาศัย อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 2 จุด การเก็บตัวอย่างพืชที่คาดว่าติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายทำได้โดยการสังเกตลักษณะรอยโรคบนพืชด้วยตาเปล่า รอยโรคดังกล่าวเป็นแผลที่เกิดจากสาหร่ายเจริญบนเนื้อเยื่อพืชและสร้างโคโลนีที่มีลักษณะกลม สีเขียวอมเหลือง หรือ ส้มแดงคล้ายสีสนิมเหล็ก ผิวหน้าโคโลนีฟูคล้ายกำมะหยี่นูนขึ้นมาจากพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืชอย่างชัดเจน [3, 6] ตัวอย่างชิ้นส่วนพืชจะถูกบรรจุในถุงเก็บตัวอย่างและนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแยกเพาะเลี้ยงในวันเดียวกัน ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม

2.2 การแยกเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่ายก่อโรคในห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างชิ้นส่วนพืชที่มีการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายมาทำความสะอาดเบื้องต้นตามวิธีของ Suto และ Ohtani [7] โดยนำตัวอย่างพืชติดเชื้อไปผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการทำความสะอาดบริเวณรอยโรคด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% และตัดชิ้นส่วนบริเวณดังกล่าวด้วยใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ก่อนนำชิ้นส่วนพืชที่ตัดได้ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร High salt medium หรือ HSM [8] ซึ่งเป็นสูตรอาหารจำเพาะสำหรับการคัดเลือกเพื่อเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตจำพวก photoautotroph และทำการถ่ายเส้นสายสาหร่าย (algal filament) ลงอาหารขวดใหม่เมื่อพบการเจริญเติบโต และทำการถ่ายเส้นสายซ้ำจนกว่าจะได้เชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์โดยมีการเติมสารปฏิชีวนะเพื่อฆ่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามความเหมาะสม [9]

2.3 การจำแนกชนิดเชื้อสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย

2.3.1 การจำแนกชนิดเชื้อสาหร่ายก่อโรคโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา

จัดจำแนกชนิดเชื้อก่อโรคใบจุดสาหร่ายเบื้องต้นโดยศึกษาจากลักษณะภายนอกที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ได้แก่ ลักษณะ ของโคโลนี เช่น ขนาด รูปร่าง สี ตำแหน่งการเกิดรอยโรคบนพืช และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ รูปร่างและจำนวนอับสปอร์ ตำแหน่งการเข้าทำลายของโรค เป็นต้น โดยอ้างอิงจากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น Suto และคณะ [10, 11] Rindi และคณะ [12, 13] Thompson และ Wujek [6] Tiwari และคณะ Muthukumar และคณะ [14]

2.3.2 การจำแนกชนิดเชื้อสาหร่ายก่อโรคโดยวิธีอณูชีววิทยา

ยืนยันชนิดของสาหร่ายก่อโรคที่แยกเพาะเลี้ยงเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์แล้วด้วยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA (18S ribosomal RNA) ตามวิธีการของ Sambrook และคณะ [15] ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม (genomic DNA extraction) ด้วยวิธี Phenol-Chloroform extraction การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอนเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR; Polymerase chain reaction) และการจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูล NCBI

การสกัดสารพันธุกรรมของสาหร่ายทำได้โดยนำสาหร่ายที่แยกเพาะเลี้ยงให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ตามวิธีการทดลองที่ 2.2 มาบดด้วย micro pestle ในหลอดทดลอง จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย Sodium Chloride Tris EDTA buffer (pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบ/วินาที นาน 1 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดทิ้งไป แล้วจึงนำมาเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 150 ไมโครลิตร พร้อมกับ SDS-EB buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol 350 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบ/วินาที นาน 5 นาที ดูดและถ่ายสารละลายส่วนใสชั้นบนลงในหลอดใหม่ เติม 95% เอทานอลเย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดมา พลิกหลอดกลับไป-มา แล้วบ่มในตู้เย็นอย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำหลอดตัวอย่างออกมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบ/วินาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ดูดสารละลายออกทิ้งทั้งหมด แล้วเติม 70% เอทานอล ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง โดยการปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม นาน 10 นาที ดูดสารละลายออกทิ้ง และปล่อยให้ดีเอ็นเอซึ่งจะตกตะกอนที่ก้นหลอดแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°c จนกว่าจะใช้งาน

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอนเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ทำได้โดยใช้ไพรเมอร์ 107F: 5'-CGAATGGCTCAT-TAAAT-3' และ ChloroR: 5'-GAATCAACCTGACA AGGCAAC-3' (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 1.) น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 40.5 µL 2.) 2X iTaq DNA polymerase buffer (Bio-rad, CA, USA) 2.5 µL 3.) KAPA dNTP mix 10 mM (KAPA Biosystem, MA, USA) 1 µL 4.) ไพรเมอร์ 107F ความเข้มข้น 2 µM 1 µL 5.) ไพรเมอร์ ChloroR ความเข้มข้น 2 µM 1 µL 6.) จีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่าย 2 µL 7.) iTaq DNA polymerase (Bio-Rad, CA, USA) 0.25 µL ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 50 µL จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal

cycle (ยี่ห้อ Analytikjena, รุ่น FlexCycler, Thuringia, Germany) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 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.) elongation ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 20 วินาที ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 7 นาทีจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปทำการตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำข้อมูลมาทำการจัดเรียงเปรียบเทียบ (BLAST search) กับฐานข้อมูล NCBI เพื่อยืนยันชนิดของสาหร่ายก่อโรค

สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากข้อมูลทางอณูชีววิทยาทำได้โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาจัดเรียงด้วยโปรแกรม Bioedit v. 7.0.9 [16] ด้วยคำสั่งอัตโนมัติ CLUSTALW multiple alignment นำลำดับที่ได้จัดเรียงเรียบร้อยแล้วมาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Cladogram) ด้วยโปรแกรม PAUP* for window version 4.0 b10 โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony และใช้ Heuristic search ในการค้นหา Most parsimonious tree(s) ด้วยจำนวนซ้ำในการวิเคราะห์เท่ากับ 1,000 สำหรับในกรณีที่เกิดรูปแบบของแผนภูมิที่เป็น Most parsimonious tree มากกว่า 1 รูปแบบ จะทำการสรุปให้เป็น consensus tree โดยใช้รูปแบบ strict consensus จากนั้นวิเคราะห์ต่อเพื่อหาค่า Bootstrap support โดยกำหนดค่าต่างๆ เช่นเดียวกับที่ตั้งไว้สำหรับ Heuristic search

2.4 การสกัดและวิเคราะห์ชนิดรงควัตถุที่พบในสาหร่ายก่อโรค

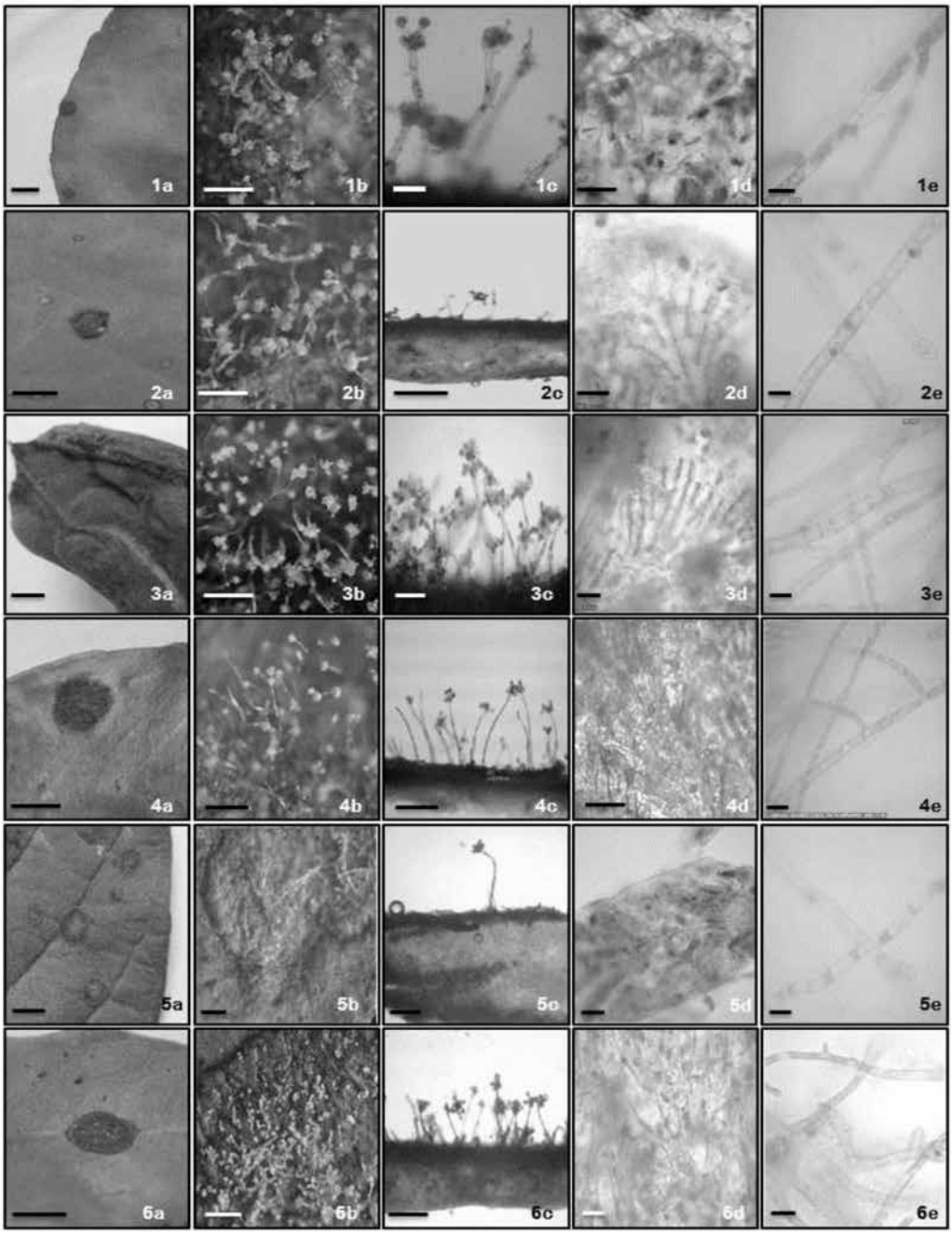
นำสาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร HSM และ Bristol เป็นเวลา 60 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilisation) ก่อนนำมาสกัดรงควัตถุตามวิธีของ Fraser และคณะ [17] กล่าวคือ ชั่งเส้นสายของสาหร่ายที่บดจนละเอียดปริมาณ 10 มิลลิกรัม นำมาสกัดโดยเติมน้ำและเมทานอลอย่างละ 400 ไมโครลิตร เขย่าจนเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 60 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าอีกครั้งแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบ/วินาที นาน 5 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนล่างที่มีรงควัตถุละลายอยู่ไปกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง evaporator and concentrator (ยี่ห้อ GeneVac, รุ่น EZ-2, Suffolk, UK)

สำหรับการวิเคราะห์รงควัตถุด้วยเครื่อง ultrahigh performance liquid chromatography (UPLC, ยี่ห้อ Waters รุ่น Acquity, UK) ร่วมกับ photodiode array detector และคอลัมน์ BEH C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 μm) ตามที่อธิบายไว้ใน Nogueira และคณะ [18] โดยละลายสารสกัดที่แห้งสนิทแล้วด้วย ethyl acetate ปริมาตร 50 μL ระบบการวิเคราะห์ประกอบด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้แก่ สารชนิด A: methanol/H_2O (50:50 by volume) สารชนิด B: acetonitrile/ethyl acetate (75:25 by volume) สภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณรงควัตถุใช้สัดส่วนของ mobile phase ตามลำดับต่อไปนี้ 50% A ต่อ 50% B เป็นเวลา 0.5 นาที จากนั้น 30% A ต่อ 70% B เป็นเวลา 4.5 นาที จากนั้น 0% A ต่อ 100% B เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น 30% A ต่อ 70% B เป็นเวลา 1 นาที และ 50% A ต่อ 50% B เป็นเวลา 2 นาที ปริมาณสารที่ใช้ฉีดตัวอย่างเท่ากับ 3 ไมโครลิตร การวินิจฉัยชนิดของรงควัตถุที่พบทำโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานดังที่อธิบายไว้ใน Fraser และคณะ [17]

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 พืชที่พบการติดโรคใบจุดสาหร่าย

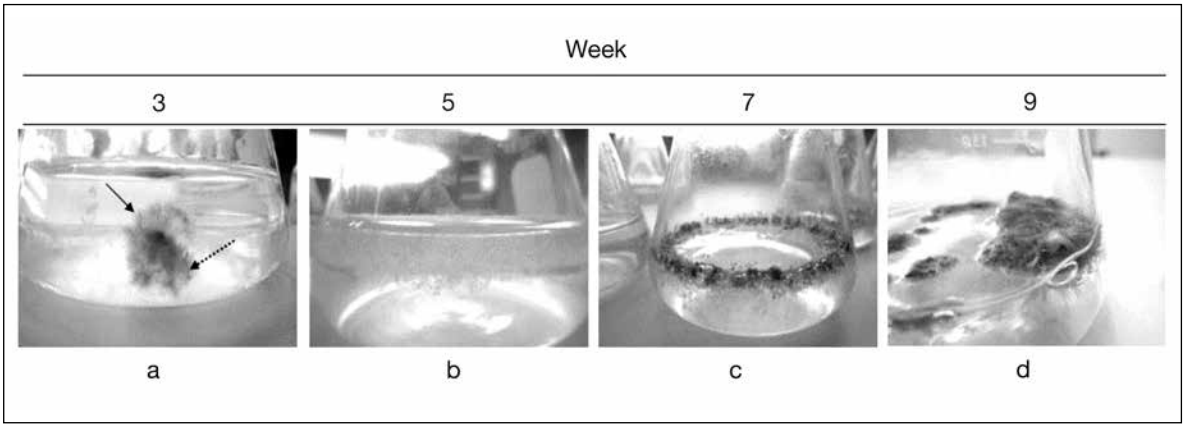
ผลจากการสุ่มเก็บตัวอย่างในพื้นที่ 3 อำเภอ 2 จังหวัด 5 จุดเก็บตัวอย่าง พบการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายบนพืชทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ มะนาว (จุดเก็บตัวอย่างสวนมะนาว อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร) ส้มโอ ฝรั่ง (จุดเก็บตัวอย่างสวนผลไม้ในอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม) เฟินชายผ้าสีดา ชมพู่มะเหมี่ยว และอโศกอินเดีย (จุดเก็บตัวอย่างบ้านพักอาศัย 2 แห่ง อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม) โดยรอยโรคใบจุดสาหร่ายที่พบบนตัวอย่างพืชทั้งหมดนั้นเกิดบนส่วนใบพืช ดังแสดงในรูปที่ 1 (1a - 6a) โดยไม่พบการเกิดโรคที่ส่วนอื่นๆ ของพืชแต่อย่างใด



รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย
รูปที่ 1a-6a; ลักษณะรอยโรค (โคโลนี) ของสาหร่ายทั้ง 6 ตัวอย่าง (Scale bar = 1cm.) บนใบพืชที่พบโรคใบจุดสาหร่าย ได้แก่ ใบมะนาว (1a) ใบชมพู่มะเหมี่ยว (2a) ใบเฟิน ชายผ้าสีดา (3a) ใบส้มโอ (4a) ใบฝรั่ง (5a) และใบอโศกอินเดีย (6a) รูปที่1b-6b; ลักษณะรอยโรคและอับสปอร์ของสาหร่ายก่อโรค (Scale bar = 200 µm.) รูปที่ 1c-6c; ตำแหน่งของรอยโรคบนใบพืชและลักษณะอับสปอร์ (Scale bar = 200 µm.) รูปที่ 1d-6d; ลักษณะของทัลลัสของสาหร่ายแบบ Pseusopharenchymatous ramuli (Scale bar = 50 µm.) รูปที่ 1e-6e; ลักษณะของเส้นสายของตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคเมื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Scale bar = 20 µm.)

3.2 การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคในห้องปฏิบัติการ

สาหร่ายก่อโรค *Cephaleuros* ทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถแยกเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร HSM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและให้แสงตลอดเวลา ในระยะแรกของการแยกเพาะเลี้ยงพบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อราอย่างรุนแรง (รูปที่ 2a ลูกศรเส้นประ) แต่สามารถแก้ไขให้ลดลงในระยะต่อมาด้วยการใช้เทคนิคถ่ายเชื้อซ้ำหลายๆ ครั้ง (subculture technique) ในอาหารสูตร HSM จนกระทั่งสามารถแยกได้สาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยสาหร่าย *Cephaleuros* ที่ทำการเพาะเลี้ยงทั้งหมดในช่วงแรกจะสังเกตเห็นได้ว่ามีการเจริญเติบโตของเส้นสายและเพิ่มมวลชีวภาพอย่างช้าๆ โดยจะพบเห็นการแตกแขนงของเส้นสายสาหร่ายในอาหารเหลวได้อย่างชัดเจนในช่วงสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 2b) การเติบโตและการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพสามารถสังเกตได้อย่างต่อเนื่องจนถึงสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งในช่วงระยะนี้เส้นสายของสาหร่ายจะเจริญและเริ่มเกาะกลุ่มกันจนมองเห็นเป็นก้อนแพ (รูปที่ 2c) เมื่อปล่อยให้สาหร่ายเจริญเติบโตต่อไปโดยไม่ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารขวดใหม่จะพบว่า เส้นสายส่วนบริเวณผิวหน้าของกลุ่มก้อนสาหร่ายจะเกาะกลุ่มกันจนเป็นแพหนาและเจริญยืดตัวจากผิวหน้าของอาหารเหลวขึ้นไปในอากาศ (รูปที่ 2d) และเมื่อทดสอบความสามารถในการเจริญของสาหร่าย *Cephaleuros* ในอาหารสูตร Bristol ผลปรากฏว่า ตรวจพบการเจริญเติบโตหลังการถ่ายเชื้อสาหร่ายลงเลี้ยงเช่นกัน หากแต่สังเกตได้ชัดว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญที่ช้ากว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร HSM ขณะเดียวกันจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของเส้นสายสาหร่ายจากสีเขียวเป็นสีส้มอย่างช้าๆ ไปพร้อมกับการเจริญเติบโต จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีส้มทั้งหมดหลังจากเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลาประมาณ 4-5 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามข้อสังเกตที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งก็คือ ในการศึกษาสัณฐานวิทยาของสาหร่ายที่แยกเพาะเลี้ยงได้ใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สาหร่าย *Cephaleuros* ทุกไอโซเลทที่เจริญภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการไม่สามารถสร้างโครงสร้างในการสืบพันธุ์ได้



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของเส้นสายสาหร่ายตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์) โดยตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือบริเวณที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อรา (ลูกศรเส้นประ) เจริญร่วมกับเส้นสายของสาหร่าย(ลูกศรเส้นทึบ)

3.3 สัณฐานวิทยาและชนิดของเชื้อสาหร่ายก่อโรค

3.3.1 สัณฐานวิทยาของสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย

หลังจากทำการรวบรวมข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างโรคใบจุดสาหร่ายที่ได้มาทั้งหมดและเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าตัวอย่างโรคใบจุดสาหร่ายที่คัดแยกมาได้นั้นมีตำแหน่งการเกิดรอยโรคที่บริเวณผิวใบพืชด้านบนในทุกตัวอย่าง อีกทั้งยังมีสีโคโลนีของโรคที่ใกล้เคียงกันคือมีสีส้มคล้ายสีสนิม นอกจากนี้ยังพบว่า รอยโรคที่เกิดจากเชื้อสาหร่ายทั้งหมดมีรูปร่าง

ลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว (รูปที่ 1a-2a, 4a-6a) กระจายอยู่ทั่วไปบนใบพืช โคโลนีมีขนาดตั้งแต่ 3 – 12 มิลลิเมตร ยกเว้นตัวอย่างสาหร่าย Cp.3 ที่แยกได้จากเฟินชายผ้าสีดามีลักษณะโคโลนีของสาหร่ายก่อโรคที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ มีรูปร่างโคโลนีที่ไม่แน่นอน (amorphous form) และพบรอยโรคใบจุดสาหร่ายขนาดใหญ่ปกคลุมทั่วทั้งใบของชายผ้าสีดา (รูปที่ 3a)

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์ที่พบในแต่ละตัวอย่างสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่า โครงสร้างของสปอร์ (sporangia) ที่ใช้ในการสืบพันธุ์ของสาหร่ายก่อโรคนั้นถูกสร้างจากทัลลัส (thallus) และชูขึ้นไปในอากาศ จึงเป็นส่วนที่ทำให้มองเห็นรอยโรคมีลักษณะที่ฟูคล้ายกำมะหยี่สีส้มสนิมเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า (รูปที่ 1b-6b) ตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมดมีโครงสร้างสืบพันธุ์ที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ รูปร่างของอับสปอร์ค่อนข้างรี กว้างประมาณ 24 – 26 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 14 - 17 ไมโครเมตร (รูปที่ 1c-6c) และอับสปอร์มีสีส้มคล้ายสีสนิม จำนวนอับสปอร์ที่พบมีจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 3 -5 อับสปอร์ต่อหนึ่งก้านชูอับสปอร์ (sporangiophore) อีกทั้งยังพบว่า มีการวางตำแหน่งของอับสปอร์ (head cell) ที่บริเวณส่วนปลายของก้านชูอับสปอร์ (terminal head cell) ขนาดของก้านชูสปอร์มีความกว้างประมาณ 16 - 20 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 250 - 320 ไมโครเมตร โดยที่บริเวณฐานของก้านชูอับสปอร์ไม่พบลักษณะกระเปาะ (bulbous)

ตัวอย่างโรคใบจุดสาหร่ายที่แยกได้ทุกตัวอย่างมีรูปแบบการเจริญของทัลลัสเป็นแบบ pseudoparenchymatous ramuli โดยเส้นสายของสาหร่ายก่อโรคจะเจริญสานกันมองเห็นคล้ายเป็นเนื้อเยื่อพาเรงคิมาเทียมและแทรกอยู่ใต้ชั้นคิวติเคิลของใบพืช (รูปที่ 1d-6d) พบการเรียงตัวของเส้นสายกระจายออกในแนวรัศมี (circular disk) เช่นเดียวกับที่พบในรายงานของ Suto และคณะที่ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายก่อโรคใบจุดในประเทศญี่ปุ่น [19] และอินเดีย [11] การศึกษาเส้นสายของสาหร่าย (filament cell) ที่แยกได้ทั้ง 6 ตัวอย่างที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบพบว่า เซลล์สาหร่ายมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า (long-cylindrical) ความกว้างประมาณ 6 - 9 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 64 - 69 ไมโครเมตร (รูปที่1e - 6e)

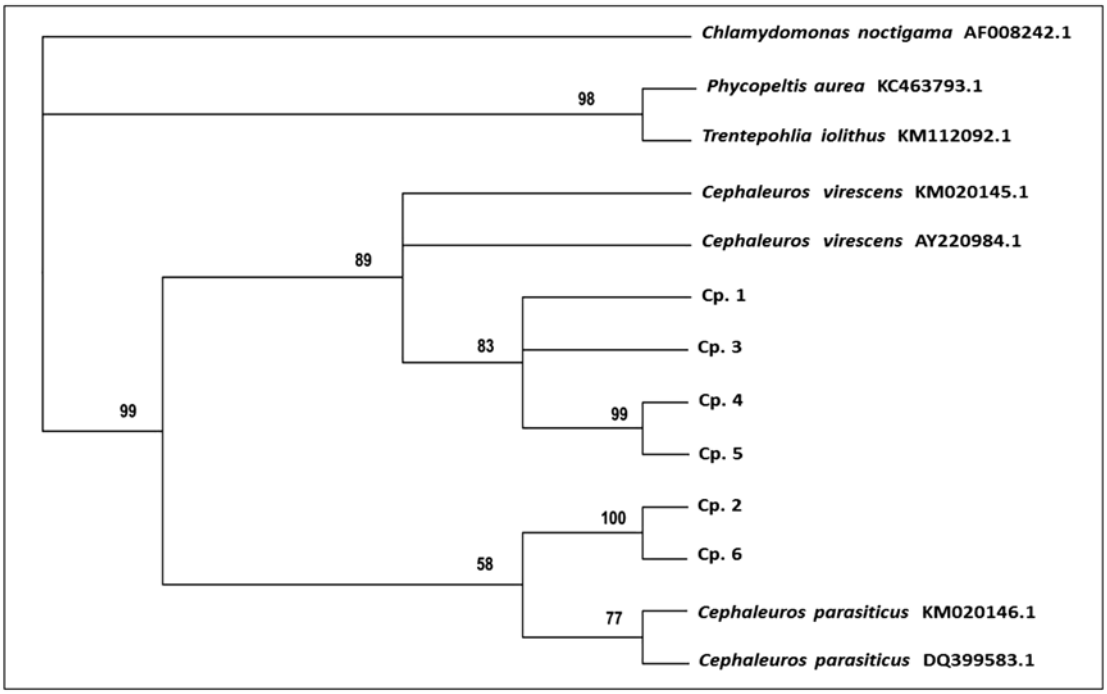
จากการรวบรวมข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายทั้ง 6 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาหร่ายก่อโรคพืชที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ อาทิ Suto และคณะ [10, 11, 19] Rindi และคณะ [12, 13] Thompson และ Wujek [6] Brooks [1] อนุรักษ์ และคณะ [5] พบว่า ข้อมูลทั้งหมดที่รวบรวมได้นั้นมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Cephaleuros virescens* Kunze โดยเฉพาะลักษณะของรอยโรค ตำแหน่งการเกิดโรค และตำแหน่งที่พบโครงสร้างสืบพันธุ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปได้เบื้องต้นว่า เชื้อสาหร่ายก่อโรคทั้งหมดที่พบและแยกได้จากการเก็บตัวอย่างพืชที่ติดโรคใบจุดสาหร่ายคาดว่าเป็นชนิด *C. virescens* อย่างไรก็ตาม เพื่อให้การจำแนกชนิดสาหร่ายมีความชัดเจนยิ่งขึ้น ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่ตำแหน่งยีน 18s rRNA ดังแสดงในผลการทดลองถัดไป

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ของตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคทั้ง 6 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง ลักษณะ	Cp.1	Cp.2	Cp.3	Cp.4	Cp.5	Cp.6
พืชเจ้าบ้าน	มะนาว (*Citrus aurantifolia*)	ชมพู่มะเหมี่ยว (*Syzygium alaccense*)	ชายผ้าสีดา (*Platycerium holtumii*)	ส้มโอ (*Citrus maxima*)	ฝรั่ง (*Psidium guajava*)	อโศกอินเดีย (*Polyalthia longifolia*)
สีโคโลนี	สีส้มสนิมอมเขียว	สีคล้ำน้ำตาลแดง	สีส้มคล้ายสนิมเหล็ก	สีส้มแดงคล้ายสนิมเหล็ก	สีส้มคล้ายสนิมเหล็ก	สีส้มคล้ายสนิมเหล็ก ขอบโคโลนีสีเขียว
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วใบ	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วใบ	ไม่มีรูปร่างที่แน่นอน ปกคลุมทั่วใบ	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วใบ	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วใบ	โคโลนีเดี่ยว รูปร่างกลม กระจายทั่วใบ
ขนาดโคโลนี (mm.)	3 - 4	3 - 5		6 - 8	7 - 12	3 - 8
ขอบโคโลนี	ขอบโคโลนีเรียบ เห็นขอบได้ชัดเจน	ขอบโคโลนีเรียบ เห็นขอบไม่ชัดเจน	ไม่มีขอบเขตของรอย โรคที่ชัดเจน	ขอบโคโลนีขรุขระ เห็นขอบชัดเจน	ขอบโคโลนีขรุขระ เห็นขอบไม่ชัดเจน	ขอบโคโลนีเรียบ เห็นขอบชัดเจน
ขนาดเซลล์สาหร่าย (μm)	6.59±0.35	7.86±0.82	8.82±1.22	7.11±1.43	7.49±0.65	7.86±0.57
(กว้าง × ยาว)	× 67.01±8.25	× 69.02±5.88	× 68.24±4.25	× 68.91±5.19	× 68.50±12.51	× 64.54±5.71
สีอับสปอร์	อับสปอร์สีขาวปนสีส้ม	อับสปอร์สีขาวปนสีส้ม	อับสปอร์สีขาวปนสีเหลือง	อับสปอร์สีส้มสนิม	อับสปอร์สีส้มสนิม	อับสปอร์สีขาวปนส้ม
ขนาดอับสปอร์ (m)	25.86±1.77	25.02±1.83	24.61±1.68	24.64±1.90	24.53±1.43	25.46±3.74
(กว้าง × ยาว)	× 15.6±1.04	× 14.00±1.21	× 15.55±1.32	× 16.17±1.58	× 16.39±2.80	× 15.11±2.03
ขนาดก้านชูอับสปอร์	17.96±1.63	18.50±0.93	16.604±1.62	19.54±2.56	17.30±2.22	17.91±1.02
(m) (กว้าง × ยาว)	× 310.63±30.43	× 313.98±55.97	× 257.74±29.31	× 327.70±48.42	× 302.68±26.83	× 282.16±40.45

3.3.2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอบางส่วนของตำแหน่งยีน 18S rRNA ด้วยไพรเมอร์ 107F และ ChloroR ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ (PCR product) ขนาดประมาณ 1500 bp และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 6 ผลิตภัณฑ์กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างบ่งชี้ว่า ทุกไอโซเลทจัดเป็นสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* หากแต่ไม่สามารถระบุได้ถึงระดับชนิด เนื่องจากระดับความเหมือน (percentage of similarity) ที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ในทั้งสาหร่ายชนิด *C. virescens* และ *C. parasiticus* โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 94-99% อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผ่านลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA จะเห็นได้ว่ากลุ่มตัวอย่างสาหร่ายทั้ง 6 ตัวอย่างที่แยกได้นั้นจัดอยู่ในเคลด (clade) เดียวกันกับสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ที่พบในฐานข้อมูล NCBI (รูปที่ 3) และสามารถจำแนกตัวอย่างได้เป็นสาหร่าย 2 ชนิด โดยตัวอย่างสาหร่าย Cp.1 3 4 และ 5 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสาหร่าย *C. virescens* และตัวอย่าง Cp.2 และ 6 จัดอยู่ในกลุ่มของสาหร่าย *C. parasiticus*

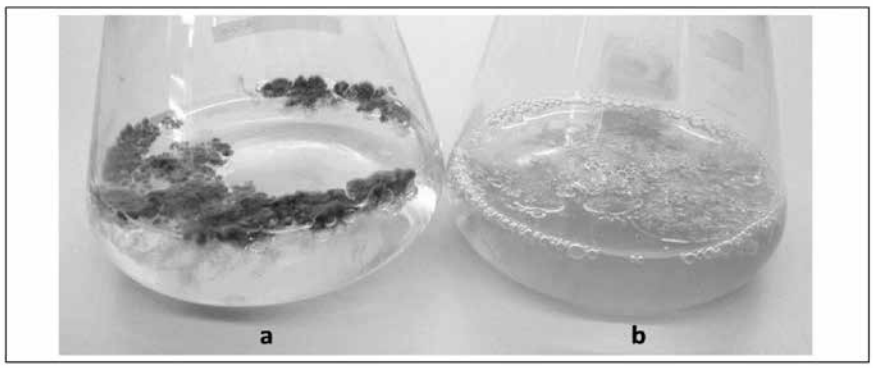


รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ strict consensus tree ของสาหร่ายที่แยกเพาะเลี้ยงได้ (Cp. 1-6) ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

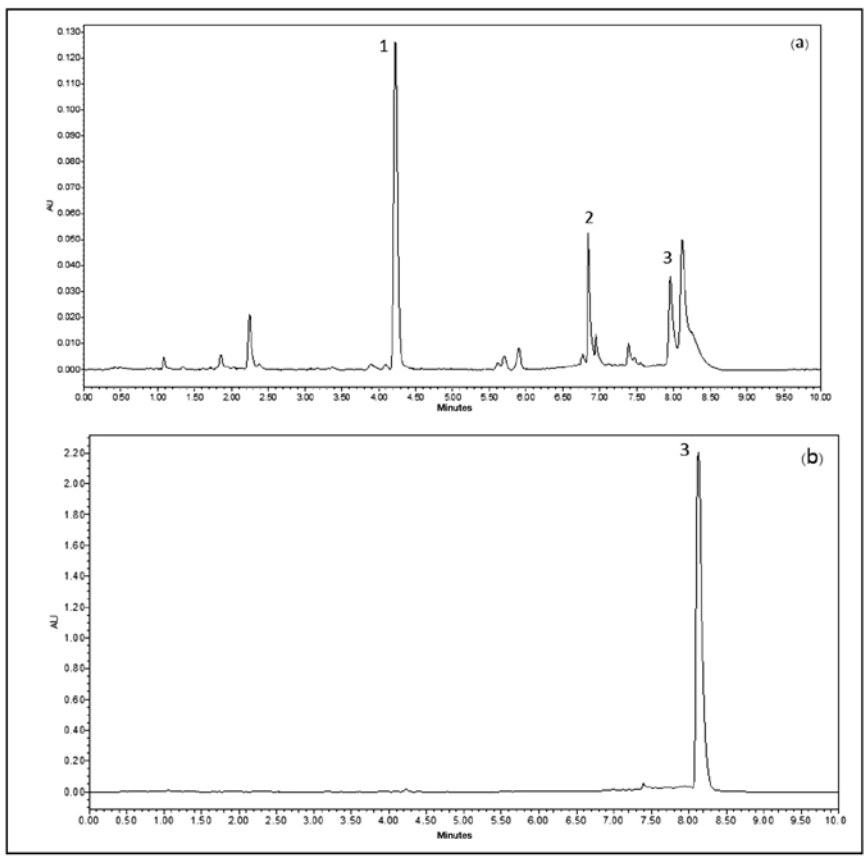
3.4 การศึกษารงควัตถุของสาหร่ายก่อโรคที่แยกได้

สาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ในอาหารสูตร Bristol เช่นเดียวกับอาหารสูตร HSM ข้อแตกต่างที่สังเกตพบคือ เส้นสายของสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM นั้นคงสีเขียวตลอดการเพาะเลี้ยง ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร Bristol มีการพัฒนาจากสีของเส้นสายจากสีเขียวเป็นสีส้มอมแดงหลังจากมีอายุประมาณ 4-5 สัปดาห์ (รูปที่ 4) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของรงควัตถุ (pigment profile) ของสาหร่ายทั้ง 6 ไอโซเลท ด้วยเครื่อง UPLC ระบุว่า ทุกตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วย ลูทีน (lutein) คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) และ เบต้าแคโรทีน (ß-carotene) โดยมีลูทีนเป็นมีรงควัตถุชนิดเด่น (major pigment) ดังแสดงในรูปที่ 5a ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนกับตัวอย่างสาหร่ายสีส้มที่เก็บเกี่ยวจากการเลี้ยงด้วยอาหาร Bristol กล่าวคือ สาหร่ายสีส้ม

นั้นตรวจพบการสะสมรงควัตถุประเภทแคโรทีนอยด์ชนิดเบต้าแคโรทีนเป็นชนิดหลักเพียงชนิดเดียว (รูป 5b) ซึ่งเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเบต้าแคโรทีนมาตรฐาน พบว่า ในระยะเวลาการเลี้ยงนาน 60 วัน สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ตรวจพบเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 193.83 µg/g dry weight ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร Bristol ตรวจพบเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 2,944.26 µg/g dry weight ซึ่งคิดเป็น 15 เท่าของปริมาณที่ตรวจพบในสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM



รูปที่ 4 สาหร่าย *Cephaleuros* ไอโซเลท Cp.3 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM (a) และ Bristol (b)



รูปที่ 5 Chromatograms ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC ในสาหร่าย *Cephaleuros* ไอโซเลท Cp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร HSM (a) และอาหารสูตร Bristol (b) โครมาโตแกรม 1 = Lutein, 2 = Chlorophyll b, 3 = β-Carotene

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 พืชที่พบการติดโรคใบจุดสาหร่าย

งานวิจัยครั้งนี้กล่าวได้ว่าเป็นการเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเพาะเลี้ยงเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดสาหร่ายอย่างเป็นทางการครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบชนิดของพืชตัวอย่างที่พบอาการของโรคใบจุดสาหร่ายกับข้อมูลของประเทศอื่นๆ รวมไปถึงข้อมูลจากประเทศใกล้เคียงที่มีรายงานการสำรวจมาก่อนหน้านี้ ได้แก่ ประเทศอินเดีย จีน เกาหลี และญี่ปุ่น พบว่า มีพืช 3 ชนิดที่ไม่เคยมีรายงานการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายมาก่อน ได้แก่ เฟินชายผ้าสีดา อโศกอินเดีย และชมพู่มะเหมี่ยว การพบการติดเชื้อของพืชดังกล่าวครั้งนี้ จึงนับได้ว่าเป็นการพบและรายงานครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบการเกิดโรคใบจุดสาหร่ายบนต้นแก้วหิมาลัย (*Murraya paniculata* (L.) Jack) ที่ยังไม่เคยมีรายงานการติดเชื้อโรคนี้เช่นกัน หากแต่ผู้วิจัยไม่สามารถแยกเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่ายก่อโรคได้สำเร็จ อย่างไรก็ตามกล่าวได้ว่า ชนิดของพืชเจ้าบ้านสำหรับโรคที่เกิดจากสาหร่ายสกุลนี้ในประเทศไทยมีความหลากหลายที่น่าสนใจ ดังจะเห็นได้จากจำนวนพืชเจ้าบ้านชนิดใหม่ 3 ชนิด จากการสุ่มสำรวจเพียง 5 จุดเก็บตัวอย่างในพื้นที่ส่วนหนึ่งในจังหวัดนครปฐมและจังหวัดสมุทรสาครเท่านั้น กล่าวได้ว่าเป็นงานวิจัยขนาดเล็กที่ทำการสุ่มสำรวจและเก็บตัวอย่างการศึกษาสาหร่ายก่อโรคแต่ก็ได้รับข้อมูลที่น่าสนใจ ทีมผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า ควรสนับสนุนให้มีการขยายพื้นที่ศึกษาโรคใบจุดสาหร่ายและเก็บตัวอย่างให้เป็นระบบมากกว่านี้ รวมไปถึงการศึกษาชีววิทยาของการก่อโรคของสาหร่ายกลุ่มนี้เพิ่มเติมในแง่ของความหลากหลายของพืชเจ้าบ้านกับเชื้อสาหร่ายก่อโรค โดยเฉพาะกับกลุ่มพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในท้องถิ่น เช่น ฝรั่ง ส้มโอ หรือชมพู่ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการป้องกันและกำจัดโรคใบจุดสาหร่ายที่พบในพืชที่เพาะปลูกในประเทศไทยต่อไป

4.2 การแยกเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่ายก่อโรคในห้องปฏิบัติการ

การเจริญของสาหร่าย *Cephaleuros* สามารถตรวจพบได้หลังจากที่ทำการใส่ชิ้นส่วนรอยโรคลงในอาหารเหลวสูตร HSM เป็นเวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์ ซึ่งกล่าวได้ว่า สาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่ายนี้มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้าเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ โดยทั่วไปที่ใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ในการเจริญในอาหารเหลว และในระหว่างขั้นตอนแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคให้ได้เชื้อบริสุทธิ์นั้น ผู้วิจัยพบว่าเกิดการปนเปื้อนโดยเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นสายสีดำ (รูปที่ 2a ลูกศรเส้นประ) เจริญร่วมกับเส้นสายของสาหร่าย (รูปที่ 2a ลูกศรเส้นทึบ) บ่อยครั้ง นับว่าเป็นอุปสรรคสำคัญในการแยกเพาะเลี้ยงสาหร่าย เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร HSM ซึ่งเป็นสูตรอาหารแบบ minimal media ที่นิยมใช้ในการคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่สร้างอาหารเองได้ดีและรวดเร็วเช่นกัน และเนื่องจากสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* เป็นสาหร่ายในกลุ่ม subaerial ที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย ดังนั้นการที่จะแยกสาหร่ายให้ได้เชื้อบริสุทธิ์จึงไม่สามารถใช้วิธี re-streak เพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยวได้เช่นเดียวกับสาหร่ายที่เป็นเซลล์เดี่ยว ผู้วิจัยจึงใช้วิธีการถ่ายเชื้อสาหร่าย (subculture) ด้วยการใช้เข็มเขี่ย (needle) เขี่ยแยกสาหร่ายออกจากเส้นสายของเชื้อราเพื่อถ่ายลงเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ทุกครั้งเมื่อสังเกตพบการปนเปื้อน และการถ่ายเชื้อซ้ำหลายๆ ครั้งนี้เองที่ทำให้สามารถแยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์มากขึ้นในขณะที่การปนเปื้อนของเชื้อราลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์ การแยกเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* ในอาหารสูตร HSM นับว่าได้ผลดี ถึงแม้จะใช้เวลาค่อนข้างนานในการแยกให้ได้สาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ก็ตาม นอกจากปัญหาเรื่องการปนเปื้อนจากเชื้อราแล้ว ข้อสังเกตที่น่าสนใจอีกประการก็คือ สาหร่าย *Cephaleuros* ทุกไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้ไม่สามารถสร้างโครงสร้างในการสืบพันธุ์ในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งข้อสังเกตนี้สอดคล้องกับผลจากงานวิจัยของ Suematu [20] และ Suto [21] ที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายก่อโรคพืชสกุลเดียวกันนี้และรายงานว่าไม่พบการพัฒนาโครงสร้างสืบพันธุ์ในสาหร่ายที่แยกได้ในสภาวะเพาะเลี้ยงปกติ หากแต่ภายหลังมีรายงานเพิ่มเติมว่า สาหร่าย *Cephaleuros* จะสามารถสร้าง gametangia และ sporangia ก็ต่อเมื่อมีการเติมฮอร์โมน Auxin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ [22] ซึ่งนับได้ว่าเป็นข้อมูลที่น่าสนใจที่

ศึกษาต่อถึงสาเหตุและปัจจัยที่ส่งผลต่อการพัฒนาของโครงสร้างสืบพันธุ์ของสาหร่ายกลุ่มนี้

4.3 สัณฐานวิทยาของสาหร่ายก่อโรคใบจุดสาหร่าย

รายงานที่กล่าวถึงเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดสาหร่ายที่ผ่านมามักมีการกล่าวถึงสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* ที่เป็นเชื้อสาเหตุ 2 ชนิด (species) ที่สำคัญ ได้แก่ *C. virescens* และ *C. parasiticus* ซึ่งสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic features) ที่คล้ายคลึงกันมาก นอกไปจากรายงานที่กล่าวถึง *C. virescens* ว่า สามารถพบได้บ่อยกว่าชนิดอื่นและมีการกระจายตัวมากกว่าแล้ว ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อก่อโรคใบจุดสาหร่ายทั้งสองชนิดออกจากกันก็คือ ตำแหน่งของการเกิดโรคและสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่พบบนใบพืช กล่าวคือ *C. virescens* พบการก่อโรคและสร้างเซลล์สืบพันธุ์บนผิวใบด้านบน ในขณะที่ *C. parasiticus* จะพบรอยโรคและสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านท้องใบ รวมถึงมีระดับการก่อโรคที่รุนแรงของโรคมากกว่าที่พบใน *C. virescens* [11]

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างโรคใบจุดสาหร่ายที่คัดแยกได้มานั้น สังเกตพบว่า ตัวอย่างสาหร่าย *C. virescens* ทั้ง 6 ไอโซเลทมีตำแหน่งการเกิดโรคและการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่บริเวณผิวใบพืชด้านบนทั้งหมดและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน โดยพบลักษณะของโคโลนีบางประการ เช่น สีและขนาดของโคโลนีมีความคล้ายกับตัวอย่างที่พบและบรรยายลักษณะไว้ในผลงานวิจัยของ Suto และคณะ [21] ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายก่อโรคชนิดนี้ในประเทศญี่ปุ่น อย่างไรก็ตาม มีข้อสังเกตที่พบในตัวอย่างสาหร่าย Cp.3 ที่แยกได้จากเฟินชายผ้าสีดาว่ามีรูปร่างและขนาดของพื้นที่ของการเกิดโรคที่มากกว่าที่พบในพืชชนิดอื่น จากการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมพบว่า ผิวหน้าของใบเฟินชายผ้าสีดานั้นมีลักษณะที่ต่างไปจากพืชเจ้าบ้านอีก 5 ชนิด อย่างชัดเจน เนื่องจากพบขนหนาสีขาว ขนาดเล็ก จำนวนมากปกคลุมโดยตลอดทั่วทั้งใบ [23] ลักษณะผิวใบดังกล่าวนี้อาจส่งเสริมการเจริญของเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายจนเป็นสาเหตุให้พบการเกิดลักษณะรอยโรคและพื้นที่ของการติดเชื้อที่มากกว่าพืชเจ้าบ้านชนิดอื่นได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเป็นการรายงานการพบโรคใบจุดสาหร่ายบนพืชชนิดนี้เป็นครั้งแรก คณะผู้วิจัยจึงไม่สามารถที่จะยืนยันสาเหตุที่แน่นอนได้

4.4 การระบุชนิดสาหร่ายก่อโรคด้วยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA และการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบ่งชี้ว่า ตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมดที่แยกเพาะเลี้ยงได้เป็นสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* ซึ่งจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (รูปที่ 3) สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ *C. virescens* และ *C. parasiticus* แต่อย่างไรก็ตามบริเวณของยีนที่นำมาศึกษา อาจจะยังไม่ใช่บริเวณที่เหมาะสมในการจำแนกระดับชนิด เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากสาหร่าย *C. virescens* (GenBank accession no. DQ399585.1) และ *C. parasiticus* (GenBank accession no. DQ399 583.1) มีค่าความเหมือนที่ใกล้เคียงกันมากถึง 99% ดังนั้นผลที่ได้จากการทดลองนี้จึงไม่สามารถจะนำมาระบุชนิดของสาหร่ายที่แยกเพาะเลี้ยงได้ว่าเป็นชนิด *C. virescens* หรือ *C. parasiticus* ได้อย่างชัดเจน ซึ่งขัดแย้งกับจากงานวิจัยก่อนหน้าที่กล่าวว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA นั้นสามารถใช้จำแนกชนิดของสาหร่ายก่อโรคได้เป็นอย่างดี [12, 24] ปัญหาของการระบุชนิดด้วยลักษณะทางอณูชีววิทยาในสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* นี้อาจจะแก้ไขได้ด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณอื่นที่สามารถบอกความแตกต่างได้ดีกว่า อาทิเช่น 28S ribosomal RNA gene หรือ ribulose-bisphosphate carboxylase gene (rbcL) เพิ่มเติมจากยีน 18S rRNA [12]

4.5 การศึกษาคุณสมบัติของรงควัตถุในสาหร่ายก่อโรคที่แยกเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ผลการวิเคราะห์โครมาโตแกรมจากสารสกัดสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร Bristol มีการสร้างและสะสมเบต้าแคโรทีนเพียงชนิดเดียวเป็นชนิดเด่น และตรวจพบปริมาณการสะสมมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร HSM ถึง

15 เท่า จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบสูตรอาหารเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 2 สูตร พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สูตร มีแหล่งของสารประกอบไนโตรเจนที่แตกต่างกัน นั่นคือ อาหารสูตร HSM มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียจากแอมโมเนียมคลอไรด์ ในขณะที่อาหารสูตร Bristol มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นไนเตรทจากโซเดียมไนเตรท นอกจากนี้ยังพบอีกว่า อาหารสูตร Bristol มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนประกอบที่ระดับความเข้มข้น 0.43 mM ในขณะที่อาหารสูตร HSM ไม่พบว่ามีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ จากข้อมูลที่กล่าวมานี้ การสร้างและสะสมเบต้าแคโรทีนเพียงชนิดเดียวที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นไนเตรท (จากโซเดียมไนเตรท) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสาหร่ายสามารถนำเข้ามาใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหาร (metabolism) ของเซลล์ได้ยากกว่าการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน สภาวะดังกล่าวอาจส่งผลให้สาหร่ายเกิดความเครียดและตอบสนองด้วยการสะสมรงควัตถุชนิดเบต้าแคโรทีนในปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยจำนวนมากในสาหร่ายสีเขียวกลุ่มอื่นที่กล่าวว่า ปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมและการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยงจะกระตุ้นให้สาหร่ายสร้างและสะสมสารกลุ่มแคโรทีนอยด์เพื่อตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้น [25-28] ผลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจจะกล่าวได้ว่าสาหร่ายก่อโรคชนิดนี้ผลิตรงควัตถุชนิดเบต้าแคโรทีนเพื่อดำรงชีวิตในสภาวะตามธรรมชาติ ในขณะที่จะสร้างและสะสมรงควัตถุชนิดนี้มากขึ้นอย่างโดดเด่นในบางสภาวะที่มีความเครียดดังที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานที่กล่าวถึงการเพาะเลี้ยงและการกระตุ้นให้สร้างรงควัตถุสำหรับสาหร่ายสกุล *Cephaleuros* มาก่อน จึงยังไม่สามารถระบุถึงสาเหตุของการสะสมสารสีที่ชัดเจนได้ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยเห็นว่า การสะสมแคโรทีนอยด์ชนิดที่มีมูลค่าสูงในทางเศรษฐกิจ [29] ของสาหร่ายชนิดนี้มีความน่าสนใจเป็นอย่างมากในแง่ของของการนำมาใช้ประโยชน์เป็นแหล่งของรงควัตถุจากธรรมชาติแหล่งใหม่ได้ต่อไป

5. สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างพืชที่พบการติดเชื้อโรคใบจุดสาหร่ายในพื้นที่บางส่วนของจังหวัดนครปฐมและสมุทรสาครแล้วนำไปจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า เชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าวคือสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* ซึ่งเป็นสาหร่ายชนิดที่ก่อโรคกับพืช และเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร Bristol พบว่าสาหร่ายมีการสะสมรงควัตถุชนิดเบต้าแคโรทีนเพียงชนิดเดียวในปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดถึง 15 เท่า งานวิจัยครั้งนี้กล่าวได้ว่าเป็นการแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างสาหร่ายก่อโรคสกุล *Cephaleuros* จากประเทศไทยเป็นครั้งแรกภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ นอกจากข้อมูลที่ได้รับจะเป็นประโยชน์แก่นักวิชาการด้านโรคพืชแล้ว การค้นพบว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มมวลชีวภาพได้ในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นถึงแนวทางการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรความหลายหลายทางชีวภาพที่อาจนำไปสู่การศึกษาลักษณะการก่อโรคของสาหร่ายก่อโรคกลุ่มนี้เพิ่มเติมเพื่อหาแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศได้

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ Prof. Paul D. Fraser, School of Biological Science, Royal Holloway, University of London, UK ในการสนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์รงควัตถุ และ อ.ดร.ยศเวท สิริจามร ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร ในการช่วยเหลือการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในงานวิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ในการดำเนินการวิจัย จนคณะผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

7. เอกสารอ้างอิง

1. Brooks, F.E., 2004, "Plant-parasitic Algae (Chlorophyta : Trentepohliales) in American Samoa," *Pacific Science Journal*, 58, pp. 419-428.

2. Mutiara, P.K., Vasun, P., Siwaret, A. and Anurag, S., 2015, "Cephaleuros virescens, the Cause of an Algal Leaf Spot on Para Rubber in Thailand," *Australasian Plant Disease Notes*, 10, pp. 1-4.

3. Nelson, S.C., 2008, "Cephaleuros species, the Plant-parasitic Green Algae," *Plant Disease*, p. 6.

4. Brown, S.H., 2013, "Algal Leaf Spot (Cephaleuros virescens) of Cocoplum," *Lee County Extension*, 239, pp. 533-7513.

5. Sunpapao, A., Pitaloka, M.K. and Petcharat, V., 2015, "Host Range, Distribution and Diversity of Plant Parasitic Algae Cephaleuros Kunze in Southern Thailand," *Khon Kaen Agriculture Journal*, 43, pp. 928-932.

6. Thompson, R.H. and Wujek, D.E., 1997, Trentepohliales : *Cephaleuros*, *Phycopeltis* and *Stomatochroon*. Morphology, Taxonomy and Ecology, Science Publishers, p. 149.

7. Suto, Y. and Ohtani, S., 2009, "Morphology and Taxonomy of Five Cephaleuros Species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan, Including Three New Species," *Phycologia*, 48, pp. 213-236.

8. Sueoka, N., Chiang, K.S. and Kates, J.R., 1967, "Deoxyribonucleic Acid Replication in Meiosis of Chlamydomonas reinhardtii," *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Vol. 46, pp. 83-91.

9. Andersen, R.A., 2005, Algal Culturing Techniques, Elsevier.

10. Suto, Y. and 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, pp. 105-115.

11. Suto, Y., Ganesan, E.K. and West, J.A., 2014, "Comparative Observations on Cephaleuros parasiticus and C. virescens (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from India," *Korean Journal of Phycology Algae*, 29, pp. 121-126.

12. 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, pp. 329-339.

13. Rindi, F., Guiry, M.D. and López-Bautista, J.M., 2006, "New Records of Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) from Africa," *Nova Hedwigia*, 83, pp. 431-449.

14. Muthukumar, T., Uma, E. and Priyadharsini, P., 2014, "Occurrence of Foliicolous Parasitic Alga Cephaleuros virescens on Cultivated Ornamental Plants in Southern India," *Botanica Lithuanica*, 20, pp. 87-98.

15. Green, M.R. and Sambrook, J., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

16. Hall, T., 1999, "A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT," *Nucleic Acids Symposium Series*, pp. 95-98.

17. Fraser, P.D., Schuch, W. and Bramley, P.M., 2000, "Phytoene Synthase from Tomato (Lycopersicon esculentum) Chloroplasts--partial Purification and Biochemical Properties," *An International Journal of Plant Biology*, 211, pp. 361-369.

18. Nogueira, M., Mora, L., Enfissi, E.M.A., Bramley, P.M. and Fraser, P.D., 2013, "Subchromoplast Sequestration of Carotenoids Affects Regulatory Mechanisms in Tomato Lines Expressing

Different Carotenoid Gene Combinations," *The Plant Cell*, 25, pp. 4560–4579.

19. Suto, S.O.a.Y., 2009, "Morphology and Taxonomy of Five Cephaleuros Species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan, Including Three New Species," *Phycologia*, 48, pp. 213-236.

20. Suematu, S., 1957, "Notes of the Cultivation-form of Cephaleuros virescens," *The Japanese Society of Phycology*, 5, pp. 38-43.

21. Suto, Y. and Ohtani, S., 2011, "Morphological Features and Chromosome Numbers in Cultures of Five Cephaleuros species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan," *Phycological Research*, 59, pp. 42-51.

22. Chowdary, Y.B.K., 1969, "Induction of Reproductive Organs in *Cephaleuros virescens*," *Indian Journal of Microbiology*, 3, pp. 153-158.

23. Vail, R., 1984, Platycerium Hobbyist's Handbook, Desert Biological Publications.

24. 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, pp. 1709-1715.

25. Pelah, D., Sintov, A. and 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, pp. 483-486.

26. Aburai, N., Sumida, D. and Abe, K., 2015, "Effect of Light Level and Salinity on the Composition and Accumulation of Free and Ester-type Carotenoids in the Aerial Microalga Scenedesmus sp. (Chlorophyceae)," Algal Research, 8, pp. 30-36.

27. Dipak, P. and Lele, S., 2005, "Carotenoid production from Microalga, Dunaliella salina," *Indian Journal of Biotechnology*, 4, pp. 476-483.

28. Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J.n. and Guerrero, M.G., 2000, "Carotenoid Content of Chlorophycean Microalgae : Factors Determining Lutein Accumulation in Muriellopsis sp. (Chlorophyta)," *Journal of Biotechnology*, 76, pp. 51-59.

29. Cuellar-Bermudez, S.P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D.L., Ornelas-Soto, N., Romero-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, pp. 190-209.