

# บทปฏิบัติการที่ 6

## สับ-ดิวิชันมาสติโกมายโคตินา

(Sub-Division Mastigomycotina)

เชื้อราในสับ-ดิวิชันนี้ เส้นใยไม่มีผนังกันตามขวาง (coenocytic hypha) โพรโตพลาสซึมติดต่อกันเป็นเนื้อเดียวกันตลอด และมีนิวเคลียสได้หลายอัน (multinucleate) การขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศมักสร้างเป็นถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) ภายในบรรจุสปอร์ที่เคลื่อนที่ (zoospores) มีจำนวนไม่จำกัด การสืบพันธุ์แบบมีเพศโดยสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็น antheridium และสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเป็น oogonium ผลจากการผสมพันธุ์ของเซลล์ทั้งสองจะได้สปอร์ชนิด oospores เกิดขึ้น แบ่งออกเป็น 3 ชั้น (Class) คือ

1. ชั้น Chytridiomycetes
2. ชั้น Hypochytridiomycetes
3. ชั้น Oomycetes

ชั้น Chytridiomycetes ราในชั้นนี้ทั้งหมดมีระยะการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ โดยขับเคลื่อนด้วยหางที่ติดอยู่ด้านหลังหนึ่งอันชนิด whiplash มีทั้งหมด 3 ลำดับ (Order)

1. ลำดับ Chytridiales ลักษณะทั่วไป thallus เป็นพวกเซลล์เดี่ยว อาจเป็นแบบ monocentric หรือ polycentric thallus มีทั้ง holocarpic และ eucarpic ไม่มีเส้นใยที่แท้จริง กลุ่มใหญ่ของราในลำดับนี้เป็นปรสิตของเชื้อรา สาหร่าย สัตว์น้ำ ซากพืชที่พบในเขตน้ำจืด มีบางชนิดเป็นปรสิตกับพืชชั้นสูงสกุลที่สำคัญ คือ *Olpidium* sp., *Rozella* sp., *Synchytrium* sp. *Rhizophidium* sp. *Chytridium* sp. และ *Nowakoskiella* sp.

2. ลำดับ Blastocladales โครงสร้างเซลล์ร่างกายเป็นแบบ eucarpic thallus เป็นเส้นใยที่มีการพัฒนาการดีแล้วเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็น rhizoid และลำต้นที่แตกกิ่งก้านสาขาได้ การขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศด้วยการสร้างสปอร์ที่ขับเคลื่อนด้วยหางเพียงหนึ่งอัน ซึ่งสปอร์ชนิดนี้สร้างภายในถุงหุ้มสปอร์ สำหรับการขยายพันธุ์แบบมีเพศเกิดขึ้นโดยการเชื่อมต่อ (fusion) ของเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ อาจมีขนาดและรูปร่างเหมือนกัน (isogametes) หรือแตกต่างกัน (anisogametes) ทุกสกุลของราในลำดับนี้สร้างถุงหุ้มสปอร์ที่มีผนังหนา มีสารพวก chitin เป็นส่วนประกอบจึงทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี (resistant sporangium) เมื่อถุงหุ้มสปอร์ชนิดนี้พักตัวระยะหนึ่งแล้วจะสร้างสปอร์เคลื่อนที่

เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ราในลำดับนี้ Sparrow ได้จัดแบ่งย่อยออกเป็น 3 วงศ์ คือ

**วงศ์ Coelomomycetaceae** ราในวงศ์นี้เป็นปรสิตของลูกน้ำยุง ลักษณะโดยทั่วไป thallus ไม่มีผนังห่อหุ้มและไม่มีการสร้าง rhizoids

**วงศ์ Catenariaceae** ปรกติมีการดำรงชีวิตแบบแซปโรไฟท์ มีบางชนิดเท่านั้นที่เป็นปรสิตของตัวหนอนและของเชื้อราด้วยกัน รูปร่างของ thallus ทั่วไปมีลักษณะเป็นหลอด (tubular) และมีผนังล้อมรอบ เมื่อมีโครงสร้างทางการสืบพันธุ์เกิดขึ้นจะพบว่ามี rhizoids และผนังกันตามขวาง

**วงศ์ Blastocladaceae** เป็นวงศ์ที่รู้จักกันแพร่หลาย เป็นเชื้อราวงศ์เดียวของลำดับ Blastocladiales ที่จะได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการ แบ่งราในวงศ์นี้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. *Blastocladia* sp. และ *Allomyces* sp. ราในกลุ่มนี้ มีการสืบพันธุ์หรือขยายพันธุ์แบบ alternation of generation ผนังสปอร์มีช่องปล่อยสปอร์ได้หลายช่อง เส้นใยแตกกิ่งก้านสาขาได้อย่างอิสระและสร้าง pseudosepta

2. *Blastocladia* sp. ราในกลุ่มที่สองนี้สร้างช่องเปิดอยู่ที่ส่วนเจริญของผนังสปอร์ บริเวณปลายสุดมีลักษณะเป็น apical pore ไม่มีการสร้าง sexual reproduction เส้นใยมีลักษณะการเจริญแตกออกเป็น 2 แฉก แต่ปราศจากการสร้าง pseudosepta

3. ลำดับ *Monoblepharidales* เป็นราน้ำกลุ่มเล็กที่น่าสนใจกลุ่มหนึ่ง เส้นใยมีพัฒนาการสูง hypha แต่ละเส้นมี vacuole เป็นจำนวนมาก ทำให้สามารถลอยน้ำได้ดี การขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศเกิดขึ้นโดยการสร้างผนังสปอร์ ซึ่งบรรจุสปอร์ชนิดเคลื่อนที่ได้ เกิด fertilization จากการผสมพันธุ์ระหว่าง egg ที่มีขนาดใหญ่เคลื่อนที่ไม่ได้กับเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เคลื่อนที่ได้ (motile sperm)

**วงศ์ Monoblepharidaceae** มีเชื้อราที่สำคัญอยู่ 3 สกุล คือ *Monoblepharis* sp., *Monoblepharella* sp. และ *Gonapodya* sp. สำหรับ 2 สกุลแรกพบในเขตร้อนทั่วไป

ชั้น *Hypochytridiomycetes* ลักษณะสำคัญของเชื้อราในชั้น *Hypochytridiomycetes* คือ ระยะเวลาการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ โดยการขับเคลื่อนของหางที่ติดอยู่ด้านหน้า (anterior) หนึ่งอันเป็นชนิด tinsel ประกอบไปด้วยลำดับ *Hypochytriales*

ลำดับ **Hypochytriales** ลักษณะโดยทั่วไปเป็นราน้ำคาลัยคล้ายคลึงกับ **Chytriales** ยกเว้น ชนิดของหางที่ติดอยู่ที่ด้านหน้าของสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้และเป็นชนิด **tinsel** เชื้อราทั้งหมดในลำดับนี้ สร้างถุงหุ้มสปอร์ที่ช่องเปิดไม่มีฝาปิด อาจเป็นชนิด **holocarpic** หรือ **eucarpic** ระยะเวลาเจริญทั่วไป สร้างเส้นใยที่มีลักษณะเป็น **rhizoid**

ชั้น **Oomycetes** ราในชั้นนี้ทุกลำดับสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่จากการขับเคลื่อนของหาง 2 ชนิด คือ **whiplash** และ **tinsel (biflagellate)** ซึ่งเกิดภายในถุงหุ้มสปอร์เส้นใยเป็นแบบ **coenocytic** แตกกิ่งก้านสาขาได้ดี การสืบพันธุ์แบบมีเพศเกิดขึ้นจากการผสมกันระหว่างโครงสร้างสืบพันธุ์เพศ ผู้ **antheridium** กับโครงสร้างสืบพันธุ์เพศเมีย **oogonium** ผลที่ได้ คือ **oospores** สปอร์ชนิดนี้มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อม (**resting spore**) ต่าง ๆ ได้ดี ราในชั้นนี้มีทั้งหมด 4 ลำดับ คือ

1. ลำดับ **Lagenidiales**
2. ลำดับ **Saprolegniales**
3. ลำดับ **Leptomitales**
4. ลำดับ **Peronosporales**

1. ลำดับ **Lagenidiales** เป็นเชื้อราน้ำที่เป็นปรสิตกับสาหร่ายน้ำจืดและราน้ำอื่น ๆ โครงสร้างของร่างกายอยู่ในรูป **thallus** ชนิดง่ายและซับซ้อน การขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศโดยการสร้างถุงหุ้มสปอร์ที่มี **papilla** หนึ่งช่องหรือมากกว่าเป็นทางสำหรับปลดปล่อยสปอร์ชนิดที่เคลื่อนที่ได้ สามารถสร้าง **resting spores** ได้ทั้งในสภาพที่มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศและไม่มีเพศ วงศ์ที่สำคัญ คือ **Olpidiopsidaceae** และ **Lagenidiaceae**

วงศ์ **Olpidiopsidaceae** **thallus** มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นถุงหุ้มสปอร์ซึ่งภายในมีสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ หรือเปลี่ยนแปลงไปเป็น **gametangium** ที่เข้าผสมกับอันอื่น **resting spores** ที่เกิดขึ้นจากการปฏิสนธิจะอาศัยอยู่บน **host** ได้อย่างอิสระ สกุลที่สำคัญ คือ **Olpidopsis varians** เป็นปรสิตกับเชื้อราน้ำ **Achlya biflagellata**

วงศ์ **Lagenidiaceae** วงศ์นี้แตกต่างจาก **Olpidiopsidaceae** โดยมี **thallus** เป็นแบบหลายเซลล์ การปล่อยสปอร์ชนิดเคลื่อนที่ได้จำเป็นต้องสร้างถุงเยื่อบาง ๆ (**vesicle**) ขึ้นบริเวณปลายสุด (**apical**) ตรงส่วน **papilla** ของถุงหุ้มสปอร์ ตัวอย่างของราในวงศ์นี้ คือ **Lagenidium** sp. ซึ่งเป็นปรสิตของสาหร่ายน้ำจืด

2. ลำดับ **Saprolegniales** ราในลำดับ **Saprolegniales** พบได้ในแหล่งน้ำและในดินที่ชื้นแฉะ เส้นใยมีพัฒนาการดีเป็นพวก **eucarpic** และ **holocarpic** การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศเกิดขึ้น

โดยการสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ในถุงหุ้มสปอร์ชนิดต่างๆของราในลำดับนี้ มีทั้งพวกที่ สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ 2 แบบ (diplanetic) เคลื่อนที่ได้แบบเดี่ยว (monoplanetic) และ ไม่เคลื่อนที่ (aplanetic) สำหรับเชื้อราในลำดับนี้บางสกุลเมื่อสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ครั้งที่สองแล้ว สามารถสร้างขึ้นได้อีกหลายครั้ง เรียกว่า **repeated zoospore emergence** ยกตัวอย่างเช่นสกุล *Saprolegnia* sp., *Achlya* sp. และ *Dictyuchus* sp. การสืบพันธุ์แบบมีเพศเป็นแบบ gametangial contact ผลผลิตที่ได้ คือ สปอร์มีเพศชนิด oospores วงศ์ที่สำคัญในลำดับนี้ คือ Saprolegniaceae

วงศ์ Saprolegniaceae พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดและดินที่ชื้นแฉะ บางชนิดเป็นปรสิตกับปลา ไช้ปลา และรากของพืชชั้นสูง เส้นใยมีการเจริญเติบโตได้ดี ไม่มีขอบเขตจำกัดเป็นแบบ eucarpic การสร้างสปอร์ระยะไม่มีเพศสร้างได้ทั้งสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ สกุลที่รู้จักกันดี คือ *Saprolegnia* sp., *Achlya* sp., *Pythiopsis* sp., *Aphanomyces* sp., *Dictyuchus* sp. และ *Geolegnia* sp.

3. ลำดับ Leptomitales ลำดับนี้เป็นราน้ำกลุ่มเล็กซึ่งมีลักษณะพิเศษ คือ เส้นใยมีลักษณะคอคอดเป็นช่อง ๆ สม่ำเสมอและมีการสะสมสารพวก cellulin รูปร่างของถุงหุ้มสปอร์อาจพบว่ามีลักษณะยาว (elongate) หรือรูปผลฝรั่ง (pyriform) ภายในเป็นที่เกิดของสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ บางชนิดเป็นแบบ monoplanetic หรือ diplanetic การสืบพันธุ์แบบมีเพศเป็นแบบ gametangial contact ภายใน oogonium จะมี oosphere อยู่ 1 อัน รอบ ๆ เป็นชั้นของ periplasm มีอยู่ 2 วงศ์ คือ

วงศ์ Leptomitaceae thallus มีลักษณะเป็นเส้นยาวตลอด สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้แบบ diplanetic ระหว่างชั้นของ oosphere ไม่มี periplasm ยกตัวอย่างเช่นเชื้อราในสกุล *Apodachlya* sp. และ *Leptomitus* sp.

วงศ์ Rhipidiaceae วงศ์นี้แตกต่างจากวงศ์ Leptomitaceae กล่าวคือ ตรงส่วนฐานของเซลล์พบโครงสร้างที่เรียกว่า hold fast ทำหน้าที่ยึดเกาะสารอาหาร และสร้างสปอร์ชนิดเคลื่อนที่ได้แบบ monoplanetic ภายใน oogonium มีชั้น periplasm รอบ oosphere เช่น ราในสกุล *Araiospora* sp., *Sapromyces* sp., *Rhipidium* sp. และ *Mindeniella* sp.

4. ลำดับ Peronosporales ราในลำดับนี้มีวิวัฒนาการชั้นสูงกว่าในลำดับอื่น ๆ ที่กล่าวมาแล้ว บางชนิดเป็นราน้ำ กิ่งบกกิ่งน้ำ และบางชนิดอาศัยอยู่บนบก มีหลายชนิดที่เป็นปรสิตกับพืชเศรษฐกิจ กลุ่มที่มีพัฒนาการมากมีการดำรงชีวิตเป็นปรสิตที่แท้จริง (obligate parasite) ของพืชมีเมล็ด เส้นใยทุกชนิดของราในลำดับนี้มีพัฒนาการดีเป็นแบบ eucarpic ถุงหุ้มสปอร์ที่สร้างขึ้นในราชนิดที่มีวิวัฒนาการต่ำในลำดับนี้ยังคงติดอยู่กับเส้นใย แต่พวกที่มีวิวัฒนาการสูงถุงหุ้มสปอร์หลุดออกจากเส้นใยและดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างอิสระ (deciduous) รูปร่างของสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้เป็นรูปไต หรือ

เมลิ็ดแก้ว (reni form) มีหางแบบ biflagellate สำหรับสกุลที่มีวิวัฒนาการขั้นสูงมาก ๆ ฤดูห่มสปอร์สามารถงอกให้ germ tube แล้วเจริญต่อไปเป็นเส้นใยได้ตามปกติ การสืบพันธุ์แบบมีเพศเกิดขึ้นโดยวิธี gametangial contact ซึ่งมีโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็น antheridium และโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเป็น oogonium ภายใน oogonium ประกอบไปด้วย 1 oosphere ที่ล้อมรอบด้วยชั้น periplasm มีทั้งหมด 3 วงศ์ คือ

วงศ์ Pythiaceae เป็นวงศ์ที่ล้าหลังที่สุด บางชนิดสร้างฤดูห่มสปอร์ขึ้นบริเวณปลายเส้นใย แต่บางชนิดสร้างฤดูห่มสปอร์ขึ้นบนเส้นใยพิเศษที่เรียกว่า ก้านชูฤดูห่มสปอร์ (sporangiophore) ซึ่งสามารถเจริญได้อย่างไม่มีขีดจำกัด มีลักษณะการเจริญเป็นแบบ sympodium ได้แก่ราในสกุล *Zoophagus* sp., *Pythium* sp. และ *Phytophthora* sp.

วงศ์ Peronosporaceae ทุกชนิดของราในวงศ์นี้เป็นปรสิตกับพืชเศรษฐกิจที่แท้จริงทำให้เกิดโรคราน้ำค้างกับพืช (downy mildew) มีสกุลต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ *Plasmopara* sp., *Peronospora* sp., *Basidiophora* sp., *Sclerospora* sp., *Bremia* sp. และ *Pseudoperonospora* sp.

วงศ์ Albuginaceae เชื้อราที่สำคัญในวงศ์นี้มีเพียงสกุลเดียว คือ *Albugo* sp. ซึ่งมีก้านชูสปอร์อ้วนสั้นฝังอยู่ใต้ผิวเซลล์พืช สร้างฤดูห่มสปอร์มีลักษณะหัวท้ายมนติดกันเป็นลูกโซ่

## วิธีปฏิบัติ

1. ศึกษาลักษณะ resting sporangium ของเชื้อราสกุล *Synchytrium decipiens* จากสไลด์ถาวรด้วยกล้องจุลทรรศน์ วาดรูปแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ

2. ตรวจสอบระยะ sporophytic thallus โครงสร้างของเซลล์ร่างกาย sporangium และ zoospores จากเชื้อรา *Allomyces* sp. ที่แยกได้จากดินที่ชื้นแฉะ วาดรูปประกอบ

3. ศึกษาลักษณะสี ขนาด ตำแหน่งของ male และ female gametangia บน gametophytic thalli ของเชื้อ *Allomyces* sp. ที่เจริญมาจาก resting sporangium จากตัวอย่างของจริงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรายละเอียดที่ได้

#### 4. ศึกษาลักษณะ flagella ของ zoospores ด้วยการย้อมสีตามวิธีดังต่อไปนี้

4.1 ตรึงด้วย osmic acid หยดน้ำที่มี zoospores ของเชื้อราลงบนสไลด์แก้วที่สะอาด และวางในจานเพาะเชื้อที่มีหยดของ osmic acid 1 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10 นาที ย้อมด้วยสี gentian violet บาง ๆ แล้วปิดทับด้วย cover glass นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.2 Lugol's iodine หยดสารละลายไอโอดีนลงบน suspension ของเชื้อราที่มี zoospores อยู่ปิดทับด้วย cover glass ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.3 Bouin's solution ใช้ Bouin's solution หยดลงด้านข้างของ suspension ที่มี zoospores ของเชื้อราที่ต้องการศึกษาปิดทับด้วย cover glass นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่ง Bouin's solution ประกอบไปด้วย Saturated aqueous picric acid 300 มิลลิลิตร ฟอร์มาลิน 100 มิลลิลิตร และกรดน้ำส้มเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

5. ศึกษาลักษณะเส้นใย sporangium sex organs และ internal proliferation ของเชื้อรา *Saprolegnia* sp. ที่แยกได้จากน้ำตามธรรมชาติ วาดรูปแสดงรายละเอียดต่างๆ ให้ชัดเจน

6. ความแตกต่างของราสกุล *Pythium* sp. และ *Phytophthora* sp. ตรวจดูได้จาก ลักษณะของเส้นใย sporangium และการปลดปล่อย zoospores จาก sporangium ของตัวอย่างเชื้อรา ของจริงที่อาจารย์ผู้ควบคุมปฏิบัติการเตรียมไว้ให้ วาดรูปแสดงรายละเอียดให้ชัดเจน

7. ศึกษาลักษณะและชนิดของ sexual spores โครงสร้างสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย จาก เชื้อรา *Pythium* sp. หรือ *Phytophthora* sp. วาดรูปพร้อมแสดงรายละเอียดให้ชัดเจน



8. เปรียบเทียบลักษณะ sporangiophores ชนิดของ sporangium และการแตกกิ่งก้านสาขาของ sporangiophores จากเชื้อราสาเหตุโรคราน้ำค้างของพืชในสกุล *Peronospora* sp., *Plasmopara* sp. และ *Sclerospora* sp. โดยการ mount ด้วยน้ำยา lactophenol ปิดทับด้วย cover glass จึงตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพที่ได้พร้อมอธิบายโดยละเอียด

๑. นำผักบุ้งที่มีโรค white-rust ซึ่งถูกทำลายด้วยเชื้อรา *Albugo* sp. มาผ่าตามขวางและ mount ด้วย lactophenol ศึกษาลักษณะของเส้นใยร่างกาย haustoria, sporangiophores, chain of sporangium, antheridium และ oogonium วาดรูปให้ชัดเจน

## คำถามท้ายบท

1. ลักษณะสำคัญของเชื้อราในสับ-ติวิชัน Mastigomycotina มีอะไรบ้าง อธิบาย

2. จงเขียน diagram วงจรชีวิตของเชื้อรา *Allomyces* sp.

3. จงเปรียบเทียบลักษณะสำคัญของระหว่างเชื้อรา *Allomyces* sp. กับ *Saporlegnia* sp. มาพอสังเขป

4. ลักษณะสำคัญของเชื้อราในลำดับ Peronosporales มีอะไรบ้าง

5. อะไรคือข้อแตกต่างของเชื้อรา *Pythium* sp. กับ *Phytophthora* sp.

6. ราในสลับ-ติวิชัน Mastigomycotina มีความสำคัญต่อชีวิตมนุษย์อย่างไร

7. จงทำ key จัดจำแนกเชื้อราในสลับ-ติวิชัน Mastigomycotina ให้ถูกต้อง