

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างข้าว

งานวิจัยนี้ทำการเก็บตัวอย่างข้าวหอมจากภาคกลาง (พันธุ์หอมปทุม) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ทุ่งกุลาร้องไห้) (พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105) ของประเทศไทย โดยวิธีการเก็บตัวอย่างจะเลือกสุ่มเก็บตัวอย่างต้นข้าวจังหวัดละประมาณ 5 ตัวอย่างๆละ 4-5 ต้น เลือกข้าวที่มีอายุประมาณ 3 เดือน ลักษณะแข็งแรงไม่มีการแสดงอาการของโรคต่างๆและใบและต้นสีเขียวสด ถอนต้นข้าวทั้งต้นพร้อมราก จากนั้นเก็บตัวอย่างข้าวใส่ในถุงพลาสติก ไม่ปิดปากถุงเพื่อไม่ให้ข้าวเน่าและเก็บตัวอย่างทั้งหมดไว้ในที่เย็นตลอดเวลา เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ หากไม่นำมาแยกราบนโดไฟฟ้าในทันทีจะเก็บตัวอย่างในที่เย็น (4-8°C) เพื่อทำการแยกในวันรุ่งขึ้น โดยทั่วไปจะต้องนำตัวอย่างมาใช้งานภายใน 24 ชั่วโมง

บันทึกภาพและลักษณะของตัวอย่างข้าวอย่างละเอียด ได้แก่ลักษณะลำต้น สี ความยาวของรวงข้าว และใบ บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับข้าว ได้แก่ พันธุ์ข้าว ที่มาของพันธุ์ข้าว อายุ ลักษณะที่อยู่อาศัย (habitat) และพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง

3.2 การคัดแยกราบนโดไฟฟ้าและทำให้บริสุทธิ์

3.2.1 การฆ่าเชื้อภายนอกตัวอย่างข้าว (Surface sterilization)

ล้างตัวอย่างข้าวด้วยน้ำประปาให้สะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกและเศษดินออก นำข้าวที่ล้างสะอาดแล้วมาตากบนกระดาษหนังสือพิมพ์รอให้แห้ง เลือกตัดส่วนลำต้น ใบและเมล็ดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ล้างให้ทั่วด้วยน้ำกลั่นประมาณ 2-3 นาที จากนั้นปั่นล้างใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปล้างครั้งที่ 2 ในสารละลาย 50% (v/v) Clorox[®] ความเข้มข้น 5.25% (w/w) ปริมาตร 200 มล. ต่อข้าว 1 ชนิด ประมาณ 5 นาที ล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (150 มล.) เป็นเวลา 3 นาที (Liewkongsataporn และคณะ, 2002) กรองเก็บตัวอย่างข้าวด้วยผ้าก๊อซที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปพักให้แห้งบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อเช่นกัน ร่อนตัวอย่างชิ้นข้าวแห้ง นำไปวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA) (ภาคผนวก ก) ที่มี chloramphenicol (Sigma, Germany) ความเข้มข้น 50 mg/1 ผสมอยู่ โดยวางชิ้นส่วนของข้าว 4 ชิ้นต่อ 1 จานอาหาร ทำ 3 จาน (triplicate) ต่อตัวอย่างชิ้นข้าว 1 ตัวอย่าง ดังนั้นข้าวแต่ละตัวอย่างจะใช้ชิ้นข้าวจำนวน 36 ชิ้น นำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน

3.2.2 การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากชิ้นตัวอย่างข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อภายนอกแล้ว

เมื่อมีเส้นใยของรางอกออกมาจากชิ้นตัวอย่างของข้าว จะตัดส่วนเส้นใยดังกล่าวด้วย cork borer เบอร์ 1 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม.) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ WA แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1/4xPDA (ภาคผนวก ก) (HiMedia, India) นำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25°C คัดเลือกราสีที่มีการเจริญบนอาหารดังกล่าวมากกว่า 7 วันจะจัดเป็นราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการทดลองทั้งหมด เก็บข้อมูลลักษณะและสีของเส้นใยที่เจริญบนจานอาหาร ด้านหลังของจานอาหาร สังเกตลักษณะและสีของของเหลว (exudate) ที่ราเอนโดไฟท์สร้างขึ้น และนับจำนวนวันในการเจริญ บันทึกภาพเชื้อราที่คัดแยกได้ เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจะเก็บไว้ในหลอดอาหารวุ้นเอียง 1/4xPDA สำหรับการเก็บในระยะสั้น ส่วนการเก็บในระยะยาวจะเก็บในสารละลาย 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80 °C

3.2.3 การทำ Hyphal tipping

ทำ Hyphal tipping เพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อราบริสุทธิ์ (pure culture) ไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย ยีสต์ หรือราชนิดอื่น โดยหลังจากที่แยกโคโลนีของราได้แล้วจะนำเชื้อรานั้นมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA อีกครั้งเป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อเริ่มมีเส้นใยเกิดขึ้นพอมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา (hyphal tip) ที่เจริญแยกเป็นเส้นเดี่ยวด้วยเข็มเย็บเย็บเย็บภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำส่วนที่ตัดมาได้นั้นไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1/4xPDA ที่อุณหภูมิ 25 °C อีกครั้งหนึ่ง

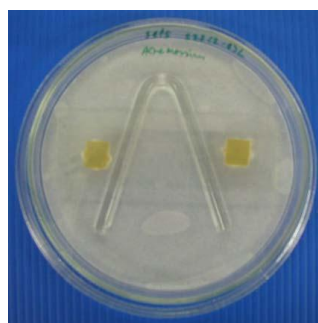
3.3 การจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ

สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.1 การทำสไลด์ของรา (slide culture)

การศึกษาลักษณะโครงสร้างราเอนโดไฟท์ของข้าวที่แยกมาได้ทั้งหมดทำได้โดยใช้เทคนิค slide culture ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมปฏิบัติกันอย่างกว้างขวาง เพราะโครงสร้างต่างๆของราจะถูกกระทบกระเทือนน้อยกว่าการเย็บเชื้อเพื่อนำมาทำ wet mount การทำสไลด์ของรามีวัตถุประสงค์เพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ ได้แก่ เส้นใย ก้านสปอร์ ถุงหุ้มสปอร์ สี ขนาดและลักษณะของสปอร์ เป็นต้น การเลี้ยงราบนสไลด์ (slide culture) ทำได้โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อ WA ลงในจานเพาะเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มม. ทิ้งไว้ให้เย็นและผิวน้ำอาหารแห้ง จากนั้นใช้มีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงกรีดอาหารเลี้ยงเชื้อ WA ออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดประมาณ 1 คืบสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟ แล้ววางลงบนแท่งแก้วรูปตัววีในจานเพาะเชื้อ ใช้มีดผ่าตัดยกชิ้นวุ้นที่ตัดไว้มาวางบนสไลด์ที่เตรียมไว้ ใช้เข็มเย็บเชื้อรามาแตะทั้งสี่ด้านของชิ้นวุ้น นำกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟ แล้วค่อยๆวางปิดชิ้นวุ้นดังกล่าว เหน็บปากกลิ้งนึ่งฆ่าเชื้อลงไปให้ชุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อ เบอร์ 1 (Whatman, England) ที่วางไว้กั้นจานเพาะเชื้อ

ดังแสดงในรูปที่ 3.1 นำไปบ่มในห้องบ่มควบคุมอุณหภูมิ 25 °C จนเส้นใยของราแผ่ขึ้นมาบน cover slip แยกแผ่นสไลด์และ cover slip ออกจากกันจะได้ slide culture ของราชนิดชนิดนั้นๆ 2 อัน หยคน้ำกลั่นลงบนสไลด์เปล่า วาง cover slip ที่มีเชื้อปิดทับลงไป พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนำไปจัดจำแนกในระดับจิ้นสและระดับสปีชีส์ สไลด์ที่เก็บในระยะยาวจะย้อมด้วย lactophenol รอให้แห้งแล้วปิดทับด้วย lacquer



รูปที่ 3.1 การเลี้ยงราบนสไลด์ (slide culture)

3.3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์

สำหรับราเอนโดไฟท์ที่ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้จะนำมาเหนี่ยวนำให้สร้างสปอร์ด้วยสูตรอาหารที่คาดว่าจะมีความเหมาะสมต่อการชักนำให้สร้างสปอร์ได้ เช่น นำมาเลี้ยงบนชิ้นส่วนของข้าวโดยตรง นอกจากนี้ยังมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek agar (ภาคผนวก ก) (Merck, Germany) เพื่อต้องการให้เห็นลักษณะของสปอร์ที่ชัดเจนเนื่องจากเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการจัดจำแนกรากลุ่ม *Aspergillus* โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ นั้นจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C และคอยสังเกตการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 2 วัน

3.3.3 วิธีการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ในระดับจิ้นสและสปีชีส์

ราเอนโดไฟท์ทั้งหมดนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ WA ด้วยการเลี้ยงราบนสไลด์เพื่อนำไปจัดจำแนกอย่างน้อยในระดับจิ้นส (Genus) โดยการสังเกตลักษณะของสปอร์ เส้นใย และสีของสปอร์ของราเอนโดไฟท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการเจริญของโคโลนีเชื้อราเอนโดไฟท์จากการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1/4xPDA ในระยะโคโลนีของราเอนโดไฟท์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 เซนติเมตร และลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งด้านบนและด้านล่างของจานเพาะเชื้อ รวมถึงการสังเกตลักษณะสปอร์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการเลี้ยงราบนสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Stereomicroscope, Olympus รุ่น SZ30, Japan; Fluorescent

microscope, Olympus รุ่น BX60, Japan) แล้วจึงนำมาจัดจำแนกลักษณะของราแต่ละชนิดตามข้อมูลที่มีเทียบกับคีย์ซึ่งใช้ในการจัดจำแนกชนิดของรา

การสังเกตลักษณะของเชื้อเพื่อใช้จัดจำแนกรา (Morphological examination)

1. ความแตกต่างของสีของโคโลนีของราบนจานเพาะเชื้อทั้งด้านบนและด้านล่าง
2. ลักษณะกลิ่นที่มีของรานั้น
3. ลักษณะของพื้นผิวโคโลนีของราด้านบนจานอาหารเพาะเลี้ยงว่ามีลักษณะอย่างไร เช่น เส้นใยมีความเป็นฟู ฟู ม้วนตัว เป็นฝุ่นผง อ่อนนุ่มเหมือนกำมะหยี่ มีน้ำเกาะ เหนียว หรือเหมือนยีสต์ เป็นต้น
4. โคโลนีของรามีขอบลักษณะเรียบหรือไม่เรียบ
5. สีของเหลวที่ราสร้าง
6. ลักษณะอวัยวะของราที่สร้าง เช่น โครงสร้างของ fruiting body sclerotia และ stroma เป็นต้น

การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ที่สำคัญเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของรา (Species identification)

1. ขนาด หมายความว่ารวมถึง ความกว้าง ความยาว และความหนา
2. สี
3. รูปร่าง
 - 3.1 ในการแยกชนิดของราทั่วๆ ไปจะทำการสังเกตลักษณะของเส้นใย (hyphae) ว่ามีลักษณะ มีผนังกั้น (septate) ไม่มีผนังกั้น (aseptate) เส้นใยเป็นเส้นยาวหรือมีลักษณะแตกแขนงเป็นกิ่ง
 - 3.2 ลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละคลาส

Mastigomycetous : จะมี oogonium antheridium oospores sporangium และการบวมของเส้นใย (hyphal swelling)

Zygomycetous : จะมี sporangium sporangiospores และ zygosporangia เป็นต้น

Ascomycetous : จะมี ascocarp ascus ascospores และ stroma เป็นต้น

Basidiomycetous : จะมี basidiocarp basidia spore print และ basidiospores

Deuteromycotina : จะมี pycnidium apothecium conidial types และ conidiophore เป็นต้น
 - 3.3 ลักษณะภายนอกของฟัสน้ำ เช่น มีผิวเรียบ ยาวรี เป็นปุ่มปม มีหนาม มีขน หรือโค้งงอ เป็นต้น
 - 3.4 รูปร่าง ลักษณะของ protuberances

คีย์ (keys) ถือเป็นเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งใช้ในการจัดจำแนกชนิดของราเพื่อเป็นเครื่องช่วยยืนยันให้มีความแม่นยำเพิ่มมากขึ้นโดยการใช้ข้อมูลที่มีอยู่มาทำการลองผิดลองถูก (trial and error)

ก็ยังสามารถจัดจำแนกราก็ได้ในระดับ division class order family และ genus ในบางกรณีอาจแยกได้ถึงในระดับสปีชีส์ (species) ได้ เมื่อสามารถศึกษาชนิดของราได้ตามต้องการแล้วต้องทำการตรวจสอบซ้ำเทียบกับรายงานการวิจัยที่เคยมีมาก่อนจึงจะเสร็จสิ้นขั้นตอนการจัดจำแนกชนิดของรา ทั้งนี้ในการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เป็นตัวสำคัญแล้วยังต้องอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของรานั้นจากการเพาะเลี้ยงด้วย (Tsuneo, 1994) ตัวอย่างของกิจที่ใช้ในการจัดจำแนกในงานวิจัยนี้ได้แก่

1. Ellis M.B., 1971, “**Dematiaceous Hyphomycetes**”, Commonwealth Mycological Institute, England.
2. Subramanian C.V., 1976, “**Hyphomycetes**”, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
3. Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Conners, I.L., and Sigler, L. 1980, “**Genera of Hyphomycetes**”, Alberta, Canada: University of Alberta Press.
4. Ellis, M.B. 1976, “**More dematiaceous hyphomycetes**”, Commonwealth, Mycological Institute, Kew, UK.
5. Klich M. A. and Pitt J. I. 1988, “**A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs**”.
6. Barnett H. L. and Hunter B. B. 1972, “**Illustrated Genera of Imperfect Fungi**”. Third edition. Burgess Publishing Company.