บทที่ 1

บทนำ

1.1 Rhizobium ในฐานะแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามสภาวะการเจริญที่สัมพันธ์กับการตรึงไนโตรเจนดังนี้

ก. พวกที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ (free-living bacteria) คือ แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยไม่ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น Klebsiella spp. และ Clostridium spp.

ข. พวกที่อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นอย่างหลวม ๆ (associative symbiotic bacteria) แบคทีเรียพวกนี้สามารถเจริญหรือแบ่งตัวได้ในเซลล์เจ้าเรือน (host) ได้ แต่มีปริมาณการแบ่งตัวน้อยมาก เช่น Azotobacter paspali

ค. พวกที่อาศัยร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (obligatory symbiotic bacteria) แบคทีเรียพวกนี้จะไม่ตรึงไนโตรเจน หรือตรึงไนโตรเจนลดลงอย่างมากเมื่ออยู่เป็นอิสระ ในทางตรงกันข้ามจะมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงเมื่ออยู่ร่วมกับเจ้าเรือน การที่แบคทีเรียเหล่านี้เข้าไปอยู่ร่วมกับพืชจะทำให้เกิดปมขึ้น ในบริเวณนั้น ตัวอย่างของแบคทีเรียพวกนี้ได้แก่ Rhizobium ซึ่งอยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่วโดยไรโซเบียมจะตรึงไนโตรเจนแล้วส่งอนุมูลแอมโมเนียมให้แก่พืชเพื่อสังเคราะห์โปรตีนต่อไป ขณะเดียวกันพืชจะให้พลังงานในรูปสารต้นตอคาร์บอนเช่น กลูโคส, ฟลุกโตส หรือสารประกอบอื่น ๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโนหลายชนิดเช่น ไกลซีน (glycine) อะลานีน (Alanine) เพื่อให้ไรโซเบียมใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียกรัมลบมีรูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.5-0.9 x 1.3-3.0 ไมโครเมตร เคลื่อนไหวโดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) ไม่มีเอนโดสปอร์ไรโซเบียมสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามช่วงเวลาการแบ่งตัวเป็น 2 เท่า

1. กลุ่มที่เจริญเติบโตเร็ว (fast growers) พวกนี้มีระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time) เป็น 2-4 ชั่วโมง ตัวอย่างได้แก่ R. leguminosarum ซึ่งทำให้เกิดปมในพืชตระกูลถั่วกลุ่ม ถั่วลันเตา (Pisum) , เวทช์ (Vetch) , เลนส์ (Lens) , R. phaseoli จะเกิดปมในพืชตระกูลถั่วกลุ่ม บีน (Beans) ส่วน R. trifoli จะทำให้เกิดปมในพืชตระกูลถั่วกลุ่มโคลเวอร์ (clovers)

2. กลุ่มที่เจริญเติบโตช้า (Slow growers) มีระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า 6-7 ชั่วโมง ตัวอย่างเช่น R. lupini ก่อให้เกิดปมในพืชตระกูลถั่วพวกลูปินส์ (lupins) Bradyrhizobium japonicum ซึ่งก่อให้เกิดปมในถั่วเหลือง (Soybean)

1.2 บทบาทของ Bradyrhizobium japonicum กับการเกษตรถั่วเหลือง

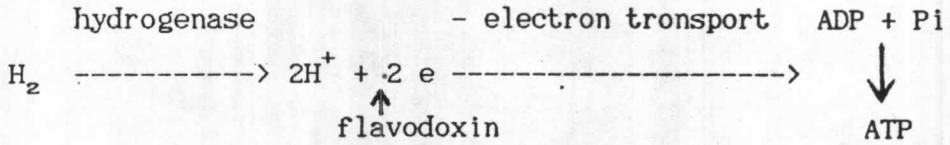
ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและของโลก เป็นพืชที่มีโปรตีนสูงสามารถใช้แทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้ นอกจากนี้เมล็ดถั่วเหลืองยังมีเปอร์เซนต์น้ำมันสูงกว่าเมล็ดถั่วอื่น ๆ กากถั่วเหลืองหลังจากการสกัดน้ำมันออกสามารถแปรรูปเป็นโปรตีนเกษตร สำหรับเป็นอาหารของคนและสัตว์ ในกากถั่วเหลืองจะมีโปรตีนที่มีคุณภาพสูงมากถึง 40 % ซึ่งเท่ากับปริมาณที่พบใน เนื้อหมู หรือเนื้อวัว (วิมลศรี เทวะผลิน, เอกสารวิชาการ ชุดพืชศาสตร์ที่ 3 เรื่องถั่วเหลือง) กสิกรนิยมปลูกถั่วเหลืองหมุนเวียนสลับกับพืชชนิดอื่น ทั้งนี้เพราะถือว่าถั่วเหลืองเป็นพืชบำรุงดิน ช่วยรักษาระดับความสมบูรณ์ของดิน ด้วยเหตุที่ถั่วเหลืองสร้างโปรตีนสูงจึงต้องการปุ๋ยไนโตรเจนเป็นจำนวนมาก เพื่อนำไปใช้เป็นสารต้นตอไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีน โดยปกติแหล่งของสารต้นตอไนโตรเจนของพืชได้แก่ ปุ๋ยไนโตรเจนในดิน หรือปุ๋ยยูเรีย ในกรณีที่ถั่วเหลืองมี Bradyrhizobium japonicum เจริญอยู่ร่วมด้วยโดยเกิดเป็นปมบริเวณราก Bradyrhizobium japonicum จะสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศแล้วเปลี่ยนให้เป็นอนุมูลแอมโมเนียมซึ่งถั่วเหลืองจะนำไปใช้ได้ ทำให้ความต้องการปุ๋ยไนโตรเจนลดลง ฉะนั้นในการทำไร่ถั่วเหลืองแทบทุกภาคของประเทศไทย กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร จึงแนะนำให้ใช้ Bradyrhizobium japonicum สายพันธุ์ที่เหมาะสมคลุกกับเมล็ดก่อนลงปลูก โดยเฉลี่ยแล้วการใช้เชื้อ Bradyrhizobium japonicum จะใช้ในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อไร่ จากการสำรวจพบว่าให้ผลผลิตสูงขึ้นในแต่ละพื้นที่แตกต่างกันไป เช่น ภาคกลาง

ผลผลิตโดยเฉลี่ยสูงขึ้น 24 % ภาคเหนือโดยเฉลี่ยสูงขึ้น 11 % เมื่อเทียบกับการปลูกโดยไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม นอกจากช่วยเพิ่มผลผลิตแล้วนับว่าการใช้ B. japonicum และนับเป็นทางหนึ่งที่ช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนอีกด้วย

ดังกล่าวแล้วข้างบนว่ากลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตรได้แนะนำให้กสิกรใช้ Bradyrhizobium japonicum คลุกเมล็ดถั่วเหลืองก่อนนำไปปลูก ดังนั้น กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน จำเป็นต้องทำการคัดสายพันธุ์ Bradyrhizobium japonicum ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูงทั้งจากในและต่างประเทศ โดยขั้นแรกทำการทดสอบประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนของเชื้อต่าง ๆ ในเรือนทดลอง (green house) ก่อน ขั้นต่อไปจึงนำไปทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจน รวมทั้งความสามารถในการแข่งขันเพื่อเกิดปมกับ Bradyrhizobium japonicum สายพันธุ์ในดินที่มีอยู่ดั้งเดิมในแหล่งนั้น ๆ

1.2.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Biological nitrogen fixation process)

การตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนอาศัยการทำงานของปฏิกิริยาที่สำคัญ ๆ หลายปฏิกิริยา เช่น กระบวนการสร้าง ATP จากการขนส่งอิเลกตรอนจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไฮโดรจิเนส



และการตรึงไนโตรเจน (Biological nitrogen fixation) เป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนกาซไนโตรเจนให้เป็น อนุมูลแอมโมเนีย โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจิเนส (nitrogenase) ดังปฏิกิริยา

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

ไนโตรจิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียเท่านั้น การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจิเนสและคุณสมบัติของไนโตรจิเนสได้มีการศึกษาใน K. pneumoniae และ Clostridium pasteurium (Carnahan และคณะ,1960) จากนั้นจึงมีการศึกษาในแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น Azotobacter vinilandi (Bulen และ Jacob,1966) , Rhizobium Japonicum (Koch และคณะ, 1967) ผลจากการศึกษาพบว่าไนโตรจิเนสบริสุทธิ์ที่แยกจากแหล่งต่าง ๆ มีคุณสมบัติทางเคมีที่คล้ายกัน (Eady และ Postgate, 1974) กล่าวคือเอนไซม์นี้ประกอบด้วยโปรตีนเชิงซ้อน 2 ส่วน ได้แก่คอมโพเนนท์ที่ 1 หรือ dinitrogenase reducgase และคอมโพเนนท์ที่ 2 หรือ dinitrogenase คุณสมบัติของโปรตีนของคอมโพเนนท์ที่ 1 จากแหล่งต่าง ๆ สรุปไว้ในตารางที่ 1 และโปรตีนของคอมโพเนนท์ที่ 2 สรุปไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งคอมโพเนนที่ 1 หรือโมลิบดินัมเหล็กโปรตีน (Component I or Mo Fe protein) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 - 250,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโมลิบดินัม 2 อะตอม สารประกอบที่มีเหล็กแต่ปราศจากฮีม (non heme ion) 28 - 34 อะตอม และหมู่อนุมูลซัลไฟด์ที่ไม่เสถียรในกรด (acid labile sulfides) 26-28 อะตอม นอกจากนี้คอมโพเนนท์ส่วนนี้ยังประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่ต่างกันโดยมีค่ามวลสารสัมพัทธ์ (stoichiometry) เป็นแบบ $\alpha_2\beta_2$ คอมโพเนนท์ที่ 2 หรือเหล็กโปรตีน (component II or Fe protein) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 - 65,000 ดาลตัน ประกอบด้วยเหล็กที่ปราศจากฮีม 4 อะตอม และหมู่อนุมูลซัลไฟด์ที่ไม่เสถียรในกรด 4 อะตอม คอมโพเนนท์ที่ 2 มีหน่วยย่อยอยู่หน่วยเดียว แต่ค่ามวลสารสัมพัทธ์พบว่าเป็นไดเมอร์ (dimer) (Bill 1980)

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนส ทำได้โดยการติดตามวัดแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชันโดยอาศัยคุณสมบัติในการถ่ายทอดอิเลกตรอนของสารที่มีพันธะสาม เช่น อะเซทิลีน (acetylene), ไซยาไนด์ (cyanide), และกาซไนโตรเจน (N_2) ดังนั้นเมื่อ ใช้อะเซทิลีนเป็นสารตั้งต้น หลังถูกรีดิวซ์จะเปลี่ยนเป็นเอทิลีน (ethylene) จะสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสได้จากปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นต่อหนึ่งหน่วยเวลา

1.3 จีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส และการควบคุมการถอดรหัสของจีน

การสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจิเนสถูกควบคุมโดย nif genes จากการศึกษาการเรียงตัวของจีนนี้ใน K. pneumoniae M5a 1 พบว่า nif genes ประกอบด้วย

17 จีน 7 โอเปอรอน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 หน้าที่ของจีนต่างๆ ทั้ง 17 จีน แสดงไว้ในตารางที่ 3 (Kennedy, C. และคณะ, 1981) จีนทั้งหมดแบ่งเป็น 3 พวกใหญ่ ๆ

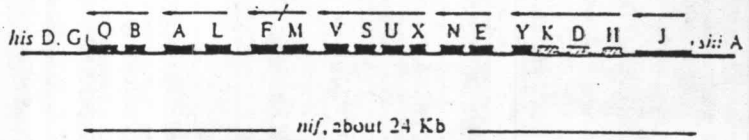
ก. จีนโครงสร้าง (structural gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจิเนส ประกอบด้วย 3 จีนคือ nif HDK มีหน้าที่สังเคราะห์หน่วยย่อยของคอมโพเนนท์ที่ 1 และคอมโพเนนท์ที่ 2 ตามลำดับ

ข. จีนควบคุม (regulatory gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีผลในการแสดงออกของจีนโครงสร้าง ได้แก่ nif A และ nif L

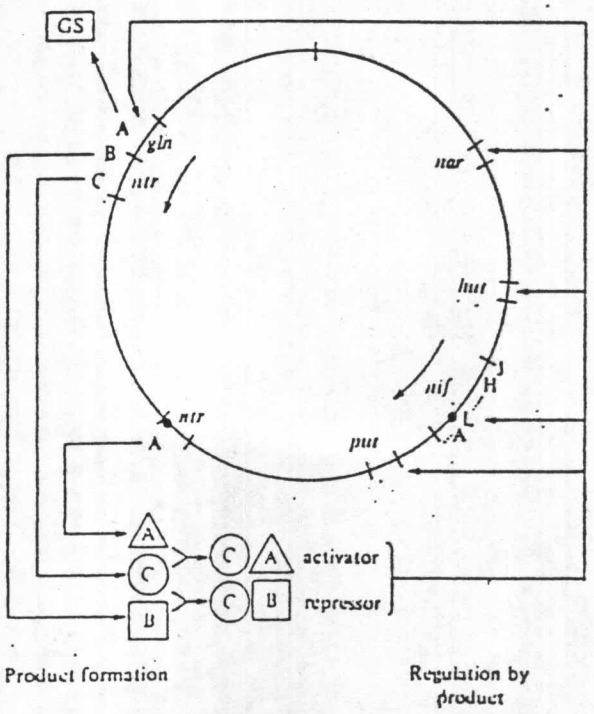
ค. จีนสังเคราะห์โปรตีนตัวอื่น ซึ่งช่วยในการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่ง Postgate (1982) ได้เสนอสมมติฐานเกี่ยวกับการควบคุมการถอดรหัสของ nif genes (รูปที่ 2) (nitrogen assimilation regulator gene) ประกอบด้วย เช่น ntr A, B และ C จะแสดงออกให้โปรตีน A, B และ C ตามลำดับโปรตีน C และ A ประกอบกันเป็นตัวกระตุ้น (activator) ส่วนโปรตีน C และ Bประกอบกันที่เป็นตัวกดดัน (repressor) ซึ่งการที่เซลล์จะสร้างตัวกระตุ้นหรือตัวกดดันนั้นขึ้นอยู่กับสภาพของสารอาหารสำหรับเซลล์ในขณะนั้น ๆ เช่นถ้ามีอนุมูลอัมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเซลล์มากก็จะสร้างตัวกดดันขึ้นมา ดังนี้เป็นต้น ตัวกดดันหรือตัวกระตุ้นที่เกิดขึ้นจะไปจับที่โปรโมเตอร์ของ nif L ซึ่งโอเปอรอน nif L นี้ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของจีนโครงสร้างไนโตรจิเนส (Drummond และคณะ 1983) โดยที่จีน nif A จะให้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัสของจีนการสร้างไนโตรจีเนส (Ausubel ,1983; Buchanan และคณะ,1981) ส่วนจีน nif L (Merrick และคณะ1982) ทำหน้าที่เป็นตัวกดดันการถอดรหัสของจีนที่สร้างไนโตรจีเนส

เมื่อใช้บางส่วนจาก nif genes ของ K. pneumoniae เป็นโพรบ (probe) ในการศึกษาความคล้ายคลึงกันกับดีเอนเอในโครโมโซมของแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เช่น Rhizobium (Dixon, 1984), Azotobacter (Jane และคณะ, 1984; Bishop และคณะ, 1985) และ Azospirillum (Elmerich, C และ Franch, C., 1982 Quirigar B. และคณะ, 1982; Buchanan-Wollaster, V. และคณะ, 1981) โดยการทำไฮบริไดเซชั่นของกรดนิวคลีอิก พบว่าบริเวณ nif HDK มีความคล้ายคลึงกันสูงมาก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 จีนไนโตรจิเนสจาก Klebsiella pneumoniae M5 a1 ขนาดประมาณ 24 kb แสดงการเรียงตัวของ 17 จีน ลูกศรแสดงทิศทาง M5 transcription ของโอเปอรอนทั้ง 7 (จาก Postgate, 1982)



รูปที่ 2 การควบคุมการถอดรหัสจีนไนโตรจิเนสโดยจีน ntr ซึ่งควบคุมเกี่ยวกับการนำเข้าของสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งนอกจากจะควบคุมจีนของไนโตรจิเนส แล้วยังควบคุม put (proline oxidation) จีน hut (histidine oxidation) จีน nar (nitrate reductase) และจีน gln A (glutamine synthase synthesis) (อีกด้วยจาก Postgate, J.R. 1982)

ตารางที่ 1 สมบัติของ Mo Fe proteins จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สกุลต่าง ๆ [1]

Organism	Mo content g atom mol^{-1}	Fe content g atom mol^{-1}	Labile S^{2-} g atom mol^{-1}	Rel. mol. mass (Kdaltons)	Sub-unit (rel. mol. mass)	Best specific activity nmol C_2H_4 $min^{-1}mg^{-1}$
A. vinelandii	2	34–38	28	216–270	70	1400
A. chroococcum	2	>22	20	222	60	2000
K. pneumoniae	2	32±3	>16	218	50, 60	2150
C. pasteurianum	2	24	24	220	50, 60	2500
R. japonicum	>1	29	26	200	50	1000

(1) จาก Eady, R.R. and Smith, B.E. Physico-chemical properties of nitrogenase and its components. In A treatise on dinitrogen fixation, 1979, pp. 399-490, New York: Wiley Interscience

ตารางที่ 2 สมบัติของ Fe proteins จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สกุลต่าง ๆ [1]

Organism	Fe content g atom/mol^{1-}	S^{2-}content g atom/mol^{1-}	Rel. mol. mass	Sub-unit rel. mol. mass
A. chroococcum	4	3.9	65.4	~30
K. pneumoniae	4	3.85	66.8	~34
C. pasteurianum	4	4	56	~28
R. lupini	3.1	–	65	~32

(1) จาก Eady, R.R. and Smith, B.E. Physico-chemical properties of nitrogenase and its components. In A treatise on dinitrogen fixation, 1979, pp. 399-490, New York, Wiley Interscience

ตารางที่ 3 โปรตีนต่าง ๆ จากจีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส พร้อมทั้งหน้าที่ ได้จากการถอดรหัสของจีนไนโตรจิเนสของ Klebsiella pneumoniae M5a1 (จาก Kennedy และคณะ, 1981)

Gene	Rel. mol. mass of product ('000)	Function of product
Q	unknown	unknown
B	unknown	involved in synthesis or insertion of FeMoco of Kp1
A	57–60	regulatory
L	45–50	regulatory
F	c. 17	codes for a flavodoxin
M	28	activates Kp2
V	42	modifies substrate specificity of Kp1
S	18–45	unknown
U	22–32	unknown
X	18	unknown
N	50	as B
E	40–46	as B
Y	19–24	unknown
K	60	codes for β sub-unit of Kp1
D	56–60	codes for α sub-unit of Kp1
H	31–39	codes for sub-unit of Kp2
J	120	electron input into nitrogenase

R. meliloti เป็นไรโซเบียมชนิดแรกที่มีการศึกษาบริเวณ nif genes เริ่มจากการที่พบว่าส่วนที่เป็น strong conservative ของนิวคลีโอไทด์มากที่สุดคือ nif H (Ruvkun และ Ausubel, 1980) ต่อมาพบว่าจีนโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนสบริเวณโอเปอรอน ของ nif HDK มีการจัดเรียงตัวเหมือนใน K. pneumoniae แต่ว่าใน B. japonicum มีการจัดเรียงตัวของ nif H แยกจาก nif DK (Hennecke และคณะ, 1987)

จากการศึกษาโดยไฮบริไดเซชั่นของกรดนิวคลีอิก พบว่า nif B, nif A ของ R. meliloti คล้ายคลึงกันของ K. pneumoniae (Hennecke และคณะ, 1985) และ nif N, nif S ของ B. japonicum คล้ายคลึงกับของ K. pneumoniae (Hennecke และคณะ, 1987) สำหรับ nif A ซึ่งเป็นจีนควบคุมนั้นพบว่าทั้งใน R. meliloti และ B. japonicum เหมือนกับ K. pneumoniae (Gussin และคณะ, 1986)

การควบคุมการถอดรหัสของ nif genes ใน R. meliloti ที่ได้มีการรวบรวมจาก (Szeto และคณะ, 1984, Aguitar และคณะ, 1985, Buikema และคณะ, 1987 และ David และคณะ, 1987, Ditta และคณะ, 1987, Ranson และคณะ, 1987 และ Szeto และคณะ, 1987) พบว่าโปรตีนที่สร้างจาก nif A เป็นตัวกระตุ้น (activator) ทำงานร่วมกับ sigma factor

1.4 การเกิดปม (Nodulation)

เมื่อไรโซเบียมเข้าสู่เซลล์รากถั่วจะทำให้เกิดปมขึ้นในบริเวณนั้น กลไกการเกิดปมจากการศึกษาของ (Goodchild 1977; Vincent 1980; Bauer 1981) พบว่ามี 8 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 3 ขั้นตอนที่ 1. ถั่วจะหลั่งสารจำพวก flavonoid ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวสัญญาณ (Horvarth และคณะ, 1986) จะทำให้ไรโซเบียมสร้าง Nodulation factor ที่เป็นสารจำพวก lipooligosaccharide นี้จะช่วยให้ไรโซเบียม (ตรงลูกศรชี้) เข้าสู่เซลล์ของพืชได้ในบริเวณรากขนอ่อน นอกจากนั้นยังทำให้เซลล์บริเวณชั้นถัดจาก epidermal (sub epidermal) มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น ขั้นที่ 2. ไรโซเบียมจะเพิ่มจำนวนและเข้าสู่เซลล์ในชั้น cortex ในขั้นที่ 3. จะมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ในชั้น pericycle เริ่มแบ่งตัว ขั้นที่ 4. เมื่อไรโซเบียมเพิ่มจำนวนมากขึ้น

มีผลทำให้การแบ่งตัวของชั้น pericycle เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จึงมีผลทำให้ชั้น endodermis และ epidermis โก่งงอ และแตกออกในขั้นที่ 5. พร้อม ๆ กันนั้นไรโซเบียมจะเริ่มเปลี่ยนสภาพ (differentiate) เป็น bacteroid เซลล์ชั้น pericycle เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเกิดเป็นปมขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ ในขั้นที่ 6. เซลล์ชั้น vascular ถูกสร้างขึ้นมาล้อมรอบบริเวณนั้น ขั้นที่ 7. พืชจะสร้างเซลล์ที่มีผนังเซลล์หนาขึ้นรอบบริเวณปมนั้นอีกชั้นหนึ่ง (ลูกศร) พร้อมกันนั้นก็มีการสร้าง vascular bundles รอบ ๆ บริเวณนั้น และ Scleroid cell ขึ้นโดยรอบอีกชั้นหนึ่งพร้อมกับ lenticel ที่ผนังเซลล์รากพืชบริเวณรอบ ๆ ปมรูปแสดงในขั้นตอนที่ 8

1.5 จีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปม (Nodulation genes)

จีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปม (nodulation genes) ในไรโซเบียมประกอบด้วยจีนหลายกลุ่ม ได้แก่ nod genes, nol genes, syr genes (Kondorosi, 1989) ในไรโซเบียมที่เติบโตช้าซึ่งรวมทั้ง B. japonicum พบว่า nod genes อยู่บนโครโมโซม แต่ในไรโซเบียมที่เจริญเติบโตเร็ว เช่น R. meliloti, R. trifoli พบว่า nod genes มีอยู่ทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิด ที่เรียกว่า sym plasmid การศึกษาการเรียงตัวของจีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปม (nod genes, nol genes, และ syr genes) บน sym plasmid ของ R. meliloti พบว่าประกอบด้วย 21 จีน 6 โอเปอรอน (Kondorosi, 1991) มีการเรียงตัวดังแสดงในรูปที่ 4

nod genes เป็นจีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Nodulation factor ซึ่งเป็นสารจำพวก lipooligosaccharide ชนิด 6-O-sulfated N-(C16:2) acyl-tri-N-acetyl-β-1-D glucosamine tetrasaccharid-(Serouge และคณะ, 1990) จากการศึกษา nodulation factor ของ R. lequminosarum และ R. meliloti พบว่ามีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกันในบางส่วน ทำให้เชื่อว่า nodulation factor นี้สร้างมาจากต้นตอของ Nodulation factor ที่เหมือนกัน (Broughton และคณะ, 1991; Spaink และคณะ, 1991) ซึ่งต่อมาพบว่าจีนโครงสร้าง nod ABC นั้นเป็นจีนที่พบในไรโซเบียมหลาย ๆ ชนิด รวมทั้ง B. japonicum nod ABC เป็นจีนที่รับผิดชอบในการสังเคราะห์โปรตีนที่สังเคราะห์สารต้นตอ Nodulation factor และสารนี้จะถูกเปลี่ยนแปลง (modify) ต่อโดยการทำงานของโปรตีน ที่สร้าง

จาก host-specific nod gene ซึ่งจะมีความจำเพาะในไรโซเบียมแต่ละชนิดที่มีเจ้าเรือน (host) ต่าง ๆ กัน

จีนในกลุ่มของ nod genes แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ (รูปที่ 5)

1.6.1 จีนควบคุม (regulatory genes) ได้แก่ nod D1, D2, D3 ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนกดดันที่มีผลในการควบคุมการแสดงออกของจีนโครงสร้างโดยในสภาวะปรกติโปรตีนจาก nod D จะกดดันไม่ให้มีการแสดงออกของจีนโครงสร้างแต่เมื่อมีสารเหนี่ยวนำที่พืชหลั่งออกมา ซึ่งได้แก่สารพวก flavone สารนั้นจะจับโปรตีนกดดันทำให้ส่วนจีนโครงสร้างแสดงออกได้ (Kondorosi และคณะ, 1991)

1.6.2 จีนโครงสร้าง (Structural genes) แบ่งได้เป็น 2 พวกคือ

ก. จีนโครงสร้างที่พบในไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ และ Bradyrhizobium (common nod genes) (Horvarth และคณะ, 1986; Faucher และคณะ, 1989; Cervantes และคณะ, 1989) ได้แก่ nod ABC ซึ่งรับผิดชอบการสังเคราะห์โปรตีน ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารต้นตอของ Nodulation factor

ข. จีนโครงสร้างส่วนที่ทำให้ไรโซเบียมมีความจำเพาะต่อชนิดของพืช (host specific nod genes) กลุ่มจีนนี้จะรับผิดชอบสร้างโปรตีนเพื่อจะเปลี่ยนแปลง (modify) สารต้นตอ Nodulation สังเคราะห์จากการทำงานของ common nod genes, nod ABC) ให้เป็น Nodulation factor ชนิดจำเพาะต่อการเกิดปมกับพืชชนิดหนึ่ง (Faucher และคณะ, 1986) การศึกษาใน R. meliloti พบว่า host specific nod genes ประกอบด้วย nod FEG, nod H และ nod PQ (Horvarth และคณะ, 1986; Faucher และคณะ, 1989; Cervantes และคณะ, 1989) กลุ่มจีนนี้ทำให้ R. meliloti มีความจำเพาะในการเกิดปมเฉพาะถั่ว alfafa เมื่อทำให้เกิดการมิวเตชั่นในส่วนของ nod Q ทำให้คุณสมบัติการเกิดปมเฉพาะถั่ว alfafa เปลี่ยนไปโดยจะเปลี่ยนไปเกิดปมกับถั่ว vetch ด้วย

1.6 สมมติฐานและวัตถุประสงค์ของการวิจัย

ดังกล่าวแล้วข้างต้นว่ากลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานที่ต้องทำหน้าที่ผลิตเชื้อไรโซเบียม เพื่อจัดจำหน่ายแก่เกษตรกร ดังนั้นจึงได้มี

การวิจัยเพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดที่มีผลในการให้การเจริญเติบโตของถั่วแต่ละชนิดที่มีผลในการให้การเจริญเติบโตของถั่วแต่ละชนิดเป็นไปได้อย่างดี ในปัจจุบันนี้กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดินมีเชื้อ B. japonicum ทั้งหมด 23 สายพันธุ์ ได้มาจากแหล่งต่าง ๆ ทั่วโลกและในประเทศไทย นำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการให้การเจริญกับถั่วเหลืองชนิดต่าง ๆ ซึ่งจากงานวิจัยครั้งนี้เพื่อจะทำการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับถั่วเหลือง สจ. 5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและต้านทานโรคและแมลงได้

ในปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพในด้านเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโดยใช้การศึกษารูปแบบของดีเอนเอหลังการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เพื่อใช้จำแนก (identify) ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ มาแล้ว เช่น Azotobacter spp. (ยิ่งพิศ ยอดโยธี วิทยานิพนธ์ 1988) Yersinia enterocolitica (Miyahara และคณะ) Candida spp. (Magee และคณะ 1987) แต่ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดเมื่อใช้รูปแบบการย่อยดีเอนเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์นั้นไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ ดังนั้นการนำเอาโครโมโซมดีเอนเอที่ถูกย่อยมาศึกษาต่อโดยการติดตามตำแหน่งจีนที่สำคัญ ที่อยู่บนโครโมโซมดีเอนเอนั้นๆ ซึ่งเทคนิคที่ใช้นั่นก็คือ เรสทริกชันแฟรกเมนท์ เลงธ์ โพลิมอฟิซึม (Restriction Fragment Length Polymorphism analysis) หรือเรียกย่อๆว่า RFLP จากการนำเอาความก้าวหน้าทางเทคนิคการตรวจสอบทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ B. japonicum 23 สายพันธุ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์โดยใช้รูปแบบของโครโมโซมดีเอนเอที่ถูกย่อย และจากการวิเคราะห์ RFLP โดยใช้ nif genes และ nod genes ซึ่งเป็น จีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนและการเกิดปมและเป็นจีนที่พบว่าอยู่บนโครโมโซม

วัตถุประสงค์

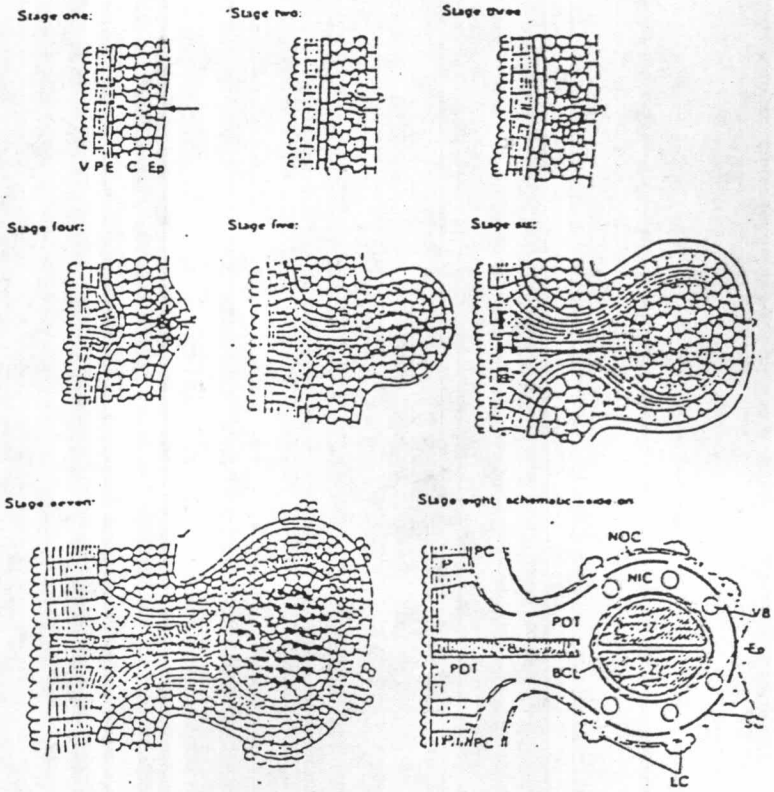
1. ศึกษาคุณสมบัติในการเกิดปม การตรึงไนโตรเจนของเชื้อ B. japonicum 23 สายพันธุ์ เมื่ออยู่รวมกับถั่วเหลือง สจ. 5

2. ศึกษารูปแบบการย่อยโครโมโมโซมดีเอนเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (restriction pattern) ของ B. japonicum ทั้ง 23 สายพันธุ์

3. ศึกษารูปแบบของ RFLP ของ B. japonicum ทั้ง 23 สายพันธุ์โดยใช้ nif และ nod genes เป็นจีนติดตามผล

4. หาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจสอบโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมของเชื้อ B. japonicum 23 สายพันธุ์กับคุณสมบัติการเกิดปมและการตรึงไนโตรเจนของ B. japonicum กับถั่วเหลือง สจ. 5

018049



ภาพที่ 1 ขั้นตอนแสดงการเกิดปมในถั่วเหลือง [1]

(V = vascular tissue ; P = pericycle ; E = endodermis ;
C = cortex ; Ep = epidermis)

ขั้นที่ 1 แบคทีเรียเข้าสู่เซลล์

ขั้นที่ 2 แสดงมีการเจริญของ infection thread

ขั้นที่ 3 pericycle มีการแบ่งตัว

ขั้นที่ 4 ชั้น endodermis และ epidermis โก่งงอแตกออก

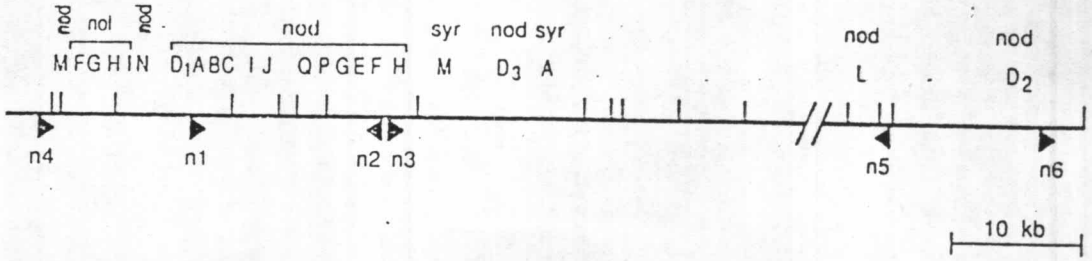
ขั้นที่ 5 ไรโซเบียมเปลี่ยนสภาพเป็น bacteroid

ขั้นที่ 6 พืชสร้างเซลล์ vascular รอบ ๆ บริเวณนั้น

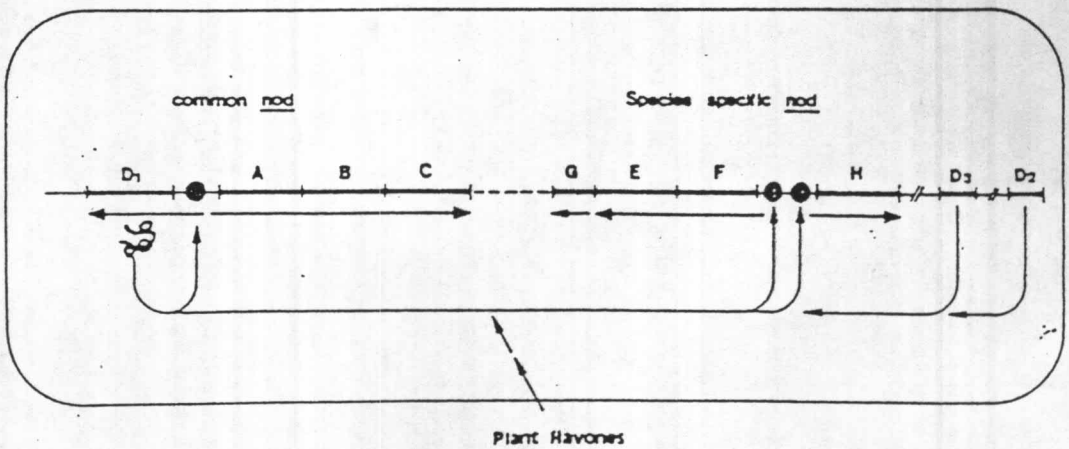
ขั้นที่ 7-8 ผนังเซลล์พืชจะหนาขึ้น

(P = plant cortex ; Lc = lenticel ; Sc = scleroid cell ;
NIC = nodule inner cortex ; PDT = pericycle derived
tissue ; BCL = boundary cell layer)

[1] จาก Goodchild, 1977; Vincent, 1980 ; Bauer, 1981



รูปที่ 4 ตำแหน่งการจัดเรียงตัวของ nodulation genes ที่พบใน R. meliloti 1042 เครื่องหมายลูกศรแสดงทิศทางของ transcription ของโอเปอรอนทั้ง 6 (จาก Kondorosi และคณะ, 1991)



รูปที่ 5 การควบคุมการถอดรหัสของ common nod genes (nod ABC) และ specific nod genes (nod FEG และ nod H) ซึ่งทั้งสองบริเวณทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่สังเคราะห์ nodulation factor โดยที่ nod D_1 D_2 D_3 สร้างโปรตีนตัวกดดัน (repressor) และจะเปลี่ยนเป็นตัวกระตุ้น (activator) เมื่อถูกเหนี่ยวนำจากสารที่หลั่งจากรากพืช (plant flavones) (จาก Mulligan และ Long, 1985; Debelle และ Sharma, 1986; Gottfert และคณะ, 1986; Peters และคณะ, 1986 ; Rostas และคณะ, 1986)