

การศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม

จา โบนิคัม สายพันธุ์ 122 และสายพันธุ์ใหม่



นายอริบ สิตตลิลิต

003755

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2524

i 18178649

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

Mr. Atip Likidlilid

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

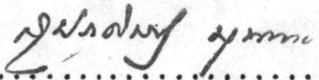
Graduate School

Chulalongkorn University

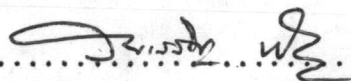
1981

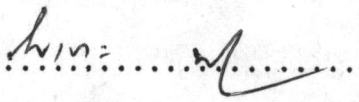
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเปียม
จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 และสายพันธุ์ใหม่
โดย นายอริป สอิตลิลิต
ภาควิชา ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทัพยาคัน

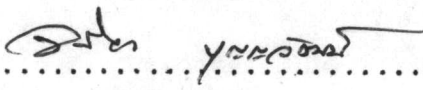
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

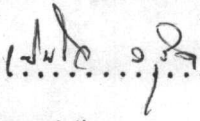

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประดิษฐ์ บุนนาค)

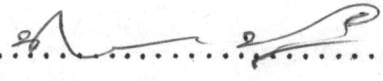
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทัพยาคัน)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทัพยาคัน)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ฉรียา บุญวาทณ์)


..... กรรมการ
(นาง ऐนใจ วสุวัต)


..... กรรมการ
(ดร. นันทกร บุญเกิด)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเปียม จาโปนิคัม
 สายพันธุ์ 122 และสายพันธุ์ใหม่

ชื่อผู้ผลิต นายอริบ ลีชิตลลิต

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ เกษมทัศน์

ปีการศึกษา 2524



บทคัดย่อ

ไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้สร้างปมกับถั่วเหลืองพันธุ์ สล. 4 การวิจัยนี้ต้องการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเปียมสายพันธุ์นี้ในฐานะเป็นแบคทีเรียอิสระ และอยู่ร่วมกับต้นถั่วเหลือง จากการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การเจริญเติบโตของไรโซเปียมนี้ อาจผันผวนการกีดกันการถอดแบบเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งอาจทดสอบได้โดยใช้อะเซทิลีนรีดักชัน สภาวะเหมาะสมของการปลดปล่อยการถอดรหัสเป็นดังต่อไปนี้คือ เจริญเติบโตไรโซเปียมด้วยอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูตาเมต 1 มิลลิกรัมต่อบิลลิลิตร เป็นสารต้นตอไนโตรเจน แมกนีซียมเป็นสารต้นตอคาร์บอน พีเอช 6.8 อุณหภูมิ 28° ซ และความชื้นของกาซออกซิเจนถูกปรับให้เป็น 0.76 มิลลิเมตรของปรอท ไรโซเปียมสายพันธุ์นี้สามารถสร้างปมกับถั่วเหลือง สล.4 ภายใต้สภาวะควบคุมให้ต้นที่เติบโตแข็งแรง น้ำหนักสดของทั้งต้นและรากของต้นที่คลุกเชื้อจะสูงกว่าต้นที่ไม่คลุกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ การตรึงไนโตรเจนตรวจพบได้จากรากของต้นคลุกเชื้อที่มีอายุตั้งแต่สองสัปดาห์ขึ้นไป ต้นที่ระยะระหว่าง 2-6 สัปดาห์มีการเพิ่มขึ้นของการตรึงไนโตรเจนอย่างทวีคูณ นอกจากนี้ในช่วงอายุนี้ จำนวนปม น้ำหนักปม โปรตีน และไนโตรเจนทั้งหมดจากใบยังเพิ่มขึ้นตามค่าการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย

การทดลองนี้ได้เคลื่อนนิพจน์ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดต้นยาที่มีชื่อว่า พิวอาร์ดีวัน ซึ่งอยู่ในเซลล์ของเอสเคอริเคีย โคลิ สายพันธุ์ เจซีห้าสี่หกหก เข้าไปในไรโซเปียมสายพันธุ์นี้ พบความถี่ของการคอนจูเกท คือ 1×10^{-3} ต่อเซลล์รับ ได้แยกคอนจูแกนท์บางตัวมาศึกษาพบว่าในสภาพแบคทีเรียอิสระ คอนจูแกนท์ซึ่งมีพลาสมิดพิวอาร์ดีวันเพิ่มขึ้นนี้ ไม่มีการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างไปจาก

ไวลด์ไทป์แต่อย่างไรในขณะที่การเจริญของมันช้าแตกต่างกัน ความสามารถในการสร้างปมของมัน กับต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สล. 4 ก็เหมือนกันกับไวลด์ไทป์ ทั้งนี้โดยตัดสินจากจำนวนปม น้ำหนักปม และ น้ำหนักสด แต่อย่างไรก็ตาม ค่าแอกติวิตี้จำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชัน ซึ่งวัดจากปมรากจะสูงกว่า ของไวลด์ไทป์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อวัดที่สัปดาห์ที่ห้าหลังการปลูก

A

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

Name Mr. Atip Likidlilid

Department Biochemistry

Thesis advisor Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.

Academic Year 1981

Abstract

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

We have also transferred a nif gene locus adjoined with a drug resistance plasmid, named pRD1, which is harbored in Escherichia coli JC 5466 to this rhizobial strain. The intragenic transfer is succeeded with a frequency of 1×10^{-3} per recipient cell. Some of the isolated conjugants are further studied. In a free living condition, these conjugants, confer plasmid pRD1, show no difference in the nitrogen-fixing ability, although their growth profiles are slower, when they are compared to those of the wild type. Their nodulation ability, with respect to the nodule number, the nodule weight and the wet weight of whole plant are concurrent with those of the wild type. However, the specific activity of acetylene reduction, pertaining to the conjugants nodulated roots, are significantly higher than that of the wild type nodulated roots. This difference is most remarkable in the symbiotic soybean plant at 5 weeks after nodulation.

กิตติกรรมประกาศ



ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ กิพยาศน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพย์โตชก รองศาสตราจารย์ ดร.จรรยา บุญญวัฒน์
อาจารย์เป็นใจ วสุวัต ดร.นันทกร บุญเกิด ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และให้แนวความคิด
อย่างดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

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

ขอขอบคุณ คุณวรวิทย์ รุ่งรัตนกลิน คุณบรรพชาย แต่งฉ่า สภาวิจัยแห่งชาติ บัณฑิตวิทยาลัย
และทุกท่านซึ่งมิได้เอ่ยนามในที่นี้ สำหรับกำลังใจ ความช่วยเหลือ ตลอดจนการสนับสนุนด้านทุนการวิจัย
จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

| | |
|-------------------------|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ค |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ฉ |
| รายการตารางประกอบ..... | ช |
| รายการรูปประกอบ..... | ญ |
| คำย่อ..... | ฎ |



บทที่

| | |
|---|----|
| 1. บทนำ..... | 1 |
| 2. วิธีการทดลอง | |
| 1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... | 15 |
| 2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... | 16 |
| 3. สูตรอาหาร..... | 16 |
| 4. การเตรียมสารละลาย..... | 21 |
| 5. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... | 22 |
| 6. การศึกษาการเจริญเติบโตของไรโซเปียม จา โปนิคัม 122..... | 23 |
| 7. การวัดการรีดิวซ์อะเซทิลีน..... | 24 |
| 8. การหาปริมาณโปรตีนของเชื้อโดยวิธีลอร์..... | 26 |
| 9. การทดสอบความถี่ในการผันกลับ..... | 26 |
| 10. การผสมพันธุ์..... | 26 |
| 11. การทดสอบการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการเกิดปมในรากถั่วเหลือง..... | 27 |
| 12. การหาปริมาณโปรตีนของใบถั่ว..... | 29 |
| 13. การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากใบถั่ว..... | 29 |
| 14. การแยกเชื้อจากปมรากถั่ว..... | 30 |

บทที่

หน้า

| | | |
|----|---|-----|
| 3. | ผลการวิจัย | |
| 1. | ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับความเข้มของการดูดแสง..... | 32 |
| 2. | ลักษณะการเจริญเติบโตของไรโซเปียม จาโพนิคม 122 เมื่อใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... | 36 |
| 3. | สภาวะที่เหมาะสมของการรีดิวซ์เฮกซามีนของไรโซเปียม จาโพนิคม 122 ในสภาพพอลิเมอร์อิสระ..... | 36 |
| 4. | เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองเมื่อปลูกและได้ปลูกด้วยไรโซเปียม จาโพนิคม 122..... | 51 |
| 5. | การเคลื่อนที่พลาสมิดจากเอสเคอริเชีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) เข้าไรโซเปียม จาโพนิคม 122 โดยวิธีคอนจูเกชัน..... | 63 |
| 4. | วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย..... | 77 |
| | เอกสารอ้างอิง..... | 90 |
| | ภาคผนวก..... | 103 |
| | ประวัติผู้เขียน..... | 105 |

รายการประกอบ

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับค่าความเข้มของการดูดแสง ที่ไม่เสื่อจางและเสื่อจาง | 35 |
| ตารางที่ 2 การใช้สารต้นต่อคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 | 39 |
| ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตและแอกติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีนของไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 เมื่อมีสารต้นต่อคาร์บอนต่างกัน | 49 |
| ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตและแอกติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีนของไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 เมื่อมีสารผสมต้นต่อคาร์บอนต่างกัน | 50 |
| ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญเติบโตทั่ว ๆ ไปของถั่วเหลืองที่ไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อ ไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 | 53 |
| ตารางที่ 6 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่ว เหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 | 55 |
| ตารางที่ 7 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก ต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 | 56 |
| ตารางที่ 8 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี เคลดทัลของต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 | 60 |
| ตารางที่ 9 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณโปรตีนที่หาโดยวิธีไบยูเรท ของต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 | 61 |
| ตารางที่ 10 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายของ กระถางที่ปลูกถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 | 64 |
| ตารางที่ 11 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด (พีอาร์ดี 1) จากเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 ไปให้ ไรโซเปียม จา โปนิคัม 122 โดยวิธีคอนจูเกชัน | 69 |

- ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตและการรื้อตัวของเชื้อราโรโซเปียม จากปดิม 122 และคอนจูแกนทีในช่วงระยะเวลา 12 วัน 70
- ตารางที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักสด จำนวนปม และแอกติวิตีจำเพาะการรื้อตัวของเชื้อราโรโซเปียม ของต้นถั่วเหลืองในสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อโรโซเปียม จากปดิม 122 และคอนจูแกนที 73
- ตารางที่ 14 เปรียบเทียบน้ำหนักสด จำนวนปม และแอกติวิตีจำเพาะการรื้อตัวของเชื้อราโรโซเปียม ของต้นถั่วเหลืองในสัปดาห์ที่ 5 ระหว่างไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อโรโซเปียม จากปดิม 122 และคอนจูแกนที 75

รายการรูปประกอบ

| | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และระยะเวลาในการเจริญของแบคทีเรีย | 33 |
| รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และการเจริญของแบคทีเรียที่ความยาวแสง 500 นาโนเมตร | 34 |
| รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.1 | 37 |
| รูปที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.5 | 38 |
| รูปที่ 5 ผลของการปรับบรรยากาศออกซิเจนต่อแอกติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีนของไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน | 41 |
| รูปที่ 6 เปรียบเทียบแอกติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีนกับความดันบรรยากาศของออกซิเจน | 42 |
| รูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและแอกติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีนของไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจนต่างกัน | 44 |
| รูปที่ 8 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและแอกติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีนของไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 กับอุณหภูมิ | 45 |
| รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นสูงสุดของเซลล์ และแอกติวิตีจำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรซีเนสกับ $\frac{1}{K}$ (Arrhenius's plot) | 46 |
| รูปที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและแอกติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีนของไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 กับพีเอช | 48 |
| รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง การเจริญเติบโต พีเอช และแอกติวิตีจำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรซีเนสของไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 | 52 |
| รูปที่ 12 สภาวะที่เหมาะสมในการรีดิวซ์อะเซทิลีนของปมรากถั่วเหลือง | 57 |

- รูปที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักต้นสดกับแอกติวิตีจำเพาะการรีดิวซ์อะเซทิลีนระหว่าง
ต้นที่ไม่คลุมเชื้อ และคลุมเชื้อไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 59
- รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปม หนักปม กับแอกติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีน
ของปมถั่วเหลือง 62
- รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทราย และแอกติวิตีจำเพาะการ
รีดิวซ์อะเซทิลีน ระหว่างต้นที่ไม่คลุมเชื้อและคลุมเชื้อไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 65
- รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และแอกติวิตีจำเพาะการรีดิวซ์อะเซทิลีน
ของเอสเคอริเคีย โคโล เค 12 เลขี 5466 (พีอาร์ดี 1) 66
- รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และแอกติวิตีจำเพาะการรีดิวซ์อะเซทิลีน
ของเอสเคอริเคีย โคโล เค 12 เลขี 5466 (พีอาร์ดี 1) ซึ่งเสริมด้วย
แคลอะมิโนแอซิด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 68
- รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไรโซเปียม จาโปนิคัม 122 และคอนจูแกนท์
(R11) 72

คำย่อ

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