

การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย
เพื่อการจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง

Comparison on Mitochondrial DNA Fingerprint
for Identification
of Thai Native Silkworm Varieties

กฤษณะ เรืองฤทธิ์^{1/} จิราพร ตยุติวฤกุล^{1/} วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ^{2/} และ อังสนา อัครพิศาล^{3/}

Krissana Ruangrit^{1/} Jiraporn Tayutivutikul^{1/} Weerathep Pongprasert^{2/} and Angsana Akrapisan^{3/}

Abstract: There are many varieties of Thai native silkworms, *Bombyx mori* Linnaeus, showing high potential for silk product improvement. However, since they are all very closely related and basically have morphological identity especially in their adult stage, it is difficult to identify them in a breeding process. Therefore, a molecular technique, Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP), was applied to study among 5 native silkworm varieties; Nonrusee, Nanglai, Keawsakol, Nangluang and Nangnoisrisaket 1, and compared to a wild silkworm, *Philosamia ricini* Boisduval. The regions between cytochrome oxidase subunit I–II gene (COI–COII gene) from mitochondrial genome of all silkworms were amplified by PCR, and were digested with 9 restriction enzymes; *Bfa* I, *Cla* I, *Hha* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I, and *Xnm* I to generate band

^{1/} ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

^{2/} ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

^{3/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

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

^{2/} Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environmental Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

^{3/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

polymorphisms on agarose and polyacrylamide gel. Four restriction enzymes; *Cla* I, *Hha* I, *Msp* I, and *Xnm* I were not useful in separating the Thai native silkworm varieties and the wild silkworm. However, there were five restriction enzymes that cut the COI-COII gene target, and four of them; *Bfa* I, *Mbo* I, *Rsa* I, and *Taq* I generated band patterns to differentiate between Thai native silkworm varieties and the wild silkworm. Only *Mse* I produced band polymorphisms that is not only separated the Thai native group from the wild one, but also divided them into two groups. The first group composed of Nonrusee and Nanglai, and the second group consisted of Keawsakol, Nangluang, and Nangnoisrisaket 1

บทคัดย่อ : พันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง (*Bombyx mori* L.) มีหลายพันธุ์ที่แสดงถึงศักยภาพสำหรับนำไปปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ผลิตภัณฑ์จากไหมมีคุณภาพดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองเหล่านี้มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก และลักษณะพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาโดยเฉพาะในระยะตัวเต็มวัยมีลักษณะที่ไม่แตกต่างจนทำให้เป็นการยากที่จะจำแนกพันธุ์ไหมในระยะนี้เพื่อใช้ในการกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นวิธีทางอณูชีววิทยาที่นำมาใช้ คือ Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองทั้ง 5 พันธุ์ได้แก่ โนนฤๅษี นางลาย เขียวสกล นางเหลือง และนางน้อยศรีสะเกษ 1 และใช้ไหมป่า (*Philosamia ricini* Boisd.) เป็นตัวเปรียบเทียบกับนอกกลุ่ม โดยศึกษาส่วนของยีน cytochrome oxidase subunit I-II gene (COI-COII gene) จากไมโทคอนเดรีย และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) แล้วตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 9 ชนิดคือ *Bfa* I, *Cla* I, *Hha* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I และ *Xnm* I ตรวจสอบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล และฟลิออริลลาไมด์เจล พบว่ามีเอนไซม์ 4 ชนิดคือ *Cla* I, *Hha* I, *Msp* I และ *Xnm* I ที่ไม่สามารถจำแนกไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์ 5 ชนิดที่สามารถตัดชิ้นส่วนของ COI-COII gene เป้าหมายได้ และในจำนวนนี้ พบว่ามีเอนไซม์ 4 ชนิดคือ *Bfa* I, *Mbo* I, *Rsa* I, และ *Taq* I ผลิตแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ นอกจากนี้พบว่ามีเพียงเอนไซม์เดียวคือ *Mse* I ที่จำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากไหมป่าได้แล้วยังสามารถจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือพันธุ์โนนฤๅษี และนางลาย กลุ่มที่ 2 คือพันธุ์เขียวสกล นางเหลือง และนางน้อยศรีสะเกษ 1

Index words : ไหม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ไมโทคอนเดรีย เทคโนโลยีชีวภาพ

Silk, DNA fingerprint, Mitochondria, Biotechnology

คำนำ

ไหม (*Bombyx mori* Linnaeus) อยู่ในวงศ์ Bombycidae อันดับ Lepidoptera (Tazima, 1964) ผลผลิตหลักที่ได้จากไหมคือ เส้นใยที่นำมาทอเป็นผ้าไหม จัดเป็นผ้าที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวจากความลื่นมันของเนื้อผ้า สี และสวมใส่สบาย เมื่อนำมาตัดเย็บเป็นเสื้อผ้า โดยไหมแต่ละพันธุ์จะมีลักษณะสี และคุณภาพของเส้นใย รวมทั้งการสร้างรังดักแด้ (cocoon) ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติเป้าหมายหลักของการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ไหมเพื่อให้มีผลผลิตและคุณภาพที่ดีขึ้น

ทั้งนี้ประเทศไทยมีไหมหลายพันธุ์ด้วยกัน คือ พันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง พันธุ์ไหมไทยลูกผสม และพันธุ์ไหมลูกผสมต่างประเทศ (สมโพธิ, 2539) พันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองที่ได้รับการรับรองโดยกรมวิชาการเกษตร คือ พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ส่วนพันธุ์พื้นเมืองอื่น ๆ ที่นิยมเลี้ยงกันคือ พันธุ์นางเหลือง นางลาย เขียวสกล และโนนญาติ ฯลฯ ซึ่งต่างก็ยังไม่เคยได้รับการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อเทียบเคียงกันเลย จึงไม่สามารถระบุความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามวิธีการจำแนกพันธุ์ไหมนิยมใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูจากลักษณะภายนอกที่เห็นเท่านั้น เมื่อต้องจำแนกไหมเป็นจำนวนมากมักต้องใช้เวลาาน และให้ผลได้ไม่ชัดเจน ในปัจจุบันได้มีวิธีการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางอนุพันธุศาสตร์ (molecular genetic) ที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำมากขึ้น จัดเป็นการจำแนกด้วยลักษณะทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งจากส่วนของนิวเคลียสและออร์แกเนลลของแต่ละพันธุ์ที่มีลักษณะเฉพาะช่วยในการจำแนกพันธุ์ได้อย่างชัดเจนรวดเร็วและแม่นยำมาก (สุรินทร์, 2536) ข้อมูล

ที่ได้รับจะเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ไหมให้มีคุณภาพและชัดเจนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การรวบรวมพันธุ์ไหม

รวบรวมตัวเต็มวัยของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองและไหมป่า (*Philosamia ricini* Boisd.) จากสถานที่ต่าง ๆ ดังนี้

- 1.1 นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ
- 1.2 นางเหลือง จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ
- 1.3 นางลาย จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี
- 1.4 เขียวสกล จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี
- 1.5 โนนญาติ จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี
- 1.6 ไหมป่า จากสถานีทดลองหม่อนไหม

หนองคาย

โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อจนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอได้ทำการสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Tuda *et al.* (1995) และของ วิณา และคณะ (2544) โดยนำตัวเต็มวัยของไหมมาตัดส่วนอก ใส่ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม lysis buffer (50 mM Tris - HCl; pH 8.0, 10 mM EDTA, SDS 0.5 เปอร์เซ็นต์, Proteinase K 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, RNase A 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใช้กรรไกรผ่าตัด ตัดตัวอย่างให้ละเอียด นำไปบ่ม

ไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที คัดสารละลายชั้นบนเติม chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที คัดสารละลายชั้นบนเติมสารละลาย 3 M sodium acetate ในปริมาตร 1 ต่อ 10 เท่าของปริมาตร เติม absolute ethanol ที่แช่เย็น 2 เท่าของปริมาตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ล้างตะกอนด้วย TE buffer เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ต่อไป

ปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้ทำ PCR โดยใช้ primer COI-RLR : 5'- TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT -3' ตำแหน่งที่ 2,184 – 2,207 และ primer COII-Croz : 5'- CCA CAA ATT TCT GAA CAT TGA CC -3' ตำแหน่งที่ 3,666 – 3,688 ของ mtDNA gene จาก gene bank รหัส AY048187 (Lu *et al.*, 2001) การเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ประกอบ

ด้วย 1X QIAGEN PCR Buffer, 1 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 200 µM primers COI-RLR, 200 µM primers COII-Croz, 0.75 ยูนิตต่อปฏิกิริยา Taq DNA polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัมตามลำดับ เมื่อผสมทุกอย่างครบแล้วนำหลอด PCR ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (MJ Research รุ่น PTC-100) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้ อุณหภูมิ 94 °C เวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 92 °C เวลา 1 นาที 56 °C เวลา 1 นาที 72 °C เวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ หลังจากนี้ที่ 72 °C เวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

PCR-RFLP

นำผลผลิตของ PCR ของไหมในแต่ละพันธุ์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิดคือ *Bfa* I, *Cla* I, *Hha* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I และ *Xmn* I ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลและโพลีอะคริลามิคเจล ย้อมด้วยเอทิลเบรียมโบรไมด์ ถ่ายรูปด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (syngene) และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ gene directory ด้วยวิธี UPGMA ของ Dice

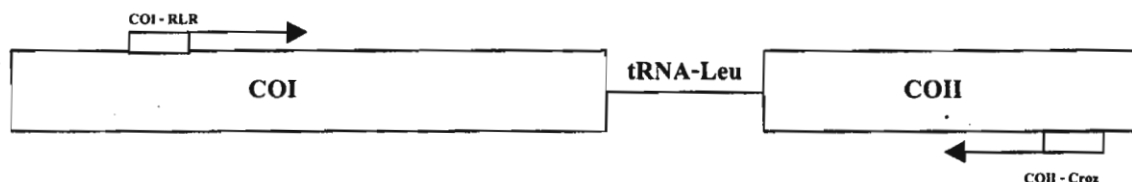


Figure 1 Scheme of COI-Croz and COII-RLR primers for amplification of COI-COII genes in mitochondrial DNA of *Bombyx mori* Linnaeus

ผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากอกของไหมตัวเต็มวัย ที่คัดแปลงจากวิธีการของ Tuda *et al.* (1995) และ วิณา และคณะ (2544) สามารถพบกลุ่มของดีเอ็นเอ เมื่อเข้าสู่ขั้นตอนการตกตะกอนของดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ทุกพันธุ์ จะได้ค่าประมาณ 0.163-0.20 หรือมีความเข้มข้นประมาณ 1.6-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และที่ 280 นาโนเมตรได้ค่าประมาณ 0.162-2.0 เมื่อนำมาคำนวณหาค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ได้ค่าความบริสุทธิ์ประมาณ 0.98-1.0 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่ทำให้ค่าความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอมีค่าน้อย

การเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของไหมด้วยเทคนิค PCR-RFLP

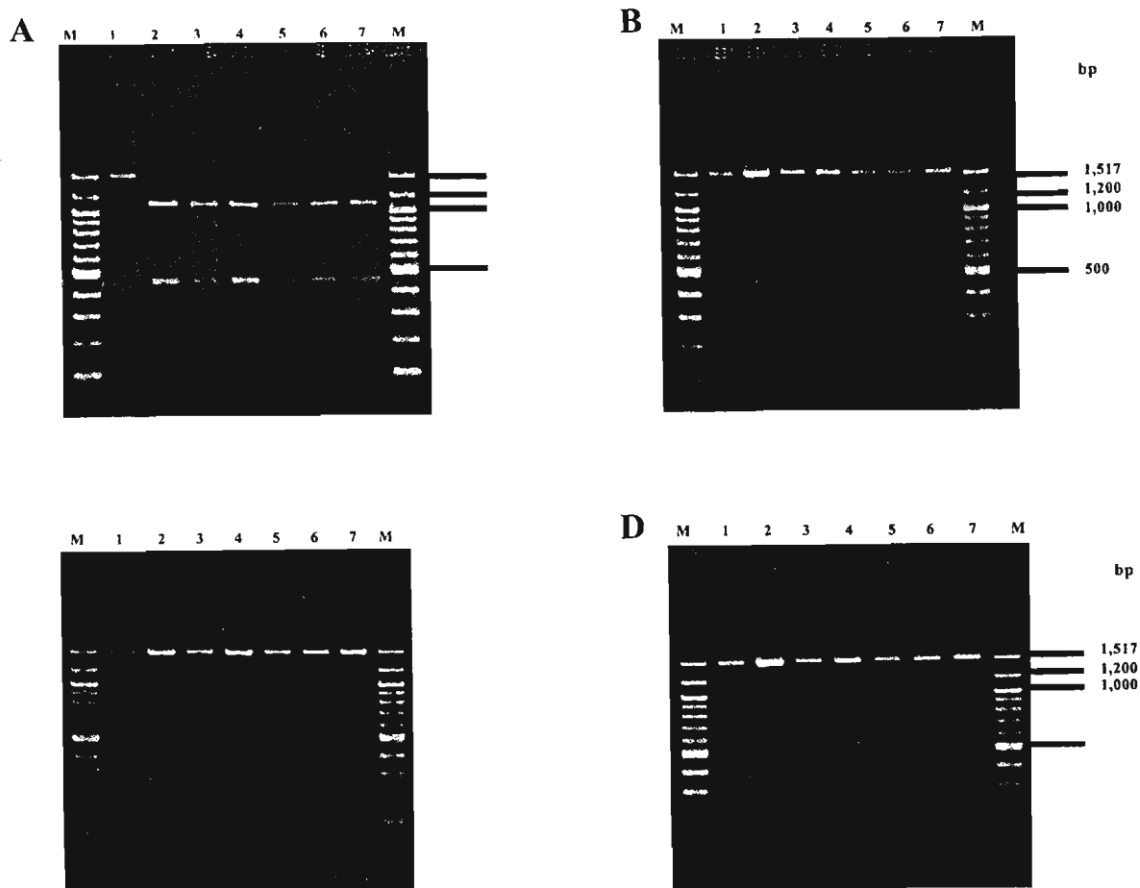
การใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไหมพื้นเมือง โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่าทุกพันธุ์รวมทั้งผีเสื้อไหมป่าซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบกับนอกกลุ่ม ได้ผลผลิตดีเอ็นเอส่วนของ COI-COII มีความยาวประมาณ 1.5 กิโลเบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder, New

England Biolabs) จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิดคือ *Bfa* I, *Cla* I, *Hha* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I และ *Xmn* I สร้างแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วย กระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล และถ่ายรูปเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไหมแต่ละพันธุ์ จากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ COI-COII ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 9 ชนิดพบว่าแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบ่งได้ 4 กลุ่มคือกลุ่ม 1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I, *Msp* I และ *Xmn* I ที่ไม่สามารถชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ COI-COII ทั้งของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองและไหมป่าได้ กลุ่ม 2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla* I ที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้แต่ไม่สามารถจำแนกกลุ่มของไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกัน กลุ่ม 3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa* I, *Mbo* I, *Rsa* I และ *Taq* I ที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ทั้งนี้ยังสามารถจำแนกไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ กลุ่ม 4 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ได้และจำแนกไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse* I

Table 1 Optical density (OD) of DNA purified from varieties of *Bombyx mori* Linnaeus.

Varieties	OD ₂₆₀ (nm)	OD ₂₈₀ (nm)	Ratio OD ₂₆₀ : OD ₂₈₀
Nonrusee	0.2062	0.2004	1.0289
Nanglai	0.1947	0.1893	1.0285
Nangluang	0.1774	0.1638	1.0830
Keawsakol	0.2015	0.2054	0.9810
Nangnoisrisaket 1	0.1625	0.1624	1.0006

Figure 2 Restriction fragment patterns, unable to discriminate all five varieties of *Bombyx mori* Linnaeus and *Philosamia ricini* Boisduval, of the PCR amplified COI-COII region of the mtDNA from a single individual on a 1.5 % agarose gel. [Restriction enzyme: A, *Cla* I; B, *Hha* I; C, *Msp* I; D, *Xmn* I. Silkworm varieties: 1, Nonrusee (untreat enzyme); 2-7 (treat enzyme); 2, wild silkworm, *Philosamia ricini*; 3, Nonrusee; 4, Nanglai; 5, Keawsakol; 6, Nangluang and 7, Nangnoisrisaket 1 and M is a 100 bp ladder, NEB]



การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย
เพื่อการจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง

	Nonrusee
	Nanglai
	Nangluang
	Keawsakol
	Nangnoisrisaket 1
	<i>P. ricini</i>

Figure 3 Relationship among five varieties of *Bombyx mori* Linnaeus and *Philosamia ricini* Boisduval, by used restriction enzymes *Bfa* I; *Mbo* I; (C)=*Rsa* I; (D)=*Taq* I

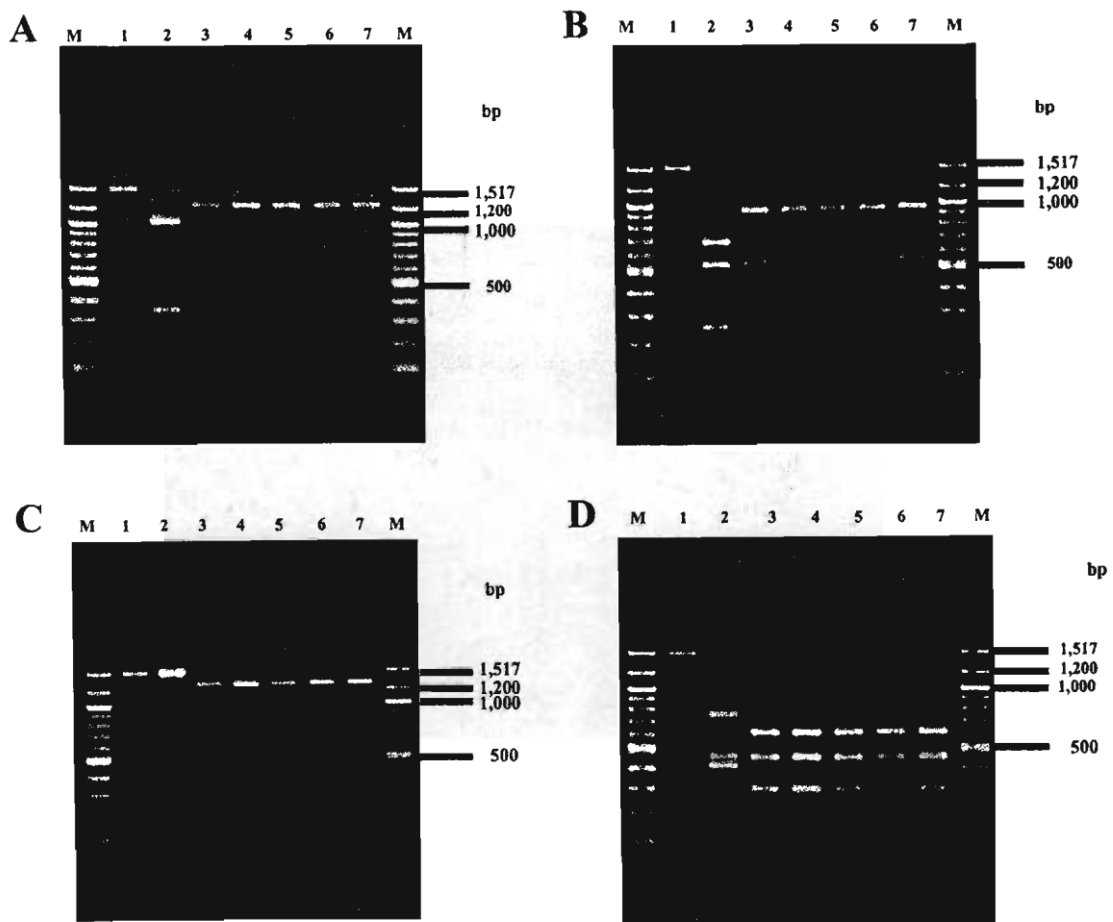


Figure 4 Restriction fragment patterns, able to discriminate among five varieties of *Bombyx mori* Linnaeus and *Philosamia ricini* Boisduval, of the PCR amplified COI-COII region of the mtDNA on a single individual on a 1.5 % agarose gel. [Restriction enzyme: A, *Bfa* I; B, *Mbo* I; C, *Rsa* I; D, *Taq* I. Silk varieties: 1, Nonrusee (untreat enzyme); 2-7 (treat enzyme); 2, wild silkworm, *Philosamia ricini*; 3, Nonrusee; 4, Nanglai; 5, Keawsakol; 6, Nangluang and 7, Nangnoisrisaket 1 and M is a 100 bp ladder, NEB]

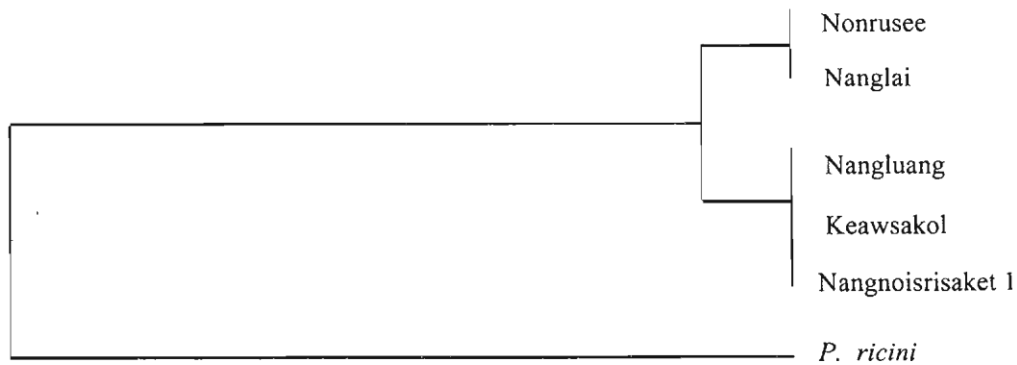


Figure 5 Relationship among five varieties of *Bombyx mori* Linnaeus and *Philosamia ricini* Boisduval by used restriction enzymes *Mse* I.

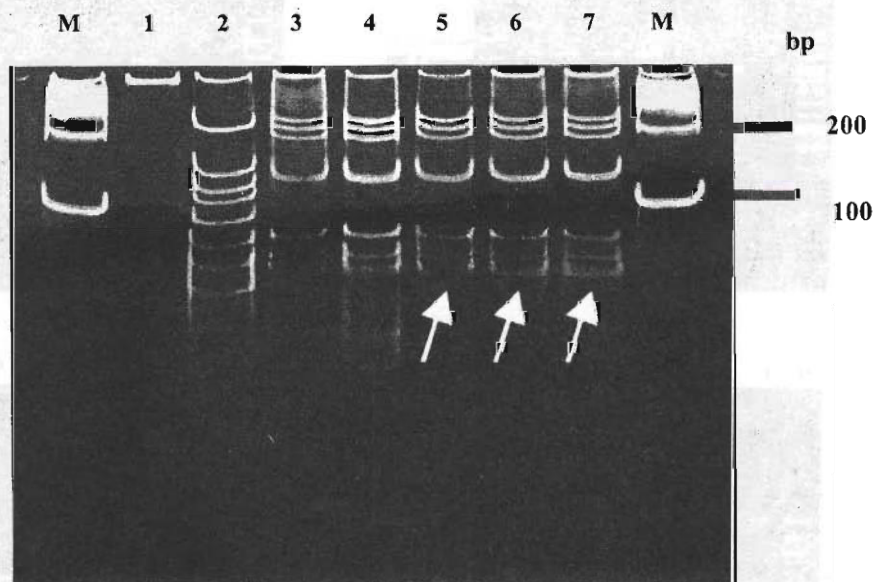


Figure 6 Restriction fragment patterns, able to discriminate among five varieties of *Bombyx mori* Linnaeus and *Philosamia ricini* Boisduval, of the PCR amplified COI-COII region of the mtDNA on a single individual on a 1.5 % agarose gel. [Restriction enzyme: *Mse* I. Silkworm varieties: 1, Nonrusee (untreat enzyme); 2-7 (treat enzyme); 2, wild silkworm, *Philosamia ricini*; 3, Nonrusee; 4, Nanglai; 5, Keawsakol; 6, Nangluang and 7, Nangnoisrisaket 1 and M is a 100 bp ladder, NEB]

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอจากส่วนนอกของผีเสื้อไหม ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Tuda *et al.* (1995) และวีณา และคณะ (2544) เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; OD) พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) ในไหมทุกพันธุ์ประมาณ 0.16-0.20 หรือมีความเข้มข้นประมาณ 1.6-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ถ้าได้ค่า OD_{260} เท่ากับ 1.0 แสดงว่ามีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (พงษ์ชัย, 2544) สารบางชนิด เช่น ฟีนอลสามารถดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรได้ อาจทำให้ได้ค่าที่วัดได้สูงกว่าความเป็นจริง ส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) เป็นค่าที่โปรตีนและอาร์เอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ถ้าอัตราส่วนของ $OD_{260}:OD_{280}$ มีค่า 1.7-1.8 แสดงว่ามีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่มากหรือดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์มาก จากการหาค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอพบว่าได้ค่าประมาณ 0.98-1.0 ซึ่งค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน (พงษ์ชัย, 2544) อย่างไรก็ตามสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอ มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน COI-COI gene ซึ่งอยู่ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโดยใช้ primer COI-RLR และ primer COII-Croz (Roehdanz, 1993) น้อยมากและได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 1.5 กิโลเบสในทุกพันธุ์รวมทั้งของผีเสื้อไหมป่าที่นำมาเปรียบเทียบกับนอกกลุ่มอย่างชัดเจนและพอเพียงต่อการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ตัวคือ *Bfa* I, *Cla* I, *Hha* I,

Mbo I, *Mse* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I และ *Xmn* I พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อแสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ คือเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I, *Msp* I และ *Xmn* I ส่วนเอนไซม์ที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้แต่แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผีเสื้อไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองได้คือ *Cla* I อย่างไรก็ตามจากการทดลองครั้งนี้พบว่าเอนไซม์ที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย และให้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถแยกระหว่างพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันคือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa* I, *Mbo* I, *Rsa* I และ *Taq* I ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาเพื่อการจำแนกไหมป่าวงศ์ Saturniidae กับไหมวงศ์ Bombycidae โดยวิธี DNA sequencing ของ Hwang *et al.* (1999) และ Liu *et al.* (1998) ส่วนเอนไซม์ที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้และให้แผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถจำแนกไหมป่าออกจากพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองได้และขณะเดียวกันสามารถใช้จำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองได้มีเพียงชนิดเดียว คือ เอนไซม์ *Mse* I ที่ประกอบด้วยลำดับของเบสเพียง 4 เบสคือ TTAA ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับการใช้ในการศึกษา PCR-RFLP ของสายพันธุ์ของไหมมากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้เพราะจากการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งหมดในไมโตคอนเดรียในแมลงหลายชนิดเช่น *D. yakuba*, *A. mellifera*, *An. quadrimaculatus* และ *An. gambiae* (Hwang *et al.*, 1999) พบว่ามักประกอบด้วยเบส A และ T ในปริมาณที่สูงมากในบางกรณีอาจสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Langor and Sperling, 1997; Roehdanz, 1995; Sihanuntavong *et al.*, 1999) แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับ

จากการตัดด้วย *Mse* I สามารถใช้จำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม 1 โนน-ถาญี และนางลาย กลุ่ม 2 นางเหลียง เขียวสกล และนางน้อยศรีสะเกษ 1 ความแตกต่างระหว่างทั้งสองกลุ่มเกิดขึ้นจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดใน กลุ่มที่ 2 มีเพิ่มขึ้นมา 1 แถบเท่านั้นแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอของทั้งสองกลุ่มมีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมากและสามารถบ่งบอกได้ว่าสายพันธุ์ไหมที่ศึกษามีความใกล้ชิดกันมากรวมทั้งการมีบรรพบุรุษร่วมกันมาก่อนในระยะเวลาที่ไม่นานมากนักซึ่งการแยกตัวออกเป็น 2 กลุ่มนี้อาจเป็นผลมาจากแรงกดดันทั้งจากธรรมชาติและการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์โดยมนุษย์

อย่างไรก็ตามในขั้นต่อไปควรมีการศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP ขยายผลเพิ่มเติมในส่วนของสายพันธุ์ไหมชนิดอื่น ๆ และชนิดของดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่งอื่น ๆ รวมทั้งควรมีศึกษาในทำนองเดียวกันนี้แต่ใช้วิธีการอื่น ๆ เช่นการใช้เทคนิค microsatellite และ DNA sequencing เป็นต้น เพื่อให้สามารถครอบคลุมพันธุ์ไหมต่าง ๆ ได้อย่างทั่วถึง เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้รับให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพราะวิธีการแต่ละวิธีมีศักยภาพในการวัดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ต่างกันและเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจำแนกพันธุ์ต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- พงษ์ชัย หาญยุทธนากร. 2544. การตรวจหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลาย. หน้า 4.1-4.7. ใน: เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิคเพื่อการศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วินา เมฆวิชัย, สุริรัตน์ เคียววานิชย์ และสุจินดา มาลัย. 2544. การสกัดดีเอ็นเอ. หน้า 3.1-3.4. ใน: เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิคเพื่อการศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สมโพธิ อัครพันธุ์. 2539. การพัฒนาหมอนไหมในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. 181 หน้า.
- สุรินทร์ ปิยะโชติณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 258 หน้า.
- Hwang, J.S., J.S. Lee, T.W. Goo, E.Y. Yun, H.R. Sohn, H.R. Kim, and O.Y. Kwon. 1999. Molecular genetic relationships between Bombycidae and Saturniidae based on the mitochondrial DNA encoding of large and small rRNA. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 15: 223-228.
- Langor, D.W., and F.A.H. Sperling. 1997. Mitochondrial DNA sequence divergence in weevils of the *Pissodes strobi* species complex (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Molecular Biology* 6(3): 255-265.
- Liu, Q.X., H. Ueda, and S. Hirose. 1998. Comparison of sequences of a transcriptional coactivator MBF2 from three lepidopteran species *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* and *Samia cynthia*. *Gene* 220: 55-59.
- Lu, C., Y. Liu, S. Liao, Z. Zhou, Z. Xiang, X. Wang, M. Zhu, and H. Han. 2001. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>. [30 November 2001]
- Roehrdanz, R.L. 1993. An improved primer for PCR amplification of mitochondrial DNA in a variety of insect species. *Insect Molecular Biology* 2(2): 89-91.

- Roehrdanz, R.L. 1995. Amplification of complete insect mitochondrial genome in two easy pieces. *Insect Molecular Biology* 4(3): 169-172.
- Sihanuntavong, D., S. Sittipraneed, and S. Klinbunga. 1999. Mitochondrial DNA diversity and population structure of the honeybee, *Apis cerana*, in Thailand. *Journal of Apiculture Research* 38(3-4): 211-219.
- Tuda, M., T. Fukatsu, and M. Shimada. 1995. Species differentiation of bruchid beetles (Coleoptera: Bruchidae) analyzed by mitochondrial DNA polymorphism. *Applied Entomology and Zoology* 30(2): 377-380.
- Tazima, Y. 1964. *The Genetic of Silkworm*. Logos Press Limited, London. 253 p.
-