การวิเคราะห์พันธุกรรมของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ด้วยเทคนิค RAPD

GENETIC ANALYSIS OF DIAMONDBACK MOTH (*Plutella xylostella*) USING RAPD TECHNIQUE

อังคณา กระจ่าง
AUNGKANA KRAJARNG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2547

ISBN 974-9708-23-7

การวิเคราะห์พันธุกรรมของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ด้วยเทคนิค RAPD

GENETIC ANALYSIS OF DIAMONDBACK MOTH (*Plutella xylostella*) USING RAPD TECHNIQUE

อังคณา กระจ่าง

AUNGKANA KRAJARNG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9708-23-7

GENETIC ANALYSIS OF DIAMONDBACK MOTH (*Plutella xylostella*) USING RAPD TECHNIQUE

AUNGKANA KRAJARNG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2004

ISBN 974-9708-23-7

COPYRIGHT 2004
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์พันธุกรรมของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ด้วยเทคนิค RAPD
นักศึกษา	นางสาวอังคณา กระจ่าง
รหัสประจำตัว	43065216
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช

บทคัดย่อ

หนอนใยผัก (*Plutella xylostella* Linn.; Lepidoptera : Yponomeutidae) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งซึ่งทำความเสียหายแก่พืชผักตระกูลกะหล่ำทั่วโลก ในประเทศไทย มักระบาดมากในช่วงฤดูหนาวถึงแล้ง การป้องกันกำจัดหนอนใยผักทำได้ค่อนข้างยาก เพราะหนอนสามารถพัฒนาความต้านทานต่อยาฆ่าแมลงได้หลายชนิดและเร็วกว่าหนอนชนิดอื่น การศึกษานี้ได้นำเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) มาใช้ในการจำแนกความผันแปรทางพันธุกรรมของหนอนใยผักจากพื้นที่ 10 จังหวัดในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย เปรียบเทียบกับหนอนใยผักจากแคนาดา ไพรเมอร์ 22 ชนิดซึ่งมีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์จะแสดงลักษณะโพลีมอร์ฟีซึมระหว่างประชากรหนอนใยผัก นำผลผลิตของการเพิ่มปริมาณที่ได้มาหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรมและวิเคราะห์แบบรวมกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) ในโปรแกรม PHYLIP สามารถแบ่งกลุ่มหนอนใยผักจาก 10 จังหวัด ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยหนอนใยผักจากลำปาง ขอนแก่น มหาสารคาม และเชียงใหม่ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยหนอนใยผักจากเลยและร้อยเอ็ด กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยหนอนใยผักจากกาญจนบุรีและนครปฐม และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยหนอนใยผักจากนนทบุรีและปทุมธานี สำหรับหนอนใยผักจากแคนาดาจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของนครปฐมและกาญจนบุรี สอดคล้องกับรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้

Thesis Title	Genetic analysis of diamondback moth (*Plutella xylostella*) using RAPD technique
Student	Miss Aungkana Krajarng
Student ID.	43065216
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Dr. Ounruan Petchrawan
Thesis Co-advisor	Assoc.Prof.Dr. Somsak Apisitwanich

ABSTRACT

The diamondback moth (*Plutella xylostella* Linn.; Lepidoptera : Yponomeutidae) is an economically cosmopolitan insect pest of cruciferous crops. In Thailand, outbreaks are more often found during the cool and dry seasons. Control measures are somewhat difficult because this insect can develop resistance to many insecticides at a faster rate than any other vegetable pests. In this study, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to identify genetic variation of diamondback moth from 10 provinces in the North, the Northeast and the Central of Thailand and compared with Canadian population. Twenty-two oligonucleotide primers, ten nucleotide in length, revealed polymorphism among diamondback moth populations. Based on the pair-wise comparison of amplified products, the genetic distance among diamondback moth populations was calculated and cluster analysis was performed using UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) method in PHYLIP program. The 10 populations of diamondback moth could be divided into 4 groups. The first group comprised of diamondback moths from Lampang, Khon Kaen, Mahasarakham and Chiang Mai. The second group comprised of diamondback moths from Loei and Roi Et. The third group comprised of diamondback moths from Kanchanaburi and Nakhon Pathom. And the fourth group comprised of diamondback moths from Nonthaburi and Pathum Thani. For the diamondback moth from Canada, the constructed dendrogram illustrated that it was closely related to the diamondback moths from Nakhon Pathom and Kanchanaburi agreed with DNA band patterns.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณา การแนะนำและคำปรึกษาในทุกด้านที่มีประโยชน์จาก ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ คำแนะนำต่างๆ และประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จักมีประโยชน์ต่อผู้วิจัยในภายหน้า ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา เสนอแนะด้านเทคนิค RAPD และการวิเคราะห์ผลการวิจัยด้วยคอมพิวเตอร์

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และ ดร. อำมร อินทร์สังข์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Serge Bellonick จาก University of Quebec ประเทศแคนาดา ที่ให้ความอนุเคราะห์หนอนใยผักจากประเทศแคนาดา

ขอขอบคุณ คุณอาศยา ศิริเอาทารย์ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน สำหรับกำลังใจ การช่วยเหลือในทุกด้านและมิตรภาพที่ดีตลอดมา

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชายที่คอยให้ความรัก กำลังใจ และคำปรึกษาตลอดมา และให้ทุนสนับสนุนการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

อังคณา กระจ่าง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ....................IV

สารบัญตาราง VII

สารบัญรูป VIII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย....................3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....................4

2.1 ชีววิทยาของหนอนใยผัก....................4

2.1.1 ลักษณะของหนอนใยผัก....................4

2.1.2 พืชอาหาร....................7

2.1.3 พื้นที่ระบาด 7

2.1.4 ความเสียหาย....................7

2.1.5 การควบคุม....................8

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาการจำแนกหนอนใยผัก 10

2.3 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 12

2.3.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR 14

2.3.2 หลักการทำ PCR 15

2.4 เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)....................16

2.4.1 ส่วนประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยา RAPD 16

2.4.2 หลักการทำ RAPD....................17

2.5 การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD 20

2.6 การใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาแมลง 20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 26

2.7.1 รูปแบบของข้อมูลที่นำไปสร้าง Phylogenetic tree 26

2.7.2 ลักษณะและชนิดของ Phylogenetic tree...26

2.7.3 วิธีการสร้าง Phylogenetic tree 27

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย 29

3.1 วัสดุและอุปการณ์ 29

3.1.1 ตัวอย่างหนอนใยผัก (*P. xylostella*) 29

3.1.2 สารเคมี 29

3.1.3 อุปกรณ์ 30

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย..31

3.2.1 การเก็บตัวอย่างหนอนใยผัก 31

3.2.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 33

3.2.3 การตรวจสอบและการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.................................34

3.2.4 การคัดเลือกไพรเมอร์ 35

3.2.5 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD 36

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล..37

บทที่ 4 ผลการทดลอง 38

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ 38

4.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนใยผัก 39

4.3 การวิเคราะห์ผลแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ 50

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 57

บรรณานุกรม 61

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ก. 69

ภาคผนวก ข. 72

ภาคผนวก ค. 74

ประวัติผู้เขียน 80

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ความแตกต่างของปฏิกิริยา RAPD กับปฏิกิริยา PCR โดยทั่วไป....................................18

3.1 การเก็บตัวอย่างหนอนใยผัก *Plutella xylostella* จากการสุ่มพื้นที่ในประเทศไทย 32

3.2 ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์ 35

4.1 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์แต่ละตัว 39

4.2 แสดงค่า similarity index และ genetic distance จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือน ของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ของหนอนใยผัก 11 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 (12 ชนิด)..53

4.3 แสดงค่า similarity index และ genetic distance จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือน ของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ของหนอนใยผัก 10 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด (22 ชนิด)..55

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 หนอนใยผักในระยะต่างๆ......6

2.2 การหลบหนีศัตรูของหนอนใยผัก......6

2.3 ความเสียหายของใบพืชที่เกิดจากการทำลายของหนอนใยผัก......8

2.4 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)......13

2.5 การทำงานของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา RAPD......19

2.6 การวิเคราะห์ RAPD......19

2.7 Rooted tree และ Rooted tree......27

2.8 ขั้นตอนการสร้าง phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์......28

3.1 การเลี้ยงหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการ......32

4.1 แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างหนอนใยผัก 11 ตัวอย่าง......38

4.2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-03......40

4.3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-01......41

4.4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-02......42

4.5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-04......43

4.6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-09......43

4.7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B-01......44

4.8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B-04......45

4.9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C-01......46

4.10 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C-04......47

4.11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 563......48

4.12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 570......49

4.13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 571......49

4.14 เดนโดรแกรมการจัดกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในประเทศไทยและแคนาดา ด้วยวิธี UPGMA จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 (12 ชนิด) ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR ใน PHYLIP version 3.6c......54

4.15 เดนโดรแกรมการจัดกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในประเทศไทย ด้วยวิธี UPGMA จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด (22 ชนิด) ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR ใน PHYLIP version 3.6c......56

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ในบรรดาศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายในปัจจุบัน จัดได้ว่าหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) เป็นหนอนผีเสื้อที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่ง ก่อความเสียหายให้แก่พืชผักตระกูลกะหล่ำทั่วโลก เช่น กะหล่ำชนิดต่างๆ คะน้า บรอคโคลี่ และผักกาดนานาชนิด สำหรับประเทศไทยพบทุกพื้นที่ที่มีการปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำ หนอนใยผักเป็นหนอนขนาดเล็ก มีการระบาดค่อนข้างรวดเร็วเพราะมีวงจรชีวิตสั้น ปีหนึ่งจะมีหนอนใยผักถึง 17-25 รุ่น หนอนใยผักจะกัดกินผิวด้านล่างใบจนเกิดเป็นรูพรุน และเข้าไปกัดกินในยอดผักที่กำลังเจริญเติบโตทำให้ยอดเสียหาย ตัวหนอนที่ออกจากไข่ใหม่ๆจะแยกย้ายกันออกทำลายพืชโดยการกัดกินผิวใบผักให้เป็นรู จากนั้นก็จะชอนกัดกินเข้าไปในเนื้อเยื่อใบ เมื่อถูกตัวจะดิ้นอย่างรุนแรงและสามารถสร้างใยทิ้งตัวหนีเมื่อมีการกระทบกระเทือน จึงรอดจากการถูกสารเคมี ตัวหนอนอายุมากขึ้นการทำลายจะเพิ่มขึ้น

ปัจจุบันหนอนใยผักมีความสามารถในการพัฒนาความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงหลายชนิดได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นปัญหาสำคัญในการป้องกันกำจัด พรรณเพ็ญ ชโยภาส (2543) รายงานว่าหนอนใยผักมีความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงหลายชนิด ได้แก่ สารฆ่าแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ เช่น เพอร์เมทริน แลมป์ดาไซฮาโลทริน และเดลตาเมทริน สารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เช่น โพรฟีโนฟอส สารกลุ่มระงับการลอกคราบ เช่น คลอร์ฟลูอะซูรอน และสารกลุ่มอื่นๆ เช่น ฟิโปรนิล เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการหันมาใช้วิธีการป้องกันกำจัดวิธีอื่นๆ ที่ได้ผลดี เช่น การใช้กับดักกาวเหนียวสีเหลือง การใช้มุ้งตาข่ายไนลอน (ปิยะรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ. 2542) การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (วินัย รัชตปกรณ์ชัย และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2537ก.) และการใช้สารสกัดจากสะเดา (วินัย รัชตปกรณ์ชัย และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2537ข.) ทั้งนี้เพื่อลดการใช้สารเคมี และช่วยชะลอความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผัก

ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพและชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสปีชีส์พืชและสัตว์ที่มีความสัมพันธ์กัน การใช้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้กันมากในการจำแนกพันธุ์พืชและสัตว์ โดยใช้หลักการให้อนุภาคสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน เอนไซม์ หรือสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากตัวอย่างของพืชหรือสัตว์ที่ทดสอบ นำมาเคลื่อนที่ในสารละลายด้วยกระแสไฟฟ้า อนุภาคของสารชีวโมเลกุลที่ได้จากพันธุ์พืชและสัตว์ที่แตกต่างกันย่อมมีประจุไฟฟ้า ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลไม่เหมือนกัน ก็จะเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน แต่การใช้เอนไซม์และโปรตีนในการตรวจสอบมีข้อจำกัด เพราะเอนไซม์และโปรตีนเป็นผลจากการแสดงกิจกรรมของยีน สภาพแวดล้อมและสภาพในเนื้อเยื่อของ

พืชและสัตว์เองมีอิทธิพลต่อการแสดงออก ผลการตรวจสอบที่ได้รับจึงมีความแปรปรวน หรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง (พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538) ในปัจจุบันจึงมีการใช้เทคนิคการวิเคราะห์จากดีเอ็นเอในการทำวิจัยหาความหลากหลายที่ตำแหน่งโครโมโซม (locus) และระดับจีโนม (genome) ทั้งหมด ซึ่งเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพมากกว่าการตรวจสอบหาความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตโดยใช้โปรตีน การใช้เทคนิคทางโมเลกุลนี้ในการศึกษาดีเอ็นเอทำให้ได้ลายพิมพ์ทางพันธุกรรม (genetic fingerprint) ของสิ่งมีชีวิตจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจสอบความผันแปรที่ระดับโมเลกุลและสามารถจำแนกความแตกต่างของพันธุกรรมและยีนได้ โดยจะตรวจสอบความผันแปรจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และอีกเทคนิคหนึ่ง คือ เทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณจีโนมในบริเวณที่ไม่จำเพาะเจาะจง โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เรียกเทคนิคนี้ว่า Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Welsh and McClelland. 1990; Williums *et. al*. 1991)

สำหรับการศึกษาโครงสร้างทางประชากรและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรแมลง รวมทั้งการกระจายของจีโนไทป์ภายในและระหว่างประชากรแมลง นิยมใช้เทคนิค RAPD ซึ่งสามารถตรวจสอบลักษณะโพลีมอร์ฟีซึม (polymorphism)ในสายพันธุ์แมลง เช่น หมัด ตัวต่อ และสัตว์ขาปล้อง (arthropod) ขนาดเล็กๆ ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังใช้ในการจำแนกซับสปีชีส์ (sub-species) และสายพันธุ์ที่ยังไม่มีการบันทึกไว้ และประยุกต์ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Black. 1993) ก่อนหน้านี้มีการใช้เทคนิคอัลโลไซม์อิเล็กโทรโฟรีซีส (allozyme electrophoresis) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและมีราคาถูก แต่พบว่า มีแมลงจำนวนมากที่ตรวจสอบความผันแปรทางอัลโลไซม์ได้น้อยมากหรือไม่พบเลย ดังเช่นในรายงานของ Wellso *et. al*. (1988) ที่ทำการศึกษาแมลงวันเฮสเซียน (Hessian fly; *Mayetiola destructor*) และ Black *et. al*. (1990) ที่ศึกษาเพลี้ย และเมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RFLP กับ RAPD แล้ว พบว่า เทคนิค RFLP มีต้นทุนสูง เครื่องมือและอุปกรณ์ในการปฏิบัติงานต้องมีเพียงพอ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานและต้องใช้สารเคมีกัมมันตภาพรังสีที่อันตราย ต่างจากเทคนิค RAPD ซึ่งรวดเร็ว สามารถดูลักษณะโพลีมอร์ฟีซึมได้ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากสกัดดีเอ็นเอ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอก่อนเพื่อหาลำดับของไพรเมอร์ มีราคาถูก ไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ง่ายต่อการศึกษาและสามารถดัดแปลงใช้กับงานในห้องปฏิบัติการต่างๆได้ (Walker and Gingold. 1993 ; Hoelzel. 1992) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาพันธุกรรมของหนอนใยผักจากบริเวณพื้นที่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทยรวม 10 จังหวัด โดยมีหนอนใยผักจากประเทศแคนาดาเป็นตัวเปรียบเทียบ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาเทคนิค RAPD เพื่อจำแนกพันธุกรรมของหนอนใยผัก *P. xylostella* จากบริเวณพื้นที่จังหวัดต่างๆในประเทศไทยที่มีลักษณะภูมิประเทศ ลักษณะภูมิอากาศ และพืชอาศัยที่แตกต่างกัน

2. วิเคราะห์ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหนอนใยผัก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาพันธุกรรมของหนอนใยผักจากบริเวณพื้นที่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทยรวม 10 จังหวัด โดยใช้เทคนิค RAPD แล้วจัดจำแนกกลุ่มของหนอนใยผักจากความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีหนอนใยผักจากประเทศแคนาดาเป็นตัวเปรียบเทียบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. แสดงถึงลักษณะความสัมพันธ์หรือความผันแปรทางพันธุกรรมของหนอนใยผักจากพื้นที่ต่างๆ

2. สามารถนำความรู้จากเทคนิค RAPD ไปประยุกต์ใช้กับการจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของหนอนใยผัก

หนอนใยผัก (*Plutella xylostella* Linn.; Lepidoptera : Yponomeutidae) เดิมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Plutella maculipennis* Linn. ต่อมาเปลี่ยนมาใช้ *P. xylostella* Linn. (อนันต์ วัฒนธัญกรรม. 2521) มีชื่อสามัญว่า diamondback moth, cabbage plutella, short-hole worm, small cabbage moth, ตัวบิน และตัวจรวด (ปิยะรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ. 2542) ระบาดทั่วไปในประเทศไทยและทั่วโลก ทำความเสียหายอยู่เสมอๆ กับพืชผักตระกูลกะหล่ำ เช่น กะหล่ำชนิดต่างๆ คะน้า บรอคโคลี่ และผักกาดนานาชนิด หนอนใยผักสามารถขยายพันธุ์ติดต่อกันได้ตลอดปี ทำให้เกิดปัญหาหนอนมีความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง เกษตรกรจำเป็นต้องปรับปรุงการใช้สารฆ่าแมลงอยู่ตลอดเวลา

2.1.1 ลักษณะของหนอนใยผัก

วงจรชีวิตของหนอนใยผัก มี 4 ระยะ ประกอบด้วย ไข่ ตัวหนอน 4 ระยะ ดักแด้ และผีเสื้อตัวเต็มวัย ความเสียหายของพืชเกิดจากระยะตัวหนอน โดยทั่วไปหนอนใยผักจะใช้ระยะเวลาประมาณ 32 วัน เพื่อพัฒนาจากไข่เป็นผีเสื้อตัวเต็มวัย โดยมีความผันแปรตั้งแต่ 21 ถึง 51 วัน ขึ้นกับสภาพอากาศและอาหาร อาจจะมีหนอนใยผักหลายรุ่นต่อฤดูเพาะปลูกผักฤดูหนึ่ง แต่ละรุ่นอาจจะมีช่วงเวลาวงจรชีวิตที่ซ้อนเหลื่อมกัน ดังนั้นจึงสามารถพบหนอนใยผักทั้ง 4 ระยะในแปลงเพาะปลูกพืชในเวลาเดียวกัน (Capinera. 2000)

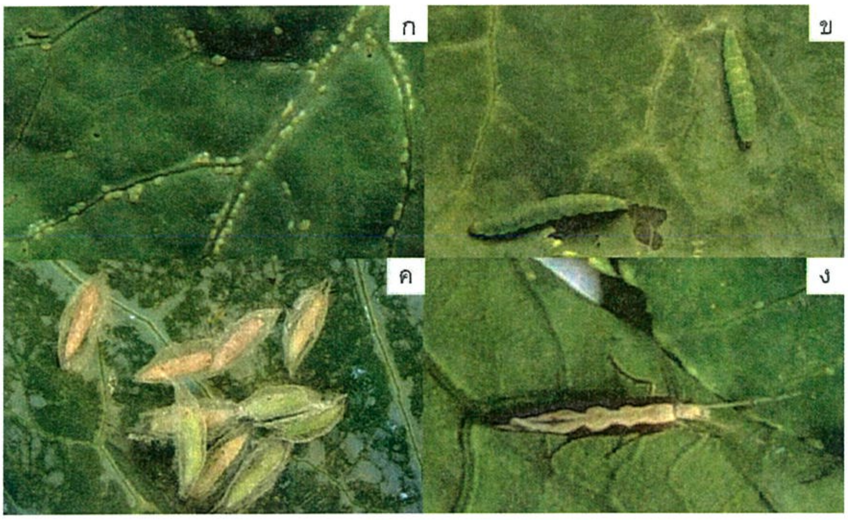
1. ไข่ หนอนใยผักเป็นหนอนที่มีขนาดเล็ก ชอบวางไข่ตามใต้ใบ โดยวางในร่องไปตามเส้นใบ บนลำต้นอ่อนหรือก้านใบ เป็นฟองเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มติดกัน 2-5 ฟอง ไข่มีขนาดเล็กมาก ยาว 0.44 มิลลิเมตร กว้าง 0.26 มิลลิเมตร ค่อนข้างแบนและยาวรี ไข่มีสีเหลืองอ่อนเป็นมัน มีผิวขรุขระ (รูปที่ 2.1ก) ไข่จะฟักภายใน 3-5 วัน เมื่อไข่ใกล้ฟักออกเป็นตัวจะมีสีเหลืองเข้ม เมื่อขยายดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะมองเห็นหัวของตัวอ่อนเป็นสีดำอยู่ภายใน ซึ่งตัวหนอนขดงอเป็นรูปตัวซี (C) อยู่ภายในไข่นั้น

2. ตัวหนอน มี 4 ระยะ โดยในแต่ละช่วงจะมีระยะเวลาพัฒนาการ ประมาณ 4.5(3-5) 4(2-7) 4(2-8) และ 5(2-10) วัน ตามลำดับ (Capinera. 2000) มีการลอกคราบ 3 ครั้งระหว่างระยะตัวหนอน เมื่อฟักออกจากไข่ใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากประมาณ 1.5 มิลลิเมตร ลำตัวค่อนข้างเหลือง หัวดำ มีขาจริง 3 คู่ และขาเทียม 5 คู่ ปรากฏอยู่ที่ส่วนท้องปล้องที่ 3 4 5 6 และปล้องสุดท้ายของลำตัว เมื่อตัวหนอนมีอายุมากขึ้น หัวจะกลายเป็นสีน้ำตาล ตามลำตัวและส่วนหัวมีขนสีดำปกคลุม

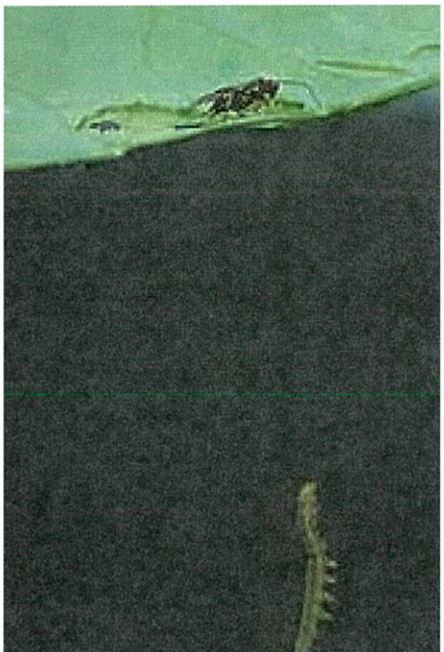
การจัดเรียงตัวของ crochets ที่ขาเทียมมีลักษณะเป็นวงกลม crochet มีสีน้ำตาลเข้มดำ ที่อกปล้องแรกจะมีแผ่นแข็ง ซึ่งมีขนสีดำอยู่เป็นจำนวนมากกว่าปล้องอื่นๆ รูหายใจไม่ค่อยชัดเจน ตัวหนอนระยะแรกๆ มีขนาดเล็กมากมองเห็นค่อนข้างยาก อาศัยอยู่ในใบพืชและเริ่มกัดกินเนื้อเยื่อภายในใบพืช หลังจากนั้นจะออกมากัดกินผิวภายนอกทำให้เป็นรูพรุน หนอนใยผักมีการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่าหนอนอื่นๆ ตัวหนอนเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ลำตัวมีความยาวประมาณ 12 มิลลิเมตร มีลักษณะหัวท้ายแหลม ลำตัวผอมยาว ส่วนท้ายมีปุ่มยื่นออกไป 2 แฉก สีลำตัวอาจเป็นสีเขียวอ่อน เทาอ่อน หรือเขียวปนเหลือง (รูปที่ 2.1ข) มีลักษณะเฉพาะ คือ เมื่อถูกรบกวนจะดิ้นอย่างแรง และอาจจะทิ้งตัวจากใบพืช โดยสามารถสร้างใยพาตัวขึ้นลงระหว่างพื้นดินกับพืชได้ หรืออาจลอยตัวอยู่โดยอาศัยเส้นใยที่มันสร้างขึ้น หลังจากนั้นเมื่อศัตรูหรือสิ่งรบกวนผ่านไป ตัวหนอนก็จะไต่กลับขึ้นมาและกินอาหารต่อไป (รูปที่ 2.2) ระยะเวลาในการเป็นตัวหนอนประมาณ 10-21 วัน

3. ดักแด้ เมื่อเจริญเต็มที่หนอนจะเริ่มเข้าดักแด้ตามใต้ใบพืชอาหาร หรือตามซอกใบ โดยถักเส้นใยเป็นตาข่ายโปร่งๆ หุ้มตัว และเข้าดักแด้อยู่ภายใน ดักแด้ของหนอนใยผักเป็นแบบ obtected pupae โดยมีอวัยวะขาและปีกติดกันเป็นเนื้อเดียวกับลำตัว มีความยาวประมาณ 5-6 มิลลิเมตร ดักแด้มีสีเขียวอ่อนหรือสีนวลในระยะแรก ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล อายุดักแด้ประมาณ 5-15 วันก็จะออกเป็นตัวเต็มวัย ขึ้นกับสภาพแวดล้อม (รูปที่ 2.1ค)

4. ตัวเต็มวัย เมื่อออกจากดักแด้จะอาศัยอยู่ตามบริเวณใต้ใบต้นผัก เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กและไม่ชอบบินไปไกลพืชอาหาร ตัวเต็มวัยมีสีเทา ส่วนหลังมีแถบสีเหลืองส้ม ลักษณะหลายเหลี่ยมเหมือนเพชรที่เจียรนัยแล้ว จึงมีชื่อเรียกในภาษาอังกฤษว่า diamondback moth (รูปที่ 2.1ง) ลำตัวยาวประมาณ 6-7 มิลลิเมตร และมีเกล็ดปกคลุมโดยตลอด ปีกคู่หน้ามีรอยสีดำอยู่ตรงกลางของปีกจนถึงโคนปีกมองเห็นได้ชัดเจน ในเพศผู้ปีกคู่หน้ามีสีเทา และมีรอยสีดำจางๆ ทางด้านบนของปีกคู่หน้า ที่ปลายปีกมองเห็นเป็นสีดำเล็ก และมีแถบสีเหลืองอยู่ที่ขอบปีกด้านใน ส่วนเพศเมียไม่มีแถบสีเหลืองอยู่ที่ขอบปีกด้านในของปีกคู่หน้า สำหรับปีกคู่หลังมีสีดำทั้งเพศผู้และเพศเมีย ตัวเต็มวัยเมื่อเกาะนิ่งอยู่กับที่จะวางหนวดชี้ตรงไปข้างหน้า หนวดเป็นแบบเส้นด้าย แต่ละปล้องมีสีดำสลับสีขาว ปลายหนวดเรียว หัวมีตาเดี่ยวสีดำ ปีกคู่หลังรูปร่างคล้ายใบหอก สีดำ และมีขนขึ้นรอบๆปีก ขามีสีเทาและดำปะปนกัน อายุของตัวเต็มวัยประมาณ 5-7 วัน อัตราส่วนจำนวนเพศเมียต่อเพศผู้ คือ 1 ต่อ 1 ตัวเต็มวัยเพศเมียตัวหนึ่งๆ สามารถวางไข่ได้ตั้งแต่ 37-407 ฟอง ขึ้นกับช่วงเวลาได้รับแสง (photoperiod) อุณหภูมิ อายุของตัวเต็มวัย และสภาพอาหาร (Shirai. 2000) เพศเมียสามารถวางไข่ได้หลายครั้ง มีการพัฒนาการวางไข่ได้สูงจึงทำให้หนอนใยผักมีอัตราการเพิ่มประชากรได้รวดเร็ว (ปิยะรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ. 2542)



รูปที่ 2.1 หนอนใยผักในระยะต่างๆ ได้แก่ ไข่ (ก) ตัวหนอน (ข) ดักแด้ (ค) และตัวเต็มวัย (ง)



รูปที่ 2.2 การหลบหนีศัตรูของหนอนใยผัก ซึ่งจะลอยตัวอยู่โดยอาศัยเส้นใยที่มันสร้างขึ้น หลังจากที่โดนแตน *Apanteles ippeus* รบกวน

ที่มา : Rueda and Shelton (1995)

2.1.2 พืชอาหาร

พืชอาหารส่วนใหญ่จะเป็นพืชวงศ์ Cruciferae ซึ่งเป็นพืชตระกูลกะหล่ำทั้งชนิดที่ปลูกและขึ้นเองตามธรรมชาติ ได้แก่ คะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดหัว ผักกาดขาว กะหล่ำปม ผักกาดเขียว บรอคโคลี่ กะหล่ำดาว (Brussel sprout) กะหล่ำคอห์ลแรบบี้ (kohlrabi) มัสตาร์ด หัวผักกาดแดง และต้นวอเตอร์เครส (watercress) (Capinera. 2000) ยกเว้นผักกาดหอม (ปิยะรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ. 2542) นอกจากนี้ยังพบในพวกวัชพืชหรือหญ้าป่าบางชนิด และพวกไม้ประดับ เช่น ต้นวอลล์ฟลาวเวอร์ (wallflower) แคนดี้ทัฟท์ (candytuft) และอลิสซัม (alyssum) (Mau and Kessing. 1992)

2.1.3 พื้นที่ระบาด

ประชากรหนอนใยผักจะมีการกระจายเป็นบริเวณกว้าง มีถิ่นกำเนิดในบริเวณเมดิเตอร์เรเนียน ทวีปยุโรป แต่ในปัจจุบันพบได้ทั่วไปในอเมริกา ยุโรป แอฟริกาใต้ อินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ (Mau and Kessing. 1992)

มีการแพร่กระจายจากยุโรปสู่อเมริกาโดยบังเอิญ ในอเมริกาเหนือมีรายงานพบครั้งแรกที่รัฐอิลินอยส์ ปี ค.ศ. 1854 และทางตะวันตกของแคนาดา ปี ค.ศ. 1885 (Harcourt. 1957) ในปัจจุบันพบกระจายทั่วสหรัฐอเมริกาและทุกๆรัฐของแคนาดา ในฮาวายมีรายงานพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1892 และปัจจุบันพบทั่วทั้งเกาะ (Mau and Kessing. 1992)

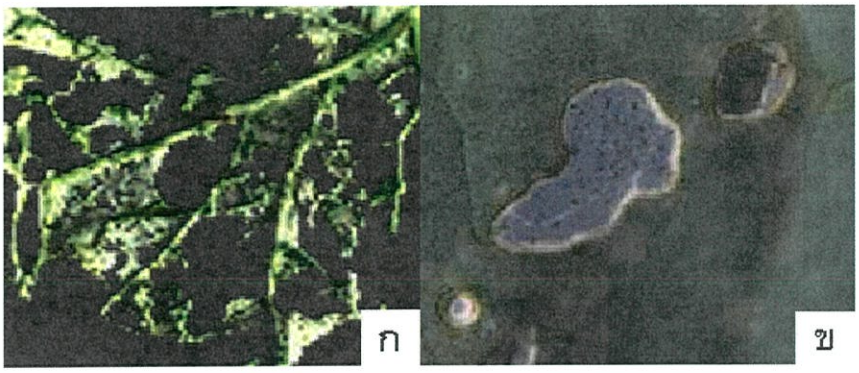
ในออสเตรเลีย เริ่มมีการระบาดในศตวรรษที่ 19 พบระบาดตลอดทั้งปีในทุกพื้นที่ของออสเตรเลีย (Hely *et. al.* 1982)

สำหรับประเทศไทย พบทั่วทุกภาคที่มีการปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำ ตามแหล่งปลูกผักเพื่อการค้าจะพบระบาดเสมอๆ ตามปกติหนอนใยผักจะเริ่มระบาดมากตั้งแต่ฤดูหนาวเป็นต้นไป และจะเพิ่มความรุนแรงขึ้นจนเป็นอันตรายมากในช่วงท้ายของฤดูหนาวต่อฤดูแล้ง ซึ่งในระยะนี้มีการปลูกผักกันมาก อากาศแห้ง หนอนมีโอกาสสะสมปริมาณได้เรื่อยๆ ในฤดูฝนอาจพบระบาดบ้างแต่ไม่รุนแรง (ปิยะรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ. 2542)

2.1.4 ความเสียหาย

การวางไข่ของผีเสื้อตัวเมียค่อนข้างหนาแน่นในพืชต้นหนึ่ง จึงพบว่ามีหนอนจำนวนมากเกิดขึ้นในเวลาเดียวกัน ตัวหนอนระยะแรกๆ จะอาศัยและกินเนื้อเยื่อแบบฟองน้ำ (spongy tissue) ใต้ผิวใบด้านล่างเกิดเป็นรูพรุน ซึ่งจะเห็นเป็นจุดขาวๆ จำนวนมาก ตัวหนอนทุกระยะจะกินผิวใบ (surface feeder) ช่วงเวลาในการกินอาหารคิดเป็น 62-78 เปอร์เซ็นต์ของช่วงชีวิตระยะตัวหนอนทั้งหมด (Harcourt. 1957) หนอนใยผักจะมีการกินในแต่ละใบไม่สม่ำเสมอกัน ถ้ามีหนอนจำนวนมาก มันจะกินเนื้อเยื่อใบทั้งหมด เหลือไว้แต่เส้นและก้านใบ (รูปที่ 2.3ก) ในบางใบตัวหนอนจะกินเนื้อเยื่อใต้ผิวใบด้านล่างทั้งหมด ทำให้เห็นผิวใบด้านบนเป็นเยื่อใสบางๆ เรียกว่า

window effect (Mau and Kessing. 1992) (รูปที่ 2.3ข) รอยทำลายจะแตกต่างจากหนอนอื่นๆ และมักเข้าไปกัดกินในยอดผักที่กำลังเจริญ ทำให้ยอดเสียหรือกัดกินใบที่หุ้มหัวผักกะหล่ำ ทำให้เสียคุณภาพ เวลาพ่นสารฆ่าแมลงจะมีโอกาสถูกตัวยาก นอกจากนี้ยังกัดกินต้นอ่อนและดอก (Capinera. 2000) ปริมาณความเสียหายมีความผันแปรมาก ขึ้นกับระยะการเจริญของพืช ความหนาแน่นและขนาดของตัวหนอน ตัวหนอนระยะสุดท้ายจะเป็นระยะที่ทำความเสียหายมากที่สุด (Mau and Kessing. 1992)



รูปที่ 2.3 ความเสียหายของใบพืชที่เกิดจากการทำลายของหนอนใยผัก โดยอาจจะกินเนื้อเยื่อใบทั้งหมด เหลือไว้แต่เส้นและก้านใบ (ก) หรือกินเนื้อเยื่อใต้ผิวใบด้านล่างทั้งหมด ทำให้เห็นผิวใบด้านบนเป็นเยื่อใสบางๆ เรียกว่า window effect (ข)

2.1.5 การควบคุม

การจัดการและการควบคุมหนอนใยผักสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การควบคุมโดยชีววิธี การควบคุมโดยใช้สารเคมี แต่เนื่องจากพบว่าหนอนใยผักมีความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงที่เป็นสารเคมี ดังนั้นเพื่อที่จะสามารถควบคุมหนอนใยผักได้ประสบความสำเร็จ จึงต้องใช้ทั้ง 2 วิธีควบคู่กันไปและอาศัยเทคนิคอื่นๆ ช่วยด้วย เช่น ความต้านทานของพืชที่ปลูก และสภาพอากาศ

2.1.5.1 การควบคุมโดยชีววิธี

การควบคุมโดยชีววิธี สามารถทำได้โดยอาศัยศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผักจากการศึกษาของปิยะรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ (2542) พบแตนเบียน 4 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum* Viggiani และ *Trichogrammatoidea bactrae* Nagarraja (Hymenoptera : Trichogrammatidae) พบทำลายไข่หนอนใยผักในเขตที่ราบภาคกลาง แตนเบียน *Cotesia plutellae* (Hymenoptera : Braconidae) พบทำลายหนอนของหนอนใยผักตลอดทั้งปีในเขตเกษตรที่ราบและที่สูง และแตนเบียนดักแด้ *Thraeella collaris* (Hymenoptera : Ichneumonidae) พบทำลายดักแด้เฉพาะในเขตเกษตรที่สูงเท่านั้น

ในฮาวายจะมีการปล่อยแตนเบียนหลายชนิดเพื่อควบคุมหนอนใยผัก พบว่า *C. plutellae* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในยุโรปและแพร่กระจายในฮาวายหลังจากมีการนำเข้ามาในปี ค.ศ. 1980 จะทำลายหนอนใยผัก 3 ระยะแรก (Mau and Kessing. 1992)

นอกจากนี้ยังมีการนำสารฆ่าแมลงที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ *kurstaki* ซึ่งผลิตออกจำหน่ายมีชื่อการค้าหลายชนิด เช่น ไดเพล ทูริไซด์เอชพี อาร์โกน่า และแบคโตสปีน มาฉีดพ่นในแปลงเพาะปลูกผักแทนการใช้สารเคมี พบว่าสามารถกำจัดหนอนใยผักได้ดีกว่าสารฆ่าแมลงที่เป็นสารเคมีและทำให้หนอนใยผักมีพัฒนาการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงช้าลง แต่อย่างไรก็ตาม ต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงจากแบคทีเรียที่นำมาใช้ให้มีอายุการใช้งานที่ยาวนานขึ้น โดยให้มีผลตั้งแต่ช่วงที่ไข่ฟักเป็นตัวหนอนจนถึงตัวหนอนเข้าดักแด้ และสารฆ่าแมลงจากแบคทีเรียต้องถูกหนอนกินเข้าไปจึงจะฆ่าตัวหนอนได้ ดังนั้นการฉีดพ่นสารฆ่าแมลงต้องผสมกับสารจับใบในกรณีที่ใบพืชมีแวกซ์เคลือบที่ผิวใบเพื่อให้สารฆ่าแมลงเคลือบผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่าง (จริยา จันทร์ไพแสง และวินัย รัชตปกรณ์ชัย. 2539; Liu *et. al*. 1998)

2.1.5.2 การควบคุมโดยใช้สารเคมี

หนอนใยผักสามารถพัฒนาให้มีความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงหลายชนิด ปัญหาความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง พบว่า ในช่วงปี ค.ศ. 1980 ใช้ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ควบคุมหนอนใยผักไม่ได้ผล และต่อมาสารฆ่าแมลงอื่นๆ ก็ไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงต้องลดการใช้สารเคมีลงให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ และเปลี่ยนไปใช้วิธีการควบคุมวิธีอื่นแทน (Liu *et. al*. 1981)

ในช่วงฤดูที่มีหนอนใยผักระบาดสูงสุด การควบคุมระยะตัวหนอนเพียงอย่างเดียวไม่ทำให้ลดความเสียหายทางเศรษฐกิจได้ทันที เนื่องจากความสามารถในการวางไข่ของผีเสื้อตัวเมียสูง จึงจำเป็นต้องมีการฉีดพ่นเพื่อควบคุมผีเสื้อตัวเต็มวัยของหนอนใยผักด้วย Mau and Kessing (1992) รายงานการทดลองในห้องปฏิบัติการว่า การประยุกต์ใช้เมวินฟอส (mevinphos) หรือ ไดบรอม (dibrom) เป็นสารฆ่าแมลงที่เหมาะสมในการกำจัดผีเสื้อตัวเต็มวัย เนื่องจากสารฆ่าแมลงชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพมาก เมื่อฉีดพ่นในแปลงเพาะปลูกไปแล้ว 1-2 ชั่วโมง หลังพระอาทิตย์ตกดิน ซึ่งเป็นช่วงที่ผีเสื้อตัวเต็มวัยจะออกมาหาอาหารกิน

2.1.5.3 การควบคุมโดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร

มยุรา สุนย์วีระ (2543) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร 20 ชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก พบว่า สารสกัดจากกานพลูให้ผลในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักวัยที่ 3 ดีที่สุด โดยมีอัตราการตายของหนอน 100 เปอร์เซ็นต์

วินัย รัชตปกรณ์ชัย และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม (2537ข.) รายงานว่า สารสกัดจากสะเดามีประสิทธิภาพดีในการควบคุมหนอนใยผักในแปลงทดลอง

2.1.5.4 การควบคุมโดยวิธีอื่น

Eigenbrode and Shelton (1990) วิจัยความต้านทานของพืชที่ปลูก พบว่า พืชตระกูล Cruciferae มีความไวต่อการทำลายของหนอนใยผักที่แตกต่างกัน กะหล่ำคอห์ลแรบบี้ มัสตาร์ด และผักกาดหัวมีความต้านทานต่อหนอนใยผักมาก ความแตกต่างของความต้านทานต่อหนอนใยผัก มีสาเหตุมาจากการที่มีแวกซ์เคลือบบนใบ ซึ่งทำให้เกิดความมันวาวของใบและใบพืชจะหนาและแข็ง ทำให้ตัวหนอนต้องใช้เวลาในการหาแหล่งอาหารนานและใช้เวลาในการกินน้อยลงบนใบที่มีแวกซ์เคลือบ แต่จะสามารถต้านทานได้เฉพาะหนอนใยผักระยะที่ 1 เท่านั้น ความมันวาวของใบยังทำให้หนอนกะหล่ำและเพลี้ยกะหล่ำมีแนวโน้มลดลง แต่มีแมลงเต่าทอง-กะหล่ำมากขึ้น

ในบางพื้นที่ เกษตรกรจะปลูกกะหล่ำปลีในแปลงเล็กๆ ระหว่างพืชที่ไม่มีความไวต่อหนอนใยผัก เพื่อให้พืชชนิดอื่นช่วยพรางกะหล่ำปลีจากหนอนใยผัก ทำให้หนอนใยผักหาอาหารได้ลำบากขึ้นและลดการทำลายของหนอนใยผักลง (Rueda and Shelton. 1995)

นอกจากนี้ Waterhouse (1987) พบว่า สภาพอากาศก็สามารถควบคุมหนอนใยผักได้ โดยอากาศหนาวที่มีลมพัดแรงจะลดกิจกรรมการหาอาหารและผสมพันธุ์ของผีเสื้อตัวเต็มวัย และทำให้ผีเสื้อเพศเมียตายก่อนที่จะวางไข่ อากาศชื้นตามด้วยฝนตกจะทำให้เกิดการระบาดของโรคเชื้อราในหนอนใยผัก และหนอนจำนวนมากจะตายเพราะจมน้ำ ไม่ควรปล่อยต้นผักที่เก็บเกี่ยวแล้วทิ้งไว้เพราะจะเป็นแหล่งขยายพันธุ์ของหนอนใยผักทีละน้อย

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาการจำแนกหนอนใยผัก

Zimmerman (1978) จัดจำแนกความแตกต่างของหนอนใยผักในฮาวายจากลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถแยกได้ 2 สปีชีส์ คือ *capparidis* และ *plutella* โดยมีแนวทางการจัดจำแนกดังนี้

1. Forewings with a large, conspicuous, pale macula near middle of costa, and with a pale vitta along posterior margin extending diagonally across the wing to reach costa near apex; aedeagus strongly sinuous.....................................**capparidis** Swezey
2. Forewings without any pale maculae on costal margin and the pale vitta along posterior margin is confined to the posterior margin; aedeagus straight and needle-like. ....**xylostella** (Linnaeus)

Moriuti (1986) ศึกษาอนุกรมวิธานของหนอนใยผัก โดยมีประวัติการตั้งชื่อ ดังนี้

Plutella Tinea xylostella Linnaeus 1758

Cerostoma maculipennis Curtis 1832

Plutella cruciferarum Zeller 1843

Plutella brassicella Fich 1856

Plutella limbipennella Clemen 1860

Plutella mollipedella Clemens 1860

Gelechia cicarella Rondani 1876

Tinea galeatella Mabille 1888

Cerostoma dubiosella Beutenmuller 1839

นอกจากนี้ Moriuti (1986) ยังได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างหนอนใยผัก (*P. xylostella*) กับ *Caunaca sera* (Meyrick 1896) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน โดยตัวเต็มวัยของ *P. xylostella* มีลักษณะ คือ ปีกของเพศผู้และเพศเมียเมื่อแผ่ออกจะมีความยาว 12-15 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้าของเพศผู้ ด้านบนจะมีสีน้ำตาลอมเทา หรือมีสีน้ำตาลเหลืองในบางส่วน อาจมีเกล็ดสีขาวและมีจุดเล็กๆ สีดำ และประมาณ 1/3 ของส่วนล่างของปีก (ด้านบน) มีสีน้ำตาลเหลืองอ่อน-ขาว ขอบด้านบนมีสีเกือบขาว และเป็นรอยหยักขึ้นด้านบน 3 รอยซึ่งมีขอบสีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลดำ สำหรับในเพศเมียมีสีน้ำตาลเหลืองสว่าง หรือน้ำตาลเหลืองเทา อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (aedeagus) จะเรียวยาว ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย antrum มีลักษณะเรียวยาว และมีเยื่อ ductus bursae หุ้ม สำหรับ *C. sera* สามารถแยกจาก *P. xylostella* ได้ชัดเจนด้วยปีกที่มีขนาดกว้างกว่า และมีความยาวเมื่อแผ่ออก 10-14 มิลลิเมตร นอกจากนี้อวัยวะสืบพันธุ์จะแตกต่างจากของ *P. xylostella* อย่างชัดเจน

Caprio and Tabashnik (1992) ศึกษา gene flow ของประชากรหนอนใยผัก 13 ประชากรจากฮาวายและสหรัฐอเมริกา โดยใช้เทคนิคอัลโลไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า มีความผันแปรเล็กน้อยภายในประชากรระหว่างเกาะฮาวาย ในขณะที่ความผันแปรระหว่างประชากรจากฮาวายกับประชากรจากสหรัฐอเมริกา 2 กลุ่มจะมีความผันแปรมากกว่าเล็กน้อย โดยมีค่าความผันแปรที่ตำแหน่ง polymorphic 4 ตำแหน่ง จาก 0.028 - 0.038 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรฮาวาย เท่ากับ 0.04 ± 0.004 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรฮาวายที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการและในธรรมชาติ เท่ากับ 0.21 ± 0.01 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรบนแผ่นดินใหญ่กับเกาะฮาวาย เท่ากับ 0.066 ± 0.008 และผลการทดลองบ่งชี้ว่า หนอนใยผักมีการเคลื่อนที่สูง

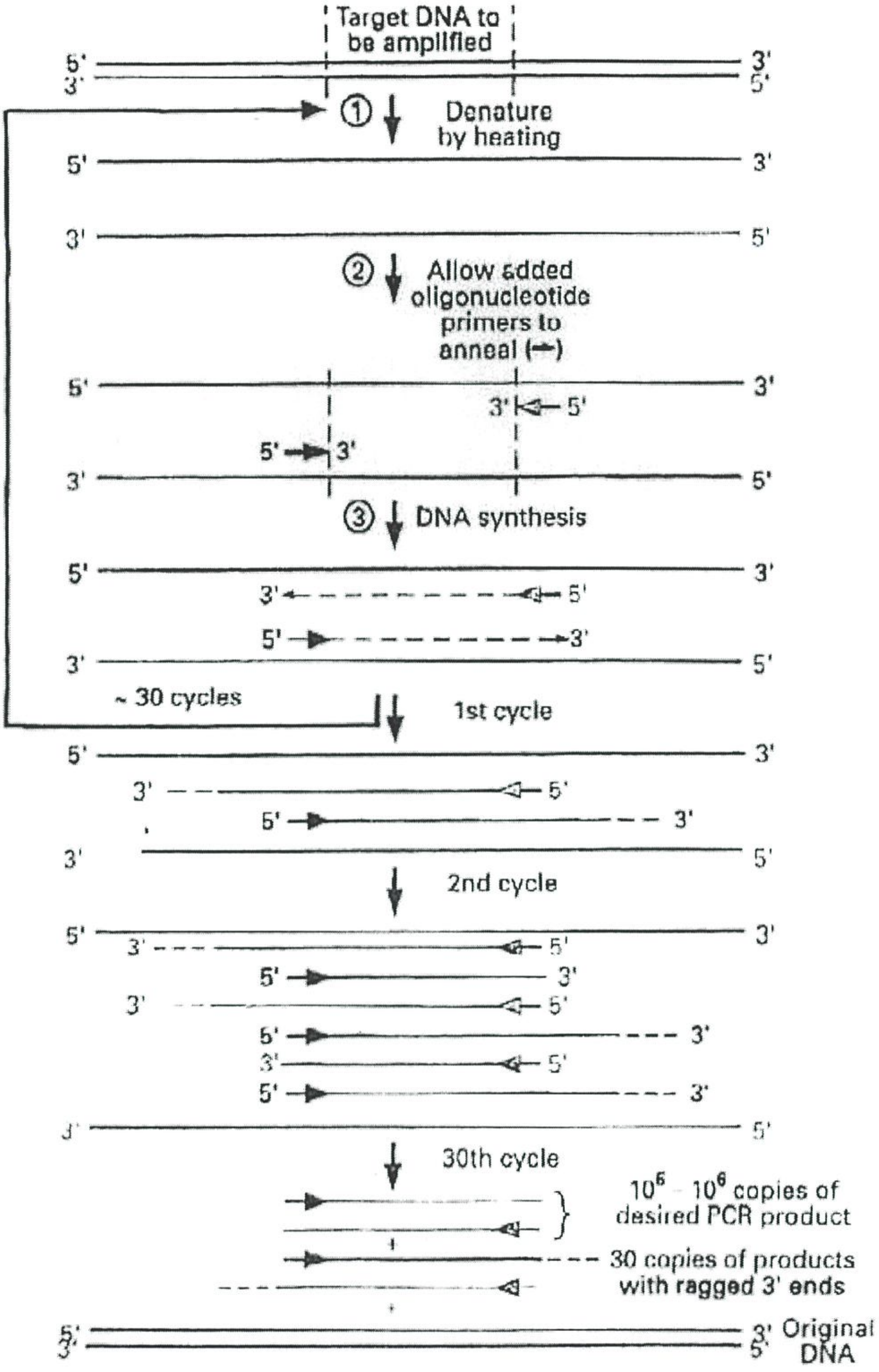
Heckel *et. al.* (1995) จำแนกความแตกต่างของหนอนใยผักจากฮาวายสายพันธุ์ NO-YA และ LAB-P ซึ่งมีความต้านทานและไม่มีความต้านทานต่อ *Bacillus thuringiensis* ตามลำดับ ด้วยเทคนิค RAPD โดยคัดเลือกไพรเมอร์ 84 ชนิดจากทั้งหมด 117 ชนิด จะได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 594 แถบ พบว่า แถบดีเอ็นเอ 371 แถบจะพบในทั้งสองสายพันธุ์ แถบดีเอ็นเอ 105 แถบจะพบในสายพันธุ์ LAB-P เท่านั้น และแถบดีเอ็นเอ 118 แถบจะพบในสายพันธุ์ NO-YA เท่านั้น ผลการ

ทดลองแสดงว่า เทคนิค RAPD สามารถสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอได้จำนวนมากพอต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของหนอนใยผักทั้งสองสายพันธุ์

Chang *et. al.* (1997) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างหนอนใยผัก 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ฮาวาย 4 สายพันธุ์ (LAB-P NO-QA SO-96 และ WO-96) สายพันธุ์ฟิลิปปินส์ (PHI) และสายพันธุ์เพนซิลเวเนีย (PEN) และสปีชีส์ *Plutella* อีก 2 สปีชีส์ที่ยังไม่มีการศึกษา โดยใช้ mitochodrial gene ขนาด 365 คู่เบส ที่แปลรหัสได้ cytochrome oxidase I (COI) พบความผันแปรเล็กน้อยในลำดับดีเอ็นเอของ COI ในหนอนใยผัก 5 สายพันธุ์ ในขณะที่หนอนใยผัก 1 สายพันธุ์เกิดความแตกต่างจากการแทนที่เบส 1 เบส ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์หนอนใยผักจะไม่มีความสัมพันธ์กับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ระหว่างแหล่งกำเนิดของแต่ละสายพันธุ์ และสร้างเดนโดรแกรมที่แสดงว่าสายพันธุ์หนอนใยผักจะเกาะกลุ่มกันและแยกจากสปีชีส์ *Plutella* 2 สปีชีส์ที่ยังไม่มีการศึกษา การทดลอง สรุปได้ว่าความผันแปรทางพันธุกรรมของหนอนใยผักที่ตำแหน่ง COI จะน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD และอัลโลไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส และการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจะเปิดเผยโครงสร้างทางพันธุกรรมของหนอนใยผักจากทั่วโลกได้มากกว่าวิธีอื่น

2.3 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรืออีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมา โดย Karry Mullis (Mullis *et. al.* 1986; Innis *et. al.* 1990; วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2536) ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่นในหลอดทดลอง โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน ช่วยให้สามารถวิเคราะห์หรือคัดแยกชิ้นส่วนที่สนใจนั้นได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำมาโคลนก่อน ทำได้โดยการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ในการทำปฏิกิริยาร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 เส้นที่มีทิศทางในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเข้าหากันเป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสนำนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (A, T, C, G) มาต่อกันเป็นสายดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับเบสเรียงตามเบสที่เป็นคู่สมกันบนเส้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณในเวลาอันสั้น (รูปที่ 2.4) สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีง่ายๆ เช่น อิเล็กโทรโฟรีซิส (Rapley. 1998)



รูปที่ 2.4 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ที่มา : Strachan (1992)

2.3.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) คือ สายดีเอ็นเอที่มีบริเวณส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณอยู่ ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่จะจำลองตัวตามดีเอ็นเอต้นแบบนี้ ในขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ ต้องระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนของตัวยับยั้ง PCR (inhibitor) เช่น heparin และ porphyrin (Rapley. 1998) ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำหรือดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างที่ฝังในพาราฟินและตัวอย่างที่เก็บไว้นาน (ancient sample) ก็สามารถวิเคราะห์ด้วย PCR ได้ (Paabo. 1989)

2. ไพรเมอร์ (primer) คือ สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวท่อนสั้นๆ มีขนาดประมาณ 20-30 เบส ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสที่ปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยคร่อมบริเวณยีนหรือส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งข้อกำหนดในการทำ PCR คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยอาจใช้ข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูล เช่น Genbank/ EMBL หรือลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งอาจจะทราบทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลาย เพื่อใช้ในการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ปลายทั้งสองและใช้ในปฏิกิริยา ทำให้บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอเกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น และมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากปลายของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลายของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่ง ไพรเมอร์ควรจะมีปริมาณเบส GC ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ (Innis *et. al.* 1990) และไม่ควรมีลำดับเบสที่จะทำให้เกิด primer-dimer หรือจับกับเบสคู่สมภายในตัวไพรเมอร์เอง (Rapley. 1998)

3. นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เป็นส่วนที่เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะนำไปต่อกับไพรเมอร์ เพื่อสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ เบสจะอยู่ในรูป deoxy-nucleotide triphosphate (dNTPs) ประกอบด้วยเบส 4 ชนิด คือ A, C, G และ T สารละลาย dNTP ตั้งต้น ควรมีความเป็นกลาง ที่ pH 7.0 และตรวจสอบความเข้มข้นด้วย spectrophotometry เมื่อจะใช้จึงนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แล้วเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดควรสมดุลกันเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ถูกต้อง ได้ผลผลิตสูง และลดความผิดพลาดในการเรียงลำดับเบสคู่สม (Innis *et. al.* 1990)

4. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ทำหน้าที่ในการสร้างสายดีเอ็นเอ มีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถทนความร้อนสูง (93-95 องศาเซลเซียส)ได้ โดยส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์ชนิด *Taq* DNA polymerase จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถทนความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสได้ เพราะประหยัดเอนไซม์และเวลา ไม่จำเป็นต้องเติมเอนไซม์ในการสังเคราะห์แต่ละรอบ เติมเพียงครั้งเดียวแล้วคอยเปลี่ยนอุณหภูมิเท่านั้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543) แต่ถ้าใช้เอนไซม์โพลีเมอเรสจาก *E. coli* หรือจากเซลล์อื่นๆ เมื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เอนไซม์ก็จะเสียสภาพด้วย จึงต้องเติมเอนไซม์ลงไปในปฏิกิริยาทุกๆ รอบของการสังเคราะห์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ควรอยู่ในช่วง 0.05-0.5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากเกินไป

จะทำให้เกิด background ที่ไม่จำเพาะ แต่ถ้าความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิตที่ต้องการในปริมาณน้อย (Innis *et. al*. 1990)

5. บัฟเฟอร์ เป็นตัวปรับสภาพสารละลายที่ทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมที่เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ โดยทั่วไปจะรับมาพร้อมกับเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส ซึ่งจะแตกต่างกันบ้างแล้วแต่บริษัท บัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl 500 มิลลิโมลาร์ เจลาติน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบัฟเฟอร์จะมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของปฏิกิริยาปรกติ และส่วนประกอบสุดท้าย คือ $MgCl_2$ ซึ่งบางชนิดจะผสมรวมกับบัฟเฟอร์ หรืออาจแยกหลอดต่างหาก เพื่อผสมทีหลัง ควรมีความเข้มข้นระหว่าง 0.5-2.5 มิลลิโมลาร์ เพราะจะมีผลต่อการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการแยกสายของดีเอ็นเอต้นแบบและการทำงานของเอนไซม์ (Innis *et. al*. 1990)

6. เครื่อง PCR (thermal cycler) คือ เครื่องเปลี่ยนอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สามารถใส่ microcentrifuge tube ขนาดเล็กจำนวนมากได้พร้อมกัน และสามารถตั้งโปรแกรมตามสภาวะที่ต้องการได้ ถ้าในบางเครื่องไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ฝาได้ ต้องเติม mineral oil ที่ด้านบนของสารละลายปฏิกิริยา เพื่อป้องกันการระเหยของของเหลวระหว่างทำ PCR ด้วย (Nicholl. 2002)

2.3.2 หลักการทำ PCR

หลังจากทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ โดยอาจทราบเฉพาะช่วงปลายของยีนนั้นก็ได้ แล้วจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ 2 เส้น แต่ละชนิดมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3’ ของเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการนั้น เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 20-35 เบส นำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นใส่รวมกับดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์ทั้งหมด (genomicDNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอนการแยกคู่ของสายดีเอ็นเอ (denaturation) คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพจากที่เคยเป็นเกลียวคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว เพื่อเปิดโอกาสให้ไพรเมอร์สามารถเข้าไปจับกับบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณบนสายดีเอ็นเอต้นแบบได้ ขั้นตอนนี้ทำได้โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 นาที เพื่อทำลายพันธะที่ใช้ในการจับคู่ของสายดีเอ็นเอ อุณหภูมิและเวลาในช่วงนี้ควรจะมีความเหมาะสม เพราะถ้าอุณหภูมิสูงหรือใช้เวลานานเกินไป จะทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง (Innis *et. al*. 1990)

2. ขั้นตอนการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ (annealing) หลังจากที่ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวแล้วลดอุณหภูมิลงมาที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสคู่สมกับส่วนปลายของยีนที่ต้องการ เข้ามาจับคู่ (anneal) กับเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการอย่างถูกต้อง อุณหภูมิ

และเวลาที่ใช้ขึ้นกับส่วนประกอบเบส ความยาวและความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิของ T_m (melting temperature) $\pm$ 5 องศาเซลเซียส (วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2536)

3. ขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) หลังจากไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบเรียบร้อยแล้ว เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นมาถึง 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เวลาที่ใช้จะขึ้นกับความยาวและความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะเริ่มทำงานด้วยการเชื่อมต่อเบสทั้งสี่ชนิดโดยจะจัดลำดับการเรียงตัวของเบส ตามเบสที่เป็นคู่สมกันบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ จากขั้นตอนนี้การสร้างสายดีเอ็นเอเส้นใหม่จึงเกิดขึ้น (Rapley. 1998)

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 30-40 รอบ ทำให้ได้ Amplified product หรือที่เรียกว่า Amplicon เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก โดยถ้าเริ่มต้นมียีนที่สนใจเพียง 1 โมเลกุล เมื่อผ่านรอบที่ 1 แล้วก็จะมี 2 โมเลกุล แต่เมื่อผ่านไปหลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการก็จะเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณแบบ exponential (2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา) (Nicholl. 2002) (รูปที่ 2.4)

เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาหลายด้าน เช่น การโคลนระดับโมเลกุล (molecular cloning) การตรวจหาสาเหตุการเกิดโรค (pathogen detection) การศึกษาพันธุวิศวกรรม การศึกษาการกลายพันธุ์ (mutagenesis) และการศึกษาหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม เป็นต้น (Melcher.1998)

2.4 เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้น โดยกลุ่มของนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่มพร้อมๆ กัน คือ กลุ่มของบริษัท Dupont ที่รายงานโดย Williams *et. al.* (1990) ซึ่งใช้ประโยชน์ RAPD ในการวางแผนที่โครโมโซม โดยเรียกชื่อเป็น RAPD โดยตรง อีกกลุ่มหนึ่งพัฒนาโดย The Califonia Institute of Biology Research ที่รายงานโดย Welsh and McClelland (1990) แต่เรียก DNA marker ว่า Arbitrarily - Primed PCR (AP-PCR) และนำไปใช้ประโยชน์ในการทำ genome fingerprinting แต่ทั้งสองกลุ่มก็มีหลักการเหมือนกัน

2.4.1 ส่วนประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยา RAPD

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา RAPD ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องเป็นดีเอ็นเอที่สะอาดพอสมควร ต้องไม่มีสิ่งเจือปนมากนัก และไม่แตกหักหรือเสียสภาพ (degrade) เพราะจะมีผลต่อการทำปฏิกิริยาซ้ำ สามารถใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี small-scale ได้ โดยปกติจะเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นประมาณ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อ

ความสะดวกในการทำปฏิกิริยา และให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10-20 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (Steen. 1999)

2. ไพรเมอร์ เป็นไพรเมอร์แบบสุ่มที่ได้จากการออกแบบขึ้นมาเอง โดยให้มีค่าเปอร์เซ็นต์เบส G+C เหมาะสม โดยทั่วไปสามารถออกแบบได้เอง หรือสั่งซื้อเป็นชุดสำเร็จรูปจากบริษัท เช่น Operon Kit เป็นต้น และชุดไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย University of British Columbia (UBC) ประเทศแคนาดา (Haymer. 1994) ความยาวของเส้นไพรเมอร์จะใช้ประมาณ 8-10 เบส ซึ่งถ้าไพรเมอร์ยิ่งมีขนาดสั้นมาก โอกาสที่สามารถเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบก็เป็นไปได้มาก ทำให้ได้เส้นดีเอ็นเอผลผลิตจำนวนมาก ฉะนั้น จำนวนเบสที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 10 เบส เพราะจะได้จำนวนเส้นดีเอ็นเอผลผลิตประมาณ 8-10 ชิ้นต่อไพรเมอร์ อย่างไรก็ตามขนาดของจีโนม ก็มีผลต่อจำนวนผลผลิตของปฏิกิริยา ความเข้มข้นของไพรเมอร์เริ่มต้นที่ใช้จะเจือจางให้เป็น 2 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นไพรเมอร์สุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 200 ไมโครโมลาร์

3. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เป็นส่วนที่สำคัญของปฏิกิริยา PCR ทั่วไป ประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยา PCR ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์เป็นสำคัญ Schierwater and Ender (1993) ทำการทดลองพบว่า เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ได้จาก แบคทีเรีย *T. aquaticus* จะให้ผลผลิตดีเอ็นเอดีที่สุดและมีรูปแบบคล้ายกัน ในขณะที่เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจากแหล่งอื่น เช่น *Thermus thermophilus* และ *Thermococcus litoralis* จะให้ผลผลิตน้อยหรือมีแถบดีเอ็นเอที่แยกกันไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม คุณภาพของเอนไซม์ก็ขึ้นกับบริษัทที่จำหน่ายด้วย ปฏิกิริยา RAPD ที่ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 ไมโครลิตร จะใช้เอนไซม์ประมาณ 0.2-1 ยูนิต ขึ้นกับชนิดและขนาดของจีโนม

4. เบสนิวคลีโอไทด์ ที่อยู่ในรูป deoxy-nucleotide triphosphate (dNTP) ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของสายดีเอ็นเอ มี 4 ชนิด คือ dATP dCTP dGTP และ dTTP ส่วนประกอบทั้งสี่จะผสมรวมกันในหลอดเดียวกัน ในปริมาณเท่ากัน ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ของแต่ละชนิด

5. บัฟเฟอร์ จะใช้เหมือนกับปฏิกิริยา PCR ทั่วไป แต่สำหรับ $MgCl_2$ โดยปกติปฏิกิริยา RAPD ต้องการ $MgCl_2$ ความเข้มข้นประมาณ 2-2.5 มิลลิโมลาร์ต่อปฏิกิริยา ซึ่งความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มีผลต่อการเกาะของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Miller. 1997)

2.4.2 หลักการทำ RAPD

เป็นการประยุกต์เทคนิค PCR เพื่อตรวจหาความแตกต่างหรือความหลากหลายของลักษณะโพลีมอร์ฟิซึมของตัวอย่างพืชและสัตว์ ซึ่งมีความแตกต่างจากเทคนิค PCR ปกติบางประการ (ตารางที่ 2.1) ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ นำมาเพิ่มปริมาณส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลยในหลอดทดลองให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันสั้นภายใต้สภาวะกดดัน (stringency) ต่ำโดยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์เพียงเส้นเดียวขนาดสั้นกว่า

ปกติ คือขนาดประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ มีปริมาณเบส G+C 50-80 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีส่วนของเบสที่เป็นพาลินโดรม (palindromes) (Miller. 1997) เป้าหมายของการเกาะของไพรเมอร์ ก็คือบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น โดยไม่ต้องคำนึงถึงทิศทางของไพรเมอร์ที่เกาะกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ที่เกิดการแยกเป็นสายเดี่ยว ในขั้นตอน denaturation เพราะฉะนั้น ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา RAPD จึงต้องใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ (35-40 องศาเซลเซียส) เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะได้โดยสุ่มมากที่สุดและเกิดการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในขั้นตอน extension (Kangfu Yu and pauls. 1992) ในรอบแรกๆ ของ PCR ที่สภาวะกดดันต่ำจะปล่อยให้เกิดการจับคู่ผิดระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ หลังจากสภาวะกดดันเพิ่มสูงขึ้นก็จะเกิดการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบและทำการเพิ่มปริมาณอย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 2.5) หลังจากจบปฏิกิริยาจึงนำผลที่ได้มาแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันหรือต่างกันก็ได้ ในจีโนมอาจจะมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะในบริเวณที่ห่างไกลกันมากๆ หลังจากทำ PCR จะไม่เกิดผลผลิต แต่ถ้าไปเกาะในบริเวณใกล้กันและทิศทางเข้าหากันจะเกิดผลผลิตขึ้นหลังจากทำ PCR (รูปที่ 2.6)

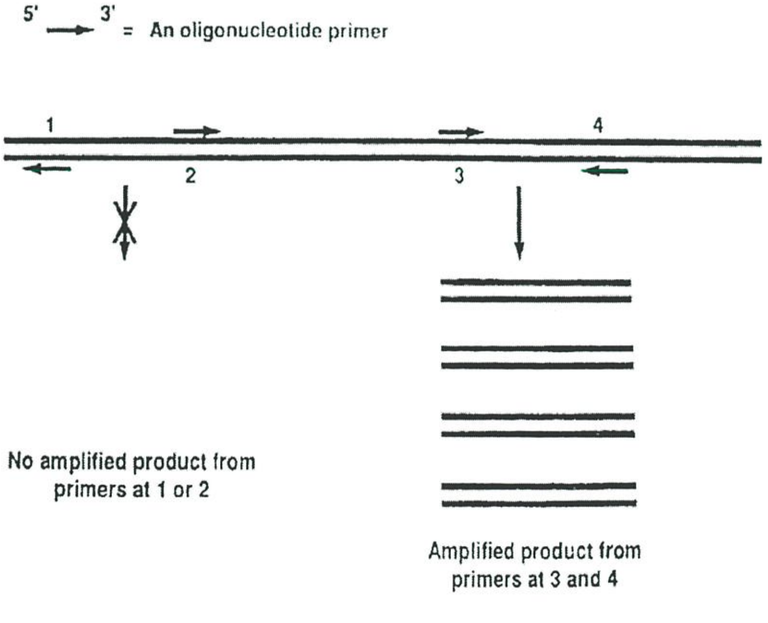
ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของปฏิกิริยา RAPD กับปฏิกิริยา PCR โดยทั่วไป

	RAPD	PCR
1. ชนิดไพรเมอร์	ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นๆ ประมาณ 8-10 เบสเพียงเส้นเดียว	ใช้ไพรเมอร์ 2 เส้น ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับบริเวณที่ต้องการ ความยาวประมาณ 18-25 เบส
2. อุณหภูมิช่วง Annealing	ต่ำประมาณ 35-38 องศาเซลเซียส	สูงกว่า ขึ้นกับค่าเปอร์เซ็นต์เบส GC ของไพรเมอร์ประมาณ 50-65 องศาเซลเซียส
3. บริเวณเป้าหมายที่ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ	เกาะโดยสุ่มไปทั่วทั้งจีโนม	เกาะแบบเฉพาะเจาะจงกับบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์มา
4. ผลผลิตการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	ผลผลิตมากขึ้นโดยทั่วไปประมาณ 8-10 ชิ้นที่สามารถเห็นได้ชัดเจนขึ้นกับขนาดของจีโนม	ปรกติจะมีน้อยชิ้น ขึ้นกับชนิดของไพรเมอร์

ที่มา : วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ (2536)

รูปที่ 2.5 การทำงานของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา RAPD : (ก) ลำดับไพรเมอร์สายสั้นๆ ของ RAPD (ข) การจับคู่ผิดระหว่างเบสของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งจะเกิดขึ้นในการทำ PCR รอบแรกๆ (ค) ไพรเมอร์ RAPD เข้าแนบติดกับสายดีเอ็นเอต้นแบบและทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จนเสร็จสมบูรณ์

ที่มา : Newton and Graham (1994)



รูปที่ 2.6 การวิเคราะห์ RAPD

ที่มา : สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2543)

2.5 การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD

เทคนิค RAPD เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) สำหรับการวิเคราะห์แบบเปรียบเทียบซึ่งใช้ง่ายและรวดเร็ว ทนต่ออิทธิพลสภาพแวดล้อมหลายๆ แบบ มีราคาถูก ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี และไม่จำกัดจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้

ความสำเร็จของการประยุกต์ใช้ RAPD ในการศึกษาอนุกรมวิธาน (taxonomy) และวิวัฒนาการของพืชหลายๆ สปีชีส์ได้รับการตีพิมพ์รวมทั้ง ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ ข้าว มัสตาร์ด หัวผักกาดแดง (radish) (Demeke and Adams. 1994) และมะเขือเทศ (Klein-Lenkhorst *et. al.* 1991) มีการใช้การวิเคราะห์ RAPD เพื่อพัฒนาหาเครื่องหมายที่จำเพาะของจีโนม *Brassica* (Hu and Quires. 1991) และศึกษาความสัมพันธ์ของอนุกรมวิธานใน *Brassica* (Demeke *et. al.* 1992) Kazan *et. al.* (1993) ใช้ RAPD ในการวิเคราะห์สปีชีส์ *Stylosathes* แบบรวมกลุ่ม (clustering analysis) เพื่อศึกษาด้านโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา (morphology) โครงสร้างและหน้าที่เซลล์ (cytology) และไอโซไซม์ (isozyme) Tibayrenec *et. al.* (1993) ได้เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง RAPD และเอนไซม์แบบมัลติโลคัส (multilocus enzyme) ในการศึกษาพันธุกรรมและวิวัฒนาการของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต และได้ยืนยันความเหมาะสมของ RAPD ในการศึกษาทาง phylogenetic นอกจากนี้ยังใช้ในการบ่งชี้ความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา (Goodwin and Annis. 1991) ใช้ในการสร้างแผนที่ยีน (genetic linkage map) (Mohon *et al.* 1994) การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์ การวิเคราะห์ประชากร และระบาดวิทยา (epidemiology)

2.6 การใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาแมลง

การศึกษาและบ่งชี้สปีชีส์ของแมลงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการวิจัยทั้งแบบพื้นฐานและแบบประยุกต์ เนื่องจากแมลงมีขนาดเล็ก โครงสร้างสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม และความหลากหลายของไบโอไทป์ (biotype) ซึ่งไม่สามารถจำแนกแมลงชนิดที่ใกล้เคียงออกจากกันตามโครงสร้างสัณฐานวิทยาได้ง่ายๆ มีวิธีการทางชีวเคมีไม่มากนักที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของสปีชีส์ได้ เช่น การใช้วิธีอัลโลไซม์อิเล็กโทรโฟรีซีส (allozyme electrophoresis) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ศึกษาลักษณะโพลีมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เอนไซม์ แล้ววิเคราะห์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซีส เมื่อนำเจลมาย้อมสีก็จะปรากฏตำแหน่งคู่อัลลีล (allele) ของเอนไซม์จากแถบสีในเจล มาใช้ในการบ่งชี้สปีชีส์ของแมลง เช่น แมลงวันเฮสเซียน (Hessian fly; *Mayetiola destructor*) แต่จากรายงานของ Wellso *et. al.* (1988) พบว่าเทคนิคนี้จะตรวจสอบลักษณะโพลีมอร์ฟิซึมของแมลงวันเฮสเซียนได้น้อยมาก และในบางกรณีจะไม่พบความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์หรือประชากรในอเมริกาเหนือ สอดคล้องกับรายงานของ Black *et. al.* (1990) ที่ทำการศึกษาเพลี้ย

เทคโนโลยี RAPD กำลังเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในการนำมาศึกษาความหลากหลายของสปีชีส์ในแมลง มีรายงานบางฉบับได้รายงานการประยุกต์เทคนิคที่ศึกษาดีเอ็นเอนี้ในการศึกษาแมลง ดังนี้

Black *et. al.* (1992) สามารถแยกเพลี้ยสปีชีส์ต่างๆ 4 สปีชีส์อันได้แก่ greenbug (*Schizaphis graminum*) เพลี้ยข้าวสาลี (*Diuraphis noxia*) เพลี้ยถั่ว (*Acyrthosiphom pisum*) และเพลี้ย ambrosia สีน้ำตาล (*Uroleucon ambrosiae*) จากการตรวจสอบลักษณะดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟีซึม และความผันแปรทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ ECO BAM OPC-01 และ OPC-04 ความผันแปรที่ตรวจสอบจะเป็นความผันแปรระหว่างไบโอไทป์ ประชากร สีลำตัว และเพลี้ยแต่ละตัวบนพืชชนิดเดียว ซึ่งจะมีจำนวนมากกว่าความผันแปรที่ตรวจสอบด้วยวิธีอัลโลไซม์

Naber *et. al.* (2000) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรแมลงวันเฮสเซียน *M. destructor* ซึ่งเป็นแมลงศัตรูของข้าวสาลีในโมรอคโคและซีเรียโดยใช้เทคนิค RAPD โดยทำการคัดเลือกไพรเมอร์ 150 ชนิด (จาก Operon Tecnologies) พบไพรเมอร์ทั้งหมด 14 ชนิด ที่แสดงลักษณะโพลีมอร์ฟีซึม ทำให้ทราบว่าระหว่างแมลงวันเฮสเซียนแต่ละตัวและประชากรทั้งหมดทั้งภายในและระหว่างพื้นที่ทางภูมิศาสตร์มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง และเมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)โดยวิธีการวัดของ Nei และวิเคราะห์แบบรวมกลุ่ม (cluster analysis) บ่งชี้ว่า ประชากรสายพันธุ์ซีเรียนแยกจากสายพันธุ์โมรอคโคอย่างชัดเจน

Garner and Slavicek (1996) Schreiber *et. al.* (1997) และ Reineke and Zebitz (1999) จำแนกผีเสื้อกลางคืนยิปซี (gypsy moth) สายพันธุ์เอเชียและอเมริกาเหนือในตอนกลางของยุโรป โดยใช้เครื่องหมาย RAPD 4 ชนิด คือ FS-1 FS-2 FS-3 และ FS-4 ซึ่งสามารถบ่งชี้ในระดับความถูกต้องที่สูงมาก โดยทำการคัดเลือกจากไพรเมอร์กว่า 300 ชนิด และยังสามารถบ่งชี้ผีเสื้อยิปซีลูกผสมระหว่างสายพันธุ์เอเชียและอเมริกาเหนือได้อีกด้วย เนื่องจากลักษณะของเครื่องหมายนี้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ตัวอย่างประชากรผีเสื้อกลางคืนยิปซีจากพื้นที่ยุโรป พบว่าผีเสื้อกลางคืนยิปซีในยุโรปส่วนใหญ่จะมีจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบ คือ เอเชีย อเมริกาเหนือ และลูกผสม จึงเป็นไปได้ว่าประชากรผีเสื้อยิปซีที่มีต้นกำเนิดในยุโรปอาจจะมีเครื่องหมายทั้งรูปแบบเอเชียและอเมริกาเหนือ

Williams *et. al.* (1994) ศึกษาแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ (geographical origin) ของด้วงเจาะลำต้น (Argentine stem weevil, *Listronotus bonariensis*; Coleoptera : Curculionidae) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูของหญ้าสำหรับเลี้ยงสัตว์ในนิวซีแลนด์ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากนิวซีแลนด์ 5 พื้นที่ อเมริกาใต้ 9 พื้นที่ และออสเตรเลีย 1 พื้นที่ แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าจากการคัดเลือกไพรเมอร์ 10 ชนิด มีไพรเมอร์ 2 ชนิดที่แสดงลักษณะโพลีมอร์ฟีซึมที่เด่นชัดของแมลง

ชนิดนี้ และผลการทดลองบ่งชี้ว่าตัวอย่างประชากร *L. bonariensis* ในนิวซีแลนด์มีถิ่นกำเนิดจากฝั่งตะวันออกของอเมริกาใต้

Zhou *et. al.* (2000) ศึกษาโครงสร้างทางประชากรของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) ในบริเวณตะวันออกของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดยเก็บตัวอย่างผีเสื้อในอิสราเอล 5 พื้นที่ และตุรกี 1 พื้นที่ แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ 3 ชนิดจากทั้งหมด 55 ชนิด สามารถใช้ในการสร้างแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึม 84 ตำแหน่งในการประเมินโครงสร้างทางประชากรและระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร จากการศึกษาพบว่าหนอนเจาะสมอฝ้ายอิสราเอลและตุรกีมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและ gene flow สูง

De Sousa *et. al.* (2001) ใช้เทคนิค RAPD วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรยุง *Aedes aegypti* ในอาร์เจนตินา 5 กลุ่ม และเปอร์โตริโก 1 กลุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-02 OPB-03 และ OPB-13 และคำนวณหาค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity) แล้วสร้างเดนโดรแกรม พบความแตกต่างระหว่างประชากรอาร์เจนตินากับเปอร์โตริโกอย่างชัดเจน

Chapco *et. al.* (1992) ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์ทางประชากรของตั๊กแตน 2 สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ 24 ชนิด ความยาว 9 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150-2500 คู่เบสที่แสดงถึงสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์

Biron *et. al.* (2000) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่ ในการศึกษาแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ของแมลงวัน (cabbage root fly, *Delia radicum;* Diptera : Anthomyiidae) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูของพืชตระกูลกะหล่ำ (Cruciferous) ในเขตอเมริกาเหนือและยุโรป ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า จากการคัดเลือกไพรเมอร์ 10 ชนิดจากทั้งหมด 520 ชนิดจะทำให้ได้เครื่องหมาย RAPD 55 เครื่องหมายร่วมกับข้อสังเกตการศึกษาสัณฐานวิทยาของไข่ได้บ่งชี้แหล่งกำเนิดของประชากรแมลงวันอเมริกาเหนือ และความใกล้ชิดกันสูงระหว่างประชากรอเมริกาเหนือกับยุโรปตะวันตกและสรุปว่า *D. radicum* มีการอพยพจากแถบตะวันตกเฉียงเหนือของยุโรปเข้าสู่ชายฝั่งตะวันออกเฉียงเหนือของอเมริกาเหนือ (บริเวณนิวยอร์ก)

Haymer and McInnis (1993) สร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมจากเทคนิค RAPD จากไพรเมอร์ OPH-14 91074 และ 91167 ซึ่งคัดเลือกจากไพรเมอร์ 22 ชนิด เพื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและความแตกต่างระหว่างประชากรของแมลงวันผลไม้เมดิเตอร์เรเนียน (*Ceratitis capitata*) จากที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการและเก็บจากในธรรมชาติ (ฮาวาย อาร์เจนตินา และอิสราเอล) ผลการทดลองจะแสดงไพรเมอร์ที่สร้างแถบดีเอ็นเอหลักที่เป็น monomorphic ในแมลงวันฮาวายทุกตัวทั้งประชากรในห้องปฏิบัติการและในธรรมชาติ และไพรเมอร์ที่บ่งชี้บริเวณจีโนมที่มีความผันแปรสูง

Mendel *et. al*. (1994) ศึกษาความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของแมลงศัตรูต้นสน *Matsucoccus josephi* (Homoptera : Matsucoccidae)ในอิสราเอล ไซปรัสและตุรกี โดยใช้เทคนิค RAPD รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 3 ชนิด จะแสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างประชากรอิสราเอลกับไซปรัส และความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างประชากรอิสราเอลกับตุรกี จากข้อมูลพบว่า *M. josephi* มีการกระจายจากไซปรัสสู่อิสราเอล

Landry *et. al*. (1993) ใช้เทคนิค RAPD ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความผันแปรทางพันธุกรรมของแตนเบียน 2 วงศ์ (Hymenoptera : Mymaridae และ Trichogrammatidae) ซึ่งมีขนาดเล็กมากและไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาภายในสปีชีส์ได้ โดยตัวต่อนี้จะมีความสำคัญในการควบคุมแมลงศัตรูทางชีววิธี จากการคัดเลือกไพรเมอร์ 19 ชนิด จะได้ไพรเมอร์ 13 ชนิดที่ให้แถบดีเอ็นเอ 57 แถบและวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony ทำให้สามารถจัดจำแนก *Anaphes* 5 ไบโอไทป์ได้

Kambhampati *et. al*. (1992) จำแนกสปีชีส์และประชากรของยุง *Aedes* 5 สปีชีส์ รวมทั้งบ่งชี้ตัวอย่างยุงที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อนให้รวมอยู่ในกลุ่มของ *Ae. Albopictus* พบว่า แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากเทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด (OPE-07 และ OPE19) ที่คัดเลือกจากทั้งหมด 20 ชนิด ส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะเฉพาะ (unique) กับยุงแต่ละตัว และแถบดีเอ็นเอบางแถบจะจำเพาะกับสปีชีส์และปรากฏในยุงทุกตัวของสปีชีส์นั้น

Gawel and Bartlett (1993) จำแนกความแตกต่างระหว่างแมลงหวี่ขาว (sweetpotato whitefly; *Bemisia tabaci*) 2 ไบโอไทป์ (ไบโอไทป์ เอ และบี) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูของฝ้ายและผักในเขตแห้งแล้งทางตะวันตกเฉียงเหนือของสหรัฐอเมริกา โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากไข่และดักแด้แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับแมลงหวี่ขาวอีก 2 สปีชีส์ (bayberry whitefly; *Parabemisia myricae* และ bandedwing whitefly; *Trialeurodes abutilonea*) พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ 12 ชนิด โดยคัดเลือกจากไพรเมอร์ชุด A (Operon Technologies) จะสร้างรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับไบโอไทป์เอและบี และจะแยกทั้งสองไบโอไทป์ออกจากกัน

Dowdy and McGaughey (1996) ศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ผีเสื้อกลางคืน (Indianmeal Moth; *Plodia interpunctella*, Lepidoptera : Pyratidae) 6 ประชากร ซึ่งเป็นแมลงที่ทำความเสียหายแก่ผลผลิตทางการเกษตรที่เก็บในยุ้งฉาง ผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ 6 ชนิด (OPA-01 OPA-11 OPB-01 OPB-05 OPB-10 และ OPR-08) จากทั้งหมด 20 ชนิด จะแสดงความแตกต่างระหว่างประชากรสูงสุดและให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 82 แถบ และไพรเมอร์ OPR-08 (19 แถบ) จะมีผลในการจัดจำแนกประชากรผีเสื้อกลางคืนดีที่สุด และแสดงว่ามีความผันแปรภายในประชากรน้อยมาก แต่มีความแตกต่างระหว่างประชากรมาก

Wilkerson *et. al.* (1995) จำแนกยุง *Anopheles (Nyssorhychus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) 4 สปีชีส์ ในปารากวัย อาร์เจนตินา และบราซิล ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ซับซ้อนและยังมีการจัดจำแนกได้ไม่ดีนัก โดยทำการคัดเลือกไพรเมอร์ 12 ชนิดจากทั้งหมด 65 ชนิดที่สร้างเครื่องหมายที่จำเพาะกับสปีชีส์ด้วยเทคนิค RAPD ผลการทดลองที่ได้ ทำให้สามารถรับรองชื่อได้ 3 สปีชีส์ คือ *An. (Nys.) albitarsis* *An. (Nys.) marajoara* และ *An. (Nys.) deaneorum*

Pornkulwat *et. al.* (1998) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของหนอนเจาะฝักข้าวโพด (*Ostrinia nubilalis*; Lepidoptera : Pyralidae) 3 ชนิดที่ไม่สามารถแยกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 120 ชนิดด้วยเทคนิค RAPD พบว่ามีไพรเมอร์แค่ 10 ชนิดที่สร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรม เมื่อนำรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้มาสร้างเดนโดรแกรม จะได้เดนโดรแกรมที่แสดงความสัมพันธ์ภายในและระหว่างชนิดของหนอนเจาะฝักข้าวโพด ซึ่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้สามารถแยกชนิดของหนอนได้ถูกต้อง

Schnell *et. al.* (1996) ศึกษาลักษณะที่สามารถถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ได้ของเครื่องหมาย RAPD ในแมลงวันผลไม้แคริบเบียน (*Anastrepha suspensa*; Diptera : Tephrotidae) 2 วงศ์ที่เลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน คือ ซังข้าวโพด และวุ้น จากไพรเมอร์ 6 ชนิด จะได้เครื่องหมายที่จำเพาะต่อแมลงวันที่เลี้ยงบนซังข้าวโพด 87 เครื่องหมาย และแมลงวันที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น 77 เครื่องหมาย เครื่องหมายที่ได้จะเป็น polymorphic ที่แบ่งแยกตามที่คาดไว้โดยมีอัตราส่วนการแบ่งแยกของ polymorphic loci เป็น 1:1 และ 3:1

Sonvico *et al.* (1996) จำแนกความแตกต่างระหว่างแมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata* และ *Anastrepha fraterculus* (Diptera : Tephritidae) ระยะตัวอ่อน ซึ่งเป็นระยะที่ยากต่อการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยา จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD และคัดเลือกไพรเมอร์กว่า 30 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ OPK-06 จะสร้างเครื่องหมายที่จำเพาะต่อแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดซึ่งแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม ไพรเมอร์ OPC-09 และ OPC-12 สร้างเครื่องหมายที่สามารถแยกประชากร *C. capitata* ในห้องปฏิบัติการออกจากประชากรในธรรมชาติ และไพรเมอร์ OPH-17 สร้างเครื่องหมายที่ยืนยันแหล่งกำเนิดของ *A. fraterculus*

Deverno *et. al.* (1998) จำแนกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของหนอน (budworm) ศัตรูต้นสน *Choristoneura* 2 สปีชีส์ คือ *Choristoneura fumiferana* และ *C. pinus* ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดและสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมาก นอกจากนี้ยังมีการผสมพันธุ์ระหว่าง 2 สปีชีส์ทำให้เกิดลูกผสมขึ้น จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD จากการคัดเลือกไพรเมอร์ 190 ชนิดจะได้ไพรเมอร์ 12 ชนิดที่แสดงเครื่องหมายที่จำเพาะต่อ *Choristoneura* แต่ละสปีชีส์ 17 เครื่องหมาย ในขณะที่ลูกผสมจะมีเครื่องหมายของทั้งสองสปีชีส์ปรากฏอยู่

Borges *et. al.* (2000) ใช้เทคนิค isoenzyme, RAPD และสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบความผันแปรทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรของ *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera :

Reduviidae) จากพื้นที่ตะวันออกเฉียงเหนือของบราซิล ซึ่งแมลงนี้เป็นพาหะนำโรค Chagas จากผลการทดลองพบว่า รูปแบบการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากเทคนิค isoenzyme ของประชากร 3 กลุ่ม จะมีลักษณะเหมือนกัน ในขณะที่รูปแบบแถบดีเอ็นเอของ RAPD จะจำแนกประชากรทั้ง 3 กลุ่ม อย่างชัดเจน สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาโดยดูโครงสร้างส่วนหัว สามารถจำแนกประชากรทั้ง 3 กลุ่มได้เฉพาะที่เป็นตัวผู้เท่านั้น

Garcia *et. al.* (1998) ใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงพาหะนำโรค Chagas (Triatomine bugs; Hemiptera : Reduviidae) ในละตินอเมริกา จากไพรเมอร์ 11 ชนิด (จากทั้งหมด 27 ชนิด) สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *Panstrongylus megistus Rhodnius prolixus* และ *Triatoma infestans* ได้ และเทคนิค RAPD ยังสามารถใช้กับตัวอย่างที่เก็บไว้นานเกิน 1 ปีได้

Lery *et. al.* (2003) ใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด เพื่อจัดจำแนกเซลล์ไลน์ของแมลง 11 เซลล์ไลน์ ประกอบด้วย Lepidoptera 6 เซลล์ไลน์ (5 สปีชีส์) Diptera 1 เซลล์ไลน์ และ Coleoptera 4 เซลล์ไลน์ (1 สปีชีส์ คือ *Leptinotarsa decemlineata*) จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ไลน์ต่างอันดับกันหรือแม้แต่สปีชีส์ 2 สปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดจากจีนัสเดียวกัน (*Spodoptera*) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะมีความแตกต่างกันมาก แต่ในทางตรงกันข้ามเซลล์ไลน์ของพวก Lepidoptera (*Phythorimaea operculella*) 2 เซลล์ไลน์จะมีความเหมือนกันโดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้ยังสามารถพบได้ในแมลงที่เก็บจากธรรมชาติด้วย

Brown *et. al.* (1997) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อจำแนกความแตกต่างภายในและระหว่างสายพันธุ์ของมอดฟันเลื่อย (*Oryzaephilus surinamensis*, Coleoptera : Silvanindae) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูธัญพืช 9 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 5-30 ปี (30-180 รุ่น) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด (OPA-01 และ OPA-06) ก็เพียงพอต่อการจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างน่าเชื่อถือ และพบว่ามีความผันแปรภายในสายพันธุ์น้อยกว่าระหว่างสายพันธุ์

McIntosh *et. al.* (1996) สร้างรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์แมลง 20 ชนิด จากอันดับ Lepidoptera Diptera Coleoptera และ Homoptera ด้วยไพรเมอร์ที่ไม่เจาะจง รูปแบบลายพิมพ์ที่ได้จะเป็นลักษณะคงที่ในเซลล์ไลน์ทุก passage เพราะจะมีรูปแบบเดียวกัน และตัวแมลงที่ใช้สร้างเซลล์ไลน์และเซลล์ไลน์ที่ได้ก็มีรูปแบบลายพิมพ์เดียวกัน จากผลการทดลองสามารถจำแนกเซลล์ไลน์ได้ ยกเว้น *Plutella xylostella* (BCIRL-PX2-HNU3) และ *Mamestra brassicae* (IZD-MB-0503) จะสร้างรูปแบบลายพิมพ์ที่เหมือนกันกับ *Tricoplusia ni* (TN-CL1) นอกจากนี้ *Spodoptera exigua* (UCR-SE-1C) จะสร้างรูปแบบเหมือนกับ *Spodoptera frugiperda* (SF9 และ IPLB-SF21) ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของเซลล์ไลน์ระหว่างการทดลอง

นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค RAPD ในการหาแผนที่ความสัมพันธ์ (linkage map) ของมอดแป้ง *Tribolium castaneum* (Beeman and Brown. 1999) และแมลงหวี่ *Drosophila buzzati* (Laayoui *et.*

al. 2000) การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD ในงานวิจัยด้านอื่นๆ เช่น Benecke *et. al.* (1998) ใช้ลายพิมพ์ RAPD ในการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการสืบสวนคดีอาชญากรรมโดยวิธีทางการแพทย์จากหนอนแมลงวันบนศพมนุษย์ ด้วยการตรวจสอบและเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการของหนอนแมลงวันที่พบในถุงใส่ศพกับหนอนที่พบภายนอกถุง และดักแด้ที่พบบนพื้นใต้ศพ

2.7 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สามารถวิเคราะห์และแสดงเป็นแผนภูมิรูปต้นไม้ (tree) ได้ จากแผนภูมินี้สามารถประเมินความสัมพันธ์ที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมระหว่างโมเลกุลหรือสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจเรียก phylogenetic หรือ cladistic ซึ่งหมายถึง กลุ่มของผู้ที่สืบทอดมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน จะมีวิวัฒนาการร่วมกันและมีความสัมพันธ์กับสมาชิกภายในกลุ่มมากกว่าสมาชิกจากกลุ่มอื่น (Brinkman and Leipe. 2001)

2.7.1 รูปแบบของข้อมูลที่นำไปสร้าง phylogenetic tree (ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. 2544)

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลจะทำให้ได้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งแยกได้เป็น 2 ประเภท คือ

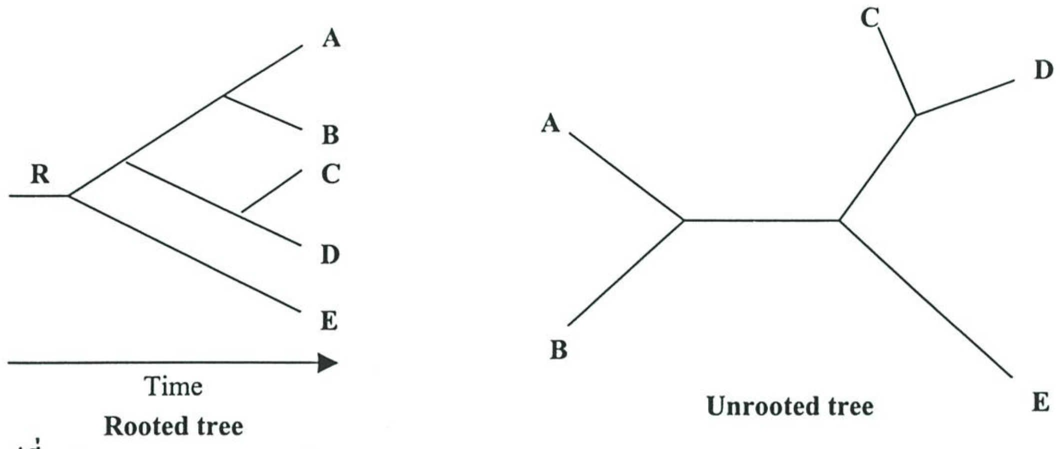
1. ข้อมูลแสดงลักษณะ (discrete characters) ของสิ่งที่ต้องการเปรียบเทียบ ข้อมูลลักษณะนี้ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเปรียบเทียบ หรือจาก restriction site polymorphism ซึ่งข้อมูลแบบนี้จัดเป็นข้อมูลปฐมภูมิ (primary data) สามารถนำไปสร้าง phylogenetic tree ได้โดยตรง โดยวิธี maximum parsimony หรือ maximum likelihood หรือสามารถแปลงเป็นข้อมูลทุติยภูมิ (secondary data) ซึ่งแสดงเป็นค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วนำไปสร้าง phylogenetic tree ต่อไป

2. ข้อมูลที่แสดงความแตกต่างหรือความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic distance or similarity) ของสิ่งเปรียบเทียบ ข้อมูลลักษณะนี้จะเป็นข้อมูลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลปฐมภูมิมาเป็นข้อมูลทุติยภูมิซึ่งแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งเปรียบเทียบ

2.7.2 ลักษณะและชนิดของ phylogenetic tree

ความสัมพันธ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตสามารถแสดงได้ด้วย phylogenetic tree ซึ่ง tree ประกอบด้วย nodes และ branches โดย node คือ จุดที่ branch แยกเป็น 2 branch branch จะแสดงสิ่งที่ต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบ ซึ่งเรียกว่า operational taxonomic units (OTUs) ในเชิงบรรพบุรุษและลูกหลาน ความยาวของ branch จะแสดงจำนวนการเปลี่ยนแปลง (หรือแสดงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม) ที่เกิดขึ้นใน branch นั้น

phylogenetic tree สามารถแบ่งแยกได้เป็น 2 ชนิด คือ Rooted tree และ Unrooted tree (รูปที่ 2.7) โดย Rooted tree นั้นจะมีกิ่งที่แสดง common ancestor (R) ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด (OTUs) ในขณะที่ Unrooted tree จะแสดงความสัมพันธ์ของ OTUs ทั้งหมดโดยไม่ระบุตำแหน่งของ common ancestor



รูปที่ 2.7 Rooted tree และ Rooted tree

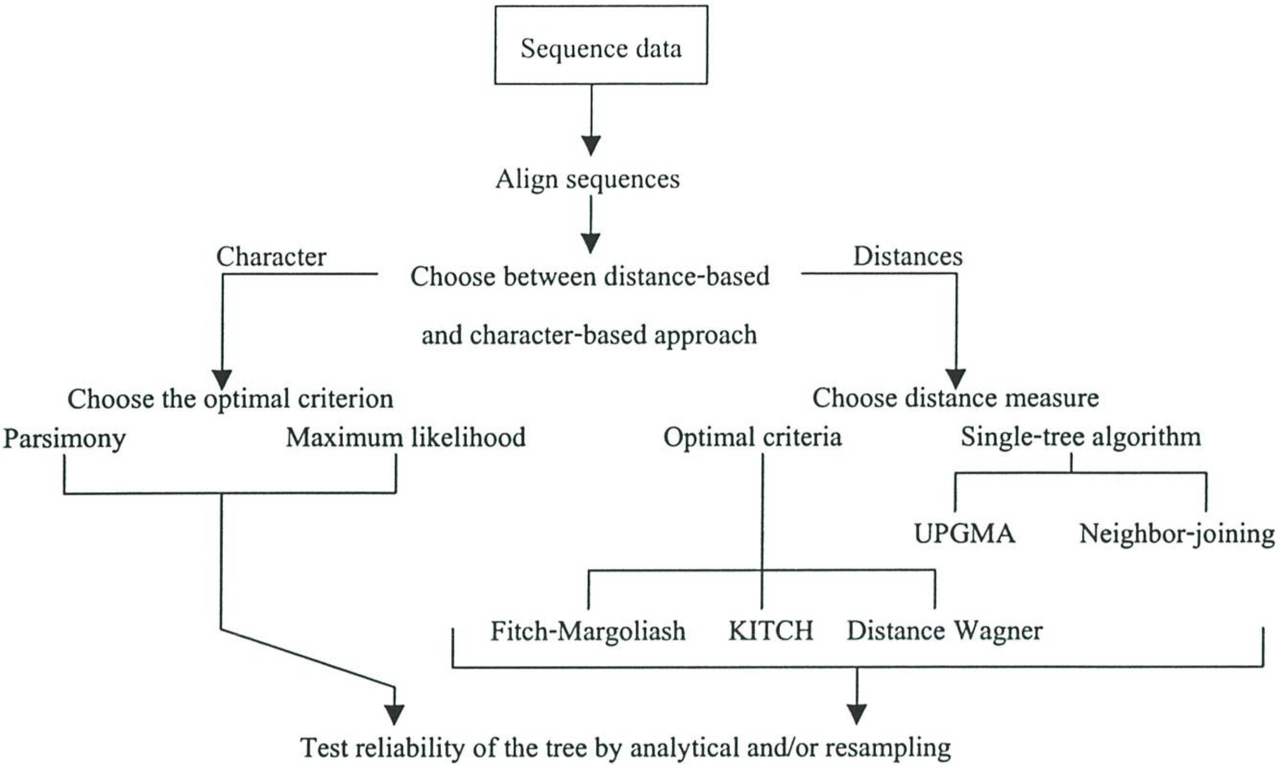
ที่มา : ศิราวุธ กลิ่นบุหงา (2544)

2.7.3 วิธีการสร้าง phylogenetic tree (สิทธิรักษ์ รอยตระกูล. 2540 และศิราวุธ กลิ่นบุหงา. 2544)

การสร้าง Phylogenetic tree จากข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประกอบด้วยขั้นตอนคร่าวๆ ดังนี้

1. คัดเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง
2. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น allozyme RFLP RAPD หรือ single locus mini- or microsatellites เป็นต้น
3. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์โดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม
4. นำข้อมูลที่ได้มาทำการจัดเรียง (alignment) ให้อยู่ในรูปแบบ (format) จำเพาะเหมาะสมกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่จะใช้
5. นำข้อมูลที่ได้มาสร้าง tree ตามวิธีที่เหมาะสมกับข้อมูล และวัตถุประสงค์ของการทดลอง
6. ประเมินค่าและแปรผลการทดลองจาก tree ที่ได้

ขั้นตอนการสร้าง phylogenetic tree สรุปเป็นแผนผัง ได้ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการสร้าง phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์
ที่มา : ศิราวุธ กลิ่นบุหงา (2544)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างหนอนใยผัก (*P. xylostella*)

- จากพื้นที่ในประเทศไทย 10 ตัวอย่าง
- จากประเทศแคนาดา 1 ตัวอย่าง

3.1.2 สารเคมี

- ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (tris-hydrochloride, Tris-HCl) บริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก แอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)
- ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- คลอโรฟอร์ม (chloroform) บริษัท J.T. Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) บริษัท J.T. Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- โพแทสเซียม อะซิเตต (potassium acetate)
- โซเดียม อะซิเตต (sodium acetate) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) บริษัท Baker Analyzed, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เอนไซม์โปรติเนส เค (protinase K) บริษัท USB, ประเทศอังกฤษ
- เอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอ (RNase A) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (ethanol) องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) บริษัท TIG, ประเทศไทย
- ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxy-nucleotide triphophate, dNTPs) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา

- เอนไซม์แทค ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) บริษัท Promega Coorperation Co.Ltd., ประเทศไทย

- ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker DNA) 2 ชนิด คือ ดีเอ็นเอแลมบ์ดาตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*d III (Lambda DNA/*Hin*d III) และดีเอ็นเอแลดเดอร์ 100 คู่เบส (100 bp DNA Ladder) บริษัท Promega Coorperation Co.Ltd., ประเทศไทย

- ไพรเมอร์ขนาด 10 เบส (primer) จาก Bioservice Unit (BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, ประเทศไทย

- เจลอะกาโรส (agarose gel) บริษัท USB, ประเทศสเปน

- light mineral oil บริษัท Promaga Coorperation Co.Ltd., ประเทศไทย

3.1.3 อุปกรณ์

- ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (larminar air flow carbinet) บริษัท International Sciencetific Supply Co.Ltd., ประเทศไทย

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) บริษัท Memmert, ประเทศเยอรมัน

- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้แรงดันไอน้ำ (autoclave, Tomy : model autoclave SS-325) บริษัท Tomy Kogyo Co. Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

- เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (centrifuge, Hermle : model z383K) บริษัท Electric Service Device Co. Ltd., ประเทศไทย

- เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (microcentrifuge) บริษัท Labquip International Limited, ประเทศไทย

- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส บริษัทกรุงไทยการไฟฟ้า จำกัด, ประเทศไทย

- ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัทซันโย ยูนิเวอร์แซล อิเล็คทริค จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, CyberScan : model pH2000) บริษัท Eutech Cybernetics, ประเทศสิงคโปร์

- เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance) บริษัท Scientific Promotion Co.Ltd., ประเทศไทย

- เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ (water – purification equiptment, fiSteam Cyclon : model WSC901.PDC.5, WSC044.MH3.4 และ WSC900.RIB.9) บริษัท Jencons (Scientific) Ltd.

- เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (thermal cycler, Perkin Elmer Thermal Cycler 480) บริษัท Perkin-Elmer Cetus Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา

- เครื่องอิเล็คโตรโฟรีซิส (Electrophoresis equipment, Gel XL-100 Electrophoresis System) บริษัท Labnet International, Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องฉายแสง UV (gel documentation) บริษัท Advision of synopic Ltd., ประเทศแคนาดา
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) บริษัท Scientic industries, Inc., ประเทศสหรัฐ-อเมริกา
- ปิเปตอัตโนมัติ (adjustable automatic pipette) บริษัทกิบไทย, ประเทศไทย
- ขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร (DURAN) บริษัท Schott, ประเทศเยอรมัน
- ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร (Sterile erlenmayer flask, DURAN) บริษัท Schott, ประเทศเยอรมัน
- หลอดทดลองขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)

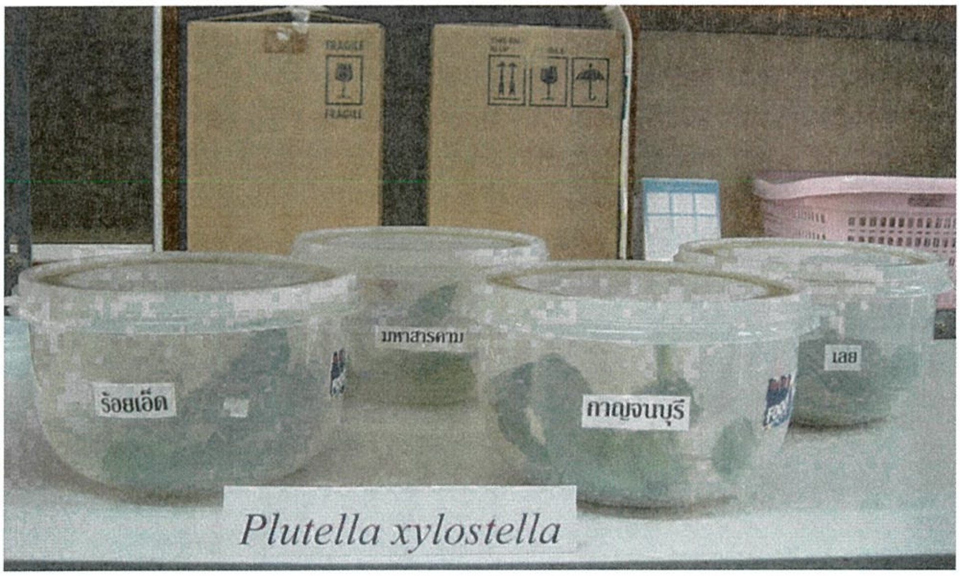
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างหนอนใยผัก

ประชากรหนอนใยผักที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้จากการเก็บตัวอย่างหนอนใยผักในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย โดยการสุ่มแปลงเกษตรในพื้นที่ 10 จังหวัดในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2544 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2546 ดังตารางที่ 3.1 ซึ่งพื้นที่ที่สุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละพื้นที่จะมีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงที่แตกต่างกัน เช่น บริเวณแปลงปลูกผักคะน้าในบริเวณย่านรังสิต จังหวัดปทุมธานี จะใช้สารสกัดจากธรรมชาติ จำพวกใบชา ส่วนพื้นที่อื่นๆ มีการใช้สารกำจัดแมลงที่เป็นสารเคมีฉีดพ่น ยกเว้นพื้นที่บริเวณแปลงปลูกผักคะน้าในจังหวัดมหาสารคาม ที่ไม่มีการใช้สารกำจัดแมลงชนิดใดเลย พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างหนอนใยผัก ส่วนมากจะเป็นพื้นที่ราบ (ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียง-เหนือ) และพืชที่ปลูกก็แตกต่างกัน ในแต่ละพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง จะทำการเก็บตัวอย่างหนอนใยผักใส่ในกล่องพลาสติก แล้วนำกลับมาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการโดยใส่ในกล่องที่บุด้วยตาข่ายและเลี้ยงด้วยผักที่ปลอดสารพิษจนหนอนทุกตัวเข้าดักแด้ และเจริญออกมาเป็นตัวเต็มวัย (รูปที่ 3.1) จากนั้นจึงจับผีเสื้อตัวเต็มวัยจากแต่ละพื้นที่ใส่ในขวดขนาดเล็กๆ ที่มีเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ต่อไป โดยมีหนอนใยผักจากประเทศแคนาดาเป็นตัวเปรียบเทียบ

ตารางที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างหนอนใยผัก *Plutella xylostella* จากการสุ่มพื้นที่ในประเทศไทย

สถานที่	ลักษณะพื้นที่	พืชอาหาร
ภาคเหนือ		
1. เชียงใหม่	ที่ราบเชิงเขา	ดอกกะหล่ำ, บรอคโคลี
2. ลำปาง	ที่ราบเชิงเขา	ดอกกะหล่ำ
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ		
3. ขอนแก่น	ที่ราบ	กะหล่ำปลี
4. มหาสารคาม	ที่ราบ	คะน้า
5. ร้อยเอ็ด	ที่ราบ	คะน้า
6. เลย	ที่สูง	ปูเล่
ภาคกลาง		
7. ปทุมธานี	ที่ราบ	คะน้า
8. นนทบุรี	ที่ราบ	บรอคโคลี
9. นครปฐม	ที่ราบ	ดอกกะหล่ำ
10. กาญจนบุรี	ที่ราบ	คะน้า



รูปที่ 3.1 การเลี้ยงหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการ

3.2.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ วิธี Lifton ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Haymer *et. al.* (1992) โดยมีวิธีการดังนี้

1. นำผีเสื้อตัวเต็มวัยของหนอนใยผักที่แช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส ออกมาผึ่งให้แห้งบนกระดาษทิชชูที่ทำการปลอดเชื้อแล้ว นำใส่โกร่งบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด โดยใช้ตัวเต็มวัยหนอนใยผัก 20 ตัวต่อหลอด

2. เติม Lifton grind buffer 500 ไมโครลิตร (ส่วนผสมและวิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข.) ทำการบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3. ดูดสารละลายที่ได้จากการบดแมลงจนเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenate) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างโกร่งด้วย Lifton grind buffer 50 ไมโครลิตร และดูดใส่หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดสารละสายส่วนใสด้านบนออกใส่ในหลอดใหม่ โดยหลีกเลี่ยงชั้นไขมันที่ลอยอยู่ที่ผิวหน้าสารละลาย

4. เติม 0.2 mg/ml Protinase K 5 ไมโครลิตร จากนั้นใช้พาราฟิล์มปิดฝาหลอดและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

5. เติม 8 M potassium acetate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนโปรตีน 40 ไมโครลิตร ค่อยๆ เอียงให้เข้ากัน วางหลอดบนน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง

6. นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน ดูดสารละลายส่วนใสใส่ลงในหลอดใหม่ 300 ไมโครลิตร

7. เติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง 600 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการเอียงไปมา นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสออกทิ้งไป

8. ละลายตะกอนให้เป็นสารละลายอีกครั้ง (resuspend) ด้วย TE buffer 200 ไมโครลิตร (พยายามทำให้ละลายด้วยการฉีดพ่น)

9. เติม 10 mg/ml RNase A 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ

10.เติมฟีนอล 200 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการเอียงขึ้นลง ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกใส่ในหลอดใหม่

11.เติมคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกใส่ในหลอดใหม่ (ขั้นตอนนี้ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

12.เติม 3 M sodium acetate pH 6.0 ปริมาตร 0.1 เท่า จากนั้นเติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ที่แช่เย็นอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

13.นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสออกทิ้งไป (ที่ก้นหลอด คือ DNA)

14.เติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่แช่เย็นอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

15.ทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนให้เป็นสารละลายอีกครั้งด้วย TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.2.3 การตรวจสอบและการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอตามวิธีของ Hosaka (1994) ดังนี้

1. ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรกับสีย้อม (loading buffer) 9 ไมโครลิตร (โบรโม-ฟีนอล บลู 0.25 เปอร์เซ็นต์ ไฟคอล (ficoll) 25 เปอร์เซ็นต์)

2. โหลดดีเอ็นเอตัวอย่างและดีเอ็นเอมาตรฐาน (ดีเอ็นเอแลมป์ดาตัดด้วย *Hin*d III) 500 300 และ 100 นาโนกรัม ลงบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

3. ย้อมเจลด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 15 นาที นำไปส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต (302 นาโนเมตร) เพื่อดูแถบดีเอ็นเอและถ่ายรูป

4. คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเออย่างคร่าวๆได้โดย เปรียบเทียบความชัดเจนและความหนาของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

5. ปรับความเข้มข้นโดยใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยปรับความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างเช่น ในการประเมินแถบของดีเอ็นเอ ถ้าตัวอย่างแสดงความเข้มของแถบใกล้เคียงกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นาโนกรัม ตัวอย่างที่ประเมินได้ควรมีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม จะต้องนำตัวอย่างดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 190 ไมโครลิตรในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นที่ได้ก็จะเป็น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

6. เพื่อยืนยันว่าได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจริง ให้นำดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 8 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร แล้วโหลดลงบนเจลอะกาโรส เพื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสอีกครั้ง โดยโหลดตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 14, 12, 10, 8 และ 6 นาโนกรัม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

7. เมื่อแถบดีเอ็นเอ แสดงความคมชัดและความหนาของแถบใกล้เคียงกับแถบของดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 นาโนกรัมแสดงว่า ดีเอ็นเอตัวอย่างมีความเข้มข้นที่ประเมินได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ถ้าหากแถบดีเอ็นเอตัวอย่างมีความหนาและชัดเจนกว่าดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 นาโนกรัม ควรปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ความเข้มข้นที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 3-5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางนี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อการวิเคราะห์ RAPD ต่อไป

3.2.4 การคัดเลือกไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 เบส และทำการสังเคราะห์ตามลำดับเบสจากชุดไพรเมอร์สำเร็จรูปของบริษัท Operon Technologie, ประเทศสหรัฐอเมริกา และ University of British Columbia (UBC), ประเทศแคนาดา ได้คัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่มีรายงานการทดลองว่าใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงและทำให้เกิดลักษณะโพลีมอร์ฟิซึมด้วยวิธี RAPD รวมทั้งหมด 22 ชนิด ตามรายงานของ Thongphak (1997) Haymer (1994) และ Heckel *et. al.* (1995) โดยแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดแรกวิเคราะห์ตัวอย่างหนอนใยผัก 10 จังหวัดในประเทศไทยกับแคนาดา และชุดที่ 2 ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างหนอนใยผักในประเทศไทยเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีชนิดและลำดับเบส ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์

	ชนิด	ลำดับเบส
ชุดที่ 1	A-01	5′-CAGGCCCTTC-3′
	A-02	5′-TGCCGAGCTG-3′
	A-04	5′-AATCGGGCTG-3′
	A-07	5′-GAAACGGGTG-3′
	A-09	5′-GGGTAACGCC-3′
	A-11	5′-CAATCGCCGT-3′
	A-12	5′-TCGGCGATAG-3′
	A-18	5′-GGTGACCGT-3′
	A-19	5′-CAAACGTCGG-3′
	B-01	5′-GTTTCGCTCC-3′
	B-07	5′-GGTGACGCAG-3′
	B-18	5′-CCACAGCAGT-3′

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

	ชนิด	ลำดับเบส
ชุดที่ 2	A-03	5′-AATCGGGCTG-3′
	B-04	5′-GGACTGGAGT-3′
	C-01	5′-TTCGAGCCAG-3′
	C-04	5′-CCGCATCTAC-3′
	D-01	5′-GGACCCAACC-3′
	517	5′-GGTCGCAGCT-3′
	521	5′-CCGCCCCACT-3′
	563	5′-CGCCGCTCCT-3′
	570	5′-GGCCGCTAAT-3′
	571	5′-GCGCGCCACT-3′

3.2.5 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณโดยวิธี RAPD ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Heckel *et. al*. (1995) โดยมีวิธีการดังนี้

1. นำ 10X PCR buffer dNTPs $MgCl_2$ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และไพรเมอร์ออกจากที่เก็บ –20 องศาเซลเซียส นำมาวางบนน้ำแข็งให้สารละลายที่แข็งตัวเป็นน้ำแข็งอยู่หลอมหมด

2. เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยกำกับหมายเลขให้เรียบร้อย วางบนโต๊ะที่ทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์

3. ปิเปตส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอต้นแบบ (15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	3	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (7 มิลลิโมลาร์)	7	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ (1.6 ไมโครโมล)	4	ไมโครลิตร
dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว	6	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

เตรียม negative control ซึ่งจะมีส่วนผสมทุกอย่าง ยกเว้นดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนระหว่างการทำ PCR

4. นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างรวมทั้งหลอด negative control ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วหยด light mineral oil 30 ไมโครลิตรทับลงบนสารละลายที่ผสมแล้ว จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycler ตามสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	94 องศาเซลเซียส	4 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
	Annealing	36 องศาเซลเซียส	1 นาที	40 รอบ
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
ขั้นที่ 3	Final Extension	72 องศาเซลเซียส	7 นาที	1 รอบ

5. นำหลอดทั้งหมดที่ทำปฏิกิริยา PCR แล้วเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

6. นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยโหลดดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading buffer 2 ไมโครลิตรไปบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-borate EDTA (TBE 1 เท่า) 1 ชั่วโมง 45 นาที ที่ 50 โวลต์ ย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ 15 นาทีและถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet transilluminator) โดยใช้ฟิล์มโพลารอยด์ ดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 100 bp DNA Ladder

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR มาหาขนาดของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบด้วยโปรแกรม GeneTool แล้วเปลี่ยนข้อมูลเป็นรหัสเลขฐานสอง (binary) คือ 1 และ 0 ซึ่งแสดงถึงการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอตามลำดับ คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ตามวิธีการของ Nei (Nei and Li. 1979) โดยใช้โปรแกรม RESTDIST และคำนวณหาค่าดัชนีความคล้ายคลึงกัน (similarity index) จากสูตร

similarity index = 1 - genetic distance

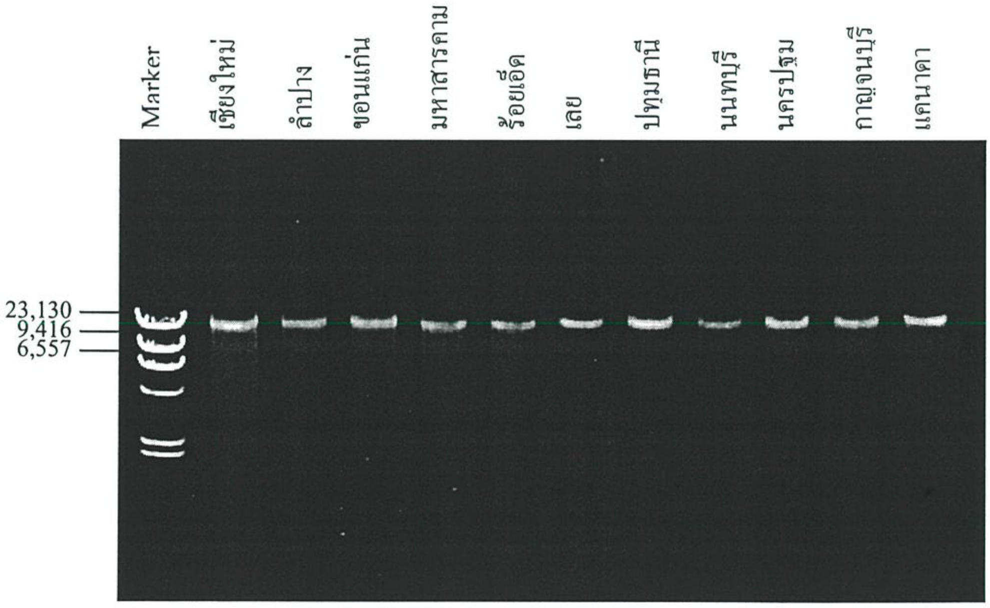
จากนั้นนำค่าระยะห่างที่ได้ทำการวิเคราะห์แบบรวมกลุ่ม (cluster analysis) และสร้างเดนโดรแกรมโดยใช้ วิธี UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR ซึ่งเป็นโปรแกรมย่อยใน PHYLIP version 3.6 (Felsenstein. 1993) และเรียกดูเดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม TREEVIEW

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Lifton ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Haymer *et. al.* (1992) สามารถสกัดดีเอ็นเอของหนอนใยผักได้ โดยเมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิสแล้ว พบว่าแต่ละตัวอย่างจะเกิดแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.1) แถบดีเอ็นเอมีความคมชัด บ่งชี้ว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีนี้ให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ RAPD และมีปริมาณเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณหลายปฏิกิริยาจากการสกัดในแต่ละครั้ง และยังสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลานานหลายเดือน ควรใส่ถุงมือในขณะที่ทำเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของโปรตีน



รูปที่ 4.1 แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างหนอนใยผัก 11 ตัวอย่าง Marker คือ λDNA/ *Hin*d III

4.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนใยผัก

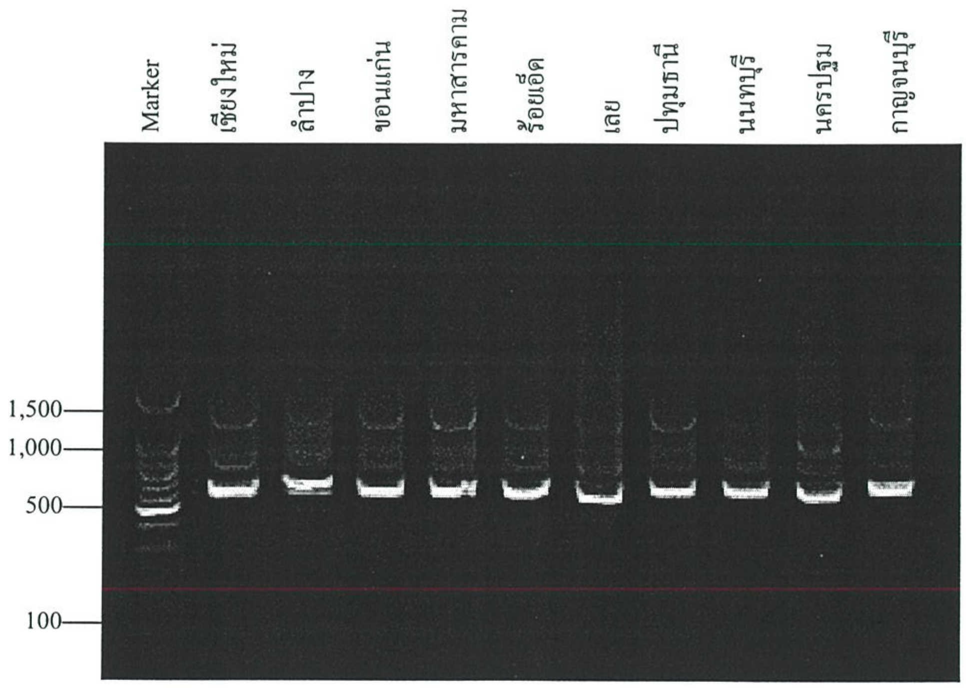
จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในภาคเหนือ ภาคตะวันออก-เฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย คือ เชียงใหม่ ลำปาง ขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด เลย ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม และกาญจนบุรี และอีก 1 ตัวอย่างจากประเทศแคนาดา ด้วยเทคนิค RAPD จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 22 ชนิด โดยจะแบ่งเป็น 2 ชุด ไพรเมอร์ชุดแรกมี 12 ชนิด ใช้วิเคราะห์หนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในประเทศไทยเปรียบเทียบกับหนอนใยผักจากแคนาดา ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 2 มี 10 ชนิดจะใช้วิเคราะห์หนอนใยผักในประเทศไทยเพียงอย่างเดียว ไพรเมอร์ทั้งหมดจะให้แถบดีเอ็นเอทั้งแบบ monomorphic และ polymorphic ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งการบันทึกผลจะนับเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มของแถบเด่นชัดเท่านั้น ตัวอย่างไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น monomorphic ที่ชัดเจนที่สุด คือ A-03 (รูปที่ 4.2) ซึ่งไม่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักแต่ละตัวอย่าง โดยจะสร้างแถบดีเอ็นเอขนาด 670 คู่เบส ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic จะแสดงถึงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักอย่างชัดเจน ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic และเป็นตัวอย่างที่ดีในการศึกษานี้ ได้แก่ A-01 A-02 A-04 A-09 B-01 B-04 C-01 C-04 563 570 และ 571 (รูปที่ 4.3-4.13) โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอมีตั้งแต่ 300 - 2300 คู่เบส

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์แต่ละชนิด

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น monomorphic	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด
A-01	1	3	4
A-02	0	5	5
A-04	0	6	6
A-07	1	4	5
A-09	1	5	6
A-11	1	3	4
A-12	1	3	4
A-18	0	3	3
A-19	0	4	4
B-01	2	6	8
B-07	2	1	3

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

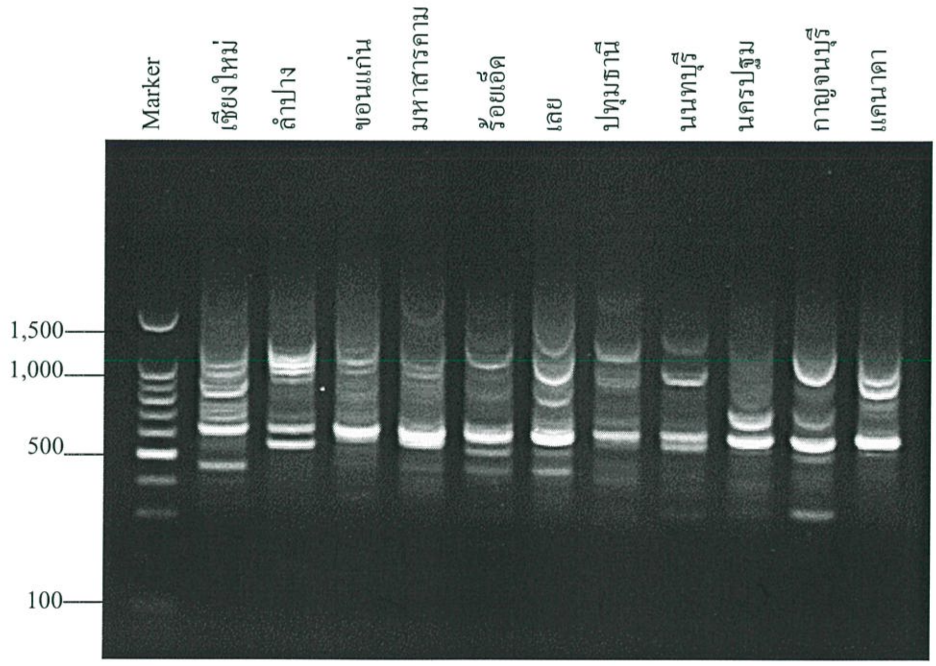
ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น monomorphic	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด
B-18	1	1	2
A-03	1	0	1
B-04	1	10	11
C-01	0	5	5
C-04	0	2	2
D-02	0	4	4
517	0	3	3
521	0	5	5
563	0	3	3
570	0	5	5
571	0	4	4



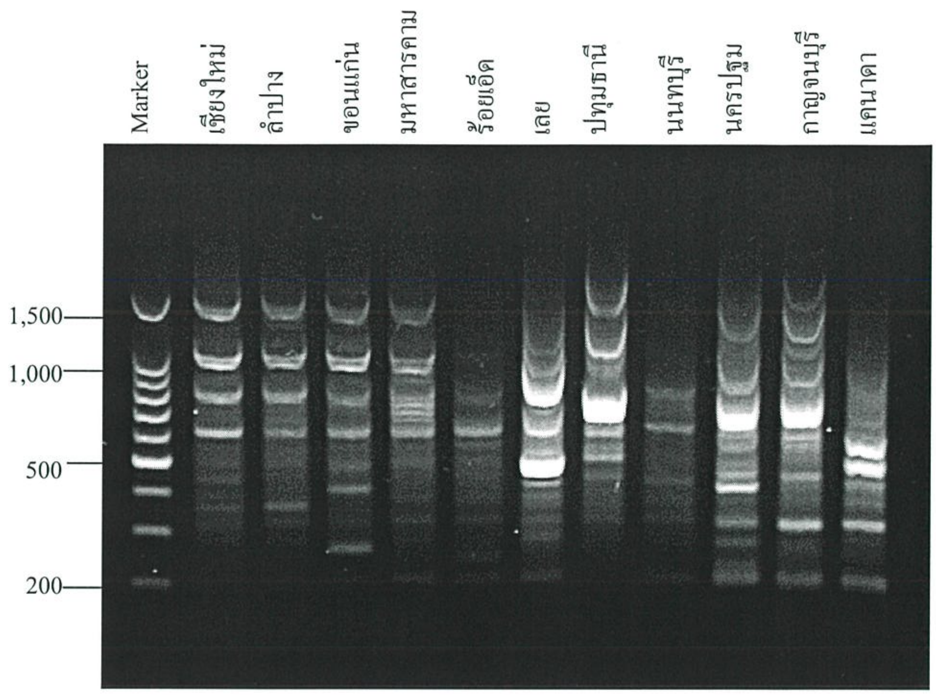
รูปที่ 4.2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-03 Marker คือ 100 bp ladder DNA

ไพรเมอร์ A-01 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างหนอนใยผักแต่ละตัวอย่างจะมีแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกัน โดยได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 คู่เบสในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างหนอนใยผักจากนครปฐม แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 860 คู่เบส ในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างจากนนทบุรี แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบสในทุกตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 540 คู่เบสในตัวอย่างจากลำปาง ร้อยเอ็ด เลย และกาญจนบุรี และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบสในตัวอย่างจากเชียงใหม่ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด และเลย ดังรูปที่ 4.3

จากไพรเมอร์ A-02 พบว่า รูปแบบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ลำปาง ขอนแก่น และมหาสารคามจะคล้ายกัน และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ลำปาง ขอนแก่น มหาสารคามและร้อยเอ็ดได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 830 และ 630 คู่เบส ในตัวอย่างจากเลยได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 830 และ 630 คู่เบส ในตัวอย่างจากปทุมธานีและกาญจนบุรีได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 และ 630 คู่เบส ในตัวอย่างจากนครปฐมได้แถบดีเอ็นเอขนาด 630 คู่เบส นอกจากนี้ไพรเมอร์นี้ยังสามารถแยกตัวอย่างจากกาญจนบุรีและปทุมธานีออกจากตัวอย่างอื่นได้ด้วยแถบดีเอ็นเอขนาด 1700 และ 1575 คู่เบส ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.4



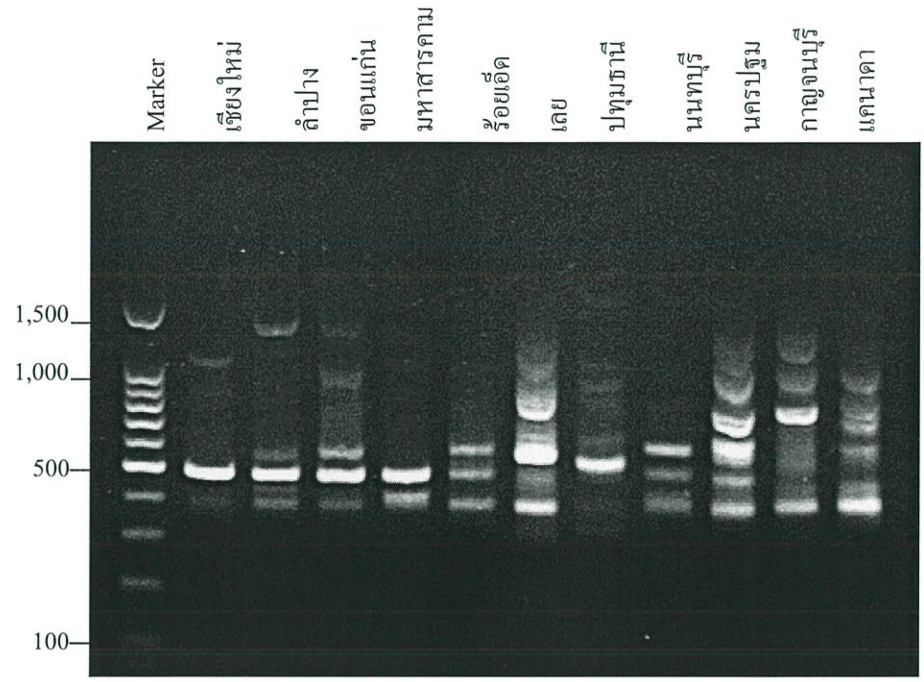
รูปที่ 4.3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-01 Marker คือ 100 bp ladder DNA



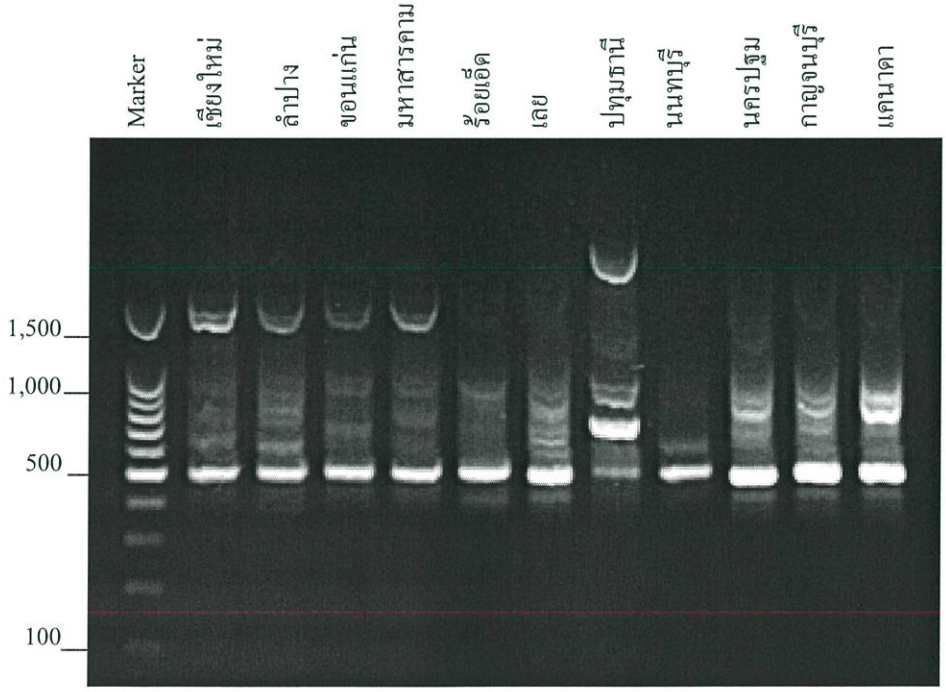
รูปที่ 4.4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-02 Marker คือ 100 bp ladder DNA

ไพรเมอร์ A-04 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 470 คู่เบสในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ลำปาง ขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด เลย นนทบุรี และนครปฐม แถบดีเอ็นเอขนาด 374 คู่เบสในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างจากปทุมธานี แถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบสในตัวอย่างจากเลย กาญจนบุรี และแคนาดา แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 680 คู่เบสในตัวอย่างจากนครปฐม และแคนาดา แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 565 คู่เบสในตัวอย่างจากขอนแก่น ร้อยเอ็ด นนทบุรี นครปฐม และแคนาดา และไพรเมอร์นี้ยังสามารถแยกตัวอย่างจากปทุมธานีได้ด้วยแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่างร้อยเอ็ดและนนทบุรีมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกประการ ดังรูปที่ 4.5

ไพรเมอร์ A-09 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1540 คู่เบสในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ลำปาง ขอนแก่น และมหาสารคาม แถบดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบสในตัวอย่างจากปทุมธานี นครปฐม กาญจนบุรี และแคนาดา แถบดีเอ็นเอขนาด 730 คู่เบสในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ลำปาง มหาสารคาม เลย นครปฐม กาญจนบุรี และแคนาดา แถบดีเอ็นเอขนาด 670 คู่เบสในตัวอย่างจากขอนแก่น เลย ปทุมธานี นครปฐม และกาญจนบุรี และแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบสในทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถแยกตัวอย่างปทุมธานีออกจากตัวอย่างอื่นด้วยแถบดีเอ็นเอขนาด 2070 คู่เบส และรูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างจากนครปฐม กาญจนบุรี และแคนาดาจะคล้ายกัน ดังรูปที่ 4.6

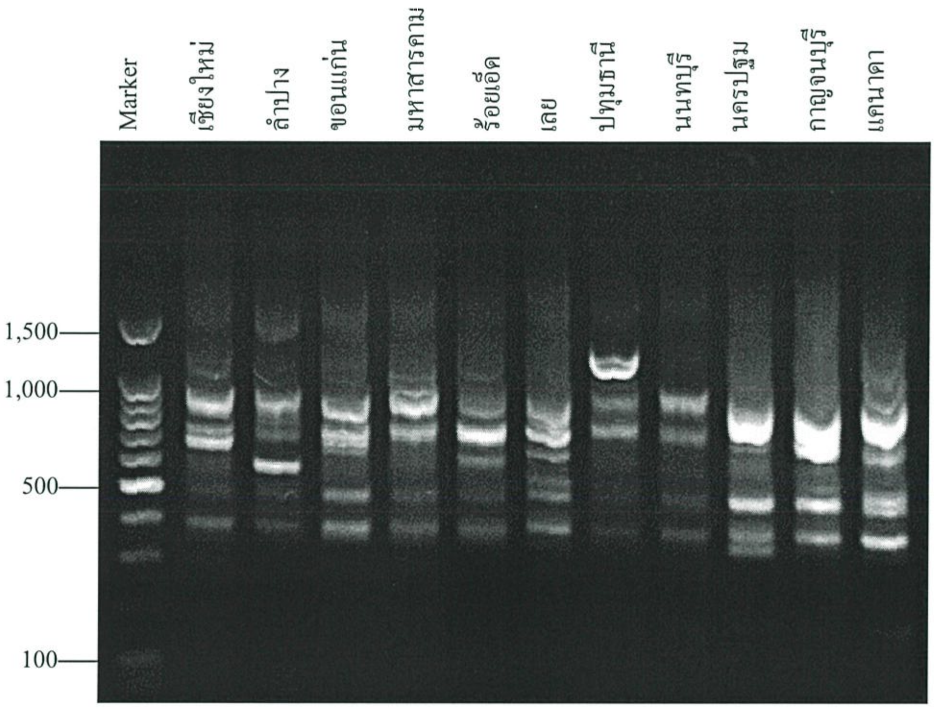


รูปที่ 4.5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-04 Marker คือ 100 bp ladder DNA



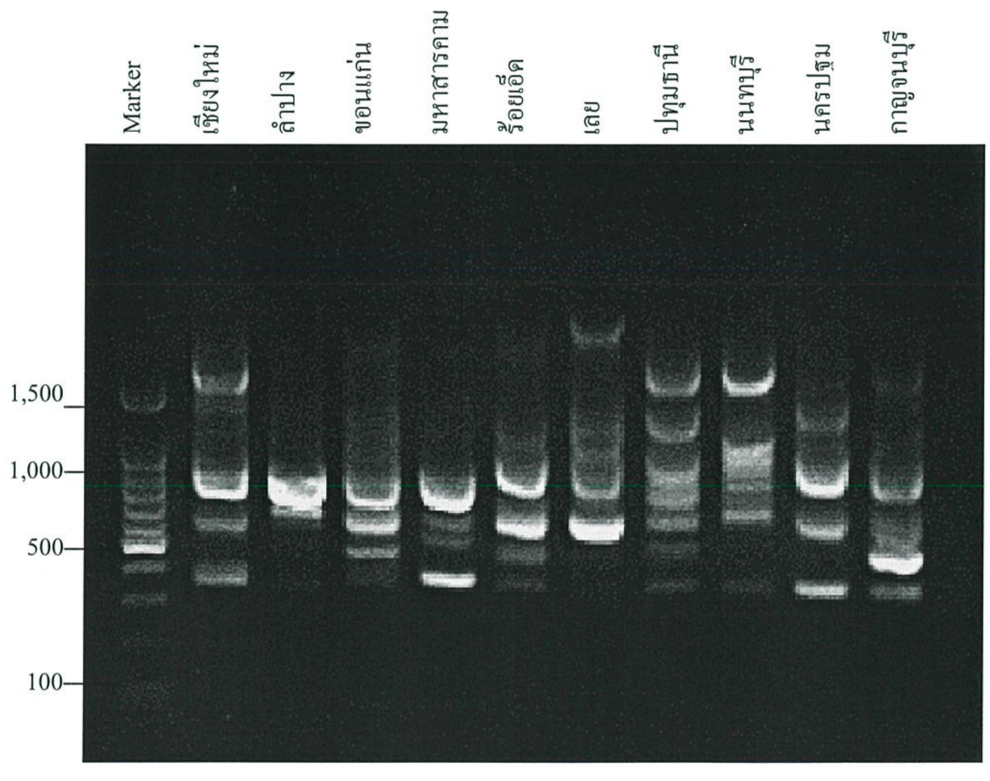
รูปที่ 4.6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-09 Marker คือ 100 bp ladder DNA

จากไพรเมอร์ B-01 พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างจากนครปฐม กาญจนบุรี และแคนาดาจะคล้ายกัน และสามารถแยกตัวอย่างจากปทุมธานี ลำปาง และนครปฐมออกจากตัวอย่างอื่นๆได้ด้วยแถบดีเอ็นเอขนาด 1122 570 และ 300 คู่เบส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสในตัวอย่างจากปทุมธานี และนนทบุรี แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างจากปทุมธานีและนนทบุรี แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส ในตัวอย่างจากเชียงใหม่ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม และแคนาดา และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430 และ 350 คู่เบสในทุกตัวอย่าง ดังรูปที่ 4.7



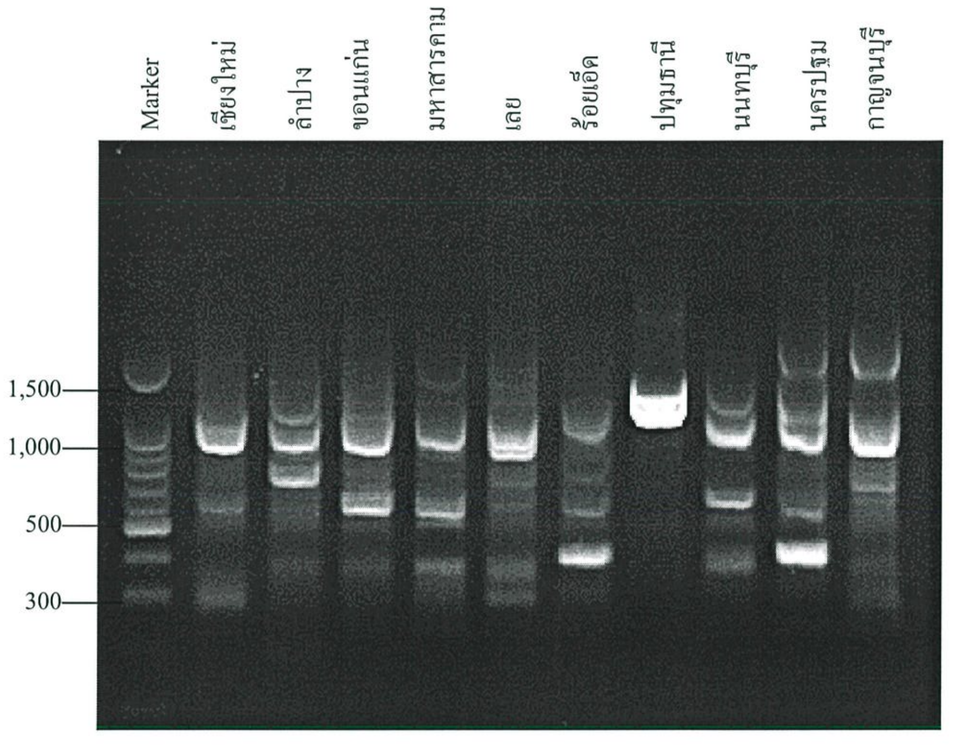
รูปที่ 4.7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B-01 Marker คือ 100 bp ladder DNA

ไพรเมอร์ B-04 สามารถแยกตัวอย่างจากเลยและปทุมธานีได้ด้วยแถบดีเอ็นเอเขนาด 2330 และ 924 คู่เบสตามลำดับ นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1700 คู่เบสในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐมและกาญจนบุรี แถบดีเอ็นเอ 1300 คู่เบสในตัวอย่างจากปทุมธานีและนครปฐม แถบดีเอ็นเอขนาด 1100 คู่เบสในตัวอย่างจากร้อยเอ็ดและนนทบุรี แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 คู่เบสในตัวอย่างจากร้อยเอ็ด นนทบุรี นครปฐม และกาญจนบุรี แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 780 คู่เบสในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ลำปาง ขอนแก่น มหาสารคาม และปทุมธานี แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบสในตัวอย่างจากลำปาง และนนทบุรี แถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด เลย และนครปฐม แถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบสในตัวอย่างจากขอนแก่น ร้อยเอ็ด และกาญจนบุรี และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 350 คู่เบสในทุกตัวอย่าง ดังรูปที่ 4.8



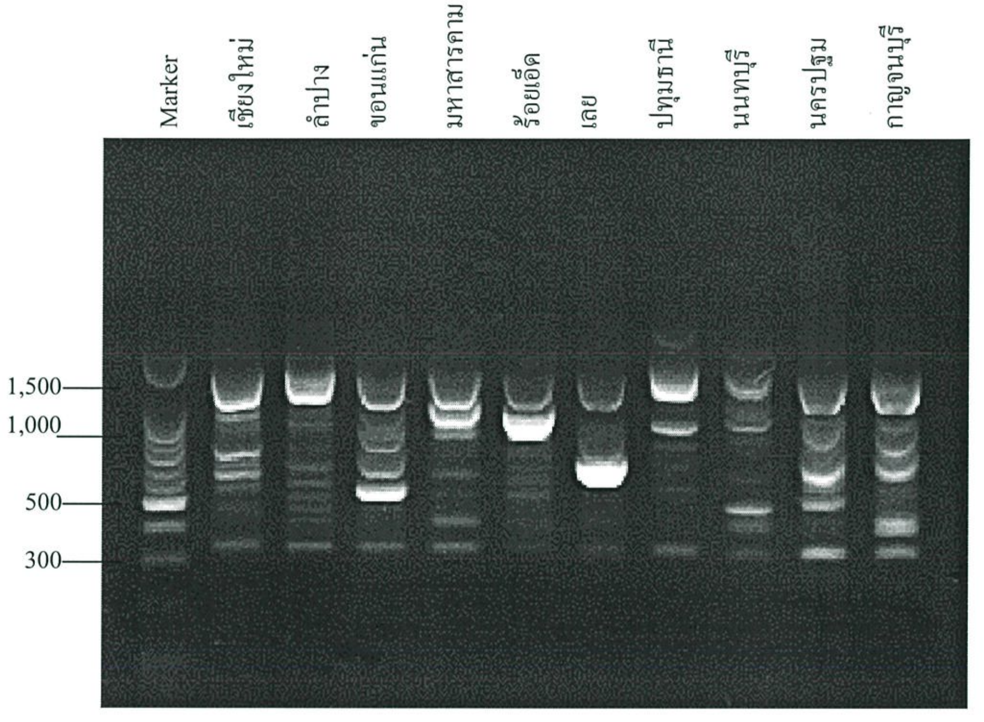
รูปที่ 4.8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B-04 Marker คือ 100 bp ladder DNA

จากไพรเมอร์ C-01 พบว่า รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างหนอนใยผักจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือยกเว้นร้อยเอ็ดจะคล้ายกัน และสามารถเพิ่มปริมาณได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1200 คู่เบสในตัวอย่างจากปทุมธานี นนทบุรี และนครปฐม แถบดีเอ็นเอขนาด 990 คู่เบสในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างจากปทุมธานีและนนทบุรี แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1080 คู่เบสในตัวอย่างจากร้อยเอ็ด และนนทบุรี แถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบสในทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างจากปทุมธานี นนทบุรี และนครปฐม และแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสในตัวอย่างจากร้อยเอ็ดและนครปฐม ดังรูปที่ 4.9



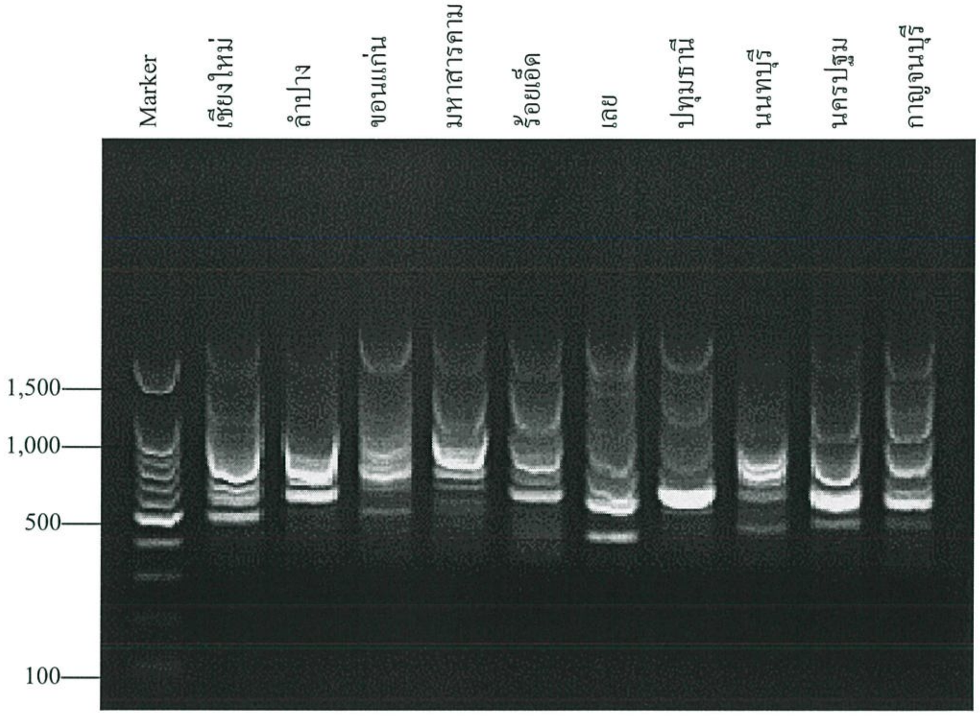
รูปที่ 4.9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C-01 Marker คือ 100 bp ladder DNA

ไพรเมอร์ C-04 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1380 คู่เบสในตัวอย่างจากปทุมธานี และนนทบุรี แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1260 คู่เบสในทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างจากปทุมธานีและนนทบุรี ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ C-04 Marker คือ 100 bp ladder DNA

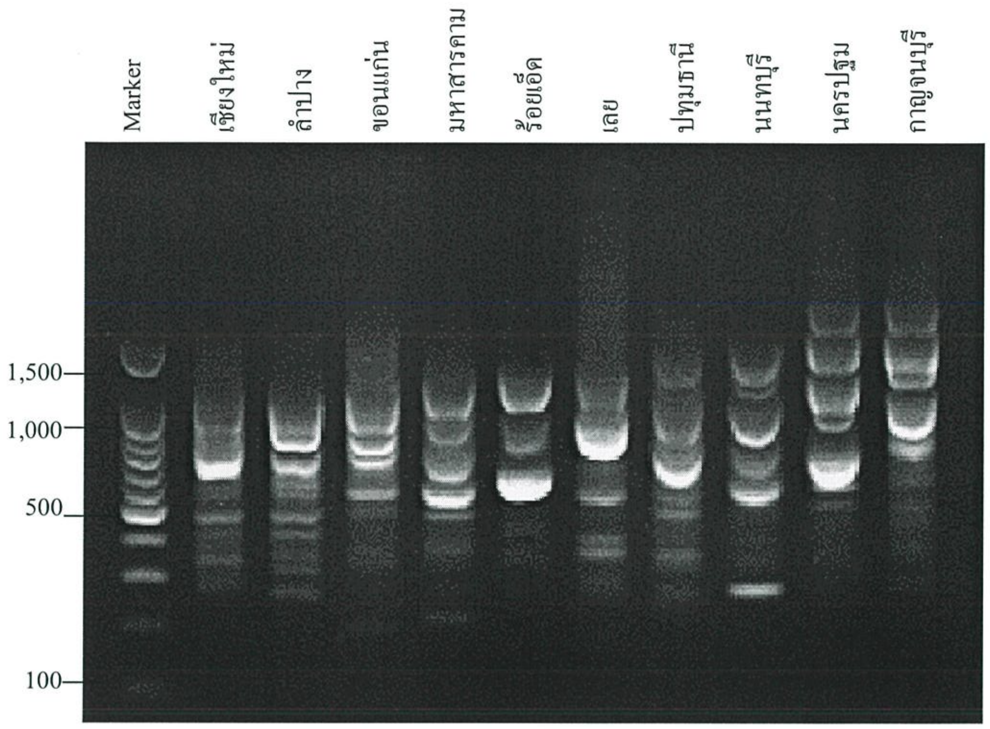
ไพรเมอร์ 563 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาด 890 คู่เบสในตัวอย่างจากขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด เลย นครปฐม และกาญจนบุรี แถบดีเอ็นเอขนาด 790 คู่เบสในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างจากเลย ปทุมธานี และนนทบุรี และแถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างจากขอนแก่น และมหาสารคาม ดังรูปที่ 4.11



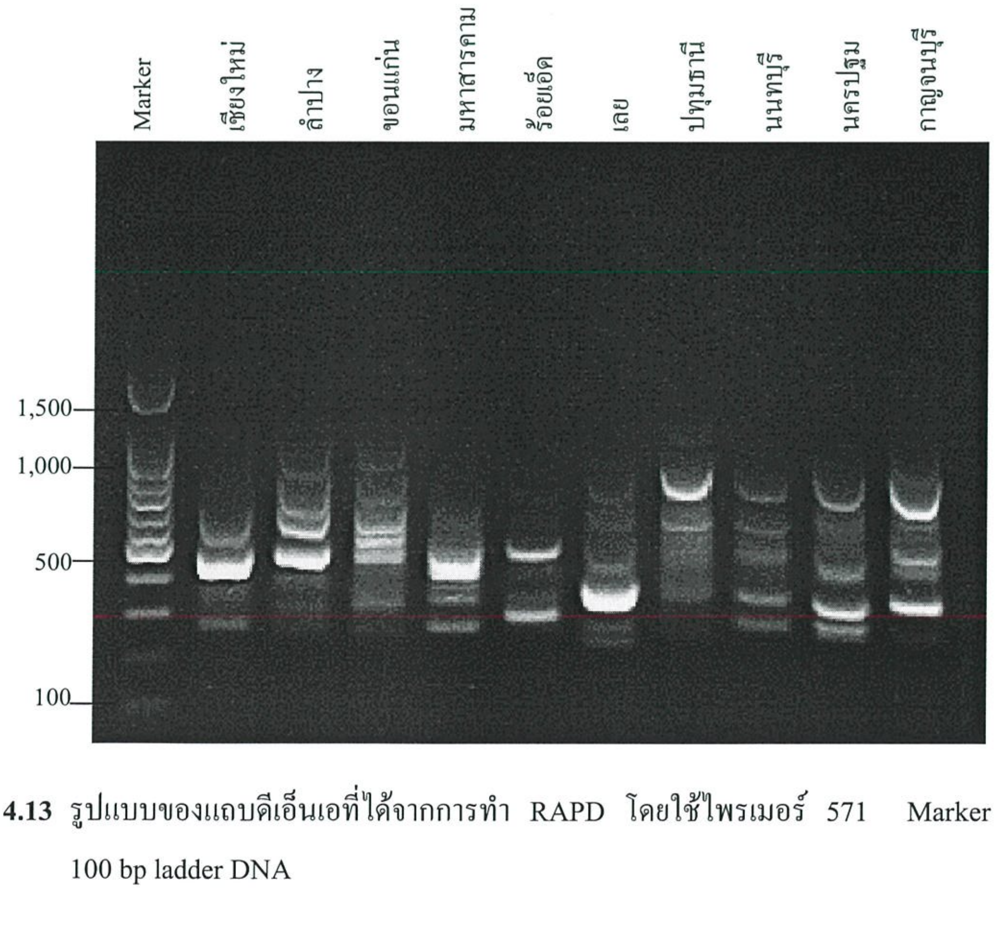
รูปที่ 4.11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 563 Marker คือ 100 bp ladder DNA

ไพรเมอร์ 570 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1800 และ 1540 คู่เบสในตัวอย่างจากนครปฐม และกาญจนบุรี แถบดีเอ็นเอขนาด 1150 คู่เบสในตัวอย่างจากมหาสารคามและนครปฐม แถบดีเอ็นเอขนาด 910 คู่เบสในตัวอย่างจากลำปาง ร้อยเอ็ด และเลย และแถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบสในตัวอย่างจากเชียงใหม่ ลำปาง มหาสารคาม ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม และกาญจนบุรี ดังรูปที่ 4.12

ไพรเมอร์ 571 สามารถแยกตัวอย่างหนอนใยผักจากเชียงใหม่และร้อยเอ็ดออกจากตัวอย่างอื่นได้ด้วยแถบดีเอ็นเอขนาด 420 และ 300 คู่เบส นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส ในตัวอย่างจากลำปาง ขอนแก่น ร้อยเอ็ด นนทบุรี และกาญจนบุรี และแถบดีเอ็นเอขนาด 320 คู่เบสในตัวอย่างจากเลย นนทบุรี และกาญจนบุรี ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 570 Marker คือ 100 bp ladder DNA



รูปที่ 4.13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 571 Marker คือ 100 bp ladder DNA

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างหนอนใยผักในประเทศไทยกับแคนาดาโดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 พบว่า รูปแบบแถบดีเอ็นเอของหนอนใยผักจากแคนาดาจะไม่แตกต่างจากหนอนใยผักในประเทศไทย ซึ่งจากรูปที่ 4.3-4.7 จะพบว่าหนอนใยผักจากแคนาดาจะมีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับหนอนใยผักในประเทศไทย โดยเฉพาะจากนครปฐมและกาญจนบุรี และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนอนใยผักในประเทศไทยด้วยกัน จะพบว่า ไพรเมอร์ชุดที่ 1 จะไม่สามารถแยกตัวอย่างหนอนใยผักจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือออกจากกันได้ โดยจะมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกัน (รูปที่ 4.3-4.7) ในขณะที่รูปแบบแถบดีเอ็นเอของหนอนใยผักจากภาคกลางจะสามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุดด้วยไพรเมอร์ A-04 (รูปที่ 4.5) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 2 พบว่า ไพรเมอร์ B-04 C-01 570 และ 571 ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกหนอนใยผักแต่ละจังหวัดออกจากกันได้ ซึ่งจะแสดงถึงความผันแปรทางพันธุกรรมของหนอนใยผักจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้สามารถแยกตัวอย่างหนอนใยผักจากบางพื้นที่ออกจากตัวอย่างอื่นได้ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ตัวอย่างหนอนใยผักจากปทุมธานีสามารถแยกได้ด้วยไพรเมอร์หลายชนิด คือ A-02 A-04 A-09 B-01 และ B-04 ตัวอย่างจากเชียงใหม่แยกได้ด้วยไพรเมอร์ 571 ตัวอย่างจากเลยแยกได้ด้วยไพรเมอร์ B-04 ตัวอย่างจากลำปางแยกได้ด้วยไพรเมอร์ B-01 ตัวอย่างจากร้อยเอ็ดแยกได้ด้วยไพรเมอร์ 571 และตัวอย่างจากกาญจนบุรีแยกได้ด้วยไพรเมอร์ A-02

4.3 การวิเคราะห์ผลแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

จากการนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ RAPD แล้วเปลี่ยนข้อมูลเป็นรหัสเลขฐานสอง (binary) คือ 1 และ 0 ซึ่งแสดงถึงการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอตามลำดับ จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม RESTDIST ซึ่งผลการทดลองจะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เป็นข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเปรียบเทียบหนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในประเทศไทยกับหนอนใยผักจากแคนาดา โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 (12 ชนิด) ซึ่งบันทึกแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 54 แถบ สามารถคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมได้ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.0023-0.0115 และส่วนที่ 2 เป็นข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเปรียบเทียบหนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในประเทศไทยด้วยกัน โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด (22 ชนิด) บันทึกแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 96 แถบ คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมได้ดังตารางที่ 4.3 และมีค่าอยู่ในช่วง 0.0036-0.0165 จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมในตารางที่ 4.2 และ 4.3 นำไปวิเคราะห์แบบรวมกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR จะได้เดนโดรแกรมดังรูปที่ 4.14 และ 4.15

เมื่อเปรียบเทียบแบบจับคู่โดยใช้ค่าดัชนีความคล้ายคลึงกัน (similarity index) ซึ่งถ้ามีค่าดัชนีความคล้ายคลึงมาก แสดงว่า ตัวอย่างคู่นั้นๆ มีความใกล้ชิดกันมาก จากตารางที่ 4.2 จะมีค่าดัชนี

ความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 0.9885 – 0.9977 โดยค่าที่น้อยที่สุดเป็นค่าระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักจากเลยกับปทุมธานี แสดงถึงความห่างไกลกันมากที่สุด และค่าดัชนีความคล้ายคลึงที่มากที่สุดเป็นค่าระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักจากเชียงใหม่กับมหาสารคาม แสดงถึงความใกล้ชิดกันมากที่สุด และพบว่า ตัวอย่างจากลำปางจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากเชียงใหม่มากที่สุด ด้วยค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9969 ตัวอย่างจากขอนแก่นจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากมหาสารคามมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9970 ตัวอย่างจากร้อยเอ็ดจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากมหาสารคามมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9974 ตัวอย่างจากเลยจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากกาญจนบุรีมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9959 สำหรับตัวอย่างจากปทุมธานีจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากนนทบุรีมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9929 ตัวอย่างจากนนทบุรีจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากเชียงใหม่มากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9956 ตัวอย่างจากนครปฐมจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากแคนาดามากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9967 ตัวอย่างจากกาญจนบุรีจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากเลยมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9959 และตัวอย่างจากแคนาดาจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากนครปฐมมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9967 เมื่อนำค่าจากการเปรียบเทียบแบบจับคู่เหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับเดนโดรแกรมในรูปที่ 4.13 พบว่า ตัวอย่างแต่ละคู่ส่วนใหญ่จะสอดคล้องกับเดนโดรแกรมที่ได้ ยกเว้นตัวอย่างจากลำปางจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากขอนแก่น ตัวอย่างจากขอนแก่นจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากร้อยเอ็ด ตัวอย่างจากปทุมธานีจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากเลย และตัวอย่างจากนนทบุรีจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากลำปาง

จากเดนโดรแกรมในรูปที่ 4.14 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบหนอนใยผักในประเทศไทยกับประเทศแคนาดา จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างหนอนใยผักจากปทุมธานี ซึ่งอยู่ห่างจากตัวอย่างอื่นมากที่สุด กลุ่มที่ 2 จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากเลย และกาญจนบุรี และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากนครปฐม และแคนาดา และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากนนทบุรี ลำปาง ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และเชียงใหม่ ซึ่งตัวอย่างหนอนใยผักจากเชียงใหม่จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตัวอย่างหนอนใยผักจากมหาสารคามมากที่สุด รองลงมาคือตัวอย่างหนอนใยผักจากร้อยเอ็ด ขอนแก่น และลำปางตามลำดับ จากเดนโดรแกรมแสดงว่าตัวอย่างหนอนใยผักจากแคนาดาจะถูกจัดให้อยู่กลุ่มเดียวกับตัวอย่างหนอนใยผักจากกาญจนบุรีและนครปฐมสอดคล้องกับรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้

จากตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบแบบจับคู่โดยใช้ค่าดัชนีความคล้ายคลึงกัน จะมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 0.9835 – 0.9964 โดยค่าที่น้อยที่สุดเป็นค่าระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักจากเลยกับปทุมธานี และค่าดัชนีความคล้ายคลึงที่มากที่สุดเป็นค่าระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักจากเชียงใหม่กับมหาสารคาม และพบว่า ตัวอย่างหนอนใยผักจากเชียงใหม่จะใกล้ชิดกับตัวอย่างจาก

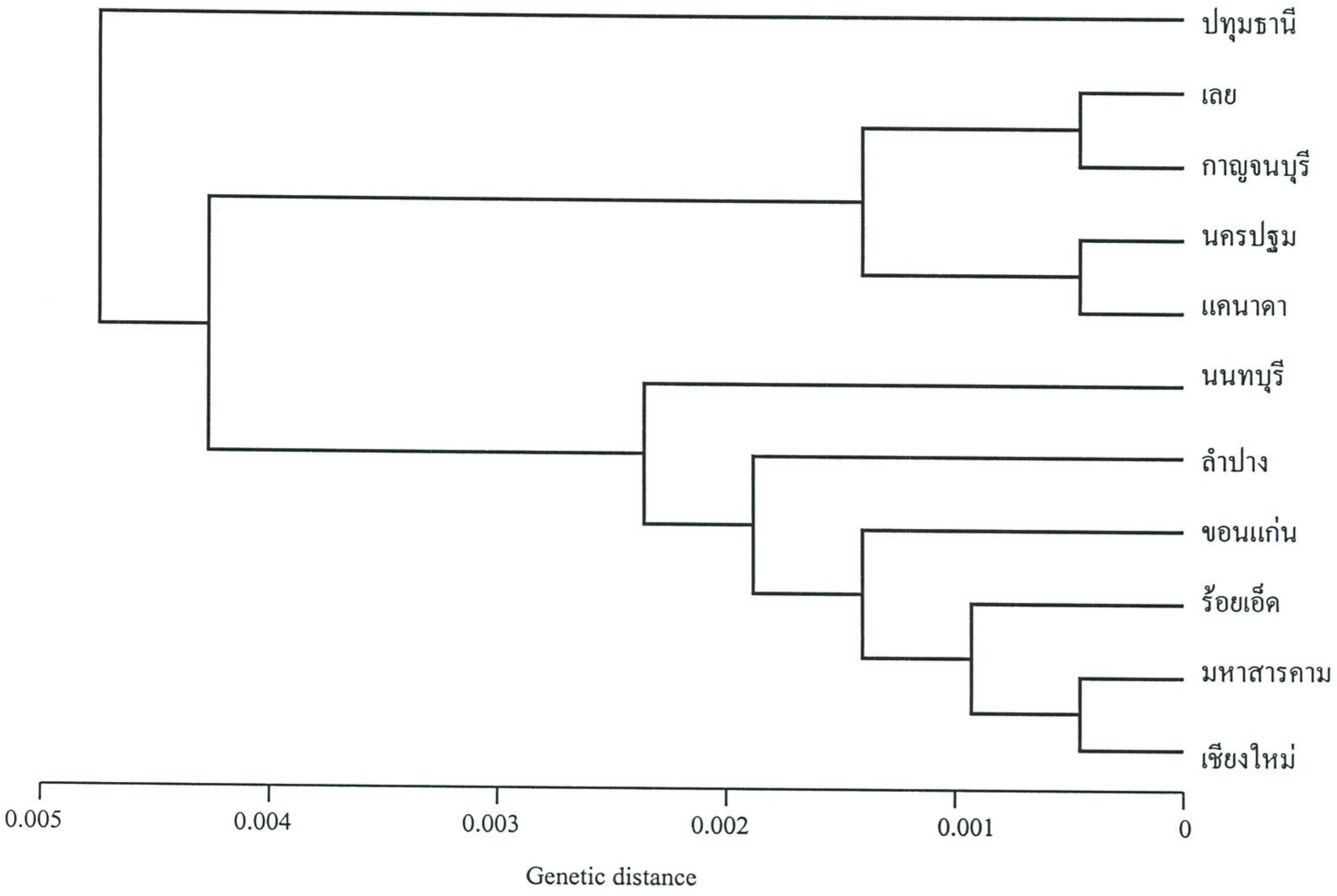
มหาสารคามมากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9964 สำหรับตัวอย่างจากลำปางจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากเชียงใหม่มากที่สุด ด้วยค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9954 ตัวอย่างจากขอนแก่นจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากมหาสารคามมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9962 ตัวอย่างจากมหาสารคามจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากเชียงใหม่มากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9964 สำหรับตัวอย่างจากร้อยเอ็ดจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากขอนแก่นมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9948 ตัวอย่างจากเลยจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากกาญจนบุรีมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9948 ตัวอย่างจากปทุมธานีและนนทบุรีจะใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9927 และตัวอย่างจากนครปฐมและกาญจนบุรีจะใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.9956 เมื่อนำค่าจากการเปรียบเทียบแบบจับคู่เหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับเดนโดรแกรมในรูปที่ 4.14 พบว่า ตัวอย่างแต่ละคู่ส่วนใหญ่จะสอดคล้องกับเดนโดรแกรมที่ได้ ยกเว้นตัวอย่างจากลำปางจะใกล้ชิดกับขอนแก่น ตัวอย่างจากร้อยเอ็ดจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากเลย และตัวอย่างจากเลยจะใกล้ชิดกับตัวอย่างจากร้อยเอ็ด

สำหรับเดนโดรแกรมในรูปที่ 4.15 แสดงการจัดกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในประเทศไทย จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากลำปาง ขอนแก่น มหาสารคาม และเชียงใหม่ โดยตัวอย่างหนอนใยผักจากเชียงใหม่จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตัวอย่างหนอนใยผักจากมหาสารคามมากที่สุด รองลงมา คือ ขอนแก่น และลำปาง ตามลำดับ และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากเลย และร้อยเอ็ด กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากกาญจนบุรีและนครปฐม และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากนนทบุรีและปทุมธานี

เมื่อเปรียบเทียบเดนโดรแกรมทั้ง 2 รูปแล้ว พบว่า เดนโดรแกรมทั้งสองจะคล้ายกัน โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และอีกกลุ่มหนึ่ง คือ ตัวอย่างหนอนใยผักจากภาคกลาง แสดงว่าตัวอย่างหนอนใยผักจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความสัมพันธ์กันมากกว่าตัวอย่างหนอนใยผักจากภาคกลาง

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า similarity index (ด้านบน) และ genetic distance (ด้านล่าง) จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือนของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ของหนอนใยผัก 11 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 (12 ชนิด)

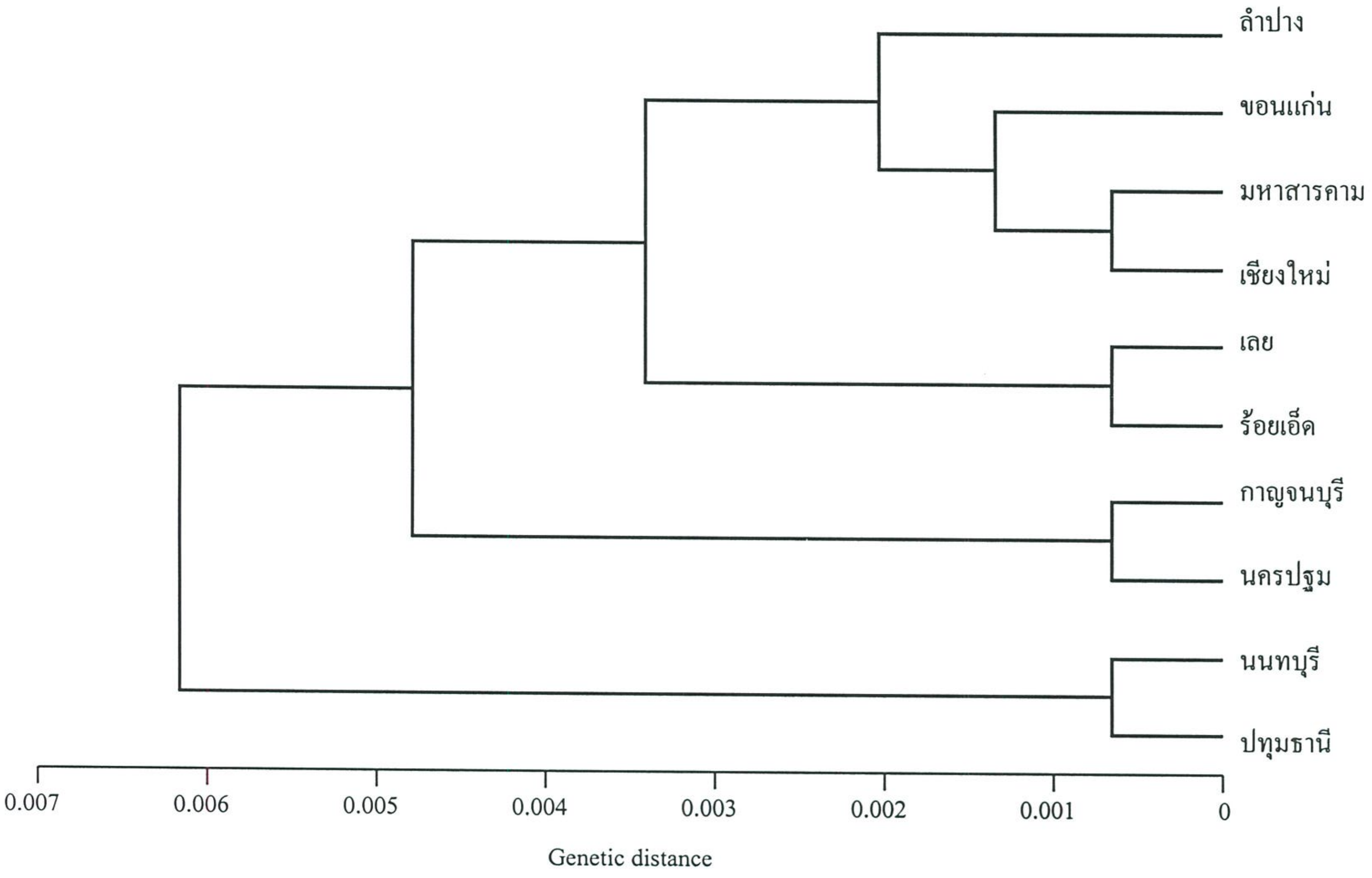
	เชียงใหม่	ลำปาง	ขอนแก่น	มหาสารคาม	ร้อยเอ็ด	เลย	ปทุมธานี	นนทบุรี	นครปฐม	กาญจนบุรี	แคนาดา
เชียงใหม่	-	0.9969	0.9969	0.9977	0.9973	0.9929	0.9911	0.9956	0.9909	0.9911	0.9936
ลำปาง	0.0031	-	0.9962	0.9962	0.9965	0.9923	0.9904	0.9948	0.9913	0.9916	0.9908
ขอนแก่น	0.0031	0.0038	-	0.9970	0.9965	0.9933	0.9892	0.9948	0.9923	0.9926	0.9919
มหาสารคาม	0.0023	0.0038	0.0030	-	0.9974	0.9923	0.9904	0.9948	0.9923	0.9926	0.9908
ร้อยเอ็ด	0.0027	0.0035	0.0035	0.0026	-	0.9945	0.9908	0.9952	0.9926	0.9919	0.9922
เลย	0.0071	0.0077	0.0067	0.0077	0.0055	-	0.9885	0.9890	0.9940	0.9959	0.9938
ปทุมธานี	0.0089	0.0096	0.0108	0.0096	0.0092	0.0115	-	0.9929	0.9908	0.9899	0.9923
นนทบุรี	0.0044	0.0052	0.0052	0.0052	0.0048	0.0110	0.0071	-	0.9916	0.9894	0.9933
นครปฐม	0.0091	0.0087	0.0077	0.0077	0.0074	0.0060	0.0092	0.0084	-	0.9958	0.9967
กาญจนบุรี	0.0089	0.0084	0.0074	0.0074	0.0081	0.0041	0.0101	0.0106	0.0042	-	0.9941
แคนาดา	0.0064	0.0092	0.0081	0.0092	0.0078	0.0062	0.0077	0.0067	0.0033	0.0059	-



รูปที่ 4.14 เดนโดรแกรมการจัดกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในประเทศไทยและแคนาดาด้วยวิธี UPGMA จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 (12 ชนิด) ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR ใน PHYLIP version 3.6c

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า similarity index (ด้านบน) และ genetic distance (ด้านล่าง) จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือนของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ของหนอนใยผัก 10 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด (22 ชนิด)

	เชียงใหม่	ลำปาง	ขอนแก่น	มหาสารคาม	ร้อยเอ็ด	เลย	ปทุมธานี	นนทบุรี	นครปฐม	กาญจนบุรี
เชียงใหม่	-	0.9954	0.9950	0.9964	0.9944	0.9920	0.9892	0.9914	0.9907	0.9909
ลำปาง	0.0046	-	0.9951	0.9947	0.9934	0.9909	0.9878	0.9917	0.9896	0.9912
ขอนแก่น	0.0050	0.0049	-	0.9962	0.9948	0.9925	0.9851	0.9893	0.9898	0.9914
มหาสารคาม	0.0036	0.0053	0.0038	-	0.9938	0.9913	0.9883	0.9905	0.9914	0.9909
ร้อยเอ็ด	0.0056	0.0066	0.0052	0.0062	-	0.9945	0.9839	0.9899	0.9915	0.9917
เลย	0.0080	0.0091	0.0075	0.0087	0.0055	-	0.9835	0.9845	0.9929	0.9948
ปทุมธานี	0.0108	0.0122	0.0149	0.0117	0.0161	0.0165	-	0.9927	0.9886	0.9860
นนทบุรี	0.0086	0.0083	0.0107	0.0095	0.0101	0.0155	0.0073	-	0.9880	0.9871
นครปฐม	0.0093	0.0104	0.0102	0.0086	0.0085	0.0071	0.0114	0.0120	-	0.9956
กาญจนบุรี	0.0091	0.0088	0.0086	0.0091	0.0083	0.0052	0.0104	0.0129	0.0044	-



รูปที่ 4.15 เดนโดรแกรมการจัดกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักจาก 10 จังหวัดในประเทศไทยด้วยวิธี UPGMA จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด (22 ชนิด) ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR ใน PHYLIP version 3.6c

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอของหนอนใยผักด้วยวิธี Lifton ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Haymer *et. al.* (1992) สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีคุณภาพดี และมีปริมาณเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณหลายปฏิกิริยาจากการสกัดในแต่ละครั้ง

ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ และมีลำดับที่ไม่เจาะจงทั้งหมด 22 ชนิด จะสร้างแถบดีเอ็นเอทั้งที่เป็น monomorphic และ polymorphic โดยคัดเลือกจากรายงานของ Thongphak (1997) Haymer (1994) และ Heckel *et. al.* (1995) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงและทำให้เกิดลักษณะโพลีมอร์ฟีซึมด้วยวิธี RAPD ซึ่งรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จะแตกต่างและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic มีทั้งที่มากกว่าและน้อยกว่าในเอกสารอ้างอิง เป็นผลมาจากตัวอย่างแมลงและสภาวะของการทดลองที่แตกต่างกัน ไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้อาจจะไม่เหมาะสมต่อการศึกษาพันธุกรรมของหนอนใยผัก ดังนั้นจึงควรมีการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการศึกษาให้ได้จำนวนมากกว่านี้ โดยทำการคัดเลือกจากไพรเมอร์จำนวนมากกว่า 100 ชนิด เพื่อให้ได้ความน่าเชื่อถือมากที่สุด (Naber *et. al.* 2000, Schreiber *et. al.* 1997 และ Biron *et. al.* 2000)

ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic ที่แสดงถึงความแตกต่างของหนอนใยผักได้อย่างชัดเจน มี 11 ชนิด คือ A-01 A-02 A-04 A-09 B-01 B-04 C-01 C-04 563 570 และ 571 โดยไพรเมอร์เหล่านี้สามารถแยกตัวอย่างหนอนใยผักในบางพื้นที่ได้ คือ ไพรเมอร์ A-02 A-04 A-09 B-01 และ B-04 สามารถแยกตัวอย่างหนอนใยผักจากปทุมธานีได้ ไพรเมอร์ 571 สามารถแยกตัวอย่างจากเชียงใหม่และร้อยเอ็ดได้ สำหรับตัวอย่างจากเลยแยกได้ด้วยไพรเมอร์ B-04 ตัวอย่างจากลำปางแยกได้ด้วยไพรเมอร์ B-01 และตัวอย่างจากกาญจนบุรีแยกได้ด้วยไพรเมอร์ A-02

แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างหนอนใยผักในประเทศไทยกับแคนาดา โดยใช้ไพรเมอร์ 12 ชนิด ทั้งหมด 54 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างหนอนใยผักในประเทศไทยด้วยกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 22 ชนิด ทั้งหมด 96 แถบ นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR จะได้เดนโดรแกรม 2 เดนโดรแกรม โดยเดนโดรแกรมแรก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างหนอนใยผักจากปทุมธานี กลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากเลย และกาญจนบุรี และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างหนอนใยผักจากนครปฐม และแคนาดา และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผัก

จากนนทบุรี ลำปาง ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และเชียงใหม่ และเดนโดรแกรมที่ 2 แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากลำปาง ขอนแก่น มหาสารคาม และเชียงใหม่ และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากเลย และร้อยเอ็ด กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากกาญจนบุรี และนครปฐม และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ตัวอย่างหนอนใยผักจากนนทบุรีและปทุมธานี

เดนโดรแกรมทั้งสองเดนโดรแกรมจะแบ่งกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักได้ใกล้เคียงกัน โดยจะจัดให้กลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่กลุ่มเดียวกัน และแยกจากกลุ่มภาคกลาง แต่มีข้อแตกต่าง คือ เดนโดรแกรมแรกที่สร้างจากข้อมูลไพรเมอร์ 12 ชนิด จะจัดให้ตัวอย่างจากปทุมธานีเป็นกลุ่มที่อยู่ห่างจากตัวอย่างอื่นมากที่สุด และอยู่ห่างจากตัวอย่างจากนนทบุรีซึ่งเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ติดกัน สรุปได้ว่าเดนโดรแกรมแรกจะจัดกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักไม่สอดคล้องกับแหล่งกำเนิด และเมื่อใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ 22 ชนิด มาสร้างเป็นเดนโดรแกรมที่ 2 จะเห็นได้ว่า ไม่มีตัวอย่างใดที่ถูกจัดให้อยู่ห่างจากตัวอย่างอื่น และแบ่งเป็นกลุ่มที่แสดงความสัมพันธ์ได้ถึง 4 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจัดให้ตัวอย่างหนอนใยผักจากภาคเหนือ คือ ลำปาง และเชียงใหม่ อยู่กับตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ ขอนแก่นและมหาสารคาม ซึ่งคาดว่า ถ้ามีการใช้ไพรเมอร์เพิ่มมากขึ้น อาจจะทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ชัดเจนขึ้น นอกจากนี้เดนโดรแกรมยังจัดให้ตัวอย่างหนอนใยผักจากเลยมีความสัมพันธ์กับตัวอย่างจากร้อยเอ็ด ตัวอย่างจากกาญจนบุรีมีความสัมพันธ์กับตัวอย่างจากนครปฐม และตัวอย่างจากนนทบุรีมีความสัมพันธ์กับตัวอย่างจากปทุมธานี แสดงให้เห็นว่า เดนโดรแกรมที่ 2 จะแบ่งกลุ่มหนอนใยผักได้สอดคล้องกับแหล่งกำเนิด และการใช้ไพรเมอร์ 22 ชนิดจะแบ่งกลุ่มตัวอย่างหนอนใยผักได้ชัดเจนกว่าการใช้ไพรเมอร์เพียง 12 ชนิด สำหรับตัวอย่างหนอนใยผักจากแคนาดาที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับตัวอย่างจากนครปฐมและกาญจนบุรีในเดนโดรแกรมแรกนั้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเดนโดรแกรมที่ 2 แล้ว คาดว่าถ้ามีการวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์เพิ่มขึ้น ก็อาจแยกตัวอย่างหนอนใยผักจากแคนาดาออกจากตัวอย่างหนอนใยผักในประเทศไทยได้

การเปรียบเทียบแบบจับคู่ โดยใช้ค่าดัชนีความคล้ายคลึงกันและเปรียบเทียบกับเดนโดรแกรมที่ได้ พบว่า โดยส่วนใหญ่ตัวอย่างแต่ละคู่จะมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงกันสอดคล้องกับเดนโดรแกรม ค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักจากประเทศไทยกับแคนาดาจะอยู่ในช่วง 0.9885 – 0.9977 และค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่างหนอนใยผักในประเทศไทยอยู่ในช่วง 0.9835 – 0.9964 ซึ่งค่าที่น้อยที่สุดเป็นค่าระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักจากเลยกับปทุมธานี และค่าที่มากที่สุดเป็นค่าระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักจากเชียงใหม่กับมหาสารคาม และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างหนอนใยผักจากประเทศไทยกับแคนาดา อยู่ในช่วง 0.0023-

0.0115 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างหนอนใยผักในประเทศไทย อยู่ในช่วง 0.0036-0.0165

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า ตัวอย่างหนอนใยผักจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทยจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก แสดงถึงความผันแปรทางพันธุกรรมที่น้อย สอดคล้องกับการทดลองของ Caprio and Tabashnik (1992) ที่พบความผันแปรเพียงเล็กน้อยระหว่างประชากรหนอนใยผักจากฮาวายและสหรัฐอเมริกาจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอัลโลไซม์อิเล็กโทรโฟรีซีส และเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์แมลงอื่นๆ พบว่า ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD ในแมลงสปีชีส์อื่นๆ ที่ถูกแบ่งแยกตามลักษณะภูมิประเทศ เช่น ยุง (Wilkerson *et. al.* 1995) แมลงวันผลไม้ (Sonvico *et al.* 1996) แตนเบียน (Landry *et. al.* 1993) และ ด้วงเจาะลำต้น Williams (*et. al.* 1994) เป็นต้น จะเห็นได้ชัดเจนกว่าในหนอนใยผัก

ข้อจำกัดหลักของเทคนิค RAPD คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic ไม่เพียงพอต่อการจำแนกหนอนใยผักที่มีความใกล้ชิดกันมากๆ ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้โดยการใช้ไพรเมอร์จำนวนมากขึ้น และสามารถใช้ได้โดยไม่จำกัดจำนวน การใช้ไพรเมอร์จำนวนมากๆจะทำให้จำแนกหนอนใยผักได้ชัดเจนขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Heckel *et. al.* (1995) ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างหนอนใยผักสายพันธุ์ฮาวายที่ต้านทานและไม่ต้านทาน *Bacillus thuringiensis* โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 117 ชนิด คัดเลือกได้ 84 ชนิด ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ 594 แถบ ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์สำหรับความต้านทานหรือความสัมพันธ์อื่น และในงานวิจัยนี้ ตัวอย่างหนอนใยผักจากแคนาดาที่ใช้มีปริมาณน้อยเกินไป ทำให้ผลที่ได้ คือ ตัวอย่างจากแคนาดารวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับตัวอย่างหนอนใยผักในประเทศไทย ดังนั้นจึงควรใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณมากกว่านี้ เพื่อยืนยันความถูกต้องในการจำแนก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chang *et. al.* (1997) ที่ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างหนอนใยผัก 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ฮาวาย 4 สายพันธุ์ สายพันธุ์ฟิลิปปินส์ และสายพันธุ์เพนซิลเวเนีย โดยใช้ mitochondrial gene ที่แปลรหัสได้ cytochrome oxidase I (COI) พบว่า การวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยและเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานาน อาจทำให้ความผันแปรทางพันธุกรรมลดลง และความผันแปรทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง COI จะน้อยกว่าที่วิเคราะห์ด้วย RAPD และโปรตีนอิเล็กโทรโฟรีซิส นอกจากนี้ควรสุ่มพื้นที่เก็บตัวอย่างเพิ่มเติม เช่น ในบริเวณจังหวัดเพชรบูรณ์ เพชรบุรี และราชบุรี ที่มีการระบาดของหนอนใยผัก

เนื่องจากหนอนใยผักมีขนาดเล็ก จึงจำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลจากดีเอ็นเอปริมาณน้อยได้ เช่น เทคนิค PCR ซึ่งเทคนิคอื่นๆ จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอและไพรเมอร์ก่อน แต่วิธี RAPD ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอก่อน และไพรเมอร์ของ RAPD จำนวนหลายร้อยไพรเมอร์เป็นชุดสากลที่สามารถหาซื้อได้ง่าย เครื่องหมาย RAPD แต่ละเครื่องหมายเป็น sequence tagged site ซึ่งสามารถทำการย้ายข้อมูลในงานวิจัยที่ทำร่วมกับผู้อื่น

ได้ง่าย ซึ่งถือเป็นข้อดี ส่วนข้อเสีย คือ เครื่องหมาย RAPD เป็น dominant marker ซึ่งใช้ตรวจสอบพวก homozygote เท่านั้น ดังนั้น จึงอาจใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น RFLP microsatellite และ minisatellite ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบพวก heterozygote และใช้ศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบกันในกรณีที่ตัวอย่างมีความใกล้ชิดกันมากๆ หรือมีความแตกต่างกันของยีนเพียงไม่กี่ตำแหน่ง ซึ่งจะตรวจสอบด้วยวิธี RAPD ได้ยาก เพราะโอกาสที่จะพบไพรเมอร์ที่แสดงลักษณะโพลีมอร์ฟิซึมเป็นไปได้น้อยมาก (พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538) เครื่องหมาย RAPD เหมาะแก่การทำแผนที่ทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาสายพันธุ์พืชและสัตว์ และเพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากร (Williams *et. al.* 1990) การทำ PCR จะไวต่อการปนเปื้อน จึงจำเป็นต้องตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยการทำ negative control ควรทำการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ก่อนใช้ด้วย autoclave หรือฉายแสงอัลตราไวโอเลต และสวมถุงมือระหว่างทำการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม nonidet P-40 สามารถช่วยลดปัญหาของตัวยับยั้ง (inhibitor) ในส่วนผสม PCR ได้ด้วย (Pornkuwat *et. al.* 1998) เทคนิค RAPD ค่อนข้างไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะในการทำ PCR บ่อยครั้งจะพบว่า เมื่อมีการเปลี่ยนอุณหภูมิ เวลาในแต่ละขั้นตอน หรือเครื่อง thermal cycler ต่างชนิดกัน แถบดีเอ็นเอที่ได้จะไม่เหมือนกัน ดังนั้นการทำ PCR แต่ละครั้ง จำเป็นต้องใช้สภาวะที่เป็นมาตรฐาน (Hallden *et. al.* 1996)

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ ได้ใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งตามหลักการแล้วเป็นไปได้ที่ไพรเมอร์สั้นๆ ซึ่งมีบริเวณเป้าหมายในการเกาะสั้น จะมีความถี่ในการเข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบมากกว่าและสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้มากกว่าไพรเมอร์ที่มีความยาวยาวกว่า แต่จากรายงานของ MacPherson *et. al.* (1993) พบว่า ไพรเมอร์ความยาว 20 นิวคลีโอไทด์ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้มากกว่าไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นงานวิจัยในอนาคต จึงอาจมีการทดลองนำไพรเมอร์ความยาว 20 นิวคลีโอไทด์ มาทดลองใช้วิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบดูความแตกต่างที่เกิดขึ้น หรือตรวจสอบตัวอย่างของสายพันธุ์ต่างๆ จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ เช่น its (internal spacer) หรือ igs (intergenic spacer) ของยีน rRNA หรือหาแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อแต่ละตัวอย่าง ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และหาไพรเมอร์เฉพาะตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้ผลการตรวจมีความถูกต้องแม่นยำและสามารถใช้บ่งชี้หนอนใยผักในแต่ละพื้นที่ได้

บรรณานุกรม

จริยา จันทร์ไพแสง และวินัย รัชตปกรณ์ชัย. 2539. "ใช้บีที (BT) กำจัดแมลงศัตรูพืช." **ข่าวงานวิจัยและเทคโนโลยี.** 15(5) : 6-8.

ปิยะรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ. 2542. "แมลงศัตรูผัก" ใน **เอกสารวิชาการกลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ.** กรุงเทพฯ :กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

พรรณเพ็ญ ชโยภาส. 2543. "ปัญหาความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผักและแนวทางแก้ไข." **วารสารกีฏและสัตววิทยา.** 22(1) : 49-52.

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538. "เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)." หน้า137-60 ใน **เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเรื่อง การตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme pattern และ RAPD ครั้งที่1.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

มยุรา สุนย์วีระ. 2543. "ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก, *Plutella xylostella* (L.)." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 18(1) : 45-50.

วินัย รัชตปกรณ์ชัย และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2537ก. "ผลของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ต่อแมลงศัตรูผักที่สำคัญในคะน้า." ใน **รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2537.** กรุงเทพฯ : กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วินัย รัชตปกรณ์ชัย และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2537ข. "ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อหนอนใยผักและหนอนกระทู้หอม." ใน **รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2537.** กรุงเทพฯ : กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2536. "เทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction." หน้า 20.2-20.12. ใน **หนังสือคู่มือปฏิบัติการเทคโนโลยี : เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม.** ครั้งที่ 1. นครปฐม : มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2536. "การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ." หน้า 18.2-18.5. ใน **หนังสือคู่มือปฏิบัติการเทคโนโลยี : เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม.** ครั้งที่ 1. นครปฐม : มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

สิทธิรักษ์ รอยตระกูล. 2540. "การใช้คอมพิวเตอร์วิเคราะห์ข้อมูลและสร้าง Phylogenetic tree." หน้า L3-1 ถึง L3-8. ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม เรื่อง เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบและจำแนกจีโนม.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. 2544. "Phylogenetics และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต." หน้า 149-171. ใน วสันต์ จันทราทิตย์ และวีระพงศ์ ลุลิตานนท์. **ชีวสารสนเทศศาสตร์.** กรุงเทพฯ : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

อนันต์ วัฒนธัญกรรม. 2521. "ปัญหาแมลงศัตรูสำคัญของพืชผัก ตอนที่ 1 หนอนใยผัก". **ปราบ.** 7 : 7-10.

Beeman R.W. and Brown, S.J. 1999. "RAPD-Based Genetic Lingkage Maps of *Tribolium castaneum*." **Genetics**. 153 : 333-338.

Benecke, M. 1998. "Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Typing of Necrophaeous Insects (Diptera, Coleoptera) in Criminal Forensic Studies : Validation and Use in Practice". **Forensic Science International.** 98 : 157-168.

Biron D.G. *et. al.* 2000. "Geographical Origin of An Introduced Pest Species, *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae), Determined by RAPD Analysis and Egg Micromorphology." **Bull. Entomol. Res.** 90 : 23-32.

Black W.C. IV. *et. al.* 1990. "Allozyme variation among populations of the Hessian fly (*Mayetiola destructor*) in the United States." **J. Heredity.** 81 : 331-337.

Black W.C. IV. *et. al.* 1992. "Use of The Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) to Detect DNA Polymorphisms in Aphids (Homoptera: Aphididae)." **Bull. Entomol. Res.** 82 : 151-159.

Black W.C. IV. 1993. "PCR with Arbitrary Primers: Approach with Care." **Insect Molec. Bio.** 2(1) : 1-6.

Borges, E.C. *et. al.* 2000. "Genetic Variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera : Reduviidae) Populations". **J. Med. Entomol.** 37(6) : 872-877.

Brinkman, F.S.L. and Leipe, D.D. . 2001. "Phylogenetic Analysis." 323-258. in Baxevanis, A.D. and Ouellette ,B.F. **Bioinformatics (A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins.** 2nd. Canada : John Wiley & Sons, Inc.

Brown, R.J. *et. al.* 1997. "Genetic Differentiation Between and Within Strains of the Saw-Toothed Grain Beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera : Silvanidae) at RAPD Loci". **Insect Molec. Bio**. 6(3) : 285-289.

Caprio, M.A. and Tabashnik, B.E. 1992. "Allozymes Used to Estimatee Gene Flow Among Populations of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutllidae) in Hawaii." **Environ. Entomol.** 21 : 808-816.

Chang W.X.Z. *et. al.* 1997. "Mitochondrial DNA Sequence Variation Among Geographic Strains of Diamondback Moth (Lepidoptera : Plutellidae)." **Ann. Entomol. Soc. Am.** 90 : 590-595.

Capinera, J.L. 2000. **Cabbage Moth - *Plutella xylostella*.** [Online]. Available : http://www.creatures.ifas.ufl.edu/veg/leaf/diamondback_moth.htm.

Chapco W. *et. al.* 1992. "A Feasibility Study of Use of Random Amplified Polymorhic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) in The Population Genetics and Systematic of Grasshoppers." **Genome.** 35 : 569-574.

Demeke T. *et. al.* 1992. "Potential Taxonomic Use of Random Amplified Polymorhic DNA (RAPD): A Case Study in *Brassica*." **Theor. Appl. Genet.** 84 : 990-994.

Demeke T. and Adams R.P. 1994. "The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evaluation." 179-191. In AM Griffin. **PCR Technology : Current Invovations.** Florida : CRC press.

De Sousa G.B. *et. al.* 2001. "Genetic Relationships among *Aedes aegypti* (Diptera: Culcidae) Populations from Argentina Using Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction Markers." **J. Med. Entomol.** 38(3) : 371-375.

Deverno, L.L. *et. al.* 1998. "Randomly Amplified Polymorphic DNA Evidence of Introgression in Two Closely Related Sympatric Species of Coniferophagous *Choristoneura* (Lepidoptera : Tortricidae) in Atlantic Canada". **Ann. Entomol. Soc. Am.** 91(3) : 248-259.

Dowdy, A.K. and McGaughey, W.H. 1996. "Using Random Amplified Polymorphic DNA to Differential Strains of the Indianmeal Moth (Lepidoptera : Pyralidae)". **Environ. Entomol.** 25(2) : 396-400.

Eigenbrode S.D. and Shelton A. M. 1990. "Behavior of Neonate Diamondback Moth Larvae (Lepidoptera : Plutellidae) on Glossy-Leafed Resistant *Brassica oleracea* L." **Environ. Entomol.** 19(5) : 1566-1571.

Favia G. *et. al.* 1994. "Analysis of The *Anopheles gambiae* Genome Using RAPD Markers." **Insect Molec. Bio.** 3(3) : 149-157.

Felsenstein, J. 1993. **PHYLIP** (Phylogeny Inference Package) version 3.6a2. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Garcia, A.L. *et. al.* 1998. "Random Amplification of Polymorphic DNA as a Tool for Taxonomic Studies of Triatomine Bugs (Hemiptera : Reduviidae)". **J. Med. Entomol.** 35 (1) : 38-45.

Garner K.J. and Slavicek J.M. 1996. "Identification and Characterization of A RAPD-PCR Marker for Distinguishing Asian and North American Gypsy Moths." **Insect Molec. Bio.** 5(2) : 81-91.

Gawel N. and Bartlett A. 1993. "Characterization of Differences between Whiteflies Using RAPD-PCR." **Insect Molec. Bio.** 2 : 33-38.

Goodwin P.H. and Annis S.L. 1991. "Rapid Identification of Genetic Variation and Pathotype of *Leptosphaeria maculans* by Random Amplified Polymorhic DNA Assay." **Appl. Environ. Microbiol.** 57 : 2482-2486.

Hallden C. *et. al.* 1996. "Competition as a Source of Errrors in RAPD Analysis." **Theor. Appl. Genet.** 93 : 1185-1192.

Hammond J.B.W. *et. al.* 1996. "Extraction of DNA from Preserved Animal Specimens for Use in Random Amplified Polymorhic DNA Analysis." **Anal. Biochem.** 240 : 298-300.

Harcourt D.G. 1957. "Biology of the Diamondback Moth, *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lepidoptera: Plutellidae), in Eastern Ontario.II. Life-History, Behavior and Host Relationships." **Can. Entomol.** 89 : 554-564.

Haymer D.S. *et. al.* 1992. "Genetic Variation between Strains of the Mediteranean Fruit Fly, *Ceratitis capaitata*, Detected by DNA Fingerprinting." **Genome.** 35 : 528-533.

Haymer D.S. and McInnis D. 1994. "Resolution of Populations of the Mediteranean Fruit Fly at the DNA Level Using Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction." **Genome.** 37 : 244-248.

Haymer D.S. 1994. "Arbitrary (RAPD) Primer Sequences Used in Insect Studies." **Insect Molec. Bio.** 3(3) : 191-194.

Heckel D.G. *et. al.* 1995. "Randomly Amplified Polymorphic DNA Differences Between Strains of Diamondback Moth (lepidoptera : Plutellidae) Susceptible or Resistant to *Bacillus thuringiensis*." **Ann. Entomol. Soc. Am.** 88 : 531-537.

Hely P.C. *et. al.* 1982. **Insect Pests of Fruit and Vegetables in NSW.** Melbourne : Inkata Press.

Hoelzel AR. 1992. **Molecular Genetic Analysis of Populations : A Practical Approach.** USA : Oxford University Press.

Hosaka K. 1994. "Current RAPD technology." 14p. in **A Handout Prepared for the Workshop on RAPD Analysis for Plant Varietal Identification, March 1-3, 1994.** Nakhon Pathom : Kamphaensaen Campus, Kasetsart University.

Hu J. and Quires C.F. 1991. "Identification of Broccoli and Cauliflower Cultivars with RAPD Markers." **Plant Cell Rep.** 10 : 505-511.

Innis M.A. *et. al.* 1990. **PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications**. London : Academic press.

Kambhampati S. *et al.* 1992. "Random Amplified Polymorphic DNA of Mosquito Species and Populations: Techniques, Statistical Analysis and Applications." **J. Med. Entomol.** 29 : 939-945.

Kangfu Yu and Pauls K.P. 1992. "Optimization of the PCR Program for RAPD Analysis." **Nucleic Acids Res.** 20(10) : 2606.

Kazan K., *et. al.* 1993. "Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in An Interspecofic Cross in the Genus Stalosanthes." **Genome.** 36 : 50-59.

Klein – Lankhost, R.M. *et. al.* 1991. "Isolation of Molecular Markers for Tomato Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)." **Theor. Appl. Genet.** 83 : 108-114.

Laayouni, H. *et. al.* 2000. "Toward A Physical Map of *Drosophila buzatii* : Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymorphisms and Sequence-tagged Site Landmarks". **Genetics.** 156 : 1797-1816.

Landy B. *et. al.* 1993. "Random Amplified Polymorphic DNA Marker for DNA Fingerprinting and Genetic Variability Assessment of Minute Parasitic Wasp Species Used in Biological Control Programs of Phytophagous Insects." **Genome.** 36 : 580-587.

Lery X. *et. al.* 2003. "Characterization and Authentication of Insect Cell Lines using RAPD Markers." **Insect Biochem. Mol. Biol.** 33 : 1035-1041.

Liu M.Y. *et. al.* 1981. "Diamondback Moth Resistance to Several Synthetic Pyrethroids." **J. Econ. Entomol.** 74 : 393-396.

Liu Y.B. *et al.* 1998. "Synergism between *Bacillus thuringiensis* Spores and Toxins Against Resistant and Susceptible Diamondback Moths (*Plutella xylostella*)." **Appl. Environ. Microbiol.** 64(4) : 1385-1389.

MacPherson J.M. *et. al.* 1993. "Variability of the Random Amplified Polymorphic DNA Assay among Thermal Cyclers, and Effects of Primer and DNA Concentration." **Molecular and Cellular Probes.** 7 : 293-299.

Mau R.F.L. and Kessing, J.L.M. 1992. ***Plutella xylostella*** **(Linnaeus).** [Online]. Available : http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/plutella.htm.

McIntosh, A.H. *et. al.* 1996. "Identification of Insect Cell Lines by DNA Amplification Fingerprinting (DAF)." **Insect Molec. Biol.** 5 : 187-195.

Melcher U. 1998. **Molecular Genetics.** [Online]. Available : http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MG01.html

Mendel Z. *et. al.* 1994. "Examination of The Origin of The Israeli Population of *Matsucocus josephi* (Homoptera: Matsucoccidae) Using Random Amplified Polymorhic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) Method." **Ann. Entomol. Soc. Am.** 87 : 165-169.

Miller R. 1997. "Lingkage Mapping of Plant and Animal Genome." 27-37. in Dear P.H. **Genome Mapping.** New York : Oxford University Press Inc.

Mohon M. *et. al.* 1994. "RFLP and RAPD Mapping of the Rice *Gm2* Gene that confers Resistance to Biotype 1 of Gall Midge (*Orseolia orysae*). **Theor. Appl. Genet.** 87 : 782-788.

Mullis K. *et. al.* 1986. "Specific Enzymatic Amplification of DNA *in vitro* : the Polymerase Chain Reaction." **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 51 : 263-273.

Naber N. *et. al.* 2000. "Genetic Variation among Populations of The Hessian Fly *Mayetiola destructor* (Diptera: Cecidomyiidae) in Morocco and Syria." **Bull. Entomol. Res.** 90 : 245-252.

Nei M. and Li W. 1979. "Mathematical Model for Studying Genetic Variation in terms of Restriction Endonucleases." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76 : 5269-5273.

Newton C.R. and Graham, A. 1994. **PCR.** United Kingdom : BIOS Scientific Publishers Limited. 161p.

Nicholl, D.S.T. 2002. **An Introduction to Genetic Engineering.** 2nd ed. Cambridge : Cambridge University Press.

Paabo, S. 1989. "Ancient DNA Extraction Characterization Molecular Cloning and Amplification." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86 : 1939-1943.

Pornkulwat, S. *et. al.* 1998. "Random Amplified Polymorphic DNA Used to Identify Genetic Variation in Ecotypes of the European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae)". **Ann. Entomol. Soc. Am.** 91(5) : 719-725.

Rapley R. 1998. "Polymerase Chain Reaction." 305-325. in Rapley R. and Walker J.M **Molecular Biomethods Handbook.** New jersey : Human Press.

Reineke, A. and Zebitz, C. 1999. "Suitability of Polymerase Chain Reaction-based Approaches for Identification of Different Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Genotypes in Central Europe". **Annals of the Entomological Society of America.** 92 : 737-741.

Rueda A. and Shelton A.M. 1995. **Diamondback Moth (DBM).** [online]. Available : http : //www.Nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/english/dbm.htm.

Schreiber, D. *et. al.* 1997. "Identification of Three Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Markers for Distinguishing Asian and North American Gypsy Moths (Lepidoptera: Lymantriidae)". **Annals of the Entomological Society of America.** 90 : 667-674.

Schierwater B. and Ender A. 1993. "Different Thermostable DNA Polymerases may Amplify Different RAPD Products." **Nucleic acids Res.** 21(19) : 4647-4648.

Schnell, R.M. *et. al.* 1996. "Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in *Anastrepha supensa* (Diptera: Tephritidae)". **Ann. Entomol. Soc. Am.** 89(1) : 122-128.

Shirai, Y. 2000. "Temperature Tolerance of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in Tropical and Temperate Regions of Asia". **Bull. Entomol. Res.** 90 : 357-364.

Sonvico, A. *et. al.* 1996. "Discrimination between The Immature Stages of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera : Tephritidae) Populations by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction". **J. Econ. Entomol.** 89(5) : 1208-1212.

Steen S.W. 1999. **Handbook for DNA isolation, RAPD-PCR and PCR-RFLP.** [online]. Available : http://biologi.uio.no/fellesavdelinger/DNA-lab/handbook.html.

Strachan, T. 1992. **The Human Genome.** Oxford : BIOS Scientific Publishers.

Thongphak D. 1997. "DNA-Based Characterization of Rice Gall Midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason) in Thailand." Master degree Thesis of Science (Agriculture), Department of Entomology, Graduate School, Kasetsart University.

Tibayrence M. *et. al.* 1993. "Genetic Chacterization of Six Parasitic Protozoa: Parity between Random-Primer DNA Typing and Multilocus Enzyme Electrophoresis." **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. 90 : 1335-1339.

Walker J.M. and Gingold E.B. 1993. **Molecular Biology and Biotechnology**. 3[rd] Edition. USA : The Royal Socity of Chemistry.

Waterhouse, D.F. 1987. "*Plutella xylostella* (linnaeus) Lepidoptera : Yponomeutidae, Diamondback Cabbage Moth." 177-191. In Waterhouse D.F. and Norris K.R. **Biological Control**. Melbourne : Inkata Press.

Wellso S.G. *et. al.* 1988. "Electrophoretic Monomorphism in Six Biotypes and Two Populations of the Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae)." **Ann. Entomol. Soc. Am.** 81 : 50-53.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. "Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers." **Nucleic Acids Res.** 18 : 7213-7219.

Wilkerson R.C. *et. al.* 1995. "Diagnosis by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of Four Cryptic Species Related to *Anophles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil." **J. Med. Entomol.** 32(5) : 697-704.

Williams C.L. *et. al.* 1994. "Geographical Origin of an Introduced Insect Pest, *Listronotus bonariensis* (Kuschel), Determined by RAPD Analysis." **Heredity**. 72 : 412-419.

Williams, J.G.K. *et. al.* 1990. "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Marker." **Nucleic Acids Res.** 18 : 6531-6535.

Zhou X. *et. al.* 2000. "Population Structure of the Pestiferous Moth *Helicoverpa armigera* in the Eastern Mediterranean Using RAPD Analsis." **Heredity**. 85 : 251-256.

ภาคผนวก ก.

การทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่นำมาใช้ในการศึกษากรดนิวคลีอิค เช่น ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ในการแยกขนาด การหาปริมาณ การศึกษาถึงโครงสร้างและคุณสมบัติบางประการ โดยอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า เนื่องจากกรดนิวคลีอิคมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4^-) ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า จึงเกิดการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์กรดนิวคลีอิคโดยเฉพาะดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้า (electrophoresis) ผ่านตัวกลางคือวุ้น (gel) ตัวกลางที่ใช้กันทั่วไปคือ อะกาโรส (agarose) หรือโพลีอะคริลาไมด์ เจล (polyacrylamind gel) วุ้นชนิดอะกาโรสมีความสามารถในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 500 ถึง 1000 คู่เบส ขณะที่โพลีอะคริลาไมด์ เจล ใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 500 คู่เบส (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2536)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านตัวกลาง

1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก ในเวลาที่เท่ากันการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่ใกล้กว่าดีเอ็นเอขนาดเล็กในตัวกลาง ทำให้สามารถแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน แต่มีรูปร่างที่ต่างกัน เช่น เป็นเส้น เป็นวงแหวน เมื่อเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าในตัวกลางจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงแหวน (circular DNA) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้น (linear DNA) และดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงแหวนเปิด (open circular DNA)

3. ความเข้มข้นและขนาดของรูพรุนของตัวกลาง ลักษณะโมเลกุลภายในของวุ้นหรือตัวกลางมีลักษณะเป็นโครงตาข่าย เมื่อมีความเข้มข้นสูง โครงตาข่ายจะสานตัวกันแน่นมากกว่าที่มีความเข้มข้นต่ำ ทำให้ขนาดของรูภายในตัวกลางมีขนาดเล็กลง จึงส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่หรือมีโครงสร้างที่ซับซ้อนจะเคลื่อนที่ในตัวกลางได้ช้าหรือใกล้กว่าดีเอ็นเอที่ขนาดเล็กและเป็นเส้นตรง วุ้นที่มีความเข้มข้นสูงจึงนำมาใช้ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ขณะที่วุ้นที่มีความเข้มข้นต่ำมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่

4. สารละลายที่ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้า (buffer) สารละลายที่ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ เพราะใช้เป็นตัวนำไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า ถ้าใส่สารละลายน้อย ไม่ท่วม

ตัวกลาง การนำไฟฟ้าจะเกิดน้อยหรือไม่เกิดขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะไม่เกิด ขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายมาก การนำไฟฟ้าจะเกิดขึ้นมากจนอาจทำลายดีเอ็นเอและตัวกลาง สารละลายที่ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้าที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ TAE buffer (Tris-acetate และ EDTA) และ TBE buffer (Tris-borate และ EDTA) ที่มีความเป็นกรดด่าง (pH) ประมาณ 8.0

5. กระแสไฟฟ้า สภาพแรงดันไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยมีความต้านทานของตัวกลางและสารละลายตัวนำไฟฟ้ามาเกี่ยวข้อง ถ้าใช้แรงดันไฟฟ้าที่สูง ความสามารถในการแยกขนาดของดีเอ็นเอจะลดลง เพราะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอ การแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 2 คู่เบส ควรใช้แรงดันไฟฟ้าไม่เกิน 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร โดยใช้หลักการกว้างๆ คือ ใช้แรงดันไฟฟ้า 5 โวลต์ต่อระยะห่างจากขั้วอิเล็กโทรด (electrode) ทั้งสองทุก 5 เซนติเมตร

อุปกรณ์และสารละลายที่ใช้ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. กล่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวนอน (horizontal agarose gel chamber)
2. ตัวจ่ายไฟกระแสตรง (DC power supply)
3. กล่องให้แสง UV ชนิดผ่าน (transilluminator)
4. ปิเปตอัตโนมัติพร้อมทิปสะอาดฆ่าเชื้อแล้ว
5. อะกาโรส (molecular biology grade)
6. Tris-borate-EDTA buffer (TBE 10 เท่า) (Tris-OH 0.89 โมลาร์ Boric acid 0.89 โมลาร์ และ EDTA 0.02 โมลาร์ สำหรับสารละลายเข้มข้นที่เตรียมเก็บไว้)
7. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
8. loading dye (โบรโมฟีนอล บลู (bromophenol blue) 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE 0.5เท่า ไฟคอล (ficoll) 15 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. คำนวณปริมาตรวุ้นอะกาโรสที่จะใช้ โดยดูจากพื้นที่ที่จะหล่อเจล โดยจะเทเจลให้มีความสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร ชั่งอะกาโรสตามปริมาณที่ต้องการ ละลายในบัฟเฟอร์ชนิด 0.5 หรือ 1 เท่าตามแต่กรณี ต้มด้วยเตาอบไมโครเวฟ ประมาณ 2 นาทีจนเดือด แล้วต้มต่อประมาณครึ่งนาทีเพื่อให้ละลายหมด
2. ทิ้งสารละลายเจลให้อุ่นลงมาเหลือประมาณ 65 องศาเซลเซียส แล้วจึงหล่อเจลในถาดใส่หวีเสียบ (comb) เพื่อทำช่องใส่ตัวอย่าง ระหว่างที่เทเจลลงในถาด ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งให้แข็งจะใช้เวลาประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วจึงยกหวีเสียบออกจากแผ่นเจลและยกแผ่นเจลมาใส่กล่อง เทบัฟเฟอร์ให้ท่วมช่องใส่ตัวอย่าง
3. สำหรับดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ให้ปิเปต loading dye ลงไปผสมปริมาตร ¼ เท่า (เช่นถ้าจะใส่ดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตร ก็ใช้สี 1 ไมโครลิตร) ซึ่งจะช่วยให้สารละลายดีเอ็นเอมี

ความหนาแน่นมากขึ้นและจมตัวลงในช่องใส่ตัวอย่าง เมื่อผสมดีแล้ว จึงหยอดลงไปแต่ละช่องใต้ระดับน้ำสารละลายบัฟเฟอร์ และควรหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน เช่น แลมบ์ดาดีเอ็นเอตัดด้วย *Hin*d III ลงไปด้วย

4. ปิดฝากล่องและต่อขั้วไฟฟ้าให้เรียบร้อย แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะขึ้นกับความยาวของเจล โดยใช้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยทั่วไปจะใช้กระแสไฟฟ้าขนาดประมาณ 1-5 โวลต์ต่อเซนติเมตรของความยาวแผ่นเจล

5. เมื่อเห็นสีของโบรโมฟีนอล บลู เคลื่อนไปอยู่ที่ปลายเจล จึงหยุดเครื่อง (ในบางกรณีอาจหยุดเครื่องเร็วหรือช้าขึ้น ขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์

6. นำแผ่นเจลออกแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ดีเอ็นเอติดสีที่จะมองเห็นได้ด้วยแสง UV แช่ไว้ประมาณ 15 นาที

7. นำแผ่นเจลออกจากสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ โดยใช้ที่ตักเจล (ระวังอย่าให้เอธิเดียมโบรไมด์ถูกผิวหนัง ขณะที่ทำควรใส่ถุงมือ) แล้วล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่ค้างอยู่โดยนำเจลไปแช่ในถาดใส่น้ำนานประมาณ 15 นาที หรือในกรณีที่ใส่เอธิเดียมโบรไมด์ลงไปในอะกาโรสที่ต้มแล้วก่อนเทลงถาดเจลก็ได้ กรณีนี้จะไม่ต้องมาย้อมสีในภายหลัง

8. นำแผ่นเจลมาส่องดูดีเอ็นเอด้วยกล่อง UV และถ่ายรูป

ภาคผนวก ข.

การเตรียมบัฟเฟอร์และสารเคมี

1. Lifton grind buffer

ประกอบด้วย	sucrose		6.8 กรัม	(0.2 โมลาร์)
	EDTA	0.5 โมลาร์	10 มิลลิลิตร	(50 มิลลิโมลาร์)
	Tris, pH 9.0	1 โมลาร์	10 มิลลิลิตร	(100 มิลลิโมลาร์)
	SDS	105 เปอร์เซ็นต์	5 มิลลิลิตร	(0.5 เปอร์เซ็นต์)

ผสมส่วนผสมทั้งหมดรวมกันแล้วเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านที่กรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 8 M KAc (potassium acetate)

ชั่ง Potassium acetate 39.25 กรัมละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วและปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร กรองผ่านที่กรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. 3 M NaOAc (sodium acetate) pH 6.0

ชั่ง sodium acetate. $3H_2O$ 408.1 กรัม ละลายในน้ำ 750 มิลลิลิตร เติม gracial acetic acid จนกระทั่งได้ pH 6.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรและฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

4. สารละลายฟีนอลอิ่มตัว (phenol buffered)

เตรียมโดยเอาฟีนอลมาทำให้หลอมละลาย โดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เติม Hydroxy quinoline ซึ่งเป็นสารพวก antioxidant ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติม Tris-HCl 0.1 โมลาร์, pH 8.0 ปริมาตรเท่าตัว กวนอย่างแรงด้วย stirrer นาน 10-15 นาที ปล่อยให้แยกชั้น ดูดสารละลายชั้นบนออก สกัดซ้ำอีกครั้งด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์, pH 8.0 จนกระทั่ง pH ของฟีนอลมากกว่า 7.8 (วัดด้วย pH paper) เติม β-mercaptoethanol ให้ได้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเติม Tris-HCl 0.1 โมลาร์, pH 8.0 เพื่อคลุมผิวของสารละลาย เก็บสารสารละลายฟีนอลอิ่มตัวที่ได้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. TE buffer

ประกอบด้วย	Tris-HCl	10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0
	EDTA	1 มิลลิโมลาร์

ชั่ง Tris-HCl 1.211 กรัม และ EDTA 0.372 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.0 ด้วย HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรและฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

6. TBE buffer (สารละลายความเข้มข้น 10 เท่า สำหรับเตรียมเก็บไว้)

ประกอบด้วย Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์ pH 8.3

boric acid 89 มิลลิโมลาร์

EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์

ชั่ง Tris-HCl 107.8 กรัม boric acid 55 กรัม และ EDTA 9.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.3 ด้วย HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรและฆ่าเชื้อโดยการ autoclave เวลาใช้งานให้เจือจางลงเป็น 1 เท่า

7. loading buffer

loading buffer ที่ใช้กันทั่วไปมีหลายสูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF และ 40% (w/v) sucrose ในน้ำกลั่นเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

สูตรที่ 2 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF และ 15% ficoll (type 400, Phamacia) ในน้ำกลั่น เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

สูตรที่ 3 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF และ 30% glycerol ในน้ำกลั่นเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

สูตรที่ 4 0.25% bromophenol blue และ 4.0% (w/v) sucrose ในน้ำกลั่นเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

โดยบัฟเฟอร์เหล่านี้มีความเข้มข้นของที่ต้องการใช้ ดังนั้นปริมาณที่ใช้จะเป็น 1/6 ของปริมาตรรวมของสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย เช่น มีสารละลายดีเอ็นเอ 10ไมโครลิตร เติม loading buffer 2 ไมโครลิตร ซึ่งให้ปริมาตรรวมสุดท้าย 12 ไมโครลิตร

8. เอนไซม์โปรติเนส เค (protinase K)

เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส และจะใช้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วย Tris 10 มิลลิโมลาร์ (pH7.8) EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ SDS 0.5 เปอร์เซ็นต์

9. เอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอ (RNase A)

เตรียมโดยชั่งอาร์เอ็นเอส เอ 100 มิลลิกรัม และละลายในสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) และ NaCl 15 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ ต้มในน้ำเดือด 15 นาที (ระวังให้ระดับสารละลายเอนไซม์อยู่ต่ำกว่าระดับน้ำเดือด) ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แบ่งเป็น aliquots (100-500 ไมโครลิตร) เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้จะยังทำงานได้ดี แม้จะผ่านการทำ freeze-thaw หลายๆ ครั้ง

ภาคผนวก ค.

ตารางภาคผนวกที่ 1 แถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างหนอนใยผัก 11 ตัวอย่างด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 (12 ชนิด) กำหนดสัญลักษณ์ 1 กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ 0 กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ไพรเมอร์ (คู่เบส)	A-01				A-02					A-04						A-07				
ตัวอย่าง	1000	860	600	540	1700	1575	900	830	630	750	680	565	500	470	374	1300	970	850	464	420
เชียงใหม่	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
ลำปาง	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
ขอนแก่น	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
มหาสารคาม	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
ร้อยเอ็ด	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
เลย	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
ปทุมธานี	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
นนทบุรี	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
นครปฐม	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
กาญจนบุรี	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
แคนาดา	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ไพรเมอร์ (คู่เบส) / ตัวอย่าง	A-09						A-11				A-12				A-18		
	2070	1540	850	730	670	500	1100	990	850	350	1000	850	650	500	620	570	400
เชียงใหม่	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
ลำปาง	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0
ขอนแก่น	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1
มหาสารคาม	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
ร้อยเอ็ด	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
เลย	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
ปทุมธานี	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
นนทบุรี	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0
นครปฐม	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
กาญจนบุรี	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
แคนาดา	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ไพรเมอร์ (คู่เบส) / ตัวอย่าง	A-19				B-01								B-07			B-18	
	640	600	560	530	1122	900	890	700	570	430	350	300	990	900	520	500	350
เชียงใหม่	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
ลำปาง	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
ขอนแก่น	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
มหาสารคาม	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
ร้อยเอ็ด	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
เลย	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
ปทุมธานี	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
นนทบุรี	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
นครปฐม	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
กาญจนบุรี	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
แคนาดา	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1

ตารางภาคผนวกที่ 2 แถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างหนอนใยผัก 10 ตัวอย่างด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 2 (10 ชนิด) กำหนดสัญลักษณ์ 1 กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ 0 กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ไพรเมอร์ (คู่เบส) / ตัวอย่าง	B-04											C-01					C-04	
	2330	1700	1300	1100	924	850	780	700	650	500	350	1080	990	750	600	400	1380	1260
เชียงใหม่	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
ลำปาง	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
ขอนแก่น	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
มหาสารคาม	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
ร้อยเอ็ด	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
เลย	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
ปทุมธานี	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
นนทบุรี	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
นครปฐม	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
กาญจนบุรี	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไพรเมอร์ (คู่เบส) / ตัวอย่าง	D-02				517			521					563		
	900	820	776	700	850	780	680	1180	950	850	814	690	890	790	650
เชียงใหม่	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
ลำปาง	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
ขอนแก่น	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
มหาสารคาม	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
ร้อยเอ็ด	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
เลย	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
ปทุมธานี	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
นนทบุรี	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
นครปฐม	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1
กาญจนบุรี	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไพรเมอร์ (คู่เบส) / ตัวอย่าง	570					571			
	1800	1540	1150	910	750	500	420	320	300
เชียงใหม่	0	0	0	0	1	0	1	0	0
ลำปาง	0	0	0	1	1	1	0	0	0
ขอนแก่น	0	0	0	1	0	1	0	0	0
มหาสารคาม	0	0	1	0	1	0	0	0	0
ร้อยเอ็ด	0	0	0	1	0	1	0	0	1
เลย	0	0	0	1	0	0	0	1	0
ปทุมธานี	0	0	0	0	1	0	0	0	0
นนทบุรี	0	0	0	0	1	1	0	1	0
นครปฐม	1	1	1	0	1	0	0	0	0
กาญจนบุรี	1	1	0	0	1	1	0	1	0

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอังคณา กระจ่าง เกิดเมื่อวันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2521 ในปี พ.ศ. 2543 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง