บทที่ 1

บทนำ

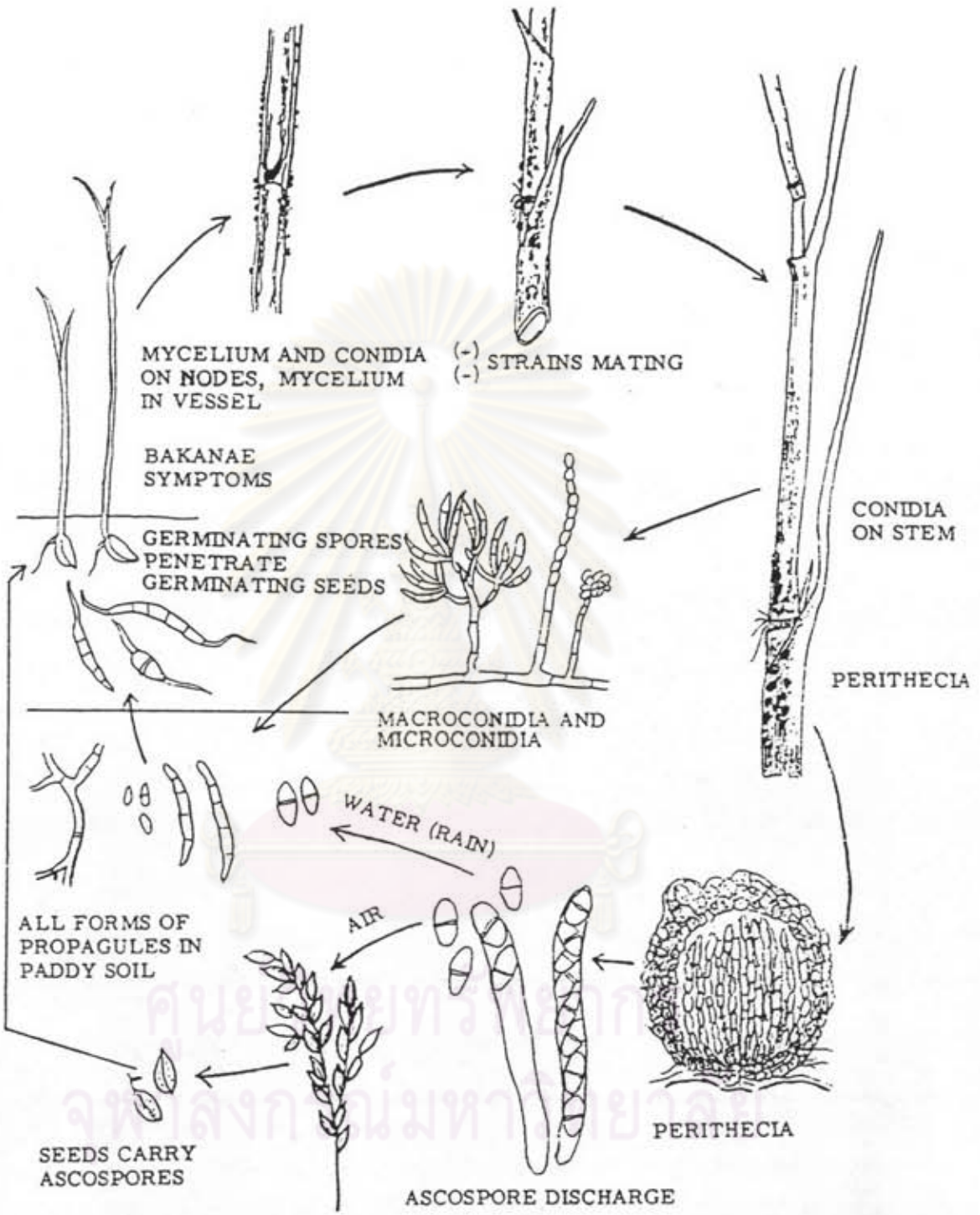
1.1 ประวัติความเป็นมา

Gibberella fujikuroi เป็นเชื้อราที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตจิบเบอเรลลิน (Gibberellin) ซึ่งเป็นกลุ่มของฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับพืชโดยมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช แต่ก่อนที่จะมีการนำเชื้อรา *G. fujikuroi* มาใช้ในการผลิตจิบเบอเรลลินจนถึงขั้นอุตสาหกรรมดังเช่นในปัจจุบันนั้น เชื้อราชนิดนี้ได้ก่อให้เกิดโรคระบาดในข้าวที่ประเทศญี่ปุ่น สร้างความเดือดร้อนอย่างมากแก่ชาวนาสืบเนื่องมาเป็นระยะเวลานานแล้ว โดยได้พบรายงานครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1828 และเวลาต่อมา ในปี ค.ศ.1898 Konishi ชาวนาญี่ปุ่น ได้เล่าถึงลักษณะอาการโดยทั่วไปของข้าวที่เป็นโรคนี้ไว้ในหนังสือด้านการเกษตรที่ตีพิมพ์ในสมัยนั้นว่า ลำต้นข้าวมีลักษณะสูงผอมเรียวและเหลืองซีด กาบใบและใบยาวแคบ รวงมีเมล็ดเพียงเล็กน้อยจนถึงไม่มีเลย ส่วนรากเจริญและแตกแขนงน้อยลง และในกรณีที่เป็นมากอาจตายได้ ซึ่งชาวนาญี่ปุ่นได้เรียกชื่อของโรคนี้แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น ได้แก่ บาคานี (Bakanae), อะโฮนี (Ahoine) และ ยูเรอิ (Yurei) เป็นต้น (Stowe and Yamaki, 1957) นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นจากหลายสาขาวิชาต่างก็ได้พยายามค้นคว้าวิจัยหาสาเหตุของโรคนี้ตลอดมา จนกระทั่ง Hori ได้พบว่า ต้นข้าวที่เป็นโรคนี้มีเส้นใยของเชื้อราเป็นจำนวนมากแทงเข้าไปในเนื้อเยื่อของลำต้น และต้นข้าวปกติสามารถถูกชักนำให้เกิดโรคได้โดยปลูกเชื้อราที่นำมาจากต้นที่เป็นโรค นอกจากนี้ ยังวินิจฉัยว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคบาคานี คือ

Fusarium heterosporum Nees. (Hori, 1898 cited by Takahashi, Phinney, and MacMillan, 1991) ซึ่งทำให้เกิดข้อโต้แย้งในหมู่นักอนุกรมวิธานเชื้อรา หลังจากนั้นในปี ค.ศ.1912 Sawada พบว่า เส้นใยของเชื้อราเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอาการของโรค (Sawada, 1912 cited by Krishnamoorthy, 1975) อย่างไรก็ตาม ในเวลาต่อมา Fujikuro ได้รายงานว่า เชื้อราสาเหตุของโรคมีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดย Sawada ได้ให้รายละเอียดเกี่ยวกับตัวเชื้อ และตั้งชื่อเชื้อในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศว่า *Lisea fujikuroi* (Saw.) (Sawada, 1917 cited by Ou, 1985) ต่อมาในปี ค.ศ.1926 Kurosawa นักโรคพืช ได้พบว่า อาหารแข็งหรืออาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ซึ่งกรองและฆ่าเชื้อแล้ว สามารถชักนำให้เมล็ดหรือต้นกล้าของข้าวปกติพัฒนาขึ้นเป็นต้นที่เป็นโรคได้ โดยเรียกสารที่เชื้อราผลิตขึ้นแล้วขับออกมานั้นว่า ทอกซิน (toxin) (Kurosawa, 1926 cited by Takahashi *et al.*, 1991) หลังจากนั้นในปี ค.ศ.1931 ขณะที่นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่กำลังให้ความสนใจกับทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้น Wollenweber ได้จัดจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อราสาเหตุของโรคนี้ใหม่ เนื่องจากพบว่าเกิดการซ้ำซ้อน โดยจัดให้ *L. fujikuroi* (Saw.) อยู่ในสกุล Gibberella ดังนั้น เชื้อรานี้จึงถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *G. fujikuroi* (Saw.) Wr. และมีชื่อว่า *Fusarium moniliforme* Sheld. เมื่อสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Wollenweber, 1931 cited by Booth, 1971) ซึ่งจากการวินิจฉัยและจัดจำแนกหมวดหมู่อย่างถูกต้อง ทำให้ทราบข้อมูลบางประการเพิ่มเติมจากที่มีผู้เคยศึกษาไว้ มีผลให้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อรานี้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่น วงจรการเกิดโรคบากานีที่ประกอบด้วยระยะการสืบพันธุ์ 2 แบบ ดังแสดงในภาพที่ 1 เป็นต้น ต่อมาในปี ค.ศ.1935 Yabuta นักเคมี ซึ่งเชี่ยวชาญในการแยกสกัดสาร และมีความสนใจในการแยกสกัดทอกซินที่เชื้อรานี้สร้างขึ้น สามารถแยกสารที่ทำให้เกิดอาการของโรคออกจากเชื้อและทำให้อยู่ในรูปของสารบริสุทธิ์ได้สำเร็จ โดยเรียกสารนี้ว่า จิบเบอเรลลิน เพื่อให้สอดคล้องกับชื่อสกุลของเชื้อรา (Yabuta, 1935 cited by Stowe and Yamaki,

1957) อย่างไรก็ดี แม้สามารถผลิตจิบเบอเรลลินในระดับห้องปฏิบัติการได้สำเร็จ แต่การค้นคว้าวิจัยเพื่อขยายการผลิตให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นไปอย่างยากลำบาก เนื่องจากช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่เกิดสงครามโลกครั้งที่ 2 และถึงแม้ว่าสงครามได้สิ้นสุดลงและผ่านพ้นไปหลายปีแล้วก็ตาม แต่ด้วยเหตุที่เศรษฐกิจของประเทศในฐานะผู้พ่ายแพ้สงครามอยู่ในสภาพตกต่ำมาก ทำให้พัฒนาการของการผลิตฮอร์โมนชนิดนี้ในญี่ปุ่นดำเนินไปอย่างช้าๆ และไม่ค่อยมีความก้าวหน้ามากนัก จนกระทั่งถึงปี ค.ศ.1950 นักวิทยาศาสตร์ชาวตะวันตกได้ทราบถึงการค้นพบจิบเบอเรลลินในญี่ปุ่น จึงเริ่มศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการผลิตฮอร์โมนชนิดนี้กันอย่างจริงจัง ซึ่งในเวลาต่อมา Sumiki ผู้ที่ทำงานวิจัยร่วมกับ Yabuta ได้มีโอกาสเดินทางไปดูงานที่ USDA Northern Regional Research Laboratories, สหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ.1951 และที่ Akers Research Laboratories of Imperial Chemical Industries, อังกฤษ ในปี ค.ศ.1953 ทำให้ทราบว่า ความก้าวหน้าในการผลิตจิบเบอเรลลินของชาวต่างชาติล้ำหน้ากว่าของญี่ปุ่นมาก โดยขณะนั้น กำลังวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตจิบเบอเรลลินขนาดใหญ่ทั้งทางด้านเคมีและชีวภาพให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Takahashi *et al.*, 1955 cited by Takahashi *et al.*, 1991) และหลังจากนั้นอีกไม่นาน Stodola เจ้าหน้าที่ของกระทรวงเกษตรสหรัฐฯ และคณะ ก็สามารถพัฒนากระบวนการผลิตจิบเบอเรลลินขนาดใหญ่ได้สำเร็จ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการผลิตเชิงการค้าดังเช่นในปัจจุบัน (Stodola *et al.*, 1955)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 วงชีวิตและการเกิดโรคบากานีของข้าวโดยเชื้อรา *G. fujikuroi* (Sun, 1975 cited by Ou, 1985)

1.2 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา

เชื้อรา *Gibberella fujikuroi* สามารถสืบพันธุ์ได้ 2 แบบ คือ

ก. <u>แบบอาศัยเพศ</u> (perfect state) เมื่อเชื้อราสืบพันธุ์โดยวิธีนี้ ถูกจัดอยู่ใน

Division Eumycota

Subdivision Ascomycotina

Class Euascomycetes หรือ Pyrenomycetes

Order Sphaeriales

Family Hypocreaceae

เชื้อราจะสร้างเพอริธิเชียม (perithecium) บนผิวหน้า (superficial) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีรูปร่างกลม (globose) ถึง รูปกรวย (conical) สีน้ำเงินเข้ม ผิวนอกหยาบ ขนาดโดยเฉลี่ย คือ สูงเท่ากับ 250-350 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 220-300 ไมครอน ภายในเพอริธิเชียม มีแอสคัส (ascus) ที่เป็นรูปไข่ (ellipsoid) ถึง รูปกระบอง (clavate) ซึ่งบรรจุแอสโคสปอร์ (ascospore) จำนวน 4-8 สปอร์ แต่ละแอสโคสปอร์มีลักษณะเป็น รูปไข่ ไม่มีสี มีผนังกั้น (suptum) จำนวน 1-3 อัน ขนาดของแอสโคสปอร์โดยทั่วไป คือ มีความยาวเท่ากับ 14-18 ไมครอน มีความกว้างเท่ากับ 4.5-6 ไมครอน

ข. <u>แบบไม่อาศัยเพศ</u> (imperfect state) เมื่อเชื้อราสืบพันธุ์โดยวิธีนี้ ถูกจัดอยู่ใน

Division Eumycota

Subdivision Ascomycotina

Class Hyphomycetes

Order Tuberculariales

Family Tuberculariaceae

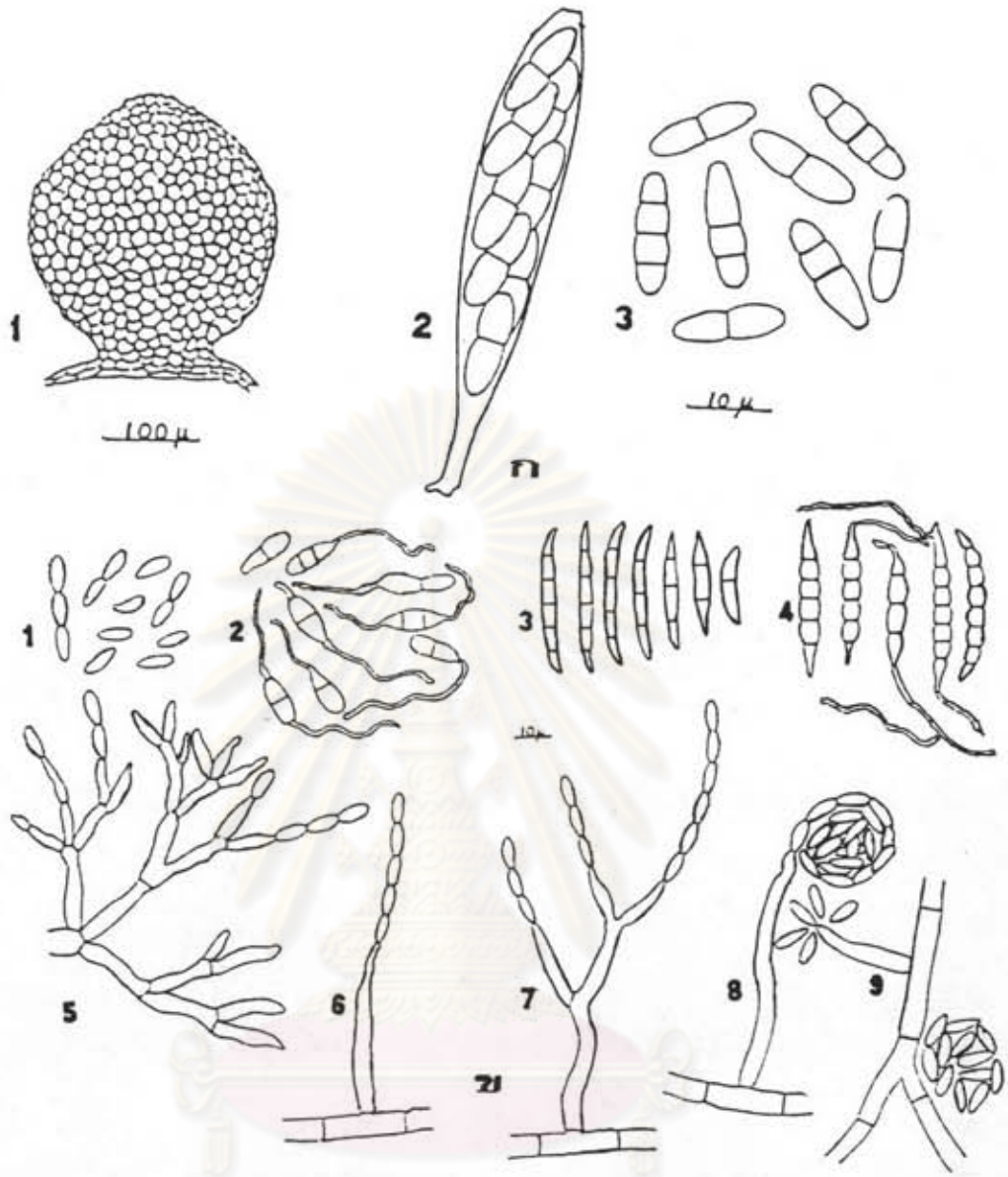
เชื้อราจะสร้างโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) แบบแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง ที่ผลิตโมโนไฟอะไลด์ (monophialide) ซึ่งทำหน้าที่สร้างโคนิเดียม (conidium) โดยเชื้อราอาจสร้างโคนิเดียมชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือทั้งสองชนิด ดังนี้

ไมโครโคนิเดียม (microconidium) สร้างบนเส้นใยที่ชูขึ้นสู่อากาศ (aerial mycelium) มีรูปร่างโค้งเรียว (fusiform) ถึง รูปกระบอง ขนาดโดยทั่วไป คือ มีความยาวเท่ากับ 5-12 ไมครอน มีความกว้างเท่ากับ 1.5-2.5 ไมครอน บางครั้งอาจมีผนังกั้น 1 อัน เกิดในลักษณะต่อกันเป็นสายโซ่ (chain) หรือเกิดเป็นกลุ่ม (false head)

แมคโครโคนิเดียม (macroconidium) สร้างบนเส้นใยที่ชูขึ้นสู่อากาศ หรือ สร้างบนสปอโรโดเชียม (sporodochium) มีรูปร่างโค้งเรียวยาวคล้ายเคียว (sickle-shaped) โดยด้านหลัง (dorsal) และ ด้านท้อง (ventral) ขนานกัน เซลล์บนสุด (apical cell) โค้งแหลม เซลล์ล่างสุด (basal cell) งอคล้ายเท้า (foot-shaped) ผนังเซลล์บาง และ ไม่มีสี ขนาดโดยทั่วไป คือ มีความยาวเท่ากับ 25-36 ไมครอน มีความกว้างเท่ากับ 2.5-3.5 ไมครอน มีผนังกั้นจำนวน 3-7 อัน

ไม่พบการสร้างแคลมไมโดสปอร์ (chlamydospore) ทั้งชนิดที่สร้างในเส้นใยและในโคนิเดียม (Booth, 1971; Messiaen and Cassini, 1981)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *G. fujikuroi*

ก. เพอริธิเชียม (1), แอสคัส (2) และ แอสโคสปอร์ (3)

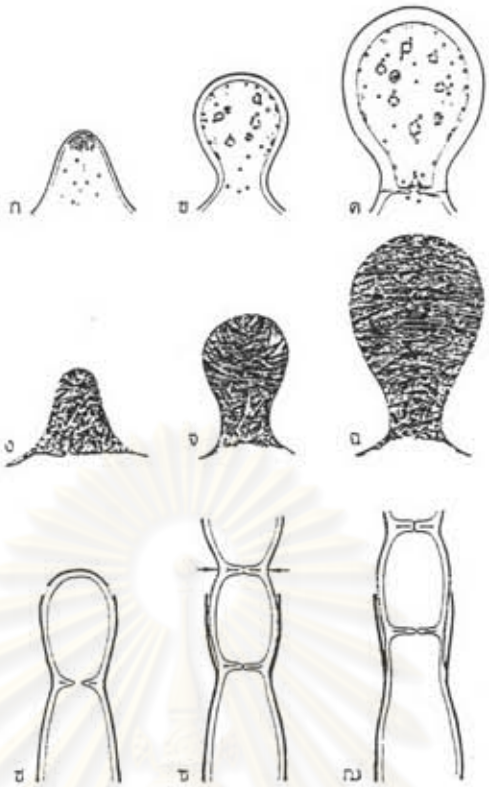
ข. ไมโครโคนิเดีย (1), ไมโครโคนิเดียที่กำลังงอก (2), แมคโครโคนิเดีย (3), แมคโครโคนิเดียที่กำลังงอก (4), โคนิดิโอฟอร์แบบแตกแขนง และแบบไม่แตกแขนง (5), ลักษณะการสร้างไมโครโคนิเดียแบบต่อกันเป็นสายโซ่ (6-7) และแบบเกิดเป็นกลุ่ม (8-9) (Voorhees, 1933)

1.3 การสร้างสปอร์ (sporulation)

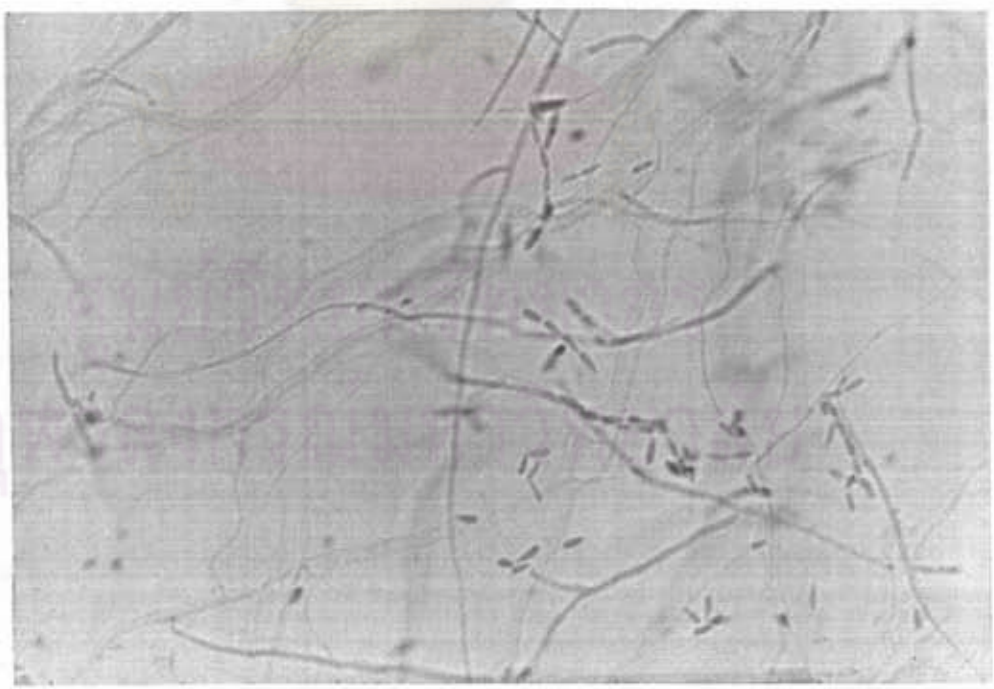
แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1.3.1 การสร้างโคนิเดียม

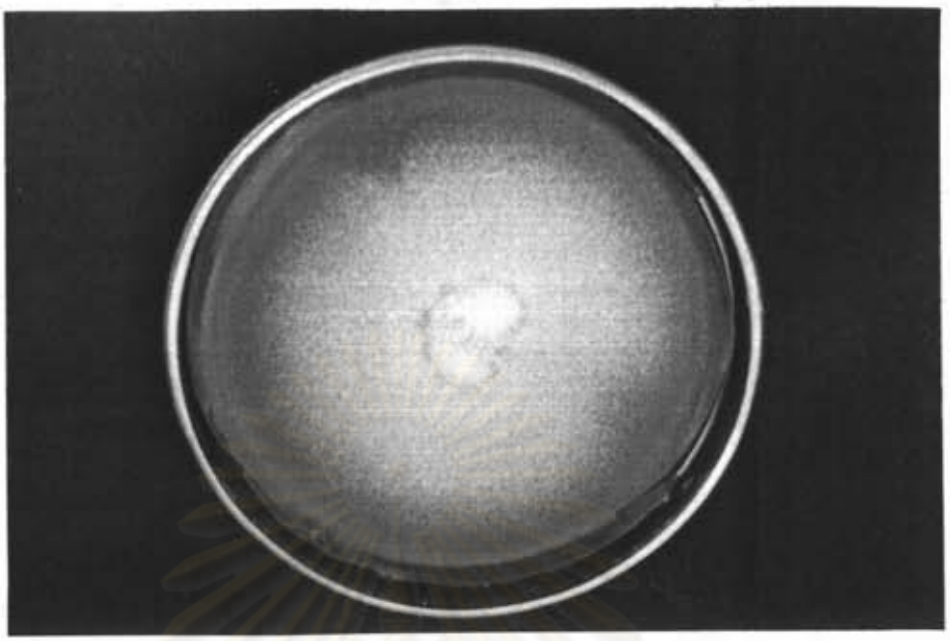
การสร้างไมโครโคนิเดียมของเชื้อรา *G. fujikuroi* เป็นแบบเอนเทอโรบลาสติก (enteroblastic) ที่มีพัฒนาการแบบไฟอะลิดิก (phialidic development) คือ เป็นการสร้างโคนิเดียมที่การเจริญเติบโตและพัฒนาการของโคนิเดียมเกิดขึ้นพร้อมๆกัน โดยผนังชั้นนอกของเซลล์ซึ่งทำหน้าที่สร้างโคนิเดียม หรือ โคนิดิโอจีนัส เซลล์ (conidiogenous cell) ไม่ได้มีส่วนรวมในการสร้างผนังโคนิเดียม (Kendrick, 1971) กระบวนการดังกล่าวเริ่มจาก มีการรวมกลุ่มของถุงขนาดเล็กและใหญ่ ซึ่งสันนิษฐานว่าบรรจุเอนไซม์และหน่วยย่อยสำหรับสร้างผนังเซลล์ ที่จุดเริ่มต้นของการสร้างโคนิเดียม (conidium initial) บริเวณปลายไฟอะไลด์ (ภาพที่ 3,ก) ต่อมา ถุงเหล่านี้มีการแพร่กระจายพร้อมกับเกิดการอ่อนและพองตัวคล้ายบอลลูนของผนังเซลล์บริเวณดังกล่าว (ภาพที่ 3,ข) หลังจากนั้นผนังเซลล์ชั้นในเริ่มก่อตัวหนาขึ้น และมีการเคลื่อนย้าย 1 นิวเคลียสหรือมากกว่า เข้าไปในส่วนที่จะกลายเป็นโคนิเดียมพร้อมกับสร้างผนังกั้น (ภาพที่ 3,ค) รูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างพัฒนาการของโคนิเดียมนั้นเกิดจากการจัดเรียงตัวของส่วนประกอบรอดเลท (rodlet) ของผนังเซลล์ชั้นใน (ภาพที่ 3,ง-ฉ) และเมื่อสร้างโคนิเดียมเสร็จก็จะดันผนังเซลล์ชั้นนอกของไฟอะไลด์ให้แยกจากกันเป็นช่องออกมา (ภาพที่ 3,ช) โดยแต่ละโคนิเดียมไม่หลุดออกจากกัน เนื่องจากผนังเซลล์ชั้นในบริเวณรอยต่อของผนังกั้น มีความหนาพอที่จะช่วยยึดเอาไว้ นอกจากนี้ ยังมีผนังเซลล์ชั้นนอกของโคนิเดียมซึ่งเป็นเยื่อบางๆช่วยห่อหุ้มไว้อีกชั้นหนึ่ง (ลูกศรในภาพที่ 3,ช) ทำให้คงลักษณะเป็นสายไว้ได้ดังในภาพที่ 3,ฌ (Cole and Kendrick, 1981; Garraway and Evans, 1984) และ ภาพที่ 4 โดยทั่วไปแล้ว เชื้อรา *G. fujikuroi* ที่ผลิตไมโครโคนิเดียมาก มักสร้างโคโลนีที่มีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 5,ก ซึ่งแตกต่างจากลักษณะโคโลนีในภาพที่ 5,ข ที่เชื้อราสร้างทั้งเส้นใยและไมโครโคนิเดียน้อย



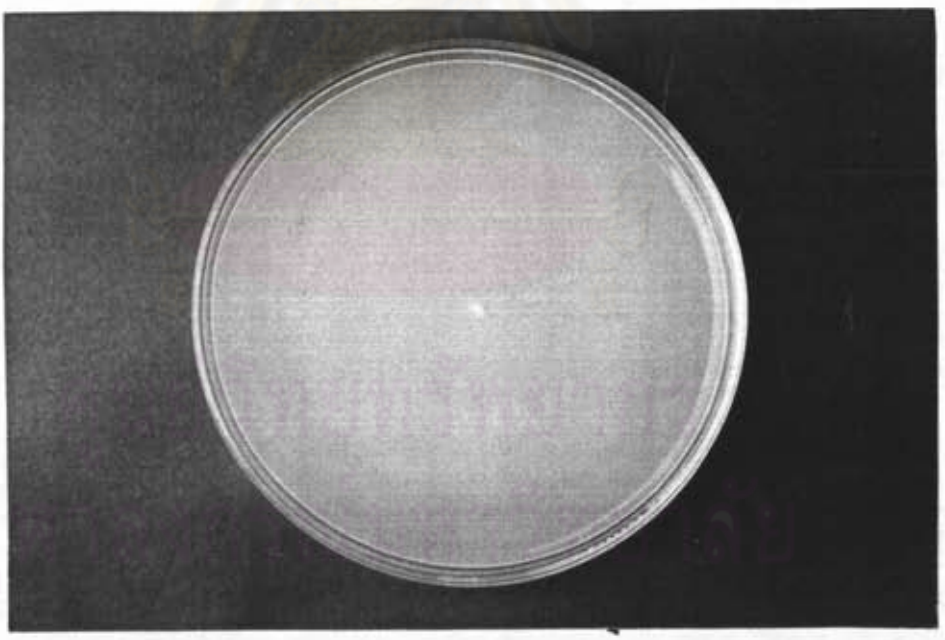
ภาพที่ 3 การสร้างโคนิเดียมแบบเอนเทอโรบลาสติก ที่มีพัฒนาการแบบไฟอะลิดิกของเชื้อรา *G. fujikuroi* (Cole and Kendrick,1981;Garraway and Evans,1984)



ภาพที่ 4 การสร้างไมโครโคนีเดียที่มีลักษณะต่อกันเป็นสายโซ่ของเชื้อรา *G. fujikuroi* (x100)



ก



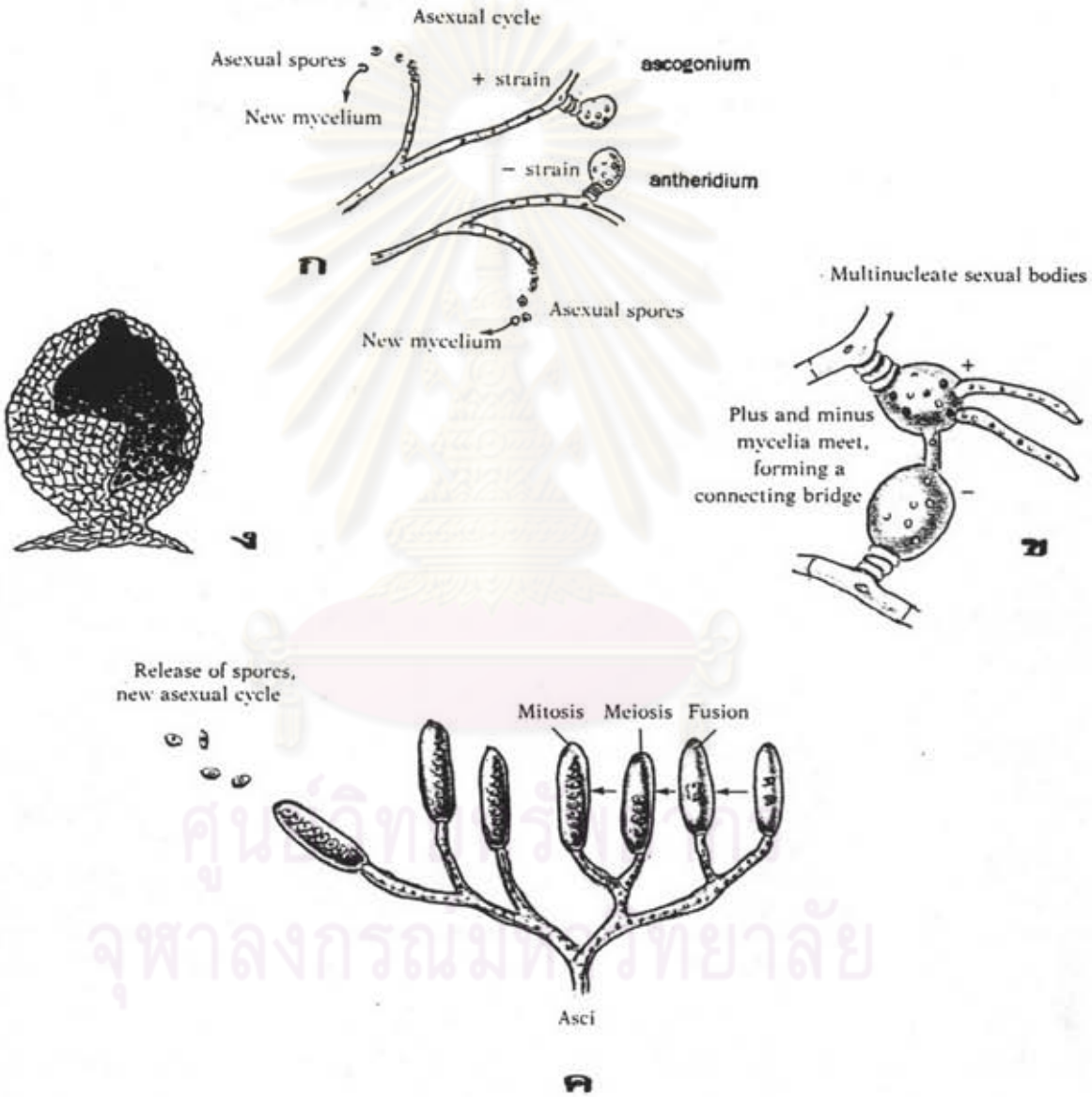
ข

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *G. fujikuroi* ที่มีการสร้างไมโครโคนิเดีย จำนวนมาก (ก) และ จำนวนน้อย (ข)

1.3.2 <u>การสร้างแอสโคสปอร์</u>

จากข้อสันนิษฐานของ Ito และ Kurosawa (Ou, 1985) ที่ว่า เชื้อรา *G. fujikuroi* เป็นเฮทเทอโรทาลิก ฟังไจ (heterothallic fungi) คือ ผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียซึ่งสามารถเข้าคู่กันได้บนทัลลัส (thallus) ที่จำเพาะนั้น ได้รับการยืนยันจากผลการทดลองของ Snyder และ Sun (1973) ในสหรัฐอเมริกา และของ Chang และ Sun (1975) ในไต้หวัน ซึ่งสามารถผลิตเพอริธีเซียมจากการผสมระหว่าง 2 แอสโคสปอร์ที่ต่างคู่ผสมพันธุ์ (mating type) กัน และเข้าคู่กันได้ หรือมีกลุ่มผสมพันธุ์ (mating group) เดียวกัน โดยนำมาจากพืชอาศัยเดียวกันหรือต่างชนิดกัน (Snyder and Sun, 1973; Chang and Sun, 1975 cited by Ou, 1985) ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นการเลียนแบบกระบวนการที่เกิดขึ้นในธรรมชาติที่มีขั้นตอนโดยทั่วไปดังนี้ คือ เริ่มจากการที่แอสโคสปอร์ต่างคู่ผสมพันธุ์กัน งอกให้เส้นใยชนิด + และ - เมื่อสภาวะภายในของเชื้อราและสภาพแวดล้อมภายนอกมีความเหมาะสม แขนงหนึ่งของเส้นใยชนิด + จะพองตัวออก มีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสจำนวนมากเข้าไปสะสมในส่วนที่พองตัวออกนั้น เรียกโครงสร้างนี้ว่า แอสโคโกเนียม (ascogonium) ในขณะเดียวกัน แขนงหนึ่งของเส้นใยชนิด - มีการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกันแต่โครงสร้างที่ได้มีขนาดเล็กกว่า เรียกว่า แอนเทอริเดียม (antheridium) (ภาพที่ 6,ก) เมื่อโครงสร้างทั้งสองนี้มีโอกาสสัมผัสกัน นิวเคลียสของแอนเทอริเดียมจะเคลื่อนย้ายเข้าไปจับคู่กับนิวเคลียสของแอสโคโกเนียม ต่อมา นิวเคลียสจากแอสโคโกเนียมจะเคลื่อนย้ายเข้าไปอยู่ใน แอสโคจีนัส ไฮฟา (ascogenous hypha) ภายในประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสจากแอนเทอริเดียมและแอสโคโกเนียม (dikaryotic) ซึ่งทำหน้าที่เหมือนเซลล์ดิปพลอยด์ทุกประการ (ภาพที่ 6,ข) ต่อมา นิวเคลียสของเซลล์ที่อยู่ถัดจากเซลล์ปลายสุดมีการรวมตัวกันเป็นนิวเคลียสเดียว เรียกว่า ดิปพลอยด์ไซโกต (diploidzygote) ซึ่งจะแบ่งตัวแบบไมโอซีส ทำให้ได้ 4 นิวเคลียส และแบ่งแบบไมโตซีส ทำให้ได้ 8 นิวเคลียส เรียงกันอยู่ในแถวเดียว หลังจากนั้น ไซโตปลาสซึมที่อยู่รอบๆ จะสร้างผนังหุ้มนิวเคลียสแฮปพลอยด์ทั้ง 8 นั้น เกิดเป็นแอสโคสปอร์อยู่ภายในถุงที่เรียกว่า

แอสคัส (ภาพที่ 6,ค) ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดียว (monokaryotic) ประกอบกันขึ้นเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์ เรียกว่า เพอริธิเซียม ซึ่งมีช่องเปิดอยู่ส่วนบนสำหรับใช้เป็นทางออกของแอสโคสปอร์ที่เจริญเต็มที่แล้ว (ภาพที่ 6,ง)



ภาพที่ 6 การสร้างแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* (Wallace, King, and Senders, 1988)

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์

โดยทั่วไปการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* เกิดขึ้นเมื่อมีความเหมาะสมของ 2 สภาวะ คือ สภาวะภายใน ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรม, แบบแผนทางชีวเคมี และ พัฒนาการระดับเซลล์ ตลอดจนอิทธิพลและปฏิกริยาระหว่างเซลล์ เป็นต้น ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวที่มีความละเอียดและซับซ้อนมาก การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการสร้างสปอร์ส่วนใหญ่ มักมองข้ามสภาวะประเภทนี้ไป หรืออาจเป็นการยากที่จะศึกษา ส่วนอีกสภาวะหนึ่ง คือ สภาวะภายนอก ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิ, แสงสว่าง ฯลฯ. ซึ่งแต่ละปัจจัยล้วนแต่สำคัญทั้งสิ้น โดยต้องมีความเหมาะสมและสมดุลซึ่งกันและกัน จึงจะสามารถส่งผลในทางกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะภายใน และนำไปสู่การสร้างสปอร์ได้ในที่สุด จากการที่ทั้งสองสภาวะมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน จึงเป็นการยากที่จะอธิบายว่า การที่เชื้อรา *G. fujikuroi* บางสายพันธุ์สร้างสปอร์น้อยจนแทบไม่สร้างเลยนั้น เกิดจากสาเหตุของความไม่เหมาะสมของสภาวะใด ถึงแม้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้อยู่บ้าง แต่ก็ไม่สามารถใช้สภาวะที่เหมาะสมชุดใดเป็นหลัก ในการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะภายนอก ซึ่งอาจให้ข้อสรุป หรือ สมมติฐานที่สามารถใช้เป็นแนวทางนำไปสู่การค้นคว้าวิจัยถึงสภาวะภายใน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างสปอร์อันละเอียดลึกซึ้งของเชื้อราชนิดนี้ต่อไป (Moor-Landecker, 1990)

จากการตรวจเอกสารเกี่ยวกับสภาวะภายนอกที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* หรือเชื้อราชนิดอื่นที่อยู่ในสกุลเดียวกัน พบว่า มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีส่วนสำคัญที่อาจช่วยส่งเสริมทางด้านการสร้างเส้นใย หรือการสร้างสปอร์ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิดและปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นๆว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ สารอาหารชนิดเดียวกันอาจส่งเสริมการ

สร้างสปอร์เมื่อใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหนึ่ง แต่กลับให้ผลในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารอาหารที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุหลักที่ใช้ในการดำรงชีพ จะต้องเป็นชนิดที่มีความพอเหมาะและมีสัดส่วนที่สมดุลซึ่งกันและกัน อย่างไรก็ดีในบางครั้ง พบว่าการสร้างสปอร์เกิดขึ้นได้ดีเมื่อได้รับการกระตุ้นจาก วิตามิน, เกลือแร่ หรือ ฮอร์โมน ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ให้ระดับเหมาะสม ยังมีส่วนช่วยให้การนำสารอาหารต่างๆที่จำเป็นในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้ในกระบวนการสร้างสปอร์ของเชื้อราเกิดได้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย สำหรับปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ, แสงสว่าง, อากาศ, ความชื้น ฯลฯ. ต่างก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน โดยเชื้อราต่างสายพันธุ์ หรือต่างแบบของการสืบพันธุ์ ย่อมต้องการปัจจัยเหล่านี้สำหรับใช้ในการสร้างสปอร์ที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่มักต้องการความจำเพาะมาก โดยปัจจัยเหล่านี้ได้มีผู้ทำการค้นคว้าวิจัยถึงผลที่มีต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราไว้มากมายตั้งแต่ปี ค.ศ.1933-1989 และรายงานสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อราแต่ละชนิดไว้ดังแสดงในตารางที่ 1-12 โดยผลการวิจัยส่วนใหญ่ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่แท้จริงในการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของแต่ละปัจจัยได้ ยกตัวอย่าง เช่น ไม่อาจสรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆที่แต่ละงานวิจัยอ้างว่าสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ได้มากนั้น มีประสิทธิภาพดีกว่ากันเพียงใด เนื่องจากแต่ละงานวิจัยใช้สภาวะหรือปัจจัยอื่นๆในการทดลองที่แตกต่างกันด้วยเหตุนี้ ในการพิจารณาผลการวิจัยข้างต้นเพื่อนำไปใช้ประกอบการกำหนดขอบเขตของงานวิจัยนี้ จึงต้องอาศัยหลักเกณฑ์อื่นๆ ซึ่งจะกล่าวถึงในบทที่ 3 ต่อไป

ตารางที่ 1 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เอกสารอ้างอิง
G. baccata	- มอลท์ อาการ์ (Malt Agar) - ชาเปก ดอก อาการ์ เติมสารสกัดจาก *Celosia argentea* L. (Czapek's Dox Agar with *Celosia argentea* L. extract)	(Afanide, Mabadeje and Naqvi, 1976)
G. moniliformis	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ (Potato Dextrose Agar) - ไรซ์ อาการ์ (Rice Agar) - โอตมีล อาการ์ (Oatmeal Agar) - คอร์นมีล อาการ์ (Cornmeal Agar) - ลิมา บีน อาการ์ (Lima Bean Agar)	(Voorhees,1933)
G. fujikuroi	- ซัค อาการ์ เติมฟางข้าว (Sach's Agar with Rice Straw)	(Snyder and Sun, 1973 and Chang and Sun, 1975 cited by Ou, 1985)
G. fujikuroi v. *fujikuroi*	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - ดิฟโก โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ (Difco Potato Dextrose Agar) - ซัค อาการ์ เติมฟางข้าวสาลี (Sach's Agar with Wheat Straw)	(Kuhlman, 1982)
G. zeae	- ซีเอ็มซี มีเดียม (CMC Medium) - อะซีเตต มีเดียม (Acetate Medium) - คาร์เนชัน ลีฟ อาการ์ (Carnation Leaf Agar) - ฮัล บาร์เลย์ เกรน มีเดียม (Hull Barley Grain Medium) - โมดิฟายด์ เปปโตน อาการ์ (Modified Peptone Agar)	(Cappellini and Peterson, 1965) (Cappellini and Peterson, 1969) (Tschanz, Horst, and Nelson, 1975) (Saito and Hori, 1985)
F. anthophilum	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์	(Marasas *et al.*, 1986)
F. lateritium	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - คอร์นมีล อาการ์	(Massie and Peterson, 1968) (Afanide *et al.*, 1976)
F. moniliforme	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - ริชาร์ด มีเดียม (Richard's Medium) - ซัค อาการ์ เติมฟางข้าว (Sach's Agar with Rice Straw) - โตชิโน อาการ์ (Toshinai Agar) - กลูโคส คาซามิโน แอซิด อาการ์ (Glucose Casamino Acid Agar) - ไรซ์ สตรอว์-ซอยบีน มีล อาการ์ (Rice Straw-Soybean Meal Agar) - ไรซ์ สตรอว์ คาซามิโน แอซิด อาการ์ (Rice Straw Casamino Acid Agar)	(Singh and Wood, 1956; Goth and Johnston, 1961; Burgess and Liddell, 1983) (Jaurihar and Mehta, 1972) (Yu and Sun, 1978 cited by Ou, 1985)

ตารางที่ 1 (ต่อ) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เอกสารอ้างอิง
F. moniliforme	- คอร์นมีล อาการ์ - โมดิฟายด์ คอร์นมีล อาการ์ (Modified Cornmeal Agar) - วอเตอร์ อาการ์ (Water Agar) - วอเตอร์ อาการ์ เติมเมล็ดธัญพืช (Water Agar with Cereal Grain) - แอซิด โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ (Acid Potato Dextrose Agar) - คาร์เนชัน ลีฟ อาการ์	(Goth and Johnston, 1981) (Marasas *et al.*, 1986)
F. moniliforme v.*subglutinans*	- ลิมา บีน อาการ์ - อาร์มสตรอง ฟิวซาเรียม มีเดียม (Armstrong's Fusarium Medium) - โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์	(Ullstrup, 1936) (Mitra and Lele, 1981) (Burgess and Liddell, 1983)
F. moniliforme mating type gr. A, B C	- วี 8 จุช อาการ์ (V8 Juice Agar) - ซัค อาการ์ เติมฟางข้าว, ใบกล้วยหรือใบแครอทแห้ง (Sach's Agar with Rice Straw, Dried Banana or Carrot Leave) - โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ เติมฟางข้าว (Potato Dextrose Agar with Rice Straw)	(Hsieh, Smith, and Snyder, 1977)
F. moniliforme isolate NRRL 6022 NRRL 6322	- คาร์เนชัน ลีฟ อาการ์ - โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - โปแตสเซียม คลอไรด์ มีเดียม	(Marasas, Nelson, and Toussoun, 1988)
F. nival	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์	(Sanderson, 1970)
F. roseum isolate Avenaceum Culmorum Graminearum	- คาร์เนชัน ลีฟ อาการ์ - โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์	(Sung and Cook, 1981)
F. solani	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - โปเตโต ซูโครส อาการ์ - มอลท์ เอ็กซ์แทรค อาการ์ (Malt extract Agar)	(Smith and Onions, 1983)
F. solani f.sp. *phasioli*	- โอตมีล อาการ์ - ชาเปก ดอก อาการ์ - แทปวอเตอร์ อาการ์ เติมข้าว (Tapwater Agar with Rice)	(Mussa and Russell, 1977)
F. subglutinans	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - โปแตสเซียม คลอไรด์ มีเดียม	(Marasas *et al.*, 1986)
F. succisae	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - โปแตสเซียม คลอไรด์ มีเดียม	
F. sulphureum	- โปเตโต ซูโครส อาการ์ (Potato Sucrose Agar)	(Barran, 1976; Barran, Schneider, and Seaman, 1977)

ตารางที่ 1 (ต่อ) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เอกสารอ้างอิง
F. oxysporum	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - โปเตโต ซูโครส อาการ์ - มอลท์ เอ็กซ์แทรค อาการ์ - โมดิฟายด์ มอลท์ เอ็กซ์แทรค อาการ์	(Smith and Onions, 1983) (Durand, Vergoignan, and Almanza, 1989)
F. oxysporum f.sp. *cubense*	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์	(Wilson, 1960)
F. proliferatum	- โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - โปแตสเซียม คลอไรด์ มีเดียม	(Marasas *et al.*, 1986)
Fusarium spp.	- วอเตอร์ อาการ์ เติมฟางธัญพืช - โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ - ไบไล มีเดียม โมดิฟายด์ บาย จอฟฟี (Bilai's Medium modified by Joffe) - แทปวอเตอร์ อาการ์ เติมฟางข้าวเจ้าหรือข้าวสาลี หรือลำต้นพืช (Tapwater Agar with Rice Straw, Wheat, Straw or Plant Stem) - คาร์เนชัน ลีฟ อาการ์	(Hansen and Snyder, 1947) (Nash and Snyder, 1962; Joffe, 1974; Fisher *et al.*, 1982) (Joffe, 1963) (Booth, 1971, 1977) (Toussoun and Nelson, 1968, Tio *et al.* ,1977; Fisher *et al.*, 1982)
Fusarium spp. mutant strain	- โปเตโต อาการ์ (Potato Agar) หรือ ซาบูโร อาการ์ ที่มีกลูโคส 2 %	(Imshenetskii and Ul'yanova, 1962)

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร		เอกสารอ้างอิง
	ชนิด	ปริมาณ	
G. zeae	- คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูโลส	0.6 ก. คาร์บอน	(Cappellini and Peterson, 1965)
	- อะซีเตต	0.6 ก. คาร์บอน	(Cappellini and Peterson, 1969; Huang and Cappellini,1981)
	- ซิเตรต	0.6-6.0	(Bonn and Cappellini, 1970)
	- อัลฟา-คีโตกลูตาเลท	ก.คาร์บอน	
	- ฟูมาเรต	0.6 ก. คาร์บอน	(Huang, Dawson and Cappellini,
	- ซัคซิเนท	0.6 ก. คาร์บอน	1979)
F. moniliforme	- ไซโลส		(Yu and Sun, 1978 cited by Ou,1985)
	- แป้ง		(Mitra and Lele, 1981)

ตารางที่ 2 (ต่อ) ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร		เอกสารอ้างอิง
	ชนิด	ปริมาณ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	
F. moniliforme v. *subglutinans*	- ดี-แมนนิตอล		(Chattopadhyay and Nandi, 1961)
	- เพคติน		
	- แป้ง	0.5%	(Mitra and Lele, 1961)
	- กลูโคส	0.5%	
	- แป้ง	2 %	(Bolkan *et al.*, 1982)
	- ฟรุกโตส	2 %	
	- มอลโตส	2 %	
F. solani	- กลูโคส	1 %	(Griffin, 1976)
F. oxysporum	- แมนนิตอล	1 %	(Olutiola, 1978)
	- กาแลคโตส	1 %	
	- อินอสซิตอล	1 %	
	- มอลโตส		(Roy, Mishra, and Sarkar, 1979)
	- ดี-ฟรุกโตส		
	- ดี-ซูโครส		
F. oxysporum f.sp. *cubense*	- กลูโคส	2 ก. คาร์บอน	(Hendrix, Jr., and Toussoun, 1964)

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร		เอกสารอ้างอิง
	ชนิด	ปริมาณ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	
G. zeae	- แอสพาติก แอซิด	0.34 ก. ไนโตรเจน	(Bonn and Cappellini, 1970)
	- ฟีนิลอะลานีน	0.34 ก. ไนโตรเจน	
F. moniliforme v. *subglutinans*	- เปปโตน		(Chattopadhyay and Nandi, 1961)
	- ดีแอล-แอสพาติก แอซิด		
	- แอล-แอสพาราจีน		
	- แอมโมเนียมไนเตรต		(Mitra and Lele, 1961)
	- ดีแอล-วาลีน		
	- แอล-อาลานีน		
	- แอล-กลูตามีน		
	- แอล-อาจีนีน		
F. oxysporum	- แอล-แอสพาราจีน	1 %	(Olutiola, 1978)
	- แอมโมเนียมไนเตรต	1 %	
	- โปแตสเซียมไนเตรต	1 %	
F. oxysporum f.sp. *cubense*	- โปรลีน	1.4 ก. ไนโตรเจน	(Hendrix *et al.*, 1964)

ตารางที่ 4 สัดส่วนระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	สัดส่วนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร		เอกสารอ้างอิง
	ชนิด	ปริมาณ	
F. moniliforme v. *subglutinans*	- ซูโครส	33.60 มก.คาร์บอน	(Prasad, 1979)
	โปแตสเซียมไนเตรต	0.61 มก.ไนโตรเจน	
F. oxysporum	- ซูโครส	33.60 มก.คาร์บอน	(Prasad, 1979)
	โปแตสเซียมไนเตรต	0.30 มก.ไนโตรเจน	
	- ซูโครส	30 มิลลิโมล	(Olutiola, 1978)
	โปแตสเซียมไนเตรต	50 มิลลิโมล	

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของเกลือแร่ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	เกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร		เอกสารอ้างอิง
	ชนิด	ปริมาณ	
F. moniliforme v. *subglutinans*	- โบรอน	0.05-5.0 พีพีเอ็ม	(Mitra and Lele, 1981)
	- คอปเปอร์	0.01 พีพีเอ็ม	
	- แมงกานีส	0.10 พีพีเอ็ม	
F. oxysporum f.sp. *lycopersici* race 2	- เหล็ก	0.13-0.25 พีพีเอ็ม	(Woltz and Jones, 1971)
	- แมงกานีส	1.00-2.00 พีพีเอ็ม	
	- สังกะสี	0.50-1.00 พีพีเอ็ม	

ตารางที่ 6 ชนิดและปริมาณของวิตามินที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	วิตามินในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร		เอกสารอ้างอิง
	ชนิด	ปริมาณ (พีพีเอ็ม)	
F. moniliforme v. *subglutinans*	- ไบโอติน	0.01-1.00	(Chattopadhyay and Nandi, 1981)
	- ไทอามีน	1.0	
	- ไพริดอกซอล ไฮโดรคลอไรด์	0.1-0.5	
	- อินอสซิตอล	0.1-0.5	
	- ไทอามีน	0.1-0.5	(Mitra and Lele, 1981)
	- แอสคอร์บิก แอซิด	0.1-0.5	
	- นิโคตินิก แอซิด	0.1-0.5	
	- ไบโอติน	0.001-0.005	

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาณของฮอร์โมนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	ฮอร์โมนในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร		เอกสารอ้างอิง
	ชนิด	ปริมาณ	
G. zeae	- ซีราเลโนน	0.1-10 นาโนกรัม	(Wolf and Mirocha, 1973)
F. moniliforme v. *subglutinans*	- มาเลอิก ไฮดราซีน - จิบเบอเรลลิก แอซิด	0.01-1.0 พีพีเอ็ม 0.01-1.0 พีพีเอ็ม	(Chattopadhyay and Nandi, 1981)

ตารางที่ 8 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	เอกสารอ้างอิง
G. zeae	6.0 6.0	(Bonn and Cappellini, 1970) (Cappellini and Peterson, 1969; Huang and Cappellini, 1981)
F. acuminatum	5.9	(Neish, 1980)
F. moniliforme	4.0	(Jaurihar and Mehta, 1972)
F. moniliforme v. *subglutinans*	6.0 6.8	(Prasad, 1979; Mitra and Lele, 1981) (Chattopadhyay and Nandi, 1981)
F. solani *F. solani* f.sp. *phasioli*	4.0 6.6	(Griffin, 1976) (Hendrix *et al.*, 1964)
F. oxysporum	5.0 7.5 7.0	(Durand *et al.*, 1989) (Olutiola, 1978) (Roy *et al.*, 1979)
F. oxysporum f.sp. *lycopersici* race II	6.5	(Woltz and Jones, 1971)
F. oxysporum f.sp. *vasinfectum*	7.0	(El-Abyad and Saleh, 1971)
F. udum	5.5	(Samajpati,1973)

ตารางที่ 9 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	อุณหภูมิ (°ซ.)	เอกสารอ้างอิง
G. baccata	20-25	(Afanide *et al.*, 1976)
G. fujikuroi v. *fujikuroi*	20 24	(Hsieh *et al.*, 1977) (Kuhlman, 1982)
G. zeae	23-25 24 25	(Tschanz *et al.*, 1975; Saito and Hori, 1985) (Cappellini and Peterson, 1965; Cappellini and Peterson, 1969; Bonn and Cappellini, 1970) (Huang *et al.*, 1979; Huang and Cappellini, 1981)
F. acuminatum	20	(Neish, 1980)
F. annulatum	21-23	(Fisher *et al.*, 1983)
F. anthophilum	21-23	(Fisher *et al.*, 1983)

ตารางที่ 9 (ต่อ) อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	อุณหภูมิ (°ซ.)	เอกสารอ้างอิง
F. culmorum	25	(Larmour and Marchant, 1977)
F. lateritium	16	(Massie and Peterson, 1966)
	25	(Afanide *et al.*, 1976)
F. moniliforme	20-25	(Goth and Johnston, 1981)
	21-23	(Fisher *et al.*, 1983)
	22-24	(Nirenberg, 1976 cited by Fisher *et al.*, 1983)
	24	
	25 (กลางวัน) และ 20 (กลางคืน)	(Burgess and Liddell, 1983)
F. moniliforme v. *subglutinans*	20-25	(Goth and Johnston, 1981)
	22-24	(Ullstrup, 1936)
	25	(Bolkan *et al.*, 1982)
F. moniliforme v. *subglutinans*	25 (กลางวัน) และ 20 (กลางคืน)	(Burgess and Liddell, 1983)
	28	(Chattopadhyay and Nandi, 1981)
	29-31	(Mitra and Lele, 1981)
F. moniliforme isolate NRRL 6022 NRRL 6322	20	(Marasas *et al.*, 1988)
F. nivale	20	(Sanderson, 1970)
	21	(Millar and Colhoun, 1969)
F. oxysporum	15-30	(Smith and Onions, 1983)
	28	(Wilson,1960)
	25	(Durand *et al.*, 1969)
	30	(Olutiola, 1978)
F. oxysporum f.sp. *lycopersici* race 2	27.5-28.5	(Woltz and Jones, 1971)
F. oxysporum f.sp. *vasinfectum*	25-30	(El-Abyad and Saleh, 1971)
F. proliferatum	21-23	(Fisher *et al.*, 1983)
F. roseum isolate	20	(Sung and Cook, 1981)
Avenaceum	21-22	(Nelson, White, and Toussoun,1971)
Culmorum	20	(Sung and Cook, 1981)
Graminearum	20	(Sung and Cook, 1981)
F. solani	15-30	(Smith and Onions, 1983)
	27-30	(Griffin, 1976)
F. solani f.sp. *cucurbitae*	28	(Weidemann, 1988)
F. solani f.sp. *phasioli*	18-20	(Mussa and Russell, 1977)
F. sulphureum	25	(Barran *et al.*, 1977)
Fusarium spp.	20-22	(Fisher *et al.*, 1982)
	22-25	(Booth, 1977)
	24	(Booth, 1971; Joffe, 1974)

ตารางที่ 10 แสงสว่างที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	ชนิดแสง, ความส่องสว่างหรือความเข้ม และระยะเวลาของการให้แสงต่อวัน	เอกสารอ้างอิง
G. fujikuroi	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" 1,900 ลักซ์ : ติดตั้งเหนือเชื้อ 36 ซม. ให้แสง 12 ชม./วัน	(Hsieh *et al.*, 1977)
G. fujikuroi v. *fujikuroi*	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" ร่วมกับ "แบล็คไลท์"	(Kuhlman, 1982)
G. zeae	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "นู-ลีด อัลตราลักซ์" 4 หลอด หรือ "วีเอชโอ วอร์มไวท์" 40 วัตต์ ร่วมกับอินแคนเดสเซ็นต์ 25 วัตต์ 350+50 ฟุต-เทียน ให้แสง 12 ชม. /วัน	(Tschanz *et al.*, 1975)
	- ฟลูออเรสเซ็นต์ 2,000 ลักซ์	(Saito and Hori, 1985)
F. annulatum	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" ติดตั้งเหนือเชื้อ 45 ซม. ให้แสง 12 ชม. /วัน	(Fisher *et al.*, 1983)
F. anthophilum	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" ติดตั้งเหนือเชื้อ 45 ซม. ให้แสง 12 ชม. /วัน	(Fisher *et al.*, 1983)
F. heterosporum	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "แบล็คไลท์" ให้แสง 12 ชม./วัน	(Leach, 1982)
F. lateritium	- แสง 2,000 ฟุต-เทียน ให้แสงต่อเนื่อง	(Massie and Peterson, 1968)
	- แสง	(Afanide *et al.*, 1976)
F. moniliforme	- ให้แสงต่อเนื่อง	(Sun and Snyder, 1978 cited by Ou, 1985)
	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" ให้แสงต่อเนื่อง	(Hsieh *et al.*, 1979)
	- แสงธรรมชาติ	(Goth and Johnston, 1981)
	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" ติดตั้งเหนือเชื้อ 45 ซม. ให้แสง 12 ชม. /วัน	(Fisher *et al.*, 1983)
	- ให้แสง 12 ชม. /วัน	(Burgess and Liddell, 1983)
F. moniliforme v. *subglutinans*	- บ่มเชื้อในที่มืด	(Chattopadhyay and Nandi, 1981; Bolkan *et al.*, 1982)
	- ให้แสง 12 ชม./วัน	(Burgess and Liddell, 1983)
F. moniliforme isolate NRRL 6022 NRRL 6322	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" ร่วมกับ "แบล็คไลท์" ให้แสง 12 ชม./วัน	(Marasas *et al.*, 1988)

ตารางที่ 10 (ต่อ) แสงสว่างที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	ชนิดแสง, ความส่องสว่างหรือความเข้ม และระยะเวลาของการให้แสงต่อวัน	เอกสารอ้างอิง
F. nivale	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "แบล็คไลท์" 76 ไมโครวัตต์/ซม.^{2} ให้แสงต่อเนื่อง - ฟลูออเรสเซ็นต์ "แบล็คไลท์" 240ไมโครวัตต์/ซม.^{2} ให้แสง 12 ชม. ตามด้วยบ่มเชื้อในที่มืด 8 ชม./วัน	(Sanderson, 1970)
F. oxysporum	- แสง 3,100 ลักซ์ ให้แสงต่อเนื่อง - ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" 40 วัตต์, 2 หลอด ร่วมกับ "แบล็คไลท์" 40 วัตต์ 1 หลอด ติดตั้งเหนือเชื้อ 32 ซม. ให้แสง 12 ชม./วัน	(Olutiola, 1978) (Smith and Onions, 1983)
F. oxysporum f.sp. *lycopersici* race 2	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" 500 ฟุต-เทียน ให้แสงต่อเนื่อง	(Woltz and Jones, 1971)
F. proliferatum	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" ติดตั้งเหนือเชื้อ 45 ซม. ให้แสง 12 ชม./วัน	(Fisher *et al.*, 1983)
F. roseum isolate Avenaceum Culmorum Graminearum	- ฟลูออเรสเซ็นต์ ร่วมกับ อินแคนเดสเซ็นท์ ให้แสง 12 ชม./วัน	(Sung and Cook, 1981)
F. solani	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" 40 วัตต์ 2 หลอด ร่วมกับ "แบล็คไลท์"40 วัตต์ 1 หลอด ติดตั้งเหนือเชื้อ 32 ซม. ให้แสง 12 ชม./วัน - แสงสว่างในห้องทดลอง	(Smith and Onions, 1983) (Griffin, 1976)
F. solani f.sp. *cucurbitae*	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "คูลไวท์" ให้แสง 12 ชม./วัน	(Weidemann, 1988)
F. solani f.sp. *phaseoli*	- ฟลูออเรสเซ็นต์ "แบล็คไลท์" 2 หลอด ให้แสง 12 ชม./วัน	(Mussa and Russell, 1977)
F. sulphureum	- ฟลูออเรสเซ็นต์ 30 วัตต์ ติดตั้งเหนือเชื้อ 10 ซม. ให้แสงต่อเนื่อง	(Barran, 1976)

ตารางที่ 10 (ต่อ) แสงสว่างที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	ชนิดแสง, ความส่องสว่างหรือความเข้ม และระยะเวลาของการให้แสงต่อวัน	เอกสารอ้างอิง
Fusarium spp.	- ฟลูออเรสเซ็นต์ 'เดย์ไลท์' 2 หลอด ติดตั้งเหนือเชื้อ 10-14 นิ้ว	(Hansen and Snyder, 1947)
	- ฟลูออเรสเซ็นต์ 'คูลไวท์' 21,8520 ลักซ์ ให้แสงต่อเนื่อง	(Massie and Peterson, 1968)
Fusarium spp.	- ฟลูออเรสเซ็นต์ 'คูลไวท์' 40 วัตต์, 2 หลอด ร่วมกับ 'แบล็คไลท์' 40 วัตต์ 1 หลอด ติดตั้งเหนือเชื้อ 14 นิ้ว ให้แสง 12 ชม./วัน	(Booth, 1971)
	- ฟลูออเรสเซ็นต์ 'แบล็คไลท์'	(Nirenberg, 1976)
	- ให้แสง 12 ชม./วัน	(Fisher *et al.*, 1982)

ตารางที่ 11 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	ความชื้นสัมพัทธ์ (%)	เอกสารอ้างอิง
F. lateritium	65-75	(Massie and Peterson, 1968)
F. oxysporum f.sp. *vasinfectum*	100	(El-Abyad and Saleh, 1971)

ตารางที่ 12 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์

เชื้อรา	ระดับการทดลอง	อัตราการให้อากาศ	เอกสารอ้างอิง
G. zeae	- ขวดเขย่า 250 มล.	200 rpm	(Bonn and Cappellini, 1970; Huang *et al.*,1979; Huang and Cappellini; 1981)
	- ขวดเขย่า 250 มล.	250 rpm	(Cappellini and Peterson, 1965)
		240 rpm	(Cappellini and Peterson, 1969)
	- ถังหมัก 5 ล.	400 rpm	(Cappellini and Peterson, 1969; Huang and Cappellini, 1981)
F. culmorum	- ขวดเขย่า 250 มล.	100 rpm	(Larmour and Marchant,1977)
F. solani f.sp. *cucurbitae*	- ขวดเขย่า 500 มล.	250 rpm	(Weidemann, 1988)
F. oxysporum	- ถังหมัก 5 ล.	2 vvm	(Durand, *et al.*, 1989)

1.5 เหตุจูงใจในการทดลอง

จิบเบอเรลลิน เป็นกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่มีประโยชน์มากมาย จึงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นทางด้านเกษตรกรรมหรือในด้านอุตสาหกรรม เป็นผลให้ความต้องการใช้จิบเบอเรลลินภายในประเทศสูงขึ้นเรื่อยๆและไม่มีแนวโน้มว่าจะลดลง โดยจิบเบอเรลลินที่มีขายตามท้องตลาดในปัจจุบันนั้น ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง ก่อให้เกิดภาระแก่เกษตรกรซึ่งมีรายได้น้อย ที่ต้องมีต้นทุนการผลิตสูงแต่ไม่สามารถกำหนดราคาขายผลผลิตเองได้, เป็นภาระแก่ผู้บริโภค ที่ต้องซื้อสินค้ามาบริโภคในราคาแพง เนื่องจากผู้ผลิตบวกต้นทุนการผลิตที่สูงเข้าไปในราคาสินค้า และเป็นภาระของรัฐบาล เพราะการนำเข้าเป็นสาเหตุหนึ่งของการเสียดุลทางการค้าระหว่างประเทศ ด้วยเหตุนี้ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งตระหนักถึงสิ่งเหล่านี้มาโดยตลอด และเล็งเห็นถึงประโยชน์ของการผลิตจิบเบอเรลลินขึ้นใช้เองภายในประเทศ จึงได้เริ่มดำเนินการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการผลิตจิบเบอเรลลินตั้งแต่ปี พ.ศ.2530 เป็นต้นมา ทั้งทางด้านการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่าและในถังหมัก และทางด้านการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* โดยก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ซึ่งสามารถผลิตจิบเบอเรลลินในปริมาณที่สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ในระหว่างขั้นตอนของการเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในถังหมักก็ดี หรือในระหว่างขั้นตอนของการเตรียมสปอร์เพื่อใช้ในการกลายพันธุ์, คัดเลือกพันธุ์ และ เก็บรักษาสายพันธุ์ก็ดี ต่างก็ประสบกับปัญหาของการเตรียมสปอร์ให้ได้ปริมาณเพียงพอที่จะใช้ในการกระบวนการวิจัย โดยต้องเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวนมาก และใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อนาน ทำให้สิ้นเปลืองเวลา, ค่าใช้จ่าย และ แรงงาน ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการทำงานวิจัยตลอดมา จนกระทั่งในปี พ.ศ.2533 อรไท สุขเจริญ ได้รายงานว่า การเติมแร่ธาตุบางชนิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ โปเตโต เด็กซ์โตรส อาการ์ (Potato Dextrose Agar) สามารถช่วยส่งเสริมการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* สายพันธุ์ C ได้ดีกว่าที่ไม่เติม แต่เมื่อจันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) นำสูตรอาหารดังกล่าวไปใช้กับสายพันธุ์อื่นๆที่ได้จากการ

ปรับปรุงสายพันธุ์ C ก็ไม่สามารถแก้ปัญหาการสร้างสปอร์น้อยของสายพันธุ์เหล่านั้นได้ จึงเปลี่ยนไปใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ โมดิฟายด์ เปปโตน อาการ์ (Modified Peptone Agar) (Saito and Hori, 1985) ซึ่งพบว่า ช่วยกระตุ้นการสร้างสปอร์ได้ในบางสายพันธุ์ แต่ยังมีอีกหลายสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ได้น้อยบนอาหารชนิดนี้ จึงทำให้ได้ข้อสังเกตว่า การเปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ใช่วิธีแก้ไขปัญหาอย่างแท้จริง การสร้างสปอร์น้อยอาจเกิดจากอิทธิพลของปัจจัยอื่นที่สำคัญนอกเหนือจากปัจจัยทางด้านอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพ จึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อราในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีความแตกต่างกันไม่มากก็น้อย ทั้งนี้เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสายพันธุ์เหล่านั้นสามารถสร้างสปอร์ได้มากขึ้น ซึ่งจะช่วยลดความยากลำบากในการเตรียมสปอร์ที่เป็นขั้นตอนสำคัญของผลิตจิบเบอเรลลินในระดับการทดลองต่างๆ หรือการผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรม ตลอดจนการเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการผลิต และนอกจากนี้ ยังอาจใช้ข้อสรุปจากงานวิจัยนี้เป็นแนวทางในการเตรียมสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ๆที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ และมีปัญหาในการสร้างสปอร์ เพื่อใช้ในขั้นตอนต่างๆ ของค้นคว้าวิจัยในการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตจิบเบอเรลลินต่อไป

1.6 ขั้นตอนการวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* จำนวน 4 สายพันธุ์ (ที่ได้จากการกลายพันธุ์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตจิบเบอเรลลินสูง แต่สร้างสปอร์ได้จำนวนน้อยในระดับแตกต่างกันไป) บนอาหารแข็งในระดับหลอดทดลอง โดยมีปัจจัยที่ศึกษาดังต่อไปนี้

1.6.1 ชนิดและปริมาณของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.6.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.6.3 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

1.6.4 ความส่องสว่างที่ใช้ในการบ่มเชื้อ