หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

การจำแนกชนิดเบรดิไรโซเบียม

เบรดิไรโซเบียม คือ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง (*Glycine max*) ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata*) ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) และถั่วซีราโทร (*Macroptilium atropurpureum*) เป็นต้น เบรดิไรโซเบียมที่ตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *B.japonicum* ลักษณะเซลของเบรดิไรโซเบียมที่อยู่ในรากพืชตระกูลถั่ว มีรูปร่างไม่แน่นอน เรียกว่า แบคทีรอยด์ (bacteroid) สามารถใช้พลังงานจากพืชตระกูลถั่วในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยเปลี่ยนกาซไนโตรเจนให้อยู่ในรูปสารประกอบ แอมโมเนียซึ่งพืชตระกูลถั่วสามารถนำไปใช้ต่อได้ เบรดิไรโซเบียมใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนช้าโดยมีช่วงเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2เท่าเป็น 6-8 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรยีสต์แมนนิทอล ส่วนไรโซเบียมโดยทั่วไป หมายถึงแบคทีเรียซึ่งตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วและมีอัตราการเพิ่มจำนวนเร็ว เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอาหารยีสต์แมนนิทอล กล่าวคือ มีระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2เท่า เท่ากับ 2-4 ชั่วโมง (Elkan และ Bunn,1992) นอกจากนี้เบรดิไรโซเบียมและไรโซเบียม ยังมีสมบัติทางชีวเคมี พันธุ์ศาสตร์ และสรีรวิทยา ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ในการศึกษาเกี่ยวกับเบรดิไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่ว ในระยะแรกเบรดิไรโซเบียมถูกเรียกว่าไรโซเบียม และพบว่าไรโซเบียมชนิดต่างๆ มีความเฉพาะเจาะจงในการสร้างปมบนรากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆจึงทำให้มีการจำแนกชนิดของไรโซเบียมตามกลุ่มพืชตระกูลถั่วที่สามารถเกิดปมได้หลังจากการใส่เชื้อไรโซเบียมชนิดเดียวกัน ซึ่งเรียกการจัดจำแนกชนิดดังกล่าวว่า การจัดจำแนกโดยใช้ cross-inoculation grouping หรือ plant inoculation grouping

โดยไม่คำนึงถึงว่าปมที่เกิดจะมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนหรือไม่ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่างไรโซเบียมกับเบรดิไรโซเบียม

(Elkan และ Bunn,1992)

ลักษณะ	ไรโซเบียม	เบรดิไรโซเบียม
เวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า	น้อยกว่า 6 ชั่วโมง	มากกว่า 6 ชั่วโมง
การใช้คาร์โบไฮเดรต	ใช้เพนโตส, เฮกโซส, น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว, สองโมเลกุลและน้ำตาลสามโมเลกุล	ใช้เพนโตสและเฮกโซสเท่านั้น
วิถีเมตะโบลิซึม	ใช้วิถี EMP เล็กน้อย ใช้วิถี ED เป็นวิถีหลัก TCAมีการทำงานเต็มที่	ใช้วิถี EMP เล็กน้อย ใช้วิถี ED เป็นวิถีหลัก TCAมีการทำงานเต็มที่
ชนิดของแฟลกเจลลา	เพอริไทรคัส	ซับโพลาร์
ตำแหน่งที่ตั้งของยีนที่เกี่ยวกับการพึ่งพาอาศัยกับพืช	อยู่บนพลาสมิดและโครโมโซม	อยู่บนโครโมโซม
ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน	*nif H,D* และ *K* อยู่ใน operonเดียวกัน	*nif D,K* และ *H* อยู่คนละ operon
ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ	สูง	ต่ำ

อักษรย่อ ED,Entner-Doudoroff pathway;EMP,Embden-Meyerhoff-Parnas pathway

PP,Pentose phosphate pathway;TCA,Tricarboxylic acid cycle

ตารางที่ 2 การจัดกลุ่มแบคทีเรียตามกลุ่มของพืชตระกูลถั่วที่เข้าอยู่อาศัย (FAO, 1984)

แบคทีเรีย	จีนัสของพืชตระกูลถั่วที่เข้าอยู่อาศัย
พวกเจริญเติบโตเร็ว (Fast growers)	
Rhizobium meliloti	*Medicago Melilotus* และ *Trigonella*
Rhizobium leguminosarum	
biovar. trifolii	ถั่วโคลเวอร์ (*Trifolium* spp.)
biovar. phaseoli	ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*)
	ถั่วปินโต (*Phaseolus multiflolis*)
biovar. viceae	ถั่วลันเตา (*Pisum* spp.)
	ถั่วปากอ้า (*Vicia* spp.)
	เลนส์ (*Lens*) และ *Lathyrus* spp.
Rhizobium loti	*Lupinus Lotus Anthyllis*
	Ornithopus
Rhizobium fredii	ถั่วเหลือง (*Glycine max*)
พวกเจริญเติบโตช้า (Slow growers)	
Bradyrhizobium japonicum	ถั่วเหลือง (*Glycine max*)
Bradyrhizobium spp.	
Bradyrhizobium sp. (*Vigna*)	ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วฝักยาว ฯลฯ
Bradyrhizobium sp. (*Lupinus*)	*Lupinus* sp. *Lotus peduncularus*

ในปี 1985 Masterson และคณะ ได้ศึกษาโครงสร้างของยีนส์ *nif* และ *nod* ทั้งในสายพันธุ์ *R. japonicum* และ *B. japonicum* โดยวิธี southern hydridization กับดีเอนเอ probes ที่มี *nif* และ *nod* ของ *R.meliloti* ผลการทดลองพบว่าทั้ง *nif* และ *nod* ของสายพันธุ์ *R. japonicum* อยู่บน plasmid ดีเอนเอ และสายพันธุ์ *B.japonicum* ทั้งหมดพบ *nif* และ *nod* บนโครโมโซม โดย *nif* จะอยู่บน 112 เมกะดัลตันพลาสมิด และ *nod* จะอยู่บน 195 เมกะดัลตันพลาสมิด

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปมในถั่วเหลือง มี 2 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่เจริญเร็ว (*Rhizobium fredii*) และแบคทีเรียที่เจริญช้า(*Bradyrhizobium japonicum*)ประวัติการแยกแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปมในถั่วเหลือง ออกเป็น 2 จีนัส มีดังนี้ ในปี ค.ศ.1982 Keyserและคณะ ได้แยกเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ที่เจริญเร็วจากถั่วเหลืองในสาธารณรัฐประชาชนจีน ไอโซเลตที่ได้มีลักษณะสมบัติแตกต่างจากพวกที่เจริญช้าคือ มีอัตราการเพิ่มจำนวนเป็น 2เท่าเท่ากับ 2-4 ชั่วโมง และสร้างกรดในอาหารยีสต์แมนนิทอล ไรโซเบียมพวกเจริญเร็วที่แยกได้ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนกับถั่วเหลือง (*Glycine soja* Sieb and Zucc.) แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน เมื่ออยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่วพวกซีราโทร *Macroptilium* sp.และโสน *Sesbania cannabina* Roxb. ดังนั้น ผลการประชุมสัมมนานานาชาติด้านการตรึงไนโตรเจน ครั้งที่ 4 ในปี ค.ศ.1980 ณ. Australian National University ที่ประเทศออสเตรเลีย เพื่อให้ทบทวนความเหมาะสมของการจำแนก *Rhizobium* ขึ้นใหม่ได้มีข้อเสนอแนะ ให้ตั้งชื่อจีนัสสำหรับไรโซเบียมที่เจริญช้าและไม่ผลิตกรดในอาหารสูตรยีสต์แมนนิทอลว่า *Bradyrhizobium* ซึ่งจีนัสใหม่นี้จะมีหลายสปีชีส์ แต่ได้ตั้งชื่อสปีชีส์เดียวคือ *Bradyrhizobium japonicum* ส่วน *Bradyrhizobium* spp.อื่น มีการเขียนสายพันธุ์พืชหลังชื่อจีนัส เช่น *Bradyrhizobium* sp.(Vigna) สำหรับเบรดิไรโซเบียมที่สร้างปมบนถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วฝักยาว เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2 (Jordan,1982) นอกจากนี้ Chen และคณะ (1988) ขอให้ย้าย *Rhizobium fredii* ไปอยู่จีนัสใหม่คือ *Sinorrhizobium*

แบคทีเรียในจีนัส *Bradyrhizobium* มีสมบัติทั่วไปได้แก่ ไม่มีเอนโดสปอร์ เซลเป็นรูปแท่ง ติดสีกรัมลบ มีขนาด0.5-0.9x1.2-3.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยอาศัยหนวด

(flagella) แบบซับโพลาร์ 2เส้น มีแหล่งสะสมอาหารภายในเซล ส่วนใหญ่เป็นพวกเม็ดไขมัน (lipid granules) เช่น โพลี-เบตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly-β-hydroxybutyrate) ดำรงชีวิตภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พีเอช 6.0-7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสม 25 - 30 องศาเซลเซียส เจริญบนอาหารวุ้นยีสต์แมนนิทอล ภายในระยะเวลา 5-7 วัน ผลิตด่างและเมือก สามารถเจริญบนอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ มีปริมาณไนโตรจีนัสเบสจีและซี ของดีเอ็นเอ 57-65 โมลเปอร์เซ็นต์ (Jordan,1984)

การจำแนกสายพันธุ์ *B. japonicum*

การจำแนกสายพันธุ์เบรดิไรโซเบียมจากปมรากถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว *Lupinus* sp.และ *Lotus pedunculatus* นั้น ทำได้หลายวิธี เช่น ปี ค.ศ.1968 Schmidt และ คณะ ใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์-แอนติบอดี (fluorescent-antibody, FA) ศึกษาไรโซเบียมอิสระในดิน โดยใช้แอนติซีรัมของสายพันธุ์ *R. japonicum* ในการตรวจสอบทั้ง agglutination และ FA บนแผ่นสไลด์ พบว่าในกลุ่มของ *R. japonicum* มี 2 สายพันธุ์ที่เกิดปฏิกิริยา อีก 10 สายพันธุ์ที่เหลือไม่เกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของสายพันธุ์ *R.japonicum* การทดสอบจากดินทั้งหมด 12 แหล่ง โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์-แอนติบอดีของ *R. meliloti* 7 สายพันธุ์, *R. leguminosarum* 9 สายพันธุ์,*R. trifolii* 9 สายพันธุ์และ *R. phaseoli* 6 สายพันธุ์ให้ผลลบ และไม่ทราบสายพันธุ์อีก 65 สายพันธุ์

ในปี ค.ศ. 1980 Roberts และคณะ ใช้การแยกโปรตีนแบบสองมิติ (two-dimentional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) ในการจำแนกและแยกสายพันธุ์ไรโซเบียม จำนวน 57 สายพันธุ์ โดยใช้รูปแบบการวางตัวของโพลีเปปไทด์ในแต่ละเจล ถ้ารูปแบบการวางตัวของโพลีเปปไทด์ที่ได้เหมือนกันสามารถบอกได้ว่า มีความเกี่ยวข้องกันระหว่างสายพันธุ์นั้นๆ ผลการทดลองพบว่ารูปแบบของโปรตีนที่ปรากฏบนเจลในกลุ่มของไรโซเบียมที่เจริญช้าจะมีรูปแบบที่เหมือนกัน แต่จะแตกต่างจากกลุ่มของไรโซเบียมที่เจริญเร็ว

ในปี ค.ศ.1988 Hashen และ Angle ใช้ความสามารถในการติดเชื้อไวรัสของเบรดิไรโซเบียมแต่ละชนิด (phage typing) ในปี ค.ศ.1990 Fuhrmann ดูลักษณะการที่

เชื้อ *B. japonicum* ผลิตไรโซไบทอกซินในพืช และการตรวจลักษณะการแสดงออกของไฮโดรจีเนส (hydrogenase phenotype) การใช้วิธีการทางเซรุ่มวิทยา (serological technique) Fuhrmann ได้คัดแยกเชื้อ *B. japonicum* จำนวน 360 ไอโซเลต จากปมทั้ง 18 แหล่งในมลรัฐ Delaware นำมาจัดกลุ่มโดยการตรวจสอบลักษณะทางเซรุ่มวิทยาด้วย ELISA ตรวจสอบลักษณะภายนอกคือ ดูลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้นยีสต์ - แมนนิทอล ดูลักษณะการที่เชื้อ *B. japonicum* ผลิตไรโซไบทอกซินในพืช จากการตรวจสอบทาง ELISA ได้แยกสายพันธุ์ที่ได้ออกเป็น 12 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของสายพันธุ์ USDA6, USDA31,USDA 38-115, USDA46, USDA76, USDA94, USDA110, USDA122, USDA123, USDA122/123 USDA130 กลุ่มที่ไม่ได้จำแนก และกลุ่มที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของสายพันธุ์ใดเลย นอกจากนี้ยังใช้ลักษณะโคโลนี แบ่งได้ 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่มีลักษณะโคโลนีใหญ่และเหนียว(large mucoid) กลุ่มที่มีลักษณะโคโลนีใหญ่และเยิ้ม (large watery) และกลุ่มที่มีลักษณะโคโลนีเล็กและแห้ง(small dry) ทั้ง 3 ลักษณะทำปฏิกิริยากับแอนติเซรุ่มของสายพันธุ์ USDA94, USDA6 USDA122 และ USDA76 มี 33 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซรุ่มของสายพันธุ์ใดเลย และ18 เปอร์เซ็นต์ของ *B. japonicum* แสดงอาการจากไรโซไบทอกซิน คือใบถั่วจะมีสีเหลืองที่ยอดอ่อนเนื่องจากขาดธาตุเหล็ก ประกอบด้วยพวกที่จัดอยู่ในกลุ่มเซรุ่มวิทยาของสายพันธุ์USDA31 USDA46, USDA71, USDA94, USDA76 และกลุ่มที่ยังไม่ทราบซีโรกรุ๊ป ทั้ง 18 เปอร์เซ็นต์มีลักษณะโคโลนีแบบเดียวกัน พบว่าปริมาณไนโตรเจนในส่วนลำต้นมีความสัมพันธ์กับการจัดกลุ่มทาง ELISA และลักษณะโคโลนี ไอโซเลตที่อยู่ในซีโรกรุ๊ป 38-115, 122 และ 110 ตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุด ไอโซเลทที่มีการทำงานของไฮโดรจีเนสประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ของไอโซเลตที่ทดสอบมีความสัมพันธ์กับซีโรกรุ๊ป 110,122 และ 122/123 Basitและคณะ(1991) ตรวจสอบลักษณะต่างๆของ *B. japonicum* ที่อยู่ใน ซีโรกรุ๊ป110 จำนวน 34 สายพันธุ์ พบว่ามีการแสดงออกของไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส (H_2 uptake hydrogenase) ในแอมพีโรเมตริกแชมเบอร์ (amperometric chamber) เมื่อเลี้ยงในสภาพเซลอิสระ(free-living) ที่มีไฮโดรเจนและออกซิเจน 2เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะโคโลนีไม่มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และ ในปี ค.ศ 1991 Kang และคณะได้ตรวจสอบประสิทธิภาพ

ของเชื้อ *B. japonicum* ในดินกับประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และทำการจัดกลุ่มโดยใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยาเช่นเดียวกัน จัดได้ 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของสายพันธุ์ YCK117, YCK141, YCK150, USDA110 และ USDA123 ในปี ค.ศ 1992 Minamisawa และคณะ แยก *B. japonicum* จากบริเวณที่เคยปลูกถั่วเหลืองเป็นเวลา 45 ปี โดยไม่มีการใส่เชื้อเลย ได้จำนวน 49 ไอโซเลต นำมาจัดลักษณะโดยการใช้ดีเอนเอ-ดีเอนเอ ไฮบริไดเซชั่น พบว่าเมื่อใช้*nifDK*เป็นโพรบกับโครโมโซมัลดีเอนเอซึ่งตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ Hind III สามารถแบ่งไอโซเลตต่างๆออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม GT I ซึ่งโพรบไฮบริไดซ์กับแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาด 9.5 กิโลเบส และกลุ่ม GT II ซึ่งโพรบไฮบริไดซ์กับแถบดีเอนเอที่มีขนาด 27 กิโลเบส แต่เมื่อใช้ RSα9 และ RSβ3 (repeated sequence , RS) เป็นโพรบ พบว่า 44 ไอโซเลต ที่แยกมาจาก 41 ปม ถูกแบ่งเป็น 33 กลุ่ม ที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการไฮบริไดซ์ของดีเอ็นเอทั้งหมดของ *B. jasponicum* กับ RSα และ RSβ ต่างกัน

ในปี พ.ศ.2536 นันทกร บุญเกิด และคณะ ได้จำแนกสายพันธุ์ *Bradyrhizobium japonicum* จำนวน 23 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี ELISAโดยใช้เซรุ่มของสายพันธุ์ USDA6 USDA24 USDA38 USDA112 USDA136 USDA134 THA6 TEX8-T USDA140 THA1 TEX8-O USDA110 THA2 THA5 USDA117 USDA35 USDA184 TAL377 USDA31 TAL944 USDA76 USDA94 USDA142และTAL432 พบว่าสามารถใช้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรัมแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ และอีก 4 สายพันธุ์ คือ USDA76 USDA94 USDA142 และ TAL432 ไม่มีปฏิกิริยาแอนติเจนและแอนติซีรัมร่วมกับสายพันธุ์ใดๆ ดังตารางที่ 3 ผลที่ได้มีความสัมพันธ์กับการจัดกลุ่ม โดยวิธีการศึกษารูปแบบการเรียงตัวของโครโมโซมัลดีเอนเอ ซึ่งถูกตัดด้วยเรสตริกชั่นเอ็นไซม์ EcoRI หรือ HindIII หรือ PstI หรือ BamHI ผลการทดลองพบว่าสามารถใช้รูปแบบการเรียงตัวของแถบดีเอนเอ บนอากาโรสเจลจำแนกความแตกต่างของเบรดิไรโซเบียมออกเป็น 5 กลุ่มและรูปแบบการเรียงตัวจำเพาะสายพันธุ์ที่ไม่เหมือนกับสายพันธุ์ใดอีก 4 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ USDA76 USDA94 USDA142 และ TAL432 แต่เมื่อศึกษาโดยการทำ Southern blot และ hybridize กับ *nif* structural gene และ *nod* gene และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน การเกิดปมกับถั่วเหลือง สจ.5 ลักษณะการ

Strains \ Antisera	USDA 6	USDA 24	USDA 38	USDA 122	USDA 136	USDA 143	THA 6	TEX 8-T	USDA 140	THA 1	TEX 8-0	USDA 110	THA 2	THA 5	USDA 117	USDA 35	USDA 184	TAL 377	USDA 31	TAL 944	USDA 76	USDA 94	USDA 142	TAL 432
USDA 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 24	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 38	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 122	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 136	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 143	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
THA 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
TEX 8-T	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 140	+	+	+	+	+	+	+	+	+															
THA 1										+	+	+	-	-	-									
TEX 8-0										+	+	+	-	-	-									
USDA 110										+	+	+	+	+	+									
THA 2										-	-	+	+	+	+									
THA 5										-	-	+	+	+	+									
USDA 117										-	-	+	+	+	+									
USDA 35																+	+	+						
USDA 184																+	+	+						
TAL 377																+	+	+						
USDA 31																			+	+				
TAL 944																			+	+				
USDA 76																					+			
USDA 94																						+		
USDA 142																							+	
TAL 432																								+

ตารางที่ 3 ปฏิกิริยา ELISA ระหว่างสายพันธุ์ *Bradyrhizobium japonicum* และแอนติซีรัมของแต่ละสายพันธุ์

(ที่มา: นันทกร บุญเกิด และคณะ., 2536)

เกิดปมกับยีนส์ที่เกี่ยวข้องคือ *nif* และ *nod* ยีนส์ พบว่าแอคติวิตีของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสทั้ง 23 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง nitrogenase activity กับรูปแบบ ดีเอนเอที่ได้จากการใช้ *nif* ไอบริไดเซชั่น และจำนวนปมที่เกิดขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบดีเอนเอ จากการใช้ *nod* ไอบริไดเซชั่น แสดงว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน การเกิดปมไม่ได้ขึ้นอยู่กับ *nif* และ *nod* โดยตรงอาจมียีนส์ตัวอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์หรือมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนและการเกิดปม

วิธีทางเซรุ่มวิทยาเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด สามารถจำแนกสายพันธุ์เบรดิไรโซเบียมได้รวดเร็ว แต่บางครั้งไม่สามารถแยกเบรดิไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ออกจากกันได้แน่นอน เนื่องจากสายพันธุ์เหล่านี้มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มระหว่างแอนติเจนและเซรุ่ม คือสายพันธุ์เหล่านั้นมีแอนติเจนชนิดเดียวกัน(Dudman, 1964) และเซรุ่มที่ได้จากกระต่ายแต่ละตัวมีความแตกต่างกันถึงแม้ว่าจะเป็นเซรุ่มต่อแอนติเจนชนิดเดียวกันก็ตาม(Kishinevsky และ Gurfel, 1980)

ในปี ค.ศ.1979 Berger และคณะ รายงานว่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา(serology) ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ไรโซเบียม มี 4 วิธีได้แก่

1. ปฏิกิริยาแอคกลูติเนชั่น (Agglutination reaction) เป็นปฏิกิริยาที่แอนติเจนซึ่งเป็นเซลทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในลักษณะเกาะกันเป็นร่างแห ผลของปฏิกิริยาสังเกตได้จากกลุ่มตะกอนที่เกิดขึ้น

2. อิมมูโนดิฟฟิวชั่น (Immunodiffusion) เป็นปฏิกิริยาที่แอนติเจนรวมตัวกับแอนติบอดีเป็นตะกอนในตัวกลางที่มีลักษณะเป็นวุ้น แอนติเจนต้องเป็นแอนติเจนที่สามารถละลายได้ (soluble antigens) มักเป็นโปรตีน หรือโพลีแซคคาไรด์

3. อิมมูโนฟลูออเรสซีน(Immunofluorescence)อาศัยการเกาะติด (conjugate) ระหว่างแอนติบอดีกับสารเรืองแสง สารเรืองแสงที่นิยมใช้คือ ฟลูออเรสซีน ไอโซไทโอไซยาเนต (fluorescein isothiocyanate) ตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ที่ใช้แสงอุลตร้าไวโอเลตหรือแสงสีน้ำเงินเป็นแสงกระตุ้นให้เกิดการเรืองแสง

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ตรวจปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติซีรัม โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ที่เกาะติดอยู่บนโมเลกุลของแอนติซีรัม เอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส(alkaline phosphatase) จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารที่เป็นสับสเตรตที่ไม่มีสีให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีได้(chromagenic substance)เป็นการตัดกลุ่มฟอสเฟตออกจากซับสเตรต nitrophenyl phosphate ที่ไม่มีสี ได้ผลิตภัณฑ์ nitrophenol ซึ่งมีสีเหลืองและตรวจวัดปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร (Fuhrmann และ Wollum ,1985)

วิธีการของ ELISA

1. Indirect ELISA วิธีนี้ Barbara และClark (1982) รายงานว่าเอ็นไซม์ไม่ได้เกาะติดบนแอนติซีรัมต่อเบรดิไรโซเบียมโดยตรง แต่เกาะติดอยู่บนแอนติซีรัมที่ได้จากแพะหรือแกะต่ออิมมูโนโกลบูลินของกระต่าย ซึ่งเมื่อเบรดิไรโซเบียมแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ผลิตจากกระต่ายแล้ว จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมจากแพะหรือแกะที่มีเอ็นไซม์เกาะติดอยู่ได้

2. Direct double antibody sandwich technique ซึ่ง Kishinevsky และ Bar-Joseph(1978) ได้นำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วลิสงครั้งแรก โดยเคลือบ microtiter plate ด้วย r-globulin ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์ คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (carbonate buffer) วิธีนี้จำเป็นต้องใช้แอนติซีรัมที่เกาะกับเอ็นไซม์แต่ละชนิดตามชนิดแอนติ-เจน ทำให้ไม่สะดวกในการเตรียมแอนติซีรัมเกาะกับเอ็นไซม์หลายๆชนิด ในปี ค.ศ. 1979 Berger และคณะ ได้ใช้กระจกสไลด์เคลือบไรโซเบียมแอนติเจน ทำปฏิกิริยากับโกลบูลินของกระต่ายที่เกาะติดอยู่กับเอ็นไซม์ฟอสฟาเตส เนื่องจากวิธีนี้ทำบนกระจกสไลด์ จึงไม่สะดวกในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ต่อมาในปี ค.ศ.1985 Nambiar และAnjaiah ได้มีการพัฒนาวิธี ELISA ให้มีประสิทธิภาพขึ้นโดยทำบน polystyrene microtiter plate สามารถวิเคราะห์ได้ถึง 96 ตัวอย่างต่อเพลต Kiskinevsky และ Gurfel (1980) ได้นำวิธีนี้ไปดัดแปลงใช้สำหรับคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียม ทั้งพวกที่เจริญเร็วและเจริญช้าออกเป็นชนิดต่างๆ ได้แก่ *Rhizobium trifolii* สายพันธุ์ 3183T 3121T และ341T *R.leguminosarum* สายพันธุ์ 250V 223V 4/76 1/79V และ7/79V *R.meliloti*111 *R.lupini* G16 A89 และ625 Peanut *Rhizobium* 280A 4344A และ3847A เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติซีรุ่มของ *Rhizobium* สายพันธุ์ 3183T 341T 250V 223V 111 G16 A89 625 280A 4344A และ3847A ทำให้สามารถแยกไรโซเบียมและเบรดิไรโซเบียมออกจากกันได้เทคนิคนี้มีความไว (sensitivity)สูง สามารถใช้แอนติเจนที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์หรือเชื้อในปม ตรวจสอบตัวอย่างได้หลายชนิดต่อเพลต

3. Fluorescent ELISA วิธีนี้พัฒนาโดย Morley และ Jones(1980) วิธีนี้จะคล้ายกับวิธีdirect double antibody sanwich technique ต่างกันที่ซับสเตรทในปฏิกิริยานี้เป็น 3-O-methylfluorescein phosphate เอ็นไซม์ที่ใช้ติดฉลากคือ alkaline phosphatase

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของ ELISA

1. ปริมาณของแอนติเจน วิธี ELISA เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถใช้แอนติเจนในปริมาณที่ต่ำเพียง 10^{-4}-10^{-5} เซลต่อมิลลิลิตรได้(Kishinevsky และ Bar-Joseph,1978; Kishinevsky และ Gurfel, 1980 ; Morley และ Jones ,1980 ; Nambiar และ Anjaiah, 1985) ปริมาณแอนติเจนจากปมก็เช่นกัน ELISA สามารถตรวจแอนติเจนจากปมรากถั่วลิสงที่มีน้ำหนักสดเพียง 0.4 มิลลิกรัม บดใน 1 มิลลิลิตร PBS (phosphate bufferred saline) หรือ 80 ไมโครกรัม ของปมรากถั่วที่มี *R.lupini* ต่อ 1หลุมของ microtiter plate ได้(Kishinevsky และ Bar-Joseph ,1978 ; Kishinevsky และ Gurfel ,1980) ดังนั้นวิธี ELISA จึงเป็นที่นิยมในการตรวจสายพันธุ์ไรโซเบียมในปม โดยเฉพาะ ในการศึกษาการแข่งขันเข้าสร้างปมระหว่างไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากวิธีนี้สามารถทำปฏิกิริยากับเซรุ่มหลายๆสายพันธุ์ได้เมื่อใช้ปมเพียง 1 ปม

2. ความเข้มข้นของเซรุ่ม ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากวิธี indirect ELISA จะแปรตามความเจือจางของเซรุ่ม (Berger et al.,1979) และระดับความเจือจางของเซรุ่มที่เหมาะสม เมื่อทำปฏิกิริยาโดยวิธี ELISA กับแอนติเจนที่มีความจำเพาะแล้วจะให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.25 (Fuhrmann และ Wollum ,1985)

3. ความเจือจางของเอ็นไซม์-คอนจูเกต (enzyme-conjugate) ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอ็นไซม์คอนจูเกต (Fuhrmann และ Wollum ,1985 Berger et al., 1979 ; Morley และ Jones,1980) การใช้เอ็นไซม์-คอนจูเกตที่ความเข้มข้นมากจะทำให้ระยะเวลาในการบ่มสั้นลง Fuhrmann และ Wollum (1985) แนะนำให้ใช้เอ็นไซม์คอนจูเกตที่ระดับความเจือจาง 1: 2,500 และใช้เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง

4. ความเข้มข้นของสับสเตรท Morley และ Jones (1980) พบว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรท 3-O-methlyfluorescein phosphate 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยเครื่อง Aminco-Bowman Spectrophotofluorimeter ความยาวคลื่น 468:512 นาโนเมตร ให้ค่าการเรืองแสงไม่ต่างกัน แต่ที่ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าการเรืองแสงสูงกว่า และแนะนำว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรท 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น่าจะเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทำ Fluorescent ELISA

5. วิธีเตรียมแอนติเจน Kishinevsky และ Bar-Joseph(1978)พบว่าแอนติเจนที่ผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที จะมีความเฉพาะ(specificity) สูงกว่า และสามารถตรวจโดยวิธี ELISA ในช่วงความเข้มข้นของแอนติเจนกว้างกว่าแอนติเจนที่ไม่ผ่านความร้อน Fuhrmann และ Wollum (1985) พบว่าการอบไอน้ำแอนติเจนเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ช่วยเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงอย่างมีนัยสำคัญ แต่การอบไอน้ำเมื่อแอนติเจนอยู่ใน coating buffer กลับลดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่ความร้อนไปทำลายแอนติเจนนิคดีเทอร์มิแนนท์ได้ในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งสอดคล้องกับ Kishinevsky และ Gurfel(1980) ที่พบว่า การให้ความร้อนกับเซลและปม ก่อนทำการทดลองจะช่วยเพิ่ม sensitivity นอกจากนี้ Berger และคณะ (1979) พบว่าการแช่แข็งปมทำให้แอนติเจนที่อยู่ภายในปมมีการทำงานของเซลลดลง แต่การทำงานนี้จะกลับคืนมาเมื่อให้ความร้อน โดยการต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ดังนั้นแอนติเจนที่จะนำมาใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA ควรจะแช่ในน้ำเดือดอย่างน้อย 15 นาที ก่อนผสม coating buffer ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ดีขึ้น(Fuhrman และ Wollum ,1985)

6. เซรุ่มที่ได้จากกระต่ายแต่ละตัวมีความเหมาะสมต่อ ELISA ต่างกัน ถึงแม้จะเป็นเซรุ่มต่อไรโซเบียมสายพันธุ์เดียวกัน(Kishinevsky และ Gurfel,1980)

7. ชนิดของ microtiter plate แต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อ ELISA ต่างกัน Furmann และ Wollum (1985) แนะนำว่า Immulon(No.1) Dynatech labolatories เป็นเพลตที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงดี เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ แต่มีราคาแพง

8. ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม Fuhrmann และ Wollum (1985) พบว่าปฏิกิริยาหลังจากใส่แอนติเจน(coating incubations) และหลังจากใส่เซรุ่มต่อไรโซเบียมแอนติเจน (anti-Rhizobium incubations) ใช้ระยะเวลาบ่มสั้นหรือยาวไม่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงในขั้นสุดท้าย แต่ระยะเวลาบ่มหลังใส่เอ็นไซม์-คอนจูเกต(conjugate incubations) มีผลต่อการดูดกลืนแสงในขั้นสุดท้ายของปฏิกิริยา เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงสุดท้ายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการ conjugate และความเข้มข้นของเอนไซม์conjugate ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้คือ อัตราส่วน 1:1000 ใช้เวลา 1 ชั่วโมง สำหรับการเกิดปฏิกิริยา และระยะเวลาที่เหมาะสมหลังจากใส่ซับสเตรต จะเป็น 20 นาที

กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยเบรดิไรโซเบียม

ปกติปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนมักจะเกิดพร้อมกับการเกิดไฮโดรเจน ซึ่งต้องใช้เอทีพีเสมอ คือ มีการใช้พลังงานในรูปของเอทีพีและมีไฮโดรเจนเกิดขึ้น ดังสมการซึ่งรายงานโดย Narula และ Tauro (1988) ดังนี้

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \xrightarrow{\text{nitrogenase}} 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

การตรึงไนโตรเจนโดยเบรดิไรโซเบียมสามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ลักษณะคือ

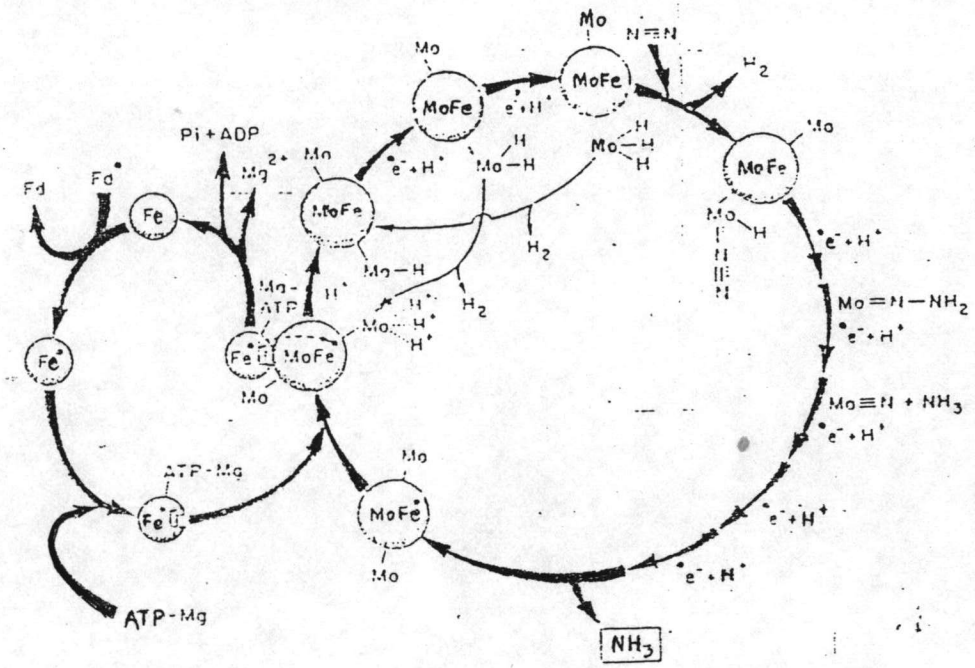
1. เมื่ออยู่ในปมรากพืชตระกูลถั่วหรืออยู่ในสภาพของแบคทีรอยด์ กระบวนการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นที่บริเวณปมของรากถั่ว เมื่อเอาปมมาศึกษากระบวนการตรึงไนโตรเจนแบบ *in vitro* พบว่าในการรีดิวซ์ไนโตรเจน 1 โมล ต้องการเอทีพีอย่างน้อย 12-16 โมล (Burns และ Handy,1975) นอกจากนี้ยังสามารถได้เอทีพีจากการออกซิไดซ์กาซไฮโดรเจนที่เกิดจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสอีกด้วย(Emerich et al.,1979) และจากการศึกษา ในแบคทีรอยด์พบว่า ในขณะที่แบคทีรอยด์ตรึงไนโตรเจนนั้นจะไม่พบเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุมูลแอมโมเนียมเป็นกรดอะมิโน (ammonium assimilation enzymes) (Brown และ Dilworth,1975)

2. เมื่ออยู่ในสภาพจุลินทรีย์อิสระ แต่เดิมเคยเชื่อกันว่าไรโซเบียมจะตรึงไนโตรเจนได้ก็ต่อเมื่ออยู่ภายในปมของพืชที่มันอาศัยอยู่เท่านั้น ความพยายามที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ไรโซเบียมตรึงไนโตรเจนในสภาพเชื้ออิสระนั้น ต้องประสบความล้มเหลวตลอดมา เนื่องจากการแสดงออกของยีนส์ที่ควบคุมไนโตรจีเนสต้องถูกกระตุ้นจากปัจจัยที่มาจากเซลพืช จนกระทั่งได้มีการเลี้ยงไรโซเบียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแคลลัสหรือเซลที่ยังไม่เปลี่ยนแปลง(Callusหรือ undifferentiated cells) ของพืชชนิดต่างๆ พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ (Kurz และ LaRue, 1975) จากการศึกษาพบว่า การเหนี่ยวนำเอ็นไซม์นี้จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีปัจจัยบางอย่างที่หลั่งออกมาจากพืช ซึ่งได้แก่เมตาโบไลท์ของพืช (plant metabolites)น้ำตาล เช่นไซโลส,อราบิโนส และกาแลคโตส รวมทั้งตัวกลางในวัฏจักรเครป

(Kreb's cycle intermediates)เช่น อลานิน และ ลิวซีน

ดังนั้นจึงได้มีการเลี้ยงไรโซเบียมในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีน้ำตาลหลายชนิด พบว่าอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเท่านั้นที่สามารถเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว พบว่าความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำเท่านั้น ที่จำเป็นในการเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส(Tjepkema และ Evans, 1975)

ในปี ค.ศ.1980 Brill รายงานว่าเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 2 ชนิด ชนิดแรกเรียกว่า คอมโพเนนท์หนึ่งหรือโมลิบดีนัมเหล็กโปรตีนหรือไนโตรจีเนส (ComponentI or MoFe protein or nitrogenase) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000-250,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโมลิบดีนัม 2 อะตอม สารประกอบที่มีเหล็กซึ่งไม่อยู่ในโมเลกุลของฮีม (nonheme iron) 28-34 อะตอม และอนุมูลหมู่ซัลไฟด์ที่ไม่เสถียรในกรด (acid-labile sulfide)26-28 อะตอม นอกจากนี้คอมโพเนนท์นี้ยังประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ($\alpha_2\beta_2$) แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60,000 ดาลตัน ส่วนที่สองเรียกว่าคอมโพเนนท์สองหรือเหล็กโปรตีนหรือไนโตรจีเนสรีดักเตส (component II or Fe protein or nitrogenase reductase) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 - 65,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยเดี่ยวๆ 2 หน่วย โปรตีนนี้ประกอบด้วยเหล็กที่ไม่อยู่ในโมเลกุลของฮีม 4 อะตอม และหมู่อนุมูลซัลไฟด์ที่ไม่เสถียรในกรด 4 อะตอม คอมโพเนนท์ที่สองทำหน้าที่ในการนำอิเลคตรอนไปยังคอมโพเนนท์หนึ่ง หลังจากที่คอมโพเนนท์สองให้อิเลคตรอนแล้ว ก็จะแยกตัวออกจากคอมโพเนนท์หนึ่ง และถูกรีดิวซ์โดยเฟอริดอกซิน หลังจากนั้นจะรวมตัวกับ Mg-ATP ซึ่งจะนำอิเลคตรอนส่งต่อไปยังคอมโพเนนท์หนึ่งต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงบทบาทของเหล็กโปรตีน (Fe-protein) (Fe) และโมลิบดีนัมเหล็กโปรตีน(MoFe protein)(MoFe) ในการตรึงไนโตรเจนและการเกิดไฮโดรเจน (H_2) โดยปฏิกิริยาการเร่งของไนโตรจีเนส (Evans et al.,1987)

ปี ค.ศ.1987 Evans และคณะ รายงานว่า ตัวรีดิวซ์ที่ช่วยในการทำงานของไนโตรจีเนสในไรโซเบียมคือ รีดิวซ์เฟอริดอกซิน (reduced ferredoxin) (Fd^-) อิเลคตรอนถูกเคลื่อนย้ายไปยังเหล็กโปรตีนของไนโตรจีเนส ซึ่งจะรวมกับ Mg-ATP ก่อนที่จะรวมกับโมลิบดีนัมเหล็กโปรตีน มีการเคลื่อนย้าย 1อิเลคตรอนไปยังโมลิบดีนัมเหล็กโปรตีน หลังจากนั้นจึงแยกตัวออก ในรูปที่ 1 มีการเคลื่อนย้าย 3 อิเลคตรอนจากเหล็กโปรตีนไปยังโมลิบดีนัมเหล็กโปรตีน ได้โมลิบดีนัมเหล็กโปรตีนที่มี 3 ไฮโดรเจน ไนโตรเจนอาจแทนที่ 2 ไฮโดรเจนอะตอม ที่มาจากโมลิบดีนัมเหล็กโปรตีนไตรไฮไดรด์ ซึ่งผลการรวมของไนโตรเจนและไฮโดรเจนที่เกี่ยวข้องจะต้องใช้ถึง 6 อิเลคตรอน

สำหรับการสร้างแอมโมเนีย 2 โมเลกุล ความจำเป็นของไนโตรเจนสำหรับการสร้างไฮโดรเจนมาจากโมลิบดินัมเหล็กโปรตีนไตรไฮไดรด์ คือ 1 โมลของไฮโดรเจนต่อโมลของไนโตรเจนที่ถูกรีดิวส์

การส่งอิเลคตรอนให้กับไนโตรเจนหรือโปรตอน ขณะที่มีการทำงานของไนโตรจีเนสขึ้นอยู่กับอัตราการหมุนกลับของโมลิบดินัมเหล็กของไนโตรจีเนส ปฏิกิริยาที่เหมาะสมขององค์ประกอบไนโตรจีเนส และความเข้มข้นที่พอเหมาะของ Mg-ATP

เทคนิคในการวัดการตรึงไนโตรเจน

การหาปริมาณการตรึงไนโตรเจนสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ การวัดปริมาณ $^{15}N_2$ ที่ถูกนำไปใช้ ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ด้วยแมสสเปคโตรมิเตอร์ (mass spectrophotometer) (Burris และ Wilson ,1957) การวัดอัตราการรีดิวซ์เอทิลีนโดยเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสด้วยเครื่องกาซโครมาโตรกราฟฟี (gas chromatography) (Koch และ Evans,1966;Hardy et al.,1968) การวัดอัตราการออกซิไดซ์โซเดียมไดไทโอไนท์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นรีดัคแตนท์(reductant) ของปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Ljones และ Burris, 1972) การวัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดย วิธีเคดาห์ล (Kjaldahl's method) (Burris, 1972) การหาปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจนโดยการออกซิไดซ์เอทิลีนให้เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ แล้ววัดสีที่เกิดขึ้นโดย ให้ฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับสารละลายแนชรีเอเยนต์(Nash reagent) ด้วยเครื่องโคโรริมิเตอร์ (Colorimeter) (LaRue และKurz, 1973)เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการศึกษาการตรึงไนโตรเจนทั้งหมดนี้ในห้องปฏิบัติการ การวัดอัตราการรีดิวซ์อะเซทิลีนเป็นเอทิลีน ด้วยเครื่องกาซโครมาโตรกราฟฟีจะได้รับความนิยมมากที่สุด (Hardy etal.,1968) เนื่องจาก

1. มีความไวสูง(sensitivity) คือมีความไวมากกว่าการใช้ $^{15}N_2$ ถึง1,000 เท่า
2. สะดวก(facility) เพราะทั้งอะเซทิลีนและเอทิลีนเป็นกาซ แค่เพียงใช้เครื่องกาซโครมาโตรกราฟฟี ก็สามารถตรวจวัดผลได้ทั้งหมด

3. มีกาซเอทิลีนเป็น natural internal standard สำหรับการวิเคราะห์ จึงสามารถวัดไปพร้อมกับเอทิลีนได้เลย
4. มีความจำเพาะสูง (specificity) เพราะกาซเอทิลีนที่เกิดขึ้นมีความคงตัวสูง และสามารถแยกจากกาซอื่นๆ เช่น อะเซทิลีน มีเทน ได้ชัดเจน เมื่อใช้กาซโครมาโตรกราฟฟี
5. ทำได้รวดเร็วกว่าวิธีอื่น
6. ผลผลิตที่วิเคราะห์เกิดการสูญหายน้อยมาก เนื่องจากมี gas-tight container
7. เสียค่าใช้จ่ายน้อย
8. สามารถเก็บรักษาตัวอย่างไว้ได้ และนำมาใช้ตรวจวัดเพื่อยืนยันผลการทดลองได้อีก

ต่อมาจึงได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาอะเซทิลีนรีดัคชั่น (acethylene reduction) เช่นในปี ค.ศ. 1975 Keister ใช้เชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ เลี้ยงในสภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลต่ำๆประมาณ 10^7 เซลต่อมิลลิลิตร และมีความเข้มข้นของออกซิเจนที่ต่ำมากๆคือมีออกซิเจนน้อยกว่า 2เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้เอทิลีนปริมาณมากและพบว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมคือปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะต่ำกว่าที่เชื้อใช้ในการดำรงชีวิตปกติ ในสภาวะนี้เอ็นไซม์ไนโตรจีเนสจะไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดยแอมโมเนียมคลอไรด์(Keister และ Evans, 1976) ส่วนวิธีที่ใช้ทั่วๆไปในปัจจุบันก็คือ การวัดน้ำหนักแห้งของต้นพืช จำนวนปม และน้ำหนักแห้งของปม เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาอะเซทิลีนรีดัคชัน (Somasegaran และ Hoben, 1985)

ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นขณะที่มีการตรึงไนโตรเจน

จากสมการการตรึงไนโตรเจน

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16ATP \xrightarrow{nitrogenase} 2NH_3 + 16\ ADP + 16Pi + H_2$$

Schubert และ Evans(1976) พบว่าจะมีการสูญเสียพลังงานในรูปของไฮโดรเจนในขณะที่มีการตรึงไนโตรเจนถึง 25 เปอร์เซ็นต์ จำนวนของอิเลคตรอนระหว่างไนโตรเจนและโปรตรอน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ อัตราส่วนของ 2 โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไนโตรจีเนสและอัตราส่วนของเอทีพีกับเอดีพี (ATP:ADP ratio) (Evans et al.,1987) นอกจากนี้อุณหภูมิและความดันของออกซิเจน ยังมีผลต่อการสูญเสียไฮโดรเจนจากปมอีกด้วย (Eisbrenner และ Evans,1983)

เอ็นไซม์ไฮโดรจีเนส

เนื่องจากในการตรึงไนโตรเจน มีการสูญเสียพลังงานในรูปของไฮโดรเจนดังกล่าวมาแล้วข้างต้น เบรดิไรโซเบียมบางสายพันธุ์ สามารถนำไฮโดรเจนบางส่วนหรือทั้งหมดที่เสียไปกลับมาใช้ได้อีกโดยเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนส ดังสมการ

$$H_2 \xrightarrow{hydrogenase} 2H^+ + 2e^-$$

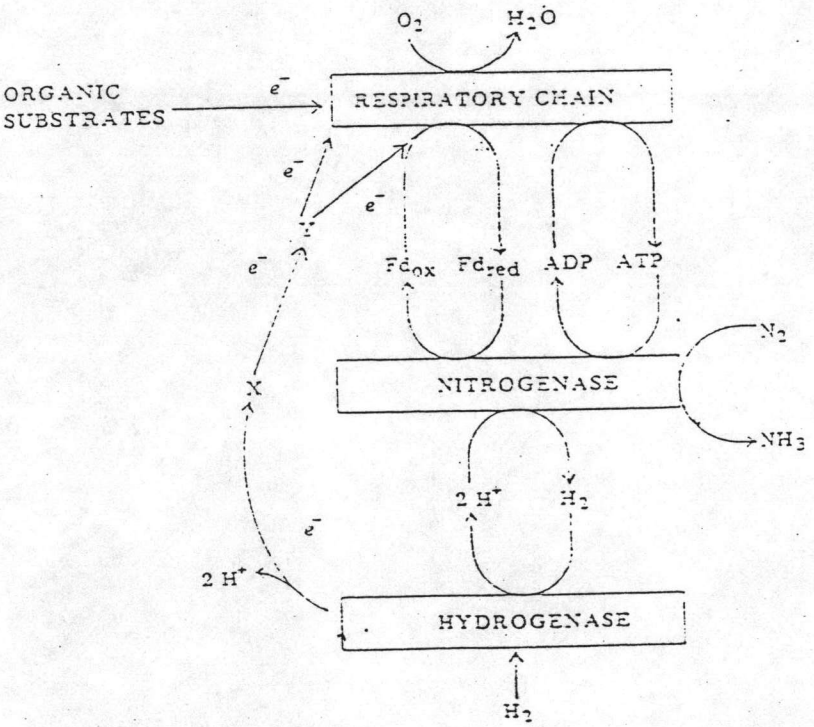
ดังนั้น จึงมีผู้รายงานว่าไฮโดรจีเนสอาจมีส่วนช่วยรักษาพลังงานและเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน (Albrecht et al.,1979 ;Pahwa and Dogra,1983 ;Van soom et al.,1993)

ในปี ค.ศ. 1972 Dixon ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าการเกิดไฮโดรเจนออกซิเดชันในแบคทีรอยด์เป็นการสร้างเอทีพี นอกจากนี้เขายังให้ข้อสังเกตอีกว่า ในขณะที่อัตราของไฮโดรเจนออกซิเดชันสูง อัตราการนำออกซิเจนเข้าไปในเซลก็จะสูงด้วย จากผลที่ได้นี้เขาได้คาดคะเนหน้าที่ของไฮโดรเจนออกซิเดชั่นในไรโซเบียม 3 ประการ ดังนี้

1. ป้องกันไนโตรจีเนสจากไฮโดรเจน

2. สร้างพลังงานสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของไนโตรจีเนส

3. ป้องกันไนโตรจีเนสจากออกซิเจน โดยH^+ ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นทำปฏิกิริยารีดักชั่นกับออกซิเจน ได้โมเลกุลของน้ำ



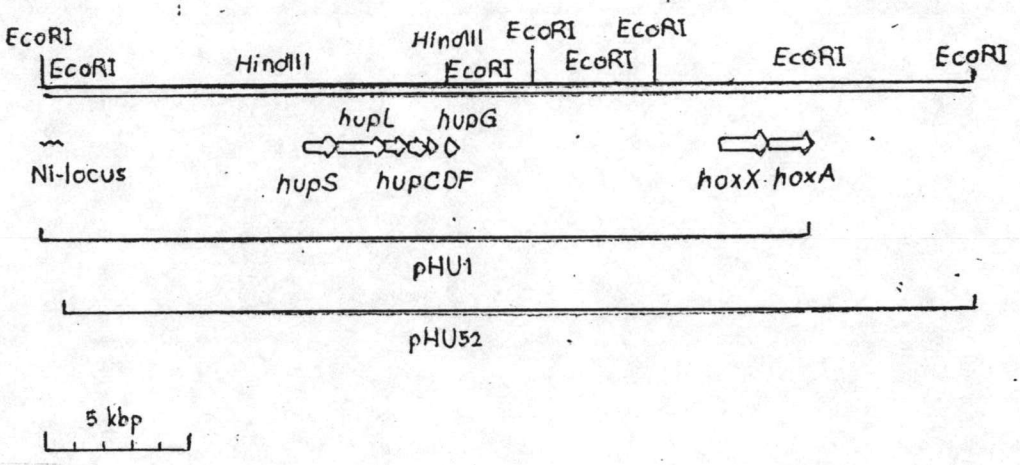
รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการตรึงไนโตรเจนและไฮโดรเจนออกซิเดชัน

(Adams et al., 1981)

Evans และคณะ(1987)รายงานว่า ยูบิควิโนน (UQ) เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอิเลคตรอนจากไฮโดรเจนไปยังออกซิเจนใน *B. japonicum* ไซโตโครม o และ aa_3 เป็นตัวออกซิไดซ์ตัวสุดท้าย ไซโตโครมชนิด b และ c เป็นตัวนำอิเลคตรอน และ UQ เป็นตัวนำไฮโดรเจน ซึ่งอยู่ในเซล *B. japonicum* จากการสกัดเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากเมมเบรนของ *R. leguminosarum*, *Agrobacter* และ *Xanthobacter autotrophicus* ในเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีไซโตโครม b ในอัตราส่วน 1 โมลต่อโมลของเอนไซม์ ทำให้มีการคาดว่าไซโตโครม b น่าจะเป็นตัวรับอิเลคตรอน สำหรับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสใน *B. japonicum* ในรูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ภายในระหว่างการตรึงไนโตรเจนและไฮโดรเจนออกซิเดชั่น

เอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสอยู่ในเมมเบรน(membrane)ของ *R.japonicum* แบคทีรอยด์ (Eisbrenner และ Evans ,1983) เป็นเอ็นไซม์ที่มีนิเกิล(Ni)เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 0.6 โมลนิเกิลต่อโมลเอ็นไซม์(Arp,1985)เอ็นไซม์ เป็นเหล็ก-ซัลเฟอร์โปรตีน (Fe-S proteins) จะไม่ถูกออกซิเจนทำลายถ้าอยู่ในเมมเบรน แต่ถ้าละลายอยู่ในสารละลายจะถูกทำลายได้ง่ายโดยออกซิเจน(Maier ,1986) ไฮโดรจีเนสที่สกัดจาก *B.japonicum* ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ประมาณ 63 และ 33 กิโลดาลตัน(Kd) ทั้ง 2 หน่วยย่อย จะปรากฏอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โมลาร์ ทำงานได้ดีที่พีเอชระหว่าง 5.5-6.0 (Evans et al., 1987) ต่อมาในปี ค.ศ. 1993 Van Soom และคณะ รายงานว่าไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส (H_2 uptake hydrogenase) (Hup) เป็นเอ็นไซม์ที่มีอยู่ในเบรดิไรโซเบียมบางสายพันธุ์ มีความไวต่อออกซิเจน สามารถดึงไฮโดรเจนที่ถูกปล่อยออกมาจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน กลับเข้าไปใช้ได้อีก เป็นเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วยนิเกิล (Ni^{2+}) ตั้งอยู่ในเพอริพลาสมิคสเปซ (periplasmic space) สามารถออกซิไดซ์ไฮโดรเจนแบบปฏิกิริยาผันกลับได้(reversible) และส่งอิเลคตรอนให้กับออกซิเจนผ่านเข้าสู่สายโซ่การส่งอิเลคตรอน มีโครงสร้างและปฏิกิริยาทางอิมมุโนวิทยา สัมพันธ์กับไฮโดรจีเนสที่มีนิเกิลเป็นองค์ประกอบในแบคทีเรียอื่นๆเช่น *Desulfovibrio gigas*,*D.baculatus*, *Rhodobacter capsulatus* และ*Azotobacter vinelandii*

อัพยีน(*hup* gene)



รูปที่ 3 แสดงบริเวณของ *hup* ของ *B.japonicum* พร้อมทั้งตำแหน่งที่ตั้งของยีน (Van Soom et al.,1993)

บริเวณ 15 กิโลเบส (kbp) ดีเอ็นเอ บนโครโมโซมของ *B. japonicum* มีความสำคัญสำหรับลักษณะการแสดงออก(phenotype)ของ *hup* และมียีนส์โครงสร้างไฮโดรจีเนส Hugland และคณะ (1984) รายงานว่า บนชิ้นส่วน 5.9 กิโลเบสแพร์ HindIII-HindIII ปรากฏใน pHU52 และ pHU1 ดังรูปที่ 3 ในปี ค.ศ.1988 Sayavedra-Sota และคณะ ได้ยืนยันโดยตีพิมพ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนส์โครงสร้างไฮโดรจีเนสของ *B. japonicum* บริเวณ 5.9 กิโลเบส HindIII-HindIII ถูกตรวจสอบขนาดและลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยไฮโดรจีเนส พบว่ายีนส์ที่ระบุหน่วยย่อยขนาดเล็กของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสคือ *hupS* อยู่บริเวณด้านหน้าถัดจาก *hupL* ซึ่งเป็นยีนส์ที่ระบุหน่วยย่อยขนาดใหญ่ และทั้ง 2 ยีนส์เป็นองค์ประกอบของโอเปอรอนเดียวกัน ลำดับกรดอะมิโนของ *HupS* ประกอบด้วยลีดเดอร์เปปไทด์ (leader peptide) จำนวน 46 กรดอะมิโน

นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีนโครงสร้างไฮโดรจีเนสของ *B. japonicum* ยังคล้ายกับของ *Desulfovibrio gigas, D. baculatus* และ *Rhodobacter capsulatus* (Sayavedra-Soto et al.,1988) ถัดจาก *hupS* และ *hupL* จะเป็น third reading frame มียีนส์ที่เรียกว่า *hupC* ซึ่งระบุระหัสการสังเคราะห์โพลีเปปไทด์ที่ไม่ชอบน้ำมากๆ (highly hydrophobic polypeptide)

ในปี ค.ศ. 1992 Hidalgo และคณะ ได้แสดงให้เห็นว่าผลผลิตที่ได้ของ third reading frame นี้คือ b-type cytochrome เกี่ยวข้องในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนจากเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสไปยังกระบวนการหายใจ (respiratory chain) ใน *B. japonicum* พบว่า b-type cytocrome (component b559)จะถูกรีดิวซ์โดยไฮโดรเจน และทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งอิเลคตรอน ระหว่างไฮโดรจีเนสและยูบิควิโนน (Eisbrenner และ Evans ,1982) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถัดจาก *hupC* ไปทางด้านท้าย(downstream) มี 3 ยีนส์คือ *hupD, hupF* และ *hupG* ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับยีนส์บริเวณที่อยู่ถัดจากยีนส์โครงสร้างไฮโดรจีเนส ไปทางด้านท้ายใน *R. leguminosarum* (Hidalgo et al.,1992) ปี ค.ศ.1993 Fu และ Maier พบว่า *B. japonicum* มิวแตนท์(mutant)มีชิ้นส่วนขนาด 2.9 กิโลเบสEcoR1 หายไป ซึ่งตั้งอยู่ทางด้านท้ายของบริเวณ 2.2 กิโลเบสของยีนส์โครงสร้างไฮโดรจีเนส ดังในรูปที่ 3 นั้นก็คือ*hup*$^-$ ทำให้ไม่มีการทำงานของไฮโดรจีเนส ชิ้นส่วนนี้จะมียีนส์ *hupG* อยู่บริเวณถัดจากยีนส์โครงสร้างด้านท้าย (Sayavedra-Soto et al.,1988) ในปี ค.ศ.1993 Van Soom และคณะ ทำ Southern hybridization กับ ยีนส์โครงสร้าง *hupS* และ *hupL* ของ *B.japonicum* พบว่า *hup* อยู่บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 5.9 กิโลเบส HindIII

การควบคุมการทำงานของไฮโดรจีเนสในสภาวะเซลอิสระ (free-living) โดยใช้สายพันธุ์ *hup*$^+$ เพื่อดูการแสดงออกของไฮโดรจีเนสนั้น เชื้อต้องการสภาพอากาศที่มีไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบและมีการเติมนิเกิลลงในอาหารด้วย(Ni^{2+})(Maier et al.,1978) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณที่อยู่ด้านหน้าของยีนส์โครงสร้างไฮโดรจีเนส จำเป็นสำหรับการควบคุมการลอกรหัส(transcription) ของการแสดงออกของไฮโดรจีเนสโดยออกซิเจน , ไฮโดรเจน และนิเกิล พบว่ายีน *hup* จะเกิดtranscriptionในที่ที่มีความเข้มข้นของไฮโดรเจน 0.1-10 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของออกซิเจน 0.1-3.0 เปอร์เซ็นต์และมีนิเกิลเป็นส่วนผสมในอาหารเท่านั้น(Kim et al.,1991)

ผลของไฮโดรจีเนสฟีโนไทป์ต่อการเจริญของพืช

ความสัมพันธ์ระหว่างพืชตระกูลถั่วกับไรโซเบียมเกี่ยวกับบทบาทของ*hup* (H_2 uptake hydrogenase)ยังมีความซับซ้อนอยู่อีกมาก และเป็นสิ่งที่น่าศึกษาพอๆกับหาความสัมพันธ์ของกลไกการทำงานระหว่างไฮโดรเจนและไนโตรเจนในปม ในปี ค.ศ. 1978 Schubert และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ATP ที่เกิดจากการคะตะไลซ์ไฮโดรเจนโดยไนโตรจีเนสและการออกซิไดซ์ไฮโดรเจนโดยไฮโดรจีเนส โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วโดยใช้ *Glycine max* L.Merr.cv.Anoka และ *Vigna unguiculata* L.Walp. c.v. Whippoorwill ใส่สายพันธุ์ไรโซเบียมต่างชนิดกัน พบว่าบทบาทของกระบวนการนำไฮโดรเจนกลับเข้าไปใช้อีก (H_2 recycling process) ในประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของพืชตระกูลถั่วต้องการการเปรียบเทียบของสายพันธุ์ไรโซเบียม ที่มียีนส์โครงสร้างของไฮโดรจีเนสอยู่ด้วย ไรโซเบียมบางสายพันธุ์สร้างระบบไฮโดรจีเนสในแบคทีรอยด์ในปมรากพืชตระกูลถั่ว ระบบนี้อาจจะเป็นการนำไฮโดรเจนที่สูญเสียไปจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนกลับเข้าไปใช้ และให้ผลผลิตมากกว่าถั่วเหลือง ที่ใช้เชื้อสายพันธุ์ที่ขาดระบบไฮโดรจีเนส (Albrecht et al., 1979 ; Pahwa and Dogra 1983) ทั้งนี้เนื่องจากการออกซิไดซ์ไฮโดรเจนโดยไฮโดรเจนอัพเทค *R. japonicum* จะสร้างพลังงานช่วยสำหรับปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน ป้องกันไนโตรจีเนสจากการทำลายของออกซิเจน และป้องกันไนโตรจีเนสจากการ

ทำลายของไฮโดรเจน (Dixon, 1972) ในปี ค.ศ. 1986 Cunningham และคณะ ยังพบว่า ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากปมราก alfalfa ขณะที่มีการตรึงไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการกระจายของแบคทีเรียดิน ที่อยู่รอบๆทั้งในด้านจำนวนและชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้ไฮโดรเจนได้ ทำให้มีประโยชน์ต่อการคัดเลือก *B.japonicum* สายพันธุ์ที่มีลักษณะของยีน *hup* ได้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น