

การวิเคราะห์พันธุกรรมของไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อย ศรีสะเกษ 1 โดยเทคนิค RAPD-PCR

Genetic Analysis of Native Silkworm, Nangnoi Si Sa Ket 1 Variety, by RAPD-PCR Technique

จารุวรรณ จันทรา^{1/} จิราพร ตยุดิวิฏกุล^{1/} อังสนา อัครพิศาล^{2/} ทิพนรณี เสนะวงศ์^{3/}
และ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ^{4/}
Jaruwat Chanttra^{1/}, Jiraporn Tayutivutikul^{1/}, Angsana Akarapisan^{2/}, Tipanee Senawong^{3/}
and Weerathep Pongprasert^{4/}

Abstract: Thai native silkworm (*Bombyx mori* L.), Nangnoi Si Sa Ket 1, one of the certified varieties from Department of Agriculture, has been extensively distributed to others research stations in Thailand for sericulture promotion at farm level. Due to rapid multiplication rate, the genetically alteration and contamination within the variety presumably occurred. Accordingly, genetic analysis of native silkworm, Nangnoi variety based on Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) Technique was carried out to determine variation of this variety collected from various sericulture stations including Chiang Mai, Mukdahan, Nong Khai, Roi Et, Sakon Nakhon, Si Sa Ket, Ubon Ratchathani, and Udon Thani. Three native silkworm varieties including Kiewsakon, Nanglai, and Nangluang and also one wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval) variety were selected and assigned as corresponding referenced band patterns. DNAs of those silkworms were extracted from haemolymph and 18 RAPD primers were applied to random amplification. RAPD products were spreaded

^{1/} ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{2/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{3/} สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{4/} ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก 65000

^{1/} Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{2/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{3/} The Queen Sirikit Institute of Sericulture, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

^{4/} Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

on agarose gel-electrophoresis and polyacrylamide gel-electrophoresis to generate polymorphisms of DNA band pattern. RAPD primers OPO-07 and OPD-11 produced specific bands at 430 and 100 bp that specified Nangnoi Ubon obtained from Roi Et from others. Meanwhile, RAPD primer, OPN-02, also produced 2 specific bands. First band, 985 bp in size, differentiated between Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai from others and second band, 434 bp in size, separated Nangnoi into 2 groups: Nangnoi Ubon and Nangnoi Si Sa Ket. The combined analysis of band pattern generated by all those 3 primers supported that Nangnoi Ubon and Nangnoi Si Sa Ket was genetically related and recently diverged from each other perhaps caused mainly by the screening process during mass rearing of Nangnoi Si Sa Ket 1 in various research stations.

Keywords: Genetic analysis, Thai native silkworm, Nangnoi Si Sa Ket 1, RAPD-PCR

บทคัดย่อ: ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เป็นไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์หนึ่งที่ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร และมีการแพร่ขยายพันธุ์ไปยังสถานที่ทดลองหม่อนไหมอื่น ๆ ทั่วประเทศไทยอย่างรวดเร็ว เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงอย่างกว้างขวาง ทำให้มีปัญหาความไม่บริสุทธิ์ภายในสายพันธุ์เกิดขึ้น ดังนั้นจึงได้ดำเนินการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ขึ้น ด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) เพื่อศึกษาความแปรปรวนของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่กระจายอยู่ตามศูนย์วิจัยหรือสถานที่ทดลองหม่อนไหมต่าง ๆ ได้แก่ เชียงใหม่ มุกดาหาร หนองคาย ร้อยเอ็ด สกลนคร ศรีสะเกษ อุบลราชธานี และอุดรธานี โดยใช้ไหมพื้นเมือง 3 พันธุ์ คือ เขียวสกล นางลาย และนางเหลือง และไหมป่า 1 พันธุ์ คือ *Samia ricini* Boisduval เป็นตัวเปรียบเทียบนอกกลุ่ม ดีเอ็นเอจากหนอนไหมสามารถสกัดได้จากเลือด และจากการใช้ RAPD ไพรมเมอร์ จำนวน 18 ไพรมเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แล้วตรวจสอบแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล และโพลีอะคริลไมด์เจล ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย พบว่าไพรมเมอร์ OPO-07 และ OPD-11 มีแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงขนาด 430 และ 100 คู่เบส ตามลำดับ สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างไหมพันธุ์นางน้อยอุบลที่ได้จากร้อยเอ็ดออกจากไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่มาจากแหล่งอื่น ๆ ได้ และไพรมเมอร์ OPN-02 พบแถบดีเอ็นเอเฉพาะ 2 แถบ มีขนาด 985 และ 434 คู่เบส โดยแถบแรกสามารถใช้จำแนกไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษจากหนองคายออกจากไหมพันธุ์นางน้อยจากแหล่งอื่น ๆ ได้ และแถบดีเอ็นเอที่สองมีขนาดเล็กกว่าสามารถใช้จำแนกไหมพันธุ์นางน้อยได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มนางน้อยศรีสะเกษและกลุ่มนางน้อยอุบลได้ ผลการวิเคราะห์ dendrogram จากการรวมข้อมูลของทั้ง 3 ไพรมเมอร์ พบว่า ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไหมนางน้อยที่ได้จากอุบลราชธานีมาก และมีแนวโน้มของการแยกตัวได้ไม่นาน ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการคัดเลือกในระหว่างการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ของนางน้อยศรีสะเกษ 1 ของศูนย์หรือสถานีวิจัยหม่อนไหมในสถานที่ต่าง ๆ

คำสำคัญ: การวิเคราะห์พันธุกรรม ไหมไทยพื้นเมือง พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 RAPD-PCR

คำนำ

ไหม (*Bombyx mori* Linnaeus) เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย ในช่วงเวลาที่ผ่านมา รัฐบาลได้ให้ความสำคัญโดยส่งเสริมการเพาะเลี้ยง

สนับสนุนการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ไหมเพื่อให้ได้เส้นไหมที่มีคุณภาพดีขึ้นมาโดยตลอด ปัจจุบันพันธุ์ไหมที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมีทั้งไหมพื้นเมือง ไหมพันธุ์ไทยลูกผสม และไหมพันธุ์ลูกผสมต่างประเทศ (สมโพธิ, 2539) ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์หลักที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงกัน

อย่างแพร่หลาย คือ พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ซึ่งได้รับการรับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร ปรับปรุงพันธุ์ครั้งแรกที่ศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ และได้แพร่ขยายไปยังสถานีหม่อนไหมอื่น ๆ ทั่วประเทศไทยอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงอย่างกว้างขวาง จนทำให้ไม่สามารถผลิตไข่เพื่อการแจกจ่ายไปยังเกษตรกรผู้เลี้ยงได้อย่างพอเพียง สถานีหม่อนไหมแห่งอื่น ๆ รวมทั้งเกษตรกรจึงผสมพันธุ์ใหม่ขึ้นเอง ทำให้เกิดปัญหาในเรื่องของควมบริสุทธิ์ภายในสายพันธุ์ขึ้น เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ใหม่ดังกล่าวเป็นอย่างมาก และยากลำบากต่อการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ซึ่งจำเป็นต้องใช้สายพันธุ์แท้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์เพื่อกำหนดสายเลือดได้อย่างถูกต้องและชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 และนางน้อยอุบล ซึ่งการจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือสรีรวิทยา ของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่กระจายตามแหล่งเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กระทำได้ยาก จำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (สุรินทร์, 2545)

ปัจจุบันมีวิธีที่สามารถช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำมาก คือ วิธีการทางชีวโมเลกุล (กฤษณะ, 2545) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตรวจสอบความแตกต่างของขนาดหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมาย (สุรินทร์, 2545) โดยการวิเคราะห์พันธุกรรมโดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) และเป็นวิธีที่สามารถใช้จำแนกพันธุ์ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตภายในกลุ่มประชากรเดียวกันได้อย่างมีประสิทธิภาพสามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ต้นทุนต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ (Hoy, 2003; Hadrys *et al.*, 1992) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค RAPD มาใช้วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 โดยการสร้างแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific band) ของไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งมีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์มากได้ โดยข้อมูลที่ได้รับ

นอกจากช่วยในการจัดจำแนกสายพันธุ์แล้วยังเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการสร้าง probes หรือ primers หรือโมเลกุลเครื่องหมายอื่น ๆ เพื่อใช้ตรวจสอบและรับรองพันธุ์ต่อไปในอนาคต (Nagaraja and Nagaraju, 1995; Promboon *et al.*, 1995)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ทำการรวบรวมหนอนไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ ศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี สถานีทดลองหม่อนไหมหนองคาย สถานีทดลองหม่อนไหมสกลนครและพันธุ์นางน้อยอุบล จากสถานีทดลองหม่อนไหมเชียงใหม่ สถานีทดลองหม่อนไหมมุกดาหาร ศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ และสถานีทดลองหม่อนไหมร้อยเอ็ด ส่วนพันธุ์นางเหลืองจากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ พันธุ์เขียวสกลและพันธุ์นางลายจากสถานีทดลองหม่อนไหมเชียงใหม่ และไหมป่า (*Samia ricini* Boisduval) จากศูนย์บริหารศัตรูพืชจังหวัดเชียงใหม่

2. ทำการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจาก haemolymph ของหนอนไหม โดยตัดขาเทียมด้วยกรรไกรสะอาด รองรับ haemolymph ที่ไหลออกมาลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เต็ม 2 เท่า ของ ultrapure water นำไปปั่นจนสังเกตเห็นกลุ่มของเส้นใยในสารละลาย ใช้ pipette tip เกี่ยวเอากลุ่มเส้นใยออกมาและย้ายใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ซึ่งมี TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่านำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3. การสกัดดีเอ็นเอได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) และประทีป และคณะ (2545) โดยนำหลอดจากข้อ 2 เต็ม Proteinase-K 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง เขย่าหลอดอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา เติมน้ำ phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา (inversion) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสขึ้นบน

(supernatant) ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้น ทำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol (24 :1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมสารให้เข้ากันโดย คว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 5 M NaCl ในปริมาตร 1 ต่อ 10 เท่าของปริมาตร และ absolute ethanol ที่แช่เย็น 1 เท่าของปริมาตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เท สารละลายออก และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายออก นำไป อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จึงละลายด้วย TE buffer pH 8.0 เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอะกาโรส-เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาความเข้มข้นและปรับให้ได้ปริมาณที่ พอเหมาะกับการทำ PCR ต่อไป

4. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR ด้วย arbitrary primers ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology, Alamada US จำนวน 18 ชนิด โดยปฏิกิริยา PCR ใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อแล้ว 2.0 ไมโครลิตร, Q solution 2.0 ไมโครลิตร, dNTPs (1mM) 2.0 ไมโครลิตร, 10X QIAGEN PCR 1.0 ไมโครลิตร, RAPD primer (0.4mM) 0.8 ไมโครลิตร, 0.5 ยูนิตของ Taq DNA polymerase 1.2 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 1.0 ไมโครลิตร นำหลอด PCR ใส่ใน เครื่อง PCR (AB Applied Biosystems รุ่น GeneAmp PCR system 2400) โดยเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ประกอบด้วย predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที 30 วินาที จำนวน 1 รอบ จากนั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 45 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 30 วินาที จำนวน 45 รอบ และ primer extension ที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้นตอนสุดท้าย ขึ้นดี

เอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยอาร์เอพีดีตรวจสอบได้โดยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่องดูเจลภายใต้แสง อัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV Transilluminator ถ่ายภาพ ด้วยเครื่องถ่ายภาพ (Gel Documentation บริษัท Syngene) หรือ ตรวจสอบผลผลิตของ RAPD โดยใช้วิธี อิเล็กโตรโฟรีซิสในอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่อง Mini-Protein 3 Electrophoresis ย้อมใน เอทิดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 5 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV Transilluminator ถ่ายภาพด้วยเครื่อง ถ่ายภาพเจล (Gel documentation) พร้อมบันทึกเพื่อนำ แบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ต่อไป

5. การวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมระหว่างหน่อใหม่พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 นางเหลือง นางลาย เขียวสกล และไหมป่า ด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) ของ Dice และสร้าง dendrogram โดยใช้โปรแกรม Gene Tools และ Gene Directory ของ บริษัท Syngene

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของไหมพื้นเมืองพันธุ์นาง น้อยศรีสะเกษ 1 และนางน้อยอุบล จากแหล่งต่าง ๆ ที่ สร้างด้วย arbitrary primer ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งหมด 18 ชนิด โดยเทคนิค RAPD-PCR นั้น พบว่า มีไพรเมอร์ 9 ชนิด คือ K-09, OPA-02, OPA-15, OPL-11, OPO-07, OPR-06, OPR-11, OPS-03, และ OPW-01 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความ แตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งเพาะเลี้ยงต่าง ๆ ได้ โดยจำแนกไหมพันธุ์นางน้อยอุบลจากสถานีทดลอง หม่อนไหมร้อยเอ็ดออกจากไหมที่เลี้ยงในสถานีอื่น ๆ แต่ ลายพิมพ์ที่ให้ความแตกต่างมากที่สุดและสามารถพบ แถบดีเอ็นเอจำเพาะหลายที่สามารถใช้ประโยชน์ใน การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไปในอนาคตได้คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากไพรเมอร์ OPO-07 (ภาพที่ 1)

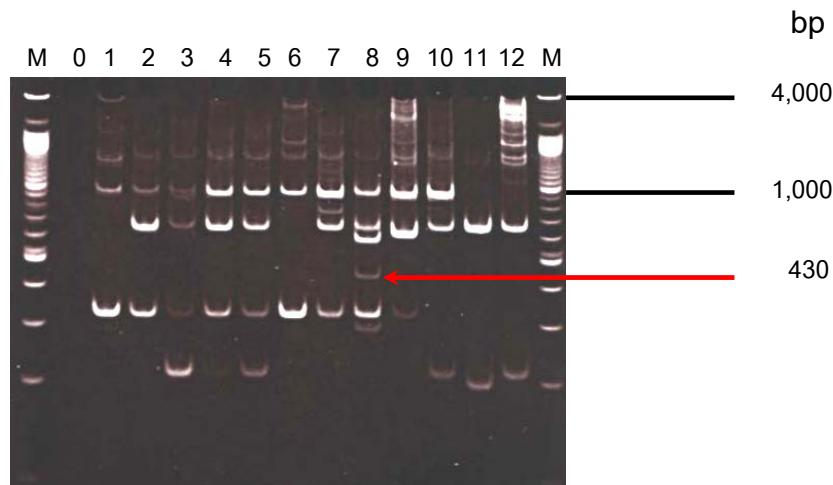


Figure 1 Genome fingerprinting of silkworms, Nangnoi Si Sa Ket group, Nangnoi Ubon group, and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm based on primer OPO-07 of RAPD technique and specific band at 430 bp for identifying Nangnoi Si Sa Ket : M = 100 bp DNA ladder, Promega, 0 = Negative control, 1 = Nangnoi Ubon from Chiang Mai, 2 = Nangnoi Si Sa Ket from Si Sa Ket, 3 = Nangnoi Si Sa Ket from Udon Thani, 4 = Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai, 5 = Nangnoi Si Sa Ket from Sakon Nakhon, 6 = Nangnoi Ubon from Mukdahan, 7 = Nangnoi Ubon from Si Sa Ket, 8 = Nangnoi Ubon from Roi Et, 9 = Nangluang, 10 = wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval), 11 = Nanglai, 12 = Kiewsakon.

OPD-11 (ภาพที่ 2) และ OPN-02 (ภาพที่ 3) โดยไพรเมอร์ OPO-07 และ OPD-11 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 430 และ 100 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้จำแนกไหมพันธุ์นางน้อยอุบลที่ได้จากสถานีทดลองหม่อนไหมร้อยเอ็ดออกจากไหมพันธุ์นางน้อยที่ได้มาจากแหล่งอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน

ส่วน ไพรเมอร์ OPN-02 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 2 ขนาด คือ 985 และ 434 คู่เบส จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 985 คู่เบส สามารถใช้จำแนกระหว่างไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่ได้จากสถานีทดลองหม่อนไหมหนองคายออกจากไหมพันธุ์นางน้อยที่ได้มาจากแหล่งอื่นๆ ได้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 434 คู่เบส สามารถ

จำแนกไหมพันธุ์นางน้อยได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ และกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยอุบลได้อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอชิ้นเล็กนี้สามารถพบได้ในไหมพันธุ์เหี่ยวสกล และนางลายด้วยเช่นกัน ดังนั้นการนำแถบดีเอ็นเอนี้มาใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีการจัดการอย่างเหมาะสม และควรมีการศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมจนมีข้อมูลที่ชัดเจนเพียงพอ

เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากไพรเมอร์แต่ละชนิดจากทั้ง 3 ไพรเมอร์ข้างต้นมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสายพันธุ์ไหมจากแหล่งต่างๆ มีความสัมพันธ์ในระดับต่างๆ แตกต่างไปตามชนิดของไพรเมอร์ เนื่องจากความหลากหลายของ

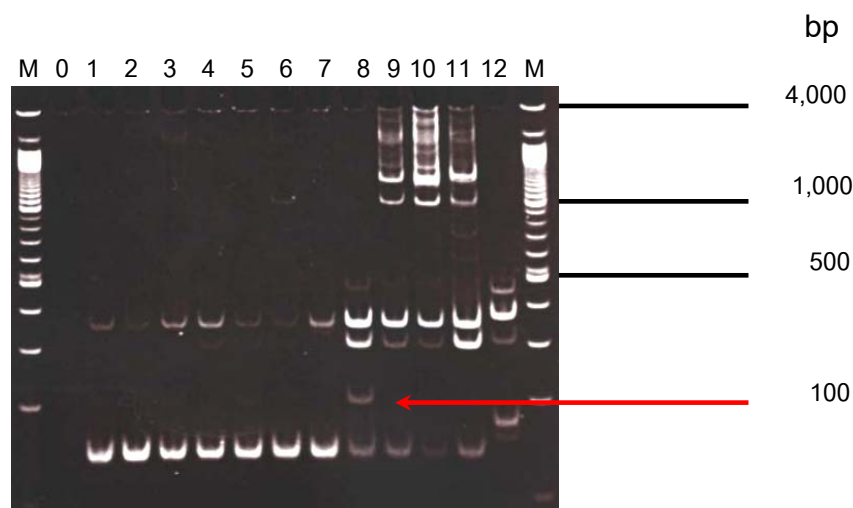


Figure 2 Genome fingerprinting of silkworms, Nangnoi Sri Sa Kate group, Nangnoi Ubon group, and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm based on primer OPD-11 of RAPD technique and specific band at 100 bp for identifying Nangnoi Si Sa Ket : M = 100 bp DNA ladder, Promega, 0 = Negative control, 1 = Nangnoi Si Sa Ket from Si Sa Ket, 2 = Nangnoi Si Sa Ket from Udon Thani, 3 = Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai, 4 = Nangnoi Si Sa Ket from Sakon Nakhon, 5 = Nangnoi Ubon from Chiang Mai, 6 = Nangnoi Ubon from Mukdahan, 7 = Nangnoi Ubon from Si Sa Ket, 8 = Nangnoi Ubon from Roi Et, 9 = Nangluang, 10 = Kiewsakon, 11 = Nanglai, 12 = wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval).

แถบดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากไพรเมอร์แต่ละชนิดนั้น มีจำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ไม่ชัดเจนแม้ว่าผลที่ได้รับสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ใหม่ที่เป็นกลุ่มหลักได้ก็ตาม ดังนั้นเพื่อสร้างความหลากหลายของข้อมูลให้มากขึ้น จึงได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ในลักษณะของการรวมข้อมูลจากลายพิมพ์ทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน (Muyan *et al.*, 2001) พบว่าสามารถให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.0-0.78 (ตารางที่ 1) โดยไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่ได้จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ ที่มาจากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี มีค่า genetic distance เป็น

0 และไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษจากทั้งสองแหล่งนี้ ยังมีความใกล้ชิดกับไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่ได้จากสถานที่ทดลองหม่อนไหมหนองคายและสกลนคร มาก โดยมีค่า genetic distance เท่ากับ 0.14 และ 0.16 ตามลำดับ และไหมในกลุ่มนางน้อยที่มีความแตกต่างมากที่สุดคือไหมนางน้อยศรีสะเกษจากหนองคายและนางน้อยอุบลจากศรีสะเกษ โดยมีค่า genetic distance เท่ากับ 0.39

เมื่อนำข้อมูลของ genetic distance มาประมวลและสร้างความสัมพันธ์ในรูป dendrogram (ภาพที่ 4) พบว่าสามารถจำแนกไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มแรก ประกอบด้วยไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่ได้จาก 4 แหล่ง คือ ศูนย์วิจัยหม่อน

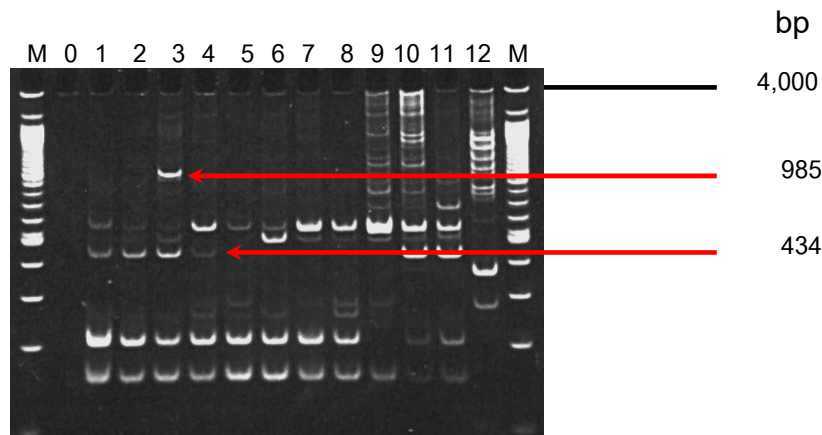


Figure 3 Genome fingerprinting of silkworms, Nangnoi Si Sa Ket group, Nangnoi Ubon group, and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm based on primer OPN-02 of RAPD technique and specific band at 985 and 434 bps for identifying Nangnoi Si Sa Ket : M = 100 bp DNA ladder, Promega, 0 = Negative control, 1 = Nangnoi Si Sa Ket from Si Sa Ket, 2 = Nangnoi Si Sa Ket from Udon Thani, 3 = Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai, 4 = Nangnoi Si Sa Ket from Sakon Nakhon, 5 = Nangnoi Ubon from Chiang Mai, 6 = Nangnoi Ubon from Mukdahan, 7 = Nangnoi Ubon from Si Sa Ket, 8 = Nangnoi Ubon from Roi Et, 9 = Nangluang, 10 = Kiewsakon, 11 = Nanglai, 12 = wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval).

ไหมศรีสะเกษ ศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี สถานีทดลองหม่อนไหมหนองคาย และสถานีทดลองหม่อนไหมสกลนคร กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ไหมพันธุ์นางน้อยอุบลที่ได้จาก สถานีทดลองหม่อนไหมเชียงใหม่ สถานีทดลองหม่อนไหมมุกดาหาร ศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ และสถานีทดลองหม่อนไหมร้อยเอ็ด และสามารถแยกออกจากไหมพันธุ์เปรียบเทียบ ประกอบด้วย ไหมพันธุ์นางเหลือน นางลาย เขียวสกล และไหมป่า ออกจากกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยได้อย่างชัดเจน

ในกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ นั้นพบว่า พันธุกรรมของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ได้จากศรีสะเกษ ซึ่งจัดเป็นพันธุ์ดั้งเดิม มีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่มีแหล่งจากอุดรธานีมากที่สุด ตามด้วยสายพันธุ์ที่มีแหล่งจากหนองคาย และสกลนครตามลำดับ ส่วนกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยอุบลจากแหล่งเชียงใหม่ มีความใกล้ชิด

กับพันธุ์ที่มีแหล่งจากมุกดาหารมากที่สุดตามด้วยพันธุ์ที่มีแหล่งจากศรีสะเกษตามลำดับ โดยพันธุ์ไหมทั้งสองกลุ่มข้างต้นมีสายพันธุ์นางน้อยอุบลจากร้อยเอ็ดเป็นตัวเชื่อมต่อความสัมพันธ์ ความแปรปรวนหรือความหลากหลายที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์ร่วมกับการมีส่วนร่วมของความใกล้ชิดกันอย่างมากระหว่างทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์บ่งบอกถึงการมีแหล่งสายพันธุ์ต้นกำเนิดเดียวกัน และการแบ่งแยกของสายพันธุ์ยังอยู่ในระยะเริ่มต้นเท่านั้นทั้งนี้การแบ่งแยกที่ปรากฏพบนี้อาจมีสาเหตุหลักจากกระบวนการคัดเลือกในขณะที่มีการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อแจกจ่ายและเผยแพร่พันธุ์ไหมแก่เกษตรกรซึ่งสายพันธุ์ที่แปรปรวนเหล่านั้นได้รับการคัดเลือกอย่างต่อเนื่องในแต่ละแหล่งจนทำให้เกิดการขับเคลื่อนของกระบวนการแยกตัวของสายพันธุ์ขึ้นในที่สุด

Table 1 Genetic distance among Thai silkworm: Nangnoi Si Sa Ket group, Nangnoi Ubon and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm calculated from combined data of RAPD genome fingerprint generated from primers: OPO-07, OPD-11, and OPN-02.

Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.00											
2	0.00	0.00										
3	0.14	0.14	0.00									
4	0.16	0.16	0.18	0.00								
5	0.29	0.29	0.30	0.33	0.00							
6	0.22	0.22	0.24	0.26	0.30	0.00						
7	0.30	0.30	0.39	0.24	0.26	0.30	0.00					
8	0.36	0.36	0.29	0.23	0.33	0.36	0.26	0.00				
9	0.60	0.60	0.64	0.54	0.50	0.52	0.41	0.44	0.00			
10	0.45	0.45	0.52	0.39	0.62	0.64	0.50	0.45	0.31	0.00		
11	0.33	0.33	0.42	0.36	0.50	0.52	0.48	0.43	0.50	0.28	0.00	
12	0.67	0.67	0.72	0.68	0.65	0.78	0.60	0.60	0.76	0.73	0.62	0.00

Remarks: 1 = Nangnoi Si Sa Ket from Si Sa Ket, 2 = Nangnoi Si Sa Ket from Udon Thani, 3 = Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai, 4 = Nangnoi Si Sa Ket from Sakon Nakhon, 5 = Nangnoi Ubon from Chiang Mai, 6 = Nangnoi Ubon from Mukdahan, 7 = Nangnoi Ubon from Si Sa Ket, 8 = Nangnoi Ubon from Roi Et, 9 = Nangluang, 10 = Kiewsakon, 11 = Nanglai, 12 = wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval).

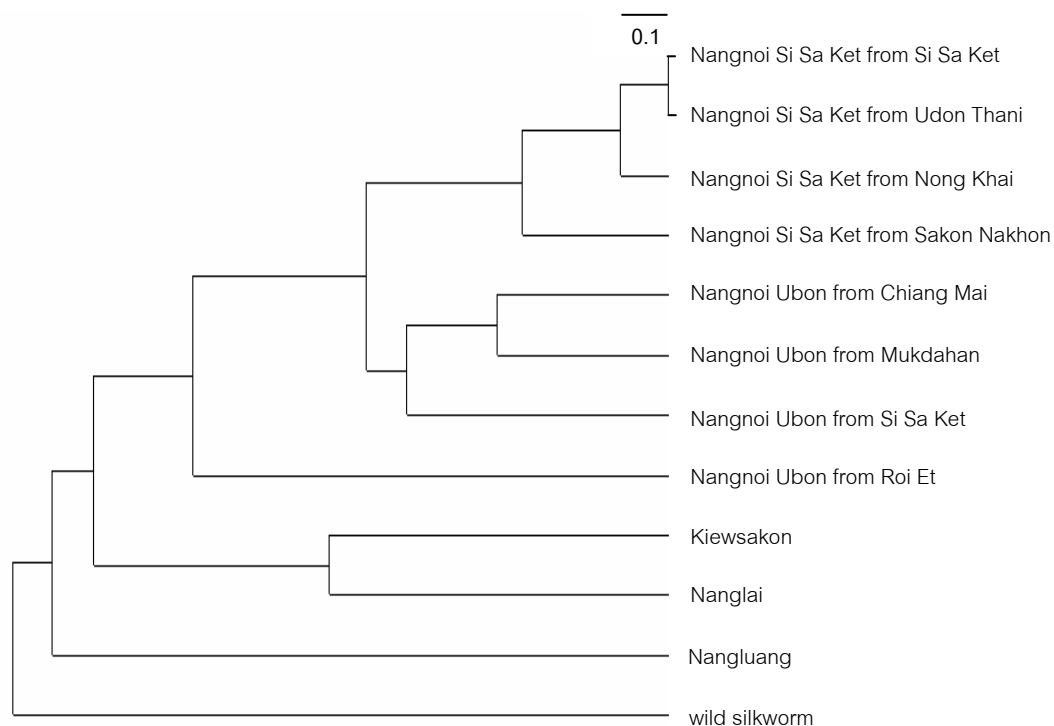


Figure 4 Dendrogram showed the relationship among Nangnoi Si Sa Ket group, Nangnoi Ubon and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval).

สรุปผล

การวิเคราะห์พันธุกรรมของไหมพันธุ์นางน้อย ศรีสะเกษ 1 ครั้งนี้ ทำให้เกิดความชัดเจนของสายพันธุ์ไหมนางน้อยศรีสะเกษที่เพาะเลี้ยงอยู่ตามสถานที่ทดลองหรือศูนย์วิจัยหม่อนไหมของจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย นั้นได้เกิดกระบวนการคัดเลือกในระหว่างการเพาะเลี้ยง ขึ้นจนทำให้สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ และกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยอุบล และสามารถอธิบายถึงความเกี่ยวพันทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้รับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์ไหมนางน้อยให้มีความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่เพาะเลี้ยงและการตรวจสอบสายพันธุ์หรือรับรองสายพันธุ์ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสถาบันหม่อนไหมแห่งชาติ เฉลิมพระเกียรติฯ ที่สนับสนุนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กฤษณะ เรืองฤทธิ์. 2545. การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียเพื่อการจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 59 หน้า.

ประทีป มีศิลป์, จิราพร ตยุดิวิกุล, ทิพรณี เสนะวงศ์, พงศธร ธรรมณอม, เพทาย พงษ์เพียจันทร์, ศานิต รัตนภูมิ และ สุรชาติพิทย์ ห้องทองแดง. 2545. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไหมชนิดฟักออกตลอดปีในประเทศไทย. หน้า 103-

116. ใน: เอกสารประกอบการประชุมวิชาการหม่อนไหมประจำปี 2545. สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สมโพธิ อัครพันธุ์. 2539. การพัฒนาหม่อนไหมในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. 181 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

Hadrys, H., M. Balick and B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1(1): 55-63.

Hoy, M. A. 2003. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Application*. 2nd ed. Academic Press, San Diego. 544 pp.

Muyan, G., Z. Zhenghong and C. Yuanlin. 2001. A study on molecular phylogenetics and molecular marker of species of silkworms. *Hereditas* 23(1): 25-28.

Nagaraja, G. M. and J. Nagaraju. 1995. Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. *Electrophoresis* 16(9): 1633-1638.

Promboon, A., T. Shimada, H. Fujiwara and M. Kobayashi. 1995. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetical Research* 66(1): 1-7.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.