บทที่ 3

ผลการทดลอง

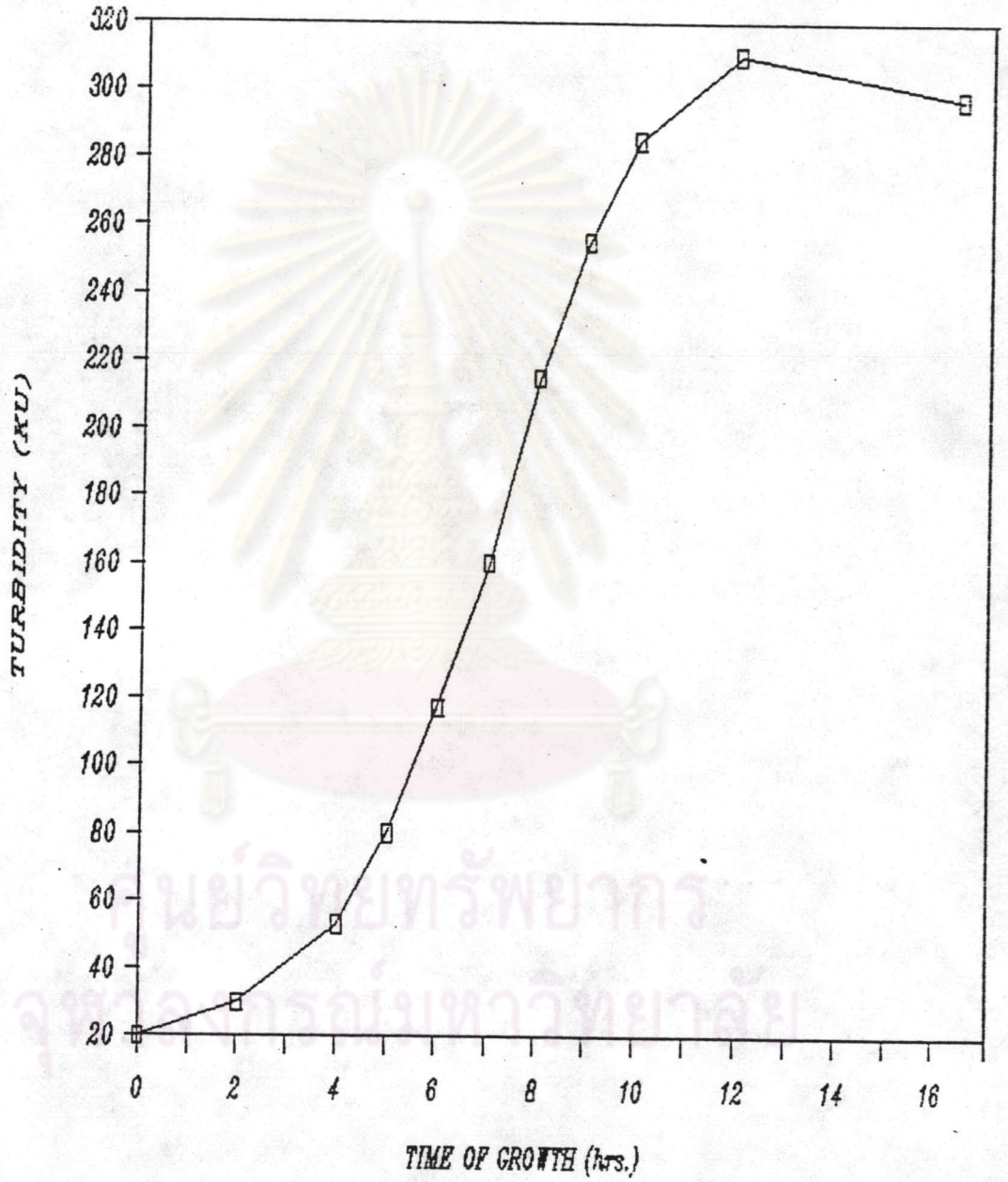
1. <u>การศึกษาการเจริญของไรโซเบียมในสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์</u>

1.1 <u>การเจริญของ Rhizobium sp. TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ</u>

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเมือกได้ ดังนั้นในการติดตามการเจริญของไรโซเบียมโดยการวัดค่าการดูดแสงอาจทำให้ได้ข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง เพื่อที่จะนำวิธีการวัดค่าการดูดแสงซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกในการติดตามการเจริญของแบคทีเรียมาใช้แทนการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) จึงได้ทดลองติดตามการเจริญของเชื้อโดย การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและการวัดค่าการดูดแสงที่ระยะการเจริญต่าง ๆ ของเชื้อ

ในการศึกษาการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำสองชนิดคือ MGG และ MMG ได้สร้างกราฟมาตรฐาน 3 แบบ คือ 1. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเซลล์ในหน่วย KU (Klett Units) กับช่วงเวลาการเจริญของเชื้อ 2. จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร กับช่วงเวลาการเจริญของเชื้อ 3. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับความขุ่นของเซลล์ ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ ของเชื้อ ซึ่งแสดงในรูปที่ 1 ก,ข,ค และ รูปที่ 2 ก,ข,ค ตามลำดับ ดังนั้นการหาเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่า (generation time) ของเชื้อสามารถกระทำได้โดยการใช้กราฟมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น ในการแปรค่าความขุ่นในหน่วย KU ให้อยู่ในหน่วยของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเสียก่อน จึงอ่านค่าเวลาที่ใช้เพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่า ข้อจำกัดในการแปรค่าคือจะต้องเลือกใช้ในช่วงกราฟความสัมพันธ์ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ซึ่งพบว่าอยู่ในช่วงการเจริญระยะ mid log ตัวอย่างเช่น การประมาณเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่าของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ MGG เป็นดังนี้ ในรูปที่ 1 ค ค่าความขุ่นที่ 100 KU เท่ากับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต 1.3×10^8 ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสัมพันธ์กับช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญ 5.4 ชั่วโมงในรูปที่ 1 ข และที่จำนวนเซลล์สองเท่าคือ 2.6×10^8 ต่อมิลลิลิตร สัมพันธ์กับช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญ 6.4 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่าในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG จึงเท่ากับ 1 ชั่วโมง

รูปที่ 1 ก กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเชื้อกับช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG

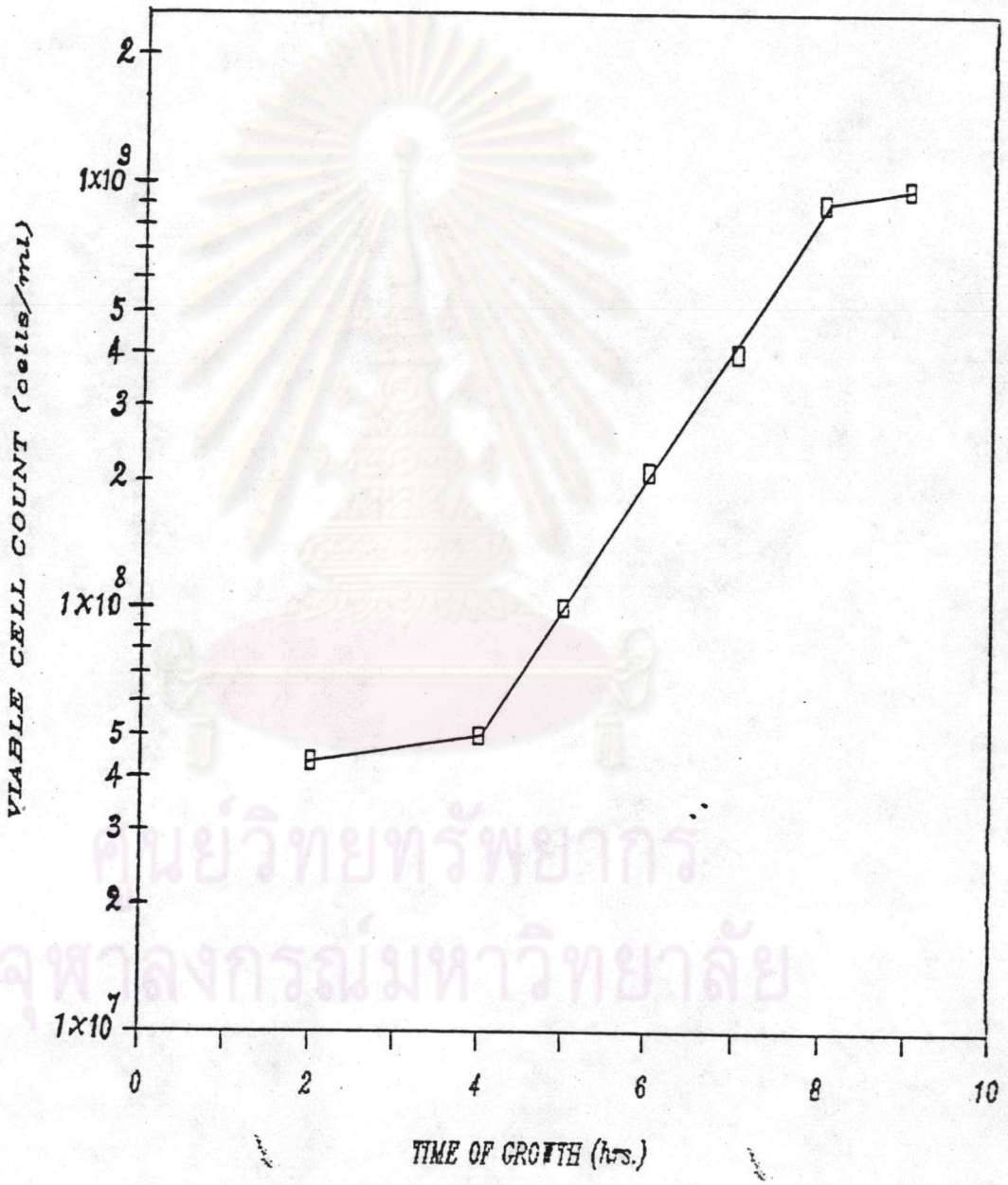


รูปแบบการเจริญของ Rhizobium sp. TAL 141 ซึ่งได้จากการวัดความขุ่นของคัลเจอร์ที่ช่วงเวลาการเจริญต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 10308416

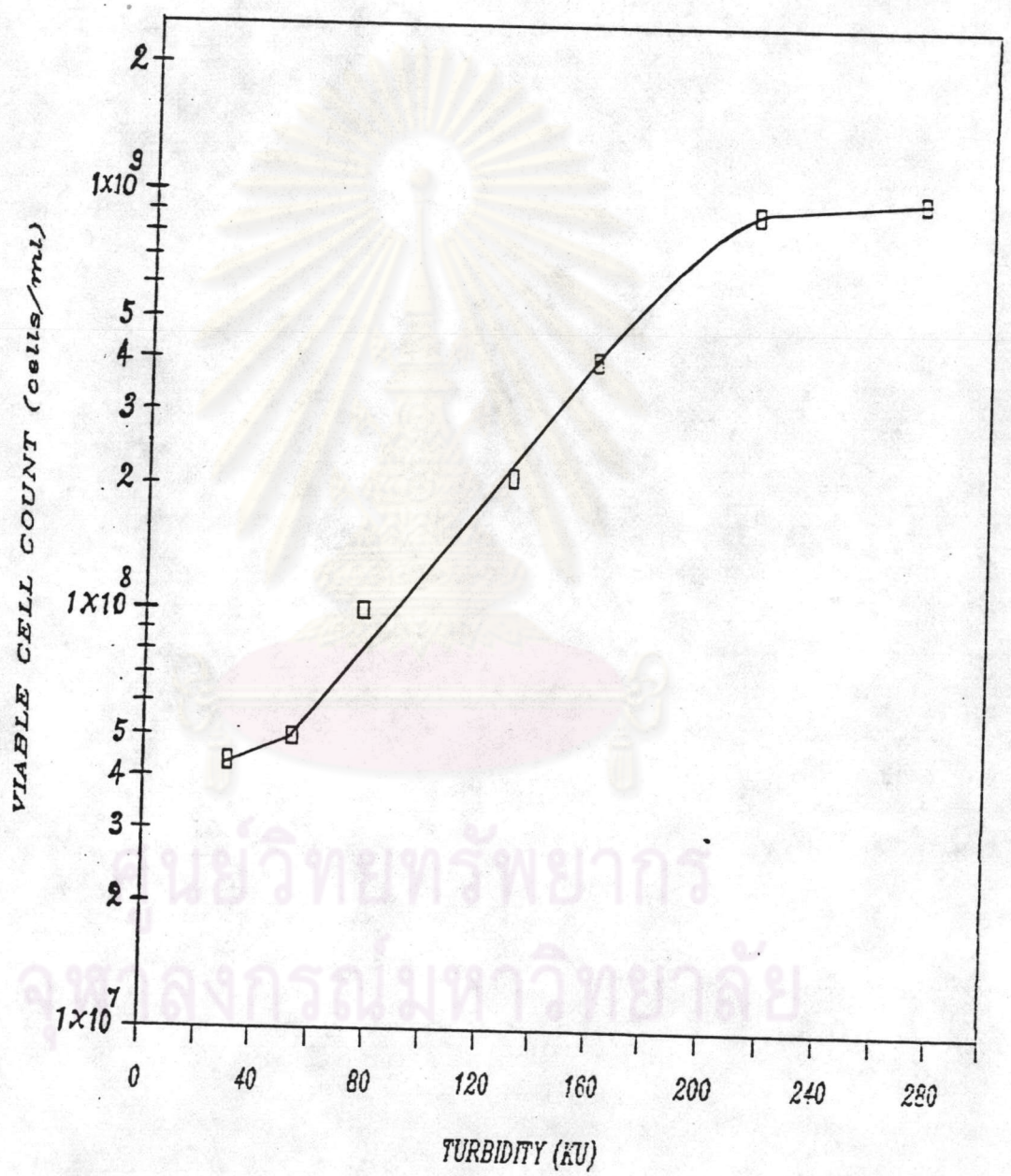
รูปที่ 1 ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับช่วงเวลาในการเจริญของเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG



รูปแบบการเจริญของ Rhizobium sp. TAL 141 ซึ่งได้จากการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ช่วงเวลาการเจริญต่าง ๆ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

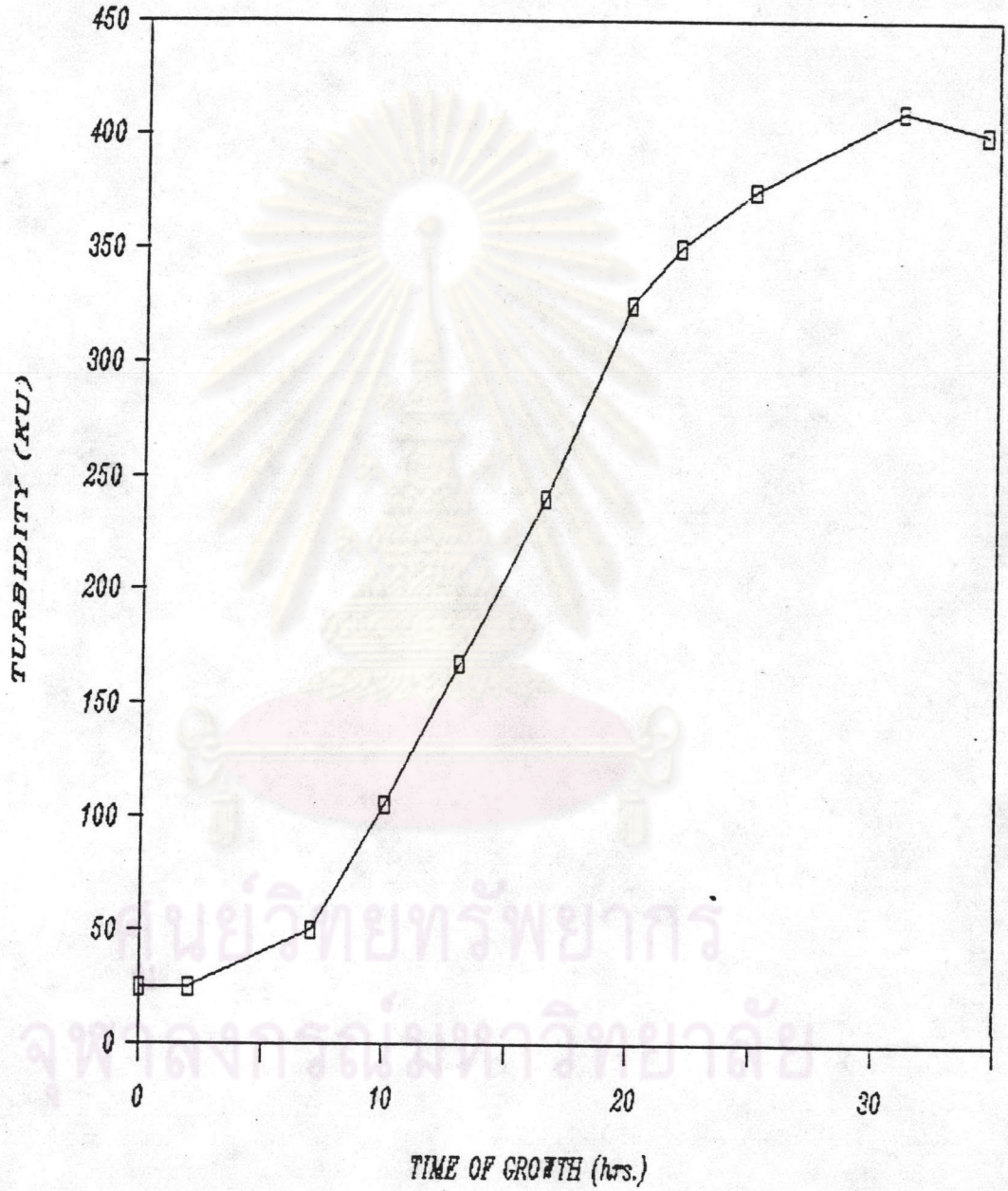
รูปที่ 1 ค กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและความขุ่นของเชื้อในอาหาร สูตรปรับต่ำ MGG



รูปกราฟแสดงความขุ่นของเซลล์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ช่วงเวลาที่สัมพันธ์กัน

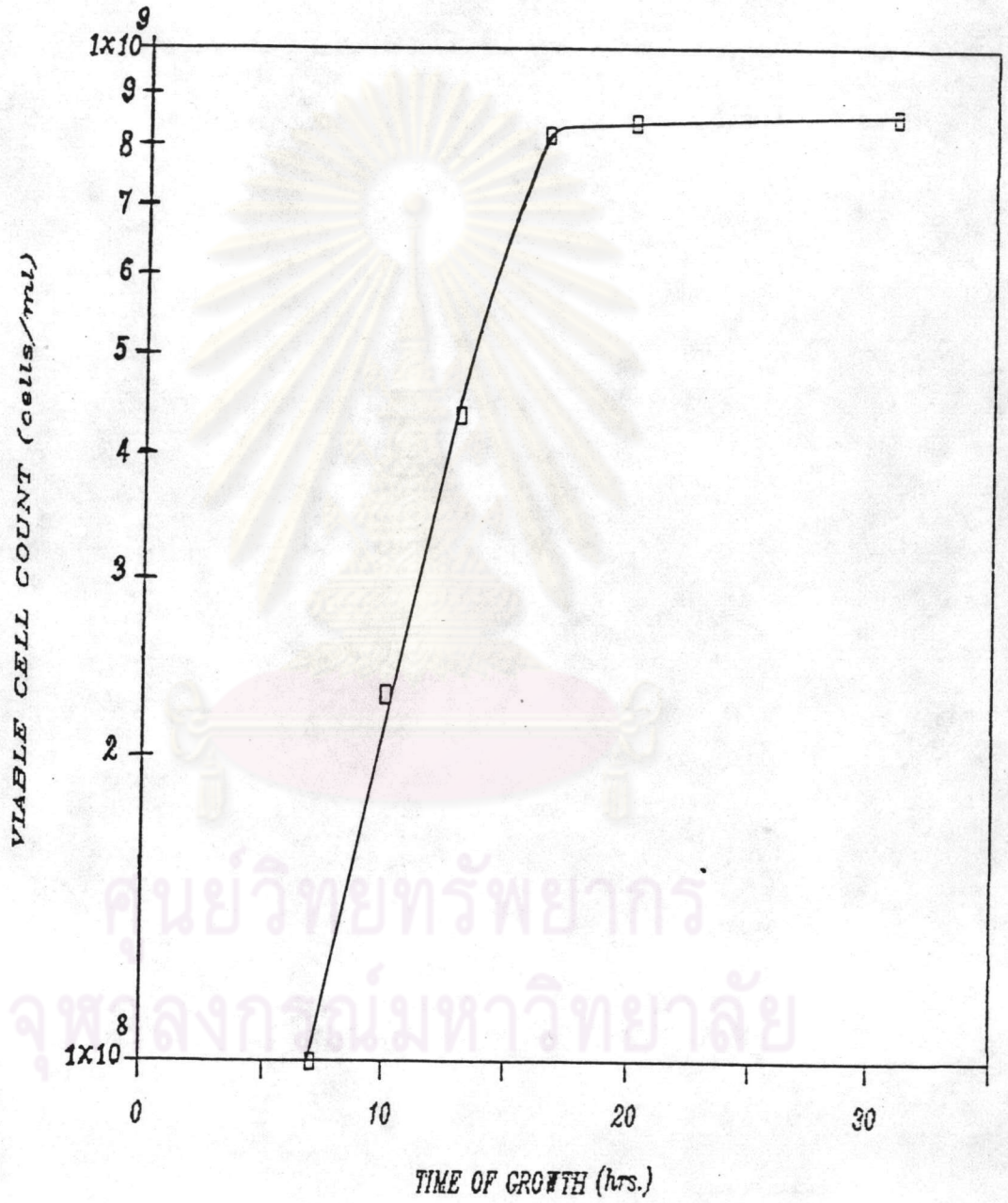
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 ก กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเชื้อกับช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG



รูปแบบการเจริญของ Rhizobium sp. TAL 141 ซึ่งได้จากการวัดความขุ่นของคัลเจอร์ที่ช่วงเวลาการเจริญต่าง ๆ

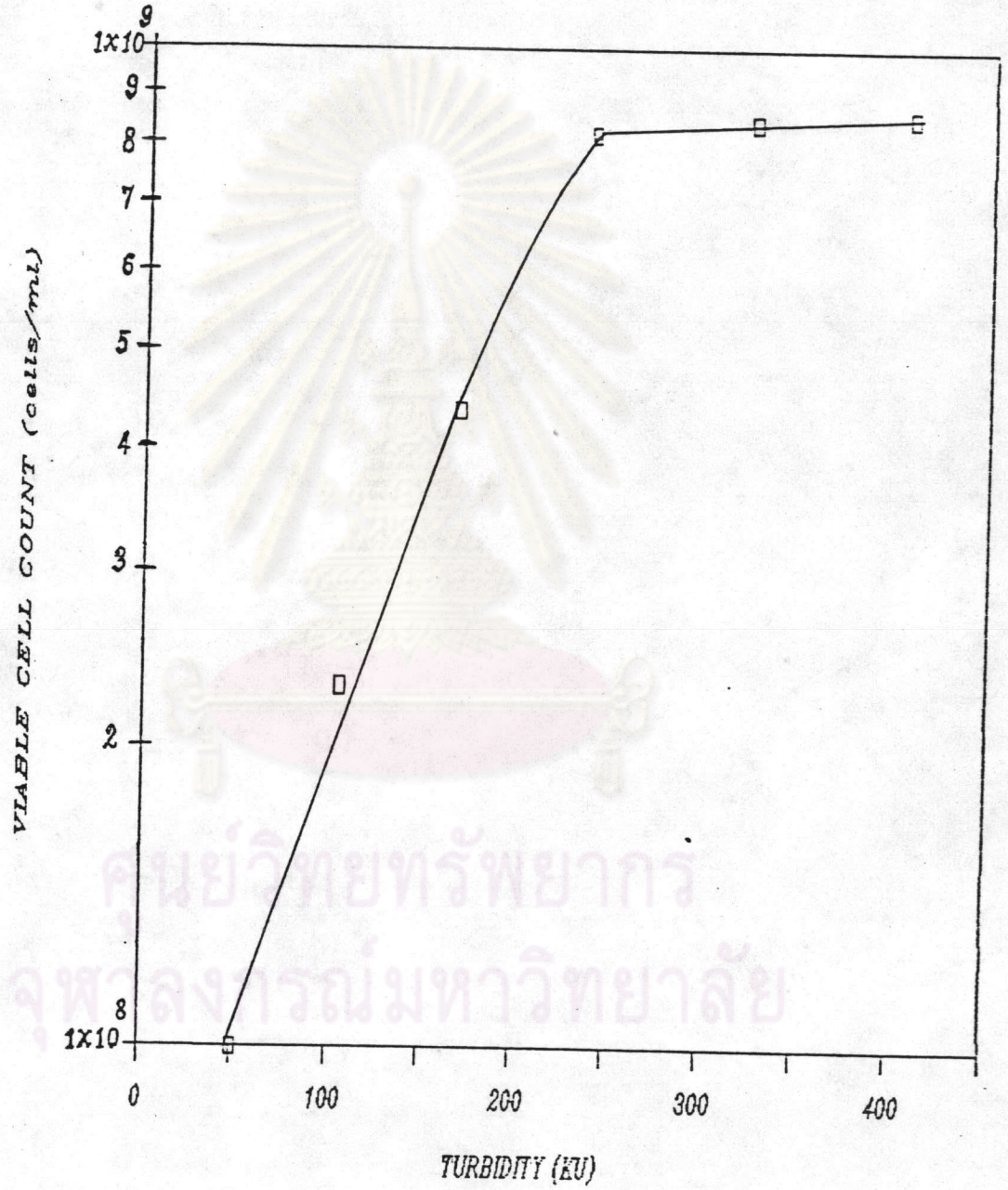
รูปที่ 2 ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับช่วงเวลาในการเจริญของเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG



รูปแบบการเจริญของ Rhizobium sp. TAL141 ซึ่งได้จากการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ช่วงเวลาการเจริญต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 ค กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและความขุ่นของเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG



รูปกราฟแสดงความขุ่นของเซลล์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ช่วงเวลาที่สัมพันธ์กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในทำนองเดียวกัน การหาเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่าในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ก็สามารถกระทำได้โดยวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่าในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG เท่ากับ 3 ชั่วโมง

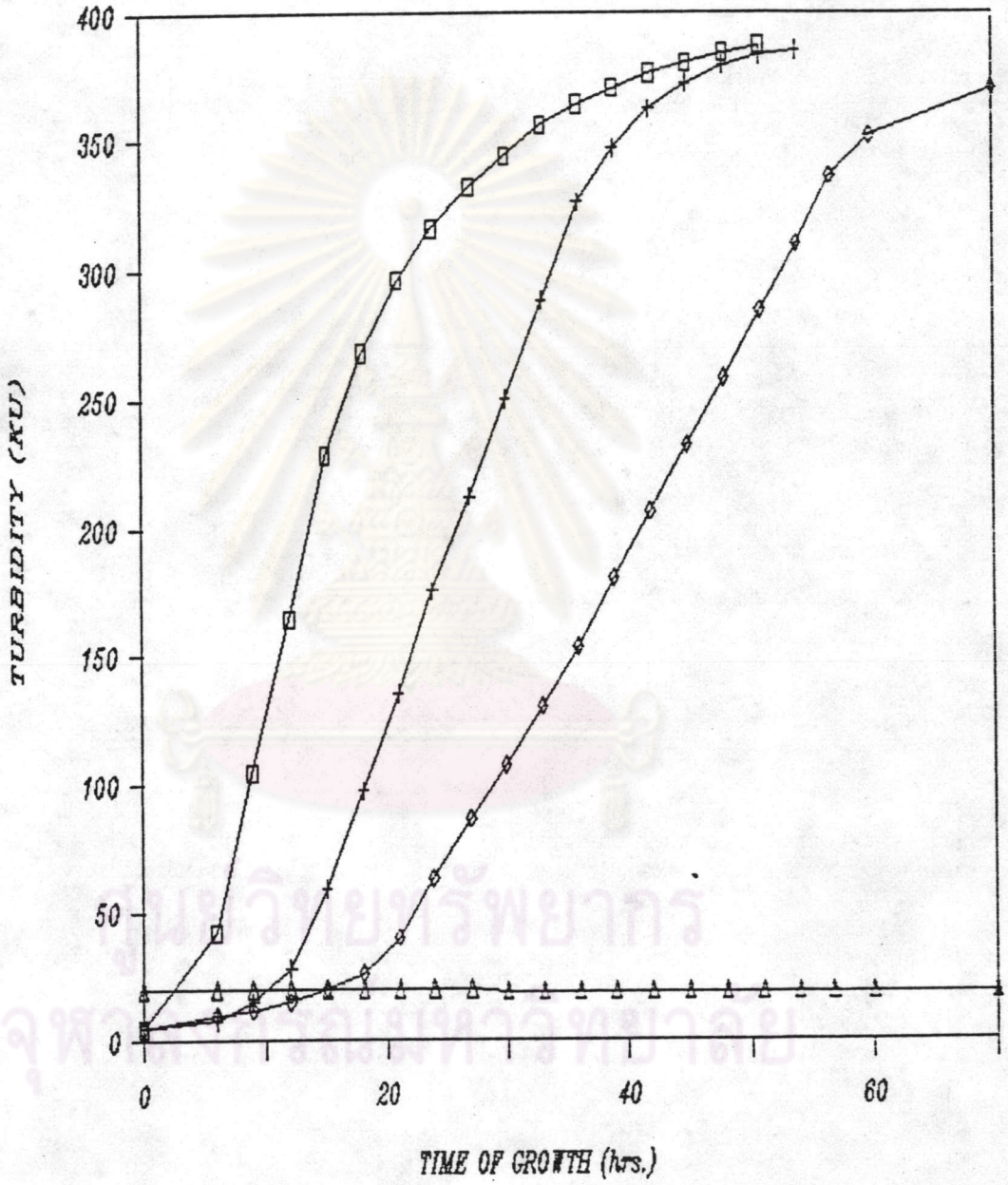
1.2 <u>การศึกษาการเจริญของไรโซเบียมในสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์</u> ได้เปรียบเทียบการเจริญของไรโซเบียมที่สามารถทนเค็ม 2 สายพันธุ์ คือ TAL 141 และ TAL 380 ในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ MMG, MGG ที่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3, 0.5 และ 0.7 โมลาร์ ซึ่งแสดงรูปแบบการเจริญไว้ในรูปที่ 3 - 6 สรุปได้ดังนี้คือ

1.2.1 การเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ 0.3 และ 0.5 โมลาร์ (รูปที่ 3) ไม่แตกต่างจากการเจริญในสภาวะปกติ ทั้งค่าการเจริญสูงสุดและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่ามีค่าใกล้เคียงกัน แต่การเจริญในสภาวะที่มีความเครียด จะใช้เวลาในการพักตัว (lag phase) นานกว่าการเจริญในสภาวะปกติ และเวลาในการพักตัวจะยาวนานขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่า TAL 141 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตร MMG ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์

1.2.2 การเจริญของ TAL 141 ในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ แตกต่างจากการเจริญในสภาวะปกติโดยสิ้นเชิง กล่าวคือ การเจริญในสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่า ยาวนานเป็น 12 เท่าของสภาวะปกติ และการเจริญสูงสุดลดลงเหลือประมาณ 1 ใน 7 ของสภาวะปกติ ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 1 สำหรับสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.5 และ 0.7 โมลาร์ในอาหารสูตรนี้ พบว่า TAL 141 ไม่สามารถเจริญได้ (รูปที่ 4)

1.2.3 การเจริญของ TAL 380 ในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ MMG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ (รูปที่ 5) ไม่แตกต่างจากการเจริญในสภาวะปกติ ทั้งค่าการเจริญสูงสุดและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่ามีค่าใกล้เคียงกัน แต่การเจริญในสภาวะที่มีความเครียด จะใช้เวลาในการพักตัว (lag phase) นานกว่าการเจริญในสภาวะปกติ และเวลาในการพักตัวจะยาวนานขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่า TAL 380 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตร MMG ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์

รูปที่ 3 รูปแบบการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์



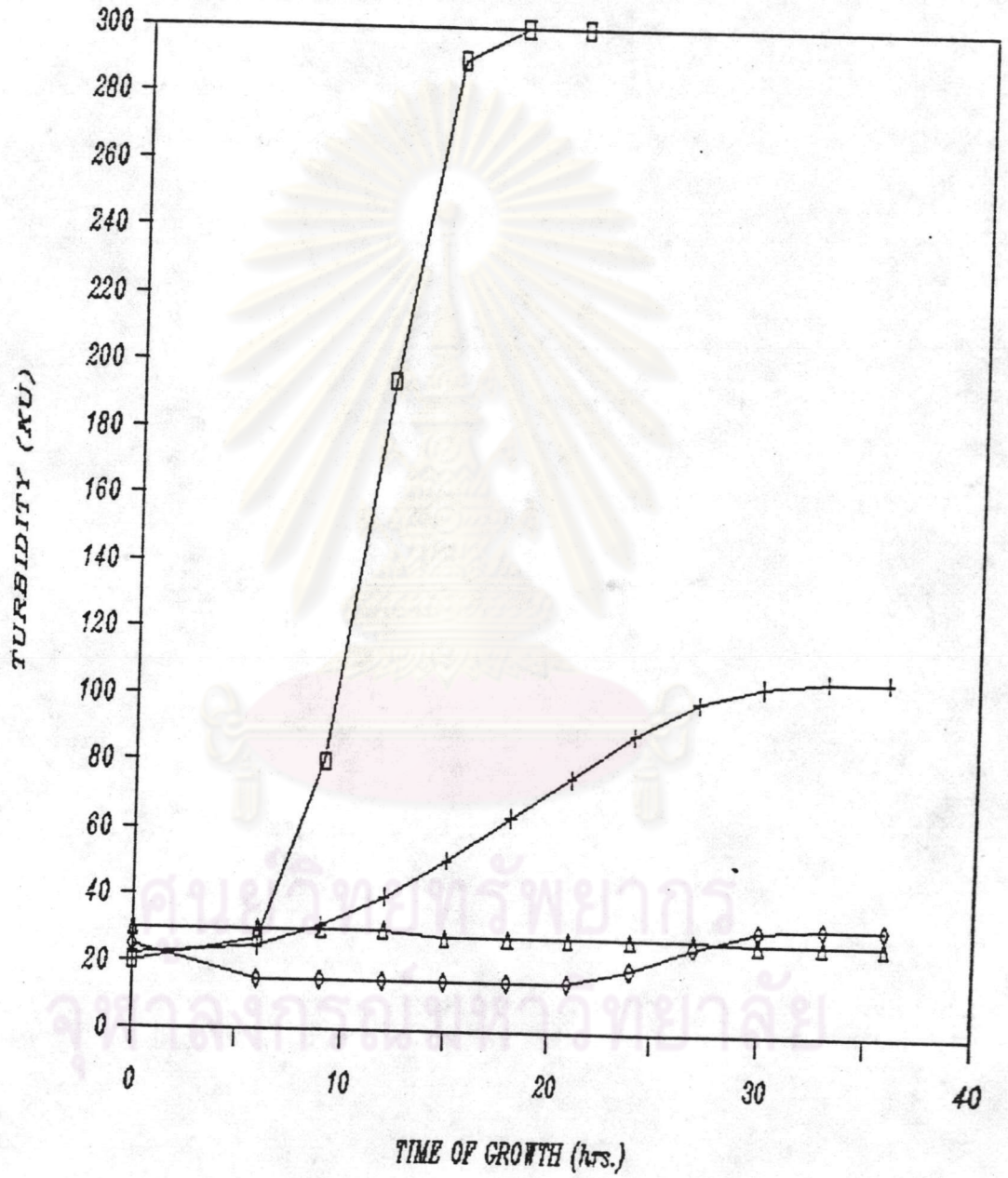
□ MMG

+ MMG+0.3 M NaCl

◊ MMG+0.5 M NaCl

Δ MMG+0.7 M NaCl

รูปที่ 4 รูปแบบการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์



□ MGG

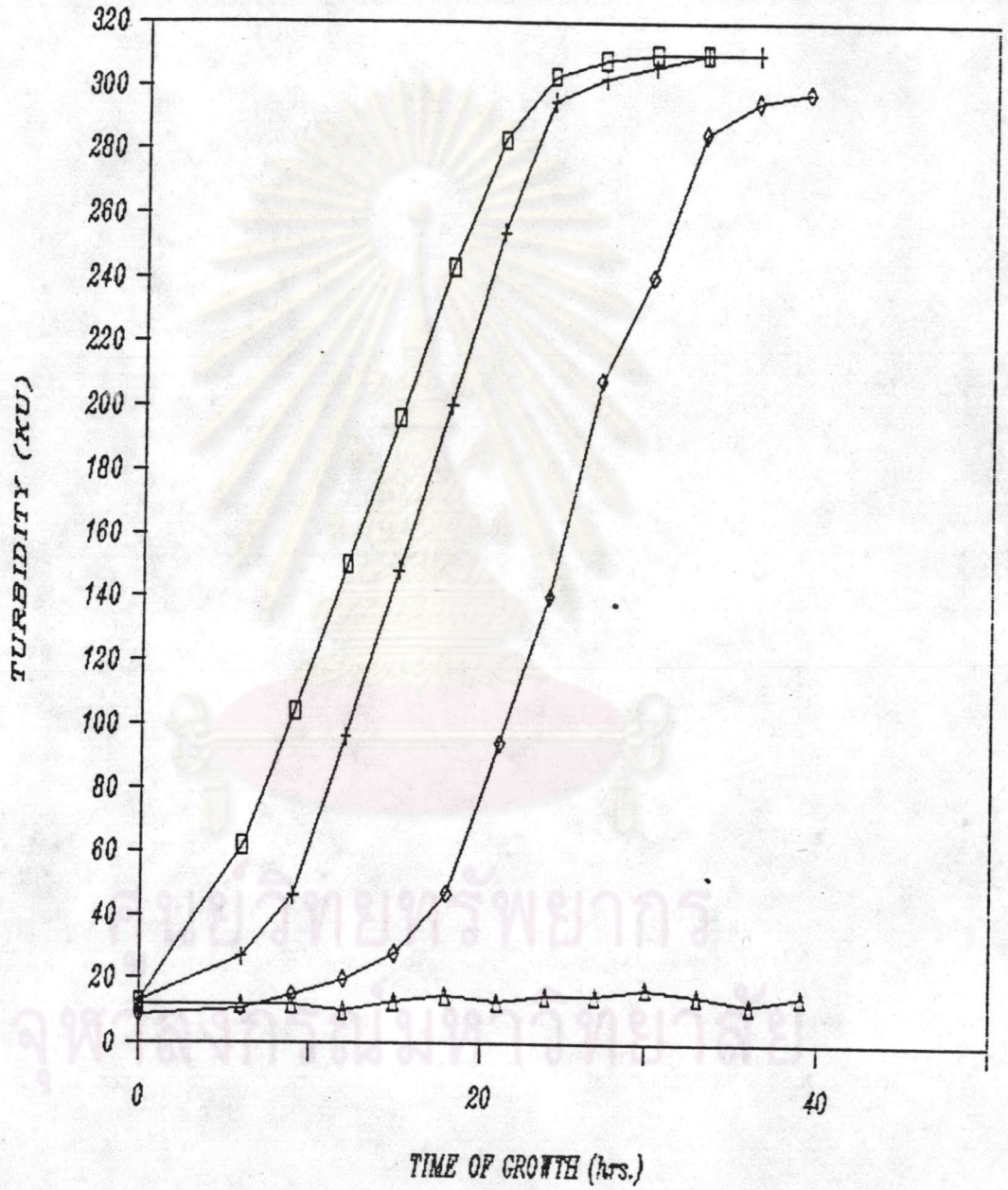
+ MGG+0.3 M NaCl

◊ MGG+0.5 M NaCl

Δ MGG+0.7 M NaCl

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 รูปแบบการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 380 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์



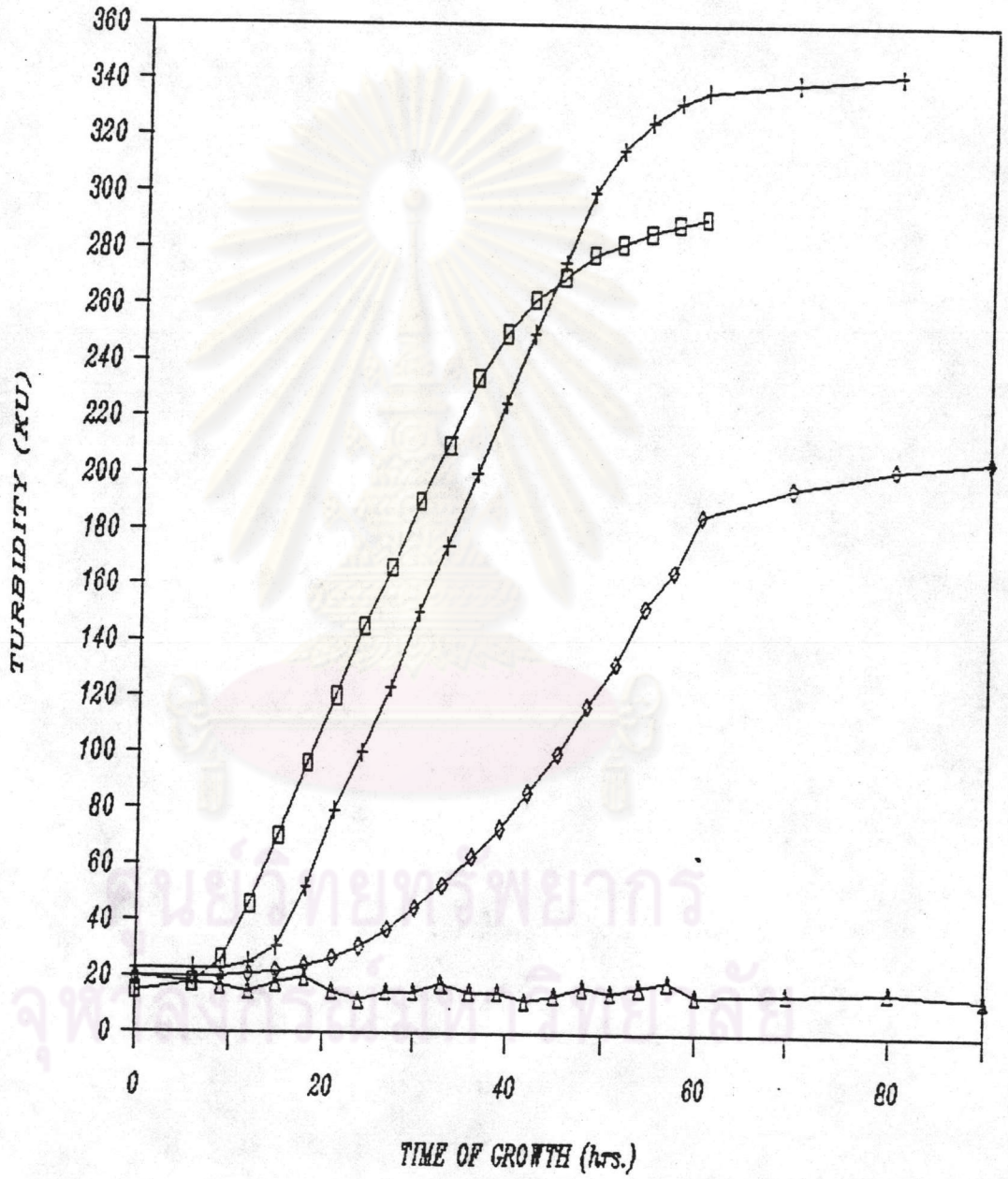
□ MMG

+ MMG+0.3 M NaCl

◊ MMG+0.5 M NaCl

Δ MMG+0.7 M NaCl

รูปที่ 6 รูปแบบการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 380 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์



□ MGG

+ MGG+0.3 M NaCl

◊ MGG+0.5 M NaCl

Δ MGG+0.7 M NaCl

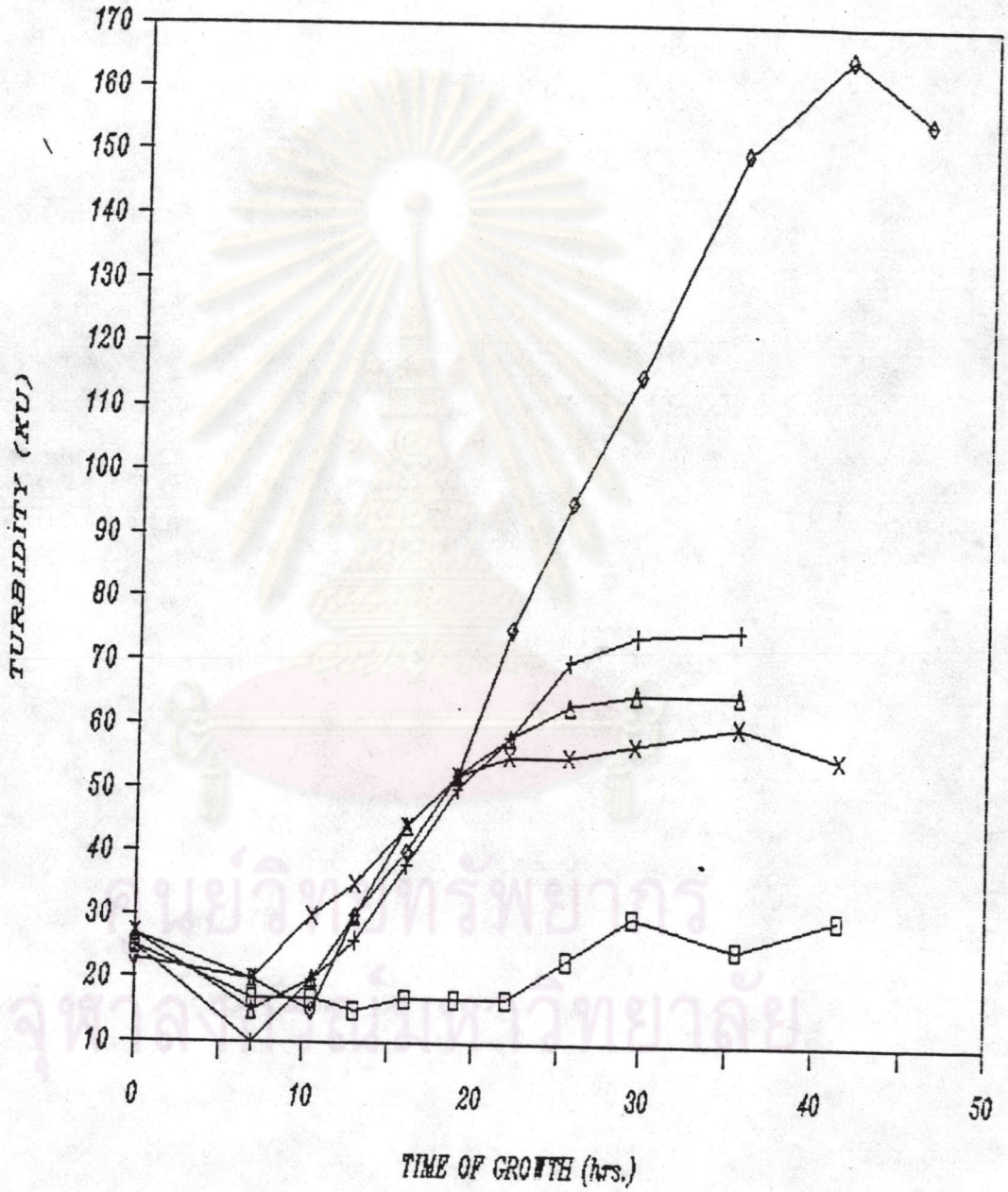
1.2.4 การเจริญของ TAL 380 ในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ (รูปที่ 6) พบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ค่าการเจริญสูงสุดและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่าใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ค่าการเจริญสูงสุดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์เช่นกัน ในกรณีของเวลาที่ใช้พักตัวก็อธิบายได้ในทำนองเดียวกับ TAL 141 (ข้อ 1.2.1)

1.3 <u>บทบาทของไกลซีนบีเทนต่อการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์</u>

1.3.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไกลซีนบีเทนต่อการเจริญในสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ ในการศึกษานี้ได้เจริญเซลล์ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และเสริมด้วยไกลซีนบีเทนที่มีความเข้มข้น 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแสดงผลการทดลองในรูปที่ 7 พบว่าไกลซีนสามารถช่วยเพิ่มการเจริญของ TAL 141 ในสูตรอาหารปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ และความเข้มข้นของไกลซีนที่เหมาะสมคือ 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งให้ค่าการเจริญสูงสุดมากกว่าสภาวะอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด

1.3.2 บทบาทของไกลซีนบีเทนในการเพิ่มการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีสภาวะเครียดของโซเดียมคลอไรด์ จากการเจริญ TAL 141 ในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ และเสริมไกลซีนบีเทน 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแสดงผลการทดลองไว้ในรูปที่ 8 อธิบายได้ว่า ไกลซีนบีเทน 1.0 มิลลิโมลาร์ สามารถช่วยเพิ่มการเจริญของ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ได้ จากการหาค่าการเจริญสูงสุดและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสองเท่าซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1 พบว่าที่ความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ให้ค่าการเจริญสูงสุด 2.6 เท่าของสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ดังกล่าว แต่ไม่เสริมไกลซีนบีเทน (เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต) และช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่า จากสภาวะที่ไม่เสริมไกลซีนบีเทน 12 ชั่วโมง เหลือเพียง 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ซึ่งไม่มีการเจริญของเชื้อ การเสริมไกลซีนบีเทนในสภาวะนี้ช่วยให้มีการเจริญสูงสุด 7.3 เท่าของสภาวะที่มีความเครียดของโซเดียม

รูปที่ 7 ความเข้มข้นของไกลซีนบีเทนที่เหมาะสมต่อการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์



□ MGG+0.5 M NaCl (no Betaine-HCl)

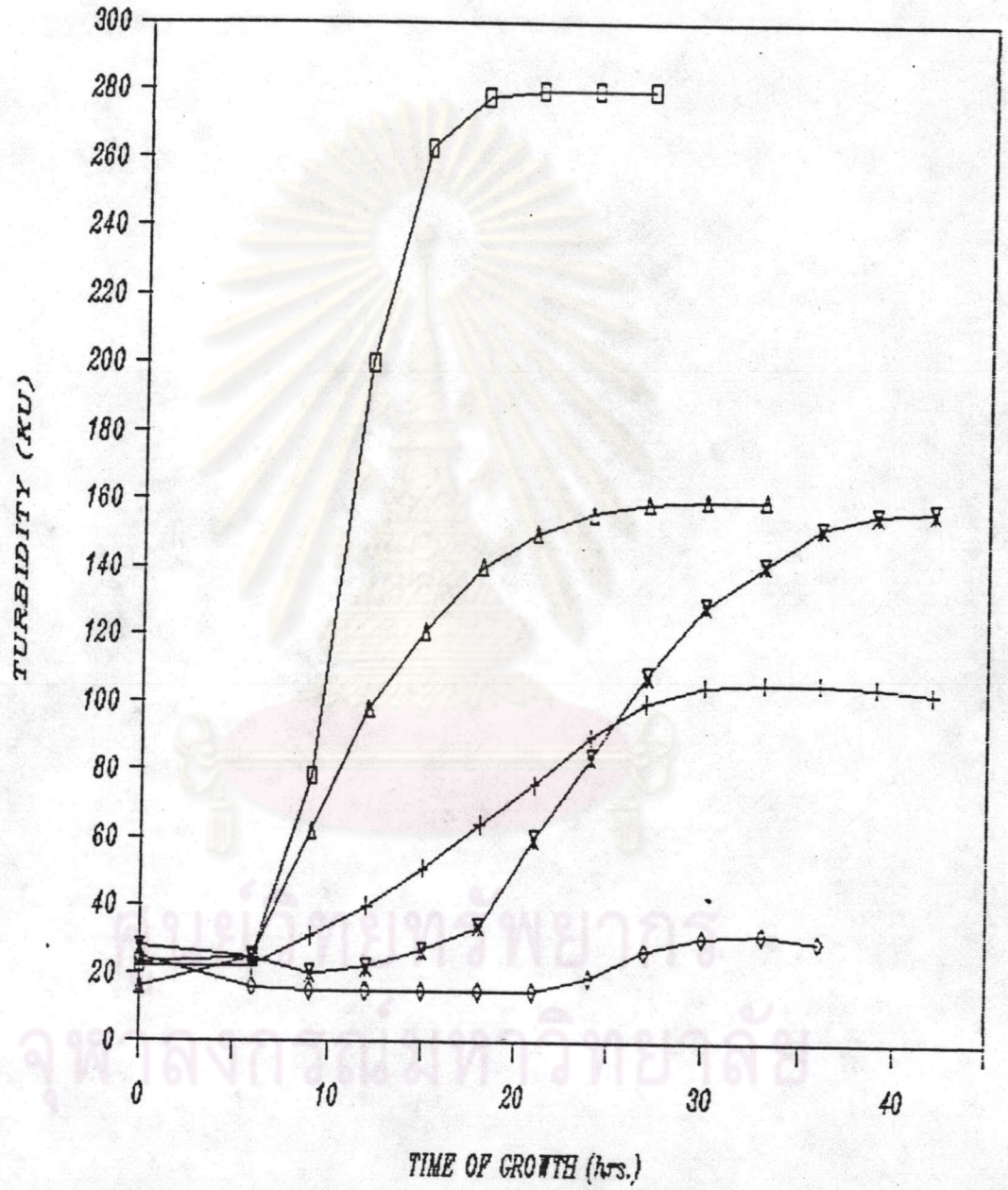
\+ +0.1 mM Betaine-HCl

◊ +1.0 mM Betaine-HCl

Δ +5.0 mM Betaine-HCl

X +10 mM Betaine-HCl

รูปที่ 8 ผลกระทบของไกลซีนบีเทนในการช่วยเพิ่มการเจริญของ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีโซเดียมคลอไรด์



□ MGG

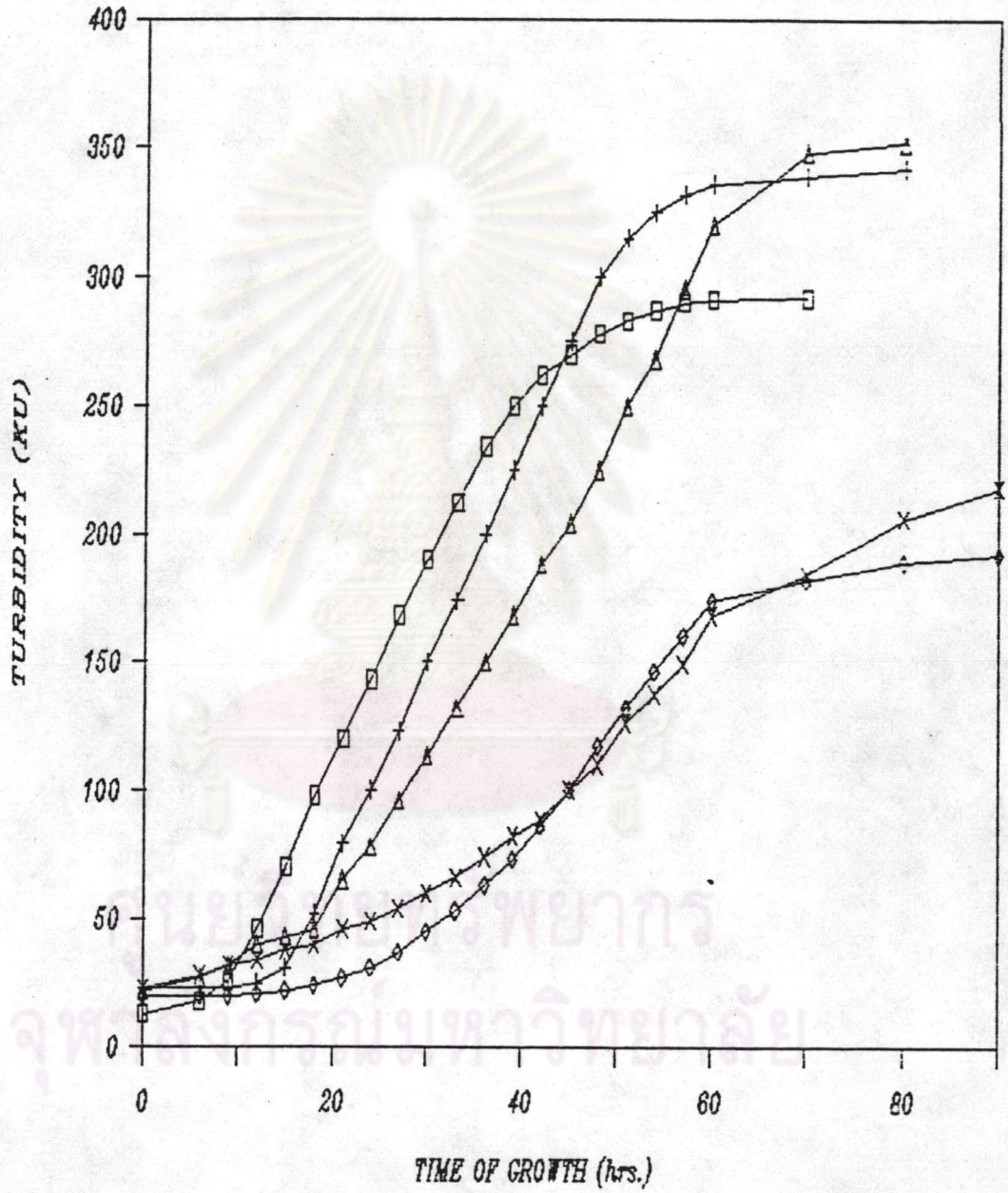
\+ +0.3 M NaCl

◊ +0.5 M NaCl

Δ +0.3 M NaCl+1 mM Betaine-HCl

⧖ +0.5 M NaCl+1 mM Betaine-HCl

รูปที่ 9 ผลกระทบของไกลซีนบีเทนต่อการเจริญของ TAL 380 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีโซเดียมคลอไรด์



□ MGG

\+ +0.3 M NaCl

◊ +0.5 M NaCl

Δ +0.3 M NaCl+1 mM Betaine-HCl

X +0.5 M NaCl+1 mM Betaine-HCl

คลอไรด์ดังกล่าวแต่ไม่เสริมไกลซีนบีเทน และใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่า 5.5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การเสริมไกลซีนบีเทนสามารถช่วยเพิ่มการเจริญของ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ได้ในขีดจำกัดเท่านั้น กล่าวคือ ทั้งค่าการเจริญสูงสุดและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สองเท่าในสภาวะเครียดดังกล่าวที่เสริมไกลซีนบีเทนก็ยังคงมีค่าต่ำและยาวนานกว่าสภาวะปกติ (ตารางที่ 1) และไกลซีนบีเทนไม่สามารถแก้ไขการเจริญของ TAL 141 ในอาหารสูตรดังกล่าวที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์ (ไม่ได้แสดงข้อมูลไว้)

ได้ทดลองเสริมไกลซีนบีเทนลงในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นต่างๆ ไม่พบว่าไกลซีนบีเทนมีผลต่อการเจริญของ TAL 141 ในสภาวะเครียดดังกล่าวแต่อย่างใด นอกจากนี้ได้นำไกลซีนบีเทนไปใช้กับสายพันธุ์ TAL 380 ก็ไม่ปรากฏผลกระทบของไกลซีนบีเทนต่อการเจริญ ทั้งการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และ MGG (รูปที่ 9) ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เช่นการเจริญของ TAL 141 ในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์

2. <u>การแยกยีนเครื่องหมาย</u>

ได้ทำการแยกยีนเครื่องหมายของ <u>Rhizobium</u> sp.TAL 141 และ <u>R. fredii</u> โดยการกลายพันธุ์ด้วย NTG 2 และ 1 ครั้งตามลำดับ ซึ่งแยกมิวแทนต์ได้ดังแสดงในตารางที่ 2 จากการกลายพันธุ์ TAL 141 ครั้งแรก ได้สายพันธุ์ TAL 141 <u>ure</u> 1 โคโลนี ซึ่งมีสมบัติเป็นมิวแทนต์ที่ไม่สามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน และให้โคโลนีที่มีเมือกน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม TAL 141 ซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่มีเมือกจำนวนมากบนอาหารสูตรเดียวกัน (YM) และแยกยีนเครื่องหมายครั้งที่ 2 ได้สายพันธุ์ TAL 141 <u>ure his</u> 1 โคโลนี มีสมบัติเป็นมิวแทนต์ที่ไม่สามารถใช้ยูเรียและต้องการฮีสติดีนในการเจริญเติบโต (<u>his</u> auxotroph) นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญในอาหารเหลวของมิวแทนต์ชนิดนี้ ในสภาวะที่ให้อากาศโดยการเขย่าจะทำให้เกิดการจับกลุ่มกันของเซลล์ ในกรณีของ USDA 192 ได้แยกยีนเครื่องหมายที่มีสมบัติเป็นออโรเมติกออกโซโทรป จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG เพียงครั้งเดียว ได้ออโรเมติกออกโซโทรปชนิดต่าง ๆ กัน คือ USDA 192 Trp Tyr Phe 5 โคโลนี, USDA 192 Trp Phe 1 โคโลนี , USDA 192 <u>trp</u> 5 โคโลนี USDA 192 <u>tyr</u> 2 โคโลนี USDA 192 <u>phe</u> 2 โคโลนี

ตารางที่ 1 การเจริญของ TAL 141 ในสูตรอาหารปรับต่ำ MGG ที่มีความเครียดของโซเดียมคลอไรด์ที่ไม่เสริมและเสริมด้วยบีเทน 1 มิลลิโมลาร์

Conditions	Generation time[1] (hr)	Growth yield	
		KU	Viable count / ml
1. MGG	1.0	280	9.5×10^8
2. MGG+0.3 M NaCl	12.0	100	1.3×10^8
3. MGG+0.3 M NaCl +1 mM Betaine	5.0	160	3.4×10^8
4. MGG+0.5 M NaCl	NG[2]	30	4.4×10^7
5. MGG+0.5 M NaCl +1 mM Betaine	5.5	155	3.2×10^8

[1] ข้อมูลได้จากรูปที่ 8 และแปรค่าจากหน่วย Klett Unit (KU) เป็น Viable cell count ด้วยกราฟความสัมพันธ์รูปที่ 1 ค ก่อนหาค่าการเจริญสูงสุดและการเพิ่มจำนวนเซลล์

[2] NG หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 2 ชนิดของยีนเครื่องหมายและจำนวนมิวแทนต์ที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG

Strains	No. of initial cells	No. of selected mutants	Type/No.of auxotrophs
TAL 141[1]	7.3×10^9	3712	ure / 1
TAL 141 ure[2]	3.5×10^9	2976	his / 1
USDA 192[1]	5.2×10^9	5460	Trp Tyr Phe/5 Trp Phe/1 trp / 5 tyr / 2 phe / 2

[1] การกลายพันธุ์ด้วย NTG ครั้งที่ 1

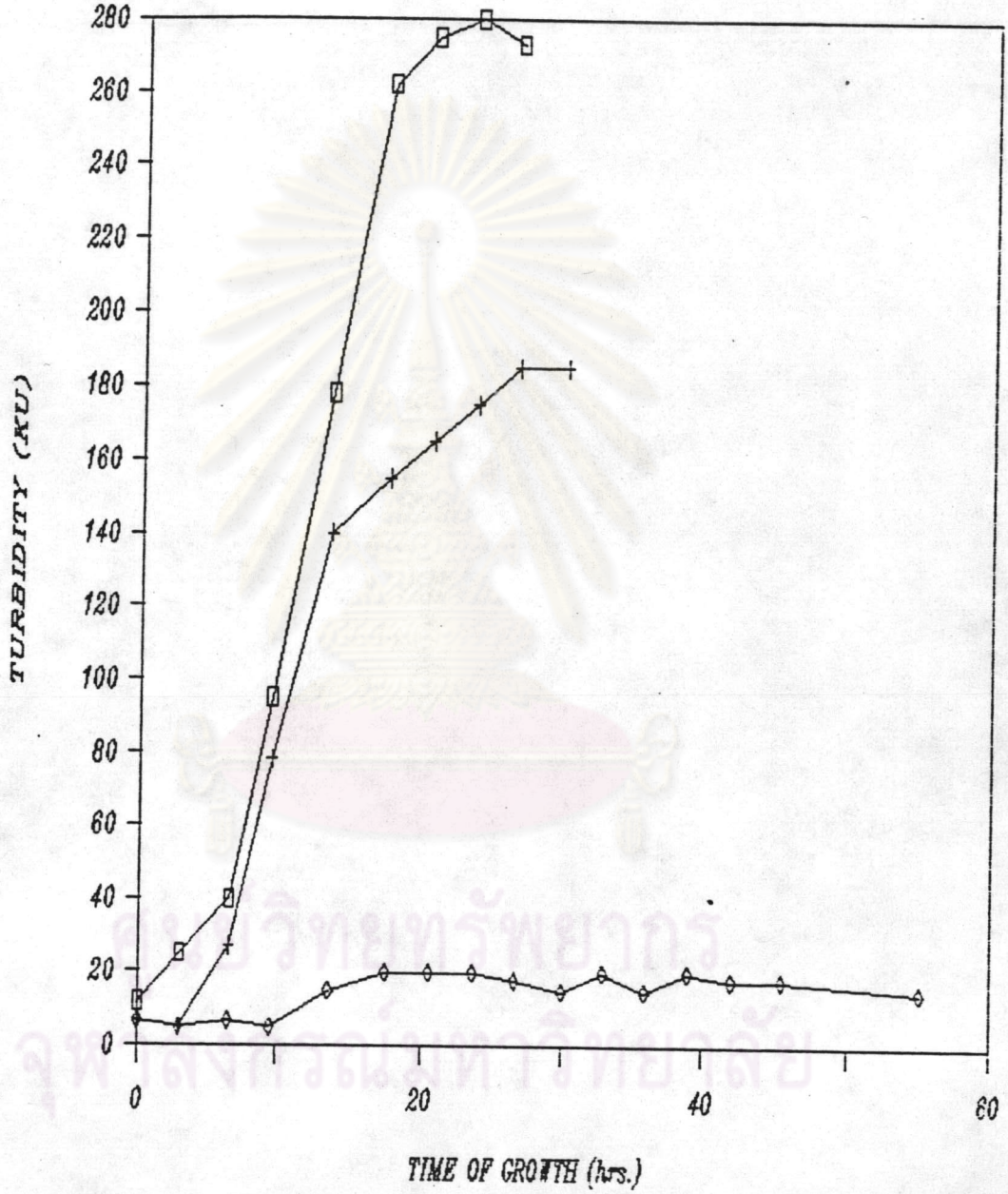
[2] การกลายพันธุ์ด้วย NTG ครั้งที่ 2

จากการสังเกตการเจริญของ TAL 141 ure his และมิวแทนต์ของสายพันธุ์ USDA 192 บนอาหารสูตรครบ (อาหารสูตรที่ 4.6.1) พบว่าสายพันธุ์ TAL 141 ure his มีการเจริญช้ากว่าสายพันธุ์เดิม TAL 141 สำหรับ USDA 192 Trp Phe มีการเจริญใกล้เคียงกับ USDA 192 สายพันธุ์เดิม และสายพันธุ์มิวแทนต์อื่นๆ ได้นำสายพันธุ์ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe มาศึกษาการเจริญในอาหารเหลวสูตรครบ สูตรปรับต่ำ MMG ซึ่งแสดงผลการทดลองในรูปที่ 10 และ 11 จะเห็นว่า TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe ซึ่งมีสมบัติเป็นออกโซโทรป ไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ในขณะที่มีค่าการเจริญสูงสุดในอาหารสูตรครบเท่ากับ 185 และ 270 KU ตามลำดับ ต่อมาได้นำสายพันธุ์ TAL 141 ure, TAL 141 ure his, USDA 192 Trp Phe และ USDA 192 Trp Phe อีกสามสายพันธุ์ไปศึกษาในเทคนิคโพรโทพลาสต์ฟิวชัน

3. การสร้างโพรโทพลาสต์

ครั้งแรกได้ทดลองนำไรโซเบียมชนิดต่างๆ มาใช้สร้างโพรโทพลาสต์ โดยการเจริญในอาหารสูตรอุดม YM ซึ่งเป็นสูตรอาหารปกติที่ใช้เจริญไรโซเบียมได้ดี แล้วสร้างโพรโทพลาสต์โดยใช้ไลโซไซม์ร่วมกับ EDTA ซึ่งใช้ได้ผลกับแบคทีเรียกรัมลบบางชนิด พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมแต่ละชนิดแตกต่างกัน และเมื่อนำโพรโทพลาสต์ไปปั่นล้างเอาไลโซไซม์ออกในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารปรับความดันแล้วก็ตาม พบว่าไม่สามารถรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ไว้ได้ เนื่องจากภายหลังการปั่นตกตะกอนเซลล์พบลักษณะการจับกันของเซลล์เป็นก้อน และเมื่อนำเซลล์มากระจายอีกครั้งในสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าว พบว่ามีการแตกของเซลล์ซึ่งสังเกตจากความขุ่นที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อนำเซลล์ไปวัดค่าการดูดแสง พบว่าค่าการดูดแสงภายหลังการปั่นล้างโพรโทพลาสต์ลดลงถึง 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดแสงของเซลล์ก่อนการสร้างโพรโทพลาสต์ กล่าวคือมีการสูญเสียเซลล์ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จึงได้ดัดแปลงขั้นตอนการล้างเซลล์โดยการใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีความหนาแน่นสูง (ประมาณ 10^{10} ต่อมิลลิลิตร) และหาสภาวะการสร้างโพรโทพลาสต์ที่ใช้ปริมาณไลโซไซม์ค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ให้เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์สูงพอสมควร (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) แล้วเจือจางเซลล์ด้วยสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ 10 เท่า เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4° หรือ -70°ซ นอกจากนี้ยังได้ดัดแปลงสภาวะในการเตรียมโพรโทพลาสต์ที่ใช้ได้ผลกับแบคทีเรียกรัมลบ

รูปที่ 10 รูปแบบการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure และ TAL 141 ure his ในอาหารสูตรครบ CM และสูตรปรับต่ำ MMG

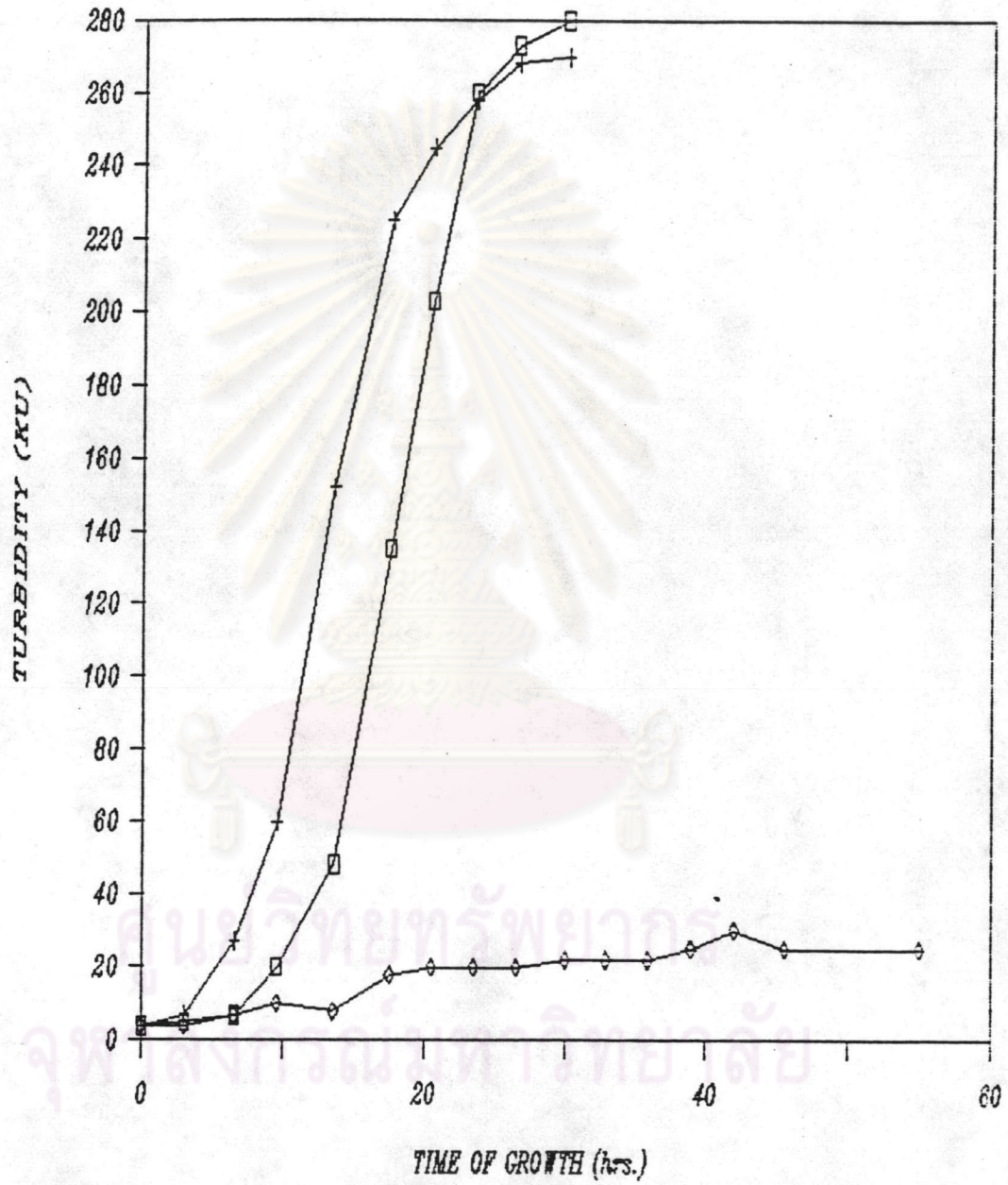


□ TAL141 ure in MMG

◊ TAL141 ure his in MMG

\+ TAL141 ure his in CM

รูปที่ 11 รูปแบบการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 และ USDA 192 Trp Phe ใน อาหารสูตรครบ CM และสูตรปรับต่ำ MMG



□ USDA192 in MMG

◊ USDA192 Trp Phe in MMG

÷ USDA192 Trp Phe in CM

บางชนิด เช่น E. coli , Azotobacter vinelandii , Pseudomonas aeruginosa (Repaske,1958) และ Providence alcalifaciens (Coetzee et al., 1979) มาประยุกต์ใช้กับสายพันธุ์มิวแทนต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 และ R. fredii USDA 192

เนื่องจากไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียกรัมลบ ที่ต้องการกาซออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโต (obligatory aerobic bacteria) และความขุ่นของคัลเจอร์จะแปรตามชนิดของอาหารและปัจจัยอื่น ๆ ดังนั้นในขั้นแรกนี้จะศึกษาผลกระทบของภาวะการเจริญของไรโซเบียมต่อการเกิดโพรโทพลาสต์

3.1 การสร้างโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure ในการทดลองใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure เป็นตัวอย่างในการศึกษาการสร้างโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียม เนื่องจากมีลักษณะโคโลนีที่มีเมือกน้อย ซึ่งคาดว่าจะทำให้การสร้างโพรโทพลาสต์ได้ผลดี จึงเลือกใช้สายพันธุ์ดังกล่าว

3.1.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและอายุของเซลล์ ในการทดลองได้เจริญเซลล์ในอาหารเหลวปริมาตร 25 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดเอเลนเมเยอร์ชนิดมีแขนข้างขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 30 °ซ 120 รอบต่อนาที และติดตามความขุ่นของคัลเจอร์ด้วยเครื่องวัดความขุ่น Klett colorimeter เก็บคัลเจอร์ที่ระยะ mid log (ประมาณ 100 KU) และ late log (ประมาณ 200 KU) แล้วนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ และล้างหนึ่งครั้งด้วยสารละลาย Tris buffer 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีซูโครส 0.4 โมลาร์ (14 กรัมเปอร์เซ็นต์) สร้างโพรโทพลาสต์ในสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ Tris buffer, EDTA และไลโซไซม์เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ , 50 มิลลิโมลาร์ และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ด้วยวิธีวัดค่าการดูดแสงที่ 660 นาโนเมตร และการสังเกตการเปลี่ยนแปลง รูปร่างของเซลล์รูปท่อน (rod shape) เป็นโพรโทพลาสต์รูปวงกลม (oval shape) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลกระทบของชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอายุของเซลล์ Rhizobium sp. TAL 141 ure ต่อการเกิดโพรโทพลาสต์ แสดงไว้ในตารางที่ 3 พบว่าเซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตรอุดม (YM) และอาหารสูตรปรับต่ำ MMG เกิดโพรโทพลาสต์ได้ในเปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกัน และเซลล์ในระยะ mid log มีแนวโน้มว่าเกิดโพรโทพลาสต์ได้สูงกว่าระยะ late log อยู่เล็กน้อย และจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากรูปท่อนเป็นรูปวงกลมให้ผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองนี้ได้นำเซลล์มากระจายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris 125 มิลลิโมลาร์ ที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์ pH 7.8 และเติม lytic buffer A ซึ่งประกอบด้วยไลโซไซม์ที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ (เตรียมไลโซไซม์ใหม่ทุกครั้งก่อนการสร้างโพรโทพลาสต์) ค่อยๆ เอียงหลอดผสมให้เข้ากันและเติม lytic buffer B ซึ่งประกอบด้วย EDTA 125 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ pH 8.0 ในอัตราส่วน 2:1:2 ตามลำดับ โดยมีปริมาตรรวม 0.5 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ผสมให้เข้ากัน ตั้งอุ่นไว้ที่ 37 °ซ จนกว่าจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสารละลายผสมในหลอดทดลอง เมื่อพบว่าสารละลายผสมมีลักษณะหนืดขึ้นแต่ความขุ่นของเซลล์ยังคงเดิม เป็นปรากฏการณ์อันหนึ่งที่พอจะบอกได้ว่ามีโพรโทพลาสต์เกิดขึ้น จึงสุ่มตัวอย่างครั้งละ 5 ไมโครลิตร เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ภายหลังการเติม lytic buffer เปรียบเทียบกับก่อนเติม lytic buffer เมื่อพบโพรโทพลาสต์รูปวงกลมจำนวนมากพอ (oval shape ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์) ภายใน 1 ชั่วโมงของการอุ่นที่ 37 °ซ ก็เติมสารละลาย 0.4 โมลาร์ ซูโครส 4.5 มิลลิลิตร เพื่อเจือจาง 10 เท่า และเก็บไว้ที่ 4 °ซ เพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์โดยวิธีวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และตรวจสอบย้ำด้วยการสังเกตรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อีกครั้งหนึ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่อนข้างสอดคล้องกัน คือวิธีหลังพบโพรโทพลาสต์ประมาณครึ่งหนึ่งของการทดสอบด้วยวิธีแรก

เมื่อเสริมโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้พบปรากฏการณ์หลายอย่างที่แตกต่างกันไป คือ (1) โซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ มีผลในการลดค่าการเจริญสูงสุดของเซลล์ในอาหารสูตร YM คือหลังจากระยะ mid log 7 ชั่วโมง แทบจะไม่มีความขุ่นเพิ่มขึ้น (ดูคำอธิบายใต้ตารางที่ 3) ในขณะที่ไม่พบผลกระทบดังกล่าวในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG (2) มีการแตกของเซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตร YM ที่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ หลังจากการปั่นตกตะกอนเซลล์ ทำให้เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์ต่ำมาก (3) การเสริมโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ทำให้การสร้างโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure เกิดได้ดีที่สุด และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากรูปท่อนเป็นรูปวงกลมก็สูงถึง 60% จาก 83% ที่ได้จากการวัดค่าการดูดแสงอีกด้วย (4) ยังพบว่าเซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ที่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ในระยะ mid log มีการเกิดโพรโทพลาสต์สูงกว่า late log ประมาณ 2 เท่า

3.1.2 ผลกระทบของกำลังไอออนจากบัฟเฟอร์ โดยหลักการวิธีสร้างโพรโทพลาสต์ในแบคทีเรียกรัมลบ ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง Tris-HCl, lysozyme และ divalent metal chelating agent ในอัตราส่วนที่เหมาะสมและจะแตกต่างกันไปในจุลชีพแต่ละชนิด (Repaske, 1956 ; Peberdy, 1980) ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงผลกระทบของความเข้มข้นของ Tris buffer ต่อการเกิดโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp.TAL 141 ure โดยใช้ Tris buffer pH 7.8 ที่มีความเข้มข้น 10-15 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของไลโซไซม์ และ EDTA คงที่ คือ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และมีซูโครส 0.4 โมลาร์ (14 กรัมเปอร์เซ็นต์) เป็นสารปรับความดัน ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ระยะ mid log จากการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่เสริมและไม่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เพื่อศึกษาผลของแหล่งต้นตอคาร์บอนควบคู่ไปกับความเข้มข้นของ Tris buffer จากผลการทดลองในตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารละลาย Tris buffer ระหว่างความเข้มข้น 10-50 มิลลิโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ใกล้เคียงกันในแต่ละสภาวะที่เสริมและไม่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MGG พบเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโพรโทพลาสต์สูงกว่าเซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตรเดียวกันที่เสริมโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้ตรงข้ามกับ

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ Tris กับเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure

Types of medium[1]	Tris-HCl (mM)	% Protoplast $OD_{660\ nm}$	% Alteration[2] of cell shape
MGG	10	80	50
	25	77	50
	50	77	50
MGG + 0.3 M NaCl	10	61	40
	25	62	40
	50	59	40

(1) สูตรอาหารชนิดต่าง ๆ (บทที่ 2)

(2) เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากรูปท่อนเป็นโพรโทพลาสต์รูปวงกลม จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการสร้างโพรโทพลาสต์ ดูรายละเอียดจากคำอธิบายใต้ตารางที่ 3 สำหรับความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์ Tris ที่ 10 และ 25 มิลลิโมลาร์ กระทำได้โดยการนำสารละลายเข้มข้นของบัฟเฟอร์ Tris 125 มิลลิโมลาร์ ซึ่งอยู่ในสารละลาย 0.4 โมลาร์ ซูโครสมาเจือจางด้วยสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้นเป็น 25, 625 และ 125 มิลลิโมลาร์ มาปรับอัตราส่วนของ Tris buffer :Lysozyme : EDTA เท่าเดิม คือ 2:1:2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซลล์ที่ได้จากการเจริญในสูตรอาหารปรับต่ำ MMG ที่มีแมนนิทอลเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน (ตารางที่ 3)

3.1.3 ความเข้มข้นของสารละลายไลโซไซม์ ได้ทดลองศึกษาผลกระทบของปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์ที่ใช้ในการสร้างโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure ที่ความเข้มข้นของไลโซไซม์ (เกรด 1 ของ Sigma) 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารละลาย Tris buffer และ EDTA คงที่ (50 มิลลิโมลาร์ เท่ากัน) และมีซูโครส 0.4 โมลาร์ เป็นสารปรับความดัน ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ระยะ mid log ซึ่งได้จากการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ที่เสริมและไม่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ของเซลล์ที่เจริญในอาหารสูตรดังกล่าว พบว่าเซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารทั้งสองสูตร สามารถนำมาสร้างโพรโทพลาสต์ได้ใกล้เคียงกันเมื่อใช้ไลโซไซม์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรดังในตารางที่ 5 แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาแนวโน้มในการเกิดโพรโทพลาสต์ตามความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เพิ่มขึ้นจาก 0.1 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้ว พบว่าเซลล์ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ที่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ มีแนวโน้มในการเกิดโพรโทพลาสต์ได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของไลโซไซม์เพียง 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ในการเกิดโพรโทพลาสต์โดยวิธีวัดค่าการดูดแสงสูงถึง 84 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เซลล์ที่ได้จากอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ที่ไม่เสริมโซเดียมคลอไรด์ ต้องการความเข้มข้นไลโซไซม์ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการเกิดโพรโทพลาสต์ 80 เปอร์เซ็นต์ (ค่าสูงสุด) และจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากรูปท่อนเป็นรูปวงกลม ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน แต่ยังคงมีค่าต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์ที่ได้จากการวัดค่าการดูดแสง เช่นเดียวกับผลการทดลองในตารางที่ 3

3.1.4 ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ซึ่งเป็น divalent metal chelating agent ที่มีประสิทธิภาพในการทำงานร่วมกับไลโซไซม์ในการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมลบบางชนิด ปริมาณ EDTA ในอัตราส่วนที่เหมาะสมกับไลโซไซม์ และบัฟเฟอร์ Tris มีผลกระทบต่อการเกิดโพรโทพลาสต์ของแบคทีเรียกรัมลบดังได้กล่าวแล้วในข้อ 3.1.2 ได้ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ระหว่าง 10-100 มิลลิโมลาร์ ต่อการเกิดโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL141 ure โดยใช้ความเข้มข้นของ Tris buffer และไลโซไซม์คงที่ (50 มิลลิโมลาร์ และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) และมีสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ เป็นสารปรับความดัน การทดลองนี้ใช้เซลล์ระยะ mid log ที่เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไลโซไซม์ (SIGMA GRADE I) กับเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure

Types of medium[1]	Lysozyme (mg/ml)	% Protoplast $OD_{660\ nm}$	% Alteration[2] of cell shape
MGG	0.1	63	30
	0.3	66	30
	0.5	73	40
	1.0	80	50
MGG + 0.3 M NaCl	0.1	77	40
	0.3	84	60
	0.5	84	60
	1.0	85	60

(1) สูตรอาหารชนิดต่าง ๆ (บทที่ 2)

(2) เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากรูปท่อนเป็นโพรโทพลาสต์รูปวงกลม จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการสร้างโพรโทพลาสต์ ดูรายละเอียดได้จากคำอธิบายใต้ตารางที่ 3 สำหรับความเข้มข้นสุดท้ายของไลโซไซม์เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระทำได้โดยการเจือจางสารละลายเข้มข้นของไลโซไซม์ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อยู่ในสารละลาย 0.4 โมลาร์ ซูโครส ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5, 1.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาปรับอัตราส่วนของ Tris buffer : Lysozyme : EDTA เท่ากับ 2:1:2 เช่นเดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ 2 ชนิด ที่มีสารต้นตอคาร์บอนแตกต่างกัน คือ แมนนิทอล และกลูโคส ซึ่งแสดงผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย EDTA 50 มิลลิโมลาร์ จะดีกว่าที่ 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ และในการทดลองที่ใช้อาหารสูตรที่คล้ายคลึงกัน 2 ชนิดนี้ เสริมด้วยยีสต์สกัด 0.025 กรัมเปอร์เซ็นต์ มีผลช่วยให้เกิดโพรโทพลาสต์ได้มากขึ้น (เปรียบเทียบตารางที่ 6 กับตารางที่ 3,4,5) โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์สูงสุดที่ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ จากวิธีวัดค่าการดูดแสงได้เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์สูงถึง 95 และ 83 เปอร์เซ็นต์ จากเซลล์ที่เจริญในสูตรอาหารที่มีแมนนิทอล และกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ตามลำดับ และจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ ก่อนและหลังการสร้างโพรโพพลาสต์ พบเซลล์รูปวงกลมภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์สูงถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ (จากเซลล์รูปท่อน 100 เปอร์เซ็นต์ก่อนสร้างโพรโทพลาสต์) ซึ่งค่าดังกล่าวใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดแสง

3.1.5 สรุปการสร้างโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp.TAL 141 ure เป็นดังนี้

ก. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเซลล์ คือ อาหารสูตรปรับต่ำที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนเป็นแมนนิทอล เสริมด้วยยีสต์สกัด 0.025 กรัมเปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ (MMGY + 0.3 M NaCl) หลังจากได้เซลล์ในระยะ mid log นำไปปั่นล้างด้วยสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ที่มี Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.8 หนึ่งครั้ง

ข. นำตะกอนเซลล์ที่ปั่นล้างแล้วไปกระจายในสารละลายสร้างโพรโทพลาสต์ คือ สารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายของ Tris buffer, ไลโซไซม์ และ EDTA เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์, 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในปริมาตรรวม 0.5 มิลลิลิตร อุ่นที่ 37 °ซ ภายใน 1 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เมื่อได้โพรโทพลาสต์รูปวงกลม นำมาเจือจางด้วยซูโครส 0.4 โมลาร์ 10 เท่า เก็บไว้ที่ 4 °ซ เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์โดยวิธีวัดค่าการดูดแสง

ค. โพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure ที่เตรียมได้จากเซลล์ที่เจริญในอาหารสูตรและสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น จะให้โพรโทพลาสต์รูปวงกลม (oval shape) เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 3 และ 4 ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ก่อนสร้างโพรโทพลาสต์ที่มีรูปร่างเป็นท่อน (ภาพที่ 1,2)

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EDTA กับเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ของ *Rhizobium* sp. TAL 141 ure

Types of medium[1]	EDTA (mM)	% Protoplast[3] $OD_{660\ nm}$	% Alteration[2] of cell shape
MGG	10	88	80
	50	95	90
	100	36	90
MGG + 0.3 M NaCl	10	81	80
	50	83	80
	100	65	80

(1) สูตรอาหารชนิดต่าง ๆ (บทที่ 2)

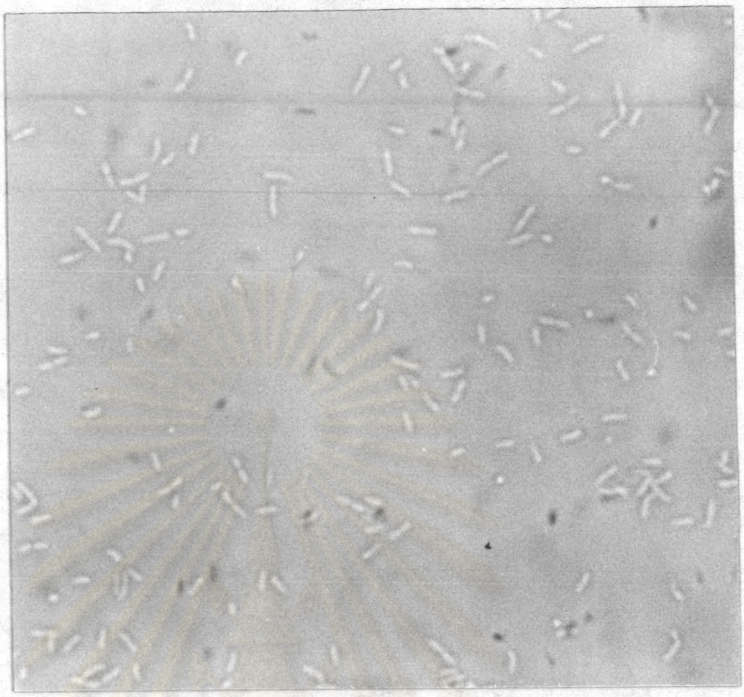
(2) เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากรูปท่อนเป็นโพรโทพลาสต์รูปวงกลมจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(3) จำนวนเซลล์หลังการสร้างโพรโทพลาสต์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดโดยวิธีวัดค่าการดูดแสงและการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

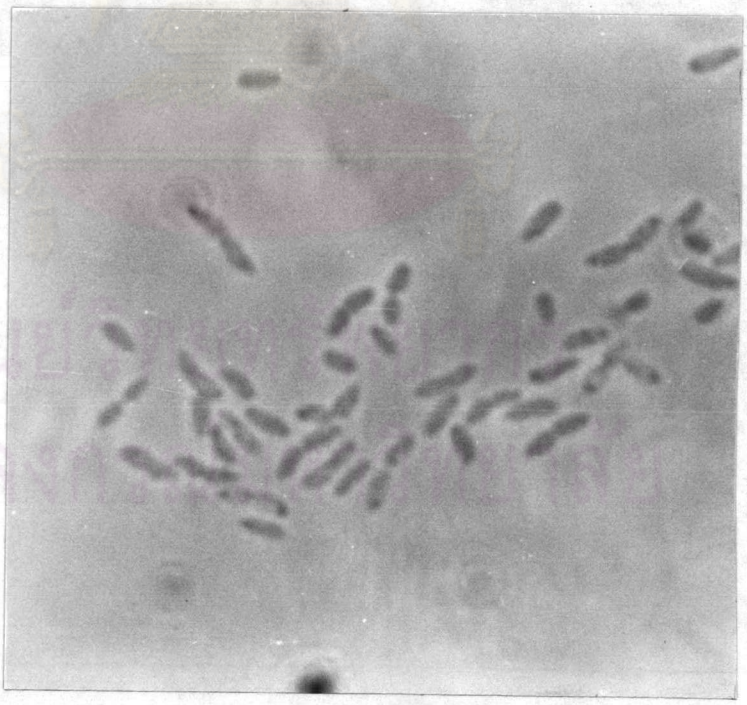
วิธีการสร้างโพรโทพลาสต์ดูรายละเอียดได้จากคำอธิบายใต้ตารางที่ 3 สำหรับความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย EDTA 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ กระทำได้โดยการเจือจางสารละลายเข้มข้นของ EDTA 500 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ ด้วยสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้นเป็น 50, 250 และ 500 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับอัตราส่วนของ Tris buffer : Lysozyme : EDTA เท่ากับ 2:1:2 เช่นเดิม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1

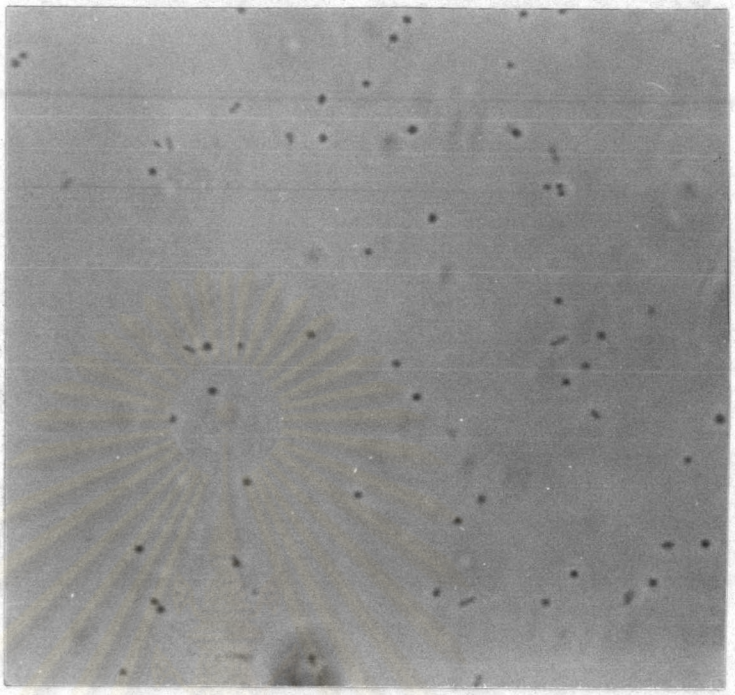


ภาพที่ 2

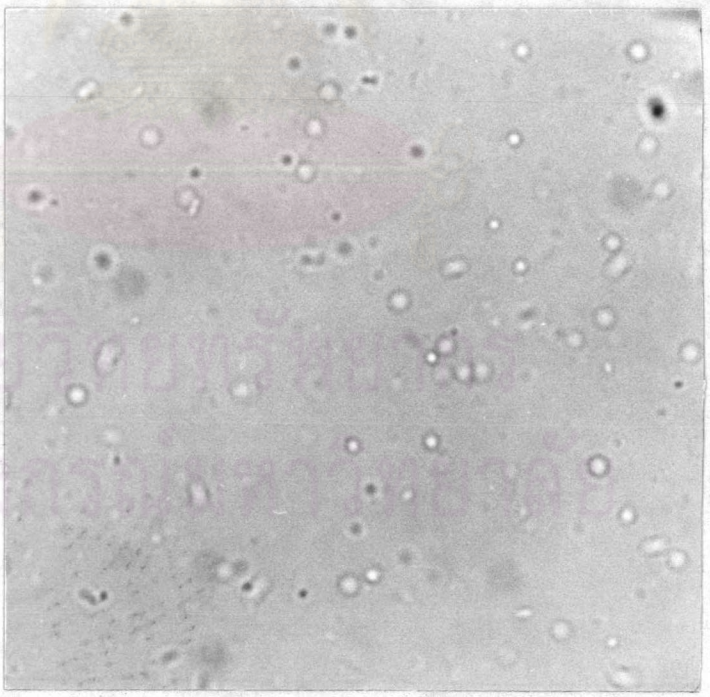


ภาพที่ 1,2 เซลล์ไรโซเบียมก่อนการสร้างโพรโทพลาสต์ โดยปกติมีรูปร่างเป็นท่อนยาว (rod shape) จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 และ 1000 เท่า ตามลำดับ

ภาพที่ 3



ภาพที่ 4



ภาพที่ 3,4 เซลล์ไรโซเบียมหลังจากการสร้างโพรโทพลาสต์ แสดงการเกิดโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียม ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากรูปท่อนยาว (rod shape) เป็นรูปวงกลม (oval shape) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสร้างโพรโทพลาสต์ จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 และ 1000 เท่า ตามลำดับ

3.2 การสร้างโพรโทพลาสต์ของสายพันธุ์พ่อแม่ (parental strain) ที่ใช้ในเทคนิคโพรโทพลาสต์ฟิวชัน เนื่องจากไม่สามารถใช้ Rhizobium sp. TAL 141 ure ในการหลอมเซลล์กับ R. fredii USDA 192 เพราะขาดยีนเครื่องหมายในการติดตามฟิวแซนต์ จึงสร้างยีนเครื่องหมายเพิ่มขึ้น คือสายพันธุ์ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe

3.2.1 ปัญหาในการเตรียมโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp.TAL 141 ure his และ มิวแทนต์ของ R. fredii USDA 192 ความแตกต่างที่เด่นชัดระหว่าง TAL 141 ure his กับ TAL 141 ure คือ TAL 141 ure his มีการเจริญในอาหารสูตรอุดมช้ากว่า TAL 141 ure และสร้างเมือกได้มากกว่า TAL 141 ure (แต่น้อยกว่า TAL 141) นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของ TAL 141 ure his ในสภาวะที่ให้กาซออกซิเจนปกติ ในอัตราส่วนปริมาตรคัลเจอร์ต่อปริมาตรขวดเอเลนเมเยอร์ 1 ต่อ 10 พร้อมทั้งเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที จะทำให้เซลล์เกิดการจับกลุ่มกัน ไม่ว่าจะเลี้ยงในอาหารสูตรใดก็ตาม และเมื่อนำเซลล์ดังกล่าวไปสร้างโพรโทพลาสต์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ใน 3.1.5 ข. พบว่าสามารถสร้างโพรโทพลาสต์ได้เพียง 60 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีวัดค่าการดูดแสง และจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์รูปท่อนเป็นรูปท่อนอ้วนสั้น (stunt-short rod shape) เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบโพรโทพลาสต์รูปวงกลม (oval shape) ซึ่งแตกต่างจากการเกิดโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure

สำหรับ R. fredii USDA 192 ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์เดิมหรือสายพันธุ์มิวแทนต์ ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ดังนั้นจึงเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร MMGY และ MMGY ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนทริปโตเฟน และฟีนิลอะลานีน (ตามชนิดของยีนเครื่องหมาย) และสร้างโพรโทพลาสต์ตามวิธีที่กล่าวไว้ใน 3.1.5 ข. ได้เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์จากการวัดค่าการดูดแสงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ แต่จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากรูปท่อนเป็นรูปท่อนอ้วนสั้นเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบโพรโทพลาสต์รูปวงกลม (ไม่ได้แสดงข้อมูลไว้)

ดังนั้นจึงต้องค้นคว้าเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการสร้างโพรโทพลาสต์โดยใช้ Rhizobium sp. TAL 141 ure his และ R. fredii USDA 192 Trp Phe เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2.2 ความเข้มข้นของไกลซีนที่เหมาะสมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Coetzee et al. (1979) สร้างโพรโทพลาสต์ของ Providence alcalifaciens โดยการเติมไกลซีนในปริมาณที่สามารถยับยั้งการเจริญบางส่วนของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วสร้างโพรโทพลาสต์โดยวิธี lysozyme-EDTA ดังนั้นจึงได้นำวิธีการนี้มาประยุกต์ใช้กับการสร้างโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure his และ R. fredii USDA 192 Trp Phe

ก. ผลกระทบของไกลซีนต่อการเจริญเติบโตจากการเจริญเซลล์ Rhizobium sp. TAL 141 ure his และ R. fredii USDA 192 Trp Phe ในสูตรอาหารกึ่งปรับต่ำ MMGY ที่เสริมด้วยกรดอะมิโน ตามชนิดของ auxotroph และไกลซีนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้ผลการทดลองดังในตารางที่ 7 ความเข้มข้นของไกลซีนที่ 3.0 และ 0.03 กรัมเปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ในสายพันธุ์ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe ตามลำดับ จะเห็นว่าความต้านทานของเซลล์ต่อไกลซีนของไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกันถึง 100 เท่า สำหรับไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his เริ่มเห็นผลกระทบของไกลซีนต่อการเจริญของเซลล์เพียงเล็กน้อยที่ความเข้มข้นของไกลซีน 0.3 กรัมเปอร์เซ็นต์ และผลกระทบของไกลซีนต่อการเจริญของเซลล์เห็นได้ชัดเจนที่ความเข้มข้นของไกลซีน 0.6 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญสูงสุดได้ประมาณ 1/2 เท่าของเซลล์ที่เจริญในอาหารสูตรชนิดเดียวกันที่ไม่เสริมด้วยไกลซีน ในขณะที่ความเข้มข้นของไกลซีนระดับต่ำเพียง 0.005-0.01 กรัมเปอร์เซ็นต์ ก็สามารถยับยั้งการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ได้ 1/2 เท่า

ข. ผลกระทบของระยะการเจริญของเซลล์ที่สัมผัสกับไกลซีนต่อการเกิดโพรโทพลาสต์ ในการสร้างโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าว ได้นำเซลล์ไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe ที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตร MMGY ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนตามชนิดของยีนเครื่องหมาย และไกลซีนที่มีความเข้มข้น 0.6 และ 0.01 กรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มาสร้างโพรโทพลาสต์ตามวิธีที่กล่าวไว้ใน 3.1.5 ข. พบว่าวิธีดังกล่าวใช้ได้ผลดีกับสายพันธุ์มิวแทนต์ของ USDA 192 ดังแสดงผลในตารางที่ 8 สายพันธุ์มิวแทนต์ของ USDA 192 ทั้งสี่สายพันธุ์ สามารถเกิดโพรโทพลาสต์ได้ใกล้เคียงกัน และมีค่าสูงถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีวัดค่าการดูดแสง และจากการสังเกต

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไกลซีนกับค่าความขุ่นสูงสุด (max. turbidity)

Strains	Types of medium[1]	Glycine conc. (g%)	Maximum turbidity (KU)	%Alteration[2] of cell shape before treatment
TAL 141 ure his	MMGY + histidine	0	275	0
		0.3	230	0
		0.6	150	70^{sr}
		1.0	100	$>90^{sr}$
		3.0	10	CND
USDA 192 Trp Phe	MMGY + tryptophan + phenylalanine	0	300	0
		0.005	185	80^{sr}
		0.01	120	90^{sr}
		0.02	65	$>90^{sr}$
		0.03	10	CND

[1] สูตรอาหารชนิดต่าง ๆ (บทที่ 2)

[2] การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ก่อนเติม lytic buffer เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสูตรอาหารที่เสริมด้วยไกลซีน พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากรูปท่อนเป็นเซลล์รูปท่อนอ้วนสั้นก่อนการสร้างโพรโทพลาสต์

^{sr} = เซลล์รูปท่อนอ้วนสั้น (stunt-short rod cells)

CND = ไม่สามารถตรวจพบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การเจริญเซลล์ในสูตรอาหารกึ่งปรับต่ำที่เสริมด้วยกรดอะมิโน (ตามชนิดของ auxotroph) และไกลซีนในการทดลองนี้ กระทำโดยการเติมกรดอะมิโนและไกลซีนในสูตรอาหารดังกล่าวก่อนแล้วจึงค่อยถ่ายเชื้อลงในสูตรอาหารดังกล่าว

ตารางที่ 8 การเกิดโพรโทพลาสต์ของมิวแทนต์ของ R. fredii USDA 192 ที่เจริญในสูตรอาหารที่เสริมด้วยไกลซีน[1] และสร้างโพรโทพลาสต์โดยวิธี lysozyme-EDTA

Strains	%Protoplast	%Alteration [2]	Incubation time [3]
	$OD_{660\ nm}$	of cell shape	(min)
USDA 192 Trp Phe no. 6	85	>95	4
USDA 192 Trp Tyr Phe no. 8	85	>95	15
USDA 192 Trp Tyr Phe no. 9	85	>95	10
USDA 192 Trp Tyr Phe no.12	91	70	30

(1) สูตรอาหารที่ใช้ในการเจริญสายพันธุ์มิวแทนต์ทั้งสี่ของ USDA 192 คือ สูตรอาหารกึ่งปรับต่ำที่เสริมด้วยกรดอะมิโนตามชนิดของ auxotroph และไกลซีน 0.01 กรัมเปอร์เซ็นต์ในระยะ early log

(2) เซลล์ของมิวแทนต์ของ USDA 192 ทั้งสี่สายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากรูปท่อนอ้วนสั้น (ซึ่งเกิดเนื่องจากการเลี้ยงเซลล์ในสูตรอาหารที่เสริมไกลซีน) เป็นโพรโทพลาสต์รูปวงกลมภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์ด้วยวิธี lysozyme-EDTA

(3) ช่วงเวลาที่ใช้ในการเกิดโพรโทพลาสต์ภายหลังการเติม lytic buffer และอุ่นที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์ พบโพรโทพลาสต์รูปวงกลมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสายพันธุ์ USDA 192 Trp Tyr Phe no.12 พบโพรโทพลาสต์รูปวงกลมเพียง 70 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ของมิวแทนต์ทั้งสี่สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งจากวิธีการวัดค่าการดูดแสงและการสังเกตรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ก็มีความแตกต่างกันในช่วงเวลาที่ใช้ในการเกิดโพรโทพลาสต์ ซึ่งแสดงถึงความยากง่ายในการเกิดโพรโทพลาสต์ของแต่ละสายพันธุ์อีกด้วย

ในกรณีของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his พบว่าการสร้างโพรโทพลาสต์โดยวิธี 3.1.5 ข. จากเซลล์ที่เจริญในสูตรอาหาร MMGY เป็น TY ซึ่งประกอบด้วย tryptone และยีสต์สกัด (yeast extract) แต่ไม่มีน้ำตาลเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนโดยตรง เมื่อใช้สูตรอาหารชนิดนี้และเสริมด้วยไกลซีนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.6 กรัมเปอร์เซ็นต์ โดยเติมไกลซีนในช่วงการเจริญระยะต่าง ๆ กัน พบว่าการเกิดโพรโทพลาสต์ของสายพันธุ์ TAL 141 ure his ได้ดีเพียงใดนั้นยังขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเติมไกลซีนระดับที่สามารถยับยั้งการเจริญบางส่วนของเซลล์อีกด้วย (0.6 กรัมเปอร์เซ็นต์) ดังผลการทดลองในตารางที่ 9 พบว่าการเสริมไกลซีนความเข้มข้นต่ำ 0.1 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในระยะการเจริญของเซลล์ early log และเสริมไกลซีนอีก 0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในระยะ mid log (สภาวะB) จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์โดยวิธีวัดค่าการดูดแสงสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเสริมไกลซีนระดับความเข้มข้นสูง 0.6 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในระยะ early log (สภาวะ C) หรือ mid log (สภาวะ A) เพียงอย่างเดียว และจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์ พบโพรโทพลาสต์รูปวงกลม (oval shape) 50 เปอร์เซ็นต์ เพียงสภาวะเดียว คือสภาวะที่เสริมไกลซีนระดับต่ำที่ระยะ early log และเติมไกลซีนระดับความเข้มข้นสูงเพิ่มอีกที่ระยะ mid log และพบเซลล์รูปท่อนอ้วนสั้นอีก 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ก่อนสร้างโพรโทพลาสต์ที่มีรูปร่างเป็นท่อนยาว (rod shape) เพียงแบบเดียว สำหรับในสภาวะที่เสริมไกลซีนระดับความเข้มข้นสูงในระยะ mid log (สภาวะ A) พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากรูปท่อนยาวเป็นรูปท่อนอ้วนสั้น (stunt-short rod shape) เพียงเล็กน้อย (30 เปอร์เซ็นต์) และสภาวะที่เสริมไกลซีนความเข้มข้นสูงในระยะ early log พบว่าเซลล์ก่อนสร้างโพรโทพลาสต์มีรูปร่างเป็นท่อนอ้วนสั้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ และเมื่อพิจารณาร่วมกับเปอร์เซ็นต์การเกิด

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะการเจริญของเซลล์ที่เติมไกลซีนระดับความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญบางส่วนของเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TY[1] ต่อการสร้างโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure his

Addition of glycine[2]		% Protoplast	An observe under LM	
stage of growth	glycine conc. (gm%)	OD_{660nm}	before treat c̄ lysozyme-EDTA	after treat c̄ lysozyme-EDTA
early log ┐ A ┘ mid log	0 ┐ 0.6 ┘	57	rod cells 100%	stunt-short rod cells 30%
early log ┐ B ┘ mid log	0.1 ┐ 0.5 ┘	77	rod cells 100%	stunt-short rod cells 50% , oral cells 50%
early log ┐ C ┘ mid log	0.6 ┐ 0 ┘	40	stunt-short rod cells >90%	stunt-short rod cells >90%

(1) สูตรอาหาร TY ของ Beringer (บทที่ 2) เจริญเซลล์โดยให้อากาศ 10 เท่าโดยปริมาตร และตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ แต่ไม่ต้องเขย่า

(2) การเติมไกลซีนในทุกสภาวะมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.6 กรัมเปอร์เซ็นต์ เพียงแต่แตกต่างกันในขั้นตอนหรือช่วงเวลาที่เติมไกลซีนของแต่ละสภาวะ

สภาวะ A เติมไกลซีน 0.6 กรัมเปอร์เซ็นต์ เมื่อเซลล์เจริญถึงช่วง mid log (ประมาณ 80 KU) และตั้งทิ้งไว้ที่ 30 °ซ 2 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปสร้างโพรโทพลาสต์ รวมเวลาที่ใช้ในการเจริญก่อนเก็บเซลล์ 14 ชั่วโมง ซึ่งให้ความขุ่นประมาณ 100 KU

สภาวะ B เติมไกลซีน 0.1 กรัมเปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TY ก่อนแล้วจึงถ่ายเชื้อลงในสูตรอาหารดังกล่าว เจริญเซลล์จนได้ระยะ mid log (ประมาณ 80 KU) แล้วเติมไกลซีนอีก 0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์ ตั้งไว้ที่ 30 °ซ 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปสร้างโพรโทพลาสต์ รวมเวลาที่ใช้ในการเจริญก่อนเก็บเซลล์ 17 ชั่วโมง ซึ่งให้ความขุ่นประมาณ 100 KU

สภาวะ C เติมไกลซีน 0.6 กรัมเปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TY ก่อนแล้วจึงถ่ายเชื้อลงในสูตรอาหารดังกล่าว เจริญเซลล์จนได้ความขุ่นประมาณ 100 KU แล้วนำไปสร้างโพรโทพลาสต์ รวมเวลาที่ใช้ในการเจริญก่อนเก็บเซลล์ 24 ชั่วโมง

c̄ = with

โพรโทพลาสต์โดยการวัดค่าการดูดแสง จะเห็นว่ามีโพรโทพลาสต์รูปท่อนอ้วนสั้น (short rod) เพียงเล็กน้อย (40 เปอร์เซ็นต์)

เป็นที่น่าสังเกตว่าการเสริมไกลซีนที่มีความเข้มข้นสูง 0.6 กรัมเปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้รูปร่างของเซลล์ TAL 141 ure his เปลี่ยนแปลงจากรูปท่อนยาวเป็นรูปท่อนอ้วนสั้นได้แม้ยังไม่เติม lytic buffer และการเจริญเซลล์ในสภาวะดังกล่าวต้องใช้เวลาในการเจริญเติบโตยาวนานกว่าสภาวะอื่น ๆ

3.2.3 การใช้ GEDTA ในการสร้างโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure his อย่างไรก็ตามการสร้างโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his จากสภาวะการเจริญที่ดีดังกล่าว (สภาวะ B ในตารางที่ 9) สามารถเกิดโพรโทพลาสต์รูปวงกลมเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ จึงทดลองเปลี่ยนชนิดของ divalent metal chelating agent จาก EDTA เป็น GEDTA โดยใช้เซลล์ที่เจริญในสูตรอาหาร TY ที่เสริมด้วยไกลซีนระดับต่ำ 0.1 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในระยะ early log และเสริมไกลซีนอีก 0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์ในระยะ mid log (คำอธิบายสภาวะ B ใต้ตารางที่ 9) และสร้างโพรโทพลาสต์ในสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ที่มีความเข้มข้นของ Tris buffer pH 7.8, ไลโซไซม์ (เกรด 1 ของ Sigma) และ GEDTA pH 8.5 เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์, 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (วิธีการสร้างโพรโทพลาสต์ทำนองเดียวกับคำอธิบายใต้ตารางที่ 3 เพียงแต่ใช้ GEDTA แทน EDTA)

เมื่อใช้ GEDTA แทน EDTA ในการทำงานร่วมกับ Tris buffer และไลโซไซม์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น พบว่า GEDTA ช่วยให้การทำงานของไลโซไซม์ในการย่อยผนังเซลล์ของ TAL141 ure his มีประสิทธิภาพดีขึ้น ซึ่งแสดงผลการทดลองในตารางที่ 10 เมื่อใช้ GEDTA ร่วมกับไลโซไซม์ เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์จากการวัดค่าการดูดแสงสูงถึง 89 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ EDTA ร่วมกับไลโซไซม์ เกิดโพรโทพลาสต์เพียง 75 เปอร์เซ็นต์ และจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากรูปท่อนยาวเป็นโพรโทพลาสต์รูปวงกลมถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ GEDTA ร่วมกับไลโซไซม์ ในขณะที่การใช้ EDTA ร่วมกับไลโซไซม์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์รูปวงกลมเพียง 50 เปอร์เซ็นต์

3.2.4 การรักษาสภาพโพรโทพลาสต์และการหวลคืนผนังเซลล์ หลังจาก

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure his เมื่อใช้ GEDTA กับ EDTA ในสารละลายที่ใช้สร้างโพรโทพลาสต์

Types of metal chelating agent	% Protoplast $OD_{660\ nm}$	% Alteration of cell shape [1]
GEDTA	89	90
EDTA	75	50

[1] เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ จากรูปท่อนยาว(ก่อนการสร้างโพรโทพลาสต์) เป็นโพรโทพลาสต์รูปวงกลม ภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์ จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการสร้างโพรโทพลาสต์แล้ว จะต้องหาวิธีรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ให้คงอยู่ ในที่นี้ได้ศึกษาถึงปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์โดยทดสอบการหวลคืนของความมีชีวิตของเซลล์

ก. ชนิดของบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ ได้เปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมที่อุณหภูมิ 4° และ -70°ซ โดยใช้โพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure his เป็นตัวอย่างในการศึกษา โดยได้นำโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure his กระจายในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ชนิด ที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์ เป็นสารปรับความดัน ทดสอบการเก็บที่ -70°ซ และที่ 4°ซ เป็นเวลา 2.5 วัน นำโพรโทพลาสต์ที่เก็บไว้มาแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์เดิมและในน้ำกลั่นในปริมาณที่เป็นอนุกรม เพื่อหาจำนวนเซลล์มีชีวิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรครบที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์ โดยวิธี spread plate บ่มที่ 28°ซ ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่าความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์จะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เก็บรักษาทั้งคู่อีกด้วย แต่ malate buffer จะให้ผลดีกว่าบัฟเฟอร์ชนิดอื่น

สรุปได้ว่าการเก็บโพรโทพลาสต์ที่ -70°ซ ใน maleate buffer น่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสม

ข. ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาความดัน ได้ศึกษาชนิดของสารปรับความดันต่อการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ คือ Rhizobium sp. TAL 141 ure his และ R. fredii USDA 192 Trp Phe (ซึ่งเก็บรักษาอยู่ในสารละลาย maleate buffer 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.5 ที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์) โดยใช้สารรักษาความดัน 2 ชนิด คือ ซูโครสและโซเดียมคลอไรด์ โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของซูโครสและโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.4 และ 0.3 โมลาร์ ตามลำดับ พบว่า Rhizobium sp. TAL 141 ure his สามารถหวลคืนโพรโทพลาสต์บนอาหารสูตรครบที่เสริมด้วยซูโครส 0.4 โมลาร์ หรือโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ได้ดีพอๆ กัน ยกเว้นแต่ว่าอาหารสูตรครบที่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์จะมีการเจริญของโคโลนีช้ากว่าอาหารสูตรครบที่เสริมด้วยซูโครสเท่านั้น (ตารางที่ 12) ทั้งสองสภาวะไม่พบการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของ R. fredii USDA 192 Trp Phe

ลองทดลองใหม่โดยใช้สารละลาย maleate buffer 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.5 ที่มีซูโครสระหว่าง 0.12-0.4 โมลาร์ ในการรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีซูโครสระหว่าง 0.175-0.292 โมลาร์ (6-10 กรัม

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อเก็บในสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4° และ -70° ซ เป็นเวลา 2.5 วัน

Protoplast stabilizing buffer	Before storage		After storage at temperature			
	4°c		4°c		-70°c	
	P buffer	D.W.	P buffer	D.W.	P buffer	D.W.
YS-14 pH 6.8	$3.5x10^8$	$2.7x10^7$	$2.6x10^8$	$2.7x10^7$	$3.2x10^8$	$2.6x10^7$
50 mM.Tris-HCl pH 7.5 + 0.4 M sucrose	$3.2x10^8$	$2.6x10^7$	$4.3x10^7$	$2.6x10^6$	$2.0x10^8$	$2.1x10^7$
10 mM.Maleate pH 6.5 + 0.4 M sucrose	NT	NT	$3.3x10^8$	$3x10^7$	NT	NT
20 mM.Maleate pH 6.5 + 0.4 M sucrose	NT	NT	$3.4x10^8$	$2.9x10^7$	NT	NT
50 mM.Maleate pH 6.5 + 0.4 M sucrose	$3.7x10^8$	$2.6x10^7$	$3.9x10^8$	$2.3x10^7$	$3.7x10^8$	$2.4x10^7$
50 mM.Maleate pH 7.5 + 0.4 M น้ำตาลทราย	NT	NT	$3.7x10^8$	$2.2x10^7$	$3.3x10^8$	$2.4x10^7$

NT = ไม่ได้ทำการทดลองในสภาวะดังกล่าว

P buffer = Protoplast stabilizing buffer ที่ใช้ในการเจือจางเพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งจะเป็นชนิดเดียวกับชนิดที่ใช้เก็บรักษาโพรโทพลาสต์ในสภาวะนั้น ๆ

D.W. = น้ำกลั่นที่ใช้เจือจางเพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีผนังเซลล์ (non protoplast)

YS-14 = สูตรอาหารที่มี YM ที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์ ทำหน้าที่เป็นสารปรับความดันสำหรับโพรโทพลาสต์

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดสารปรับความดัน กับการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL141 ure his บนสูตรอาหารอุดมยีสต์แมนนิทอล (YM) ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนตามชนิดของออกโซโทรป (สูตรอาหารครบ)

Rhizobial strain	Types of osmostabilizing agent	Viable cell count/ml	
		before PMA	after PMA
Rhizobium sp.	0.4 M sucrose	$1.0x10^8$	$6.2x10^7$
TAL 141 ure his	0.3 M NaCl	$9.1x10^7$	$5.7x10^7$
	D.W.	NT	$7.5x10^6$

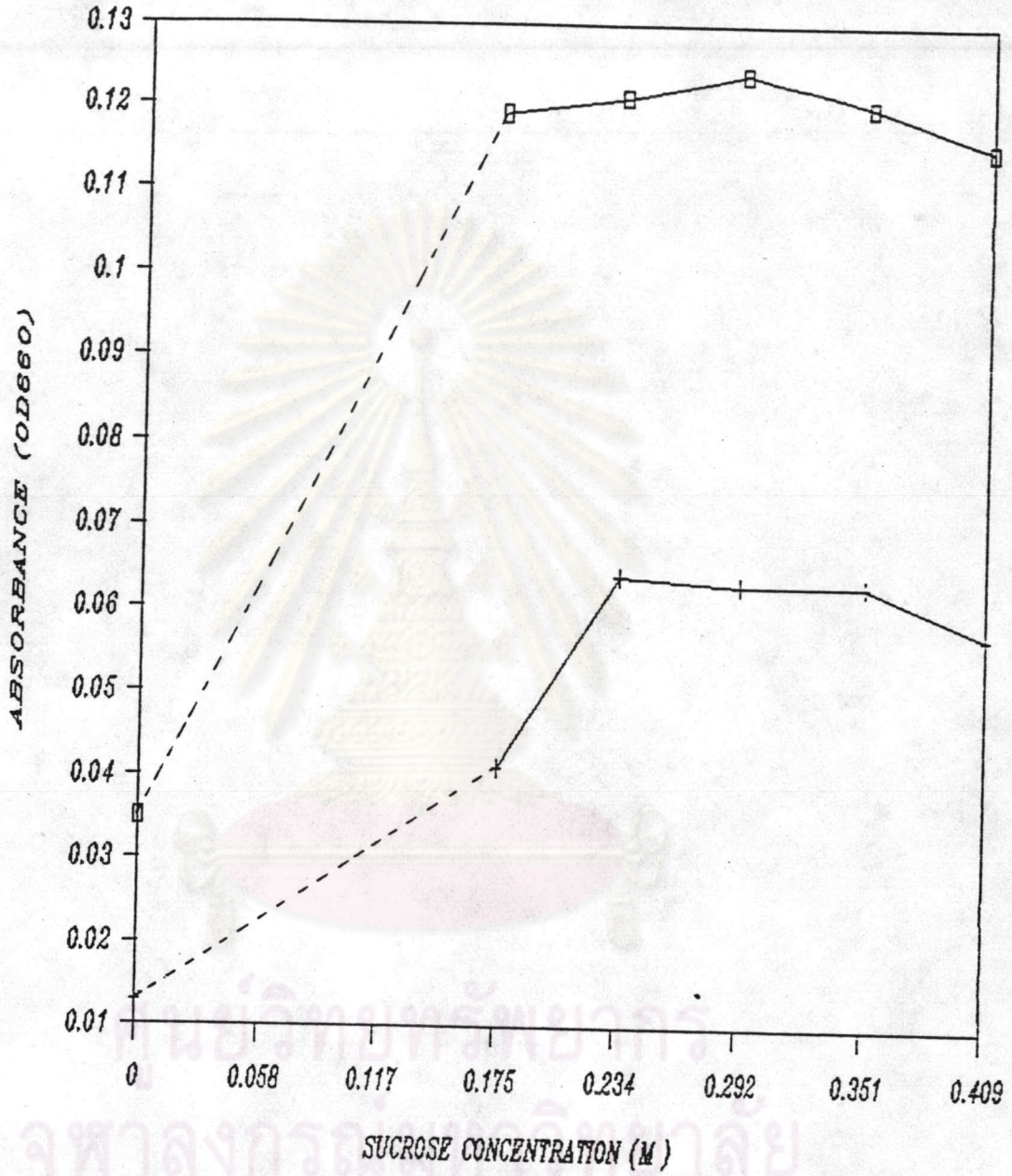
PMA = protoplast formation

NT = ไม่ได้ทำการทดลองในสภาวะดังกล่าว (not test)

การทดลองนี้ได้นำโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์มาลิเอท 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.5 ที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์ หรือโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เป็นสารปรับความดันของแต่ละชุดการทดลองเพื่อหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด เมื่อเจือจางเซลล์จนได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่พอเหมาะ ก็นำไปกระจายบนสูตรอาหารอุดมที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์ หรือโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ตามลำดับ โดยเทคนิค spread plate (Somasegaran & Hoben, 1985) และเจือจางเซลล์ในน้ำกลั่นเพื่อหาจำนวนเซลล์ที่ไม่ใช่โพรโทพลาสต์ โดยทำการทดลองในทำนองเดียวกัน แล้วกระจายบนสูตรอาหาร YM ที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์ นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (viable cell count) ของแต่ละสภาวะ

จากการทดลองดังกล่าวไม่พบการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของ USDA 192 Trp Phe จากค่าการดูดแสงที่ OD_{660} = 0.215 (จำนวนเซลล์ประมาณ 10^7-10^8 ต่อมิลลิลิตร) และไม่พบการเจริญของเซลล์ปกติที่เหลืออยู่ (เมื่อเจือจางในน้ำกลั่น) บนสูตรอาหารครบที่มีความเข้มข้นของสารปรับความดันทั้งสามชนิดดังกล่าว แต่สำหรับ TAL 141 ure his มีการหวลคืนผนังเซลล์บนสูตรอาหารครบที่มีซูโครส 0.4 โมลาร์ได้เร็วภายใน 1 วัน ในขณะที่การหวลคืนผนังเซลล์บนสูตรอาหารครบที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เป็นสารปรับความดันต้องใช้เวลาถึง 3 วัน

รูปที่ 12 การคงสภาพของโพรโทพลาสต์ ที่ปริมาณซูโครสแตกต่างกัน

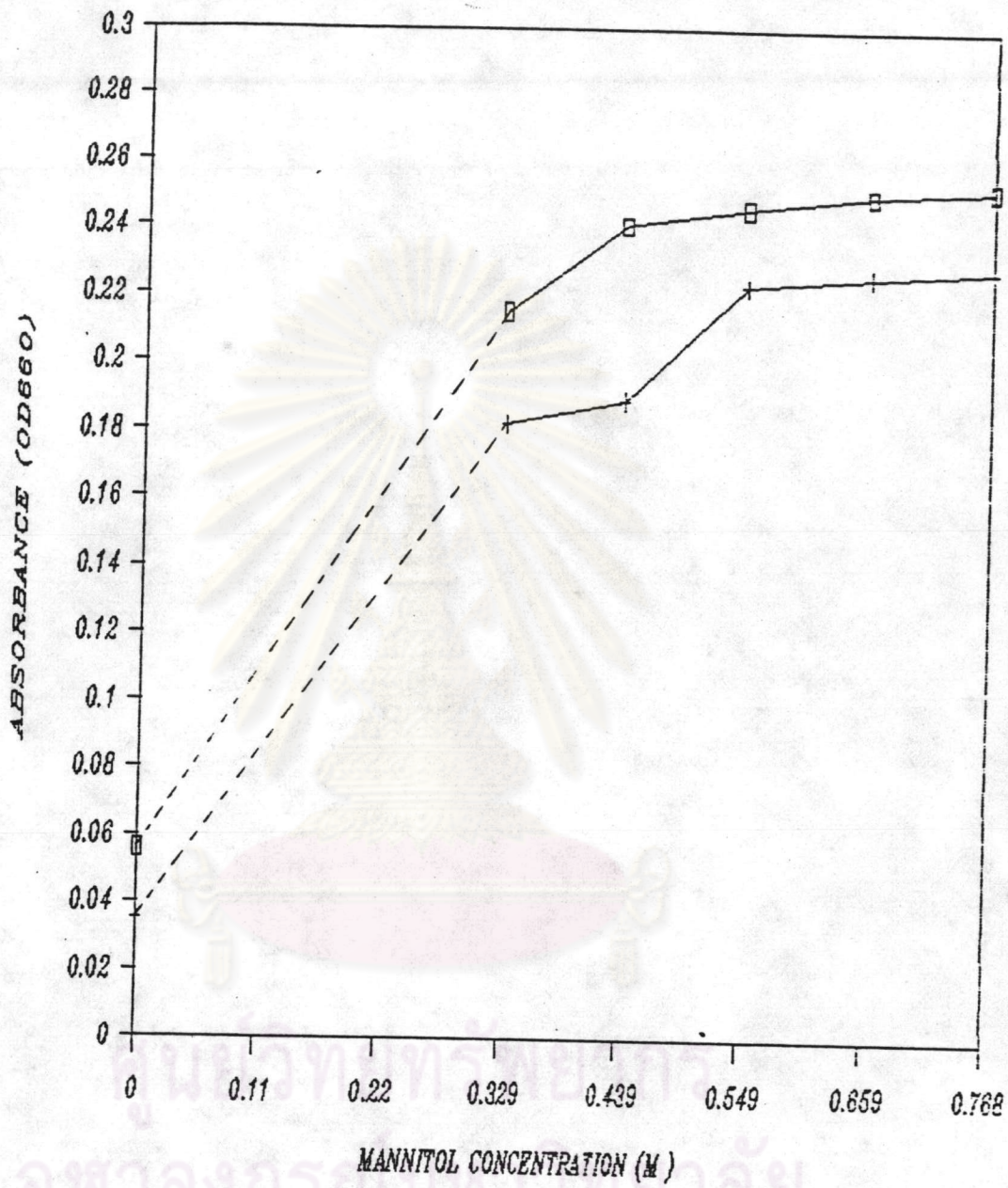


□ Rhizobium sp. TAL 141 ure his

\+ R. fredii USDA 192 Trp Phe

ในการทดลองได้นำโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมมาเจือจางในสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ ที่มีซูโครสความเข้มข้นระหว่าง 0.175 - 0.409 โมลาร์ เป็นสารปรับความดันในอัตราส่วนของโพรโทพลาสต์ต่อสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์เท่ากับ 1:9 ที่ทุกๆ ความเข้มข้นของซูโครส และนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

รูปที่ 13 การคงสภาพของโพรโทพลาสต์ ที่ปริมาณแมนนิทอลแตกต่างกัน



□ Rhizobium sp. TAL 141 ure his

\+ R. fredii USDA 192 Trp Phe

ในการทดลองได้นำโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมมาเจือจางในสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ที่มีความเข้มข้นของแมนนิทอลระหว่าง 0.329 - 0.659 โมลาร์ เป็นสารปรับความดันในอัตราส่วนของโพรโทพลาสต์ต่อสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์เท่ากับ 1:2 ที่ทุก ๆ ความเข้มข้นของแมนนิทอล และวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ตารางที่ 13 การหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ที่เตรียมจากเซลล์ในระยะการเจริญ mid log และ late log บนสูตรอาหารอุดม (YM) ที่มีซูโครส 0.234 โมลาร์ เป็นตัวปรับความดัน

Strains	Growth phase	%Protoplast regeneration (1)	%Cell loss after protoplast formation by OD_{660} (2)
Rhizobium sp. TAL 141 ure his	mid log	49	12
	late log	36	13
R. fredii USDA 192 Trp Phe	mid log	28	8
	late log	0.3	36

(1) การหาเปอร์เซ็นต์การหวลกลับของโพรโทพลาสต์ดูได้จากการคำนวณในภาคผนวก

(2) คำนวณเซลล์ที่สูญเสียภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์โดยการวัดค่าการดูดแสง (การคำนวณในภาคผนวก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เปอร์เซ็นต์) ช่วยรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ดีที่สุด ได้ทดลองเปลี่ยนชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นสารปรับความดันจากซูโครสเป็นแมนนิทอล และทดลองในทำนองเดียวกัน พบว่าโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe ต้องการความเข้มข้นของแมนนิทอลสูง 0.439 โมลาร์ (8 กรัมเปอร์เซ็นต์) และ 0.549 โมลาร์ (10 กรัมเปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (รูปที่ 13)

สรุปก็คือ ซูโครส 0.234 โมลาร์จะรักษาสภาพของโพรโทพลาสต์ดีที่สุด

ได้ทดลองนำเซลล์ระยะ mid log และ late log มาสร้างโพรโทพลาสต์และเก็บรักษาในสภาวะที่เหมาะสม คือมีซูโครส 0.234 โมลาร์ เป็นสารปรับความดันใน maleate buffer และเก็บที่ 4° หรือ -70°ซ พบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 141 ure his นั้นจะใช้เซลล์ช่วงใดมาสร้างโพรโทพลาสต์ก็ได้ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพรโทพลาสต์ไม่สูงมากนัก แต่ถ้าเป็นไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe แล้ว ต้องใช้เซลล์จากระยะ mid log อย่างเดียว

ได้นำสภาวะที่ศึกษาทั้งหมดมารวมกันแล้วทำการทดลองซ้ำ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่าโพรโทพลาสต์ของ USDA 192 Trp Phe สามารถหวลคืนผนังเซลล์ได้ในสภาวะที่เหมาะสม และการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของสายพันธุ์ทั้งสองที่เตรียมได้จากเซลล์ในระยะ mid log มีค่าสูงกว่าระยะ late log ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ซึ่งมีการหวลคืนผนังเซลล์ในระยะ mid log สูงกว่า late log ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างโพรโทพลาสต์จากเซลล์ในระยะ late log มีการสูญเสียจำนวนเซลล์มากกว่าการสร้างโพรโทพลาสต์จากเซลล์ในระยะ mid log และเห็นได้ชัดเจนในสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ซึ่งมีการสูญเสียเซลล์ภายหลังการสร้างโพรโทพลาสต์จากเซลล์ในระยะ late log สูงถึง 36 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตามได้ทดลองนำโพรโทพลาสต์ของสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe เบอร์ 8, 9 และ 12 มาหวลคืนผนังเซลล์บนสูตรอาหารครบที่มีซูโครส 0.234 โมลาร์เช่นกัน จากการสังเกตเป็นเวลา 10 วัน ไม่พบการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์บนสูตรอาหารดังกล่าว

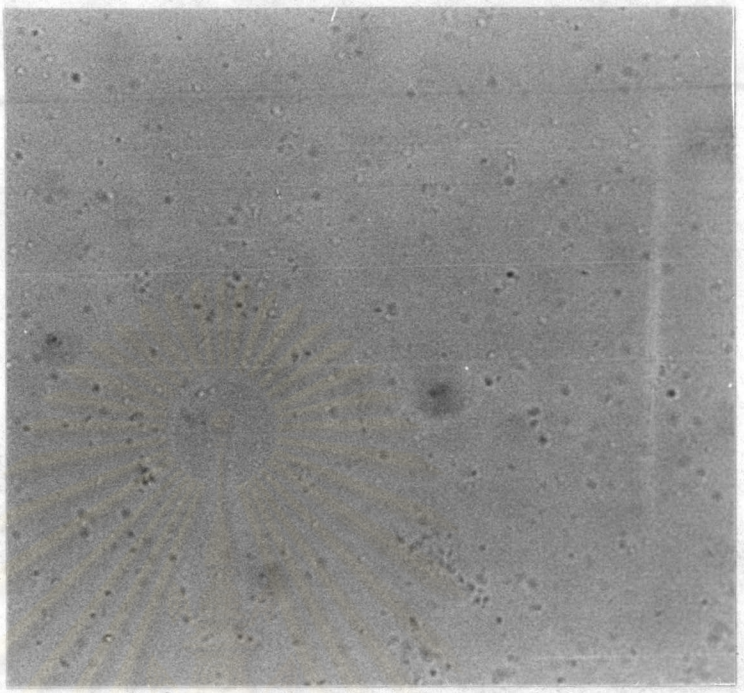
4. โพรโทพลาสต์ฟิวชันและการแยกฟิวแซนต์

ในงานวิจัยนี้ได้นำโพรโทพลาสต์ของ Rhizobium sp. TAL 141 ure his และ R. fredii USDA 192 Trp Phe มาหลอมด้วยสารเคมีที่ชื่อว่า polyethylene

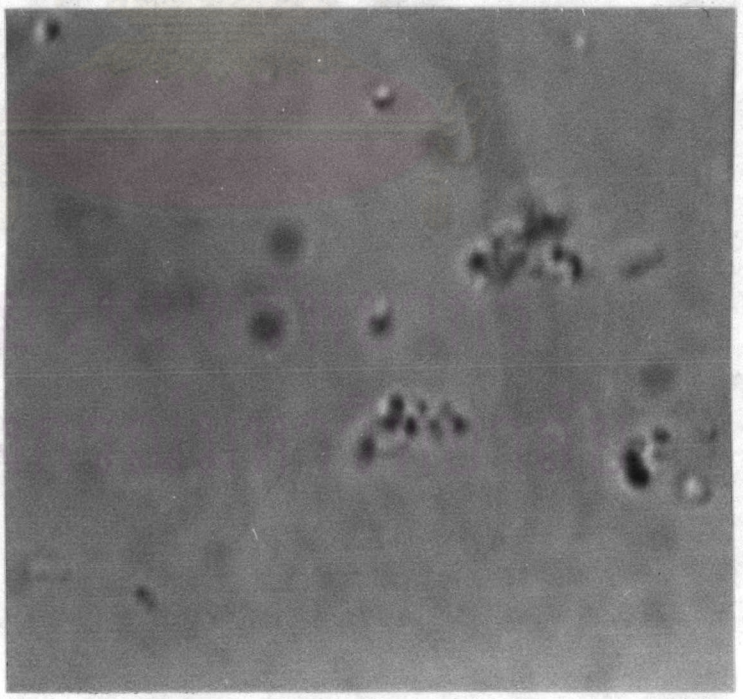
glycol (PEG) พบว่า เมื่อใช้ PEG น้ำหนักโมเลกุล 6000 ที่มีความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (15 กรัมเปอร์เซ็นต์) ในสารละลายซูโครส 0.234 โมลาร์ หลอมโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งมีจำนวนเซลล์ 10^7-10^8 ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 5 นาที และสุ่มตัวอย่างไปสังเกตลักษณะการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะกลุ่มเซลล์ขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไป ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6 (กำลังขยาย 400 และ 1000 เท่า ตามลำดับ) เมื่อนำโพรโทพลาสต์ที่ถูกหลอมในสภาวะดังกล่าวมาเจือจางในสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ที่เหมาะสม (maleate buffer 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีซูโครส 0.234 โมลาร์ pH 6.5) 10-1000 เท่า แล้วกระจายเซลล์ด้วยเทคนิค spread plate เบาๆ บนอาหารสูตรคัดเลือก MMGS-8 ซึ่งเป็นอาหารสูตรปรับต่ำที่ไม่เสริมกรดอะมิโนใดๆ ทั้งสิ้น และมีซูโครส 0.234 โมลาร์เป็นสารปรับความดัน พบการหวลคืนของโพรโทพลาสต์ซึ่งให้ลักษณะโคโลนี 2 ขนาด คือ โคโลนีขนาดเล็กที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1 มิลลิเมตร เจริญทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อและมีโคโลนีขนาดใหญ่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3-0.5 มิลลิเมตร ปะปนอยู่เล็กน้อย ซึ่งลักษณะดังกล่าวก็พบในกลุ่มควบคุมเช่นกัน คือ กลุ่มควบคุมที่มีเฉพาะโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe แต่ไม่เติม PEG ก็พบทั้งโคโลนีขนาดเล็กและใหญ่ กลุ่มควบคุมที่มีเฉพาะโพรโทพลาสต์ของ USDA 192 Trp Phe และ PEG พบเฉพาะโคโลนีขนาดเล็กกระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับกลุ่มควบคุมที่มีเฉพาะโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure his และ PEG ไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ได้ทดลองแยกโคโลนีขนาดใหญ่ที่พบบนจานอาหารคัดเลือก MMGS-8 จากกลุ่มทดลอง คือ กลุ่มที่ได้จากโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe ที่มี PEG และกลุ่มควบคุมจากโพรโทพลาสต์ของ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe แต่ไม่เติม PEG พบจำนวนโคโลนีขนาดใหญ่ทั้งหมดจากกลุ่มทดลอง 72 โคโลนี และจากกลุ่มควบคุม 44 โคโลนี จากจำนวนเซลล์ $3x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงนำโคโลนีใหญ่ทั้งหมดไปแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้งบนอาหารสูตรอุดม YM และสุ่มตัวอย่างจำนวนครึ่งหนึ่ง นำไปทดสอบสมบัติเบื้องต้นเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ คือ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe

การหลอมโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL141 ure his ที่มียีนเครื่องหมายจากการเตรียมแบบ double mutation กับโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ซึ่งเป็น point mutant นั้น มีปัญหาอยู่ว่า

ภาพที่ 5



ภาพที่ 6



ภาพที่ 5,6 กลุ่มโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมขนาดต่างๆ กัน ภายหลังการหลอมเซลล์ด้วย 15% PEG 6000 ที่ 42 °ซ จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 400 และ 1000 เท่า ตามลำดับ

ก. โครโมโซมของแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะเด่นและด้อยต่อกันหรือไม่

ข. การหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ของฟิวแซนต์และของสายพันธุ์พ่อแม่ จะแตกต่างกันหรือไม่

สำหรับปัญหาข้อ ข. นั้น จะสังเกตได้จากการทำกลุ่มควบคุมควบคู่ไปกับการคัดเลือกฟิวแซนต์ ส่วนปัญหาของข้อ ก. จะทราบได้ต่อเมื่อแยกฟิวแซนต์ออกมาได้จริง ๆ เท่านั้น

โดยหลักการ การรวมตัวกันของโครโมโซมนั้น ไม่จำเป็นจะต้องใช้เอนไซม์ เพราะแรงระหว่างไฮโดรเจนบอนด์ย่อมเกิดได้โดยง่ายแบบสุ่ม (random) แต่ภายหลังจากการเกิดรีคอมบิเนชันแล้ว 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 USDA192 Trp Phe นั้น เมื่อบ่มเซลล์ไปหลาย ๆ วัน จะได้โคโลนีขนาดเล็ก ๆ เริ่มขึ้นบาง ๆ

โชคดีที่ว่าก่อนที่จะมีโคโลนีขนาดเล็กเกิดขึ้น ก็ได้มีโคโลนีใหญ่ ๆ เกิดขึ้นด้วยซึ่งสามารถแยกไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย แต่การที่มีโคโลนีเล็ก ๆ ขึ้นภายหลัง ทำให้การแยกโคโลนีให้บริสุทธิ์เป็นสิ่งที่ต้องระมัดระวัง เพราะอาจจะมีโคโลนีเล็ก ๆ แทรกอยู่ระหว่างในโคโลนีใหญ่ ๆ ได้

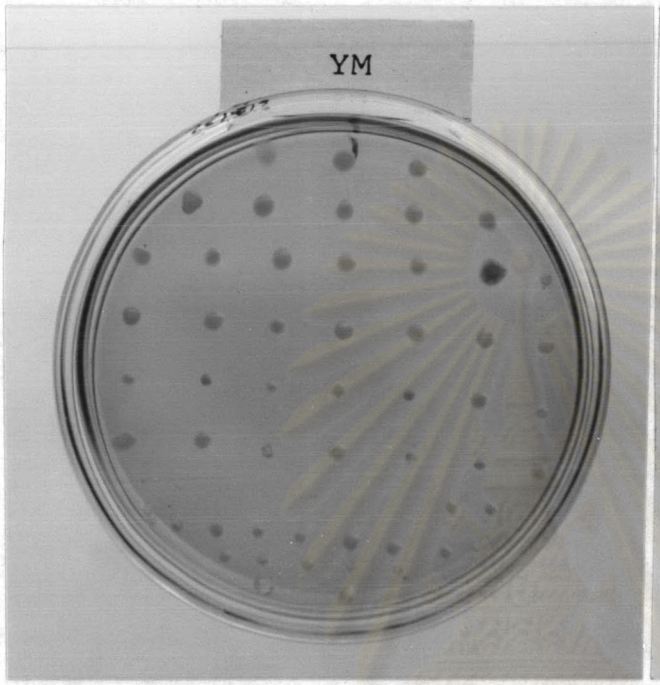
4.1 <u>การทดสอบสรีรวิทยาของฟิวแซนต์</u> ได้ศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา 2 อย่าง คือ ทดสอบสมบัติเบื้องต้นซึ่งได้แก่การทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ และศึกษาการเจริญในอาหารเหลวสูตรปรับต่ำ MMG

4.1.1 การทดสอบสมบัติเบื้องต้น ได้นำโคโลนีขนาดใหญ่จากกลุ่มทดลอง 36 โคโลนี และกลุ่มควบคุม 22 โคโลนี ไปทดสอบสมบัติต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่าโคโลนีที่เจริญบนอาหารสูตรต่างๆ เจริญได้แตกต่างกัน ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 14 ก พบว่าโคโลนีที่ได้จากกลุ่มทดลอง 9 โคโลนี มีสมบัติเหมือน TAL 141 <u>ure his</u> ทุกประการ และ 9 โคโลนี ที่มีสมบัติเหมือน USDA 192 Trp Phe ทุกประการ โคโลนีที่เหลืออีก 18 โคโลนี มีลักษณะแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ (1) สายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้าย TAL 141 <u>ure his</u> เกือบทั้งหมด ยกเว้นสมบัติในการเจริญบนอาหารสูตรปรับต่ำ MMG มีจำนวน 3 สายพันธุ์

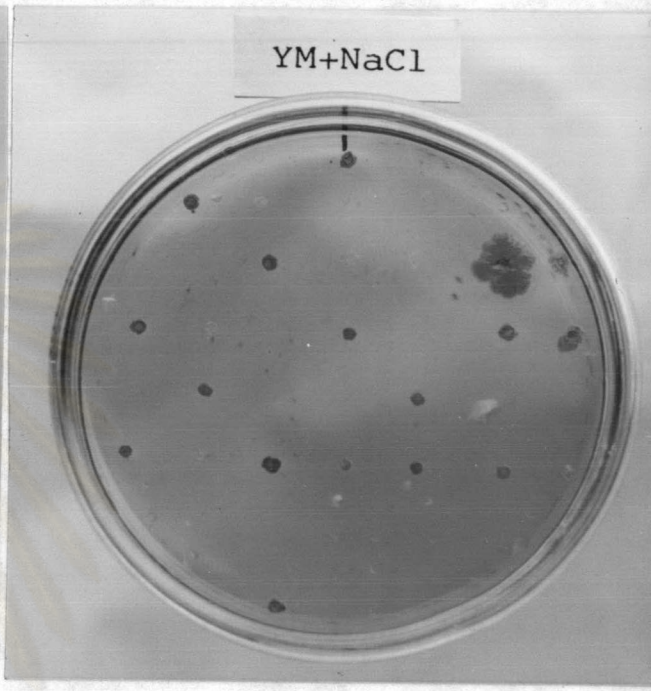
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 7

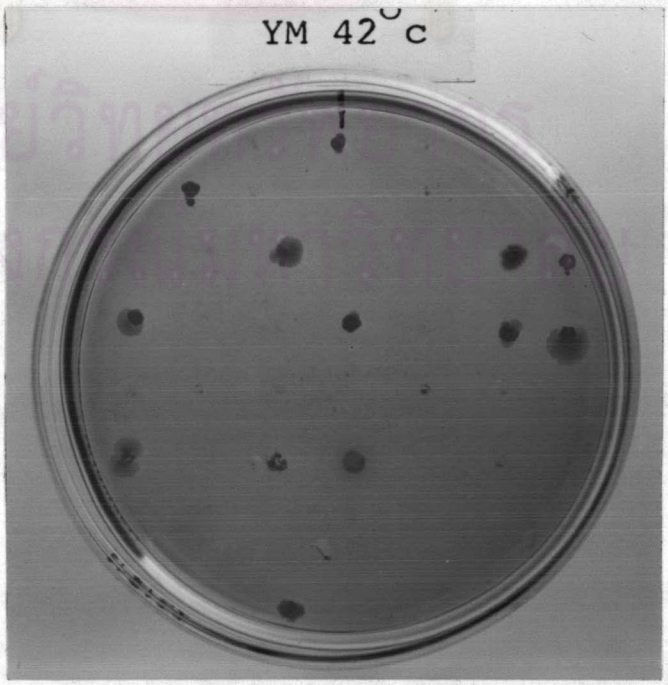
ก.



ข.



ค.

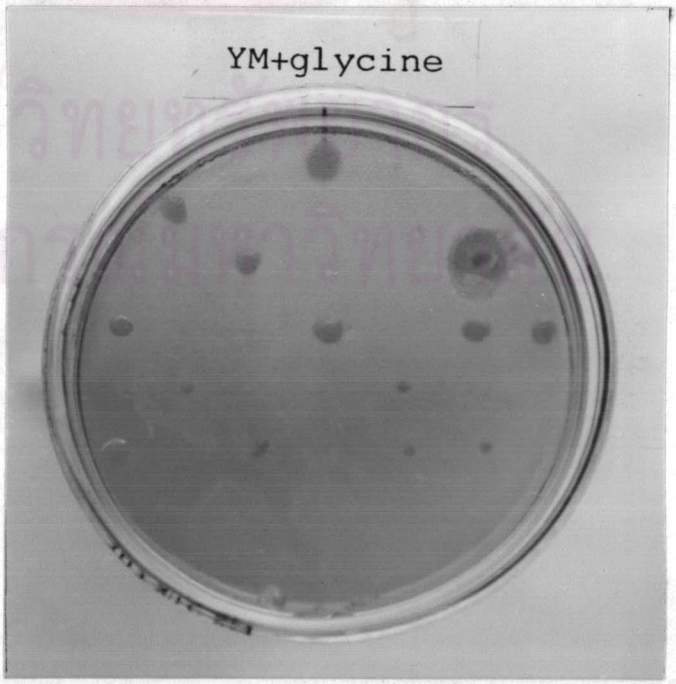


ภาพที่ 7 (ต่อ)

ง.

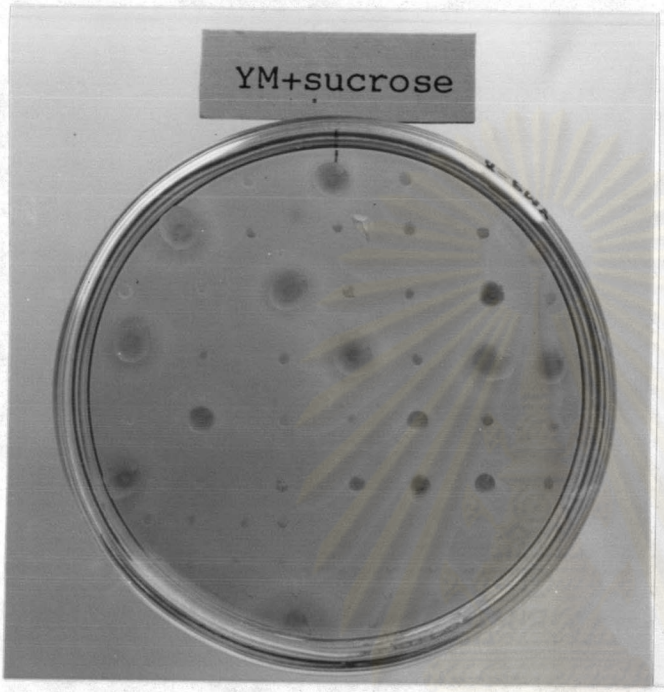
จ.

ฉ.

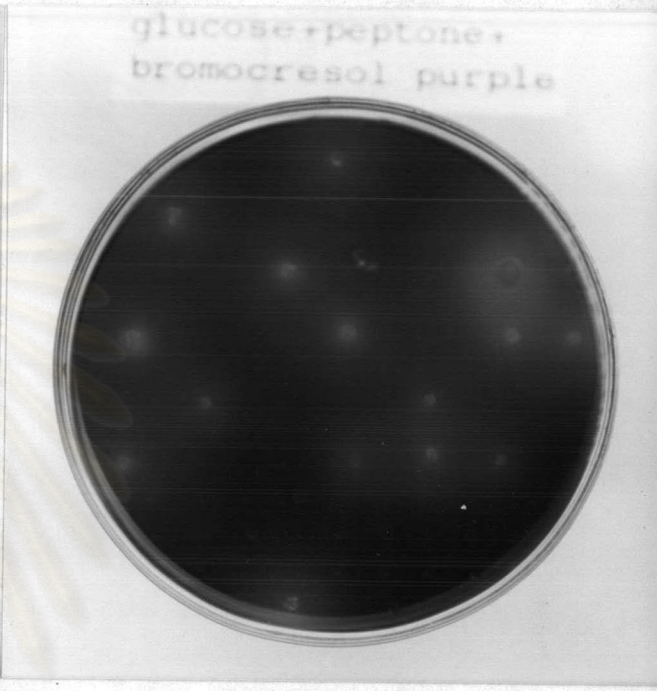


ภาพที่ 7 (ต่อ)

ช.

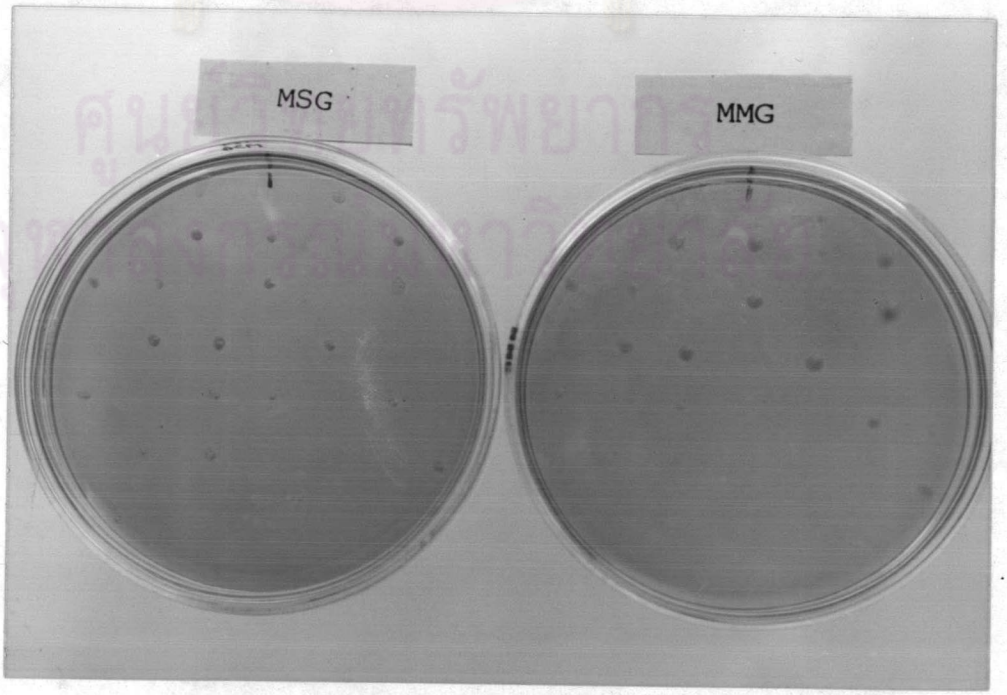


ฎ.



ฏ.

ฐ.



ตารางที่ 14 ก ความสามารถในการเจริญบนสูตรอาหารชนิดต่าง ๆ ของโคโลนีที่แยกได้จากอาหารสูตรคัดเลือก (MMGS-8) 36 โคโลนี

Types of medium	TAL 141 ure his	USDA 192 Trp Phe	No. of colonies that give +ve
[1]YM 30 °C	+	+	36
YM + 0.3 M NaCl	+	-	16
YM 42 °C	+	-	14
YM + 50 µg/ml Km	+	-	12
YM + 25 µg/ml Sm	+	-	12
YM + 0.1% Glycine	+	-	15
YM + 8% Sucrose	$+^{Suc+}$	$\pm^{Suc-}$	13
[2]MMG	-	±	18
[2]MSG	-	+	18
[3]GP + BCP	$+^{y}$	$\pm^{v}$	14

[1]YM = สูตรอาหารอุดม Km = Kanamycin Sm = Streptomycin

[2]MMG หรือ MSG = สูตรอาหารปรับต่ำที่มีแมนนิทอลหรือซัคซิเนท เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนตามลำดับ และมีกลูตาเมทเป็นแหล่งไนโตรเจน

[3]GP + BCP = glucose-peptone medium

\+ = พบการเจริญของเชื้อ - = ไม่พบการเจริญของเชื้อ

± = บางครั้งพบการเจริญของเชื้อได้เล็กน้อยหรือไม่พบการเจริญของเชื้อ

Suc+ = สามารถใช้ซูโครสได้ดี ให้โคโลนีขนาดใหญ่มีเมือกใส

Suc- = ไม่มีการใช้ซูโครส ให้โคโลนีขุ่นขนาดปกติ เช่นเดียวกับการเจริญบน YM

y = มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

v = ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเดิมคือสีม่วง

(2) สายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้าย USDA 192 Trp Phe เกือบทั้งหมด ยกเว้นสมบัติในการเจริญบนอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ได้ดีกว่า มีจำนวน 8 สายพันธุ์ (3) อีก 2 สายพันธุ์มีสมบัติก้ำกึ่งระหว่าง TAL 141 และ USDA 192 ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าคล้ายสายพันธุ์ใดมากกว่ากัน สำหรับกลุ่มควบคุมซึ่งให้โคโลนีขนาดใหญ่ 22 โคโลนี พบว่ามีสมบัติต่าง ๆ เหมือน USDA 192 Trp Phe ทุกประการ จึงพอสรุปได้ว่าโคโลนีจากกลุ่มทดลองคือฟิวแซนต์รวมกับรีเวอร์แทนต์ ส่วนโคโลนีจากกลุ่มควบคุมคือ รีเวอร์แทนต์เพียงอย่างเดียว

สุ่มตัวอย่างฟิวแซนต์ทั้งสามชนิดจำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งมีสมบัติเบื้องต้นดังแสดงในตารางที่ 14 ข เพื่อนำไปทดสอบสมบัติขั้นต่อไป

4.1.2 การเจริญของฟิวแซนต์ในสูตรอาหารเหลวปรับต่ำ MMG จากการศึกษาการเจริญของฟิวแซนต์ทั้งห้าสายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตรครบและอาหารสูตรปรับต่ำเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ได้รูปแบบการเจริญดังรูปที่ 14 และ 15 จะเห็นว่าฟิวแซนต์ทั้งห้าสายพันธุ์ สามารถเจริญได้ในสูตรอาหารปรับต่ำ MMG ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ TAL 141 ure his ไม่สามารถเจริญในสูตรอาหารปรับต่ำ และ USDA 192 Trp Phe มีการเจริญในสูตรอาหารปรับต่ำได้เพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามฟิวแซนต์ทั้งห้าสายพันธุ์ก็ยังมีความแตกต่างกันของค่าการเจริญสูงสุด และแตกต่างจากการเจริญในสูตรอาหารครบอีกด้วย

4.2 การทดสอบทางชีวภาพ

4.2.1 การหารูปแบบของโครโมโซมที่ถูกย่อยด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ ทราบกันดีแล้วว่า ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่น่าจะมี redundant gene เพราะการแยกมิวแทนต์นั้นทำได้ยากกว่าแบคทีเรียทั่วไป และเป็นอุปสรรคสำคัญของการวิจัยทางพันธุกรรมในระดับโมโลกุล ดังนั้นการแยกโครโมโซมของไรโซเบียมมาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ จึงมีโอกาสที่จะได้พบรูปแบบของโครโมโซมที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมีความหมาย (restriction pattern มีค่า) และเพื่อทดสอบว่ารีคอมบิเนชันของโครโมโซมระหว่างไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA192 Trp Phe และ TAL141 ure his ได้เกิดขึ้นจริง การทดสอบที่เบื้องต้นที่สุดก็คือ ลักษณะของ restriction patterns ของฟิวแซนต์จะต้องจัดเข้ากลุ่มกับสายพันธุ์พ่อแม่ได้

จากการทดลองเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ EcoR I, BamH I และ Xho I ตัด chromosomal DNA ของฟิวแซนต์ทั้งห้า เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ดังแสดงในภาพที่ 8 ผลการทดลองพบว่ารูปแบบโครโมโซมที่ย่อยด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ของสายพันธุ์ F11 คล้ายกับ

ตารางที่ 14 ข สมบัติเบื้องต้นของฟิวแซนต์บางสายพันธุ์ที่แยกได้

Types of medium	TAL 141 ure his	USDA 192 Trp Phe	Strains of fusant				
			F11	F14	F15	F20	F36
(1)YM 30 °C	+	+	+	+	+	+	+
YM + 0.3 M NaCl	+	-	+	+	+	-	-
YM 42 °C	+	-	+	+	+	-	-
YM + 50 µg/ml Km	+	-	+	-	+	-	-
YM + 25 µg/ml Sm	+	-	+	-	+	-	-
YM + 0.1% Glycine	+	-	+	+	+	-	-
YM + 8% Sucrose	$+^{Suc+}$	$\pm^{Suc-}$	$+^{Suc+}$	$+^{Suc+}$	$+^{Suc+}$	$\pm^{Suc-}$	$\pm^{Suc-}$
(2)MMG	-	$\pm$	+	+	+	+	+
(2)MSG	-	+	+	+	+	+	+
(3)GP + BCP	$+^{y}$	$\pm^{v}$	$+^{y}$	$+^{y}$	$+^{v}$	$\pm^{v}$	$\pm^{v}$

(1)YM = สูตรอาหารอุดม Km = Kanamycin Sm = Streptomycin

(2)MMG หรือ MSG = สูตรอาหารปรับต่ำที่มีแมนนิทอลหรือซัคซิเนท เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนตามลำดับ และมีกลูตาเมทเป็นแหล่งไนโตรเจน

(3)GP + BCP = glucose-peptone medium

\+ = พบการเจริญของเชื้อ - = ไม่พบการเจริญของเชื้อ

$\pm$ = บางครั้งพบการเจริญของเชื้อได้เล็กน้อยหรือไม่พบการเจริญของเชื้อ

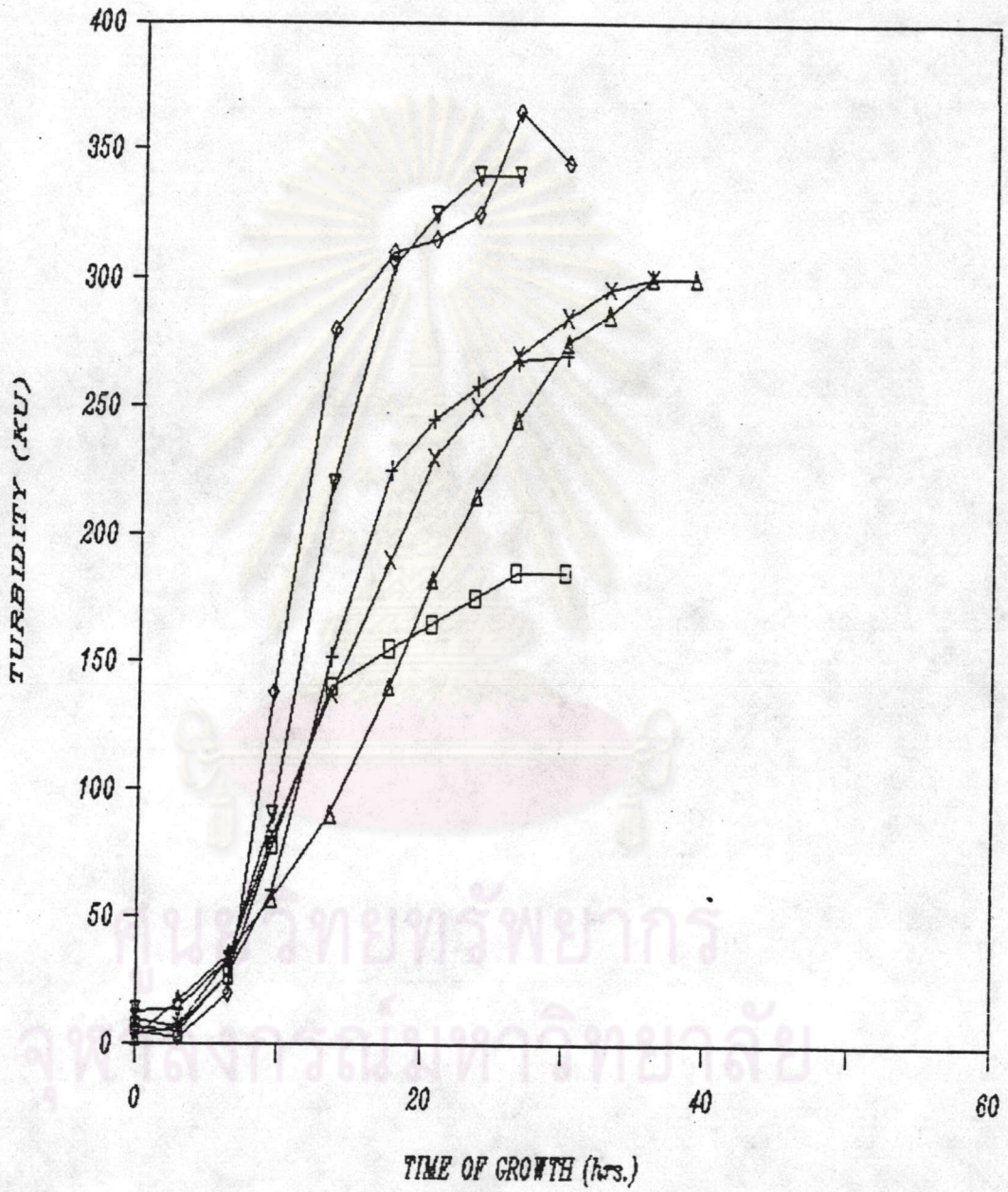
$^{Suc+}$ = สามารถใช้ซูโครสได้ดี ให้โคโลนีขนาดใหญ่มีเมือกใส

$^{Suc-}$ = ไม่มีการใช้ซูโครส ให้โคโลนีขุ่นขนาดปกติ เช่นเดียวกับการเจริญบน YM

^{y} = มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

^{v} = ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเดิมคือสีม่วง

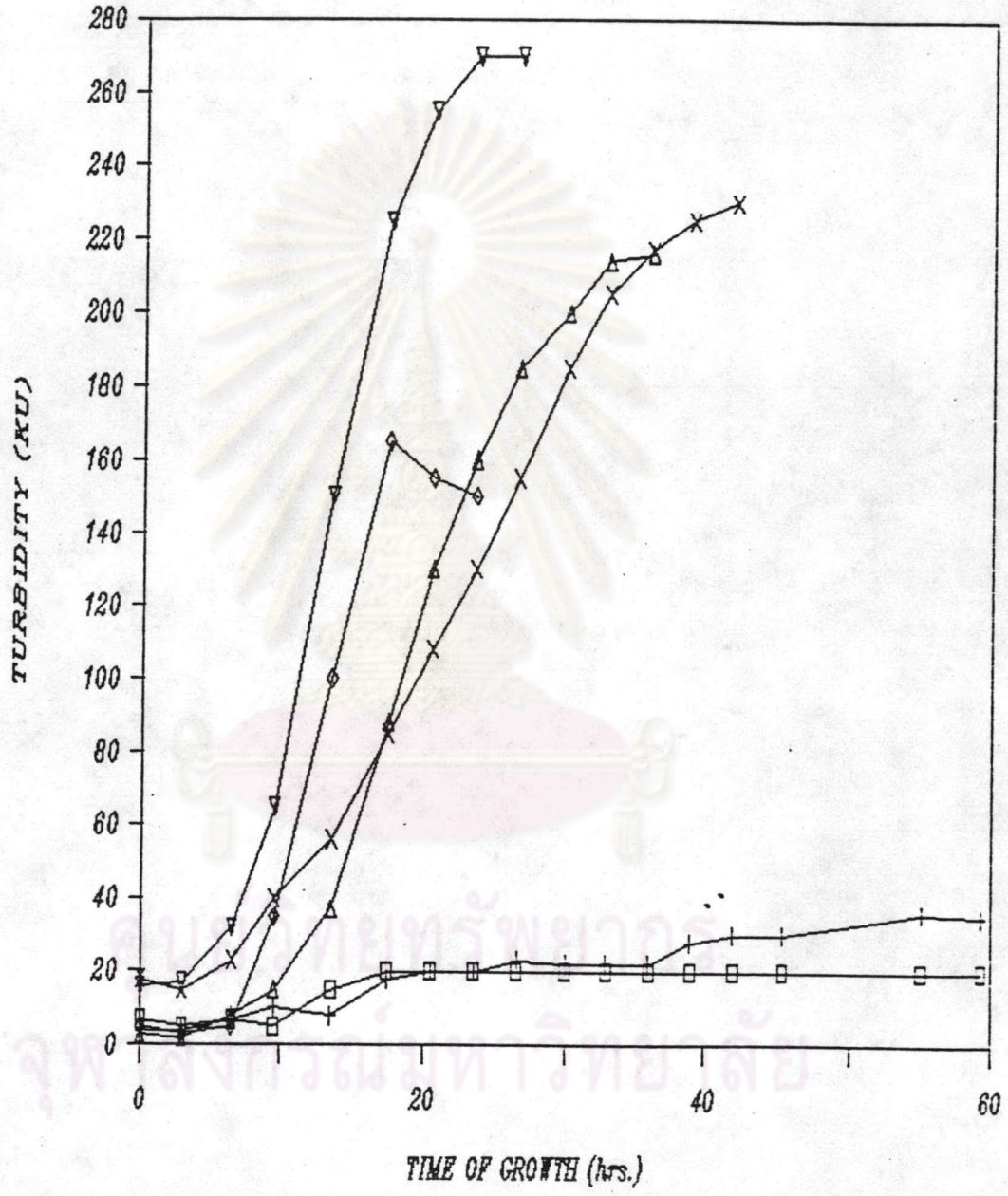
รูปที่ 14 รูปแบบการเจริญของฟิวแซนต์ในอาหารสูตรครบ CM



□ TAL141 + USDA192 X F11

◊ F14 Δ F15 ▽ F36

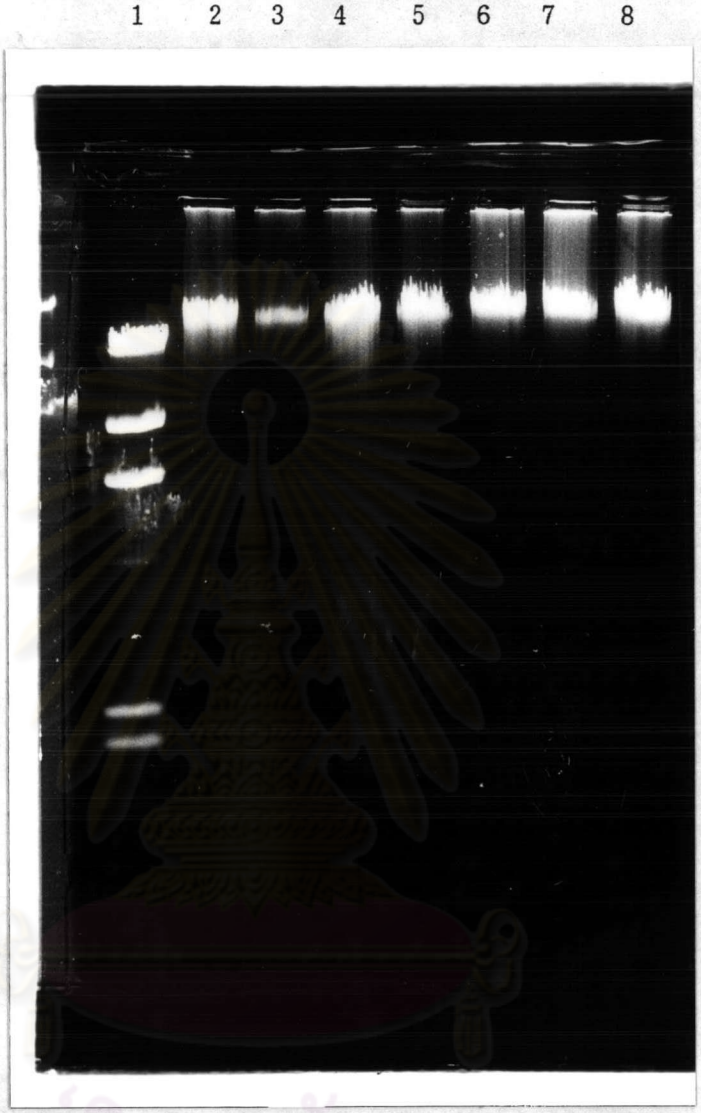
รูปที่ 15 รูปแบบการเจริญของฟิวแซนต์ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG



□ TAL141 + USDA192 X F11

◊ F14 Δ F15 ▽ F36

ภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ก แสดงรูปแบบดีเอ็นเอของโครโมโซมที่แยกได้ ก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องที่ 1 λ / Hind III มาตรฐาน

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของสายพันธุ์ TAL 141 ure his

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F11

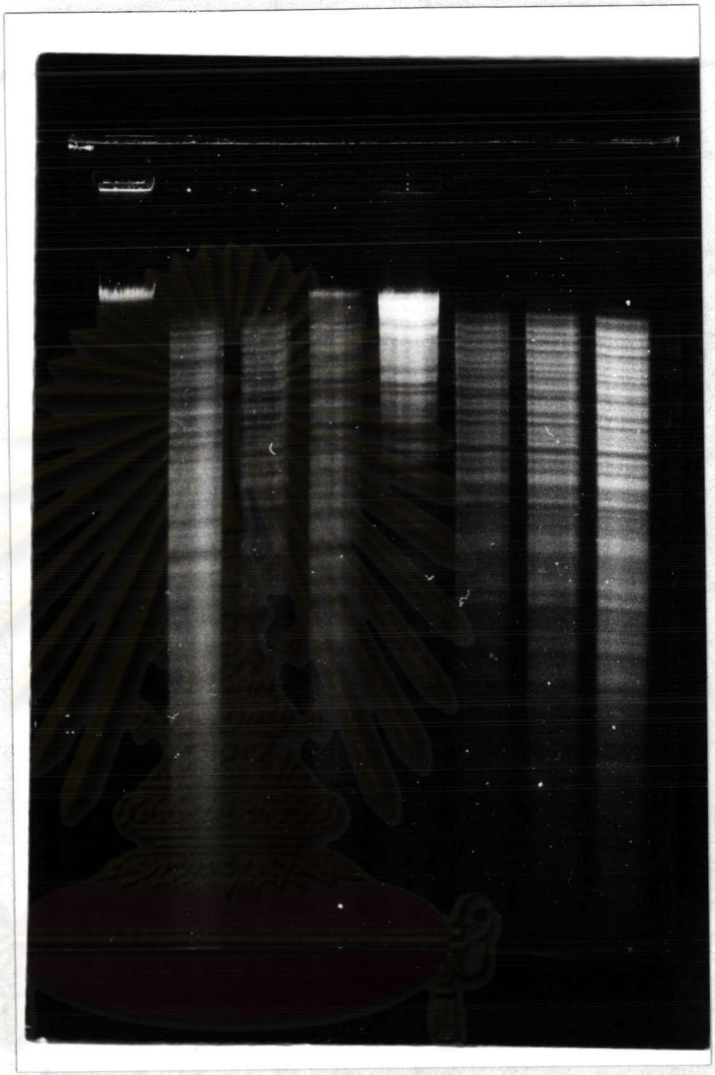
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F14

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F15

ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F20

ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F36

1 2 3 4 5 6 7 8



ภาพที่ 8 ข แสดงรูปแบบดีเอ็นเอของโครโมโซมที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของโครโมโซมก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของสายพันธุ์ TAL 141 ure his

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนด์ F11

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนด์ F14

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนด์ F15

ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนด์ F20

ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนด์ F36

1 2 3 4 5 6 7 8

ภาพที่ 8 ค แสดงรูปแบบดีเอ็นเอของโครโมโซมที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamH I

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของโครโมโซมก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของสายพันธุ์ TAL 141 ure his

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F11

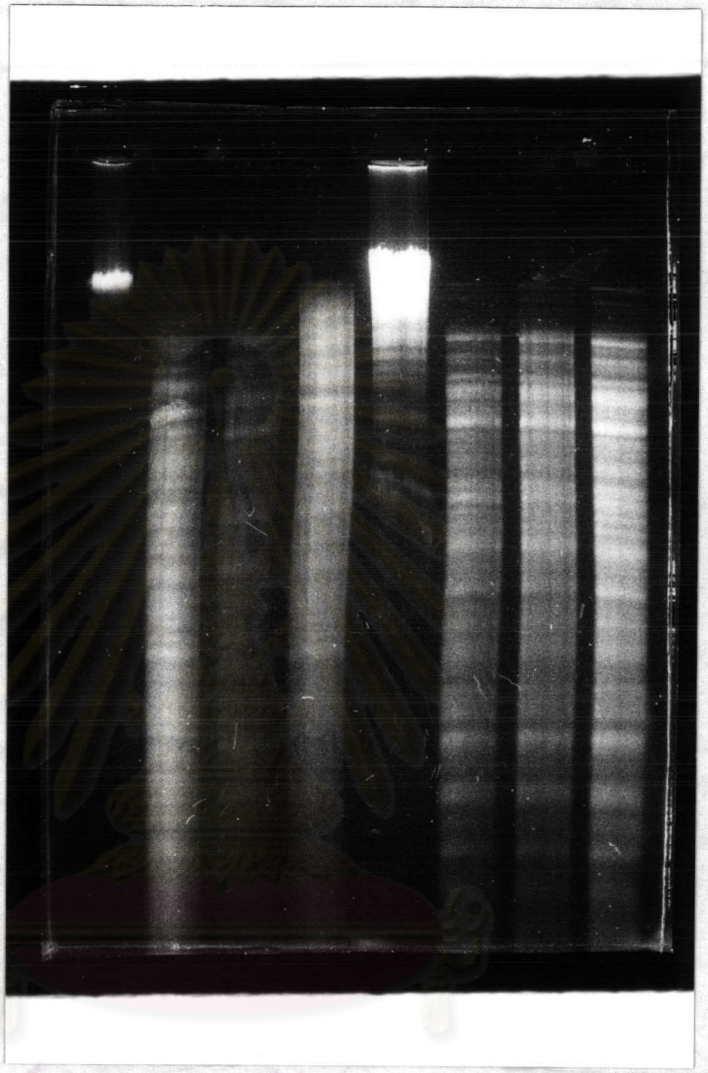
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F14

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F15

ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F20

ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F36

1 2 3 4 5 6 7 8



ภาพที่ 8 ง แสดงรูปแบบดีเอ็นเอของโครโมโซมที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Xho I

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของโครโมโซมก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของสายพันธุ์ TAL 141 ure his

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F11

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F14

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F15

ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F20

ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอของโครโมโซมของฟิวแซนต์ F36

ของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL141 ure his และ F15, F20 และ F36 คล้ายกับของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA192 Trp Phe สำหรับ F14 เป็นสายพันธุ์ที่มี restriction patterns แตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่โดยสิ้นเชิง ปรากฏการณ์นี้พบในทำนองเดียวกันเมื่อย่อยโครโมโซมด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด และยังไม่พบเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใด (เท่าที่มีในห้องปฏิบัติการ) ที่จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ของฟิวแซนต์ F14 กับสายพันธุ์พ่อแม่ทั้งสอง

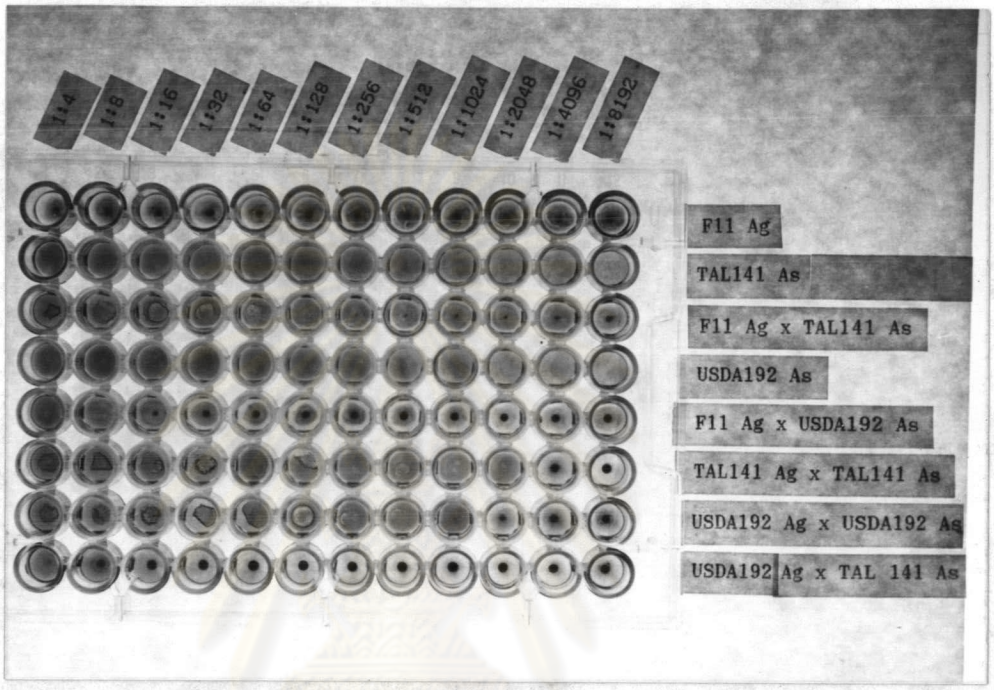
4.2.2 การทดสอบทางอิมมูโนวิทยา เนื่องจากสายพันธุ์ฟิวแซนต์ทั้งห้าสายพันธุ์ดังกล่าว บางสายพันธุ์มีสรีรสมบัติคล้าย TAL 141 ure his เช่น F11 และบางสายพันธุ์มีสรีรสมบัติคล้าย USDA 192 Trp Phe เช่น F20 และ F36 แต่บางสายพันธุ์ไม่สามารถบอกได้ว่าคล้าย TAL 141 ure his หรือ USDA 192 Trp Phe มากกว่ากัน (ตารางที่ 14ข) จึงทดสอบแอนติเจนบนผิวเซลล์ของฟิวแซนต์สายพันธุ์ทั้งห้ากับแอนติซีรัมของสายพันธุ์พ่อแม่ เพื่อช่วยในการชี้บอกความสัมพันธ์ระหว่างฟิวแซนต์ที่ได้กับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยการทดสอบการเกาะกลุ่ม (agglutination test) ซึ่งอธิบายไว้ในวิธีการทดลองในบทที่ 2 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 9 และตารางที่ 15 อธิบายได้ดังนี้ (1) ในกลุ่มควบคุม ก ซึ่งทดสอบปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติซีรัมภายในสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่า TAL141 ure his เกิด agglutination ที่ไตเตอร์ 2048 และ USDA192 Trp Phe เกิด agglutination ที่ไตเตอร์ 1024 สำหรับกลุ่มควบคุม ข ซึ่งทดสอบปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติซีรัมข้ามสายพันธุ์พ่อแม่ พบการเกิดปฏิกริยาข้าม (cross reaction) ต่ำมาก คือ ไม่พบการเกิด agglutination ระหว่างแอนติเจนของ TAL 141 ure his กับ แอนติซีรัมของ USDA 192 Trp Phe และเกิด agglutination ระหว่างแอนติเจนของ USDA 192 Trp Phe กับแอนติซีรัมของ TAL 141 ure his ที่ไตเตอร์ต่ำกว่า 4 (2) ฟิวแซนต์สายพันธุ์ F11 มีลักษณะแอนติเจนผิวเซลล์คล้ายคลึงกับ TAL 141 ure his มากกว่า USDA 192 Trp Phe คือพบว่าแอนติเจนจาก F11 เกิด agglutination กับแอนติซีรัมของ TAL 141 ure his ที่ไตเตอร์ 256 และพบการเกิด agglutination กับแอนติซีรัมของ USDA 192 Trp Phe ที่ไตเตอร์ต่ำเพียง 8 (3) ฟิวแซนต์สายพันธุ์ F15, F20 และ F36 มีลักษณะแอนติเจนบนผิวเซลล์คล้ายคลึงกับ USDA 192 Trp Phe คือ พบว่าแอนติเจนจาก F15, F20 และ F36 เกิด agglutination กับแอนติซีรัมของ USDA 192 Trp Phe ที่ไตเตอร์สูงถึง 1024 แต่พบการเกิด agglutination กับแอนติซีรัมของ TAL 141 ure his ที่ไตเตอร์ต่ำเพียง 8 (4) สายพันธุ์ลูกผสม F14 มีลักษณะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

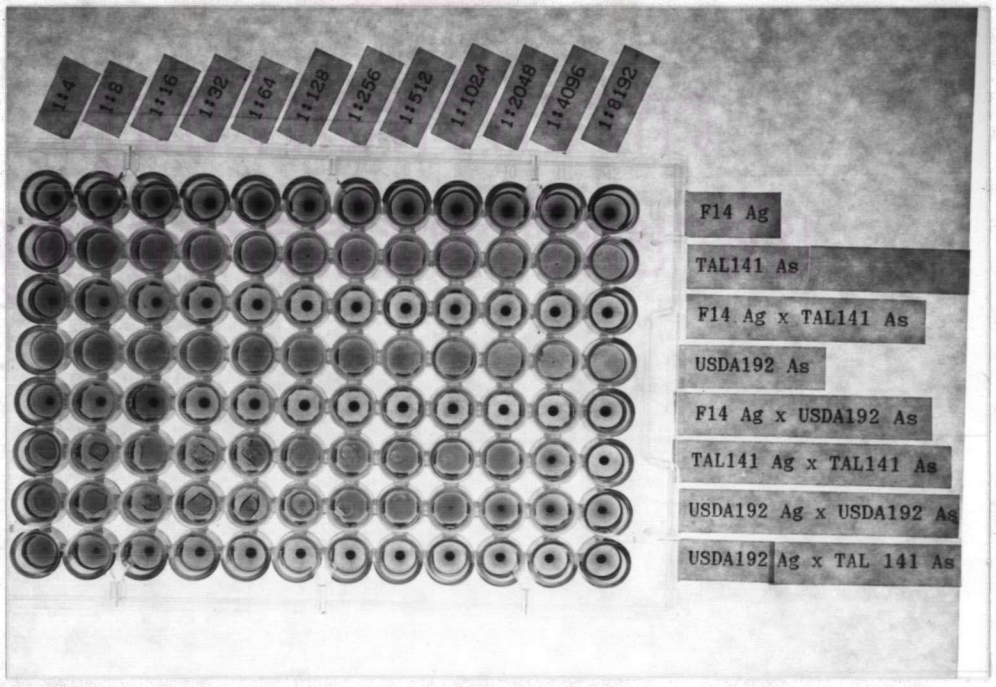
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 9

ก.

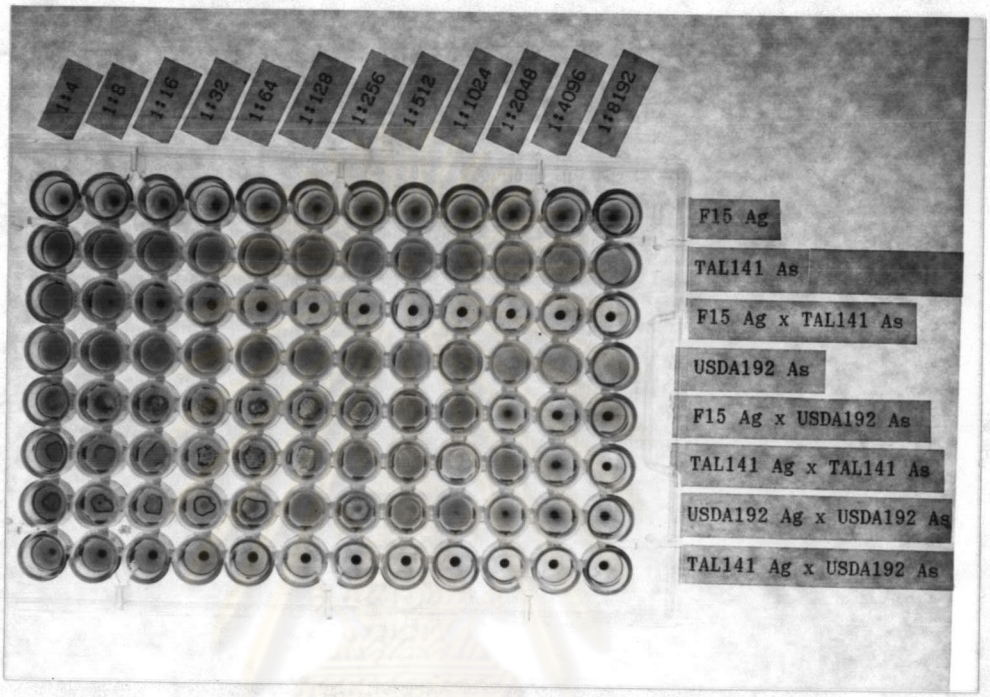


ข.

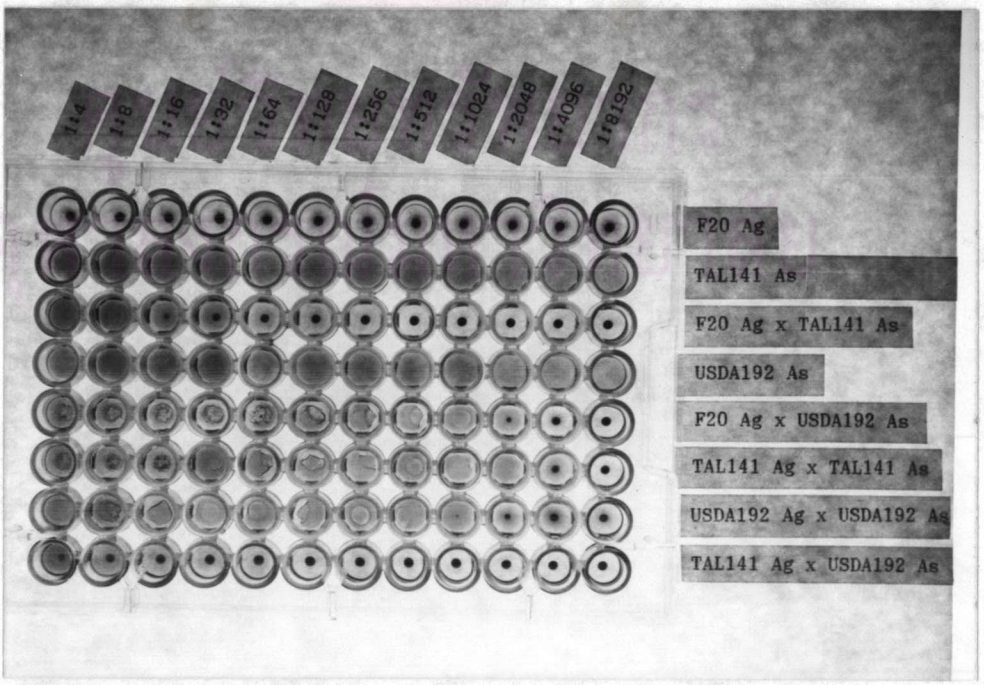


ภาพที่ 9 (ต่อ)

ค.

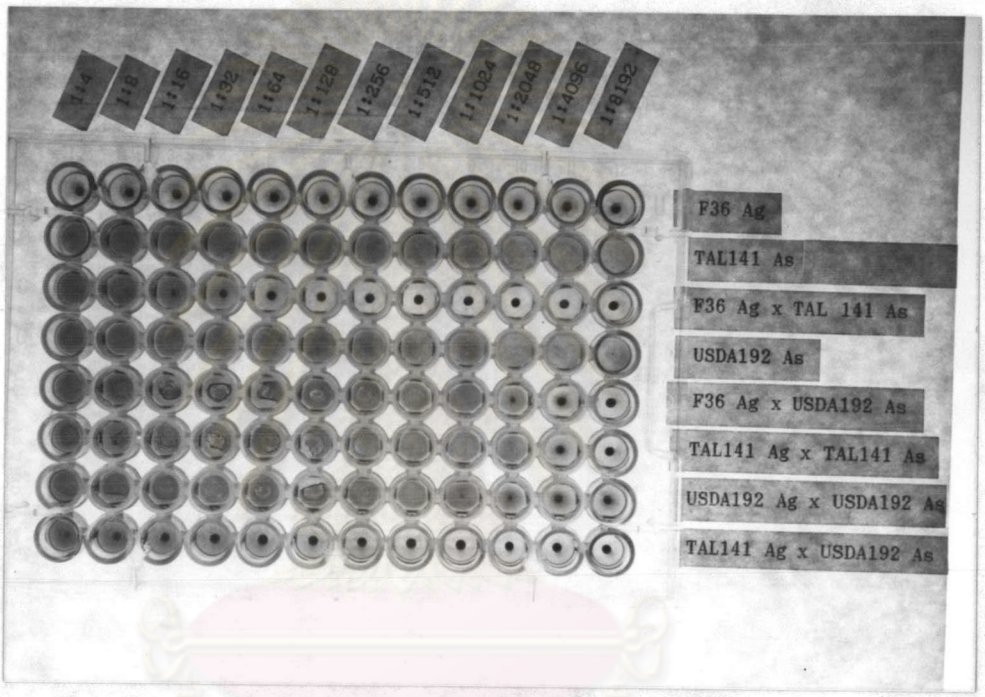

1:4
1:8
1:16
1:32
1:64
1:128
1:256
1:512
1:1024
1:2048
1:4096
1:8192
F15 Ag
TAL141 As
F15 Ag x TAL141 As
USDA192 As
F15 Ag x USDA192 As
TAL141 Ag x TAL141 As
USDA192 Ag x USDA192 As
TAL141 Ag x USDA192 As

ง.


1:4
1:8
1:16
1:32
1:64
1:128
1:256
1:512
1:1024
1:2048
1:4096
1:8192
F20 Ag
TAL141 As
F20 Ag x TAL141 As
USDA192 As
F20 Ag x USDA192 As
TAL141 Ag x TAL141 As
USDA192 Ag x USDA192 As
TAL141 Ag x USDA192 As

ภาพที่ 9 (ต่อ)

จ.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ทางอิมมูโนวิทยาระหว่างฟิวแซนต์กับสายพันธุ์พ่อแม่จากการวัดระดับแอกกลูทิเนชันไตเตอร์

Strainial antigen	Strainial antibody	Agglutination titer	Interpretation
TAL 141		2048	+ve control
ure his			
USDA 192		4	-ve control
Trp Phe	TAL 141		(cross reaction)
F11	ure his	256	partial TAL141
F14		< 4	not TAL141
F15		4	not TAL141
F20		4	not TAL141
F36		4	not TAL141
TAL 141		< 4	-ve control
ure his			(cross reaction)
USDA 192		1024	+ve control
Trp Phe	USDA 192		
F11	Trp Phe	8	not USDA192
F14		< 4	not USDA192
F15		1024	USDA192
F20		1024	USDA192
F36		1024	USDA192

แอนทิเจนบนผิวเซลล์แตกต่างจาก TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe โดยสิ้นเชิง คือ แอนทิเจนจาก F14 ไม่สามารถเกิด agglutination กับแอนทิซีรัมของ TAL141 ure his และ USDA 192 Trp Phe ที่ไตเตอร์ต่ำเพียง 4

4.3 การทดสอบการติดปมกับพืชตระกูลถั่วและแอคทิวิตีการรีดิวซ์อะเซทีลีน

ความสามารถในการติดปมกับพืชตระกูลถั่ว เป็นคุณสมบัติจำเพาะของแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียม เพื่อที่จะยืนยันว่าฟิวแซนต์ที่ได้ภายหลังโพรโทพลาสต์ฟิวชัน เป็นสายพันธุ์ไรโซเบียมจริง จึงนำฟิวแซนต์สายพันธุ์ F11, F14, F15, F20 และ F36 ไปทดสอบการติดปมกับพืชตระกูลถั่วซีราโทร (seratro) และถั่วเหลือง (soybean) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe ใน Leonardjar ดังที่อธิบายไว้ในบทที่ 2 และมีกลุ่มควบคุมคือต้นพืชที่ไม่ใส่เชื้อในการเพาะปลูก เก็บเกี่ยวพืชที่มีอายุ 4 สัปดาห์ นำส่วนรากและลำต้นไปศึกษาขั้นต่อไป

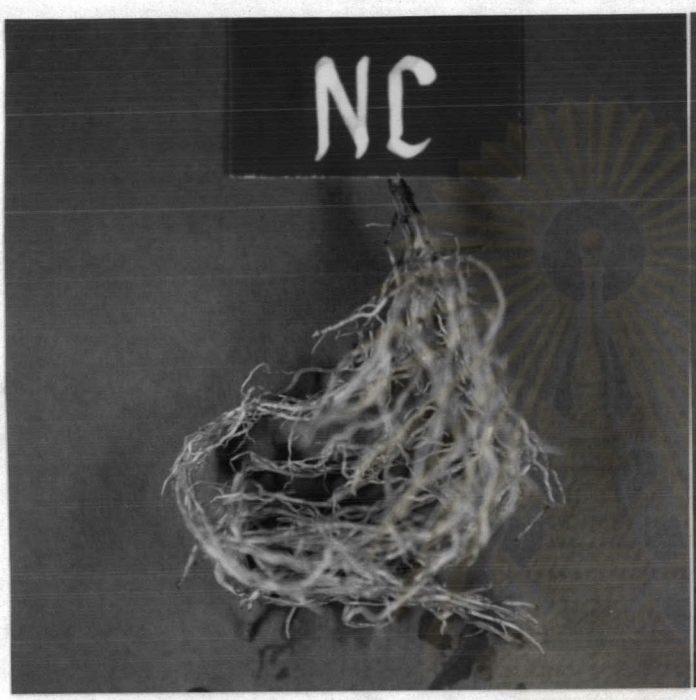
จากการสังเกตการติดปมกับรากพืชตระกูลถั่วทั้งสองสายพันธุ์ของฟิวแซนต์สายพันธุ์ดังกล่าว เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่และกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงในภาพที่ 10.1 และ 10.2 จะเห็นว่าฟิวแซนต์สายพันธุ์ F20 และ F36 มีการติดปมกับพืชตระกูลถั่วทั้งสองสายพันธุ์ (ภาพที่ 10.1 ช, 10.2 ช และ 10.1 ซ, 10.2 ซ) ได้ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างเห็นได้ชัด สำหรับฟิวแซนต์สายพันธุ์ F14 และ F15 ไม่พบความแตกต่างของจำนวนปมอย่างชัดเจน (ภาพที่ 10.1 จ, 10.2 จ และ 10.1 ฉ, 10.2 ฉ) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ (ภาพที่ 10.1 ข, 10.2 ข และ 10.1 ค, 10.2 ค) กรณีของฟิวแซนต์ F11 ไม่พบการติดปมเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 10.1 ง, 10.2 ง และ 10.1 ก, 10.2 ก) น้ำหนักแห้งและความสูงของลำต้น จำนวนปมและน้ำหนักปม รวมทั้งแอคทิวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีน แสดงผลการทดลองในตารางที่ 16 (ถั่วเหลือง) และตารางที่ 17 (ซีราโทร) ได้ค่าทางสถิติขั้นสุดท้ายดังตารางที่ 18 และตารางที่ 19 พบว่า F11 ซึ่งมีลักษณะทางสรีรวิทยาคล้าย TAL 141 ure his ไม่สามารถสร้างปมกับถั่วเหลืองและซีราโทร ในขณะที่ F14 และ F15 ซึ่งมีลักษณะทางสรีรวิทยาร่วมระหว่าง TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe สามารถสร้างปมกับถั่วเหลืองและซีราโทรได้เช่นเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่ทั้งสองดังกล่าว ส่วน F20 และ F36 ซึ่งมีลักษณะทางสรีรวิทยาที่คล้ายคลึง USDA 192 Trp Phe มีแนวโน้มจะสร้างปมในถั่วเหลืองและซีราโทรได้ดีขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จำนวนปมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 18 และ 19 ตามลำดับ) และได้สรุปสมบัติที่น่าสนใจของฟิวแซนต์ทั้งห้าสายพันธุ์ไว้ในตารางที่ 20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

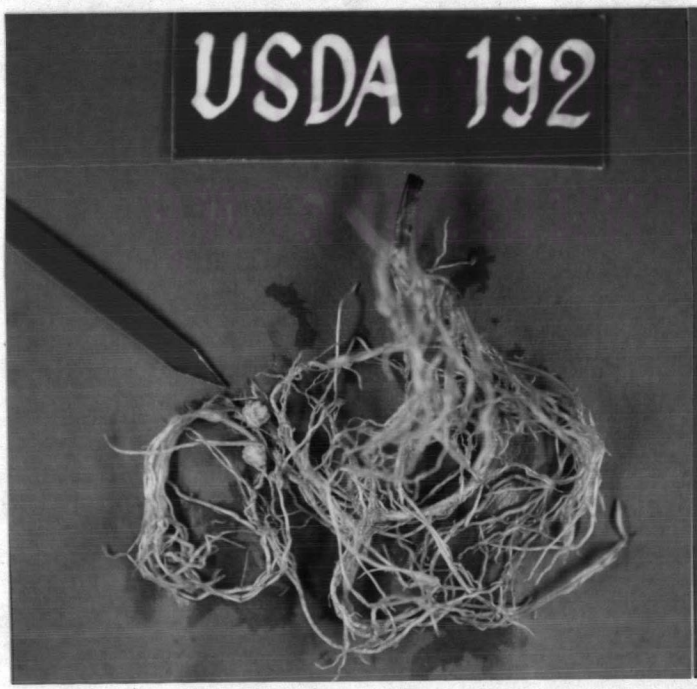
ภาพที่ 10.1

ก.

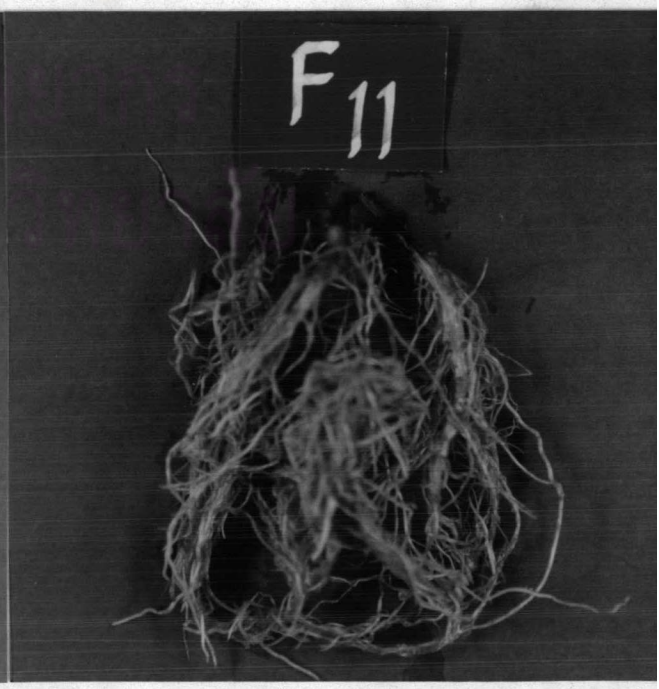


ข.

ค.



ง.

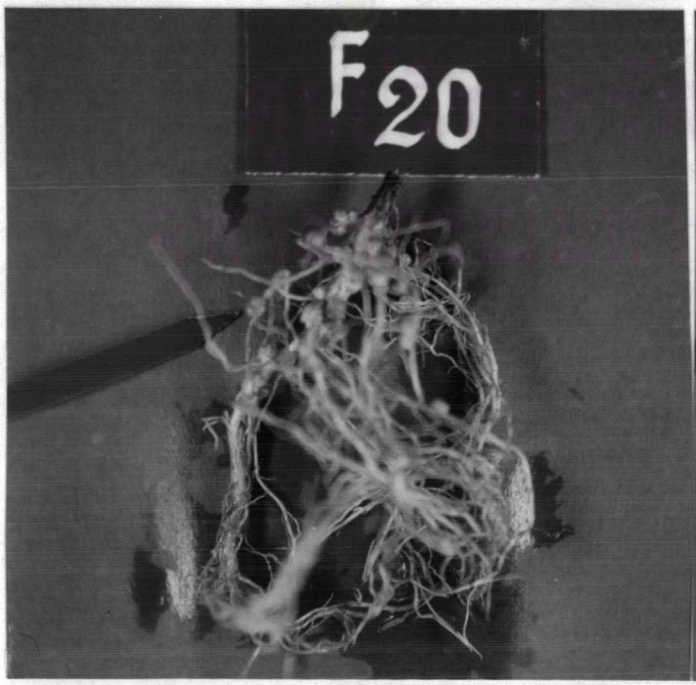


ภาพที่ 10.1 (ต่อ)

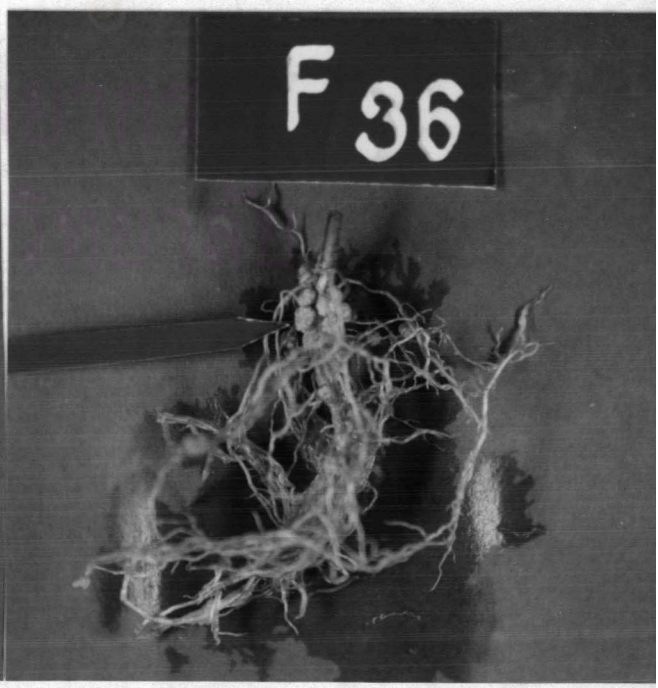
จ.

ฉ.

ช.



ซ.



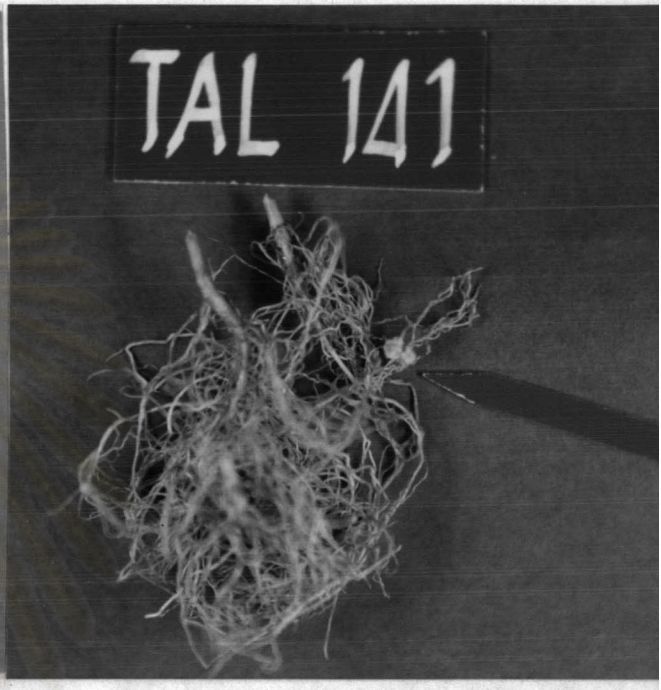
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

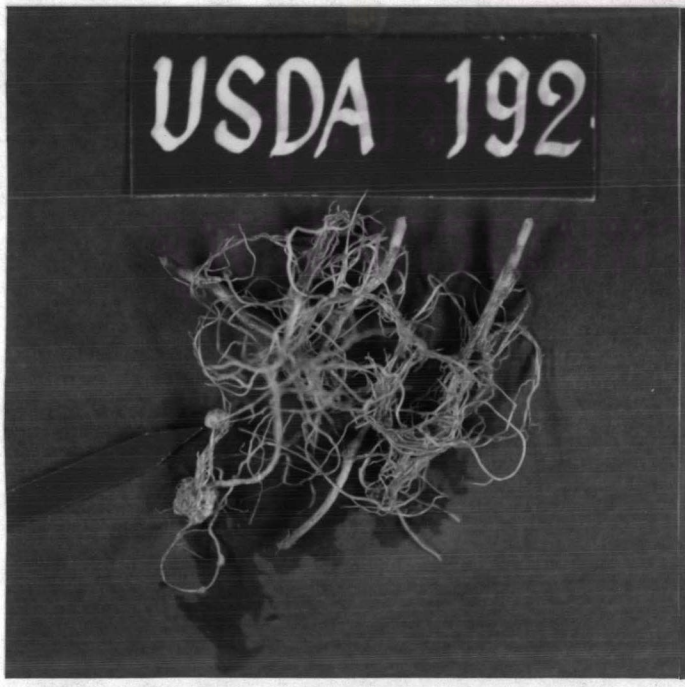
ภาพที่ 10.2

ก.

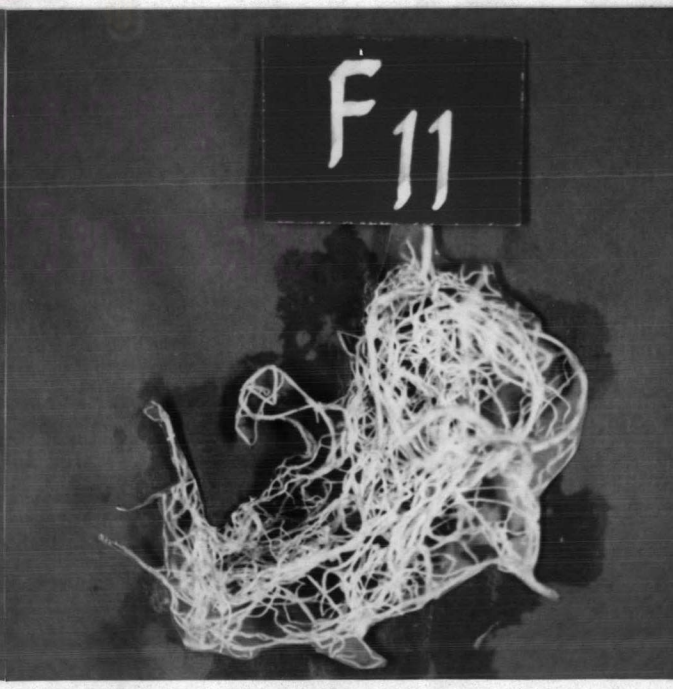
ข.



ค.



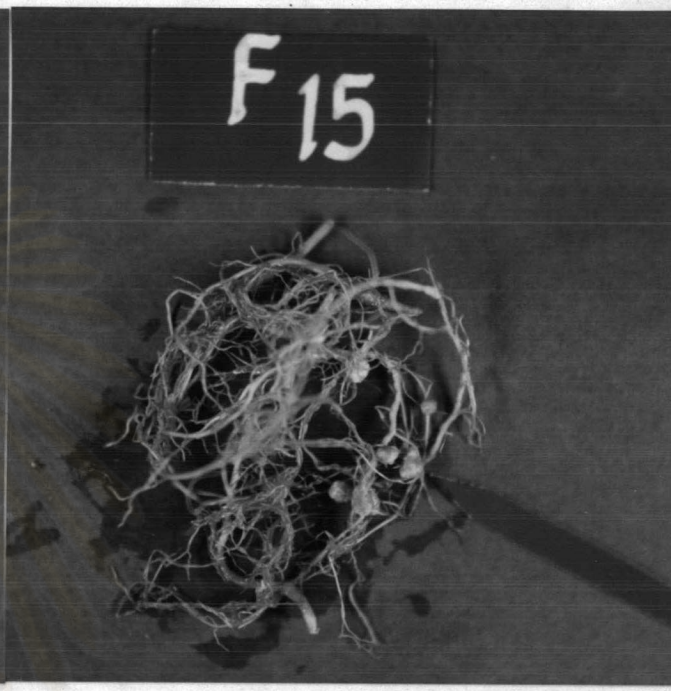
ง.



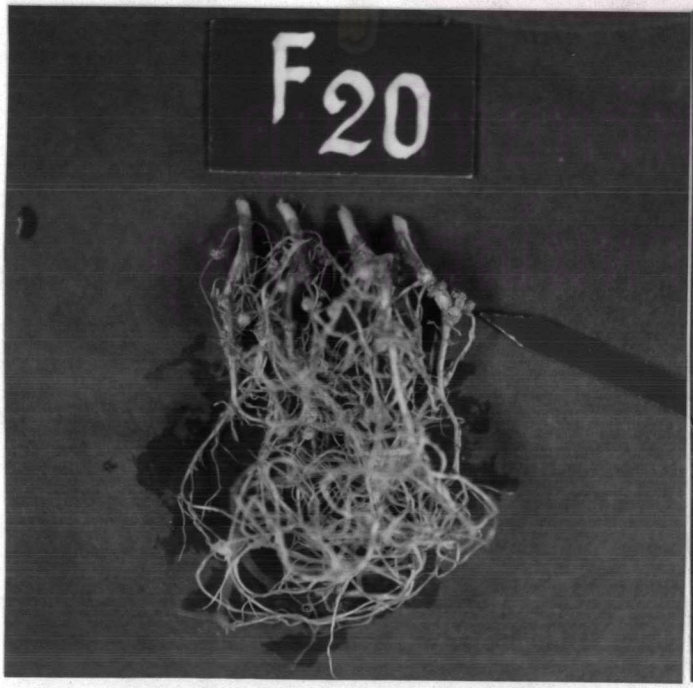
ภาพที่ 10.2 (ต่อ)

จ.

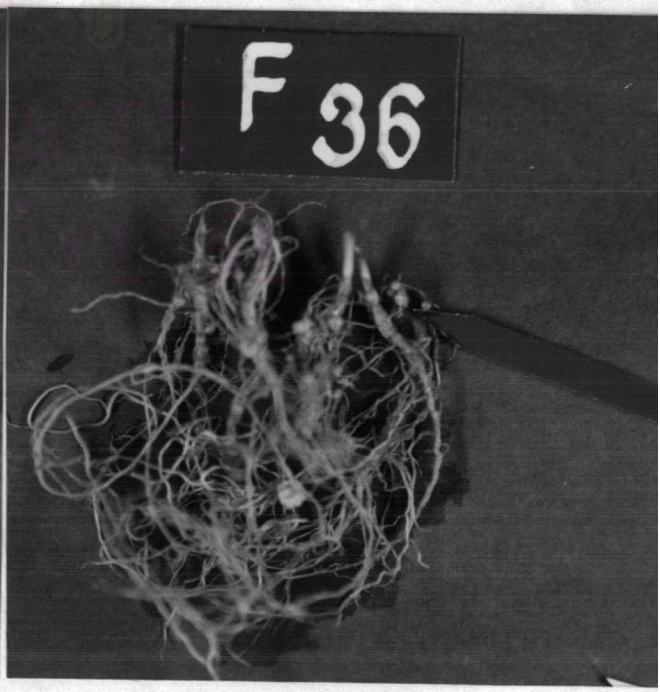
ฉ.



ช.



ช.



ตารางที่ 16 ข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญของต้นถั่วเหลืองอายุ 1 เดือน ซึ่งใส่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ฟิวแซนต์และสายพันธุ์พ่อแม่

Strains	No. of nodules per rep.	Dry wt. of nodules per rep. (mg)	A.R.A.[1] nmoles/hr/ g nodule	Plant dry wt. per rep. (g)	Plant height (cm)
TAL 141	2	10	2.6	2.158	32.6
ure his	5	20.8	11.5	1.781	29.1
	0	0	0	2.164	34.8
USDA 192	2	4.2	1.7	2.173	32.5
Trp Phe	2	8.4	2.5	2.615	36.3
	5	21.2	27.9	2.068	31.4
	0	0	0	1.805	30.4
F11	0	0	0	1.966	35.6
	0	0	0	1.906	28.8
	2	30.0	2.3	1.875	27.4
F14	3	33.9	4.7	1.835	31.1
	2	31.9	1.9	1.805	30.9
	4	41.0	8.9	1.858	29.9
F15	5	27.7	7.2	1.732	27.9
	2	16.0	5.6	1.848	29.7
	62	87.4	16.7	2.085	32.0
F20	79	102	7.1	2.237	33.0
	33	49.4	24.9	2.070	29.6
	40	59.6	16.1	2.202	30.5
F36	28	44.6	13.9	2.205	30.7
	31	41.4	96.8	1.854	28.3
	0	0	0	1.794	29.4
Control	0	0	0	1.882	27.3
	0	0	0	1.848	29.1

rep. = replicant : 1 replicant ประกอบด้วยต้นถั่วเหลือง 3 ต้นต่อ 1 Leonard jar

[1] แอคทิวิตีของการรีดิวซ์อะเซทิลีน จากการวัดด้วยเครื่องกาซโครมาโตรกราฟีของ Varian model 3700, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญของต้นซีราโทรอายุ 1 เดือน ซึ่งใส่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ฟิวแชนต์และสายพันธุ์พ่อแม่

Strains	No. of nodules per rep.	Dry wt. of nodules per rep. (mg)	A.R.A.[1] nmoles/hr/ g nodule	Plant dry wt. per rep. (g)	Plant height (cm)
TAL 141	0	0	0	.2573	4.3
ure his	0	0	0	.3279	5.8
	3	7.1	23.66	.3083	4.1
USDA 192	0	0	0	.2136	4.0
Trp Phe	8	16.8	4.99	.2518	4.4
	0	0	0	.2194	4.0
	0	20.2	0	.2926	4.6
F11	0	0	0	.2460	3.8
	0	0	0	.2721	4.1
	3	6.6	14.16	.2773	4.1
F14	0	0	0	.2406	3.7
	6	11.1	14.94	.2313	3.8
	3	2.6	4.58	.1991	3.5
F15	3	11.2	22.62	.3060	4.1
	7	23.8	24.30	.2762	4.9
	63	24.4	2.63	.2629	4.5
F20	70	31.5	1.45	.3600	5.7
	52	27.3	0.72	.3599	5.9
	40	18.3	0.18	.2488	4.5
F36	67	29.6	6.84	.2296	5.2
	59	21.0	1.41	.2302	5.1
	0	0	0	.2488	4.1
Control	0	0	0	.2296	5.3
	0	0	0	.2302	5.1

rep. = replicant : 1 replicant ประกอบด้วยต้นซีราโทร 4 ต้นต่อ 1 Leonard jar

[1] แอคทิวิตีของการรีดิวซ์อะเซทิลีน จากการวัดด้วยเครื่องกาซโครมาโตรกราฟีของ Shimadzu model GC-R1A, Japan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเกี่ยวกับสมบัติการติดปมของฟิวแซนต์กับถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับไรโซเบียมสายพันธุ์พ่อแม่[1]

Strains	No.of nodules per rep.	A.R.A.(nmoles C_2H_2/ hr/g nodules)	Dry weight per plant (g)	Height (cm)
TAL 141	2 c	4.7	2.0343 abc	32.2
ure his				
USDA 192	3 c	10.7	2.2853 a	33.4
Trp Phe				
F11	0 c	0	1.8923 bc	31.6
F14	2 c	3.0	1.8383 bc	29.8
F15	4 c	7.2	1.8127 c	29.2
F20	58 a	16.2	2.1307 ab	31.5
F36	33 b	42.3	2.0870 abc	29.8
control	-	-	1.8413 bc	28.6
% C.V.	62.91	159.5	7.87	7.2

[1] ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้โปรแกรม Completely Randomized Design (CRD) จาก BANANA STAT PACK ซึ่งเขียนขึ้นโดย WITCHA CHALEEPROM

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเกี่ยวกับสมบัติการติดปมของฟิวแซนต์กับซีราโทร เปรียบเทียบกับไรโซเบียมสายพันธุ์พ่อแม่[1]

Strains	No.of nodules per rep.	A.R.A.(nmoles C_2H_2/ hr/g nodules)	Dry weight per plant (g)	Height (cm)
TAL 141	1	7.89	0.2978 ab	4.7333
ure his				
USDA 192	3	1.66	0.2283 c	4.1333
Trp Phe				
F11	0	0	0.2702 abc	4.1667
F14	3	9.70	0.2497 bc	3.8667
F15	4	17.17	0.2604 bc	4.1667
F20	62	1.60	0.3276 a	5.3667
F36	55	2.81	0.2362 bc	4.9333
control	-	-	0.2362 bc	4.8333
% C.V.	36.59	129.39	12.96	12.95

[1] ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้โปรแกรม Completely Randomized Design (CRD) จาก BANANA STAT PACK ซึ่งเขียนขึ้นโดย WITCHA CHALEEPROM

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบสมบัติต่างๆ ของฟิวแซนต์ทั้งห้าสายพันธุ์กับสายพันธุ์พ่อแม่

Investigated properties	Parental strains		Fusants			
	TAL141 ure his	USDA192 Trp Phe	F11	F14	F15	F20 and F36
1. Growth in MMG	−	−	2+	4+	4+	4+
2. YM + 8% sucrose	$4+^{Suc+}$	$\pm^{Suc-}$	$4+^{Suc+}$	$4+^{Suc+}$	$2+^{Suc+}$	$\pm^{Suc-}$
3. YM 42 °C	4+	−	3+	4+	2+	−
4. YM + 0.3 M NaCl	3+	−	3+	4+	3+	−
5. Resist to antibiotics	Km^r, Sm^r	Km^s, Sm^s	Km^r, Sm^r	Km^s, Sm^s	Km^r, Sm^r	Km^s, Sm^s
6. Surface antigen cross reaction	TAL141	USDA192	$TAL141^w$	None	USDA192	USDA192
7. Chromosomal restriction pattern	TAL141	USDA192	TAL141	None	USDA192	USDA192
8. Nodulation to soybean	poor	poor	none	poor	medium	good
9. A.R.A. in soybean nodules	low	medium	none	low	medium	high

− = ไม่มีการเจริญ, $\pm$ = เจริญได้ < 10 % , + = เจริญได้ 25 % ,

2+ = เจริญได้ 50 % , 3+ = เจริญได้ 75 % , 4+ = เจริญได้ 100 %

$^{Suc+}$ คือ สามารถใช้ซูโครสได้ดี ให้โคโลนีขนาดใหญ่มีเมือกใส

Km^r คือ ความสามารถในการต้านทานต่อยากานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Km^s คือ ความไม่สามารถในการต้านทานต่อยากานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Sm^r คือ ความสามารถในการต้านทานต่อยาสเตรปโตมัยซิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Sm^s คือ ความไม่สามารถในการต้านทานต่อยาสเตรปโตมัยซิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

A.R.A. คือ แอคทิวิตีการรีดิวซ์อะเซทีลีน

TAL141 หมายถึง ลักษณะเหมือน TAL141 ure his ทุกประการ

$TAL141^w$ หมายถึง ลักษณะเหมือน TAL141 ure his แต่มีความแตกต่างบ้างเล็กน้อย

USDA192 หมายถึง ลักษณะเหมือน USDA192 Trp Phe ทุกประการ