

ผลการทดลอง

3.1 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ระหว่าง B. japonicum สายพันธุ์ต่าง ๆ ใน
ถั่วเหลือง สจ. 5

ได้ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของพืช ควบคู่กับการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนส จากปมรากถั่วที่ได้จากต้นถั่วที่ปลูกในสภาพปลอดจากเชื้ออื่น ยกเว้นสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่จะทดสอบเท่านั้น ซึ่งวิธีการนั้นนอกจากเป็นการแสดงความโดดเด่นของไรโซเบียมสายพันธุ์หนึ่ง ๆ และยังใช้เป็นมาตรฐานการคัดเลือกสายพันธุ์ด้วย

จากการนำ B. japonicum 23 สายพันธุ์ มาจัดกลุ่มมาตรฐานการตรึงไนโตรเจนด้วยหลักการดังอธิบายตามวิธีของ Vincent 1970 ได้ผลการทดลองดังจะแสดงต่อไปนี้

น้ำหนักต้นแห้งของถั่วที่ได้จากการใส่เชื้อ B. japonicum สายพันธุ์ต่างทั้ง 23 สายพันธุ์ จะสูงกว่าที่ไม่ได้ใส่เชื้อ B. japonicum อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 6 A, ตารางที่ 4) ในทำนองเดียวกันเมื่อทำการทดลองโดยไม่ใส่เชื้อ B. japonicum เลยถั่วจะไม่เกิดปมนอกจากนั้น จำนวนปม , น้ำหนักปมแห้งที่ได้จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสายพันธุ์ทั้ง 23 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 5

จากตารางที่ 5 น้ำหนักต้นแห้งที่ได้ค่าสูงสุดจากการวิเคราะห์ทางสถิติเป็นมาตรฐานพบว่า ในการแบ่งแยกกลุ่มที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูงคืออยู่ในช่วง 2.46-3.82 กรัมต่อต้น (รูปที่ 6 A ช่องที่ 1-14) และกลุ่มที่ให้น้ำหนักต้นแห้งปานกลางอยู่ในช่วง 2.06-2.38 กรัมต่อต้น (รูปที่ 6 A ช่อง 15-21) และกลุ่มที่ให้น้ำหนักต้นแห้งค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 1.54-1.89 กรัมต่อต้น (รูปที่ 6 A ช่อง 22-23) เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักต้นแห้งกับจำนวนปม พบว่าสายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูง จำนวนปมที่เกิดขึ้นอยู่ในระดับสูงในช่วง 30-43 ปมต่อต้น ได้แก่สายพันธุ์ THA 6(1), THA 5(2), USDA 24(5), USDA117(6), USDA31(7), USDA 8-0(8), USDA 122(13), รูปที่ 6 A ช่องที่ 1, 2, 5, 6, 7, 8, 13 ส่วนสายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูงแต่ให้จำนวนปมในระดับปานกลางในช่วง 24-26 ปมต่อต้น ได้แก่สายพันธุ์ USDA 184(3), USDA143(4), TAL 102(10), USDA 142(11) รูปที่ 6C ช่อง 3, 4, 9, 10, 11, 14 ส่วน

สายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูงแต่มีจำนวนปมต่ำคือ 20 ปมต่อต้น มีสายพันธุ์เดี่ยวคือ USDA 136(6) รูปที่ 6 C ช่องที่ 12 ส่วนการทดลองที่ให้น้ำหนักต้นแห้งปานกลาง (รูปที่ 6 A ช่องที่ 15-20) พบว่ามีจำนวนปมอยู่ในระดับสูง ได้แก่สายพันธุ์ THA 2(15), TAL 432(16), TAL 944(17), USDA 8-t(18), USDA76(19), THA 1(20) รูปที่ 6 C ช่องที่ 15-20) ส่วนสายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักต้นแห้งพีชต่ำนั้นจะมีปมอยู่ในระดับปานกลาง ได้แก่สายพันธุ์ USDA 35(22), TAL 377(23) (รูปที่ 6 C ช่องที่ 22-23) และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักต้นแห้งกับน้ำหนักปมแห้ง พบว่าสายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูงและมีน้ำหนักปมแห้งสูง (0.18-0.27) กรัมต่อต้น รูปที่ 6 B ช่องที่ 1-14 เช่นเดียวกัน ได้แก่ THA 6(1), THA 5(2), USDA 184(3), USDA 143(4), USDA 24(5), USDA 117(6), USDA 31(7), USDA 8-0(8), USDA 6(9), TAL 102(10), USDA142(11), USDA136(12), USDA 122(13), USDA 38(14) สายพันธุ์ที่ให้ น้ำหนักต้นแห้งปานกลางจะมีน้ำหนักปมแห้งสูงและปานกลาง (0.13-0.18) กรัมต่อต้น ได้แก่ THA 2(15), TAL 432(16), TAL 944(17), USDA 8-t(18), USDA76(19), THA 2(15), TAL 432(16), TAL 944(17), USDA 8-t(18), USDA76(19), THA 1(20) รูปที่ 6 B ช่องที่ 15-21 สายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักต้นแห้งค่อนข้างต่ำมีจำนวนปม อยู่ในช่วง 0.12 กรัมต่อต้น (รูปที่ 6 B ช่องที่ 22-23) ได้แก่ USDA 35(22), TAL 377(23)

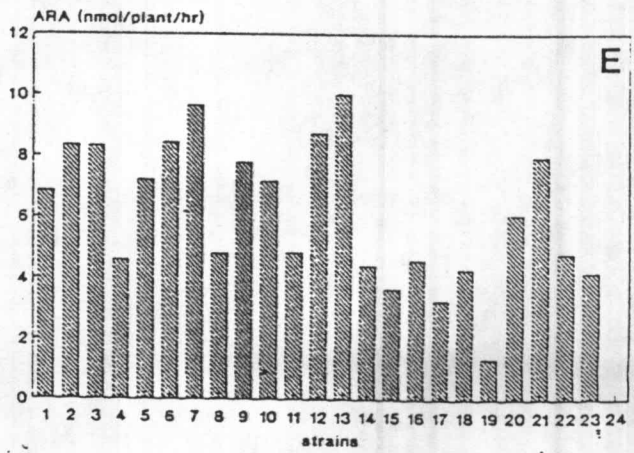
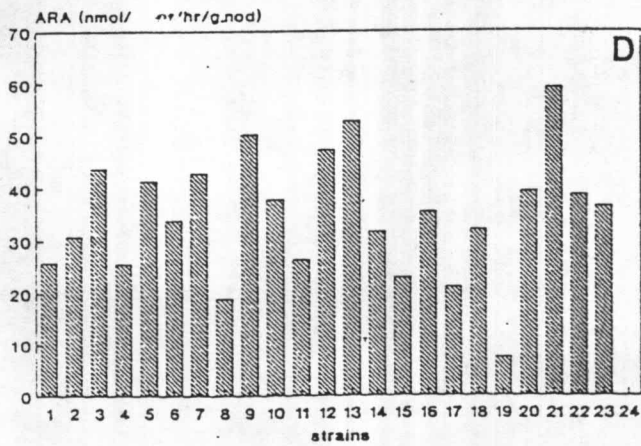
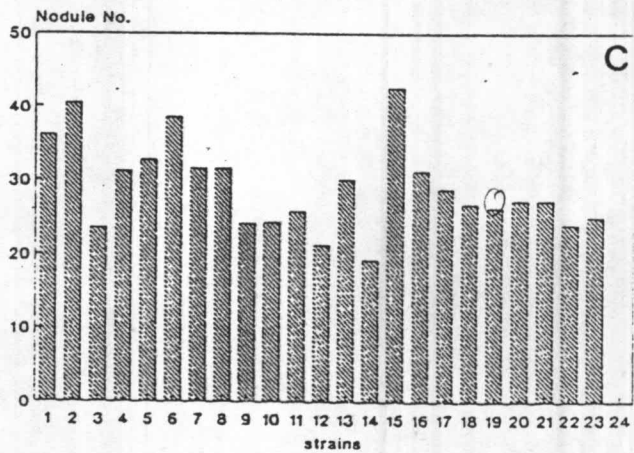
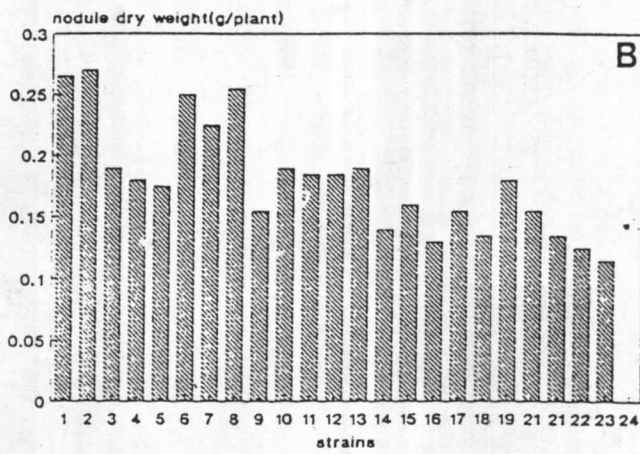
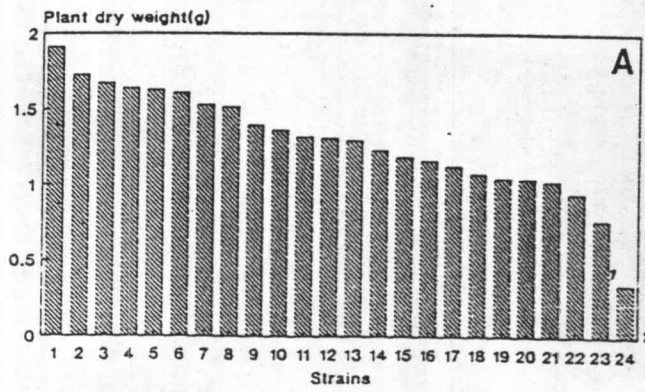
จากการศึกษาตำแหน่งหรือบริเวณปมเกิดจะมี 2 แบบ คือ เกาะกลุ่มอยู่ที่ รากแก้วได้แก่สายพันธุ์ THA 6(1) และ USDA 143(4) และสายพันธุ์ส่วนใหญ่ทั้งหมด ตัวอย่างแสดง (ในรูปที่ 7 C,D) ส่วน THA 2(15), USDA 117(6), THA 5(2) จะทำให้เกิดปมกระจายทั้งบริเวณรากแก้วและรากแขนง ดังแสดงในรูปที่ 7 A, B

ค่า ARA ที่แสดงถึง nitrogenase activity จากค่าการวิเคราะห์ทาง สถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างสายพันธุ์ ทั้ง 23 สายพันธุ์

ข้อที่น่าสังเกตที่หนึ่งคือ USDA 76(19) เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้พีชเกิด chlorosis อากาโรไบฟีซมีสีเหลืองเช่นเดียวกับสายพันธุ์ USDA 94 (21) แต่กลับพบว่า ค่า nitrogenase activity ของ USDA 76(19) ต่ำกว่า USDA 94 (21) อย่างเห็นได้ชัด

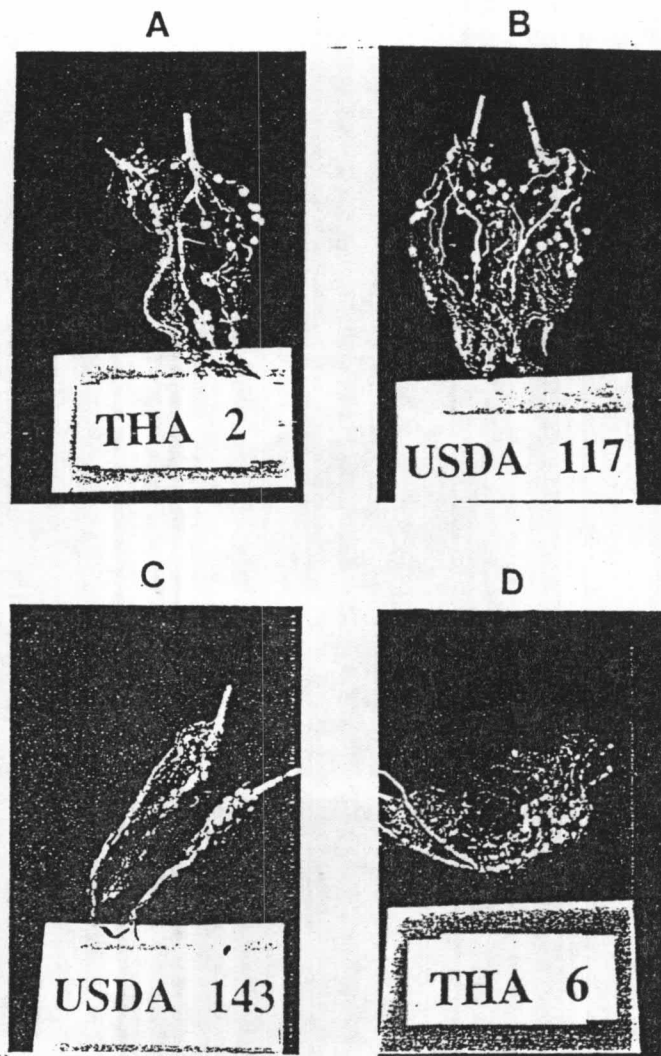
ข้อที่น่าสังเกตที่ 2 คือ THA 5(2), USDA 117(6), THA 2 (15) ที่มีการ กระจายปมอยู่ตามรากแก้วรากแขนงนั้นให้น้ำหนักต้นแห้งสูง จำนวนปมสูง และ น้ำหนักปม

แห่งสูงยกเว้นสายพันธุ์ THA 2(15) ที่ให้ระดับปานกลางแต่สายพันธุ์ทั้งหมดกลับมีค่า ARA
ค่อนข้างต่ำ



ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของน้ำหนักต้นแห้ง จำนวนปม น้ำหนักปมแห้งและ ARA ของต้นถั่ว เมื่อทดสอบ *B. japonicum* แต่ละสายพันธุ์กับถั่วเหลือง สายพันธุ์ สจ. 5 โดยวิธี Leonard jar เก็บเกี่ยวพืชอายุ 42 วัน⁽¹⁾

No.	สายพันธุ์	น้ำหนักแห้งต้นพืช	ARA	จำนวนปม	น้ำหนักปมแห้ง
		กรัมต่อต้น	nmol/plant/hr	ปม	กรัม
1	THA 6	3.82 a	5.37 a	36 ac	0.27 a
2	THA 5	3.45 ab	8.36 ab	40 ab	0.27 a
3	USDA 184	3.35 ac	8.34 ab	23 ce	0.19 ac
4	USDA 143	3.28 ac	4.87 ab	25 c	0.19 ac
5	USDA 24	3.26 ac	6.36 ab	32 ae	0.18 ac
6	USDA 117	3.22 ac	8.46 ab	38 ac	0.25 ab
7	USDA 31	3.06 ad	9.67 a	32 ae	0.22 ac
8	USDA 8-0	3.03 ad	4.83 ab	31 ae	0.26 ab
9	USDA 6	2.79 ae	7.81 ab	24 ce	0.16 ac
10	TAL 102	2.73 ae	7.21 ab	24 ce	0.19 ac
11	USDA 142	2.64 ae	6.36 ab	24 ce	0.15 ac
12	USDA 136	2.62 ae	8.77 ab	21 de	0.19 ac
13	USDA 122	2.59 ae	10.03 a	30 ae	0.19 ac
14	USDA 38	2.46 ae	4.36 ab	26 b	0.18 ac
15	THA 2	2.38 be	3.67 ab	43 a	0.16 ac
16	TAL 432	2.33 be	4.61 ab	31 ae	0.13 bc
17	TAI 944	2.26 be	3.27 ab	29 ae	0.15 ac
18	Tex 8-t	2.15 be	4.43 ab	27 ae	0.14 bc
19	USDA 76	2.10 be	1.36 ab	20 e	0.14 bc
20	THA 1	2.09 be	6.1 ab	27 ae	0.18 ac
21	USDA 94	2.06 ce	7.99 ab	29 ae	0.14 bc
22	USDA 35	1.89 de	4.54 ab	24 ce	0.12 cd
23	TAL 377	1.54 e	4.20 ab	25 ce	0.12 cd
24	UNINOCULATE	0.75 f	0 b	0 f	0 d
% CV.		23.37 %	48.09 %	25.26 %	22.58 %



รูปที่ 7 ตำแหน่งการเกิดปมของเชื้อ B. japonicum สายพันธุ์ต่าง ๆ กับถั่วเหลือง สจ. 5
 (A) THA 2(15); (B) USDA 117(6); (C) USDA 143(4); (D) THA 6(1)
 (A, B) ตำแหน่งการเกิดปมจะกระจายอยู่ตามรากแก้วรากแขนง
 (C, D) ตำแหน่งการเกิดปมจะอยู่บริเวณรากแล้ว และปมจะรวมเป็นกลุ่มก้อน

3.2 รูปแบบของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์เรสทริกชันเอนไซม์ (restriction pattern)

การวิเคราะห์ restriction pattern เป็นการบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมเบื้องต้นสามารถใช้บอกความแตกต่างของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ในระดับ species (กลุ่ม) เช่นใน Streptomyces (Ono และคณะ 1982) ในระดับสายพันธุ์ B. japonicum (Schmidt, E.L และคณะ 1986), Yersinia enterocolitica (Miyahara, M. และคณะ 1988)

ถ้าทดลองโดยใช้โครโมโซมดีเอ็นเอที่แยกจากสายพันธุ์ไรโซเบียมต่าง ๆ กัน แต่ได้ลักษณะของ restriction pattern ผลการทดลองนี้ น่าจะบ่งชี้ถึงการจัดเรียงตัวของจีนจำนวนหนึ่งบนโครโมโซมที่คล้ายคลึงกันได้

จากผลการทดลองสกัดแยกโครโมโซมดีเอ็นเอตามวิธีของ Rodriguez และคณะ 1979 และ ศิริพร สิทธิประณีต 2531 พบว่าได้โครโมโซมดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในรูป high molecular weight มีขนาดประมาณ 78 กิโลเบส (รูปที่ 8) เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง 260 : 280 นาโนเมตรจะอยู่ในช่วง 1.6-1.8 (ภาคผนวก ก)

นำโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้ย่อยด้วย EcoRI ได้รูปแบบของดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันแบ่งได้เป็น 9 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่สายพันธุ์ USDA 6(9), USDA 24(5), USDA 38(14), USDA 122(13), USDA 136(12) USDA 143(4), THA 6(1) และ USDA 8-t(18)(รูปที่ 9 A) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ THA 1(20), TAL 102(10), USDA 8-0 (8)(รูปที่ 9 B) กลุ่มที่ 3 ได้แก่ THA 2(15), THA 5 (2) และ USDA 117 (6) (รูปที่ 9 C) กลุ่มที่ 4 ได้แก่ USDA 35(22), USDA 184(3) และ TAL 377 (23) (รูปที่ 9 D) กลุ่มที่ 5 ได้แก่ USDA 31(7) และ TAL 944(17) (รูปที่ 9 E) กลุ่มที่ 6 ได้แก่ USDA 76(19) (รูปที่ 13 A ช่องที่ 1) กลุ่มที่ 7 ได้แก่ USDA 94 (21)(รูปที่ 13 A ช่องที่ 2) กลุ่มที่ 8 ได้แก่ USDA 142 (11) (รูปที่ 13 A ช่องที่ 3) กลุ่มที่ 9 ได้แก่ TAL 432 (16) (รูปที่ 13 A ช่องที่ 4)

เพื่อทดสอบว่า รูปแบบที่เกิดขึ้นนั้นยังคงแสดงรูปแบบที่ให้ในแต่ละกลุ่มที่เหมือนกันของสายพันธุ์นั้น ๆ จึงทดลองโดยการเปลี่ยน restriction enzyme จาก EcoRI เป็น

BamHI HindIII และ PstI ซึ่งแต่ละตัวจะมี recognition sequence แตกต่างกันไป ซึ่งส่วนใหญ่ เอนไซม์ที่ใช้กันนั้นมีความจำช่วง 6 เบสเพอร์ จากผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดของ เสรทริกซัน เอนไซม์นั้นยังคงให้รูปแบบของดีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มของสายพันธุ์นั้น ๆ เหมือนกันกับเมื่อใช้ EcoRI นั้นแสดงถึงการที่บนโครโมโซมดีเอ็นเอ นั้นมีจุดตัดที่มีการซ้ำของ sequence ในช่วง 6 เบสเพอร์อยู่สูง ซึ่งจากรายงานของ Betler และคณะ นั้นพบว่า โครโมโซมดีเอ็นเอของไรโซเบียมนี้มี repetitive sequence แต่อย่างไรก็ตามในการเลือกใช้ restriction enzyme ที่มี recognition sequence ที่คาดว่าน่าจะมีจุดตัดอยู่บนโครโมโซมน้อยอาจจะทำให้แถบที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยลงและอาจแสดงความแตกต่างของรูปแบบมากกว่านี้

ผลจากการย่อยสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วย restriction enzyme ชนิดต่างแสดงดังต่อไปนี้ (รูปที่ 10) เป็นการย่อยสายพันธุ์ USDA 6(9), USDA 38(14), USDA 122(13), USDA 136(12), USDA 143(4), THA 1(20), TAL 102(10), USDA 8-0(8), THA 2(15), THA 5(2), USDA 35(22), USDA 184(3), USDA 31(7), TAL 944 (17) ด้วยเอนไซม์ BamH I (รูปที่ 11) เป็นการย่อยสายพันธุ์ USDA 6(9), USDA 24(5), USDA 38(14), USDA 122(13), USDA 136(12), USDA 143(4), THA 6 (1), THA 1 (20), TAL 102(10), USDA 8-0(8), THA 2(15), THA 5 (2) USDA 35(22), USDA 184(3), TAL 377(23), USDA 31(7), TAL 944(17) ด้วยเอนไซม์ Hind III และรูปที่ 12 เป็นการย่อยสายพันธุ์ USDA 6(9), USDA 24(5), USDA 38(14), USDA 122(13), USDA 136(12), USDA 143(4) THA 6(1), USDA 8-t(18), THA 1(20), TAL 102 (10), USDA 8-0(8) THA 2(15), THA 5(2), USDA 117(6), USDA 35(22) USDA 184 (3) และ TAL 377 (23) ด้วยเอนไซม์ Pst I

เมื่อเปรียบเทียบให้เห็นว่า รูปแบบดีเอ็นเอกลุ่ม I-IV ซึ่งมีสายพันธุ์หลายสายพันธุ์ที่ให้รูปแบบดีเอ็นเอ ในแต่ละกลุ่มจึงได้ทำการทดลอง โดยสุ่มสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มมากลุ่มละ 1 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ USDA 24 (5) , TAL 102 (10), TAL 2 (15) , USDA 35 (22), TAL 944 (17), USDA 76 (19), USDA 94 (21), USDA 142 (11), TAL 432 (16) แล้วนำมาย่อยด้วยเสรทริกซัน เอนไซม์ EcoRI พบว่า มีความแตกต่างในแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในแต่ละสายพันธุ์ในแต่ละเอนไซม์แสดงในรูปที่ 14

ผลจากการศึกษา restriction pattern สรุปได้ดังนี้

1. สายพันธุ์ USDA 6(9), USDA 24(5), USDA 38(14), USDA 136 (12), USDA 143(4), THA 6(1) และ USDA 8-t(18) มี restriction pattern เหมือนกันของแถบดีเอ็นเอทุก ๆ เรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้จัดอยู่ในรูปแบบที่ I สายพันธุ์ THA 1(20), TAL 102(10), USDA 8-0(8) มี restriction pattern เหมือนกันจัดอยู่ในแบบที่ II, THA 2(15), THA 5(2) และ USDA 117 (6) มี restriction pattern เหมือนกันจัดอยู่ในรูปแบบที่ III, USDA 35(22), USDA 184(3) และ TAL 377(23) มี restriction pattern เหมือนกันจัดอยู่ในรูปแบบที่ IV, USDA 31(7) และ TAL 944(17) มี restriction pattern เหมือนกันจัดอยู่ในรูปแบบที่ V

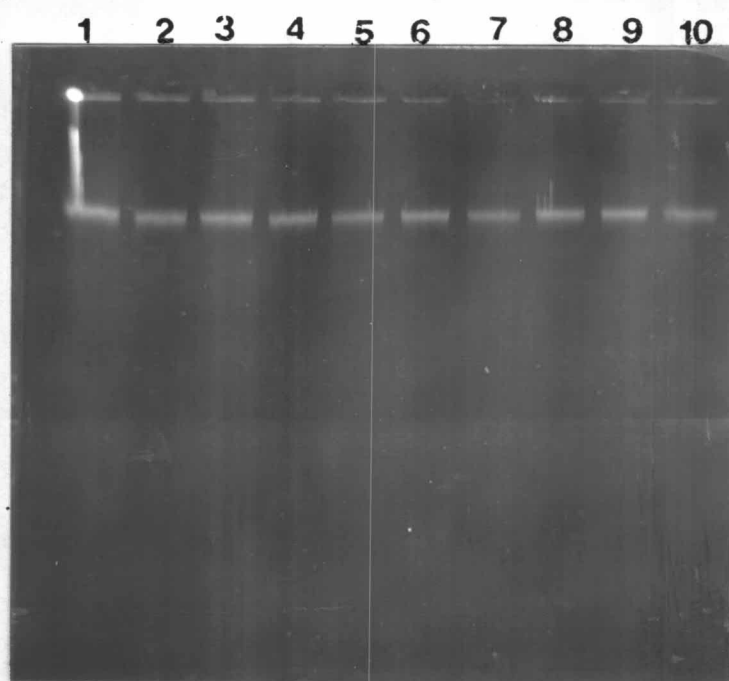
2. สายพันธุ์ USDA 76(19), USDA 94(21), USDA 142(11) และ TAI 432(16) ให้ restriction pattern ที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ทุกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ (restriction pattern VI-IX)

เพื่อให้เห็นภาพการเปรียบเทียบของ restriction pattern ที่เกิดขึ้นทั้งหมด 9 แบบ โดยนำเอา restriction pattern เหมือนกันมากลุ่มละ 1 สายพันธุ์ กับอีก 4 สายพันธุ์ที่พบว่ามีความแตกต่างในรูปแบบดีเอ็นเอย่อยด้วย EcoRI ผลแสดงในรูปแบบที่ 14 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูปแบบ restriction pattern เกิดขึ้นทั้งหมด 9 รูปแบบ

3.3 การวิเคราะห์ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

เนื่องจาก nif และ nod genes เป็นจีนที่มีความเกี่ยวข้องและสัมพันธ์โดยตรงกับประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และการเกิดปม ดังนั้น การนำ nif และ nod จีน มาใช้เป็นตัวติดตาม (probe) สำหรับการหา RFLP น่าจะเป็นเหมือนตัวบ่งชี้ถึงความเชื่อมโยงระหว่างสายพันธุ์กับสรีระวิทยาของการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมในต้นถั่วได้ตรงเป้าหมายที่สุด

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ตัวติดตามเป็น nif structural genes ซึ่งมีส่วนของ nif HDK ของ K. pneumoniae ที่ได้มีการโคลนอยู่ในรูป pSA30 หลังจากทำการสกัด



รูปที่ 8 Chromosomal DNA B. japonicum

lanes (1) THA 1(20); (2) THA 2(15); (3) TAL 102(10);
 (4) USDA 8-0(8); (5) USDA 35(22); (6) USDA 184(3);
 (7) TAL 377(23); (8) USDA6(9); (9) USDA38(14);
 (10) THA 6 (1)

ผลจากการสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอจาก B. japonicum วิเคราะห์จาก
 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอทิดีเอ็มโบรไมด์ส่องภายใต้
 U.V. จะเห็นได้ว่าโครโมโซมดีเอ็นเอที่ได้จากรูปมีขนาดเดียว

รูปที่ 9 Restriction enzyme EcoRI digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum

A. Restriction pattern I

lanes (1) USDA 24(5); (2) USDA 6(9); (3) USDA 38(14);
(4) USDA 122(13); (5) USDA 136(12); (6) USDA 143(4);
(7) THA 6(1);

B. Restriction pattern II

lanes (1) THA 1(20); (2) TAL 102(10); (3) USDA 8-0(8)

C. Restriction pattern III

lanes (1) THA 2(15); (2) THA 5(2); (3) USDA 117(6)

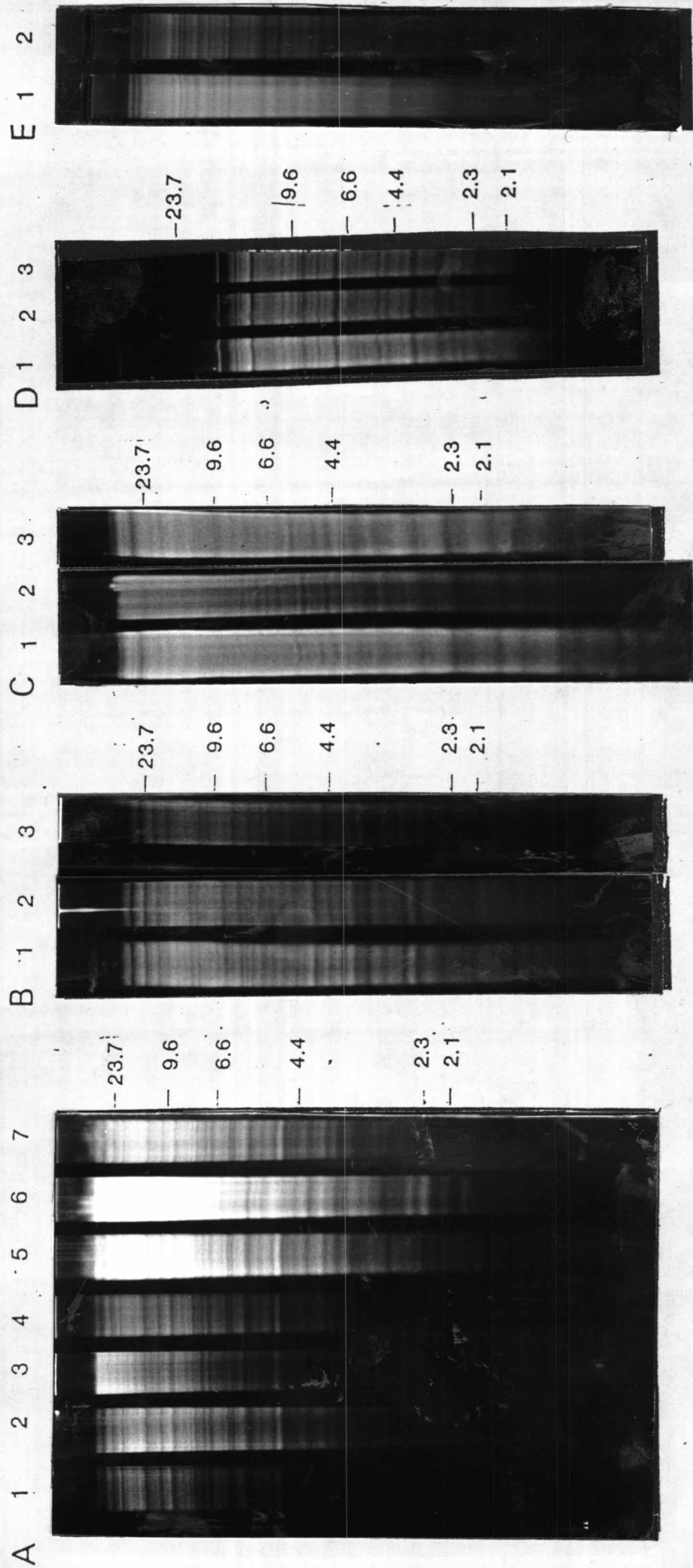
D. Restriction pattern IV

lanes (1) USDA 35(22) (2) USDA 184(3) (3) TAL 377(23)

E. Restriction pattern V

lanes (1) USDA 31(7); (2) TAL 944(17)

ผลจากการนำโครโมโซมดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. japonicum จำนวน 3 ไมโครกรัมย่อยด้วย EcoRI 15 ยูนิต วิเคราะห์ผลบน 0.7 % อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรโมด์ ส่องภายใต้แสง U.V. จากผลแสดงสายพันธุ์ของ B. japonicum ที่มีรูปแบบ restriction pattern I-V



รูปที่ 10 Restriction enzyme BamHI digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum

A. Restriction pattern I

lanes (1) USDA 24(5); (2) USDA 6(9); (3) USDA 38(14);
(4) USDA 122(13); (5) USDA 136(12); (6) USDA 143(4);
(7) THA 6(1); (8) USDA 8-t(18)

B. Restriction pattern II

lanes (1) THA 1(20); (2) TAL 102(10); (3) USDA 8-0(18)

C. Restriction pattern III

lanes (1) THA 2(15); (2) THA 5(2); (3) USDA 117(6)

D. Restriction pattern IV

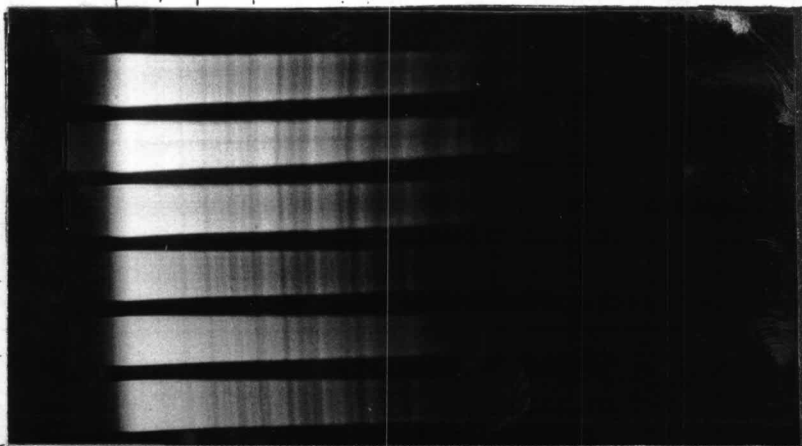
lanes (1) USDA 35(22) (2) USDA 184(3) (3) TAL 377(23)

E. Restriction pattern V

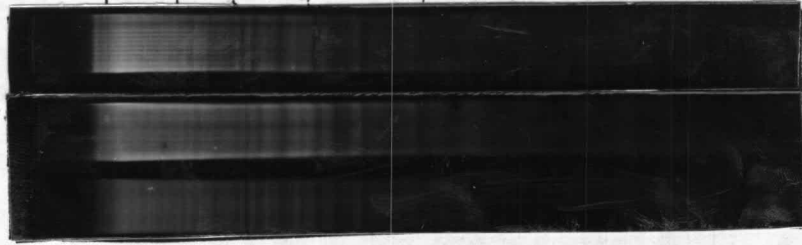
lanes (1) USDA 31(7); (2) TAL 944(17)

ผลจากการนำโครโมโซมดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. japonicum จำนวน 3 ไมโครกรัมย่อยด้วย BamHI 15 ยูนิต วิเคราะห์ผลบน 0.7 % อะกาโรส เจลอีเลคโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ ส่องภายใต้แสง U.V. จากผลแสดงสายพันธุ์ของ B. japonicum ที่มีรูปแบบ (restriction pattern) เหมือนกัน (restriction pattern I-V)

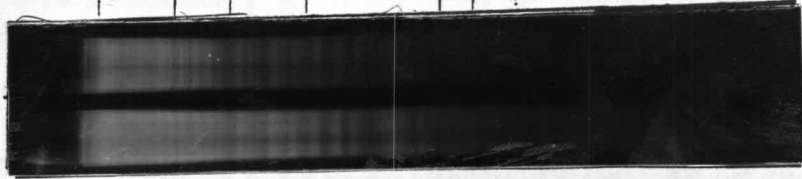
A 1 2 3 4 5 6



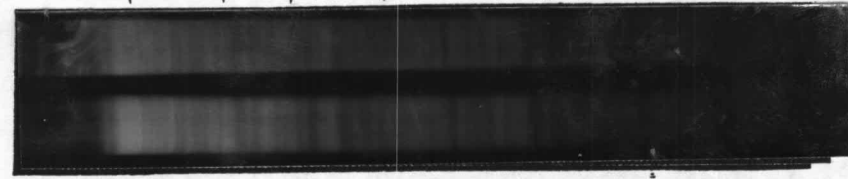
B 1 2 3



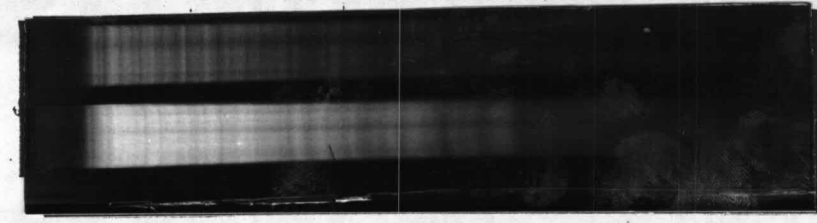
C 1 2



D 1 2



E 1 2



รูปที่ 11 Restriction enzyme HindIII digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum spp.

A. Restriction pattern I

lanes (1)USDA 24(5); (2) USDA 6(9); (3) USDA 38(14);
(4) USDA 122(13);(5) USDA 136(12); (6) USDA 143(4);
(7) THA 6(1);

B. Restriction pattern II

lanes (1) THA 1(20); (2) TAL 102(10); (3) USDA 8-0(18)

C. Restriction pattern III

lanes (1) THA 2(15); (2) THA 5(2);

D. Restriction pattern IV

lanes (1) USDA 35(22) (2) USDA 184(3) (3) TAL 377(23)

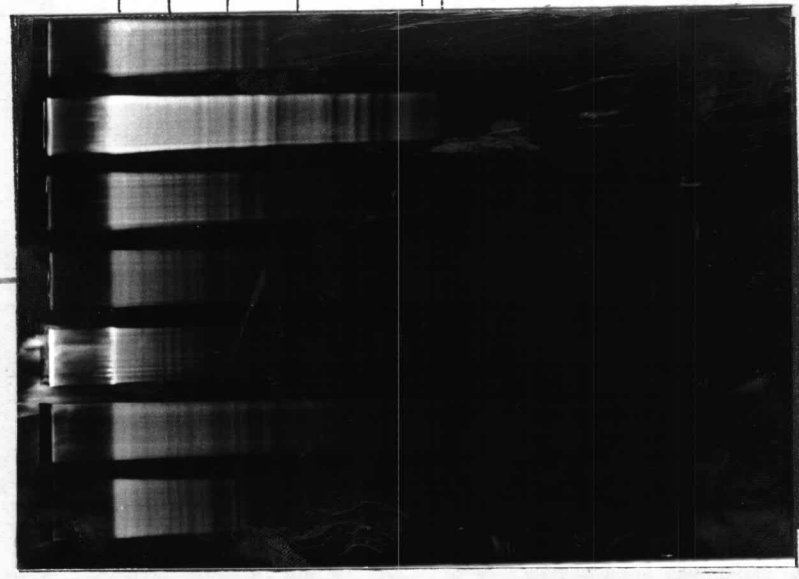
E. Restriction pattern V

lanes (1) USDA 31(7); (2) TAL 944(17)

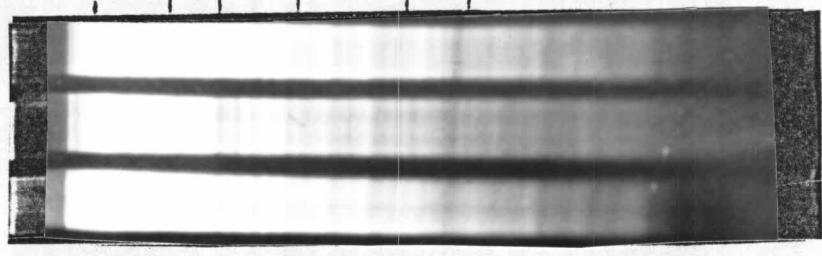
ผลจากการนำโครโมโซมดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. japonicum จำนวน 3 ไมโครกรัมย่อยด้วย HindIII 15 ยูนิต วิเคราะห์ผลบน 0.7 % อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ ส่องภายใต้แสง U.V.

จากผลแสดงสายพันธุ์ของ B. japonicum ที่มี restriction pattern I-V

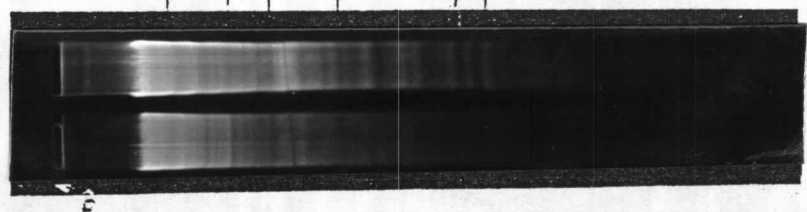
A 1 2 3 4 5 6 7



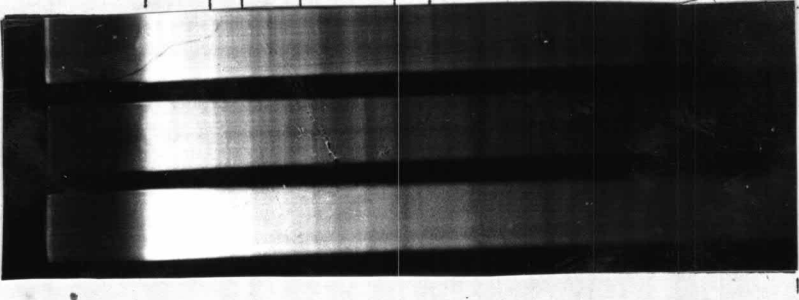
B 1 2 3



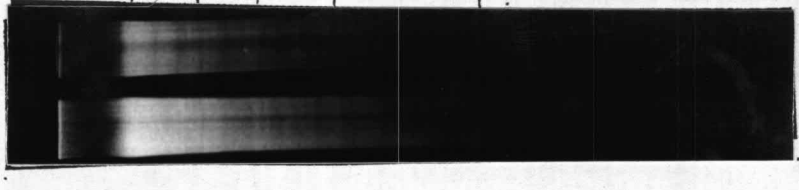
C 1 2



D 1 2 3



E 1 2



รูปที่ 12 Restriction enzyme PstI digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum spp.

A. Restriction pattern I

lanes (1) USDA 24(5); (2) USDA 6(9); (3) USDA 38(14);
(4) USDA 122(13); (5) USDA 136(12); (6) USDA 143(4);
(7) THA 6(1); (8) USDA8-t(18)

B. Restriction pattern II

lanes (1) THA 1(20); (2) TAL 102(10); (3) USDA 8-0(8)

C. Restriction pattern III

lanes (1) THA 2(15); (2) THA 5(2); (3) USDA 117(6)

D. Restriction pattern IV

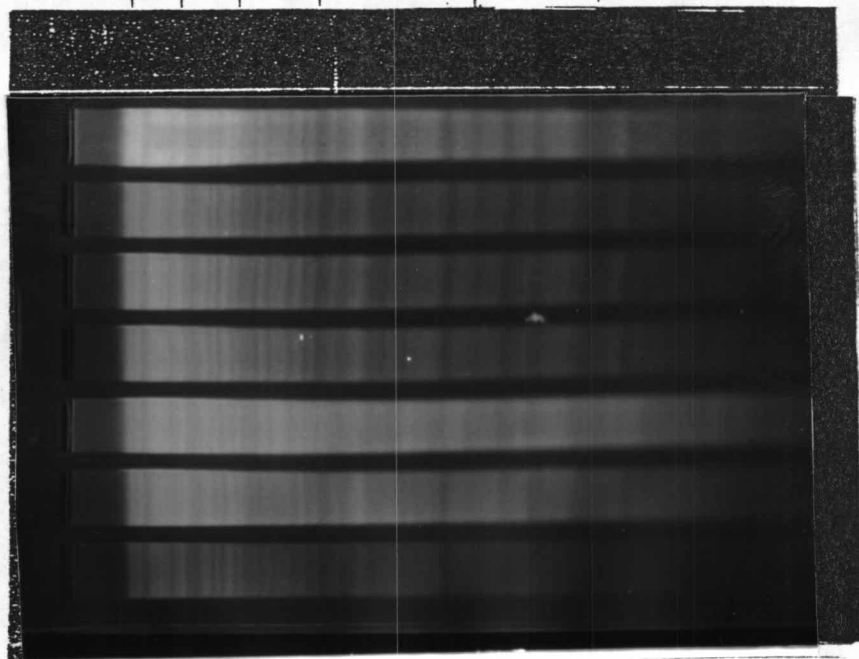
lanes (1) USDA 35(22) (2) USDA 184(3) (3) TAL 377(23)

E. Restriction pattern V

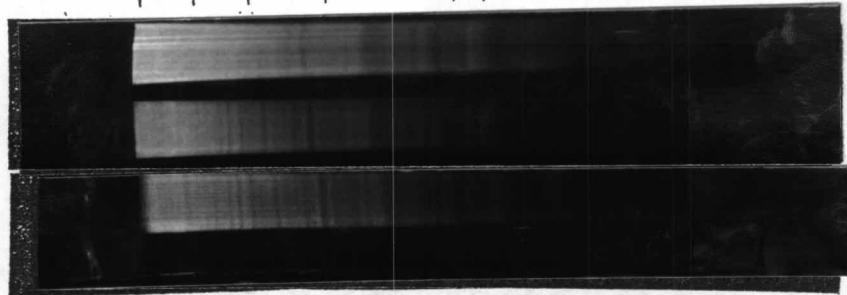
lanes (1) USDA 31(7); (2) TAL 944(17)

ผลจากการนำโครโมโซมดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. japonicum จำนวน 3 ไมโครกรัมย่อยด้วย PstI 15 ยูนิต วิเคราะห์ผลบน 0.7 % อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ ส่องภายใต้แสง U.V. จากผลแสดงสายพันธุ์ของ B. japonicum ที่มีรูปแบบ (restriction pattern I-V)

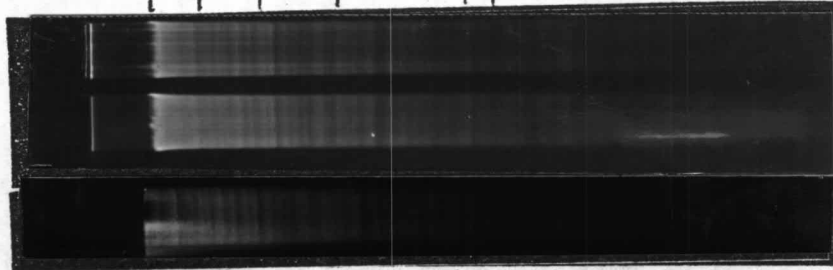
A 1 2 3 4 5 6 7 8 B 1 2 3 C 1 2 3 D 1 2 3 E 1 2



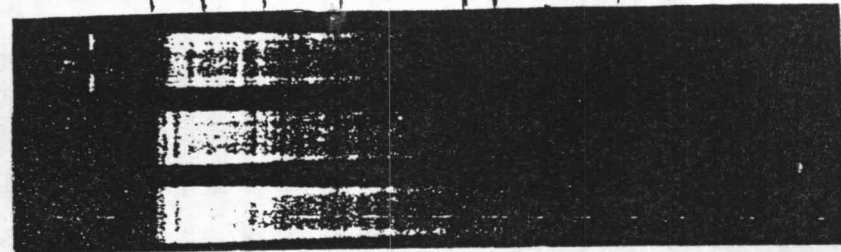
23.7
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1
0.6



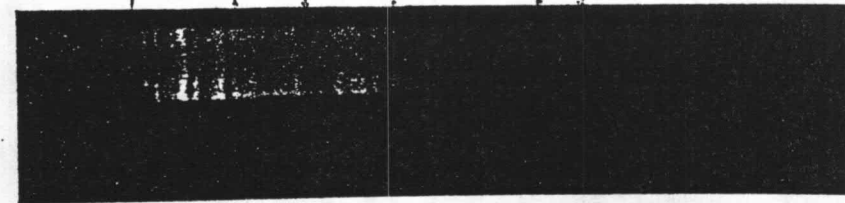
23.7
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1
0.6



23.7
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1
0.6



23.7
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1
0.6

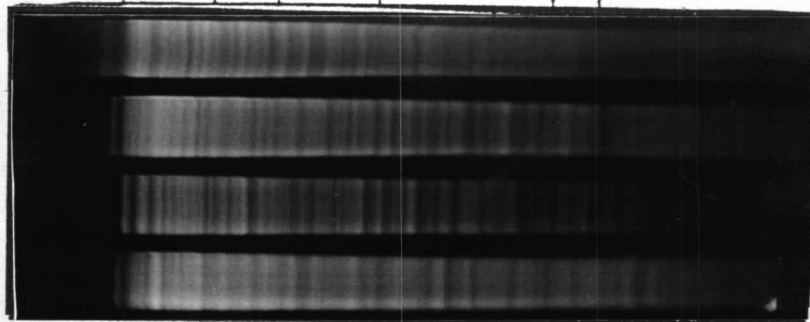


23.7
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1

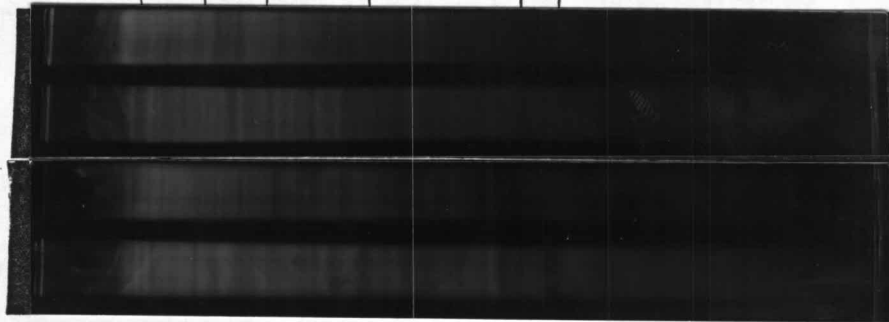
- รูปที่ 13 A. Restriction enzyme EcoRI digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum
lanes (1) USDA 76(19) (RP VI) ; (2) USDA 94(21) (RP VII)
(3) USDA 142(11) (RP VIII) (4) TAL 432(16) (RP IX)
- B. Restriction BamHI digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum
lanes (1) USDA 76(19) (RP VI) ; (2) USDA 94(21) (RP VII)
(3) USDA 142(11) (RP VIII) (4) TAL 432(16) (RP IX)
- C. Restriction HindIII digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum
lanes (1) USDA 76(19) (RP VI) ; (2) USDA 94(21) (RP VII)
(3) USDA 142(11) (RP VIII) (4) TAL 432(16) (RP IX)
- D. Restriction pattern IV digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum
lanes (1) USDA 76(19) (RP VI) ; (2) USDA 94(21) (RP VII)
(3) USDA 142(11) (RP VIII) (4) TAL 432(16) (RP IX)

จากผลแสดงสายพันธุ์ของ B. japonicum ที่มีรูปแบบ (restriction pattern VI - IX)

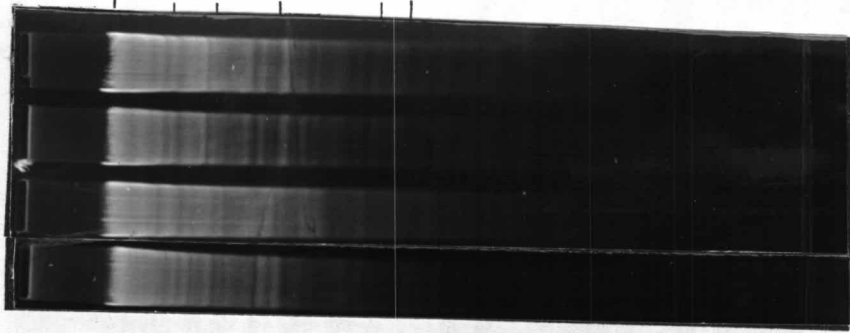
A 1 2 3 4



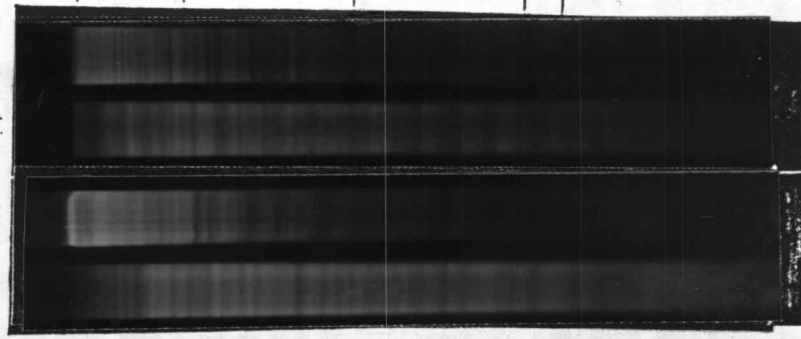
B 1 2 3 4



C 1 2 3 4



D 1 2 3 4

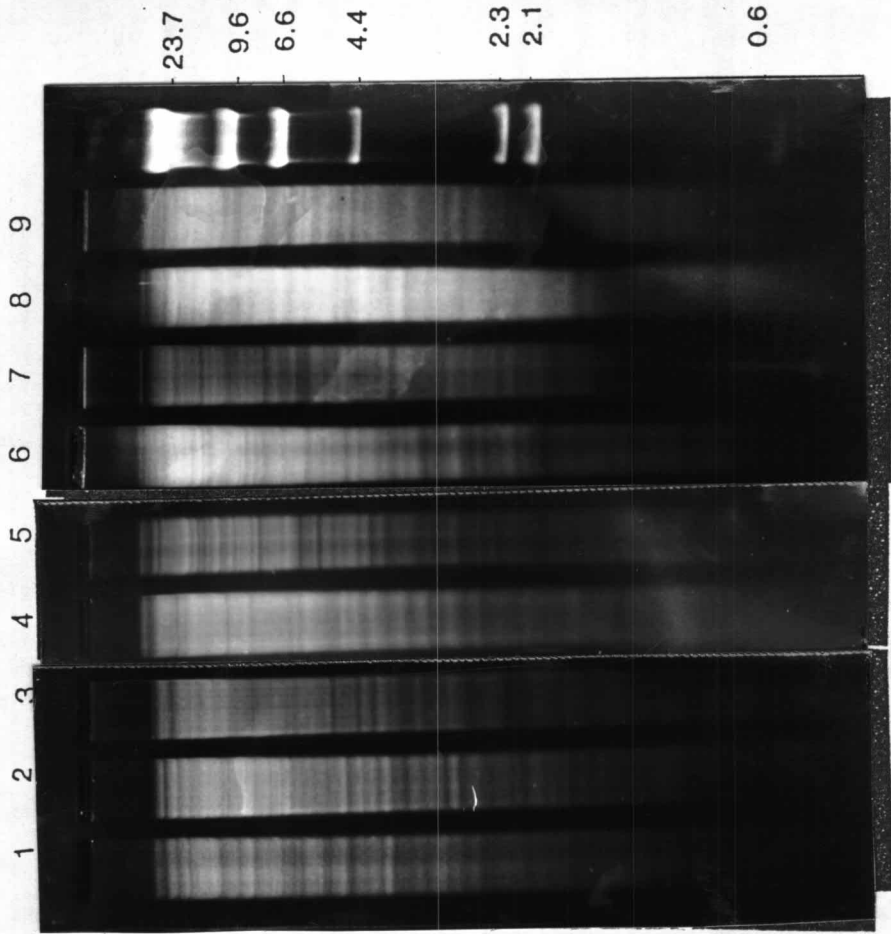


รูปที่ 14 Restriction enzyme EcoRI digestion pattern of chromosomal DNA from B. japonicum

- lanes (1) USDA 24(5) (RP I)
(2) TAL 102(10) (RP II)
(3) THA 2(15) (RP III)
(4) USDA 35(22) (RP IV)
(5) TAL 944(17) (RP V)
(6) USDA 76(19) (RP VI)
(7) USDA 94(21) (RP VII).
(8) USDA 142 (11)(RP VIII)
(9) TAL 432(16) (RP IX)

(RP) = restriction pattern

ผลจากการนำโครโมโซมดีเอ็นเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. japonicum จำนวน 3 ไมโครกรัม ย่อยด้วย EcoRI 15 ยูนิต วิเคราะห์ผลจากการทำอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ ส่องภายใต้ U.V. จากรูป จัดแบ่งกลุ่มของ B. japonicum ตามรูปแบบการย่อยด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ (restriction pattern) ได้ 9 รูปแบบ



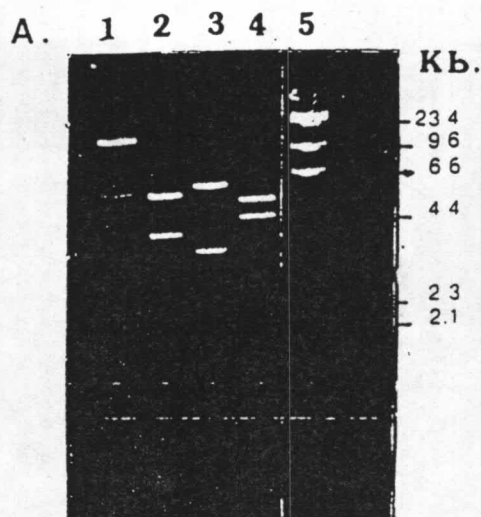
และตรวจสอบคุณลักษณะก่อนนำไปใช้ศึกษาโดยวิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วนพลาสมิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างพบว่าจากการย่อยด้วย Hind III ใช้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 5.4 และ 4.7 กิโลเบส และเมื่อย่อยด้วย BamHI ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 6.5 และ 3.7 กิโลเบส เมื่อใช้ EcoRI ย่อยได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6.2 และ 2.4 กิโลเบส (รูปที่ 15 A ช่องที่ 2, 3, 4) ตามลำดับ ผลจากการตรวจสอบพลาสมิดครั้งนี้แสดงว่าขนาดชิ้นส่วนที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ตรงตาม restriction map (รูปที่ 15 B)

nod genes ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นส่วนของ common nod genes ที่มีส่วน nod ABC และ D ของ *R. meliloti* ที่อยู่ในพลาสมิด pSL42 หลังจากการสกัดและตรวจสอบคุณลักษณะโดยการวิเคราะห์ชิ้นพลาสมิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ พบว่าจากการย่อยด้วย BamHI ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 8.5 กิโลเบส แต่เมื่อย่อยด้วย EcoRI ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 8.5 กิโลเบส จากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิด BamHI และ HindIII ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6.3 และ 22 กิโลเบส จากการย่อยด้วย BamHI และ EcoRI ได้ชิ้นขนาด 5.2 และ 3.3 กิโลเบส (รูปที่ 10 A ช่องที่ 1-4) ตามลำดับ ผลจากการตรวจสอบ ขนาดชิ้นของดีเอ็นเอจากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งหมดแสดงว่าพลาสมิดนั้นมี restriction map ตรงกับ pSL42 (รูปที่ 16 B)

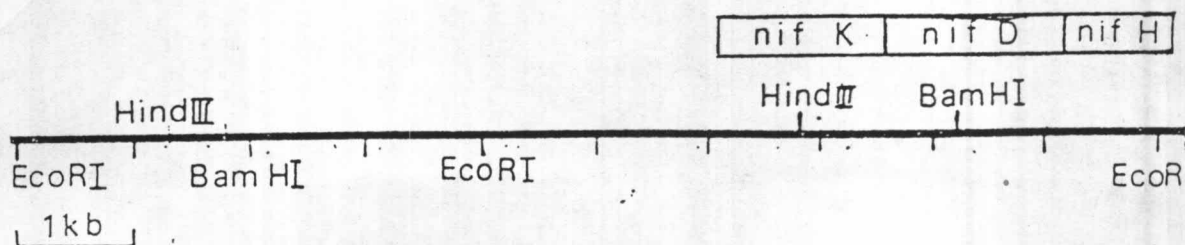
3.3.1 การติดฉลากกัมมันตภาพรังสีตัวติดตาม

เมื่อนำตัวติดตาม pSA30 และ pSL42 มาติดฉลากกัมมันตภาพรังสีโดยวิธี Nick Translation (Rigby และคณะ, 1977) โดยใช้ 32 P-dCTP (1 mci) ผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

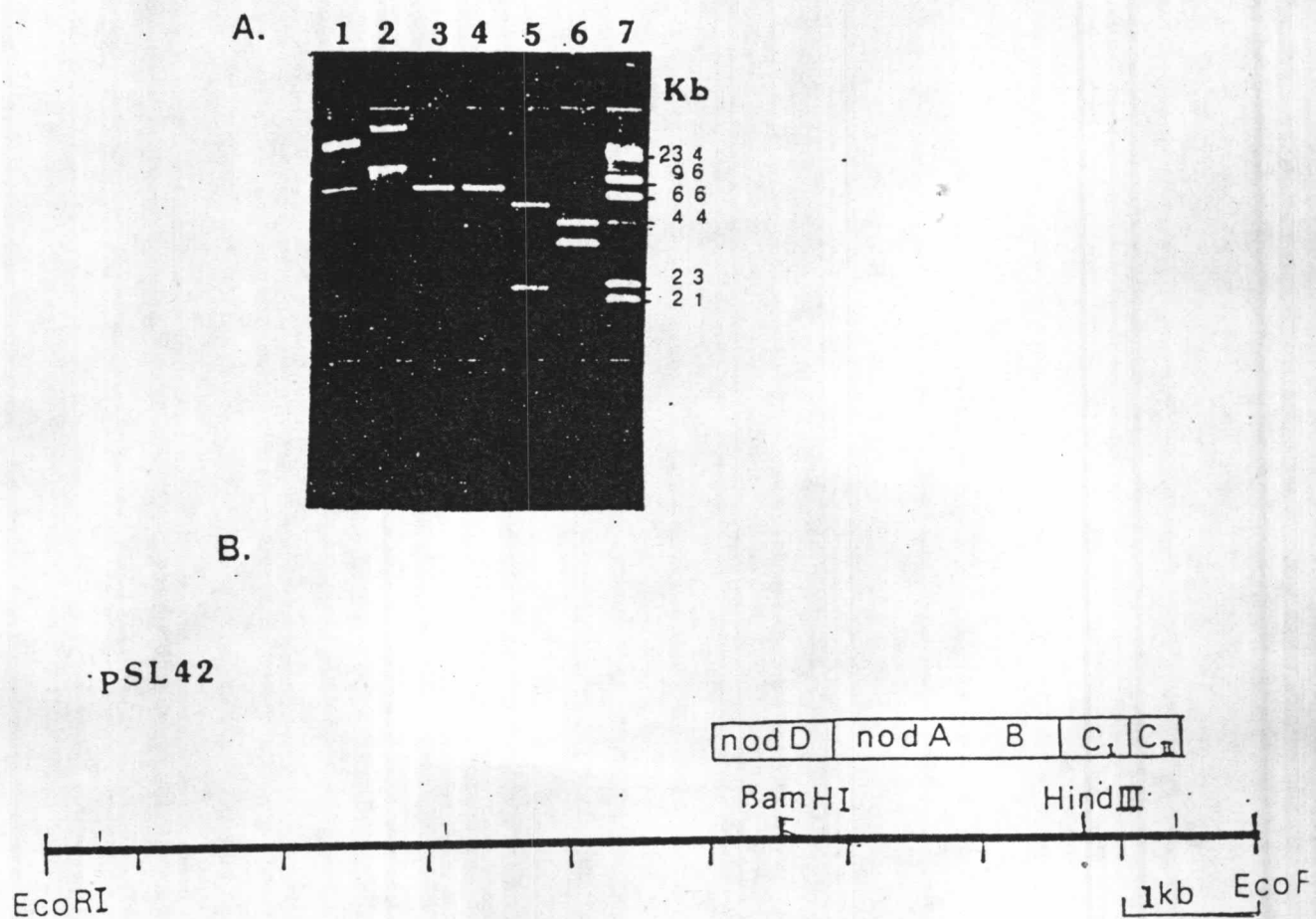
การศึกษา Kinetic ของ Nick Translation จะทำให้ทราบถึงเวลาที่ จะทำให้เกิดการ incorporate ของรังสี 32 P-dCTP เข้าไปยังสายพลาสมิดดีเอ็นเอตัวติดตามให้ได้ค่า Specific activity สูงสุด เพราะเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์บางตัวในปฏิกิริยา DNase I กลับมาย่อยสลายสายดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรียบร้อยแล้วทำให้ค่า Specific activity ลดลง ดังนั้นจึงควรหยุดปฏิกิริยาที่เวลาการเกิด % incorporation สูงสุด รูปที่ 17 แสดง Kinetic ของ Nick Translation ของ pSA30 และ pSL42 ค่า Specific activity ของ 32 P-pSA 30 และ 32 P-pSL 42



B. pSA 30



- รูปที่ 15 A. การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอ pSA 30 โดยการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์
- ช่องที่ 1 pSA 30
 - ช่องที่ 2 pSA 30 ย่อยด้วย EcoRI
 - ช่องที่ 3 pSA 30 ย่อยด้วย BamHI
 - ช่องที่ 4 pSA 30 ย่อยด้วย HindIII
 - ช่องที่ 5 Standard x DNA ย่อยด้วย HindIII
- B. แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของ pSA 30



รูปที่ 16 A. การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอ pSL 42 โดยการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องที่ 1 pSA 30

ช่องที่ 2 pSA 30

ช่องที่ 3 pSL 42 ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 4 pSL 42 ย่อยด้วย EcoRI

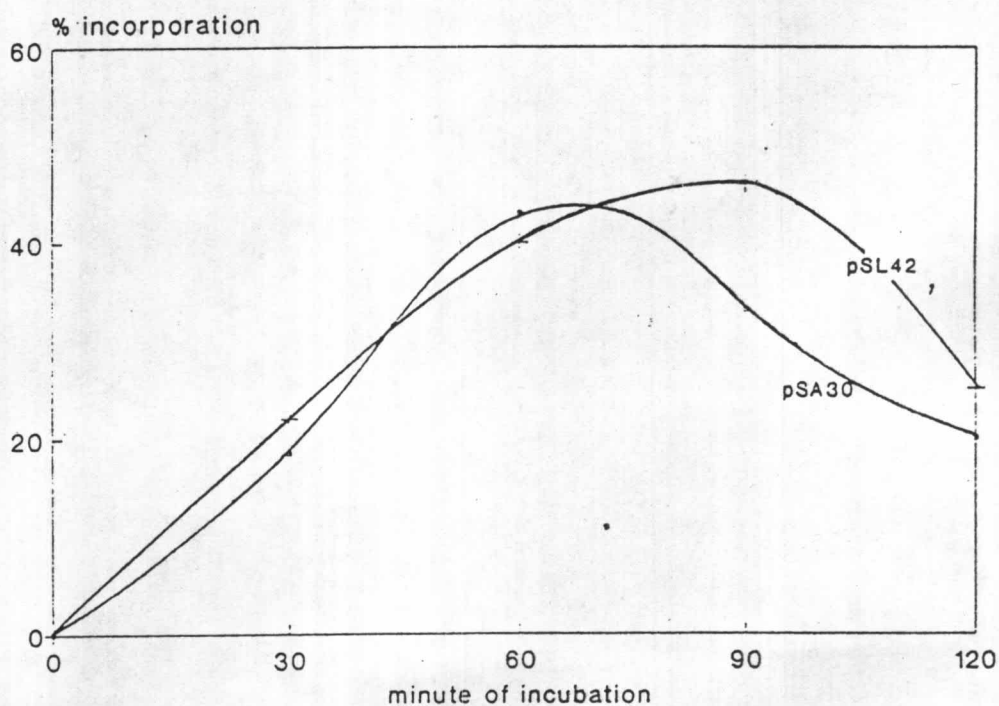
ช่องที่ 5 pSL 42 ย่อยด้วย BamHI และ HindIII

ช่องที่ 6 pSL 42 ย่อยด้วย BamHI และ EcoRI

ช่องที่ 7 Standard x DNA ย่อยด้วย HindIII

B. แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของ pSL 42

Kinetics of Nick Translation



รูปที่ 17 ผลการวิเคราะห์ Kinetic ของ Nick Translation ของพลาสมิด pSA 30 และ pSL 42

นำพลาสมิด pSA 30 และ pSL 42 อย่างละ 500 นาโนกรัมติดฉลาก α^{32} PdCTP 100 ไมโครคูรี (ละลายอยู่ใน Tricine N-Tris hydroxy methylglycine pH 7.6) Nick Translation Kit ของ New England Nuclear

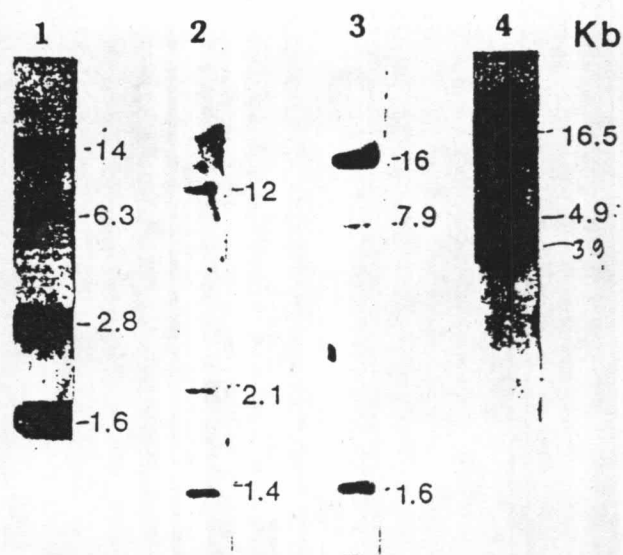
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและเปอร์เซ็นต์ incorporation

pSA 30 มี specific activity 8.6×10^7 cpm/Ug

เปอร์เซ็นต์ incorporation 43 %

pSL 42 มี specific activity 1.27×10^8 cpm/Ug

เปอร์เซ็นต์ incorporation 46 %

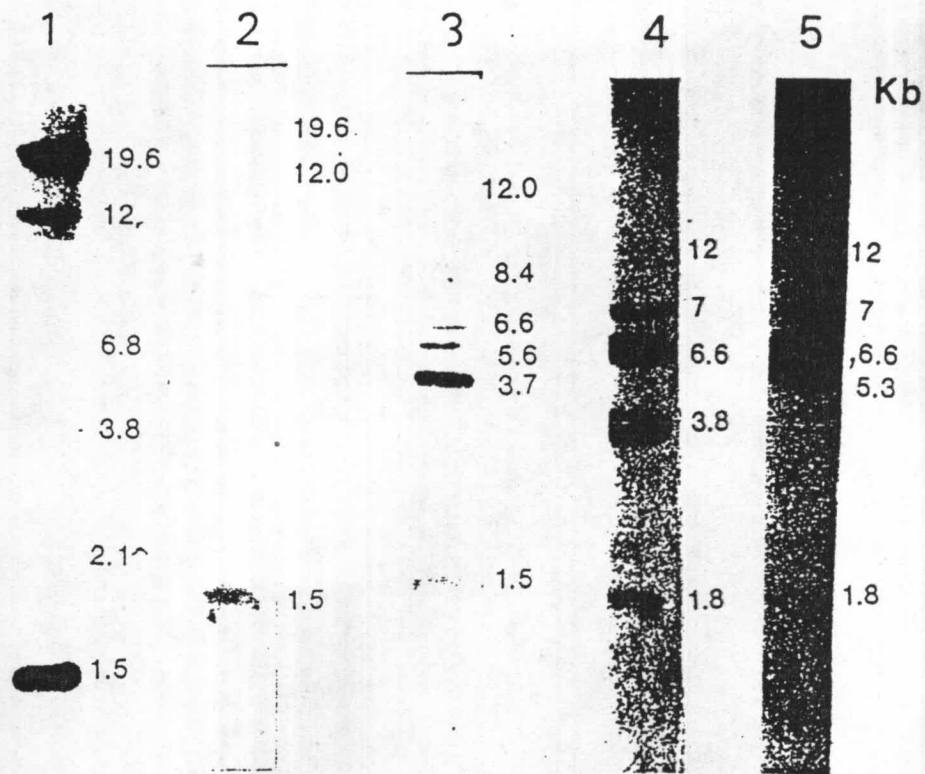


รูปที่ 18 รูปแบบของ *nif* hybridization ที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization กับพลาสมิด ^{32}P -pSA 30

จากการนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีชิ้นส่วนโครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. japonicum* ถูกย่อยโดย EcoRI (รูปที่ 10) ไฮบริไดซ์กับ ^{32}P -pSA 30 ที่อุณหภูมิ 42 °ซ. 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างและประกอบกับฟิล์ม X-ray เป็นเวลา 3 วัน ที่ -70 °ซ.

จากรูปแสดงรูปแบบที่เกิดขึ้นต่างกัน 4 รูปแบบ

ช่องที่ (1) USDA 24(5); (2) TAL 102(10); (3) THA 5(2) ;
(4) USDA 31(7)



รูปที่ 19 รูปแบบของ nif hybridization ที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization กับพลาสมิด 32 P-pSA 30

จากการนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีชิ้นส่วนของโครโมโซมดีเอ็นเอของ B. japonicum ถูกย่อยโดย PstI (รูปที่ B) ไฮบริไดซ์กับ 32 P-pSA 30 ที่อุณหภูมิ 42°C 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างและประกบกับฟิล์ม X-ray เป็นเวลา 3 วัน ที่ -70°C.

จากผลพบว่ารูปแบบทั้งหมดที่ได้แบ่งตามความแตกต่างได้เป็น 4 รูปแบบ
ช่องที่ (1) USDA 24(5); (2) TAL 102(10); (3) THA 5(2);
(4) USDA 76(19); (5) USDA 94(21)

ตารางที่ 6 การจัดกลุ่มของ *B. japonicum* 23 สายพันธุ์ โดยการวิเคราะห์ RFLP จากการทำ Southern blot hybridization กับ *nif* structural gene ของ *Klebsiella pneumoniae* ที่อยู่บนพลาสมิด pSA30 ที่ใช้เป็นตัวติดตาม

รูปแบบที่	Restriction hybridization fragment (kb)		สายพันธุ์
	EcoRI	Pst I	
1	14,6.3,2.8,1.6	19.6,12.0,6.8,3.8,2.1,1.5	USDA6(9),USDA24(5), USDA38(14),THA6(1) USDA122(12),USDA136(13) USDA143(4),USDA 8-t(18) USDA35(22),USDA184(3), TAL377(23),USDA142(11) TAL 432(10)
2	12,2.1,1.4	19.6,12.0,1.5	THAI(20),TAL102(10), USDA8-0(8)
3	16,7.9,1.6	12,8.4,6.6,5.6,3.7,1.5	THA2(15),THA5(2) USDA117(6)
4	16.5,4.9,3.9	12,7,6.6,5.3,1.8	USDA31(7),TAL944(17) USDA94(2)
5		12,7,6.6,3.8,1.8	USDA76(19)

ที่ได้เป็น 8.6×10^7 cpm/ug และ 1.28×10^8 cpm/ug ส่วนเวลาที่จะทำให้ได้ incorporation สูงสุด ของ pSA 30 คือ 1 ชั่วโมง ส่วนของ pSL 42 คือ 1.30 ชั่วโมง ตามลำดับส่วนค่า % incorporation ของ pSA 30 คือ 43 % และ pSL 42 คือ 46 %

หลังจากแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของ

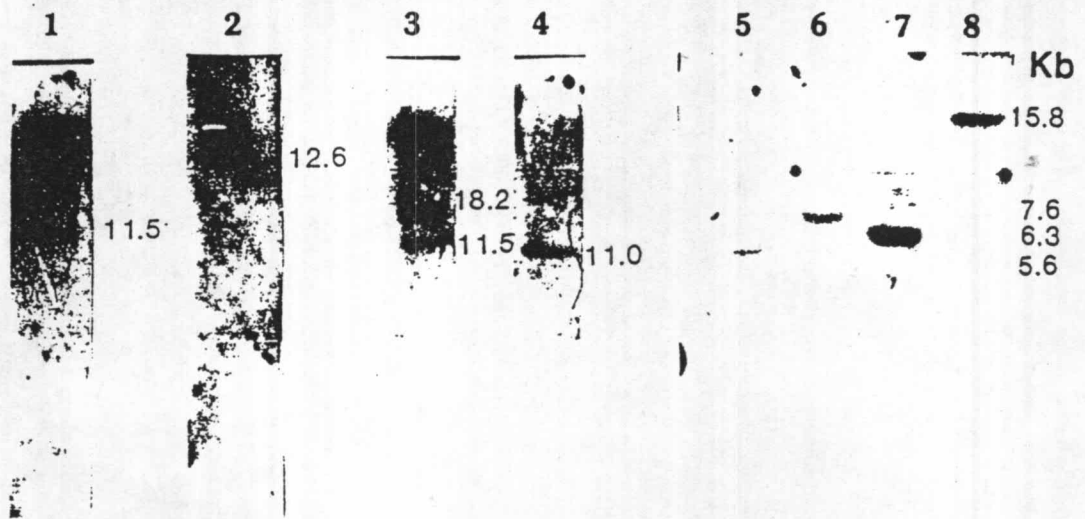
B. japonicum 23 สายพันธุ์ ด้วยเอนไซม์ EcoRI โดยการทำ อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว จึงเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอชิ้นสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส เมื่อนำไนโตรเซลลูโลสนี้มาหา RFLP โดยไฮบริดซ์กับ 32 PpSA 30 หลังเสร็จสิ้นจากการไฮบริดซ์แล้วจึงนำไปทำ Autoradiography แถบสีดำที่ปรากฏ แสดงถึงตำแหน่งของชิ้นโครโมโซมดีเอ็นเอที่มี nif genes อยู่ จากการหาขนาดดีเอ็นเอโดยคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสกับระยะทางการเคลื่อนที่ ชิ้นของดีเอ็นเอขนาดเล็กที่สุดที่จะตรวจสอบได้จากการทำอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่อะกาโรสเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ในระบบที่วิเคราะห์ในการวิจัยนี้คือ 500bp. ผลจากการทดสอบพบว่า จำแนกรูปแบบที่เกิดจากการไฮบริดซ์กับ 32 P-pSA 30 ของเชื้อทั้งหมด 23 สายพันธุ์ ได้เป็น 4 รูปแบบ (รูปที่ 18) รูปแบบที่ 1 8nv มีชิ้นส่วนที่ได้จากการไฮบริดซ์ขนาด 14, 6.3, 2.8, และ 1.6 กิโลเบส สายพันธุ์ของ B. japonicum ที่ให้รูปแบบที่ 1 คือ USDA 6(9), USDA 24(5), USDA 38(14), USDA 136 (12), USDA 143(4), THA 6(1) และ USDA 8-t(18) USDA 35(22), USDA 184(3), TAL 377(23) USDA 142(11), TAL 432(16) ดังแสดงในตารางที่ 8 รูปแบบที่ 2 มีชิ้นส่วนที่ได้จากการไฮบริดซ์ขนาด 12, 2.1 และ 1.4 กิโลเบส (รูปที่ 18 ช่องที่ 2) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่ 2 คือ THA 1(20), TAL 102(10), USDA 8-0(8) (ตารางที่ 8) รูปแบบที่ 3 มีชิ้นส่วนที่ได้จากการไฮบริดซ์ขนาด 16, 7.9 และ 1.6 กิโลเบส (รูปที่ 18 ช่องที่ 3) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่ 3 คือ THA 2(15), THA 5(2), และ USDA 117(6) (ตารางที่ 8) รูปแบบที่ 4 มีชิ้นส่วนที่ได้จากการไฮบริดซ์ขนาด 16.5, 4.9 และ 3.9 กิโลเบส (รูปที่ 18 ช่องที่ 4) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบ คือ USDA 31(7), TAL 944(17), USDA 76(19) และ USDA 94(21) (ตารางที่ 6)

หลังแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของ

B. japonicum 23 สายพันธุ์ ด้วย PstI โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วจึงเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้นขึ้นสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส เมื่อนำไนโตรเซลลูโลสนี้มาหา RFLP

โดยไฮบริดซ์กับ ³²P-pSA30 หลังจากการไฮบริดซ์แล้วนำไปปรากฏภาพบนแผ่นฟิล์ม X-ray ผลจากการทดลองพบว่าจำแนกรูปแบบที่เกิดจากการไฮบริดซ์ได้เป็น 5 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 มีชิ้นส่วนจากการไฮบริดซ์ขนาด 19.6, 12.0, 6.8, 3.8 2.1 และ 1.5 กิโลเบส (รูปที่ 19 ช่องที่ 1) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่ 1 เหมือนกันคือ USDA 6(9), USDA 24(5), USDA 38(14), USDA 136 (12), USDA 143(4), THA 6(1) และ USDA 8-t(18)2, USDA 35(22), USDA 184(3), TAL 377(23), USDA 142 (11), TAL 432(16) (ตารางที่ 6) รูปแบบที่ 2 มีชิ้นส่วนที่ได้จากการไฮบริดซ์ขนาด 19.6, 12 และ 1.5 กิโลเบส (รูปที่ 19 ช่องที่ 2) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบทั้ง 2 เหมือนกันคือ THA 1(20), TAL 102(10), USDA 8-0(8) (ตารางที่ 6) รูปแบบที่ 3 มีชิ้นส่วนที่ได้จากการไฮบริดซ์ขนาด 12.0, 8.4, 6.6, 5.6, 3.7 และ 1.5 กิโลเบส (รูปที่ 19 ช่องที่ 3) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่ 3 เหมือนกันคือ THA 2(15) THA 5(2) และ USDA 117(6) (ตารางที่ 6) รูปแบบที่ 4 มีชิ้นส่วนที่ได้จากการไฮบริดซ์ขนาด 12, 7, 6.6, 5.3 และ 1.8 กิโลเบส (รูปที่ 19 ช่องที่ 4) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่เหมือนกันคือ USDA 31(7), TAI 944(17), USDA 94(21) (ตารางที่ 6) รูปแบบที่ 5 มีชิ้นส่วนไฮบริดซ์ขนาด 12, 7, 6.6, 3.8 และ 1.8 กิโลเบส (รูปที่ 19 ช่องที่ 5) มีสายพันธุ์เดียวที่ให้รูปแบบนี้คือ USDA 76(19) (ตารางที่ 6)

การหา RFLP ช่องทั้ง 23 สายพันธุ์โดยใช้ BamHI และตัวติดตาม ³²PpSL 42 ผลจากการทดลองพบว่ารูปแบบที่เกิดจากการไฮบริดซ์ได้มีทั้งหมด 8 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 มีชิ้นส่วนจากการไฮบริดซ์ขนาดเดียว คือ 11.5 กิโลเบส (รูปที่ 20 ช่องที่ 1) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่ 1 เหมือนกันคือ USDA 6(9), USDA 24(5), USDA 38(14), USDA 136 (12), USDA 143(4), THA 6(1) และ USDA 8-t(18) (ตารางที่ 7) รูปแบบที่ 2 มีชิ้นส่วนไฮบริดซ์ขนาดเดียวคือ 12.6 กิโลเบส (รูปที่ 20 ช่องที่ 2) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่ 2 เหมือนกันคือ THA 1(20), TAL 102(10) และ USDA 8-0(8) (ตารางที่ 7) รูปแบบที่ 3 มีชิ้นส่วนไฮบริดซ์ขนาด 18.2 และ 11.5 กิโลเบส (รูปที่ 20 ช่อง 3) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่ 3 เหมือนกันคือ THA 2(15), THA 5(2) และ USDA 117(6) (ตารางที่ 7) รูปแบบที่ 4 มีชิ้นส่วนไฮบริดซ์ขนาดเดียวคือ 11 กิโลเบส (รูปที่ 20 ช่องที่ 4) สายพันธุ์ที่ให้รูปแบบที่ 4 เหมือนกันคือ USDA 35(22), USDA 184(3) และ TAL 377(23) (ตารางที่ 7) รูปแบบที่ 5-8 (รูปที่ 20 ช่องที่ 5-8) นั้นเป็นรูปแบบของสายพันธุ์ USDA 76(19), USDA 94(21), USDA 142(11) และ TAL 432(16) ตาม



รูปที่ 20 รูปแบบของ *nod* hybridization ที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization กับพลาสมิด ^{32}P -pSL 42

จากการนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีชิ้นส่วนของโครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. japonicum* ถูกย่อยโดย BamHI ไฮบริไดซ์กับ

^{32}P -pSL 42 ที่อุณหภูมิ 42 °C 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้าง และประกบกับฟิล์ม X-ray เป็นเวลา 3 วัน ที่ -70 °C.

จากผลพบว่ารูปแบบทั้งหมดที่ได้แบ่งตามความแตกต่างได้เป็น 5 รูปแบบ

- ช่องที่ (1) USDA 24(5); (2) TAL 102(10) ; (3) THA 5(2) ;
 (4) USDA 31(7); (5) USDA 76(19); (6) USDA94(21);
 (7) USDA142(11); (8) TAL432(16)

ตารางที่ 7 การจกกลุ่มของ *B. japonicum* 23 สายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ RFLP จากการทำ Southern blot hybridization กับ *nod* (Common *nod* gene) ของ *R. meliloti* อยู่บนพลาสมิด pSL42 ที่ใช้เป็นตัวติดตาม (probe)

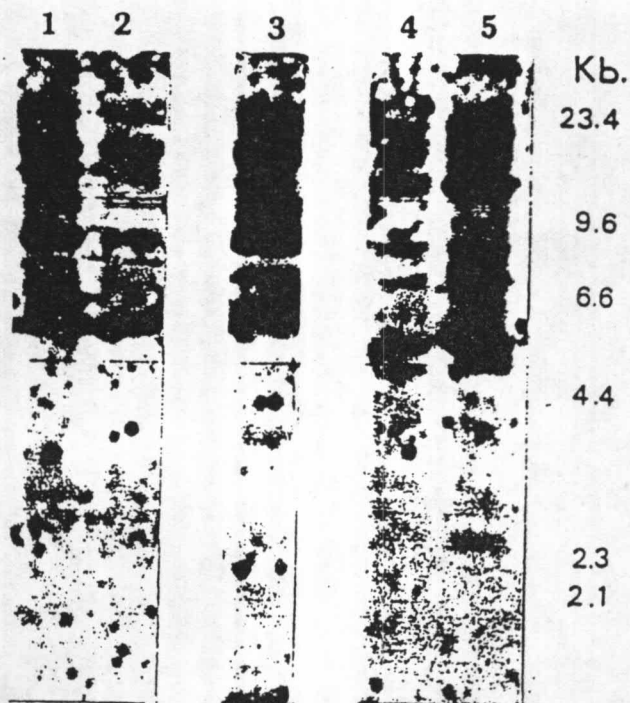
รูปแบบที่	Restriction hybridization fragment (kb)				สายพันธุ์
	BamHI	EcoRI	Pst I	HindIII	
1	11.5	ND	ND	ND	USDA6(9),USDA24(5), USDA38(14),USDA122(12), USDA136(13),THA6(1), USDA143(4),USDA8-t(18)
2	12.6	ND	11.5	ND	THAI(20),TAL102(10), USDA8-0(8)
3	18.2, 11.5	11.5, 8.8, 1.7	11.5, 3.5	ND	THA2(20),THA5(2),USDA117(6),
4	ND	13.8, 6	ND	ND	USDA35(22),USDA18(3), TAL377(23)
5	11.0	ND	8.7, 2.5	ND	USDA31(7),TAL944(17)
6	5.6	6	1.9, 1.5, 1.3	6.6, 1.5, 1.3	USDA76(19)
7	7.6	6	3.5, 2.4	5.8, 1.7, 1.4	USDA94(21)
8	6.3	13.8	3.5, 2, 1.9	7.6, 5.8, 1.7	USDA142(11)
9	15.8	13.8, 6.9, 4.0, 1.6	3.2, 2.3, 1.7, 1.6	6, 1.7, 1.3	TAL432(16)

ND = ไม่ได้พิจารณา

ลำดับ. ชิ้นส่วนของไฮบริดส์มีขนาด 5.6, 7.6, 6.3 และ 15.8 กิโลเบส ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากการหา RFLP ของสายพันธุ์ USDA 76(19), USDA 94(21), USDA 142(11) และ TAL 432(16) จากการย่อยโคโรโมโซมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์รีstriction เอ็นไซม์อื่น ๆ เช่น EcoRI ไฮบริดส์กับ ³²P-P-sL42 พบว่าสายพันธุ์ USDA 76(19) และ USDA 94(21) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์เหมือนกันคือ 6 กิโลเบส (รูปที่ 2) สายพันธุ์ USDA 142(11) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ 13.8 กิโลเบส สายพันธุ์ TAL 432(16) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ 13.8 กิโลเบส (รูปที่ 21 ตารางที่ 7) จากการย่อยด้วย Pst I (ตารางที่ 7) สายพันธุ์ USDA 76(19) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ขนาด 1.9, 1.5 และ 1.3 กิโลเบส สายพันธุ์ USDA 94(21) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ขนาด 3.5, 2.4 กิโลเบส สายพันธุ์ USDA 142(11) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ขนาด 3.5, 2 และ 1.9 กิโลเบส สายพันธุ์ TAL 432(16) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ขนาด 3.2, 2.3 1.7 และ 1.6 กิโลเบส จากการย่อยด้วย Hind III (แสดงตารางที่ 7) สายพันธุ์ USDA 76(19) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ขนาด 6.6, 1.5 และ 1.3 กิโลเบส สายพันธุ์ USDA 94(21) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ขนาด 5.8, 1.7 และ 1.4 กิโลเบส สายพันธุ์ TAL 432(16) มีชิ้นส่วนไฮบริดส์ 6, 1.7 และ 1.3 กิโลเบส

การทดลองทำ RFLP โดยใช้ตัวติดตามที่เป็น bacteriophage (M13) ผลจากการทดสอบเบื้องต้น (preliminary test) ในการใช้ตัวติดตาม M13 ที่ติดฉลากด้วย ³²P dCTP โดยวิธี random primer ไฮบริดส์กับโคโรโมโซมดีเอ็นเอ ของ B. japonicum บางสายพันธุ์ที่ถูกตัดด้วย EcoRI และถูกตรึงอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แสดงในรูปที่ 21 (ช่องที่ 1-7) สายพันธุ์ USDA 6(9), THA 6(1), THA 1(20) THA 2(15), USDA 117(6) ตามลำดับ



รูปที่ 21 รูปแบบของ M13 hybridization ที่ได้จากการทำ Southern blot และ hybridization กับ M 13 probe (ที่ตัดลากกับมันตภาพรังสีโดยวิธี random primer)

จากการนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีชิ้นส่วนของโครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. japonicum* บางสายพันธุ์ย่อยด้วย EcoRI ไฮบริไดซ์กับ 32 P-M13 ที่อุณหภูมิ 37 °C 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างและประกบกับฟิล์ม X - ray เป็นเวลา 3 วัน ที่ -70 °C จากผลการทดลองขั้นแรกเริ่มต้น (preliminary test) นั้นพบว่าให้รูปแบบที่แตกต่างกันหมดยกเว้นช่องที่ 1, 2 ช่องที่ (1) USDA 6(9); (2) THA 6(1); (3) THA 1(20); (4) THA 2(15) ; (5) USDA 117(6)

ตารางที่ 8 แสดงการจัดแบ่งกลุ่มของ *B. japonicum* 23 สายพันธุ์ โดย restriction pattern, nod RFLP และ nif RFLP

สายพันธุ์	Restriction pattern				<u>nod</u> RFLP		<u>nif</u> RFLP
	BamHI	EcoRI	HindIII	PstI	BamHI	EcoRI	PstI
USDA6(9),USDA24(5)			I		1	1	1
USDA38(14),USDA122(13)							
USDA136(12),USDA143(4)							
THA6(1),USDA8-t(18)							
THA1(20), TAL102(10)							
USDA8-0(8)			II		2	2	2
THA2(15), THA 5(2)							
USDA117(6)			III		3	3	3
USDA35(22), USDA184(3)							
TAL377(23)			IV		ND	1	1
USDA31(7),TAL944(17)			V		4	4	4
USDA76(19)			VI		5	4	5
USDA94(21)			VII		6	4	4
USDA142(11)			VIII		7	1	1
TAL432(16)			IX		8	1	1

ND = ไม่ได้พิจารณา