บททบทวนเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของราเมือก

ราเมือก (slime mold) ถูกเรียกว่า ราเมือก เพราะช่วงหนึ่งในวงจรชีวิตของมันมีการสังเคราะห์สารออกมาภายนอกมากมาย เป็นพวกเมือก เมือกเหล่านี้เป็นสารพวก โพลีแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (acidic polysaccharide) ประกอบด้วยกาแลคโตส (galactose) ซัลเฟต (sulfate) และแรมโนส (rhamnose) จำนวนเล็กน้อย (McCormic และคณะ, 1970)

Alexopoulos และ Mims (1979) ได้จัดจำแนกราเมือกชนิดแท้ (true slime mold) โดยยึดวิธีการของ Whittaker และ Margulis ไว้ดังนี้

Superkingdom	:	Eucaryonta
Kingdom	:	Myceteae (Fungi)
Division	:	Gymnomycota
Subdivision	:	Plasmodiogymnomycotina
Class	:	Myxomycetes (true slime mold)
Subclass I	:	Ceratiomyxomycetidae
Subclass II	:	Myxogastromycetidae
Subclass III	:	Stemonitomycetidae

Class Myxomycetes เป็นราเมือกที่แท้จริง สมาชิกของกลุ่มนี้มีการกระจายตัวกันอย่างกว้างขวาง และมีจำนวนมากที่สุดในกลุ่มของราเมือก มักจะพบตามบริเวณที่มีความชื้นสูง ร่ม มีทรากเน่าเปื่อยผุพัง มีบางสปีชีส์ที่พบในที่เฉพาะแห่งเช่น พบเฉพาะในเขตร้อน เขตอบอุ่น หรือในบริเวณที่สูง ๆ เท่านั้น ความชื้นและอุณหภูมิจะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้ราเมือกมีปริมาณมาก-น้อยแตกต่างกันไป (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ราเมือกที่แท้จริงนี้มี 2 พวกคือ พวกที่มีสปอร์อยู่ภายในอับสปอร์จัดเป็น endosporous type ได้แก่ราเมือกใน subclass Myxogastromycetidae และ subclass Stemonitomycetidae ส่วนอีกพวกหนึ่งเป็นพวกที่มีสปอร์อยู่ด้านนอกของสปอร์โรฟอร์จัดเป็น exosporous type ได้แก่ราเมือกใน subclass Ceratiomyxomycetidae

ส่วนการแบ่งเป็นออร์เดอร์ แฟมมิลี จีนัส และสปีชีส์นั้น จะอาศัยลักษณะรูปร่างและส่วนประกอบของฟรุตติงบอดีเป็นหลัก ซึ่งราเมือกจะมีลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้ชัดเจน และรักษาความแตกต่างเหล่านี้เสมอในแต่ละสปีชีส์ แต่อย่างไรก็ตาม Alexopoulos ยังได้ชี้ให้เห็นว่าพลาสโมเดียมของราเมือกก็ยังแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มใหญ่ๆ ด้วย (Ashworth และ Dee, 1975)

วงจรชีวิตของราเมือกใน Class Myxomycetes

จากการที่มีการศึกษาวงจรชีวิตของราเมือกหลายสปีชีส์ พบว่าวงจรชีวิตของราเมือกในพวกที่สร้าง exospores และ endospores จะมีความแตกต่างกันในบางระยะของวงจรชีวิตบ้างเล็กน้อย

ในพวกที่สร้าง exospores นั้น ได้มีการศึกษารายละเอียดในจีนัส Ceratiomyxa นี้มาก และพบว่า C. fruticulosa เป็นราเมือกที่พบบ่อยที่สุด แต่มีผู้เข้าใจเกี่ยวกับชีวิตของมันน้อยมาก แม้จะมีผู้พยายามเพาะเลี้ยง C. fruticulosa ให้เจริญจนครบวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการ แต่ก็ไม่สามารถสังเกตผลได้ชัดเจน (Alexopoulos และ Mims, 1979)

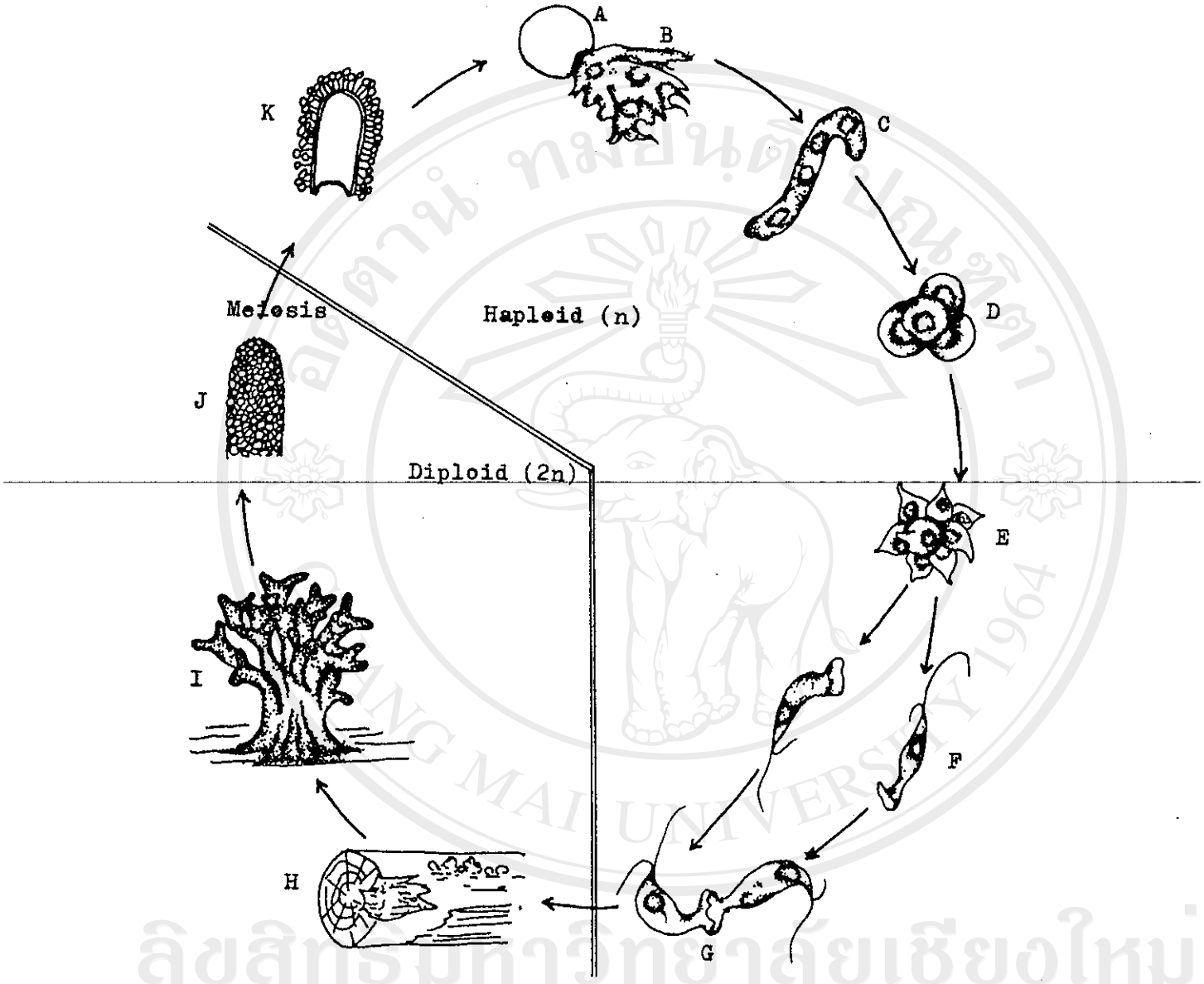
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วงจรชีวิตของ C. fruticulosa (Martin และ Alexopoulos, 1969 ; Scheetz, 1972 ; Alexopoulos และ Mims, 1979)

ภายในสปอร์ของ C. fruticulosa ที่เติบโตเต็มที่แล้วจะประกอบด้วยนิวเคลียส 4 อัน ซึ่งแต่ละนิวเคลียสมีจำนวนโครโมโซมเพียง 1 ชุด (n) สปอร์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะงอกออกมาเป็นก้อนโปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม ๆ ต่อมาจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นลักษณะยาวคล้ายเส้นด้ายซึ่งยังคงมี 4 นิวเคลียสอยู่เช่นเดิม ระยะนี้เรียกว่า "thread stage" ความสำคัญของระยะนี้ยังไม่มีใครทราบ เส้นด้ายนี้จะบรรจบเข้าหากันแล้วแยกเป็น 4 ส่วน แต่ละส่วนมี 1 นิวเคลียส และยังคงอยู่ด้วยกันในลักษณะที่ติดกัน ระยะนี้เรียกว่า "tetrad" หลังจากนั้นจะมีการแบ่งตัวแบบไมโตซีสอีกจะได้ 8 เซลที่อยู่ติดกัน เรียกระยะนี้ว่า "octette" ในที่สุดทั้ง 8 เซลนี้จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น 8 สวอมเซล (swarm cells) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเซลสืบพันธุ์ (gametes) ต่อไป สวอมเซลของ C. fruticulosa จะมองดูคล้ายกับมีแฟลกเจลลัมเพียงเส้นเดียว เพราะเส้นที่ 2 จะเล็กและเห็นได้ยาก เซลสืบพันธุ์นี้จะหลอมรวมกันเป็นคู่ ๆ แล้วกลายเป็นไซโกต (Zygote) จากไซโกตก็จะเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นพลาสโมเดียม

ในระยะสร้างสปอร์ พลาสโมเดียมจะเปลี่ยนรูปร่างไปเป็นพิลลา (pillar หรือ column) และจะงอกพาพิลลี (papillae) จากส่วนของพิลลา ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เป็นลักษณะเฉพาะของสปีชีส์นี้ต่อไปจะมีชั้นบาง ๆ ของโปรโตพลาสซึมมาปกคลุมพาพิลลี หลังจากมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีสแล้ว โปรโตพลาสซึมจะแยกออกเป็นส่วน ๆ แต่ละส่วนมี 1 นิวเคลียสซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเพียง 1 ชุด เรียกว่าโปรโตสปอร์ (protospore) โปรโตสปอร์จะเจริญยื่นออกมาอยู่บนส่วนของก้านที่มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย จะมีการสร้างผนังมาล้อมรอบและกลายเป็นสปอร์ (ดังแสดงไว้ในแผนผังวงจรชีวิตที่ 1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนภาพที่ 1 วงจรชีวิตของ *Ceratiomyxa fruticulosa* A.สปอร์กำลังงอกหลังจากเกิดการแบ่งแบบไมโอซีสเรียบร้อยแล้ว B.มิกซ์อะมีบามี 4 นิวเคลียส C.Thread stage มี 4 นิวเคลียส D.Tetrad E.Octette F. สวอมเซล G.สวอมเซลกำลังหลอมรวมกัน H.พลาสโมเดียมกำลังเจริญเป็นสปอร์โรฟอร์บนขอนไม้ผุ I.สปอร์โรฟอร์ J.พิลลา 1 อันพร้อมกับโปรโทสปอร์ ซึ่งกำลังเริ่มต้นแบ่งแบบไมโอซีส K.สปอร์

<u>วงจรชีวิตของราเมือกทั่ว ๆ ไป</u> (Martin และ Alexopoulos, 1969 ; Alexopoulos และ Mims, 1979)

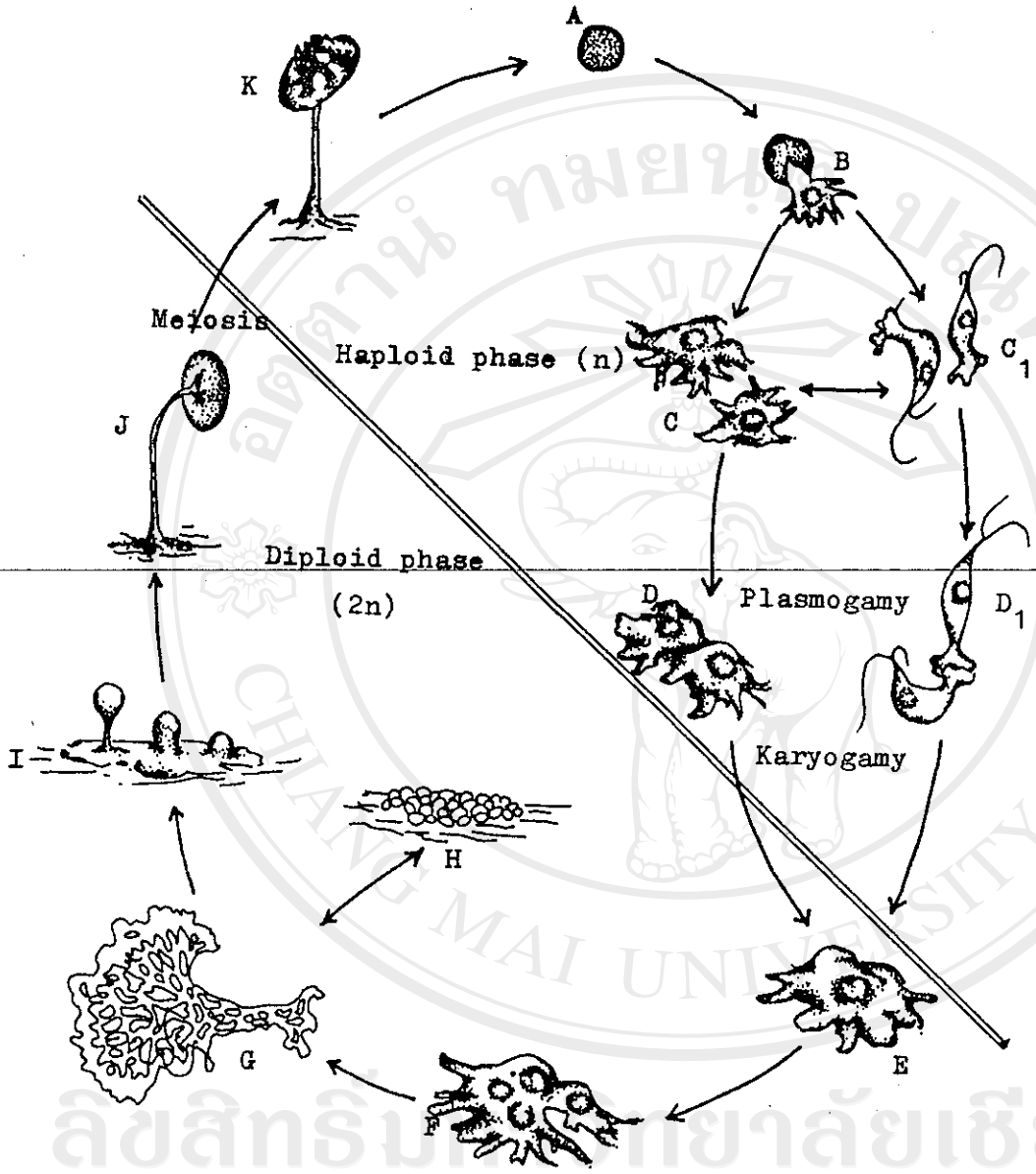
ราเมือกส่วนมากจะเป็นพวกที่สร้าง endospore (n) สปอร์ที่แก่เต็มที่แล้วจะมีนิวเคลียสอยู่ภายใน 1-4 นิวเคลียส สปอร์เมื่อได้รับความชื้นและอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะงอกออกมาเป็นสวอมเซล หรือมิกซ์อะมีบา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม ถ้ามีน้ำมากก็จะงอกออกมาเป็นสวอมเซล ซึ่งมีแฟลกเจลลาอยู่ทางด้านหัวช่วยในการเคลื่อนไหว แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่มีน้ำน้อย หรือเพียงแต่ชื้น ๆ ก็จะงอกออกมาเป็นมิกซ์อะมีบา ทั้งระยะมิกซ์อะมีบา และสวอมเซลนี้สามารถจะเปลี่ยนกลับไปมาได้ เมื่อถึงระยะหนึ่ง มิกซ์อะมีบาหรือสวอมเซลจะทำหน้าที่เป็นเซลสืบพันธุ์ โดยจะจับคู่กันระหว่างเซลสืบพันธุ์ที่ต่างกัน มีการรวมกันของไซโตพลาสซึม และจะตามด้วยการรวมตัวของนิวเคลียสเกือบจะทันที เกิดเป็นไซโกต (2n) ขณะที่ไซโกตเจริญเติบโตขึ้น จะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซีสไปด้วย แล้วค่อย ๆ เปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นแบบอะมีบา ซึ่งมีหลายนิวเคลียสเรียกว่า พลาสโมเดียม พลาสโมเดียมนี้เมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นสปอร์โรฟอร์ ภายในสปอร์โรฟอร์จะมีโครงสร้างที่สำคัญคือ สปอร์ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยในการขยายพันธุ์ การแบ่งตัวแบบไมโอซีสจะเกิดขึ้นในสปอร์ทำให้ได้นิวเคลียสที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว 4 นิวเคลียส จำนวน 3 ใน 4 นิวเคลียสจะสลายไป เหลือเพียงนิวเคลียสเดียวกลายเป็นสปอร์ที่มีเพียง 1 นิวเคลียสอยู่ภายในอับสปอร์

ถ้าสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม มิกซ์อะมีบาจะเข้าเกราะ (encyst) โดยที่มิกซ์อะมีบา 1 ตัว จะกลายเป็น 1 ซีสต์ หรือสวอมเซลจะสลัดแฟลกเจลลาทิ้งกลายเป็นมิกซ์อะมีบาแล้วจึงเข้าเกราะ จนกว่าสภาวะแวดล้อมเหมาะสมขึ้นมาอีก มิกซ์อะมีบาก็จะงอกออกมาได้ใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนพลาสโมเดียมนั้น ถ้าสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปไม่เหมาะสม จะเปลี่ยนรูปร่างไปเป็นสเคลอโรเตียม (sclerotium) ซึ่งมีโครงสร้างที่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ และสามารถจะกลับคืนเข้าสู่ระยะพลาสโมเดียมได้อีก เมื่อมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (ดังแสดงไว้ในแผนผังวงจรชีวิต ภาพที่ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนภาพที่ 2 วงจรชีวิตของราเมือกทั่ว ๆ ไป A.สปอร์ที่แก่เต็มที่ B.สปอร์กำลังงอก C.มิกซ์อะมีบา C_1.สวอมเซล D.มิกซ์อะมีบากำลังหลอมรวมกัน D_1.สวอมเซลกำลังหลอมรวมกัน E.ไซโกต F.พลาสโมเดียมที่อายุน้อย G.พลาสโมเดียมที่เจริญเต็มที่ H.สเคลอโรเทียม I.เริ่มมีขบวนการสร้างสปอร์ J.อับสปอร์ที่ยังอ่อนอยู่ K.อับสปอร์ที่เจริญเต็มที่ (Alexopoulos และ Mims, 1979)

2. ประวัติการเพาะเลี้ยงราเมือก

การเพาะเลี้ยงราเมือกในห้องปฏิบัติการนั้น ประสบกับปัญหามากมาย และไม่ค่อยประสบผลสำเร็จ เพราะขาดหลักฐานและข้อมูลเกี่ยวกับชีวประวัติของราเมือก ราเมือกที่แท้จริงนี้ไม่ค่อยได้นำมาใช้ในการทดลองมากมายนักเพราะการเพาะเลี้ยง และการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยาก พลาสโมเดียมส่วนมากจะไม่สร้างฟรุตติงบอดี ในห้องปฏิบัติการง่ายนัก หรือบางทีก็ไม่แน่ว่าสปอร์จะงอกได้ หรือเมื่องอกแล้วก็ไม่แน่ว่าจะเจริญเป็นพลาสโมเดียมได้หรือเปล่า (Sobels และ Cohen, 1953)

ในวงจรชีวิตของราเมือกนั้น ในแต่ละขั้นที่แตกต่างกันจะมีความต้องการอาหารแตกต่างกันด้วย ดังนั้นจึงไม่สามารถนำสปอร์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อที่ผิวแล้วมาเพาะบนอาหารที่ปราศจากเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง แล้วให้ราเมือกที่เพาะนี้เจริญจนครบวงจรชีวิตได้อย่างสมบูรณ์ (Alexopoulos และ Mims, 1979) แม้กระทั่งการที่จะเจริญอยู่บนสิ่งใดสิ่งหนึ่งก็พบว่าบางสปีชีส์มีความชอบที่จะเกาะกับสับสเตรท (substrate) บางชนิดมากกว่าชนิดอื่น ความชอบเหล่านี้พบว่ามีมากเกินกว่าที่จะบอกว่าความบังเอิญ เช่น Cribarias จะชอบไม้สน Didymia หลายชนิดชอบใบไม้ที่ตายแล้ว Badhamia ส่วนมากจะชอบเปลือกต้นไม้ที่มีรสอร่อยเป็นต้น (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ราเมือกที่นำมาใช้ศึกษาในห้องปฏิบัติการส่วนมากจะเป็นพวก Physarales เช่น Didymium, Physarella, Badhamia, Fuligo และหลายสายพันธุ์ใน Physarum sp. ราเมือกที่ทำการศึกษาและวิจัยกันมากคือ Physarum polycephalum ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือ พลาสโมเดียมจะใหญ่ หนา แผ่ออกเป็นรูปพัด และเพาะง่าย (Ashworth และ Dee, 1975)

2.1 ราเมือกที่นำมาเพาะเลี้ยงได้จนครบวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการ

ในจำนวนราเมือกทั้งหมดที่สำรวจพบมีประมาณ 50-60 สปีชีส์ที่สามารถ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการเพาะเลี้ยงได้ครบวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการ (Ashworth และ Dee, 1975) และพวกนี้ส่วนมากอยู่ใน order Physarales เช่น

Ectrinostelium minutum สปอร์งอกได้ง่ายบนผิวของอาหารวุ้นที่ไม่แข็ง และสามารถเจริญจนครบวงจรชีวิตได้โดยไม่ผ่านการเป็นสวอมเซล (Alexopoulos และ Mims, 1979)

Arcyria cinerea และ Hemitrichia vesparium สามารถเหนี่ยวนำให้เจริญจนครบวงจรชีวิตได้อย่างสมบูรณ์ (Alexopoulos, 1960)

Arcyria elaterensis เจริญได้จนครบวงจรชีวิตในอาหารที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบ (Mulleavy, 1977)

Didymium muscorum, D. intermedium และ D. squamulosum ราเมือกทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญจนครบวงจรชีวิตได้ถึง 2 รอบ และยังสามารถรักษาคุณลักษณะของมันไว้ได้ (Lakhanpal และ Mukerji, 1977)

Physarum polycephalum สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้จนครบวงจรชีวิตอย่างสมบูรณ์ในอาหารที่รู้ส่วนประกอบที่แน่นอน และยังสามารถกระตุ้นให้อยู่ในระยะต่าง ๆ ได้ในเวลาค่อนข้างจะแม่นยำ (Daniel และ Rusch, 1961)

Physarum apiculosporum สามารถเจริญได้จนครบวงจรชีวิตบนอาหารที่ง่าย ๆ คือ เมล็ดของข้าวโอ๊ต (Avena sativa) ที่ต้มสุกแล้วนำไปวางบนกระดาษกรองในจานเพาะเชื้อ (Harkonen, 1978)

Physarum gyrosum ในปี ค.ศ.1972 Indira ได้ทำการเพาะเลี้ยงบน Oat meal agar 3 % และ Carrot decoction agar 3 % พบว่าสามารถเจริญได้ครบวงจรชีวิต โดยที่ไม่ต้องทำสภาพพิเศษแต่อย่างใดเพียงแต่ว่าระยะที่จะสร้างสปอร์นั้น จะต้องการแสงที่มีความเข้มสูงกว่าชนิดอื่น ส่วน Licea

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

alexopouli และ L. biforis เมื่อปี ค.ศ.1976 นั้น Mock และ Kowalski ได้รายงานการเพาะเลี้ยงราเมือกทั้ง 2 ชนิดนี้ว่าสามารถเพาะเลี้ยงได้เจริญจนครบวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการ (สุรัสวดี, 2522)

2.2 วิธีการเพาะเลี้ยงราเมือก อาหาร และปัจจัยต่าง ๆ

ก. การเพาะสปอร์

วิธีการเพาะเลี้ยงและอาหาร

สาเหตุที่ทำให้ผนังสปอร์แตกขณะที่สปอร์กำลังงอกอยู่นั้น ยังไม่มีใครทราบแน่ชัด ได้มีข้อสมมุติฐานว่าอาจจะมีกลไกหลาย ๆ อย่าง ตั้งแต่แรงดันออสโมซีสจนถึงปฏิกิริยาต่าง ๆ ของเอ็นไซม์ จากการศึกษาใน Arcyria cinerea พบว่าขณะที่ขบวนการงอกกำลังดำเนินอยู่สปอร์จะเริ่มบวมที่ปลายข้างหนึ่ง และส่วนประกอบภายนอกของผนังสปอร์จะแตก หรือแยกออก โปรโตพลาสซึมก็จะงอกออกมา (Mims, 1971)

ได้มีนักวิจัยพยายามจะเพาะสปอร์ราเมือกให้งอกออกมา แต่ส่วนใหญ่แล้วสปอร์ไม่ค่อยงอก (Henney, 1967) ทำให้เป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงราเมือกที่เริ่มจากสปอร์ในห้องปฏิบัติการ Elliott ได้รายงานในปี ค.ศ.1949 ถึงการศึกษาราเมือกจำนวน 59 สปีชีส์ โดยใช้สปอร์ที่อายุต่างกัน บางสปอร์มีอายุ 61 ปี เขากระตุ้นให้สปอร์เหล่านี้งอก โดยใช้ Sodium taurocholate เป็น wetting agent และ Erbitch ก็ได้รายงานในปี ค.ศ.1964 ว่าสปอร์ของ Hemitrichia clavata ที่มีอายุ 75 ปี สามารถงอกได้ (Martin และ Alexopoulos, 1969)

นักวิจัยหลายท่านได้รายงานว่า สปอร์ของราเมือกส่วนมากจะงอกในน้ำ หรือถ้าผ่านการ treat ด้วย wetting agent เช่นพวกเกลือน้ำดี (bile

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

salt) สารที่ได้จากการต้มเคี่ยวของพวกไม้ เปลือกไม้ ฟาง ก็ช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์ราเมือกหลายสปีชีส์ (Alexopoulos และ Mims, 1979)

ใน A. cinerea นั้น สปอร์สามารถงอกได้ดีภายใน 12-24 ชั่วโมง เพียงแต่เอาวางในน้ำหรือน้ำกลั่น โดยที่ผนังสปอร์จะแตกออกเป็นรูปตัววี จะสังเกตการงอกได้โดยกระจายสปอร์จำนวนมาก ๆ ลงบนผิวของ Difco bacto-agar 2.5 % ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อแล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 2-3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นประมาณ 18 ชั่วโมง สปอร์จะงอก นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ (Mims, 1971)

นอกจากนี้การเพาะเลี้ยง A. cinerea นั้น อาจจะทำได้โดยเคาะสปอร์จำนวนมากลงบนผิววุ้นธรรมดา 2.5 % ซึ่งเทอยู่ในจานเพาะเชื้อแล้ว หลังจากนั้นเท E. coli suspension และน้ำกลั่นลงไปจนท่วม ควรตรวจดูจานเพาะเชื้ออย่างสม่ำเสมอ เพื่อดูว่าจานเพาะเชื้อยังมีผิวน้ำบาง ๆ ปกคลุมอยู่หรือไม่ เมื่อสังเกตพบพลาสโมเดียมขนาดเล็กเกิดขึ้น ใส่เกล็ดข้าวโอ๊ตที่บดละเอียดและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป นำจานเพาะเชื้อนี้ไปเพาะเลี้ยงไว้บนหิ้งในห้องปฏิบัติการ จนกระทั่งมันสร้างฟรุตติงบอดี พบว่าในการสร้างฟรุตติงบอดีของ A. cinerea นี้ ไม่จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิ หรือแสงสว่างแต่อย่างใด (Mims, 1969)

Physarum flavicomum สามารถเพาะได้โดยการนำสปอร์เดี่ยว (single spore) เพาะในจานเลี้ยงเชื้อที่มี Corn meal agar ซึ่งลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่งแล้ว และหยด suspension ของ Aerobacter aerogenes ที่เจือจางแล้วลงไป 4-5 หยด นำจานเพาะเชื้อนี้ไปบ่มเชื้อไว้ที่ 25 °ซ หลังจากนั้นประมาณ 14 วัน จะพบมิกซ์อะมีบาเกิดขึ้น

ในอาหารเพาะเชื้อที่สังเคราะห์ขึ้นนั้น ถ้าวางสปอร์บนผิวอาหารวุ้นที่ชื้น ๆ ไม่มีน้ำท่วมผิววุ้น ในบางสปีชีส์จะไม่เกิดสวอมเซล แต่ถ้าหากเติมน้ำลงไปบนผิวอาหารวุ้นจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงจากสภาพมิกซ์อะมีบาไปสู่สวอมเซลได้ แม้ว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การงอกของสปอร์ซึ่งมีอยู่เพียงสปอร์เดียวจะยากกว่าการงอกของสปอร์ที่รวมกันอยู่เป็นกลุ่มก้อน ตามที่ Smart ได้รายงานไว้ในปี 1937 แต่ก็สามารถเพาะราเมือกจากสปอร์เพียง 1 สปอร์ของราเมือกหลายสปีชีส์ได้ และเจริญต่อจนครบวงจรชีวิตได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งราเมือกเหล่านี้เป็นพวกเฮทเทอโรทัลลิค (heterothallic species) (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ระยะเวลาในการงอกและจำนวนเปอร์เซ็นต์ที่สปอร์จะงอกนั้น นอกจากน้ำจะเป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นแล้ว อุณหภูมิ pH อายุของสปอร์ สปีชีส์ สายพันธุ์ (strain) ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการงอกของสปอร์อีกด้วย Smart รายงานอีกในปีเดียวกันว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการงอกคือ 22-23 °ซ และ pH ที่เหมาะสมคือ 4.5-7.0 (Martin และ Alexopoulos, 1969 ; Alexopoulos และ Mims, 1979)

<u>ระยะเวลาในการงอกของสปอร์</u> (Alexopoulos และ Mims, 1979 ; Ashworth และ Dee, 1975 ; Hechler, 1981 ; Henney, 1967 ; Mims, 1971)

ระยะเวลาในการงอกของสปอร์นั้นจะมีแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสปีชีส์ สายพันธุ์ อายุของสปอร์ และสภาวะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อราเมือก	ระยะเวลาในการงอก	หมายเหตุ
Reticularia lycoperdon	15 นาที	ต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมมาก ๆ
Lamproderma scintillans	15-25 นาที	งอกในน้ำ
Oligonema flandum	อย่างน้อยที่สุด 14 วัน	-
Brefeldia maxima	7-8 วัน	-
Arcyria cinerea	12-24 ชั่วโมง	งอกในน้ำ
Fuligo septica	1 ชั่วโมง หรือน้อยกว่า	-
Reticularia lycoperdon	น้อยกว่า 1 ชั่วโมง	-
Reticularia splendens	น้อยกว่า 1 ชั่วโมง	-
Physarum polycephalum	2-3 ชั่วโมง	งอกในน้ำ
Physarum flavicomum	14 วัน	งอกใน Corn meal agar

ข. การเพาะเลี้ยงมิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซล

ธรรมชาติและพฤติกรรมของมิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซล

สปอร์เมื่องอกออกมาเป็นมิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซลแล้วถ้ามีแบคทีเรียเป็นอาหาร มิกซ์อะมีบาจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในปี ค.ศ.1943 Blickle พบว่าการแบ่งเซลนี้อาจจะเร่งให้เร็วขึ้นได้โดยการเติมสารพวก sulfhydryl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อมันเจริญถึงจุดหนึ่งแล้วมันจะมีพฤติกรรมเหมือนเซลสืบพันธุ์ สวอมเซลจะแตะกัน (contact) ตรงส่วนปลายที่เหนียว ๆ การหลอมรวมกัน (copulation) ของเซลสืบพันธุ์ราเมือกนั้น เป็นลักษณะเฉพาะในแต่ละสปีชีส์ และก็ยังไม่ทราบราย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละเอียดมากนัก บางครั้งต้องมีการชักนำเป็นระยะเวลานานก่อนที่จะเริ่มเกิดเป็นไซโกต พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบนั้น มิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซลเกิดขึ้นเป็นจำนวนเกือบ ๆ พัน แต่จำนวนไซโกตที่เกิดขึ้นมีค่อนข้างน้อย มิกซ์อะมีบาอาจจะยังแตะกันอยู่เป็นเวลานาน โดยไม่มีการหลอมรวมกัน หรืออาจจะแตะกันแล้วแยกออกจากกัน บางตัวอาจจะหลอมรวมกันหลังจากแตะกันไม่นาน ยังไม่ทราบว่ามีปัจจัยอะไรบ้างที่ทำให้เกิดพฤติกรรมแบบนี้ (Martin และ Alexopoulos, 1969)

การกระตุ้นให้ไมโครซีสต์ (microcyst) งอกออกมาเป็นสวอมเซล

ถ้ามิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซลได้รับอาหารไม่เพียงพอจะเกิดเป็นซีสต์เรียกว่า ไมโครซีสต์ (microcyst) ถ้าซีสต์นี้เกิดในขณะที่มีสภาพเป็นน้ำการทำให้ซีสต์กลับเข้าสู่สภาพมิกซ์อะมีบาจะทำได้ยากมาก แต่ถ้าซีสต์เกิดบนผิวที่แห้ง การเติมน้ำที่มีแบคทีเรียเจือปนอยู่ (aqueous bacterial suspension) จะช่วยเหนี่ยวนำให้ซีสต์งอก และต่อมาจะกลายเป็นสวอมเซล (Martin และ Alexopoulos, 1969) ไมโครซีสต์ของ Didymium iridis จะถูกกระตุ้นให้งอกออกมาเป็นมิกซ์อะมีบาได้โดยการย้ายไปเลี้ยงไว้ใน 5 mM potassium phosphate buffer เป็นเวลา 1 - ชั่วโมง พบว่า 90 % ของไมโครซีสต์จะงอกออกมาเป็นมิกซ์อะมีบา (Raub และ Aldrich, 1981)

วิธีการเพาะเลี้ยง-อาหาร

ในเรื่องความต้องการทางอาหารของมิกซ์อะมีบานั้น ยังไม่มีผู้ทราบรายละเอียดมากนัก นอกจากจะพบว่ากินแบคทีเรียเป็นอาหาร ทั้งแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ และแบคทีเรียที่ได้ทำให้ตายแล้ว แต่ก็ได้มีการทดลองเพาะเลี้ยงมิกซ์อะมีบา และสวอมเซลของ Physarum flavicomum ในอาหารเหลวที่รู้ส่วนประกอบทางเคมีที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แน่นอน ซึ่งในอาหารนั้นประกอบด้วยเกลือแกง, กลูโคส, ไวตามินเอช (biotin), ไวตามิน บีหนึ่ง (thiamine), ฮีมาติน (hematin), ไกลซีน (glycine), อาร์จินิน (l-arginine) และเมไทโอนิน (l-methionine) และให้มิกซ์อะมีบาที่เลี้ยงในอาหารเหลวนี้ได้รับอากาศโดยการใช้เครื่องเขย่า (Henney และ Asgari, 1975)

การเพาะเลี้ยงแบบ monoxenic นั้น อาจทำได้โดยการปล่อยให้มิกซ์อะมีบาที่งอกออกมาจากสปอร์ และอยู่บนผิวของอาหารวุ้นนั้นเคลื่อนตัวผละออกจากสิ่งเจือปนอยู่แล้วจึงย้ายมิกซ์อะมีบาไปเลี้ยงไว้ในอาหารที่ผสมแบคทีเรียเช่น E. coli หรือ Aerobacter aerogenes ต่อไป (Martin และ Alexopoulos, 1969)

มิกซ์อะมีบาของ P. polycephalum สามารถเลี้ยงให้ได้ axenic culture ในอาหารเหลว อาหารนี้ประกอบด้วยซีรัม อัลบูมินของวัว, สารที่ได้จากการสกัดเอมบริโอของลูกไก่และวัว, น้ำต้มตับ, เปปโตน และกลูโคส ปรากฏว่าเซลเจริญได้ดี และสามารถถ่ายเชื้อได้มากกว่า 100 ครั้ง โดยไม่เป็นอันตราย (Goodman, 1972) มิกซ์อะมีบาของราเมือกชนิดนี้เจริญได้ดีที่ pH 6.9 (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ช่วงระยะเวลาของระยะที่เป็นมิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซล

ระยะของมิกซ์อะมีบา หรือสวอมเซลนี้อาจจะหมดภายใน 3-4 ชั่วโมง จนถึงหลาย ๆ วัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของราเมือก แต่อาจจะเลี้ยงให้อยู่ได้นานขึ้นได้ มีผู้ทดลองใน Didymium nigripes พบว่าถ้าเติม 2 % กลูโคส หรือ 0.2 % บรูซีน (brucine) ลงในอาหาร จะสามารถยับยั้งไม่ให้เกิดพลาสโมเดียมได้ แต่ไม่มีผลต่อการเกิดไซโกต และจากการทดลองของ Ross ในปี ค.ศ.1957 พบว่าใน D. nigripes และ D. squamulosum นั้น ถ้ามีกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะยังคงเกิดไซโกตได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่จะเกิดพลาสโมเดียมช้าลง เพราะกลูโคสมีผลต่อการรวมกลุ่มของไซโกตซึ่งจะทำให้เกิดพลาสโมเดียม (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ค. การเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม

ธรรมชาติและพฤติกรรมของพลาสโมเดียม

มีบ่อยครั้งที่พบว่าการเจริญเป็นพลาสโมเดียมจะยังไม่เริ่มขึ้นจนกว่าจะผ่านระยะการเหนี่ยวนำ (induction period) ซึ่งอาจจะใช้เวลาหลายสัปดาห์ (Sobels และ Cohen, 1953)

ในราเมือกบางสปีชีส์นั้นพบว่า การเพาะเลี้ยงมิกซ์อะมีบาจากสปอร์เพียงสปอร์เดียวจะไม่เกิดพลาสโมเดียม แต่เมื่อผสม culture เข้าด้วยกันแล้วจะเกิดพลาสโมเดียมขึ้นเป็นบางส่วน ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้สันนิษฐานว่าพลาสโมเดียมที่เกิดขึ้นนั้นได้จากมิกซ์อะมีบาที่มี mating type ต่างกัน โดยที่สปอร์พวกนี้เป็นแบบ heterothallic ดังนั้น สปอร์ 1 สปอร์ ก็จะให้ mating type เพียง 1 อย่างเท่านั้น แต่ก็พบว่าประมาณ 2 % ของ culture ที่มาจากสปอร์เพียงอันเดียวก็ยังมีพลาสโมเดียมเกิดขึ้น ซึ่งอาจจะเกิดจากความบังเอิญที่ในสปอร์นั้นมีมากกว่า 1 เซล ซึ่งตามปกติแล้ว ในสปอร์ควรจะเหลือเพียง 1 เซล หลังจากเกิดการแบ่งแบบไมโอซีส (Ashworth และ Dee, 1975)

วิธีการเพาะเลี้ยง อาหาร และปัจจัยอื่น ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

อาหารที่ใช้เลี้ยงพลาสโมเดียมนั้นมีหลายชนิดเช่น rolled oat, เกล็ดข้าวโอ๊ต, ข้าวโอ๊ตป่น, เมล็ดเดือยป่า (Hordeum vulgare) เมล็ดข้าวโอ๊ต ใบไม้ผุ ไม้ผุ เปลือกไม้ ดิน Coconut milk agar, Carrot agar, Knop's solution

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

agar, Corn meal agar, Lactose-yeast extract agar, Baker's yeast-Bacto-agar, Chemically defined liquid medium, Two-membered cultured

พวกใบไม้ผุ ไม้ผุ ดิน หรือเปลือกไม้นั้น เป็นอาหารที่มีความเข้มข้นอ่อน ๆ เหมาะกับการเจริญของราเมือก อาหารที่เตรียมในห้องปฏิบัติการจะมีความเข้มข้นมากกว่า พลาสโมเดียมนั้นถ้าหากเอาไปเลี้ยงบนอาหารมาตรฐานที่ใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียแล้ว พบว่ามันจะตายอย่างรวดเร็ว (Sobels และ Cohen, 1953) พลาสโมเดียมของราเมือกไม่สามารถจะทนสารอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นมาก ๆ ได้ ดังนั้น พวกใบไม้ผุ ดิน เปลือกไม้ จึงเป็นอาหารที่ราเมือกส่วนมากเจริญได้ดี

พวกเมล็ดธัญญาพืชนั้น พบว่าใช้เลี้ยงราเมือกได้หลายชนิดเช่น Physarum nudum สามารถเลี้ยงได้ดีบนเกล็ดข้าวโอ๊ต และสามารถรักษาไว้ได้นาน โดยมีการถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในอาหารจานใหม่ประมาณ 2 ครั้งต่ออาทิตย์ (Carlile, 1974) P. apiculosporum เจริญบนเมล็ดเดือยป่า และเจริญบนเมล็ดข้าวโอ๊ตที่ต้มจนสุกแล้ววางบนกระดาษกรองในจานเพาะเชื้อ (Harkonen, 1978) นอกจากนี้ยังพบราเมือกอีกหลายชนิดที่เจริญบนเมล็ดธัญญาพืชเช่น Didymium comatum, D. dubium, D. iridis, D. difforme และ D. squamulosum (Harkonen และ Koponen, 1979)

พลาสโมเดียมที่มีอายุน้อยของ Physarum flavicomum นั้น สามารถเลี้ยงให้เจริญจนเป็นพลาสโมเดียมขนาดใหญ่ได้ โดยการนำไปเลี้ยงใน rolled oat ที่บดให้ละเอียดซึ่งปราศจากเชื้อแล้ว นำไปบ่มเชื้อไว้ในที่มืด จนกระทั่งเจริญเป็นพลาสโมเดียมจำนวนมาก จึงย้ายไปเลี้ยงไว้ในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิคงที่ที่ 25 ± 1 °ซ (Henney 1967)

อาหารพวก Difco Corn meal agar 1.5 % ก็นำมาเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียมได้หลายชนิดเช่น ฟานีโรพลาสโมเดียม (phaneroplasmodium) ของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Didymium clavus, ฟานีโรพลาสโมเดียมสีเหลืองซึ่งยังไม่ทราบชนิด, ฟานีโรพลาส-โมเดียมของ Fuligo septica, อะฟาโนพลาสโมเดียม (aphanoplasmodium) ของ Stemonitis fusca, โปรโตพลาสโมเดียม (protoplasmodium) ขนาดเล็ก ๆ ของ Clastoderma debaryanum และพลาสโมเดียมของ Hemitrichia vesparium ซึ่งเป็นพลาสโมเดียมที่มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างฟานีโรพลาสโมเดียมกับอะฟาโนพลาสโมเดียม (McManus และ Roth, 1965)

ได้มีการเพาะเลี้ยง Arcyria cinerea, Diderma effusum, Lamproderma scintillans, Perichaena depressa และ Tubifera microsperma ใน Coconut milk agar พบว่าได้ผลดีมีสิ่งเจือปนเจริญขึ้นน้อยมาก แต่ก็ยังได้ผลดีสู้เลี้ยงใน Carrot agar ไม่ได้ (Kalyanasundaram และ Venkataramani, 1974)

ได้มีผู้พยายามที่จะใช้ Two-membered culture ในการเลี้ยงราเมือก โดยใช้ยีสต์ผสมข้าวโอ๊ตใส่ลงในหลอดที่ใช้เพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 20–25 มิลลิเมตร) โดยอาจจะเติมข้าวโอ๊ต 2–3 เมล็ด หรือ rolled oats 0.3 กรัม ลงในหลอด เติมอาหารวุ้น 2 % ลงไป 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.0 แล้วเอาไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อหลอดเย็นแล้วคลึงหลอดด้วยฝ่ามือทั้งสองเพื่อให้ข้าวโอ๊ตแขวนลอยในวุ้น พลาสโมเดียมบางชนิดอาจจะเจริญได้ดีในอาหารที่เข้มข้นกว่านี้ที่อุณหภูมิ 20–24°ซ จะต้องถ่ายเชื้อทุก ๆ อาทิตย์ นอกเสียจากว่า culture นั้น จะมีชีวิตอยู่ได้นาน (Sobels และ Cohen, 1953)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้มีผู้นำ Physarum gyrosum ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี E. coli (ทั้งชนิดที่ได้ทำการฆ่าเชื้อแล้วและที่ยังมีชีวิตอยู่) ปนอยู่กับข้าวโอ๊ตป่น และ yeast extract ปรากฏว่ามันเจริญได้ดี และเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบน Baker's yeast bacto-agar ใน 0.025 M. phosphate buffer ที่ pH 7 และมีกลูโคส 0.2 % ผสมกับ E. coli ที่ยังมีชีวิตอยู่ (Schroeder และคณะ, 1974)

ใน Two-membered culture นั้น ได้ใช้กับแบคทีเรียและยีสต์หลายตัวเช่น E. coli, A. aerogenes, Serratia marcescens, Saccharomyces cerevisiae, S. ellipsoideus และ Torula aclotiana โดยนำมา streak บนผิววุ้นแล้วใช้เลี้ยงพลาสโมเดียม แต่ S. cerevisiae และ S. ellipsoideus เป็นยีสต์ที่ควรนำมาใช้มากกว่า T. aclotiana เพราะเพาะเลี้ยงง่าย และบั่นแยกออกมาได้ง่ายกว่า T. aclotiana ซึ่งมีลักษณะเป็นเมือก (Sobels และ Cohen, 1953 ; Alexopoulos และ Mims, 1979)

สิ่งที่ควรระวังใน Two-membered culture คือ จะต้องคอยดูพลาสโมเดียมอย่างดี เพราะบางตัวจะเจริญอย่างรวดเร็วจนถึงขีดสูงสุด แล้วก็ตายเพียงชั่วข้ามคืน พวกพลาสโมเดียมที่เจริญได้รวดเร็วนี้จะถ่ายไปบนอาหารจานใหม่ได้เลย โดยไม่ต้องระวังเรื่องความบริสุทธิ์ของเชื้อ ถึงแม้อาหารที่ใช้เลี้ยงจะไม่คอยบริสุทธิ์ก็ไม่เป็นปัญหา เพราะพลาสโมเดียมพวกนี้จะสามารถกินพวกสิ่งเจือปนที่มีอยู่ได้หมด (Sobels และ Cohen, 1953)

Alexopoulos (1960) ได้ตั้งข้อสังเกตว่า อะฟาโนพลาสโมเดียมนั้น ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น แล้วปล่อยให้ผิวของอาหารวุ้นแห้งจะไม่เจริญเลย แม้ว่าจะเจริญเติบโตอย่างดีมากอนก็ตาม โดยมากมักจะเข้าเกราะเกิดเป็นซีสต์มากมาย และซีสต์นี้พบว่าเมื่อถูกกระตุ้นโดยการเติมน้ำลงไปใน culture จะเจริญเป็นพลาสโมเดียมได้อีกบ่อยครั้ง แต่ก็สามารถจะอยู่บนผิววุ้นที่มีสภาพแห้งได้เหมือนกัน ถ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หากอยู่ในระยะที่กำลังจะสร้างสปอร์ ส่วนพวกฟานีโรพลาสโมเดียมชอบผิววุ้นที่แห้งกว่า อะฟาโนพลาสโมเดียม แต่ก็มีหลายสปีชีส์ของ Physarales ที่ชอบสภาพที่มีน้ำแฉะ

ในเชื้อที่เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างหยาบ (crude culture) นั้น สิ่งสำคัญมากก็คือ การระวังไม่ให้มีสิ่งมีชีวิตอื่นเจือปน หรือเจริญขึ้นมากมายหนาแน่นจนปกคลุมพลาสโมเดียมจนตาย (Sobels และ Cohen, 1953)

พวก Knop's solution agar หรือ Lactose-yeast extract agar ก็สามารถนำมาเลี้ยงพลาสโมเดียมได้ผลดี อาหารวุ้นพวกนี้เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียจะต้องระวังไม่ให้แบคทีเรียเจริญมากเกินไปจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของราเมือก (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ส่วนพวกอาหารที่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอนนั้น ก็ได้มีผู้ทดลองนำไปเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ปรากฏว่าหลายชนิดเจริญได้ดีเช่น Physarum flavicomum, P. rigidum, P. polycephalum ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยเกลือแร่, กลูโคส, ไวตามิน เอช, ไวตามิน บีหนึ่ง, ฮีมาติน และกรดอะมิโน 3 ตัวคือ เมทธิโอนิน, ไกลซีน และอาร์จินิน แต่พวก P. rigidum ต้องการวาลีนเพิ่มอีก 1 ตัว อาหารชนิดนี้ใช้เลี้ยงพลาสโมเดียมของราเมือกทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ผลดี แต่สูตรอาหารของ Daniel และคณะ ซึ่งใช้เลี้ยง P. polycephalum ได้ดีนั้น จะนำมาใช้เลี้ยง P. flavicomum และ P. rigidum ไม่ได้ดี (Henney และ Lynch, 1969)

จากการทดลองใน P. polycephalum พบว่ากลูโคสและแมนโนสสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ (migrate) ของพลาสโมเดียมได้ ส่วนฟรุคโตสไม่มีผลเช่นนั้น (Rose และคณะ 1973) ในที่ขาดออกซิเจนพบว่าพลาสโมเดียมจะเคลื่อนที่ต่อไปได้อีกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น มีผู้พบว่ากลูโคส, มอลโตส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลที่ช่วยในการเติบโตของพลาสโมเดียม (Ashworth และ Dee, 1975)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การย้ายพลาสโมเดียมไปเลี้ยงในอาหารจานใหม่

พบว่าเมื่อย้ายพลาสโมเดียมไปเลี้ยงในอาหารจานใหม่แล้ว ภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงต่อมา พลาสโมเดียมจะผละลงสู่อาหารจานใหม่ และเจริญเติบโตกระจายทั่วไปอย่างสม่ำเสมอ แต่ถ้าเราย้ายไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงที่มีแต่วุ้นเปล่า ๆ ไม่มีอาหาร พบว่าหลังจากนั้นประมาณ 12-24 ชั่วโมง พลาสโมเดียมจะไม่มีการเจริญเติบโต แต่จะคืบคลานไปตามผิววุ้น และในที่สุดก็จะตายหรือสร้างเป็นสเคลอโรเตียม (Ashworth และ Dee, 1975)

ในปี ค.ศ.1939 และ ค.ศ.1941 Cohen และ Sobels เมื่อปี ค.ศ.1950 พบว่าพลาสโมเดียมสามารถปรับตัวให้เข้ากับอาหารใหม่ได้ ถ้าทำการถ่ายพลาสโมเดียมไปสู่อาหารจานใหม่บ่อย ๆ จะใช้อาหารชนิด Two-membered หรือ Pure culture ก็ได้โดยการถ่ายพลาสโมเดียมลงไปให้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้ พบว่าพลาสโมเดียมมีการปรับตัวให้เข้ากับยีสต์และแบคทีเรียใน Two-membered culture หรือใน glycerol ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน หรือในยีสต์ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (autoclaved yeast) หรือใน yeast autolysate ซึ่งเป็นสิ่งที่ใช้เป็นแหล่งอาหารสิ่งเดียวใน Pure culture (Sobels และ Cohen, 1953)

การเก็บรักษา culture ของพลาสโมเดียม

มีผู้แนะนำว่าสิ่งที่ควรระวังคือ ห้ามขูดหรือบดขยี้พลาสโมเดียมออกจากแหล่งที่มันอาศัยอยู่ เครื่องมือที่ใช้ในการตัดพลาสโมเดียมคือ เครื่องมือที่มีส่วนปลายแบนคล้ายพาย และคม เป็นเหล็กผสมนิเกิลและโครเมียม ถ้าพลาสโมเดียมกำลังคืบคลานไปตามผนังของภาชนะแก้ว หรือภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง ให้ใช้ปิเปตดูดน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วล้างเอาพลาสโมเดียมออกมา เมื่อพลาสโมเดียมหลุดออกมาแล้วอาจจะใช้ห่วงลวดหรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลวดที่ทำเป็นตะขอ ช้อนเอาพลาสโมเดียมออกมาเลี้ยงในอาหารจานใหม่ (Sobels และ Cohen 1953)

ในห้องปฏิบัติการนั้น พลาสโมเดียมอาจจะถูกเลี้ยงไว้ได้เป็นเวลานานในอาหารที่มีแบคทีเรียเจือปนอยู่กับข้าวโอ๊ตบด หรือปน (Alexopoulos และ Mims, 1979 ; สุรัสวดี, 2522) พลาสโมเดียมที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีลักษณะเป็นอนุภาคเช่น เกล็ดข้าวโอ๊ต แบคทีเรีย จะเห็นฟูด แวคคูโอลได้ (Ashworth และ Dee, 1975) ในการเก็บรักษานั้น culture จะต้องนำไปบ่มไว้ในที่มืดไม่ให้ถูกแสง โดยการปิดด้วยวัตถุ หรือม่านทึบแสงในระหว่างการเคลื่อนย้ายเท่านั้นที่อาจให้มีการถูกแสงจำนวนเล็กน้อยได้ (Daniel และ Rusch, 1961)

<u>การทดสอบว่าพลาสโมเดียมที่มีอยู่เป็นสปีชีส์เดียวกันหรือไม่</u>

ในปี ค.ศ.1887 De Bary ได้พบว่า ราเมือกที่สปีชีส์ต่างกันพลาสโมเดียมจะไม่รวมกัน ซึ่งวิธีนี้ใช้เป็นสิ่งทดสอบสปีชีส์ที่ต่างกันได้ (Alexopoulos และ Mims, 1979) ถ้านำพลาสโมเดียมที่ต่างชนิดกันไม่เหมือนกันในด้านกรรมพันธุ์ 2 ชนิดมาหลอมรวมกัน จะมีปฏิกิริยาร้ายแรงเกิดขึ้นอย่างเร็วและมีผลทำให้ชนิดใดชนิดหนึ่งตาย หรือตายไปทั้ง 2 ชนิด (Ashworthและ Dee, 1975) ความสามารถในการหลอมรวมกันของพลาสโมเดียมนี้ได้ศึกษาทดลองใน <u>P. polycephalum</u>, <u>D. iridis</u> และ <u>D. squamulosum</u> พบว่าการหลอมตัวของพลาสโมเดียมถูกควบคุมโดยกรรมพันธุ์ (Ashworth และ Dee, 1975 ; Alexopoulos และ Mims, 1979)

<u>วิธีการทดสอบ</u>

ทำได้โดยตัดชิ้นส่วนของทั้ง 2 พลาสโมเดียมมาวางไว้บนอาหารจานเดียวกัน ให้ห่างกันประมาณ 2-3 เซนติเมตร หลังจากนั้นประมาณ 24 ชั่วโมง จะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าแต่ละพลาสโมเดียมจะสร้างส่วนที่คล้ายพัด 2 ส่วน และเจริญเติบโตไปทางด้านหน้า (anterior) ขณะที่อยู่ใกล้กันแค่ 2-3 มิลลิเมตร ก็จะแตะกันนั้นต้องคอยสังเกตอย่างต่อเนื่องทางกล้องจุลทรรศน์ เพราะการหลอมตัวเกิดขึ้นเร็วมาก หลังจากแตะกันประมาณ 2-3 ชั่วโมง พลาสโมเดียมทั้งสองจะกลายเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน มีทิศทางการไหลของโปรโตพลาสซึมแบบเดียวกัน (Ashworth และ Dee, 1975)

ง. <u>การเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระยะสร้างสปอร์</u>

เนื่องจากราเมือกอยู่ได้ในแหล่งภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันทั่วโลก จึงคาดว่าสภาวะที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์อาจแตกต่างกันในสปีชีส์ที่แตกต่างกัน (Ashworth และ Dee, 1975) หลาย ๆ สปีชีส์มีการสร้างสปอร์ตามฤดูกาลที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเกี่ยวกับช่วงเวลาของการได้รับแสง หรือการตอบสนองต่ออุณหภูมิ ความชื้น หรืออาจจะมีปัจจัยอื่น ๆ อีก (Martin และ Alexopoulos, 1969)

<u>สภาวะที่จำเป็นและเหมาะสมในการสร้างสปอร์</u> (Daniel และ Rusch, 1961)

จากการทดลองในพลาสโมเดียมของ <u>P. polycephalum</u> ที่ได้เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าสภาวะที่จำเป็นของการสร้างสปอร์คือ

1. อายุที่เหมาะสมของพลาสโมเดียม และช่วงระยะเวลาที่อาหารในภาชนะที่เพาะเลี้ยงเริ่มขาดแคลนลง

2. การบ่มเชื้อไว้ในที่มืด 4 วัน ในอาหารที่มีแต่เพียง inorganic salt และ niacin หรือ tryptophan

3. ให้พลาสโมเดียมถูกกับแสงในช่วงคลื่น 350-500 mμ m เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าราเมือกจะสร้างอับสปอร์ที่มีสปอร์อยู่ภายใน โดยที่ขบวนการสร้างนี้จะเสร็จสมบูรณ์ในเวลา 12–16 ชั่วโมง

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์

พบว่าอุณหภูมิ ความชื้น แสง pH และอาหารเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ แต่ยังไม่ทราบว่าอะไรเป็นปัจจัยแรกที่เป็นตัวกระตุ้นการสร้างสปอร์ (Martin และ Alexopoulos, 1969) ได้มีการศึกษากันอย่างละเอียดใน P. polycephalum และในสปีชีส์อื่น ๆ ด้วย พบว่าทุกสปีชีส์ที่ได้ศึกษานั้น การขาดอาหารจะจำเป็นในการสร้างสปอร์ในพลาสโมเดียมที่มีเม็ดสีนั้น ระยะการอดอาหารของมันอาจจะใช้เวลานานหลายวันก่อนที่จะนำมารับแสง จึงจะเกิดขบวนการสร้างสปอร์ได้ มีผู้คิดว่าพลาสโมเดียมที่อดอาหารนี้อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงทางเมตาโบลิสซึมที่เป็นไปอย่างเฉพาะเจาะจง และถ้าได้รับแสงในช่วงวิกฤตนี้แล้ว แม้จะเป็นระยะเวลาเพียง 1 ชั่วโมง ก็เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์ได้ แม้ว่าจะเอาไปบ่มเชื้อไว้ในที่มืดต่ออีกก็จะสร้างฟรุตติงบอดีภายใน 12 ชั่วโมง จากการทดลองในพลาสโมเดียมที่มีสีเหลือง 4 สปีชีส์ และพลาสโมเดียมที่ไม่มีสี 10 สปีชีส์ ในสภาพที่อดอาหาร พบว่าพลาสโมเดียมทั้งหมดต้องการแสงในขบวนการสร้างสปอร์ และพบว่าพวกพลาสโมเดียมสีเหลืองมีความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลตได้ดี (Ashworth และ Dee, 1975) ความยาวคลื่นของแสงที่จะกระตุ้นจะอยู่ในช่วง 310–500 mμm พวกความยาวคลื่นที่สั้นกว่าจะให้ผลดีกว่า (Alexopoulos และ Mims, 1979) และจากการทดลองใน P. polycephalum พบว่าอุณหภูมิ และ pH เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งกันและกัน ภายในขอบเขตที่จำกัดแน่นอนอันหนึ่ง ดังเช่น ในอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะต้องการ pH ที่ต่ำลงในขบวนการสร้างสปอร์ (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลของ pH ในอาหารที่มีผลต่อการเจริญของราเมือกในด้านขบวนการสร้างสปอร์นั้น ได้ศึกษาใน citrate buffer 0.03 M พบว่าอาหารที่ปรับ pH ให้เป็น 4, 5 หรือ 6 นั้น จะเกิดการสร้างสปอร์ 100 % ส่วนใน $CaCO_3$ buffered medium เมื่อปรับ pH เป็น 6 แล้วจะยับยั้งการหลอมตัวของพลาสโมเดียมขนาดเล็ก ๆ และในที่สุดก็จะยับยั้งขบวนการสร้างสปอร์ (Daniel และ Rusch, 1961)

ขบวนการสร้างสปอร์ในสภาวะธรรมชาติและในสภาวะที่ควบคุม

ขบวนการสร้างสปอร์ในสภาวะธรรมชาติ

ความรู้เกี่ยวกับการสร้างสปอร์ของราเมือกในสภาวะธรรมชาติยังมีไม่มากนัก ในบางสปีชีส์ดูเหมือนว่าขบวนการสร้างสปอร์จะเกิดในเวลาที่เฉพาะเจาะจงเวลาหนึ่งในรอบปี อุณหภูมิที่เหมาะสมก็แตกต่างกันในสปีชีส์ที่ต่างกัน แต่พบว่าขบวนการสร้างสปอร์มักจะเกิดในตอนกลางคืนเป็นส่วนใหญ่ (Ashworth และ Dee, 1975)

พลาสโมเดียมจะเจริญไปเป็นฟรุตติงบอดีที่มีลักษณะเฉพาะตัวขึ้นหนึ่งภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าอยู่ภายใต้สภาวะที่ทำให้มีการแห้งโดยเร็ว หรือมีสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่นถ้ามีฝนตกซ้ำกันหลาย ๆ หน จะพบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เกิดความแตกต่างไปมากมาย เช่น สปีชีส์ที่ปกติมีก้านอาจกลายเป็นพวกไม่มีก้าน หรือเกือบจะไม่มี หรือก้านนั้นอาจจะยาวผิดปกติ คุณสมบัติเฉพาะตัวและการสะสมของหินปูนอาจจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้น (Martin และ Alexopoulos, 1969)

พลาสโมเดียมนั้นแม้ว่าจะอยู่ในสภาพที่ขาดอาหารก็ยังสามารถเคลื่อนตัวต่อไปได้อีกในระยะทางค่อนข้างมาก ซึ่งคาดว่าอาจจะเพื่อเลือกหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสปอร์ มีการศึกษาในพลาสโมเดียมของ Badhamia utricularis โดยการนำพลาสโมเดียมไปวางรับแสงสว่างหลังจากเลี้ยงไว้ใน rolled oat ในที่มืดเป็นเวลา 1 อาทิตย์แล้ว ตอนแรกพบว่าพลาสโมเดียมจะเคลื่อนตัวเข้าไปในที่ร่ม แต่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นจะกลับเคลื่อนตัวเข้าหาแสงแล้วสร้างฟรุตติงบอดี ตรงเขตต่อระหว่างแสงและที่ร่ม (Ashworth และ Dee, 1975)

ขบวนการสร้างสปอร์ในสภาวะที่ควบคุม

Dr.H.P.Rusch ได้รู้วิธีการเหนี่ยวนำ P. polycephalum ให้อยู่ในระยะสร้างสปอร์ได้เป็นลำดับขั้นอย่างแม่นยำ วิธีนี้ใช้ได้เฉพาะใน Liquid shaken culture และพลาสโมเดียมที่เลี้ยงบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนอาหารเหลวเท่านั้น (Ashworth และ Dee, 1975)

ขบวนการที่ใช้กระตุ้นให้เกิดขบวนการสร้างสปอร์ใน P. polycephalum นั้น มีดังนี้ (Daniel และ Rusch, 1961)

1. หลังจากที่เพาะเลี้ยงพลาสโมเดียมในอาหารที่เหมาะสมแล้ว 66 ชั่วโมง พลาสโมเดียมขนาดเล็กเหล่านี้จะถูกเก็บแล้วถ่ายไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมกับขบวนการสร้างสปอร์ ระยะเวลาในช่วงนี้จะต้องไม่เกิน 45 นาทีคือ เก็บพลาสโมเดียมจะไม่เกิน 15 นาที แล้วถ่ายพลาสโมเดียมไปสู่อาหารใหม่จะไม่เกิน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มเชื้อไว้ในที่มืดที่ 21.5°ซ เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง เพื่อให้พลาสโมเดียมขนาดเล็กเหล่านี้หลอมรวมกัน

2. หลังจากบ่มเชื้อไว้ในที่มืดแล้ว นำภาชนะที่เพาะเลี้ยงมาวางรับแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์ โดยใช้หลอดไฟขนาด 40 วัตต์ 2 ดวง วางห่างกัน 4 ฟุต ระหว่างที่ให้พลาสโมเดียมรับแสงจะมีพัดลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว 2 เครื่อง วางอยู่ที่ปลายแต่ละข้างของหลอดไฟเพื่อช่วยลดความร้อนของหลอดไฟ อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะไม่มากกว่า 2°ซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. หลังจากการรับแสงแล้วนำเอาเชื้อไปบ่มไว้ในห้องบ่มเชื้อเพื่อให้เกิดขบวนการสร้างสปอร์ จะพบลักษณะที่เป็นเม็ดลูกปัดเกิดขึ้นในเวลา 6–8 ชั่วโมง หลังจากถูกแสง ขบวนการสร้างสปอร์จะเสร็จสมบูรณ์ในเวลา 12–16 ชั่วโมง

Hosoda ได้ทดลองเกี่ยวกับขบวนการสร้างสปอร์ของพลาสโมเดียมชนิดนี้ ซึ่งเลี้ยงไว้บน rolled oat ที่วางอยู่บนวุ้น 1.5 % ในที่มืด หลังจากเลี้ยงไว้ได้ 2 วัน ก็ย้ายไปเลี้ยงไว้บนวุ้นธรรมดาซึ่งไม่มี rolled oat พบว่าพลาสโมเดียมที่ได้รับแสงเป็นเวลา 2 วัน จะถูกกระตุ้นให้เกิดขบวนการสร้างสปอร์ และถ้าหากว่าพลาสโมเดียมได้ถูกทำให้อดอาหารแล้วบ่มไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลานานก่อนที่จะให้รับแสงจะพบว่าเกิดการสร้างสปอร์ขึ้นเป็นจำนวนมาก และเกิดขึ้นในระยะที่เริ่มต้นขาดอาหาร (Hosoda, 1981)

พลาสโมเดียมนั้นถ้าได้รับแสงในเวลาที่ไม่เหมาะสมอาจจะต้องให้ได้รับแสงอีกหลาย ๆ วันจนกว่าจะเกิดขบวนการสร้างสปอร์ ในการกระตุ้นนั้นถ้ากระตุ้นถึง point of commitment แล้วการกระตุ้นนั้นจะกลับคืนสู่สภาพเดิมไม่ได้ แม้จะนำกลับไปเลี้ยงในอาหารที่สมบูรณ์ แต่ถ้าหากนำเอาพลาสโมเดียมกลับไปเลี้ยงในอาหารที่สมบูรณ์อีกก่อนที่จะกระตุ้นถึงจุดนี้ก็จะพบว่ามีการเจริญต่ออีก และไม่เกิดขบวนการสร้างสปอร์ แม้ว่าพลาสโมเดียมนั้นจะได้ผ่านระยะการอดอาหาร และรับแสงสว่างมาแล้วก็ตาม ได้มีผู้ศึกษาถึงลักษณะสำคัญของแสง 2 ประการคือ ความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลาของระยะที่ถูกแสงกับความเข้มของแสง และแสงสีต่าง ๆ ได้มีการสังเกตว่าพลาสโมเดียมแต่ละชนิดจะมีความไวต่อแสงต่างกัน ส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่มีความไวต่ำ โดยใช้สภาวะมาตรฐานคือ ให้ถูกแสง 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 1.0 ส่วนการกระทำ หรือผลจริง ๆ ของแสงสีต่าง ๆ ต่อขบวนการสร้างสปอร์นั้นยังไม่ทราบแน่นอน (Ashworth และ Dee, 1975 ; Daniel และ Rusch, 1961)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะกับการเจริญของพลาสโมเดียมนั้น มีกลูโคสเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ยับยั้งการเกิดขบวนการสร้างสปอร์แม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำ (Daniel และ Rusch, 1961)

พลาสโมเดียมของราเมือกบางชนิดจะเจริญได้อย่างรวดเร็วแต่สร้างฟรุตติงบอดีได้ยากในห้องปฏิบัติการ การถ่ายพลาสโมเดียมไปเลี้ยงไว้บนวุ้นธรรมดาแล้วใส่เปลือกไม้ หรือกระดาษกรอง ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วลงไปสัก 1–2 ชิ้น จะกระตุ้นให้มีการสร้างฟรุตติงบอดี (Quimio, 1978)

จ. การเพาะเลี้ยงให้เกิดสเคลอโรเตียม และการเก็บรักษา

การเกิดสเคลอโรเตียมนั้น จะเกิดขึ้นเนื่องจากมีสภาพที่แห้งแล้ง อุณหภูมิต่ำ ขาดอาหาร pH ต่ำ มีแรงดันออสโมซีสสูงมีจำนวนโลหะหนักในอัตราที่เกือบถึงอัตราที่ทำให้เป็นอันตราย หรืออาจจะมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมอื่น ๆ (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ถ้าพลาสโมเดียมเกิดการขาดอาหารขณะอยู่ในที่มืด หรือความชื้นลดลงอย่างช้า ๆ หรือสภาวะไม่เหมาะสมอื่น ๆ ราเมือกจะสร้างสเคลอโรเตียม ซึ่งภายในประกอบด้วยสฟีรูล (spherule) actinomycin D มีส่วนทำให้เกิดเยื่อหุ้มของสฟีรูล แต่สฟีรูลที่เกิดขึ้นจะมีการแยกที่ไม่ค่อยสมบูรณ์ จะยังมีลักษณะเป็นกระจุกใหญ่ ขบวนการสร้างสฟีรูล (spherulation) จะถูกยับยั้งโดย cycloheximide (McCormick และคณะ, 1970)

ใน P. polycephalum นั้น พลาสโมเดียมอาจจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสฟีรูลได้ในอาหารเหลว โดยการนำพลาสโมเดียมไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งพลังงาน เพราะว่าขบวนการเกิดสฟีรูลจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอ็นไซม์ (Ashworth และ Dee, 1975) ในปี ค.ศ.1969 Chet และ Rusch ได้รายงานว่า พลาสโมเดียมขนาดเล็ก ๆ ของ P. polycephalum สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นสฟีรูลได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยการถ่ายพลาสโมเดียมเหล่านี้ลงไปในอาหารที่มีแมนนิทอล (mannitol) Guttes และ Guttes ได้รายงานในปี ค.ศ.1963 ว่าการกระตุ้นให้เกิดสพีรูลโดยการถ่ายพลาสโมเดียมไปเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายเกลือ จะเริ่มเห็นสพีรูลเกิดขึ้นประมาณ 23 ชั่วโมง หลังจากที่ได้ถ่ายพลาสโมเดียมลงไปเลี้ยงในสารละลายเกลือ และภายใน 35 ชั่วโมง มันจะเปลี่ยนไปเป็นสพีรูลประมาณ 95 % (McCormick และคณะ, 1970)

พลาสโมเดียมของ P. polycephalum ที่ถูกเลี้ยงบน rolled oat แล้วย้ายไปเลี้ยงไว้ให้อยู่ในสภาพขาดอาหารในจานเลี้ยงเชื้อที่มีแต่วุ้นธรรมดา 1.5 % และบ่มเชื้อไว้ในที่มืด จะเปลี่ยนเป็นสเคลอโรเตียมในเวลา 3 วัน (Hosoda, 1981) อาจจะเหนี่ยวนำให้เกิดสเคลอโรเตียม โดยใช้วิธีง่าย ๆ คือ เปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อให้ค่อย ๆ แห้งลง (Sobels และ Cohen, 1953)

สเคลอโรเตียมนี้ ถ้าเก็บไว้ในสภาพที่เหมาะสมอาจจะเก็บได้ 1-3 ปี และสามารถกระตุ้นให้กลับมาเป็นพลาสโมเดียมได้อีก เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม (Martin และ Alexopoulos, 1969)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved