การชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. โดยแสงอัลตราไวโอเลท

นางสาวชาลินี คงสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-139-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18911968

INDUCED MUTATION IN HOLY MUSHROOM *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. BY ULTRAVIOLET LIGHT

Miss Chalinee Kongsawat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics
Department of Botany
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-333-139-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลท
โดย	นางสาวชาลินี คงสวัสดิ์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
	รองศาสตราจารย์ ปาริชาต ภู่สว่าง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ปาริชาต ภู่สว่าง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชาลินี คงสวัสดิ์ : การชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. โดยแสงอัลตราไวโอเลท (INDUCED MUTATION IN HOLY MUSHROOM *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. BY ULTRAVIOLET LIGHT) อ.ที่ปรึกษา : รศ. มุกดา ดูหิรัญ , อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และ รศ. ปาริชาต ภู่สว่าง , 93 หน้า. ISBN 974-333-139-5

เซลล์เดี่ยวของเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*) สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG004 ถูกชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยการใช้เส้นใยอายุ 6 วัน บดด้วยความเร็วรอบ 6900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 50 μ พบว่าอัตราการอยู่รอด 10% เกิดขึ้นด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลท ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่าง 22 เซนติเมตร เป็นเวลา 25 วินาที และอัตราการอยู่รอด 10% เกิดเมื่อได้รับสาร NTG ที่มีความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที

การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ได้มิวแตนท์ของสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ที่สามารถต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทจำนวน 1 และ 2 โคโลนี และ จำนวน 5 และ 2 โคโลนี ตามลำดับ การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG ได้มิวแตนท์ของสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ที่สามารถต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทจำนวน 3 และ 4 โคโลนี และ จำนวน 4 และ 3 โคโลนี ตามลำดับ

สายพันธุ์ที่ถูกชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ สูงสุดคือ 003-UV-cv_1 และ 004-UV-ny_3 เป็น 10.73 และ 6.48 ตามลำดับ ขณะที่ใน MUG 003 และ MUG 004 สายพันธุ์เดิมจะมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอเป็น 5.72 และ 3.85 ตามลำดับ สายพันธุ์ที่ถูกชักนำด้วยสาร NTG ซึ่งมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงสุดคือ 003-NTG-ny_3 และ 004-NTG-cv_1 เป็น 6.96 และ 5.59 ตามลำดับ ลักษณะสัณฐานวิทยาสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้ทั้งหมดนั้น จะมีขนาดเซลล์ ลักษณะเส้นใย สีของโคโลนี และการมี clamp connection ไม่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม แต่ลักษณะการฟูของโคโลนีในบางสายพันธุ์มิวแตนท์จะแตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม อัตราการเจริญเติบโตในสายพันธุ์ MUG003 มิวแตนท์ทุกสายพันธุ์จะมีอัตราการเจริญและน้ำหนักแห้งของเส้นใยต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมทั้งหมด สำหรับสายพันธุ์ MUG 004 จะมีอัตราการเจริญและน้ำหนักแห้งของเส้นใยใกล้เคียงกับสายพันธุ์เดิม

ภาควิชา ..พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ..พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา ..2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

3970439023 : MAJOR GENETICS
KEY WORD: *Ganoderma lucidum* / INDUCED MUTATION / ULTRAVIOLET LIGHT

CHALINEE KONGSAWAT : INDUCED MUTATION IN HOLY MUSHROOM *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. BY ULTRAVIOLET LIGHT. THESIS ADVISOR. : ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D AND ASSOC. PROF. PARICHART POOSAWANG. 93 pp. ISBN 974-333-139-5

Single cells of Holy mushroom (*Ganoderma lucidum*) strain MUG 003 and MUG 004 was induced for mutation. The single cells were produced by 6900 rpm homogenizing of 6 days old mycelia for 10 minutes and filtered through 50 μ pore size filter cloth. The ten percentage survival of the cells, exposed cells to ultraviolet light for 25 second, at 254 nm and at 22 cms in distance, were selected. The ten percentage survival of the cells, treated 125 μg/ml NTG for 30 minutes were also selected.

Induced mutation by ultraviolet light provided one nystatin resistance mutant and two crystal violet resistance mutants from strain MUG 003, and five nystatin resistance mutants and two crystal violet resistance mutants from MUG 004. Induced mutation by NTG provided three nystatin resistance mutants and four crystal violet resistance mutants from MUG 003, and four nystatin resistance mutants and three crystal violet resistance mutants from MUG 004.

The ultraviolet light inducing strains 003-UV-cv_1 and 004-UV-ny_3 produced the highest polysaccharide per DNA ratio. Strain 003-UV-cv_1 had the ratio of 10.73 and 004-UV-ny_3 had the ratio of 6.48, while the wild type of MUG 003 and MUG 004 had the ratio of 5.72 and 3.85, respectively. The NTG inducing strains 003-NTG-ny_3 and 004-NTG-cv_1 produced the highest polysaccharide per DNA ratio. Strain 003-NTG-ny_3 had the ratio of 6.96 and 004-NTG-cv_1 had the ratio of 5.59. All resistant mutants morphology, the size of cell, the color of colony and the clamp connection, were not different from the wild type. But some resistant mutants had fluffy mycelium, which were different from the wild type. Mycelial growth rate of all mutants of MUG 003 were lower than that of the wild type. Mycelia growth rate of the mutant of MUG 004 were similar to that of the wild type.

ภาควิชา พฤกษศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา พันธุศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2542	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และ รองศาสตราจารย์ ปาริชาติ ภู่สว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ รวมทั้งได้กรุณาสละเวลาปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ไม่อาจเอ่ยนามได้ทั้งหมด สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มีให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณทุนสถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย..... .....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1
2 ตรวจเอกสาร.....4
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....21
4 ผลการทดลอง.....31
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....62

รายการอ้างอิง.....77
ภาคผนวก.....82
ประวัติผู้เขียน.....93

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวที่ได้จากการบดอย่างละเอียด ของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004.....33

2 เปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวที่ได้หลังการกรอง ของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004.....34

3 ระยะเวลาที่ฉายแสงอังตราไวโอเลตและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004.....36

4 ความเข้มข้น NTG และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004.....38

5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสเตรปโตไมซิน กับรัศมีการเจริญของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004.....40

6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนสเตตินกับรัศมีการเจริญของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004.....42

7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคริสตัลไวโอเลทกับรัศมีการเจริญของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004.....44

8 จำนวนโคโลนีที่แยกได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยแสงอัลตราไวโอเลท.....46

9 จำนวนโคโลนีที่แยกได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG.....47

10 จำนวน resistance mutant จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลท.....48

11 จำนวน resistance mutant จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG.....50

12 ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ ปริมาณ ดีเอ็นเอ และอัตราส่วนระหว่างโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ ของสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์.....52

13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์.....55

14 รหัสมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004 ที่ชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท.....87

15 รหัสมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG003 และ MUG004 ที่ชักนำด้วยสาร NTG.....88

16 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลว PDB สายพันธุ์ MUG 003 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท.....89

17 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลว PDB สายพันธุ์ MUG 003 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ชักนำด้วยสาร NTG.....90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

18 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลว PDB สายพันธุ์ MUG 004 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท.....91

19 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลว PDB สายพันธุ์ MUG 004 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ชักนำด้วยสาร NTG.....92

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	เห็ดหมื่นปี	5
2	สปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี	6
3	วงชีพของเห็ดหมื่นปี	7
4	การเกิดปฏิกริยา hydrolysis ใน cytosine	13
5	การเกิด thymine dimer เมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเลท	14
6	การซ่อมแซม thymine dimer โดยกลไกที่ต้องใช้แสง	15
7	การซ่อมแซมโดยกลไกที่ไม่ต้องใช้แสง	16
8	โครงสร้างของสาร NTG	17
9	กลไกการเกิดมิวเตชันโดยสารกลุ่ม alkylating agent	17
10	ลักษณะดอกเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ที่ใช้ในการทดลอง	23
11	อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004	31
12	เซลล์เดี่ยวจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ที่ได้จากการบดอย่างละเอียด	35
13	ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลทกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ของสายพันธุ์ MUG003 และ MUG004	37
14	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NTG กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ของสายพันธุ์ MUG003 และ MUG004	39
15	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสเตรปโตไมซินกับการเจริญ ของสายพันธุ์ MUG003 และ MUG004	41
16	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนสเตตินกับการเจริญ ของสายพันธุ์ MUG003 และ MUG004	43
17	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคริสตัลไวโอเลทกับการเจริญ ของสายพันธุ์ MUG003 และ MUG004	45
18	เปรียบเทียบปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อปริมาณ ดีเอ็นเอ ของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์เดิม และสายพันธุ์มิวแตนท์	54
19	ลักษณะโคโลนีแบบต่างๆ ของสายพันธุ์มิวแตนท์	56
20	ลักษณะ clamp connection ของเส้นใยเห็ดหมื่นปี	57

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

21 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสายพันธุ์ MUG003 และมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท.....58

22 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสายพันธุ์ MUG003 และมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยสาร NTG.....59

23 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสายพันธุ์ MUG004 และมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท.....60

24 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสายพันธุ์ MUG004 และมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยสาร NTG.....61

25 กราฟมาตราฐานน้ำแป้งมาตราฐาน โดยวิธี antrone test.....85

26 กราฟมาตราฐานของสารละลาย คาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ โดยวิธี diphenylamine reagent 86

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เห็ดหมื่นปี เป็นเห็ดสกุล Ganoderma ชนิดที่มีสรรพคุณทางยาจัดเป็นเห็ดสมุนไพร มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst มีชื่อเรียกในภาษาต่าง ๆ เช่น เรียก Ling Zhi ในภาษาจีน Mannentake เรียกในภาษาญี่ปุ่น และ Lacquered mushroom หรือ Holy mushroom เรียกในภาษาอังกฤษ (สุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2531) ลักษณะดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายพัด ผิวหมวกเห็ดมีลักษณะเป็นมันเงา สีน้ำตาลแดงอาจมีสีเหลืองหรือขาวบริเวณขอบหมวก สปอร์รูปรี สีน้ำตาล ปลายบนตัด ผนังหนา 2 ชั้น ผนังชั้นในยื่นคล้ายหนามไปชนผนังชั้นนอก ผิวนอกของสปอร์เรียบ (ศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ และคณะ, 2531) จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าเห็ดหมื่นปีมีสารซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cacinostatic substance) ได้แก่ สารจำพวกโปลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) โปลีแซคคาไรด์ที่พบ คือ β-(1→3)-D-glucan และสารประกอบอื่นๆ ในเห็ดหมื่นปี เช่น กรดกาโนเดอริค (ganoderic acid) เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) อะดีโนซีน (adenosine) เป็นต้น สารประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติในการช่วยลดความดันโลหิต ลดไขมันในเลือด ลดระดับน้ำตาลในเลือด กระตุ้นการไหลเวียนของเลือด ลดความหนืดของเลือด ลดการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด เพิ่มภูมิคุ้มกันโรค และขจัดพิษที่มีต่อตับ (สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง, 2539) เห็ดหมื่นปีพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติมีอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ ที่นำมาทดลองปลูกส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศและสายพันธุ์จากญี่ปุ่น (สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง, 2539) ในปี ค.ศ. 1988 ประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตเห็ดหมื่นปีประมาณ 250 ตันน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังมีการเพาะเห็ดหมื่นปี เพื่อเป็นการค้าในอีกหลายประเทศ ได้แก่ จีน ไต้หวัน เกาหลี และไทย (Mizuno และคณะ, 1995)

การชักนำให้เกิดมิวเตชัน (induced mutation) โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลท (ultraviolet light) ซึ่งเป็นแสงที่มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ (nonionizing) มีช่วงคลื่นแสงประมาณ 254 - 260 นาโนเมตร ซึ่งในช่วงคลื่นแสงที่ 254 นาโนเมตร เป็นช่วงคลื่นที่เบสเพียวรีน (purine) และ เบสไพริมิดีน (pyrimidine) ในดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด มีผลทำให้ดีเอ็นเอเกิดความผิดปกติที่พันธะทางเคมี จะชักนำให้ thymine 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกัน เกิดเป็น thymine dimer ขึ้น (Russell,1994) Kiguchi และ Yanagi (1985) ชักนำให้เกิดมิวเตชันใน *Coprinus macrorhizus* โดยฉายแสงอัลตราไวโอเลทที่โปรโตพลาสต์ (protoplast) จากเส้นใย (mycelia) เป็นเวลา 60 วินาทีได้ auxotrophic mutant ที่ต้องการกรดอะมิโนเมไธโอนีน (methionine) และ ซีสเทไธโอนีน (cystathionine) ในการเจริญ Toyomasu และคณะ (1986) ใช้โปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ด

Pleurotus ostreatus และ *Pleurotus salmoneo-stramineus* ฉายแสงอัลตราไวโอเลทเป็นเวลา 30 - 60 วินาที ได้ auxotrophic mutant ของ *P. ostreatus* และ *P. salmoneo-stramineus* ที่ต้องการกรดอะมิโนฮีสติดีน (histidine) ไอโซลูซีน (isoleucine) และเวลีน (valine) ในการเจริญ ตาม Li และ Chang (1991) นำเส้นใยของเห็ดฟางที่ผ่านกระบวนการบดอย่างละเอียด (homogenize) ฉายแสงอัลตราไวโอเลทเป็นเวลา 60 วินาที ได้ลักษณะ crystal violet resistance mutant และ malachite green resistance mutant อย่างละ 1 สายพันธุ์ Mukherjee และ Sengupta (1992) พบว่าเกิดลักษณะ auxotrophic mutant ที่ต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญหลายชนิด (multiple auxotrophic mutant) เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลท เป็นเวลา 10 นาที ไปที่โปรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดโคน (*Termitomyces clypeatus*) ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 0.39 มิลลิโมล N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ซึ่งการศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเตชันนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของเห็ด เพื่อนำไปสู่การหาลักษณะที่ใช้บ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) ต่อไป

งานวิจัยนี้ มุ่งศึกษาถึงการชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหมื่นปี โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลทและ NTG โดยศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมกับสปอร์และเส้นใยเพื่อใช้ชักนำให้เกิดมิวเตชัน และใช้สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) และปริมาณโปลีแซคคาไรด์ ระหว่างสายพันธุ์มิวแตนท์และสายพันธุ์เดิม เพื่อให้ได้เห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ที่สามารถผลิตโปลีแซคคาไรด์ได้สูงขึ้น โดยชักนำให้เกิดมิวเตชันในสายพันธุ์เห็ดหมื่นปีสายพันธุ์เดิมที่มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ในเส้นใยสูงและต่ำอย่างละสายพันธุ์ เพื่อใช้ในการทดสอบว่าเห็ดหมื่นปีสามารถปรับปรุงสายพันธุ์ให้ดีขึ้นได้ โดยมุ่งหวังว่าปริมาณโปลีแซคคาไรด์อาจจะสูงขึ้น ซึ่งโปลีแซคคาไรด์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง และสามารถนำสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดหมื่นปีต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

ศึกษาการใช้แสงอัลตราไวโอเลทและสารประกอบ NTG เพื่อชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหมื่นปี ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อปริมาณดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์เดิมกับสายพันธุ์มิวแตนท์

ขั้นตอนการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อ

2. หาภาวะที่เหมาะสมเพื่อการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยแสงอัตราไวโอเลตและสารประกอบ NTG

3. ชักนำให้เกิดมิวเตชัน หาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และจัดทำ survival curve

4. หา genetic marker

5. ชักนำให้เกิดมิวเตชัน และคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ ที่การอยู่รอด 10 %

6. เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและปริมาณโปลีแซคคาไรด์ ระหว่างสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์มิวแตนท์ ซึ่งอาจจะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม และให้ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ที่มากกว่าสายพันธุ์เดิม ซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์เห็ดหมื่นปีต่อไปได้

ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้ จะทำการศึกษาวิธีการสร้างสายพันธุ์มิวแตนท์ของเห็ดหมื่นปี โดยหาวิธีชักนำให้เกิดมิวเตชัน ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมแก่สปอร์และเส้นใยเพื่อใช้ชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลทและสาร NTG ทำการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์โดยอาศัยคุณสมบัติการต้านทานต่อสารยับยั้งการเจริญและยาปฏิชีวนะเป็น genetic marker ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปริมาณโปลีแซคคาไรด์ ระหว่างสายพันธุ์เดิมกับสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดหมื่นปี

การจัดจำแนกหมวดหมู่ของเห็ดหมื่นปี (Alexopoulos และ Mims, 1976) เป็นดังนี้

Kingdom	Mycetea
Division	Amastigomycota
Subdivision	Basidiomycotina
Class	Basidiomycetes
Subclass	Holobasidiomycetidae
Series	Hymenomycetes
Order	Aphyllopharales
Family	Polyporaceae
Genus	Ganoderma
Species	*Ganoderma lucidum*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหมื่นปี (ปัญญา โพธิฐิรัตน์, 2538)

เห็ดหมื่นปีจัดเป็นเห็ดพวก polypore ประกอบด้วย 2 ระยะคือ

1. ระยะเส้นใย

เส้นใยของเห็ดหมื่นปีจะมีสีขาวแตกกิ่งก้านสาขาออกไปได้มากมาย เส้นใยมีผนังกั้นเป็นส่วนๆ เส้นใยในระยะที่ 2 จะพบ clamp connection และในแต่ละเซลล์จะพบ 2 นิวเคลียส ไม่มีการสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เกิดจากการแตกหักของเส้นใย (oidia) เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตเต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอยู่รวมกันเหนียวคล้ายพังผืด และมีการรวมเป็นกระจุกหรือขยุ้มรา หลังจากนั้นจะมีการพัฒนากลายเป็นตุ่มยื่นออกมา เรียกว่า sclerotia หรือ primodia ซึ่งจะพัฒนาเป็นดอกเห็ดต่อไป

2. ระยะดอกเห็ด ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

2.1 หมวกดอก (cap) ดอกเห็ดหมื่นปี (รูปที่ 1) อาจเกิดเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มๆ ละ 3 – 4 ดอก ที่มีโคนดอกติดกัน หมวกดอกที่ออกมาใหม่ๆ จะมีลักษณะเป็นแท่งสีเหลือง สีของดอกเห็ดจะมีสีขาว สีเหลือง และสีน้ำตาล ตามลำดับ ต่อมาส่วนบนของหมวกดอกจะแผ่คล้ายพัด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดอกเห็ดขณะที่ยังอ่อนอยู่จะมีสีขาวหรือสีเหลือง กลางหมวกดอกมีสีน้ำตาล แต่ถ้าหมวกดอกเจริญเต็มที่จะงองุ้มลง สีของหมวกดอกจะเข้มมากขึ้น เนื้อเยื่อภายในดอกเห็ดจะมีเส้นใยสีน้ำตาล ความหนาของผิวหมวกดอกไปจนถึงรูที่อยู่ใต้หมวกดอกจะหนาประมาณ 0.2 – 1.0 เซนติเมตร ผิวของหมวกดอกมีลักษณะเป็นเงา คล้ายทาด้วยแซลแลค มีสีน้ำตาลหรือสีเซสนัท

2.2 ส่วนใต้หมวกดอก ส่วนใต้หมวกดอกของเห็ดหมื่นปีมีลักษณะเป็นรูเล็กๆ สีเหลืองหรือสีขาวจำนวนมากมาย จึงจัดเป็นพวก polypore ภายในรูเป็นแหล่งกำเนิดของสปอร์ เมื่อดอกเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างสปอร์และปล่อยออกมามากมาย สปอร์บางส่วนจะปลิวตกบนพื้นดิน แต่สปอร์บางส่วนจะลอยขึ้นไป ปกคลุมผิวของหมวกดอก มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล มีรสขม สปอร์ของเห็ดหมื่นปีมีสีน้ำตาล รูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งตัด มีผนังหนา 2 ชั้น ผนังด้านนอกเรียบ ส่วนผนังด้านในมีลักษณะคล้ายหนามยื่นออกมาชนผนังด้านนอก

2.3 ก้านดอก (stalk) เห็ดหมื่นปีอาจจะมีก้านดอกหรือไม่มีก็ได้ โดยเฉพาะเห็ดหมื่นปีที่ขึ้นบนขอนไม้ อาจไม่พบก้านดอก ที่มีก้านดอกอาจจะอยู่กึ่งกลางหรือค่อนไปข้างใดข้างหนึ่งของหมวกดอก

รูปที่ 1 เห็ดหมื่นปี

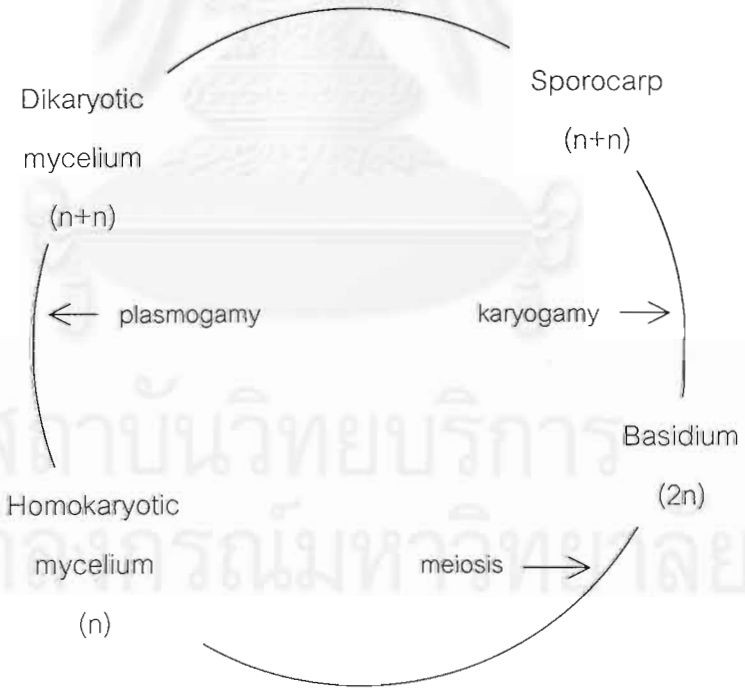
ลักษณะสปอร์ของเห็ดหมื่นปี

สปอร์ของเห็ดหมื่นปีที่พบในทั่วไปคือ สปอร์อาศัยเพศ (basidiospore) (รูปที่ 2) ซึ่งจะสร้างขึ้นเมื่อดอกเห็ดพัฒนาสมบูรณ์แล้ว โดยปล่อยออกมาจากรูเล็กๆ ใต้หมวกดอก สปอร์มีสีน้ำตาล รูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งตัด ผนังหนา มี 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเรียบ ผนังชั้นในยื่นคล้ายหนามไปชนผนังชั้นนอก ลักษณะของผนังสปอร์และจำนวนหนาม เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Micosopes: SEM) ใช้เป็นลักษณะในการจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ganoderma* ได้ (สุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2531) Triratana และ Chaipasert (1991) ศึกษาการชักนำให้เกิดการงอกในสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี พบว่า การชักนำให้เกิดการงอกของสปอร์อาศัยเพศเห็ดหมื่นปีนั้นยากมาก แต่สามารถชักนำให้เกิดการงอกได้โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC36900 เลี้ยงร่วมกับสปอร์อาศัยเพศบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

รูปที่ 2 สปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี (กำลังขยาย x100 x6)

วงชีพของเห็ดหมื่นปี

วงชีพของเห็ดหมื่นปีเป็นแบบ heterothallic แบบ tetrapolar (Chang และ Chen, 1986) เส้นใยของเห็ดหมื่นปีแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่หนึ่งเรียกว่า primary mycelium ซึ่งเป็นเส้นใยที่งอกออกมาจาก basidiospore มีโครโมโซมเป็น haploid (n) ในระยะแรกของการงอกจะเป็น multinucleate ต่อมาจึงมีผนังมากั้นทำให้ได้เส้นใยที่มี 1 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ ซึ่งเรียกว่า homokaryotic mycelium สามารถแตกกิ่งก้านสาขาออกไปได้มาก เส้นใยระยะนี้ไม่พบ clamp connection จากนั้นมีการพัฒนาไปเป็นเส้นใยระยะที่สอง เรียกว่า secondary mycelium เมื่อเกิดใหม่ๆ จะมีลักษณะคล้ายกับเส้นใยระยะที่หนึ่ง แต่สามารถตรวจพบ clamp connection ได้ในบางบริเวณ ในหนึ่งเซลล์จะพบมี 2 นิวเคลียส จึงเรียกเส้นใยแบบนี้ว่า heterokaryotic mycelium ภายในเส้นใยกว้าง เส้นใยระยะที่สองนี้ เมื่ออายุมากขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลง คือ ผนังเซลล์อาจหนาขึ้น ไม่มีไซโตพลาสม อาจตรวจพบ granular และภายในเส้นใยอาจจะแคบ เส้นใยระยะนี้เมื่อได้รับภาวะที่เหมาะสมจะรวมตัวกันเป็นตุ่มเห็ด (primordia) ซึ่งมีสัณฐานเป็นกลุ่มของเส้นใยที่ยึดกันแน่น มีสีน้ำตาล จากนั้นจะเจริญเป็นดอกเห็ด (basidiocarp) (Raper, 1966) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 วงชีพของเห็ดหมื่นปี (Raper, 1966)

สารออกฤทธิ์และสรรพคุณทางยาของเห็ดหมื่นปี

เห็ดหมื่นปีเป็นที่รู้จักกันมานานแล้วว่า เป็นเห็ดที่มีสรรพคุณทางยา ใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ของมนุษย์ เช่น โรคตับ โรคความดันโลหิตสูง คลอเรสเตอรอลสูง โรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร โรคหืด โรคไขข้ออักเสบ โรคเส้นประสาท โรคนอนไม่หลับ โรคหลอดลมอักเสบเรื้อรัง และโรคลมพิษ เป็นต้น (Miyasaki และ Nishijima, 1981; Kohda และคณะ, 1985; Soxe และคณะ, 1985) จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ในเห็ดหมื่นปีมีมากกว่า 150 ชนิด องค์ประกอบส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของดอกเห็ด ซึ่งปริมาณและคุณภาพของสารประกอบเหล่านั้นจะแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สถานที่เพาะ และสภาพอากาศ เป็นต้น (Mizuno และคณะ, 1995)

สามารถจำแนกสารออกฤทธิ์ได้ ดังต่อไปนี้

1. สารไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดขม (bitter triterpenoid)

ดอกเห็ดหมื่นปีจะมีรสขม ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พบในเห็ดชนิดอื่น ระดับความขมนี้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สถานที่เพาะปลูก ภาวะในการปลูก และสายพันธุ์ เป็นต้น ซึ่งรสขมนี้จะไม่พบในระยะที่เป็นเส้นใย ถึงแม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างรสขมกับสรรพคุณทางยานี้จะยังไม่เป็นที่ยืนยัน รสขมนี้จะใช้เป็นสัญลักษณ์ในการวัดสรรพคุณทางยา เชื่อกันว่าเห็ดหมื่นปีที่มีสรรพคุณทางยาจะมีรสขม และใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Ganoderma* sp. (Miyahara และคณะ, 1987) สำหรับสารไตรเทอร์พีนอยด์นี้ เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ใช่ไขมัน แต่มีคุณสมบัติคล้ายไขมัน สารที่มีรสขมส่วนใหญ่จะอยู่ที่ดอกและก้าน ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ของเห็ดหมื่นปี สารไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดขมที่มีความสำคัญในการรักษาโรค คือกรดกาโนเดอริค (ganoderic acid A B C1 C2 D-K และ R-Z) และกรดลูซิเดนิค (lucidenic acid) (Shiao และคณะ,1988; Lin และคณะ, 1988)กลุ่มของสารเหล่านี้เป็นตัวยับยั้งการหลั่งของสารฮีสตามิน (histamine–release inhibition activity) ซึ่งเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกริยาภูมิแพ้ชนิดหนึ่ง ช่วยลดความดันโลหิต และช่วยลดไขมันในเลือด นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (cytotoxicity on hepatoma cells) และการต้านสารพิษที่มีต่อตับ (antihepatotoxic) ได้อีกด้วย (Shiao และคณะ, 1987; Hirotani และคณะ, 1987)

2. โปลีแซคคาไรด์ (polysaccharide)

โปลีแซคคาไรด์เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่อาจเกาะติดกับโปรตีนหรือสารอื่นๆ ในเห็ดหมื่นปีมีโปลีแซคคาไรด์หลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยา ได้แก่ กาโนเดอแรนส์ (ganoderans A B และ C) ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดจากการเพิ่มอินซูลิน ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือด สารเบต้าดีกลูแคน (beta–D–glucan) และ

โปลีแซคคาไรด์อีกหลายตัว มีฤทธิ์รวมกันในการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนในเลือด ไขกระดูกและในตับ ช่วยลดการอักเสบ ช่วยกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดบี-เซลล์ (B-cells) และ ที-เซลล์ (T-cells) มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) นอกจากนั้น พบว่า สาร β-(1→3)-- D – glucan ที่พบในเห็ดหมื่นปีนั้น จะมีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง (Soxe และคณะ, 1985)

3. สเตอรอยด์ (steroids)

มีปริมาณอยู่เพียงเล็กน้อย แต่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ที่ตรวจพบในเห็ดหมื่นปี คือ กาโนสเตอโรน (ganosterone) หรือ กาโนโดสเตอโรน (ganodosterone) และเออโกสเตอรอล ซึ่งมีฤทธิ์ในการลดพิษที่มีต่อตับ (Kac และคณะ, 1984)

4. กลุ่มสารนิวคลีโอไทด์ (nucleotide)

ในเห็ดหมื่นปีจะมีชนิดของสารนิวคลีโอไทด์คล้ายกับในเห็ดชนิดอื่นๆ คือจะประกอบด้วย สารอะดีโนซีน 5' – GMP 5' – XMP และ RNA เป็นต้น และพบว่าสารอะดีโนซีน ในเห็ดหมื่นปีจะมีผลในการบรรเทาความเจ็บปวด มีฤทธิ์เช่นเดียวกับกัวโนซีน (gaunosine) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์อีกตัวหนึ่งที่พบในเห็ดหมื่นปี มีสรรพคุณในการป้องกันการอุดตันจากลิ่มเลือดในเส้นเลือด (Kim และ Nam, 1984)

5. สารประกอบเยอร์มาเนียม (germanium contents)

เยอร์มาเนียมเป็นธาตุแข็ง พบในโสมและกระเทียม และพบมากในเห็ดหมื่นปี (Chiang และ Wann, 1986) เป็นตัวส่งเสริมกระบวนการทำงานของร่างกาย สามารถรวมตัวและช่วยกำจัดสารพิษและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ และสามารถลดความเจ็บปวดในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้ (Mizuno และคณะ, 1995)

ผลงานการค้นคว้าวิจัยสารสกัดจากเห็ดหมื่นปี

ในปี ค.ศ. 1984 Lee และคณะ ศึกษาปฏิกิริยาในการต้านมะเร็งของสารสกัดที่ได้จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี พบว่า เป็นสารจำพวกโปลีแซคคาไรด์ และมีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด fibrosacroma ในหนูทดลอง Kohda และคณะ (1985)ได้สกัดสารจากเห็ดหมื่นปีและแยกโครงสร้างของสารสกัดนั้น พบว่าประกอบไปด้วยสารไตรเทอร์พีน (triterpene) กรดกาโนเดอริค ชนิด A และ B และสารไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ ไตรเทอร์พีนชนิด C และ D ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการลดระดับฮีสตามีนในหนูทดลอง

Wang และคณะ (1993) ทำการแยกโปลีแซคคาไรด์และทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดได้จากเห็ดหมื่นปี 3 สปีชีส์ พบว่า ประกอบไปด้วย β-(1→3) – D – glucan โฮโมโปลีแซคคาไรด์ (homopolysaccharide) hetero - β– D – glucan และ สาย hetero – glycosidic ของน้ำตาลแมนโนส (manose) กาแลคโตส (galactose) ไซโลส (xylose) และ ฟูโคส (fucose) ซึ่งสารที่สกัดได้เหล่านี้มีฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็ง

นอกจากสารออกฤทธิ์ที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการค้นพบองค์ประกอบอื่นๆ อีกหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยา เช่น กรดไขมันชนิดโอเลอิค (oleic acid) และสารไซโคลออกต้าซัลเฟอร์ (cyclooctasulfur) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการหลั่งของฮีสตามีน มีโปรตีนที่เป็นเอนไซม์จำพวกไลโซไซม์ (lysozyme) โปรติเอส (protease) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ ทำหน้าที่ย่อยสลายเชื้อแบคทีเรีย (สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง, 2539) นอกจากสารที่กล่าวข้างต้น มีรายงานถึงสารอาหารอื่นๆ เช่น แร่ธาตุ โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และวิตามินบี เป็นต้น (Nagaraja และ Kumar, 1987)

สำหรับปฏิกริยาในการต่อต้านมะเร็งของสารสกัดที่ได้จากเห็ดหมื่นปีนั้น พบว่าส่วนใหญ่เกิดจากสารจำพวกโปลีแซคคาไรด์ (Lee และคณะ, 1984) จึงทำให้มีความสนใจในการศึกษาทางโครงสร้างและลักษณะทางชีววิทยาของสารโปลีแซคคาไรด์เหล่านี้ (Miyasaki และ Nishijima, 1981)

สารโปลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็งในเห็ดหมื่นปี

เห็ดหมื่นปีจะประกอบด้วยโปลีแซคคาไรด์ประมาณ 27 % (Soxe และคณะ, 1985) ซึ่งสารประกอบโปลีแซคคาไรด์ในเห็ดหมื่นปีส่วนใหญ่จะเป็นโปลีแซคคาไรด์ที่สามารถสกัดได้โดยใช้น้ำร้อน หรือสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate) หรือสารละลายด่าง หรือสารละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (dimethyl sufoxide : DMSO) เป็นต้น และสามารถแยกออกได้โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟี (chromatographic) (Mizuno และ Hazama, 1986)

ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งนั้น พบว่าเกิดจากสาร hetero - β - D – glucan ที่มีสายของ β - (1→3) – D – glucan เช่น β - D – glucan glucurono - β - D – glucan arabioxyl - β - D – glucan xylo - β - D – glucan mano - β - D – glucan และ xylomano - β - D – glucan ซึ่งโปลีแซคคาไรด์เหล่านี้ โดยเฉพาะที่อยู่ในเห็ดหมื่นปี จากการทดสอบพบว่ามีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้เป็นสารต่อต้านมะเร็งตัวใหม่ เพราะว่าสารที่ได้จากเห็ดหมื่นปีเหล่านี้จะไม่มีผลข้างเคียง (Mizuno และคณะ, 1995)

สารโปลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งนั้นไม่ได้มีแต่เฉพาะ β - D – glucan ที่ละลายน้ำได้เท่านั้น แต่ยังพบสารเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ซึ่งไม่สามารถละลายน้ำ โปลีแซคคาไรด์ที่อยู่ในรูปของเฮมิเซลลูโลสนี้สามารถสกัดได้โดยใช้สารละลายอัลคาร์ไรด์หรือ DMSO (Mizuno และคณะ, 1995) นอกจากนั้น ยังพบโปลีแซคคาไรด์ตัวอื่นๆ อีก เช่น α - (1→6) - β - D – glucan α - (1→4) - β - D – glucan หรือไกลโคเจน (glycogen) fucogalactan mannofucogalactan fucoxylamannan และ xylomannoarabino – galactan แต่ยังไม่มีการทดสอบเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็ง (Mizuno และคณะ, 1984)

มิวเตชัน (mutation)

มิวเตชัน หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ(Brown, 1992) และการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง การเกิดมิวเตชันแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. มิวเตชันที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (spontaneous mutation) เป็นมิวเตชันที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ มิวเตชันชนิดนี้จะไม่ทราบมิวตาเจน (mutagen) อาจเกิดจากปัจจัยทางกายภาพ หรือสารเคมีที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม (Gardner, 1975)

2. มิวเตชันที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เป็นมิวเตชันที่เกิดจากมนุษย์ใช้มิวตาเจนชักนำให้เกิด (Goodenough, 1978) ซึ่งมิวตาเจนมี ดังนี้

2.1 มิวตาเจนทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ และรังสีต่างๆ ซึ่งเป็นมิวตาเจนที่สำคัญในการชักนำให้เกิดมิวเตชัน แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1) รังสีก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ แกมมา อัลฟา เบตา อิเลคตรอน นิวตรอน โปรตอน และอนุภาคอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนที่เร็ว รังสีเหล่านี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่างๆ ได้สูง โดยทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ และทำให้อิเลคตรอนที่เรียงอยู่วงนอกสุดในโครงสร้างอะตอมหลุดไป ทำให้ไอออนมีประจุบวกเกิดขึ้น อิเลคตรอนที่หลุดออกมานี้จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงจะชนอะตอมอื่น ในที่สุดพลังงานของอิเลคตรอนเหล่านี้จะลดลง อิเลคตรอนที่หลุดออกมาเหล่านี้จะไปเกาะกับอะตอมอื่นทำให้เกิดไอออนมีประจุลบขึ้นมา ดังนั้นอิเลคตรอนที่หลุดมาจากอะตอมหนึ่ง และไปเพิ่มให้กับอีกอะตอมหนึ่ง จึงมีไอออนที่มีประจุบวกและลบเกิดขึ้น ขณะที่รังสีเคลื่อนที่ผ่านไปที่ใด จะทำให้เกิดกลุ่มของไอออนที่มีประจุบวกและลบ ไอออนเหล่านี้ต้องเกิดปฏิกริยาเคมี เพื่อทำให้มีประจุเป็นกลาง และเพื่อโครงสร้างอะตอมจะได้คงที่ ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นจะมีผลทำให้เกิดมิวเตชันได้ ผลที่เกิดจากรังสี

ที่ก่อให้เกิดไอออนที่พบทั่วไป คือ ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมและโครมาติด บริเวณที่แตกหักนี้จะเกี่ยวข้องกับส่วนที่ต่อกันของน้ำตาล และหมู่ฟอสเฟตของสายโพลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

2) รังสีไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลท (ultraviolet) รังสีประเภทนี้จะไม่มีการก่อให้เกิดไอออนตามทางที่เคลื่อนผ่าน เนื่องจากมีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่างๆ และพลังงานต่ำกว่ารังสีประเภทแรก

ทั้งรังสีก่อให้เกิดไอออนและรังสีไม่ก่อให้เกิดไอออน เมื่อใช้ในอัตราที่สูงๆ จะฆ่าสิ่งมีชีวิตได้ แต่ถ้าใช้ในอัตราที่ไม่สูงจนเกินไป จะกระตุ้นให้เกิดมิวเตชันได้

2.2 มิวตาเจนทางเคมี (chemical mutagen) ได้แก่ สารเคมีต่างๆ ที่ชักนำให้เกิดมิวเตชัน (มาลินี ตันติยาภรณ์, 2534) มีดังนี้

1) สารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบส (base analogues) โดยสารเคมีชนิดนี้จะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสบางตัวในสายดีเอ็นเอจึงเข้าไปแทนที่ ทำให้สายดีเอ็นเอมีเบสอื่นเข้าไปแทน เมื่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้น จะได้สายดีเอ็นเอผิดไปจากเดิม สารเคมีชนิดนี้ เช่น 5 – bromouracil และ 2 - aminopurine

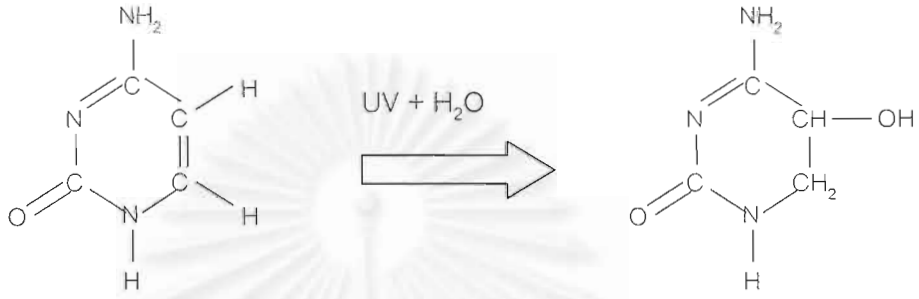
2) สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเบส (base modifying agent) ได้แก่ nitrous acid hydroxylamine สารในกลุ่ม alkylating agent ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการก่อให้เกิดมิวเตชัน เช่น ethylmethane sulfonate (EMS) ethylethane sulfonate (EES) และ N – methyl – N' - nitro - N – nitrosoguanidine (NTG) เป็นต้น

3) สารเคมีที่ทำให้เกิดการขาดหายไปหรือเพิ่มนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ (intercalating agent) สารกลุ่มนี้ได้แก่ proflavin และ acridine dye

การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลท

การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลทนิยมใช้กันมากในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Drake, 1970) แสงอัตราไวโอเลตเป็นแสงที่มีพลังงานและอำนาจการทะลุทะลวงต่ำ แต่พบว่าดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลทสูงสุดที่ 254 นาโนเมตร และเบสเพียวรีนและไพริมิดีนสามารถดูดกลืนรังสีชนิดนี้ได้ดี พลังงานที่ดูดกลืนไว้นี้สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะ (bond) ของเบสเพียวรีนและไพริมิดีน แต่พบว่า เบสไพริมิดีนมีการเปลี่ยนแปลงง่ายกว่าเบสเพียวรีน ซึ่งแสงอัลตราไวโอเลทจะมีผลต่อไพริมิดีน ดังนี้

1. ทำให้เกิดปฏิกริยา hydrolysis ใน cytosine (รูปที่ 4) โดยแสงอัลตราไวโอเลทจะทำให้พันธะของ cytosine อ่อนลง โมเลกุลของน้ำจะเข้าไปเกาะแทนที่ (hydrolysis) ทำให้ cytosine ไม่สามารถจับกับ guanine ได้ตามปกติ มีผลทำให้การจับคู่เบสผิดพลาดและทำให้เกิดมิวเตชัน (Gardner, 1975)



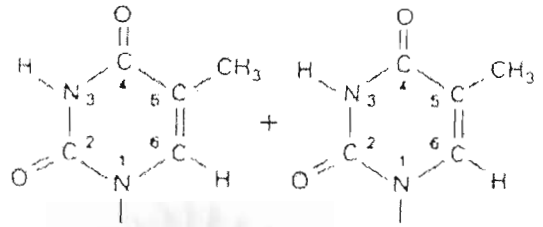
cytosine 5→ 3 – hydroxycytosine

รูปที่ 4 การเกิดปฏิกริยา hydrolysis ใน cytosine (Gardner, 1975)

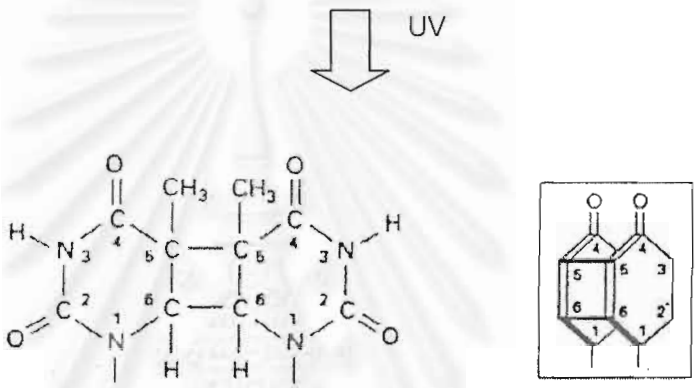
2. ทำให้เกิด thymine dimer (รูปที่ 5) โดยแสงอัลตราไวโอเลททำให้เบส thymine 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันบนสายโพลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สายเดียวกันของโมเลกุลดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ทำให้เกิด thymine dimer ขึ้น (Gardner, 1975) การเกิด thymine dimer จะทำให้ thymine ไม่สามารถจับคู่กับ adenine ของสายโพลินิวคลีโอไทด์ที่อยู่ตรงข้ามได้ ซึ่งจะมีผลทำให้เกิด transition ได้ เช่น คู่เบส T – A ถูกแทนที่ด้วยคู่เบส C – G นอกจากนี้ แสงอัลตราไวโอเลทสามารถทำให้เกิด cytosine dimer ได้และมีผลทำให้เกิดมิวเตชันได้เช่นเดียวกัน (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2541)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก)

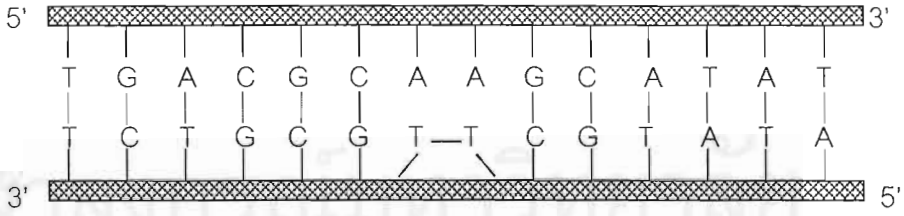


thymine thymine



thymine dimer

ข)



รูปที่ 5 การเกิด thymine dimer เมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเลท (Brown, 1993)

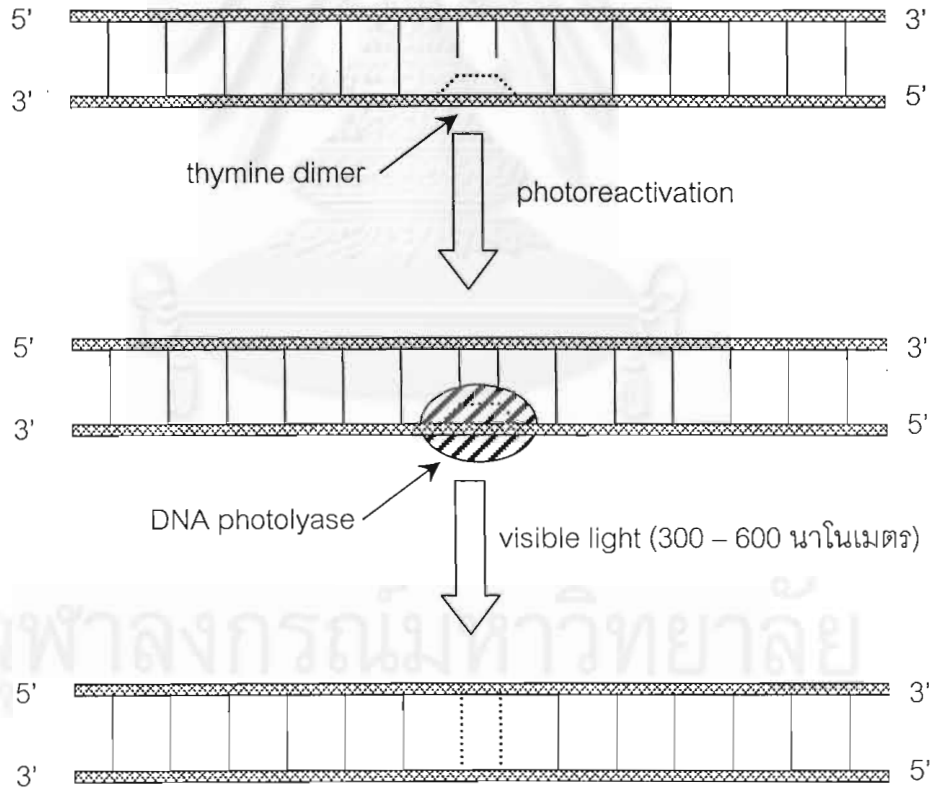
ก) รูปแบบการเกิด thymine dimer

ข) thymine dimer ในโมเลกุล DNA

กระบวนการซ่อมแซม (repair) ของ thymine dmer

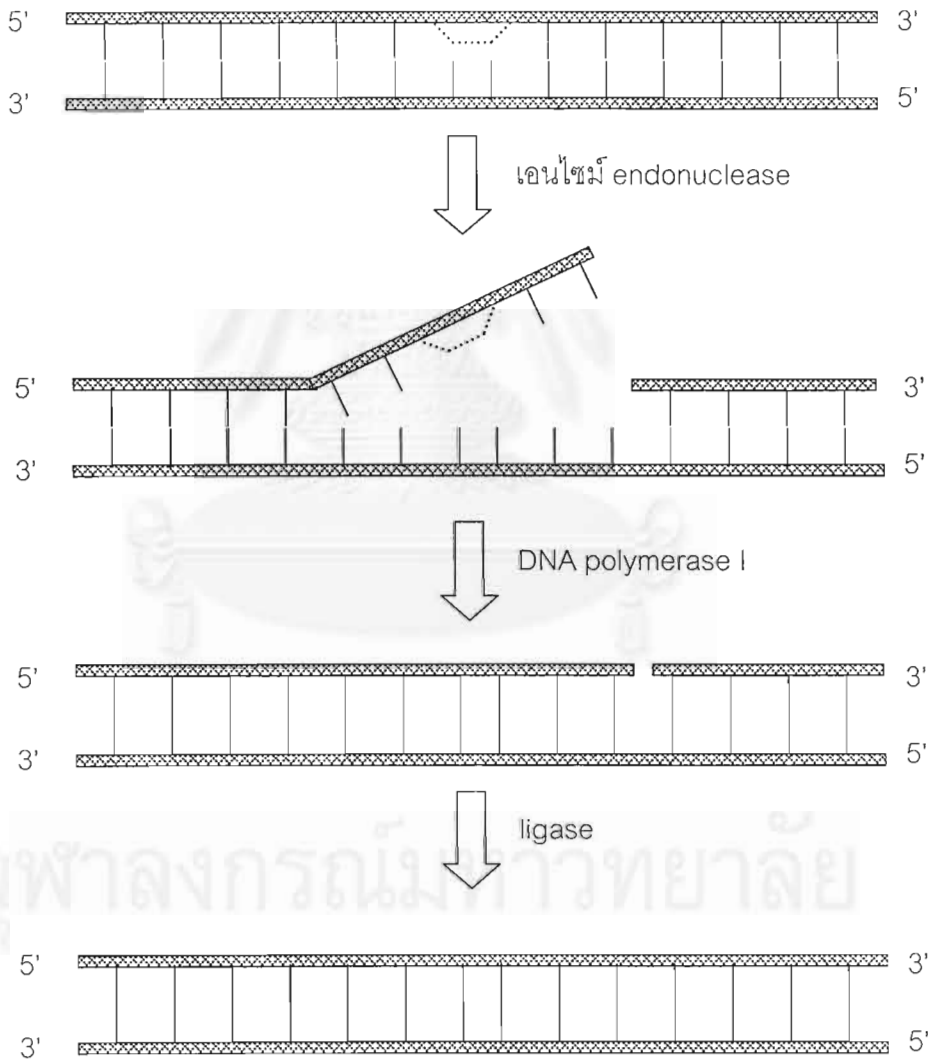
การเกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลต และทำให้เกิด thymine dimer ในสายโพลินิวคลีโอไทด์ขึ้น แต่สามารถแก้ไขให้ถูกต้องได้โดยกระบวนการซ่อมแซม ซึ่งกลไกการซ่อมแซม สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1) กลไกที่ต้องใช้แสง (photoreactivation) เป็นการซ่อมแซมความผิดปกติของโมเลกุลดีเอ็นเอ เช่น เมื่อเกิด thymine dimer ขึ้น เอนไซม์ photoreactivating หรือเอนไซม์ DNA photolyase จะไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิด thymine dimer และเอนไซม์นี้จะดูดซับแสงสว่าง (visible light) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์นี้เข้าทำลายพันธะที่ยึดระหว่าง thymine ด้วยกัน ทำให้ thymine สามารถเข้าคู่กับ adenine ของสายตรงข้ามได้เหมือนเดิม หลังจากนั้นเอนไซม์นี้จะหลุดจากตำแหน่งดีเอ็นเอที่ผิดปกติ จะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม (Brown, 1993) ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 การซ่อมแซม thymine dimerโดยกลไกที่ต้องใช้แสง (Brown, 1993)

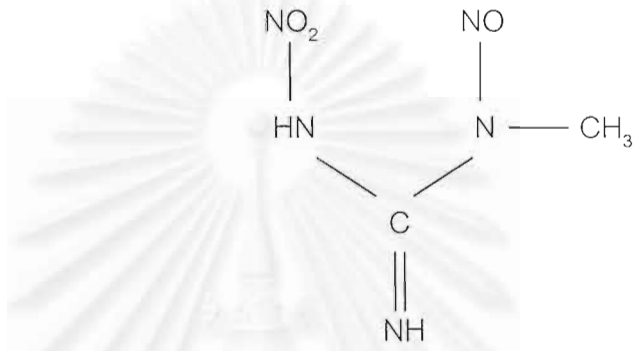
2) กลไกที่ไม่ต้องใช้แสง (dark repair) หรือ excision repair เป็นกระบวนการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ผิดปกติทั่วๆ ไป โดยจะมีการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่เสียหายหรือผิดปกติออกไปโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ และจะมีการสร้างส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องแทนส่วนที่ถูกตัดออก เช่น หากเกิด thymine dimer ขึ้น จะมีเอนไซม์ endonuclease ไปจับกับ thymine dimer และตัดพันธะระหว่างน้ำตาลและฟอสเฟต หลังจากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase I จะทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องบริเวณช่องว่างที่ถูกตัดออกไปให้สมบูรณ์และเอนไซม์ ligase จะเชื่อมต่อดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นกับดีเอ็นเอสายเดิม (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2541) ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การซ่อมแซมโดยกลไกที่ไม่ต้องใช้แสง (Devlin, 1982)

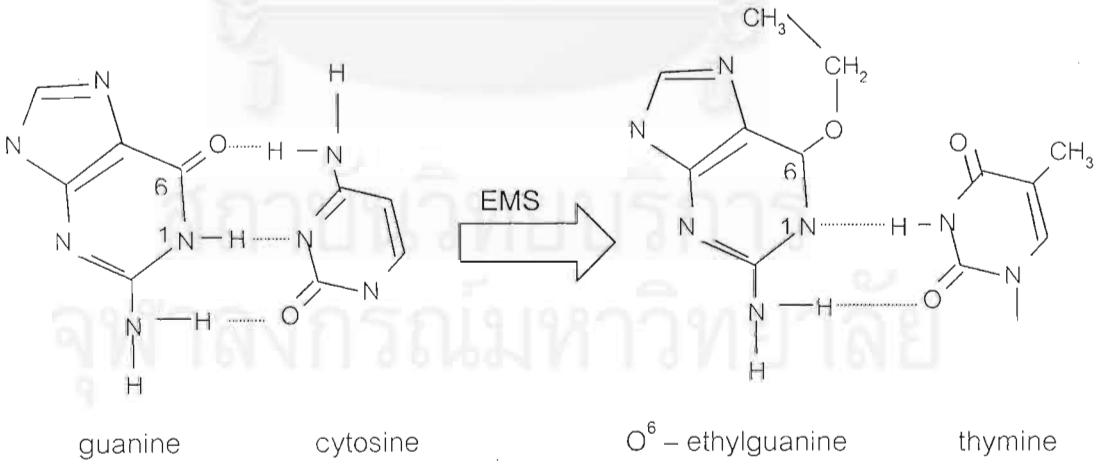
การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้สาร NTG

N – methyl – N' - nitro - N – nitrosoguanidine หรือ NTG (รูปที่ 8) เป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating agent ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยจะไปเติมหมู่เมธิล (methyl) ให้กับเบสบางตัว ซึ่งเป็นผลให้สูตรโครงสร้างของเบสนั้นเปลี่ยนไป การจับคู่เบสเมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้นใหม่เกิดผิดปกติ เช่น สาร EMS เป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating agent ซึ่งจะเกิดปฏิกริยาคล้ายกับสาร NTG แต่จะเติมหมู่เอธิล (ethyl) แทน (รูปที่ 9) (Goodenough, 1978)



N – methyl – N' - nitro - N – nitrosoguanidine (NTG)

รูปที่ 8 โครงสร้างของ NTG (Fincham และ Day, 1971)



รูปที่ 9 กลไกการเกิดมิวเตชันโดยสารในกลุ่ม alkylating agent (Goodenough, 1978)

มิวแตนท์ที่นิยมใช้ศึกษาทางพันธุศาสตร์ (Brown, 1992)

ในการเกิดมิวเตชันนั้น บางครั้งลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) นั้นจะไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากเกิดมิวเตชันในบริเวณของยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะฟีโนไทป์ จึงต้องมีการตรวจสอบมิวแตนท์โดยวิธีอื่น นอกเหนือจากการดูลักษณะฟีโนไทป์ ซึ่งมิวแตนท์ที่นิยมใช้ศึกษาทางพันธุศาสตร์ มีดังต่อไปนี้

1. Auxotrophic mutants มิวแตนท์ชนิดนี้จะขาดยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารที่จำเป็นในการเจริญ เช่น กรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม มิวแตนท์ชนิดนี้สามารถเจริญได้ หากมีการเติมสารอาหารที่ต้องการลงในอาหาร

2. Condition – lethal mutants มิวแตนท์ชนิดนี้จะสามารถเจริญได้แต่ในภาวะที่เฉพาะเท่านั้น เช่น temperature – sensitive mutants ซึ่งจะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้น และจะตายหากอุณหภูมิสูงกว่านั้น

3. Antibiotics resistance mutants มิวแตนท์ชนิดนี้จะสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ได้ ซึ่งโดยปกตินั้นยาปฏิชีวนะจะฆ่าสายพันธุ์ wild – type ซึ่งการต้านทานนี้เกิดเนื่องจาก โมเลกุลที่เป็นเป้าหมายของยาปฏิชีวนะนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลง

4. Regulatory mutants มิวแตนท์ชนิดนี้จะสูญเสียความสามารถในการควบคุมการแสดงออก (expression) ของยีนหรือโอเปอรอน (operon) เช่น ปกติใน *E.coli* ยีน lac operon จะไม่แสดงออกเมื่อขาดแลคโตส (lactose) เพราะ repressor จะไปจับกับ operator ทำให้ operon ปิด จึงไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยแลคโตสได้ แต่หากเกิดมิวเตชันกับยีนที่ผลิต repressor ทำให้ repressor นั้นมีโครงสร้างที่ผิดปกติไป ทำให้ไม่สามารถจับกับ operator ได้ เพราะฉะนั้น lac operon ก็จะเปิดและมีการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยแลคโตสอย่างสม่ำเสมอ แม้ว่าในระบบจะไม่มีแลคโตสก็ตาม

มิวแตนท์ที่นิยมใช้ศึกษางานวิจัยทางด้านพันธุศาสตร์นั้นคือ auxotrophic mutant แต่เนื่องจาก auxotrophic mutant จะมีวิธีการคัดเลือกที่ยุ่งยาก เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก ซึ่งการคัดเลือก resistance mutant จะสามารถทำได้ง่ายกว่า auxotrophic mutant (Li และ Chang, 1991)

ผลงานการค้นคว้าวิจัยการชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ด

Kiguchi และ Yanagi (1985) ทำการชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ด *C. macrorhizus* โดยใช้สปอร์ไม่อาศัยเพศ (oidia) ฉายแสงอัลตราไวโอเลทเป็นเวลา 60 วินาที ได้ auxotrophic mutant ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ มีความต้องการสารต่างๆ ในการเจริญเติบโต ดังนี้ 1 สายพันธุ์ ต้องการกรดอะมิโนเมไธโอนีน และ 2 สายพันธุ์ ต้องการกรดอะมิโนซีสเตไทโอนีน Mukherjee และ Sengupta (1986) ศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเตชันใน *V. volvacea* โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลท และ NTG จากงานวิจัยนี้ได้ลักษณะ morphological mutant จากลักษณะโคโลนีสีขาวเป็นสีเหลืองเส้นใยมีลักษณะแคบ และ auxotrophic mutant ที่ต้องการอะดินีน (adenine) ในการเจริญ จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลทให้กับโปรโตพลาสต์จากเส้นใย เป็นเวลา 10 นาที ส่วนการใช้ NTG พบว่าโปรโตพลาสต์ของ *V. volvacea* จะตายเป็นจำนวนมาก เมื่อใช้ NTG ความเข้มข้น 15 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 และ 2 นาที ตามลำดับ และไม่สามารถแยกลักษณะ morphological mutant หรือ auxotrophic mutant ได้ Ohmasa (1986) ทำการชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ด *P. ostreatus* โดยใช้ชิ้นส่วนของเส้นใยกับ NTG ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ auxotrophic mutant 2 สายพันธุ์ คือ ต้องการยูราซิล (uracil) และต้องการกรดอะมิโนเมไธโอนีนในการเจริญ Toyomasu Matsumoto และ Mori (1986) ศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ด 2 สายพันธุ์ *คือ P. ostreatus* และ *P. salmoneo – stramineus* โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลทให้กับโปรโตพลาสต์ เป็นเวลา 30 – 60 วินาที สามารถแยก auxotrophic mutant ของ *P. ostreatus* ต้องการฮีสติดีนในการเจริญ และ auxotrophic mutant ของ *P.salmoneo – stramineus* ต้องการไอโซลูซีนกับเวลีนในการเจริญ Barroso Thi - Mai และ Labarere (1988) ชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลทในเห็ดฟาง (*V. volvacea*) โดยใช้สปอร์อาศัยเพศผ่านแสงอัลตราไวโอเลทด้วยอัตรา 120 จูลต่อตารางเมตร สามารถแยกมิวแตนท์ที่มีลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) และเตตตราไซคลิน (tetracycline) ได้

ในปี ค.ศ. 1989 Labarere Noel และ Imbernon ได้คัดเลือกมิวแตนท์ที่มีลักษณะต้านทานยา ปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล และพาโรโมไมซิน (paromomycin) ใน *Agrocybe aegerita* โดยทำการคัดเลือกมิวเตชันที่เกิดเองตามธรรมชาติ และจากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลทกับสปอร์อาศัยเพศ Li และ Chang (1991) คัดเลือกลักษณะต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทและมาลาไคกรีน โดยทำการคัดเลือกจากมิวเตชันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และจากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลท ในเส้นใยที่ผ่านกระบวนการบดอย่างละเอียด และสปอร์อาศัยเพศของ *V. volvacea* พบว่า สามารถคัดเลือกลักษณะมิวแตนท์ที่เกิดขึ้นเองตาม

ธรรมชาติ มีลักษณะต้านทานต่อมาลาไคกรีน 1 สายพันธุ์ และลักษณะ มิวแตนท์ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลท เป็นเวลา 60 วินาที ได้ลักษณะที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลต 1 สายพันธุ์ และมาลาไคกรีน 3 สายพันธุ์

Mukherjee และ Sengupta (1992) ศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเตชันใน *T. clypeatus* โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลท และ NTG กับโปรโตพลาสต์ พบว่า การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลทหรือ NTG เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งอย่างเดียว จะไม่เกิด auxotropic mutant แต่การชักนำให้เกิดมิวเตชันสองขั้นตอน (double step mutation) โดยการเลี้ยงเส้นใยบนอาหารแข็งที่มี NTG ความเข้มข้น 0.39 มิลลิโมล เป็นเวลา 10 – 12 วัน หลังจากนั้น นำเส้นใยมาทำโปรโตพลาสต์แล้วฉายแสงอัลตราไวโอเลท เป็นเวลา 10 นาที เกิดลักษณะ auxotrophic mutant ที่ต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญหลายชนิด (multiple auxotrophic mutant) 3 สายพันธุ์ คือ ต้องการ pantothenic acid biotin และ thiamine / ต้องการ adenine hypoxanthine และ guanine / ต้องการ pantothenic acid biotin thiamine methionine และ isoleucine

Dhalival Garcha และ Khanna (1992) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ *P. florida* เพื่อใช้ผลิต laccase โดยการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วย NTG ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับโปรโตพลาสต์จากเส้นใย พบว่า มิวแตนท์ที่ได้สามารถให้ผลผลิต laccase ได้สูงขึ้น

Matsumoto และ Fukumasa-Nakai (1994) ได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยการบ่มสปอร์อาศัยเพศในอาหารที่มีแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) 3.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถแยกมิวแตนท์ที่มีลักษณะการต้านทานต่อคลอแรมฟินิคอลใน *P. ostreatus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลท รุ่น D – 6900 ของบริษัท Heidelberg, Germany
2. เครื่องบดอย่างละเอียด (homogenizer) รุ่น Vertis Model 23 ของบริษัท VirTis Company, U.S.A
3. กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscopes) รุ่น Wilover S ของบริษัท Hund, Germany
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น NovaSpce4049 ของบริษัท LKB Biochrom, England
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Universal16 ของบริษัท Hettich, Germany
6. เครื่องชั่ง (balance) แบบละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น 80A-200M ของบริษัท Precisa, Switzerland
7. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ของบริษัท Brand, Germany
8. micrometer ของบริษัท Nikon, Japan

เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. เชื้อจากเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เคมีภัณฑ์

1. อาหารแข็ง PDA (potato dextrose agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
2. อาหารเหลว PDB (potato dextrose broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
3. สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A
4. สารละลายไนสเตติน (nystatin) ของบริษัท E.R. Squibb and Sons, U.S.A
5. คริสตัลไวโอเลท (crystal violet) ของบริษัท E.MERCK, Germany
6. น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
7. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate :KH_2PO_4) ของบริษัท May and Baker Laboratory, England

8. แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate : $MgSO_4$) ของบริษัท May and Baker Laboratory, England

9. โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium hydrogen phosphate: K_2HPO_4) ของบริษัท May and Baker Laboratory, England

10. ไทมีน (thiamine - HCl) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A

11. เปปโตน (bacto – peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A

12. ผงสกัดยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A

13. วุ้นผง (agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A

14. แอนโทรน (anthrone : $C_{14}H_{10}O$) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A

15. กรดซัลฟุริกเข้มข้น (conc. sulfuric : H_2SO_4) ของบริษัท J.T. Baker Chemical, U.S.A

16. แป้ง (soluble starch BHD.) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A

17. N–methyl–N'–nitro–N–nitrosoguanidine (NTG) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A

18. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium hydrogen phosphate: Na_2HPO_4) ของ บริษัท May and Baker Laboratory, England

19. Tri (hydroxymethyl – aminomethane) ของบริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

20. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate: $(NH_4)_2SO_4$) ของ บริษัท May and Baker Laboratory, England

21. เฟอรัสซัลเฟต (ferrous sulfate: $FeSO_4$) ของ บริษัท May and Baker Laboratory, England

22. แคลเซียมไนเตรด (calsium nitrate: $Ca(NO_3)_2$) ของ บริษัท May and Baker Laboratory, England

23. DNA มาตรฐาน (deoxyribonucleic acid from Calf Thymus) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

24. ไดเฟนีลามีน (diphenylamine) ของ บริษัท May and Baker Laboratory, England

25. กรดน้ำส้ม (glacial acetic acid) ของบริษัท E.MERCK, Germany

26. อเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) ของ BDH Laboratory Chemicals, England

27. กรดเพอคลอริค (perchloric acid 70 %) ของบริษัท J.T. Baker Chemical, U.S.A

28. ไดเอธิล อีเธอร์ (diethyl ether) ของบริษัท J.T. Baker Chemical, U.S.A

ก) สายพันธุ์ MUG 003

ข) สายพันธุ์ MUG 004

รูปที่ 10 ลักษณะดอกเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ที่ใช้ในการทดลอง

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากดอกเห็ดสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG004 (รูปที่ 10) เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) ศึกษาอัตราการเจริญของเห็ดหมื่นปีทั้งสองสายพันธุ์ โดยเลี้ยงเส้นใยสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ในอาหารเหลว PDBปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ต้องเขย่า เก็บเส้นใยทุก 2 วัน นำเส้นใยที่ได้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักแห้ง เขียนกราฟระหว่างน้ำหนักแห้งของเส้นใยกับระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ

2. หาภาวะที่เหมาะสมเพื่อการชักนำให้เกิดมิวเตชัน

ศึกษาเพื่อหาเซลล์เดี่ยว เพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดมิวเตชัน

2.1 การใช้สปอร์ไม่อาศัยเพศ (oidia)

นำเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 เลี้ยงบนอาหารแข็ง LcA (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตการสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศ ทุกๆ 3 วัน

2.2 การใช้สปอร์อาศัยเพศ (basidiospore)

2.2.1 การทำ heat shock

นำสารละลายสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ความเข้มข้น 10^8 – 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการงอกทุกๆ 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2.2 การเลี้ยงร่วมกับยีสต์

นำสารละลายสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ความเข้มข้น 10^8 – 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง PDA ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง เขี่ยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยเขี่ยเชื้อยีสต์ยาว 3.5 เซนติเมตร จำนวน 3 เส้น บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส สังเกตการงอกทุกๆ 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3 การทำเส้นใยให้เป็นเซลล์เดี่ยว

นำเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 เลี้ยงบนอาหารเหลว PDB โดยไม่ต้องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4, 6 และ 8 วัน นำมาบดอย่างละเอียดที่ความเร็วรอบ 2300, 4600 และ 6900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5, 10, 15 และ 20 นาที ดูความละเอียดของเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำเส้นใยที่บดอย่างละเอียดแล้ว มากรองด้วยผ้ากรองขนาดรู 400 μ , 200 μ และ 50 μ หลังจากนั้น นำมาตรวจดูจำนวนเซลล์เดี่ยวที่เกิดขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขนาดหัว x40 และนับจำนวนเซลล์ด้วย haemacytometer

3. การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และทำ survival curve

ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เพื่อจัดทำ survival curve

3.1 การฉายแสงอัลตราไวโอเลท

3.1.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 6 วัน ซึ่งอยู่ในระยะ log phase นำเส้นใยบดอย่างละเอียดด้วยความเร็ว 6200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านผ้ากรองขนาด 50 μ หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์เดี่ยวที่ได้ไปเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง PDA

3.1.2 การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลท

นำเชื้อที่เตรียมได้มาฉายแสงอัลตราไวโอเลท กับหลอด UV ระยะห่าง 22 เซนติเมตร (Mukherjee และ Sengupta, 1986) ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 วินาที ทำ 3 ซ้ำ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด 7 - 10 วัน นำมานับจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิต เขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดกับเวลาที่ฉายแสง เพื่อหา survival curve

3.2 การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG

นำเซลล์เดี่ยวที่ผ่านการกรองด้วยผ้ากรองขนาดรู 50 μ จากข้อ 3.1.1 ของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 มาใส่สารละลาย NTG ที่เตรียมไว้ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 8.0 (ภาคผนวก ก) 2 ครั้ง นำสารละลายเส้นใยที่ได้มา

เกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง PDA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดกับความเข้มข้นของ NTG เพื่อหา survival curve

4. การหา genetic marker

ศึกษาโดยใช้ลักษณะการต้านทานต่อสารยับยั้งการเจริญ และลักษณะ prototroph – auxotroph เป็น genetic marker

4.1 หาความเข้มข้นของสารยับยั้งการเจริญ

ศึกษาเพื่อหา genetic marker โดยหาความต้านทานต่อสารยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์เดิม ด้วยการใส่สารยับยั้งการเจริญลงในอาหารแข็ง PDA ดังต่อไปนี้

4.1.1 สเตรปโตไมซิน (streptomycin)

ใส่สารละลายยับยั้งการเจริญเติบโตสเตรปโตไมซินลงในอาหารแข็ง PDA ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่เชื้อเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ลงไป สังเกตการเจริญเติบโต ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับความเข้มข้นของสารสเตรปโตไมซิน

4.1.2 ไนสเตติน (nystatin)

ใส่สารละลายยับยั้งการเจริญเติบโตไนสเตตินลงในอาหารแข็ง PDA ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 และ 1400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่เชื้อเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ลงไป สังเกตการเจริญเติบโต ทำ 3 ซ้ำ และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับความเข้มข้นของสารไนสเตติน

4.1.3 คริสตัลไวโอเลท (crystal violet)

ใส่สารละลายยับยั้งการเจริญเติบโตคริสตัลไวโอเลทลงในอาหารแข็ง PDA ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่เชื้อเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ลงไป สังเกตการเจริญเติบโต ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับความเข้มข้นของสารคริสตัลไวโอเลท

4.2 หา genetic marker โดยใช้ลักษณะ auxotroph - prototroph

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 บนอาหารชนิด minimal และอาหารชนิด complete (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตการเจริญ บันทึกผล

5. ชักนำให้เกิดมิวเตชัน และการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

ศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเตชันและคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงของ genetic marker

5.1 การชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลท

นำเส้นใยจากข้อ 2.3 ไปฉายแสงอัลตราไวโอเลท เป็นเวลา 25 วินาที หลังจากนั้นนำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่รอด และแยกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เพื่อทำ pure culture ของลักษณะมิวแตนท์ ทำการทดลอง 5 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

5.2 การชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยใช้สาร NTG

นำเส้นใยจากข้อ 2.3 ใส่สาร NTG ให้ความเข้มข้นเป็น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาหารเหลว เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 0.1 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 8.0 (ภาคผนวก ก) 2 ครั้ง นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่รอด และแยกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เพื่อทำ pure culture ของลักษณะมิวแตนท์ ทำ 5 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

5.3 การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

5.3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยแสงอัลตราไวโอเลท

นำโคโลนีจากข้อ 5.1 มาเลี้ยงบนอาหารสำหรับคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ (selective media) ดังนี้

ก. เลี้ยงสายพันธุ์มิวแตนท์บนอาหารแข็ง PDA ที่มีไนสเตติน (ทำตามข้อ 4.1.2) โดยคัดเลือกลักษณะการต้านทานไนสเตตินทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจดูโคโลนีที่รอด นำโคโลนีที่รอดมา subculture 3 ครั้ง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน หลังจากนั้น นำมาทดสอบการต้านทานต่อไนสเตตินอีกครั้ง

ข. เลี้ยงสายพันธุ์มิวแตนท์บนอาหารแข็ง PDA ที่มีคริสตัลไวโอเลท (ทำตามข้อ 4.1.3) โดยคัดเลือกลักษณะการต้านทานคริสตัลไวโอเลททำ 3 ซ้ำ ตรวจดูโคโลนีที่รอด นำโคโลนีที่รอดมา subculture 3 ครั้ง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน หลังจากนั้น นำมาทดสอบการต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทอีกครั้ง

ค. เลี้ยงสายพันธุ์มิวแตนท์บนอาหารแข็ง minimal media และ complete media (ทำตามข้อ 4.2) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตการเจริญ

5.3.2 <u>การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG</u>

นำโคโลนีจากข้อ 5.2 มาเลี้ยงบนอาหารสำหรับคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ ดังนี้

ก. เลี้ยงสายพันธุ์มิวแตนท์บนอาหารแข็ง PDA ที่มีไนสเตติน (ทำตามข้อ 4.1.2) โดยคัดเลือกลักษณะการต้านทานไนสเตตินทำ 3 ซ้ำ ตรวจดูโคโลนีที่รอด นำโคโลนีที่รอดมา subculture 3 ครั้ง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน หลังจากนั้น นำมาทดสอบการต้านทานต่อไนสเตตินอีกครั้ง

ข. เลี้ยงสายพันธุ์มิวแตนท์บนอาหารแข็ง PDA ที่มีคริสตัลไวโอเลท (ทำตามข้อ 4.1.3) โดยคัดเลือกลักษณะการต้านทานคริสตัลไวโอเลททำ 3 ซ้ำ ตรวจดูโคโลนีที่รอด นำโคโลนีที่รอดมา subculture 3 ครั้ง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน หลังจากนั้น นำมาทดสอบการต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทอีกครั้ง

ค. เลี้ยงสายพันธุ์มิวแตนท์บนอาหารแข็ง minimal media และ complete media (ทำตามข้อ 4.2) ทำ 3 ซ้ำ สังเกตการเจริญ

6. เปรียบเทียบสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

เปรียบเทียบสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ ได้แก่ ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

6.1 เปรียบเทียบปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อ DNA

6.1.1 <u>การหาปริมาณโปลีแซคคาไรด์</u>

ก. นำเส้นใยสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้ทั้งหมด เลี้ยงบนอาหารเหลว PDB โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้น เก็บเส้นใยล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ใช้เส้นใยสด 10 กรัม เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร บดอย่างละเอียดด้วยเครื่องบดอย่างละเอียด ความเร็วรอบ 6,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นที่ความเร็ว 8,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test และเก็บตะกอนเพื่อใช้หาปริมาณดีเอ็นเอ

ข. เตรียมสารละลายแอนโทรน (ภาคผนวก ก) นำมาทดสอบหาประมาณโปลีแซคคาไรด์ โดยผสมกับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 1 มิลลิลิตร ให้เข้ากันดีกับสารละลายแอนโทรน 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 – 5 นาที สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 325 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบผลกับกราฟของสารละลายมาตรฐานจดบันทึกผล

6.1.2 การหาปริมาณ DNA

ก. นำตะกอนที่ได้จากข้อ 6.1.1ก มาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ หลังจากนั้น ล้างด้วย 95% เอธานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 4:1 (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แล้วล้างด้วยสารละลายอีเธอร์ต่อเอธานอล ในอัตราส่วน 1:3 (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แยกตะกอนที่ได้ครั้งสุดท้ายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 1.5 โมล กรดเพอคลอริค 10 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 8,000 g นาน 10 นาที แยกเฉพาะส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไดเฟนีลามีน รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ก)

ข. นำ 1 มิลลิลิตร ของส่วนใสที่สกัดได้มาเติมสารละลายไดเฟนีลามีน 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น วัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร หาปริมาณดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบผลกับกราฟสารละลายมาตรฐาน

6.2 เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย โดยศึกษาจากลักษณะต่างๆ ดังต่อไปนี้

6.2.1 ลักษณะและขนาดเซลล์ของเส้นใย

ทำการวางเซลโลเฟน (cellophane) ใกล้กับโคโลนีที่กำลังเจริญ รอจนกระทั่งเส้นใยงอกออกมาบนเซลโลเฟน นำเซลโลเฟนไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดหัว x40 ดูลักษณะเส้นใยสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์และ วัดขนาดของเซลล์ด้วยไมโครมิเตอร์ (micrometer)

6.2.2 ลักษณะโคโลนี

เลี้ยงเส้นใยสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์บนอาหารแข็ง PDAปริมาณ 10 มิลลิลิตร สังเกตดูลักษณะโคโลนี

6.2.3 สีของโคโลนี

เลี้ยงเส้นใยสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์บนอาหารแข็ง PDAปริมาณ 10 มิลลิลิตร สังเกตดูสีโคโลนี

6.2.4 การมี clamp connection

ทำการวางเซลโลเฟนใกล้กับโคโลนีที่กำลังเจริญ รอจนกระทั่งเส้นใยงอกออกมาบนเซลโลเฟน นำเซลโลเฟนไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดหัว x40 ตรวจดูลักษณะการมี clamp connection ของเส้นใย

6.2.5 อัตราการเจริญของเส้นใยเป็นเวลา 7 วัน

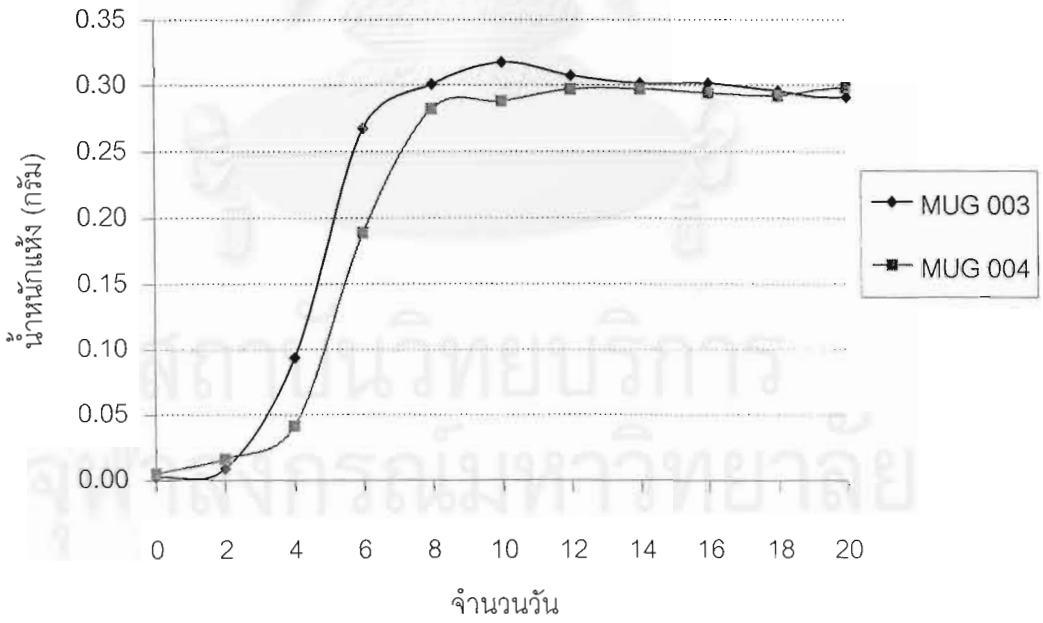
เลี้ยงเส้นใยสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ในอาหารเหลว PDBปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ต้องเขย่า เก็บเส้นใยทุก 2 วัน นำเส้นใยที่ได้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักแห้ง เขียนกราฟระหว่างน้ำหนักแห้งของเส้นใยกับระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*) จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ MUG 003และ MUG 004 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟการเจริญเติบโต พบว่า เส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จะมีอัตราการเจริญเติบโตระยะ log phase ในวันที่ 4 ถึง วันที่ 8 และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 10 ของการเจริญ ดังรูปที่ 11 จากการทดลองนี้ทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 เพื่อใช้ศึกษาชักนำให้เกิดมิวเตชันต่อไป



รูปที่ 11 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

2. หาภาวะที่เหมาะสมเพื่อการชักนำให้เกิดมิวเตชัน

2.1 การใช้สปอร์ไม่อาศัยเพศ

จากการศึกษาการสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG004 ที่เลี้ยงบนอาหาร LcA พบว่า ไม่มีการสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศเลย

2.2 การใช้สปอร์อาศัยเพศ

2.2.1 การทำ heat shock

จากการศึกษาการงอกของสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 โดยการนำจานอาหารที่มีสปอร์อาศัยเพศอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นบ่มที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ไม่มีการงอกของสปอร์อาศัยเพศ

2.2.2 การเลี้ยงร่วมกับยีสต์

จากการศึกษาการงอกของสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 โดยการนำจานอาหารที่มีสปอร์อาศัยเพศอยู่ เขี่ยเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* ยาว 3.5 เซนติเมตร จำนวน 3 เส้น บ่มที่อุณหภูมิ 25 , 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ไม่มีการงอกของสปอร์อาศัยเพศ

2.3 การทำเส้นใยให้เป็นเซลล์เดี่ยว

จากการที่นำเส้นใยมาบดอย่างละเอียดด้วยความเร็วต่างๆ กัน ทำให้ได้ปริมาณของเซลล์เดี่ยวต่างๆ กัน (ตารางที่ 1) เส้นใยเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 อายุ 6 วัน บดอย่างละเอียดตั้งแต่ความเร็วรอบ 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะพบเซลล์เดี่ยวมากที่สุด แต่ยังคงมีเส้นใยที่ไม่เป็นเซลล์เดี่ยวผสมอยู่ หลังจากกรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 400 μ, 200 μ และ 50 μ (ตารางที่ 2) พบว่า การกรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 50 μ จะพบแต่เส้นใยที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ซึ่งมีขนาดของเซลล์ 5.28 – 6.11 x 83.3 – 93.1 μ (รูปที่ 12)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวที่ได้จากการบดอย่างละเอียด ของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และสายพันธุ์ MUG 004

อายุเส้นใย (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	เวลาที่บด (นาที)	จำนวนิเซลล์เดี่ยว (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
			MUG 003	MUG 004
4	2,300	5	3×10^5	3×10^5
		10	3×10^5	3×10^5
		15	3×10^5	3.5×10^5
		20	4×10^5	4.5×10^5
	4,600	5	3×10^5	3×10^5
		10	3×10^5	3×10^5
		15	3.5×10^5	3.5×10^5
		20	1×10^6	2×10^6
	6,900	5	3.5×10^5	3.5×10^5
		10	4×10^5	4×10^5
		15	4×10^5	4×10^5
		20	1×10^6	1×10^6
6	2,300	5	7×10^5	9×10^5
		10	1×10^6	1×10^6
		15	1.5×10^6	1.2×10^6
		20	2×10^6	1.5×10^6
	4,600	5	7×10^5	7×10^5
		10	3×10^6	1×10^6
		15	2.5×10^6	1.5×10^6
		20	4×10^6	2×10^6
	6,900	5	9×10^5	9×10^5
		10	2.4×10^6	3.2×10^6
		15	2.4×10^6	2×10^6
		20	2.5×10^6	2.4×10^6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

อายุเส้นใย (วัน)	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	เวลาที่บด (นาที)	จำนวนเซลล์เดี่ยว (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
			MUG 003	MUG 004
8	2,300	5	0	0
		10	0	0
		15	3×10^5	2.5×10^5
		20	3.5×10^5	3.5×10^5
	4,600	5	0	0
		10	2.5×10^5	2.5×10^5
		15	3×10^5	3.5×10^5
		20	3×10^5	3×10^5
	6,900	5	0	0
		10	3.5×10^5	3.5×10^5
		15	3.5×10^5	3.5×10^5
		20	5×10^5	4.5×10^5

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวที่ได้หลังการกรอง ของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

ขนาดรูผ้ากรอง	จำนวนเซลล์เดี่ยว (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	MUG 003	MUG 004
ผ้าขนาดรู 400 μ	3×10^6	2.4×10^6
ผ้าขนาดรู 200 μ	2.5×10^6	2×10^6
ผ้าขนาดรู 50 μ	1.25×10^6	1×10^6

ก) ไม่กรองด้วยผ้ากรองขนาดรู 50 μ (x 40 x5)

ข) กรองด้วยผ้ากรองขนาดรู 50 μ (x 40 x5)

รูปที่ 12 เซลล์เดี่ยวจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี (ศรชี้) ที่ได้จากการบดอย่างละเอียด

3. การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และทำ survival curve

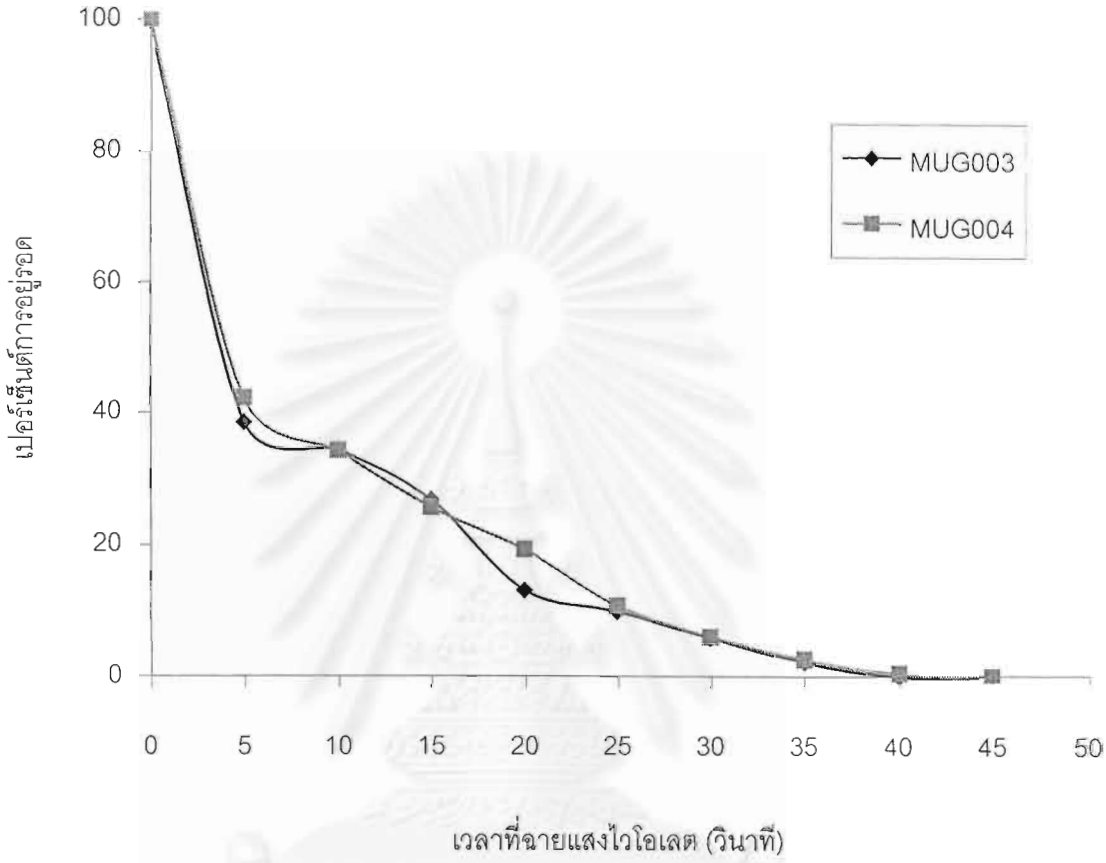
3.1 การฉายแสงอัลตราไวโอเลท

จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลทให้กับเซลล์เดี่ยวเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG004 ได้ผลดังตารางที่ 3 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลทกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ได้ ดังรูปที่ 13 เห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 10 % เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลท เป็นเวลา 25 วินาที ได้เซลล์เดี่ยวที่สามารถงอกได้ประมาณ 6 - 7 โคโลนี และ 7 – 8 โคโลนี ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ระยะเวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลทและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

เวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอแลต (วินาที)	เซลล์เดี่ยวที่สามารถงอกได้			
	MUG 003		MUG 004	
	จำนวนโคโลนี*	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด	จำนวนโคโลนี*	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด
0	67.00	100.00	70.65	100.00
5	25.85	38.58	29.80	42.18
10	23.00	34.33	24.15	34.18
15	18.00	26.87	17.15	24.27
20	8.85	13.20	13.65	19.32
25	6.65	9.93	7.65	10.83
30	4.00	5.97	4.30	6.09
35	1.50	2.24	1.80	2.55
40	0	0	0.30	0.42
45	0	0	0	0

* หมายเหตุ จำนวนโคโลนีเฉลี่ย จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลท 3 ซ้ำ



รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลทกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ของสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

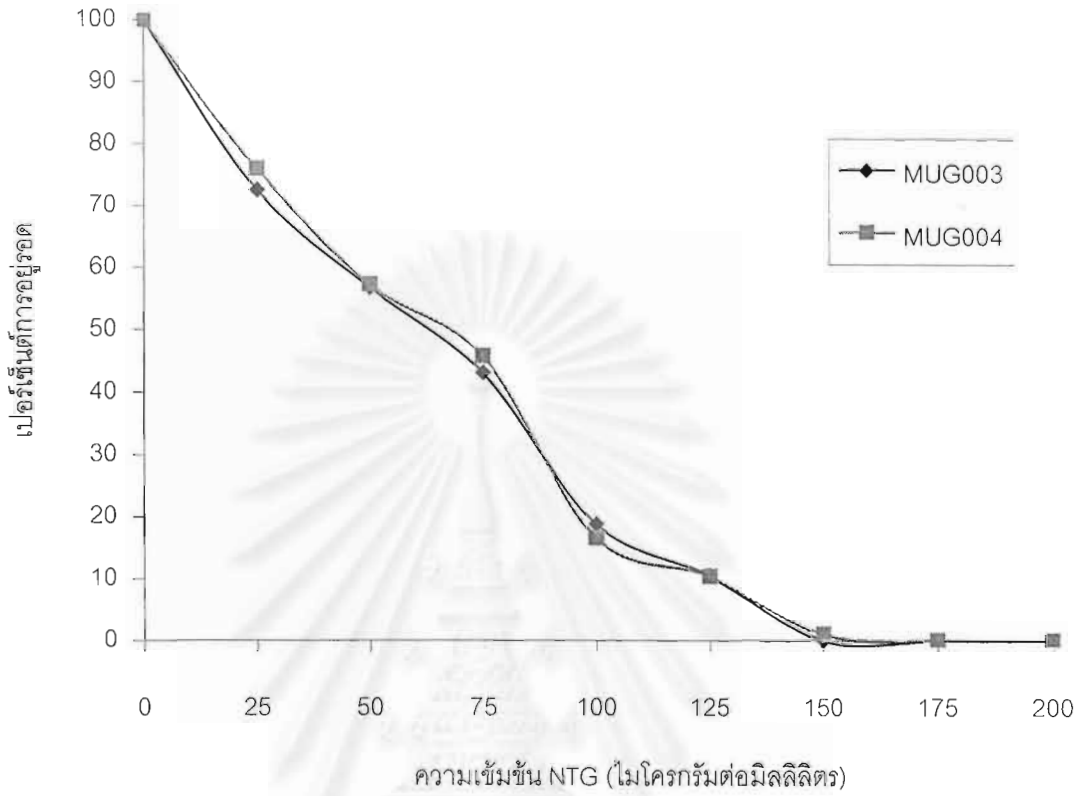
3.2 การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG

จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้สาร NTG กับเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ได้ผลดังตารางที่ 4 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NTG กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ได้ ดังรูปที่ 14 เห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 10 % เมื่อได้รับสาร NTG ที่ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที พบว่า เซลล์เดี่ยวที่สามารถงอกได้ประมาณ 6 – 7 โคโลนี ทั้งสองสายพันธุ์

ตารางที่ 4 ความเข้มข้น NTG และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

ความเข้มข้นสาร NTG (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เซลล์เดี่ยวที่สามารถงอกได้			
	MUG 003		MUG 004	
	จำนวนโคโลนี*	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด	จำนวนโคโลนี*	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด
0	63.34	100.00	64.00	100.00
25	46.00	72.62	48.66	76.03
50	36.00	56.84	36.66	57.28
75	27.34	43.16	29.34	45.84
100	12.00	18.95	10.66	16.66
125	6.66	10.51	6.66	10.41
150	0	0	0.66	1.03
175	0	0	0	0
200	0	0	0	0

* หมายเหตุ จำนวนโคโลนีเฉลี่ย จากการใช้สาร NTG 3 ซ้ำ



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NTG กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ของสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การหา genetic marker

4.1 การหาความเข้มข้นของสารละลายที่ยับยั้งการเจริญ

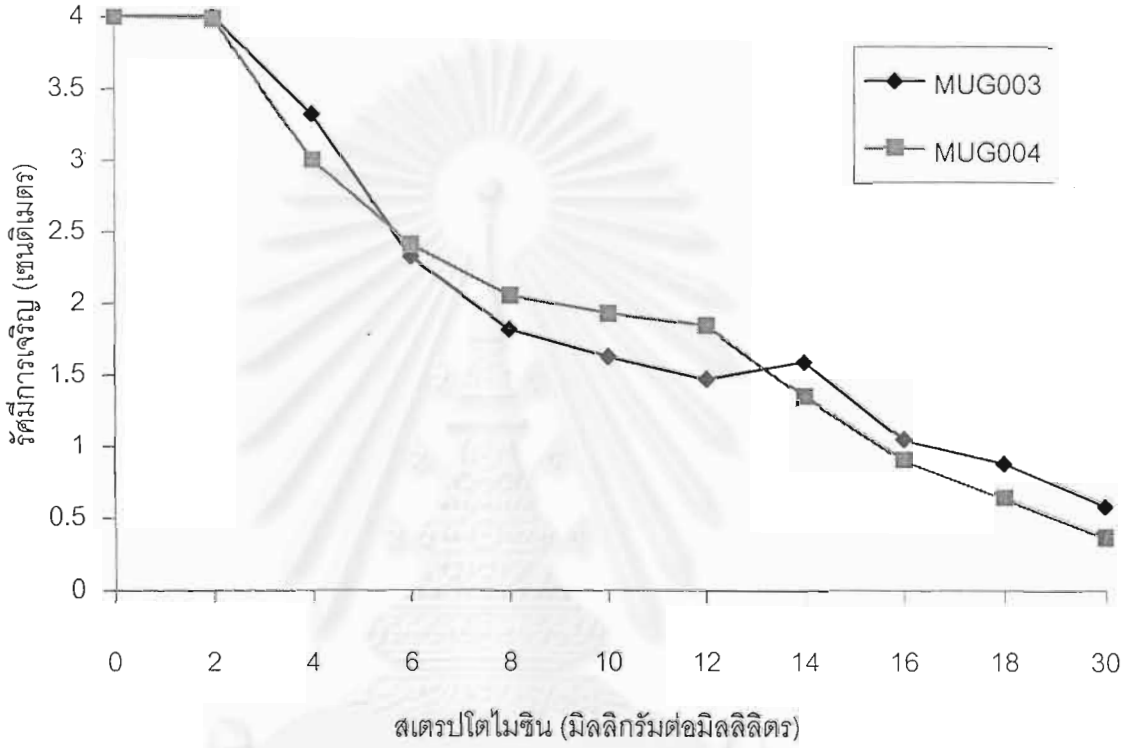
ใช้ลักษณะการยับยั้งการเจริญของสารละลายต่างๆ โดยการนำมาหาความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายที่ยับยั้งการเจริญ ดังต่อไปนี้

4.1.1 สเตรปโตไมซิน

จากการเลี้ยงเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ในอาหารที่เติมสเตรปโตไมซิน ได้ผลดังตารางที่ 5 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสเตรปโตไมซินกับรัศมีการเจริญ ดังรูปที่ 15 สเตรปโตไมซินจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเห็ดหมื่นปีทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้อย่างสมบูรณ์ แม้ว่าใช้สเตรปโตไมซินที่ความเข้มข้นสูงถึง 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน ยังคงไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสเตรปโตไมซิน กับรัศมีการเจริญของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	รัศมีการเจริญ (เซนติเมตร)	
	MUG 003	MUG 004
0	4.00	4.000
2	4.00	3.983
4	3.325	3.000
6	2.325	2.408
8	1.817	2.050
10	1.625	1.925
12	1.467	1.842
14	1.592	1.342
16	1.042	0.900
18	0.883	0.633
30	0.587	0.384



รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสเตรปโตไมซินกับการเจริญของสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

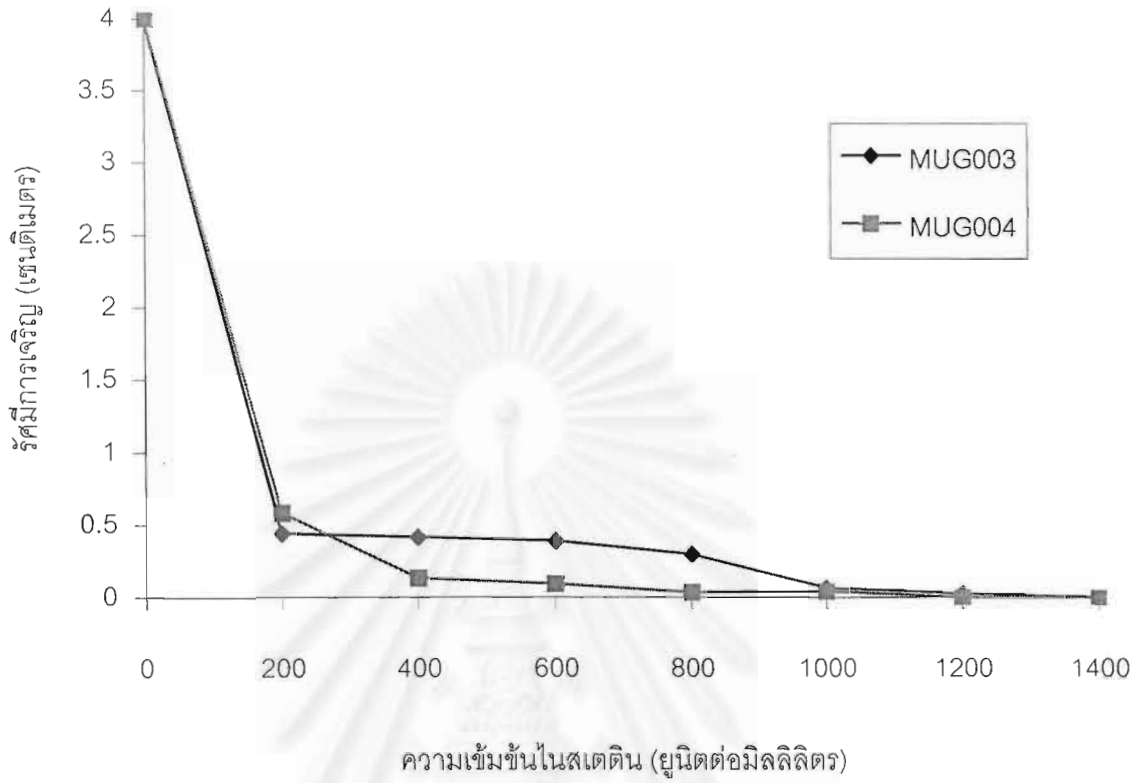
4.1.2 ไนสเตติน

จากการเลี้ยงเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ในอาหารที่มีไนสเตตินได้ผลดัง ตารางที่ 6 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของไนสเตตินกับรัศมีการเจริญ ได้ดังรูปที่ 16 ความเข้มข้นของไนสเตตินที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ ในสายพันธุ์ MUG 003 คือ 1,400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และในสายพันธุ์ MUG 004 คือ 1,200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนสเตตินกับรัศมีการเจริญ ของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

ความเข้มข้น	รัศมีการเจริญ (เซนติเมตร)	
(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	MUG 003	MUG 004
0	4.00	4.000
200	0.417	0.583
400	0.300	0.133
600	0.442	0.092
800	0.392	0.033
1000	0.067	0.042
1200	0.025	0
1400	0	0

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนสเตตินกับการเจริญของสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

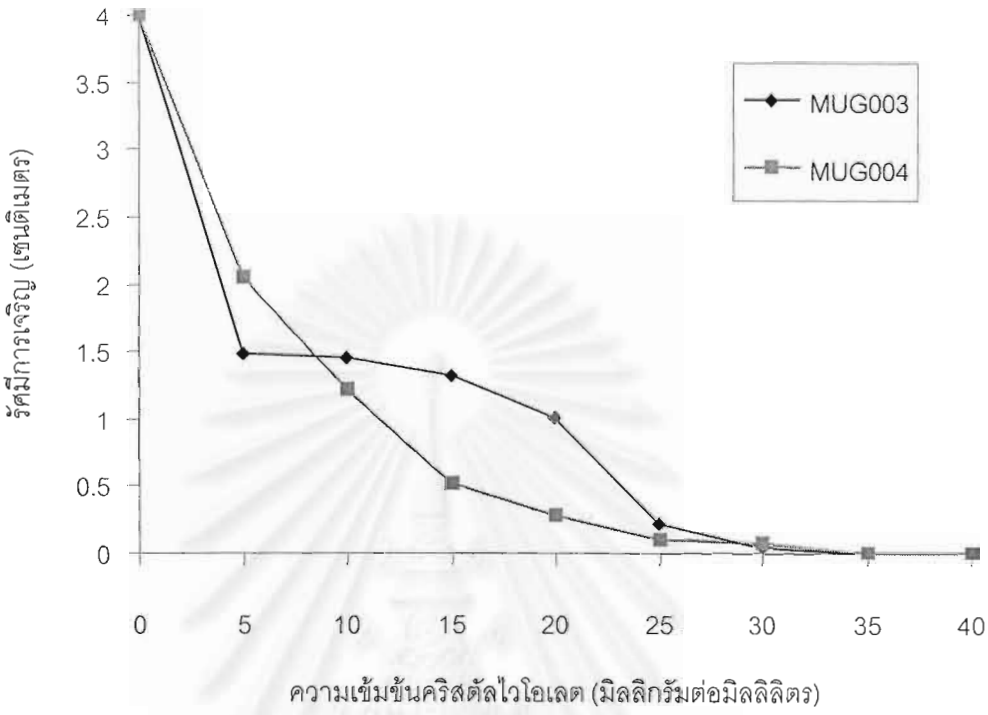
4.1.3 คริสตัลไวโอเลท

จากการเลี้ยงเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ในอาหารที่เติมคริสตัลไวโอเลท ได้ผลดังตารางที่ 7 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นคริสตัลไวโอเลทกับรัศมีการเจริญของทั้งสองสายพันธุ์ได้ดังรูปที่ 17 พบว่า ความเข้มข้นของคริสตัลไวโอเลทที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 คือ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคริสตัลไวโอเลทกับรัศมีการเจริญ ของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	รัศมีการเจริญ (เซนติเมตร)	
	MUG 003	MUG 004
0	4.000	4.000
5	1.483	2.050
10	1.458	1.225
15	1.317	0.525
20	1.017	0.283
25	0.217	0.108
30	0.050	0.075
35	0	0
40	0	0

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคริสตัลไวโอเลทกับการเจริญ ของสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 15 – 17 พบว่า อาหารที่มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 คือ อาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นของไนสเตตินเป็น 1,400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ อาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นของคริสตัลไวโอเลทเป็น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 นั้น พบว่าอาหารที่มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปี คือ อาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นของไนสเตติน 1,200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ อาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นของ คริสตัลไวโอเลทเป็น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้น จึงใช้ความเข้มข้นของสารละลายดังกล่าว เป็น genetic marker สำหรับการคัดเลือกมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG 003 และมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG 004

4.2 หา genetic marker โดยใช้ลักษณะ auxotroph – prototroph

จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 บนอาหาร minimal media และ complete media พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญได้ทั้งในอาหาร minimal media และ complete media แสดงว่าทั้งสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 เป็น prototroph

5. ชักนำให้เกิดมิวเตชัน และการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

5.1 การชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลท

จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยแสงอัลตราไวโอเลท เป็นเวลา 25 วินาที สามารถแยกโคโลนี ได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนโคโลนีที่แยกได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยแสงอัลตราไวโอเลท

สายพันธุ์	จำนวนโคโลนีที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลท*					รวม
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	
MUG 003	13	16	14	15	15	73
MUG 004	15	18	15	15	17	80

* หมายเหตุ จำนวนโคโลนีที่ได้ทั้งหมด จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลท 3 ซ้ำต่อครั้ง

จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลททั้งหมด 5 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ ได้จำนวนโคโลนีที่คาดว่าจะเป็นมิวแตนท์ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จำนวน 73 และ 80 โคโลนี ตามลำดับ

5.2 การชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG

จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยให้สาร NTG ที่ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที สามารถแยกโคโลนีได้ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 จำนวนโคโลนีที่แยกได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG

สายพันธุ์	จำนวนโคโลนีที่ได้จากการใช้สาร NTG*					รวม
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	
MUG 003	15	16	15	15	16	78
MUG 004	14	17	16	15	17	79

* หมายเหตุ จำนวนโคโลนีที่ได้ทั้งหมด จากการใช้สาร NTG 3 ซ้ำต่อครั้ง

จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยการใช้สาร NTG ทั้งหมด 5 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ ได้จำนวนโคโลนีที่คาดว่าจะเป็นมิวแตนท์ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จำนวน 78 และ 79 โคโลนี ตามลำดับ

5.3 การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

5.3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยแสงอัลตราไวโอเลท

นำโคโลนีที่คาดว่าเป็นมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลท แยกมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตติน ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท และตรวจสอบลักษณะ auxotroph-prototroph ได้ดังนี้

ก. ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อไนสเตตินได้ 18 และ 19 โคโลนี จากจำนวนทั้งหมด 75 และ 78 โคโลนี ตามลำดับ แต่หลังจากทดสอบความเสถียร โดยการ subculture 3 ครั้ง และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ที่ยังคงลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG004 เหลือเพียง 1 และ 2 โคโลนี ตามลำดับ ส่วน โคโลนีอื่นๆ นั้นไม่สามารถคงลักษณะที่ต้านทานต่อไนสเตตินได้ ดังตารางที่ 10

ข. ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทได้อีก 18 และ 17 โคโลนี จากจำนวนทั้งหมด 75 และ 78 โคโลนี ตามลำดับ แต่หลังจากทดสอบความเสถียร โดยการ subculture 3 ครั้ง และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ที่ยังคงลักษณะที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 อย่างละ 2 โคโลนี ส่วนโคโลนีอื่นๆ นั้นไม่สามารถคงลักษณะที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทได้ ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 จำนวน resistance mutant จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลท

สายพันธุ์	จำนวน resistance mutant ที่แยกได้ครั้งที่ 1		จำนวน resistance mutant ที่มีความเสถียร	
	ไนสเตติน	คริสตัลไวโอเลท	ไนสเตติน	คริสตัลไวโอเลท
MUG 003	18	18	1	2
MUG 004	19	17	5	2

จากตารางที่ 10 พบว่า จากโคโลนีที่คาดว่าเป็นมิวแตนท์ ซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยแสงอัลตราไวโอเลท (ตารางที่ 8) ในสายพันธุ์ MUG 003 ทั้งหมด 73 โคโลนี พบว่า แยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อไนสเตติน 18 โคโลนี และ resistance mutant ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทได้อีก 18 โคโลนี แต่หลังจากทดสอบความเสถียร โดยการ subculture 3 ครั้ง และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ที่ยังคง

ลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินเหลือเพียง 1 โคโลนี และ resistance mutant ที่ยังคงลักษณะที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทเหลือ 2 โคโลนี ส่วนโคโลนีอื่นๆ นั้นไม่สามารถคงลักษณะที่ต้านทานต่อสารยับยั้งได้ ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 พบว่า จากโคโลนีที่คาดว่าจะเป็นมิวแตนท์ 79 โคโลนี (ตารางที่ 8) สามารถแยก resistance mutant ที่มีลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินได้ 19 โคโลนี และ resistance mutant ที่มีลักษณะต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทอีก 17 โคโลนี หลังจากทดสอบความเสถียรแล้ว พบว่า resistance mutant ที่ยังคงลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินเหลือ 5 โคโลนี ส่วน resistance mutant ที่ยังคงลักษณะต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทเหลือ 2 โคโลนี ส่วนโคโลนีอื่นๆ นั้นไม่สามารถคงลักษณะที่ต้านทานต่อสารยับยั้งได้ นำสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ต้านทานต่อสารยับยั้งการเจริญและยังคงความเสถียร มาทำการใส่รหัส (ภาคผนวก ข)

ค. นำมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตตินและมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทที่มีความเสถียรมาทดสอบลักษณะ auxotroph-prototroph โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง minimal และอาหารแข็ง complete พบว่าทั้ง 10 โคโลนี สามารถเจริญได้ทั้งบนอาหารแข็ง minimal และ อาหารแข็ง complete แสดงว่ามิวแตนท์นั้นมีลักษณะเป็น prototroph

5.3.2 <u>การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG</u>

นำโคโลนีที่คาดว่าเป็นมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG แยกมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตตินต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท และตรวจสอบลักษณะ auxotroph-prototroph ได้ดังนี้

ก. ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อไนสเตตินได้ 3 และ 4 โคโลนี จากจำนวนทั้งหมด 78 และ 79 โคโลนี ตามลำดับ และหลังจากทดสอบความเสถียร โดยการ subculture 3 ครั้ง และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ทั้งหมดยังคงลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินทั้งในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ดังตารางที่ 11

ข. ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทได้อีก 2 และ 3 โคโลนี จากจำนวนทั้งหมด 78 และ 79 โคโลนี ตามลำดับ และหลังจากทดสอบความเสถียร โดยการ subculture 3 ครั้ง และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ทั้งหมดยังคงลักษณะที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลททั้งในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 จำนวน resistance mutant จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG

สายพันธุ์	จำนวน resistance mutant ที่แยกได้ครั้งที่ 1		จำนวน resistance mutant ที่มีความเสถียร	
	ไนสเตติน	คริสตัลไวโอเลท	ไนสเตติน	คริสตัลไวโอเลท
MUG 003	3	2	3	2
MUG 004	4	3	4	3

จากตารางที่ 11 พบว่า จากโคโลนีที่คาดว่าเป็นมิวแตนท์ ซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG (ตารางที่ 9) ในสายพันธุ์ MUG 003 ทั้งหมด 78 โคโลนี พบว่า แยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อไนสเตติน 3 โคโลนี และ resistance mutant ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท 2 โคโลนี หลังจากทดสอบความเสถียร โดยการ subculture 3 ครั้ง และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ทั้งหมดยังคงมีลักษณะการต้านทานต่อไนสเตตินเช่นเดิม ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 พบว่า จากโคโลนีที่คาดว่าจะเป็นมิวแตนท์ 79 โคโลนี (ตารางที่ 9) สามารถแยก resistance mutant ที่มีลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินได้ 4 โคโลนี และ resistance mutant ที่มีลักษณะต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท 3 โคโลนี หลังจากทดสอบความเสถียรแล้ว พบว่า resistance mutant ทั้งหมดยังคงมีลักษณะการต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทเช่นเดิม หลังจากนั้น นำสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ต้านทานต่อสารยับยั้งการเจริญและยังคงความเสถียรมาทำการใส่รหัส (ภาคผนวก ข)

ค. นำมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตตินและมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทที่มีความเสถียรมาทดสอบลักษณะ auxotroph-prototroph โดยเลี้ยงบนอาหาร minimal และ complete พบว่าทั้ง 12 โคโลนี สามารถเจริญได้ทั้งบนอาหารแข็ง minimal และ อาหารแข็ง complete แสดงว่ามิวแตนท์นั้นมีลักษณะเป็น prototroph

6. เปรียบเทียบสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

6.1 เปรียบเทียบปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อปริมาณดีเอ็นเอ

เมื่อนำสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์มาวิเคราะห์ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ ด้วยวิธี anthrone test หาปริมาณของดีเอ็นเอโดยไดฟีนีลามีนรีเอเจนต์ และหาอัตราส่วนระหว่างปริมาณโปลีแซคคาไรด์กับปริมาณดีเอ็นเอ ได้ดังตารางที่ 14 ซึ่งปริมาณโปลีแซคคาไรด์นั้นจะแตกต่างกันไป ในสายพันธุ์เดิมของ MUG 003 (003-wild type) และ MUG 004 (004-wild type) จะมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ 21.28 และ 16.89 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ สายพันธุ์มิวแตนท์ที่เกิดจากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์สูงสุด คือ 003-UV-cv_1 และ 004-UV-ny_3 มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ 33.78 และ 27.87 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยสาร NTG ที่ปริมาณโปลีแซคคาไรด์สูงสุด คือ 003-NTG-ny_3 และ 004-NTG-cv_1 มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ 21.03 และ 24.92 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนปริมาณดีเอ็นเอในสายพันธุ์เดิมของ MUG 003 (003-wild type) และ MUG 004 (004-wild type) จะมีปริมาณดีเอ็นเอ 3.72 และ4.39 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ สายพันธุ์มิวแตนท์ที่เกิดจากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่มีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด คือ 003-UV-ny_1 และ 004-UV-cv_2 มีปริมาณดีเอ็นเอ 3.65 และ 4.64 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยสาร NTG ที่ปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด คือ 003-NTG-cv_2 และ 004-NTG-ny_1 มีปริมาณดีเอ็นเอ 3.83 และ 4.57 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ

เมื่อนำมาคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอในสายพันธุ์เดิม MUG 003 และ MUG 004 มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ 5.72 และ 3.85 ตามลำดับ มิวแตนท์จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่มีอัตราส่วนปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงสุดคือ 003-UV-cv_1 และ 004-UV-ny_3 มีอัตราส่วนเป็น 10.73 และ 6.48 ตามลำดับ ส่วนมิวแตนท์จากการชักนำด้วยสาร NTG ที่มีอัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงสุดคือ 003-NTG-ny_3 และ 004-NTG-cv_1 มีอัตราส่วนเป็น 6.96 และ 5.59 ตามลำดับ

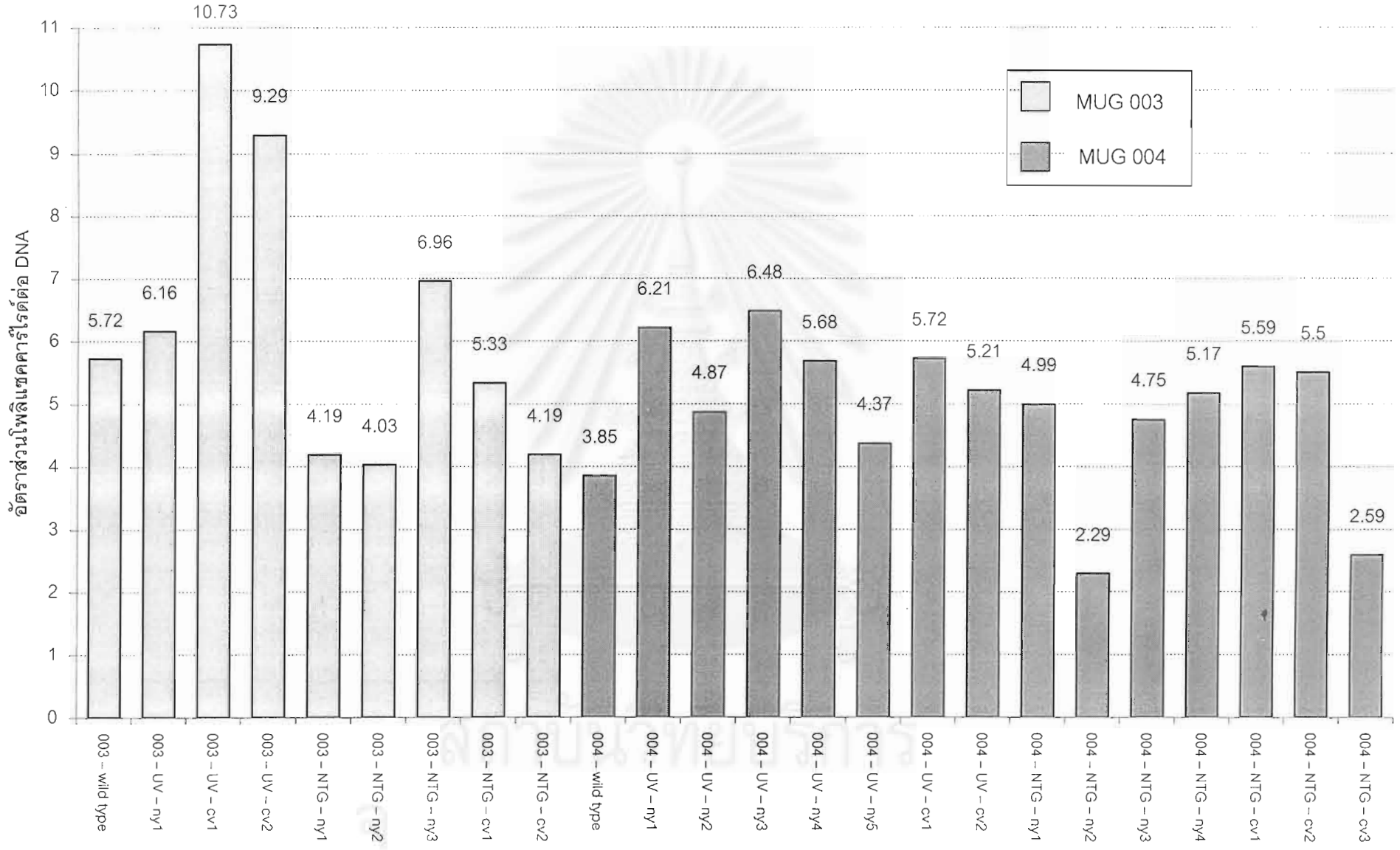
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ ปริมาณดีเอ็นเอและอัตราส่วนระหว่างโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอของสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์

สายพันธุ์	ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม)	ปริมาณ DNA (มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม)	อัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อ DNA
003 – wild type	21.28	3.72	5.72
003 – UV – ny_1	22.47	3.65	6.16
003 – UV – cv_1	33.78	3.15	10.73
003 – UV – cv_2	30.57	3.29	9.29
003 – NTG – ny_1	14.70	3.51	4.19
003 – NTG – ny_2	14.70	3.65	4.03
003 – NTG – ny_3	21.03	3.02	6.96
003 – NTG – cv_1	19.68	3.69	5.33
003 – NTG – cv_2	16.05	3.83	4.19
004 – wild type	16.89	4.39	3.85
004 – UV – ny_1	23.65	3.81	6.21
004 – UV – ny_2	20.61	4.23	4.87
004 – UV – ny_3	27.87	4.30	6.48
004 – UV – ny_4	24.32	4.28	5.68
004 – UV – ny_5	19.26	4.41	4.37
004 – UV – cv_1	25.93	4.53	5.72
004 – UV – cv_2	24.16	4.64	5.21
004 – NTG – ny_1	22.80	4.57	4.99
004 – NTG – ny_2	9.29	4.05	2.29
004 – NTG – ny_3	20.95	4.41	4.75
004 – NTG – ny_4	20.95	4.05	5.17
004 – NTG – cv_1	24.92	4.46	5.59
004 – NTG – cv_2	21.28	3.87	5.50
004 – NTG – cv_3	11.15	4.30	2.59

เขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนปริมาณโปลีแซคคาไรด์และปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์เดิมและของสายพันธุ์มิวแตนท์ได้ ดังกราฟรูปที่ 16 พบว่า ในสายพันธุ์ MUG 003 สายพันธุ์มิวแตนท์ทั้งหมดที่ได้จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท จะมีอัตราส่วนระหว่างโปลีแซคคาไรด์กับดีเอ็นเอสูงกว่าสายพันธุ์เดิม และสายพันธุ์มิวแตนท์ 003 – UV – cv_1 จะมีอัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงที่สุด คือมีค่า 10.73 แต่จากการชักนำด้วยสาร NTG พบสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีโปลีแซคคาไรด์สูงขึ้นเพียงสายพันธุ์เดียวคือ 003 – NTG – cv_1 จะมีค่า 5.33 นอกนั้นจะมีปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์เดิม ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 ซึ่งในสายพันธุ์เดิมนั้นจะมีอัตราโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมของ MUG 003 พบว่า สายพันธุ์มิวแตนท์ทั้งหมดที่ได้จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท จะมีอัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยสายพันธุ์มิวแตนท์ที่มีอัตราส่วน โปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงสุดคือ 004 – UV – ny_3 คือมีค่า 6.48 และสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยสาร NTG จะมีอัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงกว่าสายพันธุ์เดิมเกือบทั้งหมด ยกเว้นสายพันธุ์มิวแตนท์ 004 – NTG – ny_1 และ 004 – NTG – cv_3 เท่านั้นที่มีอัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอเป็น 4.99 และ 2.59 ซึ่งต่ำกว่าในสายพันธุ์เดิม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



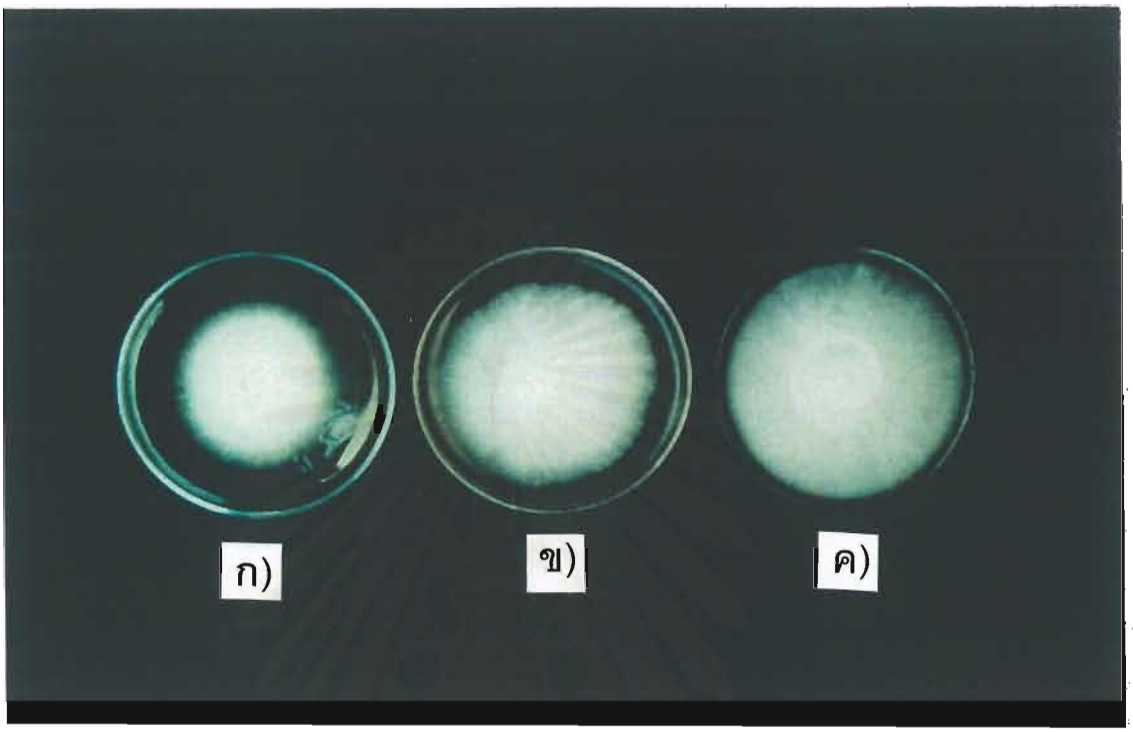
รูปที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์

6.2 เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย โดยดูขนาดเซลล์เส้นใย ลักษณะเส้นใย ลักษณะโคโลนี (รูปที่ 19) สีโคโลนี และการมี clamp connection ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์

สายพันธุ์	ขนาดเซลล์เส้นใย กว้าง x ยาว (μ)	ลักษณะเส้นใย	ลักษณะโคโลนี	สีโคโลนี	การมี clamp connection
003 - wild type	5.28 x 83.3	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
003 – UV – ny_1	6.11 x 84.7	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
003 – UV – cv_1	5.28 x 91.7	เรียวยาว	ฟูเล็กน้อย	ขาว	มี
003 – UV – cv_2	4.72 x 93.1	เรียวยาว	ฟูเล็กน้อย	ขาว	มี
003 – NTG – ny_1	5.56 x 84.7	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
003 – NTG – ny_2	5.00 x 91.7	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
003 – NTG – ny_3	5.56 x 90.3	เรียวยาว	ฟูเล็กน้อย	ขาว	มี
003 – NTG – cv_1	5.28 x 88.9	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
003 – NTG – cv_2	5.28 x 97.2	เรียวยาว	ฟู	ขาว	มี
004 – wild type	6.11 x 93.1	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – UV – ny_1	5.83 x 88.9	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – UV – ny_2	5.83 x 93.1	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – UV – ny_3	5.56 x 91.7	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – UV – ny_4	5.56 x 84.7	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – UV – ny_5	5.28 x 98.6	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – UV – cv_1	6.11 x 95.8	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – UV – cv_2	5.00 x 93.1	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – NTG – ny_1	5.28 x 95.8	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – NTG – ny_2	5.00 x 90.3	เรียวยาว	ฟู	ขาว	มี
004 – NTG – ny_3	5.56 x 90.3	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – NTG – ny_4	5.83 x 83.3	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – NTG – cv_1	5.28 x 97.2	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – NTG – cv_2	6.11 x 91.7	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี
004 – NTG – cv_3	5.00 x 93.1	เรียวยาว	เรียบ	ขาว	มี



รูปที่ 19 ลักษณะโคโลนีแบบต่างๆ ของสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์

ก) ลักษณะโคโลนีเรียบ : 003-wild type, 003–UV–ny_1, 003–NTG–ny_1, 003–NTG–ny_2, 003-NTG-cv_2, 004-wildtype, 004-UV-ny_1, 004-UV-ny_2, 004-UV-ny_3, 004-UV-ny_4, 004-UV-ny_5, 004-UV-cv_1, 004-UV-cv_2, 004-NTG-ny_1, 004-NTG-ny_3, 004-NTG-ny_4, 004-NTG-cv_1, 004-NTG-cv_2 และ 004-NTG-cv_3

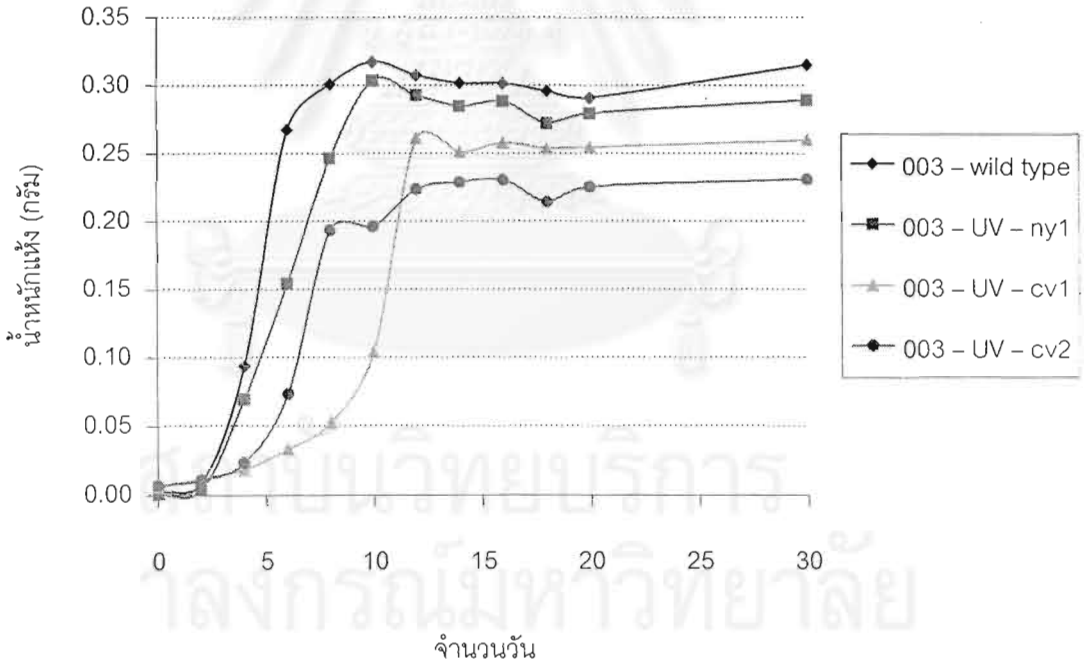
ข) ลักษณะโคโลนีฟูเล็กน้อย : 003–UV–cv_1, 003–UV–cv_2 และ 003-NTG-ny_3

ค) ลักษณะโคโลนีฟู : 003-NTG-cv_2 และ 004-NTG-ny_2

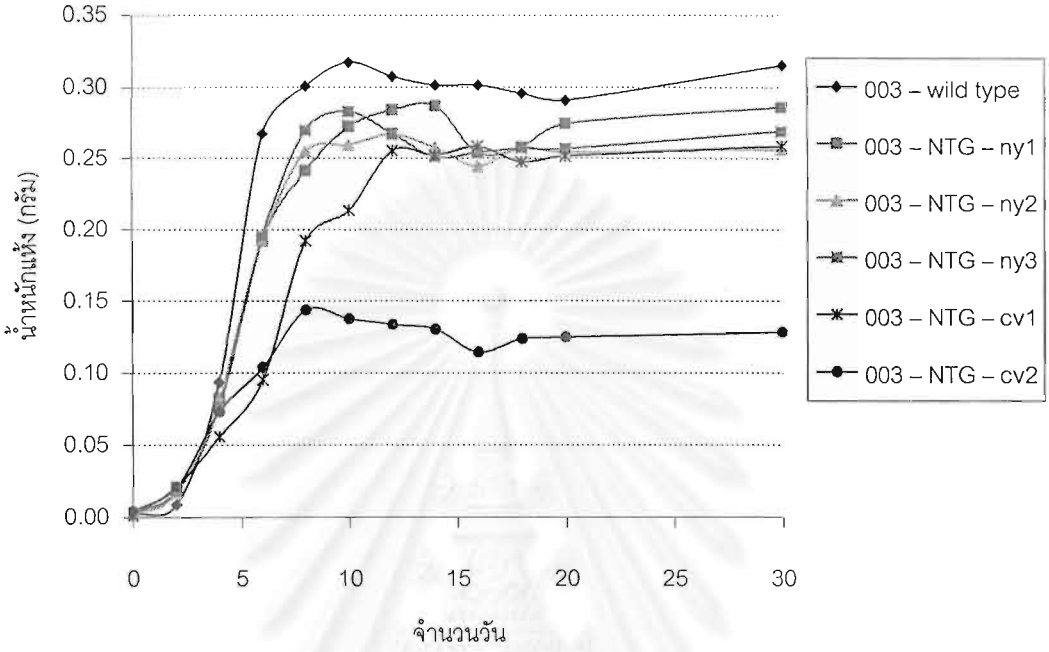
รูปที่ 20 ลักษณะ clamp connection ของเส้นใยเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ (x100 x5)

จากตารางที่ 15 พบว่า สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้ทั้งหมดนั้น จะมีขนาดเซลล์เส้นใย ลักษณะเส้นใย สีของโคโลนี และการมี clamp connection ไม่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม แต่ลักษณะการฟูของโคโลนีในบางสายพันธุ์มิวแตนท์จะแตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม โดยบางมิวแตนท์จะมีลักษณะของโคโลนีที่ฟูมากกว่า สายพันธุ์เดิม ในสายพันธุ์ MUG 003 สายพันธุ์เดิมจะมีลักษณะโคโลนีเรียบแต่ในมิวแตนท์ 003-Uv-cv_1 003-UV-cv_2 และ 003-NTGny_3 จะมีลักษณะโคโลนีที่ฟูกว่าสายพันธุ์เดิมเล็กน้อย และ 003-NTG-cv_2 จะมีลักษณะโคโลนีที่ฟูกว่าสายพันธุ์เดิมมาก ส่วนสายพันธุ์ MUG 004 ในสายพันธุ์เดิมจะมีลักษณะโคโลนีเรียบเช่นเดียวกับสายพันธุ์เดิมของ MUG 003

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ (รูปที่ 19 – 22) พบว่า ในสายพันธุ์ MUG 003 อัตราการเจริญเติบโตของสายพันธุ์เดิม (003-wild type) จะมีอัตราการเจริญเร็วที่สุดและได้น้ำหนักแห้งมากที่สุด ส่วนมิวแตนท์จากการชักนำด้วยแสงอัลตรไวโอเลตจะมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ส่วนมิวแตนท์จากการชักนำด้วยสาร NTG จะมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงเช่นกัน ยกเว้น 003-NTG-cv_2 จะมีอัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB น้ำหนักแห้งของเส้นใยน้อยที่สุด สำหรับสายพันธุ์ MUG 004 มิวแตนท์จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต มิวแตนท์รหัส 004-UV-ny_3 004-UV-cv_1 จะมีอัตราการเจริญและน้ำหนักแห้งของเส้นใยใกล้เคียงกับสายพันธุ์เดิม (004-wild type) ส่วนในมิวแตนท์ที่เหลืออีก 5 สายพันธุ์ จะมีอัตราการเจริญและน้ำหนักแห้งของเส้นใยต่ำกว่าเล็กน้อย และมิวแตนท์จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG มิวแตนท์ 004-NTG-ny_3 004-NTG-ny_4 จะมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับสายพันธุ์เดิม ที่เหลืออีก 5 สายพันธุ์ จะมีอัตราการเจริญต่ำกว่าเล็กน้อย

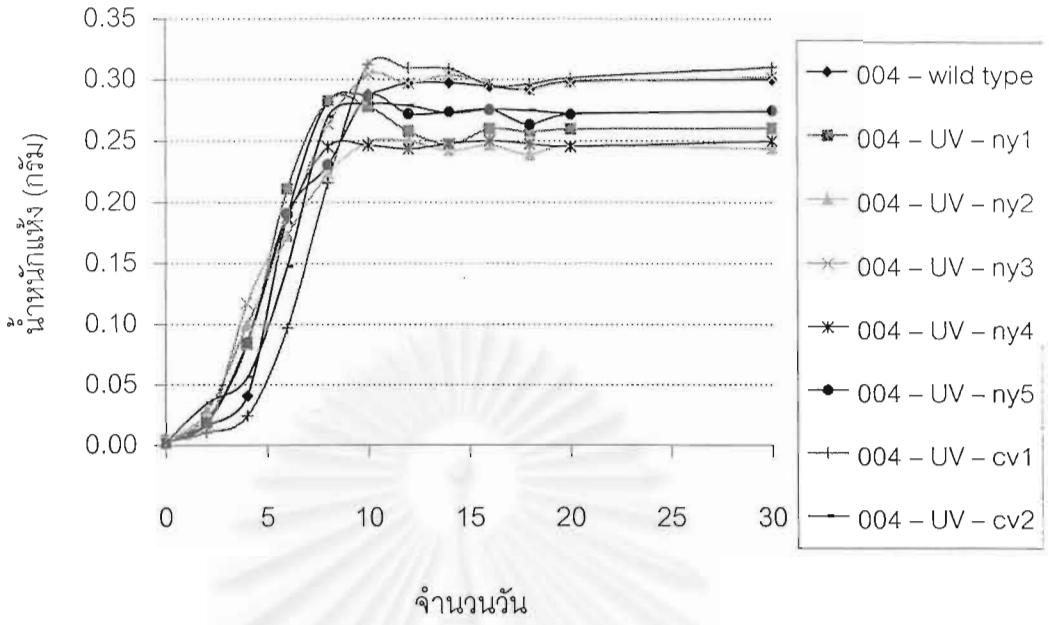


รูปที่ 21 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสายพันธุ์ MUG 003 และมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท



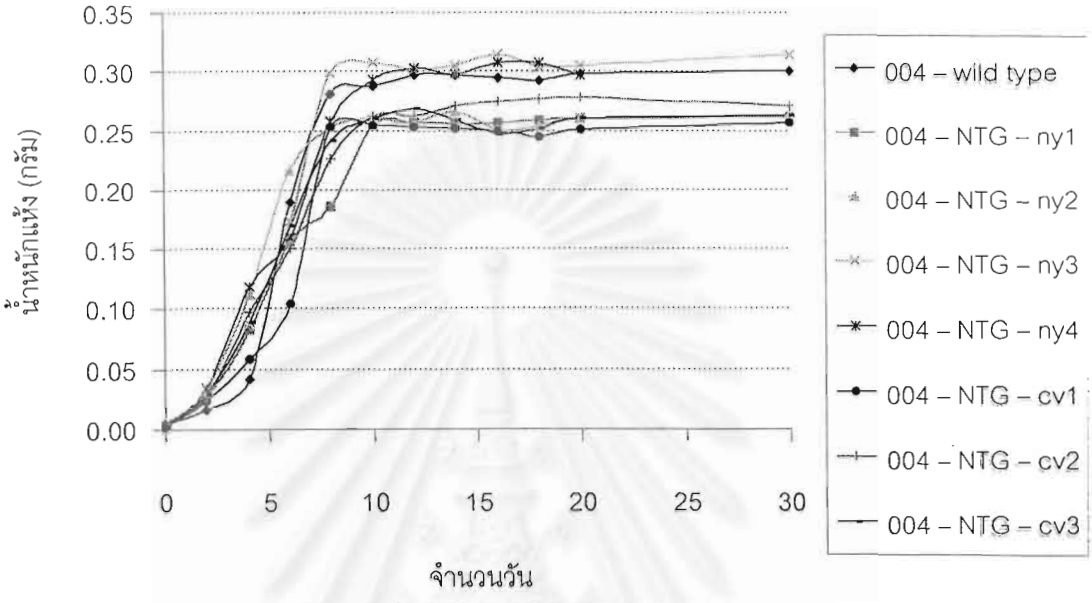
รูปที่ 22 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสายพันธุ์ MUG 003 และมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยสาร NTG

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสายพันธุ์ MUG 004 และมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสายพันธุ์ MUG 004 และมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยสาร NTG

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ

เส้นใยเห็ดหมื่นปี จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งแยกมาจากดอกเห็ด 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ซึ่งสายพันธุ์ MUG 003 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์สูง ส่วนสายพันธุ์ MUG 004 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่ำ (คมศิลป์ พลแดง, 2541) ซึ่งเหมาะสมสำหรับนำมาศึกษาเพื่อหาวิธีปรับปรุงให้มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ที่สูงขึ้น โดยเส้นใยทั้งสองสายพันธุ์จะอยู่ในระยะ log phase ในวันที่ 4 – 8

2. การหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดมิวเตชัน

การชักนำให้เกิดมิวเตชันในภาวะที่เหมาะสมนั้นควรใช้สิ่งที่มีชีวิตที่เป็นเซลล์เดี่ยว เนื่องจากถ้ามีมากกว่า 1 เซลล์อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน และทำให้การเก็บผลผิดพลาด ดังนั้นจึงมีความพยายามในการที่จะต้องใช้เซลล์เดี่ยวมาทำการชักนำให้เกิดมิวเตชัน เซลล์เดี่ยวที่ควรนำมาใช้ ได้แก่ สปอร์ไม่อาศัยเพศ สปอร์อาศัยเพศ และเซลล์เดี่ยวที่ได้จากเส้นใย เป็นต้น

2.1 <u>การใช้สปอร์ไม่อาศัยเพศ</u>

เนื่องจากสปอร์ไม่อาศัยเพศเป็นเซลล์เดี่ยวชนิดหนึ่งที่เกิดจาก vegetative cell ที่มีการเจริญไปเป็น สปอร์ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดมิวเตชันกับสปอร์ไม่อาศัยเพศ

โดยปกติเส้นใยของเห็ดหมื่นปีจะไม่มีการสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศ (Triratana และ Chaiprasert, 1991) จึงได้นำเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร LcA ซึ่งเป็นอาหารที่ชักนำให้เกิดสปอร์ไม่อาศัยเพศในเชื้อรา พบว่าอาหาร LcA ไม่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศได้ ดังนั้นจึงพบว่าเส้นใยเห็ดหมื่นปียังคงไม่มีการสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศ

2.2 <u>การใช้สปอร์อาศัยเพศ</u>

เนื่องจากสปอร์อาศัยเพศเป็นเซลล์เดี่ยวที่เกิดจากการรวมกันของ 2 นิวเคลียส ได้เป็น 1 นิวเคลียส (2n) และผ่านกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสได้เป็น 4 นิวเคลียส (n) และแต่ละนิวเคลียสจะเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในส่วนซึ่งพองออกที่ปลาย sterigma บน basidium เรียกว่า basidiospore เนื่องจากสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปีในภาวะปกติ การงอกจะเกิดขึ้นได้ยากมาก

เนื่องจากมีผนังสองชั้นและหนา (Triratana และ Chaiprasert, 1991) ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่ทำให้เกิดการงอกของสปอร์อาศัยเพศ

2.2.1 การทำ heat shock

การชักนำให้เกิดการงอกของสปอร์เห็ดที่งอกยากนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งการทำ heat shock ก็เป็นวิธีหนึ่ง ทำโดยการให้ความร้อนประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 – 30 นาที แล้วให้ความเย็นที่ 5 – 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 – 30 นาทีนั้น จะสามารถทำให้สปอร์อาศัยเพศที่งอกยากนั้นสามารถงอกขึ้นได้ โดยความร้อนที่ให้ไปนั้นจะมีผลให้โปรตีนและไขมันที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์นั้นเสียสภาพไป ทำให้คุณสมบัติของโปรตีนและไขมันนั้นเปลี่ยนไป (Moore–Landecker, 1990) และความเย็นทำให้เซลล์ของสปอร์หดอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการแตกของผนังสปอร์ สปอร์จึงสามารถงอกได้ แต่ในงานวิจัยนี้พบว่า การทำ heat shock ไม่สามารถทำให้เกิดการงอกของสปอร์อาศัยเพศเห็ดหมื่นปีได้ เนื่องจาก สปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปีนั้นมีผนังที่หนาถึง 2 ชั้น ซึ่งการใช้ heat shock อาจจะยังไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ทั้งสองชั้นได้

2.2.2 การเลี้ยงร่วมกับยีสต์

นอกจากการทำ heat shock แล้วยังพบว่ายีสต์ *S.cereviciae* สามารถกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ที่งอกยากของเห็ดบางชนิดได้เช่นกัน ซึ่งเป็นผลมาจากกรดไอโซวาเลริก (isovaleric) และกรดไขมันสายยาว (long – chain fatty acid) ที่ปล่อยออกมาจาก *S.cereviciae* ทำให้สปอร์นั้นเกิดการงอกได้ (Moore – Landecker, 1990) Triratana และ Chaiprasert (1991) สามารถชักนำให้เกิดการงอกของสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปีได้ โดยการเลี้ยงสปอร์ของเห็ดหมื่นปีบนอาหารแข็งพีดีเอ และเขี่ยเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* ATCC36900 พบว่าสปอร์อาศัยเพศสามารถงอกได้แต่งอกได้ยากและมีจำนวนน้อยมาก สามารถแยกโคโลนีที่เกิดจากการงอกของสปอร์อาศัยเพศได้เพียง 14 โคโลนีเท่านั้น จากการทดลองไม่สามารถชักนำให้เกิดการงอกของสปอร์อาศัยเพศได้เลย ถึงแม้จะเลี้ยงสปอร์อาศัยเพศบนอาหารแข็งพีดีเอ และเขี่ยเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* เช่นกัน แต่ยีสต์ *S.cerevisiae* ที่ใช้นั้นไม่ใช่สายพันธุ์ ATCC36900 จึงทำให้ไม่เกิดการงอกของสปอร์อาศัยเพศ

2.3 การทำให้เส้นใยเป็นเซลล์เดี่ยว

สำหรับการหาภาวะที่เหมาะสมกับเส้นใยเพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวสำหรับใช้ชักนำให้เกิดมิวเตชันนั้น หลังจากนำเส้นใยอายุต่างๆ มาบดอย่างละเอียดด้วยเครื่องบดอย่างละเอียด (homogenizer) ที่ความเร็วรอบ และเวลาต่างๆ กันแล้ว พบว่า เส้นใยอายุ 6 วัน สามารถบดอย่าง

ละเอียดและเกิดเซลล์เดี่ยวได้สูงที่สุด แต่ถ้าหากเส้นใยอายุ 8 วันแล้ว เมื่อทำการบดอย่างละเอียดแล้วจะเกิดเซลล์เดี่ยวน้อยมาก เนื่องจากเส้นใยในระยะนี้ผนังเส้นใยเริ่มหนาและเหนียว ทำให้การบดอย่างละเอียดเกิดเซลล์เดี่ยวน้อย ความเร็วรอบที่ใช้บดอย่างละเอียดที่เหมาะสมคือ 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป จะได้ปริมาณเซลล์เดี่ยวมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์เดี่ยวที่ได้มานี้ยังคงมีกระจุกเส้นใย และเส้นใยที่มิใช่เซลล์เดี่ยวปะปนมาด้วย เนื่องจากการใช้เครื่องบดอย่างละเอียดไม่สามารถทำให้เกิดเซลล์เดี่ยวได้ทั้งหมด จึงจำเป็นต้องมีการกำจัดกระจุกของเส้นใยและเส้นใยที่ไม่เป็นเซลล์เดี่ยวทิ้ง โดยการกรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 400 μ, 200 μ และ 50 μ พบว่าการกรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 400 μ ยังพบทั้งกระจุกเส้นใยและเส้นใยที่ไม่เป็นเซลล์เดี่ยวเช่นเดิม แต่เมื่อกรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 200 μ พบว่ากระจุกเส้นใยหายไป แต่ยังคงพบเส้นใยที่ไม่เป็นเซลล์เดี่ยวหลงเหลืออยู่ และหากกรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 50 μ พบว่าทั้งกระจุกเส้นใยและเส้นใยที่ไม่เป็นเซลล์เดี่ยวจะหายไป เหลือเพียงเซลล์เดี่ยวๆ เท่านั้น เพราะฉะนั้น ภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ชักนำให้เกิดมิวเตชัน คือใช้เส้นใยอายุ 6 วัน บดอย่างละเอียดที่ความเร็ว 6,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 50 μ จะได้เซลล์เดี่ยวของเส้นใยเพื่อใช้ชักนำให้เกิดมิวเตชันได้

3. **การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และทำ** survival curve

3.1 <u>การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลท</u>

จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลทกับเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดลงเมื่อเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลทเพิ่มขึ้น เนื่องจากการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทนั้น จะทำให้เกิด thymine dimer ในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์ ทำให้ thymine ไม่สามารถจับคู่กับ adenine ของสายโพลินิวคลีโอไทด์ที่อยู่ตรงข้ามได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ(DNA replication) ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และเมื่อเกิดการพิมพ์รหัส (transcription) ขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรม (genetic code) ที่เปลี่ยนแปลงไป (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2541) หากการเกิดมิวเตชันแล้วรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นเป็นบริเวณที่สังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์สูญเสียไป จนไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นได้หรือสร้างขึ้นมาแล้วแต่องค์ประกอบเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์แก่เซลล์อีกต่อไปได้ เซลล์นั้นจะตาย (อาทิตย์ ปุษยะนาวิน, 2539) ซึ่งเป็นสาเหตุของการลดจำนวนเซลล์ลงหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลท

ในการชักนำให้เกิดมิวเตชันในจุลินทรีย์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลท วิธีการที่นิยมใช้กันคือ จะเจือจางเชื้อจุลินทรีย์นั้นด้วยบัฟเฟอร์ในจานแก้ว นำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลทแล้วนำสารละลายบัฟเฟอร์นั้นมาเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยง (Kiguchi และ Yanagi, 1985; Mukherjee และ Senguta,

1986; Li และ Chang, 1991) ซึ่งจะมีข้อเสียคือ เซลล์แต่ละเซลล์จะได้รับแสงอัลตราไวโอเลทนั้นไม่เท่ากัน โดยเซลล์ที่อยู่บนผิวหน้าจะได้รับแสงอัลตราไวโอเลทมากกว่าเซลล์ที่อยู่ลึกลงไป อีกทั้งเซลล์ที่อยู่บนผิวหน้ายังบังแสงอัลตราไวโอเลททำให้เซลล์ที่อยู่ด้านล่างไม่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลทเท่าที่ควร เมื่อนำเซลล์เหล่านั้นมาเกลี่ยเชื้อ เซลล์ที่รอดชีวิตจะเป็นเซลล์ที่อยู่ด้านล่างซึ่งได้รับแสงอัลตราไวโอเลทน้อยกว่าเซลล์อื่นๆ แต่ในงานวิจัยนี้ ทำการเกลี่ยเชื้อก่อนจึงนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลท ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหาข้อเสียนี้ไปได้ เซลล์ทุกเซลล์จะถูกเกลี่ยให้ติดอยู่บนอาหารแข็ง PDA ในระดับเดียวกัน ทำให้เซลล์ไม่เกิดการบังแสงซึ่งกันและกัน เซลล์เหล่านั้นจึงได้รับแสงอัลตราไวโอเลทเท่าๆ กัน เพราะฉะนั้นเซลล์ที่เหลือรอดย่อมจะเป็นเซลล์ที่ได้รับแสงเท่ากับเซลล์อื่นๆ ที่ตายไป แสงอัลตราไวโอเลทที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดมิวเตชันจะมีช่วงคลื่น 254 นาโนเมตร มีผลทำให้เกิด thymine dimer และ cytosine dimer ขึ้นบ้างบนสายโพลินิวคลีโอไทด์ ซึ่งหากทำการเพิ่มเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลท โดยให้ความเข้มแสงและระยะห่างจากต้นกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลทเท่าเดิม ย่อมทำให้แสงมีโอกาสตกกระทบโมเลกุลดีเอ็นเอมากขึ้น ทำให้ยีนเกิดการเสียหายเป็นบริเวณกว้างขึ้นจึงเป็นสาเหตุให้อัตราการตายเพิ่มขึ้น เพราะฉะนั้น อัตราการตายจึงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลท

3.2 <u>การชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG</u>

ส่วนการใช้สาร NTG นั้น พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร NTG สาร NTG เป็นสารในกลุ่ม alkylating agent จะไปเติมหมู่เมธิลให้กับเบสทำให้การจับคู่เบสผิดปกติ เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์แบบสุ่มขณะที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Goodenough, 1978) เมื่อเกิดการพิมพ์รหัสขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปเช่นเดียวกับการใช้แสงอัลตราไวโอเลท หากรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นเป็นบริเวณที่สังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์สูญเสียไป จนไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นได้หรือสร้างขึ้นมาแล้วแต่องค์ประกอบเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์แก่เซลล์อีกต่อไปได้ เซลล์นั้นจะตาย จึงเป็นสาเหตุของการลดจำนวนของเซลล์ลงหลังใช้สาร NTG

ส่วนการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG นั้น วิธีการที่นิยมใช้กันคือ ทำการเจือจางเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสาร NTG ความเข้มข้นต่างๆ และเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 – 30 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสมในการที่สาร NTG จะแทรกซึมไปจนทั่วเซลล์ของจุลินทรีย์ (Mukherjee และ Senguta, 1986; Ohmasa, 1986) แล้วจึงนำเซลล์มาล้างสาร NTG ออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง หลังจากนั้นจึงนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยง ซึ่งวิธีนี้จะทำให้เซลล์ทุกเซลล์ได้รับสาร

NTG เท่าๆ กัน เพราะฉะนั้น การเพิ่มความเข้มข้นของสาร NTG ที่ใช้ เป็นการเพิ่มอัตราการตายในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ใช้คัดเลือกมิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยทั่วไปมักใช้ค่าประมาณ ร้อยละ 1 – 10 (Mukherjee และ Senguta, 1986; Li และ Chang, 1991) แล้วแต่ความเหมาะสมของแต่ละงานวิจัย ในงานวิจัยนี้ใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 10 % เมื่อชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทหรือสาร NTG เป็นค่าในการคัดเลือกมิวแตนท์ ซึ่งจากงานวิจัยนี้การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลทได้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 % เมื่อฉายแสงที่ระยะห่าง 22 เซนติเมตร เป็นเวลา 25 วินาที ส่วนการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG ได้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10% เมื่อให้สาร NTG ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที

4. การหา genetic marker

4.1 หาความเข้มข้นของสารยับยั้งการเจริญ

การหา genetic marker เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 โดยใช้สารยับยั้งการเจริญ 3 ชนิด ได้แก่ สเตรปโตไมซิน ไนสเตติน และคริสตัลไวโอเลท ได้ผลดังนี้

4.1.1 สเตรปโตไมซิน (streptomycin)

สเตรปโตไมซินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากสเตรปโตไมซินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อแบคทีเรีย โดยจะออกฤทธิ์ทำลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย และเข้าเกาะตำแหน่งต่างๆ ในสาย mRNA ทำให้ไม่สามารถเกิดการแปลรหัสที่สมบูรณ์ได้ (รุจิรัตน์ ศิลารัตน์, 2526) ทำให้แบคทีเรียตายหรือหยุดการแบ่งตัวหรือหยุดกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ แต่ในเซลล์ของเห็ดราจะมีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงก็ตาม เนื่องจากเห็ดรามีผนังเซลล์หนา นอกจากนี้ยังเป็นสารประกอบพวกโปลีแซคคาไรด์และไคติน (Moore–Landecker, 1990) ซึ่งแตกต่างจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่จะประกอบไปด้วยสารประกอบเปปติโดไกลแคน (peptidoglycans) (Black, 1996) ซึ่งทนต่อสารเคมีได้น้อยกว่า นอกจากนี้ยีนในจีโนม (genome) ของเห็ดราจะซับซ้อนกว่าจึงสามารถสังเคราะห์สารที่จะจับโมเลกุลของสเตรปโตไมซินให้เป็นกลางได้ดีกว่าแบคทีเรีย (อาทิตย์ ปุษยะนาวิน, 2539) ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเห็ดหมื่นปีซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดรา จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ ถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นของสเตรปโตไมซินสูงถึง 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วก็ตาม ดังนั้น สเตรปโตไมซินจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาเติมในอาหารสำหรับการคัดเลือกเพื่อใช้เป็น genetic marker ของการชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหมื่นปี

4.1.2 ไนสเตติน (nystatin)

ไนสเตตินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งสิ่งมีชีวิตจำพวกราและยีสต์โดยตรง มีกลไกการออกฤทธิ์ คือ จะไปรวมตัวจับกับเออร์โกสเตอรอลซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตอรอล (sterol) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเห็ดรา มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเข้าออกสารของผนังเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วของโปแตสเซียมไอออน (K^+) น้ำตาล และเมตาบอไลท์ (metabolite) ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นตาย (Yu Merigan และ Barriere, 1999) จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเห็ดหมื่นปีได้อย่างสมบูรณ์ โดยเมื่อเริ่มที่ความเข้มข้นของไนสเตติน 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าอัตราการเจริญของเห็ดหมื่นปีทั้งสองสายพันธุ์ลดลงอย่างรวดเร็ว และการเจริญจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของไนสเตติน 1,400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 1,200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในสายพันธุ์ MUG 003 และMUG 004 ตามลำดับ

4.1.3 คริสตัลไวโอเลท (crystal violet)

คริสตัลไวโอเลทเป็นสีย้อมที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตจำพวกรา (Li และ Chang, 1991) โดยโมเลกุลของคริสตัลไวโอเลทจะไปแทรกสอดตามผนังเซลล์ ทำให้การสังเคราะห์ผนังเซลล์หยุดลง (Black, 1996) ในที่สุดสิ่งมีชีวิตนั้นจะตาย จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์เช่นกัน โดยทั้งสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จะถูกยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของคริสตัลไวโอเลท 35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 การตรวจหา genetic marker โดยใช้ลักษณะ auxotroph - prototroph

สำหรับลักษณะ auxotroph และ prototroph ที่ใช้เป็น genetic marker นั้น ลักษณะ prototroph คือสามารถเจริญได้ทั้งบนอาหารชนิด minimal ซึ่งเป็นอาหารที่มีแร่ธาตุและสารอาหารเล็กน้อยซึ่งพอเพียงสำหรับสายพันธุ์ปกติที่จะสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เซลล์ต้องการเองได้ (ยุวพิน เลิศวีระวัฒน์, 2529) และอาหารชนิด complete ซึ่งเป็นอาหารที่มีแร่ธาตุ สารอาหารและกรดอะมิโนอย่างเกินพอสำหรับสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เซลล์ต้องการได้ ซึ่งลักษณะ auxotroph และ prototroph ที่ใช้เป็น genetic marker เป็นลักษณะความสามารถในการสร้างสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ หากสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบนอาหารชนิด minimal และ อาหารชนิด complete แสดงว่าสิ่งมีชีวิตนั้นเป็น prototroph แต่หากสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารชนิด complete แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บน minimal แสดงว่าสิ่งมีชีวิตนั้นเป็น auxotroph ซึ่งลักษณะ auxotroph นี้นิยมใช้เป็น genetic

marker ในการศึกษางานทางด้านมิวเตชันในเห็ด (Kiguchi และ Yanagi, 1985; Toyomasu และคณะ, 1986; Mukherjee และ Senguta, 1986; Mukherjee และ Senguta, 1992) แต่การศึกษาลักษณะ auxotroph นั้นจะมีขั้นตอนในการทดสอบที่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายมาก ในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีการคัดเลือกมิวแตนท์โดยใช้ลักษณะการต้านทานต่อสารยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่าย (Cees, 1996) ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า ในสายพันธุ์เดิมของ MUG 003 และ MUG 004 สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบนอาหารชนิด minimal และอาหารชนิด complete แสดงว่าทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะเป็น prototroph

5. การชักนำให้เกิดมิวเตชันและการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

5.1 <u>การชักนำให้เกิดมิวแตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลท</u>

ในการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลท ทำการคัดเลือกมิวแตนท์ที่เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 % แต่ละการทดลองทำ 5 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ ในสายพันธุ์ ตรวจนับโคโลนีที่รอดในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 พบ 73 และ 80 โคโลนี ตามลำดับ ซึ่งจำนวนโคโลนีที่รอดจะเกิดมิวเตชัน โดยเกิด pyrimidine dimer ขึ้น หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืดเพื่อป้องกันการซ่อมแซมดีเอ็นเอเพราะฉะนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในรหัสพันธุกรรม

5.2 <u>การชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG</u>

ในการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยใช้สาร NTG ทำการคัดเลือกมิวแตนท์ที่เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10 % ทำการทดลองแต่ละชุด 5 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ ในสายพันธุ์ ตรวจนับโคโลนีที่รอดในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 พบ 78 และ 79 โคโลนี ตามลำดับ ซึ่งจำนวนโคโลนีที่รอดจะเกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG ซึ่งเป็นสาร alkylating agent ซึ่งมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลของเบส guanine และ thymine ในสายโพลินิวคลีโอไทด์ ทำให้เบสนั้นจับคู่ผิดไป

5.3 <u>การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์</u>

5.3.1 <u>การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยแสงอัลตราไวโอเลท</u>

ก. ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตตินได้ 18 และ 19 โคโลนี ตามลำดับ มิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทนั้น จะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์ เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการพิมพ์รหัส ขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3 ซึ่งหากเกิดมิวเตชันแล้วรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์สารเออร์โกสเตอรอล ทำให้ไม่มีการสร้างเออร์โกสเตอรอลขึ้น

ดังนั้นไนสเตตินจึงไม่สามารถไปจับได้ จึงไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโต ทำให้มิวแตนท์นั้นมีความต้านทานต่อไนสเตติน (Yu Merigan และ Barriere, 1999)

ข. ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทได้ 18 และ 17 โคโลนี ตามลำดับ มิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทนั้น จะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์ เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการพิมพ์รหัสจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งหากรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการสร้างผนังเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์และคริสตัลไวโอเลทไม่สามารถจะแทรกสอดตามผนังเซลล์ได้ หรือสายพันธุ์มิวแตนท์อาจมีเอนไซม์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมทำให้สามารถย่อยคริสตัลไวโอเลทได้ ทำให้ไม่มีคริสตัลไวโอเลทแทรกสอดตามผนังเซลล์ คริสตัลไวโอเลทจึงไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโต ดังนั้นมิวแตนท์จะมีความต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท

หลังจากนั้นนำมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลททั้งหมดมาทดสอบความเสถียร โดยการ subculture 3 ครั้ง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่าในสายพันธุ์ MUG 003 สามารถแยกมิวแตนท์ที่ยังคงต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทได้ 1 และ 2 โคโลนี ตามลำดับ ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 สามารถแยกมิวแตนท์ที่ยังคงต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทได้ 5 และ 2 โคโลนี ตามลำดับ พบว่าสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ยังคงความเสถียรอยู่ได้อาจจะเนื่องจาก ขณะที่ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลทอาจจะเป็นช่วงที่ดีเอ็นเอมีการจำลองตัวเอง (replication) พอดี เพราะฉะนั้นรหัสที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นจะถูกจำลองตัวเองไปแล้วในโมเลกุลดีเอ็นเอจึงไม่มีการเปลี่ยนกลับไปเหมือนเดิม ซึ่งในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทนี้ มีมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทเป็นจำนวนมากที่ความสามารถในการต้านทานสารยับยั้งหายไป อาจจะเนื่องมาจากอาจจะเกิดกระบวนการซ่อมแซม ซึ่งกลไกการซ่อมแซมที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเลทนั้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ กลไกที่ต้องใช้แสง และกลไกที่ไม่ต้องใช้แสง หรือ excision repair ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้ป้องกันการซ่อมแซม pyrimidine dimer โดยกลไกที่ต้องใช้แสงด้วยการบ่มเชื้อเห็ดหมื่นปีที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลทแล้วในที่มืด เพราะฉะนั้น มิวแตนท์ที่สูญเสียความสามารถในการต้านทานสารยับยั้งการเจริญในเห็ดหมื่นปีทั้งสองสายพันธุ์นั้น น่าจะเกิดจากการซ่อมแซมโดยกลไกที่ไม่ต้องใช้แสงนั่นเอง

ค. ในงานวิจัยนี้พบว่า สายพันธุ์เดิม MUG 003 และ MUG 004 มีลักษณะเป็น prototroph และสายพันธุ์มิวแตนท์ของทั้งสองสายพันธุ์ก็ยังคงเป็น prototroph อยู่ ซึ่งแสดงว่า ผลของการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลท ในครั้งนี้ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

จากลักษณะ prototroph ไปเป็น auxotroph แสดงว่ายังมีการสร้างเอนไซม์ซึ่งมีผลควบคุมการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตนั้น

5.3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์จากการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG

ก. ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตติน 3 และ 4 โคโลนี ตามลำดับ ซึ่งการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG นั้น จะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์ เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการพิมพ์รหัสขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป หากเกิดมิวเตชันแล้วรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์สารออร์โกสเตอรอลเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ไม่มีการสร้างเออร์โกสเตอรอลขึ้น ดังนั้นไนสเตตินจึงไม่สามารถไปจับได้ จึงไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโต ทำให้มิวแตนท์นั้นความต้านทานต่อไนสเตติน (Yu Merigan และ Barriere, 1999)

ข. ในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทได้ 2 และ 3 โคโลนี ตามลำดับ มิวเตชันด้วยสาร NTG นั้น จะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์ เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการพิมพ์รหัสขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งหากรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการสร้างผนังเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์และคริสตัลไวโอเลทไม่สามารถจะแทรกสอดตามผนังเซลล์ได้ หรือสายพันธุ์มิวแตนท์อาจมีเอนไซม์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมทำให้สามารถย่อยคริสตัลไวโอเลทได้ ทำให้ไม่มีคริสตัลไวโอเลทเข้าไปแทรกสอดตามผนังเซลล์ คริสตัลไวโอเลทจึงไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโต ดังนั้นมิวแตนท์จะมีความต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท

หลังจากนั้นนำมิวแตนท์ที่ต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลททั้งหมดมาทดสอบความเสถียร โดยการ subculture 3 ครั้ง และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า สามารถแยกมิวแตนท์ที่ยังคงต้านทานต่อไนสเตตินในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ได้ 3 และ 4 โคโลนี ตามลำดับ เท่ากับที่แยกได้ครั้งแรก ส่วนมิวแตนท์ที่ยังคงต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลทในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 สามารถแยกได้ 2 และ 3 โคโลนี ตามลำดับ เท่ากับที่แยกได้ครั้งแรกเช่นกัน ซึ่งในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG ซึ่งมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลของเบส guanine และ thymine ในสายโพลินิวคลีโอไทด์ เมื่อเกิดการพิมพ์รหัสทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งโครงสร้างของโมเลกุลเบสที่เปลี่ยนแปลงไปแล้วนั้นจะไม่สามารถกลับคืนสภาพเดิมได้จากการซ่อมแซม

ค. ในงานวิจัยนี้พบว่า สายพันธุ์เดิม MUG 003 และ MUG 004 มีลักษณะเป็น prototroph และสายพันธุ์มิวแตนท์ของทั้งสองสายพันธุ์ก็ยังคงเป็น prototroph อยู่ ซึ่งแสดงว่า ผลของการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG ในครั้งนี้ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากลักษณะ prototroph ไปเป็น auxotroph แสดงว่ายังมีการสร้างเอนไซม์ซึ่งมีผลควบคุมการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตนั้น

6. เปรียบเทียบสายพันธุ์มิวแตนท์กับสายพันธุ์เดิม

6.1 ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อหน่วยดีเอ็นเอของเซลล์

เส้นใยของเห็ดหมื่นปีเป็นเส้นใยที่มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีผนังกั้นและแตกกิ่งก้านสาขาออกไปมากมาย (ปัญญา โพธิฐิติรัตน์, 2538) และเซลล์แต่ละเซลล์ที่ผนังกั้นนั้นจะมีขนาดที่ไม่เท่ากันทุกเซลล์ ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ ถึงแม้จะใช้น้ำหนักของเส้นใยเท่ากัน แต่จำนวนเซลล์นั้นจะไม่เท่ากัน เพราะฉะนั้นปริมาณโปลีแซคคาไรด์ที่วิเคราะห์ได้มานั้น อาจจะไม่ได้มาจากจำนวนของเซลล์ที่ไม่เท่ากัน จึงจำเป็นต้องหาปริมาณของดีเอ็นเอและทำอัตราส่วนระหว่างปริมาณโปลีแซคคาไรด์กับปริมาณดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อหน่วยดีเอ็นเอของเซลล์

6.1.1 ปริมาณโปลีแซคคาไรด์

ปริมาณโปลีแซคคาไรด์ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี anthrone test นั้น ในมิวแตนท์ที่ชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทและสาร NTG จะได้ปริมาณโปลีแซคคาไรด์นั้นจะแตกต่างกันไป ในสายพันธุ์เดิมของ MUG 003 (003-wild type) และ MUG 004 (004-wild type) จะมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ 21.28 และ 16.89 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ สายพันธุ์มิวแตนท์ที่เกิดจากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์สูงสุด คือ 003-UV-cv_1 และ 004-UV-ny_3 มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ 33.78 และ 27.87 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้จากการชักนำด้วยสาร NTG ที่ปริมาณโปลีแซคคาไรด์สูงสุด คือ 003-NTG-ny_3 และ 004-NTG-cv_1 มีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ 21.03 และ 24.92 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ตามลำดับ เนื่องจากการชักนำให้เกิด มิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทและสาร NTG นั้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการพิมพ์รหัส ขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลง (ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, 2541) ซึ่งหากเกิดมิวเตชันแล้วรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ซึ่งอยู่ในปฏิกริยาการผลิตสารโปลีแซคคาไรด์ในเส้นใยของเห็ดหมื่นปี โดยอาจทำได้ให้เอนไซม์ที่มี activity ดีขึ้น จึงทำให้การผลิตสารโปลีแซคคาไรด์ในเส้นใยนั้นสูงกว่าสายพันธุ์เดิม

และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมแล้วทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ซึ่งอยู่ในปฏิกริยาการผลิตสารโปลีแซคคาไรด์ในเส้นใยของเห็ดหมื่นปีนั้น ทำให้ผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง และ/หรือผลิตเอนไซม์แล้วมี activity ลดลง จะทำให้การผลิตสารโปลีแซคคาไรด์ในเส้นใยนั้นลดลงจากสายพันธุ์เดิม แต่จากปริมาณโปลีแซคคาไรด์ที่วัดได้ในการทดลองนี้ไม่สามารถระบุชนิดของโปลีแซคคาไรด์ให้ทราบชัดเจนได้ เพราะการตรวจวัดในงานวิจัยนี้เป็นการตรวจวัดปริมาณโปลีแซคคาไรด์โดยรวม แต่เส้นใยของเห็ดหมื่นปีนั้นมีโปลีแซคคาไรด์มากมายหลายชนิด ซึ่งโปลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งคือ β - (1→3) – D - glucan จากการทดลองจึงไม่อาจสรุปให้แน่ชัดได้ว่าปริมาณโปลีแซคคาไรด์ที่เพิ่มขึ้น เป็นโปลีแซคคาไรด์ชนิด β-(1→3)–D-glucan ถ้าจะให้ทราบถึงชนิดของโปลีแซคคาไรด์ที่เพิ่มนั้น จำเป็นจะต้องมีการตรวจสอบต่อไปในอนาคต

6.1.2 <u>ปริมาณ DNA</u>

สำหรับปริมาณดีเอ็นเอซึ่งวิเคราะห์ด้วย ไดฟีนีลามีน รีเอเจนต์ พบว่า มิวแตนท์ที่ได้ทั้งจากการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลทและสาร NTG ทั้งในสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จะมีปริมาณของดีเอ็นเอใกล้เคียงกับสายพันธุ์เดิม โดยสายพันธุ์ MUG 003 สายพันธุ์เดิมนั้นจะมีปริมาณดีเอ็นเอ3.72 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ในสายพันธุ์มิวแตนท์จะมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 3.02 – 3.96 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม และสายพันธุ์ MUG 004 สายพันธุ์เดิมมีปริมาณดีเอ็นเอ4.39 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม ในสายพันธุ์มิวแตนท์จะมีปริมาณดีเอ็นเอ อยู่ระหว่าง 3.81 – 4.64 มิลลิกรัมต่อเส้นใย 1 กรัม เนื่องจากเส้นใยน้ำหนักเท่าๆ กันที่ได้จากสายพันธุ์เดิมหรือสายพันธุ์มิวแตนท์ จะให้จำนวนเซลล์ที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นปริมาณของดีเอ็นเอก็จะไม่เท่ากันด้วย ซึ่งผลของการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลทและสาร NTG นั้น จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์เท่านั้น เพราะฉะนั้น การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสหรือการขาดหายของเบสบางตัวในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์ จึงไม่น่ามีผลต่อปริมาณของดีเอ็นเอ

การหาปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อหน่วยดีเอ็นเอของเซลล์ มีอัตราดังตารางที่ 14 พบว่าในสายพันธุ์เดิม MUG 003 และ MUG 004 มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ 5.72 และ 3.85 ตามลำดับ มิวแตนท์จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่มีอัตราส่วนปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงสุดคือ 003-UV-cv_1 และ 004-UV-ny_3 มีอัตราส่วนเป็น 10.73 และ 6.48 ตามลำดับ ส่วนมิวแตนท์จากการชักนำด้วยสาร NTG ที่มีอัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงสุดคือ 003-NTG-ny_3 และ 004-NTG-cv_1 มีอัตราส่วนเป็น 6.96 และ 5.59 ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ระหว่างกลไกการผลิตโปลีแซคคาไรด์กับกลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทที่ใช้เป็น genetic marker ในการคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์ พบว่า กลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารทั้งสองชนิด ไม่มีความสัมพันธ์กับกลไกการผลิตโปลีแซคคาไรด์ ดังนั้น ลักษณะการยับยั้งการเจริญเติบโตของไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทจึงใช้เพื่อให้ทราบว่าสายพันธุ์นั้นๆ เกิดมิวเตชันขึ้นจริง เนื่องจากงานวิจัยนี้มิวแตนท์ที่มีค่าปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงสุด สูงกว่าสายพันธุ์เดิมมากกว่า 2 เท่า ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 12 อย่างชัดเจน ดังนั้น หากต้องการเปรียบเทียบทางสถิติ ควรจะมีการทดลองเพิ่มเติม โดยการวางแผนการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตโปลีแซคคาไรด์ในสายพันธุ์ดังกล่าวต่อไป สำหรับสารโปลีแซคคาไรด์ในเห็ดหมื่นปีนั้นจะมีฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็ง (Lee และคณะ, 1984) และในการชักนำให้เกิดมิวเตชันในงานวิจัยนี้ พบว่ามิวแตนท์ที่ได้จะให้ปริมาณโปลีแซคคาไรด์สูงขึ้น ดังนั้นจึงอาจจะมีประโยชน์ทางด้านการแพทย์ และควรศึกษาถึงศักยภาพของสารโปลีแซคคาไรด์ในสายพันธุ์มิวแตนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมต่อไป

6.2 <u>เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา</u>

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมิวแตนท์ที่ได้ ส่วนใหญ่จะไม่ต่างจากสายพันธุ์เดิมนัก โดยเฉพาะลักษณะเส้นใย สีของโคโลนี และการมี clamp connection นั้นยังคงเหมือนสายพันธุ์เดิม ส่วนขนาดของเซลล์เส้นใยนั้นจะใกล้เคียงกับสายพันธุ์เดิม แต่ลักษณะการฟูของโคโลนีในบางมิวแตนท์จะมีลักษณะโคโลนีที่ฟูกว่าสายพันธุ์เดิม เนื่องมาจากแสงอัลตราไวโอเลทและสาร NTG นั้นจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมแบบสุ่ม ซึ่งหากรหัสพันธุกรรมนั้นเป็นรหัสที่สังเคราะห์โปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาที่แสดงออกจะทำให้ลักษณะของเซลล์นั้นจะยังคงมีลักษณะสัณฐานวิทยาเช่นเดิม สำหรับมิวแตนท์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาต่างจากสายพันธุ์เดิมนั้น เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงที่รหัสพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย

สำหรับอัตราการเจริญของเส้นใยมิวแตนท์เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม (รูปที่ 21 - 24) จะพบว่า มีทั้งมิวแตนท์ที่มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นและลดลงไปจากสายพันธุ์เดิม เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลทและสาร NTG นั้นจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมแบบสุ่ม ซึ่งหากรหัสพันธุกรรมนั้นเป็นรหัสที่สังเคราะห์โปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์หรือกระบวนการแบ่งเซลล์ จะทำให้ลักษณะของเซลล์นั้นจะยังคงอัตราการเจริญเช่นเดิม ส่วนมิวแตนท์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมนั้น อาจเกิดเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์หรือกระบวนการแบ่งเซลล์

สรุปผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ

เส้นใยเห็ดหมื่นปี จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด - ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งแยกมาจากดอกเห็ด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ MUG 003และ MUG 004 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยในอาหารเหลว PDB พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในระยะ log phase ในวันที่ 4 – 8

2. หาภาวะที่เหมาะสมเพื่อการชักนำให้เกิดมิวเตชัน

ภาวะที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดมิวเตชันในเห็ดหมื่นปี คือ การใช้เส้นใยของเห็ดหมื่นปี อายุ 6 วัน บดอย่างละเอียดที่ความเร็ว 6900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำมากรองผ่านผ้ากรองขนาดรู 50 μ

3. การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและ ทำ survival curve

ในการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยแสงอัลตราไวโอเลท เซลล์เดี่ยวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 10% เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลท ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่าง 22 เซนติเมตร เป็นเวลา 25 วินาที ได้เซลล์เดี่ยวที่สามารถงอกได้ประมาณ 6 - 7 และ 7 – 8 โคโลนี ตามลำดับ ส่วนการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร NTG จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 10% เมื่อได้รับสาร NTG ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ทั้งสองสายพันธุ์จะมีเซลล์เดี่ยวที่สามารถงอกได้ประมาณ 6 - 7 โคโลนี

4. การหา genetic marker

การใช้สเตรปโตไมซินไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ได้สมบรูณ์ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็น genetic marker ส่วนไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยในทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้น genetic marker สำหรับการคัดเลือกมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG 003 คือ อาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นของไนสเตตินเป็น 1,400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ อาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นของคริสตัลไวโอเลทเป็น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 นั้น พบว่าอาหารที่มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปี คือ อาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นของไนสเตติน 1,200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ อาหารแข็ง PDA ที่มีความเข้มข้นของ คริสตัลไวโอเลทเป็น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การชักนำให้เกิดมิวเตชันและคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนท์

จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลททั้งหมด 5 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ ได้จำนวน โคโลนีที่คาดว่าจะเป็นมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จำนวน 73 และ 80 โคโลนี ตามลำดับ ในสายพันธุ์ MUG 003 สามารถแยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อไนสเตตินและต้านทานต่อ คริสตัลไวโอเลท อย่างละ 18 โคโลนี และหลังจากการ subculture 3 ครั้ง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ที่ยังคงลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินเหลือ 1 โคโลนี และต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท 2 โคโลนี resistance mutant ที่มีความเสถียรทั้งหมดนี้ สามารถเจริญได้ทั้งบนอาหารชนิด minimal และอาหารชนิด complete ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 สามารถแยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อไนสเตตินได้ 19 โคโลนี และต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท 17 โคโลนี และหลังจากการ subculture 3 ครั้ง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ที่ยังคงลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินเหลือ 5 โคโลนี และต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท 2 โคโลนี resistance mutant ที่มีความเสถียรทั้งหมดนี้ สามารถเจริญได้ทั้งบนอาหารชนิด minimal และอาหารชนิด complete

สำหรับการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG ทั้งหมด 5 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ ได้จำนวน โคโลนีที่คาดว่าจะเป็นมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 จำนวน 78 และ 79 โคโลนี ตามลำดับ ในสายพันธุ์ MUG 003 สามารถแยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อไนสเตตินได้ 3 โคโลนี และต้านทานต่อ คริสตัลไวโอเลท 4 โคโลนี และหลังจากการ subculture 3 ครั้ง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ทั้งหมดยังคงต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทเช่นเดิม และ resistance mutant ที่มีความเสถียรทั้งหมดนี้ สามารถเจริญได้ทั้งบนอาหารชนิด minimal และอาหารชนิด complete ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 สามารถแยกลักษณะ resistance mutant ที่ต้านทานต่อไนสเตตินได้ 4 โคโลนี และต้านทานต่อคริสตัลไวโอเลท 3 โคโลนี และหลังจากการ subculture 3 ครั้ง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า resistance mutant ที่ยังคงลักษณะต้านทานต่อไนสเตตินและคริสตัลไวโอเลทเช่นเดิม และ resistance mutant ที่มีความเสถียรทั้งหมดนี้ สามารถเจริญได้ทั้งบนอาหารชนิด minimal และอาหารชนิด complete

6. เปรียบเทียบสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์

จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลท พบว่ามิวแตนท์ที่ได้นั้นจะมีอัตราส่วนปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงกว่าสายพันธุ์เดิมทั้งหมด ในสายพันธุ์ MUG 003 มิวแตนท์รหัส 003-UV-cv$_1$ จะมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงที่สุด คือ 10.73 (ใน MUG 003 สายพันธุ์เดิมจะมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ 5.72) ส่วนในสายพันธุ์ MUG 004 (ใน

MUG 004 สายพันธุ์เดิมจะมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ 3.85) มิวแตนท์รหัส 004-UV-ny_3 จะมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงที่สุด คือ 6.48

ส่วนการชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG ในสายพันธุ์ MUG 003 มิวแตนท์สายพันธุ์ 003-NTG-ny_3 จะมีอัตราส่วนปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงที่สุด คือ 6.96 มิวแตนท์สายพันธุ์ MUG 003 ที่เหลืออีก 4 สายพันธุ์จะมีปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่ำกว่าสายพันธุ์เดิม สำหรับสายพันธุ์ MUG 004 มิวแตนท์สายพันธุ์ 004-NTG-cv_1 จะมีอัตราส่วนปริมาณโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงที่สุด คือ 5.59 ส่วนมิวแตนท์ที่เหลืออีกจะมีอัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงกว่าสายพันธุ์เดิมเกือบทั้งหมด ยกเว้นมิวแตนท์รหัส 004 – NTG – ny_1 และ 004 – NTG – cv_3 เท่านั้นที่มีอัตราส่วนโปลีแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอเป็น 4.99 และ 2.59 ซึ่งต่ำกว่าในสายพันธุ์เดิม

ลักษณะสัณฐานวิทยา สายพันธุ์มิวแตนท์ที่ได้ทั้งหมดนั้น จะมีขนาดเซลล์เส้นใย ลักษณะเส้นใย สีของโคโลนี และการมี clamp connection ไม่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม แต่ลักษณะการฟูของโคโลนีในบางสายพันธุ์มิวแตนท์จะแตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม โดยบางมิวแตนท์จะมีลักษณะของโคโลนีที่ฟูมากกว่า สายพันธุ์เดิม ในสายพันธุ์ MUG 003 สายพันธุ์เดิมจะมีลักษณะโคโลนีเรียบแต่ในมิวแตนท์ 003-UV-cv_1 003-UV-cv_2 และ 003-NTG-ny_3 จะมีลักษณะโคโลนีที่ฟูกว่าสายพันธุ์เดิมเล็กน้อย และ 003-NTG-cv_2 จะมีลักษณะโคโลนีที่ฟูกว่าสายพันธุ์เดิมมาก ส่วนสายพันธุ์ MUG 004 ในสายพันธุ์เดิมจะมีลักษณะโคโลนีเรียบเช่นเดียวกับสายพันธุ์เดิมของ MUG 003 และส่วนใหญ่มิวแตนท์ของ MUG 004 ที่ได้นั้นจะมีลักษณะ โคโลนีที่เรียบเช่นเดียวกับสายพันธุ์เดิม ยกเว้น 004-NTG-ny_2 เท่านั้น ที่จะมีลักษณะโคโลนีที่ฟูกว่าสายพันธุ์เดิม

ส่วนอัตราการเจริญเติบโตในสายพันธุ์ MUG 003 สายพันธุ์เดิม (003-wild type) จะมีอัตราการเจริญเร็วที่สุด และได้น้ำหนักแห้งมากที่สุด ส่วนมิวแตนท์ทุกสายพันธุ์จะมีอัตราการเจริญและน้ำหนักแห้งของเส้นใยต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมทั้งหมด โดยมิวแตนท์รหัส 003-NTG-cv_2 จะมีอัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB น้ำหนักแห้งของเส้นใยน้อยที่สุด สำหรับสายพันธุ์ MUG 004 พบว่าในสายพันธุ์เดิม (004-wild type) และมิวแตนท์รหัส 004-UV-ny_3 004-UV-ny_4 004-NTG-ny_3 จะมีอัตราการเจริญและน้ำหนักแห้งของเส้นใยใกล้เคียงกัน ส่วนในมิวแตนท์ที่เหลืออีก 7 สายพันธุ์จะมีอัตราการเจริญและน้ำหนักแห้งของเส้นใยต่ำกว่าเล็กน้อย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คมศิลป์ พลแดง. 2541. **การสกัดสารโปลีแซคคาไรด์จากเห็ดหมื่นปี**. วิทยาปฏิบัติปริญญาภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. **พันธุศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปริญญา รัตนะพิมาฯ. 2535. **การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในเห็ดหมื่นปี** [*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.]. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2538. **เทคโนโลยีการเพาะเห็ด**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

มาลินี ตันติยาภรณ์. 2534. **พันธุศาสตร์จุลินทรีย์**. กรุงเทพมหานคร : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

ยุวพิน เลิศวีระวัฒน์. 2529. **การชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท ให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศของแอลฟา/แอลฟา ฟิวแสนท์ของ** *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุจิรัตน์ ศิลารัตน์. 2526. **การชักนำให้เกิดการดื้อยาใน** *Trichomonas vaginalis*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์, สัญชัย ตันตยาภรณ์, พรรณี บุตรธนู และสมพงษ์ อังโขรัมย์. 2531. หลินจือเห็ดมีสรรพคุณทางยา. **วารสารกสิกร** ปีที่ 61 ฉบับที่ 5 : 427-433.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์. 2531. เห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*). **วารสารวิทยาศาสตร์** ปีที่ 42 ฉบับที่ 2 : 69-74.

สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง. 2539. **เห็ดหลินจือ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ ที.พี.พริ้นท์.

อาทิตย์ ปุษยะนาวิน. 2539. **การคัดเลือกมิวแทนต์ของ** *Pachysolen tanophilus* **ที่หมักไซโลสโดยการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. 1979. **Introductory Mycology**. 3rd edition. New York : John Wiley & Sons , Inc.

Barroso, G., Thi Mai,T., and Labarere, J. 1988. Effects of UV irradiation on germination and on chloramphenicol and tetracycline resistance of *Volvariealla volvacea* basidiospores. **Mushroom Journal Tropics**. 8 : 73-84.

Black J.B. 1996. **Microbiology : Principle and Applications**. 3rd edition. New Jersey : Prentice–Hall, Inc.

Brown, T.A. 1992. **Genetics a Molecular Approach**. 2nd edition. London : Chapman & Hall.

Cees J.B. 1996. **Fungal Ganetics : Principle and Practice**. New York : Marcel Dekker.

Chang T.T., and Chen T. 1986. Studies on Nuclear Behavior, Mating Type and Heterokaryosis of Several Species of Ganoderma in Thiwan. **Plant Products Bulletin**. 28:231 – 240

Chiang H.C., and Wann M.H. 1986. Improved method of assay for germanium in crude drugs. **Taiwan Yao Hsuch Tsa Chih**. 38 : 189 – 198

Devlin T.M. 1982. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**. New York : John Wieley & Sons, Inc.

Dhaliwal, R.P.S., Garcha, H.S., and Khanna P.K. 1992. High laccase producing mutant of *Pleurotus florida* . **World Journal Microbiology Biotechnology**. 8 : 39 – 41.

Drake J.W. 1970. **The Molecular Basis of Mutation**. California : Holden – day.

Fincham J.R.S., and Day P.R. 1971. **Botanical Monographs Volume 4 Fungal Genetics**. 3rd edition. London : Clowes & Sons.

Gardner, E.J. 1975. **Principles of Genetics**. 5th edition. New York : John Wiley & Sons, Inc.

Goodenough U. 1978. **Genetics**. 2nd edition. London : Holt, Rinehart and Winston.

Hirotani M., Asaka I., Ino C., Furuya T. , and Shiro M. 1987 Studies on the metabolites of higher fungi part7 ganoderic acid derivative and ergosta – 4,7,2 – triene – 3,6 – dione from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**. 26:2797 – 2803

Kac D., Barbieri G., Falco M.R., Scldes A.M., and Gros E.G. 1984. The major sterol from three species of Polyporaceae. **Phytochemistry**. 23 : 2686 - 2687

Kiguchi, T., and Yanagi, O. 1985. Interspecific heterokaryyon and fruit body formation in *Coprinus macrorhizus* by protoplast fusion of auxotrophic mutant. Applied Microbiology and Biotechnology.22 : 121 - 127.

Kim J.H., and Nam J.S. 1984. Studies on distribution of the mononucleotides in *Ganoderma lucidum*. Hanguk Kyunhakhoechi. 12 : 111 – 116

Kohda H., Tokumoto W., Sakamoto K., Fujii M., Hirai Y., Yamasaki K., Komoda Y., Nakamura H., and Ishihara S. 1985. The Biologically Active Constituent of Ganoderma lucidum (Fr.) Karst. Hostamine Ralease – Tnhobitory Triterpenes. Chemistry Pharmacy Bulletin. 33:1367 - 1374

Labarere. J , Noel,T , and Imernon, M. 1989. Selection and genetic analysis of antibiotic-resistance mutant strains in *Agrocybe aegerita*. Mushroom Science. XII. Part I.

Lee S., Chen F., Chang S., Wei Y., Liu I., Chen C., Wei R., Chen K., and WeiHan P. 1984. *In Vivo* Antitumor Effect of Crude Extract from the Mycelium of *Ganoderma lucidum*. Journal Chinese Oncol Society. 5: 22 – 28

Li, S., and Chang, S. 1991. Selection and characterization of crystal-violet- and malachite-green-resistance mutant in *Volvariella volvacea*. World Journal Microbiology Biotechnology. 7: 541-550.

Lin L.J., Shio M.S., and Yeh S.F. 1988. Triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry. 28:2269 – 2271

Matsumoto, T., and Fukumasa – Nakai, Y. 1994. Isolation and genetics analysis of a chloramphenicol – resistance mutant of *Pleurotus ostreatus*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 58 : 434 – 435.

Miyahara R., Yoshimoto T., and Asawa K. 1987. Chemical structures and change of extracts during growth of reishi (*Ganoderma lucidum*). Mokuzai Gakkaishi. 33:416 – 422

Miyasaki T., and Nishijima M. 1981. Studies on Fungal Polysaccharide XXVII Structural Examination of a Water – soluble, Antitumor Polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. Chemistry Pharmacy Bulletin. 29:3611 – 3616

Mizuno T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., and Li, J. 1995. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substance and medicinal effects. Food Review International. 11: 151-166.

Mizuno T., Kato N., Totsuk A., Takenaka K., Shinkai K., and Shimizu M. 1984. Fractionation, structral features and antitumor activity of water – soluble polysaccharide from "Reishi", the fruit body of *Ganoderma lucidum*. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 58 : 871 – 880

Mizuno T., and Hazama T. 1986. Studies on the host – mediated antitumor polysaccharide fraction, formolysis and antitumor activity of fibrous polysaccharide (noncellulose) from Reishi, the fruit body of *Ganoderma lucidum*. Shizuoka Daigaku Nogakubu Kenkgu Hokoku. 36 : 77 – 83

Moore - Landecker, E. 1990. Fundamentals of the fungi. 3rd edition. New Jersey : Prentice – Hall, Inc.

Mukherjee , M., and Sengupta, S . 1986. Mutanogenesis of protoplast and regeneration of mycelium in mushroom *Volvariealla volvacea*. Applied Environmental Microbiology . 52 :1412 - 1414.

Mukherjee , M., and Sengupta, S . 1992. Induced mutation of mycelial protoplast of mushroom , *Termitomyces clypeatus* for obtaining auxotrophic mutants. Indian Journal Experimental Biology. I30:1206-1207.

Nagaraja T.G., and Kumar N.N. 1987 Mineral analysis of some fleshly fungi. Geobios. 14:115 - 116

Ohmasa . 1986. Intraspecific Protoplast Fusion of Pleurotus ostreatus Using Auxotrophic Mutant. Japan Journal Breeding. 36:429 – 433

Raper J.R. 1966. Genetics of Sexuality in Higher Fungi. New York : The Ronald Press Company.

Russell, P.J. 1994. Fundamentals of Genetics. New York : Harper Collins College Publishers.

Shaio M.S., Lin L.J, Yeh S.F., and Chou C.S. 1987 Two new triterpenes of the fungus *Ganoderma lucidum*. Journal of Nature Products. 50:886 – 890

Shaio M.S., Lin L.J., and Yeh S.F. 1988 Triterpenes in *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry. 26:873 – 875

Soxe Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., and Misaki A. 1985. Structures and Antitumor Activities of the Polysaccharide Isolated from Fruiting Body and the Growing Culture of Mycelium Ganoderma lucidum. . Agriculture Biology Chemistry. 49: 2641 - 2653

Toyomasu, T., Matsumoto, T., and Mori, K. 1986. Interspecific Protoplast Fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneo-stramineus*. Agriculture Biology Chemistry. 50:223 - 225 .

Triratana S., and Chaiprasert A. 1991. Sexuality of *Ganoderma lucidum*. Science and Cultivation of Edible Fungi. : 57 – 63

Wang G., Zhang J., Mizuno T., Zhuang C., Ito H., Mayuzumi H., Okamoto H., and Li J. 1993. Antitumor Active Polysaccharide from the Chiness Mushroom Songshan Lingzhi, the Fruiting Body of *Ganoderma tsugae*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 57:894 – 900

Yu V.L., Merigan T.C., and Barriere S.L. 1999. Antimicrobial Therapy and Vaccines. Maryland : William & Wilkins.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหาร

1.1 สูตรอาหารแข็ง PDA

potato dextrose agar	39	กรัม

ละลาย potato dextrose agar เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา15 นาที

1.2 สูตรอาหารเหลว PDB

potato dextrose broth	39	กรัม

ละลาย potato dextrose broth เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารแข็ง LcA

น้ำตาลกูลโคส	1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
โซเดียมไนเตรท	2	กรัม
ผงสกัดยีสต์	0.2	กรัม
ผงวุ้น	13	กรัม

pH 6.5 – 7.0

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH เป็น 6.5 – 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สูตรอาหารชนิด complete

เปปโตน	2	กรัม
สารสกัดยีสต์	2	กรัม
น้ำตาลกูลโคส	20	กรัม
ไทมีน	0.005	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.46	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.50	กรัม
ผงวุ้น	14	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH เป็น 6.5 – 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 สูตรอาหารชนิด minimal

น้ำตาลกูลโคส	20	กรัม
ไทมีน	0.005	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.46	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.50	กรัม
ผงวุ้น	14	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH เป็น 6.5 – 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. บัฟเฟอร์สำหรับการชักนำให้เกิดมิวเตชัน โดยสาร NTG

2.1 บัฟเฟอร์สำหรับละลายสาร NTG

Tri (hydroxymethyl – aminomethane)	6	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต	0.25	มิลลิกรัม

แคลเซียมไนเตรด	0.005	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH เป็น 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2 0.1 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0)

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	3	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH เป็น 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การหาโปลีแซคคาไรด์ในเส้นใย

3.1 การเตรียมสารละลาย

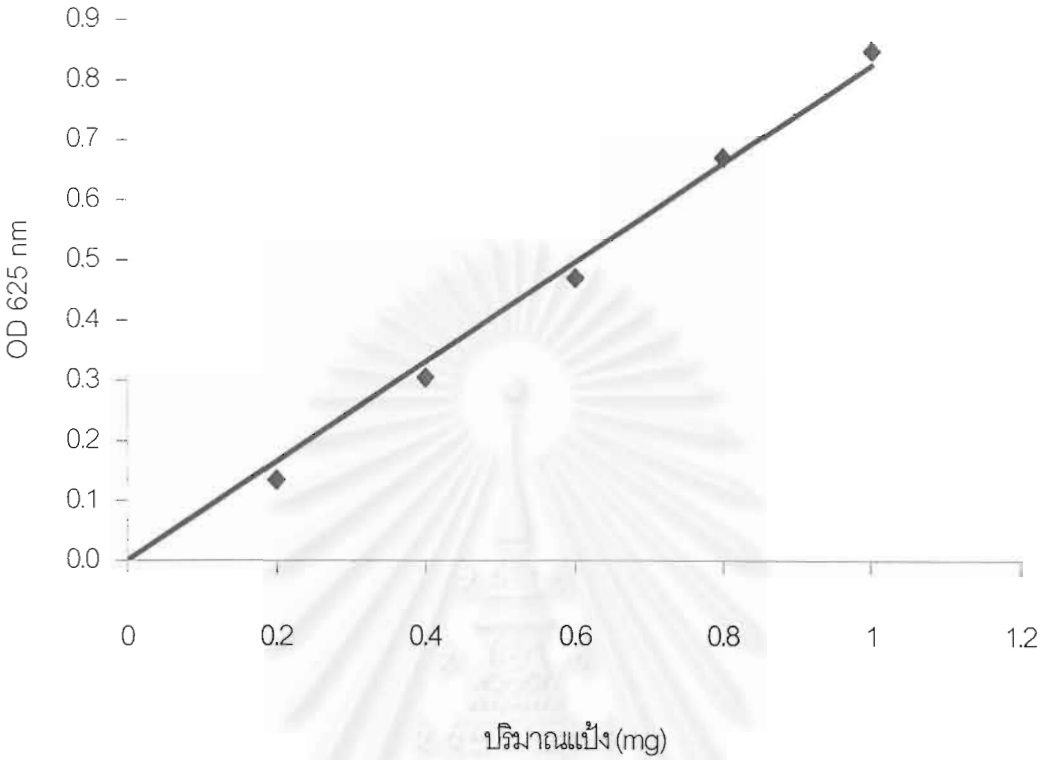
สารละลายแอนโทรน (anthrone solution)

แอนโทรน	0.2	กรัม
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร

ละลายแอนโทรนในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ทิ้งไว้ 30 นาที

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ใช้น้ำแป้งเป็นมาตรฐาน โดยเตรียมน้ำแป้งความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำ 1.5 มิลลิลิตร ของน้ำแป้งทุกความเข้มข้น มาเติมสารละลายแอนโทรน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 – 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 กราฟมาตราฐานของน้ำแป้งมาตราฐาน โดยวิธี anthrone test

4. การหาปริมาณดีเอ็นเอในเส้นใย

4.1 <u>การเตรียมสารละลาย</u>

4.1.1 ไดเฟนีลามีน รีเอเจนต์ (diphenylamine reagent)

ไดเฟนีลามีน	0.3	กรัม
กรดอะซิติก	30	มิลลิลิตร
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	0.75	มิลลิลิตร
0.2 % อะเซทาลดีไฮด์	0.3	มิลลิลิตร

4.1.2 95% เอธานอลต่อน้ำ

95 % เอธานาอล	4	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

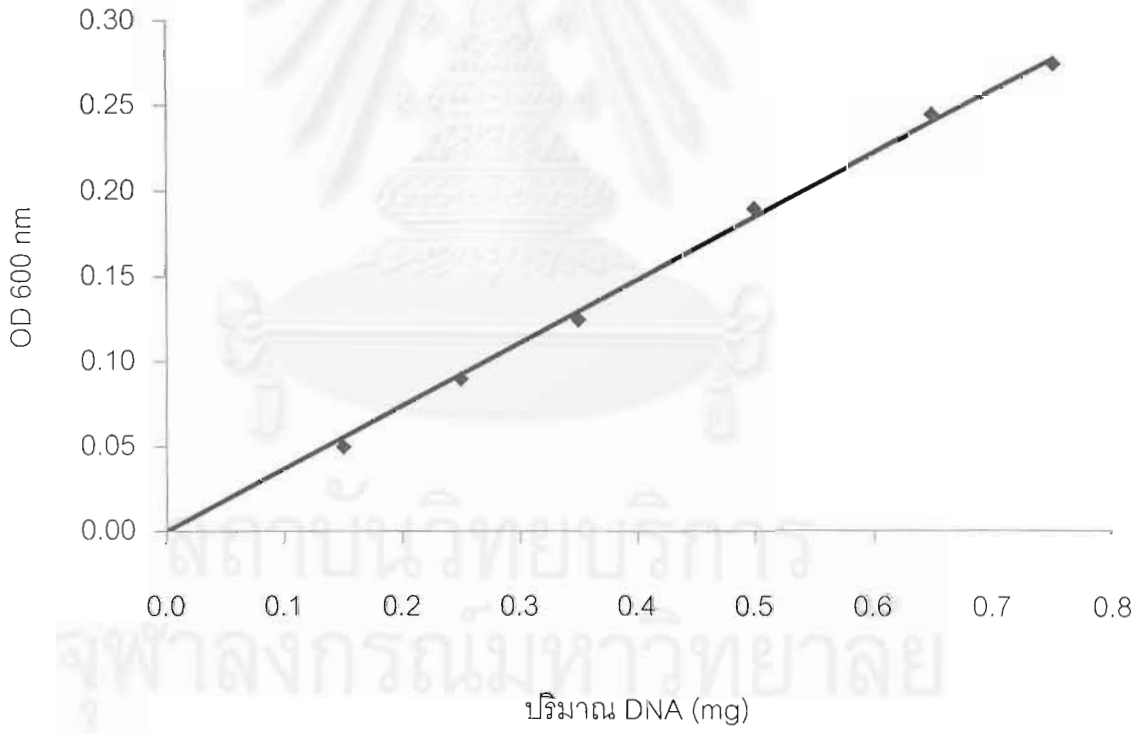
4.1.3 สารละลายอีเธอร์ต่อเอธานอล

ไดเอธิล อีเธอร์	1	ส่วน
95 % เอธานอล	3	ส่วน

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ใช้คาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยละลาย คาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ ด้วยสารละลาย 0.45 โมลต่อลิตร กรดเพอคลอริก เตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 0.15, 0.25, 0.35, 0.5, 0.65 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

นำ 1.5 มิลลิลิตร ของสารละลายดีเอ็นเอทุกความเข้มข้น มาเติมสารละลายไดฟีนีลามีน 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด15 นาที ตั้งทิ้งไว้ในเย็น วัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานของสารละลาย คาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ โดยวิธ diphenylamime reagent

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 14 รหัสของมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ที่ชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท

มิวแตนท์ MUG 003	มิวแตนท์ MUG 004
003 – UV – ny_1	004 – UV – ny_1
003 – UV – cv_1	004 – UV – ny_2
003 – UV – cv_2	004 – UV – ny_3
	004 – UV – ny_4
	004 – UV – ny_5
	004 – UV – cv_1
	004 – UV – cv_2

หมายเหตุ รหัสจะประกอบไปด้วย ตัวเลข 003 และ 004 ซึ่งหมายถึง สายพันธุ์ MUG 003 และสายพันธุ์ MUG 004 ตามลำดับ อักษร UV หมายถึงชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแสงอัลตราไวโอเลท อักษร ny และ cv หมายถึง มิวแตนท์ที่ได้มีความต้านทานต่อไนสเตติน และคริสตัลไวโอเลท ตามลำดับ และตัวเลขห้อยท้ายอักษรจะเป็นหมายเลขของมิวแตนท์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 รหัสของมิวแตนท์สายพันธุ์ MUG 003 และ MUG 004 ที่ชักนำด้วยสาร NTG

มิวแตนท์ MUG 003	มิวแตนท์ MUG 004
003 – NTG – ny_1	0004 – NTG – ny_1
003 – NTG – ny_2	004 – NTG – ny_2
003 – NTG – ny_3	004 – NTG – ny_3
003 – NTG – cv_1	004 – NTG – ny_4
003 – NTG – cv_2	004 – NTG – cv_1
	004 – NTG – cv_2
	004 – NTG – cv_3

หมายเหตุ รหัสจะประกอบไปด้วย ตัวเลข 003 และ 004 ซึ่งหมายถึง สายพันธุ์ MUG 003 และสายพันธุ์ MUG 004 ตามลำดับ อักษร NTG หมายถึงชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยสาร NTG อักษร ny และ cv หมายถึง มิวแตนท์ที่ได้มีความต้านทานต่อไนสเตติน และคริสตัลไวโอเลท ตามลำดับ และตัวเลขห้อยท้ายอักษรจะเป็นหมายเลขของมิวแตนท์นั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลว PDB สายพันธุ MUG 003 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เจริญในอาหารเหลว PDB (กรัม)										
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 16	วันที่ 18	วันที่ 20	วันที่ 30
003 – wild type	0.0890	0.09360	0.2673	0.3007	0.3174	0.3014	0.3074	0.0315	0.2857	0.2809	0.3152
003 – UV – ny_1	0.0039	0.0693	0.1543	0.2465	0.3035	0.2927	0.2848	0.2884	0.2721	0.2793	0.2895
003 – UV – cv_1	0.0120	0.0186	0.0334	0.0526	0.1038	0.2610	0.2512	0.2577	0.2538	0.2546	0.2601
003 – UV – cv_2	0.0108	0.0234	0.0730	0.1936	0.1964	0.2237	0.2289	0.2304	0.2139	0.2254	0.2312

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลว PDB สายพันธุ MUG 003 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ชักนำด้วยสาร NTG

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เจริญในอาหารเหลว PDB (กรัม)										
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 16	วันที่ 18	วันที่ 20	วันที่ 30
003 – wild type	0.0890	0.09360	0.2673	0.3007	0.3174	0.3014	0.3074	0.0315	0.2857	0.2809	0.3152
003 – NTG – ny_1	0.0185	0.0822	0.1933	0.2410	0.2720	0.2840	0.2869	0.2538	0.2576	0.2742	0.2860
003 – NTG – ny_2	0.0170	0.082	0.1921	0.2542	0.2592	0.2666	0.2572	0.2440	0.2583	0.2541	0.2563
003 – NTG – ny_3	0.0185	0.0767	0.1953	0.2696	0.2827	0.2675	0.2509	0.2540	0.2571	0.2567	0.2691
003 – NTG – cv_1	0.0213	0.0558	0.0954	0.1922	0.2133	0.2553	0.2519	0.2583	0.2471	0.2514	0.2588
003 – NTG – cv_2	0.0214	0.0731	0.1039	0.1437	0.1376	0.1338	0.1303	0.1143	0.1238	0.1247	0.1283

ตารางที่ 18 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลว PDB สายพันธุ์ MUG 004 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เจริญในอาหารเหลว PDB (กรัม)										
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 16	วันที่ 18	วันที่ 20	วันที่ 30
004 – wild type	0.0164	0.0412	0.1888	0.2819	0.2879	0.2969	0.2971	0.2941	0.2919	0.2980	0.3002
004 – UV – ny_1	0.0230	0.0837	0.2108	0.2825	0.2778	0.2576	0.2470	0.2596	0.2572	0.2594	0.2604
004 – UV – ny_2	0.0281	0.0993	0.1722	0.2228	0.2488	0.2495	0.2419	0.2464	0.2338	0.2461	0.2436
004 – UV – ny_3	0.0153	0.1175	0.1858	0.2630	0.3044	0.2969	0.3037	0.2956	0.2916	0.2973	0.3021
004 – UV – ny_4	0.0197	0.0855	0.1870	0.2452	0.2462	0.2434	0.2474	0.2499	0.2475	0.2453	0.2500
004 – UV – ny_5	0.0184	0.0851	0.1907	0.2305	0.2861	0.2719	0.2733	0.2753	0.2613	0.2713	0.2745
004 – UV – cv_1	0.0204	0.0143	0.0970	0.1570	0.3123	0.3095	0.3089	0.2953	0.2961	0.3014	0.3102
004 – UV – cv_2	0.0351	0.0566	0.1476	0.2940	0.2798	0.2786	0.2625	0.2655	0.2647	0.2723	0.2741

ตารางที่ 19 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลว PDB สายพันธุ MUG 004 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์มิวแตนท์ที่ชักนำด้วยสาร NTG

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เจริญในอาหารเหลว PDB (กรัม)										
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 16	วันที่ 18	วันที่ 20	วันที่ 30
004 – wild type	0.0164	0.0412	0.1888	0.2819	0.2879	0.2969	0.2971	0.2941	0.2919	0.2980	0.3002
004 – NTG – ny_1	0.0257	0.0825	0.1562	0.2856	0.2543	0.2567	0.2554	0.2561	0.2592	0.2602	0.2613
004 – NTG – ny_2	0.0327	0.1123	0.2168	0.2532	0.2597	0.2571	0.2658	0.2502	0.2548	0.2604	0.2634
004 – NTG – ny_3	0.0285	0.0880	0.1743	0.2686	0.3269	0.3214	0.3050	0.3146	0.3033	0.3014	0.3241
004 – NTG – ny_4	0.0340	0.1184	0.1599	0.2702	0.2937	0.3029	0.2875	0.2750	0.2580	0.2563	0.2574
004 – NTG – cv_1	0.0239	0.0575	0.1045	0.2536	0.2537	0.2526	0.2522	0.2496	0.2451	0.2511	0.2571
004 – NTG – cv_2	0.0268	0.0964	0.1506	0.2254	0.2729	0.2911	0.2813	0.2742	0.2660	0.2684	0.2703
004 – NTG – cv_3	0.0297	0.0881	0.1694	0.2416	0.2606	0.2682	0.2586	0.2468	0.2523	0.2601	0.2630

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชาลินี คงสวัสดิ์ เกิดวันที่ 26 มิถุนายน พ.ศ. 2517 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง เข้าศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2539 ได้รับทุนการศึกษาจากสถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ในปีการศึกษา 2540 และสำเร็จการศึกษา ปีการศึกษา 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย