บทที่ 1

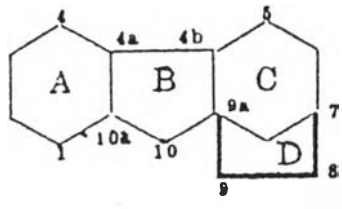
บทนำ

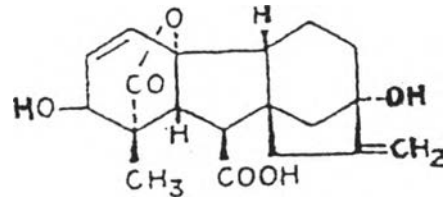
สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ประวัติความเป็นมา

จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) เป็นกลุ่มของฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง พบครั้งแรกในญี่ปุ่น เนื่องจากการระบาดของโรคข้าวที่เรียกว่า "bakanae" โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi หรือ Fusarium moniliforme ระยะแรกของการเกิดโรค ใบและลำต้นของข้าวจะยืดยาวอย่างรวดเร็วจนมีความสูงกว่าต้นข้าวปกติ (1) ปี ค.ศ.1926 Kurosawa เป็นคนแรกที่แสดงให้เห็นว่า น้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรานี้ทำให้ต้นข้าวปกติเกิดอาการยืดยาวเหมือนกับโรค bakanae ปี ค.ศ.1938 ที่มหาวิทยาลัยโตเกียว โดย Yabuta และ Sumiki ประสบความสำเร็จในการตกผลึกและแยกสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว และตั้งชื่อว่า Gibberellin A

หลังจากสงครามโลกครั้งที่สอง นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกสนใจงานวิจัยนี้ ปี ค.ศ.1954 กลุ่ม Imperial Chemical Industries,Ltd.(ICI) ประเทศอังกฤษ ได้รายงานการแยกสารออกฤทธิ์จากน้ำหมักของ Gibberella fujikuroi ที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญของพืช โดยมีผลทางสรีรวิทยาคล้ายกับสารที่ได้จากการวิจัยในญี่ปุ่น แต่มีโครงสร้างของโมเลกุลต่างกันเล็กน้อยจึงให้ชื่อสารนี้ว่า กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) หรือ GA_3 (2) (รูปที่ 1) ในปี ค.ศ. 1955 คณะนักวิจัยของมหาวิทยาลัยโตเกียว สามารถแยกจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆออกจากกันได้และทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นมีการค้นพบจิบเบอเรลลินอีกหลายชนิดทั้งในเชื้อรา Gibberella fujikuroi Neurospora crassa สาหร่าย พืชชั้นสูง พืชชั้นต่ำ ในชิ้นส่วนของพืช เช่น เมล็ดถั่วที่ยังอ่อน (1) ในปัจจุบันได้มีการค้นพบจิบเบอเรลลิน 68 ชนิด ตั้งชื่อว่า GA_1-GA_{68} มีสูตรโครงสร้างคล้ายกันมาก ต่างกันเล็กน้อยในการเรียงตัวของบางอะตอมเท่านั้น โดยกลุ่มของจิบเบอเรลลิน (GA_s) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วย Tetra-carbocyclic gibbane nucleus ดังรูปที่ 1





Tetra-carbocyclic gibbane Gibberellic acid

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Tetra-carbocyclic gibbane และ กรดจิบเบอเรลลิก

จิบเบอเรลลินแต่ละชนิด มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญของพืชต่างกันแต่ในทางสรีรวิทยายอมรับว่า GA_3 มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของพืชมากกว่าจิบเบอเรลลินชนิดอื่นๆ (3) ผลของจิบเบอเรลลินในทางสรีระวิทยาขึ้นกับชนิดของจิบเบอเรลลินและชนิดของพืช (2) ดังนี้

1. ผลในการเกิดดอก สามารถชักนำให้เกิดดอกกับพืชบางชนิดที่เป็นพืชวันยาว (long day plant) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการควบคุม
2. ผลทำลายการพักตัวและกระตุ้นการงอก เช่น สามารถทำลายการพักตัวของหัวมันฝรั่ง ทำให้งอกได้
3. ยับยั้งการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของพืช ใช้ในการผลิตพืชไม่มีเมล็ด ทางอุตสาหกรรมใช้ผลิตองุ่นไม่มีเมล็ด
4. ผลต่อการแสดงออกของเพศ เช่น เพิ่มจำนวนดอกตัวผู้ของแตงกวา
5. กระตุ้นการผลิตเอนไซม์บางชนิด เช่น สามารถชักนำให้เมล็ดข้าวบาเล่ย์ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้มากขึ้น ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเบียร์ระหว่างขั้นตอนการผลิตมอลท์

สารบริสุทธิ์ของกรดจิบเบอเรลลิก เป็นผลึกสีขาว ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ น้ำหนักโมเลกุล 346.37 จุดหลอมเหลว 233-235^{o}ซ (4) ความเป็นพิษต่อคนและสัตว์น้อยมาก โดย

มีค่าความเป็นพิษ $(LD)_{50}$ เท่ากับ 15,000 มก.ต่อน้ำหนักหนูทดลอง 1 กิโลกรัม ปกติแล้วพืชสามารถผลิต GA_3ได้เอง ดังนั้นการใช้สารนี้กับพืชเพื่อนำมาบริโภคจึงถือได้ว่าปลอดภัย

ได้มีการศึกษาการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินทั้งโดยวิธีทางเคมี การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และสกัดจากพืชชั้นสูง (2) Corey และ Danheiser (5) สามารถสังเคราะห์ GA_3โดยวิธีทางเคมีสำเร็จแต่ต้องผ่านกระบวนการทางเคมีหลายขั้นตอน (ประมาณ 36 ขั้นตอน) ซึ่งยุ่งยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ส่วนการสกัด GA_3 จากพืชชั้นสูง ได้ปริมาณน้อยมาก ประมาณ 0.001-1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด (4) ดั้งนั้นในทางอุตสาหกรรม จึงผลิตโดยหมักด้วยเชื้อรา Gibberella fujikuroi ทำให้ความรู้ทางด้านกระบวนการสังเคราะห์ การแยกและทำให้บริสุทธิ์ การนำไปใช้ประโยชน์เป็นไปอย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น (1,2) รวมทั้งพัฒนาการหมักและการปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตจิบเบอเรลลินให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังตารางที่ 1

2. การปรับปรุงสายพันธุ์

เนื่องจากจุลชีพสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type strains) มักให้ผลผลิตต่ำ จึงต้องมีวิธีเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต แนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์อาศัยเทคนิคการตัดต่อยีน(genetic recombination) และ การกลายพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ (mutation and selection) (18,19) การตัดต่อยีนเป็นเทคนิคสำหรับการกลายพันธุ์ ที่ต้องทราบถึงพื้นฐานทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์นั้นๆอย่างละเอียด รวมถึงกระบวนการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแล้วเป็นอย่างดี (18,20) แต่เนื่องจากจิบเบอเรลลินเป็นผลผลิตชนิดทุติยภูมิที่ผลิตโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi นั้นยังมีข้อมูลดังกล่าวน้อยมากจึงไม่สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตจิบเบอเรลลินได้

ปัจจุบันการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ยังคงใช้เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม โดยมีจุดประสงค์หลักคือเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารที่ต้องการให้สูงขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (21) การเพิ่มผลผลิตโดยวิธีการกลายพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ มีตัวอย่างมากมายที่ได้ประสบผลสำเร็จมาแล้ว และสามารถนำสายพันธุ์ที่ได้มาใช้ในระดับอุตสาหกรรม เช่น การกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตของยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ โดยเฉพาะการผลิตเพนนิซิลลินโดยเชื้อรา Pennicillium chrysogenum สามารถเพิ่มผลผลิตได้มากกว่า

ตารางที่ 1 การพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลินของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ

ค.ศ.	ชื่อจุลินทรีย์	เวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณจิบเรลลิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	วิธีตรวจสอบปริมาณ	เอกสารอ้างอิง
1939	G. fujikuroi	30-45	10	bioassay	6
1953	G. fujikuroi	4	17	bioassay	7
1955	G. fujikuroi 917	18	200	- *	8
1955	F. moniliforme 917	7	650	- *	9
1959	F. moniliforme 917	7	880	fluorometric	10
1959	G. fujikuroi	20	1002	- *	11
1961	G. fujikuroi	25	1102	- *	12
1986	G. fujikuroi P_3	7	1217 **	TLC	13
1987	G. fujikuroi C	7	685	HPLC	16
1990	G. fujikuroi C	14.5	1023	HPLC	17
1990	G. fujikuroi P_3	7	1116 **	TLC	14
1991	G. fujikuroi 567	10	1200	fluorometric	15

* ไม่ได้ระบุวิธีวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน

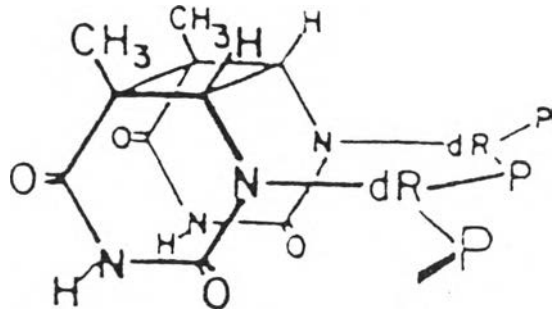
** ปริมาณจิบเบอเรลลิน มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารแข็ง (mg/kg wheat bran)

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดิมถึง 10-20 เท่า (20,21) นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงสายพันธุ์ Aspergillus niger เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว การเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น กลูโคอะไมเลส แอลฟาอะไมเลส และ กลูโคสออกซิเดส เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการค้นพบสารก่อการกลายพันธุ์หลายชนิด และได้นำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยสามารถแบ่งกลุ่มสารก่อการกลายพันธุ์ได้ดังนี้

2.1 แสงอุลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet radiation)

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้เป็นการเริ่มต้นโปรแกรมการกลายพันธุ์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และสะดวก สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ผลดี เมื่อเลือกใช้ช่วงเวลา และความเข้มแสงที่พอเหมาะ แสงอุลตร้าไวโอเลตที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยทั่วไปมักใช้ germicidal lamp เป็นหลอดไฟเมอคิวรี่ที่สามารถปลดปล่อยรังสีที่ความยาวคลื่น 2537^{o}A เนื่องจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของดีเอนเออยู่ในช่วง 2600^{o}A ซึ่งใกล้เคียงกับความยาวคลื่นของแสงอุลตร้าไวโอเลต เป็นสาเหตุทำให้เกิดความผิดปกติบนสายดีเอนเอ (20,22-24) โดยจะเกิดการจับกันของ pyrimidine dimer ในดีเอนเอโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดียวกัน หรือฝั่งตรงข้ามด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) เกิดเป็น thymine dimer (รูปที่ 2) thymine-cytosine dimer หรือ cytosine-cytosine dimer ดังนั้นในระหว่างการจำลองตัวของดีเอนเอ ทำให้มีโอกาสที่ดีเอนเอโพลีเมอเรสแทรกนิวคลีโอไทด์ผิดที่ตำแหน่งนี้สูงมาก ปริมาณ (dose) ของแสงอุลตร้าไวโอเลตที่เหมาะสม คือ ปริมาณที่ทำให้มีอัตราการอยู่รอดของสปอร์ประมาณ 0.01-5 เปอร์เซนต์ (18,20,24)



รูปที่ 2 thymine dimer

ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตส่วนใหญ่จะเกิดการกลายพันธุ์แบบ transition คือ GC → AT อาจพบ transversion , frameshift mutation และ deletionได้ (18,24) ความผิดปกติของเบสที่เกิดจากแสงอุลตร้าไวโอเลตสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ด้วยแสงความยาวคลื่น 300 - 500 นาโนเมตร (visible light)เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "photoreactivation" จะต้องอาศัยเอนไซม์ photolyase เข้าช่วย ซึ่งเอนไซม์นี้ต้องการแสงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวเป็นแหล่งพลังงานในการซ่อมแซม โดยการตัด pyrimidine dimer เพื่อป้องกันการเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวจึงต้องพยายามไม่ให้สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตร้าไวโอเลตแล้วถูกแสงในช่วงคลื่น visible light ทันที แต่ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร จะมีผลต่อการเกิด photoreactivation ได้น้อย หลังจากการฉายแสงจึงมักทำการทดลองต่อในที่มีแสงสีเหลืองหรือแสงสีแดง (22,24)

2.2 Ionizing radiation

เช่น รังสีที่มีกำลังงานมาก รวมทั้งรังสีที่มีช่วงความยาวคลื่นสั้น เช่น รังสีเอกซ์ รังสีคอสมิคและรังสีแกมม่า รังสีนี้เป็นสาเหตุให้เกิดการ ionize ของน้ำและสารอื่นๆในโมเลกุล ทำให้เกิด free radical ซึ่งจะเข้าไปทำปฏิกิริยา และ ทำลายโมเลกุลขนาดใหญ่ในเซลล์โดยเฉพาะดีเอนเอ ionizing radiation สามารถทะลุผ่านแก้วและวัตถุอื่น จึงต้องใช้ความระมัดระวังในการทดลอง ส่วนมากมักใช้กับการกลายพันธุ์ในพืชและสัตว์ ส่วนแสงอุลตร้าไวโอเลต มักใช้กับการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งไม่มีปัญหาเรื่องการทะลุผ่านแก้ว (25)

2.3 สารเคมีที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Chemical mutagen)แบ่งเป็น 3 กลุ่ม

Base analog เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบส purine หรือ เบส pyrimidine เมื่อจับกับดีเอนเอ การจำลองตัวบนสายดีเอนเอจะเกิดขึ้นอย่างปกติ แต่มีโอกาสเกิดการผิดพลาดในการลอกแบบ สารในกลุ่มนี้ คือ 5-bromouracil และ 2-aminopurine

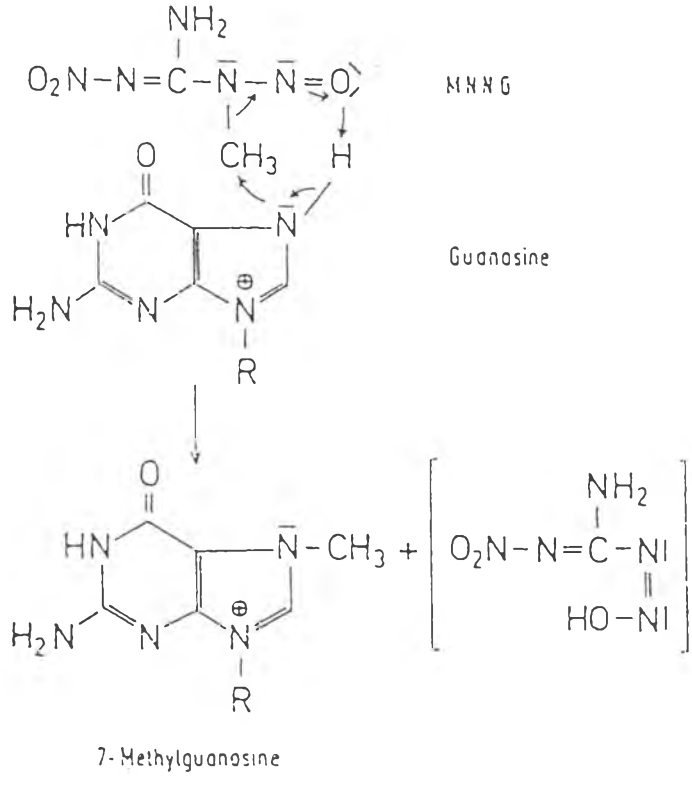
สารเคมีกลุ่มที่ทำปฏิกิริยากับดีเอนเอ เช่น nitrous acid (HNO_2) และ hydroxylamine (NH_2OH) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสบนสายดีเอนเอหนึ่งตัว หรือมากกว่าเกิดการจับคู่เบสผิดพลาด

Alkylating agent สารในกลุ่มนี้ เช่น sulfonate , nitrogen mustards , mitomycin และ nitroso compound มีคุณสมบัติย้ายหมู่อัลคิลตั้งแต่หนึ่งหมู่ขึ้นไปให้กับโมเลกุลของสารอื่น (23) สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในความถี่ที่สูงกว่า

base analog (25) สารในกลุ่มนี้ที่ใช้กันมาก คือ N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (NTG)

NTG เป็นสารประกอบทางเคมีชนิดหนึ่ง ถูกสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ.1947 เป็นผลึกสีเหลือง ความสามารถในการละลาย 4 มก.ต่อมล. จุดหลอมเหลว 116-118°ซ ทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 6-9 (24)

NTG มีประสิทธิภาพสูงมากในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์หลายชนิด การทำงานของ NTG ต้องมีการแตกตัวเป็นอิสระจึงสามารถเป็นสารชักนำได้ ในสภาวะที่เป็นกรด NTG จะแตกตัวเป็น nitrous acid ทำให้เกิด deamination แต่ในสภาวะที่เป็นด่างจะสลายตัวให้ diazomethane (CH_2N_2) ซึ่งเป็น strong methylating agent สารทั้งสองมีคุณสมบัติชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะตัว ดังนั้นการชักนำโดย NTG จึงขึ้นอยู่กับความเป็นกรดด่างขณะทำปฏิกิริยา (22,24) เนื่องจาก NTG เป็น alkylating agent เมื่อแตกตัวจะมีการเติมหมู่เมธิล 1 หมู่ให้กับเบส (รูปที่ 3) ทำให้เกิดความผิดพลาดในช่วงเล็กๆของดีเอนเอ



รูปที่ 3 กลไกของ NTG ในการเติมหมู่เมธิลให้กับเบสกวานีนของกรดนิวคลีอิก (R=OH)

จากนั้นจะชักนำให้คู่เบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้ามาอยู่ที่ replication fork ได้ดีกว่าคู่เบสปกติ ทำให้มีการเพิ่มปริมาณการซ่อมแซมหลังจากทำปฏิกิริยากับ NTG มากที่สุด (26) NTG จึงมีประสิทธิภาพมากที่สุดกับเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัว ดังนั้นจึงควรบ่มสปอร์ (preincubation) ก่อนการทำปฏิกิริยากับ NTG

90 เปอร์เซนต์ของการกลายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG มักจะเกิด GC → AT transition และอาจเกิด deletion หรือ frameshift mutation โดยสัดส่วนของคู่เบส GC หายไป (27) การกลายพันธุ์ด้วย NTG ต้องเตรียม NTG ในแต่ละครั้งของการทดลองและเก็บในที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการสลายตัว (28) NTG จะสลายตัวอย่างรวดเร็วที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8-9 นิยมละลาย NTG ในสารละลาย Tris-maleic acid พีเอช 8 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 28-37^{o}ซ เป็นเวลา 30 นาที โดยมีการกวนเล็กน้อย ปัจจัยที่สำคัญในการใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ คือ ความเข้มข้นของ NTG (dose) จะพบการกลายพันธุ์เป็นจำนวนมาก ในช่วงความเข้มข้นที่มีเปอร์เซนต์รอดของสปอร์อยู่ระหว่าง 0-50 เปอร์เซนต์ (17,18)

3. การปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi

Erokhina (31) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา Fusarium moniliforme ด้วยรังสี และสารเคมีหลายชนิด เช่น รังสีแกมมา ethylmethanesulfonate nitrosoguanidine nitrosoethylurea ethylene imine และ ปฏิกิริยาระหว่าง ethylene imine ร่วมกับแสงอุลตร้าไวโอเลต แล้วทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตจิบเบอเรลลินด้วยวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี พบเชื้อราที่สามารถสร้างจิบเบอเรลลินเพิ่มขึ้นโดยแปรผันตั้งแต่ 7-90 เปอร์เซนต์ จากสายพันธุ์ตั้งต้น สายพันธุ์กลายพันธุ์ส่วนใหญ่จะผลิต GA_1 และ GA_3 เท่านั้น และการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินชนิดต่างๆใน auxotroph ส่วนใหญ่ถูกทำลายในขณะที่บางตัวผลิตจิบเบอเรลลินเพิ่มขึ้น 15-74 เปอร์เซนต์ จากสายพันธุ์ตั้งต้น ต่อมา Erokhina (32)ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ NTG และ แสงอุลตร้าไวโอเลต ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ของ Fusarium moniliforme พบว่า NTG สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีกว่ารังสีอุลตร้าไวโอเลต

Imshenetskii และ Ul'Yanova (33) กลายพันธุ์ Fusarium moniliforme ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต คัดเลือก mutant 120 สายพันธุ์ มาตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลินด้วย Folin-chiokal'to reagent แบ่งได้ 4 กลุ่มสายพันธุ์คือ 65 เปอร์เซนต์เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 น้อยกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 29 เปอร์เซนต์ ผลิตได้เท่ากับสายพันธุ์ตั้งต้น 1.7 เปอร์เซนต์ ผลิตได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น และ 4.1 เปอร์เซนต์ไม่สามารถผลิต GA_3 ได้ ดังนั้นการกลายพันธุ์ conidia ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต จะให้สายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงขึ้นจำนวนน้อยมาก

ค.ศ. 1984 Avalos (34) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi เพื่อผลิต carotenoid pigment พบว่า NTG และ แสงอุลตร้าไวโอเลตเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่ดีสำหรับ microconidia ของเชื้อ Gibberella fujikuroi เมื่อกลายพันธุ์ microconidia ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 nm และฉายแสง visible light ทันที อัตราการอยู่รอดจะเพิ่มขึ้น (reversible) อย่างเห็นได้ชัด นอกจากนั้นการบ่มสปอร์ก่อนการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตไม่มีผลเพิ่มอัตราการตายของสปอร์ ส่วนเส้นใย (mycelium) จะทนต่อแสงอุลตร้าไวโอเลตมากกว่า microconidia

เมื่อใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์พบว่าความถี่ในการพบสายพันธุ์กลายพันธุ์เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อเพิ่ม dose ของ NTG และอัตราการตายจะเพิ่มขึ้น ถ้าบ่มสปอร์ให้งอก (preincubation) ใน nutrient broth นาน 2 ชั่วโมง หลังจาก 6 ชั่วโมงไปแล้ว 80 เปอร์เซนต์ของ microconidia จะงอก germ tube ทำให้อัตราการตายลดลงและประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ด้วย NTG จะลดลง นอกจากนั้นเมื่อกลายพันธุ์สปอร์ที่อยู่ในระยะพักตัว (resting spore) ด้วย NTG พบว่าจะมีอัตราการตายน้อยกว่าสปอร์ที่บ่มแล้ว เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NTG ที่เท่ากัน สายพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ด้วย NTG จะพบความผิดปกติ คือมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้นในด้าน ขนาดของโคโลนี ผิวหน้าของโคโลนี (surface texture) สี และลักษณะภายนอกอื่นๆ

Koelblin และคณะ (35) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารก่อการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ Gibberella fujikuroi พบว่า NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (morphology change) และ สี (pigment) รังสีเอ็กซ์จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์เพียงเล็กน้อย ส่วนการใช้แสงอุลตร้าไวโอเลต

จะทำให้เกิดสายพันธุ์ที่เปลี่ยนแปลงด้านสี (pigment mutant) เป็นส่วนใหญ่ การใช้แสงอุลตร้าไวโอเลตร่วมกับรังสีเอ็กซ์ มีอิทธิพลอย่างมากต่ออัตราการเจริญ (growth rate) ของเชื้อ Gibberella fujikuroi ส่วนการใช้แสงอุลตร้าไวโอเลต และ NTG จะให้จำนวนสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นมากที่สุด

หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว เชื้อราที่ได้จะต้องนำมาเพาะเลี้ยงและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการให้ผลิตภัณฑ์สูงขึ้น การเพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกนั้นจะใช้สภาวะที่เหมาะสมตามสายพันธุ์ดั้งต้น แต่เมื่อคัดสายพันธุ์กลายพันธุ์แล้ว จะต้องนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งอาจต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งต้น

4. การวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน

ในการปรับปรุงสายพันธุ์ต้องมีวิธีวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินที่เหมาะสม จากอดีตที่ผ่านมาได้มีผู้วิเคราะห์หาปริมาณจิบเบอเรลลินด้วยวิธีต่างๆกันดังนี้

4.1 วิธีทางชีวภาพ (Biological assay)

อาศัยหลักการตอบสนองของเมล็ดพืชแคระซึ่งไวต่อจิบเบอเรลลินที่เติมลงไปเนื่องจาก pathway ของการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินในพืชนั้นถูกทำลาย ไม่สามารถผลิตได้ตามปกติ จิบเบอเรลลินที่เติมลงไปสามารถชักนำให้เกิดการขยายตัวของพืชแคระได้ พืชแคระที่นำมาทดสอบมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีความไวต่อจิบเบอเรลลินแตกต่างกัน เช่น ถั่วแคระ (dwarf pea) และข้าวแคระ (dwarf rice) (1,36) วิธีนี้ใช้ยืนยันกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) แต่ไม่เหมาะในการตรวจสอบชนิดและปริมาณ เนื่องจากจิบเบอเรลลินบางชนิดให้ผลต่อพืชคล้ายกัน (2) ความไว(sensitivity) ต่ำ ใช้เวลานานในการตรวจสอบ (37)

4.2 อิมมูโนเอสเสย์ (Immunoassay)

ได้มีการพัฒนาการใช้ Enzyme Immunoassay ในการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน (2) วิธีนี้มีความไวสูงมาก และจำเพาะกับจิบเบอเรลลินแต่ละชนิด ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จึงไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ หลักการคือเกิด antigen-antibody complex แต่จิบเบอเรลลินเป็นโมเลกุลเล็กเกินกว่าจะเป็นอิมมูโนเจนด้วยตัวเองได้ จึงต้องไปเชื่อม (conjugate) กับโมเลกุลใหญ่ เช่น bovine serum albumin (BSA) หรือ human serum

albumin (HSA) ให้กลายเป็นอิมมูโนเจนที่ดี แต่เนื่องจากจิบเบอเรลลินบางชนิด มีโครงสร้างคล้ายกันมาก จึงต้องระวังการเกิด cross reactivity ของจิบเบอเรลลิน ซึ่งมีถึง 68 ชนิด ส่วนการเตรียมอิมมูโนเจนยุ่งยาก และต้องใช้สารราคาแพงจึงไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์เป็นงานประจำ

4.3 สเปกโทรโฟโตเมตรี (Spectrophotometric method)

กรดจิบเบอเรลลิกเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดเข้มข้นจะให้สารสีแดง (wine red) และพัฒนาไปเป็นสารเรืองแสงสีน้ำเงิน แต่ในระหว่างปฏิกิริยา จะมีการเกิด gibberellenic acid จากกรดจิบเบอเรลลิก และ แลคโตน ซึ่งให้สีใกล้เคียงกันเป็นสารบนเบื้อน ทำให้การวัดค่าของกรดจิบเบอเรลลิกผิดพลาด (1,2) จึงไม่นิยมใช้วิธีดังกล่าว

การหาค่าโดยใช้ fluorescence spectrum ของกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อทำปฏิกิริยากับ 50% กรดซัลฟูริกในเอทานอลที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 25 นาที สารที่ได้จะให้activation peak ที่ 418 μm และ emission peak ที่ 463 μm สามารถประมาณค่า GA_3 ได้แต่เนื่องจากน้ำหมักของ Gibberella fujikuroi มีจิบเบอเรลลินหลายชนิด ทำให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงผิดพลาด เพราะจิบเบอเรลลินบางชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน วิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยมใช้

4.4 เปเปอร์โครมาโตกราฟี (Paper Chromatography)

วิธีนี้มีผู้นิยมใช้กันน้อย เนื่องจากต้องใช้เวลาในการแยกสารนาน ประสิทธิภาพในการแยกสารต่ำ

4.5 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (Thin Layer Chromatography , TLC)

วิธีนี้สะดวกและมีประสิทธิภาพในการแยกสารดี Kumar และ Lonsane (38) ได้ศึกษาเทคนิคการประมาณค่า GA_3 ในสารสกัดที่ได้จากการหมักเชื้อ Gibberella fujikuroi ที่เจริญในอาหารแข็ง โดยใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วย silica gel G ความหนา 300 ไมโครเมตร ระบบตัวพาประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : เอทิลอะซิเตท : กรดอะซิติกในอัตราส่วน 5:4:1 พ่นด้วย 5 เปอร์เซนต์ กรดซัลฟูริกในเอทานอล อบที่ 100°ซ นาน 30 นาที สังเกตจุดสารภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร วัดความเข้มของจุดภายใต้เครื่อง spectrofluorodensitometer พบว่าวิธีนี้ จำเพาะกับ GA_3 ไม่บนเบื้อนสารอื่น สามารถแยก GA_3 ออกจากสารอื่นในน้ำหมักได้

Cavell และ คณะ (39) สามารถแยกจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆในน้ำสกัดจากพืชชั้นสูงและน้ำหมักของเชื้อ Gibberella fujikuroi บนแผ่น TLC ใช้ระบบตัวพาที่ประกอบด้วย เบนซีน : กรดโพรพิโอนิค : น้ำ ในอัตราส่วน 8:3:5 ได้ค่า R_f ของ GA_3 ที่ 0.45

Saucedo และ คณะ (40) ได้ตรึงเส้นใยของเชื้อ Gibberella fujikuroi ใน calcium alginate แล้วตรวจสอบปริมาณ GA_3 บนแผ่น TLC โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักเป็น 2.5 ด้วย 10 เปอร์เซนต์ กรดซัลฟูริก สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท วิเคราะห์ปริมาณ GA_3 บนแผ่น TLC silica gel 60 F_{254} ในระบบตัวพาที่ประกอบด้วย เบนซีน : กรดโพรพิโอนิค : น้ำ (6:3:1) และเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 6:4 ตรวจสอบจุดสารโดยการพ่นด้วย 5 เปอร์เซนต์กรดซัลฟูริกในเอทานอล วัดความเข้มของจุด GA_3 ภายใต้เครื่อง Scanning densitometer

เทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณบนแผ่น TLC อาจใช้วิธีเปรียบเทียบพื้นที่จุดด้วยสายตาโดยนำสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้วไปวิเคราะห์บนแผ่น TLC แผ่นเดียวกัน พื้นที่สัมพัทธ์หรือความเข้มของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะถูกประเมินออกมาด้วยตาเปล่า ซึ่งจะให้ความถูกต้อง 5-10 เปอร์เซนต์ ส่วนวิธีการวัดสมบัติทางกายภาพของจุดสีโดยวัดค่าความเข้มของการสะท้อนแสง ฟลูออเรสเซนต์ หรือการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง scanning photodensitometer แล้วบันทึกด้วย recorder จะให้ความถูกต้องเพียง 3-5 เปอร์เซนต์ (41) อาจใช้วิธีวัดพื้นที่ของจุดเทียบกับสารมาตรฐานหรือวิธีการแยกสารออกจากแผ่น TLC แล้วนำไปวัดปริมาณสารด้วยวิธีการที่เหมาะสม แต่สองวิธีหลังนี้ยุ่งยากไม่เหมาะที่จะนำมาใช้คัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

4.6 ไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างมาก ในการแยกและจำแนกผลิตภัณฑ์ในธรรมชาติ รวมทั้งการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน สามารถแยกจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆ ออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว การเตรียมสารไม่ยุ่งยาก อรไท สุขเจริญ (17) ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 จากน้ำหมักของ Gibberella fujikuroi C โดยปรับปรุงจากวิธีของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (16) ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C_8 สารละลายตัวพาเป็น 35 เปอร์เซนต์เมทานอลในกรดฟอสฟอริก พีเอช 3 อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มล.ต่อนาที วัดการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร

ใช้พาราเซตามอลเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน

4.7 แกสโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography)

เป็นการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารประกอบที่กลายเป็นไอได้ง่าย ในรูปของเมทธิลเอสเทอร์ (methyl ester) หรือ ไตรเมทธิลไซลิล (trimethylsilyl) เป็นต้น (2) การเตรียมอนุพันธ์เพื่อตรวจวัดนี้ มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก การเตรียมสารละลายไดอะโซมีเทน (diazomethane) สำหรับการเติมหมู่เมทิล เป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง ต้องการอุปกรณ์เฉพาะในการเตรียมและยังมีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) จึงไม่ควรใช้วิเคราะห์ในงานประจำ

5. เหตุจูงใจในการวิจัย

จิบเบอเรลลิน เป็นกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่มีประสิทธิภาพสูง ในการกระตุ้นการเจริญของพืช ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับจิบเบอเรลลินกันมาก (1,2) ทั้งในด้านการสังเคราะห์ การทำให้บริสุทธิ์และการนำไปใช้ประโยชน์ ในทางการเกษตรใช้เพิ่มการติดผล การเกิดดอก การเปลี่ยนเพศดอก ใช้ผลิตพืชนอกฤดู และผลิตพืชให้มีคุณสมบัติตามความต้องการของตลาด ปัจจุบันได้ค้นพบจิบเบอเรลลิน 68 ชนิด แต่ละชนิดมีอิทธิพลต่อพืชแตกต่างกัน แต่ในทางสรีรวิทยายอมรับว่า GA_3 มีอิทธิพลต่อการเจริญของพืชมากกว่าจิบเบอเรลลินชนิดอื่น จึงทำให้ปริมาณการใช้ GA_3 ในประเทศไทยเพิ่มขึ้นทุกปี และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอีกในอนาคต ปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้า GA_3 จากต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา จีน และญี่ปุ่น ซึ่งมีราคาสูง จึงน่าจะมีการผลิตขึ้นใช้เองภายในประเทศ แต่สายพันธุ์ที่มีอยู่ยังให้ผลผลิตที่ไม่สูงนัก จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้สูงขึ้น

งานวิจัยนี้ มีจุดประสงค์ที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) จากเชื้อรา Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C โดยวิธีทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต สลับกับ NTG แล้วตามด้วยการคัดเลือกพันธุ์โดยตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้จากการกลายพันธุ์เบื้องต้น (primary screening) ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) ต่อจากนั้นนำสายพันธุ์ที่คัดไว้มาเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และศึกษา

คุณสมบัติบางประการของสายพันธุ์กลายพันธุ์ ในแง่ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนไป (morphological change) กับประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น และเป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และเพื่อนำสายพันธุ์ใหม่ ไปใช้ในการผลิต GA_3

6. ขั้นตอนการวิจัย

6.1 ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต

6.2 หาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มสปอร์ (preincubation) ของ Gibberella fujikuroi ก่อนการกลายพันธุ์ด้วย NTG

6.3 ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ Gibberella fujikuroi ด้วย NTG

6.4 คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เพิ่มขึ้น

6.5 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (morphological change) กับประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์กลายพันธุ์

6.6 ตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว ในถังหมักขนาด 5 ลิตร