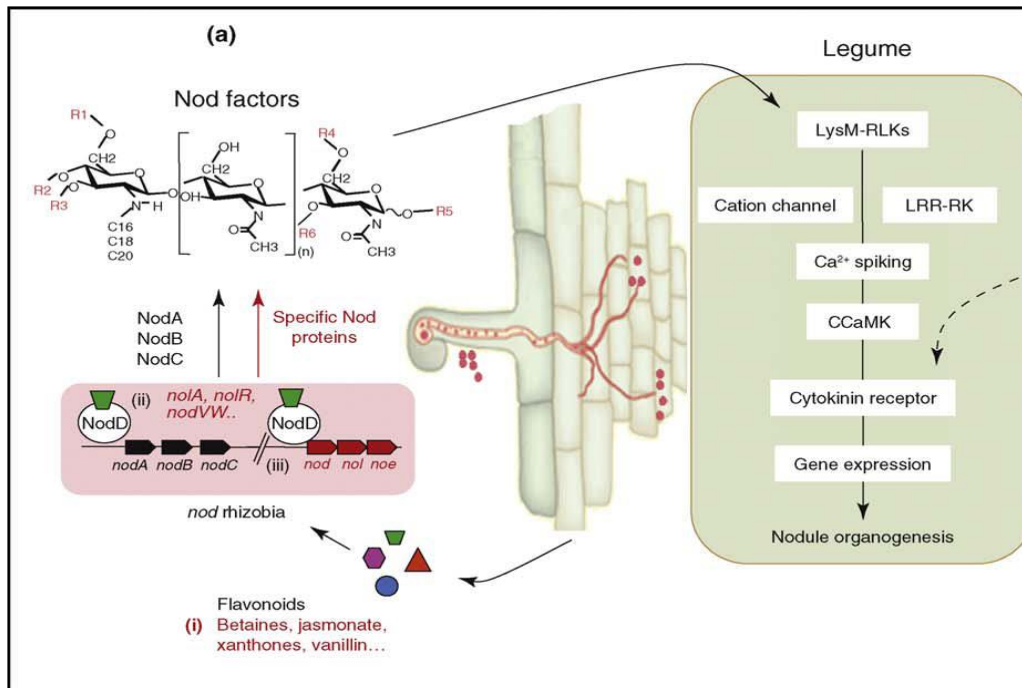


ปฏิกิริยาชีวภาพไรโซเบียม

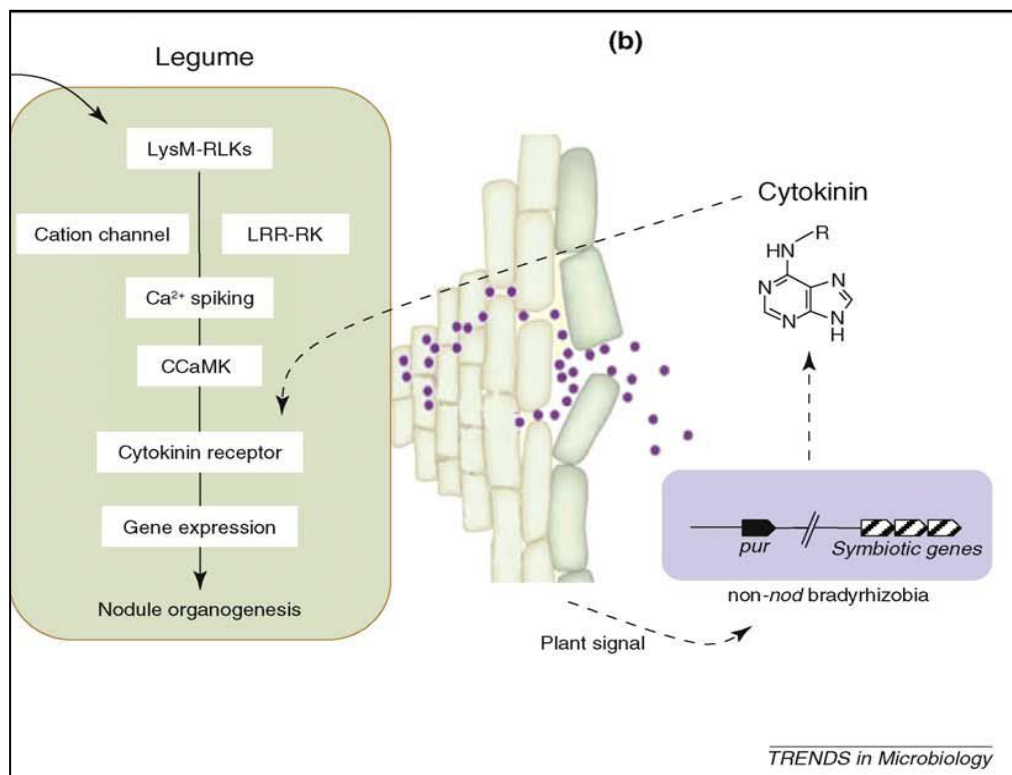
ปฏิกิริยาชีวภาพในกลุ่มนี้มีเชื้อแบคทีเรียในสกุลไรโซเบียม เป็นจุลินทรีย์สำคัญในการออกฤทธิ์ตรึงไนโตรเจนให้กับพืช โดยเชื้อจุลินทรีย์ในสกุลนี้จะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเป็นปุ๋ยให้แก่พืช โดยอาศัยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) เป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจนเมื่อเชื้อไรโซเบียมเข้าไปอยู่ในปมรากแก้ว หรืออาศัยร่วมกับพืชแล้ว (symbiosis) ทั้งนี้เชื้อไรโซเบียมมีหลายชนิด เช่น *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Azorhizobium* sp. เป็นต้น ซึ่งเชื้อไรโซเบียมแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเข้าสร้างปมจำเพาะเจาะจงกับพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดแตกต่างกัน รวมทั้งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกันอีกด้วย เชื้อไรโซเบียมที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันในรูปของปุ๋ยชีวภาพ เช่น *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 ใช้สำหรับถั่วเหลือง หรือ *Bradyrhizobium* sp. TAL173 ใช้สำหรับถั่วลิสง เป็นต้น ดังนั้นข้อจำกัดของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม คือ ต้องใช้ร่วมกับพืชตระกูลถั่วเท่านั้น และจะต้องเป็นชนิดที่มีความจำเพาะกับถั่วชนิดนั้น ๆ แต่ทั้งนี้พบว่ารูปแบบการตรึงไนโตรเจนของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่วสามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชได้มีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนจากอากาศที่อยู่อย่างอิสระ (free living) โดยจากการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไรโซเบียมกับโสนโรสตราต้า (*Sesbania rostrata*) พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุดถึง 190 กิโลกรัม/ไร่/ปี ในขณะที่การใช้ไรโซเบียมกับถั่วเขียว (เช่น ถั่วเหลือง (*Glycine max*), ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*), และถั่วเขียว (*Vigna radiata*)) สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 10-28, 12-21, และ 10-57 กิโลกรัม/ไร่/ปี ตามลำดับ ดังนั้นในทางอ้อมจะเห็นได้ว่าเป็นการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการปลูกโสนเพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของปุ๋ยพืชสดสำหรับช่วยอนุรักษ์ธาตุอาหารในดิน โดยเมื่อพืชตระกูลถั่วถูกไถกลบ จะสลายตัวและปล่อยธาตุอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจนในชั้นดิน และเป็นประโยชน์แก่พืชเศรษฐกิจอื่น ๆ ต่อไป

กระบวนการเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม กับพืชตระกูลถั่ว

ในปัจจุบันพบว่าเชื้อไรโซเบียมมีกลไกในการเข้าสร้างปมได้น้อย 2 แบบ คือ การเข้าสร้างปมโดยอาศัยการสร้าง nod factor จากเชื้อไรโซเบียม (รูปที่ 9.1) เพื่อกระตุ้นให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อยอมรับเซลล์ของแบคทีเรียให้เข้าไปสร้างปมกับพืชได้ และอีกแบบหนึ่งคือ การเข้าสร้างปมกับพืชโดยไม่อาศัย nod factor (รูปที่ 9.2) โดยเชื้อไรโซเบียมอาจเข้าสู่รากพืชได้ตามรอยแตก (crack) ของเซลล์พืช จากนั้นเชื้อไรโซเบียมจึงมีกลไกอื่นในการควบคุมให้พืชสร้างปมต่อไป ทั้งนี้สมมติฐานว่า เชื้อไรโซเบียมเหล่านี้สามารถสร้างฮอร์โมนไซโตไคนิน (cytokinin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง จากนั้นฮอร์โมนที่เชื้อสร้างขึ้นจะเข้าไปสู่พืชที่มี cytokinin receptor เพื่อส่งสัญญาณให้ยีนอื่น ๆ ในพืชที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโครงสร้างของปมมีการแสดงออก เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในปมถั่วได้เหมือนกับการใช้กลไกการสร้าง nod factor แต่อย่างไรก็ดีกลไกการสร้างปมในลักษณะนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด ดังนั้นจะกล่าวถึงในกลไกการใช้ nod factor ในการเข้าสร้างปม ซึ่งมีการศึกษาโดยละเอียดมากกว่า ทั้งนี้ขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้



รูปที่ 1 การเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วโดยอาศัยกลไกการสร้าง nod factor
ที่มา: ประยุกต์จาก Masson-Boivin และคณะ, 2009



รูปที่ 2 การเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วโดยไม่อาศัยกลไกการสร้าง nod factor
ที่มา: ประยุกต์จาก Masson-Boivin และคณะ, 2009

การเข้าเกาะของไรโซเบียมที่บริเวณรากขนอ่อนของพืชตระกูลถั่ว (Attachment of rhizobia to root hair)

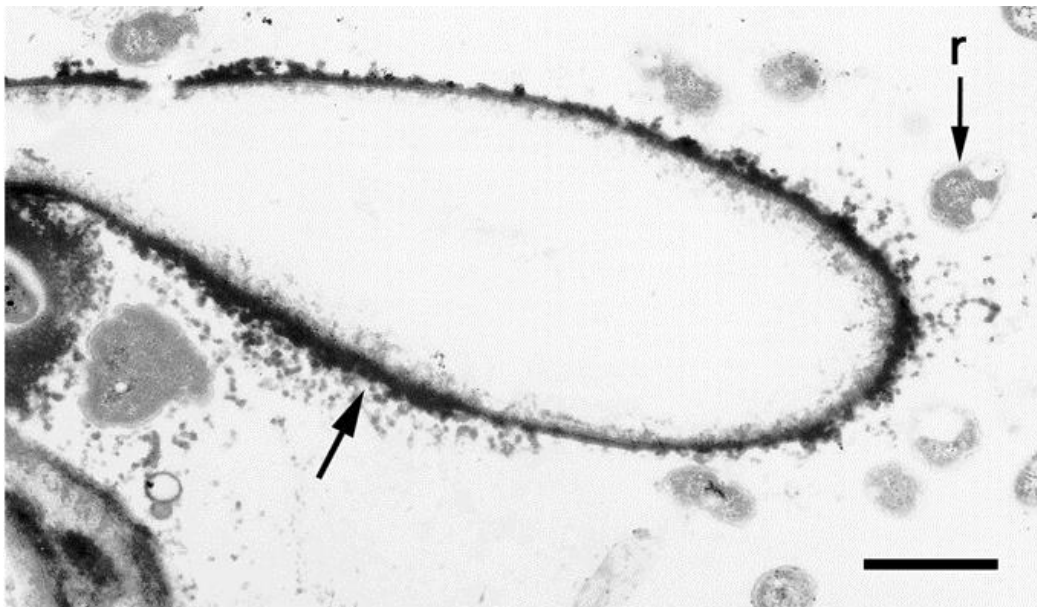
ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นหลังจากที่เซลล์ของไรโซเบียมเคลื่อนที่เข้ามาใกล้บริเวณราก โดยแบ่งการเข้าเกาะของเชื้อไรโซเบียมได้เป็น 2 ขั้นตอนย่อย คือ

การเข้าเกาะที่บริเวณปลายรากขนอ่อนแบบหลวม (weak adhesion)

เป็นขั้นตอนที่เกิดแบบสุ่ม ยังไม่มีความจำเพาะเจาะจง โดยเชื้อไรโซเบียมสร้างสารในกลุ่ม Ca^{2+} -dependent binding protein เช่น rhicadhesin ซึ่งมักพบในเชื้อไรโซเบียมทั่วไป หรือสารที่มีความจำเพาะขึ้นมาในกลุ่มของ *Rhizobium leguminosarum* และ *R. etli* เช่น โปรตีน RapA1 สารเหล่านี้ทำให้เชื้อไรโซเบียมเข้ายึดเกาะกับรากขนอ่อนของพืชตระกูลถั่วได้ แต่เป็นการยึดเกาะแบบหลวม

การเข้ายึดเกาะที่บริเวณปลายรากขนอ่อนแบบแน่น (tight adhesion)

ขั้นตอนนี้ไรโซเบียมเริ่มเกาะกลุ่มรวมตัวกันมากขึ้น และสร้างส่วนที่เป็น cellulose fibril ทำให้เซลล์ไรโซเบียมยึดติดกับผิวของรากแน่นขึ้น ทั้งนี้พบว่า cellulose fibril ที่ไรโซเบียมสร้างขึ้นเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อไรโซเบียมสามารถแข่งขันกับเชื้ออื่น ๆ (competition) ในการเข้ายึดเกาะกับรากพืชได้ นอกจากนี้ในช่วงนี้พืชปล่อยสารกลุ่ม lectin มาสะสมอยู่ที่บริเวณปลายรากขนอ่อน (root hair tip) ทั้งนี้ lectin เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะเจาะจงในพืชแต่ละชนิด โดยเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติของปลายด้านหนึ่งที่เกาะกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็น mono- หรือ oligosaccharide ทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวดอกรับกับส่วนที่เป็น exopolysaccharide ของแบคทีเรียที่จำเพาะกับ lectin ชนิดนั้น ๆ ดังนั้นจึงเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่เหมาะสมในขั้นตอนการเข้าสร้างปมต่อไป ทั้งนี้รูปที่ 9.3 แสดงถึงการเข้ายึดเกาะของเชื้อไรโซเบียมบริเวณรากขนอ่อนของถั่วอัลฟัลฟา (alfalfa)



รูปที่ 3 รูปถ่ายจากกล้อง TEM แสดงถึงรากขนอ่อนของถั่วอัลฟัลฟา ที่มีโครงสร้างของ lectin อยู่บริเวณรากขนอ่อน และมีเชื้อไรโซเบียม (r) เข้ามาเกาะ

ที่มา: van Rhijn และคณะ, 2001

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างรากพืชและเชื้อไรโซเบียมขณะเข้าสู่เซลล์ราก

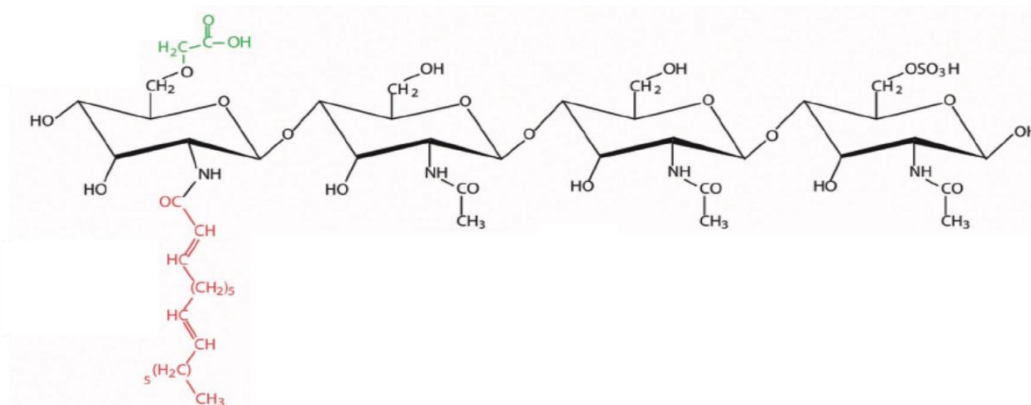
ในขั้นตอนนี้จำเป็นต้องอาศัยกลไกของทั้งจากพืช และเชื้อไรโซเบียมร่วมกันในการเข้าสู่รากพืช ทั้งนี้สามารถอธิบายในแต่ละส่วน ดังนี้

การปลดปล่อยสารที่จำเพาะต่อเชื้อไรโซเบียมออกจากรากพืช

พืชตระกูลถั่วมีการปลดปล่อยสารกลุ่ม flavonoids ออกจากรากพืช โดยมีบทบาทในการชักนำให้ไรโซเบียมเข้าใกล้รากพืช โดยเชื้อไรโซเบียมที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดจะสามารถตอบสนองต่อสารกลุ่ม flavonoids ที่พืชปล่อยออกมาได้แตกต่างกัน ตัวอย่างของสารกลุ่ม flavonoids ที่ปลดปล่อยจากพืชตระกูลถั่ว และเกี่ยวข้องกับการสร้าง Nod-factor เช่น Luteolin ในถั่วอัลฟัลฟา, Delphinidin, Kaempferol, Malvidin, Myricetin, Petunidin, Quercetin ในถั่วแขก, Apigenin, Eriodictyol ในถั่วลิ้นเตา, หรือ Daidzein, Genistein ในถั่วเหลือง เป็นต้น แต่อย่างไรก็ดีพบสารที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่ม flavonoids สามารถกระตุ้นการสร้าง nod factor ในไรโซเบียมได้เช่นกัน เช่น Stachydrine, Trigonellin ซึ่งพบในถั่วอัลฟัลฟา

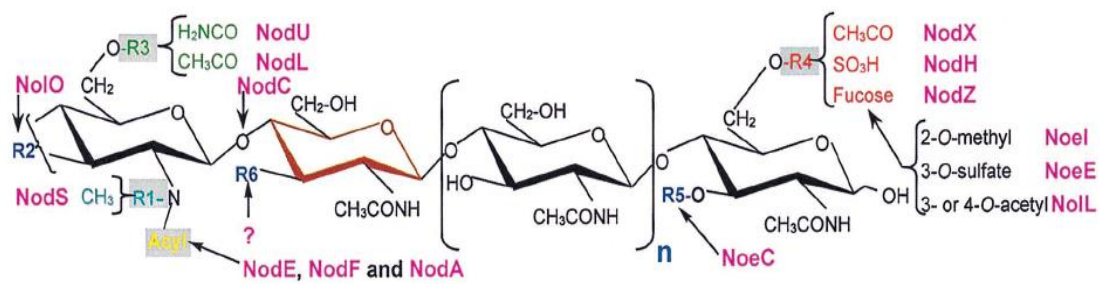
การตอบสนองของเชื้อไรโซเบียมต่อสารที่พืชปล่อยออกมา

สารกลุ่ม flavonoid ที่พืชปล่อยออกมาสามารถกระตุ้นให้ไรโซเบียมเริ่มผลิตสารกลุ่มที่เรียกว่า nod-factor ซึ่งมีโครงสร้างเป็น Lipo-chitooligosaccharide (LCOs) คือ มีหน่วยย่อยเป็น acetylglucosamine ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β -1-4 (nod factor core) และมีองค์ประกอบอื่น ๆ มาประกอบเพิ่มเติม (decoration to nod factor core) เช่น การเติม fatty acid, arabinose, fucose เป็นต้น (รูปที่ 9.4) ทั้งนี้เชื้อไรโซเบียมแต่ละชนิดมีจำนวนของหน่วยย่อย acetylglucosamine ที่มีความยาวแตกต่างกัน รวมทั้งมีส่วนที่เป็น decoration to nod factor core ที่แตกต่างกันไปด้วยขึ้นอยู่กับเชื้อไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ โดยยีนที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ nod factor ในไรโซเบียม คือ ยีนในกลุ่ม *nod*, *nol* และ *noe* เช่น เอนไซม์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากยีน *nodB*, *nodC* ทำหน้าที่ในการต่อสายของ nod factor core ให้ยาวขึ้น ในขณะที่โปรตีนที่ได้จากการทำงานของยีน *nodA*, *nodE*, *nodF* ทำหน้าที่ในการเติมสาย fatty acid ให้กับ nod factor core หรือโปรตีนที่ได้จากยีน *noeC* จะทำหน้าที่ในการเติมน้ำตาล arabinose และโปรตีนที่ได้จากยีน *nodZ*, *nolK* ทำหน้าที่ในการเติมน้ำตาล fucose เป็นต้น (รูปที่ 9.5)



รูปที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างของ nod factor ที่ประกอบไปด้วยโครงสร้างหลักที่เป็น acetylglucosamine ต่อกันเป็นสายยาวหรือ nod factor core และส่วนที่เป็นองค์ประกอบตกแต่ง (decoration to nod factor core)

ที่มา: ประยุกต์จาก Gage, 2004



Strains	Acyl	R1	R2	R3	R4	R5	R6	n
<i>A. caulinodans</i> ORS571	C _{18:1} , C _{16:0}	Me	OH	Cb, H	Fuc, H	Ara, H	OH	1, 2
<i>B. elkanii</i> USDA61	C _{18:1}	Me, H	Cb, H	Ac, H	MeFuc	H	OH	1, 2
<i>B. japonicum</i> USDA110	C _{16:0} , C _{16:1} , C _{18:1}	H	OH	H	MeFuc	H	OH	2
<i>Rhizobium</i> sp. strain GRH2	C _{16:0} , C _{18:0} , C _{18:1} , C _{20:1}	Me, H	OH	H	S, H	H	OH	1, 2, 3
<i>Rhizobium</i> sp. strain ORS1645	C _{18:0} , C _{18:1}	Me	Cb ^c	Cb ^c	S, H	H	OH	2
<i>Rhizobium</i> sp. strain NGR234	C _{16:1} , C _{18:0} , C _{18:1}	Me	Cb, OH	Cb, H	MeFuc, AcMeFuc, SMeFuc	H	OH	2
<i>R. etli</i> CFN42	C _{18:1}	Me	Cb, OH	H	AcFuc	H	OH	2
<i>R. etli</i> CE3	C _{18:0} , C _{18:1}	Me	Cb, OH	H	AcFuc	H	OH	2
<i>R. fredii</i> USDA191 ^b	C _{18:1} , C _{18:0} , C _{16:1}	H	H	H	Fuc, MeFuc	H	H	0, 1, 2
<i>R. fredii</i> USDA257	C _{18:1}	H	OH	H	Fuc, MeFuc	H	OH	0, 1, 2
<i>R. galegae</i>	C _{18:1} , C _{18:2} , C _{18:3} , C _{20:2} , C _{20:3}	H	OH	Cb	H	H	Ac	1
<i>R. huakuii</i> ^d	C _{18:4}	H	OH	H	S	H	OH	2
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843	C _{16:0} , C _{16:1} , C _{18:0} , C _{18:1} , C _{18:2} , C _{20:3}	H	OH	H, Ac	H	H	OH	0, 1, 2
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii LPR5045	C _{18:0} , C _{18:1} , C _{20:3} , C _{20:4}	H	OH	Ac	H	H	OH	2
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae RBL5560	C _{18:1} , C _{18:4}	H	OH	Ac	H	H	OH	1, 2
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae TOM	C _{18:1} , C _{18:4}	H	OH	Ac	Ac	H	OH	1, 2
<i>R. loti</i> NZP2213	C _{16:0} , C _{16:1} , C _{18:0} , C _{18:1} , C _{20:0} , C _{20:1} , C _{22:1}	H	Cb	H	Fuc, AcFuc	H	Fuc	-1, 0, 1, 2
<i>R. loti</i> NZP2037	C _{18:0} , C _{18:1}	Me	Cb	Cb	AcFuc	H	OH	2
<i>R. meliloti</i> RCR2011	C _{16:1} , C _{16:2} , C _{16:3}	H	OH	H, Ac	S	H	OH	1, 2
<i>R. tropici</i> CFN299	C _{18:1}	Me	OH	H	S, H	H	OH	2
<i>S. saheli</i> ORS611	C _{16:0} , C _{18:1}	Me	Cb ^c	Cb ^c	Fuc, H	Ara, H	OH	2
<i>S. teranga</i> bv. acaciae ORS1602	C _{16:0} , C _{18:0} , C _{18:1}	Me	Cb ^c	Cb ^c	S, H	H	OH	2

รูปที่ 5 องค์ประกอบของ nod factor จากเชื้อไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ และยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ nod factor ตัวอักษรย่อ Ac, acetyl; Ara, arabinosyl; Cb, carbamoyl; Fuc, fucosyl; H, hydrogen; Me, methyl; S, sulfate; MeFuc, methylfucose; AcMeFuc, acetylated methylfucose; SMeFuc, sulfated methylfucose.

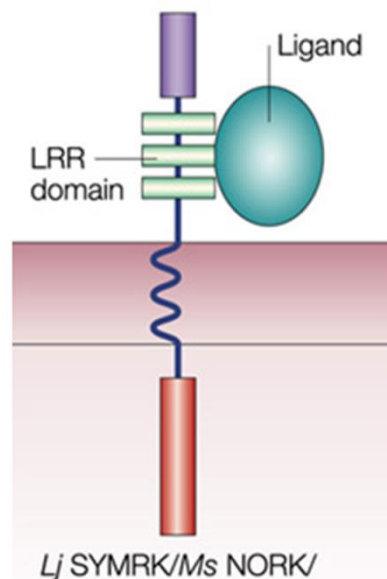
ที่มา: ประยุกต์จาก Perret และคณะ, 2000

อย่างไรก็ดียังมียีนที่สำคัญในการสร้าง nod factor อีก คือ *nodD* สังเคราะห์โปรตีน NodD ซึ่งเป็น DNA-binding protein ที่อยู่ใน family ของโปรตีน LysR ทำหน้าที่เป็น transcriptional regulator ซึ่งใช้ในการควบคุมการ transcription ของยีน *nod* อื่น ๆ โดยการแสดงออกนี้ต้องอาศัยสัญญาณที่จำเพาะเจาะจงจากพืช เช่น กลุ่มของสาร flavonoids เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องการยีน *nodI* และ *nodJ* ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อส่ง nod factor ที่ผลิตแล้วออกไปสู่ภายนอกเซลล์เพื่อกระตุ้นให้พืชมีการตอบสนองต่อไป

การตอบสนองของพืชต่อ nod factor ที่ไรโซเบียมผลิตออกมา

การตอบสนองในพืชจำเป็นต้องอาศัยโปรตีนที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นประตูเข้าบ้าน ทำหน้าที่รับ สัญญาณ หรือตอบรับ nod factor ที่เปรียบเสมือนได้กับลูกกุญแจ โดยมีการศึกษากันมากในพืชตระกูลถั่ว 4 กลุ่ม ได้แก่ *Lotus japonicus*, *Pisum sativum*, *Medicago truncatula* และ *M. sativa* โดยกลุ่มโปรตีน หรือยีนที่ทำหน้าที่รับ สัญญาณจาก nod factor โดยมักใช้ชื่อเรียกยีนจากอักษรย่อตัวแรกของชื่อจีนัสของพืชตระกูลถั่ว ตามด้วยอักษรย่อตัว แรกจากชื่อสปีชีส์ เช่น โปรตีน Lj จาก *L. japonicus*, Ps จาก *P. sativum*, Mt จาก *M. truncatula* และ Ms จาก *M. sativa*

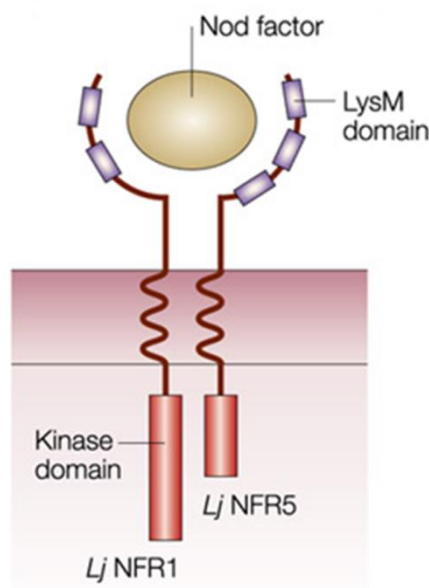
โปรตีนในกลุ่มนี้ได้แก่ Nod factor binding site เช่น ใน *M. truncatula* จะมี NFSB1 ซึ่งพบว่ามี ความจำเพาะเจาะจงกับ nod factor ในระดับต่ำ (พบโปรตีนชนิดนี้ในรากของมะเขือเทศเช่นกัน) ในขณะที่ใน *M. varia* จะมี NFSB2 ซึ่งมีความสามารถในการจับกับ nod factor ได้แน่นกว่าจากพันธะ covalent linkage นอกจากนี้ยังพบ โปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งคือ LRR (Leucine rich receptor kinase) มีลักษณะเป็นสายเพพไทด์ (peptide) เดี่ยว มีกรดอะมิโน Leucine ซ้ำ ๆ กันอยู่ประมาณ 22-28 หน่วย จึงเรียก Leucine-rich-repeat (LRR) โดยมีส่วนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ kinase อยู่ใน plasma membrane (รูปที่ 9.6) โดยโปรตีนกลุ่ม LRR นี้จะจดจำ ligand ต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของ เซลล์แบคทีเรียที่จำเพาะกับ receptor นี้ โดยโปรตีนกลุ่มนี้ถูกพบใน *Lotus japonicas* และเรียกโปรตีนกลุ่มนี้ว่า SYMRK (symbiotic receptor like kinase) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่มีหน้าที่คล้ายกันนี้ใน *M. sativa* ที่เรียกว่า NORK (nodulation receptor kinase) ดังนั้น โปรตีน receptor ในส่วนนี้จึงจดจำองค์ประกอบที่อยู่บนผิวเซลล์แบคทีเรียร่วมด้วย



รูปที่ 6 Leucine rich receptor kinase (LRR) บนพืชตระกูลถั่ว

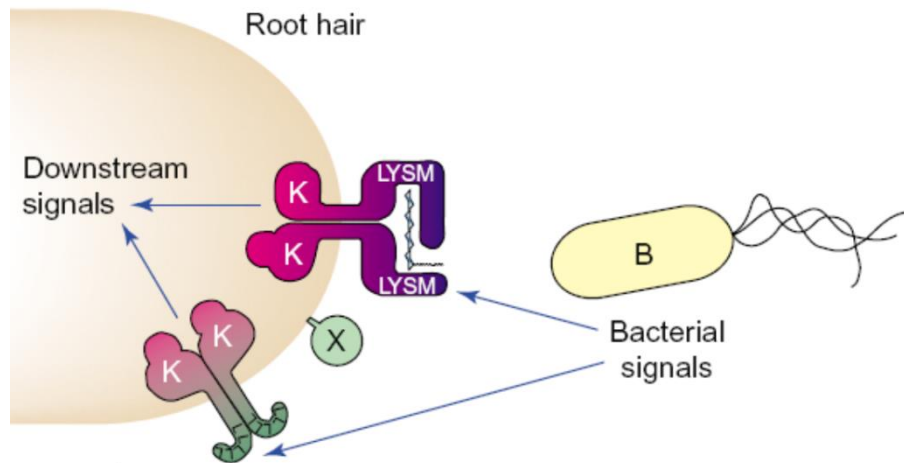
ที่มา: ประยุกต์จาก Oldroyd และ Downie, 2004

ในขณะที่ยังมีโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งบนผิวของพืชตระกูลถั่วที่ทำหน้าที่ในการจดจำ nod factor โดยตรง ได้แก่ LjNFR1 และ LjNFR5 (NFR: nod factor response) ใน *L. japonicas* หรือใน *P. sativum* ได้แก่ PsSYM10 (SYM: symbiotic) และใน *M. truncatula* ได้แก่ MtNFP (NFP: nod factor perception) ลักษณะที่สำคัญของโปรตีนกลุ่มนี้ คือ ทำหน้าที่เป็น receptor ของ nod factor โดยมีส่วนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ kinase อยู่ในชั้นของพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเซลล์รากถั่วเช่นเดียวกับโปรตีน LRR โดยโปรตีนในกลุ่มนี้ยังมีส่วนที่เป็นตัวรับสัญญาณจาก nod factor (Nod-factor receptor) มีลักษณะเป็น heterodimer ที่มีกรดอะมิโน Lysine M (LysM) ยาวประมาณ 40 หน่วย เป็น motif domain (2-3 domains) บางครั้งจึงเรียกโครงสร้างส่วนนี้ว่า LysM-RK (LysM-receptor Kinase) (รูปที่ 7) พบว่าเป็นบริเวณที่สำคัญ ที่สามารถจับกับโมเลกุลที่เป็น peptidoglycan โดยเฉพาะโมเลกุลหลักที่เป็น N-acetyl-glucosamine-N-acetylmureine และยังพบว่าสามารถจับกับโมเลกุลของไคติน (chitin) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกับโครงสร้างหลักของ nod factor ได้เช่นกัน จากนั้น kinase domain ที่อยู่บน LjNFR1 จะทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณไปที่อื่น ๆ ในพืชโดยปฏิกิริยา phosphorylation ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า พืชตระกูลถั่วมี receptor ที่สามารถจับได้กับทั้ง nod factor และจับได้กับองค์ประกอบอื่น ๆ ที่เป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์แต่ละชนิด ดังนั้น receptor เหล่านี้จึงเปรียบเสมือนประตูบ้านบานแรกที่มีความจำเพาะเจาะจงกับทั้งเชื้อ และ nod factor ที่สร้างขึ้นมาเพื่อเป็นการยืนยันให้เฉพาะเชื้อไรโซเบียมที่จำเพาะเข้าไปในเซลล์ของพืชเท่านั้น (รูปที่ 9.8)



รูปที่ 7 LysM receptor kinase ที่มีบทบาทต่อการรับสัญญาณจาก nod factor

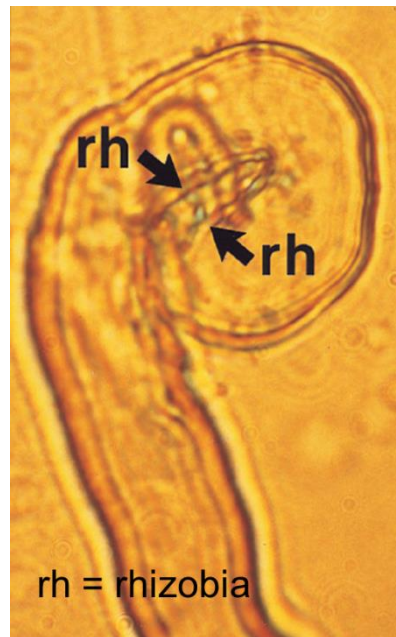
ที่มา: ประยุกต์จาก Oldroyd และ Downie, 2004



รูปที่ 8 ภาพแสดง receptor บนรากของพืชตระกูลถั่วที่จะตอบรับกับเซลล์ไรโซเบียม และ nod factor

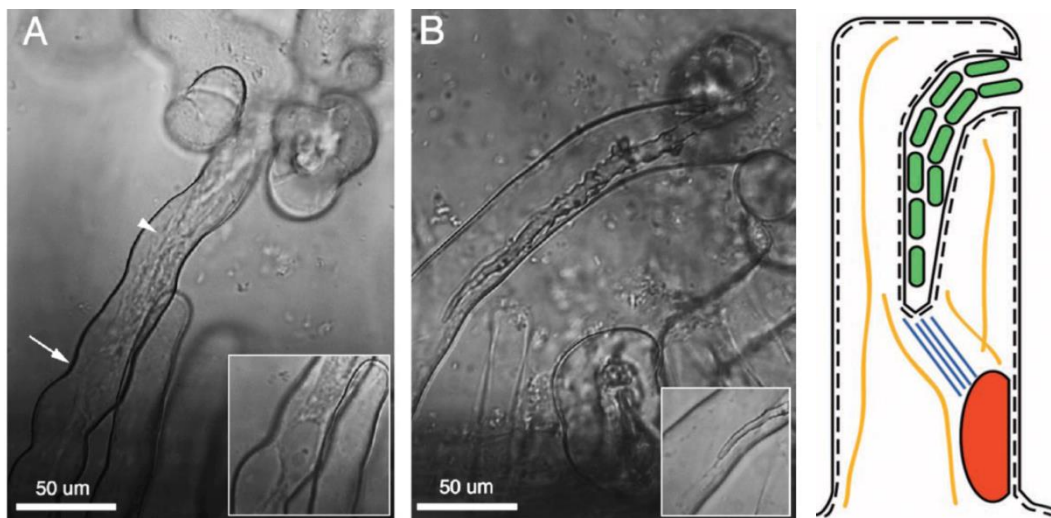
ที่มา: ประยุกต์จาก Spaink, 2004

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์พืชที่ตอบสนองต่อ nod factor เช่น การกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงระดับ Ca^{2+} (Calcium spiking) ในเซลล์รากขนอ่อน การเปลี่ยนแปลงระดับของ Ca^{2+} เกิดจากการทำงานของโปรตีน CCaMK (Calcium and Calmodulin dependent protein kinase) โดยโปรตีน CCaMK สามารถจับเกาะกับ Ca^{2+} ได้ทั้ง Ca^{2+} ที่อยู่ในรูปไอออนอิสระ และ Ca^{2+} ที่อยู่ในรูปที่ซับซ้อน โดยการเข้าจับเกาะของ Ca^{2+} นี้เองก่อให้เกิดปฏิกิริยา phosphorylation และการเกิด phosphorylation นี้เองจะเป็นสัญญาณที่ส่งต่อไปยังยีนสำคัญอื่นๆ ของถั่วที่เกี่ยวข้องกับการเริ่มต้นสร้างปมต่อไป เช่น การเปลี่ยนแปลงลักษณะของ cytoskeletal ทำให้รากเกิดการโค้งงอ (root hair curling) (รูปที่ 9.9) และการสร้าง infection thread หรือท่อที่มีขนาดเล็กที่จะนำเชื้อไรโซเบียมเข้าสู่เซลล์พืช โดยการเปลี่ยนแปลงลักษณะของ cytoskeleton นี้เกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ของ actin filament ในเซลล์พืช ซึ่งพบว่าจะเกิดขึ้นภายใน 5 นาที หลังจากได้รับสัญญาณจาก nod factor โดย actin filament เหล่านี้จะรวมตัวกันเกิดเป็น microtubule ซึ่งจัดเรียงตัวอยู่ในลักษณะที่เป็นท่อ โดยมีเส้นใยบาง ๆ เชื่อมต่อกันกับนิวเคลียสของพืช เพื่อนำให้ท่อ infection thread นี้เข้าสู่รากในชั้น cortex ต่อไป (รูปที่ 9.10 และ 9.11) โดยการเคลื่อนตัวของเซลล์ไรโซเบียมอาจเป็นการเคลื่อนตัวที่เซลล์ไรโซเบียมถูกบีบไหล ให้เลื่อนลงไปตามท่อ infection thread โดยแรงยึดระหว่างเซลล์ไรโซเบียมและท่อใน infection thread เอง เมื่อเซลล์ของไรโซเบียมหลุดออกจาก infection thread แล้ว เซลล์ของไรโซเบียมจะถูกห่อหุ้มด้วยส่วนที่เป็น plasma membrane ของพืชอีก 1 ชั้น ผืนที่ห่อหุ้มเซลล์ไรโซเบียมนี้เรียกว่า peribacteroid membrane จากนั้นเซลล์ของไรโซเบียมจึงเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากลักษณะของเซลล์ที่เป็นท่อนสั้นๆ ไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายตัว Y (Y-shape) เซลล์ในขั้นตอนนี้เรียก bacteroid ในขณะที่เดียวกันเซลล์ของรากถั่วจะเพิ่มขนาดขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อพัฒนาไปเป็นปมในที่สุด ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจของนักวิทยาศาสตร์ที่พยายามเข้าใจกลไกการเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม และกลไกของพืชตระกูลถั่วในการอนุญาตให้เชื้อไรโซเบียมเข้าไปสร้างปมราก ทั้งนี้เพื่อพัฒนาให้พืชอื่น ๆ สามารถมีกลไกการตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชตระกูลถั่วและเชื้อไรโซเบียม



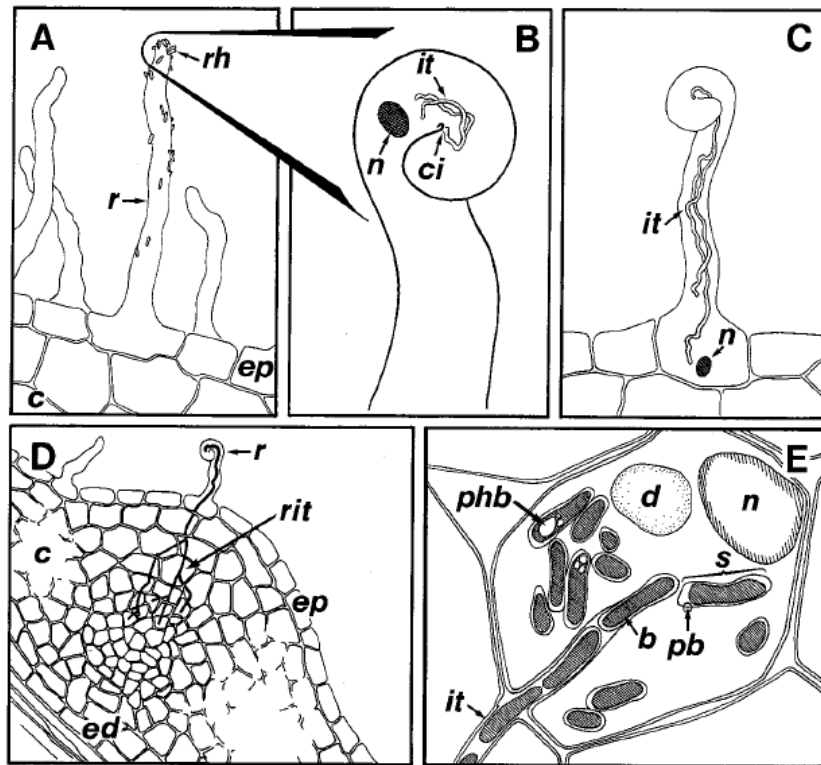
รูปที่ 9 การโค้งงอของรากขนอ่อนของพืชตระกูลถั่วที่เกิดจากการตอบสนองต่อ nod factor

ที่มา: ประยุกต์จาก Perret และคณะ, 2000



รูปที่ 10 การเกิด infection thread ภายในรากขนอ่อนโดยมีเส้นใยเชื่อมต่อระหว่างปลายของ infection thread กับ นิวเคลียสของพืช เพื่อนำให้เซลล์ของไรโซเบียมผ่านเข้ามาทางปลายรากขนอ่อน

ที่มา: ประยุกต์จาก Gage, 2004



รูปที่ 11 ภาพกระบวนการเข้าสู่รากของเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว; (A) เซลล์ของไรโซเบียมเริ่มจับเกาะที่ปลายราก; (B) nod-factor ทำให้ปลายรากเริ่มโค้งงอ (curling); (C) การสร้าง infection thread ในรากขนอ่อน; (D) infection thread แผ่ขยายเข้าสู่ชั้น cortex; (E) ไรโซเบียมมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ และมีส่วนที่เป็น vesicle ของเซลล์พืชห่อหุ้มอยู่; (b) Bacteroids; (it) infection thread; (s) symbiosomes; (phb) polyhydroxybutarate; (pb) peribacteroid membrane; (c) cortex; (d) digestive vacuole; (ep) epidermis; (ed) endodermis

ที่มา: Perret และคณะ, 2000

วิธีการนำปุ๋ยชีวภาพไปใช้ประโยชน์

ในกรณีของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม จะนำไปใช้กับพืชตระกูลถั่ว เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีในโตรเจน เพิ่มผลผลิตให้กับพืชตระกูลถั่ว และเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับดิน โดยเกษตรกรจะต้องเลือกใช้ชนิดของเชื้อไรโซเบียมให้ตรงกับชนิดของพืชตระกูลถั่วที่ต้องการปลูก และควรสังเกตวันหมดอายุของปุ๋ยชีวภาพก่อนใช้ ทั้งนี้เกษตรกรสามารถปลูกพืชตระกูลถั่วเพื่อเก็บเมล็ดหรือฝักขาย เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง หรือปลูกพืชตระกูลถั่วเพื่อใช้เป็นปุ๋ยพืชสด เช่น โสน ปอเทือง ซึ่งเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ในปริมาณสูง ดังนั้นเมื่อไถกลบพืชตระกูลถั่วลงในดินจะทำให้ได้ธาตุอาหารพืชโดยเฉพาะไนโตรเจน และเพิ่มอินทรีย์วัตถุให้แก่ดิน เพื่อเตรียมดินให้พร้อมใช้ในการปลูกพืชชนิดต่อไป ทั้งนี้วิธีการนำปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมไปใช้ ในกรณีของปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบของเหลว (liquid inoculant) พบว่ามีความสะดวกมากกว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบของแข็ง (solid-based inoculant) เนื่องจากเกษตรกรสามารถ

นำปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดเหลวนี้ไปคลุกกับเมล็ดถั่วได้โดยตรง โดยมีอัตราส่วนการผสมระหว่างปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ที่ความเข้มข้นของเซลล์มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) สามารถใช้ผสมกับเมล็ดถั่วเหลืองได้ 10 กิโลกรัม แต่หากนำไปใช้กับถั่วลิสง จะสามารถใช้ได้กับเมล็ดถั่วลิสง 15 กิโลกรัม ในกรณีผสมกับเมล็ดถั่วเขียวได้ 5 กิโลกรัม และหากนำไปใช้คลุกกับเมล็ดสนอ์ฟริกกันจะสามารถใช้ได้กับเมล็ด 4 กิโลกรัม โดยทำการคลุกเคล้าไรโซเบียมกับเมล็ดพันธุ์อย่างทั่วถึงก่อนปลูก และควรปลูกเมล็ดที่คลุกเชื้อไรโซเบียมในดินที่มีความชื้นเพียงพอ และใช้เมล็ดให้หมด ทั้งนี้ไม่ควรเก็บปุ๋ยชีวภาพตากแดด หรือในที่ที่มีอุณหภูมิสูง เนื่องจากอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียตายลง ส่งผลให้ลดโอกาสในการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่ว

เอกสารอ้างอิง

- Brencic A., Winans S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69(1): 155-194
- Gage D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and molecular biology reviews*. 68: 280-300.
- Holsters M. (2008). SYMRK, an enigmatic receptor guarding and guiding microbial endosymbioses with plant roots. *PNAS*. 105(12): 4537-4538
- Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X., Batut J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends in microbiology*. 17: 458-466.
- Oldroyd G. E. D., Downie J. A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5(7): 566-576
- Perret X., Staehelin C., Broughton W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64: 180-201.
- Shaw L. J., Morris P., Hooker J. E. (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology* 8(11): 1867-1880
- Soto M. J., Sanjuan J., Olivares J. (2006). Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology*. 152(11): 3167-3174
- Spaink H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by Rhizobial bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 54(1): 257-288
- Spaink H. P. (2004). Specific recognition of bacteria by plant LysM domain receptor kinases. *Trends in microbiology*. 12: 201-204.
- Sprent J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*. 174(1): 11-25
- Tirichine L., Imaizumi-Anraku H., Yoshida S., Murakami Y., Madsen L. H., Miwa H., Nakagawa T., Sandal N., Albrechtsen A. S., Kawaguchi M. (2006). Dereglulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*. 441: 1153-1156

van Rhijn P., Fujishige N. A., Lim P. O., Hirsch A. M. (2001). Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Plant Physiology. 126: 133-144.