

## บทที่ 4

## ผลการทดลอง

## 1. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจาก ออกของไหมตัวเต็มวัยที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Tuda *et al.* (1995) และวีณา และคณะ (2544ข) สามารถพบกลุ่มของดีเอ็นเอ เมื่อเข้าสู่ขั้นตอนการตกตะกอนของดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ทุกพันธุ์จะได้ค่าประมาณ 0.163-0.20 หรือมีความเข้มข้นประมาณ 1.6-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ 280 นาโนเมตรได้ค่าประมาณ 0.162-2.0 เมื่อนำมาคำนวณหาค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ได้ค่าความบริสุทธิ์ประมาณ 0.98-1.0 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่ทำให้ค่าความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอมีค่าน้อย

ตารางที่ 1 ค่า Optical Density (OD) และอัตราส่วนของ  $OD_{260} : OD_{280}$  เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอของพันธุ์ไหม โดยเจือจางดีเอ็นเอ 200 เท่า

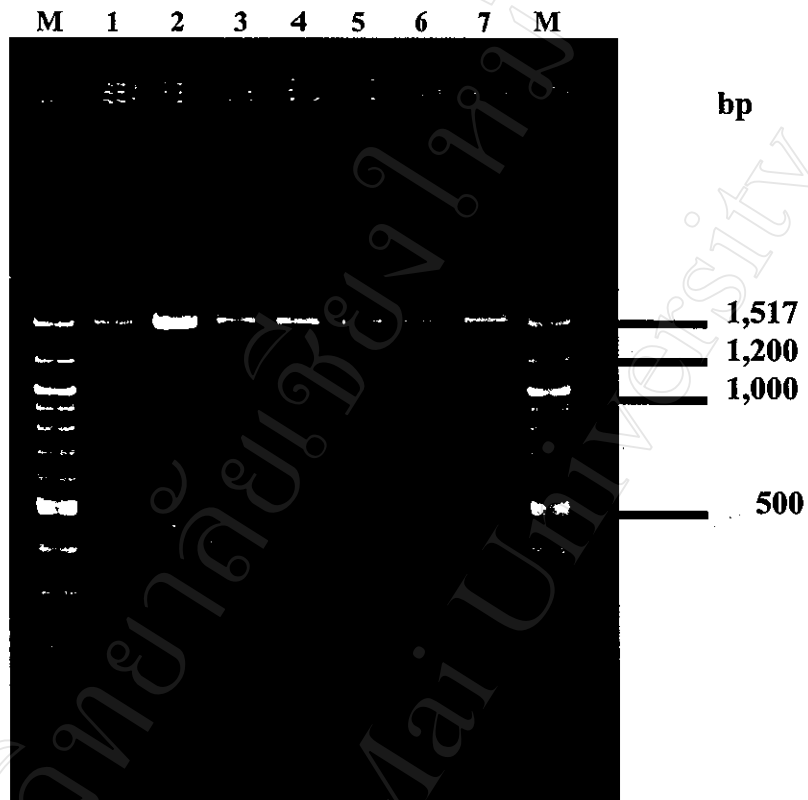
พันธุ์	ค่า $OD_{260}$ (nm)	ค่า $OD_{280}$ (nm)	Ratio $OD_{260} : OD_{280}$	ปริมาณความเข้มข้น ของดีเอ็นเอ (ng/ $\mu$ l)
โนนถายี่	0.2062	0.2004	1.0289	2,062
นางลาย	0.1947	0.1893	1.0285	1,947
นางเหลือง	0.1774	0.1638	1.0830	1,774
เขียวสกล	0.2015	0.2054	0.9810	2,015
นางน้อยศรีสะเกษ 1	0.1625	0.1624	1.0006	1,625

## 2. การเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไหมด้วยเทคนิค PCR-RFLP

การใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไหมพื้นเมือง โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่าทุกพันธุ์รวมทั้งผีเสื้อไหมป่าซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบนอกกลุ่ม ได้ผลผลิตดีเอ็นเอส่วนของ COI-COII มีความยาวประมาณ 1.5 กิโลเบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder, New England Biolabs) จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิดคือ *Bfa* I, *Cla* I, *Hha* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I และ *Xmn* I สร้างแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล และถ่ายรูปเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไหมแต่ละพันธุ์

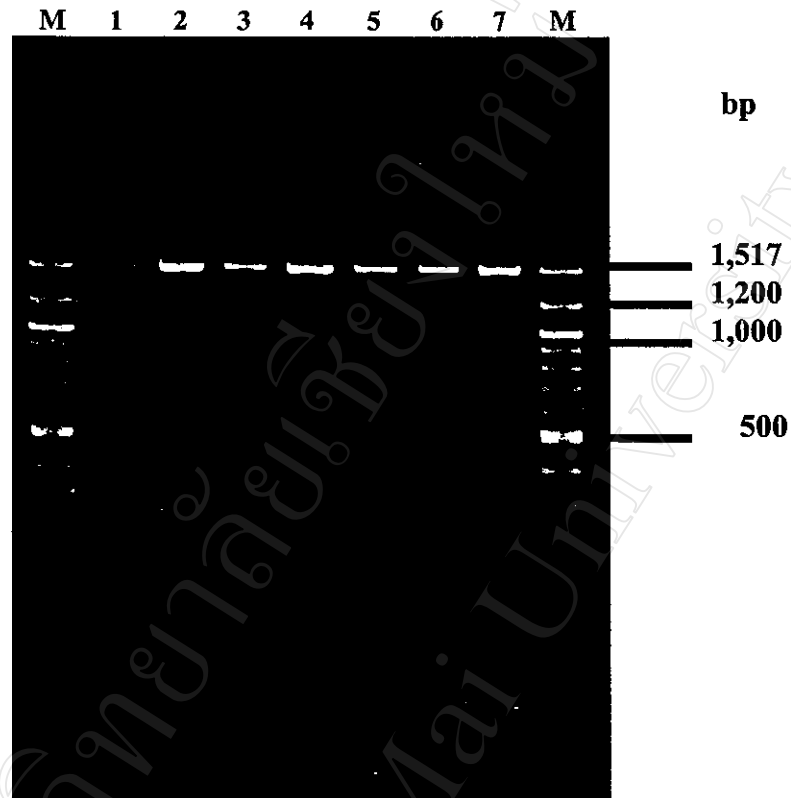
จากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ COI-COII ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 9 ชนิดพบว่าแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบ่งได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่ม 1 คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I, *Msp* I และ *Xmn* I ที่ไม่สามารถชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ COI-COII ทั้งของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองและไหมดั่งภาพที่ 13-15



ภาพที่ 13 ทรายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I

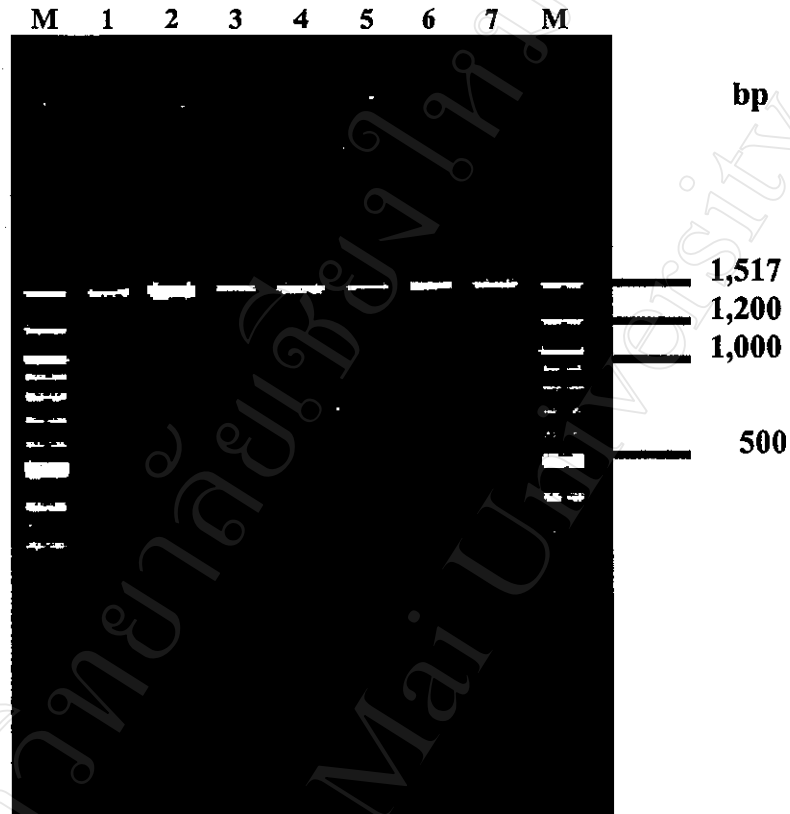
- M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)
- 1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนถาญีที่ไม่ใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I
- 2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนถาญี พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขียวสกล และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I



ภาพที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะ *Msp* I

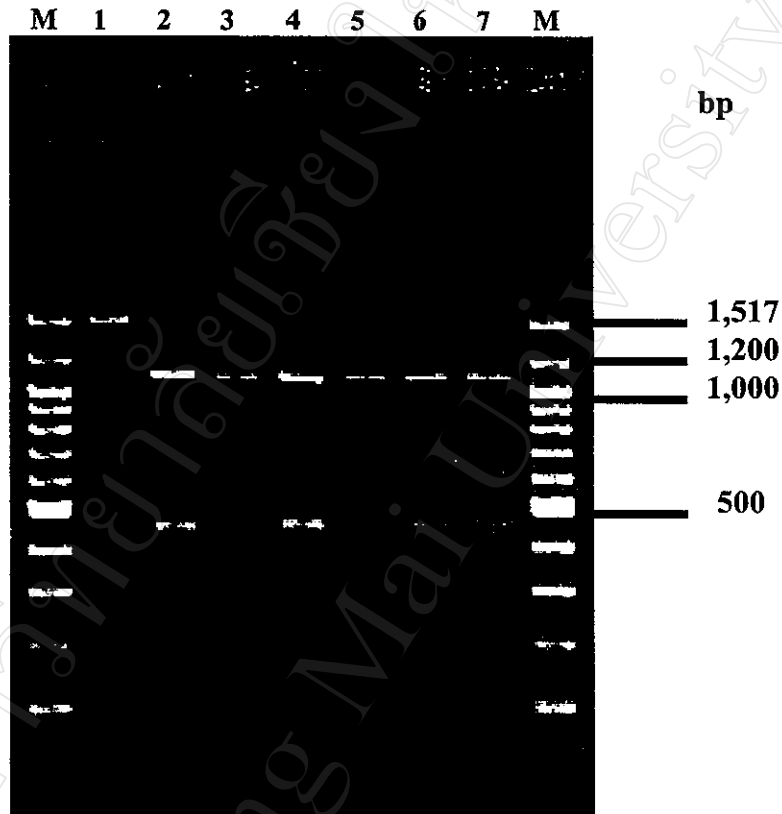
- M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)
- 1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนธานีที่ไม่ได้  
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp* I
- 2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนธานี  
พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขียวสกล และพันธุ์นางน้อย  
ศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp* I



ภาพที่ 15 ภายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xmn* I

- M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)
- 1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนฤาษีที่ไม่ใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xmn* I
- 2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนฤาษี พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขี้ยวสกล และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xmn* I

กลุ่ม 2 คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla* I สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้แต่ไม่สามารถจำแนกกลุ่มของไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกัน โดยตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 2 แถบที่มีขนาด 1,140 คู่เบส และ 460 คู่เบส (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะ *Cla* I

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)

1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนธานีที่ไม่ใส่  
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla* I

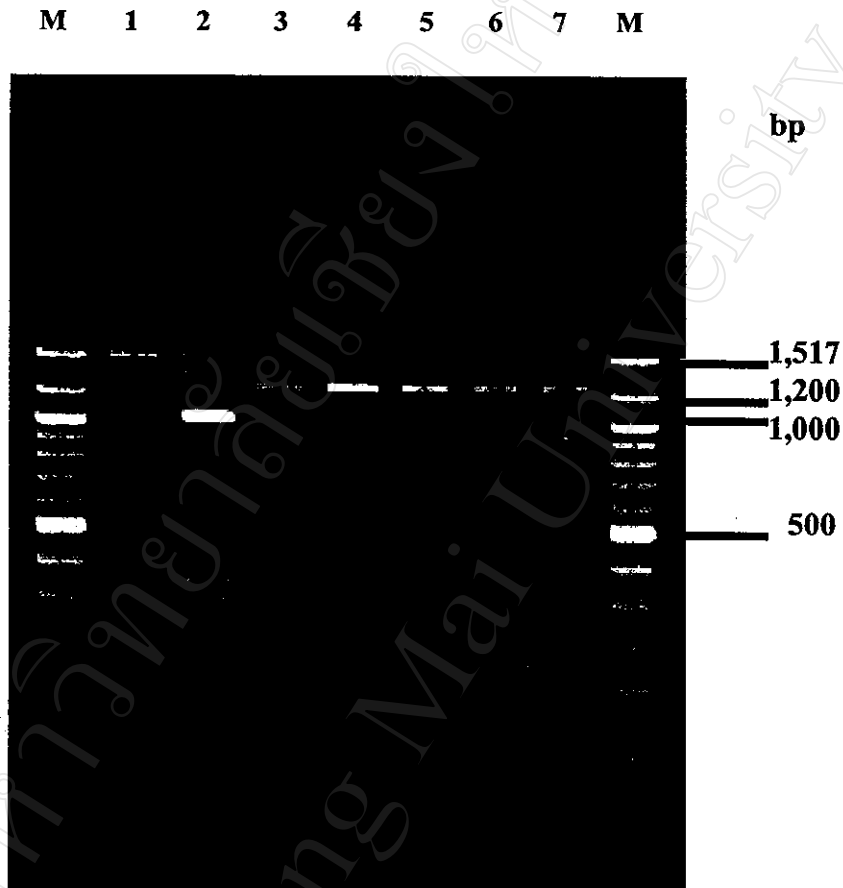
2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนธานี  
พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขียวสกล และพันธุ์นางน้อย  
ศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla* I

กลุ่ม 3 คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa* I, *Mbo* I, *Rsa* I และ *Taq* I ที่สามารถตัดชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอได้ ทั้งนี้ยังสามารถจำแนกไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis ในโปรแกรม Gene Tool และใน Gene Directory (syngene, England) ใช้วิธี UPGMA ของ Dice ซึ่ง จะแสดงผลออกมาในรูป dendrogram (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 Dendrogram แสดงภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa* I, *Mbo* I, *Rsa* I และ *Taq* I

แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองและไหมป่าที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa* I ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 1,302 คู่เบส และ 137 คู่เบส ส่วนของไหมป่าได้ 2 ชิ้นส่วนเช่นกันแต่มีขนาดต่างกันคือ ขนาด 1,070 คู่เบส และ 370 คู่เบส (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะ *Bfa* I

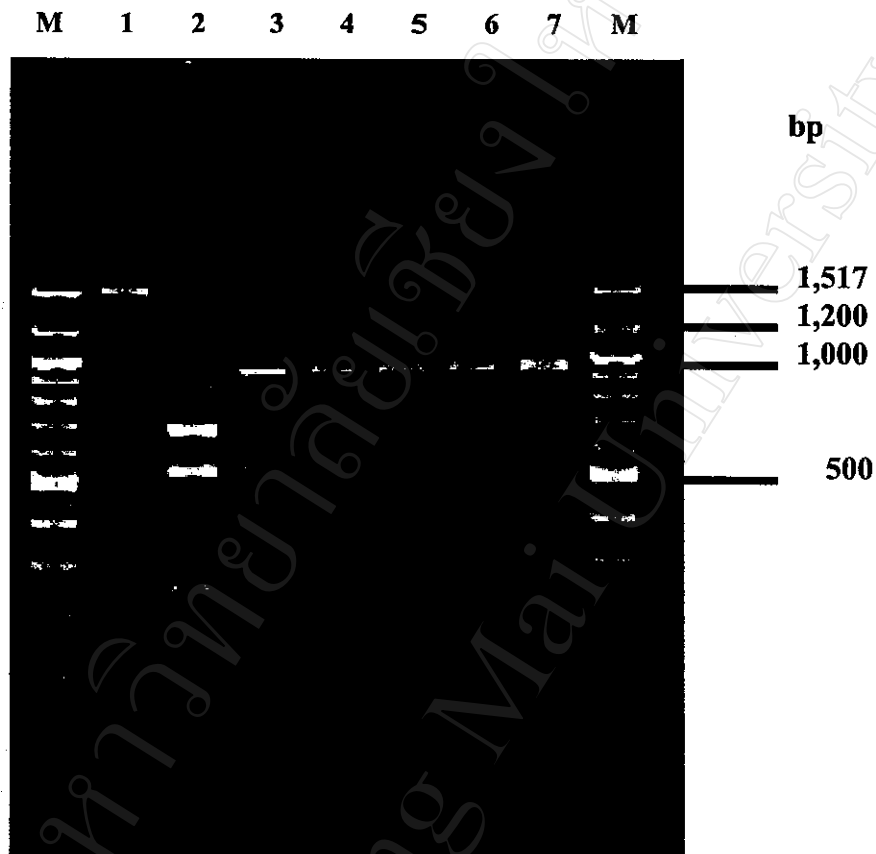
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)

1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนฤาษีที่ไม่ใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa* I

2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนฤาษี พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขียวสกล และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa* I



แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองและไหมป่าที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo* I ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 960 คู่เบส และ 540 คู่เบส ส่วนของไหมป่าได้ 3 ชิ้นส่วนคือ ขนาด 700 คู่เบส 530 คู่เบส และ 260 คู่เบส (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์

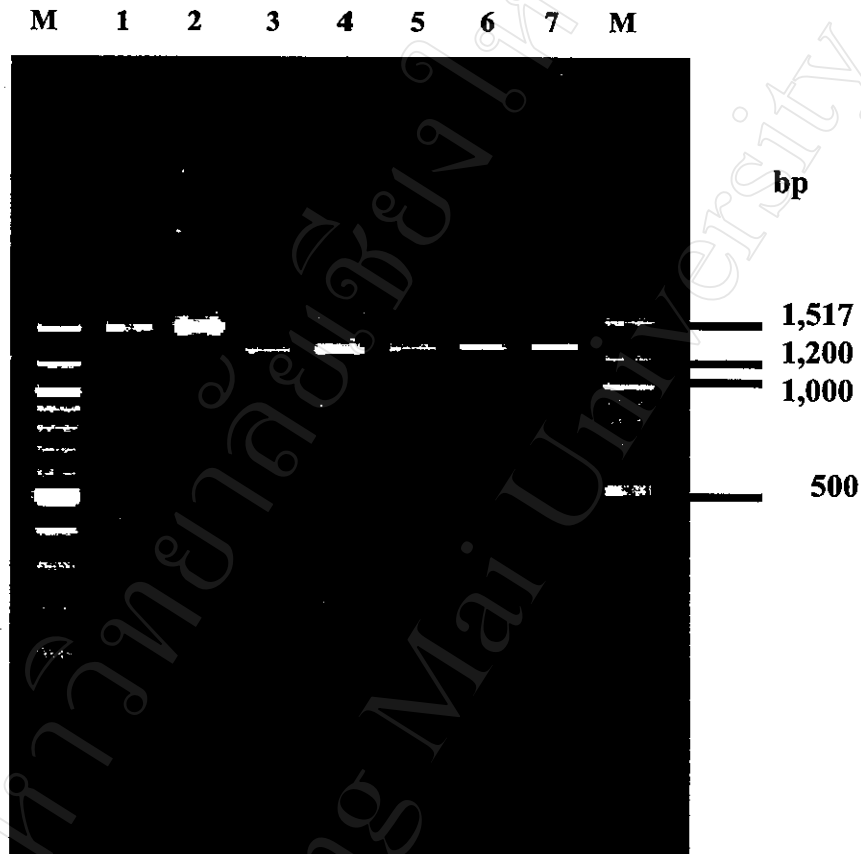
ตัดจำเพาะ *Mbo* I

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)

1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนฤาษีที่ไม่ใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo* I

2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนฤาษี พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขียวสกล และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo* I

แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองและไหมป่าที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 1250 คู่เบส และ 250 คู่เบส ส่วนไหมป่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์

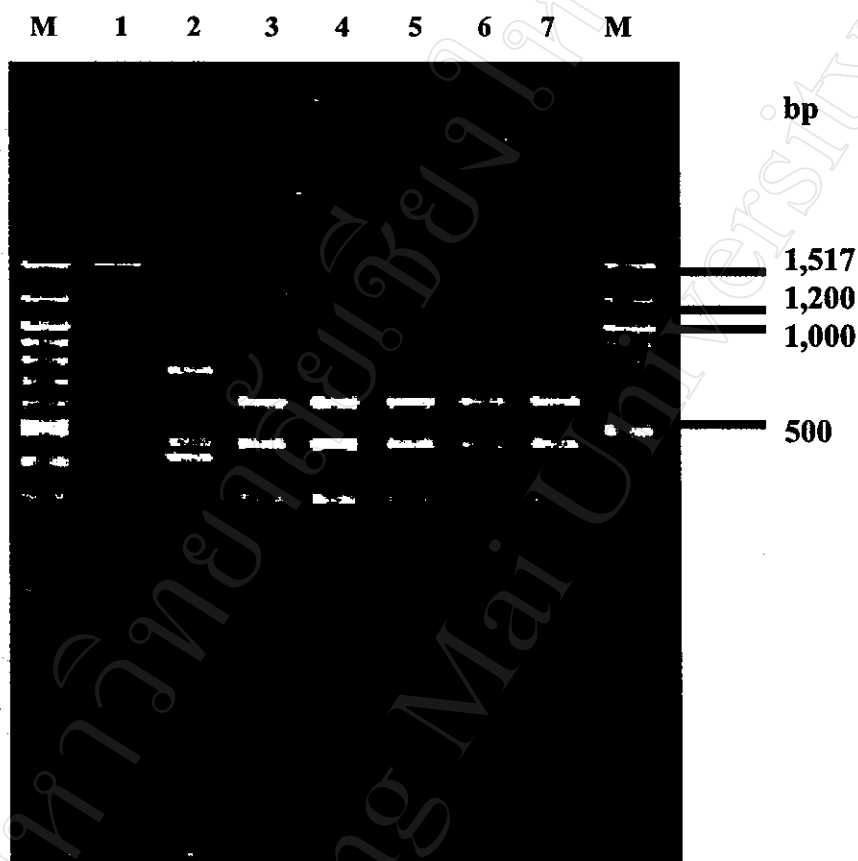
ตัดจำเพาะ *Rsa* I

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)

1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนถาญีที่ไม่ใส่  
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I

2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนถาญี  
พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขี้ยวสกล และพันธุ์นางน้อย  
ศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I

แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองและไหมป่าที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq I* ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง 4 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 617 คู่เบส 450 คู่เบส และ 300 คู่เบส 90 คู่เบส ส่วนของไหมป่าได้ 4 ชิ้นส่วนเช่นกันแต่มีขนาดที่ต่างกันคือ ขนาด 750 คู่เบส 400 คู่เบส 300 คู่เบส และ 200 คู่เบส (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq I*

- M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)
- 1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนฤาษีที่ไม่ใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq I*
- 2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนฤาษี พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขียวสกล และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq I*

กลุ่ม 4 คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ได้และจำแนกไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกจากกันได้ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse* I โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ บนอะครีลาไมด์เจล ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 ชั่วโมง และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis ในโปรแกรม Gene Tool และใน Gene Directory (syngene, England) ใช้วิธี UPGMA ของ Dice ซึ่งจะแสดงผลออกมาในรูป dendrogram (ภาพที่ 22)

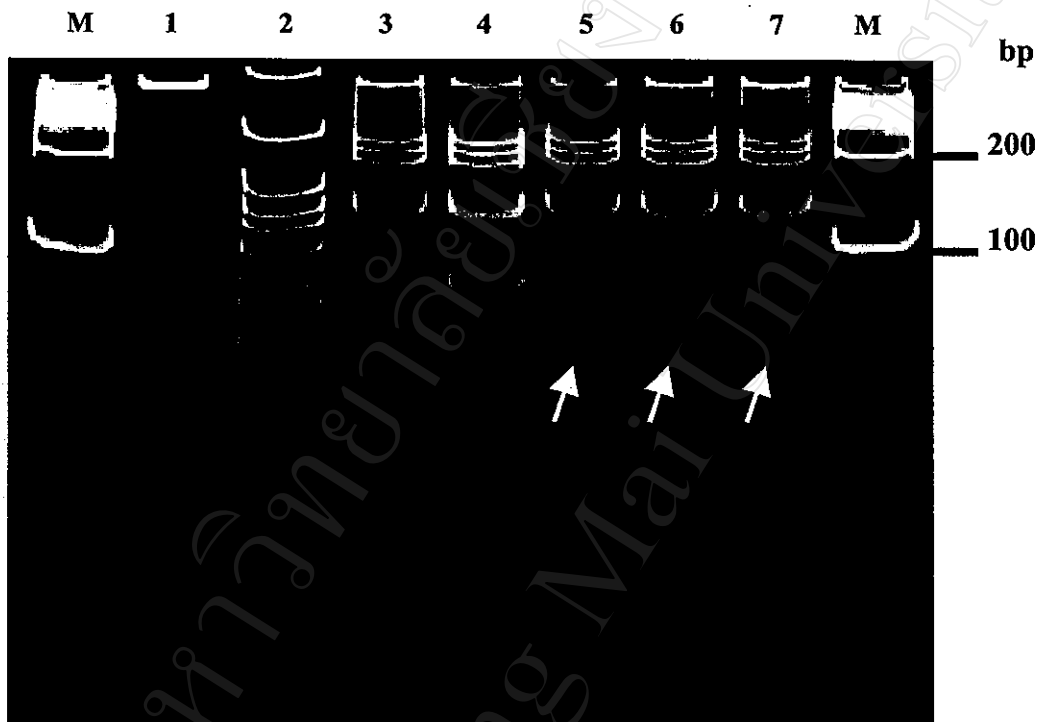


ภาพที่ 22 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไหมป่าไหมและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse* I

จากภาพแสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 43 คู่เบส (ลูกศรชี้) ที่สามารถจำแนกไหมพันธุ์พื้นเมืองออกจากกันได้เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 23) ดังนี้

กลุ่ม 1 ไหมพันธุ์โนนถายี และพันธุ์นางลาย

กลุ่ม 2 ไหมพันธุ์เขียวสกล นางเหลือง และนางน้อยศรีสะเกษ 1



ภาพที่ 23 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วน COI-COII ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse I*

- M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp ladder, New England Biolabs)
- 1 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของไหมพันธุ์โนนถายีที่ไม่ใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse I*
- 2-7 คือ ผลผลิตดีเอ็นเอของไหมป่า ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์โนนถายี พันธุ์นางลาย พันธุ์นางเหลือง พันธุ์เขียวสกล และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ตามลำดับ เมื่อใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse I*