บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

การแจงชั้น (Classification)

ไหมเป็นแมลงที่มีการเปลี่ยนรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Holometabolous) คือ ระยะไข่ (egg) หนอน (larva) ดักแด้ (pupa) และตัวเต็มวัย (adult) ซึ่งแต่ละระยะจะมีช่วงการเจริญเติบโตและมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป (จิราพร, 2544)

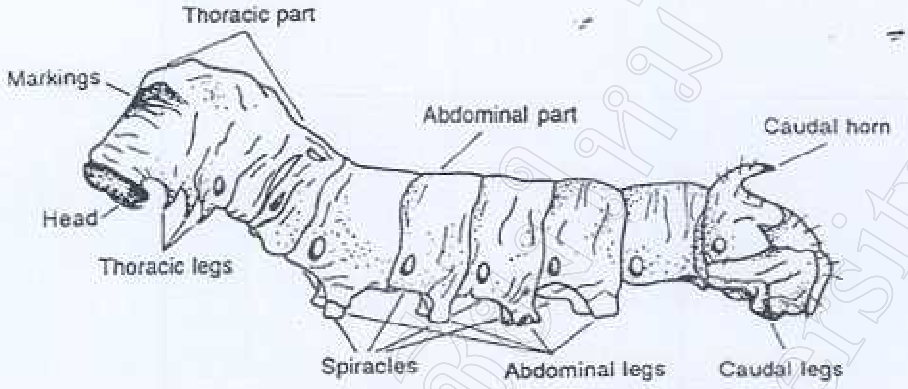
ไหมสามารถแจงชั้นได้ดังนี้ (ไสว, 2544; Borror *et al.*, 1989)

Kingdom (อาณาจักร) Metazoa
  Phylum (ไฟลั่ม) Arthopoda
    Class (ชั้น) Hexapoda or Insecta
      Order (อันดับ) Lepidoptera
        Family (วงศ์) Bombycidae
          Genus (สกุล) *Bombyx*
            Species (ชนิด) *mori*

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Bombyx mori* (Morphology)

ลักษณะหนอนไหมเมื่อฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะมีสีดำเข้ม หัวค่อนข้างใหญ่ ตามผิวลำตัวมีขนขึ้นปกคลุมทั่ว เมื่อหนอนไหมเจริญเติบโตผนังลำตัวจะเริ่มเรียบและสีผิวจาง รูปร่างของหนอนประกอบไปด้วย ส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) มีขา 3 คู่ มีขาเทียม (prolegs หรือ abdominal legs) ที่ส่วนท้อง 4 คู่ (ภาพที่ 1)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University


Thoracic part
Markings
Abdominal part
Caudal horn
Head
Thoracic legs
Spiracles
Abdominal legs
Caudal legs

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของหนอนไหม

ผีเสื้อไหมเป็นระยะที่เจริญเปลี่ยนแปลงต่อมาจากระยะดักแด้ลำตัวผีเสื้อแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รอบ ๆ ลำตัวผีเสื้อจะถูกปกคลุมด้วยขนที่มีขนาดเล็กทั่วทั้งหมด ที่อกปล้องกลางและหลังจะมีปีกปล้องละ 1 คู่ โดยผีเสื้อเพศผู้จะมีส่วนท้อง 8 ปล้อง เพศเมียจะมี 7 ปล้อง (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 ลักษณะทั่วไปของผีเสื้อไหม

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ลักษณะทั่วไปของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองที่เลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันมีลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ (กรมวิชาการเกษตร, 2535ข)

2.1 นางน้อยศรีสะเกษ 1

ลักษณะเด่นของพันธุ์

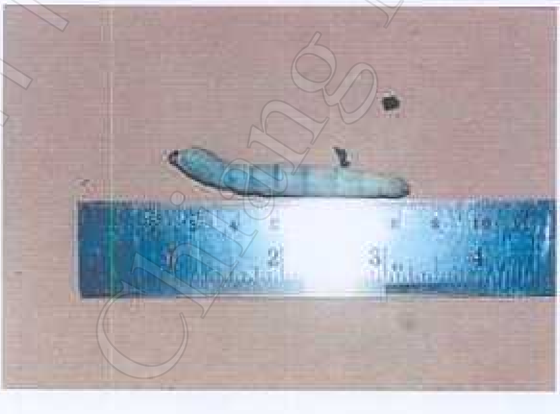
สามารถเลี้ยงได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ความสามารถในการสาวเส้นไหมออกสูง เส้นใยเหนียวและเลื่อมมัน แต่ปริมาณไข่ไหมต่อแม่ และเปอร์เซ็นต์เปลือกรังค่อนข้างต่ำ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นพันธุ์ที่ฟักออกตามธรรมชาติตลอดปี ลำตัวสีขาวนวลตลอด ไหมสุกลำตัวสีเหลือง ตัวหนอนโตเต็มที่ความยาวเฉลี่ย 5.38 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 1.94 กรัม รังไหมมีสีเหลืองเข้ม หัวรังกลมมน ท้ายรังค่อนข้างแหลม ไข่สีขาวอมเหลือง

ลักษณะทางการเกษตร

ขนาดรัง 1.62 x 3.18 เซนติเมตร ในหนึ่งรังมีน้ำหนักรังสด 0.80 กรัม น้ำหนักเปลือกรัง 10.3 เซนติกรัม เปลือกรัง 12.8-13.5 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงรอดของหนอนไหม 90-95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไข่เฉลี่ย 250 ฟองต่อไหมหนึ่งแม่ อายุของหนอนไหมตั้งแต่ฟักออกจนถึงทำรังประมาณ 18-22 วัน จำนวนรังไหม 1,200 รังต่อหนึ่งกิโลกรัม เหมาะกับการเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงโดยเฉพาะ



ภาพที่ 3 ลักษณะของหนอนไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 วัย 5

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2.2 นางเหลือง

ลักษณะเด่นของพันธุ์

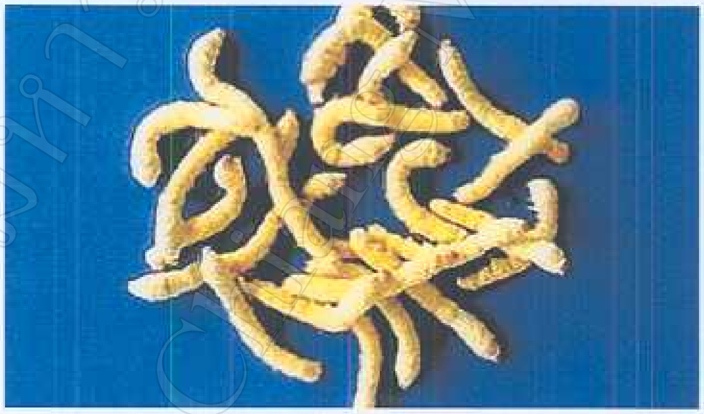
เลี้ยงง่ายสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ทุกฤดูกาล มีความทนทานต่อโรค รังไหมมีสีเหลืองเข้ม ความสามารถในการสาวเส้นไหมออกสูง แม้ว่าไหมจะทำรังขณะฝนตกชุก ความชื้นในอากาศสูง เส้นใยเหนียวและเลื่อมมัน เปอร์เซ็นต์เลี้ยงรอดสูงมาก แต่อย่างไรก็ตามรังมีขี้ไหม (floss) มาก และเปอร์เซ็นต์เปลือกรังค่อนข้างต่ำ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นพันธุ์ที่ฟักออกตามธรรมชาติตลอดปี (polyvoltine) ไข่สีขาวอมเหลืองลำตัวสีเหลือง ไม่มีจุดประ ไหมสุกลักษณะตัวสีเหลืองเข้ม ความยาว ตัวหนอนโตเต็มที่ เฉลี่ย 5.49 เซนติเมตร น้ำหนักตัวหนอนโตเต็มที่ 1 ตัว เฉลี่ย 1.4 กรัม รังไหมมีสีเหลืองเข้ม หัวท้ายแหลม

ลักษณะทางการเกษตร

ขนาดรัง 1.30 x 2.85 เซนติเมตร ในหนึ่งรังมีน้ำหนักรังสด 0.75-0.80 กรัม น้ำหนักเปลือกรัง 9.04 เซนติกรัม เปลือกรัง 11.3-12.1 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงรอดของหนอนไหม 95-98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไข่ไหมเฉลี่ย 250 ฟองต่อหนึ่งแม่ อายุของหนอนไหมตั้งแต่ฟักออกจากไข่จนถึงทำรังประมาณ 20-24 วัน จำนวนรังไหม 1,300-1,400 รังต่อหนึ่งกิโลกรัม สามารถเลี้ยงได้ดีในทุกสภาพเขตนิเวศนวิทยาเกษตร



ภาพที่ 4 ลักษณะของหนอนไหมพันธุ์นางเหลือง วัย 5

2.3 นางลาย

ลักษณะเด่นของพันธุ์

ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เปอร์เซ็นต์รังเสียต่ำความสามารถในการสาวเส้นไหมออกสูง เส้นใยเหนียวและเลื่อมมัน แต่รังมีขี้ไหมค่อนข้างมากและค่อนข้างอ่อนแอต่อโรค

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นพันธุ์ที่ฟักออกตามธรรมชาติตลอดปี ลำตัวมีลายสีน้ำตาลเข้มคาดขวางโดยตลอด ไข่สีขาวอมเหลือง ตัวหนอนโตเต็มที่ความยาวเฉลี่ย 6.3 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 1.2 กรัม รังไหมมีสีเหลืองเข้ม หัวท้ายรังค่อนข้างแหลม

ลักษณะทางการเกษตร

ขนาดรัง 1.43 x 2.90 เซนติเมตร ในหนึ่งรังมีน้ำหนักรังสด 0.71 กรัม น้ำหนักเปลือกรัง 8.90 เซนติกรัม เปลือกรัง 12.5-13.0 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงรอดของหนอนไหม 90-92 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไข่ไหมเฉลี่ย 320-350 ฟองต่อหนึ่งแม่ อายุของหนอนไหมตั้งแต่ฟักออกจากไข่จนถึงทำรังประมาณ 19-21 วัน จำนวนรังไหม 1,300-1,400 รังต่อกิโลกรัม ไม่ควรเลี้ยงในสภาพที่มีการแพร่ระบาดของโรค

ภาพที่ 5 ลักษณะของหนอนไหมพันธุ์นางลาย วัย 5

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2.4 เขียวสกล

ลักษณะเด่นของพันธุ์

ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ความสามารถในการสาวเส้นไหมออกสูง เส้นใยเหนียวและเลื่อมมัน และเปอร์เซ็นต์เปลือกรังค่อนข้างต่ำ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นพันธุ์ที่ฟักออกตามธรรมชาติตลอดปี ลำตัวมีสีเขียวอ่อน ไข่มีสีเหลืองอ่อน ขนาดของตัวหนอนโตเต็มที่ 1.20 x 5.50 เซนติเมตร ตัวหนอนโตเต็มที่น้ำหนักเฉลี่ย 1.91 กรัม รังไหมมีสีเหลืองเข้ม สีเส้นไหมสีเหลือง รูปร่างรังไหมหัวท้ายรังแหลม

ลักษณะทางการเกษตร

ขนาดรัง 3.30 x 1.38 เซนติเมตร ในหนึ่งรังมีน้ำหนักรังสด 0.93 กรัม น้ำหนักเปลือกรัง 12.27 เซนติกรัม เปลือกรัง 13.10 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงรอดของหนอนไหม 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไข่ไหมเฉลี่ย 380 ฟองต่อหนึ่งแม่ อายุของหนอนไหมตั้งแต่ฟักออกจากไข่จนถึงทำรังประมาณ 22 วัน

ภาพที่ 6 ลักษณะของหนอนไหมพันธุ์เขียวสกล วัย 5

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2.5 โนนฤาษี

ลักษณะเด่นของพันธุ์

ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เปอร์เซ็นต์เปลือกรังสูง ความสามารถในการสาวเส้นไหมออกสูง เส้นใยเหนียวและเลื่อมมัน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นพันธุ์ที่ฟักออกตามธรรมชาติตลอดปี ลำตัวมีสีเหลืองอ่อน ไข่สีเหลืองอ่อน ขนาดของตัวหนอนโตเต็มที่ 1.30 x 5.60 เซนติเมตร ตัวหนอนโตเต็มที่น้ำหนักเฉลี่ย 2.28 กรัม รังไหมมีสีเหลืองเข้ม สีเส้นไหมสีเหลือง รูปร่างรังไหมหัวท้ายรังแหลม

ลักษณะทางการเกษตร

ขนาดรัง 3.36 x 1.46 เซนติเมตร ในหนึ่งรังมีน้ำหนักรังสด 1.08 กรัม น้ำหนักเปลือกรัง 14.20 เซนติกรัม เปลือกรัง 13.13 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงรอดของหนอนไหม 96 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไข่ไหมเฉลี่ย 410 ฟองต่อหนึ่งแม่ อายุของหนอนไหมตั้งแต่ฟักออกจากไข่จนถึงทำรังประมาณ 20 วัน

ภาพที่ 7 ลักษณะของหนอนไหมพันธุ์โนนฤาษี วัย 5

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

3. การจำแนกพันธุ์ไหมจากลักษณะทั่วไป

สามารถจำแนกพันธุ์ไหมได้ดังนี้ (จิราพร, 2544; ชาญชัย, 2537; กอบกุล, 2541)

1. จำแนกตามสภาพภูมิศาสตร์ของแหล่งที่พบ (geographical distribution) คือไหมญี่ปุ่น ไหมจีน ไหมยุโรป ไหมอินเดีย และไหมเขตร้อน
2. จำแนกตามจำนวนครั้งที่ไข่ไหม ฟักออกตามธรรมชาติในรอบปี (voltinism) ได้แก่
    - 2.1 ไหมที่ฟักออกปีละ 1 ครั้งต่อปี (univoltine) ไข่ไหมพวกนี้จะมีการพักตัวผ่านฤดูหนาวได้แก่ ไหมที่อยู่ในแถบทวีปยุโรป ซึ่งถือว่าเป็นเขตอบอุ่น (temperate zone) โดยไข่ไหมจะฟักออกเป็นตัวไหมได้เองตามธรรมชาติปีละครั้งเท่านั้น
    - 2.2 พวกที่ฟักออกปีละ 2 ครั้งต่อปี (bivoltine) ไข่ไหมพวกนี้จะมีอยู่ในเขตอบอุ่นเช่นกัน ส่วนมากจะพบในประเทศ ญี่ปุ่น จีน เกาหลี เป็นต้น มีชีพจักรคล้าย ๆ ไหม univoltine ต่างกันที่เมื่อครบวงจรชีวิตแล้ว จะสามารถเพิ่มวงจรชีวิตต่อไปได้ในปีเดียวกัน หลังจากนั้นจะพักตัวผ่านฤดูหนาว แล้วไปเริ่มวงจรชีวิตในปีถัดไป
    - 2.3 ไหมที่ฟักออกได้ปีละหลายครั้ง (polyvoltine) พบในเขตร้อน (tropical zone) ไข่ไหมชนิดนี้จะไม่มีการพักตัว สามารถฟักได้เองหลังจากที่แม่ผีเสื้อวางไข่แล้ว 10 – 12 วัน
3. จำแนกตามจำนวนครั้งของการลอกคราบในระยะที่เป็นตัวหนอน (moltinism) แบ่งเป็นพวกที่ลอกคราบ 3 ครั้ง 4 ครั้ง และ 5 ครั้ง ไหมที่เลี้ยงเป็นการค้าอยู่ในปัจจุบันมีเฉพาะพวกที่ลอกคราบ 4 ครั้งเท่านั้น
4. จำแนกตามลักษณะการผสมข้าม ได้แก่ การนำพันธุ์ตั้งแต่ 2 พันธุ์ขึ้นไปมาผสมกัน ซึ่งลักษณะของการผสมข้ามมีหลายประการด้วยกัน สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ไหมลูกผสมที่เกิดขึ้น คือ
    - ลูกผสมชั่วที่ 1 (F1 hybrid)
    - ลูกผสมชั่วที่ 2 (F2 hybrid)
    - ลูกผสมข้ามสายพันธุ์ (three – way cross hybrid)
    - ลูกผสมสี่สายพันธุ์ (double cross hybrid)
5. จำแนกตามสีของรัง (cocoon color) ซึ่งจะแตกต่างไปตามสายพันธุ์ เช่นพันธุ์เขตร้อนมักมีสีเหลือง หรือเหลืองอมชมพู พันธุ์ญี่ปุ่นรังสีขาว พันธุ์จีนรังสีขาวหรือสีเหลือง พันธุ์ยุโรปรังขาวหรือเหลืองอมชมพู สีของรังไหมที่นิยมเลี้ยงกันเป็นอุตสาหกรรม คือ รังไหมสีขาว
6. จำแนกตามฤดูกาลเลี้ยงไหม (reason season) ในประเทศญี่ปุ่นหรือเกาหลี การเลี้ยงไหมจะใช้พันธุ์ที่เหมาะสมในแต่ละฤดูกาล เช่น พันธุ์ฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งให้ผลผลิตสูง แต่มีความ

ต้านทานโรคต่ำ ส่วนพันธุ์ไหมที่เลี้ยงกันในฤดูร้อนและฤดูใบไม้ร่วงเป็นพันธุ์ไหมอีกพันธุ์หนึ่งที่มีความต้านทานโรคสูง แต่ผลผลิตต่ำกว่าไหมที่เลี้ยงในฤดูใบไม้ผลิ เป็นต้น

7. จำแนกตามลักษณะผิวหนังด้านนอกเป็นลายหรือเป็นสีเดียวกันตลอด เช่นพันธุ์ไหมจีนจะมีลักษณะลำตัวขาวตลอดตัว (plain) ไม่มีเครื่องหมายเป็นลายใด ๆ ทั้งสิ้นบนตัวไหม ส่วนพันธุ์ไหมญี่ปุ่นผิวของลำตัวมักจะมีจุดหรือเครื่องหมายเป็นลาย (marking) เช่น eye spot, crescent และ star spot ถ้าหากว่ามีลักษณะดังกล่าวครบทั้ง 3 ชนิด เรียกว่า normal marking ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ไหมได้เช่นกัน
8. จำแนกตามสีของไข่ไหม (eggs color) สีของไข่ไหมจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ เช่น ไข่ไหมเขตร้อน หลังจากแม่ผีเสื้อวางไข่แล้วจะมีสีเหลืองอ่อน จนกระทั่งไข่ไหมมีอายุ 7–8 วัน ก็จะเปลี่ยนเป็นสีจุดน้ำเงินเข้มหรือดำ (blue point) ต่อมาจะเป็นสีดำทั้งหมดเรียกว่า all blue ส่วนไข่ไหมเขตอบอุ่น ซึ่งมีการฟักออก 1–2 ครั้งต่อปี หลังจากแม่ผีเสื้อวางไข่แล้ว 24 ชั่วโมง จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน น้ำตาลอมชมพู น้ำตาลเข้ม และสีเทาเข้มสุดท้ายก่อนที่จะฟักออกเป็นตัวประมาณ 1–2 วัน ไข่ไหมพวกนี้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินทั้งหมด เช่นเดียวกับไข่ไหมในเขตร้อน
9. จำแนกตามความย่น (wrinkle) ของผิวรัง ไหมพันธุ์เขตร้อนจะมีผิวรังเรียบเกลี้ยงมีขี้ไหมมาก ส่วนมากไหมในเขตอบอุ่น เช่น สายพันธุ์ญี่ปุ่น จีน มักมีความย่นของผิวรังมาก และมีขี้ไหมน้อย

4. การจำแนกลักษณะทางอณูวิทยา (Molecular character)

ชีววิทยาระดับโมเลกุลเป็นสาขาที่มีความเจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว และมีการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในหลายสาขาวิชาในการแยกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน

4.1 ไอโซไซม์ (Isozyme)

โปรตีนถือเป็นสารเริ่มแรกที่ถูกสังเคราะห์โดยตรงมาจากยีน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้นที่ลำดับเบสของยีนก็จะมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป และก่อให้เกิดความแตกต่างของการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนเดิม (สุคันธรส และคณะ, 2535) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากการได้รับอิทธิพลของสภาพแวดล้อมทำให้กระบวนการทางชีวเคมีที่สร้างเอ็นไซม์หรือไอโซไซม์แตกต่างกันได้ (เสาวณี, 2538) การใช้แบบของไอโซไซม์ (Isozyme pattern) จึงเป็นการแยกโดยดูจากลักษณะของเอ็นไซม์ชนิดเดียวกันที่มียีนต้นแบบมากกว่าหนึ่งยีนทำให้โมเลกุลและองค์ประกอบต่างกัน โดยอาศัยเทคนิคทาง

Chiang Mai University

อิเล็คโตรโฟริซิส โดยสามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์เดียวกันหรือต่างพันธุ์กันได้ (สมศักดิ์, 2540)

4.2 DNA marker

ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ เก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิด เช่น คลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรีย ในรูปของดีเอ็นเอ ลักษณะที่ปรากฏในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นเป็นผลรวมของการกระทำร่วมกันของโปรตีนหลายชนิดซึ่งมีต้นตอมาจากดีเอ็นเอที่มีความสามารถที่จะจำลองตัวได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป (สุรินทร์, 2536) บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอเนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองหรือเหตุอื่น ๆ ซึ่งวิธีการตรวจสอบหาความแตกต่างได้โดยดูความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา เช่น เทคนิค RFLP เป็นต้น (สุรีรัตน์, 2544)

4.2.1 เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เป็นวิธีการศึกษาโดยใช้หลักการของการตัดดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งเอ็นไซม์แต่ละชนิดจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสจำเพาะ หรือตำแหน่งจดจำ (restriction site) เท่านั้น เมื่อดีเอ็นเอในบริเวณจำเพาะถูกตัดจะทำให้ได้ชิ้นของดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ กัน และหากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในบริเวณจุดตัดจำเพาะ ชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจะมีขนาดและรูปแบบเปลี่ยนไป เรียกว่าเกิดโพลีมอร์ฟิซึม หรือมี RFLP

4.2.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลี่เมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ในปี 1983 Mullis และคณะ อ้างโดยจริยา (2540ข) ได้ค้นพบวิธีการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้วิธีการทางด้านอณูวิทยานี้มีการพัฒนาที่เร็วขึ้น คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลี่เมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) หรืออีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzymetic amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (Vosberg, 1989) เฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง ซึ่งถ้าต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะต้องมีดีเอ็นเอต้นแบบ (template) และอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ หรือนิวคลิโอไทด์ตั้งต้น (primer) ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นเนื่องจาก primer มีผลมากในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจึงต้องมีการเลือก primer ที่เหมาะสม คือต้องคำนึงถึงความยาวของ primer สัดส่วนของ GC/AT และอุณหภูมิในการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (melting temperature) (Dieffenbach *et al.*, 1993; Rychlik, 1995) และมีการใช้เอ็นไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลิโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP, dCTP, dTTP, dGTP เข้ามาต่อ

เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบจะได้ดีเอ็นเอสายใหม่ เมื่อทำหลาย ๆ รอบก็จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นได้ ในการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ต้องอาศัยส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ, thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), oligonucleotide primer, pH ของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และความเข้มข้นของเกลือแมกนีเซียม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ รอบที่เหมาะสมด้วย (จริยา, 2540ก; วัชรี และมนตรี, 2536; วีระพงศ์, 2539; Gibbs, 1990; McPherson *et al.*, 1991; Newton and Graham, 1994; Roux, 1995) ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90–95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วินาที การใช้เวลาและอุณหภูมิที่นานและสูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์และนิวคลิโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้อุณหภูมิที่ต่ำหรือเวลาน้อยเกินไป จะทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกสายไม่สมบูรณ์ คือไม่เป็นสายเดี่ยว ทำให้ผลผลิตลดลง แต่ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบมีส่วนประกอบของ G + C สูงมาก ๆ ก็จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น
2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ 45–60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม คือ เป็นลำดับเบสนิวคลิโอไทด์ที่จับคู่กับนิวคลิโอไทด์สายเดิม และการใช้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้สูง ๆ จะช่วยเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่และลดการเกิดการจับคู่ของนิวคลิโอไทด์ที่ไม่ถูกต้อง (misextension) ที่ $3'$ – end ของ primer
3. ขั้นตอน primer extension (synthesize) เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย $3'$ ของ primer แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง $5'$ ไปทาง $3'$ โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น Taq DNA polymerase ซึ่งจะใช้อุณหภูมิ 70–72 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้จะขึ้นกับความยาว ความเข้มข้นและลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เพราะโดยทฤษฎีแล้ว Taq DNA polymerase สามารถขยายสายดีเอ็นเอได้ประมาณ 6,000 นิวคลิโอไทด์ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการใหม่ๆ โดยอาศัยหลักการทาง PCR เป็นพื้นฐาน เช่น เทคนิค RAPD, AFLP และ PCR-RFLP เป็นต้น

4.2.3 เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เป็นการเพิ่มขยายส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการจำแนกด้วย primer ที่สั้นและเป็น universal โดยอาศัยการจับแบบสุ่ม (random primer) ซึ่งส่วนมากจะใช้ประมาณ 10 mer ในแมลงจะมีการใช้ primer ที่มีอัตราของ G และ C ประมาณ 76 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปทำให้มีความคงที่ในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายดีขึ้น (Haymer, 1994) การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจะทำในสภาวะอุณหภูมิต่ำเพื่อให้ primer สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้หลายตำแหน่งแล้วนำเอาดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปแยกบนโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) โดยอาศัยหลักการที่ว่าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส (base) ได้แก่ adenosine (A) thymine (T) guanine (G) และ cytosine (C) ซึ่งจากรายงานในปี 1993 ของ Yu และคณะ อ้างโดยอุไรวรรณ (2540) กล่าวว่าน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ได้จะไม่เท่ากันในพันธุ์ที่แตกต่างกันแต่จะเหมือนกันในพันธุ์เดียวกันจึงทำการสุ่มเอาตัวแทนบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับขบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ (วัชรี และมนตรี, 2536; Abe *et al.*, 1998b; 2000)

4.2.4 เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอ (สุรศักดิ์, 2540) AFLP เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos ในปี 1993 อ้างโดยเอมอร (2544) ซึ่งเป็นการผสานกันระหว่างเทคนิค RFLP และ RAPD โดย polymorphism ที่ได้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของลำดับการเรียงตัวของเบสบริเวณที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเทคนิค PCR เช่นเดียวกับ RAPD ขั้นตอนในการทำ AFLP มี 3 ขั้นตอนคือ 1. ทำการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อชิ้นดีเอ็นเอด้วย adapter 2. เลือกเพิ่มดีเอ็นเอบางชิ้นอย่างจำเพาะเจาะจงโดยใช้ primer ที่มี nucleotide เป็นตัวคัดเลือก และขั้นตอนที่ 3 นำไปแยกความแตกต่างด้วยกระแสไฟฟ้าและวิเคราะห์ polymorphic band ที่เกิดขึ้น (Vos *et al.*, 1995)

4.2.5 เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP)

เป็นวิธีการที่พัฒนามาจาก RFLP แต่มีข้อดี คือ รวดเร็ว มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อนไม่จำเป็นต้องใช้ Hybridization มาช่วยในการตรวจสอบ และปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยก็เพียงพอที่จะใช้ศึกษาได้ สามารถเลือกศึกษาเฉพาะบริเวณที่สนใจเป็นส่วน ๆ ได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการศึกษาด้วยวิธี PCR แล้วนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นนำไปแยกดูชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกัน (สุรีรัตน์, 2544) โดยการนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

5. อิเล็คโตรโฟริซิส (Electrophoresis)

เป็นวิธีการที่ใช้กระแสไฟฟ้าช่วยในการแยกสารประกอบต่าง ๆ ออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันบางประการของโมเลกุลในการแยก เช่น ขนาด รูปร่าง ประจุ เป็นต้น ในการเคลื่อนที่ของสารให้แยกออกจากกันต้องอาศัยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าและตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสม (จริยา, 2540ข; สุจินดา, 2544; อาภัสสรา, 2537)

5.1 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟริซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

คือการแยกสารที่มีอัตราส่วนของประจุต่อมวลและขนาดที่แตกต่างกันในสนามไฟฟ้า โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลเป็นตัวกลาง (supporting media) สารชีวโมเลกุลที่สามารถแยกได้โดยวิธี PAGE คือ กรดอะมิโนหรือโปรตีน ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ

ข้อดีของ PAGE

1. มีประสิทธิภาพสูงในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก (5–500 bp)
2. มีความสามารถในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเพียง 1 bp หรือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของ 500 bp นั่นคือมีค่า resolving power สูงมาก
3. สามารถใช้แยกดีเอ็นเอได้ในเวลาที่รวดเร็วและแยกดีเอ็นเอปริมาณมากได้ โดยไม่ทำให้ค่า resolving power สูญเสียไป
4. สามารถใช้แยกจำนวนดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดี
5. ดีเอ็นเอที่สกัดจากโพลีอะคริลาไมด์ค่อนข้างบริสุทธิ์ สามารถนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไปได้
6. เป็นสารที่ inert จึงทำให้เสถียรได้ใน pH อุณหภูมิ และ ionic strength ต่าง ๆ ในช่วงกว้าง
7. เป็นโพลีเมอร์ที่ได้จากการต่อกันเป็นสายยาวของอะคริลาไมด์โมโนมอร์ (acrylamide monomer) จึงทำให้สามารถเตรียมได้จากสารสังเคราะห์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและสามารถควบคุมขนาดของช่องว่างของโพลีอะคริลาไมด์ได้

ข้อเสียของ PAGE

1. มีความยุ่งยากในการเตรียม และการจัดการมากกว่าอะกาโรสเจล
2. อาจทำให้ผลการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอสายคู่ได้ไม่ชัดเจนในบางกรณีเพราะการเคลื่อนที่จะผิดปกติคือ ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจเคลื่อนที่ผิดกันประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งขึ้นกับส่วนประกอบของเบสและลำดับเบสที่มีอยู่ในดีเอ็นเอ

Copyright by Chiang Mai University

5.2 อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟริซิส (Agarose gel electrophoresis)

เป็นวิธีการพื้นฐานสำคัญ ซึ่งสามารถใช้ช่วยวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ ทั้งในแง่คุณลักษณะและปริมาณได้ โดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อกระแสไฟฟ้าเข้าไปในอะกาโรสเจลแล้วดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก เนื่องจากประจุจากหมู่ฟอสเฟต และตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งสีนี้จะสอดแทรกเข้าไประหว่าง nucleotide base และจะเกิดการเรืองแสงเมื่อส่องผ่านด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ข้อดีของการแยกด้วยวิธีนี้คือเป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการแยกดีเอ็นเอด้วยโพลีอะคริลาไมด์ สำหรับอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟริซิสสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาด 100 คู่เบสถึง 60 กิโลเบสได้ (จุฑาพันธุ์, 2544)

การวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้อาศัยลักษณะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลเป็นหลัก อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ สำหรับปัจจัยที่ควรคำนึงถึงมีดังนี้

1. ขนาดของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ และระยะทางในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอ
2. รูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลหรือขนาดเท่ากันแต่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลด้วยอัตราที่ต่างกันภายใต้สภาวะเดียวกัน ดีเอ็นเอที่ขดเป็นวง (closed circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่เป็นเส้น (linear)
3. ความเข้มข้นของอะกาโรส ดีเอ็นเอเส้นตรงที่มีขนาดเท่ากันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราที่แตกต่างกันเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่างกัน
4. การเติมเอธิเดียมโบรไมด์ในเจลและบัฟเฟอร์ เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์ทำให้ประจุลบและความยืดหยุ่นของดีเอ็นเอลดลง แต่ทำให้ความยาวของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของสารเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอเกลียวคู่และเอธิเดียมโบรไมด์จะลดลงประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน
5. ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเส้นตรงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความต่างศักย์เมื่อใช้ความต่างศักย์ต่ำ แต่ถ้าเพิ่มความต่างศักย์สูงขึ้นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเปลี่ยนแปลง
6. ส่วนประกอบของเบสและอุณหภูมิ ซึ่งจะไม่มีผลอย่างนัยสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลที่ช่วงอุณหภูมิ 4–30 องศาเซลเซียส (ตรงข้ามกับอะคริลาไมด์เจล) ดังนั้นการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกขนาดดีเอ็นเอจึงมักทำที่อุณหภูมิห้อง

แต่อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะค่อนข้างบอบบางถ้าทำที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นการทำที่ 4 องศาเซลเซียส จะช่วยให้เจลแข็งขึ้น

7. ทิศทางของกระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วงไม่เกิน 100 กิโลเบส จะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วเดียวกันถ้าอยู่ในสนามไฟฟ้าที่มีทิศทางเดียวกันและคงที่ แต่ถ้าทิศทางของกระแสไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไปเป็นช่วง ๆ การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะเปลี่ยนไป เนื่องจากดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่ จะใช้เวลาในการปรับทิศทางของกระแสไฟฟ้าได้ช้ากว่าโมเลกุลเล็ก
8. ชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรโฟริซิส องค์ประกอบและ ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรโฟริซิสมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ถ้าบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำหรือใช้น้ำกลั่นแทนบัฟเฟอร์ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าเกินไป แต่ถ้าใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนมากระหว่างการทำอิเล็คโตรโฟริซิสซึ่งทำให้ดีเอ็นเอสูญเสียสภาพและเจลละลาย บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟริซิสคือ Tris-acetate buffer (TAE) และ Tris-borate buffer (TBE)

6. การใช้ดีเอ็นเอในการจำแนกแมลง

แหล่งของดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกด้วยวิธีการทางด้านโมเลกุลสามารถที่จะใช้จากนิวเคลียส หรือไมโตคอนเดรียก็ได้ โดยการวิเคราะห์หาลักษณะของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของแมลงทำให้เราทราบถึงลักษณะพันธุกรรมของแมลงในประชากรหนึ่ง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Kambhampati and Smith, 1995) และได้มีการออกแบบ primer เพื่อทำ PCR สำหรับศึกษาในแมลงชนิดต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างมากมายช่วยให้การพัฒนาเทคนิคทาง PCR มีความเหมาะสม สะดวกและรวดเร็วมาก (Zhang and Hewitt, 1996)

การจำแนกแมลงด้วยแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียนั้น Sperling and Hickey (1994) ได้ใช้ทั้งวิธีการทาง PCR และ DNA sequencing ร่วมกันเพื่อสำรวจหาความแตกต่างกันของ spruce budworm ที่เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของป่าไม้และไม้พุ่มในอเมริกาเหนือ โดยศึกษาทั้งภายในชนิดเดียวกันคือ *Choristoneura fumiferana* และต่างชนิดกัน ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียใช้ตั้งแต่บริเวณกึ่งกลางของ COI gene 470 คู่เบสผ่าน tRNA leucine จนถึงจุดสิ้นสุดของ COII gene ความยาวโดยรวม 1,573 คู่เบส พบว่ามีความต่างของลำดับเบสบน COI gene ภายในแมลงชนิดเดียวกัน *C. fumiferana* มีความแตกต่างจากชนิดอื่น ๆ ประมาณ 2.7-2.9 เปอร์เซ็นต์ แต่ในทางตรงกันข้าม *C. pinus, C. biennis, C. occidentalis* และ *C. orae* มีความแตกต่างกันน้อยกว่า 1

เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับในผีเสื้อ hemlock looper, *Lambdina fiscellaria* (Gn.) (Sperling *et al.*, 1999) ที่เป็นแมลงที่สำคัญในป่าไม้ทางตอนเหนือของอเมริกาซึ่งมี 3 ชนิดย่อย ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อตรวจดูลักษณะทางพันธุกรรม ก็มีความแตกต่างกันในชนิดย่อยเช่นกัน

Roehrdanz (1993; 1995) ได้ทดลองเปรียบเทียบลำดับของ nucleotide ของผึ้ง (honeybee) กับ *Drosophila yakuba* โดยใช้ส่วนของดีเอ็นเอขนาด 1.6-1.7 กิโลเบส ที่อยู่ในส่วนของ COI gene และ COII gene ช่วยในการพัฒนา primer ให้มีความเหมาะสมและสามารถทำงานได้กับสารพันธุกรรมของแมลงได้ง่ายและตรงความต้องการมากขึ้นทั้งในอันดับ Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera และพัฒนาเทคนิคในหลาย ๆ ด้านเพื่อเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวมาก ๆ ได้สำเร็จเช่น ในไมโตคอนเดรียของ *Helicoverpa zea* และ *Heliothis virescens* ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ที่ขนาดความยาวประมาณ 25–85 เปอร์เซ็นต์ จาก mtDNA ทั้งหมดได้

Tuda *et al.* (1995) ได้จำแนกแมลงในกลุ่ม bruchid beetles 4 ชนิดคือ *Callosobruchus chinensis* (L.), *C. rhodesianus* (Pic), *C. phaseoli* (Gyttenhal) และ *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) โดยใช้ตัวอย่างละ 2 ตัว ในแต่ละชนิดของหนอนวัย 1 หนอนวัย 4 และตัวเต็มวัยเพศเมีย จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด คือ *Taq* I, *Rsa* I, *Sau3A* I, *Bfa* I, *Dde* I และ *Hinf* I สามารถจำแนกแมลงทั้ง 4 ชนิดได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ *Taq* I, *Rsa* I และ *Sau3A* I นอกจากนี้วิธีดังกล่าวสามารถช่วยจำแนกความแตกต่างของหนอนแมลงวันในวงศ์ Oestridae ที่เป็นสาเหตุของโรค myiasis ในระดับ genera ได้จาก COI gene ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I, *Hinf* I, *Rsa* I และ *Hpa* II (Otrato *et al.*, 2000) นอกจากนี้ Sihanuntavong และคณะ (1999) ได้ใช้ส่วนของ large mitochondrial rRNA gene (lrRNA gene) และ small mitochondrial rRNA gene (srRNA gene) ในไมโตคอนเดรีย และส่วนของ COI gene ถึง COII gene ศึกษาความแตกต่างภายในชนิดของผึ้งโพรง (*Apis cerana*) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I พบว่า *A. cerana* จากภาคเหนือมีความแตกต่างจาก *A. cerana* บริเวณคาบสมุทรของประเทศไทยที่อาศัยอยู่บนเกาะสมุยและเกาะภูเก็ต ความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากระยะทางและสภาพพื้นที่อาศัยอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Deowanish *et al.* (1996) ที่หาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไมโตคอนเดรีย ของ *A. cerana* จากประเทศญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน เวียดนาม ไทย เนปาล และฟิลิปปินส์ โดยวิธีการ RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 10 ตัว พบว่ามีความแตกต่างกันของ *A. cerana* ที่นำมาจากต่างสถานที่กัน

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาในเพลี้ยอ่อนใน genus *Hamamelistes* ซึ่งในญี่ปุ่นมีการเรียกหลายชื่อทำให้มีความสับสนในการจำแนกและไม่สามารถแยกได้ระหว่างเพลี้ยอ่อนที่มีการเข้า

ทำลายก่อน (the primary host) ในพืช *Hamamelis* และเพลี้ยอ่อนที่มีการเข้าทำลายทีหลัง (the secondary host) ในพืช *Betula* โดยการทำ sequencing ส่วนของ COII gene แล้วพบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 species คือ *Hamamelistes miyabei* (Matsumura) พบบนต้น *Hamamelis japonica* และ *Betula maximowicziana, H. kagamii* (Monzen) พบบนต้น *H. japonica* และ *B. grossa,* และ *H. betulinus* (Horvath) พบบนต้น *H. japonica, B. platyphylla, B. davurica* และอาจพบบนต้น *B. ermanii* (Aoki *et al*., 2001) และยังมีการศึกษาในส่วนของ COI gene ถึงการวิวัฒนาการของแมลงบางชนิดในอันดับ Orthoptera (Harison *et al*., 1987; Zhang *et al*., 1995; Lunt *et al*., 1996), Diptera (Nigro *et al*., 1991; Spicer, 1995; Lunt *et al*., 1996), Hymenoptera (Lunt *et al*., 1996) และ Lepidopterra (Brown *et al*., 1994) ศึกษาถึงลำดับของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของ *Lucilia* spp. (Diptera: Calliphoridae) (Stevens and Wall, 1997)

วิธีการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย PCR-RFLP ในไมโตคอนเดรียของแมลงสามารถหาความแตกต่างของ screwworm จากคาริบเบียน อเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ (Taylor *et al*., 1996a, 1996b) มีการทดลองในแมลงวัน screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) ที่มีความสำคัญมาก และ *C. macellaria* (Fabricius) ที่มีความสำคัญรองลงมาในด้านการแพทย์และอนามัย เพราะเป็นแมลงพาหะแพร่เชื้อโรค เช่นโรค myiasis โดยแมลงทั้ง 2 ชนิดนี้อาจเป็นตัวแพร่เชื้อโรค myiasis ได้ทั้งคู่ วิธีการ PCR-RFLP ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ เพื่อจำแนกแมลงทั้ง 2 ชนิดจากสถานที่ต่างกันในบราซิล โดยส่วนที่ทำการศึกษาคือ COI และส่วน A+T rich/12S ตัดด้วยเอนไซม์ *Dra* I และ *Ssp* I พบว่าสามารถแยกแมลงทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้ (Litjens *et al*., 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสภาพความแตกต่างของนิเวศนวิทยาของยุง *Anopheles punctulatus* และ *An. farauti* 3 กลุ่ม คือ *An. farauti* Laveran sensu stricto, *An. farauti* no. 2 และ *An. farauti* no.7 จาก Guadalcanal และเกาะ Solomon ด้วยวิธีการ PCR-RFLP ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มของยุงได้ คือ *An. punctulatus* จะพบเฉพาะที่ราบชายฝั่งเท่านั้นส่วน *An. farauti* sensu lato จะพบในทุกพื้นที่ ๆ ทำการสำรวจ อาจพบอาศัยอยู่ร่วมกับ *An. farauti* Laveran sensu stricto และ *An. farauti* no. 2 ที่พบบริเวณน้ำกร่อย บางครั้งอาจพบ *An. Punctulatus* อยู่ร่วมกับ *An. Farauti* sensu lato ทั้ง 3 ชนิดนี้มีเฉพาะ *An. farauti* Laveran sensu stricto เท่านั้นที่สามารถเก็บได้ในกับดักเหยื่อที่วางไว้ และเก็บได้ในเวลา 18.30-20.00 น. มากกว่าเวลา 21.00-24.00น. (Beebe *et al*., 2000a) และยังได้ทำการศึกษาส่วนของ ITS ในประชากรของ *An. farauti* Laveran sensu stricto ที่เป็นพาหะของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณตะวันตกเฉียงใต้ของแปซิฟิก (ตอนเหนือของออสเตรเลีย ปาปัวนิวกินี อินโดนีเซียตะวันตก เกาะ Solomon และ Vanuatu) พบว่ายุงที่มีพื้นที่การกระจายเหลื่อมล้ำกันจะมีลำดับของ ITS ที่คละกัน (Beebe *et al*., 2000b)

ในการศึกษาแมลง *Forficula auricularia* L. ที่อาศัยอยู่พื้นที่สูงประมาณ 1200 เมตรจากระดับน้ำทะเล และที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ต่ำด้วย PCR-RFLP ในส่วนของ 16S rRNA และ Cytochrome Oxidase ก็พบว่าทั้ง 2 พื้นที่ ๆ ทำการศึกษาไม่มีความแตกต่างกันคือเป็นแมลงในชนิดเดียวกัน และในขณะเดียวกันก็ได้ศึกษาด้วย Allozyme ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน (Guillet *et al*., 2000)

การเปรียบเทียบลำดับของดีเอ็นเอในตัวไหมได้มีการเปรียบเทียบระหว่าง *B. mori, B. mandarina* และ *Samia cynthia* โดยใช้ส่วนของ Multiprotein blidging factor 2 (MBF2) พบว่าใน *B. mori* และ *B. mandarina* มีส่วนที่เหมือนกัน 97 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *B. mori* และ *S. cynthia* จะมีส่วนที่เหมือนกัน 50 เปอร์เซ็นต์ (Liu *et al*., 1998) นอกจากนี้ Abe *et al*. (2000) ได้รายงานว่ามีการทดลองหา W โครโมโซม ของไหมเพศเมียในสายพันธุ์ C108, C137, J137, p50 และ WILD-W (จากการผสมพันธุ์ระหว่างเพศเมียของไหม *B. mandarina* กับเพศผู้ของสายพันธุ์ C108) ซึ่ง Tanaka ในปี 1916 อ้างโดย Abe *et al.* (2000) รายงานว่าในเพศเมียของไหมจะมีโครโมโซมเป็น ZW (เหมือนกับโครโมโซม XY ของคน) ส่วนเพศผู้จะมีโครโมโซมเป็น ZZ (เหมือนกับโครโมโซม XX ของคน) โดยการศึกษาของ Abe *et al.* (1998a) จากการใช้ specific RAPDs 4 ชนิด คือ W-Kabuki, W-Samurai, W-Kamikaze และ W-Yamato พบว่าไหมเพศเมียทั้ง 4 สายพันธุ์ของ *B. mori* และ *B. mandarina* ที่นำมาทำการทดลองจะแสดงแถบดีเอ็นเอของ W โครโมโซมทุกตัว ต่อมาได้ทดลองโดยการบรรจุ specific RAPD W-Kabuki ไว้ในส่วนของ W โครโมโซมของไหม *B. mori* พบว่ามีการถ่ายทอดลักษณะนั้นและมีการสะสมอยู่ใน W โครโมโซมในไหมรุ่นต่อ ๆ มา และ W โครโมโซมนี้จะมีวิวัฒนาการที่ช้ากว่าโครโมโซมอื่น ๆ (Abe *et al.*, 2000)

Nagaraja and Nagaraju (1995) ได้เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไหมจากแหล่งที่มีสภาพทางนิเวศนวิทยาต่างกัน 13 แหล่ง ที่มีการผสมกันภายในกลุ่มของมันเอง คือ สายพันธุ์ที่มีการพักตัว 6 แหล่ง และสายพันธุ์ที่ไม่มีการพักตัว 7 แหล่ง ด้วยวิธีการ RAPD เพื่อเป็นตัวแทนในการเปรียบเทียบความหลายหลายทางพันธุกรรมจากลักษณะทางสภาพภูมิศาสตร์ดั้งเดิม สัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี ซึ่งผลที่ได้สามารถแบ่งไหมที่เป็นสายพันธุ์ที่มีการพักตัวและไม่มีการพักตัวออกจากกันได้ และเมื่อมีการศึกษาด้วย banded krait minor satellite DNA-derived probe ทั้งที่มีการผสมภายในกลุ่มเดียวกัน และพันธุ์ที่ทำการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่มีการพักตัวและไม่มีการพักตัว (F1) ก็ได้ผลเช่นเดียวกันคือ จะแสดงแถบของดีเอ็นเอจำเพาะของสายพันธุ์นั้น ๆ อย่างชัดเจน (Nagaraju *et al*., 1995; Nagaraju and Singh, 1997)

การทดลองในไมโตคอนเดรียที่เกี่ยวกับไหมนั้น Hwang *et al.* (1999) ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ lrRNA และ srRNA gene เพื่อหาความสัมพันธ์ของแมลงในวงศ์ Bombycidae

(*B. mori* และ *B. mandarina*) และ Saturniidae (*Antheraea yamamai* และ *A. pernyi*) พบว่าในส่วนของ 16S rRNA gene ของ *B. mori* มีลำดับเบสที่เหมือนกับ *B. mandarina*, *A. yamamai* และ *A. pernyi* ประมาณ 98, 87 และ 86 เปอร์เซ็นต์ และในส่วนของ 12S rRNA gene จะมีลำดับเบสที่เหมือนกันประมาณ 99, 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University