หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

การวิจารณ์ผลการทดลอง

ดินเค็มเป็นปัญหาที่พบบ่อยในทางเกษตรกรรม ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อพืชและจุลชีพที่อาศัยอยู่ในดิน ไรโซเบียมแต่ละชนิด (species) และแต่ละสายพันธุ์ (strains) สามารถทนเค็มของโซเดียมคลอไรด์ได้แตกต่างกัน (Rai & Prasad, 1983) ในทำนองเดียวกันความสามารถในการทนเค็มของพืชแต่ละชนิดก็แตกต่างกันด้วย (Wilson & Norris, 1970) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การอยู่ร่วมแบบซิมไบโอซิสระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วเกิดขึ้นไม่ได้ อันเนื่องมาจากการล้มเหลวของระบบสื่อสารทางเคมี (chemotaxis) การม้วนตัวของรากขนอ่อนและความล้มเหลวในกระบวนการเข้าสู่รากของไรโซเบียม ดังนั้นการทำกสิกรรมในพื้นที่ที่มีดินเค็มอาจทำได้โดยใช้ไรโซเบียมกับพืชจำเพาะสายพันธุ์ที่ทนเค็มได้

การติดตามความสามารถของการเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์จึงเป็นความจำเป็นพื้นฐานในการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียม เพื่อใช้ประโยชน์ในการเกษตร

1. <u>การเจริญของไรโซเบียมในสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์</u>

การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ทั่วๆ ไปสามารถติดตามโดยใช้ค่าความขุ่นแทนการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต แต่สำหรับไรโซเบียม ไม่สามารถศึกษาการเจริญจากการวัดค่าความขุ่นได้โดยตรง เนื่องจากค่าความขุ่นในบางช่วงของการเจริญจะไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ทั้งนี้ตัดสินได้จากการเปรียบเทียบการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG และ MMG (รูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ)

การเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG และ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ 0.3 และ 0.5 โมลาร์ มีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างกัน (รูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ) ในขณะที่การเจริญในสภาวะปกติในอาหารสูตรปรับต่ำทั้งสองดังกล่าวมีค่าการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกัน และพบปรากฏการณ์ที่คล้ายคลึงกันใน <u>Rhizobium meliloti</u> TAL 380 (รูปที่ 5 และ 6) แสดงให้เห็นว่าสารต้นตอคาร์บอนต่างชนิดกันมีผลต่อการเจริญในสภาวะเครียดของโซเดียมคลอไรด์

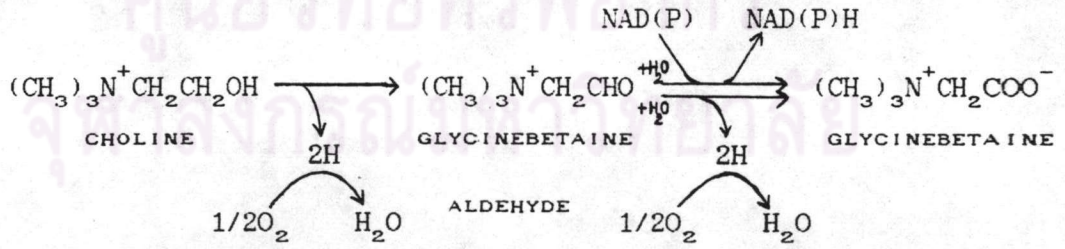
เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 1 ก, ข และ ค ด้วยกัน จะสรุปได้ว่า การเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่ความขุ่นของคัลเจอร์ระหว่าง 40 ถึง 210 KU คือระยะการแบ่งตัวทวีคูณ เซลล์ที่แบ่งตัวในช่วงระยะนี้มีค่าระหว่าง $4x10^7$-$1x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับการแบ่งตัวประมาณ 3-4 ครั้ง ค่าการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่าจึงเท่ากับประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อเปลี่ยนเป็นอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ก็พบปรากฏการณ์นี้เช่นกัน ดังนั้นการที่พบค่าความขุ่นของคัลเจอร์ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG สูงมากกว่า 400 KU จึงเป็นเครื่องหมายที่แสดงว่าเป็นเพียงเมือกที่แบคทีเรียขับออกมาเท่านั้น (รูปที่ 2 ก) เมือกที่ผลิตขึ้นมาในปริมาณมากจะมีประโยชน์ต่อการปรับตัวของแบคทีเรีย สามารถป้องกันสิ่งแปลกปลอมได้นานาชนิด และยังมีความสำคัญต่อการอยู่ร่วมกันระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว จะเห็นได้ว่า ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG นั้น ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 สามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ได้สูงถึง 0.5 โมลาร์ ค่าความขุ่นสูงสุดในอาหารดังกล่าวเมื่อมีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ต่ำกว่าเมื่อไม่มีโซเดียมคลอไรด์เพียงเล็กน้อย (รูปที่ 3) ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีความเครียดสูงเช่นนี้ ไม่พบในการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG (รูปที่ 4) สมมติฐานเกี่ยวกับการผลิตเมือกได้ดีในอาหารสูตร MMG จึงน่าจะเป็นไปได้ แต่การที่ TAL 141 เจริญในสภาวะที่มีความเครียดสูงได้ช้ากว่าเมื่อไม่มีความเครียด เป็นเครื่องหมายแสดงว่าเซลล์ต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้น น่าจะเป็นไปได้ว่า พลังงานที่เพิ่มขึ้นนี้ก็เพื่อจะขับโซเดียมคลอไรด์ออกภายนอกเซลล์นั่นเอง เพราะสิ่งมีชีวิตทั่วไปต้องการรักษาปริมาณโปแตสเซียมไว้ภายใน และขับโซเดียมคลอไรด์ออกภายนอกเสมอ

เมื่อได้ทดลองศึกษาการเจริญในอาหารสูตร MMG ของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 380 ซึ่งเป็นไรโซเบียมที่เจริญเติบโตเร็ว ว่าจะมีรูปแบบของการทนความเครียดได้เช่นเดียวกับ TAL 141 หรือไม่ ผลที่ได้ในรูปที่ 5 แสดงว่า น่าจะใช้สมมติฐานเรื่องการสร้างเมือกมาอธิบายได้ แต่ครั้นใช้อาหารสูตร MGG บ้าง กลับพบว่าในอาหารสูตรนี้ การทนความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ดีกว่าสายพันธุ์ TAL 141 แสดงว่า ระบบการทนเครียดระหว่างไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 และ TAL 380 อาจแตกต่างกัน

เพื่อทดสอบสมมติฐานนี้ จึงได้เจริญ TAL 141 และ TAL 380 ในสภาพที่มีโพรลีนและไกลซีนบีเทน ผลการทดลองพบว่า โพรลีนไม่ได้ช่วยให้รูปแบบการเจริญแตกต่างไป (ไม่ได้รายงานผล) แต่ไกลซีนบีเทน 1 มิลลิโมลาร์ กลับช่วยเพิ่มการเจริญของ TAL 141 ในขณะที่ไม่ช่วยเพิ่มการเจริญของ TAL 380 แสดงว่าระบบการต้านทานความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ของไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์น่าจะต่างกัน

มีข้อน่าสังเกตว่า ไกลซีนบีเทนจะช่วยทำให้ TAL 141 ที่หยุดการเจริญในสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์สูง 0.5 โมลาร์ ให้สามารถเจริญต่อไปได้ (รูปที่ 7) ปรากฏการณ์นี้แสดงว่าเมตาบอลิสมของ TAL 141 จะต้องปกติ เพียงแต่พลังงานที่สร้างขึ้นไม่มากพอที่จะทำให้เซลล์สามารถที่จะเจริญแบ่งตัวได้ ครั้นเติมไกลซีนบีเทนลงไปพลังงานก็สามารถถูกสร้างมากขึ้นได้ มากพอที่เซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ด้วย และการสังเคราะห์พลังงานโดยอาศัยไกลซีนบีเทนนี้ มีการยับยั้งป้อนกลับด้วยคือ ถ้าหากความเข้มข้นของไกลซีนบีเทนไม่พอเหมาะ การสังเคราะห์พลังงานก็จะสูงค่าหนึ่ง แต่ถ้าความเข้มข้นของไกลซีนบีเทนพอเหมาะ (1 มิลลิโมลาร์) พลังงานภายในจะสังเคราะห์ได้มากจนสามารถทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนจาก 4.4×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 3.2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ สามารถเพิ่มการสังเคราะห์พลังงานได้สูงอีกประมาณ 6 เท่าตัว การทดลองนี้ทำให้เข้าใจได้ว่า การหยุดการเจริญของ TAL 141 ใน MGG มิได้มีสาเหตุจากการขาดแคลนสารต้นตอคาร์บอน แต่กลับมีสาเหตุจากการควบคุมการสังเคราะห์พลังงานมากกว่าอย่างอื่น

ใน Escherichia coli ไกลซีนบีเทนก็เป็นสารเมตาบอไลต์ที่ทำให้ Escherichia coli สามารถเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณสูงได้ (osmotolerance) โดยพบว่าสารนี้จะเป็นตัวชักนำการสังเคราะห์เอนไซม์ Glycine betaine aldehyde dehydrogenase ทำให้ Escherichia coli สามารถปลดปล่อย reducing power ได้ (Landfald et al., 1986) ดังสมการ



Smith et al. (1988) รายงานว่า มีผู้พบไกลซีนบีเทน สามารถทำหน้าที่เป็นสารปรับสมดุลย์ออสโมติกใน Rhizobium meliloti โดยสารดังกล่าวนี้สามารถเป็นสารป้องกันความเครียดออสโมติกสำหรับไรโซเบียม ทั้งในสภาพอิสระและในสภาพที่อยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่ว แต่บทบาทของไกลซีนบีเทน ใน R. meliloti จะแตกต่างจากใน E. coli คือ ไรโซเบียม

ดังกล่าวสามารถใช้ไกลซีนบีเทน เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนได้ เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีออสโมลาริตีต่ำ และจะสะสมไกลซีนบีเทน เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีออสโมลาริตีสูง Smith พบว่า บทบาททั้งสองดังกล่าวของ ไกลซีนบีเทน ใน R. meliloti ถูกควบคุมโดยระดับออสโมติกของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไปมีผลควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์และสลายไกลซีนบีเทน โดยในสภาพแวดล้อมที่มีระดับออสโมติกสูง จะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายไกลซีนบีเทน ทำให้มีการสะสมไกลซีนบีเทน เมื่อเกิดความเครียดของเซลล์

จากงานวิจัยนี้ R. meliloti TAL 380 มีความสามารถในการทนเค็มในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งไม่เสริมไกลซีนบีเทนได้ในระดับสูงกว่า Rhizobium sp. TAL 141 แต่เมื่อเสริมไกลซีนบีเทนลงในอาหารดังกล่าว กลับพบว่าไกลซีนบีเทนสามารถช่วยเพิ่มการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ซึ่งเป็นความเครียดระดับเดียกับที่ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 380 สามารถเจริญได้โดยไม่ต้องเสริมไกลซีนบีเทน

จากรายงานข้างต้นที่ว่า R. meliloti มีกลไกในการทนเค็มโดยใช้ไกลซีนบีเทนเป็นสารปรับสมดุลย์ออสโมติก ก็น่าจะอธิบายได้ว่า กลไกการทนเค็มของ R. meliloti TAL 380 และ Rhizobium sp. TAL 141 ไม่น่าแตกต่างกันโดยสิ้นเชิง ซึ่งอธิบายได้ด้วยเหตุผลที่ว่า R. meliloti TAL 380 น่าจะมีการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนได้ภายในเซลล์ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสลายไกลซีนบีเทน และเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนให้ทำงานมากขึ้น เช่นเดียวกับ R. meliloti ทั่วไป แต่อย่างไรก็ตามความสามารถของไกลซีนบีเทนในการทำหน้าที่เป็นสารปรับสมดุลย์ออสโมติกย่อมมีขีดจำกัด ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในการเสริมไกลซีนบีเทนให้แก่ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในสภาวะที่มีความเครียดออสโมติก

อาจตั้งสมมติฐานได้ว่า กลไกในการทนเค็มของไรโซเบียมทั้งสองน่าจะคล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันเพียงแหล่งที่มาของไกลซีนบีเทน ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารปรับสมดุลย์ออสโมติก สิ่งที่จะพิสูจน์สมมติฐานนี้ได้ก็คือ การตรวจสอบแอคทิวิตีของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสมของไกลซีนบีเทน

นอกจากการปรับสมดุลย์ออสโมติกของแบคทีเรียโดยวิธีการที่กล่าวมาแล้ว ยังมีวิธีการอื่นๆ อีก ซึ่งพัชรี เจียรนัยกูร (2528) ได้รวบรวมไว้ดังนี้คือ การปรับสมดุลย์ออสโมติกโดยการ

ผ่านกลไก Na^+/H^+ antiporter เพื่อขจัดโซเดียมออกนอกเซลล์และควบคุมการเคลื่อนที่ของน้ำ และการผ่านกลไกของโปรตีนพอรีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นรูให้สารโมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายน้ำผ่านได้โดยวิธีการแพร่แบบธรรมดา และจากงานวิจัยของเธอที่เกี่ยวกับการคัดเลือกมิวแทนต์ของไรโซเบียมที่มีสมบัติในการทนเค็มได้ เธอพบว่ามิวแทนต์ดังกล่าวมีอัตราการขจัดออกของโซเดียมอิออนสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ผ่านกลไก Na^+/H^+ antiporter

2. การแยกยีนเครื่องหมาย

ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวที่มีอยู่ในสต๊อกของภาควิชาชีวเคมี ที่มีสมบัติพิเศษสามารถทนความเครียดได้สูง คือ ทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 42 °ซ และเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 0.5 โมลาร์ นอกจากนี้ จรัญญา เงินประเสริฐศิริ (2528) ยังได้เคยทดลองกลายพันธุ์ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าได้สายพันธุ์หนึ่งซึ่งมี reversion frequency น้อยกว่า 10^{-5} ต่อเซลล์ และสามารถกำจัดอำนาจการทนเครียดทั้งสองดังกล่าวข้างต้นได้พร้อมกัน ดังนั้นไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีสมบัติทางสรีรวิทยาที่ดี ซึ่งน่าจะใช้เป็นสายพันธุ์ให้ยีนแก่ไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่สามารถทนเครียดและทนอุณหภูมิสูงได้ โดยเฉพาะ Rhizobium fredii ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำไร่ถั่วเหลือง

การแยกยีนเครื่องหมายในไรโซเบียมโดยการกลายพันธุ์ อาศัยเทคนิค replica plating ประสบปัญหามากจากการที่ไรโซเบียมสามารถสังเคราะห์เมือกเยิ้มติดกัน ทำให้ไม่สามารถแยกโคโลนีเดี่ยวๆ ออกจากกัน (single colonies) ดังนั้นการศึกษาสรีรวิทยาที่ผ่านมาจึงเป็นประโยชน์โดยตรงต่อการแยกยีนเครื่องหมาย เพราะทำให้สามารถหาสูตรอาหารที่ช่วยลดการสร้างเมือกของไรโซเบียม เช่น การเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารเป็นต้น ด้วยเหตุนี้การแยกยีนเครื่องหมายในไรโซเบียมจึงพอทำได้ ทั้งๆ ที่โดยทางปฏิบัติแล้ว เป็นการแยกมิวแทนต์ที่ยากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Postgate, 1982) สำหรับงานวิจัยนี้ ในขั้นแรกได้แยกยีนเครื่องหมายคือ ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure และพบว่า เป็นมิวแทนต์ที่มียีนเครื่องหมายคงทนถาวรดีพอสมควร จึงได้นำไปศึกษาการสร้างโพรโทพลาสต์ แต่เมื่อได้สภาวะการสร้างโพรโทพลาสต์ที่เหมาะสมแล้ว กลับพบปัญหาเกี่ยวกับการคัดเลือกฟิวแซนต์ จึงต้องกลับมาแยกยีนเครื่องหมายเพิ่ม คือ แยกยีนเครื่องหมาย his จากสายพันธุ์ TAL 141 ure ดังนั้นสายพันธุ์ TAL 141 ure his จึงเป็นสายพันธุ์ double mutation ไรโซเบียมสายพันธุ์นี้จึงเหมาะที่จะ

ใช้เป็นสายพันธุ์ให้ (gene donor) มาก เพราะมีความเสถียรสูง (เนื่องจากการทำ double mutation) ไม่เคยมีปัญหาเรื่องการหวลกลับของฟีโนไทพ์แต่ประการใด ยกเว้นการเจริญในอาหารบางชนิดจะแตกต่างจากสายพันธุ์เดิมบ้างเล็กน้อย (รูปที่ 10) นอกจากนี้สมบัติอื่นๆ ของสายพันธุ์ดังกล่าว เช่น การทนเค็ม การทนอุณหภูมิสูง รวมทั้งความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ กานามัยซิน และ สเตรปโตมัยซิน ยังคงเดิมทุกประการ

Rhizobium fredii USDA 192 เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างปมได้กับถั่วเหลือง แต่ทว่าไม่สามารถทนความเครียดได้ คือ ไม่เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ไม่เจริญในที่อุณหภูมิสูง 42°ซ และไวต่อยาปฏิชีวนะ กานามัยซิน และ สเตรปโตมัยซิน ได้กลายพันธุ์ไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 ครั้งที่หนึ่งเพื่อที่จะแยกออกโซโทรปของกรดอะมิโน กลุ่มที่เป็นออโรมาติก พบว่ามีถึง 5 สายพันธุ์ ที่แสดงสมบัติ pleiotropic กับกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ทริปโตเฟน (Trp) ไทโรซีน (Tyr) และ ฟีนิลอะลานีน (Phe) ซึ่งมี reversion frequency ประมาณ 10^{-6} จากการกลายพันธุ์เพียงครั้งเดียว ได้นำมิวแทนต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ดังกล่าว มาศึกษาสภาวะการสร้างโพรโทพลาสต์และการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ พบว่า มีเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่สามารถหวลคืนผนังเซลล์ได้ภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์ แต่กลับพบว่า ความคงทนถาวรในการเป็น pleiotropism ดังกล่าว ด่อนข้างต่ำ คือ เมื่อถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้ง มีการหวลคืนของยีนเครื่องหมายอย่างช้าๆ โดยการขึ้นเป็นโคโลนีเล็กๆ ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG แต่อย่างใดก็ตามเมื่อเจริญเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นๆ ที่เป็นไรโซเบียมสายพันธุ์ปกติสามารถแยกได้โดยการสังเกตความรวดเร็วในการเจริญนี่เอง (รูปที่ 11) จึงตัดสินใจนำไปใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ในเทคนิคโพรโทพลาสต์ฟิวชัน

3. การสร้างโพรโทพลาสต์

3.1 สภาวะการเจริญของเซลล์ที่ใช้ในการสร้างโพรโทพลาสต์ เนื่องจากไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียกรัมลบ จึงใช้วิธี lysozyme-EDTA ในการสร้างโพรโทพลาสต์ ดังนั้นเซลล์ที่จะนำมาใช้ในการสร้างโพรโทพลาสต์ จะต้องอยู่ในสภาพที่ ไลโซไซม์สามารถผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเปปติโดไกลแคนซึ่งซ่อนอยู่ภายในเยื่อเซลล์สองชั้น อุปสรรคขั้นแรกในการสร้างโพรโทพลาสต์ก็คือ เมือกที่ไรโซเบียมสังเคราะห์ขึ้นจะกีดขวางไม่ให้ไลโซไซม์แทรกเข้าสู่ช่องว่างระหว่างผนังเซลล์ได้ ดังนั้นในการเตรียมเซลล์จึงเลือกใช้สารต้นตอคาร์บอนที่ให้ปริมาณเมือกน้อย รวมทั้งเสริมโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหาร ซึ่งเป็นภาวะที่สังเกตเห็นปริมาณเมือกที่หุ้มโคโลนีอยู่

น้อยมาก

แบคทีเรียต่างชนิดกันจะสังเคราะห์เมือกหุ้มเซลล์ในสภาวะที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น Azotobacter จะสังเคราะห์เมือกปริมาณเล็กน้อยเมื่อเจริญในอาหารสูตรอุดม แต่โดยทั่วไปแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่มีความเครียดหรือกำลังอิออนสูง จะสังเคราะห์เมือกในปริมาณน้อยอยู่แล้ว จากผลการทดลองได้สนับสนุนว่าถ้าเลือกอาหารที่ถูกต้องแล้ว การเก็บเซลล์ระยะ early log หรือ late log ไม่มีผลต่อการสร้างโพรโทพลาสต์แต่อย่างใด มีข้อน่าสังเกตว่าถ้าใช้สูตรอาหารที่ทำให้ปราศจากเมือกอย่างมาก เช่น สูตรอาหารอุดม (YM) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ มีผลต่อความคงทนในการเก็บรักษาโพรโทพลาสต์ที่เตรียมได้ แสดงว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมเท่านั้นที่ทำให้ได้โพรโทพลาสต์เปอร์เซ็นต์สูง

การสร้างโพรโทพลาสต์ในครั้งแรกได้ใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure เป็นตัวอย่างในการศึกษา ครั้นเมื่อสร้างโพรโทพลาสต์ได้ตามความต้องการแล้ว พบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure เป็นสายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาหลอมโพรโทพลาสต์ จึงย้อนกลับไปเตรียมยีนเครื่องหมายอีกครั้งหนึ่ง ได้สายพันธุ์มิวแทนต์อีกชนิดหนึ่งคือ TAL141 ure his ซึ่งคราวนี้พบว่า สายพันธุ์ใหม่นี้จะสังเคราะห์เมือกได้แตกต่างจาก TAL 141 ure จึงทำให้สภาวะการสร้างโพรโทพลาสต์ที่เคยใช้ได้ดีกับ TAL 141 ure ต้องการการปรับปรุงอีกครั้งหนึ่ง

Sagara et al. (1971) เสนอว่าการเจริญเซลล์ไมซีเลียมของ Streptomyces ในอาหารที่เสริมด้วยไกลซีน ที่มีความเข้มข้นในระดับที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตบางส่วน (partially growth inhibitory concentration of glycine) จะทำให้ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยไลโซไซม์เร็วขึ้น Strominger et al.(1965) อธิบายถึงการทำงานของไกลซีนว่ามีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาในการเติม L-alanine เข้าที่ UDP-acetylmuramic acid Coetzee et al. (1979) ใช้วิธี glycine-lysozyme-EDTA ในการสร้างโพรโทพลาสต์ของแบคทีเรียกรัมลบ Providence alcalifaciens

Bourne et al.(1986) รายงานเกี่ยวกับการสร้างโพรโทพลาสต์ของ Bacillus subtilis ไว้ว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลอย่างมากต่อปริมาณการเกิดโพรโทพลาสต์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เขาพบว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารที่ปราศจากน้ำตาลเกิดโพรโทพลาสต์ได้ในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกันกว่าเซลล์ที่เจริญในสูตรอาหารที่มีน้ำตาล ด้วยเหตุนี้จึงได้ลองเสริมไกลซีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ในกรณีของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his การสร้าง

โพรโทพลาสต์ต้องใช้เซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตร TY ที่ปราศจากน้ำตาล และเสริมไกลซีนปริมาณสูงในระยะการเจริญที่เหมาะสมด้วย แต่สำหรับการสร้างโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ต้องใช้เซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตรกึ่งปรับต่ำ MMGY ที่มีกรดอะมิโนตามชนิดของยีนเครื่องหมาย และเสริมไกลซีนปริมาณเล็กน้อยในระยะเริ่มต้นของการเจริญเซลล์ การเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารดังกล่าวนี้ ทำให้ได้เซลล์ที่มีความเหมาะสมต่อการสร้างโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ยิ่งขึ้น

3.2 สภาวะการทำงานของไลโซไซม์ Weibull (1957) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับการสร้างโพรโทพลาสต์ของแบคทีเรียกรัมลบว่าจะประสบผลสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 3 ประการ คือ ความเข้มข้นของไลโซไซม์, กำลังไอออนของ Tris buffer และ EDTA ซึ่งจะต้องอยู่ในสภาพสมดุลย์กันอย่างเหมาะสม และความเข้มข้นของไลโซไซม์และ EDTA ที่เหมาะสมมีค่าแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิด (species) ของแบคทีเรียด้วย

จากการสร้างโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure ดูเหมือนว่าความเข้มข้นของ Tris buffer ไม่มีผลต่อการสร้างโพรโทพลาสต์ ในขณะที่ความเข้มข้นของไลโซไซม์และ EDTA เป็นปัจจัยที่จะต้องพิจารณา แต่อย่างไรก็ตาม Tris-buffer ซึ่งมีระบบบัฟเฟอร์ค่อนข้างเป็นเบส (pH7.8) จะช่วยเอื้ออำนวยต่อการทำงานของ lysozyme-EDTA ในแบคทีเรียกรัมลบ ดังที่พบรายงานว่าแบคทีเรียกรัมลบจะต้านทานต่อการทำงานของไลโซไซม์ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนปกติภายในเซลล์ (Repaske, 1958) แต่สามารถทำให้เซลล์แตกได้ด้วยการใช้ EDTA ร่วมกับไลโซไซม์

ครั้นนำสภาวะการสร้างโพรโทพลาสต์ที่ใช้ได้ผลกับไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL141 ure มาใช้กับไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his และ R. fredii USDA 192 Trp Phe ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ในเทคนิคโพรโทพลาสต์ฟิวชัน กลับพบว่าไม่เกิดประสิทธิผลเท่าใดนัก เนื่องจากไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวมีการขับเมือกมากกว่าสายพันธุ์ TAL 141 ure ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการทำงานของไลโซไซม์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การสร้างโพรโทพลาสต์ไม่ประสบผลสำเร็จ

อย่างไรก็ตามการสร้างโพรโทพลาสต์ของสายพันธุ์ TAL 141 ure his ยังต้องการ divalent metal chelating agent ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์มิวแทนต์ของ USDA 192 และสายพันธุ์ TAL 141 ure ซึ่งเป็นสายพันธุ์เริ่มต้นของ TAL 141 ure his (ตารางที่ 10)

โดยทั่วไปแบคทีเรียชนิดเดียวกันมักจะมีองค์ประกอบของโปรตีนและฟอสโฟลิปิดที่คล้ายคลึงกัน แต่ถ้าสภาวะของการเจริญแตกต่างกันไปจะทำให้ปริมาณของฟอสโฟลิปิด หรือแม้แต่ชนิดของกรดไขมันในฟอสโฟลิปิดจะแตกต่างกันไปด้วย นอกจากนี้ปริมาณของโปรตีนที่ฝังในเนื้อเซลล์ยังแปรตามปริมาณของกาซออกซิเจนอีก จึงเป็นไปได้ที่ไรโซเบียมสายพันธุ์เดียวกัน แต่ถ้าเจริญคนละสภาวะอาจต้องการ metal chelating agent คนละชนิด จึงตั้งเป็นข้อสังเกตไว้ว่า การเตรียมโพรโทพลาสต์นั้น จำเป็นต้องทดสอบชนิดของ metal chelating agent และสภาวะการเตรียมเซลล์ตั้งต้นเสมอ

เนื่องจากไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียกรัมลบ ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีผนังเซลล์ที่ซับซ้อนและแข็งแรงกว่าแบคทีเรียกรัมบวก โดยในชั้น periplasmic space ยังประกอบด้วยแมกเนเซียมและแคลเซียม ซึ่งมีส่วนช่วยให้ผนังเซลล์แข็งแรง จึงเป็นเหตุให้ต้องใช้ EDTA (หรือ GEDTA) ร่วมกับไลโซไซม์ ในการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมลบดังได้กล่าวมาแล้ว จะเห็นว่าในขั้นตอนการสร้างโพรโทพลาสต์นั้น EDTA และ GEDTA ซึ่งเป็น divalent metal chelating agents จะดึงแมกเนเซียมและแคลเซียมออกจากเซลล์ ไม่เฉพาะแต่แมกเนเซียมและแคลเซียมที่อยู่ในชั้น periplasmic space เท่านั้น แต่คาดว่าน่าจะมีผลต่อแมกเนเซียมและแคลเซียมทุกบริเวณของเซลล์ ดังนั้นภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์ได้นำโพรโทพลาสต์ไปเก็บรักษาใน maleate buffer ซึ่งมีแมกเนเซียมและแคลเซียมอิออน ก็เท่ากับว่าเป็นการให้แมกเนเซียมและแคลเซียมอิออนทดแทนแก่เซลล์ นอกจากนี้ maleate buffer มีระบบบัฟเฟอร์ที่ค่อนข้างเป็นกลาง (pH 6.5) จึงช่วยลดประสิทธิภาพในการทำงานของ lysozyme-EDTA ภายหลังจากที่ได้โพรโทพลาสต์ ซึ่งป้องกันการทำลายเซลล์จากผลต่อเนื่องของ lysozyme-EDTA

Okamishi et al. (1974) รายงานว่าการใช้แมกเนเซียมและแคลเซียมอิออนร่วมกันในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง (hypertomic solution) จะทำให้มีประสิทธิภาพทั้งในการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์และในการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของ Streptomycetes ดังนั้นภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์แล้วเก็บใน maleate buffer ซึ่งมีแมกเนเซียมและแคลเซียมอิออน จึงช่วยในการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมเช่นเดียวกับ Streptomycetes

3.3 <u>ชนิดของสารปรับความดัน</u> ซูโครสเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ โดยปกติไม่สามารถผ่านเซลล์เมมเบรนของโพรโทพลาสต์ได้โดยกระบวนการแพร่ จึงเป็นสารที่เหมาะสมในการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ ในขณะที่แมนนิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ สามารถผ่าน

ผนังเซลล์ได้อย่างช้าๆ (Weibull, 1957) จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของสารปรับความดันในบัฟเฟอร์ มีผลต่อการเก็บรักษาและการหลุดคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ ซึ่งอธิบายได้จากปรากฏการณ์ในการทดลอง ที่ใช้ซูโครสเป็นสารปรับความดันในการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียม ความเข้มข้นของซูโครสที่สูงเกินไป (0.4 โมลาร์) สามารถยับยั้งการหลุดคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องจาก ไรโซเบียมส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ในสารอาหารที่มีความดันออสโมติกสูง

จากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของซูโครส ในการทำหน้าที่เป็นสารปรับความดันสำหรับโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธีวัดค่าการดูดแสง (รูปที่ 12) และเลือกความเข้มข้นของซูโครสที่ให้ค่าการดูดแสงสูงสุดเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ เนื่องจากคาดหวังว่า สภาพที่เป็นสารละลาย isotonic สำหรับโพรโทพลาสต์จะให้ค่าการดูดแสงสูงสุด และค่าการดูดแสงที่ต่ำกว่าค่าการดูดแสงสูงสุดเป็นได้ 2 กรณี คือ ถ้าใช้ความเข้มข้นซูโครสสูงกว่าความเข้มข้นซูโครสที่ให้ค่าการดูดแสงสูงสุด ก็จะเป็นสารละลาย hypertonic สำหรับโพรโทพลาสต์ ซึ่งค่าการดูดแสงที่ต่ำกว่าในกรณีนี้จะไม่แตกต่างจากค่าการดูดแสงสูงสุดมากนัก อีกกรณีหนึ่ง คือ ถ้าใช้ความเข้มข้นซูโครสต่ำกว่าความเข้มข้นซูโครสที่ให้ค่าการดูดแสงสูงสุด ก็จะเป็นสารละลาย hypotonic สำหรับโพรโทพลาสต์ซึ่งค่าการดูดแสงที่ต่ำกว่าในกรณีนี้ จะมีความแตกต่างจากค่าการดูดแสงสูงสุดมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของซูโครสลดต่ำลงเรื่อยๆ ทั้งนี้เนื่องจากมีการแตกของโพรโทพลาสต์มากขึ้น อย่างไรก็ตามวิธีวัดค่าการดูดแสงดังกล่าวข้างต้นจำเป็นต้องอาศัยความถูกต้องและแม่นยำในการวัด ดังนั้นในการศึกษาจึงต้องทำซ้ำ 5 ครั้ง และจากการทดลองได้ค่าการดูดแสงใกล้เคียงกันในแต่ละซ้ำที่ความเข้มข้นเดียวกันซึ่งแสดงถึงความน่าเชื่อถือได้ (รูปที่ 12, 13) ครั้นเมื่อนำความเข้มข้นซูโครสที่เหมาะสมดังกล่าวเป็นสารปรับความดันในการหลุดคืนผนังเซลล์โพรโทพลาสต์ของไรโซเบียม ก็พบการหลุดคืนของโพรโทพลาสต์ของ USDA 192 Trp Phe ในเปอร์เซ็นต์ที่น่าพอใจ ซึ่งสอดคล้องกับการคาดการณ์ด้วยวิธีวัดการดูดแสง

จากการเปลี่ยนแปลงชนิดของสารปรับความดัน จากซูโครสเป็นแมนนิทอล พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของซูโครสและแมนนิทอลที่ใช้เป็นสารปรับดันมีความแตกต่างกันมาก (รูปที่ 12 และ 13) กล่าวคือต้องใช้แมนนิทอลความเข้มข้นสูงกว่าซูโครส ซึ่งน่าจะอธิบายเหตุผลได้ด้วยรายงานของ Weibull (1957) ในเรื่องที่เกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารปรับความดันในการ

ผ่านเซลล์เมมเบรนของโพรโทพลาสต์ ดังที่ได้กล่าวแล้วว่าซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ ไม่สามารถผ่านเซลล์โพรโทพลาสต์ ในขณะที่แมนนิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ สามารถผ่านเซลล์เมมเบรนได้อย่างช้าๆ จึงน่าจะต้องใช้แมนนิทอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่าซูโครสในการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ นอกจากแมนนิทอลมีสมบัติดังกล่าวข้างต้นแล้วยังมีสมบัติในการเกิดผลึกได้ง่าย เมื่อสารละลายแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นสูงอยู่ในที่อุณหภูมิ 4 °ซ ลักษณะดังกล่าวเป็นอุปสรรคในการเก็บรักษาโพรโทพลาสต์ชั่วคราว ระหว่างที่จะหลอมโพรโทพลาสต์ ซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นนี้จะบาดเซลล์ทำให้สูญเสียเซลล์ก่อนนำไปหลอมโพรโทพลาสต์

เป็นที่น่าสังเกตว่า การใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เป็นสารที่ไม่เหมาะสมในการใช้เป็นสารปรับความดัน เพราะนอกจากทำหน้าที่เป็นสารปรับความดันแล้ว ยังอาจเป็นสารให้ความเครียดแก่ไรโซเบียมอีกด้วย (ตารางที่ 12)

3.4 <u>การหลอมผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์</u> เป็นที่น่าสังเกตว่าการหลอมผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์ให้เปอร์เซ็นต์การหลอมเป็นที่น่าพอใจ (ตารางที่ 13) ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องจากขั้นตอนในการสร้างโพรโทพลาสต์ซึ่งลดสภาวะที่รุนแรง (ไม่มีขั้นตอนการปั่นล้างโพรโทพลาสต์) ทำให้โพรโทพลาสต์ที่สร้างได้ค่อนข้างแข็งแรงและสมบูรณ์ดี แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการที่จะนำเซลล์ไปใช้ในขั้นตอนการหลอมโพรโทพลาสต์ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ เนื่องจากได้ขจัดอุปสรรคภายนอกทั้งหมดแล้ว

4. <u>การแยกฟิวแซนต์</u>

การหลอมโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 <u>ure his</u> ที่มียีนเครื่องหมายจากการเตรียมแบบ double mutation กับโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ซึ่งเป็น point mutant นั้น มีปัญหาอยู่ว่า

ก. โครโมโซมของแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะเด่นและด้อยต่อกันหรือไม่

ข. การหลอมผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของฟิวแซนต์และของสายพันธุ์พ่อแม่ จะแตกต่างกันหรือไม่

สำหรับปัญหาข้อ ข. นั้น จะสังเกตได้จากการทำกลุ่มควบคุมควบคู่ไปกับการคัดเลือกฟิวแซนต์ ส่วนปัญหาของข้อ ก. จะทราบได้ต่อเมื่อแยกฟิวแซนต์ออกมาได้จริงๆ เท่านั้น

โดยหลักการ การรวมตัวกันของโครโมโซมนั้น ไม่จำเป็นจะต้องใช้เอนไซม์ เพราะแรงระหว่างไฮโดรเจนบอนด์ย่อมเกิดได้โดยง่ายแบบสุ่ม (random) แต่ภายหลังจากการเกิด

รีคอมบิเนชันแล้ว จะได้โครโมโซมเสถียรหรือไม่ เป็นปัญหาของการแบ่งตัวของโครโมโซม (replication)

จากการทดลองพบว่า กลุ่มควบคุม TAL141 ure his นั้น ไม่ปรากฏว่ามีโคโลนีขึ้นบนสูตรอาหารคัดเลือกแต่อย่างใด ซึ่งก็ไม่น่าสงสัย เพราะโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure his เป็น double mutation ย่อมมีอัตราการหวลกลับเท่ากับ 10^{-10}-10^{-12} ต่อเซลล์ แต่สำหรับกลุ่มควบคุมของ USDA 192 Trp Phe นั้น เมื่อบ่มเซลล์ไปหลายๆ วัน จะได้โคโลนีขนาดเล็กๆ เริ่มขึ้นบางๆ

ในการทดลองพบว่ามีโคโลนีขนาดเล็กเกิดขึ้น ร่วมกับโคโลนีใหญ่ๆ ทำให้การทำโคโลนีให้บริสุทธิ์เป็นสิ่งที่ต้องระมัดระวัง เพราะอาจจะมีโคโลนีเล็กๆ แทรกอยู่ระหว่างในโคโลนีใหญ่ๆ ได้

4.1 <u>การทดสอบสมบัติเบื้องต้นของฟิวแซนต์</u> เนื่องจากไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his นั้น ไม่มีฟิวแซนต์เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุม เมื่อการทดสอบเบื้องต้นพบว่ามีบางโคโลนีต้านยากานามัยซิน และบางโคโลนีที่ต้านยากานามัยซินแล้วยังต้านยาสเตรปมัยซินได้ด้วย สมบัติการต้านยานี้ทำให้เกิดความมั่นใจว่า ถึงอย่างไรควรมีเซลล์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his กลับคืนในรูปของสายพันธุ์ TAL 141 บ้าง นอกจากนี้ยังพบโคโลนีที่สามารถขึ้นได้ที่ 42 °ซ บางโคโลนีที่มีสมบัติไวต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (Km^s) และสเตรปโตมัยซิน (Sm^s) อีกด้วย การค้นพบนี้ทำให้เริ่มแน่ใจว่า น่าจะแยกฟิวแซนต์ได้แล้ว เพราะว่าตามหลักการแล้ว การเปลี่ยนจากความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ (Km^r และ Sm^r) เป็นการไวต่อยาปฏิชีวนะ (Km^s และ Sm^s) เป็นไปไม่ได้โดยง่าย เนื่องจากมีอัตราการเกิดเช่นนี้น้อยมาก เช่นเดียวกับการไม่พบการหวลกลับของ double mutation เช่นกัน

ต่อมาได้พบว่าซูโครสก็เป็นยีนเครื่องหมายที่ดีอีกอย่างหนึ่ง เพราะจากการที่ใช้ซูโครสเป็นสารปรับความดันนั้น พบว่า ฟิวแซนต์สายพันธุ์ที่ใช้ซูโครสได้(Suc^+) จะให้ลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างจากสายพันธุ์ที่ใช้ซูโครสไม่ได้หรือใช้ได้เพียงเล็กน้อย (Suc^-) อย่างชัดเจน ซึ่งลักษณะการใช้ซูโครสได้นี้เป็นลักษณะของสายพันธุ์ TAL 141 สรีรวิทยาดังกล่าวนี้เป็นสมบัติของไรโซเบียมสายพันธุ์เจริญเร็ว (fast growing) และลักษณะการใช้ซูโครสได้เพียงเล็กน้อยนี้เป็นลักษณะของสายพันธุ์ USDA 192 ซึ่งเป็นมิวแทนต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์เจริญช้า (slow growing) ปรากฏการณ์เกี่ยวกับความสามารถของไรโซเบียมสายพันธุ์เจริญเร็วในการใช้น้ำตาลไดแซคคาไรด์

เป็นแหล่งพลังงาน และไรโซเบียมสายพันธุ์เจริญช้าไม่สามารถใช้น้ำตาลไดแซคคาไรด์ ได้มีหลักฐานยืนยันมานานแล้ว (Stowers, 1985)

การค้นพบดังกล่าวข้างต้นนี้ทำให้ทราบว่า อย่างน้อยที่สุดต้องมีปรากฏการณ์ดังนี้

ก. เซลล์ที่เป็น Km^r, Sm^r และเป็น Suc^+ นั้น น่าจะเป็นเซลล์ที่มีโครโมโซมเป็นของสายพันธุ์ TAL 141

ข. เซลล์ที่มี Km^r, Sm^r และเป็น Suc^- นั้น จะต้องเป็นเซลล์ที่มีโครโมโซมแตกต่างจากสายพันธุ์ TAL 141 เพราะยีน suc หายไป หรือ ถูกกดดันเอาไว้ มีโอกาสเป็นโครโมโซมของสายพันธุ์ TAL 141 ได้เท่าๆ กับสายพันธุ์ USDA 192

ค. เซลล์ที่มี Km^s, Sm^s และเป็น Suc^+ นั้น น่าจะมาจากการที่ได้ยีน suc เพิ่ม หรือ เกิดการชักนำยีน suc ซึ่งน่าจะเป็นโครโมโซมของสายพันธุ์ USDA 192 มากกว่าอย่างอื่น

ง. เซลล์ที่เป็น Km^s, Sm^s แต่สามารถขึ้นได้ที่ 42°ซ นั้น น่าจะเป็นโครโมโซมของสายพันธุ์ USDA 192 มากกว่า เพราะการเปลี่ยนจาก Km^r, Sm^r เป็น Km^s, Sm^s เป็นกระบวนการที่เป็นไปได้ยาก

จ. เซลล์ที่เจริญใน YM หรือ MMG ได้ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ TAL 141 ure his หรือ USDA 192 Trp Phe ย่อมเป็นเครื่องหมายที่บ่งชัดเจนว่า ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนโครโมโซมอย่างมาก เพราะถ้าเป็น revertants แล้ว จะไม่เกิดปรากฏการณ์เช่นนี้

จากปรากฏการณ์ที่กล่าวมานี้ทำให้เชื่อแน่ว่า การแยกครั้งนี้ได้ฟิวแซนต์อย่างแน่นอน ปัญหาก็คือ ฟิวแซนต์เหล่านี้มีสมบัติเสถียรหรือยัง จึงได้เลือกฟิวแซนต์สมบัติเด่นๆ ไปทำ subculture 4-5 ครั้ง ฟิวแซนต์ใดที่ผ่านการทำ serial subculture แล้วคงสมบัติเดิม จึงจะนำไปศึกษาเพิ่มเติม

4.2 การทดสอบสมบัติระดับยีนและอิมมูโนวิทยา การทดสอบเบื้องต้นที่สุดเพื่อบอกว่ามีรีคอมบิเนชันของโครโมโซมระหว่างไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe และ TAL 141 ure his ได้เกิดขึ้นจริง ก็คือ ลักษณะของรูปแบบของโครโมโซมที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (restriction patterns) ของฟิวแซนต์จะต้องจัดเข้ากลุ่มกับสายพันธุ์พ่อแม่ได้ พบว่ารูปแบบโครโมโซมที่ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ของสายพันธุ์ F11 คล้ายกับของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his และ F15, F20 และ F36 คล้ายกับของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ปรากฏการณ์นี้พบในทำนองเดียวกันเมื่อย่อยโครโมโซมด้วยเรสทริกชัน

เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด เป็นเครื่องบ่งชี้ว่า รีคอมบิเนชัน dorminancy อาจจะไม่มี โอกาสที่ได้โคโลนีของฟิวแซนต์คล้ายคลึงกับสายพันธุ์พ่อแม่ น่าจะเป็นไปได้มากกว่า หรืออาจจะยังไม่พบเรสทริกชันเอนไซม์ที่สามารถย่อยจำเพาะตรงตำแหน่งของยีนที่เกิดรีคอมบิเนชันก็เป็นไปได้ การที่พบฟิวแซนต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe มากกว่าฟิวแซนต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his อาจเป็นเพราะว่าฟิวแซนต์ของสายพันธุ์ TAL 141 ure his ต้องการรีคอมบาย (recombine) มากครั้งกว่า เนื่องจากเป็น double mutation ดังนั้นจำนวนฟิวแซนต์จึงพบน้อยกว่า แต่มีสายพันธุ์ที่พิเศษสุดก็คือสายพันธุ์ F14 มีรูปแบบโครโมโซมที่ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ แตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่โดยสิ้นเชิง เป็นข้อชี้นำที่ท้าทายว่ารีคอมบิเนชันระหว่างสปีชีส์ของไรโซเบียมเกิดได้อย่างไม่มีจำกัด จนสามารถสร้างสายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์ใหม่ได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

สมบัติทางอิมมูโนวิทยาเป็นการศึกษาโปรตีนซึ่งเป็นแอนติเจนของเซลล์ทั้งตัว ย่อมไม่สามารถบอกความแตกต่างของ point mutation หรือ double mutation ในการสังเคราะห์สารเมตาโบไลต์ ยกเว้นแต่ว่า point mutation นั้นเป็น regulatory type ที่จะทำให้เกิด pleiotropic effect กับการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด เช่น ที่เกิดในยีน cap เป็นต้น ดังนั้นการที่ยีนเครื่องหมายของการทดลองนี้เป็น ure his (double mutation) และ Trp Phe (point mutation) ก็ไม่อาจจะทำให้พบความแตกต่างทางอิมมูโนวิทยาได้

น่าสังเกตว่ากรณีที่ให้อิมมูโนวิทยาแตกต่างกันมากย่อมหมายถึง มีการเปลี่ยนแปลงที่โครโมโซมอย่างมาก จนกระทั่งสามารถมีผลกระทบต่อแอนทิเจนรวมบนผิวเซลล์ได้ ตัวอย่างเช่น F11 ซึ่งมีแอนทิเจนคล้ายไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his ก็จริง แต่ก็ยังให้ค่าไตเตอร์เพียง 256 แสดงว่าแอนทิเจนบนผิวเซลล์ได้แปรเปลี่ยนไปอย่างมาก และการที่ F15, F20 และ F36 มีส่วนคล้ายไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ก็อธิบายได้ในทำนองเดียวกัน ที่น่าแปลกก็คือ F14 ที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมอย่างสิ้นเชิง เสมือนหนึ่งว่าได้มีสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นทีเดียว ซึ่งลักษณะของ F14 นี้ทำให้ค่อนข้างจะเชื่อว่ารีคอมบิเนชันระหว่างไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe จะต้องเกิดระหว่างกันอย่างมากมายหลายตำแหน่ง และผลการทดสอบทางอิมมูโนวิทยาซึ่งเป็นการทดสอบผลกระทบของ gene products อย่างกว้างขวาง แต่กลับให้ผลสอดคล้องกับผลการทดสอบทางการย่อยโครโมโซมด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ซึ่งเป็นการทดสอบ redundant gene (ไม่ใช่

gene products) นั้น เป็นเครื่องบ่งชี้อย่างยิ่ง (double indication) ว่า การเรียงตัวของยีนในโครโมโซมของฟิวแซนต์นั้นเหมือนกันกับของเซลล์พ่อแม่อย่างแน่นอน ในกรณีของ F11, F15, F20 และ F36 แต่สำหรับ F14 น่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ โดยการรีคอมบิเนชันระหว่างชนิดของไรโซเบียมนี้ ยังไม่เคยมีใครรายงานมาก่อนเลย นับเป็นปรากฏการณ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล เป็นอย่างยิ่ง

4.3 <u>การทดสอบการสร้างปม</u> กระบวนการอยู่ร่วมกันระหว่างไรโซเบียมกับต้นถั่วเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ต้องการยีนจำนวนมากในการทำงานร่วมกัน ได้มีผู้พยายามทำการวิจัยสองอย่าง คือ (ก) สามารถนำโอเปอรอน <u>sym</u> นี้ไปถ่ายโอนให้กับพืชอื่นๆ ได้หรือไม่ (ข) สามารถทำ cross symbiosis คือ แยก <u>sym</u> จากไรโซเบียมสายพันธุ์เจริญเร็วซึ่งมีความจำเพาะกับต้นถั่วที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจน้อยกว่าต้นถั่วซึ่งมีความจำเพาะกับไรโซเบียมเจริญช้าได้หรือไม่ ในปัจจุบันยังไม่มีผู้ใดรายงานความสำเร็จดังกล่าวนี้

ในการทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างฟิวแซนต์กับพืชตระกูลถั่ว ถั่วเหลืองและซีราโทร พบว่า F11 ซึ่งคล้ายกับไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 <u>ure his</u> นั้น หมดความสามารถในการอยู่ร่วมกับต้นถั่วเหลืองและซีราโทร เหตุการณ์นี้เป็นเหตุการณ์ปกติธรรมดาเพราะกระบวนการอยู่ร่วมกันนั้นซับซ้อน โอกาสที่ฟิวแซนต์จะสูญเสียความสามารถในการอยู่ร่วมกับพืช โดยเฉพาะต้นถั่วเหลืองนั้นเกิดง่ายมาก และเนื่องด้วยเหตุนี้ทุกประเทศจึงต้องมีศูนย์คัดพันธุ์ไรโซเบียม เพื่อจะแยกไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการอยู่ร่วมกับถั่วเหลือง เพื่อแจกจ่ายให้ชาวไร่ถั่วเหลืองเสมอ สิ่งที่น่าชื่นชมยินดีก็คือ การที่ F20 และ F36 มีแนวโน้มในการติดปมสูงกว่า USDA 192 Trp Phe แม้ว่าการทดสอบในงานวิจัยนี้ยังไม่ให้ผลที่หนักแน่น แต่แนวโน้มที่ว่ามีปมติดมากกว่ามีสูงมาก นี่เป็นเหตุการณ์ที่น่าสนใจว่า การแยกฟิวแซนต์นั้นกลับทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนได้ แม้ว่าโดยผลการทดลองที่มีอยู่นี้ ไม่อาจอธิบายได้ว่าเหตุใดประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนจึงไม่เพิ่มขึ้น แต่ผลการทดลองที่ทำซ้ำและให้ผลอย่างเดียวกันนี้ ก็เป็นประโยชน์โดยตรงต่อการเกษตรอยู่แล้ว

พิเศษสุดก็คือ การที่ F14 ซึ่งเป็นสปีชีส์ใหม่สามารถจะสร้างปมได้ทั้งกับถั่วเหลืองและซีราโทร แม้ว่าประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนไม่สูงมากและไม่เป็นที่น่าสนใจจะนำไปปรับใช้ในไร่ถั่วเหลือง แต่ทว่ากลับเป็นสายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ในการวิจัย <u>sym</u> อย่างยิ่ง ว่า <u>sym</u> ที่ได้ใหม่นี้จะแตกต่างจาก <u>sym</u> ของสายพันธุ์พ่อแม่อย่างใด ทำให้สามารถกำจัดความจำเพาะต่อสปีชีส์

ของไรโซเบียมให้หมดไปได้ F14 จึงเป็นสายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยต่อไปอย่างยิ่ง

4.4 สรุปสมบัติของฟิวแซนด์ F11 เป็นฟิวแซนด์ที่มีโครโมโซมพื้นฐานเป็นไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 รีคอมบิเนชันเกิดขึ้นที่ตำแหน่งของ his อย่างแน่นอน แต่การที่ F11 ให้การสร้างปมที่แตกต่างจากไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 นั้นอาจเป็นเพียง pleiotropic effect ซึ่งเป็นเพียงเรื่องผลผลิตของยีน หรืออาจเป็นเพราะการเกิดรีคอมบิเนชันที่ตำแหน่งอื่นๆ อีกด้วย

F20, F36 เป็นฟิวแซนด์ที่มีโครโมโซมพื้นฐานเป็นของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 รีคอมบิเนชันเกิดที่ยีนควบคุมการสร้างกรดอะมิโนทริปโตเฟนและฟีนิลอะลานีนอย่างแน่นอน จึงทำให้แก้ไข pleiotropic effect นี้ได้ แต่การที่ F20, F36 มีแนวโน้มในการเจริญที่ดีขึ้นและสร้างปมได้สูงขึ้นนั้น อาจเป็นเพราะ pleiotropic effect ของการรีคอมบิเนชันก็ได้

F15 เป็นสายพันธุ์ที่มีโครโมโซมพื้นฐานเหมือนกับไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 แสดงว่า pleiotropic effect ของ Trp Phe ได้รับการแก้ไขแล้ว ยังก่อให้เกิดความสามารถในการเจริญที่ 42°ซ สามารถต้านยากานามัยซิน (Km^r) และสเตรปโตมัยซิน (Sm^r) อีกด้วย แสดงว่ารีคอมบิเนชันที่เกิดใน F15 ย่อมไม่เหมือนกับที่เกิดใน F20 และ F36 อย่างชัดเจน F15 จึงเป็นฟิวแซนด์ที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ที่จะใช้ศึกษาวิจัยถึง pleiotropic effect ที่พบใน TAL 141 ซึ่งจะทำให้ได้พื้นฐานของความเข้าใจเกี่ยวกับการทนความเครียดของไรโซเบียม จะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยการเพิ่มประสิทธิภาพของการสร้างปมถั่วเหลือง ในการทำการเกษตรในดินเค็มและแห้งแล้งโดยตรง

F14 เป็นสายพันธุ์พิเศษสุดที่แสดงว่ารีคอมบิเนชันระหว่างสปีชีส์ของไรโซเบียมเกิดได้หลายตำแหน่ง เป็นการเปิดเผยทาง molecular genetics ของไรโซเบียม ที่ไม่เคยมีใครรายงานมาก่อน

5. ประโยชน์ของงานวิจัยนี้

5.1 ได้ค้นพบปรากฏการณ์ที่ว่าระบบการควบคุมการสังเคราะห์พลังงานทางชีวภาพที่แตกต่างกัน จะทำให้แบคทีเรียสามารถทนความเครียดได้แตกต่างกัน

5.2 ได้พบสภาวะบางอย่างที่จำเป็นในการสร้างโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมให้ได้ประสิทธิภาพและประสิทธิผลสูง รวมทั้งได้เสนอแนวทางเก็บรักษาโพรโทพลาสต์ที่สร้างได้เพื่อประโยชน์ในการทำโพรโทพลาสต์ฟิวชันด้วย

5.3 ได้ค้นพบว่าไรโซเบียมต่างชนิดกันนั้น อาจเกิดยีนรีคอมบิเนชันกันได้หลายตำแหน่ง เป็นการค้นพบที่มีประโยชน์ต่อการวิจัยทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของไรโซเบียม

5.4 ได้แยกฟิวแชนต์ที่มีแนวโน้มว่า จะมีประโยชน์ในการศึกษาการอยู่ร่วมกันระหว่างไรโซเบียมกับต้นถั่ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย