บทที่ 4

บทวิจารณ์

4.1 การทดสอบความสัมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ของ B. japonicum โดยใช้การเกิดปมและการตรึงไนโตรเจน

ทราบกันดีแล้วว่า กระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนพอ ๆ กับกระบวนการเกิดปม กระบวนการตรึงไนโตรเจนประกอบด้วยกระบวนการย่อย ๆ 5 กระบวนการ คือ

1. การสร้าง ATP
2. การสร้างอำนาจริดิวซ์
3. การถอดรหัสของจีนที่สร้างเอนไซม์ไนโตรจิเนส
4. การเร่งปฏิกิริยาของการตรึงไนโตรเจน
5. การนำหมู่แอมโมเนียมไปใช้

กระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นขบวนการที่ซับซ้อนกล่าวคือ

1. การควบคุมสารต้นตอที่จะนำมาสร้างพลังงาน (ATP) และอำนาจริดิวซ์จะขึ้นโดยพืช

2. การควบคุมการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนส และการนำผลผลิตของเอนไซม์ไปใช้ขึ้นกับผลการเจริญของไรโซเบียมในปม

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นปกติที่จะพบว่า สายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสไม่สูงมากนักแต่กลับให้ผลผลิตในรูปน้ำหนักแห้งของถั่ว สูงกว่าสายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีของไนโตรจิเนสสูงกว่า (เช่นสายพันธุ์ THA 6 (1), USDA 143(4) และ USDA 8-0(8)) ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมจากต้นพืช จึงเป็นวิธีการที่ต้องทำอยู่แม้จนทุกวันนี้

จากผลการทดลองที่พบว่า THA 2 (15), THA 5(2), และ USDA 117(6) ซึ่งให้ตำแหน่งการเกิดปมต่างกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองส่วนใหญ่ โดยเกิดปมกระจาย

ตามรากแก้วและรากแขนง THA 2 (15), THA 5(2) และ USDA 117 (6) นี้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสค่อนข้างต่ำทั้งที่มีจำนวนปมสูงและให้น้ำหนักแห้งต้นพืชต่างกันตามลำดับต่อไปนี้ (THA5 > USDA117 > THA2 รูปที่ 6A,C,D,E) เป็นเครื่องแสดงว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเป็นเรื่องของความซับซ้อน รวมทั้งบริเวณที่เกิดของปมที่อยู่ตรงรากแก้วซึ่งพบว่าส่วนใหญ่จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสสูงกว่าที่พบอยู่กระจายตามรากแก้วและรากแขนง ก็บ่งชี้ถึงดิฟเฟอเรนทิเอชันของแบคทีเรียในเซลล์พืชที่แตกต่างกันอยู่นั่นเอง

จากผลการทดลองพบว่าในบางสายพันธุ์เช่น USDA 76(19) และ USDA 94 (21) สามารถเกิดปมในปริมาณสูงใกล้เคียงกันทั้งสองสายพันธุ์ แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสต่างกันมากโดย USDA76(19) มีแอคติวิตีต่ำกว่า USDA 94(21) ถึง 6 เท่า (รูปที่ 6 A,B,C) แต่ให้น้ำหนักต้นแห้งค่อนข้างต่ำ ทั้งคู่ นอกจากนั้นทั้งสองสายพันธุ์ยังทำให้พืชมีลักษณะอาการขาดธาตุเหล็ก เนื่องจากปมถั่วผลิตสาร rhizobiotoxin ยับยั้งไม่ให้พืชสร้างคลอโรฟิลล์ จากผลครั้งนี้บ่งชี้ได้ว่าอาจจะมีความแตกต่างกันในการทำงานของเอนไซม์ในโตรจิเนสในระดับจีน

4.2 <u>การใช้ Restriction pattern เพื่อแบ่งกลุ่ม B.japonicum</u>

การจำแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ (species) ของไรโซเบียม นิยมใช้การทดสอบการติดปมกับถั่ว และนิยมใช้สมบัติทางสรีระวิทยา เช่น ช่วงเวลาการเจริญ และนิยมแบ่งกลุ่มย่อยระหว่างสปีชีส์ (species) โดยใช้การสังเกตความสามารถในการใช้สารต้นตอคาร์บอน หรือไนโตรเจนที่แตกต่างกัน หลังจากเทคนิคทางชีวเคมีได้รับการพัฒนาขึ้นก็มีการนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ในระดับลึกถึงโมเลกุล เช่นการใช้ ELISA (Enzyme Link Immunosorbent Assay) เป็นต้นซึ่ง ดร.นันทกร และคณะ, 1989 ได้อาศัยเทคนิคนี้ในการแบ่งสายพันธุ์ <u>B. japonicum</u> 23 สายพันธุ์เดียวกันนี้ในการทดลองและแบ่งได้เป็น 8 กลุ่ม โดยอาศัยผลของการเกิดปฏิกริยา Cross-reaction แสดงในตารางที่ 9 อย่างไรก็ตาม เทคนิค ELISA นี้เป็นการทดสอบที่แสดงถึงความคล้ายคลึงกันของผิวเซลล์ของเซลล์ทั้งเซลล์ เพราะได้ใช้ผนังเซลล์ของไรโซเบียมเป็นแอนติเจน (cell surface antigen) การใช้ cell surfaceเป็นแอนติเจนนั้น สัตว์จะสร้างระบบแอนติบอดีที่ซับซ้อนและอาจจะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา cross-reaction จะทำให้

การจำแนกสายพันธุ์ให้ความแตกต่างน้อยลง การที่จะปรับปรุง ELISA เทคนิคโดยการทำแอนติเจนให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นหรือ การพยายามที่จะทำ monoclonal antibody เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากมาก ในการเตรียมแอนติเจน ถ้ามีสิ่งปนเปื้อน เพียง 1 % ในการ immunize ก็จะทำให้สารปนเปื้อนนั้นมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนเช่นกัน และจากการทดสอบที่พบว่ามีการเกิด cross reaction สาเหตุหนึ่งนั้นอาจมาจากความจำเพราะ ของ antisera มีน้อยฉะนั้นจะต้องเสียเวลามากขึ้น ในการทำให้ antisera บริสุทธิ์

การนำเอาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ โดยอาศัยความรู้จากการสกัดโครโมโซมัลดีเอนเอและความรู้เรื่องเรสทริกชัน เอนไซม์ มีคุณสมบัติในการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอนเอ โดยมี recognition sequence ต่าง ๆ กันไป ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 4-6 bp. การศึกษารูปแบบของดีเอนเอที่ได้จากการย่อยด้วย restriction enzyme (restriction pattern) เป็นการใช้บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ในระดับดีเอนเอได้ ปัจจุบันมีการใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์หลายชนิด เช่น Streptomyces spp. (Ono ,1982) ,Azotobacter spp. (ยิ่งพิศ ยอดโยธี วิทยานิพนธ์ ,1988) แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีข้อจำกัดก็คือดีเอนเอที่นำมาใช้ควรจะมีขนาดไม่ใหญ่มาก และควรมี reiterate sequence สูงไม่เช่นนี้จะทำให้รูปแบบหลังตัดไม่ได้แถบดีเอนเอที่ชัดเจนสูง (smear)

จากผลการทดลองครั้งนี้ดีเอนเอที่สกัดได้มีขนาดประมาณ 73 กิโลเบส (Brock 1974) อยู่ในรูป high molecular weight และมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูงดังจะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260:280 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.8 จากการตรวจสอบบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของ RNA และแสดงถึงดีเอนเอที่ได้มีขนาดเดียว (รูปที่ 8)

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า ปัญหาสำคัญของการสกัดโครโมโซมัลดีเอนเอคือเมือก (slime) ที่ไรโซเบียมสร้างขึ้นทำให้ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอนเอทำให้สกัดได้ในปริมาณน้อย การทดลองใช้อาหารสูตรที่ลดเมือกหรือการใช้ sodium chloride 1 โมลาร์ ล้างเซลล์แบคทีเรียก่อนการสกัดช่วยทำให้ลดปัญหาได้

แถบดีเอนเอที่ได้หลังการย่อยด้วย เรสทริกชัน เอนไซม์ และตรวจสอบโดย อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าเป็น discrete band ชัดเจน จากผลที่ได้นี้แสดงถึงบนโครโมโซมัลดีเอนเอนั้น มีบริเวณที่เป็น recognition sequence อยู่หลายชุดซึ่งแสดงถึงการมี reiterate sequence กระจายอยู่บนโครโมโซม ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Betler และคณะ, 1983 ที่พบว่าบนโครโมโซมัลดีเอนเอของ Rhizobium spp.มี reiterate sequence นอกจากนี้ยังพบว่ามี reiterate sequence ใน Streptomyces spp. (Ono,1982) เช่นกัน

จาก restriction pattern รูปที่ 14 จำแนกความแตกต่างของ B. Japonicum 23 สายพันธุ์ออกได้เป็น 9 กลุ่มโดยที่ restriction pattern (VI-IX) นั้นเป็นรูปแบบที่มีความจำเพาะของสายพันธุ์ USDA 76(19),USDA 94(21), USDA 142(11) และ TAL 432(16) ตามลำดับ สำหรับrestriction pattern (I-V) นั้นประกอบด้วยสายพันธุ์ที่แตกต่างกันออกเป็นกลุ่ม ๆ ไป ถึงแม้จะมีการเปลี่ยน restriction enzyme ชนิดอื่น ๆ จาก EcoRI เป็น BamHI,HindIIIและ PstI ก็ยังคงให้รูปแบบที่แสดงความแตกต่างเฉพาะของสายพันธุ์ทั้ง 4 ได้แก่ USDA 76(19),USDA 94(21), USDA 142(11) และ TAL 432(16) ได้เท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ที่ให้ restriction pattern กลุ่มเดียวกันก็คงให้ restriction pattern ในรูปที่สอดคล้องกันไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จาก EcoRI เป็น BamH ,HindIII และ PstI แล้วก็ตาม

จากการจัดกลุ่มที่ใช้วิธีการทาง serology โดย ELISA (นันทกรและคณะ, 1989) กับ restriction pattern พบว่ามีความสัมพันธ์กันคือ สายพันธุ์ที่มีปฏิกิริยา cross reaction กันจะให้ restriction pattern เหมือนกันและสายพันธ์ที่ไม่เกิด cross reaction 4 สายพันธุ์ ได้แก่ USDA 76(19),USDA 94(21), USDA 142 (11) และ TAL 432(16) จะให้ restriction pattern ที่ต่าง ๆ กันไปแต่อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ในกลุ่มของ ELISA ของ cross reaction กลุ่มที่ 2 นั้นพบว่ามี restriction pattern 2 รูปแบบ โดยที่รูปแบบของสายพันธุ์ที่ใช้เป็น antisera หลัก TAL 102(10) มี restriction pattern คล้ายกับ THA I(20),USDA 8-0(8) กว่า rest0(8) กว่า restriction pattern ของ THA 2(15),THA 5(2) และ USA 117(6) จากผลครั้งนี้แสดงว่าการใช้ restriction pattern ในการจำแนกสายพันธุ์ สามารถจำแนกความแตกต่างในสายพันธุ์ที่อยู่ใน serogroup เดียวกันได้ จาก

ตารางที่ 9 ปฏิกิริยา ELISA ระหว่างสายพันธุ์ไรโซเบียมและ antisera ของแต่ละสายพันธุ์

Strains \ Antisera	USDA 6	USDA 24	USDA 38	USDA 122	USDA 136	USDA 143	THA 6	TEX 8-T	THA 1	TEX 8-0	USDA 110	THA 2	THA 5	USDA 117	USDA 35	USDA 184	TAL 377	USDA 31	TAL 944	USDA 76	USDA 94	USDA 142	TAL 432
USDA 6	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 24	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 38	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 122	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 136	+	+	+	+	+	+	+	+															
USDA 143	+	+	+	+	+	+	+	+															
THA 6	+	+	+	+	+	+	+	+															
TEX 8-T	+	+	+	+	+	+	+	+															
THA 1									+	+	+	-	-	-									
TEX 8-0									+	+	+	-	-	-									
USDA 110									+	+	+	+	+	+									
THA 2									-	-	+	+	+	+									
THA 5									-	-	+	+	+	+									
USDA 117									-	-	+	+	+	+									
USDA 35															+	+	+						
USDA 184															+	+	+						
TAL 377															+	+	+						
USDA 31																		+	+				
TAL 944																		+	+				
USDA 76																				+			
USDA 94																					+		
USDA 142																						+	
TAL 432																							+

รายงานของ Schmidt, L.D. และคณะ,1986 พบว่ามีความแตกต่างของ restriction pattern ในสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มของ serogroup เดียวกันได้ การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Schmidt,L.D. และคณะ, 1986 ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างของ restriction pattern ในสายพันธุ์ของ B. japonicum ที่อยู่ในกลุ่มของ serogroup 123

ดังได้กล่าวแล้วว่าเป้าหมายของการคัดเลือกสายพันธุ์ของ B. japonicum ก็เพื่อจะให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนสูงสุด ดังนั้นจึงมุ่งความสนใจไปที่จีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนและการเกิดปม จึงเป็นเหตุให้ใช้ nif structural genes (nif HDK) และ common nod genes (nod ABC และ D) เป็นจีนติดตาม (probe) เพื่อแสดงความเชื่อมโยงระหว่างสายพันธุ์ทั้ง 23 สายพันธุ์กับการแสดงถึงประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนโดยวัดจากค่า ARA และการเกิดปมกับการจัดเรียงตัวบนโครโมโซมของจีนทั้ง 2 กลุ่มที่เกี่ยวข้องนี้

4.3 การใช้ RFLP (restriction fragment length polymorphism)

เนื่องด้วยจีนที่ใช้เป็นตัวติดตามนั้นคือ nif HDK และ nod ABC และ D อยู่ในรูป recombinant plasmid pSA30 และ pSL42 ตามลำดับ ซึ่ง pSA30 และ pSL42 มีดีเอนเอพาหะเป็น (vector) pBR322 และ pACYC184 ตามลำดับ เพื่อทดสอบว่าส่วนของดีเอนเอพาหะของ plasmid ทั้ง 2 นั้นจะมีส่วนที่จะไฮบริไดซ์ระหว่างโครโมโซมัลดีเอนเอของ B. japonicum ทั้ง 23 สายพันธุ์หรือไม่ จึงทำการทดลองโดยวิธี dot blot hybridization ระหว่างโครโมโซมัลดีเอนเอของ B. japonicum กับ ^{32}P-pBR322 และ ^{32}P-pACYC184 ผลแสดงไว้ใน พบว่าส่วนของดีเอนเอพาจะไม่ไฮบริไดซ์ กับโครโมโซมัลดีเอนเอของ B. japonicum ทั้ง 23 สายพันธุ์ (ภาคผนวก ช) ดังนั้นจึงใช้ pSA30 และ pSL42 เป็นตัวติดตามในการทดลองทั้งหมดต่อไป

จาก nif และ nod genes สามารถไฮบริไดซ์กับโครโมโซมัลดีเอนเอของ B. japonicum ทั้ง 23 สายพันธุ์ได้แสดงให้เห็นว่า nif structural genes และ common nod genes นั้นอยู่บนโครโมโซม ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Masterson,V.R.และคณะ,1985 ที่พบว่า B. japonicum มี nif และ nod อยู่บน

โครโมโซมแต่ใน R.japonicum พบว่าทั้ง nif และ nod อยู่บนโครโมโซมและพลาสมิดด้วย

รูปแบบของ nif hybridization ที่มีความแตกต่างกันนั้นสามารถแสดงถึงความแตกต่างในการเรียงตัวของ nif structural gene (physical gene organization) และหรือแสดงความแตกต่างที่เกิดในลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ nif structural gene, Kaluza, และคณะ,1983 พบว่า nif H ใน B.japonicum แยกจาก nif DK แต่ใน K. pneumoniae นั้น nif HDK อยู่ติดกัน นอกจากนี้ความแตกต่างที่ได้จากการทำ nif hybridization นั้นอาจจะโยงใยไปถึงความแตกต่างในหน้าที่การทำงานของจีนที่เกี่ยวข้องนั้น ๆ ซึ่งเคยมีรายงานของ Sadowsky ,J.M. และคณะ, 1987 ซึ่งใช้ nif DH เป็นตัวติดตามผลการทดลองพบว่า RFLP ของ B.japonicum ใน serogroup 123 ประกอบด้วย 29 สายพันธุ์จะเหมือนกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีความสัมพันธุ์กันระหว่างการจัดกลุ่มด้วย RFLP และการจัดกลุ่มด้วย serology นอกจากนั้นยังพบว่ามีความสัมพันธุ์กับจำนวนปมของถั่วเหลืองด้วย

ผลจากการทดลองครั้งนี้จำแนกความแตกต่างของรูปแบบ nif hybridization จากการใช้ EcoRI ได้ถึง 4 รูปแบบ ขนาดชิ้นที่ได้จากการทำไฮบริไดซ์นั้นเสมอมากกว่า 1 ชิ้น แสดงว่าจุดตัดของ EcoRI นั้นอยู่ภายใน nif HDK ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับการที่ชิ้นดีเอนเอที่ไฮบริไดซ์บางชิ้นจะมีขนาดเล็กกว่าขนาดของ nif HDK ตารางที่ 8 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า B. japonicum 23 สายพันธุ์มี RFLP เมื่อใช้ EcoRI และ ^{32}P-nif HDK เพียง 4 กลุ่มเท่านั้นแสดงให้เห็นว่าใน B. japonicum ทั้ง 23 สายพันธุ์นี้นอกจากมีส่วน nif HDK ที่ conserve แล้วยังมี sequence บริเวณรอบ ๆ nif HDK ที่ conserve ด้วย (บริเวณ upstream) ข้อสรุปทำนองนี้ได้พบจากการศึกษาใน R. japonicum โดย Hadley และคณะ ,1983 เช่นกัน

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า restriction pattern ของ B. japonicum ทั้ง 23 สายพันธุ์เมื่อตัดด้วย EcoRI ,BamHI,HindIII และ PstI มีถึง 9 แบบ แต่ nif hybridization pattern เมื่อตัดด้วย EcoRI มีเพียง 4 แบบแสดงว่าบาง restriction pattern ที่ต่างกันให้ nif hybridization pattern ที่เหมือนกัน ยิ่งแสดงให้เห็นว่า nif HDK และบริเวณใกล้เคียงมีลักษณะ conserve มาก แต่อย่างไร

ก็ตามเมื่อศึกษารูปแบบของ nif hybridization ที่ได้จากการย่อยด้วย PstI นั้น จำแนกได้ถึง 5 รูปแบบ ซึ่งมากกว่าการย่อยด้วย EcoRI ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้ restriction enzyme ย่อยตัดดีเอนเอมีผลในการจำแนกความแตกต่างด้วย คาดว่าถ้ามีการใช้ restriction enzyme ที่มีจุดตัดอยู่ภายในบริเวณ nif genes จะทำให้การจัดจำแนกได้ความแตกต่างมากยิ่งขึ้น หรือการใช้ restriction enzyme ที่มี recognition sequence ในช่วง 4 bp. ซึ่งถ้าดีเอนเอนั้นมีจุดตัดบริเวณนี้และมีความแตกต่างกันก็ทำให้ได้ความแตกต่างของรูปแบบการไฮบริไดซ์มากขึ้น

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ ระหว่างการตรวจสอบโดยใช้รูปแบบของ nif hybridization กับหน้าที่การทำงานของจีนนั้น ๆ พบว่าสำคัญค่า ARA ซึ่งแสดงถึงไนโตรจีเนส แอคติวิตีนั้นไม่มีความสัมพันธ์กันกับรูปแบบของ nif hybridization

รูปแบบของ nod hybridization ที่ได้จากการย่อยด้วย BamHI จำแนกได้เป็น รูปแบบจาก 20 สายพันธุ์ รูปแบบที่ได้ส่วนใหญ่นั้นจะให้ชิ้นส่วนของ nod มีขนาดเดียวและมีขนาดใหญ่กว่า nod ABC และ D ที่ใช้เป็นตัวติดตามนั้นแสดงให้เห็นว่า BamHI นั้นตัดภายนอกบริเวณของ nod ABC และ D แต่ในรูปแบบของ nod hybridization ที่ 3 ได้แก่สายพันธุ์ THA 2(15),THA 5(2) และ USDA 117(6) ที่ได้ชิ้นส่วน 2 ขนาด อาจจะมีการตัดภายใน nod ABC และ D (รูปที่ 20 ,ตารางที่ **8**)

จากผลครั้งนี้ถึงแม้ nod ABC และ D ที่เป็น conserve gene เช่นเดียวกับ nif HDK แต่การจัดจำแนกความแตกต่างจาก nod ABC และ D ได้มากกว่า (ตารางที่ **8**) ซึ่งอาจจะเป็นผลจากการเลือกใช้ restriction enzyme ที่ยังไม่เหมาะสมสำหรับการจำแนกโดยใช้ nif HDK ก็เป็นไปได้ หรืออาจเป็นเพราะว่าบริเวณใกล้เคียง (upstream และ downstream) ของ nod ABC และ D ในสายพันธุ์ต่าง ๆ มีความแตกต่างกันมาก

ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจสอบโดยใช้รูปแบบของ nod hybridization จากหน้าที่การแสดงออกของจีนนั้นเมื่อพิจารณาจากลักษณะการเกิดปมที่เกิดบริเวณรากแก้วนั้นจะมีรูปแบบของ nod hybridization ต่าง ๆ กันไป แต่สำหรับลักษณะการเกิดปมที่เกิดกระจายตามรากแก้วและรากแขนงนั้นจะมีรูปแบบของ nod hybridization ที่

เฉพาะต่างจากรูปแบบทั้งหมดที่ได้ และจากจำนวนปมพบว่าในสายพันธุ์ที่เกิดลักษณะเช่นนี้จะให้จำนวนปมสูงอยู่ใน 3 อันดับแรก ความสัมพันธ์ที่พบเช่นนี้อาจจะเป็นสิ่งที่ชี้บอกถึงลักษณะการเกิดปมนั้นอาจมีส่วนเกี่ยงข้องกับ nod gene ก็เป็นไปได้ Kondorosi และคณะ, 1989 ได้รายงานว่าการเกิดปมในช่วง late nodule development เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร ที่มีผลในการเกิดปมในช่วงนี้ สารนั้นขึ้นกับการทำงานของ nod gene

Stanley และคณะ, 1985 Kaijalainen และคณะ, 1985 แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวติดตามที่เป็น conserve gene นั้นจะทำให้จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้น้อยลงและกล่าวไว้ว่า จีนเหล่านี้ซึ่งได้แก่ nif และ nod จะมีวิวัฒนาการเกิดการเปลี่ยแปลงในบริเวณน้อยกว่าจีนในบริเวณอื่น ๆ ที่อยู่บนโครโมโซม ดังนั้นความแตกต่างที่อาจพบได้ใน conserve gene นั้นจึงมีน้อยมาก ในกรณีที่พบนั้นถือได้ว่าเกิด genetic diversity ซึ่งสามารถหาได้จากการเปรียบเทียบชิ้นส่วนของจีนที่เปลี่ยนไปเทียบเป็นเปอร์เซนต์ของการเกิด sequence divergence จะพบว่าจะมีเปอร์เซนต์ต่ำกว่าการใช้ตัวติดตามที่ไม่ใช่ nif และ nod ซึ่งจัดว่าเป็น conserve genes

ในการวิจัยครั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ RFLP โดยใช้ nif และ nod เป็นตัวติดตามแล้วพบว่าใช้จัดจำแนกกลุ่มของ B. japonicum ได้ไม่ค่อยดีนัก จึงทดลองนำเอา M13 ซึ่งเป็น bacteriopha ที่มี tandem repeat ซึ่งมาใช้เป็นตัวติดตามมีขนาด 13 bp. tandem repeat นี้มีผู้รายงานว่าพบได้ในโครโมโซมัลดีเอนเอของคน, สัตว์, พืช และแบคทีเรีย และจากรายงานของ ทัศนาชจร และคณะ, 1988 ได้รายงานไว้ว่าการจำแนกความแตกต่างของดีเอนเอในคนโดยการใช้ M13 เป็นตัวติดตามจะให้ความไว (sensitivity) สูงและให้ resolution ดีกว่าตัวติดตามอื่น ๆ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำทดลองเบื้องต้นโดยใช้โครโมโซมัลดีเอนเอของ B. japonicum บางสายพันธุ์ที่ย่อยด้วย EcoRI มาไฮบริไดซ์กับ M13 ที่ติดฉลากโดยวิธี random primer ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 21 แถบที่ได้จะมีจำนวนมากกว่าการใช้ nif และ nod เป็นตัวติดตาม แต่ผลที่ได้ยังไม่เห็นว่าให้ความแตกต่างได้ละเอียดกว่าการใช้ nif และ nod เป็นตัวติดตาม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใช้จำนวนสายพันธุ์ที่น้อยเกินไปและอาจจะยังเลือกใช้เรสทริกชันเอนไซม์ที่ไม่เหมาะสม จากรายงานของ Wheatcroft, R และ Watson, J.R., 1987 ได้ลองใช้ IsRm เป็นตัวติดตามที่เป็น tandem repeat เป็นตัวติดตาม พบได้ใน R. meliloti สามารถนำมาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิ้

ได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ตัวติดตามอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากการใช้ nif structural gene และ common nod gene ได้แก่ hemA, glnA เป็นตัวติดตามที่ให้ความแตกต่างมากกว่า (Kaijalainen ,1989) nif และ nod genes