# บทที่ 5

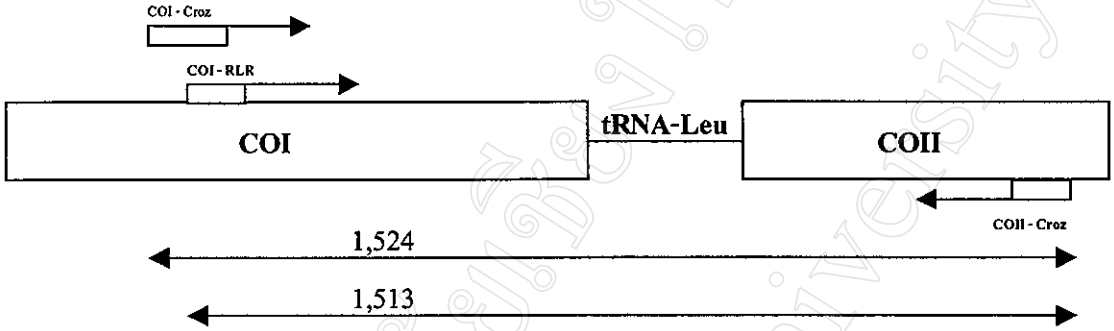
## วิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอจากส่วนอกของผีเสื้อไหม ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Tuda *et al.* (1995) และวีณา และคณะ (2544ก) เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; OD) พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ($OD_{260}$) ในไหมทุกพันธุ์ประมาณ 0.16-0.20 หรือมีความเข้มข้นประมาณ 1.6–2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าได้ค่า $OD_{260}$ เท่ากับ 1.0 แสดงว่ามีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (พงชัย, 2544) ในการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอจะต้องเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งในที่นี้เจือจางที่ 200 เท่า และนอกจากนี้ต้องมีการปนเปื้อนของสารให้น้อยที่สุด เพราะสารบางชนิดเช่น ฟีนอลที่สามารถดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรได้ อาจทำให้ได้ค่าที่วัดได้สูงกว่าความเป็นจริง ส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ($OD_{280}$) เป็นค่าที่โปรตีนและอาร์เอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ค่าอัตราส่วนของ $OD_{260}$ : $OD_{280}$ ใช้บ่งบอกความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าอัตราส่วนของ $OD_{260}$ : $OD_{280}$ มีค่า 1.7–1.8 แสดงว่ามีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่มากหรือดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์มาก และถ้าอัตราส่วนของ $OD_{260}$ : $OD_{280}$ มีค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนและอาร์เอ็นเอปนอยู่ จากการหาค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอพบว่าได้ค่าประมาณ 0.98-1.0 ซึ่งค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล (พงชัย, 2544) ในการศึกษานี้แม้ผลการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างมีช่วงของค่าความบริสุทธิ์ $OD_{260}$ : $OD_{280}$ แปรปรวนมาก อย่างไรก็ตามสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น โปรตีน หรืออาร์เอ็นเอ มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน COI-COII gene ซึ่งอยู่ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโดยใช้ primer COI-RLR และ primer COII-Croz (Roehdanz, 1993) น้อยมากและได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 1.5 กิโลเบสในทุกพันธุ์รวมทั้งของผีเสื้อไหมป่าที่นำมาเปรียบเทียบนอกกลุ่มอย่างชัดเจนและพอเพียงต่อการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

primer ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย COI–COII สามารถเลือกใช้ได้หลายตำแหน่งกล่าวคือ primer forward มีให้เลือกใช้ได้ 2 ชนิด คือ primer COI–Croz ตำแหน่งที่ 2,160–2,185 บนลำดับเบสของไมโตคอนเดรียของ *D. yakuba* (Clary and Wolstenhome, 1985) และ primer COI–RLR ซึ่งได้รับการพัฒนาจากลำดับเบสของไมโตคอนเดรียของผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ที่ตำแหน่ง 2,492–2,515 (Crozier and Crozier, 1993) และเมื่อเทียบกับตำแหน่งของลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียของ *D. yakuba* จะต้องเลื่อนจากตำแหน่งเดิม (COI–Croz) ไปอีก 11

เบส เป็นตำแหน่ง 2,171–2,194 ส่วน reversed primer นั้นมีเพียงชนิดเดียวคือ primer COII–Croz ตั้งอยู่บน COII ตำแหน่ง 3,663–3,684 บนลำดับเบสของไมโตคอนเดรียของ *D. yakuba*

primer ทั้งสามชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ COI–COII เป้าหมายได้ในแมลงหลายชนิดและให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอยาวประมาณ 1,400–1,500 คู่เบสขึ้นอยู่กับชนิดของแมลง และชนิดของ primer คู่ที่เลือกใช้ (ภาพที่ 24)




ภาพที่ 24 ตำแหน่งของ primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนลำดับดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียของ *D. yakuba*

ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ COI–RLR เป็น forward primer และ COII–Croz เป็น reverse primer ทั้งนี้เพราะให้ผลของการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายจากไหมพันธุ์ต่าง ๆ ที่ทำการศึกษาได้สูงสุดและชัดเจนเมื่อเทียบกับ primer อื่น ๆ รวมทั้งความยาวที่ได้มีความเหมาะสมเพียงพอในการนำมาใช้ศึกษาทาง PCR–RFLP

เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ตัว คือ *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 ส่วนเอนไซม์ที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้แต่แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผีเสื้อไหมป่าและพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองได้ คือ *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)

ส่วนเอนไซม์ที่สามารถตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้และให้แผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถจำแนกไหมป่าออกจากพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองได้และขณะเดียวกันสามารถใช้จำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองได้มีเพียงชนิดเดียวคือ เอนไซม์ *Mse* I

เอนไซม์ *Mse* I มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา PCR–RFLP ของสายพันธุ์ของไหมมากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้เพราะจากการศึกษาลำดับของดีเอ็นเอทั้งหมดในไมโตคอนเดรียในแมลงหลายชนิดเช่น *D. yakuba, A. mellifera, An. quadrimaculatus* และ *An. gambiae* (Hwang *et al.*, 1999) ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียที่พบในแมลงมักประกอบด้วยเบส A และ T ในปริมาณที่สูงมากในบางกรณีอาจสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Langor and Sperling, 1997; Roenrdanz, 1995; Sihanuntavong *et al.*, 1999)

เอนไซม์ประกอบด้วยลำดับของเบสเพียง 4 เบสเท่านั้นคือ TTAA ซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์ที่สั้นมาก และสั้นกว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I ที่มีลำดับของเบสใกล้เคียงกันคือ TTTAAA ที่ใช้ได้ผลในแมลงหลายชนิดเช่นกันดังกรณีการจำแนกความแตกต่างภายในชนิดของผึ้ง (*A. cerana*) จากภาคเหนือ เกาะสมุย และเกาะภูเก็ต โดยใช้เอนไซม์ *Dra* I ตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจาก srRNA, lrRNA และ COI-COII gene (Sihanuntavong *et al.*, 1999) แต่อย่างไรก็ตามในเชิงของโอกาสของการปรากฏตัวของลำดับเบสของ *Mse* I บนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งหมดจะสูงกว่า *Dra* I เนื่องจากสั้นกว่า อีกทั้ง *Mse* I สามารถตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกับที่ *Dra* I ตัดได้เช่นกัน

แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากการตัดด้วย *Mse* I สามารถใช้จำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม 1 โนนฤาษี และนางลาย กลุ่ม 2 นางเหลือง เขียวสกล และนางน้อยศรีสะเกษ 1 ความแตกต่างระหว่างทั้งสองกลุ่มเกิดขึ้นจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดในกลุ่มที่ 2 มีเพิ่มขึ้นมา 1 แถบเท่านั้นแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอของทั้งสองกลุ่มมีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก และสามารถบ่งบอกได้ว่าสายพันธุ์ไหมที่ศึกษามีความใกล้ชิดกันมากรวมทั้งการมีบรรพบุรุษร่วมกันมาก่อนในระยะเวลาที่ไม่นานมากนักซึ่งการแยกตัวออกเป็น 2 กลุ่มนี้อาจเป็นผลมาจากแรงกดดันทั้งจากธรรมชาติและจากการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์โดยมนุษย์

อย่างไรก็ตามในขั้นต่อไปควรมีการศึกษาด้วยวิธี PCR–RFLP ขยายผลเพิ่มเติมในส่วนของสายพันธุ์ไหมชนิดอื่น ๆ และชนิดของดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่งอื่น ๆ รวมทั้งควรมีศึกษาในทำนองเดียวกันนี้แต่ใช้วิธีการอื่น ๆ เช่นการใช้เทคนิค microsattlelite และ DNA sequencing เป็นต้น เพื่อให้สามารถครอบคลุมพันธุ์ไหมต่าง ๆ ได้อย่างทั่วถึง เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้รับให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพราะวิธีการแต่ละวิธีมักมีศักยภาพในการวัดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ต่างกันและเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์ต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น