

การแยก การจัดจำแนกชนิดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ สาหร่ายปรสิตพืช *Cephaleuros* spp. บนอาหารสังเคราะห์

Isolation, identification and morphological features of plant parasitic algae in genus *Cephaleuros* spp. on synthetic media

เพ็ญภัศร บรรจงศิริ¹, Mutiara K. Pitaloka¹ และ อนูรักษ์ สันป่าเป้า^{1*}

Penpadsorn Bunjongsiri¹, Mutiara K. Pitaloka¹ and Anurag Sunpapao^{1*}

บทคัดย่อ: โรคจุดสาหร่าย (algal spot) มีสาเหตุมาจากสาหร่ายปรสิตพืชในสกุล *Cephaleuros* Kunze ex E.M. Fries ลักษณะอาการคือแผลสีส้มถึงน้ำตาล พุคคล้ายกำมะหยี่เนื่องจากโครงสร้างของก้านชูสปอร์ (sporangiophore) และซีต (setae) การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยารวมทั้งการวัดขนาดของเซลล์ต่างๆ ของสาหร่ายบนพืชอาศัยและบนอาหารสังเคราะห์ ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย *Cephaleuros expansa* บนพืชอาศัยฝรั่ง *C. pilosa* บนพืชอาศัยมังคุด และ *C. virescens* บนพืชอาศัยจำปา แยกทาลัสของสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร Bold's basal media (BBM) และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยานบนอาหารสังเคราะห์ วัดขนาดของเส้นใย อัตราส่วนความกว้างต่อความยาว (W/L ratio) ของเส้นใย ขนาดของมุม (branching angle) และองค์ประกอบคล้ายโครงสร้างสืบพันธุ์ (gametangia-like body) จากลักษณะดังกล่าวพบว่าขนาดความกว้างของเซลล์เส้นใย และมุมในการแตกแขนงของเส้นใย มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนขนาดความยาวของเซลล์เส้นใย และอัตราส่วนของความกว้างและความยาวของเส้นใยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากผลการศึกษพบว่า ความกว้างของเซลล์เส้นใยและขนาดมุมของแขนงเส้นใย สามารถใช้แยกความแตกต่างของสาหร่ายสกุลนี้ได้

คำสำคัญ: สาหร่าย, เพาะเลี้ยง, ปรสิต, สัณฐานวิทยา

ABSTRACT: Algal spot is a disease caused by plant parasitic algae in genus *Cephaleuros* Kunze ex E.M. Fries. Lesions represent velvety orange to brown due to sporangiophore and setae on leaf surface. Identification of *Cephaleuros* is based on morphological properties on plan host and on synthetic media. Symptomatic leaf samples of *Cephaleuros expansa* on guava host, *C. pilosa* on mangosteen host and *C. virescens* on magnolia hosts were collected. Algal thalli were isolated and cultured on Bold's basal media (BBM), morphological features such as wide, length, W/L ratio, branching angle and gametangia-like body were conducted. The results showed that wide and branching angle of filamentous cells were significantly differed among 3 species of *Cephaleuros*, while length and W/L ratio were not. The results indicate that wide and branching angle of filamentous cells are sufficient to separate among *Cephaleuros* species.

Keywords: algae, culture, parasite, morphology

¹ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112

* Corresponding author: anurag.su@psu.ac.th

บทนำ

โรคจุดสาหร่าย (algal spot) มีลักษณะอาการจุดสีส้มถึงน้ำตาลคล้ายกำมะหยี่ เนื่องจากมีโครงสร้างที่ชูออกมาใบพืช ลักษณะนี้คล้ายกับโรคราสนิมแดง (red rust) ที่เคยมีรายงานว่าก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชอาศัยในประเทอินเดีย (Man and Hutchinson, 1907) ลักษณะเนื้อเยื่อสีน้ำตาล (necrosis) ใต้ทาลัสของสาหร่ายจัดเป็นอาการผิดปกติของพืช (symptom) ส่วนทาลัสและโครงสร้างที่โผล่ออกมาจากทาลัส เช่น ก้านชูสปอร์จัดเป็นหลักฐานทางกายภาพของสาเหตุโรคพืช (sign) อาการของโรคจุดสาหร่ายบนพืชอาศัยมีลักษณะเป็นจุด ภายในประกอบด้วยเส้นใยสีส้มจนถึงสีน้ำตาลรวมกันอยู่หลายๆ เส้น แผลจะมีลักษณะเป็นวง คล้ายกำมะหยี่ หรือรูปปร่างไม่เป็นระเบียบ สาหร่ายสกุลนี้พบมากบริเวณเขตร้อนชื้น (tropical and sub-tropical) อาศัยน้ำในการแพร่พันธุ์ โดยการว่ายน้ำของซูโอสปอร์ (zoospore) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมซูโอสปอร์จะงอกเข้าไปในชั้นคิวติเคิลของพืช และสร้างทาลัสบนพืชอาศัยนั้น สาหร่ายสกุลนี้สร้างความเสียหายให้กับพืชอาศัยคือ ใช้น้ำและแร่ธาตุอาหารจากพืชอาศัย (Wolf, 1930) หลังสารพิษทุติยภูมิที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชอาศัย (Jourbert and Rijkenberge, 1971) และทำให้พืชอาศัยสูญเสียบริเวณที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจากเนื้อเยื่อภายใต้ทาลัส (thallus) ของสาหร่าย แห้งตายเป็นสีน้ำตาล (Safeulla and Govindu, 1948) นอกจากนี้โรคจุดสาหร่าย ที่เกิดจากสาหร่ายปรสิตรูปในสกุล *Cephaleuros* ยังลดกระบวนการทางสรีรวิทยาและกระบวนการทางชีวเคมีในใบชาอีกด้วย (Ponmurugan et al., 2007)

การศึกษาด้านอนุกรมวิธานและการจำแนกชนิดของสาหร่ายชนิดนี้ในประเทศไทยเริ่มโดย นิพนธ์ (2553) ได้รวบรวมพืชอาศัยของสาหร่ายปรสิตรูปในสกุล *Cephaleuros* ทั้งนี้ผู้เขียนได้จำแนกลักษณะอาการบนพืชอาศัยและก้านชูสปอร์ในการจัดจำแนกระดับชนิดเป็น *Cephaleuros virescens* ซึ่งลักษณะ

ดังกล่าวยังไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนกในระดับชนิดได้ Thompson และ Wujek (1997) ได้เสนอ monograph สำหรับจัดจำแนกสาหร่ายในอันดับ Trentepohliales รวมถึงสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* โดยดูจากลักษณะที่สำคัญคือ บริเวณที่สาหร่ายเจริญ (growth habit) บริเวณที่สร้าง head cell และลักษณะการเจริญของแผล จากการใช้วิธีการของ Thompson และ Wujek (1997) จัดจำแนกสาหร่ายในสกุลนี้ในประเทศไทย Pitaloka et al. (2014) รายงานถึงสาหร่าย *C. solutus* บนพืชอาศัยทุเรียน ต่อมา มีรายงานว่าสาหร่าย *C. diffusus*, *C. expansa*, *C. karstenii*, *C. pilosa*, และ *C. virescens* ก่อโรคจุดสาหร่ายในพืชอาศัยหลายชนิดในเขตภาคใต้ของประเทศไทย (Sunpapao and Pitaloka, 2015; Sunpapao et al. 2015; Sunpapao et al. 2016) นอกจากนี้ Suto และ Ohtani (2011) ได้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสกุล *Cephaleuros* ลงบนอาหารสังเคราะห์และแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของสาหร่าย โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์ พบว่าขนาดของเส้นใยและการแตกแขนงของเส้นใยในสาหร่ายแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน

Sunpapao และคณะ (2015) ทำการจำแนกชนิดสาหร่าย *Cephaleuros* บนพืชอาศัยทั้ง 3 ชนิดคือ ฝรั่ง มังคุด และจำปา โดยใช้วิธีการของ Thompson และ Wujek (1997) แต่ยังไม่ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสังเคราะห์ งานวิจัยนี้ทำการแยกสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์และศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายแต่ละชนิด

วิธีการศึกษา

การแยกสาหร่ายและการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

เก็บตัวอย่างโรคจุดสาหร่ายบนใบพืชอาศัย 3 ชนิด คือ ฝรั่ง มังคุด และจำปา จากจังหวัดสงขลาและพัทลุง ตัวอย่างละ 30 ใบ (n = 30) จำแนกชนิดของสาหร่าย

ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีการของ Thompson and Wujek (1997) แยกส่วนของทลล์สำหรับมาเพาะเลี้ยงตามกรรมวิธีของ Suto and Ohtani (2011) นำใบพืชที่มีสาหร่ายมาทำความสะอาดโดยล้างในน้ำไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เช็ดด้วยกระดาษที่แห้งแล้ว จุ่มใบพืชที่มีสาหร่ายใน 70% แอลกอฮอล์ 1 นาทีและล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ลอกทลล์ของสาหร่ายจากใบพืชอาศัยให้บางที่สุดขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร นำทลล์ไปวางบนอาหาร Bold's basal media (BBM) (Bischoff and Bold, 1963; Andersen, 2005) บ่มจานเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 20°C โดยให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับบ่มในที่มืด 12 ชั่วโมง ระยะเวลา 3 - 6 เดือน

สัณฐานวิทยาสาหร่าย *Cephaleuros* Kunze ex E.M. Fries บนอาหารสังเคราะห์และการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติ

ใช้เข็มเย็บเส้นใยจากโคโลนีของสาหร่ายจากพืชอาศัยทั้ง 3 ชนิดบนอาหารสังเคราะห์ BBM นำไปวางบนสไลด์แก้ว หยดน้ำกลั่น และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการวัดขนาดของเส้นใย วัดอัตราความกว้างต่อความยาวของเส้นใย และตรวจดูองค์ประกอบคล้ายโครงสร้างสืบพันธุ์ (gametangia-like body) ที่ถูกสร้างบนอาหารสังเคราะห์ วัดขนาดความกว้างของมุมของแขนงสาหร่าย จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 30 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง ($n = 30$) นำข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าสถิติโดยโปรแกรม SPSS เพื่อหาความแตกต่างระหว่างชนิดของสาหร่าย โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสังเคราะห์

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายด้วยวิธีการของ Thompson and Wujek (1997) พบสาหร่าย *Cephaleuros expansa* บนพืชอาศัยมะม่วง สาหร่าย *C. pilosa* บนพืชอาศัยมังคุดและ *C. virescens* บนพืช

อาศัยจำปา โดยในแต่ละชนิดที่ขึ้นพบเพียงแค่สาหร่ายชนิดเดียวบนพืชอาศัยนั้น ๆ ทำการแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์โดยลอกทลล์ของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด และนำไปเพาะลงบนอาหารสังเคราะห์ BBM หลังจากบ่มสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 3 - 6 เดือนพบโคโลนีสีเขียวของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด โคโลนีมีลักษณะกลม (circular) ไปจนถึงรูปร่างไม่เป็นระเบียบ (irregular) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 2 เซนติเมตร โคโลนีของ *C. expansa* และ *C. virescens* มีสีเขียว (Figure 1 A, C) ส่วนโคโลนีของ *C. pilosa* มีสีเขียวอ่อนเส้นใยเจริญเข้าไปในส่วนของอาหารสังเคราะห์ (Figure 1 B) เมื่อทำการแยกเส้นใยของสาหร่ายมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบลักษณะของเส้นใยแตกต่างกัน เส้นใยบนพืชอาศัย (Figure 2 A, D, G) มีรูปร่างที่แตกต่างกับเส้นใยบนอาหารสังเคราะห์ (Figure 2 B, E, H) เส้นใยที่พบบนพืชอาศัยมีการรวมเป็นเนื้อเยื่อเทียม (pseudoparenchymatous) ส่วนเส้นใยสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์อยู่แบบเดี่ยว ๆ และแตกแขนง รูปร่างของเส้นใยบนอาหารสังเคราะห์ส่วนมากเป็นแบบทรงกระบอกยาว (long cylindrical) และเส้นใยของ *C. expansa* มีขนาดของเส้นใย $5 - 10 \pm 0.04 \times 47.5 - 110 \pm 0.54$ ไมโครเมตร อัตราส่วน W/L คือ 0.06 - 0.17 มุมของแขนงเส้นใยมีขนาด $65 - 98 \pm 0.54$ องศา สาหร่าย *C. pilosa* มีขนาดของเส้นใย $5 - 10 \pm 0.05 \times 35 - 87.5 \pm 0.49$ ไมโครเมตร อัตราส่วน W/L คือ 0.06 - 0.24 มุมของแขนงเส้นใยมีขนาด $43 - 95 \pm 0.47$ องศา ส่วนสาหร่าย *C. virescens* มีขนาดของเส้นใย $5 - 7.5 \pm 0.04 \times 45 - 85 \pm 0.36$ ไมโครเมตร อัตราส่วน W/L คือ 0.06 - 0.15 มุมของแขนงเส้นใยมีขนาด $40 - 95 \pm 1.06$ องศา (Table 1) สาหร่ายทั้ง 3 ชนิดกำเนิดโครงสร้างคล้ายโครงสร้างสืบพันธุ์ (gametangia-like body) แต่ไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ (zoospore) และแบบอาศัยเพศ (gamete) บนอาหารสังเคราะห์

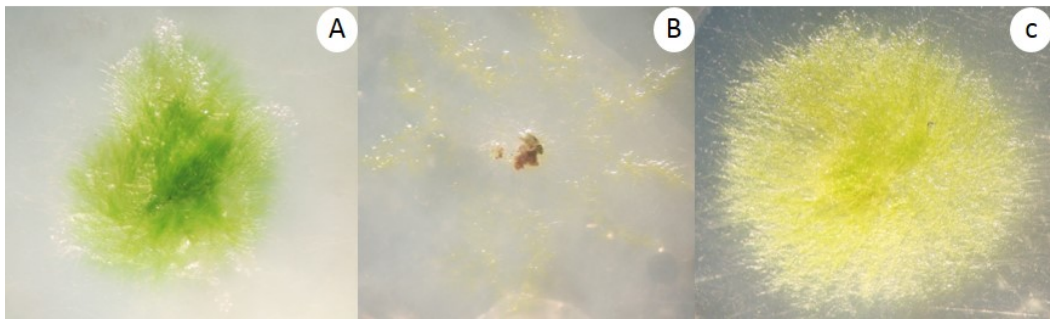


Figure 1 *Cephaleuros* colonies on Bold's basal media. A: *Cephaleuros expansa* isolated from guava host, B: *C. pilosa* isolated from mangosteen host and C: *C. virescens* isolated from magnolia host.

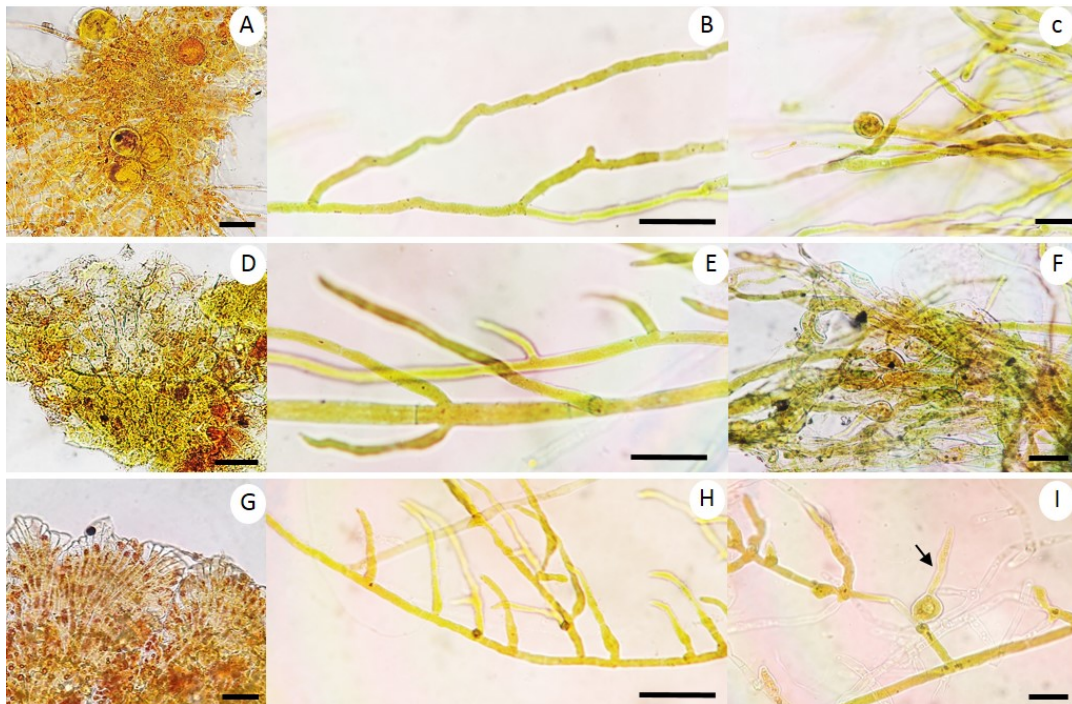


Figure 2 Thalli, filamentous cells and gametangia-like bodies of *Cephaleuros* spp. A: *Cephaleuros expansa* on guava host, B: filamentous cells of *C. expansa* on Bold's basal media (BBM), C: gametangia-like body produced on BBM, D: *C. pilosa* on mangosteen host, E: filamentous cells of *C. pilosa* on BBM, F: gametangia-like body produced on BBM, G: *C. virescens* on magnolia, H: filamentous cells of *C. virescens* on BBM, I: gametangia-like body produced on BBM. Arrow indicates filamentous cell projects from gametangia-like body. Bar = 10 µm.

จากการแยกเพาะสาหร่ายบนอาหารสังเคราะห์สูตร BBM พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตช้า ระยะเวลาประมาณ 3-6 เดือน โคโลนีมีขนาดเล็ก 0.5 - 2 เซนติเมตร ปัญหาที่สำคัญของการแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายคือการปนเปื้อนของเชื้อรา การทดลองนี้ไม่ได้ผลสมควรจะมีกำจัดเชื้อราลงไปในการทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราเป็นจำนวนมาก Suto and Ohtani (2011) ได้รายงานไว้ว่า ลักษณะโคโลนีของสาหร่าย *C. virescens* บนอาหารสังเคราะห์สูตร algal culture media (CA media) มีการแตกแขนงของเส้นใยเป็นมูมที่น้อยกว่า 40 องศา ซึ่งไม่ตรงกับ *C. virescens* ในการทดลองนี้ที่มีแขนงขนาดทำมุม 40 - 95 องศา ทั้งนี้สาหร่ายในแต่ละพื้นที่มีระบบนิเวศที่แตกต่างกัน

ประกอบกับความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ไม่เหมือนกัน อาหารเพาะเลี้ยงต่างกัน เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ อาจส่งผลให้การแตกแขนงของเส้นใยมีขนาดมูมของแขนงต่างกันได้ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายปรสิติฟิซบนอาหารสังเคราะห์พบองค์ประกอบคล้ายโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เรียกว่า gametangia-like body แต่จากการเพาะเลี้ยงไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (gamete) ซึ่งสนับสนุนการทดลองของ Suto and Ohtani (2011) ไม่มีการสร้างก้านชูสปอร์ของสาหร่าย *Cephaleuros* มีเพียงแต่เส้นใยที่งอกมาจาก gametangia-like body (Figure 2 arrow)

Table 1 Dimension of length and wide of filamentous cells, W/L ratio and branching angle of three *Cephaleuros* species on synthetic Bold's basal medium.

Variable	<i>C. expansa</i>	<i>C. pilosa</i>	<i>C. virescens</i>	Chi-square	P-value
Wide (µm)	5 - 10 ± 0.04	5 - 10 ± 0.05	5 - 7.5 ± 0.04	14.90	0.05 [*]
Length (µm)	47.5 - 110 ± 0.54	35 - 87.5 ± 0.49	45 - 85 ± 0.36	ns	ns
W/L ratio ^a	0.06 - 0.17	0.06 - 0.24	0.06 - 0.15	ns	ns
Branching angle (°)	65 - 98 ± 0.34	43 - 95 ± 0.47	40 - 95 ± 0.48	14.53	0.05

* P < 0.05

^a Kruskal-Wallis test was used when data did not meet the assumption of ANOVA

ns = non-significant

สรุป

จากการแยกเพาะเลี้ยงและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายปรสิติฟิซ *C. expansa*, *C. pilosa* และ *C. virescens* ทั้ง 3 ชนิดบนอาหารสังเคราะห์ BBM พบสาหร่ายมีการเจริญเติบโตช้า ไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศและแบบอาศัยเพศ มีการสร้าง gametangia-like body และมีเส้นใยงอกออกมาจากโครงสร้างนี้ จากการวิเคราะห์ด้วยคำสถิติพบว่าสัณฐานวิทยาของสาหร่ายที่ใช้แยกชนิดของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดออกจากกันคือ

ความกว้างของเส้นใย และมุมของแขนงเส้นใย ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากความแตกต่างนี้สามารถนำมาใช้จำแนกความแตกต่างของสาหร่ายปรสิติฟิซในสกุล *Cephaleuros* ได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ระยะเวลาที่ 2

เอกสารอ้างอิง

- นิพนธ์วิสารทนนท์. 2553. คู่มือวินิจฉัยโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา สาหร่าย และการให้คำแนะนำในการควบคุมโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 594 หน้า.
- Andersen, R.A. (ed). 2005. Algal culturing techniques, Elsevier Academic Press, London. 578 pp.
- Bischoff, H.W., and H.C. Bold. 1963. Phycological studies. IV. Some soil algae from enhanced rock and related algal Species. University of Texas Publication. 6318: 1-95 pp.
- Joubert, J.J., and F.H.J. Rijkenberge. 1971. Parasitic green algae. Rev. Phytopathol. 9: 45-64.
- Mann, H.H., and C.M. Hutchinson. 1907. *Cephaleuros virescens* Kunze: the 'red rust' of tea. Mem. Dep. Agri. India. Bot. 1: 1-33.
- Pitaloka, M.K., V. Petcharat, and A. Sunpapao. 2014. *Cephaleuros solutus* Karsten, as a causal agent of durian (*Durio zibethinus* Murray) algal leaf spot disease in Thailand. Khon Kaen Agr. J. 42(suppl3): 644-648.
- Ponmurugan, P., and U.I. Baby. 2007. Utilization of different nutrient sources by *Phomopsis theae* and their influence on its growth and reproduction. J. Myco Plant Pathol. 37(3): 499-504.
- Safeeulla, K.M., and H.C. Govindu. 1948. Some new hosts for *Cephaleuros*. J. Mysore Uni. Section B. 11: 47-49.
- Sunpapao, A., and M. K. Pitaloka. 2015. A new record of plant parasitic green algae, *Cephaleuros diffusus* (Trentepohliaceae, Chlorophyta), on *Acacia auriculiformis* hosts in Thailand. Biodiversitas. 16(2): 116- 120.
- Sunpapao, A., M. K. Pitaloka, and S. Arikrit. 2015. The genus *Cephaleuros* Kunze ex E.M.Fries (Trentepohliales, Ulvophyceae) from southern Thailand. Nova Hedwigia. 101(3-4): 451-462.
- Sunpapao, A., M.K. Pitaloka, and S. Arikrit. 2016. Algal leaf spot associated with *Cephaleuros virescens* (Trentepohliales, Ulvophyceae) on *Nephelium lappaceum* in Thailand. Biodiversitas. 17(1): 31-35.
- Suto, Y., and S. Ohtani. 2011. Morphological features and chromosome numbers in culture of five *Cephaleuros* species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan. Phycological Research. 59: 42-51.
- Thompson, R. H., and Wujek, D. E. 1997. Trentepohliales, Cephaleuros, Phycopeltis and Stomatochroon: Morphology, Taxonomy and Ecology. 1st Edition. Enfield Publishing and Distribution. United States of America. 149 p.
- Wolf, F.A. 1930. A parasitic alga, *Cephaleuros virescens* Kunze, on citrus and certain other plants. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 45: 187-205.