บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

1. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลกับค่าความเข้มการดูดแสง

การที่พบว่าจำนวนเซลจากการนับ (4.0×10^7 - 3.0×10^{10} เซลต่อมิลลิลิตร) กับค่าความเข้มของการดูดแสง (0.49 - 1.00 หน่วย OD 500) เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อกันนั้น อาจเป็นเพราะ แบคทีเรียในระยะเริ่มแบ่งตัวยังมิได้ขับเมือก แต่พอล่วงเลยวันที่ 8 ซึ่งเป็นช่วงที่เซลเริ่มเข้าสู่ระยะเซลคงตัว (Stationary phase) ซึ่งเป็นช่วงที่เซลเริ่มมีปริมาณคงที่หรือเริ่มลดลงนั้นความเข้มของการดูดแสงกลับเพิ่มสูงขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าในช่วงนี้เซลมีการขับเมือกออกมามากจึงเข้ามารบกวนการดูดแสง และเมื่อนำเซลในช่วงนี้มาทำให้เจือจางพบว่าค่าความเข้มของการดูดแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างมากมาย อาจทำให้เข้าใจผิดได้ว่าเซลในช่วงนี้มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอีก ทั้ง ๆ ที่จริงแล้วเป็นช่วงที่เซลไม่มีการเจริญเติบโตเลย ดังนั้นในการทดลองต่อไปนี้จึงใช้ค่าความเข้มการดูดแสงในช่วง 8 วันแรกซึ่งมีค่าประมาณ 1.00 หน่วย OD 500 เป็นมาตรฐานในการศึกษาการเจริญเติบโตของไรโซเบียมต่อไป

2. ลักษณะการเจริญเติบโตของไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 เมื่อใช้สารต่าง ๆ เป็นต้นตอคาร์บอน

การที่พบว่าไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 นี้สามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอล กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ในอาหารสูตรปรับต่ำ แสดงว่าโครโมโซมของมันประกอบด้วยยีนซึ่งสามารถถอดรหัสได้เป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เมตาบอไลท์และสิ่งจำเป็นทุกอย่างได้เอง และการที่มันเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำได้ดีกว่าในอาหารสูตรอุดมนั้น เปรียบเทียบค่าเพิ่มตัวเป็นสองเท่าในน้ำตาลเหล่านั้น คือในอาหารสูตรปรับต่ำ แมนนิทอล กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสมีค่าเท่ากับ 12, 16, 17, และ 14 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนในอาหารสูตรอุดมมีค่าเท่ากับ 24, 28, 16 และ 28 ชั่วโมงตามลำดับ) อาจเป็นเพราะว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้ออุดมมีโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งอาจ

ไปหน่วยงานเหนี่ยวการเจริญเติบโตของไรโซเ ม (Upchurch, R.G., and Elkan, G.H. 1977) และผงสกัดจากยีสต์อาจทำให้เกิดการผิดปกติ (distortion) ของเซลได้ (Skinner, F.A.; Roughley, R.J.,; and Chandler, M.R. 1977) ซึ่งการที่ยัคซิเนทเป็นสารต้นตอคาร์บอนที่ให้การเจริญเติบโตได้น้อยมากในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองอาจมีสาเหตุเนื่องจากยัคซิเนทที่มีความเข้มข้นสูง (40 มิลลิโมลาร์ หรือประมาณ 10 กรัมต่อลิตร) ทำให้มีการเกาะกลุ่มของเซล ซึ่งสามารถต้านทานการเจริญเติบโตของเซลเกาะกลุ่มนี้จะต่างจากการเกาะกลุ่มแบบ 'classical star' ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทั่ว ๆ ไป โดยเกิดจากสาเหตุใดยังไม่ทราบ (Wilcockson, J., and Werner, D. 1978)

3. <u>สภาวะที่เหมาะสมของการรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 ในสภาพจุลินทรีย์อิสระ</u>

3.1 ผลของการปรับบรรยากาศออกซิเจน

ดังได้กล่าวไว้แล้วว่าออกซิเจนสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ และการยับยั้งนี้เป็นแบบไม่หวนกลับ (uncompetitive inhibition) นั่นย่อมแสดงการทำงานของเอ็นไซม์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถหวนกลับมาทำงานได้อีก ถึงแม้จะขจัดออกซิเจนออกแล้วก็ตาม (Zumft, W.G., and Mortenson, L.E. 1975, Sprent, J.I. 1979) สำหรับไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 ซึ่งเป็น semiaerophilic bacteria ซึ่งจะเจริญเติบโตได้เมื่อมีออกซิเจนอยู่จำนวนหนึ่งด้วย ด้วยเหตุนี้จึงพบว่า การปรับบรรยากาศของออกซิเจนทุกวัน (0.76 มิลลิเมตรปรอท) เป็นค่าพอเหมาะที่ไรโซเบียมสามารถเจริญเติบโตและถอดรหัสของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้พร้อม ๆ กัน (Vincent, J.M. 1977, Keister, D.L., and Evans, W.R. 1976) ส่วนความดันบรรยากาศที่มากไปกว่านี้ (1.2 และ 1.6 มิลลิเมตรปรอท) แม้ว่าจะไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของมันแต่ก็ให้ผลกระทบต่อการควบคุมการกดดันการถอดรหัสของเอ็นไซม์ตัวนี้มาก (พบค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่ 1.2 มิลลิเมตรปรอท เท่ากับ 36 นาโนโมลต่อขวดทดลอง และ 1.6 มิลลิเมตรปรอทเท่ากับ 22 นาโนโมลต่อขวดทดลอง)

ตรงกันข้ามถ้ามิได้ปรับบรรยากาศอีกเลยในการบ่มตัวของไรโซเบียมในวันถัด ๆ มานั้น ทำให้ค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดปรากฏที่ความดัน 1.6 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าออกซิเจนที่ใส่ลงไปเพื่อปรับบรรยากาศครั้งแรกนั้นคงถูกใช้ไปเรื่อย ๆ จนถึงความดันที่เหมาะสมจึงทำให้เกิดการถอดรหัสของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ สำหรับกรณีที่ปรับบรรยากาศให้คงที่โดยใช้อาร์กอนเข้าแทนบรรยากาศที่นำออกไปวิเคราะห์ปริมาณนั้นพบว่า แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนค่อนข้างต่ำ เรื่องนี้อาจอธิบายได้เป็นสองกรณีคือ หนึ่ง มีออกซิเจนแปดเปื้อนในอาร์กอน หรือสอง เพราะสัดส่วนบรรยากาศภายในขวดนั้นไม่เหมาะสมที่จะทำให้เอ็นไซม์ไนโตรจีเนสทำงานได้

3.2 ผลของแหล่งต้นตอไนโตรเจน

การที่พบว่าปริมาณของแอมโมเนียมที่เพิ่มขึ้นมีผลกระทำทำให้แอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสลดลงนั้นเป็นปรากฏการณ์ที่สอดคล้องกับปรากฏการณ์ที่พบในแบคทีเรียอิสระทั่วไป (Parejko, R.A.,and Wilson, P.W. 1970, Pankhurst, C.E. and Craig, A.S, 1978) แต่ที่น่าสังเกตในกรณีของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ก็คือ การถอดรหัสเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสของมันเกิดขึ้นได้ต้องมีสารต้นตอไนโตรเจนอยู่ในสารอาหารด้วย ในแบคทีเรียอิสระทั่วไปจะถอดรหัสเป็นเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้แม้ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจนอย่างสิ้นเชิง โดยทั่วไป สารประกอบไนโตรเจนที่เสริมลงในอาหารจะมีอิทธิพลต่อการควบคุมการถอดรหัสของเอ็นไซม์ตัวนี้ต่างกัน ดังจะเห็นได้ว่าไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 นี้ใช้กลูตาเมทเป็นสารต้นตอไนโตรเจน จะให้ค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมเป็นสารต้นตอไนโตรเจน (ใช้กลูตาเมทให้ค่า 35 นาโนโมลต่อขวดทดลอง ส่วนแอมโมเนียมให้ค่า 7 นาโนโมลต่อขวดทดลอง) ปรากฏการณ์นี้ตรงกันข้ามกับที่พบในไรโซเบียม จาโปนิคัม 61 เอ 76 ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนในสภาพอิสระได้ดีที่สุดเมื่อใช้แอมโมเนียมเป็นต้นตอไนโตรเจน (Kurz, W.G.W., and LaRue, T.A. 1975)

3.3 ผลของอุณหภูมิ

ที่ 25°ซ พบว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่จะชักนำการตรึงไนโตรเจนได้ ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนจะลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับการถูกกระทบกับอุณหภูมิในแบคทีเรียทั่ว ๆ ไป (Pankhurst, C.E.,and Craig, A.S., 1978)

และที่พบว่าไรโซเบียมจะเจริญได้ดีในช่วง 25 - 32 ° ซ นั้นก็นับเป็นลักษณะการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับที่พบในไรโซเบียม กลุ่มเจริญเติบโตช้าสายพันธุ์อื่น ๆ

3.4 ผลของพีเอช

โดยทั่วไปแล้วการเจริญเติบโตของไรโซเบียมส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงพีเอช 5.5 - 7.5 (Vincent, J.M. 1977) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้คือพีเอช 6.8 การที่ไรโซ-เบียม จาโปนิคัม 122 สามารถเจริญเติบโตดีพอสมควรในพีเอช 10 นี้อาจอธิบายได้ว่า ในสภาพที่เซลเจริญเติบโตในภาวะปกติผลิตผลที่ไรโซเบียม จาโปนิคัมขับออกสู่สิ่งแวดล้อมคือ ไฮดรอกไซด์-อิออนอินโดลอะซีติดแอซิด (indole acetic acid) จำนวนเล็กน้อย และเมื่อกรดซึ่งเป็นสารพวกกลูแคนเมื่อพิจารณาแล้วตัวการที่มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงของพีเอชคือ ไฮดรอกไซด์อิออน การที่มันสามารถเจริญได้พอสมควรในพีเอช 10 นี้ก็แสดงว่ามันเคยชินกับสภาพแวดล้อมนี้จึงอาจจะเจริญเติบโตได้ ในทางกลับกันในพีเอชที่เป็นกรดเช่นพีเอช 4 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากไรโซเบียมไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับพีเอชนี้ได้นั่นเอง สำหรับการรีดิวซ์อะเซทีลีนนั้น กิบสันและคณะ (Gibson et al. 1976) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดจะมีผลทำให้แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนมีค่าลดลง ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกันคือที่พีเอช 6.8 มีการเจริญเติบโตสูงสุดจึงควรมีแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดด้วย

3.5 ผลของแหล่งต้นตอคาร์บอน

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปแล้วว่าสารต้นตอคาร์บอนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ไม่เท่ากันในแต่ละชนิดของไรโซเบียม แต่สามารถทำให้เจริญเติบโตได้ (Pagan et al. 1975, Kurz, W.G.W.,and LaRue, T.A. 1975) การที่พบว่าแมนนิทอลหรือแมนนิทอลกับกลูโคเนทนั้นมีแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดนั้นอาจเป็นเพราะแมนนิทอลนี้สามารถเหนี่ยวนำให้มีการถอดรหัสของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส และถ้ามีกลูโคเนทอยู่ด้วยอาจทำให้การเหนี่ยวนำนี้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น แต่กลไกที่แท้จริงนั้นยังไม่มีผู้ใดทราบ ซึ่งเหตุการณ์นี้สามารถสนับสนุนได้จากการเจริญเติบโตของไรโซเบียมในที่มีสารต้นตอคาร์บอนชนิดต่าง ๆ จากผลการทดลองนี้พบว่าไรโซ-เบียมเจริญเติบโตได้ดีในเกือบทุกสารต้นตอคาร์บอน แสดงว่าพลังงานย่อมมีเพียงพอในการป้อน

ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน แต่การที่พบว่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนมีค่าต่างกันนั้นย่อมแสดงว่ามียีดจำกัดอยู่ที่เอ็นไซม์ไนโตรจีเนส สำหรับกลีเซอรอลนั้นพบว่าเจริญได้น้อยกว่าสารต้นตอคาร์บอนอื่น ๆ อาจเป็นเพราะเอ็นไซม์ที่ใช้เพื่อเปลี่ยนแปลงให้เข้าสู่วิถีเอ็นท์เนอร์ดูโดรอฟฟ์ย่อนประสิทธิภาพ จึงทำให้การเจริญเติบโตช้าลง

จะเห็นได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียมต่างสายพันธุ์กันจะมีความแตกต่างกัน

4. การเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองเมื่อคลุกและมิได้คลุกด้วยไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 ในห้องทดลอง

รูปแบบการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 ที่พบนี้สอดคล้องกับการทดลองในภาคสนามที่รายงานไว้โดยอำนวย มานิตย์ (2520) โดยทั่วไปถั่วเหลืองอาจถูกโรคราสนิม (soybean rust) หรือราน้ำค้าง (downey mildew) บุกรุกได้ แต่จะเห็นได้ว่าตลอดเวลา 12 สัปดาห์ของการปลูกนั้นไม่พบว่ามีโรคแทรกเลย น่าจะสนับสนุนการรายงานของกรมวิชาการเกษตรที่ว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 นี้เป็นพันธุ์ที่ดีเหมาะสำหรับเผยแพร่สู่ประชาชน คุณสมบัติที่ดีอีกประการหนึ่งก็คือถั่วพันธุ์นี้มีความทนทานต่อความแห้งแล้ง และสามารถขึ้นได้ดีในดินเกือบทุกชนิด

แม้จะพบว่าการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อเป็นรูปแบบเดียวกันแต่ขนาดของต้นก็ดี ลักษณะของฝักก็ดี จากต้นที่คลุกเชื้อจะสมบูรณ์กว่าต้นไม่คลุกเชื้อ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก ถั่วเหลืองที่คลุกเชื้อนี้มีการตรึงไนโตรเจนอยู่ที่รากช่วยส่งแอมโมเนียมให้กับพืชเพราะในภาวะที่ทดลองนั้นปลอดจากสารต้นตอไนโตรเจนนั่นเอง

4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง กับการเจริญเติบโตของต้นถั่วที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อไรโซเบียม

ในการปลูกต้นถั่วในภาวะที่ควบคุมเมื่อคลุกและไม่คลุกเชื้อนั้น ในระยะเวลาปลูก 2 สัปดาห์ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างต้นที่คลุกและไม่คลุกเชื้อ ที่เป็นดังนี้อาจอนุมานได้ว่า ระยะนี้เป็นระยะที่ต้นถั่วเจริญเติบโตโดยอาศัยสารต้นตอไนโตรเจนที่มีอยู่ในเมล็ดถั่ว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รวมทั้งอาจหมายความว่าเป็นระยะที่ไรโซเบียมปรับตัวเองจากแบคทีเรียเป็นแบคทีรอยด์ก็ได้ ครั้นเมื่อย่างเข้าสัปดาห์ที่ 4 ความแตกต่างของทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นระหว่างต้นที่คลุกและไม่คลุกเชื้อเริ่มเห็นเด่นชัดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งก็น่าจะหมายความว่าแบคทีรอยด์ซึ่งอยู่ร่วมกับรากถั่วนั้นได้ให้ผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองแล้ว จากระยะนี้ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 นั้นอัตราความแตกต่างของน้ำหนักสดหรือน้ำหนักแห้งระหว่างต้นที่คลุกและไม่คลุกเชื้อยังคงสม่ำเสมอตลอด ก็อาจหมายความว่าการอยู่ร่วมกันระหว่างต้นถั่วกับแบคทีรอยด์อยู่ในสภาพสมดุลย์ เลยช่วงเวลานี้ไปแล้วอัตราความแตกต่างของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งระหว่างแบคทีรอยด์กับรากต้นถั่วอาจเสียสมดุลย์ไป เพราะในช่วงนี้ รัฐจักรของต้นถั่วเริ่มเข้าสู่ระยะต้นแก่ การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดหรือน้ำหนักแห้งของต้น จึงอาจมีผลกระทบมาจากปัจจัยหลาย ๆ รูปแบบ

น่าสังเกตว่าข้อเปรียบเทียบดังกล่าวนี้อยู่ในรูปแบบเดียวกัน ถ้าหากเปรียบเทียบน้ำหนักสดหรือน้ำหนักแห้งของรากจากต้นที่คลุกและไม่คลุกเชื้อแทน หรืออาจจะกล่าวได้ว่าผลกระทบจากแบคทีรอยด์ที่มีต่อต้นถั่วนั้นน่าจะสม่ำเสมอทั่วทั้งต้น

4.3 สภาวะที่เหมาะสมของการรีดิวซ์อะเซทีลีนจากปมรากถั่ว

การที่พบว่าอะเซทีลีน 10 เปอร์เซ็นต์เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่จะทำให้แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่พบในรากปมถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 สูงสุดนั้น เป็นปรากฏการณ์ที่พบในถั่วเหลืองทั่ว ๆ ไป และที่พบว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมคือ 20 เปอร์เซ็นต์มากหรือน้อยกว่านี้จะทำให้แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนลดต่ำลง เนื่องจากออกซิเจนที่มากเกินไปสามารถทำลายเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่รายงานจากโคส, อีแวนส์, คริสเวลล์และคณะ (Koch, B., and Evans, H.J. 1966, Criswell et al. 1976) เมื่อทดลองแยกปมจากรากของถั่วเหลืองพบว่ามีอัตราการรีดิวซ์อะเซทีลีนต่ำกว่ารากทั้งหมดที่มีปมอยู่ตลอดเวลาการบ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจากการขาดสารอาหารที่จะได้รับจากการสังเคราะห์แสงหรือเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสของปมสัมผัสกับกาซออกซิเจนเกิดการเสื่อมคุณภาพ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับรายงานของฮาร์ดีและคณะและเบอร์เกอเสน (Hardy et al. 1968, Bergersen, F.J. 1970) อัตราการตรึงไนโตรเจนของรากที่มีปมอยู่และปมอย่างเดียวของรากถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 นี้จะเป็นเส้นตรงตลอดระยะเวลา 3 ชั่วโมง

แต่โคล์ อีแวนส์ (Koch, B. and Evans, H.J. 1968) รายงานว่าถั่วเหลืองพันธุ์ชิพีว่า (Chipewa) จะให้ค่าเป็นเส้นตรงในระยะเวลา 1 ชั่วโมง และสโลเจอร์ (Sloger, C. 1969) รายงานว่าถั่วเหลืองอิมพรูพเพลิแคน (Improve Pelican) จะให้ค่าเป็นเส้นตรงภายใน 4 ชั่วโมงทั้งนี้โดยมีสภาวะต่าง ๆ เช่นการเก็บปม การปลูก ระยะเวลาในการปลูกรวมทั้งวิธีการวัดการรีดิวซ์อะเซทีลีนคล้ายคลึงกัน สิ่งเหล่านี้ล้วนแสดงว่าถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์มีระยะเวลาในการทำงานของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสไม่เท่ากัน ในการทดลองนี้จึงดัดแปลงวิธีของฮาร์ดี และคณะ (Hardy et al. 1968) โดยเลือกใช้ตัวอย่างของรากพืชทั้งหมดที่มีปมติดอยู่มาหาแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนโดยใส่ออกซิเจน 20 เปอร์เซ็นต์ในบรรยากาศของกาซที่ใช้อินคิวเบท เพราะให้ค่าการตรึงไนโตรเจนสูงสุด

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสด จำนวนปม น้ำหนักปม กับการรีดิวซ์อะเซทีลีน

จากผลการทดลองพบว่าน้ำหนักสด จำนวนปม น้ำหนักปมจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนในช่วง 6 สัปดาห์แรกที่ศึกษา ปรากฏการณ์เช่นนี้ก็สอดคล้องกับรายงานจากต้นถั่วอัลฟัลฟา (Duhigg, P,; Melton, B,; and Baltensperger, A. 1978) การที่พบเช่นนี้อาจหมายความว่าแบคทีรอยด์ที่อยู่ร่วมกับรากถั่วได้ตรึงไนโตรเจนแล้วส่งอนุมูลแอมโมเนียมให้กับต้นถั่วเพื่อใช้เจริญเติบโต ขณะเดียวกันถั่วก็ส่งสารตันตอบให้แบคทีรอยด์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างจำนวนปมให้มากขึ้น ซึ่งเหตุการณ์นี้อาจได้รับการสนับสนุนจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายซึ่งพบว่าจะมีค่าสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในขณะที่มีการตรึงไนโตรเจนสูง เหตุการณ์ทำนองเดียวกันนี้จะกลับกันในต้นถั่วที่ไม่ได้ลูกเชื้อ แสดงว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ต้นถั่วไม่ได้ลูกเชื้อได้รับนั้นมาจากทรายซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัด แต่ในช่วง 6 สัปดาห์หลังพบว่าน้ำหนักสด จำนวนปม และน้ำหนักปมไม่มีความสัมพันธ์ กับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน กล่าวคือในขณะที่น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 11 และลดลงในสัปดาห์ที่ 12 เช่นเดียวกันจำนวนปมและน้ำหนักปมจะเพิ่มขึ้นถึงสัปดาห์ที่ 7 และจะลดลงเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 8 - 12 แต่แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป ขณะเดียวกันปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายก็ลดลงด้วย นั่นย่อมแสดงว่าการเจริญเติบโตในช่วงนี้เกิดจากการตรึงไนโตรเจนรวมกับการนำปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายไปใช้ การที่แอคติวิตี้จำเพาะ

การรีดิวซ์อะเซทีลีนลดลงอย่างรวดเร็วนั้น อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากต้นถั่วในระยะนี้เป็นระยะที่มีการออกดอกและติดฝัก จึงเป็นช่วงที่ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมไว้ในใบ (Allen, O.N. 1973) ได้ส่งไปยังส่วนที่เป็นดอกและฝักทำให้ส่วนที่ถูกส่งไปยังปมรากลดลง (Lawn, R.J., and Burns, W.A. 1974) ฮาร์ดี, ฮาเวลกา และโฮลส์เตน (Hardy, R.W.F.; Havelka, V.D.; and Holsten, R.D. 1972) พบว่าปริมาณของคาร์โบไฮเดรตเป็นปัจจัยกำหนดประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจน กล่าวคือปริมาณการตรึงไนโตรเจนจะลดลงเมื่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลง นอกจากนี้เพท (Pate, J.S. 1958) พบว่าการตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นอีกเมื่อตัดเอาส่วนของตาดอกและฝักทิ้งไป จะเห็นได้ว่าลักษณะที่สนับสนุนเหตุการณ์เหล่านี้คือการเจริญของต้นถั่ว พบว่าถั่วจะเริ่มติดปมในสัปดาห์ที่ 6 และใบถั่วจะเริ่มเหลืองในสัปดาห์ที่ 7 จึงแสดงว่าการสังเคราะห์แสงในช่วงนี้จะมีน้อยลง อย่างไรก็ตามสเปรนท์ (Sprent, J.I. 1979) พบว่าสาเหตุใหญ่ที่ทำให้การตรึงไนโตรเจนลดลงคือความแก่ของปม (nodule senescence) ซึ่งเกิดจากสาเหตุใดยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สาเหตุหนึ่งที่อาจทำให้เกิดความแก่ของปมคือปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินที่เพิ่มสูงขึ้น และยังพบว่าเป็นตัวกดการสร้างปมด้วย (Chen, P.C. and Philips, D.A. 1977) ดังนั้นเมื่อพิจารณาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทราย พบว่าในสัปดาห์ที่ 6 จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายสูงมาก จึงอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายจำนวนนี้ได้เร่งความแก่ของปมแล้ว จึงเป็นเหตุให้การตรึงไนโตรเจนลดลง

5. <u>การเคลื่อนนีฟพลาสมิดจากเอสเคอริเคีย โคไล เข้าไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 โดยวิธีคอนจูเกชัน</u>

เคลบเซียลลา นิวโมนิอี เป็นแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้เมื่อปราศจากกาซออกซิเจน และเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้นตอไนโตรเจนจำกัด ค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนที่วัดได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในสภาพปลดปล่อยการถอดรหัสของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส และไม่เสริมด้วยต้นตอไนโตรเจนมีค่าประมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง (Dixon, R.A., and Postgate, J.R. 1971) เมื่อดิกสันและโพสเกท (Dixon, R.A., and Postgate, J.R. 1972) ได้ตัดยีนเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสเข้าไปต่อกับพีพลาสมิดอาร์พี 4

(P plasmid RP4) แล้วเคลื่อนเข้าไปสู่เอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 แล้วให้ชื่อพลาสมิดใหม่นี้ว่าพีอาร์ตี 1 จากผลการทดลองพบว่าค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะลดลงมาเล็กน้อยคือประมาณ 0.85 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมงซึ่งพบในการทดลองนี้

เนื่องจากค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสที่ได้จากเอสเคอริเคีย โคไล นี้มีค่าค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับค่าที่ได้รับจากไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 (33 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อวัน) ด้วยเหตุนี้จึงน่าสนใจที่จะลองเคลื่อนพีอาร์ตี 1 ซึ่งมียีนที่ถอดรหัสเป็นเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสต่ออยู่ด้วยไปให้ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ทั้งนี้เพราะเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ตี 1) และไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ต่างก็เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รวมทั้งพลาสมิดพีอาร์ตี 1 มีขอบเขตของเซลเจ้าเรือนกว้าง (wide host range).

คอนจูแกนท์ที่ได้ซึ่งเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ (สูตรอาหารที่ 3.3) ที่เสริมด้วยคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินน่าจะเป็นตรรชนีชี้ว่าเป็นเซลที่มีพลาสมิดเคลื่อนเข้ามาอยู่ด้วย และนอกจากสามารถในการต้านยาปฏิชีวินะที่พบทันทีในไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 แล้วการแบ่งตัวในอาหารสูตรปรับต่ำยังช้ากว่าไวลด์ไทพ์อีกด้วยซึ่งก็น่าจะเป็นเครื่องสนับสนุนอีกด้วยว่าเกิดความแตกต่างของการใช้พลังงานระหว่างคอนจูแกนท์กับไวลด์ไทพ์อย่างแน่นอน จากการที่คอนจูแกนท์สามารถต้านยาทั้งสามซึ่งเป็นฟีโนไทพ์ที่ปรากฏในไรโซเบียมนั้น คอนจูแกนท์ย่อมสูญเสียพลังงานเพื่อรักษาพลาสมิดรวมทั้งการถอดและแปรรหัสของยีนบางส่วนของพลาสมิดอีกด้วย เหตุการณ์นี้ก็สอดคล้องกับลักษณะของพลาสมิดที่พบในแบคทีเรียทั่ว ๆ ไป

เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของคอนจูแกนท์ที่แยกได้กับค่าที่พบจากไวลด์ไทพ์ในสภาพจุลินทรีย์อิสระที่เหมาะสม (ตามที่รายงานจากบทที่3 ข้อ 3) ผลปรากฏว่าค่าเหล่านั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น่าจะหมายความว่าพลาสมิดพีอาร์ตี 1 ที่เคลื่อนเข้าไปนั้นแม้ว่าจะยังคงรักษาสภาพของพลาสมิดอยู่ได้ แต่ก็คงมิได้ถอดรหัสของยีนส่วนที่เป็นเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสออกมา เหตุการณ์นี้ปรากฏเช่นเดียวกับที่พบในไรโซเบียม เมลิโลไตซึ่งเป็นไรโซเบียมสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็ว (Dixon, R.A.; Cannon, F.C.; and Kondorosi, A. 1976)

เนื่องจากสภาพการปลดปล่อยการถอดรหัสของเอ็นไซม์ไนโตรเจนนีเนสในไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 นั้นต้องการปริมาณออกซิเจนค่อนข้างต่ำจึงเป็นไปได้ว่าการจำกัดปริมาณของออกซิเจนเท่ากับเป็นข้อจำกัดการสร้างพลังงานต่อหน่วยเวลาด้วย ด้วยเหตุนี้จึงน่าจะตั้งสมมติฐานว่าในสภาพที่คอนจูแกนท์นี้อยู่ร่วมกับรากถั่วหรือเมื่อเป็นแบคทีรอยด์นั้น อาจมีโอกาสได้พลังงานสูงกว่าในสภาพที่เป็นแบคทีเรียอิสระ และในสภาวะเช่นนั้นอาจเอื้ออำนวยการปลดปล่อยการถอดรหัสของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสจากพลาสมิดพีอาร์ดี 1 ได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้ใช้คอนจูแกนท์ที่แยกได้เป็นตัวทดสอบการสร้างปมกับต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4

จากการใช้สภาวะที่ได้ศึกษามาแล้ว (รายงานไว้ในบทที่ 3 ข้อ 4) มาปรับใช้ ผลการทดลองพบว่า สัปดาห์ที่ 4 ซึ่งเป็นสัปดาห์ที่คุณลักษณะต่าง ๆ (เช่น น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของต้นและราก จำนวนปม น้ำหนักปม ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และปริมาณโปรตีนทั้งหมด) ของถั่วที่คลุกเชื้อจะต่างจากที่ไม่คลุกเชื้อแบบมีนัยสำคัญ เหตุการณ์เหล่านี้ก็พบซ้ำอีกเมื่อทดลองกับคอนจูแกนท์ทั้ง 10 ตัว แต่เมื่อนำค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่สังเกตได้จากไวลด์ไทพ์มาเปรียบเทียบกับค่าที่สังเกตได้จากคอนจูแกนท์แล้ว พบว่าค่าส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกัน (เช่น น้ำหนักสด จำนวนปม) ยกเว้นค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของคอนจูแกนท์บางตัวมีค่าสูงกว่าไวลด์ไทพ์เล็กน้อย (ผลเปรียบเทียบภาวะเดียวกัน) แต่ความแตกต่างกลับเห็นได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 5 กล่าวคือแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของคอนจูแกนท์จะสูงกว่าไวลด์ไทพ์ เหตุที่เป็นดังนี้อาจเป็นเพราะว่าในสัปดาห์ที่ 5 แบคทีรอยด์ได้รับต้นตอพลังงานหรือสารประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นในการเจริญเติบโตมากกว่าสัปดาห์ที่ 4 (สังเกตจากต้นถั่วจะสมบูรณ์ที่สุดในสัปดาห์ที่ 5) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของน้ำหนักสดระหว่างต้นที่คลุกด้วยไวลด์ไทพ์และคอนจูแกนท์แล้ว ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างไร อาจประเมินเหตุการณ์ที่ได้นี้เป็นสองกรณีคือ กรณีแรก การตรึงไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นในแบคทีรอยด์ ไม่ให้ผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการเจริญเติบโตของต้นถั่ว ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้พบว่าเป็นจริงเมื่อเคลื่อนนีฟพลาสมิดชนิดเดียวกันลงในเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลคี (Enterobacter cloacae) ซึ่งแยกได้จากรากหญ้าเฟสทูกา เฮทเทอโรฟิลลา (Festuca heterophylla) (Kleeberger, A. and Klingmiiller, W. 1980) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณส่วนเกินของการตรึงไนโตรเจนที่พบในแบคทีรอยด์นี้ ก็ยังนับว่าน่าจะเป็นประโยชน์ต่อต้นถั่ว

โดยทางอ้อมด้วย เพราะว่าปริมาณแอมโมเนียมที่เพิ่มขึ้นนี้อาจกลายเป็นต้นตอไนโตรเจนที่สำคัญของต้นถั่วได้ภายหลังจากที่มีการเกิดความแก่ หรือเกิดการเสื่อมสลายตัวของปม ถ้าเป็นเช่นนั้นจริง ปริมาณไนโตรเจนในทรายควรจะพบสูงกว่าปริมาณไนโตรเจนในทรายจากขวดทดลองที่คลุกด้วยไวลด์ไทพ์ ส่วนความเป็นไปได้ในกรณีที่สองคือ การที่น้ำหนักสดของต้นถั่วที่พบในต้นที่คลุกด้วยไวลด์ไทพ์มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ติดต่อกันจากสัปดาห์ที่ 4 จนถึงสัปดาห์ที่ 11 นั้น อาจเป็นไปได้ว่าในสัปดาห์ที่ 5 อิทธิพลจากแบคทีรอยด์ต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วยังไม่เต็มสมบูรณ์ ถ้าหากว่าการทดลองนี้ได้ทำการปลูกต้นถั่วจนครบวงจรแล้ว ผลกระทบของการตรึงไนโตรเจนที่พบในแบคทีรอยด์อาจส่งไปถึงการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 ก็เป็นได้ สำหรับจำนวนปมนั้นพบว่าส่วนใหญ่แล้วไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าประสิทธิภาพการสร้างปมมีเท่ากันทั้งในไวลด์ไทพ์และคอนจูแกนท์ อย่างไรก็ตามโดเบอเรนเนอร์ (Dobereiner, J. 1966) ได้ศึกษาเรื่องนี้ในถั่วเหลืองพบว่าน้ำหนักปมจะเป็นตรรชนีบ่งชี้ถึงปริมาณการตรึงไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้จากปมรากได้ดีกว่าจำนวนปม ทั้งนี้เพราะพวกที่มีปมขนาดใหญ่และน้ำหนักมากจะตรึงไนโตรเจนได้มากกว่าพวกที่มีปมมากแต่น้ำหนักน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อแยกเชื้อคอนจูแกนท์ออกจากปมรากพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะอยู่ด้วยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 แสดงว่านิฟพลาสมิดนี้มีความเสถียร (stable) พอสมควรเมื่ออยู่ในไรโซเบียม

สรุปผลการวิจัย

คุณสมบัติของไรโซเบียม ฉาโปนิคัม 122 มีดังนี้คือ

1. เจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอน

2. การตรึงไนโตรเจนซึ่งทดสอบโดยวิธีการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะให้ค่าสูงสุดในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลกับกลูโคเนทเป็นสารต้นตอคาร์บอน กลูตาเมทเป็นต้นตอไนโตรเจน ความดันบรรยากาศของออกซิเจนถูกปรับให้คงที่เท่ากับ 0.76 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ 28 °ซ พีเอช 6.8

3. สามารถให้ปมเมื่อคลุกกับถั่วเหลือง สจ. 4 โดยให้ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปม น้ำหนักปม แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของพืช

ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับมิได้คลุกเชื้อ

4. เพิ่มคุณค่าทางอาหารของถั่วในรูปของการเพิ่มปริมาณโปรตีน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด เมื่อเทียบกับต้นถั่วที่มิได้คลุกเชื้อในสภาวะการปลูกแบบเดียวกัน

5. เพิ่มปริมาณไนโตรเจนในดิน เพราะหลังจากต้นถั่วเข้าสู่ระยะ senescence จะมีการสลายของปมและรากจึงปล่อยอนุมูลแอมโมเนียมลงสู่ดินเหมาะสำหรับเป็นพืชบำรุงดิน

เปรียบเทียบคุณสมบัติของไรโซเบียมที่มียีนการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชุดกับไวลด์ไทพ์

1. การเพิ่มยีนพีอาร์ดี 1 ซึ่งมียีนซึ่งถอดรหัสเป็นเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสเข้าไปทำให้การเจริญเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำย้ากว่าไวลด์ไทพ์

2. ค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำยีนเมื่อแบคทีเรียเจริญแบบอิสระไม่ต่างจากค่าที่พบในไวลด์ไทพ์

3. ค่าแอคติวิตี้จำเพาะของการตรึงไนโตรเจน ทดสอบจากค่าการรีดิวซ์อะเซทีลีนในสภาวะที่เหมาะสม เมื่อแบคทีเรียอยู่ร่วมกับรากของต้นถั่ว ต่างจากของไวลด์ไทพ์อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 5 ของการปลูก

4. อิทธิพลอื่น ๆ ของคอนจูแกนท์เมื่ออยู่รวมกับรากของต้นถั่ว เช่นการให้น้ำหนักแห้งน้ำหนักสดหรือการสร้างจำนวนปมไม่ต่างจากไวลด์ไทพ์

5. ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะจะต่างกับไวลด์ไทพ์ กล่าวคือสามารถต้านยาคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินได้พร้อมกัน 3 ตัว

6. พลาสมิดที่เพิ่มเข้าไปนี้จะมี compatibility ต่างจากของไวลด์ไทพ์ สังเกตได้จากการที่มันสามารถคงสภาพของพลาสมิด และสามารถแยกมันมาจากปมรากถั่วเหลืองกลับคืนสู่สภาพอิสระโดยให้คุณสมบัติทุกอย่างกลับคืนรูปเดิม

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยนี้

1. เชื้อสายพันธุ์นี้เป็นเชื้อที่ใช้ในการเกษตรโดยตรง ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงไนโตรเจนในสภาพอิสระ จะเป็นประโยชน์ที่จะใช้เป็นมาตรฐานเพื่อทดสอบเชื้อสายพันธุ์นี้ในโอกาสข้างหน้า ถ้าต้องการปรับปรุงให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง

2. สหสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสด จำนวนปม หรือน้ำหนักปมกับค่าการตรึงไนโตรเจนที่พบในภาวะการสร้างปมที่ทดลองนี้ มีประโยชน์ที่จะใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของการตรึงไนไนโตรเจนของเชื้อตัวนี้เมื่ออยู่ร่วมกับรากถั่วในอนาคตข้างหน้า

3. จาก feasibility test นี้จะพบว่าแม้จะมีขีนการตรึงไนโตรเจนซึ่งมีประสิทธิภาพในการให้แอมโมเนียมสูง ก็มีแนวโน้มที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในพืชได้

4. Drug markers จะเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีว่าเชื้อที่คลุกลงในถั่วเหลืองเป็นตัวเดิมหรือไม่เหมาะสำหรับทดสอบความอยู่รอดของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองทางภาคสนาม