หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. <u>บทบาทของพืชตระกูลถั่วกับกระบวนการตรึงไนโตรเจน</u>

กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Biological nitrogen fixation process หรือ BNF process) หมายถึง กระบวนการต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนโดยตรงและโดยอ้อม

ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Biological nitrogen fixation reaction) หมายถึงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกาซไนโตรเจนให้เป็นอนุมูลอัมโมเนียม โดยการใช้เอทีพีและอำนาจรีดิวซ์ และโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เชิงซ้อนที่มีชื่อรู้จักกันแพร่หลายว่า ไนโตรจีเนส ดังปฏิกิริยา

$$xATP + 6e^- + 6H^+ + N_2 \xrightarrow{\text{nitrogenase}} xADP + xPi + 2NH_3$$

ดังนั้นกระบวนการที่สัมพันธ์กับปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนโดยตรง ได้แก่

1.1 กระบวนการสร้างเอทีพี

1.2 กระบวนการสร้างอำนาจรีดิวซ์

1.3 กระบวนการนำอนุมูลอัมโมเนียมไปใช้

1.4 กระบวนการถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนส

1.5 และกระบวนการควบคุมปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน

เอนไซม์ไนโตรจีเนสซึ่งทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นอนุมูลอัมโมเนียม เป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียเท่านั้น และเอนไซม์นี้จะพบในสองสภาวะ คือ (1) เมื่อแบคทีเรียเจริญอย่างอิสระและตรึงไนโตรเจน หรือเรียกว่า free living BNF และ (2) เมื่อแบคทีเรียเจริญอยู่ร่วมกับรากพืช และตรึงไนโตรเจน หรือเรียกว่า symbiotic BNF

ปัจจัยใดที่ไม่ให้ผลกระทบต่อปฏิกิริยา BNF โดยตรง ก็สามารถจัดเข้าเป็นปัจจัยที่ให้ผลกระทบต่อ BNF โดยอ้อม เช่น

1.1 กระบวนการแข่งขันระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อเข้าอยู่ร่วมกับพืช

1.2 กระบวนการแลกเปลี่ยนสารเมตาบอไลต์ระหว่างแบคทีเรียกับพืช

1.3 กระบวนการดิฟเฟอเรนทิเอชันจากแบคทีเรียเป็นแบคทีรอยด์ในเซลล์ของรากพืช

1.4 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรียและของพืชเจ้าเรือน

ตามหลักฐานทางประวัติศาสตร์ ก่อนการค้นพบว่ามีแบคทีเรียบางสกุลที่อาศัยร่วมกับพืชและทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน ก็ได้มีการค้นพบแล้วว่า ถั่วเป็นอาหารที่มีคุณภาพสูงต่อทั้งคนและสัตว์ พืชที่อยู่ร่วมกับแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้นี้ มีจำนวนถึงหนึ่งหมื่นสองพันชนิด ในจำนวนนี้มีเพียงห้าสิบชนิดเท่านั้น ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจการเกษตรโดยตรง ที่เหลือนอกนั้นจะมีผลต่อนิเวศน์วิทยาของวัฏจักรไนโตรเจนของโลก (Lim et al., 1982) และกระบวนการตรึงไนโตรเจนนี่เอง ที่เป็นกระบวนการต้นตอไนโตรเจนที่ผลิตอนุมูลอัมโมเนียม ซึ่งชีวิตบนโลกได้นำไปใช้ ดังนั้น BNF จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญทั้งในระดับเศรษฐกิจ และในระดับนิเวศน์วิทยาอีกด้วย

ในปัจจุบันประชากรโลกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการแพทย์ การโภชนาการ และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับความเป็นอยู่ของมนุษย์มีการพัฒนามากจนทำให้ชีวิตมนุษย์ยืนยาวขึ้น พื้นที่ๆ จะใช้ในการผลิตย่อมลดลงและความต้องการอาหารก็มากขึ้น คาดว่าปี ค.ศ. 2000 ประชากรของโลกจะเพิ่มถึง 6.2 พันล้านคน ซึ่งหมายถึงจะต้องมีการเพิ่มผลผลิตอาหารประมาณ 2-3 เท่าของปัจจุบันเพื่อให้เพียงพอกับจำนวนประชากรดังกล่าว (Anon, 1979) การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรนั้นสามารถทำได้ 2 ทางคือ การขยายพื้นที่ และการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต ในอนาคตการขยายพื้นที่ในการผลิตเกือบจะเป็นไปไม่ได้ ในทางตรงกันข้ามอาจจะมีการลดพื้นที่ ฉะนั้นทางเดียวที่จะเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ก็คือ การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต (นันทกร บุญเกิด, 2529 ก) เมื่อประมาณ 30 ปีที่ผ่านมา ได้มีการนำเทคโนโลยีการผลิตสมัยใหม่มาใช้ ซึ่งในกระบวนการผลิตต้องอาศัยแหล่งพลังงานเป็นสำคัญ การผลิตปุ๋ยโดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจนซึ่งเป็นหัวใจสำคัญในการเพิ่มผลผลิตอาหาร ในการผลิตปุ๋ยไนโตรเจน (ในรูปของแอมโมเนียบริสุทธิ์) 1 กิโลกรัม ต้องใช้พลังงานจากก๊าซธรรมชาติประมาณ 1,600 ลิตร และคาดว่าอีกสิบปีข้างหน้าอาจจะไม่สามารถขยายกำลังการผลิตให้เพียงพอกับความต้องการได้ เนื่องจากการลดลงและราคาที่สูงขึ้นของแหล่งพลังงานจากน้ำมันดิบ (fossil fuels) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ปุ๋ยไนโตรเจนมีราคาสูงขึ้นด้วย จึงคาดหวังว่าการใช้ประโยชน์จากการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพจะช่วยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้กับระบบการผลิตทางการเกษตรได้มากกว่า ซึ่งนับว่าเป็นการผลิตอาหารสมัยใหม่ สำหรับประชากรโลกที่กำลังเพิ่มขึ้น และการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพจะมีบทบาท

อย่างมากต่อประเทศในโลกที่สามซึ่งมีอัตราการเพิ่มของประชากรค่อนข้างสูง แต่ขาดแคลนแหล่งพลังงานจากน้ำมันดิบและขาดสิ่งเอื้ออำนวยในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยเคมี

อาจเป็นไปได้ว่า ในอนาคตมนุษยชาติจะต้องพึ่งพาสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนเพื่อการอยู่รอดมากขึ้น พืชตระกูลถั่วจึงควรมีความสำคัญเป็นอันดับแรกในการเพิ่มผลผลิตอาหาร

2. ไรโซเบียมบางสายพันธุ์กับการเกษตรถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและของโลก ประโยชน์ของถั่วเหลืองนอกจากจะใช้สำหรับบริโภคโดยตรงแล้ว ยังสามารถนำไปสกัดแยกน้ำมันออก และได้กากถั่วเหลืองซึ่งนำไปแปรรูปเป็นโปรตีนเกษตรสำหรับเป็นอาหารของคนและสัตว์ ทั้งนี้เพราะกากถั่วเหลืองนี้จะมีโปรตีนที่มีคุณภาพสูงและมีปริมาณถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับปริมาณของเนื้อหมูหรือเนื้อวัว (วิมลศรี เทวะผลิน, จากเอกสารวิชาการ ชุดพืชศาสตร์ ที่ 3 เรื่อง ถั่วเหลือง)

Rhizobium japonicum เป็นไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตช้าและสามารถอยู่ร่วมกับรากของต้นถั่วเหลือง (Glycine max) ปัจจุบันได้พบว่ามีไรโซเบียมอีกชนิดหนึ่ง คือ Rhizobium fredii ซึ่งมีสรีรวิทยาส่วนใหญ่คล้ายคลึงกับ R. japonicum ยกเว้นไรโซเบียมชนิดนี้มีสรีรวิทยาในการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่า R. japonicum ดังนั้นถั่วเหลืองมีความสำคัญเท่าไร ไรโซเบียมทั้งสองชนิดดังกล่าวก็มีความสำคัญเท่านั้นด้วย ในการทำไร่ถั่วเหลือง แทบทุกประเทศจะมีหน่วยงานของรัฐที่รับผิดชอบการผลิตสายพันธุ์ไรโซเบียมจำเพาะ เพื่อส่งไปให้เกษตรกรคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองก่อนการปลูก ในประเทศไทยก็มีหน่วยจุลินทรีย์ดินของกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ทำหน้าที่คัดสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีสมบัติเด่นสามารถจะอยู่ร่วมกับต้นถั่วเหลืองแล้วทำให้เกษตรกรถั่วเหลืองได้ผลผลิตที่มีคุณค่าสูงขึ้น (นันทกร บุญเกิด, 2529 ข)

ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามในระดับสากลที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ไรโซเบียมจำเพาะพร้อมๆ กับปรับปรุงต้นถั่วเหลือง หลักการปรับปรุงสายพันธุ์ไรโซเบียมมีสองทาง คือ ปรับปรุงในส่วนที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนโดยตรง (intrinsic factor) และส่วนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนโดยอ้อม (extrinsic factor)

2.1 ปัจจัยภายใน (intrinsic factor)

2.1.1 โอเปอรอนของ nif และ hup : ทราบกันดีแล้วว่าไรโซเบียมจะตรึงไนโตรเจนได้ดี เมื่อเจริญในสภาพของแบคทีรอยด์ในปมของพืชตระกูลถั่วเท่านั้น ได้มีการค้นพบว่า ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมที่เจริญเติบโตช้า รวมทั้ง R. japonicum จะ

มีโปรตอนเป็นตัวยับยั้งแข่งขัน ทั้งนี้เนื่องจากพบว่า ประสิทธิภาพการใช้เอทีพีเพื่อผลิตอนุมูลอัมโมเนียมของไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตช้ามีเพียง 30-60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตเร็วมีประสิทธิภาพสูงถึง 90-96 เปอร์เซ็นต์ (Schubert and Evans, 1976) กล่าวอีกนัยหนึ่งปฏิกิริยา ATP dependent hydrogenase ของ R. japonicum จะว่องไวมาก จนสามารถจะแข่งขันการใช้เอทีพีและอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนได้อย่างเท่าเทียมกัน

ขณะเดียวกัน Albrecht et al. (1979) รายงานว่า แม้ว่าจะมีการสูญเสียเอทีพีในปฏิกิริยา ATP dependent hydrogenase แต่ถ้าในไรโซเบียมสายพันธุ์นั้นๆ มีเอนไซม์ ATP independent hydrogenase อยู่ด้วย เอนไซม์นี้สามารถจะใช้ไฮโดรเจนที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนสให้กลับไปเป็นไฮโดรเนียมอิออน และปลดปล่อยอิเล็กตรอนที่มีกำลังสูงพอที่จะเข้าไปในกระบวนการขนถ่ายอิเล็กตรอน (electron transport chain) และสามารถนำไปสร้างเอทีพีได้ ดังปฏิกิริยา

ปฏิกิริยา ATP dependent hydrogenase :

$$ATP + 2e^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{nitrogenase}} ADP + Pi + H_2 \quad .....(1)$$

ปฏิกิริยา ATP independent hydrogenase :

$$H_2 \xrightarrow{\text{hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \xrightarrow{\text{electron transport}} \begin{array}{l} \downarrow \\ \text{flavodoxin} \end{array} \qquad \begin{array}{l} ADP + Pi \\ \downarrow \\ ATP \end{array} \quad .....(2)$$

นิยมเรียกกระบวนการที่สามารถนำไฮโดรเจนย้อนกลับไปสร้างเอทีพีว่า hup (hydrogen uptake positive) system

ด้วยเหตุนี้การที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนใน R. japonicum จึงต้องอาศัย nif และ hup ที่มีการทำงานที่สอดคล้องกัน และสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถจะเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในต้นถั่วถึง 50 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 เมตาบอลิสมของน้ำตาลต่างกัน : ไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตเร็วนั้นสามารถจะใช้ซูโครสเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ ในขณะที่ไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตช้า รวมทั้ง R. fredii ไม่สามารถใช้ซูโครสเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ ทราบกันดีแล้วว่าพืชสามารถสร้าง

ซูโครสได้ดี ดังนั้นไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตเร็วจึงมีโอกาสเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณรากพืช

Stowers (1985) รายงานว่าไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตเร็วสามารถใช้ซูโครสและไดแซคคาไรด์อื่นๆ ได้ เนื่องจากมีเอนไซม์อินเวอร์เทส นอกจากซูโครสแล้วยังพบความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถของไรโซเบียม ในการใช้แมนนิทอลและกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนกับความสามารถในการตรึงไนโตรเจน Mulongoy et al. (1977) พบว่า R. japonicum USDA 110 บางโคโลนี มีความสามารถในการใช้แมนนิทอลและตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างกัน โคโลนีที่ไม่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ดี-แมนนิทอล ดีไฮโดรจีเนส จะมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าและสามารถใช้กลูโคสได้ดีกว่า โคโลนีที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ดี-แมนนิทอล ดีไฮโดรจีเนสสูง Stowers (1985) รายงานว่าซัคซิเนทซึ่งเป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน 4 อะตอม ก็มีส่วนช่วยในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม ทั้งในสภาพอิสระและในสภาพเซลล์ที่เป็นแบคทีรอยด์ ซึ่งไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้าไม่สามารถใช้ซัคซิเนทเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้

ถ้าจะตั้งคำถามว่า หากปริมาณน้ำตาลที่พืชส่งให้ไรโซเบียมระหว่างที่เจริญอยู่ในปมของรากพืชมีจำนวนจำกัด คำถามก็คือไรโซเบียมได้นำน้ำตาลเหล่านี้ไปใช้สร้างเอทีพีได้สูงสุดหรือยัง

เกี่ยวกับเรื่องนี้ผลงานของ Elkan น่าสนใจมาก เมื่อเขาแยกสายพันธุ์ของ Rhizobium japonicum จากปมต้นถั่วเหลืองได้เป็น 2 แบบ คือ สายพันธุ์ที่มีลักษณะโคโลนีใหญ่และเล็ก เขาได้ศึกษาสรีรวิทยาของ R. japonicum ของทั้งสองสายพันธุ์นั้น พบว่า สายพันธุ์ที่มีขนาดของโคโลนีเล็กจะใช้แมนนิทอลและซอบิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอนไม่ได้ นอกจากนี้การเจริญในอาหารที่มีกลูโคสจะรวดเร็วกว่าสายพันธุ์ที่มีโคโลนีใหญ่อีกด้วย (Kuykendall and Elkan, 1976) และเมื่อเปรียบเทียบแอคทิวิตีของเอนไซม์หลายชนิดที่มีหน้าที่เกี่ยวกับเมตาบอลิสมของกลูโคส ปรากฏว่า ข้อมูลที่ได้บ่งชี้ว่า R. japonicum สายพันธุ์ที่มีโคโลนีขนาดเล็ก มีการสลายตัวของกลูโคสผ่าน Embden Meyerhof pathway แต่เพียงอย่างเดียว ในขณะที่สายพันธุ์ที่ให้การตรึงไนโตรเจนต่ำมีการสลายตัวของกลูโคสผ่านทั้ง Embden Meyerhof pathway ร่วมกับ Entner Doudoroff pathway เนื่องจากกระบวนการหลังเป็นกระบวนการที่สลายกลูโคสและให้เอทีพีน้อยกว่ากระบวนการแรก เชื่อว่าความแตกต่างของแบบแผนการสลายตัวของกลูโคสควรจะมีอิทธิพลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนได้ (Mulongoy et al., 1977)

ด้วยเหตุนี้ การที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนในไรโซเบียมที่สร้างปมกับถั่วเหลือง จึงสามารถนำความรู้เรื่องเมตาบอลิสมของน้ำตาลมาตั้งเป็นสมมติฐานได้ดังนี้

ก. สามารถทำให้ไรโซเบียมที่สร้างปมกับถั่วเหลือง ใช้ซูโครสเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้หรือไม่ เพราะเมตาบอลิสมของกลูโคสอาจเร่งอัตราเร็วของการเจริญของไรโซเบียมกลุ่มนี้ให้เร็วกว่าเดิมคือ มีช่วงเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่า จาก 7.5 ชั่วโมงเป็น 1 ชั่วโมง ในกรณีที่ไรโซเบียมกลุ่มนี้สามารถใช้ซูโครสจากต้นพืชได้ ก็จะเจริญเร็วขึ้น และช่วยให้ส่งอนุมูลอัมโมเนียมให้แก่พืชได้เร็วขึ้น

ข. สามารถเพิ่มอำนาจการแข่งขันของไรโซเบียมสายพันธุ์จำเพาะในการเข้าสู่เซลล์ของรากต้นถั่วเหลืองได้ดีกว่าเดิมหรือไม่ ทั้งนี้เพราะเมื่อพืชส่งซูโครสออกมาจากเซลล์ราก ย่อมกลายเป็นปัจจัยดึงดูด (attractant) ให้ไรโซเบียมสายพันธุ์จำเพาะกับต้นถั่วเหลืองที่มีความสามารถในการใช้ซูโครส เคลื่อนเข้าหาเซลล์ของรากพืชได้เร็วขึ้น

ค. สามารถทำให้ไรโซเบียมที่สร้างปมกับถั่วเหลืองที่มีการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิสมของน้ำตาล ทนทานต่อความเครียดต่างๆ ได้ดีเหมือนไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตเร็ว เช่น R. phaseoli ได้หรือไม่ เนื่องจากไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตเร็วเท่านั้นที่สามารถทนทานต่ออุณหภูมิสูง (มากกว่า 37°ซ) ทนเค็ม (เทียบเท่ากับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์) เป็นต้น

2.2 ปัจจัยภายนอก (extrinsic factor)

2.2.1 อุณหภูมิและความแห้งแล้ง : เมื่ออุณหภูมิสูงมักจะมีผลกระทบต่อการสร้างปมและกระบวนการอยู่ร่วมกันระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว

2.2.2 ความเค็ม : บางครั้งอาจกล่าวได้ว่า ความเค็มเป็นความเครียดที่แผ่กระจายอยู่ทั่วไปในพื้นที่เกษตรกรรม เกลือที่ละลายในดินสามารถแพร่ไปที่พื้นผิวของรากในอัตราที่สูงเกินกว่าความสามารถของรากในการดูดซึม ดังนั้นเกลือจะถูกสะสมอยู่รอบๆ รากพืชในระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งจะมีผลต่อพืชและแบคทีเรีย ความสามารถของไรโซเบียมชนิดและสายพันธุ์ต่างๆ ในการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ มีความแตกต่างกันตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 0.5 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ และความแตกต่างของพันธุ์พืชก็แปรตามความสามารถในการทนเค็มด้วยเช่นกัน ดังนั้นการไม่ประสบผลสำเร็จในการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกับพืช น่าจะอธิบายได้ด้วยความล้มเหลวของคีโมแทกซีส การม้วนตัวของรากพืช และความล้มเหลวของกระบวนการเข้าสู่รากพืชของแบคทีเรีย อันสืบเนื่องจากผลของเกลือซึ่งมีผลต่อเมตาบอลิสมของไรโซเบียมและพืช (Rai, 1986) กระบวนการสร้างปมจึงไม่อาจเกิดขึ้นได้ หรืออาจมีผลต่อกิจกรรมของปมโดยตรง โดยน้ำ

ภายในปมจะถูกดึงออกเพื่อรักษาสภาพออสโมติก ซึ่งลดกิจกรรมการทำงานของปม

2.2.3 ความเป็นกรดด่าง : โดยทั่วไปจะพิจารณาร่วมกับปัจจัยอื่นๆ ด้วย เช่น แคลเซียม โมลิบดินัม อลูมินัม และมังกานีส ฯลฯ ในสภาพที่ดินมีความเป็นกรด มักจะพบว่าขาดธาตุแคลเซียม และธาตุโมลิบดินัมด้วย ซึ่งจะมีผลต่อทั้งไรโซเบียม และการเข้าสู่รากพืชของไรโซเบียม

2.2.4 ธาตุอาหาร : พืชตระกูลถั่วก็ต้องการสารอาหารเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นๆ กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และการสังเคราะห์เล็กฮีโมโกลบิน (leghaemoglobin) ต้องการธาตุโมลิบดินัมและธาตุเหล็ก บางพื้นที่ก็ขาดธาตุอาหารหลัก เช่น ธาตุฟอสฟอรัส ซึ่งมีผลต่อการสร้างปม การตรึงไนโตรเจน และการเจริญของพืช ในกรณีที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนลงในดินก็จะมีผลในการลดการสร้างปมและความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

3. <u>การสร้างไรโซเบียมสายพันธุ์ใหม่ (bacterial strain construction)</u>

ดังได้กล่าวแล้วว่า <u>R. fredii</u> เป็นไรโซเบียมที่อยู่ร่วมกับถั่วเหลืองมีสรีรสมบัติคล้ายคลึงกับ <u>R. japonicum</u> ซึ่งเป็นไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตช้า ยกเว้น <u>R. fredii</u> สามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่า <u>R. japonicum</u> ดังนั้นการที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของไรโซเบียมที่ตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลือง นอกจากจะใช้วิธีคัดเลือกสายพันธุ์จากธรรมชาติ ตามที่กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ทำเป็นประจำอยู่แล้ว อีกหนทางหนึ่ง ก็คือ การใช้พันธุวิศวกรรมเข้าไปช่วยปรับปรุง

การที่จะปรับปรุงประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนของ <u>R. fredii</u> จึงต้องการวิธีการสร้างสายพันธุ์ใหม่ซึ่งหมายถึง มีการโยกย้ายเปลี่ยนแปลงยีนบนโครโมโซมนั่นเอง

โดยหลักการ วิธีการโยกย้ายยีนมี 3 ทางคือ

3.1 <u>ทรานสฟอร์เมชัน (transformation)</u> ได้แก่ การนำดีเอ็นเอขนาดไม่ใหญ่นัก ใส่เข้าไปในแบคทีเรียโดยตรง ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียกรัมบวก พบในแบคทีเรียกรัมลบบ้าง ถ้าสร้างสภาวะให้เหมาะสม เช่น การทรานสฟอร์มพลาสมิดขนาดไม่เกิน 10 กิโลเบส เข้าเซลล์ของ <u>E. coli</u> ที่ได้รับการแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็นต้น สำหรับไรโซเบียม อธิป ลิขิตลิลิต (2524) รายงานว่า อาจจะใช้วิธีทรานสฟอร์เมชันได้เช่นเดียวกับวิธีที่ใช้ใน <u>E. coli</u>

3.2 <u>ทรานสดักชัน (transduction)</u> ได้แก่ การนำยีนจำนวนหนึ่งจากสาย

พันธุ์หนึ่ง มาแลกเปลี่ยนกับยีนที่มีหน้าที่เดียวกัน ในแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่ง โดยอาศัยการทำงานที่ผิดพลาดของแบคเทอริโอฟาจ เช่น ใน E. coli ใช้แบคเทอริโอฟาจ P1 และ Mu เป็นต้น สำหรับไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตเร็ว มีผู้รายงานว่าพบกระบวนการนี้อยู่บ้าง แต่ไม่ปรากฏรายงานในไรโซเบียมที่อยู่ร่วมกับถั่วเหลือง (Postgate, 1982)

3.3 คอนจูเกชัน (conjugation) เป็นการแลกเปลี่ยนยีนโดยอาศัย ระบบการเคลื่อนย้ายยีนผ่านเอพิโซม (episome หรือ fertility system) ระบบการคอนจูเกชันนั้นมีประโยชน์กว้างขวางมาก ทำให้สามารถสร้างแผนผังของโครโมโซมของ E. coli ได้ ข้อสำคัญก็คือจะต้องมีการสร้าง F' ที่มียีนรอบโครโมโซมของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ อยู่ด้วย สำหรับไรโซเบียมที่อยู่ร่วมกับถั่วเหลือง มิได้มีการค้นพบระบบนี้

โดยหลักการ การเคลื่อนย้ายของยีนทั้ง 3 รูปแบบนี้ ต้องการความจำเพาะเจาะจงหลายอย่าง ได้แก่

ก. ต้องมีโปรตีนที่ผิวเซลล์ไม่กีดกั้นต่อกัน (surface exclusion)

ข. ความจำเพาะระหว่างเซลล์เจ้าบ้านกับชิ้นส่วนของยีนที่จะเคลื่อนย้ายเข้าเซลล์นั้น (host specificity)

ค. ความสอดคล้องระหว่างกระบวนการเพิ่มจำนวน (compatibility of replication)

แต่เนื่องจากระบบการเคลื่อนย้ายยีนทั้งสามรูปแบบนั้น มักจะจำกัดตัวอยู่เฉพาะใน E. coli เท่านั้น การสร้างสายพันธุ์ในแบคทีเรียสกุลอื่นโดยวิธีการเคลื่อนย้ายยีน จึงมีขอบเขตจำกัด

4. การใช้โพรโทพลาสต์ฟิวชันในไรโซเบียม

เซลล์ยูคาริโอต ประกอบด้วยเยื่อเซลล์ชั้นเดียว ถ้าหากนำเซลล์เหล่านี้มารวมกันโดยการใช้ตัวเชื่อมที่เหมาะสม ก็อาจทำให้เซลล์สองเซลล์หลอมเข้าเป็นเซลล์เดียวกันได้ และโครโมโซมของเซลล์ทั้งสองก็จะมารวมตัวกันได้เอง วิธีการนี้เรียกว่า การหลอมเซลล์ (cell fusion)

แต่เนื่องจากแบคทีเรียประกอบด้วยเยื่อเซลล์สองชั้น และมีคุณสมบัติการกีดกันผิวเซลล์ซึ่งกันและกัน โดยเฉพาะถ้าเป็นแบคทีเรียต่างชนิดกัน (species) ดังนั้น ถ้าหากสามารถทำลายการกีดกันนี้ได้ชั่วคราว ก็สามารถจะใช้วิธีการหลอมเซลล์เช่นเดียวกับเซลล์ยูคาริโอต

หลักการทำโพรโทพลาสต์ฟิวชัน มี 3 ประการ คือ

4.1 <u>ต้องหาเอนไซม์ที่สามารถทำลายผนังเซลล์ (cell walls) ของจุลินทรีย์</u> โดยทั่วไปแล้ว ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ใดก็ตามที่ยังไม่เคยได้รับการศึกษามาก่อน การที่จะทราบว่าจะใช้เอนไซม์ตัวใดทำลายผนังเซลล์ย่อมเป็นไปได้ยาก

สำหรับในแบคทีเรีย มีการศึกษากันมากในชนิดกรัมบวก เนื่องจากผนังเซลล์สามารถถูกย่อยได้ง่ายด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ แต่ในกรณีของแบคทีเรียกรัมลบซึ่งมีผนังเซลล์ซับซ้อน การสร้างโพรโทพลาสต์จะขึ้นกับปัจจัยสำคัญ 3 ประการ คือ ความสมดุลย์ระหว่าง ความเข้มข้นของไลโซไซม์ สภาพความเป็นประจุ และความเข้มข้นของ EDTA (Peberdy, 1980) โดยไลโซไซม์มีหน้าที่หลักในการย่อยชั้นเปปทิโดไกลแคนของผนังเซลล์โดยตรง ที่บริเวณพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างอะตอมคาร์บอนตัวที่หนึ่งของ N-acetylmuramic acid (NAM) กับอะตอมคาร์บอนตัวที่สี่ของ N-acetylglucosamine (NAG) (Stryer, 1981) และ EDTA ซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการจับโลหะที่รบกวนการทำงานของไลโซไซม์ในชั้นของผิวเซลล์

นอกจากปัจจัยสำคัญดังกล่าวแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการสร้างโพรโทพลาสต์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้แตกต่างกันอีกด้วย ได้แก่ สภาวะและส่วนประกอบของอาหารในการเลี้ยงเซลล์ก่อนนำมาสร้างโพรโทพลาสต์ จะทำให้ส่วนประกอบทางเคมี โปรตีน หรือไขมันที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลเกี่ยวข้องกับความคงทนของโครงสร้างรอบนอกเซลล์ ซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของไลโซไซม์ (Dunwell et al.,1961) เช่น อาหารชนิดที่ส่งเสริมการสร้างแคปซูลหรือเมือกหุ้มเซลล์ จะมีผลกระทบต่อแอคทิวิตีของไลโซไซม์ (Repaske, 1958) เนื่องจากไลโซไซม์แทรกเข้าในชั้นผนังเซลล์ลำบากขึ้น แต่ในทางตรงกันข้าม ถ้าเสริมไกลซีนในระดับยับยั้งการเจริญบางส่วนลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ จะทำให้ไลโซไซม์ทำงานได้สะดวกขึ้น เพราะการเสริมไกลซีนในระดับดังกล่าว มีผลในการยับยั้งการนำ L-alanine เข้าต่อที่ UDP-acetylmuramic acid (Sagara et al.,1971 และ Coetzee et al.,1979)

4.2 <u>ค้นหาสภาวะที่จะรักษาสภาพและการหลอมโพรโทพลาสต์ที่เตรียมได้</u> สภาวะที่นิยมใช้กัน ได้แก่ การใช้สารละลายน้ำตาล เช่น ซูโครส กลีเซอรอล หรือสารละลายเกลือ เช่น โซเดียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้นสูงพอเหมาะกับสภาพโพรโทพลาสต์เป็นตัวกลาง และนิยมใช้ polyethylene glycol (PEG) เป็นตัวกลางในการเชื่อมโพรโทพลาสต์เข้าด้วยกัน ทำให้ได้ diploid, tetraploid หรือ polyploid

protoplast

PEG เป็นสารอินทรีย์เคมี จะเข้าจับกับกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีขั้ว เช่น ฟอสโฟลิปิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์ ทำให้เซลล์เข้ามาอยู่ใกล้ชิดกัน Maggio et al.(1976) รายงานว่า PEG สามารถช่วยลดความต่างศักย์ของ lipid monolayers ได้หลายร้อยมิลลิโวลต์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการหลอมโพรโทพลาสต์

4.3 ค้นหาสภาวะที่ใช้หวลคืนโพรโทพลาสต์ให้กลับสภาพเดิม โดยการใช้สูตรอาหารที่เหมาะสม เช่น การใช้น้ำตาลที่เหมาะสมเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน หรือกรดอะมิโนที่เหมาะสม เป็นต้น นอกจากนี้ที่สำคัญที่สุด คือ การที่จะเลือกสภาวะที่รีคอมบิแนนต์ (recombinant) สามารถเติบโตได้และสายพันธุ์พ่อแม่เติบโตไม่ได้ ดังนั้นขีดจำกัดของการทำโพรโทพลาสต์ฟิวชันจึงอยู่ที่การสร้างยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกแบบคัดทิ้งโดยตรง (selection) หรือ การคัดทิ้งแบบเคาน์เตอร์ (counterselection) ที่เหมาะสมด้วย

5. การเตรียมยีนเครื่องหมาย และการเลือกไรโซเบียมสำหรับใช้ในเทคนิคโพรโทพลาสต์ฟิวชัน

ปัญหาของการหลอมโพรโทพลาสต์ ไม่ว่าในเซลล์ยูคาริโอต หรือ โพรคาริโอต จะอยู่ที่ว่าสามารถที่จะเตรียมยีนเครื่องหมายที่เหมาะสมได้หรือไม่ เพราะถ้าปราศจากยีนเครื่องหมายแล้ว ก็จะไม่สามารถทราบว่า มีฟิวแซนต์ (fusant) เกิดขึ้น และพิสูจน์ไม่ได้ว่าเซลล์เดิมได้กลายสภาพไปแล้ว

สำหรับไรโซเบียมนั้น มีผู้รายงานว่า การแยกยีนเครื่องหมายโดยการประยุกต์วิธีการที่ใช้ใน E. coli มาใช้ บางครั้งมีปัญหา เพราะไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่ขับเมือกมาหุ้มเซลล์ จึงทำให้เป็นอุปสรรคในการทำการพิมพ์แบบ รวมทั้งธรรมชาติของไรโซเบียมที่อาจมี redundant genes ในโครโมโซมเป็นจำนวนมาก ก็เป็นอุปสรรคอย่างหนึ่งในการแยกยีนเครื่องหมาย (Quinto, 1982) แต่ก็มีข้อได้เปรียบอยู่อย่างหนึ่ง คือ การที่สรีรวิทยาของไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตเร็วแตกต่างจากไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตช้า ดังนั้น ถ้าเลือกสรีรสภาพที่เหมาะสมก็จะสามารถประยุกต์ใช้เป็นยีนเครื่องหมายตามธรรมชาติ (natural gene marker) ได้ เช่น ความสามารถในการใช้ซูโครสของไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตเร็ว และความไม่สามารถในการใช้ซูโครสของไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตช้า นอกจากนี้ยังมีสมบัติที่แตกต่างกันอื่นๆ อีก ดังตารางที่ ก

ตารางที่ ก เปรียบเทียบสรีรสมบัติของไรโซเบียมกลุ่มเติบโตเร็วและไรโซเบียมกลุ่มเติบโตช้าบางสายพันธุ์

สรีรสมบัติ	ไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตเร็ว	ไรโซเบียมกลุ่มเจริญเติบโตช้า
1. การใช้ซูโครส	+	-
2. การใช้ซัคซิเนท	+	±
3. การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความแรงของอิออน 0.3 โมลาร์	+	-
4. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 °ซ	+	-
5. การผลิตกรดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน	+	-

\+ หมายถึง เจริญได้, ใช้ได้, ผลิตได้

\- หมายถึง เจริญไม่ได้, ใช้ไม่ได้, ผลิตไม่ได้

± หมายถึง เจริญหรือใช้ได้เพียงเล็กน้อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.1 <u>การแยกออกโซโทรปและมิวแทนต์อื่นๆ</u> นอกจากยีนเครื่องหมายตามธรรมชาติแล้ว ในกรณีที่จำนวนยีนเครื่องหมายไม่เพียงพอ อาจจะแยกยีนเครื่องหมายเพิ่มเติมได้ เช่น การแยกออกโซโทรปชนิดต่างๆ หรือการแยกมิวแทนต์ที่มีความผิดปกติในการใช้แหล่งคันตอคาร์บอนหรือไนโตรเจน โดยอาศัยการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลายพันธุ์ และการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้

6. <u>การทดสอบสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการสร้างสายพันธุ์ (Strain verification from strain construction)</u>

การรวมตัวของโครโมโซมโดยวิธีที่เรียกว่า โพรโทพลาสต์ฟิวชันนั้น เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนของกลุ่มโพลีนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสสอดคล้องกันเท่านั้น แต่ทว่าฟิวแซนต์ที่ได้จากการรวมกันนั้น อาจไม่เสถียร เนื่องจากกำลังของ compatibility ของสองสายพันธุ์ที่ต่างกัน ในกรณีดังกล่าว สมบัติของยีนเด่นและยีนด้อยอาจเกิดขึ้นได้ ทำให้มีโอกาสพบฟิวแซนต์ที่มีสมบัติคล้ายเซลล์หนึ่งมากกว่าอีกเซลล์หนึ่ง หากไม่นับสมบัติที่เกี่ยวกับ compatibility แล้ว การที่จะทดสอบว่าได้ฟิวแซนต์ (fusant) มีสมบัติคล้ายเซลล์เดิมสายพันธุ์ใดมากกว่า อาจทำได้ดังต่อไปนี้

6.1 <u>การแก้ไขยีนเครื่องหมายในอัตราที่ต่ำกว่า 10^{-5} ต่อเซลล์</u> โดยทั่วไป อัตราการหวลกลับของมิวแทนต์เป็นไวด์ไทพ์ (reversion frequency) โดยอาศัย spontaneous mutation จะเท่ากับ 10^{-5} ต่อเซลล์ ด้วยเหตุนี้ ถ้าหากมีการหวลกลับของยีนเครื่องหมายจำนวนสองยีน (double markers) พร้อมกัน โอกาสการหวลกลับด้วย spontaneous mutation ย่อมไม่มี เนื่องจากแบคทีเรียที่ขุนที่สุดมีจำนวนเพียง 10^{9} ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ไม่มากพอที่จะทำให้เกิดการการหวลกลับของยีนเครื่องหมายสองยีนได้ ด้วยเหตุนี้ การหวลกลับของยีนเครื่องหมายสองยีน จึงเป็นหลักฐานสนับสนุนขั้นที่หนึ่ง (primary support) ที่แสดงว่ามีรีคอมบิเนชันของโครโมโซม

6.2 <u>การเพิ่มเติมความสามารถในการใช้สารอาหาร</u> ทราบกันดีแล้วว่า การที่แบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล หรือสารต้นตอไนโตรเจนพื้นฐานบางชนิดสำหรับการเจริญนั้น อาจเป็นเพราะ (1) ไม่มียีนในโครโมโซมที่จะใช้สารอาหารนั้นๆ หรือ (2) เกิดการชักนำการถอดระหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสมนั้นๆ ดังนั้น ถ้าหากเซลล์ที่ได้แสดงสมบัติการเปลี่ยนแปลงคาร์บอนหรือไนโตรเจนเมตาบอลิสม จากที่เคยแสดงตามธรรมชาติเดิม ย่อมเป็น

หลักฐานสนับสนุนขั้นที่สอง (secondary support) ที่แสดงว่ามีการรีคอมบิเนชันของโครโมโซมระหว่างเซลล์สองสายพันธุ์

6.3 <u>การแปรรูปการจดจำที่ผิวเซลล์</u> โดยทั่วไป สมบัติของ antigenic determinant ของผิวเซลล์นั้น จะขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อเซลล์ชั้นนอก ซึ่งมีจำนวนมากมายหลายชนิด ตามหลักการ การแปรสูตรอาหารจะส่งผลกระทบต่อโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อเซลล์ชั้นนอกเพียงบางชนิด จึงทำให้ antigenic intensity ลดกำลังลง แต่ก็ยังคงรักษาความจำเพาะระหว่างแอนทิเจนกับแอนทิบอดีเดิมไว้

แต่ถ้าในกรณีที่ความจำเพาะระหว่างแอนทิเจนกับแอนทิบอดี ต่างจากเดิมโดยสิ้นเชิงนั้น จะเป็นหลักฐานที่สนับสนุนขั้นที่หนึ่ง (primary support) ที่แสดงว่า มีรีคอมบิเนชันระหว่างโครโมโซมเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง สมบัตินี้จะสัมพันธ์กับสมบัติการเปลี่ยนแปลงการใช้สารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตอีกด้วย

6.4 <u>การแปรเปลี่ยนสมบัติทางชีวเคมีบางอย่าง</u> โดยทั่วไป โครโมโซมของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีพิสัยขององค์ประกอบของ GC แน่นอน โดยเฉพาะในไรโซเบียมนั้น มีผู้รายงานว่า ไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตช้า จะมีองค์ประกอบ GC ในช่วง 61.5-65.5 เปอร์เซ็นต์ และไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตเร็ว จะมีองค์ประกอบ GC ในช่วง 59.1-63.1 เปอร์เซ็นต์ (Vincent, 1977) ถ้าสมบัติองค์ประกอบ GC แปรผกผันกับสรีรวิทยาการเจริญ จะเป็นหลักฐานสนับสนุนขั้นที่สอง (secondary support) ที่แสดงว่ามีการรีคอมบิเนชันระหว่างโครโมโซม นอกจากนี้ไรโซเบียมยังประกอบด้วย redundant genes จำนวนหนึ่ง จึงเป็นข้อที่จะถามว่ารูปแบบของโครโมโซมที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (restriction patterns) จะเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแสดงบอกสายพันธุ์ (strain identification) ได้หรือไม่ ถ้าทำได้ การแปรผกผันของรูปแบบของโครโมโซมที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ และสรีรวิทยาการเจริญจะเป็นหลักฐานสนับสนุนขั้นที่สองเช่นเดียวกัน

ในทำนองเดียวกัน การวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ต่างๆ เช่น การพบแอคทิวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทส ในไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตช้า หรือการหายไปของแอคทิวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตเร็ว เมื่อเจริญในอาหารที่มีไดแซคคาไรด์ การพบแอคทิวิตีของเอนไซม์ดี-แมนนิทอล ดีไฮโดรจีเนสสูง พร้อมๆ กับมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูง เป็นต้น ซึ่งสมบัติที่ยกตัวอย่างมานี้ เป็นการเกิดโดยการแปรผกผันของแอคทิวิตีของเอนไซม์กับสรีรวิทยาของ

สายพันธุ์เดิม ก็สามารถใช้เป็นหลักฐานสนับสนุนขั้นที่สองได้เช่นกัน

6.5 การสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว

6.5.1 ความจำเพาะของไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว (Halverson and Stacey, 1986) อาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่สามารถสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วอยู่ในสกุลไรโซเบียม การอยู่ร่วมกันระหว่างพืชตระกูลถั่วกับไรโซเบียม เกิดได้เนื่องจากมีการแลกเปลี่ยนโมเลกุลสารที่ใช้ติดต่อกันระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว และไรโซเบียมจะเข้าสู่รากและสร้างปมกับพืชจำเพาะ การที่ไรโซเบียมสามารถจดจำและเกาะติดกับรากพืชจำเพาะได้ เนื่องจากพืชดังกล่าวจะหลั่งสารที่ชื่อว่าเลกตินไปเกาะที่ผิวรอบนอกเซลล์ของรากพืช และผิวเซลล์ด้านนอกของไรโซเบียม ซึ่งประกอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ จะจับกับเลกตินที่มีโครงสร้างที่เหมาะสมที่สุด ความจำเพาะระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วเป็นสมบัติพื้นฐานที่ในการแบ่งกลุ่มไรโซเบียมได้

หลังจากที่ไรโซเบียมเข้าสู่รากพืช จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างพร้อมทั้งเพิ่มจำนวนเป็นแบคทีรอยด์ ซึ่งสามารถเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศเป็นอัมโมเนีย และส่งให้พืชเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้

6.5.2 พันธุกรรมที่เกี่ยวกับการสร้างปม (genetic of nodulation) โดยทั่วไปโอเปอรอนที่ควบคุมการสร้างปม (nodulation genes, nod) นั้นเป็นยีนที่มีการทำงานร่วมกันซ้ำซ้อน เช่นเดียวกับโอเปอรอนที่ควบคุมการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation operons, nif) และไรโซเบียมมี nif และ nod บางยีนอยู่บนพลาสมิดที่เรียกว่า Sym plasmid ถึงแม้ว่าไรโซเบียมบางสายพันธุ์จะมี Sym plasmid เพียงหนึ่งในจำนวนพลาสมิดหลายๆ พลาสมิดก็ตาม พลาสมิดชนิดนี้อาจจะแตกต่างกันในไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ ที่เห็นได้ชัดก็คือ ขนาดของพลาสมิดชนิดนี้จะแตกต่างกันออกไป

มีหลักฐานยืนยันว่า nod เป็นเพียงชิ้นส่วนเล็กน้อยของ Sym plasmid การพบมิวแทนต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างปม (Nod-) มีจำนวนน้อยกว่ามาก เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน การพบว่าไรโซเบียมที่เป็น Nod- ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการม้วนตัวของรากพืชได้ ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ Sym plasmid จะไม่สามารถทำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตาม ยังมียีนส่วนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างปมอีก คือ หลักฐานการพบมิวแทนต์ชนิดออกโซโทรป ไม่สามารถสร้างปมได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งบ่งชี้ว่า nod บางยีนอยู่บนโครโมโซมที่ทำหน้าที่ในการพัฒนาปมให้เจริญขึ้น นอกจากนี้ยังมีข้อยืนยันบางอย่างว่า

nod เป็นยีนคนละตำแหน่งกับ nif ก็คือ การพบมิวแทนต์ของ R. meliloti ที่ได้รับ nif ของ K. pneumoniae สามารถสร้างปมได้ แต่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน (Noel, 1984)

จากปรากฏการณ์ข้างต้นสรุปได้ว่า การทำงานของ nod และ nif เป็นอิสระจากกันโดยสิ้นเชิง แต่กระบวนการตรึงไนโตรเจนแบบอยู่ร่วมกันระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วจะประสบผลสำเร็จได้นั้น จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง nod และ nif

7. วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้

7.1 ศึกษาความแตกต่างทางสรีรสมบัติในการทนเค็มของไรโซเบียมชนิดเจริญเติบโตเร็ว

7.2 ศึกษาสภาวะการสร้างและหลอมโพรโทพลาสต์จาก Rhizobium sp. TAL 141 และ Rhizobium fredii USDA 192

7.3 ทดสอบสมบัติบางประการ เพื่อแสดงว่ามีโพรโทพลาสต์เกิดขึ้นจริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016476