# บทที่ 3

## ผลการทดลอง

### 3.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต และการคัดเลือกสายพันธุ์

3.1.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต เป็นวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กันมาก และใช้ในการเริ่มต้นโปรแกรมการกลายพันธุ์ เนื่องจากง่าย สะดวกและปลอดภัยในการใช้งาน ส่วนใหญ่ใช้ germicidal lamp ซึ่งเป็นหลอดไฟเมอคิวรี่ที่ปลดปล่อยรังสีที่ความยาวคลื่น 2537$^{o}$A ซึ่งใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิก จึงสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (20) แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มแสง ระยะเวลาที่ได้รับแสง ระยะทางระหว่างแสงกับจุลชีพ อายุและสภาพการเจริญของจุลชีพ ความหนาแน่นของเซลล์จุลชีพ เป็นต้น Avalos (34) ได้รายงานเปรียบเทียบผลของแสงอุลตร้าไวโอเลตต่อ microconidia ของ Gibberella fujikuroi ที่ไม่มีการบ่มสปอร์ (resting spore) กับสปอร์ที่บ่มแล้ว พบว่ามีอัตราการตายไม่แตกต่างกัน จึงสรุปว่าแสงอุลตร้าไวโอเลต ไม่มีผลในการเพิ่มอัตราการตายของสปอร์ที่กำลังจะงอก ส่วนเส้นใย (mycelium) จะด้านทาน (resistant) ต่อแสงอุลตร้าไวโอเลตมากกว่า microconidia ในการวิจัยนี้จึงนำ microconidia ที่ไม่มีการบ่มมาใช้สำหรับกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต

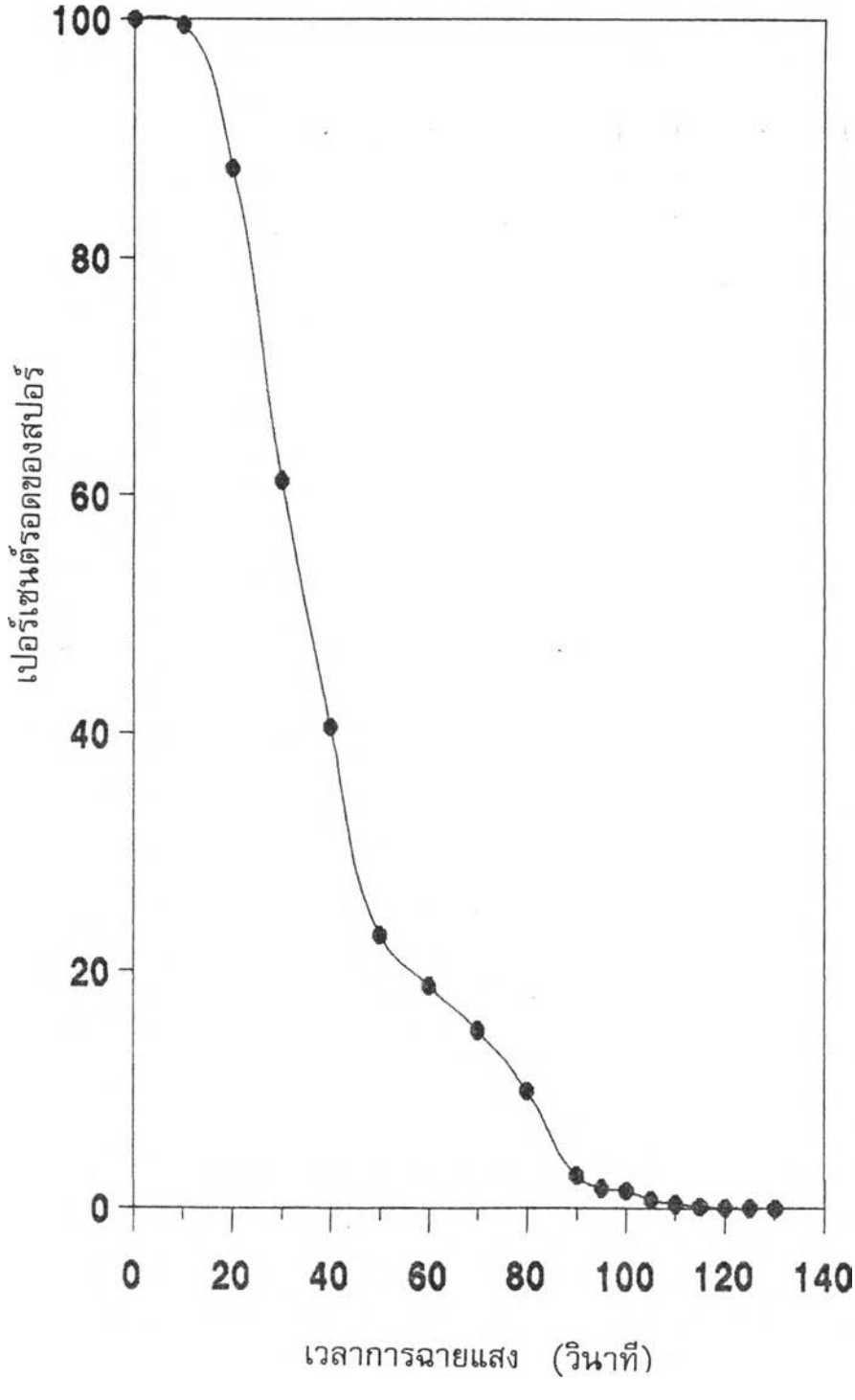
การวิจัยนี้ได้ชักนำให้ microoonidia ของ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งต้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตตามวิธีทดลองในข้อ 6.1 โดยใช้สปอร์จากเชื้อที่มีอายุ 10 วัน จำนวนสปอร์เริ่มต้น $10^{5}$ สปอร์ต่อมล. หลังจากฉายแสงอุลตร้าไวโอเลตแล้ว บ่มเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25$^{o}$ซ เป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อเชื้อเจริญจนเริ่มเห็นเส้นใย (mycelium) นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) และคำนวนเปอร์เซนต์การรอด ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 จะเห็นว่าสปอร์เริ่มจะมีการตายเกิดขึ้นเล็กน้อยเมื่อฉายแสงอุลตร้าไวโอเลตไปแล้ว 10 วินาที แต่หลังจากนั้นอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และการตายของ

สปอร์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆที่เวลาตั้งแต่ 90 วินาทีเป็นต้นไป

ตารางที่ 2 จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซนต์รอดของสปอร์สายพันธุ์ C ภายหลังการฉายแสงอุลตร้าไวโอเลตในช่วงเวลาต่างๆ

| เวลาการฉายแสง (วินาที) | จำนวนสปอร์ที่เจริญ (สปอร์) | เปอร์เซนต์การรอดของสปอร์ |
|---|---|---|
| 0 | $8.0X10^4$ | 100 |
| 10 | $7.9X10^4$ | 98.7 |
| 20 | $7.6X10^4$ | 88.3 |
| 30 | $5.3X10^4$ | 61.6 |
| 40 | $1.9X10^4$ | 22.0 |
| 50 | $1.7X10^4$ | 19.7 |
| 60 | $1.5X10^4$ | 17.4 |
| 70 | $1.4X10^4$ | 16.2 |
| 80 | $1.0X10^4$ | 11.6 |
| 90 | $2.5X10^3$ | 2.9 |
| 95 | $1.6X10^3$ | 1.8 |
| 100 | $1.2X10^3$ | 1.5 |
| 105 | $7.5x10^2$ | 0.8 |
| 110 | $3.5x10^2$ | 0.4 |
| 115 | $1.7x10^2$ | 0.2 |
| 120 | 70 | 0.08 |
| 125 | 32 | 0.04 |
| 130 | 8 | 0.01 |

รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของสปอร์สายพันธุ์ C หลังจากชักนำให้สปอร์เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต



มีรายงานว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตนั้น ปริมาณ (dose) ที่เหมาะสม คือ ปริมาณของแสงอุลตร้าไวโอเลตที่ทำให้มีอัตราการอยู่รอดของสปอร์ในช่วง 0.01-5 เปอร์เซนต์ ในช่วงเวลาดังกล่าวจะมีโอกาสได้สายพันธุ์กลายพันธุ์มากกว่าช่วงเปอร์เซนต์รอดอื่นๆ (18,20,25) และเนื่องจากยังไม่พบรายงานบ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (morphological change) กับประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ดังนั้นจุดประสงค์ในการทดลองนี้ เพื่อต้องการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกของเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ของเชื้อเหล่านั้น ควบคู่ไปกับการคัดเลือกสายพันธุ์ด้วย จากการศึกษาลักษณะภายนอกที่เจริญบนอาหาร PDA เสริมแร่ธาตุ ของสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะภายนอก ดังนี้

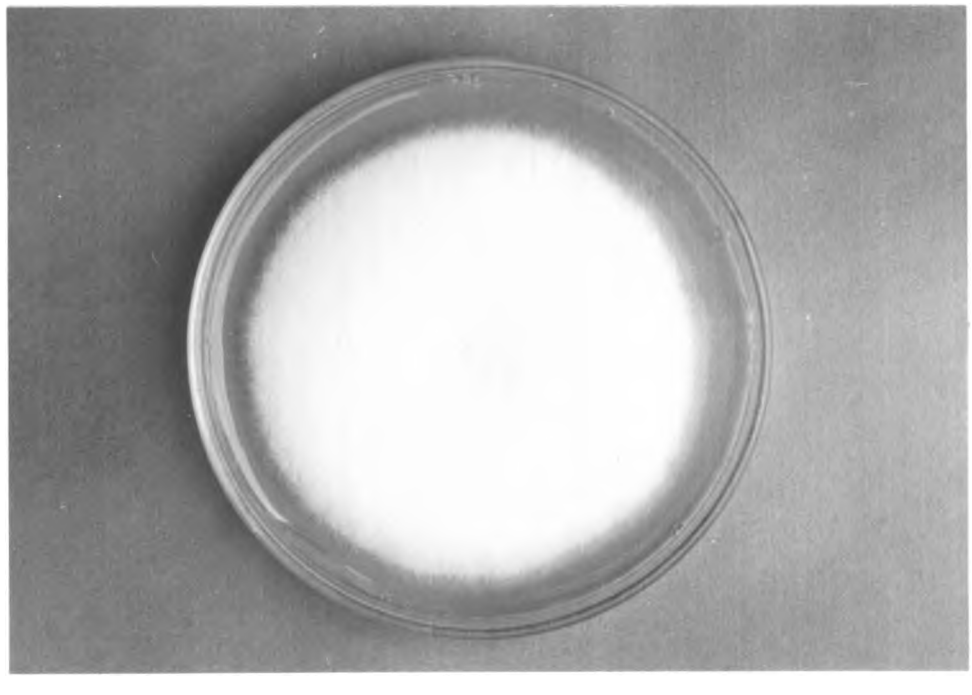
กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยยาวฟู เจริญเร็วมาก เหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งต้น (รูปที่ 6 ข-ค)

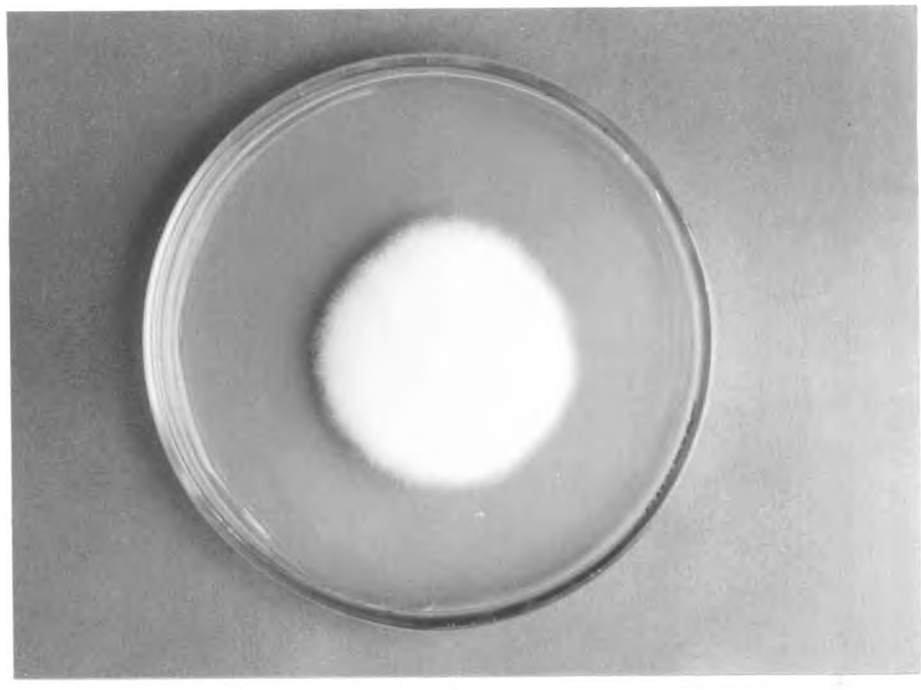
กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม ผิวหน้าโคโลนีหยัก เจริญเร็วปานกลาง (รูปที่ 6 ง-ช)

กลุ่มที่ 3 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสั้น การเจริญช้า หรือผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด (รูปที่ 6 ซ-ฎ)

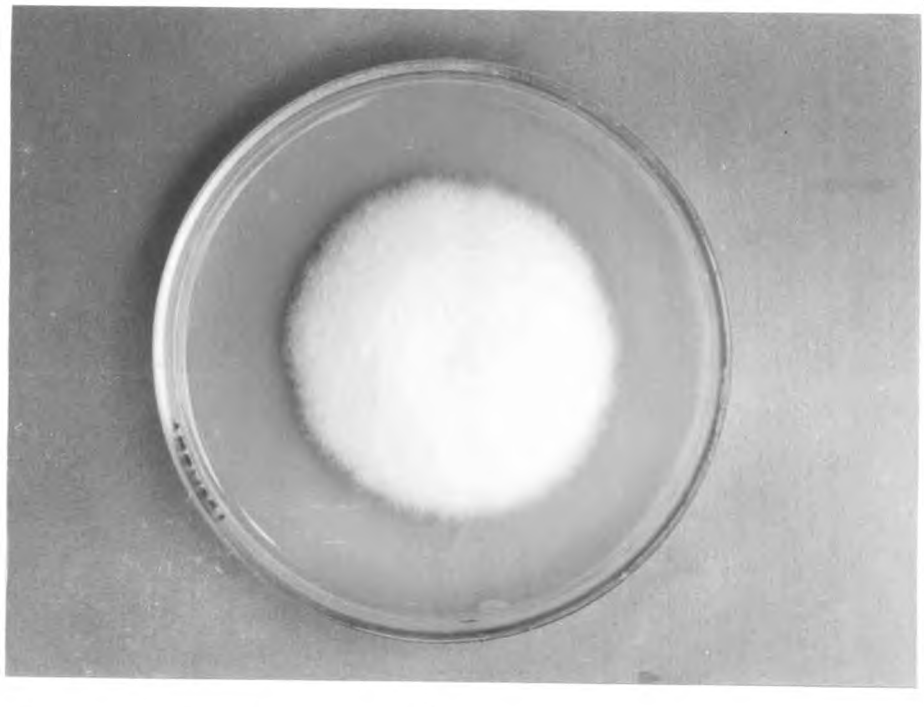
รูปที่ 6 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์ C และตัวอย่างสายพันธุ์กลายพันธุ์กลุ่มต่างๆ ที่เจริญบนอาหารสูตร PDA เสริมแร่ธาตุ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25°ซ อายุ 5 วัน

ก สายพันธุ์ C





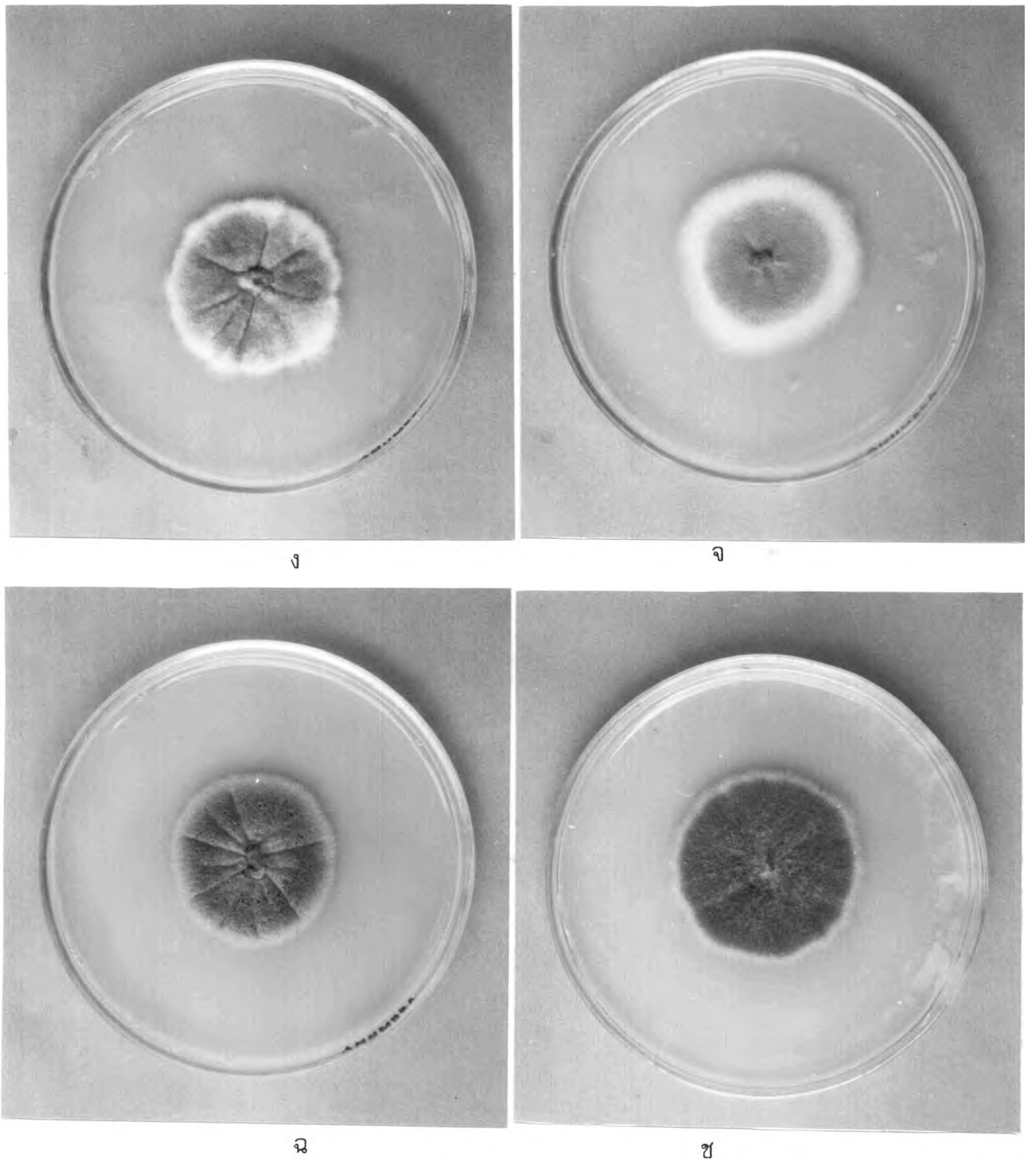
ข



ค

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

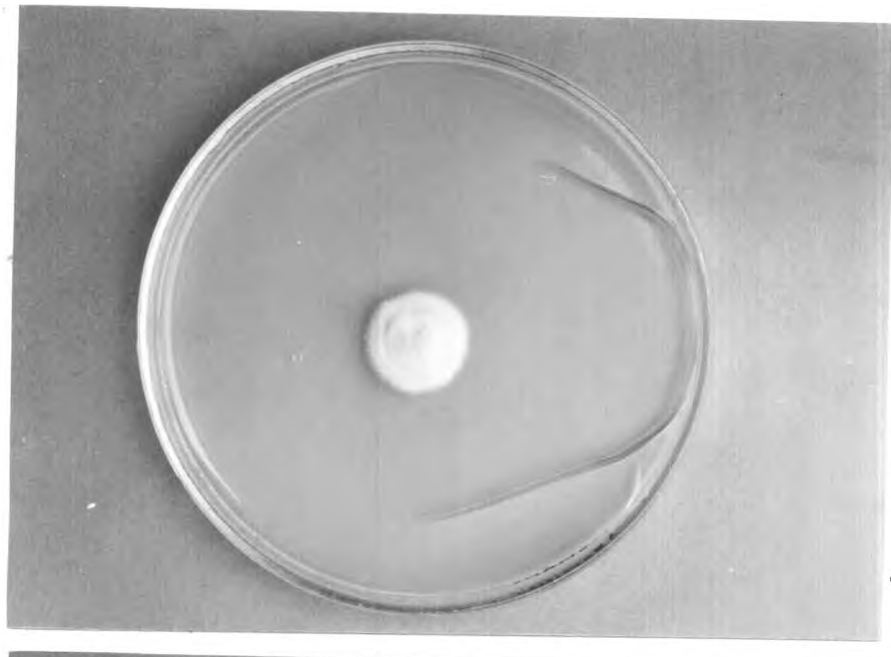
กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยยาวฟู เจริญเร็วมาก เหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม



ง จ

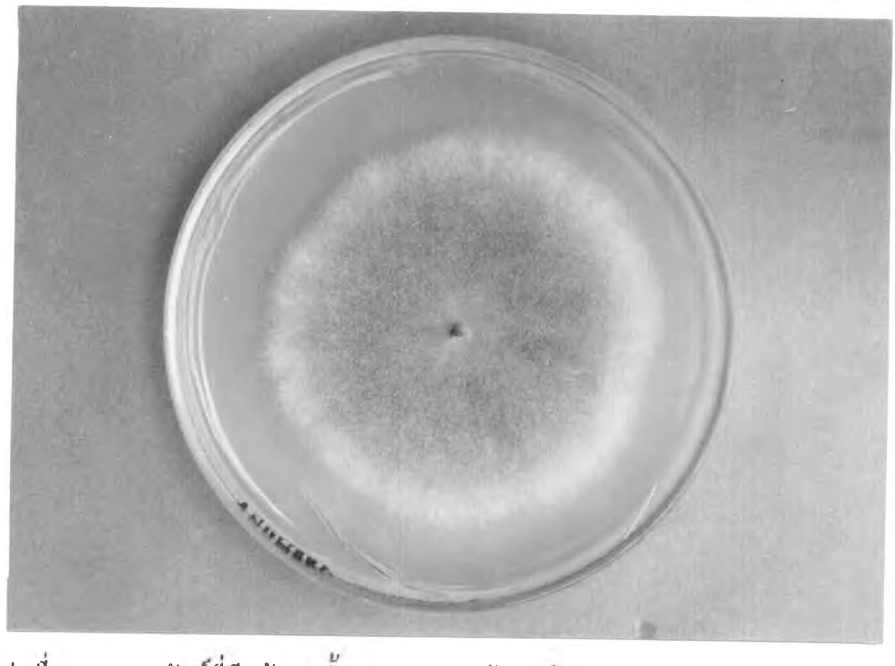
ฉ ช

กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม หรือผิวหน้าโคโลนีหยัก เจริญเร็วปานกลาง



ช

ฌ



ฎ

กลุ่มที่ 3 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสั้น การเจริญช้า หรือผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด

จากนั้นได้เก็บสายพันธุ์โดยการสุ่มตัวอย่างจากกลุ่มต่างๆทั้ง 3 กลุ่ม โดยเก็บจากการทดลอง (treatment) ที่มีเปอร์เซนต์การรอดตายระหว่าง 0.01-2.9 เปอร์เซนต์ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จำนวน 17 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 2 จำนวน 10 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 3 จำนวน 14 สายพันธุ์

โดยพบสายพันธุ์ในกลุ่มที่ 1 จำนวนมากที่สุด

3.1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงขึ้น

นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาทั้ง 41 สายพันธุ์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าตามวิธีในข้อ 4.3 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ขั้นปฐมภูมิด้วย TLC แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีระดับความเข้มของจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ตามวิธีทดลองข้อ 7.1 จากการทดลองนี้กำหนดให้สายพันธุ์ตั้งต้นมีความเข้มของจุด $GA_3$ อยู่ในระดับ 3 จากการคัดเลือกด้วย TLC ทั้ง 41 สายพันธุ์ ไม่พบสายพันธุ์ที่มีความเข้มของจุดสาร $GA_3$ สูงกว่าระดับ 3 จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความเข้มในระดับ 3 จำนวนทั้งหมด 18 สายพันธุ์มาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยนำน้ำหมักมาตรวจหาปริมาณ $GA_3$ ด้วย HPLC พบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 8 สายพันธุ์ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงกลุ่มของสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ C พร้อมทั้งปริมาณ $GA_3$ ที่สายพันธุ์ต่างๆผลิตได้

**กลุ่มที่ 1** สายพันธุ์ที่มีเส้นใยยาวฟู เจริญเร็วมาก เหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด$GA_3$บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) | รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด$GA_3$บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C | ชมพู | 3 | 565 | UV4-20 | ชมพู | 3 | 552 |
| | | | | UV4-37 | ชมพู | 3 | 519 |
| UV4-3 | ชมพู | 3 | 610 | UV4-41 | ชมพู | 3 | 490 |
| UV4-26 | ชมพู | 3 | 615 | UV4-19 | ชมพู | 3 | 519 |
| UV4-28 | ชมพูอ่อน | 3 | 648 | UV4-40 | ชมพู | 2 | - |
| UV4-34 | ชมพู | 3 | 480 | UV4-11 | ชมพู | 2 | - |
| UV4-7 | ชมพู | 3 | 435 | UV4-38 | ชมพู | 1 | - |
| UV4-12 | ชมพู | 3 | 589 | UV4-14 | แดง | 2 | - |
| UV4-4 | ชมพู | 3 | 572 | UV4-1 | แดง | 3 | 622 |
| UV4-27 | ชมพู | 3 | 583 | | | | |

ตารางที่ 3 (ต่อ)

**กลุ่มที่ 2** สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม หรือผิวหน้าโคโลนีหยัก เจริญเร็วปานกลาง

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|
| UV4-31 | ขาว | 3 | 575 |
| UV4-29 | ขาว | 3 | 560 |
| UV4-32 | แดง | 1 | - |
| UV4-2 | แดง | 2 | - |
| UV4-35 | แดงม่วง | 1 | - |
| UV4-17 | ส้มอ่อน | 3 | 527 |
| UV4-25 | ส้ม | 2 | - |
| UV4-33 | ส้ม | 2 | - |
| UV4-5 | ส้ม | 2 | - |
| UV4-8 | ส้มเข้ม | 1 | - |

I 1874 1289

ตารางที่ 3 (ต่อ)

**กลุ่มที่ 3** สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสั้น การเจริญช้า หรือผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|
| UV4-13 | ขาว | 3 | 500 |
| UV4-36 | ขาว | 3 | 518 |
| UV4-22 | ขาว | 2 | - |
| UV4-21 | ขาว | 1 | - |
| UV4-24 | ขาว | 1 | - |
| UV4-6 | ขาว | 1 | - |
| UV4-23 | ขาว | 1 | - |
| UV4-15 | ชมพู | 2 | - |
| UV4-16 | แดงเข้ม | 2 | - |
| UV4-30 | แดงม่วง | 0 | - |
| UV4-18 | เหลือง | 2 | - |
| UV4-9 | เหลือง | 2 | - |
| UV4-39 | ส้มเข้ม | 0 | - |
| UV4-10 | ส้ม | 0 | - |

* ค่าที่ได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

\- ไม่วิเคราะห์ด้วย HPLC เนื่องจากความเข้มของจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น

จากการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ พบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้น จำนวน 8 สายพันธุ์ คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงขึ้น ลำดับที่ 1-4 จำนวน 4 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ UV4-1 UV4-3 UV4-26 และ UV4-28 นำสายพันธุ์เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ กับสายพันธุ์ตั้งต้นภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน ตามวิธีในข้อ 7.3 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงสุด โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 7 10 และ 13 ของการเพาะเลี้ยงมาหาปริมาณ $GA_3$ ที่เชื้อผลิตได้ด้วย HPLC ได้ผลตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลักษณะของสายพันธุ์และประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ของ สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ เทียบกับสายพันธุ์ C

| รหัสสายพันธุ์ | ลักษณะเส้นใย | สีของน้ำหมัก | ประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 7 | 10 | 13 (วัน) |
| C | ฟู | ชมพู | 337 | 464 | 560 |
| UV4-1 | ฟูปานกลาง | แดง | 373 | 483 | 521 |
| UV4-3 | ฟู | ชมพู | 394 | 488 | 575 |
| UV4-26 | ฟู | ชมพู | 329 | 450 | 584 |
| UV4-28 | ฟู | ชมพูอ่อน | 399 | 525 | 591 |

จากข้อมูลในการเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดสายพันธุ์ที่สามารถผลิต $GA_3$ ได้สูงสุด พบว่าสายพันธุ์ UV4-1 ให้ $GA_3$ สูงในการเลี้ยงเชื้อครั้งแรก (ตารางที่ 3) แต่ปริมาณ $GA_3$ กลับลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นในการเลี้ยงครั้งต่อไป (ตารางที่ 4) และปริมาณ $GA_3$ ที่ได้ผันแปรไม่คงที่ ส่วน UV4-3 และ UV4-26 ให้ปริมาณ $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นไม่มากนัก คือ เพิ่มขึ้น 2.6 และ 4.2 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ สายพันธุ์ UV4-28 ให้ปริมาณ $GA_3$ ค่อนข้างคงที่และสูงกว่าสายพันธุ์อื่น คือ

ผลิต $GA_3$ 591 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ประมาณ 5.5 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ยังเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตสารสีแดง หรือไบคาเวอริน (17) ในน้ำหมักน้อยกว่าสายพันธุ์ C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น เป็นประโยชน์ในขั้นตอนการสกัดแยกและตกผลึก $GA_3$ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ UV4-28 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อใช้ในการกลายพันธุ์ด้วย NTG ต่อไป

3.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกของสายพันธุ์กลายพันธุ์ กับประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$

จากผลการทดลองที่แสดงไว้ในข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 พอจะสรุปความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกและประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ได้ดังแสดงในตารางที่ 5 กลุ่มที่ 1 จะพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นจำนวน 7 สายพันธุ์ จากสายพันธุ์ในกลุ่มนี้จำนวนทั้งหมด 17 สายพันธุ์ หรือมีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นได้ถึง 41 เปอร์เซนต์ กลุ่มที่ 2 พบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นเพียง 1 สายพันธุ์ จากสายพันธุ์ในกลุ่มนี้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ หรือมีโอกาสพบพียง 10 เปอร์เซนต์ ส่วนกลุ่มที่ 3 คัดเลือกมา 14 สายพันธุ์ แต่ไม่พบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นเลย จะเห็นได้ว่าในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกกับประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ของสายพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตนั้น สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะเส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม หรือผิวหน้าโคโลนีหยัก เจริญเร็วปานกลาง ส่วนใหญ่จะมีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น และ สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีเส้นใยสั้น เจริญช้า หรือผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาดจะมีปริมาณ $GA_3$ ต่ำมาก หรือ ไม่ปรากฏจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC สายพันธุ์เหล่านี้จึงถูกคัดทิ้งในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เนื่องจากเจริญได้น้อยในอาหารเหลวที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ ส่วนสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีเส้นใยยาวฟู เจริญเร็ว ลักษณะเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น มีแนวโน้มที่จะพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ ใกล้เคียงหรือมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นได้มากที่สุด ดังนั้นในขั้นแรกควรคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่มีลักษณะดังกล่าวมาก่อน แล้วจึงนำไปคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงกลุ่มของสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก* และความสามารถในการผลิต $GA_3$ วิเคราะห์โดย HPLC

| กลุ่มที่ | ลักษณะภายนอก | จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมด | จำนวนสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น | เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้น |
|---|---|---|---|---|
| 1 | เส้นใยยาวฟู เจริญเร็ว เหมือนหรือคล้ายสายพันธุ์ตั้งต้น | 17 | 7 | 41 |
| 2 | เส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม ผิวหน้าโคโลนีหยัก เจริญเร็วบานกลาง | 10 | 1 | 10 |
| 3 | เส้นใยสั้น การเจริญช้า ผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด | 14 | 0 | 0 |

* การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกสังเกตจากการเจริญบนอาหารแข็ง PDA เสริมแร่ธาตุ บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 5 วัน

3.2 การกลายพันธุ์ด้วย NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์

3.2.1 ศึกษาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มสปอร์ (preincubation) ของ Gibberella fujikuroi ก่อนการกลายพันธุ์ด้วย NTG

ปี ค.ศ.1968 Cedar-Olmedo และคณะ (45) ทดลองใน E.coli พบว่า NTG จะเข้าไปจับที่ replication point ของโครโมโซมแล้วทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยประสิทธิภาพสูง โดยสันนิษฐานว่า NTG จะเติมหมู่เมทิลให้กับเบสกวานีนของดีเอนเอที่กำลังจำลองตัว หลังจากนั้นจะเกิดการซ่อมแซมมากกว่าที่จุดอื่นๆ ทำให้มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์มาก

สปอร์ของจุลินทรีย์เป็นโครงสร้างที่ทนต่อสิ่งแวดล้อม (resistant structure) และอยู่ในระยะพักตัว (resting cell) เมื่อใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์จะต่ำ (34) ดังนั้นจึงต้องบ่มสปอร์ (preincubation) เพื่อให้ดีเอนเอเกิดการจำลองตัวก่อนเติมสารก่อการกลายพันธุ์ การทดลองนี้จะศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มสปอร์ และหาอัตราการอยู่รอดของสปอร์เมื่อเติม NTG เข้าไปในสารแขวนลอยของสปอร์ที่มีอายุการงอกต่างๆกัน โดยบ่มให้ microconidia ของสายพันธุ์ UV4-28 งอก ที่เวลาตั้งแต่ 0-6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเติม NTG ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 มิลลิโมลาร์ นาน 30 นาที ตามวิธีทดลองข้อ 6.2.1 อัตราการอยู่รอดของสปอร์เป็นไปตามตารางที่ 6 และ รูปที่ 7

จากการทดลองนี้ สปอร์ที่อยู่ในระยะพักตัว (เวลา 0 ชั่วโมง) (รูปที่ 8ก) มีอัตราการอยู่รอด 50 และ 45 เปอร์เซนต์ ที่ความเข้มข้นของ NTG 0.5 และ 0.7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แต่หลังจากบ่มสปอร์นาน 1 ชั่วโมง อัตราการอยู่รอดจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด และอัตราการอยู่รอดจะเริ่มคงที่ที่เวลา 2-5 ชั่วโมง ซึ่งยังไม่มีการงอก germ tube (รูปที่ 8ข-ค) แต่หลังจาก 5 ชั่วโมงไปแล้ว อัตราการอยู่รอดมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นอีก ที่เวลานี้สปอร์ส่วนใหญ่มีการงอก germ tube(รูปที่ 8ง) การใช้ NTG ทั้งสองความเข้มข้นมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน (รูปที่ 7)

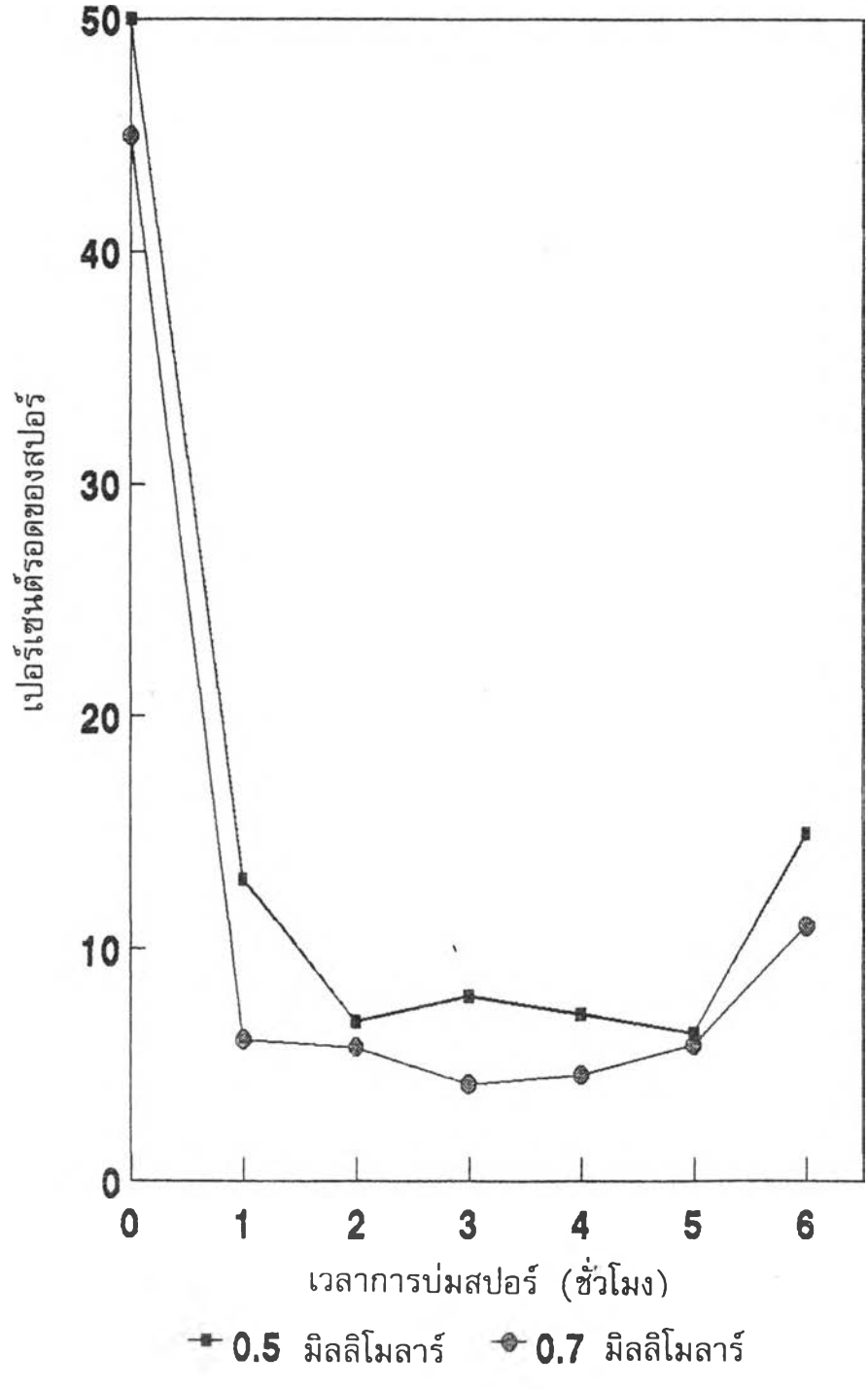
Avalos (43) อธิบายว่าในช่วงเวลาการบ่มสปอร์ระยะแรก สปอร์จะยังไม่งอก germ tube แต่สปอร์จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ภายในนิวเคลียส และประสิทธิภาพการเลือกผ่านสารของเซลล์ลดลงในขณะที่ดีเอนเอเริ่มมีการจำลองตัว ช่วงเวลาดังกล่าวจะเป็นเวลาที่สปอร์ไว (sensitive) ต่อ NTG มากที่สุด ส่วนสปอร์ที่มีการงอก germ tube ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จะพัฒนาไปเป็นเส้นใย (mycelium) ซึ่งทน (resistant) ต่อ NTG การบ่มสปอร์นานๆเมื่อมี

การงอก germ tubeแล้ว อัตราการอยู่รอดจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นช่วงเวลาที่เหมาะเพื่อบ่มสปอร์ก่อนการกลายพันธุ์ด้วย NTG คือ 2-5 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ สำหรับการวิจัยต่อไปจะเลือกบ่มสปอร์นาน 3 ชั่วโมงก่อนการกลายพันธุ์ด้วย NTG

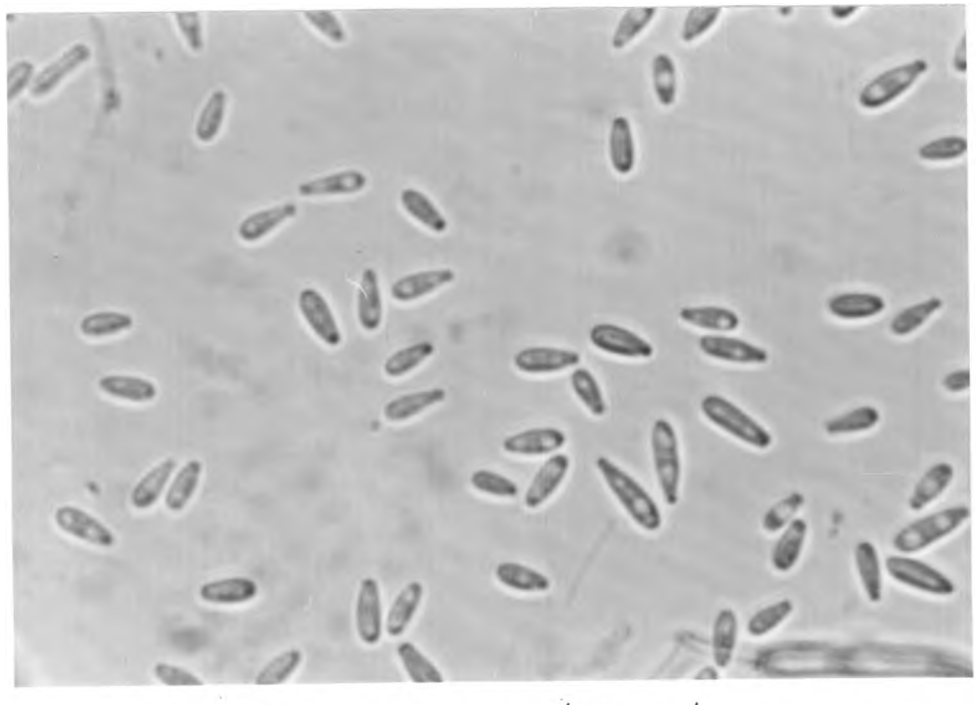
ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของสปอร์ที่มีอายุการงอกต่างๆกัน เมื่อทำปฏิกิริยากับ NTG ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 มิลลิโมลาร์

| เวลาการบ่มสปอร์ (ชั่วโมง) | NTG 0.5 มิลลิโมลาร์ | | NTG 0.7 มิลลิโมลาร์ | |
|---|---|---|---|---|
| | จำนวนสปอร์ที่เจริญ | เปอร์เซนต์การรอด | จำนวนสปอร์ที่เจริญ | เปอร์เซนต์การรอด |
| 0 | $5.0X10^5$ | 50.0 | $4.5X10^5$ | 45.0 |
| 1 | $1.3X10^5$ | 13.0 | $6.1X10^4$ | 6.1 |
| 2 | $6.9X10^4$ | 6.9 | $5.8X10^4$ | 5.8 |
| 3 | $8.0X10^4$ | 8.0 | $4.2X10^4$ | 4.2 |
| 4 | $7.2X10^4$ | 7.2 | $4.6x10^4$ | 4.6 |
| 5 | $6.4X10^4$ | 6.4 | $5.9X10^4$ | 5.9 |
| 6 | $1.5X10^5$ | 15.0 | $1.1X10^5$ | 11.0 |

รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการบ่มสปอร์กับเปอร์เซนต์รอดของสปอร์เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NTG 0.5 และ 0.7 มิลลิโมลาร์

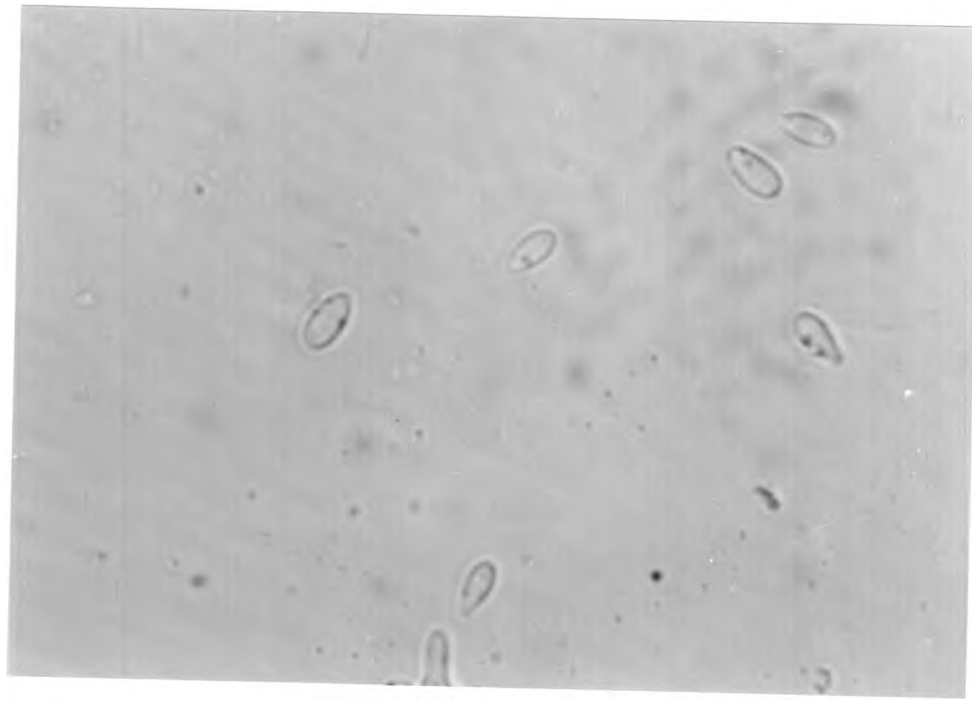


รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของสปอร์เมื่อบ่มใน nutrient broth ที่ช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (bright field) กำลังขยาย 400 เท่า

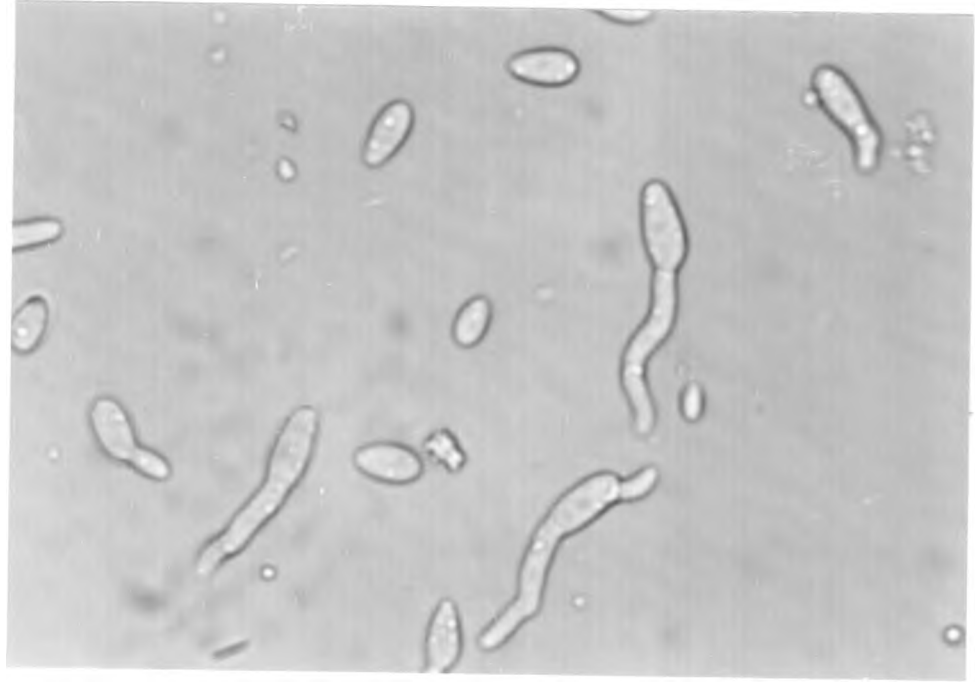


ก. บ่มใน nutrient broth ที่เวลา 0 ชั่วโมง

ข. บ่มใน nutrient broth ที่เวลา 2 ชั่วโมง



ค. บ่มใน nutrient broth ที่เวลา 4 ชั่วโมง



ง. บ่มใน nutrient broth ที่เวลา 6 ชั่วโมง

3.2.2 การชักนำให้สายพันธุ์ UV4-28 กลายพันธุ์ด้วย NTG

NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์หลายชนิด Erokhina (32) Avalos (34) และ Koelblin (35) รายงานตรงกันว่า NTG มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ microconidia ของ Gibberella fujikuroi เกิดการกลายพันธุ์ได้สูงกว่าแสงอุลตร้าไวโอเลต ในการวิจัยต่อไปจึงได้ใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์โดยคาดว่าจะพบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นได้

การชักนำให้เชื้อ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตในการทดลองที่ 3.1.1 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ UV4-28 ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ 591 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่าสายพันธุ์ C 5.5 เปอร์เซนต์ และความสามารถในการผลิตสีแดงในน้ำหมักลดลง มาชักนำให้สปอร์เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG โดยบ่มสปอร์ใน nutrient broth เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลายพันธุ์ตามวิธีทดลองข้อ 6.2.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 2-3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ และคำนวนเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังตารางที่ 7 และรูปที่ 9 จะเห็นว่าเมื่อใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์แล้ว การตายของสปอร์จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากสัมผัสกับ NTG

ปัจจัยของการใช้ NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ ความเข้มข้นของ NTG Calam (29) รายงานว่าในการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์มักจะพบสปอร์ที่กลายพันธุ์แล้วเป็นจำนวนมากในช่วงความเข้มข้นของ NTG ที่ให้เปอร์เซนต์รอดของสปอร์อยู่ระหว่าง 0-50เปอร์เซนต์ และ Avalos (34) รายงานว่า เมื่อใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ที่เปอร์เซนต์รอด 14 เปอร์เซนต์ จะมีโอกาสพบ Auxotroph และสายพันธุ์กลายพันธุ์ในเปอร์เซนต์ที่สูง จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต มีแนวโน้มว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนสายพันธุ์ตั้งต้นจะมีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นในเปอร์เซนต์ที่สูงกว่าสายพันธุ์ในลักษณะอื่น เพื่อที่จะยืนยันผลดังกล่าว จึงทำการทดลองซ้ำโดยแบ่งกลุ่มสายพันธุ์กลายพันธุ์เป็น 3 กลุ่มเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1.1 และเก็บสายพันธุ์จากแต่ละกลุ่มที่อยู่ในช่วงเปอร์เซนต์รอดระหว่าง 2.3-20.2 เปอร์เซนต์แบบสุ่ม (random) โดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่แยกจากกันได้ดี ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยยาวฟู เจริญเร็วมาก เหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น จำนวน 116 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม ผิวหน้าโคโลนีหยัก เจริญเร็วปานกลาง จำนวน 39 สายพันธุ์

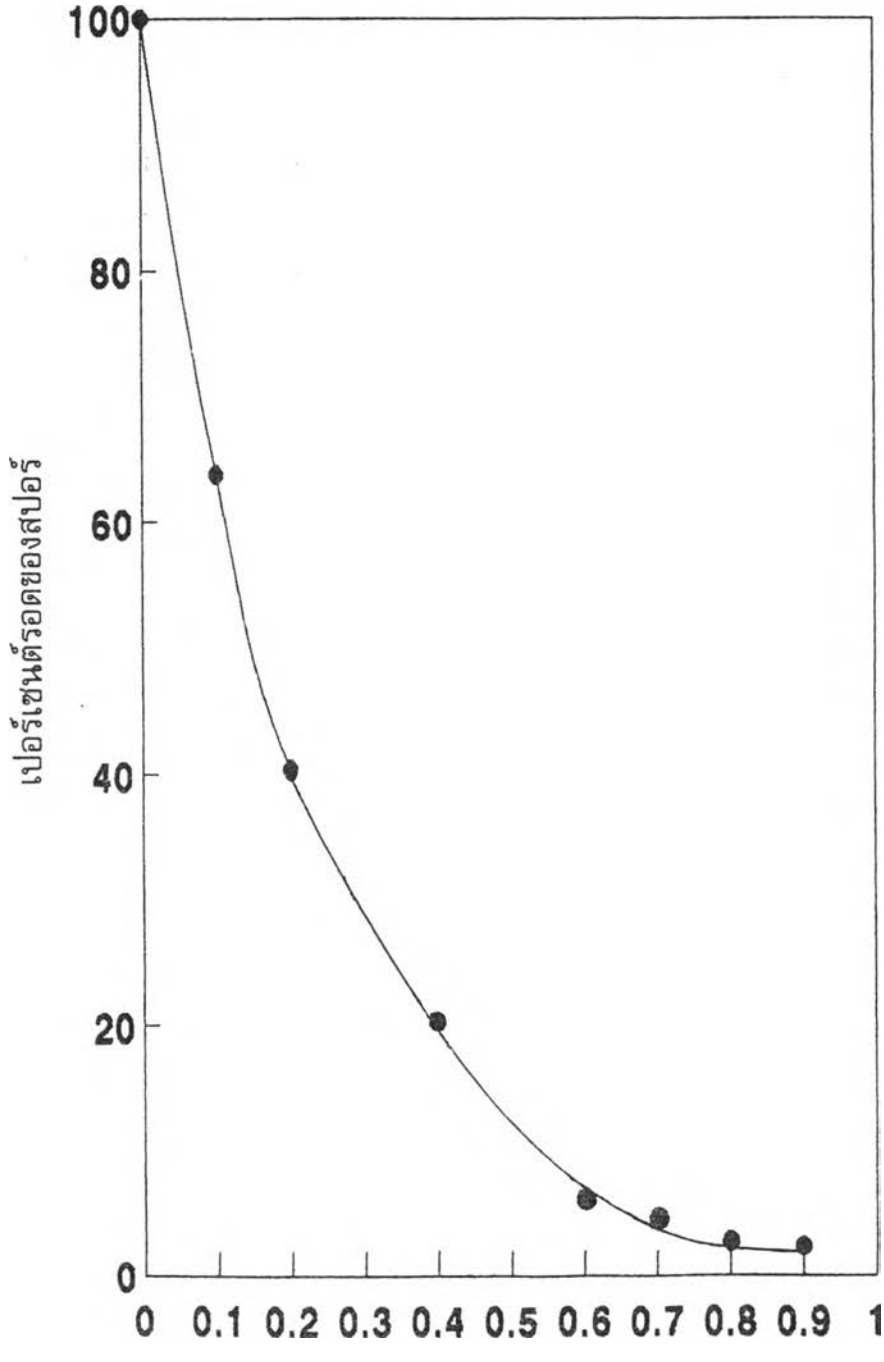
กลุ่มที่ 3 สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสั้น การเจริญช้า หรือผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด จำนวน 26 สายพันธุ์

รวมสายพันธุ์ที่คัดเลือกทั้งหมด 181 สายพันธุ์

ตารางที่ 7 จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ของสายพันธุ์ UV4-28 ภายหลังการเติม NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นของ NTG (มิลลิโมลาร์) | จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ | เปอร์เซนต์การรอดของสปอร์ |
|---|---|---|
| 0 | $4.7X10^5$ | 100 |
| 0.1 | $3.0X10^5$ | 63.8 |
| 0.2 | $1.9X10^5$ | 40.4 |
| 0.3 | $1.7X10^5$ | 36.1 |
| 0.4 | $9.5X10^4$ | 20.2 |
| 0.5 | $3.4X10^4$ | 7.2 |
| 0.6 | $2.9X10^4$ | 6.1 |
| 0.7 | $2.2X10^4$ | 4.6 |
| 0.8 | $1.3X10^4$ | 2.7 |
| 0.9 | $1.1x10^4$ | 2.3 |

รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของสปอร์สายพันธุ์ UV4-28 กับความเข้มข้นของ NTG



3.2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงขึ้น

นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาทั้ง 181 สายพันธุ์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ขั้นปฐมภูมิด้วย TLC แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีระดับความเข้มของจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น จากการทดลองนี้กำหนดให้สายพันธุ์ดั้งต้นมีความเข้มของจุด $GA_3$ อยู่ในระดับ 3 ได้ผลตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงกลุ่มของสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ UV4-28 พร้อมทั้งปริมาณ $GA_3$ ที่สายพันธุ์ต่างๆผลิตได้

**กลุ่มที่ 1** สายพันธุ์ที่มีเส้นใยยาวฟู เจริญเร็วมาก เหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งต้น

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด$GA_3$บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) | รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด$GA_3$บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| UV4-28 | ชมพูอ่อน | 3 | 571 | 05-12 | ชมพูอ่อน | 4 | 546 |
| | | | | 05-24 | ชมพูอ่อน | 4 | 498 |
| 04-3 | ชมพูอ่อน | 4 | 580 | 05-25 | ชมพูอ่อน | 4 | 512 |
| 04-4 | ชมพูอ่อน | 4 | 619 | 06-3 | ชมพูอ่อน | 4 | 567 |
| 04-8 | ชมพูอ่อน | 4 | 610 | 06-8 | ชมพูอ่อน | 4 | 678 |
| 04-10 | ชมพูอ่อน | 4 | 635 | 06-11 | ชมพูอ่อน | 4 | 512 |
| 04-23 | ชมพูอ่อน | 4 | 648 | 06-14 | ชมพูอ่อน | 4 | 584 |
| 04-25 | ชมพูอ่อน | 4 | 642 | 07-1 | ชมพูอ่อน | 4 | 589 |
| 05-3 | ชมพูอ่อน | 4 | 707 | 07-15 | ชมพูอ่อน | 4 | 549 |
| 05-6 | ชมพูอ่อน | 4 | 618 | 07-25 | ชมพูอ่อน | 4 | 577 |
| 05-9 | ชมพูอ่อน | 4 | 548 | 08-19 | ชมพูอ่อน | 4 | 728 |

ตารางที่ 8 (ต่อ)

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) | รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 08-21 | ชมพูอ่อน | 4 | 747 | 05-20 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 08-6 | ชมพูอ่อน | 4 | 492 | 05-22 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 08-28 | ชมพูอ่อน | 4 | 678 | 06-1 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 09-3 | ชมพูอ่อน | 4 | 611 | 06-2 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 09-4 | ชมพูอ่อน | 4 | 512 | 06-5 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 09-10 | ชมพูอ่อน | 4 | 698 | 06-6 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 09-23 | ชมพูอ่อน | 4 | 508 | 06-7 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 09-24 | ชมพูอ่อน | 4 | 567 | 06-9 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 09-11 | ชมพูอ่อน | 4 | 712 | 06-10 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 04-1 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 06-22 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 04-9 | เหลือง | 3 | - | 07-2 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 04-11 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-3 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 04-17 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-5 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 04-19 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-6 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 04-24 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-13 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 05-1 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-14 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 06-13 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-16 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 06-16 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-17 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 05-14 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-18 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 05-16 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-20 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 05-19 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 08-2 | ชมพูอ่อน | 3 | - |

ตารางที่ 8 (ต่อ)

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) | รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 08-5 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 09-28 | ชมพูอ่อน | 3 | - |
| 08-7 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 04-7 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 08-8 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 04-13 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 08-11 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 04-14 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 08-12 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 04-16 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 08-14 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 04-20 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 08-15 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 05-2 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 08-22 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 05-7 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 08-23 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 05-8 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 08-25 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 06-12 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 09-1 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 05-15 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 09-2 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 06-19 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 09-5 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 05-17 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 09-6 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-7 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 09-9 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-11 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 09-17 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 07-21 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 09-18 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 09-8 | ชมพูอ่อน | 2 | - |
| 09-19 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 06-17 | ชมพูอ่อน | 1 | - |
| 09-20 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 05-5 | ชมพูอ่อน | 1 | - |
| 09-26 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 05-10 | แดง | 1 | - |
| 09-27 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 06-4 | แดง | 3 | - |

ตารางที่ 8 (ต่อ)

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) | รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 05-18 | ขาว | 1 | - | 08-3 | ส้ม | 4 | 536 |
| 06-20 | ขาว | 4 | 579 | 08-4 | ส้ม | 3 | - |
| 08-13 | ขาว | 4 | 598 | 08-17 | ส้ม | 3 | - |
| 09-16 | ขาว | 3 | - | 04-9 | เหลือง | 3 | - |
| 09-21 | ขาว | 4 | 505 | 09-14 | เหลือง | 4 | 657 |
| 07-24 | ส้ม | 3 | - | 09-13 | เหลือง | 3 | - |

**กลุ่มที่ 2** สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม หรือผิวหน้าโคโลนีหยัก เจริญเร็วปานกลาง

ตารางที่ 8 (ต่อ)

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) | รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 05-27 | ชมพูอ่อน | 4 | 678 | 08-27 | แดงเข้ม | 3 | - |
| 09-32 | ชมพูอ่อน | 4 | 534 | 06-26 | แดงเข้ม | 3 | - |
| 09-35 | ชมพูอ่อน | 4 | 505 | 06-27 | แดงเข้ม | 3 | - |
| 06-15 | ชมพูอ่อน | 4 | 607 | 08-33 | แดงเข้ม | 1 | - |
| 04-27 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 09-12 | แดงเข้ม | 1 | - |
| 08-32 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 05-26 | แดงคล้ำ | 1 | - |
| 08-34 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 08-35 | แดงเข้ม | 1 | - |
| 09-30 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 06-23 | แดงเข้ม | 0 | - |
| 09-3 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 08-7 | เหลือง | 3 | - |
| 09-37 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 06-24 | เหลือง | 3 | - |
| 09-38 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 08-24 | เหลือง | 3 | - |
| 08-30 | ชมพูอ่อน | 2 | - | 04-28 | เหลือง | 1 | - |
| 06-28 | แดง | 4 | 567 | 09-34 | ส้ม | 3 | - |
| 05-11 | แดง | 4 | 765 | 09-33 | ส้ม | 2 | - |
| 09-31 | แดง | 3 | - | 08-18 | ส้ม | 1 | - |
| 06-25 | แดง | 3 | - | 08-1 | แสด | 2 | - |
| 04-26 | แดง | 2 | - | 08-9 | ม่วง | 3 | - |
| 06-27 | แดง | 2 | - | 06-12 | น้ำเงิน | 1 | - |
| 04-2 | แดง | 1 | - | 08-36 | ขาว | 4 | 571 |
| 07-27 | แดง | 1 | - | | | | |

**กลุ่มที่ 3** สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสั้น การเจริญช้า หรือผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด

ตารางที่ 8 (ต่อ)

| รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) | รหัสสายพันธุ์ | สีในอาหารเหลว | ความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC | ปริมาณ $GA_3$* (มก./ล.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 08-41 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 06-30 | แดง | 1 | - |
| 04-32 | ชมพูอ่อน | 3 | - | 08-20 | แดงเข้ม | 1 | - |
| 08-39 | ชมพูอ่อน | 2 | - | 04-30 | แดงเข้ม | 1 | - |
| 08-16 | ชมพูอ่อน | 1 | - | 07-29 | แดงเข้ม | 1 | - |
| 04-21 | ชมพูอ่อน | 1 | - | 07-28 | ขาว | 4 | 498 |
| 06-29 | ชมพูอ่อน | 1 | - | 07-31 | ขาว | 2 | - |
| 07-30 | ชมพูอ่อน | 1 | - | 05-13 | ขาว | 2 | - |
| 04-22 | ม่วงอ่อน | 2 | - | 09-38 | ขาว | 2 | - |
| 05-21 | ม่วง | 0 | - | 08-26 | ขาว | 1 | - |
| 07-9 | แดง | 4 | 627 | 09-12 | เหลือง | 3 | - |
| 08-40 | แดง | 2 | - | 08-37 | ส้มอ่อน | 2 | - |
| 04-31 | แดง | 2 | - | 06-25 | น้ำตาล | 0 | - |
| 06-28 | แดง | 1 | - | 07-8 | ครีม | 1 | - |

* ค่านี้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

\- ไม่วิเคราะห์ด้วย HPLC เนื่องจากความเข้มของจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

จากการคัดเลือกด้วย TLC ทั้ง 181 สายพันธุ์ พบสายพันธุ์ที่มีความเข้มของจุดสาร $GA_3$ ในระดับ 4 จำนวน 43 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8) นำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยใช้น้ำหมักมาตรวจหาปริมาณ $GA_3$ ด้วย HPLC พบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 25 สายพันธุ์ จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงขึ้น ลำดับที่ 1-5 จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 05-3 05-11 08-19 08-21 และ 09-11 นำสายพันธุ์เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ กับสายพันธุ์ตั้งต้นภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงสุด ด้วย HPLC ได้ผลตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ลักษณะของสายพันธุ์และประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ของสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ เทียบกับสายพันธุ์ UV4-28

| รหัสสายพันธุ์ | ลักษณะเส้นใย | สีน้ำหมัก | ประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 7 | 10 | 13 (วัน) |
| UV4-28 | ฟู | ชมพูอ่อน | 418 | 458 | 580 |
| 05-3 | ฟู | ชมพูอ่อน | 414 | 495 | 702 |
| 05-11 | ฟู | แดง | 446 | 556 | 772 |
| 08-19 | ฟู | ชมพูอ่อน | 438 | 538 | 748 |
| 08-21 | ฟูเล็กน้อย | ชมพูอ่อน | 469 | 563 | 648 |
| 09-11 | ฟู | ชมพูอ่อน | 422 | 514 | 695 |

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ของทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ 05-11 สามารถผลิต $GA_3$ สูงสุด 772 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ผลิตสีแดงของไบคาเวอรินในน้ำหมัก ซึ่งจะเป็นปัญหาในขั้นตอนการสกัดแยก $GA_3$ จึงไม่เหมาะที่จะใช้เลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม ส่วนสายพันธุ์ 08-19 สามารถผลิต $GA_3$ ได้ 748 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับสายพันธุ์ 05-11 และยังคงคุณสมบัติของสายพันธุ์ UV4-28 โดยผลิตสีแดงในน้ำหมักน้อย สายพันธุ์ 08-21 ผลิต $GA_3$ ได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์อื่นในวันที่ 7 และ 10 ของการเพาะเลี้ยง แต่ผลิตได้น้อยกว่าสายพันธุ์อื่นในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง การเจริญของเส้นใยในอาหารแข็งค่อนข้างช้า เมื่อเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงใหม่จะเจริญได้ช้ากว่าสายพันธุ์อื่นไม่เหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต่อไป สายพันธุ์ 05-3 และ 09-11 ผลิต $GA_3$ ต่ำกว่าสายพันธุ์อื่น ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ 08-19 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ UV4-28 28.9 เปอร์เซนต์ และยังคงมีลักษณะภายนอกเหมือนสายพันธุ์ UV4-28 มาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นสำหรับชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG

3.2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกของสายพันธุ์กลายพันธุ์กับประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$

จากการที่ได้แบ่งกลุ่มสายพันธุ์กลายพันธุ์ ตามลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเป็น 3 กลุ่ม เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1.1 เมื่อได้ตรวจสอบปริมาณ $GA_3$ ที่ผลิตได้ด้วย TLC และ HPLC แล้วได้ผลตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 10 จะเห็นว่ากลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นมากที่สุด คือ 18 เปอร์เซนต์ กลุ่มที่ 2 มีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงขึ้น 7.6 เปอร์เซนต์ ส่วนกลุ่มที่ 3 จะมีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นในเปอร์เซนต์ที่ต่ำที่สุด คือมีโอกาสพบสายพันธุ์เหล่านี้เพียง 3.8 เปอร์เซนต์เท่านั้น ผลการทดลองนี้สามารถยืนยันผลการทดลองที่ 3.1.3 ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกัน คือ สายพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น มีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นในเปอร์เซนต์ที่สูงที่สุด ส่วนสายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเปลี่ยนแปลงไป คือ สายพันธุ์ที่มีเส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงเข้ม ผิวหน้าโคโลนีหยัก การเจริญปานกลาง หรือ พวกที่มีเส้นใยสั้น ผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด เจริญช้า มีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงขึ้นจำนวนน้อย

ตารางที่ 10 แสดงกลุ่มของสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก* และความสามารถในการผลิต $GA_3$ วิเคราะห์โดย HPLC

| กลุ่มที่ | ลักษณะภายนอก | จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมด | จำนวนสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น | เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้น |
|---|---|---|---|---|
| 1 | เส้นใยยาวฟู เจริญเร็ว เหมือนหรือคล้ายสายพันธุ์ดั้งต้น | 116 | 21 | 18.2 |
| 2 | เส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม ผิวหน้าโคโลนีหยัก เจริญเร็วปานกลาง | 39 | 3 | 7.3 |
| 3 | เส้นใยสั้น การเจริญช้า ผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด | 26 | 1 | 3.4 |

* การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกสังเกตจากการเจริญบนอาหารแข็ง PDA เสริมแร่ธาตุ บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 5 วัน

จากผลการทดลองที่ได้นี้ สามารถนำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสายพันธุ์เบื้องต้นได้ โดยหลังจากการกลายพันธุ์แล้วนำสายพันธุ์กลายพันธุ์ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เสริมแร่ธาตุ บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 5 วัน จะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกชัดเจน สายพันธุ์ที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์ดั้งต้นในลักษณะที่กล่าวมาแล้วไม่ควรนำไปคัดเลือกสายพันธุ์ ควรนำสายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งต้น คือ เส้นใยยาวฟู การเจริญเร็ว (รูปที่ 6ก-ค) มาทำการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิเท่านั้น ทั้งนี้จะสามารถลดจำนวนสายพันธุ์ที่คัดเลือกลงได้และเพิ่มโอกาสในการพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงขึ้น

3.3 การกลายพันธุ์สายพันธุ์ 08-19 ซ้ำด้วย NTG

3.3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

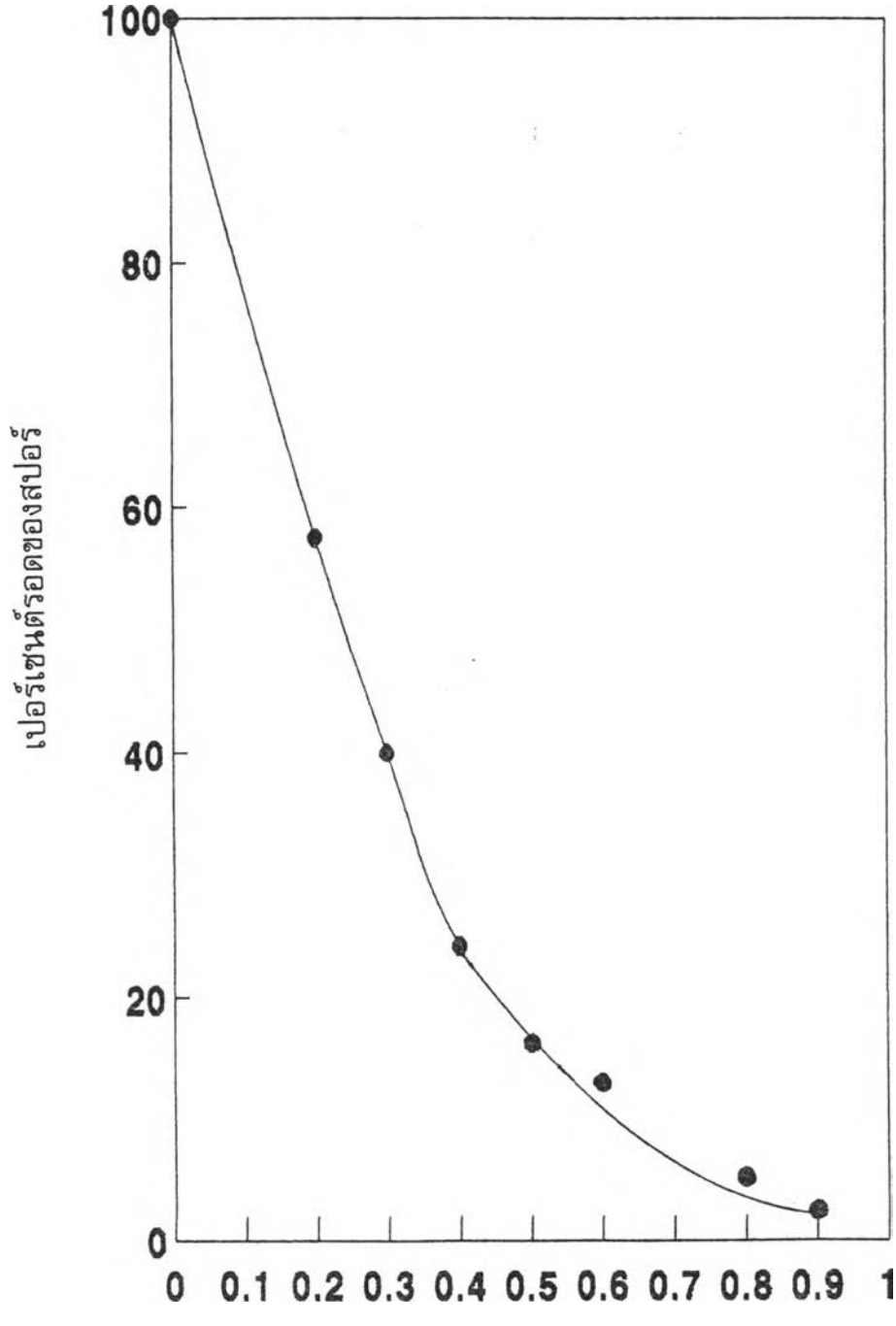
จากผลการทดลองที่ 3.2.3 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ 08-19 ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลิน 748 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG เนื่องจากการทดลองที่ 3.2.2 เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NTG ในช่วง 0.1-0.9 มิลลิโมลาร์ จะพบเปอร์เซนต์รอดอยู่ในช่วงที่ต้องการ และสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงขึ้นได้ ดังนั้นจึงใช้ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวสำหรับกลายพันธุ์สายพันธุ์ 08-19 ด้วย NTG เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต $GA_3$ สูงขึ้น ตามวิธีในข้อ 6.2.2 คำนวนเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 และ รูปที่ 10 คือ เมื่อใช้ช่วงความเข้มข้นของ NTG เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.2 พบว่าอัตราการอยู่รอดของสปอร์สายพันธุ์ 08-19 เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ UV4-28 (ตารางที่ 7 และรูปที่ 9) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นเล็กน้อย แสดงว่าสายพันธุ์ 08-19 ทนต่อการกลายพันธุ์ด้วย NTG มากกว่าสายพันธุ์ UV4-28 เมื่อใช้สภาวะการทดลองเดียวกัน

จุดประสงค์การทดลองนี้ ต้องการสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้น และในผลการทดลองที่ 3.1.3 และ 3.2.4 พบว่าสายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้นมีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นมากที่สุด ดังนั้นจึงเก็บสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซนต์รอดอยู่ในช่วง 2.5-16.2 เปอร์เซนต์ โดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่แยกจากกันได้ดี และมีลักษณะภายนอกเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้นแบบสุ่ม จำนวนทั้งหมด 420 สายพันธุ์

ตารางที่ 11 จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซนต์รอดของสปอร์สายพันธุ์ 08-19 ภายหลังการเติม NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นของ NTG (มิลลิโมลาร์) | จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ | เปอร์เซนต์การรอดของสปอร์ |
|---|---|---|
| 0 | $4.0X10^5$ | 100 |
| 0.1 | $2.8X10^5$ | 70.0 |
| 0.2 | $2.3X10^5$ | 57.5 |
| 0.3 | $1.6X10^5$ | 40.0 |
| 0.4 | $9.7X10^4$ | 24.2 |
| 0.5 | $6.5X10^4$ | 16.2 |
| 0.6 | $5.2X10^4$ | 13.0 |
| 0.7 | $4.3X10^4$ | 10.7 |
| 0.8 | $2.1X10^4$ | 5.2 |
| 0.9 | $1.0X10^4$ | 2.5 |

รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของสปอร์สายพันธุ์ 08-19 กับความเข้มข้นของ NTG



3.3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงขึ้น

นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาทั้ง 420 สายพันธุ์ ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ขั้นปฐมภูมิด้วย TLC แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีระดับความเข้มของจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากการทดลองนี้กำหนดให้สายพันธุ์ตั้งต้นมีความเข้มของจุด $GA_3$ อยู่ในระดับ 4 ได้ผลตามตารางที่ 12

ตารางที่ 12 จำนวนสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ที่ตรวจสอบโดยวิธี TLC มีความเข้มจุด $GA_3$ ในระดับต่างๆกัน

| จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมด | จำนวนสายพันธุ์ที่มีความเข้มจุด $GA_3$ อยู่ในระดับ 1-3 | จำนวนสายพันธุ์ที่มีความเข้มจุด $GA_3$ อยู่ในระดับ 4 | จำนวนสายพันธุ์ที่มีความเข้มจุด $GA_3$ อยู่ในระดับ 5 |
|---|---|---|---|
| 420 | 45 | 259 | 116 |

จากการตรวจสอบขั้นปฐมภูมิทั้ง 420 สายพันธุ์ (ตารางที่ 12) พบความเข้มจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC อยู่ในระดับ 1-5 จะเห็นว่าเมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น พบว่า สายพันธุ์ส่วนใหญ่มีความเข้มของจุด $GA_3$ ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น คือ 259 สายพันธุ์ ส่วนสายพันธุ์ที่ให้ความเข้มในระดับต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมีจำนวน 45 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่มีความเข้มจุด $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมีจำนวน 116 สายพันธุ์ เพื่อต้องการตรวจสอบปริมาณ $GA_3$ ที่แน่ชัด จึงได้นำน้ำหมักของสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วว่าผลิต $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นขั้นปฐมภูมิจำนวน 116 สายพันธุ์นี้มาหาปริมาณ $GA_3$ ด้วย HPLC พบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 74 สายพันธุ์ และพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 42 สายพันธุ์ (ตารางที่13)

ตารางที่ 13 แสดงจำนวนสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในขั้นทุติยภูมิที่ผลิต $GA_3$ ได้ในระดับต่างๆ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC

| จำนวนสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (ความเข้มจุด $GA_3$ อยู่ในระดับ 5) | จำนวนสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น* (ช่วง 618 ถึง 704 มิลลิกรัมต่อลิตร) | จำนวนสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น* (ช่วง 714 ถึง 876 มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|
| 116 | 42 | 74 |

* สายพันธุ์ 08-19 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นผลิต $GA_3$ 714 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้น จำนวน 74 สายพันธุ์ คัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงสุดลำดับที่ 1-7 รวม 7 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ 08-19 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงสุด ได้ผลแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ลักษณะของสายพันธุ์และประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ของสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ เทียบกับสายพันธุ์ 08-19

| รหัสสายพันธุ์ | ลักษณะเส้นใย | สีของน้ำหมัก | ประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 7 | 10 | 13 (วัน) |
| 08-19 | ฟู | ชมพูอ่อน | 480 | 604 | 737 |
| N5-69 | ฟู | ชมพูอ่อน | 524 | 672 | 865 |
| **N6-3** | **ฟู** | **ชมพูอ่อน** | **560** | **688** | **872** |
| N7-33 | ฟู | ชมพูอ่อน | 557 | 622 | 819 |
| **N7-54** | **ฟู** | **ชมพูอ่อน** | **622** | **721** | **878** |
| N7-58 | ฟู | ขาว | 491 | 639 | 786 |
| N7-86 | ฟู | ชมพูอ่อน | 536 | 673 | 854 |
| **N9-34** | **ฟู** | **ชมพูอ่อน** | **655** | **754** | **891** |

จากผลการทดลองในตารางที่ 14 ลักษณะเส้นใยและสีน้ำหมักของสายพันธุ์กลายพันธุ์ใหม่เหมือนสายพันธุ์ 08-19 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น ยกเว้นสายพันธุ์ N7-58 น้ำหมักจะมีสีขาวมาก แต่ผลิต $GA_3$ ต่ำกว่าสายพันธุ์อื่น ส่วนสายพันธุ์ N6-3 N7-54 และ N9-34 มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ใกล้เคียงกัน คือผลิตได้ 872 878 และ 891 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ 08-19 18.3 19.1 และ 20.8 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

3.3.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตและ NTG สองซ้ำ

หลังจากชักนำให้ Gibberella fujikuroi เกิดการกลายพันธุ์แล้ว เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ของสายพันธุ์ตั้งต้น คือ สายพันธุ์ C กับสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต และ NTG ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน จึงได้นำสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงสุดของแต่ละขั้นตอนการกลายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว ตามวิธีในข้อ 4.3 วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินด้วย HPLC ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์

| รหัสสายพันธุ์ | ประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | |
|---|---|---|---|
| | 7 | 10 | 13 (วัน) |
| C | 398 | 486 | 546 |
| UV4-28 | 412 | 517 | 574 |
| O8-19 | 460 | 575 | 722 |
| N6-3 | 516 | 648 | 850 |
| N7-54 | 525 | 621 | 852 |
| N9-34 | 548 | 675 | 884 |

จากตารางที่ 15 เมื่อนำสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ สูงสุด ในแต่ละขั้นของการกลายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน พบว่า

สายพันธุ์ C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมมีประสิทธิภาพการผลิต$GA_3$ สูงสุด 546 มิลลิกรัมต่อลิตร

สายพันธุ์ UV4-28 กลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต ผลิต $GA_3$ สูงสุด 574 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจากสายพันธุ์ C 5.1 เปอร์เซนต์

สายพันธุ์ 08-19 กลายพันธุ์ด้วย NTG ผลิต $GA_3$ สูงสุด 722 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจากสายพันธุ์ C 32.2 เปอร์เซนต์

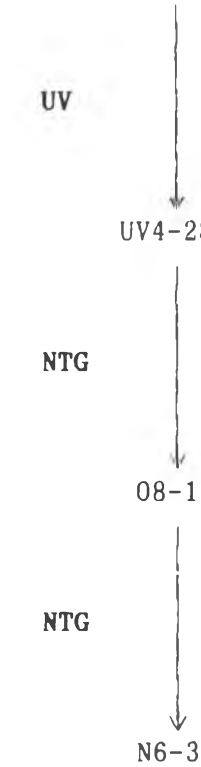
สายพันธุ์ N6-3 กลายพันธุ์ด้วย NTG ผลิต $GA_3$ สูงสุด 850 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจากสายพันธุ์ C 55.6 เปอร์เซนต์

สายพันธุ์ N7-54 กลายพันธุ์ด้วย NTG ผลิต $GA_3$ สูงสุด 852 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจากากสายพันธุ์ C 56 เปอร์เซนต์

สายพันธุ์ N9-34 กลายพันธุ์ด้วย NTG ผลิต $GA_3$ สูงสุด 884 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจากสายพันธุ์ C 62 เปอร์เซนต์

จากข้อมูลการกลายพันธุ์ในการวิจัยนี้ สรุปเป็นขั้นตอนการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ได้ดังแสดงในรูปที่ 11 จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเพียง 5.1 เปอร์เซนต์ ส่วนการกลายพันธุ์ด้วย NTG ครั้งแรก พบว่าสามารถผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ UV4-28 27.1 และ การกลายพันธุ์ด้วย NTG ครั้งที่สองสามารถผลิต $GA_3$ เพิ่มจากสายพันธุ์ 08-19 24.7 เปอร์เซนต์ แสดงว่า NTG มีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ได้ดีกว่าแสงอุลตร้าไวโอเลตซึ่งตรงกับรายงานของ Erokhina (32) ที่ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ NTG และแสงอุลตร้าไวโอเลตในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ Fusarium moniliforme พบว่า NTG สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีกว่ารังสีอุลตร้าไวโอเลตเช่นเดียวกัน

รูปที่ 11 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ และประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$




| สายพันธุ์ | ประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | เปอร์เซนต์ที่เพิ่มจากสายพันธุ์ C |
|---|---|---|
| *Gibberella fujikuroi* C | 546 | - * |
| UV4-28 | 574 | 5.1 |
| 08-19 | 722 | 32.2 |
| N6-3 | 850 | 55.6 |
| N7-54 | 852 | 56 |
| N9-34 | 884 | 62 |

* สายพันธุ์ดั้งต้น

## 3.4 ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงขั้นต้นปฐมภูมิด้วย TLC เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณ $GA_3$ ด้วย HPLC

การวัดปริมาณ $GA_3$ ทำได้หลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้กัน คือ HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำมากที่สุด สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์นั้น ไม่สามารถนำสายพันธุ์จำนวนมากมาวิเคราะห์ปริมาณ $GA_3$ ด้วย HPLC ได้ เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ต้องนำน้ำหมักมาผ่านการสกัดให้ค่อนข้างบริสุทธิ์พอที่จะนำไปวิเคราะห์ได้ จึงต้องใช้เวลานาน และใช้สารเคมีเป็นจำนวนมาก ไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความรวดเร็วและมีตัวอย่างจำนวนมาก

TLC เป็นวิธีตรวจหาปริมาณ $GA_3$ คร่าวๆวิธีหนึ่ง ค่าที่ได้เป็นเพียงค่าเปรียบเทียบซึ่งสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิได้ โดยเปรียบเทียบความเข้มของจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC ระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายพันธุ์ใหม่ที่ได้ วิธีการสกัด และการตรวจสอบปริมาณ $GA_3$ ทำได้รวดเร็วกว่า HPLC จึงสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ครั้งละมากๆได้ ดังนั้นจึงเป็นการเหมาะสมที่ใช้เป็นวิธีคัดเลือกเบื้องต้น หลังจากนั้นจึงทำการคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่มีความเข้มจุด $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมาวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC อีกครั้ง จากข้อมูลในการกลายพันธุ์ Gibberella fujikuroi ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต 1 ครั้ง และ NTG 2 ครั้ง สามารถนำข้อมูลเหล่านี้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิด้วย TLC กับการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ คือ วิเคราะห์ปริมาณ $GA_3$ ด้วย HPLC ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 16

จากข้อมูลในการกลายพันธุ์ทั้ง 3 ครั้ง จะเห็นได้ว่า การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิด้วย TLC โดยการเปรียบเทียบความเข้มของจุด $GA_3$ บนแผ่น TLC โดยพิจารณาความเข้มด้วยตาเปล่าพบว่าสายพันธุ์ที่มีความเข้มของจุด $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นนั้น เมื่อนำมาตรวจสอบความสามารถในการผลิต $GA_3$ ด้วย HPLC จะมีจำนวนสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วย TLC 44.4 58.1 และ 63.7 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า การตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ด้วย TLC น่าจะเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบเบื้องต้นได้

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ด้วย TLC และ HPLC

| การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ | จำนวนสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งต้น | | โอกาสที่จะพบสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ สูงขึ้น*** (%) |
|---|---|---|---|
| | ตรวจสอบด้วย TLC* | วิเคราะห์ด้วย HPLC** | |
| แสงอุลตร้าไวโอเลต | 18 | 8 | 44.4 |
| NTG ครั้งที่ 1 | 43 | 25 | 58.1 |
| NTG ครั้งที่ 2 | 116 | 74 | 63.7 |

* คัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีความเข้มของจุด $GA_3$ สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น

** วิเคราะห์ด้วย HPLC เป็น มิลลิกรัมต่อลิตร

*** วิเคราะห์โดย TLC เทียบกับ HPLC

### 3.5 ตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ของ สายพันธุ์ N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการทดลองที่ผ่านมา Gibberella fujikuroi สายพันธุ์กลายพันธุ์ N9-34 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต $GA_3$ ได้มากที่สุดคือ 884 มิลลิกรัมต่อลิตรในระดับขวดเขย่า ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกสายพันธุ์ N9-34 มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิต $GA_3$ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีทดลองข้อ 4.4 ซึ่งเป็นสภาวะการเพาะเลี้ยง Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C ของอรไท

สุขเจริญ (17) โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน วิเคราะห์ผลทุก 24 ชั่วโมง ได้ผลตามตารางที่ 17 และรูปที่ 12

จากตารางที่ 17 เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว เป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิการเพาะเลี้ยง 25°ซ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที โดยให้ความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพการหมัก (ไม่มีการควบคุม) จะเห็นว่าในช่วงวันที่ 1-4 สายพันธุ์ N9-34 จะใช้สารอาหารไปในการเพิ่มปริมาณเซลล์ สังเกตจากการลดลงของน้ำตาลซูโครส และการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นไปอย่างรวดเร็วในขณะเชื้อผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสเริ่มลดลงจะมีการเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้งอย่างช้าๆ เชื้อสามารถผลิต $GA_3$ สูงขึ้นได้อีกจนถึงวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง สายพันธุ์ N9-34 ผลิต $GA_3$ 983 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 35.8 กรัมต่อลิตร หรือ ผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นจากการผลิตในระดับขวดเขย่าประมาณ 10 เปอร์เซนต์

เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงสายพันธุ์ N9-34 กับการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ C โดยอรไทสุขเจริญ ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อเดียวกัน พบว่า รูปแบบการใช้น้ำตาลเหมือนกันสามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตส จากรายงานของอรไท สายพันธุ์ C มีความสามารถในการผลิต $GA_3$ ได้สูงสุด 530 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 180 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 24.3 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น ปริมาณ $GA_3$ จะลดลง ในขณะที่ไม่มีการเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนสายพันธุ์ N9-34 ผลิต $GA_3$ ในชั่วโมงที่ 180 ได้ประมาณ 581 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลิตสูงกว่าสายพันธุ์ C เล็กน้อย แต่หลังจากนั้นยังสามารถผลิต $GA_3$ เพิ่มขึ้นได้อีกพร้อมๆกับการเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้ง จนถึงวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งผลิต $GA_3$ 983 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนั้นสายพันธุ์ C ยังผลิตสารสีแดงหรือไบคาวารินร่วมไปด้วยโดยปริมาณที่ผลิตขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยงเชื้อ สำหรับสายพันธุ์ N9-34 ผลิตสารสีแดงน้อยมาก ดังนั้นสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จึงมีประสิทธิภาพในการผลิต $GA_3$ ดีกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

ตารางที่ 17 ผลการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

| เวลาการเพาะเลี้ยง (วัน) | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร) | พีเอชของน้ำหมัก | ซูโครส (กรัมต่อลิตร) | กลูโคส (กรัมต่อลิตร) | ฟรักโตส (กรัมต่อลิตร) | $GA_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 4.1 | 6.58 | 104.7 | 1.6 | 0 | 0 |
| 1 | 13.4 | 3.99 | 90.2 | 6.5 | 1.9 | 55 |
| 2 | 19.1 | 3.76 | 57.1 | 24.0 | 11.8 | 144 |
| 3 | 22.0 | 3.58 | 7.9 | 45.3 | 25.7 | 249 |
| 4 | 21.7 | 3.47 | - | 48.8 | 30.5 | 337 |
| 5 | 23.4 | 3.48 | - | 43.6 | 23.7 | 426 |
| 6 | 26.2 | 3.45 | - | 39.0 | 20.2 | 449 |
| 7 | 26.9 | 3.47 | - | 33.4 | 16.8 | 537 |
| 8 | 28.0 | 3.42 | - | 25.5 | 10.5 | 626 |
| 9 | 29.4 | 3.35 | - | 20.0 | 8.6 | 655 |
| 10 | 31.1 | 3.28 | - | 18.2 | 3.7 | 790 |
| 11 | 31.8 | 3.28 | - | 12.1 | - | 845 |
| 12 | 33.3 | 3.29 | - | 8.6 | - | 912 |
| 13 | 35.8 | 3.24 | - | - | - | 983 |

รูปที่ 12 แสดงการเจริญและการผลิต $GA_3$ สายพันธุ์ N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร