

บทที่ 4

ผลการทดลอง

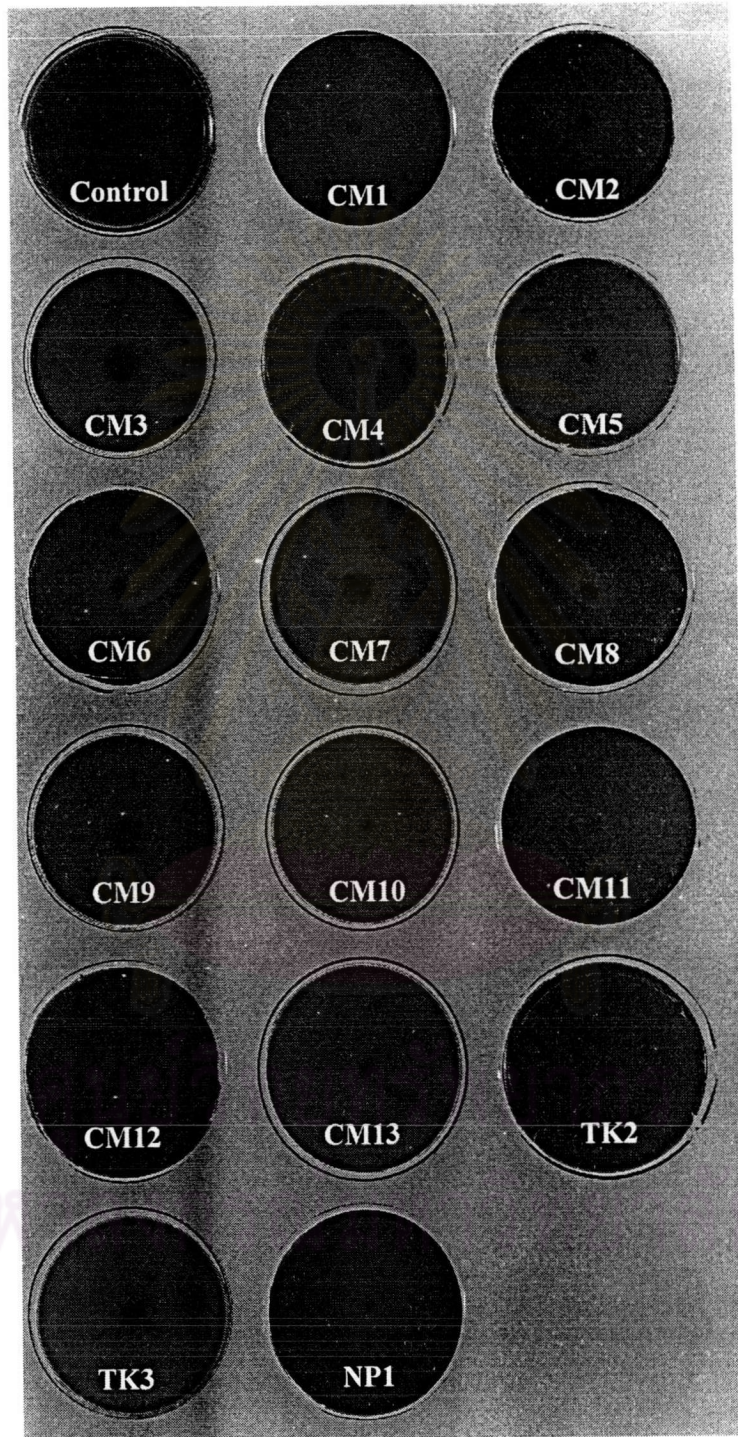
1. การคัดแยกและเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่า

การคัดแยกราจากดิน กิ่งไม้ และดอกเห็ด จากแหล่งต่างๆ จำนวน 50 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าบนอาหารแข็ง MoA พบว่ามีราจำนวน 16 ไอโซเลต ที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้ ดังตารางที่ 2 และ รูปที่ 8

ตารางที่ 2 ราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้จากแหล่งต่างๆ

รหัสราที่สามารถคัดแยกได้	แหล่งที่มา	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้	จำนวนไอโซเลตที่สามารถลดสีได้
NP1 - NP12	โรงงานแสงโสม นครปฐม (NP)	ดิน	12	1
PT1 - PT5	โรงงานเบียร์ จ. ปทุมธานี	ดิน	5	0
CM1-CM4				
CM7-CM8 และ CM 11- CM12	ป่าขุนแม่กวง จ. เชียงใหม่	ดอกเห็ด	15	8
CM9-CM10 และ CM13- CM18	(CM)	กิ่งไม้	8	2
CM5 และ CM6	พิมพ์ชนก เต็งเจริญ (2544)	ดอกเห็ด	2	2
	บ่อน้ำพุร้อน จ. เชียงใหม่	ดิน	0	0
TK1 – TK8	อุทยานแห่งชาติ ตาดสินมหาราช จ. ตาก (TK)	ดอกเห็ด	8	3
รวม			50	16

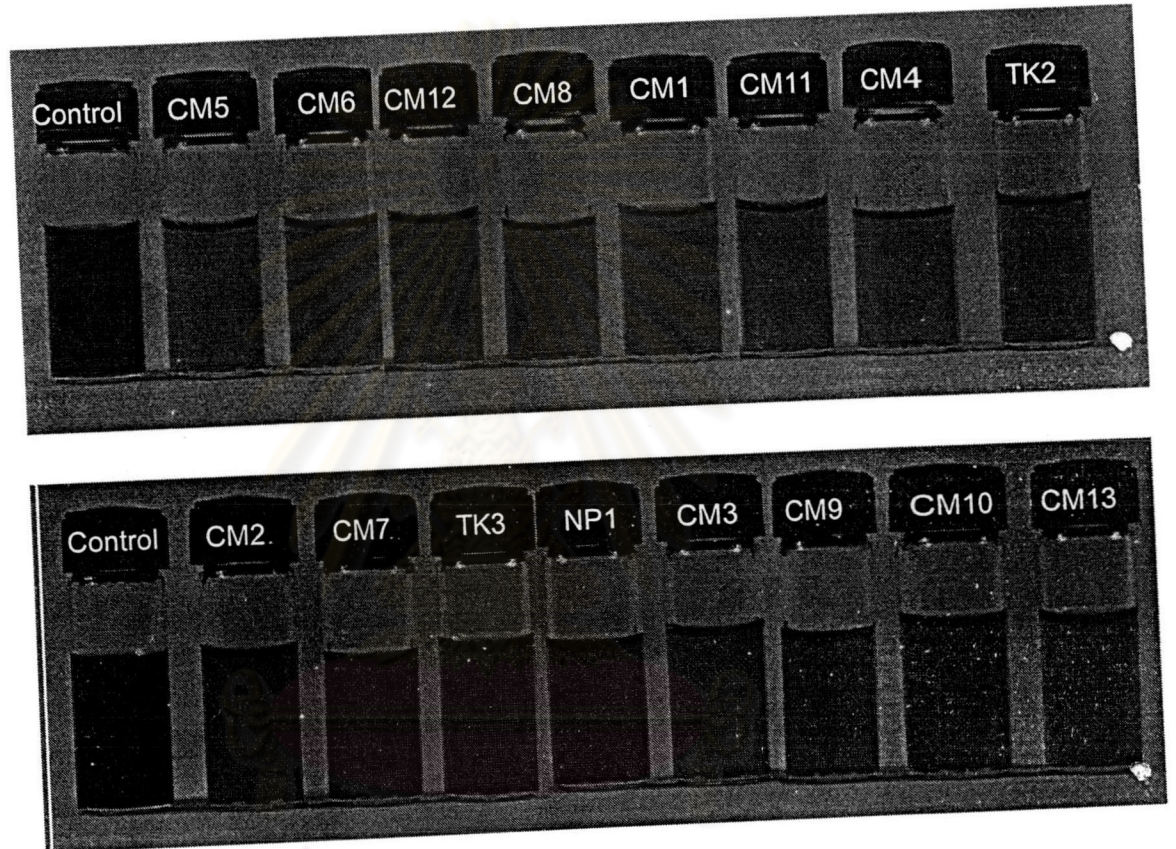
ราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าที่ผสมอยู่ในอาหารแข็ง (MoA) จำนวน 16 ไอโซเลต ได้แก่
NP1 CM1 CM2 CM3 CM4 CM5 CM6 CM7 CM8 CM9 CM10 CM11 CM12 CM13 TK2
และ TK3



รูปที่ 8 ความสามารถในการลดสีของรา 16 ไอโซเลตบนอาหาร MoA เป็นเวลา 7 วัน

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการลดสี

ราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าบนอาหาร MoA จำนวน 16 ไอโซเลต นำมาวิเคราะห์ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าโดยเลี้ยงในอาหารเหลว MoB สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้ดังรูปที่ 9 และตารางที่ 3



รูปที่ 9 ลักษณะสีของอาหารเหลว MoB ที่ลดสีด้วยรา 16 ไอโซเลต เป็นเวลา 40 วัน
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

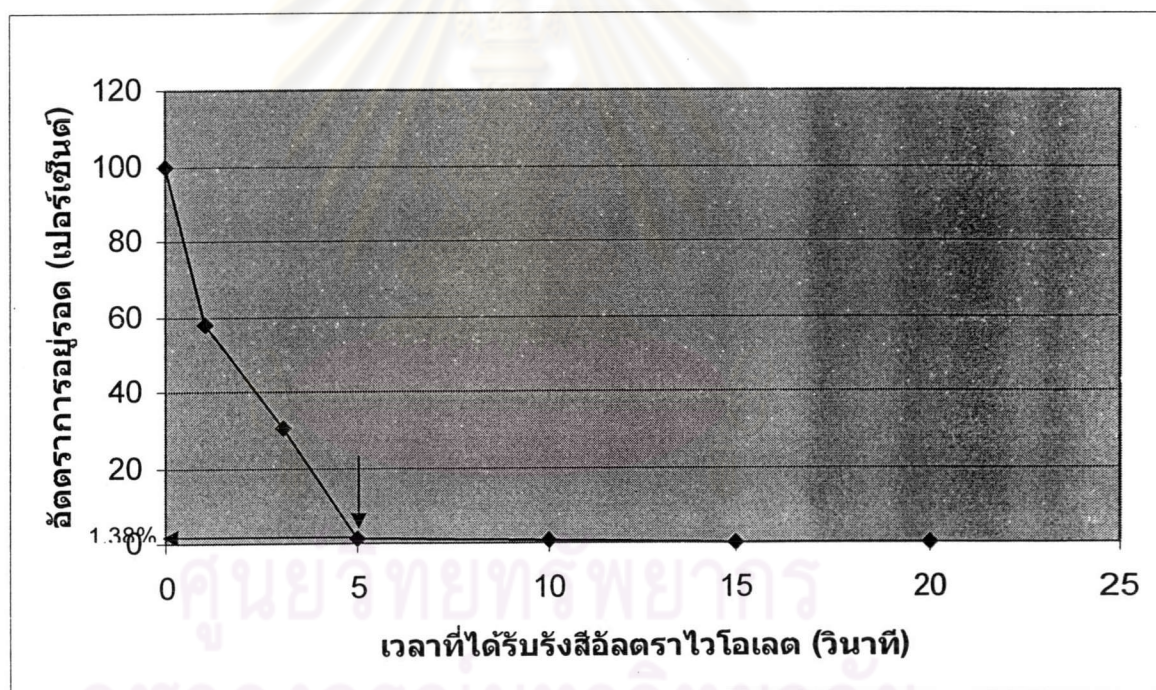
ตารางที่ 3 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากต่าง ๆ

ชนิดของรา	ความสามารถในการลดสีของน้ำกากต่ำ (เปอร์เซ็นต์)												
	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25	วันที่ 30	วันที่ 35	วันที่ 40					
CM1	23.90±8.75	35.10±15.23	35.34±10.65	26.44±10.32	29.23±48.45	29.02±6.38	25.79±9.56	15.90±5.95					
CM2	0.86±4.35	0.39±0.21	10.12±8.12	23.88±5.56	20.12±7.15	19.13±5.89	15.06±4.45	14.12±8.45					
CM3	8.15±7.18	0	0	0	0	0	0	0					
CM4	11.28±3.95	0.91±0.65	6.12±2.56	8.21±2.35	12.35±7.45	19.19±4.95	23.97±8.96	31.60±7.68					
CM5	1.94±1.05	15.05±8.65	31.29±8.95	31.27±3.25	33.41±8.54	49.10±8.98	43.13±8.75	40.15±911.54					
CM6	0	0	13.56±7.65	20.31±5.69	40.20±8.76	35.12±14.59	34.15±9.19	33.13±8.35					
CM7	0	0	0	0	0	0	1.09±0.95	20.25±5.95					
CM8	1.79±1.69	1.25±0.95	0.42±1.36	1.364±8.53	34.02±8.45	34.67±12.87	36.37±10.58	36.37±12.65					
CM9	0.54±0.35	10.89±4.54	8.13±5.96	7.16±2.45	6.11±4.26	5.12±2.59	6.12±4.59	6.12±4.56					
CM10	2.78±1.64	0	0	0	0	0	0	0					
CM11	18.65±9.54	20.16±5.69	33.48±12.52	30.13±10.52	27.57±12.12	27.60±7.98	25.66±4.59	26.12±12.15					
CM12	5.52±3.25	6.16±2.56	11.56±4.25	19.09±8.36	19.05±8.56	20.72±	24.44±2.95	39.60±16.45					
CM13	0.72±0.25	0	0	0	0	0	0	0					
NP1	0	0	0	0	13.40±7.95	12.41±4	12.12±8.25	12.34±8.93					
TK2	6.99±4.56	5.97±4.58	26.97±10.63	20.15±5.48	20.16±5.69	19.16±	18.95±4.98	18.45±4.85					
TK3	0	0	8.13±2.65	16.92±5.45	10.12±4.59	9.12±	8.12±2.95	7.012±1.95					

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่า พบว่ารา CM5 มีความสามารถในการลดสีได้สูงที่สุด จึงนำเชื้อ CM5 เป็นเชื้อไวต์ไทป์ในการชักนำให้เกิดมิวแทนต์ต่อไป

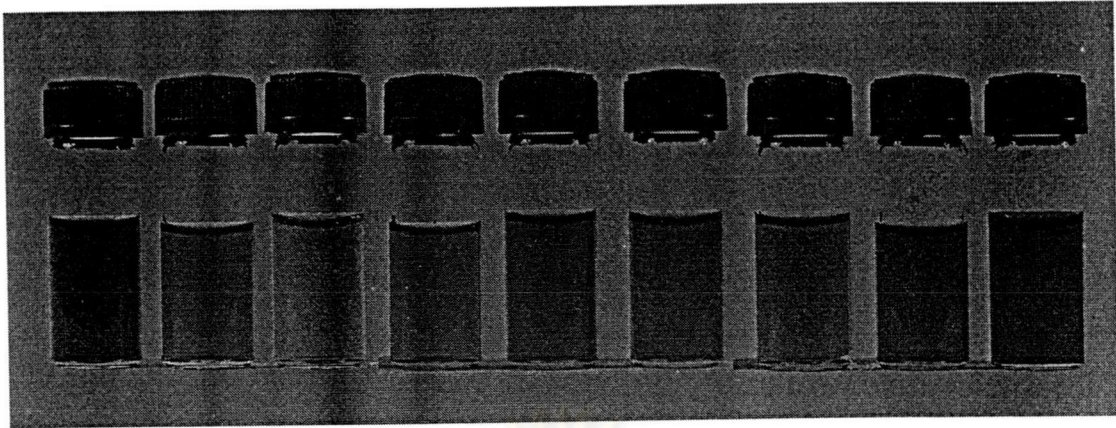
3. การให้เกิดมิวแทนต์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและสาร MNNG

การชักนำให้เกิดมิวแทนต์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต รา CM5 ถูกนำมาชักนำให้เกิดมิวแทนต์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตด้วยความเข้มแสง 120 J/cm^2 เป็นเวลา 0 - 20 วินาที จากรูปที่ 10 พบว่า ที่เวลา 5 10 และ 15 วินาที สามารถชักนำ CM5 ให้เกิดมิวแทนต์โดยให้อัตราการอยู่รอดที่ต่ำกว่า 10% โดย UV1 ถึง UV5 มิวแทนต์ ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตนาน 5 นาที UV6 และ UV7 มิวแทนต์ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตนาน 10 นาที และ UV8 มิวแทนต์ได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตนาน 15 นาที

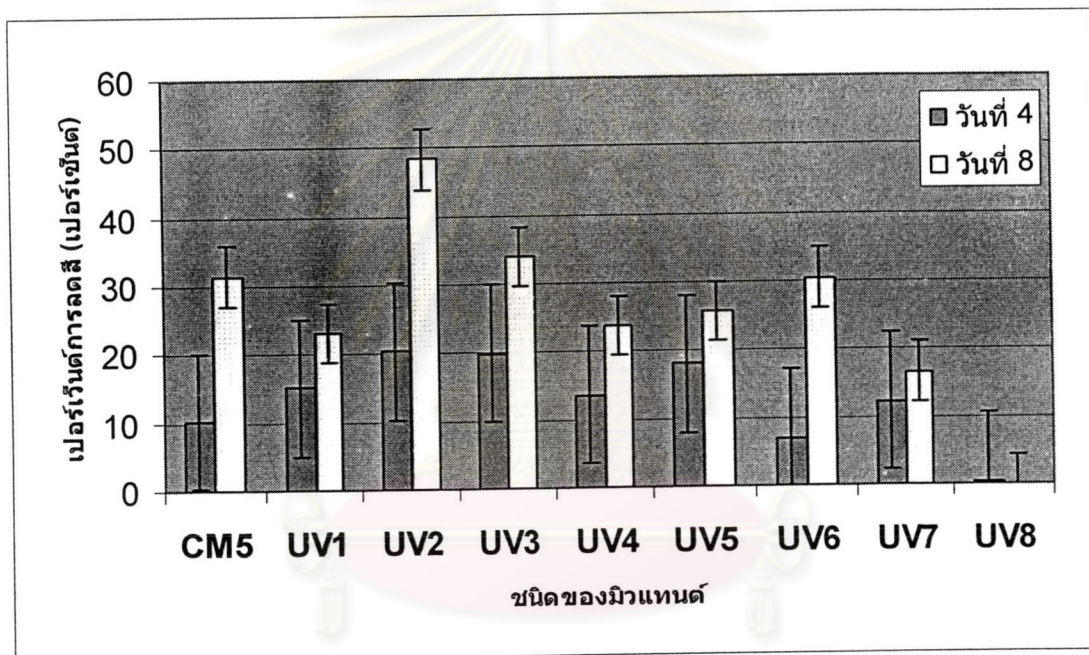


รูปที่ 10 อัตราการอยู่รอดของรา CM5 เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

การวิเคราะห์ความสามารถของรา UV มิวแทนต์ รามิวแทนต์ทั้งหมดนำไปวิเคราะห์ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่า มีลักษณะสีของอาหารเหลวดังรูปที่ 11 และผลการวิเคราะห์ความสามารถในการลดสีรูปได้ดังรูปที่ 12



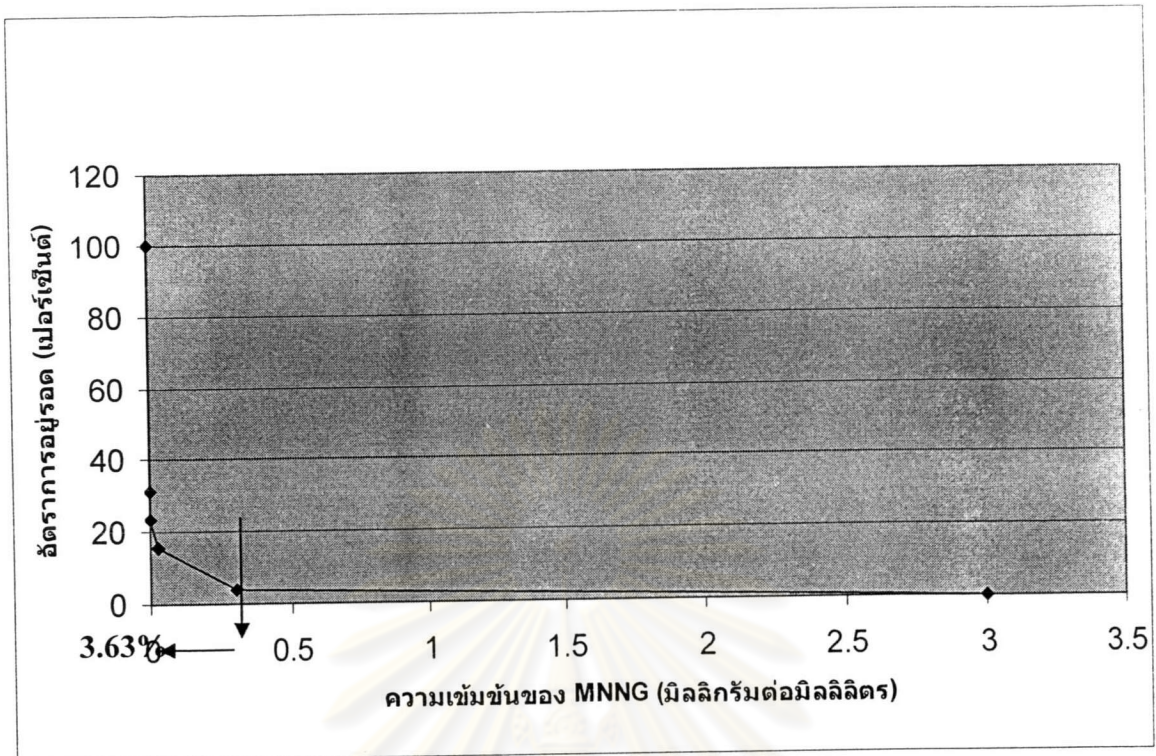
รูปที่ 11 ลักษณะสีของอาหารเหลวที่ผ่านการลดสีด้วยรังสีวี-มิวแทนต์ เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 12 ความสามารถในการลดสีของรา UV มิวแทนต์เปรียบเทียบกับ ไรต์ไทป์

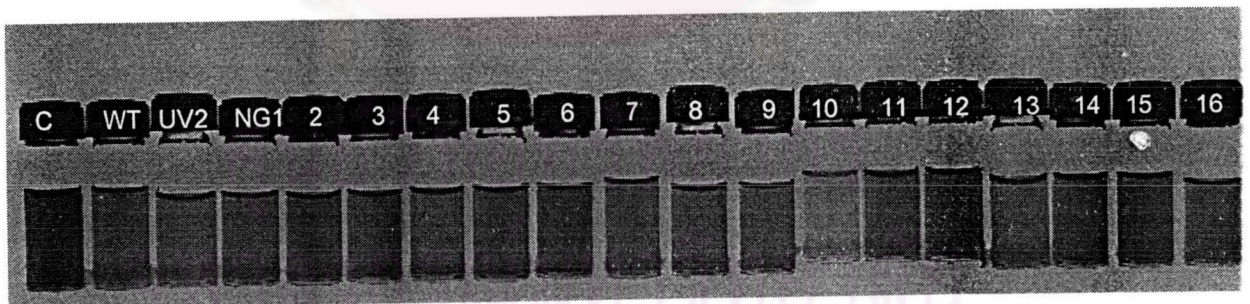
จากรูปที่ 12 พบว่า UV2 มิวแทนต์ มีความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าได้สูงที่สุด 48.30 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 8 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับราไรต์ไทป์และมิวแทนต์ทั้งหมด จึงเลือกรา UV2 มิวแทนต์ ไปชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร MNNG ต่อไป

การชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร MNNG รา UV2 มิวแทนต์ ถูกนำมาชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร MNNG เข้มข้น 0-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที มีอัตราการอยู่รอดดังรูปที่ 13 พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.3000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถชักนำ UV2 ให้เกิดมิวเทชัน โดยให้อัตราการอยู่รอดที่ต่ำกว่า 10% ได้เชื้อมิวแทนต์ทั้งสิ้น 16 ตัว ได้แก่ UV2NG1 ถึง UV2NG16 มิวแทนต์



รูปที่ 13 อัตราการอยู่รอดของรามิวแทนต์ UV2 เมื่อได้รับสาร MNNG

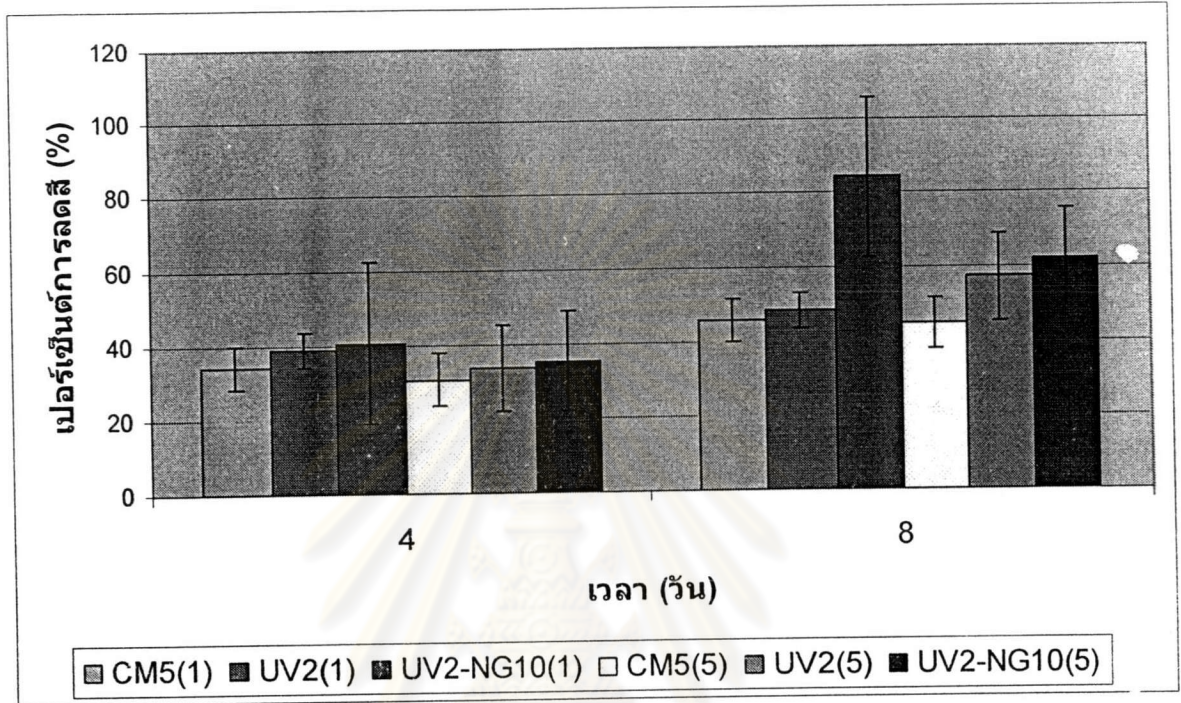
การวิเคราะห์ความสามารถในการลดสีของเชื้อรา UV2-NG มิวแทนต์ รามิวแทนต์ทั้ง 16 มิวแทนต์ ถูกนำไปวิเคราะห์ความสามารถในการลดสีของน้ำกาบซ่าเปรียบเทียบกับไวต์ไทป์ CM5 และ UV2 มิวแทนต์ มีลักษณะสีของอาหารเหลวดังรูปที่ 14 และมีความสามารถในการลดสีดังรูปที่ 15



รูปที่ 14 ลักษณะของอาหารเหลวที่ผ่านการลดสีด้วยรามิวแทนต์ UV2-NG1 ถึง 16 ในเวลา

8 วัน

การทดสอบความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของรา CM5 และมิวแทนต์
เมื่อผ่านการต่อเชื้อ เป็นเวลา 5 รุ่น พบว่า รามิวแทนต์มีความสามารถในการลดสีน้อยลง
เมื่อเปรียบเทียบกับการลดสีที่ทดสอบก่อนการต่อเชื้อ ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของรา CM5 และมิวแทนต์เมื่อผ่านการต่อ
เชื้อเป็นเวลา 5 รุ่น ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนรุ่นที่ผ่านการต่อเชื้อ

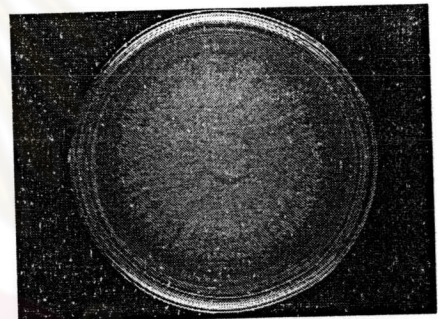
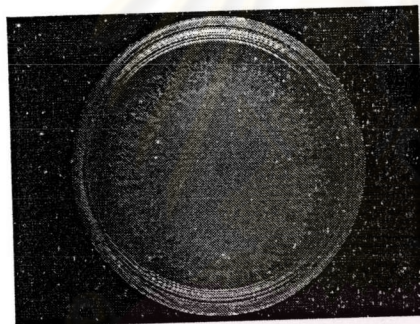
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การศึกษาลักษณะของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์

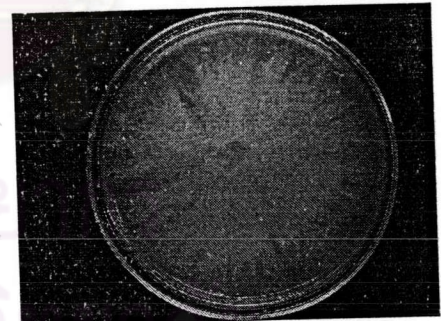
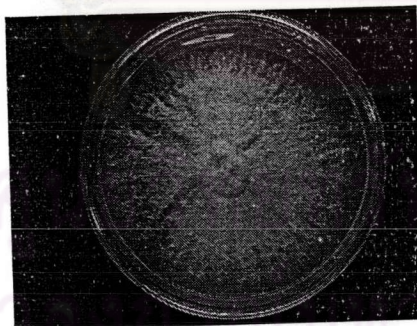
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหารสูตร PDA มีลักษณะไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีลักษณะดังต่อไปนี้

ไวด์ไทป์ CM5	โคโลนีสมีลักษณะเป็นเส้นใยแผ่เป็นกลม สีขาว ขอบของโคโลนีเป็นเส้นใยบางๆ ยาวสม่ำเสมอ ความฟูของเส้นใยเล็กน้อย
UV2 มิวแทนต์	โคโลนีสมีลักษณะเป็นเส้นใยแผ่เป็นกลม สีขาว ขอบของโคโลนีเป็นเส้นใยบางๆ ยาวสม่ำเสมอ เช่นเดียวกับไวด์ไทป์ มีเซกเตอร์เกิดขึ้น ความฟูของเส้นใยน้อยกว่าไวด์ไทป์
UV2-NG10 มิวแทนต์	โคโลนีสมีลักษณะเป็นเส้นใยแผ่เป็นกลม สีขาว ขอบของโคโลนีเป็นเส้นใยบางๆ ยาวสม่ำเสมอ เช่นเดียวกับไวด์ไทป์ แต่ความฟูของเส้นใยมากกว่าไวด์ไทป์

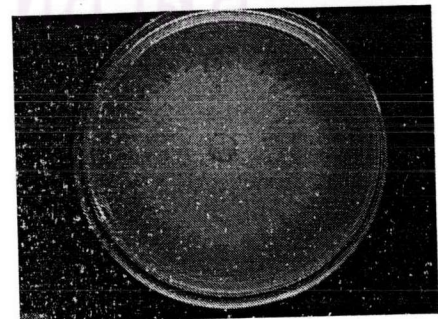
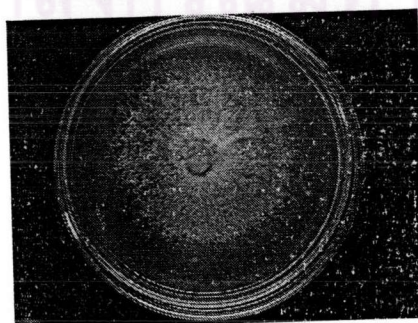
ไวด์ไทป์ CM5



UV2 มิวแทนต์

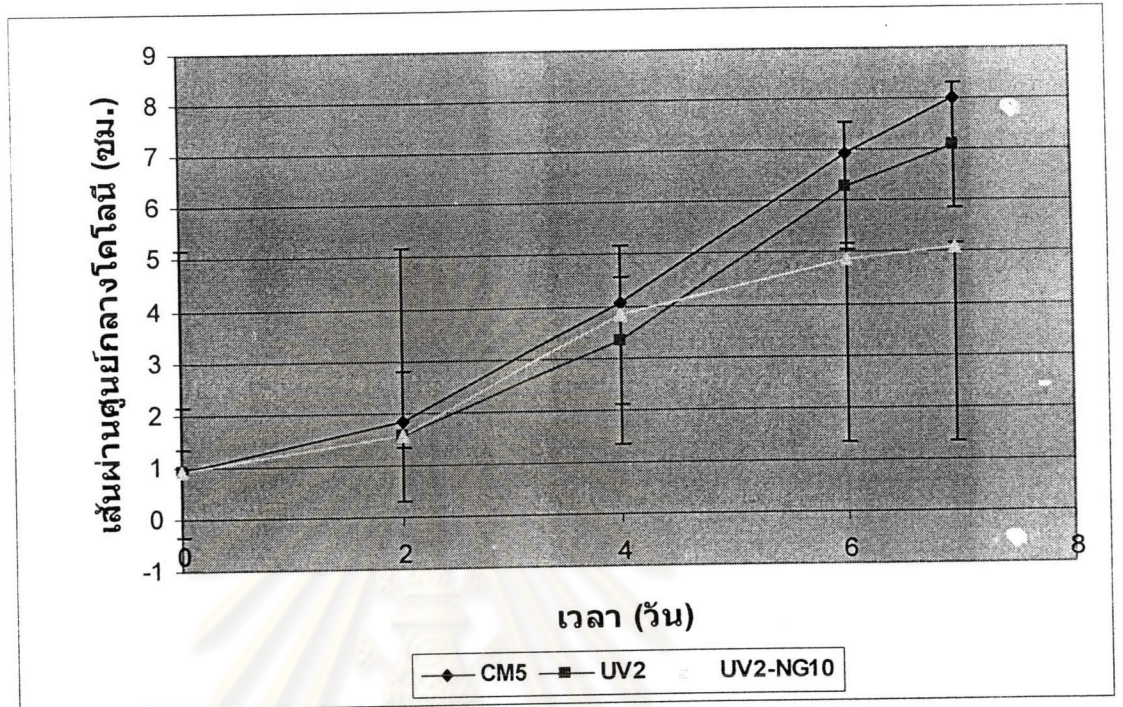


UV2-NG10
มิวแทนต์



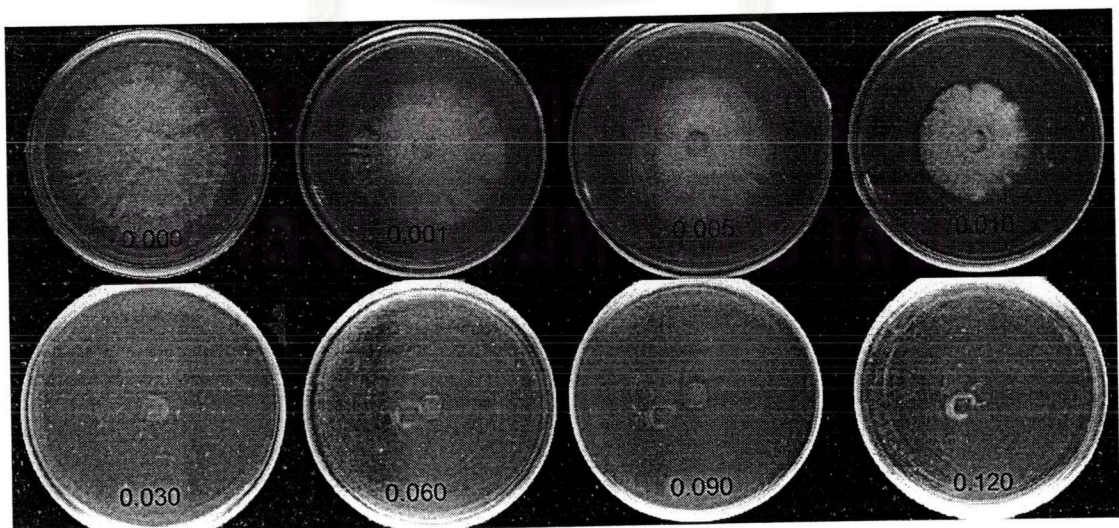
รูปที่ 17 ลักษณะของโคโลนีของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหาร PDA

อัตราการเติบโตของไวด์ไทป์เปรียบเทียบกับมิวแทนต์ แสดงดังรูปที่ 18 จะเห็นได้ว่า ราไวด์ไทป์มีการเติบโตได้ดีกว่ามิวแทนต์ทั้งสองชนิด

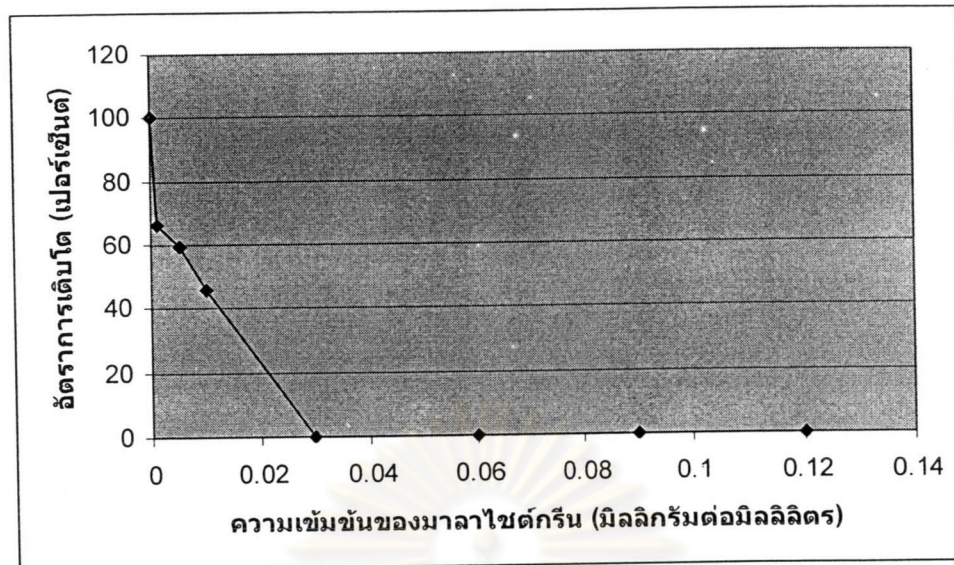


รูปที่ 18 อัตราการเติบโตของไวด์ไทป์เปรียบเทียบกับมิวแทนต์

การศึกษาหา MIC ของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์ เพื่อใช้เป็น resistance marker รา CM5 มีความสามารถในการเติบโตบนอาหารที่เติมมาลาไซต์กรีน เข้มข้น 0-0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 19 และ 20

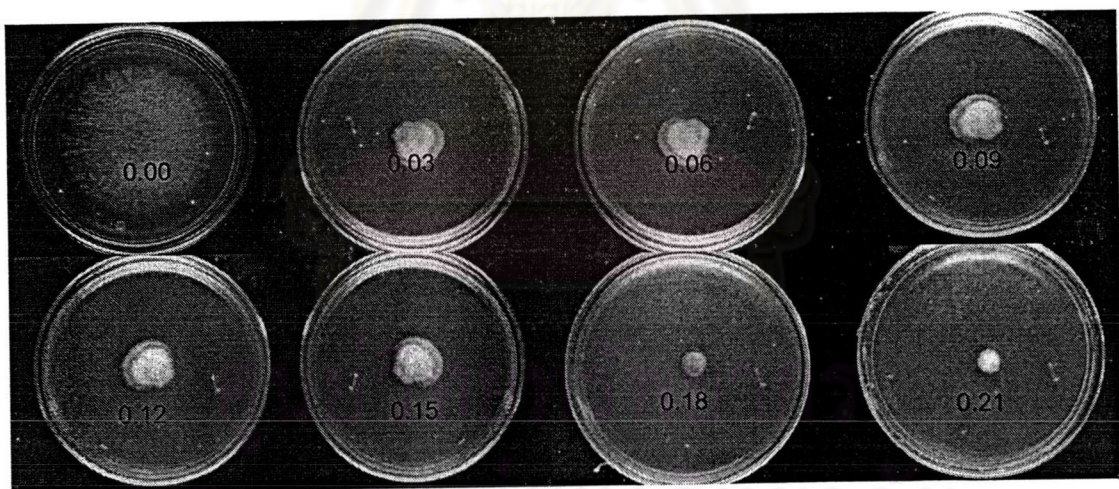


รูปที่ 19 การเจริญของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่มีมาลาไซต์กรีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน

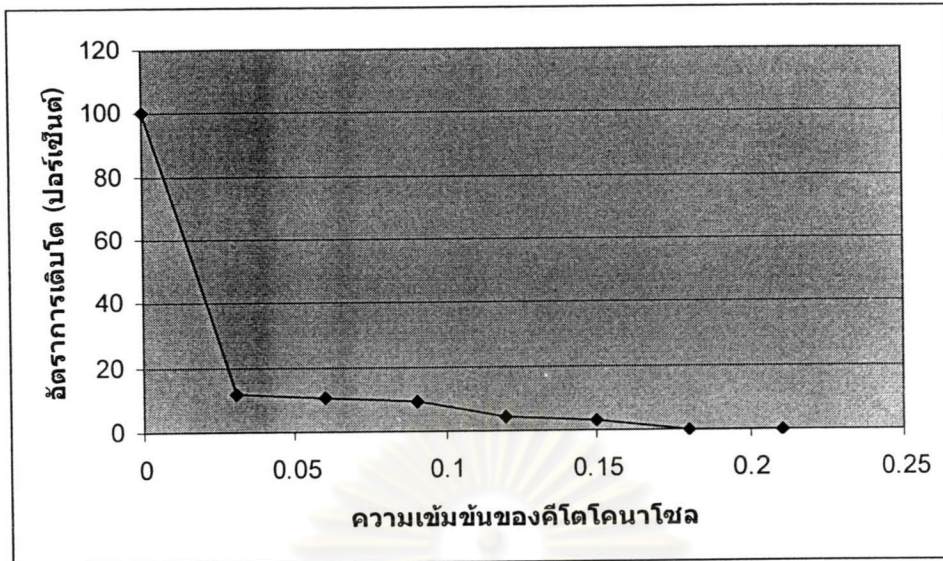


รูปที่ 20 อัตราการเติบโตของของรา CM5 บนอาหารที่เติมมาลาไชต์กรีนความเข้มข้นต่าง ๆ

จากรูปที่ 20 ค่า MIC ต่อมาลาไชต์กรีนของรา CM5 คือ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับความสามารถของรา CM5 บนอาหาร PDA ที่เติมคีโตโคนาโซลความเข้มข้นระหว่าง 0-0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีการเติบโตในวันที่ 7 ดังรูปที่ 21 และมีอัตราการเติบโตดังภาพ 22



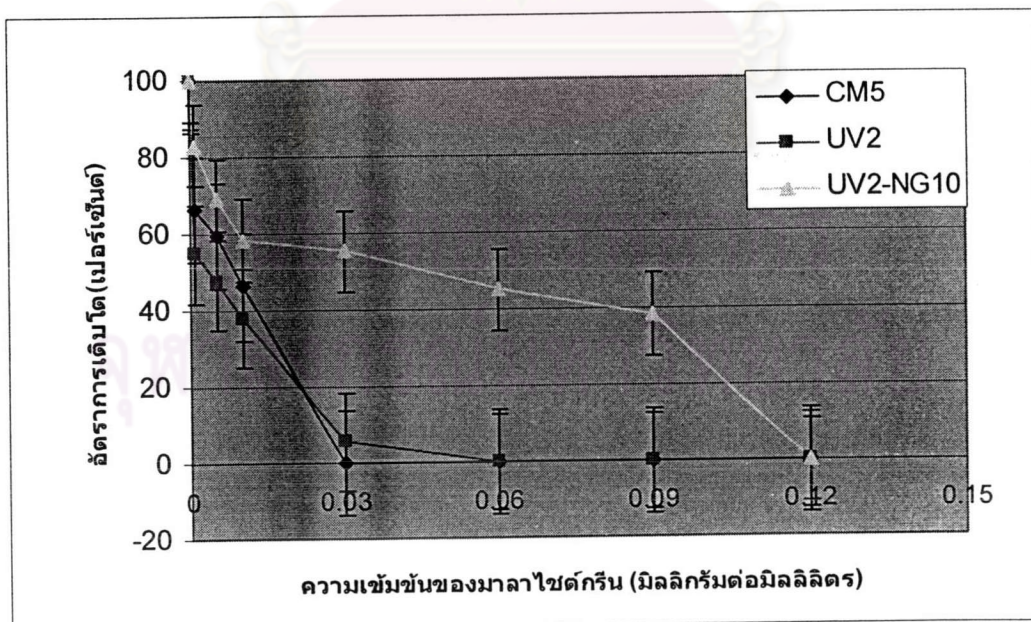
รูปที่ 21 รา CM5 ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เติมคีโตโคนาโซล ความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ 22 อิทธิพลของสารคีโตโคนาโซลต่อการเติบโตของเชื้อ CM5

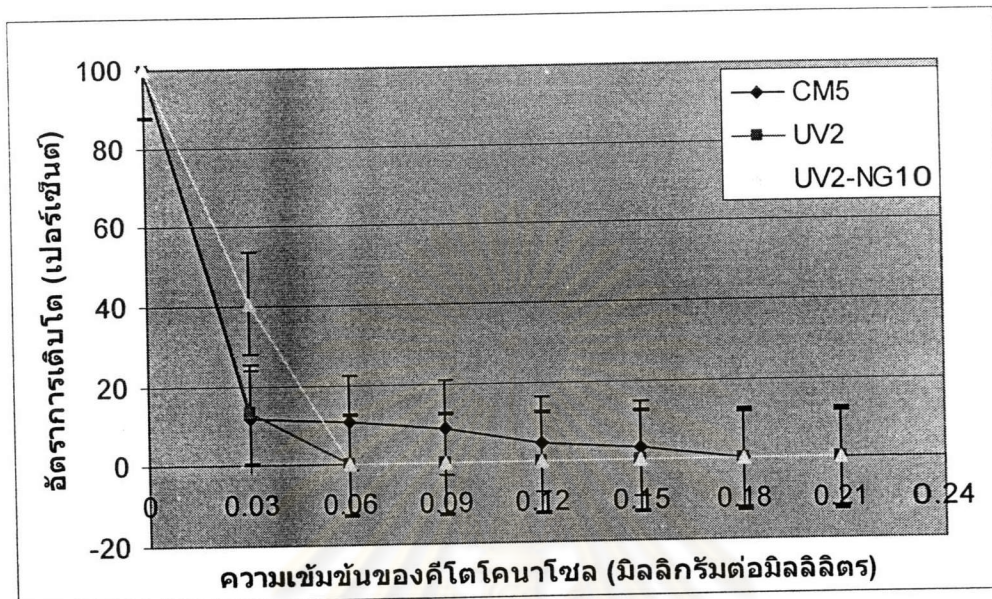
จากรูปที่ 21 และ 22 แสดงว่า รา CM5 มีค่า MIC ต่อคีโตโคนาโซล คือ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การหาค่า MIC ต่อมาลาไรด์กรีนของมิวแทนต์ ดังภาพที่ 23 พบว่ารา UV2 มิวแทนต์ และ UV2-NG10 มีความสามารถในการต้านทานมาลาไรด์กรีนได้มากกว่าไวต์ไทป์ โดยมีค่า MIC คือ 0.06 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 23 อัตราการเติบโตของราไวต์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหารที่เติมมาลาไรด์กรีนความเข้มข้นต่างๆ

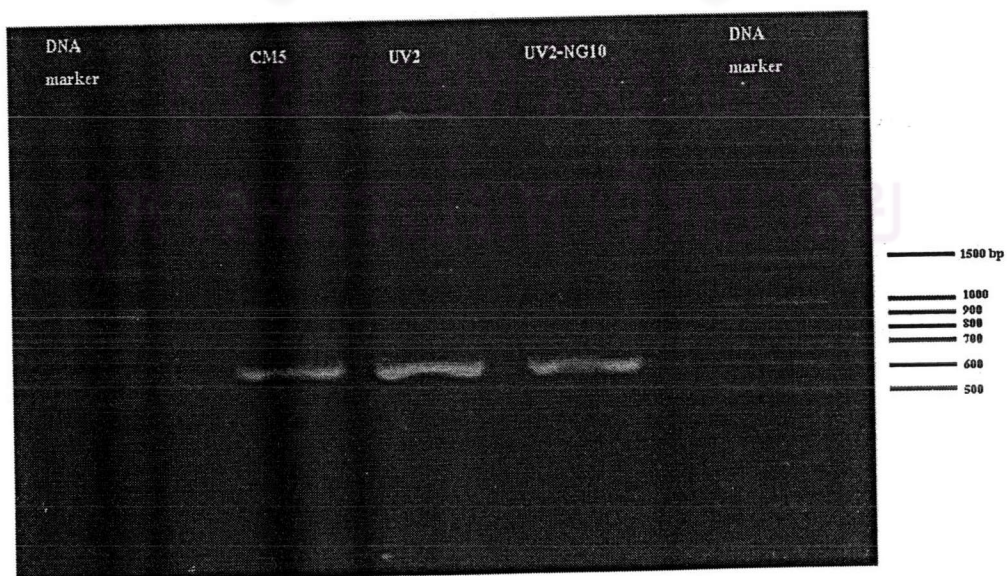
การหาค่า MIC ต่อคีโตโคนาโซลของมิวแทนต์ ดังรูปที่ 24 พบว่ารา UV2 มิวแทนต์ และ UV2-NG10 มีความสามารถในการต้านทานคีโตโคนาโซลได้น้อยกว่าไวด์ไทป์มากโดยมีค่า MIC เท่ากัน คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 24 อัตราการเติบโตของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหารที่เติมคีโตโคนาโซลความเข้มข้นต่าง ๆ

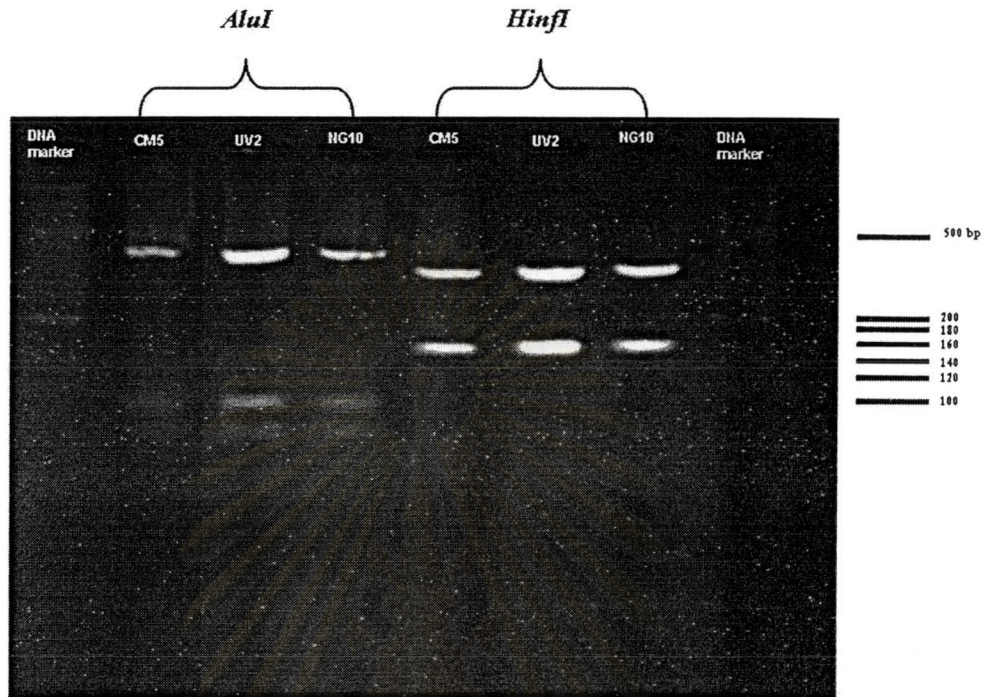
การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมที่ ITS โดยเทคนิค RFLP

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS พบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้ของรา CM5 และมิวแทนต์มีขนาดเท่ากัน ประมาณ 600- 700 bp ดังรูปที่ 25

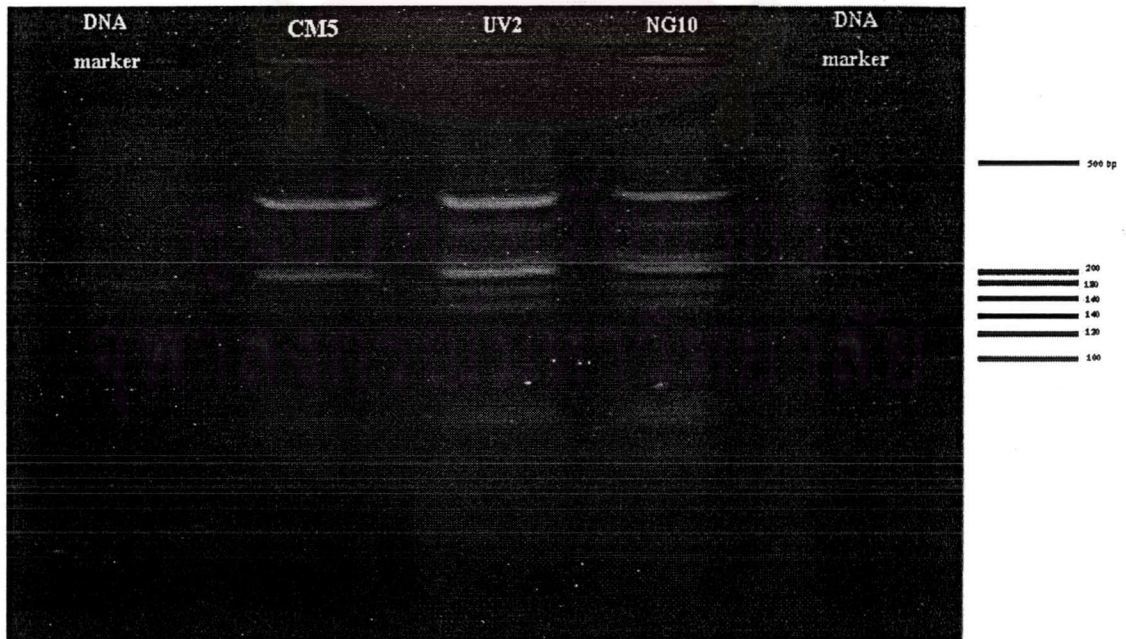


รูปที่ 25 ผลการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์

เมื่อนำดีเอ็นเอบริเวณ ITS มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* *HinfI* และ *MboI* พบว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดนั้นมีขนาดใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 26 และ 27 รูปแบบของ RFLP ที่ได้ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 26 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของราไค้ไทป์และมิวแทนต์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HinfI*



รูปที่ 27 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของราไค้ไทป์และมิวแทนต์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI*

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของราไวด์ไทยและมิวแทนต์พบว่า ไพรเมอร์ ITS1-F และไพรเมอร์ ITS4 สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บางส่วนของ 18S rDNA ตำแหน่ง ITS 5.8S rDNA และบางส่วนของ 28S rDNA โดยมีความยาวของชิ้นส่วนดังกล่าวเท่ากับที่ 668 bp และผลการเปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของเบสที่ตำแหน่งดังกล่าวของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่ามีความเหมือนซึ่งกันและกัน 100 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการจัดเรียงตัวของเบสของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงให้เห็นดังต่อไปนี้

1	50
CM5-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA	
UV2-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA	
NG10-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA	
1	100
CM5-CCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTTTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTC	
UV2-CCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTTTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTC	
NG10-CCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTTTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTC	
101	150
CM5-CGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTG	
UV2-CGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTG	
NG10-CGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTG	
151	200
CM5-TAGGTTGGCGTGGGTTTCTGGCCTTTAGGCTGGGAGCATTCTGCCGGCCT	
UV2-TAGGTTGGCGTGGGTTTCTGGCCTTTAGGCTGGGAGCATTCTGCCGGCCT	
NG10-TAGGTTGGCGTGGGTTTCTGGCCTTTAGGCTGGGAGCATTCTGCCGGCCT	
201	250
CM5-ATGTTTACTACAAACACTAAAGTAACAGAATGTAAACGCGTCTAACGCAT	
UV2-ATGTTTACTACAAACACTAAAGTAACAGAATGTAAACGCGTCTAACGCAT	
NG10-ATGTTTACTACAAACACTAAAGTAACAGAATGTAAACGCGTCTAACGCAT	
251	300
CM5-TTAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA	
UV2-TTAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA	
NG10-TTAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA	

301 350
 CM5-CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
 UV2-CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
 NG10-CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
 351 400
 CM5-GAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG
 UV2-GAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG
 NG10-GAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG
 401 450
 CM5-TTTGAGTATCATGAAATTCTCAACCCATAAAATCTTTGTGATATATGGGCT
 UV2-TTTGAGTATCATGAAATTCTCAACCCATAAAATCTTTGTGATATATGGGCT
 NG10-TTTGAGTATCATGAAATTCTCAACCCATAAAATCTTTGTGATATATGGGCT
 451 500
 CM5-TGGATTTGGAGGCTTGCTGGTCCTGTTCTGGGCTCGGCTCCTCTTGAATG
 UV2-TGGATTTGGAGGCTTGCTGGTCCTGTTCTGGGCTCGGCTCCTCTTGAATG
 NG10-TGGATTTGGAGGCTTGCTGGTCCTGTTCTGGGCTCGGCTCCTCTTGAATG
 501 550
 CM5-CATTAGCTTGATTCCGTGCGAATTGGCTCTCAGTGTGATAATTATCTACG
 UV2-CATTAGCTTGATTCCGTGCGAATTGGCTCTCAGTGTGATAATTATCTACG
 NG10-CATTAGCTTGATTCCGTGCGAATTGGCTCTCAGTGTGATAATTATCTACG
 551 600
 CM5-CTGTGACCATGAAGTGTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCCCTGAAGGACAAC
 UV2-CTGTGACCATGAAGTGTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCCCTGAAGGACAAC
 NG10-CTGTGACCATGAAGTGTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCCCTGAAGGACAAC
 601 650
 CM5-TTTCTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGC
 UV2-TTTCTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGC
 NG10-TTTCTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGC
 651 668
 CM5-ATATCAATAAGCGGAGGA
 UV2-ATATCAATAAGCGGAGGA
 NG10-ATATCAATAAGCGGAGGA