การศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 และสายพันธุ์ใหม่

นายอริย์ ลิขิตลิลิต

003755

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2524

I 18178649

A Study on the Nitrogen-Fixing Potential of *Rhizobium japonicum* strain 122 and Its Mutrants

Mr. Atip Likidlilid

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1981

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 และสายพันธุ์ใหม่
โดย	นายอธิป ลิขิตลิลิต
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพย์โตษก)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ดริยา บุญญวัฒน์)

.....กรรมการ
(นางเย็นใจ วสุวัต)

.....กรรมการ
(ดร. นันทกร บุญเกิด)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 และสายพันธุ์ใหม่

ชื่อนิสิต นายอริป ลิอิตลิลิต

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์

ปีการศึกษา 2524

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้สร้างปมกับถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 การวิจัยนี้ต้องการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมสายพันธุ์นี้ในฐานะเป็นแบคทีเรียอิสระ และอยู่ร่วมกับต้นถั่วเหลือง จากการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะที่พอเหมาะ การเจริญเติบโตของไรโซเบียมนี้ อาจผ่อนคลายการกดดันการถอดแบบเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งอาจทดสอบได้โดยใช้อะเซทีลีนรีดักชัน ภาวะเหมาะสมของการปลดปล่อยการถอดรหัสเป็นดังต่อไปนี้คือ เจริญเติบโตไรโซเบียมด้วยอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูตาเมท 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารต้นตอไนโตรเจน แมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอน พีเอช 6.8 อุณหภูมิ 28° ซ และความดันของกาซออกซีเจนถูกปรับให้เป็น 0.76 มิลลิเมตรของปรอท ไรโซเบียมสายพันธุ์นี้สามารถสร้างปมกับถั่วเหลือง สจ.4 ภายใต้ภาวะควบคุมให้ต้นที่เติบโตแข็งแรง น้ำหนักสดของทั้งต้นและรากของต้นที่คลุกเชื้อจะสูงกว่าต้นที่ไม่คลุกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ การตรึงไนโตรเจนตรวจพบได้จากรากของต้นคลุกเชื้อที่มีอายุตั้งแต่สองสัปดาห์ขึ้นไป ต้นถั่วระยะระหว่าง 2-6 สัปดาห์มีการเพิ่มขึ้นของการตรึงไนโตรเจนอย่างทวีคูณ นอกจากนี้ในช่วงอายุนี้ จำนวนปม น้ำหนักปม โปรตีน และไนโตรเจนทั้งหมดจากใบยังเพิ่มสูงขึ้นตามค่าการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย

การทดลองนี้ได้เคลื่อนนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดต้านยาที่มีชื่อว่า พีอาร์ดีวัน ซึ่งอยู่ในเซลของเอสเคอริเคีย โคไล สายพันธุ์ เจซีห้าสี่หกหก เข้าไปในไรโซเบียมสายพันธุ์นี้ พบความถี่ของการคอนจูเกท คือ 1×10^{-3} ต่อเซลรับ ได้แยกคอนจูแกนท์บางตัวมาศึกษาพบว่าในสภาพแบคทีเรียอิสระ คอนจูแกนท์ซึ่งมีพลาสมิดพีอาร์ดีวันเพิ่มขึ้นนี้ ไม่มีการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างไปจาก

ไวลด์ไทพ์แต่อย่างไรในขณะที่การเจริญของมันช้าแตกต่างกัน ความสามารถในการสร้างปมของมันกับต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ก็เหมือนกันกับไวลด์ไทพ์ ทั้งนี้โดยตัดสินจากจำนวนปม น้ำหนักปม และน้ำหนักสด แต่อย่างไรก็ตาม ค่าแอคติวิตี้จำเพาะของอะเซ่ทีลีนรีดักชัน ซึ่งวัดจากปมรากจะสูงกว่าของไวลด์ไทพ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อวัดที่สัปดาห์ที่ห้าหลังการปลูก

Thesis Title A Study on the Nitrogen-Fixing Potential of Rhizobium japonicum strain 122 and Its Mutants

Name Mr. Atip Likidlilid

Department Biochemistry

Thesis advisor Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.

Academic Year 1981

Abstract

Rhizobium japonicum 122 is one of the best symbiotic strain, used to nodulate the Glycine max, SJ 4. Our purpose is to study its nitrogen fixation ability as a free living and a symbiotic bacterium of the Glycine max SJ 4, under a derepressed condition. We have found that an inoculum, obtained under a derepressed condition, shows nitrogenase activity which can be detected by the method of acetylene reduction. The optimal derepressed condition is as follows: cultivation is done under a specific minimal medium of pH 6.8, supplemented with one milligram per milliliter of glutamate as the sole nitrogen source, and mannitol as the sole carbon source, reared at 28° C under 0.76 mm Hg of partial pressure of oxygen in argon. Nodulation of this rhizobial strain to its host, Glycine max SJ 4, under a controlled and sterile condition gives rise to a healthy soybean plant. The increased biomass of stem and root signifies the influence of nodulation, comparing to that of nonnodulation. Ther is an exponentially increase in the nitrogen-fixing activity, associated with the plant roots during the first 2-6 weeks after plant nodulation. Coincidently with the increase in nitrogen fixing activity, the increase in nodule number, nodule weight, protein content and total nitrogen content from leaves are corresponding by observed.

We have also transferred a nif gene locus adjoined with a drug resistance plasmid, named pRD1, which is harbored in Escherichia coli JC 5466 to this rhizobial strain. The intragenic transfer is succeeded with a frequency of $1x10^{-3}$ per recipient cell. Some of the isolated conjugants are further studied. In a free living condition, these conjugants, confer plasmid pRD1, show no difference in the nitrogen-fixing ability, although their growth profiles are slower, when they are compared to those of the wild type. Their nodulation ability, with respect to the nodule number, the nodule weight and the wet weight of whole plant are concurrent with those of the wild type. However, the specific activity of acetylene reduction, pertaining to the conjugants nodulated roots, are significantly higher than that of the wild type nodulated roots. This difference is most remarkable in the symbiotic soybean plant at 5 weeks after nodulation.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพยโตษก รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์ อาจารย์เย็นใจ วสุวัต ดร. นันทกร บุญเกิด ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และให้แนวความคิดอย่างดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ Dr. R.A. Dixon, Dr. J.R. Postgate แห่ง Agricultural Research Council Unit of Nitrogen Fixation, UK., Dr. A. Kondorosi แห่ง Institute of Genetics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Hungary. ที่ได้กรุณาให้เชื้อ Escherichia coli K12 JC5466 (pRD1) และอาจารย์เย็นใจ วสุวัต แห่งสายยาปักเตรีวิทยาและจุลินทรีย์ดิน กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ได้ให้เชื้อ Rhizobium Japonicum 122 และอนุญาตให้ใช้สถานที่ รวมทั้งเครื่องมือสำหรับการทำวิทยานิพนธ์นี้บางส่วน

ขอขอบคุณ คุณวรวิชญ์ รุ่งรัตนกลิน คุณบรรหาญ แตงฉ่ำ สภาวิจัยแห่งชาติ บัณฑิตวิทยาลัย และทุกท่านซึ่งมิได้เอ่ยนามในที่นี้ สำหรับกำลังใจ ความช่วยเหลือ ตลอดจนการสนับสนุนด้านทุนการวิจัย จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

รายการตารางประกอบ ..... ช

รายการรูปประกอบ ..... ญ

คำย่อ ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วิธีการทดลอง

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 15

2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 16

3. สูตรอาหาร 16

4. การเตรียมสารละลาย 21

5. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 22

6. การศึกษาการเจริญเติบโตของไรโซเบียม ฉายโปนิคัม 122 23

7. การวัดการรีดิวซ์อะเซทีลีน 24

8. การหาปริมาณโปรตีนของเชื้อโดยวิธีลอรี 26

9. การทดสอบความถี่ในการผันกลับ 26

10. การผสมพันธุ์ 26

11. การทดสอบการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการเกิดปมในรากถั่วเหลือง 27

12. การหาปริมาณโปรตีนของใบถั่ว 29

13. การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากใบถั่ว 29

14. การแยกเชื้อจากปมรากถั่ว 30

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3. ผลการวิจัย

1. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลกับค่าความเข้มของการดูดแสง..... 32

2. ลักษณะการเจริญเติบโตของไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 เมื่อใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 36

3. สภาวะที่เหมาะสมของการรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 ในสภาพวุ้นทรัยอิสระ..... 36

4. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองเมื่อคลุกและไม่คลุกด้วยไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122..... 51

5. การเคลื่อนนีฟพลาสมิดจากเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) เข้าไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 โดยวิธีคอนจูเกชัน..... 63

4. วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย..... 77

เอกสารอ้างอิง..... 90

ภาคผนวก..... 103

ประวัติผู้เขียน..... 105

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลที่มีชีวิตกับค่าความเข้มของการดูดแสงที่ไม่เลือกลางและเลือกลาง 35

ตารางที่ 2 การใช้สารต้นตอคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 39

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 เมื่อมีสารต้นตอคาร์บอนต่างกัน 49

ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 เมื่อมีสารผสมต้นตอคาร์บอนต่างกัน 50

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญเติบโตทั่ว ๆ ไปของถั่วเหลืองที่ไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 53

ตารางที่ 6 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 55

ตารางที่ 7 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 56

ตารางที่ 8 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีเคลดาล้ยของต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 60

ตารางที่ 9 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณโปรตีนที่หาโดยวิธีไบยูเรทของต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 61

ตารางที่ 10 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายของกระถางที่ปลูกถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 64

ตารางที่ 11 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด (พีอาร์ดี 1) จากเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 ไปให้ไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 โดยวิธีคอนจูเกชัน 69

หน้า

ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตและการรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนจูแกนท์ในช่วงระยะเวลา 12 วัน 70

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักสด จำนวนปม และแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของต้นถั่วเหลืองในสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนจูแกนท์ 73

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบน้ำหนักสด จำนวนปม และแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของต้นถั่วเหลืองในสัปดาห์ที่ 5 ระหว่างไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนจูแกนท์ 75

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลและระยะเวลาในการเจริญของแบคทีเรีย 33

รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลและการเจริญของแบคทีเรียที่ความยาวแล่ง 500 นาโนเมตร 34

รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.1 37

รูปที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.5 38

รูปที่ 5 ผลของการปรับบรรยากาศออกซิเจนต่อแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน 41

รูปที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนกับความดันบรรยากาศของออกซิเจน 42

รูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจนต่างกัน 44

รูปที่ 8 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 กับอุณหภูมิ 45

รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นสูงสุดของเซล และแอคติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสกับ $\frac{1}{T}$ (Arrhenius's plot) 46

รูปที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 กับพีเอช 48

รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง การเจริญเติบโต พีเอช และแอคติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 52

รูปที่ 12 สภาวะที่เหมาะสมในการรีดิวซ์อะเซทีลีนของปมรากถั่วเหลือง 57

หน้า

รูปที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักต้นสดกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนระหว่างต้นที่ไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 59

รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปม น้ำหนักปม กับแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของปมถั่วเหลือง 62

รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทราย และแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน ระหว่างต้นที่ไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 65

รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของเอส่เคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) 66

รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของเอส่เคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) ซึ่งเสริมด้วยเคล่อะมิโนแอซิด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 68

รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนจูแกนท์ (R11) 72

คำย่อ

ADP	=	Adenosine - 5' - diphosphate
ATP	=	Adenosine - 5' - triphosphate
$Carb^R$	=	Carbenicillin resistance or Ampicillin resistance
gnd^+	=	Gluconate -6- phosphate dehydrogenase
$\underline{his}^+$	=	histidine
Km^R	=	Kanamycin resistance
nif^+	=	nitrogen fixation
OD	=	optical density
Pi	=	Inorganic phosphate
rec A 46	=	Recombination
$\underline{rfb}^+$	=	Thymidinediphosphoglucose pyrophosphorylase
$shiA^+$	=	shikimate
Spc^R	=	Spectinomycin resistance
Tc^R	=	Tetracycline resistance
Trp	=	tryptophan auxotroph