ความสัมพันธ์ระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วในเชิงพันธุกรรมระดับโมเลกุล

หนึ่ง เตียอำรุง[1*] และ นันทกร บุญเกิด[2]

Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (1996). **Symbiotic Relationship Between Rhizobia and Legumes in Molecular Genetic Aspect.** *Suranaree J. Sci. Technol. 3: 15-20*

ไรโซเบียม (*Rhizobium*) จัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างปุ๋ยให้กับพืช โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่ว โดยสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนที่มีอยู่ในบรรยากาศซึ่งมีปริมาณถึง 78 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็นแอมโมเนีย ซึ่งพืชนำไปใช้เหมือนปุ๋ยในการเจริญเติบโตได้ กระบวนการดังกล่าวเป็นที่รู้จักกันดีในนามของกระบวนการตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียในพวกไรโซเบียมนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยยึดหลักการเจริญเติบโต คือ *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* ทั้งนี้ *Rhizobium* เป็นพวกเจริญเร็ว (fast growing) ส่วน *Bradyrhizobium* เจริญช้า (slow growing) กลุ่มของไรโซเบียมนี้จะสามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชได้โดยจะต้องอาศัยอยู่ร่วมกับพืชในภาวะแบบพึ่งพาหรือที่เรียกกันว่า "*Symbiosis*" โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะอาศัยอยู่ในปมรากของพืชตระกูลถั่ว ซึ่งสร้างขึ้นโดยขบวนการร่วมกันระหว่างไรโซเบียมและถั่ว

กลไกที่ไรโซเบียมจะเข้าสู่รากของพืชได้นั้นจะเริ่มจากการที่เซลล์ของรากพืชจะปล่อยสารจำพวก flavonoid หรือ isoflavonoid สารนี้จะไปกระตุ้นกลุ่มของยีนที่ควบคุมการสร้างปม (nodulation genes; nod) ในเซลล์ไรโซเบียมให้มีการแสดงผลออกมา แล้วจึงเริ่มผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพวก lipooligosaccharide เช่นใน *Rhizobium meliloti* จะสร้าง tetra และ pentamers ของ N-acetylglucosamine ดังแสดงโครงสร้างทางเคมีในรูปที่ 1 สารในกลุ่มนี้ที่ถูกสร้างจากกลุ่มของ nod gene บางครั้งก็เรียกว่า nod factor ซึ่ง nod factor จะทำให้รากของพืชเริ่มโค้งงอ และเปลี่ยนเป็นปมต่อไป ขั้นตอนนี้เองเป็นขณะเดียวกับที่ไรโซเบียมได้เคลื่อนตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อของรากตามส่วนเนื้อเยื่อที่เรียกว่า cortex โดยถั่วจะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า infection thread ผนังเซลล์พืชจะทำเป็นท่อขึ้นไปตามรากต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 2 ในส่วนปรากฏการณ์ทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของรากพืชเองนั้น พบว่าขณะที่ไรโซเบียมเข้าสู่ราก ยีนในเซลล์ของรากพืชมีการแสดงออกและสร้างโปรตีนที่ชื่อว่า hadulins อีกด้วย

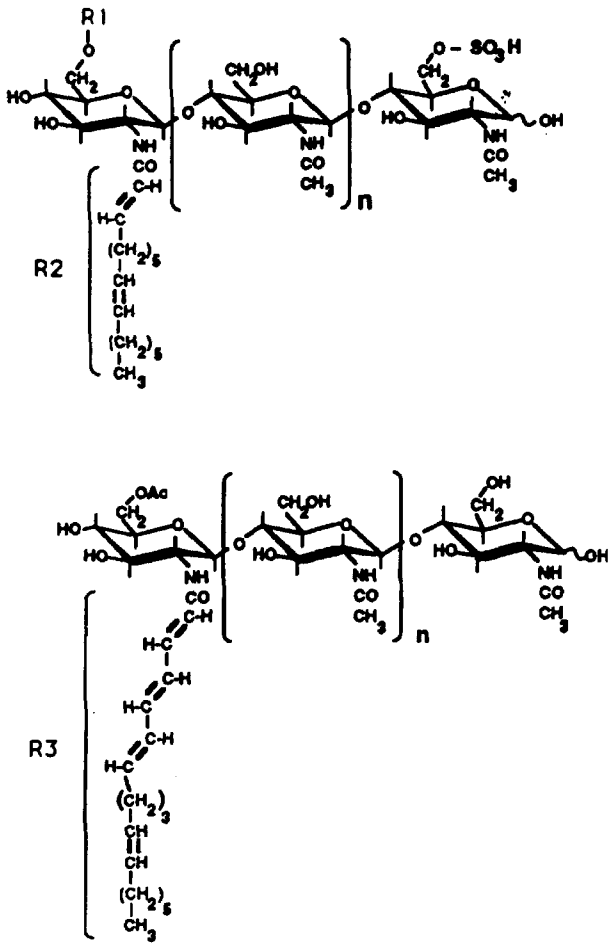
กลุ่มของยีนที่มีบทบาทต่อการอยู่ร่วมแบบพึ่งพาอาศัยกันระหว่างไรโซเบียมและพืชนั้นสามารถจำแนกได้ดังต่อไปนี้

1. กลุ่มของ nod gene

ในกลุ่มของไรโซเบียมที่เจริญได้รวดเร็วนั้นกลุ่มของ nod gene จะพบอยู่บนพลาสมิด (plasmid) ขนาดใหญ่ที่เรียกว่า pSym ส่วนในกลุ่มของไรโซเบียมที่เจริญได้ช้า เช่น ในยีนัส *Bradyrhizobium* จะพบว่ากลุ่มของ nod gene แทรกตัวอยู่ในโครโมโซมในไรโซเบียมทุกสายพันธุ์จะพบกลุ่ม nod gene ที่เป็น *nod ABCIJ* หรือที่เรียก common nod gene การที่ได้ชื่อเช่นนี้เป็นเพราะว่าลักษณะทางกายภาพ และหน้าที่ จะพบว่าคล้ายหรือเหมือนกันในไรโซเบียมทุกชนิด ส่วนอีกกลุ่มที่พบว่าเป็นกลุ่มที่มีความ

[1] *Dr.rer.nat., อาจารย์, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ,* [2] *Ph.D., หัวหน้าสถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000*

** ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ*



n = 2 or 3; R1=H or $COCH_3$; R2=C16:2, C16:3, C16:1; R3 = C18:4, C18:1

Fig. 1. Structure of the nod factor
a) Nod factors from *R. meliloti*
b) Nod factors from *R. leguminosarm* bv. *viciae*
c) Nod factors from *B. japonicum USDA 110*
Source: *Palacios et al. (1992).*

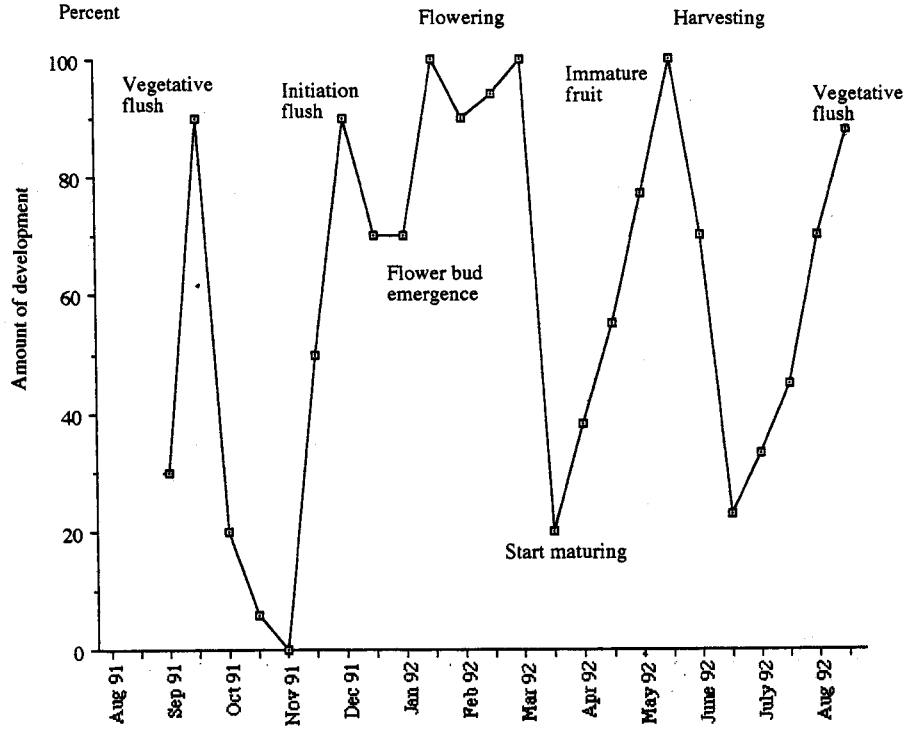


Figure 1. Mangosteen phenological cycle.

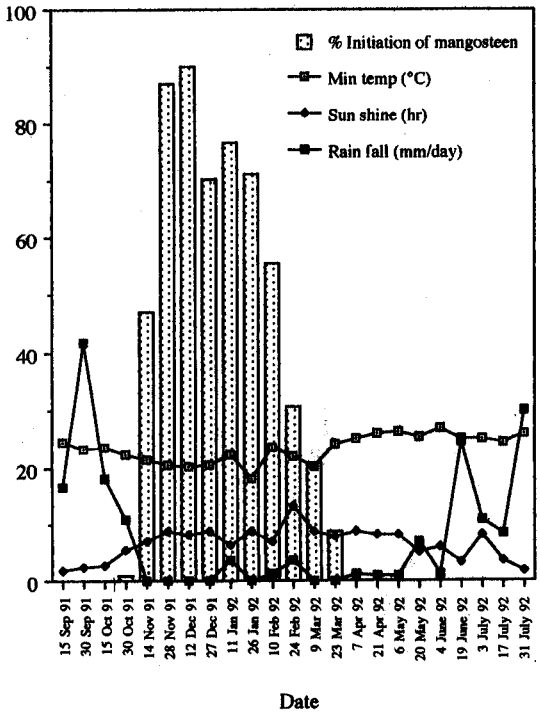


Figure 2. Microclimatic data and percent initiation of managosteen.

ชุดที่ 2 เริ่มต้นเดือนกันยายน จนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในกลางเดือนกันยายน (รูปที่ 1)

การชักนำให้เกิดตาดอก (flower bud induction) ของมังคุดเริ่มต้นเดือนพฤศจิกายน ยังผลให้มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และรูปร่างของปลายยอด (apices) จากระยะเจริญเติบโตของลำต้นและใบ ไปเป็นระยะดออกดอกและผล ในกลางเดือนพฤศจิกายน จากนั้นตาดอกเริ่มโผล่เห็นเป็นตาตุ่มสีม่วงแดงในต้นเดือนธันวาคม จนเห็นชัดทั่วๆ ไป เมื่อเกิดดอก 70 เปอร์เซ็นต์ ในกลางจนถึงปลายเดือนธันวาคม และดอกมังคุดจะเริ่มบานจนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในกลางเดือนมกราคม (รูปที่ 1 และ 2)

มังคุดเริ่มติดผลและเริ่มเจริญเติบโตจนถึงเก็บเกี่ยวในเดือนพฤษภาคม (รูปที่ 1)

2. การเปลี่ยนแปลงของปลายยอดที่ลอกดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอรีโอ

ในการเกิดใบ (รูปที่ 3) ปลายยอดของมังคุดจะแบน [รูปที่ 3 (c)] และเริ่มเจริญเติบโตนูนเป็น 4

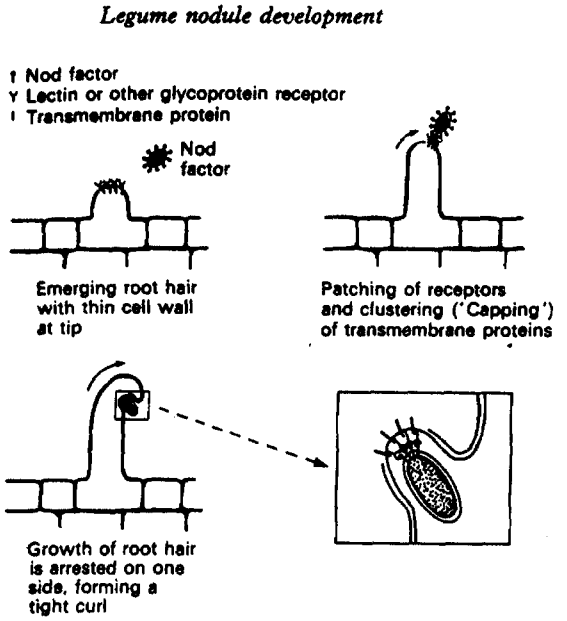


Fig. 3. The Nod factor-receptor model for rhizobial invasion.
Source: *Hirsch (1992).*

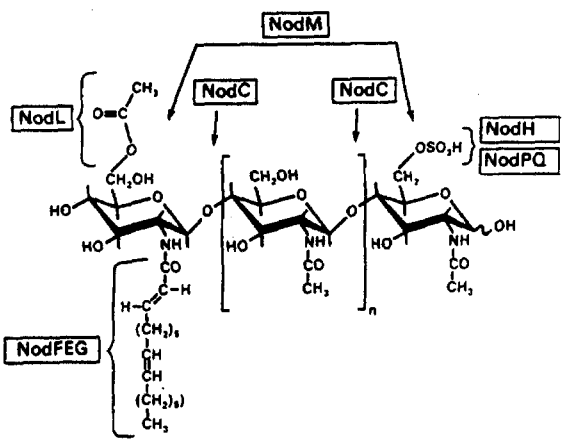


Fig. 4. The proposed roles of the *nod* gene products in the synthesis of Nod factor are indicated by arrows. (h refer to number of glucosamine residues).
Source: *Hirsch (1992).*

แล้วใส่ลงรากของถั่วอัลฟัลฟา (alfalfa) พบว่าที่ความเข้มข้น 10^{-11} M จะทำให้ลักษณะของรากเปลี่ยนไป ในขณะที่ความเข้มข้นที่สูงกว่าคือ 10^{-7} M จะกระตุ้นให้กลุ่ม cortical cell ในรากมีการแบ่งตัวมากขึ้น ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าที่รากของพืชเองอาจมีส่วนที่เป็น receptor มากกว่า 2 ชนิด ซึ่งในที่นี้อาจเป็น receptor สำหรับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของราก และ receptor สำหรับการแบ่งเซลล์ นักวิทยาศาสตร์พบว่า ถ้านำ Nod factor จาก *R. meliloti* นี้ใส่ลงไปในถั่วจำพวก vetch (*Vicia sativa* L.) จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่ราก แต่ถ้ามีการกำจัดกลุ่มซัลเฟตบนโมเลกุลของ Nod factor ออก (ศึกษาจากการทำให้ *R. meliloti* กลายพันธุ์) แล้วใส่ลงไปในถั่วดังกล่าวอีกครั้ง ด้วยความเข้มข้น 10^{-8} -10^{-9} M พบว่ารากของ vetch มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป เมื่อย้อนกลับมาศึกษา *R. meliloti* ที่ถูกกลายพันธุ์ไป พบว่ามีความสัมพันธ์กับยีนอีก 2 ชุด คือ *nod PQ* และ *nod H* มีบทบาทต่อกลุ่มของซัลเฟตบนโมเลกุลของ Nod factor โดยมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่ชื่อว่า ATP sulphurylase และกลุ่มของซัลเฟตเองมีผลต่อการกำหนดความจำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะส่วนที่ receptor ของถั่ว alfalfa มาก

Nod factor ที่สร้างขึ้นนี้ จะเปรียบเสมือนสัญญาณที่ไปกระตุ้นให้ระดับ Ca^{2+} ในเซลล์รากพืชเปลี่ยนไป โดย Nod factor จะทำให้เกิดกระบวนการที่เรียกว่า depolarization ที่บริเวณเซลล์เมมเบรนของรากพืช ปรากฏการณ์อื่นๆ ที่สำคัญที่เกิดตามมาก็คือ vacuole ในเซลล์รากพืชมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง มีการจัดเรียงตัวใหม่ของ cytoskeletal ในรากพืช และปริมาณของฮอร์โมนบางชนิดเปลี่ยนไป เช่น พบว่ามีการสร้าง cytokinin เกิดขึ้นซึ่งจัดเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบ mitosis และรากก็จะเกิดเป็นปมในที่สุด (ดังแสดงสรุปในรูปที่ 5)

2. กลุ่ม nif gene

มีบทบาทต่อการสร้างโปรตีนที่สำคัญที่สุดในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ ไนโตรจีเนส (nitrogenase) รวมไปถึงหน่วยย่อยต่างๆ

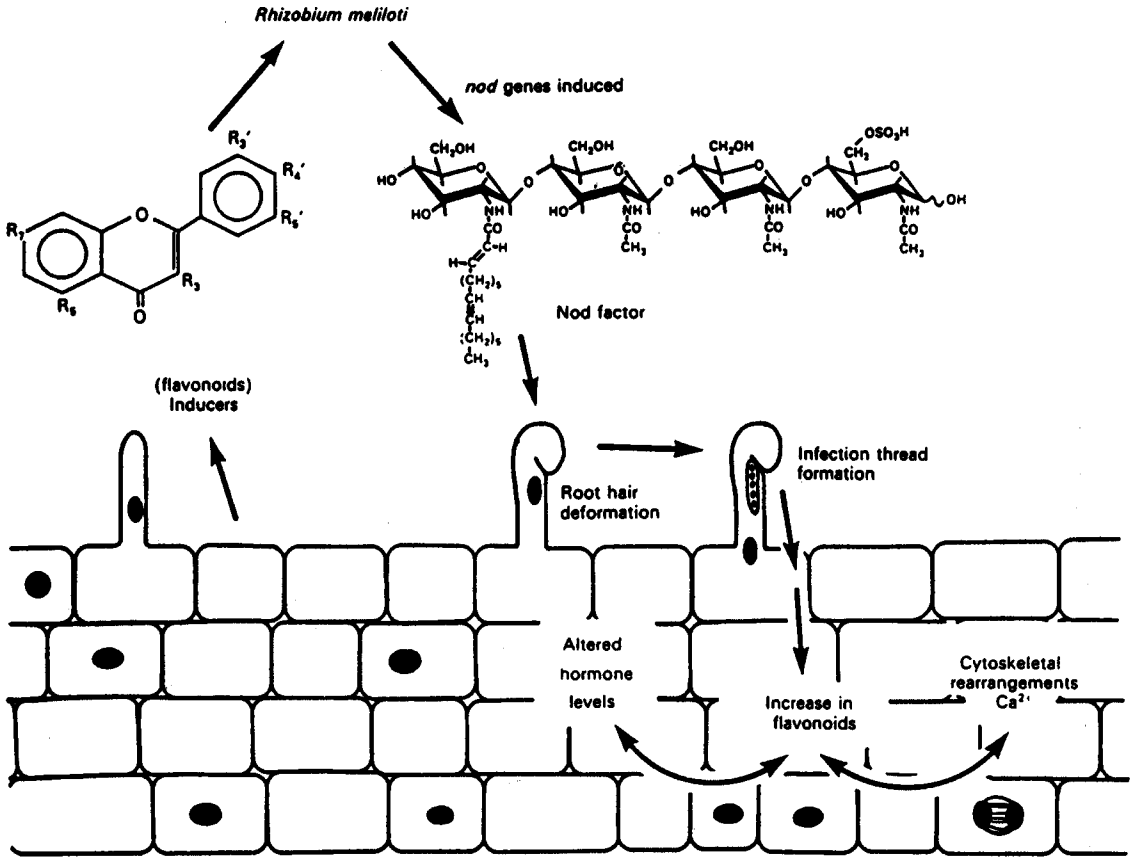


Fig. 5. Legume roots secrete flavonoids that induce rhizobial nod genes. Nod factors are produced and these elicet root hair curling.
Source: *Hirsch (1992).*

ของเอนไซม์ด้วย ไนโตรจีเนสโดยทั่วไปประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็น iron protein (Fe protein) และ molyldenum-iron (MoFe protein) โดยที่ทั้งสองส่วนนี้จะช่วยกันสร้างกระบวนการที่เรียกว่า ATP dependent reduction ทำให้ก๊าซไนโตรเจนเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนีย ปฏิกิริยาโดยรวมสามารถสรุปได้คือ ขั้นแรกจะเกิดกระบวนการ reduction ของส่วนที่เป็น Fe protein จากนั้นจึงมีการเคลื่อนย้ายของอิเลคตรอนผ่าน ATP ไปยัง MoFe protein และ MoATP แล้วอิเล็กตรอนกับโปรตรอนที่เกิดขึ้นจึงถูกส่งไปอีกครั้งที่โมเลกุลของก๊าซไนโตรเจนซึ่งมักจะเกาะอยู่ที่ FeMo cofactor ของ MoFe protein นั่นเอง กลุ่มของ nif genes ประกอบด้วย *nif H, nif D, nif K, nif E, nif N, nif B, nif S, nif W, nif X* และ *nif A* โดยบทบาทของแต่ละยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ดังสรุปในตารางที่ 1

ส่วนที่เป็น *nif D* และ *nif K* จะเป็นส่วนสำคัญต่อโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยเฉพาะส่วนที่เป็น a_2 b_2 FeMo protein หรือที่เรียกว่า component I ส่วน nif H นั้นจะเป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง Fe protein หรือที่เรียกว่า component II ในการสังเคราะห์ FeMo cofactor ของส่วนที่เป็น component I นั้น กลุ่มของ nif gene ที่เกี่ยวข้องคือ *nif E, nif N,* และ *nif B* ส่วนยีน nif A นั้นจะมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการทำงานของ component I และ II และยีน *nif W* นั้นมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการทำงานของ MoFe protein รวมไปถึงการควบคุมประสิทธิภาพการทำงานโดยรวมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอีกด้วย

Table 1. Nif genes and their known or proposed function.

Gene	Product and/or (proposed) function
nif H	Fe protein of nitrogenase
nif D	a subunit of MoFe protein of nitrogenase
nif K	*b* subunit of MoFe protein of nitrogenase
nif E	involved in FeMo cofactor biosynthesis
nif N	involved in FeMo cofactor biosynthesis
nif B	involved in FeMo cofactor biosynthesis
nif S	cysteine desulfurase; activation of sulfer for metallocluster synthesis
nif W	unknown function; required for activity of FeMo protein
nif X	unknown function
nif A	positive regulator of nif, fix and additional genes

Source: *Fischer et al., (1994).*

บทบาทและหน้าที่ของกลุ่ม nif gene โดยรวมก็คือมีหน้าที่เกี่ยวกับการรวมตัวของหน่วยย่อยของเอนไซม์ การก่อให้เกิดความสมบูรณ์ของโครงสร้างเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์ในการทำงานอีกด้วย

3. กลุ่ม fix gene

3.1 ยีน fix ABCX กลุ่มของ fix gene พบครั้งแรกในเชื้อ *R. meleloti* ที่จัดเรียงตัวอยู่ในรูป single operon ยกเว้นใน *R. japonicum* ซึ่งจะมียีน fix A แยกออกจากยีน fix BCX ความสำคัญของกลุ่ม fix genes นี้จะสัมพันธ์กับกระบวนการขนถ่ายอิเล็กตรอน ไปยังเอนไซม์ไนโตรจีเนส หรือกระบวนการ redox นั่นเอง

3.2 ยีน fix NOQP มีความสำคัญต่อภาวะแบบพึ่งพา โดยเฉพาะในส่วนบทบาทของเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการหายใจในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำในปมรากถั่ว

3.3 ยีน fix GHIS มีความสำคัญต่อกระบวนการ redox และสัมพันธ์กับเอนไซม์ เอทีพีเอส (ATPase) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการจัดสรรพลังงานให้แก่เซลล์เพื่อการดำรงชีวิต

3.4 ยีน fix R นักวิทยาศาสตร์คาดว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการ oxidation-reduction แต่รายละเอียดหรือหลักฐานในการสนับสนุนยังไม่ชัดเจน

ทั้งหมดนี้เป็นเพียงการสรุปปรากฏการณ์เชิงพันธุกรรมระดับโมเลกุล ในขั้นแรกของการเข้าอยู่ร่วมอาศัยแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ระหว่างแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่ว ซึ่งถูกค้นพบเมื่อไม่ถึง 5 ปีมานี้เอง แม้ว่าเราจะรู้จักปมรากถั่วหรือปุ๋ยชีวภาพมากว่า 100 ปีแล้ว ซึ่งแสดงให้เห็นถึงกลไกของยีนที่เกี่ยวข้องว่ามีการถูกควบคุม การแสดงออก สัมพันธ์กับการตรึงไนโตรเจนอย่างไร แต่ปรากฏการณ์อีกหลายประเด็นซึ่งยังเป็นสิ่งลี้ลับอยู่นั้นยังคงเป็นความลับอยู่ต่อไป ปัจจุบันความรู้และความก้าวหน้าของเทคนิคทางชีววิทยาอณู และพันธุวิศวกรรม ยังคงเป็นเครื่องมือที่ดี ที่จะสร้างกุญแจเพื่อเปิดประตูแห่งความลี้ลับทั้งหลายของธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ระหว่างไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่วก็ตกอยู่ในข่ายนี้เช่นเดียวกัน

บรรณานุกรม

Fischer, H-H. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. 58:352-386.

Hirsch, M.A. (1992). Development biology of legume nodulation. New Phytol. 122: 211-237.

Palacios, R., Mora, J., and Newton, E.W. (1992). New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers. pp. 24-27.

Relic, B., and others. (1994). Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. Mol. Microbiol. 31: 171-178.