การจำแนกชนิดของแมลงสาบด้วยวิธี DNA barcodes

Identification of cockroach by DNA barcodes

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต
ภาณุพงศ์ สหายสุข
จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย
สุชาดา สำรวยผล
พัชรา ศรีวิชัย
สังสิทธิ์ สังวรโยธิน
ชำนาญ อภิวัฒนศร

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2553

ชื่อเรื่อง การจำแนกชนิดของแมลงสาบด้วยวิธี DNA barcodes
ผู้วิจัย อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, ภาณุพงศ์ สหายสุข, จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย, สุชาดา สำรวยผล, พัชรา ศรีวิชัย, สังสิทธิ์ สังวรโยธิน, ชำนาญ อภิวัฒนศร
สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์ 2558
สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้างานวิจัย 43 หน้า
คำสำคัญ DNA barcodes, Cytochrom oxidase I (COI) gene
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธี DNA barcodes เพื่อนำมาใช้ในการ จำแนกชนิดแมลงสาบเปรียบเทียบกับวิธีสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยทำการจำแนกแมลงสาบจำนวน 12 ชนิด แบ่งเป็นแมลงสาบที่ทราบชนิดจำนวน 10 ชนิด และแมลงสาบที่ไม่ทราบชนิดอีก 2 ชนิด นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างขาของแมลงสาบชนิดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง มาทำการ เพิ่มจำนวนยีน COI ด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ LepF1 และ LepR1 primer ได้ DNA product ขนาด 700 base pairs จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ alignment และ phylogenetic trees โดยใช้โปรแกรม Chromas MFC Application, BioEdit, Clustal X และ MEGA 4.0 และยืนยันชนิดของแมลงสาบใน Genbank และ IBOL system พบว่าแมลงสาบที่ทราบชนิดแล้วจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blettella germanica*, *Supella longipalpa*, *Pycnocelus surinamensis* ให้ผลสอดคล้องกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนอีก 2 ชนิด ได้แก่ *Blatta lateralis*, *Panesthia angustipennis* ให้ผลไม่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดย *Blatta lateralis* ให้ผลการยืนยันอยู่ในอันดับ (order) Blattaria 100% และ *Panesthia angustipennis* ให้ผลการยืนยันตรงกับ *Periplaneta fuliginosa* อาจจะเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Panesthia angustipennis* และ *Periplaneta fuliginosa* มีความคล้ายคลึงกันมากในลักษณะภายนอก ส่วนแมลงสาบที่ไม่ทราบชนิด unknown 1 ให้ผลสอดคล้องกับอันดับ (order) Blattaria วงศ์ (family) Blattelladae และ unknown 2 ให้ผลสอดคล้องกับ Blattaria และเมื่อ

ศึกษาความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของแมลงสาบ (interspecifics K2P values) และความแตกต่างภายในสปีชีส์ (intraspecifics K2P value) พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.097-0.268 และ 0.00-0.015 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า มากกว่า 0.02 และไม่เกิน 0.02 ตามลำดับ จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าวิธี DNA barcodes โดยใช้ยีน COI สามารถนำมาใช้ในการจำแนกแมลงสาบได้อย่างมีประสิทธิภาพสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Research title Identification of cockroach by DNA barcodes

Researchers(s) Isaya Janwithayanuchit, Panupong Sahaisuk, Jiraporn Ruangsittichai, Suchada Sumruayphol, Patchara Sriwichai, Sungsit Sungvorayothin, Chamnarn Apiwathnasorn

Institution Huachiew Chalermprakiet University

Year of publication 2015

Publisher Huachiew Chalermprakiet University

Source Huachiew Chalermprakiet University

No. of pages 43 pages

Keywords DNA barcodes, Cytochrom oxidase I (COI) gene

Copyright Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

This research aims to develop DNA barcodes method for identification of cockroaches in compared with the standard morphology method. Out of 12 species, 10 were known species and 2 were unidentified species. DNA was extracted from cockroach legs; five samples for each species, in sum a total of 60 samples were collected. COI gene was amplified by PCR technique using LepF1 and LepR1 primer for DNA product size 700 base pairs. Then, DNA sequencing was performed, alignment and phylogenetic trees was done by using Chromas MFC Application, BioEdit, Clustal X and MEGA 4.0. Cockroach species were confirmed in Genbank and IBOL system. The study found that results from 8 species: *Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blettella germanica*, *Supella longipalpa*, *Pycnocelus surinamensis* were consistent with the morphology method while results from two species: *Blatta lateralis* and *Panesthia angustipennis* were inconsistent with the morphology method. *Blatta lateralis* was confirmed to be in the order *Blattaria* 100% and *Panesthia angustipennis* was resulted as *Periplaneta fuliginosa*. One presumption was that *Panesthia angustipennis* and *Periplaneta fuliginosa* are very similar in morphology. Unidentified species 1 is found to be in line with the order Blattaria family Blattelladae. Unidentified

species 2 was consistent with Blattaria. Once studying the differences between species of cockroaches (Interspecifics K2P values) and intra-species differences (Intraspecifics K2P value), we found that the genetic distance were 0.097- 0.268 and 0.00- 0.015, respectively which were greater than 0.02 and less than 0.02, respectively. The study concluded that DNA barcodes using the COI gene can be used to classify cockroaches effectively and consistent with the morphology protocol.

บทที่ 1
บทนำ

แมลงสาบเป็นแมลงมีปีกที่เก่าแก่ที่สุด ถือกำเนิดมาบนโลกนี้ตั้งแต่ ยุคโบราณ (carboniferous) เมื่อประมาณ 250 ล้านปีที่แล้ว ปัจจุบันทั่วโลกมีแมลงสาบที่สามารถจำแนกชนิดได้ประมาณ 4,000 ชนิด แมลงสาบส่วนใหญ่มักอาศัยอยู่ตามป่าหรือที่รกร้าง มีเพียงประมาณ 50 ชนิด ที่พบอยู่ในบริเวณที่พักอาศัยของมนุษย์ แมลงสาบที่พบบ่อยในประเทศไทยได้แก่ แมลงสาบอเมริกัน (American cockroach) เป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาได้แก่ แมลงสาบเอเชียหรือแมลงสาบตะวันออก (oriental cockroach) แมลงสาบเยอรมัน (German cockroach) และแมลงสาบลายน้ำตาล (brown-banded cockroach) แมลงสาบมีการเจริญเติบโตแบบ incomplete metamorphosis ประกอบด้วยระยะไข่ (egg) ตัวอ่อน (nymph) และตัวเต็มวัย (adult) ตัวอ่อนจะเหมือนกับตัวเต็มวัยทุกประการยกเว้น ระบบสืบพันธุ์ในตัวอ่อนจะยังไม่เจริญสมบูรณ์ การลอกคราบจากตัวอ่อนเจริญเป็นตัวเต็มวัยนั้นจะต้องลอกคราบประมาณ 5-12 ครั้ง ขึ้นอยู่กับแมลงสาบแต่ละชนิดซึ่งจะมีความแตกต่างกันไป[1]

วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงสาบทำได้โดยวิธีทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากแมลงสาบมีขนาดใหญ่ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดในด้านต่าง ๆ เช่น ชิ้นส่วนของตัวอย่างต้องครบถ้วนสมบูรณ์ การจำแนกชนิดจำเป็นต้องใช้ระยะตัวเต็มวัยตัว ตัวอย่ างบางชนิดมีขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และจำป็น ต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้ ความ เชี่ยวชาญในการจำแนก[2-3] ซึ่งวิธีการนี้ทำให้เกิดความผิดพลาดได้ และเนื่องด้วยในปัจจุบันแมลงสาบเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอย่างร้ายแรง โดยเป็นสาเหตุหลักของโรคภูมิแพ้ เนื่องจาก สารคัดหลั่ง สิ่งขับถ่ายหรือซากของแมลงสาบที่กลายเป็นผงเหมือนฝุ่นละออง จะ เป็นแหล่งกำเนิดของสารก่อโรคภูมิแพ้ (allergen) โดยจะพบผู้ป่วยโรคภูมิแพ้จากแมลงสาบถึงร้อยละ 40-60 ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ทั้งหมด และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี อาการเบื้องต้นจะคันบริเวณผิวหนัง คันตา น้ำตาไหล ไอจาม ไปจนถึงอาการรุนแรงถึงปอดอักเสบ หอบหืด หายใจไม่ออก [4] คณะผู้วิจัย จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดแมลงสาบโดยวิธี DNA barcodes[5-6] เปรียบเทียบกับวิธีสัณฐานวิทยาที่เป็นวิธีมาตรฐาน โดยในการศึกษาครั้งนี้สนใจที่จะศึกษาแมลงสาบทั้งหมด 12 ชนิด จำแนกเป็นแมลงสาบที่ทราบชนิดโดยวิธีสัณฐานวิทยาจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blatta lateralis*, *Blettella germanica*, *Supella longipalpa*, *Pycnocelus surinamensis*, *Panesthia angustipennis* และแมลงสาบที่ไม่ทราบชนิดโดยวิธีสัณฐานวิทยา จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ unknown 1, unknown 2

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาวิธี DNA barcodes เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงสาบ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลของแมลงสาบจากแผนภาพวงศ์วานวิวัฒนาการ

ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาวิธี DNA barcodes เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงสาบเปรียบเทียบกับวิธีสัณฐานวิทยา (morphology) ของแมลงสาบ 12 ชนิด จำแนกเป็นแมลงสาบที่ทราบชนิดโดยวิธีสัณฐานวิทยา จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blatta lateralis*, *Blettella germanica*, *Supella longipalpa*, *Pycnocelus surinamensis*, *Panesthia angustipennis* และแมลงสาบที่ไม่ทราบชนิดจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ unknown 1, unknown 2 และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงสาบจากแผนภาพวงศ์วานวิวัฒนาการ

นิยามศัพท์เฉพาะ

COI (Cytochrome c oxidase I)[7-21] หมายถึง ยีนในไมโตคอนเดรีย พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีความหลากหลายน้อยในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แต่มีความหลากหลายสูง ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน เป็นยีนที่สามารถเพิ่มขยายชิ้นส่วนของ DNA ได้ ด้วย universal primer มีประโยชน์ในการใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และ BOLD เพื่อยืนยันชนิดแมลงสาบ

DNA barcodes[7-23] หมายถึง วิธีการทางอณูชีววิทยาที่ประยุกต์ใช้เพื่อระบุชนิด หรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณ เครื่องหมายดีเอ็นเอจากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อ แล้วนำ มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ระบุชนิดแล้ว บริเวณ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้เปรียบเทียบนั้น อาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและเป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่น ๆ ที่ต้องการใช้เปรียบเทียบกัน วิธีนี้จะช่วยให้ระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธี DNA barcodes เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงสาบ
2. เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการจำแนกชนิดของแมลงสาบโดยเทคนิคทางอณูชีว วิทยาเพื่อยืนยันผลการจำแนกชนิดของแมลงสาบโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แมลงสาบ (cockroach)[1-4]

แมลงสาบ (cockroach, roach, steambug) มีมาตั้งแต่สมัยดึกดำบรรพ์ประมาณ 250 ล้านปีมาแล้ว เป็นแมลงที่สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี จึงสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้จนปัจจุบัน โดยที่สัตว์ชนิดอื่น ๆ สูญพันธุ์ไปแล้วเป็นจำนวนมากมายหลายชนิด แมลงสาบจัดอยู่ในอาณาจักร (kingdom) Animalia ไฟลัม (phylum) Arthopoda ชั้น (class) Insecta อันดับ (order) Orthoptera บางตำราอาจจัดอยู่ในอันดับ Dictyoptera, Blattodae มีหลายวงศ์ (family) ได้แก่ Blattidae, Blattellidae, Blaberidae, Cryptocercidae และ Polyphagidae ปัจจุบันคาดว่าทั่วโลกมีแมลงสาบที่สามารถจำแนกชนิดได้ประมาณ 4,000 ชนิด แมลงสาบส่วนใหญ่มักอาศัยอยู่ตามป่าหรือที่รกร้าง มีเพียงประมาณ 50 ชนิด หรือประมาณร้อยละ 1 ที่พบอยู่ในบริเวณที่พักอาศัยของมนุษย์ (domestic)

รูปร่างลักษณะภายนอกของแมลงสาบ

ไข่ (egg) แมลงสาบวางไข่เป็นกลุ่ม ๆ ละหลายฟอง มีเปลือกแข็งสีน้ำตาลห่อหุ้มไข่แต่ละกลุ่มกลายเป็นฝักไข่ (egg case) ฝักไข่ มีลักษณะคล้ายเมล็ดถั่วหรือกระเป๋าถือของผู้หญิง เรียกว่า ootheca จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงสาบ ใน ootheca จะมีไข่ประมาณ 12-50 ฟอง

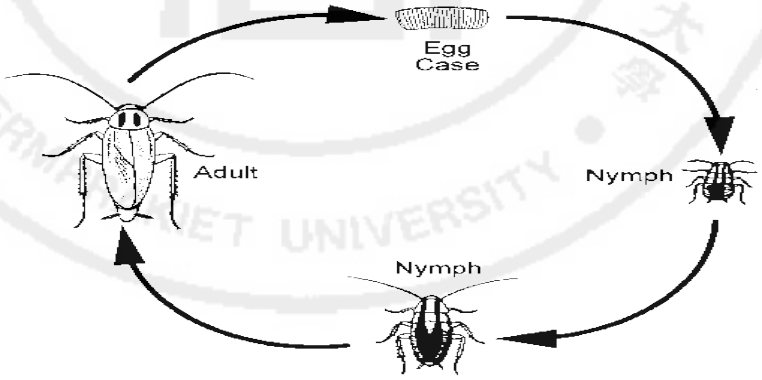
ตัวอ่อน (nymph) มีรูปร่างลักษณะคล้ายตัวเต็มวัยมาก แต่มีขนาดเล็กกว่า ไม่มีปีก และอวัยวะเพศสืบพันธุ์ยังเจริญไม่เต็มที่

ตัวเต็มวัย (adult) แมลงสาบตัวเต็มวัยมีขนาดประมาณ 10-50 มม. สีน้ำตาลหรือดำ ลักษณะลำตัวเป็นรูปไข่และแบนทางด้านหลังมาด้านท้อง (dorsoventrally flattened) ผิวนอก (integument) ของลำตัวแข็งและเป็นมันส่วนหัวมีขนาดเล็กและอาจซ่อนอยู่ใต้แผ่นแข็งปกคลุมส่วนหัวและอก ที่เรียกว่า pronotum มีหนวดยาว 1 คู่ เป็นรูปเส้นด้าย (filiform) แบ่งออกเป็นหลายปล้อง มีปากแบบกัดเคี้ยว (chewing type) มีตาประกอบขนาดใหญ่ 1 คู่ ส่วนอกแบ่งออกเป็นสามปล้อง ปล้องแรกมีส่วนของ pronotum แผ่ขยายคลุมส่วนหัวมีปีก 2 คู่ แมลงสาบที่มีปีกเจริญดี ปีกคู่หน้า จะมีลักษณะแคบ หนา ลักษณะคล้ายหนัง เรียกว่า tegmina มีหน้าที่ปกป้องปีกคู่หลังที่ใช้ในการบินซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นเยื่อบาง (membranous) ทั้งแผ่น ปีกคู่หลังจะพับได้แบบพับซ้อนอยู่ใต้ปีกคู่หน้า ในแมลงสาบบางชนิดปีกอาจหดสั้นเหลือเป็นแผ่นเล็ก ๆ สั้น ๆ คลุมส่วนท้องไม่มิดหรืออาจคลุมส่วนท้องทางด้านหน้าเพียงเล็กน้อย และแมลงสาบบางชนิดอาจไม่มีปีกเลย แมลงสาบมีขาแข็งแรง 3 คู่ ปกคลุมด้วยหนามและขนแข็ง ปลายสุดของขามีกรงเล็บ (tarsal claws) 1 คู่ ระหว่างกรงเล็บมีแผ่นบาง (pad) 1 อัน เรียกว่า arolium แมลงสาบใช้กรงเล็บและ arolium ในการเกาะยึดกับวัตถุในขณะเริ่มเดิน แมลงสาบสามารถเดินและวิ่งได้เร็ว แต่บินไม่เก่ง อย่างไรก็ตามหากถูกรบกวนมาก ๆ มันอาจบินหนีได้

ส่วนท้องของแมลงสาบมีลักษณะเป็นรูปไข่และแบ่งออกเป็นปล้อง ๆ ด้านหลังของส่วนท้องถูกปกคลุมด้วยปีกทั้งหมด แต่แมลงสาบบางชนิดปีกอาจคลุมส่วนท้องได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ปล้องสุดท้ายของส่วนท้องมี cerci 1 คู่ ในแมลงสาบเพศผู้มี stylets 1 คู่ ลักษณะเป็นเส้นบาง ไม่มีปล้อง มีขนาดเล็กกว่า cerci และตั้งอยู่ระหว่าง cerci ทั้งสองอัน ส่วนท้องของแมลงสาบมีต่อม สตีนอล (stenal gland) ผลิตสารฟีโรโมน (pheromone) ที่ส่งกลิ่นเฉพาะออกมาเพื่อแสดงถึงอาณาเขตของมัน

วงชีวิตของแมลงสาบ

แมลงสาบมีการเจริญเติบโตแบบ incomplete metamorphosis ประกอบด้วยระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย (รูปที่ 2.1) แมลงสาบตัวเมียวางไข่ในฝักไข่ที่มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว หรือกระเป๋าสุภาพสตรี (ootheca) เพื่อป้องกันอันตรายแก่ไข่และตัวอ่อนจากความแห้ง รวมทั้งสารเคมี ภายในฝักไข่บรรจุไข่จำนวนไข่ 12-50 ฟอง ขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงสาบ ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนมีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัย แต่ขนาดเล็กกว่า ปีกสั้นกว่าและอวัยวะสืบพันธ์ยังเจริญไม่เต็มที่ ตัวอ่อนลอกคราบ 5-12 ครั้ง จึงกลายเป็นตัวเต็มวัย แมลงสาบกินอาหารทั้งพืชและเนื้อสัตว์ (omnivorous) แต่ส่วนใหญ่ชอบอาหารประเภทแป้ง ถั่วและน้ำตาล ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหารสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลายเดือน แต่ถ้าขาดน้ำจะตายภายใน 2-3 สัปดาห์ แมลงสาบชอบออกหากินในเวลากลางคืน ชอบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเพราะมีพฤติกรรมแบบ thygmotaxis คือ จะเดินเข้าหาด้านที่ถูกสัมผัส แมลงสาบมักถ่ายมูลและสำรอกขณะกินอาหาร จึงเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายของเชื้อโรค นอกจากนั้นยังขับสารที่ส่งกลิ่นเหม็นเฉพาะตัวออกมาตามอาหารและแหล่งที่อยู่อาศัยพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและใกล้เขตร้อน



รูปที่ 2.1 วงชีวิตของแมลงสาบ

การจำแนกชนิดของแมลงสาบ [1, 10]

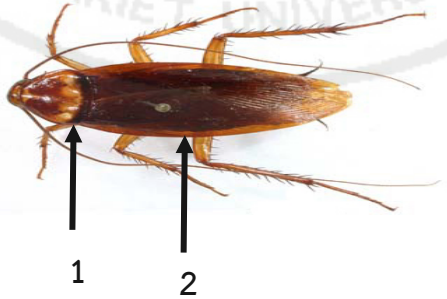
แมลงสาบมีขนาดที่แตกต่างกันไป มีทั้งขนาดเล็กจนกระทั่งขนาดใหญ่ แมลงสาบที่มีขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่จะอยู่ในวงศ์ Blattidae ได้แก่ *Periplaneta americana* (American cockroach), *Periplaneta brunnea* (large brown cockroach), *Periplaneta australasiae* (Australian cockroach), *Periplaneta fuliginosa* (smoky brown cockroach), *Neostylopyga rhombifolia*

(Harlequin cockroach), *Blatta laeralis* และ วงศ์ Blaberidae ได้แก่ *Pycnoscelus surinamensis* (Surinum cockroach), *Panesthia angustipennis* ส่วนแมงสาบที่มีขนาดเล็กจะอยู่ในวงศ์ Blattellidae ได้แก่ *Blattella germanica* (German cockroach), *Supella longipalpa* (brown-banded cockroach, tropical cockroach), *Blattella litulicollis* (smaller German cockroach) เป็นต้น

วงศ์ Blattidae เป็นแมลงสาบขนาดใหญ่ ขอบด้านในของ femur จะมี spines จำนวนมาก แมลงสาบในวงศ์นี้ได้แก่

1. แมลงสาบอเมริกัน (*Periplaneta americana* หรือ American cockroach)

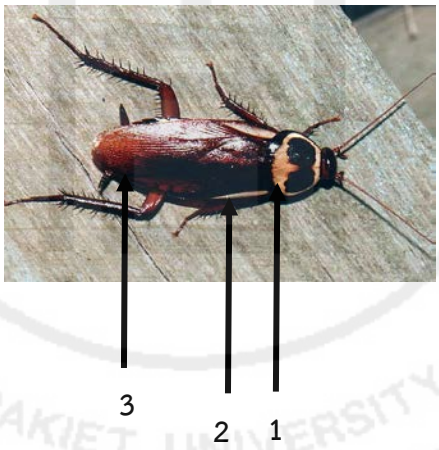
แมลงสาบอเมริกันมีแหล่งกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา ปัจจุบันมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั่วโลก แต่จะพบมากในแถบแอฟริกาเหนือและอินเดียในเขตอบอุ่น พบในประเทศอเมริกาและอังกฤษ ส่วนประเทศไทยพบจำนวนมาก มีขนาดใหญ่ ลำตัวยาวประมาณ 30-40 มม. มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนท้องของตัวเต็มวัยเพศเมียใหญ่กว่าเพศผู้และไม่มี stylets ที่ขอบนอกของ pronotum มีสีเหลืองตัดกับสีน้ำตาลที่อยู่ด้านใน มีปีกเจริญดีทั้งสองเพศ โดยเพศเมียมีปีกยาวคลุมส่วนปลายท้อง แต่ในเพศผู้ปีกจะยาวคลุมท้องไม่มิด (รูปที่ 2.2) แมลงสาบชนิดนี้บินได้ในระยะใกล้ ๆ เมื่อตัวเต็มวัยมีอายุได้ประมาณ 7 วัน จะมีการผสมพันธุ์กัน หลังจากนั้น 4-10 วัน เพศเมียเริ่มวางไข่ตามรอยแยกในแต่ละ ootheca มีไข่อยู่ประมาณ 14-28 ฟอง ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนได้ประมาณ 15-20 ตัว ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่ได้ประมาณ 12-24 ootheca และพา ootheca ติดตัวไปประมาณ 1 วัน จึงปล่อยออกติดตามฝาผนังในที่มิดชิด ไข่มีระยะฟักตัวประมาณ 1-2 เดือน ตัวอ่อนมีการลอกคราบ 7-13 ครั้ง ใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 6-12 เดือน ตัวเต็มวัยมีอายุยืนประมาณ 1-7 เดือน หรืออาจนานถึง 1 ปี หรือมากกว่า ชอบอาศัยอยู่ตามท่อหรือช่องว่างที่ปิดไม่สนิท มักพบตามร้านอาหาร ร้านขายของชำ ร้านขนมปัง และตามสถานที่ต่าง ๆ ที่มีอาหาร หรือแม้แต่ในท่อระบายน้ำโสโครก



รูปที่ 2.2 แมลงสาบอเมริกัน (*Periplaneta americana* หรือ American cockroach) (**หมายเลข 1 :** บริเวณอก ส่วน pronotum มีจุดดำขนาดใหญ่ 2 จุด ล้อมรอบด้วยวงเส้นสีเหลืองซึ่งอาจเต็มวงหรือมีเพียงครึ่งวงก็ได้ **หมายเลข 2 :** ลำตัวสีน้ำตาลแดงมันวาว ทั้งสองเพศมีปีกเจริญดีและยาวถึงปลายของส่วนท้อง ปีกมีสีน้ำตาลแดงตลอดทั้งปีกและไม่มีแถบสีเหลืองที่ขอบปีก)

2. แมลงสาบออสเตรเลีย (*Periplaneta australasiae* หรือ Australian cockroach)

Periplaneta australasiae มีแหล่งที่อยู่ในทวีปแอฟริกา มีการแพร่กระจายน้อยกว่า *Periplaneta americana* พบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั่วโลก ขนาดลำตัวยาวประมาณ 27-33 มม. มีขนาดเล็กกว่า *Periplaneta americana* เล็กน้อย ลำตัวมีสีเข้มกว่า ลักษณะทั่วไปคล้ายกับ *Periplaneta americana* มาก แต่แตกต่างกันคือ *Periplaneta australasiae* มีแถบสีเหลืองอ่อน (pale streak) ยาวประมาณ 1 ใน 3 ของปีกอยู่ที่ด้านข้างของปีกคู่แรกข้างละแถบ แมลงสาบชนิดนี้มีปีกเจริญดีและยาวคลุมส่วนท้องได้มิด ทำให้สามารถใช้ปีกบินได้ ส่วนท้องของเพศเมียจะอ้วนกว่าเพศผู้ ในเพศเมียมี stylets 1 คู่ อยู่ตรงปลายของส่วนท้อง (รูปที่ 2.3) เมื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ประมาณ 5 วัน เพศผู้และเพศเมียจะผสมพันธุ์กัน จากนั้นประมาณ 15 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียจะเริ่มวางไข่ ในแต่ละ ootheca มีไข่อยู่ประมาณ 20-25 ฟอง ootheca มีความยาวประมาณ 10-11 มม. ลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับ ootheca ของ *Periplaneta americana* แต่มีสีเข้มกว่าและมีจำนวนไข่มากกว่า ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่ได้ประมาณ 20-30 ชุดตลอดช่วงชีวิต การวางไข่แต่ละครั้งใช้เวลาห่างกันประมาณ 40 วัน ขึ้นอยู่อุณหภูมิและความชื้น ตัวอ่อนมีการลอกคราบประมาณ 9-12 ครั้ง โดยใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 6-12 เดือน



รูปที่ 2.3 แมลงสาบออสเตรเลีย (*Periplaneta australasiae* หรือ Australian cockroach) (**หมายเลข 1 :** บริเวณอกส่วน pronotum จะเห็นลักษณะเป็นขอบเหลืองอย่างชัดเจน **หมายเลข 2 :** ขอบปีกคู่หน้า บริเวณใกล้ฐานปีก มีแถบสีเหลืองสองแถบ ซึ่งแถบนี้จะยาวประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวปีก ซึ่งมีลักษณะเหมือนเป้สะพาย **หมายเลข 3 :** ลำตัวมีสีน้ำตาลแดง)

3. แมลงสาบสีน้ำตาล (*Periplaneta brunnea* หรือ large brown cockroach)

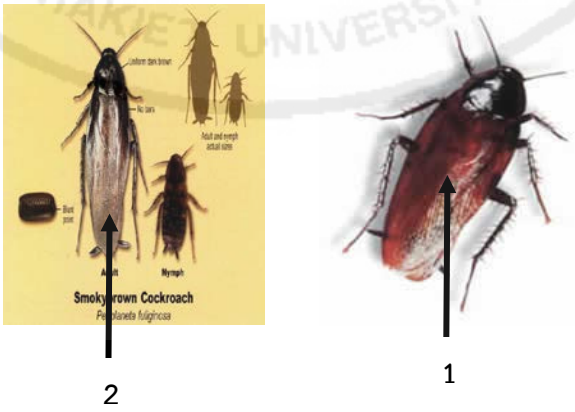
Periplaneta brunnea พบได้ในบริเวณที่พักอาศัย ลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับ *Periplaneta americana* แต่ต่างกันที่ cerci โดย cerci ของ *Periplaneta brunnea* มีรูปร่างอ้วนสั้นและโป่งตรงกลางคล้ายรูปกระสวย ส่วน cerci ของ *Periplaneta americana* มีรูปร่างเรียวยาวและปลายแหลม

เพรียวกว่า (รูปที่ 2.4) แมลงสาบชนิดนี้ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตประมาณ 1 ปี แมลงสาบเพศเมียวางไข่โดยปล่อย ootheca ติดกับพื้นผิวและซ่อนอยู่ตามเศษวัสดุ บางครั้งแมลงสาบเพศเมียจะคอยปกป้องไข่ของมัน ในแต่ละ ootheca มีไข่อยู่ข้างในประมาณ 21-28 ฟอง ภายในเวลา 35 วัน ไข่จะฟักออกเป็นตัวอ่อนได้ประมาณ 14-16 ตัว

รูปที่ 2.4 *Periplaneta brunnea* (large brown cockroach) (**หมายเลข 1 :** ลักษณะโดยทั่วไปของ *Periplaneta brunnea* ซึ่งคล้ายกับ *Periplaneta american* **หมายเลข 2 :** cerci มีความแตกต่างจาก *Periplaneta americana* โดยที่ cerci ของ *Periplaneta brunnea* มีรูปร่างอ้วนสั้นและโป่ง ตรงกลางคล้ายรูปกระสวยเป็นอัตราส่วน กว้าง X ยาว 1:1 ส่วน cerci ของ *Periplaneta americana* มีรูปร่างเรียวยาวและปลายแหลมเพรียวกว่า อัตราส่วน กว้าง X ยาว 1:2)

4. *Periplaneta fuliginosa* (smoky brown cockroach)

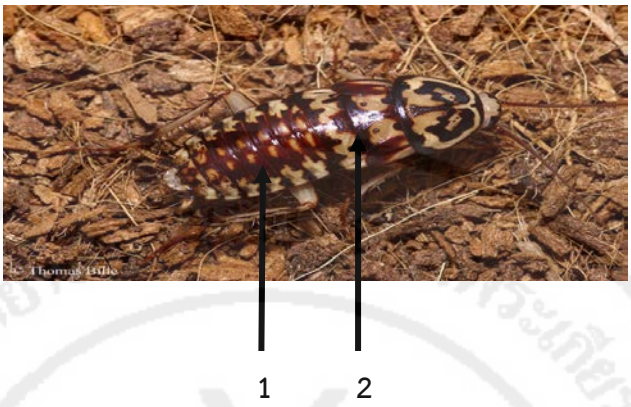
Periplaneta fuliginosa เป็นแมลงสาบที่มีลักษณะใกล้เคียงกับแมลงสาบอเมริกัน แต่ลำตัวสีน้ำตาลเข้มมันวาว ทั้งตัวผู้และตัวเมียยาวประมาณ 30-34 มม. หนวดเรียวและยาวกว่าลำตัว ทั้งสองเพศมีปีกเจริญดีและยาวคลุมถึงปลายของส่วนท้อง (รูปที่ 2.5) แมลงสาบชนิดนี้พบมากในสหรัฐอเมริกา ยุโรป ญี่ปุ่น และจีน พบได้ทั้งในและนอกบ้านบริเวณในบ้านที่สำรวจพบคือห้องนอนและห้องครัว



รูปที่ 2.5 *Periplaneta fuliginosa* **(หมายเลข 1** : สีบริเวณลำตัวนั้นจะมีลักษณะที่เด่นคือ มีสีน้ำตาลเข้มมันวาว **หมายเลข 2 :** ปีกนั้นยาวปกคลุมลำตัวจนถึงส่วนปลายของท้อง)

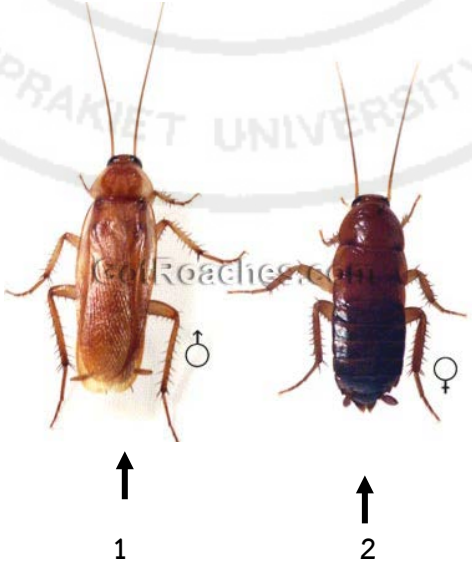
5. *Neostylopyga rhombifolia* (Harlequin cockroach)

Neostylopyga rhombifolia มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 25-30 มม. ลักษณะลำตัวเป็นรูปไข่ มีลักษณะปีกหน้าซึ่งหดสั้นลงกลายเป็นติ่งเล็กๆ ลำตัวมีสีสันสดใสเป็นลวดลายสีเหลืองสลับกับสีดำ ตัวเต็มวัยเพศเมียจะอ้วนและป้อมกว่าเพศผู้ (รูปที่ 2.6) มักพบซ่อนตัวอยู่ในครัวหรือภาชนะต่าง ๆ



รูปที่ 2.6 *Neostylopyga rhombifolia* (Harlequin cockroach) (**หมายเลข 1** : ลักษณะเด่นคือลำตัวมีสีสันสดใสเป็นลวดลายสีเหลืองสลับกับสีดำ **หมายเลข 2 :** บริเวณปีกนั้นจะหดสั้นลงจนมีลักษณะคล้ายติ่งเล็ก ๆ)

6. *Blatta lateralis* (Turkestan cockroach หรือ rusty red cockroach หรือ red runner cockroach) เป็นแมลงสาบที่ชอบอาศัยอยู่นอกบ้าน มีถิ่นฐานดั้งเดิมอยู่ที่แถบอเมริกาเหนือและเอเชียกลาง มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 30 มม. ตัวผู้มีสีส้มอมน้ำตาล - สีแดง ลำตัวผอมยาว ปีกสีเหลือง สามารถบินได้ ตัวเมียมีสีน้ำตาลเข้ม-ดำ มีแถบเส้นสีครีมบนปีก ลำตัวมีขนาดกว้างกว่าตัวผู้ (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 *Blatta lateralis* (Turkestan cockroach หรือ rusty red cockroach หรือ red runner cockroach) (หมายเลข 1 : ตัวผู้ หมายเลข 2 : ตัวเมีย)

วงศ์ Blattellidae

1. แมลงสาบเยอรมัน (*Blattella germanica* หรือ German cockroach)

Blattella germanica เป็นแมลงสาบขนาดเล็กที่มีการกระจายตัวมากที่สุด มีแหล่งกำเนิดอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของทวีปแอฟริกา แล้วแพร่กระจายไปยังยุโรปตะวันออก ปัจจุบันมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลกแต่พบมากในเขตอบอุ่น *Blattella germanica* มีชื่อสามัญอื่น คือ croton bug หรือ water bug มีขนาดเล็ก ลำตัวยาวประมาณ 12-16 มม. มีสีเหลืองอมน้ำตาล ตัวเต็มวัยเพศเมียมีสีเข้มกว่าและมีส่วนท้องใหญ่กว่าเพศผู้ pronotum มีแถบสีดำ 2 แถบทอดอยู่ตามแนวยาวของ pronotum แมลงสาบชนิดนี้มีปีกเจริญดีทั้ง 2 เพศและมีปีกยาวคลุมส่วนท้อง (รูปที่ 2.8) แมลงสาบตัวผู้มีต่อม (scent gland) สำหรับสร้างสารที่มีกลิ่นเหม็นและมีรูเปิดสู่ภายนอกทางด้านหลังของส่วนท้องปล้องที่ 7 และ 8 ตัวอ่อนมีสีน้ำตาลเข้มและมีแถบสีเหลืองอ่อนอยู่ตรงกลางหลัง ส่วนทางด้านข้างจะมีแถบสีดำ 2 แถบทอดไปตามความยาวของลำตัว เมื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ประมาณ 7-10 วัน เพศผู้และเพศเมียจะผสมพันธุ์กัน หลังจากผสมพันธุ์กันแล้ว 2-3 วัน เพศเมียเริ่มวางไข่โดยนำ ootheca ติดตัวไปด้วยจนไข่ใกล้จะฟักจึงปล่อย ootheca ติดกับวัตถุโดยมีสารเหนียวยึดติดแน่น ระยะฟักตัวของไข่กินเวลาประมาณ 20-30 วัน ใน ootheca แต่ละอันมีไข่อยู่ประมาณ 30-40 ฟอง พบอยู่ในบ้านเรือน เช่น ตามตู้เก็บอาหารในครัว ใต้อ่างล้างชามหรือในห้องน้ำ นอกจากนี้อาจพบได้ตามภัตตาคารหรือเรือโดยสาร ตัวเต็มวัยและตัวอ่อนที่มีขนาดใหญ่อาจอาศัยอยู่ภายนอกอาคารได้

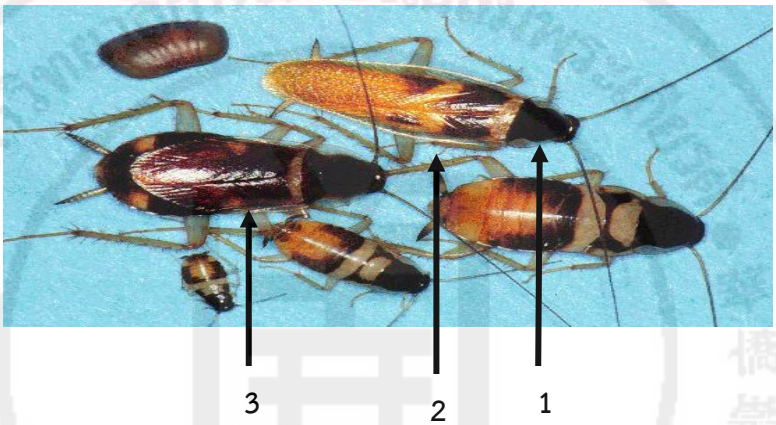
2 1

รูปที่ 2.8 *Blattella germanica* **(หมายเลข 1** : บริเวณด้านหลังของอกปล้องแรก (pronotum) มีแถบสีดำ 2 แถบทอดอยู่ตามแนวยาวของ pronotum **หมายเลข 2** : เพศเมียเริ่มวางไข่โดยนำ ootheca ติดตัวไปด้วยจนไข่ใกล้จะฟัก)

2. *Supella longipalpa* (brown-banded cockroach, tropical cockroach)

แมลงสาบชนิดนี้มีแหล่งกำเนิดและพบมากในทวีปแอฟริกา พบการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั่วโลก ตัวเต็มวัยมีลักษณะภายนอกคล้าย *Blattella germanica* ขนาดลำตัวยาวประมาณ 10-14 มม. pronotum มีสีดำ แต่ตรงขอบด้านข้างมีสีอ่อน ลักษณะที่เด่นชัด คือ มี palpi ยาว

มาก ปีกคู่แรกมีแถบตามขวางสีน้ำตาล 2 แถบ และด้านท้องมีสีครีมทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกันมาก คือ เพศผู้รูปร่างค่อนข้างยาว มีปีกเจริญดีปกคลุมถึงส่วนปลายท้อง ส่วนเพศเมียมีรูปร่างค่อนข้างอ้วนและมีปีกสั้นปกคลุมส่วนท้องไม่มิด (รูปที่ 2.9) เมื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ประมาณ 5-10 วัน เพศผู้และเพศเมียจะผสมพันธุ์กัน หลังจากนั้นอีก 10 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียจะเริ่มวางไข่โดยปล่อยไข่ติดแน่นตามฝาผนัง เฟอร์นิเจอร์ วิทยุ โทรทัศน์ ootheca มีความยาว 4-5 มม. มีสีน้ำตาลแดง มีลักษณะโค้งทำให้มีรูปร่างคล้ายกระเป๋าถือของสุภาพสตรี ใน ootheca แต่ละอันมีไข่อยู่ประมาณ 15-20 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่ได้ประมาณ 10-20 ชุด อาศัยอยู่ตามห้องนอน ตู้เสื้อผ้า หลังกรอบรูป หรือหนังสือที่วางบนชั้น ชอบวางไข่ติดตามขอบหรือภายในเฟอร์นิเจอร์ วิทยุและโทรทัศน์ จึงทำให้มีชื่อสามัญอื่นอีกคือ furniture cockroach หรือ TV cockroach

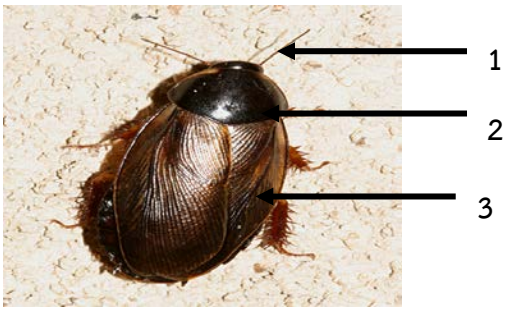


รูปที่ 2.9 *Supella longipalpa* (**หมายเลข 1 :** มีลักษณะภายนอกคล้าย *Blattella germanica* แต่บริเวณ pronotum มีสีดำ **หมายเลข 2 :** ลักษณะที่เด่นชัด คือ มี palpi ยาวมาก ปีกคู่แรกมีแถบตามขวางสีน้ำตาล 2 แถบ เพศผู้รูปร่างค่อนข้างยาว มีปีกเจริญดีปกคลุมถึงส่วนปลายท้อง **หมายเลข 3 :** เพศเมียมีรูปร่างค่อนข้างอ้วนและมีปีกสั้นปกคลุมส่วนท้องไม่มิด)

วงศ์ Blaberidae

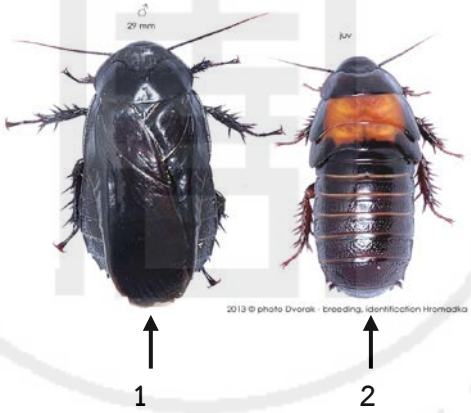
1. แมลงสาบสุรินัม (*Pycnoscelus surinamensis* หรือ Surinum cockroach)

Pycnoscelus surinamensis เป็นแมลงสาบขนาดปานกลาง ตัวผู้ยาว 13-17 มม. ตัวเมียยาว 15-18 มม. หนวดสั้นกว่าลำตัว ปีกเจริญดีมีสีอ่อนกว่าสีของลำตัว pronotum มีแถบสีเหลืองขยายยาวจนคลุมขอบด้านข้าง หรืออย่างน้อยจะเป็นแถบหรือจุดสีเหลืองตรงขอบด้านข้าง ขอบหลังของ pronotum เป็นมุมแหลมมน ส่วนท้องค่อนข้างอ้วนกลม (รูปที่ 2.10) ชอบอาศัยอยู่ภายนอกอาคารบ้านเรือน มักพบในโพรงดินหรือบริเวณที่มีก้อนหินทับ บางครั้งพบอยู่ในบ้านเรือนได้



รูปที่ 2.10 แมลงสาบสุรินัม (*Pycnoscelus surinamensis*) (**หมายเลข 1 :** ส่วนของหนวดนั้นมีขนาดสั้นกว่าลำตัว **หมายเลข 2 :** แผ่นแข็งปกคลุมส่วนหัวและอก (pronotum) มีแถบสีเหลืองขยายยาวจนคลุมขอบด้านข้าง **หมายเลข 3 :** ส่วนบริเวณลำตัวนั้นค่อนข้างอ้วนกลม)

2. Panesthia angustipennis เป็นแมลงสาบขนาดกลาง ยาวประมาณ 15-20 มม. ตัวผู้ยาว 13-17 มม. ตัวเมียยาว 15-18 มม. หนวดสั้นกว่าลำตัว ปีกเจริญดี มีสีอ่อนกว่าสีของลำตัว pronotum มีแถบสีเหลืองขยายยาวจนคลุมขอบด้านข้าง หรืออย่างน้อยจะเป็นแถบหรือจุดสีเหลืองตรงขอบด้านข้าง (รูปที่ 2.11)



รูปที่ 2.11 *Panesthia angustipennis* **หมายเลข 1** : ตัวผู้ **หมายเลข 2** : ตัวเมีย

ความสำคัญทางการแพทย์ [4, 11]

แมลงสาบสามารถนำเชื้อก่อโรคได้ ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว และไข่พยาธิ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ซึ่งพฤติกรรมในการหาอาหารและกินอาหารของแมลงสาบ เป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่เชื้อโดยวิธีกล (mechanical transmission) (ตารางที่ 2.1) แมลงสาบยังเป็น intermediate host ของพยาธิหลายชนิด ได้แก่ *Macracanthorychus hisudinaceus*, *Moniliformis moniliformis*, *Hymenolepis diminuta*, *Gonglyonema neoplasticum* และ *Spirura gastrophila*[1] นอกจากนี้แมลงสาบยังเป็นสาเหตุสำคัญของอาการแพ้ (allergy) เนื่องจากลำตัวของแมลงสาบและอุจจาระของมันเป็นแหล่งของสารก่อภูมิแพ้ (allergen) ที่พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญอันดับสองที่ก่อโรคภูมิแพ้ในคน โดยเฉพาะกลุ่มคนที่มีฐานะทางสังคมและเศรษฐกิจค่อนข้างต่ำ และในคนไทย

ประมาณร้อยละ 40-60 ให้ผลบวกต่อการทดสอบทางผิวหนังต่อสารสกัดจากแมลงสาบ โดย allergen ที่ตรวจพบในฝุ่นบ้านส่วนใหญ่มักเป็น allergen ของแมลงสาบชนิด *Periplaneta americana* โดยพบมากจากฝุ่นในห้องครัว allergen ของแมลงสาบก่อให้เกิดโทษต่อคนได้จากการหายใจเข้าไปหรือสัมผัสถูกตัว โดยทำให้เกิด allergic rhinitis, allergic conjunctivitis, atypical dermatitis และหอบหืด

ตารางที่ 2.1 เชื้อโรคที่แมลงสาบสามารถแพร่กระจายได้

กลุ่มเชื้อโรค	ชนิดเชื้อโรคที่พบ	โรค
แบคทีเรีย	*Escherichia coli*	Urogenital / intestinal infection
	Klebsiella pneumonia	Pneumonia
	Proteus vulgaris, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Citrobactor freundii*, *Enterobactor cloacae*	Gastrointestinal tract infection Urinary tract infection and upper respiratory tract infection
	Salmonella typhi, *Salmonella typhimurium*	Typhoid, gastroenteritis, other enteric fevers
	Shigella spp.	Dysentary, diarrhea
	Yersinia pestis	Plague
	Staphylococcus aureus	Upper respiratory tract infection, Boils, abscesses
	Enterococcus faecalis	Faecal contamination
	Mycobacterium leprae	Leprosy
ไวรัส	Hepatitis virus	Hepatitis
เชื้อรา	*Aspergillus fumigates*	Aspergillosis
	Candida spp.	Candidiasis
โปรโตซัว	*Entamoeba histolytica*	Entamoebasis
	Giardia lamblia	Diarrhea
พยาธิ	*Ancylostoma duodenale*	Hookworm infection
	Ascaris lumbricoides	Ascariasis
	Enterobius Vermicularis	Pinworm infection
	Necator americanus	Hookworm infection
	Trichuris trichiura	Trichuriasis

เทคนิคทางอณูชีววิทยา [12-14]

1. อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นวิธีการที่ใช้แยกชีวโมเลกุลซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างกันของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้น ๆ ในสนามไฟฟ้า วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการแยกกรดนิวคลิอิก (ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) นิยมใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก โครงรูปเกลียวขดแน่น ที่เรียกว่า ซูเปอร์คอยล์ (supercoil) จะเคลื่อนที่ได้เร็วโครงรูปปลายเปิด (linear form) และรูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ นอกจากนี้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นสูง จะมี ขนาดรูพรุนภายในอะกาโรสเจลเล็กกว่า อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ทำให้ดีเอ็นเอที่มีขนาดและโครงรูปเหมือนกันจะวิ่งในกระแสไฟฟ้าได้ช้ากว่าในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ (ตารางที่ 2.2) เมื่อทำการแยกกรดนิวคลีอิคในสนามไฟฟ้าแล้ว จะนำ อะกาโรสเจล มาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เพื่อตรวจหาตำแหน่งของแถบกรดนิวคลีอิก หลังจากนั้น ตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอทิเดียมโบรไมด์และกรดนิวคลีอิกโดยดูการเรืองแสง (fluorescence) ของสารเชิงซ้อนภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light) โดยวิธีนี้สามารถตรวจหาแถบกรดนิวคลีอิกที่มีปริมาณต่ำขนาด 1 นาโนกรัมได้ ส่วนขนาดของกรดนิวคลิอิกสามารถทราบได้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ DNA marker ที่ทราบขนาดที่แน่นอน

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอ

ความเข้มข้นของอะกาโรส (%)	ขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (กิโลเบส)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-.02
2.0	3-0.1

2. เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) [12-14]

หลักการของ PCR

PCR เป็นการเพิ่มขยายจำนวนหรือปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็นล้านเท่า เทียบ ได้กับการทำดีเอ็นเอโคลนนิ่ง เป็นการเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็น

เอในเซลล์ โดยจะต้องมีเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ไพรเมอร์เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์สายใหม่ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1) ขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยว (denaturation) 2) ขั้นตอนการเกาะของไพรเมอร์ (annealing) และ 3) ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากรหัสของสายแม่แบบ (extension) โดยเมื่อการสังเคราะห์เสร็จ 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอจากเริ่มต้น 2 สาย (1 คู่) เป็น 4 สาย (2 คู่) ตามด้วยไพรเมอร์มาเกาะแล้วการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ เป็นรอบที่ 2 ผลผลิตที่ได้ก็จะเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณ ตามจำนวนรอบที่ใช้ตามสูตร 2^{n} โดย n คือจำนวนรอบที่ใช้ เช่น ถ้าจำนวนรอบ 20 รอบ ก็จะได้ดีเอ็นเพิ่มขึ้น 2^{20} นั้นเอง

ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR 1 รอบ (cycle) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นขั้นตอนที่ดีเอ็นเอต้นแบบถูกทำให้แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว 2 สาย เวลาที่ใช้มักนิยมใช้แค่เพียง 1 นาที โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้สูงถึง 94 องศาเซลเซียส

2. Annealing ในขั้นตอนนี้ primer จะเข้าจับที่ตำแหน่งจำเพาะของดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้ง 2 สาย โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้ประมาณ 45-65 องศาเซลเซียส ทั้งนี้การเลือกใช้อุณหภูมิจะขึ้นอยู่กับค่า Tm-5

3. Extension ขั้นตอนนี้เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase จะทำงานโดยเร่งการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3’ ของ primer ที่จับอยู่บนสายดีเอ็นเอแม่แบบทั้ง 2 สาย ทำให้บริเวณที่ต้องการ (target fragment) จะถูกจำลองได้โดยสมบูรณ์ โดยอุณหภูมิที่นิยมใช้คือ 72 องศาเซลเซียส ทำทั้งหมด 30-40 รอบ จะได้ PCR product ประมาณล้านเท่าของ ๆ เดิม

ประเภทของการเทคนิค Polymerase Chain Reaction

1. Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) เป็นการเพิ่มจำนวนอาร์เอ็นเอโดยวิธี PCR ผ่านการเปลี่ยนแปลงอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA ก่อนด้วยเอ็นไซม์ reverse transcriptase มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการวัดปริมาณ mRNA หรือต้องการหาการแสดงออกของยีนเป้าหมายผ่านการถอดรหัสเป็นอา ร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นการวัดปริมาณในแบบ semi-quantitative

2. Nested PCR เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายแบบ 2 ครั้งปฏิกิริยา โดยจะต้องมีการออกแบบไพรเมอร์เป็น 2 ชุด ที่อยู่ในตำแหน่งภายในดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น ทั้งนี้ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งแรก จะเป็นไพรเมอร์ที่ครอบคลุมดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งหมดที่ต้องการ ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 2 จะออกแบบอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีชิ้นขนาดเล็กลงเมื่อทำปฏิกิริยาครั้งที่สอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น ๆ

3. Hot start PCR เป็นการทำ PCR ที่ให้มีการเริ่มต้นด้วยการใช้อุณหภูมิที่สูงในเวลาที่นานกว่าการทำปฏิกิริยาปกติ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ดีเอ็นเอแม่แบบสามารถแยกเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะใช้เทคนิคนี้ในกรณีที่ดีเอ็นเอแม่แบบมีสัดส่วนของรหัสเบสที่เป็น G-C มาก ๆ ทำให้การแยกเกลียวคู่ของดีเอ็นเอต้องใช้พลังงานมาก

4. Two step PCR เป็นการทำ PCR 2 ขั้นตอน จากปกติ 3 ขั้นตอน โดย จะตัดขั้นตอนที่ 2 (annealing) ออก เนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบ มีขนาดยาวและ/หรือมีสัดส่วนของ G-C ค่อนข้างมาก ทำให้ Ta มีค่าสูงมากใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงาน จึงสามารถทำขั้นตอน ที่ 2 พร้อมกับขั้นตอนที่ 3 ในเวลาเดียวกันได้ โดยมีวัตถุประสงค์ในการทำปฏิกิริยาเร็วขึ้น

5. Touch down PCR เป็นการทำ PCR โดยกำหนดจำนวนรอบในช่วงแรกให้มีอุณหภูมิในขั้นที่ 2 (annealing) สูงกว่าค่า Ta เล็กน้อย หลังจากนั้นกำหนดจำนวนรอบที่เหลือให้อุณหภูมิในขั้นตอนที่ 2 ลดลง ทั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์ให้ไพรเมอร์ที่สามารถเกาะกับดีเอ็นเอแม่แบบได้อย่างจำเพาะเท่านั้นที่จะเกิดผลผลิต จากนั้นเมื่อมีผลผลิตที่จำเพาะในปริมาณหนึ่งก็สามารถลดอุณหภูมิลง ไพรเมอร์ก็จะเกาะเฉพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้มากขึ้น โดยวัตถุประสงค์นี้เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่ไม่ใช้เป้าหมายออก

6. Long PCR เป็นการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายทีมีขนาดยาวกว่า 5 กิโลเบส ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาจีโนม เทคนิคที่ดัดแปลงจาก PCR ทั่วไปคือ เพิ่มเวลาการทำงานของเอนไซม์ (ในขั้นตอนที่ 3) ให้มากขึ้นถึง 4-15 นาที และจะต้องเลือกใช้เอนไซม์ที่มีคุณภาพสูงรวมกัน เช่น Tth ร่วมกับ Vent หรือ Taq ร่วมกับ Pwo หรือ Taq ร่วมกับ Pfu

7. Anchored PCR เป็นการเติมส่วนดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าไปที่ปลายของไพรเมอร์ ขณะที่สังเคราะห์ไพรเมอร์ เพื่อใช้ดีเอ็นเอส่วนนี้เป็นที่จับของไพรเมอร์คู่ใหม่ในการทำ PCR รอบใหม่ หรือปฏิกิริยาชุดใหม่ โดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาส่วนของรหัสที่ขาดหายทั้งด้านปลาย 5 ’ และ 3 ’ โดยเฉพาะการหาจุดเริ่มต้นของการสร้างอาร์เอ็นเอ โดยใช้ c-DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวนส่วนปลาย 3 ’ และ 5’ เรียกว่า RACE PCR (Rapid amplification of cDNA Ends-PCR)

8. Degenerated PCR เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายของยีนไม่มีข้อมูลมาก่อน หรือจากข้อมูลที่ได้จากการแปลรหัสจากกรดอะมิโน จึงทำให้การออกแบบไพรเมอร์มีโอกาสเป็นไปได้หลายรหัส เพื่อให้ครอบคลุมรหัสที่ถูกต้องที่สุด จึงจำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์หลายแบบปะปนกัน ซึ่งเรียกว่า degenerative primers

9. Competitive PCR เป็นการทำ PCR เพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบ แบบ semi-quantitative ทำได้ 2 แบบ คือ 1) การใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ในการศึกษาดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ชนิด โดยชนิดแรกเป็นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษาปริมาณ ส่วนดีเอ็นเอชนิดที่สอง เป็นดีเอ็นเอที่เรารู้ปริมาณแต่มีผลผลิตของขนาดดีเอ็นเอไม่เท่ากัน เมื่อได้ผลผลิตดีเอ็นเอชนิดแรกจะมาเปรียบเทียบปริมาณกับผลผลิตของดีเอ็นเอชนิดที่สองนั่นเอง 2) การใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ที่แตกต่างกัน โดยออกแบบให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น มีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อย เพื่อมิให้มีความแตกต่างในการใช้สับสเตรท ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งสองชิ้น โดยที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี่จะจับกับดีเอ็นเอแม่แบบเดียวกันในตำแหน่งที่ต่างกัน ไพรเมอร์คู่หนึ่งจะจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการหาปริมาณ ส่วนไพร์เมอร์อีกคู่หนึ่ง ออกแบบให้จับกับดีเอ็นเอที่มีปริมาณปกติที่แน่นอนแล้วนำมาเปรียบเทียบกันได้

10. Allele specific PCR เป็นการทำ PCR เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของรหัสดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยเน้นความจำเพาะของเบสเดียว หากมีความผิดปกติ หรือมีการเปลี่ยนแปลงผ่าเหล่าของเบสนั้นก็สามารถตรวจสอบได้ เหมาะในการศึกษาการผ่าเหล่าตำแหน่งเดียว (point mutation) เทคนิคนี้เน้นการออกแบบไพรเมอร์และการเลือกเอนไซม์โพลีเมอเรสให้ถูกต้อง กล่าวคือไพรเมอร์ที่ออกแบบเส้นหนึ่งจะมีเบสตัวสุดท้ายที่ปลาย 3 ’ เป็นตัวกำหนดการหาเบสที่ผิดปกติ ถ้าดีเอ็นเอแม่แบบมีเบสถูกต้องไพรเมอร์ จะ สามารถจับได้กับดีเอ็นเอแม่แบบทำให้เอนไซม์สร้างผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ในกรณีที่มีการผ่าเหล่าตำแหน่งดังกล่าวไพรเมอร์จะเกาะได้ไม่สมบูรณ์ โดยตำแหน่งตัวสุดท้ายไม่เกาะ เมื่อใช้เอนไซม์โพลีเมอเรสชนิดที่ไม่มีการตรวจสอบคือขาด exonuclease ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายได้ จึงไม่มีผลผลิตเกิดขึ้น

3. DNA barcodes[7-16]

DNA barcodes เป็นเทคนิคใหม่ที่อาศัยหลักการอณูชีววิทยาในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ใช้ในการศึกษาของความหลากหลายทางชีวภาพ แนวคิดของดีเอ็นเอบาร์โคดมาจากแท่งรหัสบาร์โคดสินค้าเพื่อช่วยให้สามารถบันทึกราคาสินค้าและข้อมูลสินค้าได้อย่างถูกต้อง ช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการจัดเก็บข้อมูล จากแนวคิดนี้ทำให้มีการพัฒนาแท่งรหัสบาร์โคดดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ซึ่งใช้ในการจำแนก จัดกลุ่มและติดตามการเปลี่ยนแปลง จำนวนของสิ่งมีชีวิตในแต่ละพื้นที่ เนื่องจากการจำแนกสิ่งมีชีวิตแบบดั้งเดิม (classical taxonomy) อาศัยความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ ได้แก่ 1) ในการจำแนกชนิดของแมลง ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความซับซ้อนเรียกว่า species complex คือ มีลักษณะภายนอกที่เหมือนกันจนไม่สามารถแยกออกได้ด้วยรูปร่างลักษณะภายนอก แต่มีลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่แตกต่างกันและอยู่ในสภาพทางภูมิศาสตร์ที่ต่างกัน 2) ไม่สามารถใช้ลักษณะรูปร่างในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในทุกช่วงอายุของการเจริญเติบโต ต้องรอให้เป็นระยะตัวเต็มวัย จึงสามารถจำแนกชนิดได้ 3) การจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตด้วยลักษณะรูปร่าง จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมากเพื่อใช้ยืนยันชนิด 4) การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะรูปร่างต้องใช้เวลานาน ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตให้เป็นหมวดหมู่ รวมทั้งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านที่มีความชำนาญโดยเฉพาะ ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีการวิธีการ เพื่อช่วยในการจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีประสิทธิภาพ สะดวกและรวดเร็ว จึงมีการนำหลักการ DNA barcodes มาใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความผันแปรทางลำดับนิวคลีโอไทด์ ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษา DNA barcodes นำไปประยุกต์ใช้ในหลายสาขาได้แก่ การจำแนกชนิดและติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนของสิ่งมีชีวิตในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ส่งผลให้เกิดการอนุรักษ์สิ่งมีชีวิตที่มีแนวโน้มที่จะสูญพันธุ์ หรือมีการค้นพบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ ๆ รวมทั้งนำไปใช้ในการตรวจสอบพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ให้มีความถูกต้อง สามารถใช้ในงานด้านพิพิธภัณฑ์ สาธารณสุข กฎหมาย และเศรษฐกิจ

หลักการของ DNA barcodes ในการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต อาศัยหลักการเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเลือกทำการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความผันแปร

ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน (interspecific variation) สูงกว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่กำหนดให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการจำแนกชนิดของสัตว์ ได้แก่ ดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มากเพียงพอในการจำแนกชนิดได้ดีกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส นอกจากนี้ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย ซึ่งมีจำนวนมากตั้งแต่ 100 - 10,000 genome copies ทำให้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้ง่าย ใช้ได้ดีในกรณีที่มีตัวอย่างสิ่งมีชีวิตไม่มากหรืออาจเกิดการแตกสลาย และดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีเฉพาะส่วนดีเอ็นเอที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ (exon) ทั้งจีโนม ไม่มีส่วนที่แปลรหัสไม่ได้ (intron) หรือมีอยู่น้อยมากทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สั้น เหมาะแก่การนำมาใช้ในการจำแนกชนิด ยีนที่เหมาะสมในการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียนั้น มีหลายชนิด ได้แก่ cytochrome oxidase subunit 1 (COI), cytochrome b (Cyt B), NADH dehydrogenase 4 (ND4) และ NADH dehydrogenase 5 (ND5) โดยแต่ละยีนจะมีอัตราวิวัฒนาการโมเลกุล (rate of molecular evolution) แตกต่างกันไป และมีขนาดลำดับไม่ยาวมากนัก ประมาณ 900 base pairs ยีน COI มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการจำแนกชนิดได้ดีกว่ายีนอื่นเนื่องจาก 1) ดีเอ็นเอตำแหน่งด้าน 5’ COI ของกลุ่มอาณาจักรสัตว์เป็นบริเวณอนุรักษ์ เหมาะสมที่ใช้ในการกำหนดลำดับของไพรเมอร์ (universal primer) ที่เป็นแบบ universal primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตได้หลายชนิด 2) ยีน COI มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงพอต่อการจำแนกชนิด และมีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มากเกินไป เมื่อใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ด้วยเหตุนี้ยีน COI จึงคัดเลือกเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ยีน COI ขนาดประมาณ 700 base pairs จึงเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพราะเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้น และชัดเจน สามารถเพิ่มขยายด้วย PCR ได้ง่าย มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดสูงกว่าภายในชนิดเดียวกัน และมีบริเวณที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved region) ที่ใช้ สำหรับในการกำหนด universal primer เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอได้หลายกลุ่มสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์ สำหรับฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ได้แก่ ฐานข้อมูล GenBank ที่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดยใช้โปรแกรม BLASTn ที่มีรายงานเฉพาะยีนดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เท่านั้น

4. แผนภาพวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetics trees) [13-27]

ความสัมพันธ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตสามารถแสดงได้ด้วย phylogenetic trees ซึ่ง จะประกอบด้วย nodes และ branches โดยกิ่ง 1 กิ่งจะเชื่อม nodes ที่ใกล้กัน 2 nodes เข้าด้วยกัน โดย nodes จะแสดงสิ่งที่ต้องทำการศึกษา (taxonomic units) กับสิ่งที่ทำการเปรียบเทียบจะเรียกว่า operational taxonomic unit (OTUs) โดย branches จะแสดงความสัมพันธ์ของสิ่งที่ต้องการศึกษาในเชิงบรรพบุรุษและลูกหลาน ลักษณะรูปแบบของ trees เรียกว่า topology ความยาวของ branches แสดงจำนวนการ

เปลี่ยนแปลง (หรือแสดงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม) ที่เกิดขึ้นใน branches นั้นอัตราการแทนที่ของกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ (amino acid or nucleotide substitutions) ของแต่ละยีนในจีโนมมีค่าเกือบคงที่ นำไปสู่การนำเอาข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์มาคำนวณหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (phylogenetic relationships) ในระดับต่าง ๆ โดยทั่วไปเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่า ข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ให้รายละเอียดที่มีแบบแผนชัดเจนในด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเทียบเคียงได้กับ ข้อมูลที่มาจากสัณฐานวิทยา วิธีการหนึ่งคือการวิเคราะห์ phylogenetic trees ซึ่ง ประกอบด้วยขั้นตอน ดัง นี้ 1) คัดเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสม 2) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ โดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม 4) นำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic trees ที่เหมาะสมกับข้อมูล และแปลผลการทดลองจาก phylogenetic trees ที่ได้

การวิเคราะห์ข้อมูลพันธุศาสตร์เพื่อนำไปสร้าง phylogenetic trees โดยรูปแบบของข้อมูลแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. ข้อมูลแสดงลักษณะ (discrete characters) ของสิ่งเปรียบเทียบ (operational taxonomic unit, OTUs) ข้อมูลลักษณะนี้ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเปรียบเทียบ หรือจาก restriction site polymorphism ซึ่งข้อมูลแบบนี้จัดเป็นข้อมูลปฐมภูมิ (primary data) สามารถนำไปสร้าง phylogenetic trees ได้โดยตรง โดยวิธี maximum parsimony หรือ maximum likelihood หรือสามารถแปลงข้อมูลเป็นข้อมูลทุติยภูมิ ซึ่งแสดงเป็นค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วนำไปสร้าง phylogenetic trees ต่อไป

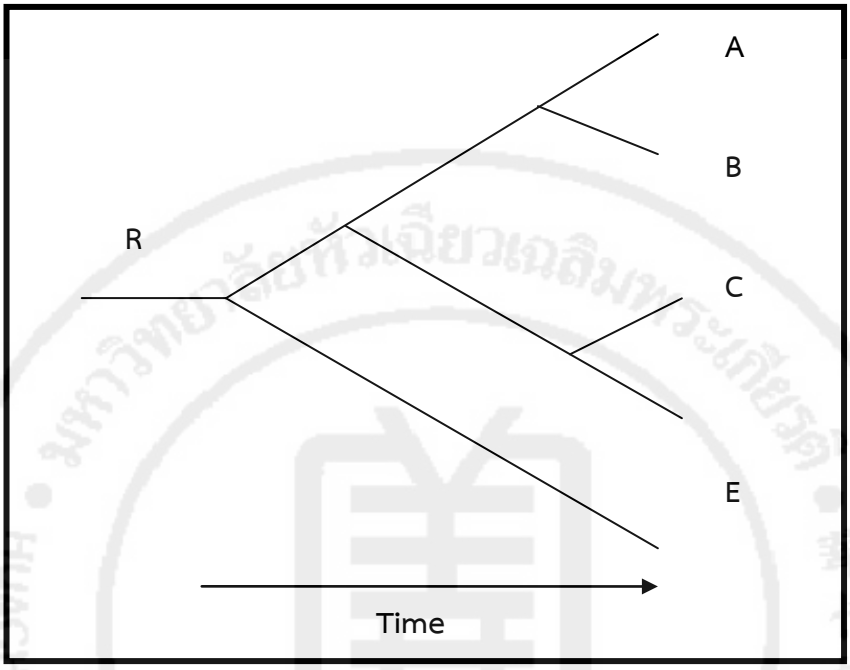
2. ข้อมูลแสดงความแตกต่างหรือความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic distance or similarity) ของสิ่งเปรียบเทียบ ข้อมูลลักษณะนี้จะเป็นข้อมูลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลปฐมภูมิ (primary data) มาเป็นข้อมูลทุติยภูมิ (secondary data) ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งที่เปรียบเทียบ ข้อมูลแบบนี้จะได้มาจาก restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของยีนหรือชิ้น DNA และ VNTR (minisatellites และ microsatellites), amplified fragment length polymorphism (AFLP), DNA fingerprints และ RAPD เป็นต้น

ชนิดของ phylogenetic trees แบ่งแยกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

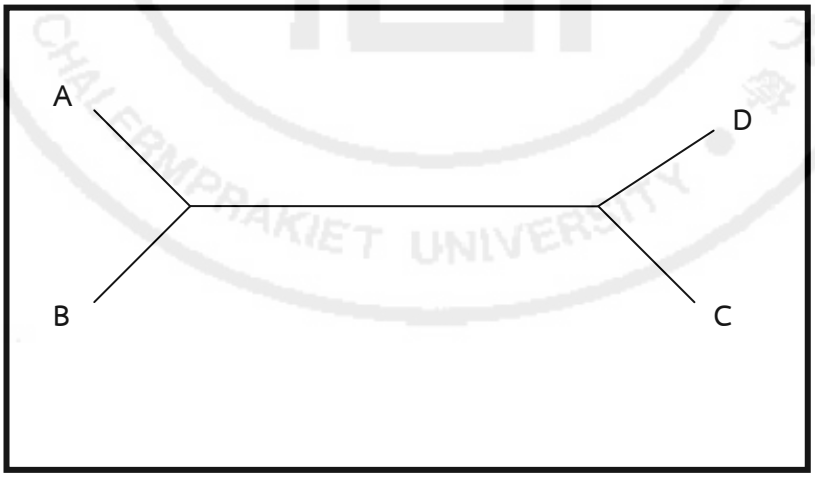
1. Rooted trees จะมีกิ่งที่แสดง common ancestor (R) ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด (OTUs) โดยราก (root) จะเป็นตำแหน่งเริ่มต้นซึ่งเป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วม (common ancestor; R) ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษาทั้งหมด แขนง (branch) เป็นตัวแทนกลุ่มอนุกรมวิธาน 1 กลุ่ม (single taxonomic group) ปม (node) เป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษที่แยกออกเป็นกลุ่มลูก 2 กลุ่ม หรือมากกว่า

ถ้ามีกลุ่ม ลูกมากกว่า 2 กลุ่มเกิดจาก 1 ปม ปมนั้นเรียกว่า โพลิโทมี (polytomy) ยอด (tip) เป็นส่วนปลายสุดของปม เป็นจุดที่แสดงถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ยังคงมีชีวิตอยู่หรือสูญพันธุ์ไปแล้ว (รูปที่ 2.12)

2. Un-rooted trees จะแสดงความสัมพันธ์ของ OTUs ทั้งหมด โดยไม่ระบุตำแหน่งของ บรรพบุรุษ (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.12 Phylogenetic trees ชนิด rooted trees



รูปที่ 2.13 Phylogenetic trees ชนิด un-rooted trees

3. DNA barcodes

DNA barcodes เป็นเทคนิคใหม่ที่อาศัยหลักการชีววิทยาโมเลกุลในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งใช้ในการศึกษาของความหลากหลายทางชีวภาพ แนวคิดของดีเอ็นเอบาร์โคดมาจากแท่งรหัสบาร์โคดสินค้า เพื่อช่วยให้สามารถบันทึกราคาสินค้าและข้อมูลสินค้าได้อย่างถูกต้อง ช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการจัดเก็บข้อมูล จากแนวคิดนี้ทำให้มีการพัฒนาแท่งรหัสบาร์โคดดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ซึ่งใช้ในการจำแนก จัดกลุ่มและติดตามการเปลี่ยนแปลง จำนวนของสิ่งมีชีวิตในแต่ละพื้นที่ (Stoeckle and Hebert, 2008) เนื่องจากการจำแนกสิ่งมีชีวิตแบบดั้งเดิม (classical taxonomy) ซึ่งอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ (Marquardt, 2005) ได้แก่ 1) ในการจำแนกชนิดของแมลง ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความซับซ้อนเรียกว่า species complex ซึ่งก็คือกลุ่มแมลงที่ต่างชนิดกันที่มีลักษณะภายนอกที่เหมือนกันจนไม่สามารถแยกออกได้ด้วยรูปร่างลักษณะภายนอก แต่มีลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่แตกต่างกันและอยู่ในสภาพทางภูมิศาสตร์ที่ต่างกัน 2) ไม่สามารถใช้ลักษณะรูปร่างในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในทุกช่วงอายุของการเจริญเติบโต ต้องรอให้เป็นระยะตัวเต็มวัย จึงสามารถจำแนกชนิดได้ 3) การจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตด้วยลักษณะรูปร่าง จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมากเพื่อใช้ยืนยันชนิด ด้วยเหตุนี้การ จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงไม่เหมาะกับตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย และมีความสำคัญในเชิงอนุรักษ์ 4) การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะ รูปร่างต้องใช้เวลานานมากในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตให้เป็นหมวดหมู่ รวมทั้งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้าน ที่มีความชำนาญโดยเฉพาะ งานดังกล่าวเป็นงานที่ละเอียดอ่อนต้องมีความมานะอุตสาหะสูง ดังนั้น เพื่อที่จะช่วยในงานด้านการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตให้เร็ว และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น Prof. Paul D.N. Hebert และคณะ เป็นผู้ที่มีนำหลักการ DNA barcodes มาใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความผันแปรทางลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันได้ และเป็นผู้ริเริ่มทำให้เกิดโครงการแท่งรหัส baecode ของ

สิ่งมีชีวิต (barcodes of life) ภายใต้การทำงานขององค์กรระหว่างประเทศที่ ชื่อว่า Consortium of the Barcodes of Life จัดตั้งขึ้น ในปี 2005 องค์กรนี้เกิดจากความร่วมมือของนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก ที่มีความคิดรวบรวมข้อมูล DNA barcodes ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดประมาณ 10 ล้านชนิด ได้แก่ โปรติสต์ รา พืชและสัตว์ชนิดต่าง ๆ ให้มีการจัดจำแนกเพื่อให้ได้ข้อมูลของชนิด จัดทำให้เป็นระบบ สามารถสืบค้น อ้างอิง และตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้จึงเกิดเป็นฐานข้อมูลที่ใช้อ้างอิง สำหรับ DNA barcodes ที่เรียกว่า BOLD (BOLD: The Barcodes of Life Data System) ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษา DNA barcodes นำไปประยุกต์ใช้ในหลายสาขาได้แก่ การจำแนกชนิดและติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนของสิ่งมีชีวิตในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ส่งผลให้เกิดการอนุรักษ์สิ่งมีชีวิตที่มีแนวโน้มที่จะสูญพันธุ์ หรือมีการค้นพบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ ๆ รวมทั้งนำไปใช้ในการตรวจสอบพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ให้มีความถูกต้อง สามารถใช้ในงานด้านพิพิธภัณฑ์ สาธารณสุข กฎหมาย และเศรษฐกิจ หลักการของ DNA barcodes ในการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต อาศัยหลักการเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเลือกทำการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน (interspecific variation) สูงกว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) ชิ้นส่วนของดีเอนเอที่กำหนดให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดของสัตว์ ได้แก่ ดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มากเพียงพอในการจำแนกชนิดได้ดีกว่าดีเอนเอในนิวเคลียส นอกจากนี้ดีเอนเอในไมโตคอนเดรีย มีจำนวนมากตั้งแต่ 100 - 10,000 genome copies ทำให้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้ง่าย ใช้ได้ดีในกรณีที่มีตัวอย่าง สิ่งมีชีวิตไม่มากหรืออาจเกิดการแตกสลาย และดีเอนเอในไมโตคอนเดรียมีเฉพาะส่วนดีเอนเอที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ (exon) ทั้งจีโนม ไม่มีส่วนที่แปลรหัสไม่ได้ (intron) หรือมีอยู่น้อยมากทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สั้น เหมาะแก่การนำมาใช้ในการจำแนกชนิด (http://phe.rockefeller.edu/barcodes/) ยีนที่เหมาะสมในการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียนั้น มีหลายชนิดได้แก่ ยีนได้แก่ cytochrome oxidase subunit 1 (COI), cytochrome b (Cyt B), NADH dehydrogenase 4 (ND4) และ NADH dehydrogenase 5 (ND5) โดยแต่ละยีนจะมีอัตราวิวัฒนาการโมเลกุล (rate of molecular evolution) แตกต่างกันไป และมีขนาดลำดับไม่ยาวมากนักประมาณ 900 base pairs ยีน COI มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการจำแนกชนิดได้ดีกว่ายีนอื่น เนื่องจาก 1) ดีเอนเอตำแหน่งด้าน 5’ COI ของกลุ่มอาณาจักรสัตว์เป็นบริเวณอนุรักษ์ เหมาะสมที่ใช้ในการกำหนดลำดับของไพรเมอร์ (universal primer) ที่เป็นแบบ universal primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ ในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตได้หลายชนิด 2) ยีน COI มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงพอต่อการจำแนกชนิด และมีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มากเกินไป เมื่อใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ด้วยเหตุนี้ยีน COI จึงคัดเลือกเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต (Former et al., 1994; Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b; Hajibabaei et al., 2007) ยีน COI ขนาด 650 base pairs จึงเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับ เพราะเป็นชิ้นส่วนดี

เอ็นเอที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่สั้น และชัดเจนสามารถเพิ่มขยายด้วย PCR ได้ง่าย มี ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดสูงกว่าภายในชนิดเดียวกัน และมีบริเวณที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved region) ที่ใช้ สำหรับในการกำหนด universal primer เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอได้หลายกลุ่มสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์ (Kress and Erickson, 2008) สำหรับฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI มี 2 ฐานข้อมูลด้วยกันคือ ฐานข้อมูล GenBank ที่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) [8] และฐานข้อมูล BOLD (Barcodes of Life Data System; http://www.boldsystems.org) ที่มีรายงานเฉพาะยีนดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เท่านั้น โดยเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลแล้ว พบว่ามีความคลึงกันมากกว่าหรือเท่ากับ 97 % จะทำให้สามารถทราบชื่อของสิ่งมีชีวิตนั้น หากมีความคล้ายคลึงน้อยกว่า 97 % จะถูกจัดเป็นสิ่งมีชีตที่ยังไม่เคยรายงานในฐานข้อมูลมาก่อน

4. แผนภูมิรูปต้นไม้ (phylogenetics trees)

ความสัมพันธ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตสามารถแสดงได้ด้วยแผนภูมิรูปต้นไม้ (phylogenetic trees) ซึ่งจะประกอบด้วย nodes และ branches โดยกิ่ง 1 กิ่งจะเชื่อม nodes ที่ใกล้กัน 2 nodes เข้าด้วยกัน โดย nodes จะแสดงสิ่งที่ต้องทำการศึกษา (taxonomic units) กับสิ่งที่ทำการเปรียบเทียบจะเรียกว่า operational taxonomic unit (OTUs)[19] โดย branches จะแสดงความสัมพันธ์ของสิ่งที่ต้องการศึกษาในเชิงบรรพบุรุษและลูกหลาน ลักษณะรูปแบบของ tree เรียกว่า topology ความยาวของ branches แสดงจำนวนการเปลี่ยนแปลง (หรือแสดงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม) ที่เกิดขึ้นใน branches นั้นอัตราการแทนที่ของกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ (amino acid or nucleotide substitutions) ของแต่ละยีนในจีโนมมีค่าเกือบคงที่ นำไปสู่การนำเอาข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์มาคำนวณหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (phylogenetic relationships)[16] ในระดับต่าง ๆ โดยทั่วไปเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่า ข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ให้รายละเอียดที่มีแบบแผนชัดเจนในด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเทียบเคียงได้กับข้อมูลที่มาจากสัณฐานวิทยา วิธีการหนึ่งคือการวิเคราะห์ phylogenetic trees ซึ่ง ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

1. คัดเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสม
2. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง
3. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ โดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม
4. นำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic trees ที่เหมาะสมกับข้อมูล และแปลผลการทดลองจาก phylogenetic trees ที่ได้[18]

การวิเคราะห์ข้อมูลพันธุศาสตร์เพื่อนำไปสร้าง phylogenetic trees

1. รูปแบบของข้อมูล แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

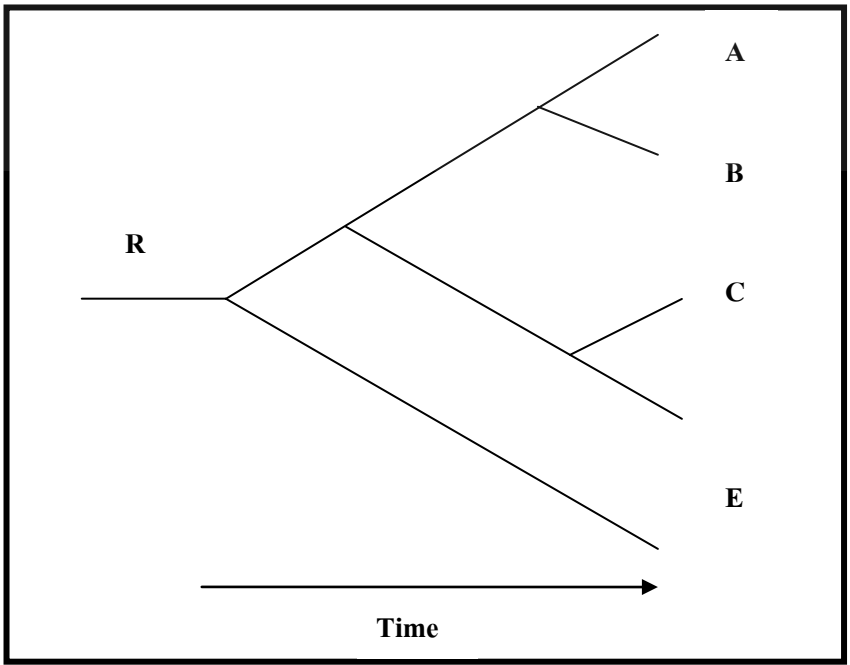
1.1 ข้อมูลแสดงลักษณะ (discrete characters) ของสิ่งเปรียบเทียบ (operational taxonomic unit, OTUs) ข้อมูลลักษณะนี้ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเปรียบเทียบ หรือจาก restriction site polymorphism ซึ่งข้อมูลแบบนี้จัดเป็นข้อมูลปฐมภูมิ (primary data) สามารถนำไปสร้าง phylogenetic trees ได้โดยตรง โดยวิธี maximum parsimony หรือ maximum likelihood หรือสามารถแปลงข้อมูลเป็นข้อมูลทุติยภูมิ ซึ่งแสดงเป็นค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วนำไปสร้าง phylogenetic trees ต่อไป

1.2 ข้อมูลที่แสดงความแตกต่างหรือความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic distance or similarity) ของสิ่งเปรียบเทียบ ข้อมูลลักษณะนี้จะเป็นข้อมูลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลปฐมภูมิ (primary data) มาเป็นข้อมูลทุติยภูมิ (secondary data) ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งที่เปรียบเทียบ ข้อมูลแบบนี้จะได้มาจาก restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของยีนหรือชิ้น DNA และ VNTR (minisatellites และ microsatellites), amplified fragment length polymorphism (AFLP), DNA fingerprints และ RAPD[21] เป็นต้น

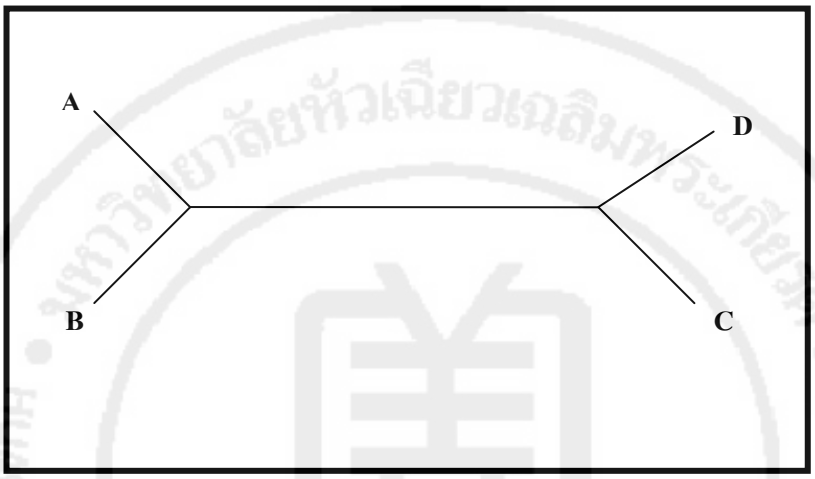
ชนิดของ phylogenetic trees แบ่งแยกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. Rooted tree จะมีกิ่งที่แสดง common ancestor (R) ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด (OTUs) โดยราก (root) จะเป็นตำแหน่งเริ่มต้นซึ่งเป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วม (common ancestor; R)[19] ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษาทั้งหมด แขนง (branch) เป็นตัวแทนกลุ่มอนุกรมวิธาน 1 กลุ่ม (single taxonomic group) ปม (node) เป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษที่แยกออกเป็นกลุ่มลูก 2 กลุ่ม หรือมากกว่า ถ้ามีกลุ่ม ลูกมากกว่า 2 กลุ่มเกิดจาก1 ปม ปมนั้นเรียกว่า โพลิโทมี (polytomy) ยอด (tip) เป็นส่วนปลายสุดของปม เป็นจุดที่แสดงถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิต ที่ยังคงมีชีวิต อยู่หรือสูญพันธุ์ไปแล้ว (รูปที่ 2.12)

2. Un-rooted tree จะแสดงความสัมพันธ์ของ OTUs ทั้งหมด โดยไม่ระบุตำแหน่งของ บรรพบุรุษ (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.12 Phylogenetic trees ชนิด rooted tree



บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

- Autopipette ขนาด 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl และ tip
- 1.5 ml microcentrifuge tube
- PCR tube
- Incubator
- Electrophoresis
- PCR machine
- Vortex
- Centrifuge
- Gel documentation
- Forceps
- ใบมีดผ่าตัด

2. น้ำยาและสารเคมี

- DNA Extraction kit (QIAamp DNA Mini Kit reagent)
- 10 x PCR buffer
- 50 mM $MgCl_2$
- 10 µM primer A (LepF1)
- 10 µM primer B (LepR1)
- 10 mM dNTPs
- Platinum Taq DNA Polymerase 5 U/µl
- ddH_2O
- Agarose gel
- 0.5 x TBE buffer
- Disodium EDTA
- DNA ladder
- 6 x Gel Loading dye
- Ethidium bromide

วิธีการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างตัวเต็มวัยของแมลงสาบ 12 ชนิด ได้แก่ *Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blatta lateralis*, *Blettella germanica*, *Supella longipalpa*, *Pycnocelus surinamensis*, *Panesthia angustipennis*, unknown 1, unknown 2 โดยใช้ส่วนขา ชนิดละ 5 ตัวอย่าง

2. จำแนกชนิดออกเป็นจีนัส สปีชีส์โดยวิธีสัณฐานวิทยา (morphology) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยผู้เชี่ยวชาญ

3. การจำแนกแมลงสาบโดยวิธี DNA barcode

3.1 การ สกัดดีเอ็นเอจากแมลงสาบ โดยใช้ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) ตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

1) นำขาแมลงสาบจำนวน 1 ขาใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

2) ล้างด้วย 70% Alcohol 500 μl จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปบ่มที่ 50°C นาน 1-2 ชั่วโมง

3) เติม ATL buffer 180 μl และ proteinase K 20 μl บ่มที่ 56°C นาน 18-24 ชั่วโมง

4) ดูดสารละลายมาใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ และเติม AL buffer 200 μl ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 70°C นาน 10 นาที

5) เติม Absolute ethanol 200 μl ผสมสารละลายให้เข้ากัน

6) ดูดส่วนใสของสารละลายลงใน QIAamp Spin Column ทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้ membrane อิ่มตัว นำไปปั่นที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที DNA จะเกาะอยู่บน membrane

7) ถอด 1.5 ml microcentrifuge tube ออกจาก QIAamp Spin Column แล้วนำ 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่มาสวม QIAamp Spin Column แทน

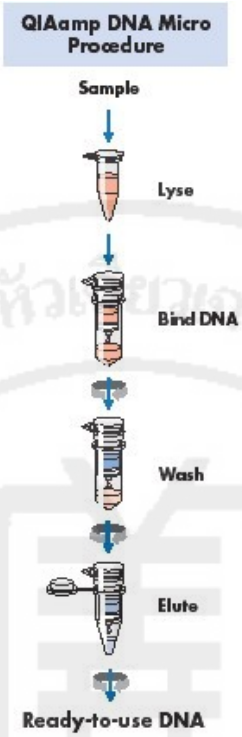
8) เติม AW1 buffer 500 μl ลงใน QIAamp Spin Column แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที ทำซ้ำข้อ 7

9) เติม AW2 buffer 500 μl ลงใน QIAamp Spin Column แล้วนำไปปั่นที่ 14,000 rpm นาน 3 นาที

10) ถอด 1.5 ml microcentrifuge tube ออกจาก QIAamp Spin Column แล้วนำสารละลายใน QIAamp Spin Column ทิ้งไป จากนั้นใส่กลับลงไปใน QIAamp Spin Column หลอดเก่า นำไปปั่นที่ 14,000 rpm นาน 1 นาที ทำให้ buffer ที่เหลืออยู่ออกให้หมด ทำซ้ำข้อ 7

11) เติม AE buffer 50 μl ลงใน QIAamp Spin Column นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที

12) ถอด QIAamp Spin Column ไปใส่ใน 1.5 ml. microcentrifuge tube อันใหม่ ส่วนสารที่อยู่ใน 1.5 ml. microcentrifuge tube หลอดเดิม นำไปแช่ที่ -20°C สารนั้นคือ DNA ที่ได้จากการสกัด เพื่อนำไปใช้ในการทำ Polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณ COI gene ของแมลงสาบในหลอดทดลอง ด้วยวิธี PCR

Primer LepF1 (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3')

LepR1 (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3')

ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย

10X buffer	5 µl
50 mM $MgCl_2$	2.5 µl
10 µM Primer A (LepF1)	0.5 µl
10 µM Primer B (LepR1)	0.5 µl
10 mM dNTPs	0.25 µl
Taq DNA Polymerase 5 U/µl	0.24 µl
ddH_2O	36.01 µl
DNA template	5 µl

ทำตามขั้นตอน ดังนี้

Pre-denaturation	94°C	1	นาที	
Denaturation	94°C	30	วินาที	4 cycles
Annealing	45°C	40	วินาที	
Extension	72°C	1	นาที	
Denaturation	94°C	30	วินาที	35 cycles
Annealing	55°C	40	วินาที	
Extension	72°C	1	นาที	
Final extension	72°C	10	นาที	

นำ PCR product ไป run 1.5% agarose gel โดยใช้ PCR product 5 µl + 6X gel loading dye 1 µl ที่ความต่างศักย์ 120 volts เปรียบเทียบกับ 100 base pairs ladder จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel documentation โดยใช้ COI gene ซึ่งเป็น DNA ที่สกัดได้จากยุง *Anopheles epiroticus* เป็น positive control ส่วน negative control เป็นหลอดที่ไม่ได้เติม DNA template

3.3 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)

นำ PCR product ที่ได้ไปทำการ purified จากนั้นทำการส่ง sequence โดยใช้บริการของบริษัท Pacific Science จำกัด เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Chromas MFC Application, BioEdit, Clustal X และ Mega 4.0, Mega 4.0.2 เพื่อดูความสัมพันธ์ของแมลงสาบแต่ชนิด โดยการวิเคราะห์ phylogenetic tree, interspecific and intraspecific divergence analysis และยืนยันชนิดแมลงสาบโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และ BOLD

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การวิจัยนี้ได้ทำการจำแนกชนิดของแมลงสาบโดยวิธี DNA barcodes เปรียบเทียบกับวิธีสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานโดยผู้เชี่ยวชาญ จำแนกเป็นแมลงสาบที่ทราบชนิด จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blatta lateralis*, *Blettella germanica*, *Supella longipalpa*, *Pycnocelus surinamensis*, *Panesthia angustipennis* พบว่ามีลักษณะตรงตามหลักทฤษฎีที่ระบุไว้ และเป็นแมลงสาบที่ไม่ทราบชนิดอีก 2 ชนิด ได้แก่ unknown 1, unknown 2 ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันกับ *Blettella germanica* (ตารางที่ 4.1) จากนั้นทำการสกัด DNA จากส่วนขาของแมลงสาบชนิดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง ด้วยชุดสกัด DNA QIAGEN Mini Kit และเพิ่มจำนวนยีน COI ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ LepF1 และ LepR1 primer แล้วนำ PCR product ที่ได้มา run 1.5 % agarose gel electrophoresis ได้ DNA product ขนาด 700 base pairs เมื่อเทียบกับ 100 base pair ladder DNA markers จากการทดลองพบว่าสามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน COI ของแมลงสาบทั้ง 12 ชนิด จำนวน 60 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR ได้ (รูปที่ 4.1-4.4)

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (sequencing) พบว่ามี 55 ตัวอย่าง ที่สามารถนำมาศึกษาต่อ ได้ ส่วนอีก 5 ตัวอย่าง ไม่สามารถอ่านผลได้ เนื่องจากขาดความสมบูรณ์ ของ sequence ที่จะนำไปใช้ในการเปรียบเทียบ โดยจำนวน 55 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *Periplaneta americana* 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1 -5) *Periplaneta australasiae* 4 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 2-5) *Periplaneta brunnea* 4 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1, 3-5) *Periplaneta fuliginosa* 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1-5) *Neostylopyga rhombifolia* 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1-5) *Blatta lateralis* 4 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1-4) *Blettella germanica* 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1-5) *Pycnocelus surinamensis* 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1-5) *Supella longipalpa* 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1-5) *Panesthia angustipennis* 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1-5) unknown 1 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1-5) unknown 2 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง 1, 4-5) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก forward primer และ reverse primer โดยใช้โปรแกรม Chromas MFC Application และโปรแกรม ClustalX (รูปที่ 4.5-4.7) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เพื่อยืนยันชนิดของแมลงสาบในฐานข้อมูลของ Genblank ผ่านโปรแกรม Blastn และ IBOL system (รูปที่ 4.8-4.10) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalX และ BioEdit (รูปที่ 4.11 และ 4.12) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาประมวลผลผ่านโปรแกรม Mega 4.0 ได้ผลออกมาเป็นแผนภาพวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดย

เปลี่ยนเป็นไฟล์ .meg ก่อนจะใช้โปรแกรม Mega 4.0.2 และใช้ชันโรง (*Trigona apicalis*) เป็น out group (รูปที่ 4.13-4.18)

จากการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ (interspecifics K2P values) และความแตกต่างภายในสปีชีส์ (maximum intraspecifics K2P values) ของแมลงสาบ โดยใช้คำสั่ง pair wise distance บนโปรแกรม Mega 4.0 จากแผนภาพวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic trees) ชนิด Neighbor-joining และสถิติที่ใช้คือ Kimura-2-parameter (K2P) ซึ่งค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมากกว่า 0.02 จะถือว่าแมลงสาบชนิดนั้น ๆ อยู่ต่างสปีชีส์กัน ซึ่งหมายความว่า 0.02 มีค่าเท่ากับ 2% นั่นคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดที่มีขนาด 100 base paires เมื่อนำมาเปรียบเทียบกัน ถ้ามีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมากกว่า 2 base paires จะถือว่าสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดนี้อยู่ต่างสปีชีส์กัน[27- 31]

จากการศึกษาความแตกต่างภายในสปีชีส์ (intraspecifics K2P value) จะพบว่าแมลงสาบที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันทั้ง 12 ชนิด มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.00-0.015 โดย *Supella longipalpa*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blatta lateralis*, *Blattella germanica*, *Pycnocelus surinamensis*, unknown 1 มีค่า ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ 0.00 ส่วน *Periplaneta americana*, *Periplaneta brunnea*, *Panesthia angustipennis*, unknown 2 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ 0.013, 0.015, 0.001, 0.004 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ไม่เกิน 0.02 ทุกชนิด (รูปที่ 4.18 และตารางที่ 4.2)

เมื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ พบว่าแมลงสาบทั้ง 12 ชนิด มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างแมลงสาบแต่ละชนิดตั้งแต่ 0.097-0.268 ซึ่งมีค่า ระยะห่างทางพันธุกรรมมากกว่า 0.02 ยกตัวอย่างเช่น *Supella longipalpa* มีค่าความแตกต่างระหว่างสปีชีส์กับ *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta americana*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Panesthia angustipennis*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blatta lateralis*, *Blattella germanica*, *Pycnocelus surinamensis*, unknown 1, unknown 2 เท่ากับ 0.212, 0.248, 0.215, 0.223, 0.201, 0.216, 0.224, 0.226, 0.230, 0.248 และ 0.265 ตามลำดับ ส่วนชันโรง (*Trigona apicalis*) ที่เป็น out group มีค่าความแตกต่างระหว่างสปีชีส์กับแมลงสาบทั้ง 12 ชนิด ตั้งแต่ 0.477-0.547 (รูปที่ 4.18 และตารางที่ 4.3)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงสาบทั้ง 12 ชนิด ไปยืนยันชนิดของแมลงสาบใน Genbank และ IBOL system พบว่าแมลงสาบที่ทราบชนิด 8 ชนิด ได้แก่ *Supella longipalpa*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta americana*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blattella germanica*, *Pycnocelus surinamensis* ให้ผลยืนยันชนิดของแมลงสาบสอดคล้องกับสัณฐานวิทยาทุกตัวอย่างใน GenBank และ IBOL system ยกเว้นแมลงสาบ 4 ชนิด ได้แก่ *Blatta lateralis*, *Panesthia angustipennis*, unknown 1 และ unknown 2 ที่ให้ผล

ไม่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดย *Blatta lateralis* ให้ผลไม่สอดคล้องทั้งใน GenBank และ IBOL system โดยให้ผลการยืนยันของแมลงสาบชนิดนี้ได้เพียงอันดับ (order) Blattaria 100% *Panesthia angustipennis* ให้ผลการยืนยันชนิดของแมลงสาบโดย GenBank และ IBOL system ตรงกับ *Periplaneta fuliginosa* 91% และ 90.84% ตามลำดับ อาจเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Panesthia angustipennis* และ *Periplaneta fuliginosa* มีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน คือ pronotum มีสีน้ำตาลเข้ม ปีกที่ปกคลุมลำตัวมีสีเข้ม แต่ *Panesthia angustipennis* จัดอยู่ในแมลงสาบขนาดกลาง มีความยาวของลำตัวประมาณ 20-25 มม. ขณะที่ *Periplaneta fuliginosa* จัด เป็นแมลงสาบขนาดใหญ่ มีความยาวของลำตัวประมาณ 30-34 มม. ส่วน unknown 1 ให้ผลยืนยันชนิดของแมลงสาบใน GenBank สอดคล้องในอันดับ (order) Blattaria 85% และใน IBOL system สอดคล้องกับวงศ์ (family) Blattelladae 86.28% ส่วน unknown 2 ให้ผลยืนยันชนิดของแมลงสาบใน GenBank และ IBOL system สอดคล้องกับ Blattaria 86% และ 86.73% ตามลำดับ

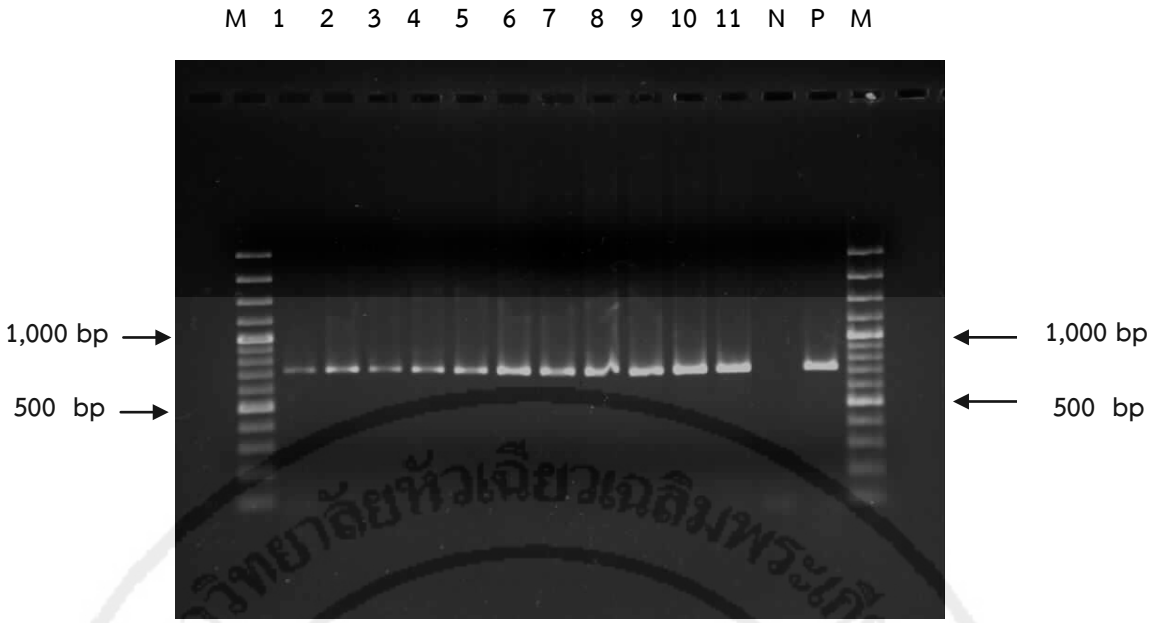
จากผลของแผนภาพวงศ์วานวัฒนาการพบว่า แมลงสาบที่มีวิวัฒนาการแตกต่างระหว่างสปีชีส์มาก ได้แก่ *Pycnocelus surinamensis*, unknown 1, *Supella longipalpa*, *Blattella germanica* และ unknown 2 โดยที่แมลงสาบ unknown 2 ,ความสัมพันธ์กันกับ *Blattella germanica* ส่วนแมลงสาบที่เหลืออีก 7 ชนิด ได้แก่ *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta americana*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blatta lateralis*, *Panesthia angustipennis* มีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกันร้อยละ 90 คาดว่าน่าจะมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า *Periplaneta americana*, *Periplaneta brunnea*, *Panesthia angustipennis* และ unknown 2 มีความหลากหลายในสปีชีส์เดียวกันสูงกว่าแมลงสาบชนิดอื่น ๆ (รูปที่ 4.18)

ตารางที่ 4.1 การจำแนกชนิดของแมลงสาบที่นำมาศึกษา

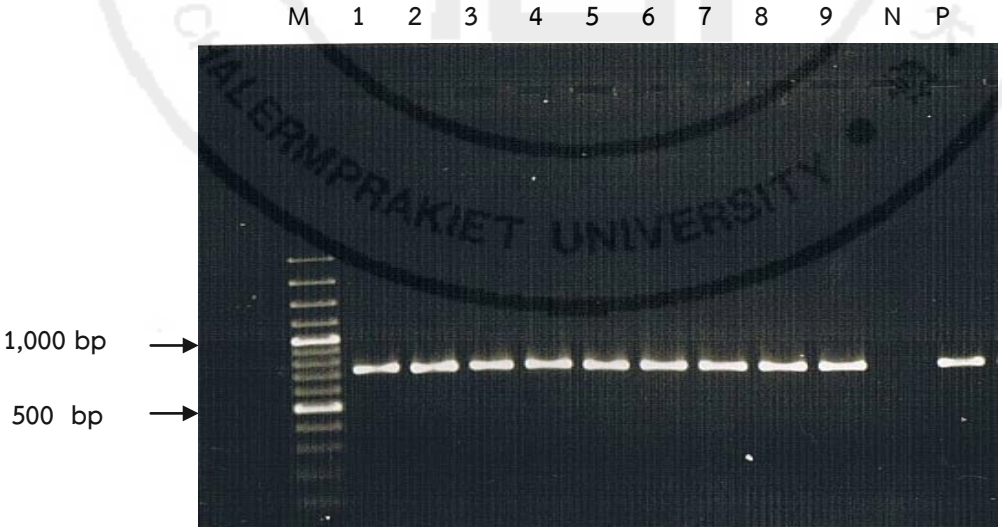
ชนิด	ลักษณะสำคัญ
1. แมลงสาบอเมริกัน (*Periplaneta americana* หรือ American cockroach)	มีขนาดใหญ่มีลำตัวยาวประมาณ 30-40 มม. มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนท้องของตัวเต็มวัยเพศเมียใหญ่กว่าเพศผู้และไม่มี stylets ที่ขอบนอกของ pronotum มีสีเหลืองตัดกับสีน้ำตาลที่อยู่ด้านใน
2. แมลงสาบออสเตรเลีย (*Periplaneta australasiae* หรือ Australian cockroach)	มีขนาดใหญ่ ลำตัวยาวประมาณ 27-33 มม. ลักษณะทั่วไปคล้ายกับ *Periplaneta americana* แต่มีข้อที่แตกต่างกันคือ *Periplaneta australasiae* มีแถบสีเหลืองอ่อน (pale streak) ยาวประมาณ 1/3 ของปีกอยู่ที่ด้านข้างของปีกคู่แรกข้างละแถบ
3. *Periplaneta brunnea* (large brown cockroach)	มีลักษณะคล้ายกับ *Periplaneta americana* แต่ต่างกันที่ cerci โดย cerci ของ *Periplaneta brunnea* มีรูปร่างอ้วนสั้นและโป่งตรงกลางคล้ายรูปกระสวย ส่วน cerci ของ *Periplaneta americana* มีรูปร่างเรียวยาวและปลายแหลมเพรียวกว่า
4. *Periplaneta fuliginosa* (smoky brown cockroach)	มีขนาดใหญ่ มีลักษณะใกล้เคียงกับแมลงสาบอเมริกัน แต่ลำตัวสีน้ำตาลเข้มมันวาว ทั้งตัวผู้และตัวเมียยาวประมาณ 30-34 มม. หนวดเรียวและยาวกว่าลำตัว ทั้งสองเพศมีปีกเจริญดีและยาวคลุมถึงปลายของส่วนท้อง
5. *Neostylopyga rhombifolia* (Harlequin cockroach)	มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 25-30 มม. ลักษณะลำตัวเป็นรูปไข่ มีลักษณะปีกหน้าซึ่งหดสั้นลงกลายเป็นติ่งเล็ก ๆ ลำตัวมีสีสันสดใสเป็นลวดลายสีเหลืองสลับกับสีดำ ตัวเต็มวัยเพศเมียจะอ้วนและป้อมกว่าเพศผู้
6. *Blatta lateralis* (Turkestan cockroach หรือ rusty red cockroach หรือ red runner cockroach)	มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 30 มม. ตัวผู้มีสีส้มอมน้ำตาล - สีแดง ลำตัวผอมยาว ปีกสีเหลือง สามารถบินได้ ตัวเมียมีสีน้ำตาลเข้ม-ดำ มีแถบเส้นสีครีมบนปีก ลำตัวมีขนาดกว้างกว่าตัวผู้
7. แมลงสาบเยอรมัน (*Blattella germanica* หรือ German cockroach)	มีขนาดเล็ก ลำตัวยาวประมาณ 12-16 มม. มีสีเหลืองอมน้ำตาล ตัวเต็มวัยเพศเมียมีสีเข้มกว่าและมีส่วนท้องใหญ่กว่าเพศผู้ pronotum มีแถบสีดำ 2 แถบทอดอยู่ตามแนวยาวของ pronotum
8. *Supella longipalpa* (brown-banded cockroach)	มีขนาดเล็ก ยาวประมาณ 10-14 มม. ช่วงอกมีสีดำ แต่ตรงขอบด้านข้างมีสีอ่อน ลักษณะที่เด่นชัด คือ มี palpi ยาวมาก ปีกคู่แรกมีแถบตามขวางสีน้ำตาล 2 แถบ หรือบริเวณปีกไม่มีแถบสีน้ำตาล

ชนิด	ลักษณะสำคัญ
9. แมลงสาบสุรินัม (*Pycnoscelus surinamensis* หรือ Surinum cockroach)	มีขนาดลาง ตัวผู้ยาว 13-17 มม. ตัวเมียยาว 15-18 มม. หนวดสั้นกว่าลำตัว ปีกเจริญดี มีสีอ่อนกว่าสีของลำตัว pronotum มีแถบสีเหลืองขยายยาวจนคลุมขอบด้านข้าง หรืออย่างน้อยจะเป็นแถบหรือจุดสีเหลืองตรงขอบด้านข้าง
10. *Panesthia angustipennis*	มีขนาดกลาง ลำตัวยาวประมาณ 15-20 มม. ตัวผู้ยาว 13-17 มม. ตัวเมียยาว 15-18 มม. หนวดสั้นกว่าลำตัว ปีกเจริญดี มีสีอ่อนกว่าสีของลำตัว pronotum มีแถบสีเหลืองขยายยาวจนคลุมขอบด้านข้าง หรืออย่างน้อยจะเป็นแถบหรือจุดสีเหลืองตรงขอบด้านข้าง
11. Unknown 1, unknown 2	เป็นแมลงสาบขนาดเล็ก ทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก และเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพบว่าคล้ายกับแมลงสาบเยอรมัน (*Blattella germanica*) มาก มี ขนาดลำตัวยาวประมาณ 10-14 มม. pronotum มีสีดำ ตรงขอบด้านข้างมีสีอ่อน ลักษณะที่เด่นชัดคือ มี palpi ยาวมาก เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกัน คือ เพศผู้รูปร่างค่อนข้างยาว มีปีกเจริญดีปกคลุมถึงส่วนปลายท้อง ส่วนเพศเมียมีรูปร่างค่อนข้างอ้วน และมีปีกสั้นปกคลุมส่วนท้องไม่มิด ส่วนที่ทำให้แมลงสาบ 2 ชนิดนี้แตกต่างกันก็คือ ส่วนของปีก จะปรากฏลักษณะของปีกอยู่ 2 แบบ คือ unknown 1 มีปีกสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีลาย ส่วน unknown 2 มีแถบสีดำ 2 แถบบริเวณปีกด้านบนใกล้บริเวณ pronotum

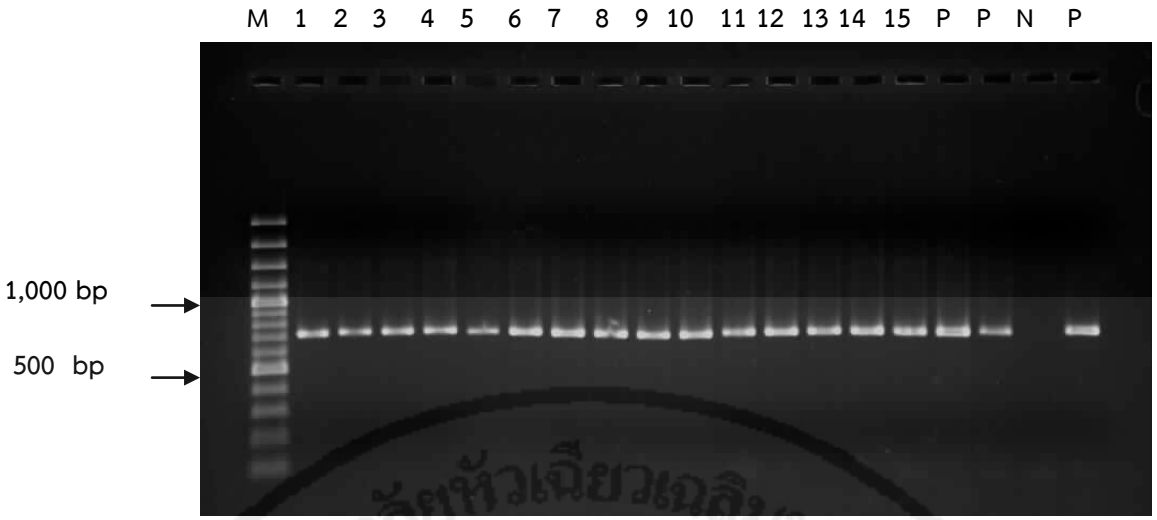
HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY



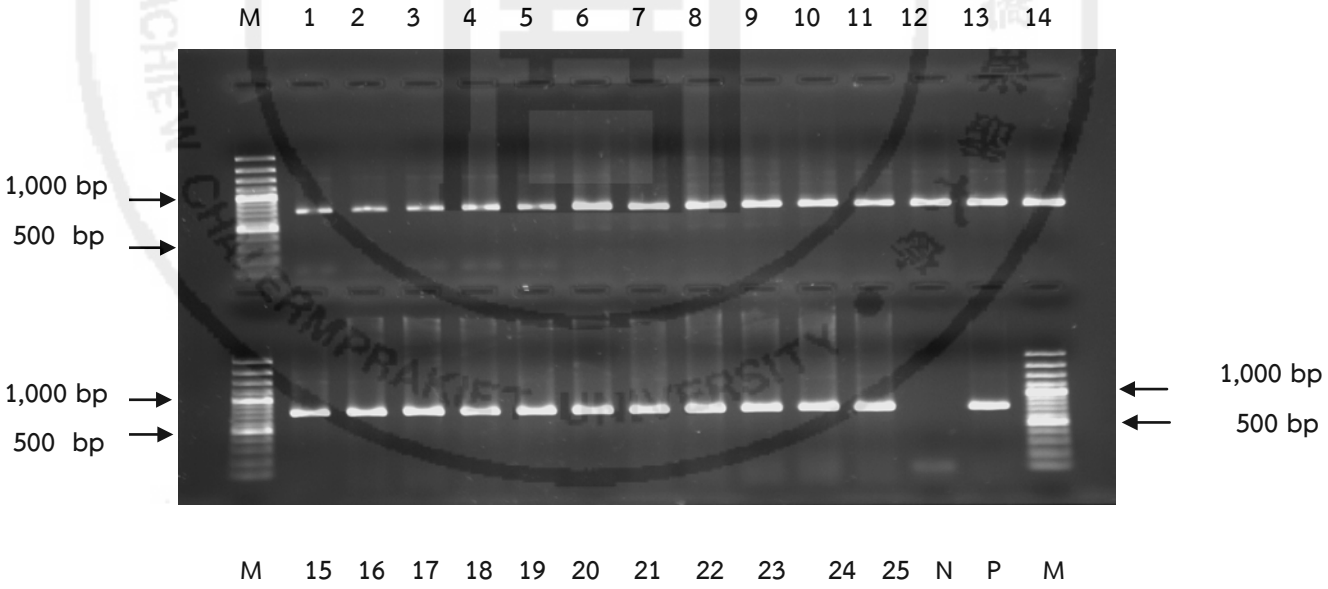
รูปที่ 4.1 Agarose gel electrophoresis ของ ยีน COI ที่ได้จากการทำ PCR ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแมลงสาบ *Periplaneta australasiae* (lane 1-5) *Periplaneta fuliginosa* (lane 6-10) *Panesthia angustipennis* (lane 11) ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 700 base pairs เปรียบเทียบกับ 100 base pairs ladder DNA markers (lane M) lane N: negative control, lane P: positive control (*Anopheles epiroticus*)



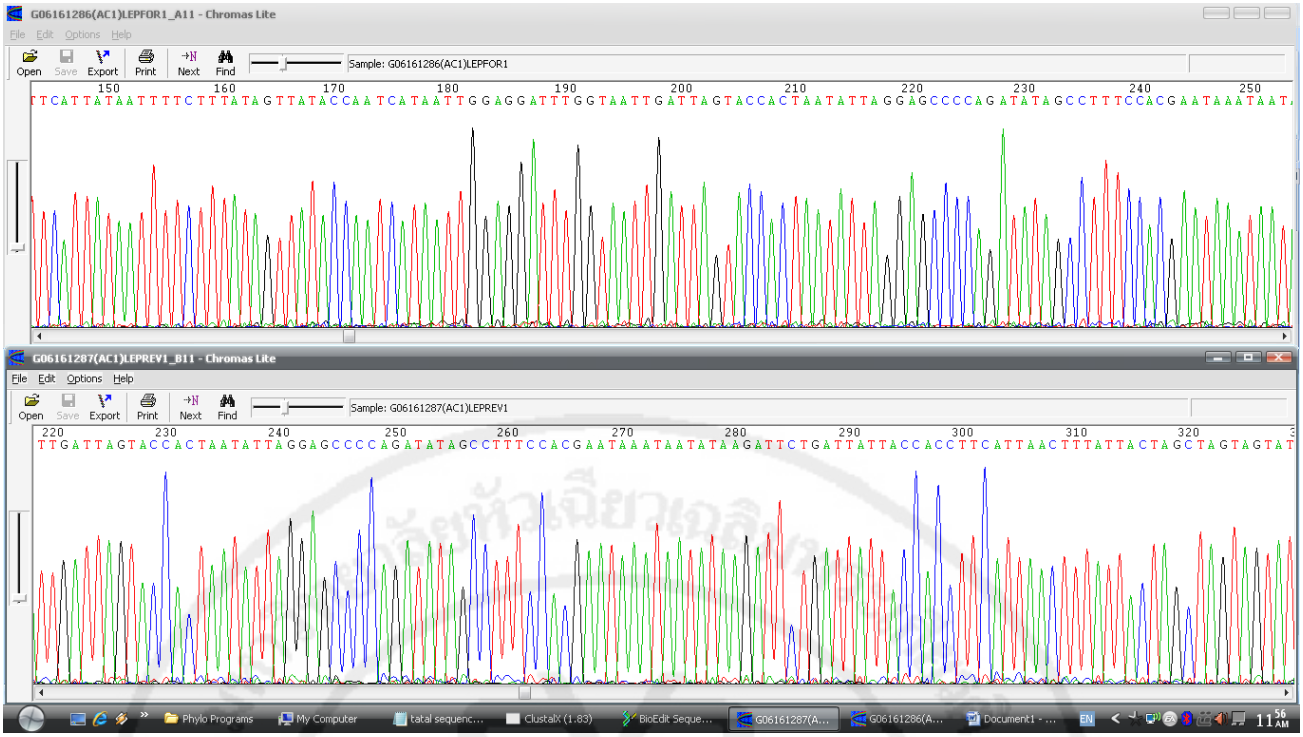
รูปที่ 4.2 Agarose gel electrophoresis ของยีน COI ที่ได้จากการทำ PCR ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแมลงสาบ *Periplaneta brunnea* (lane 1-5) และ *Panesthia angustipennis* (lane 6-9) ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 700 base pairs เปรียบเทียบกับ 100 base pairs ladder DNA makers (lane M) lane N: negative control, lane P: positive control (*Anopheles epiroticus*)



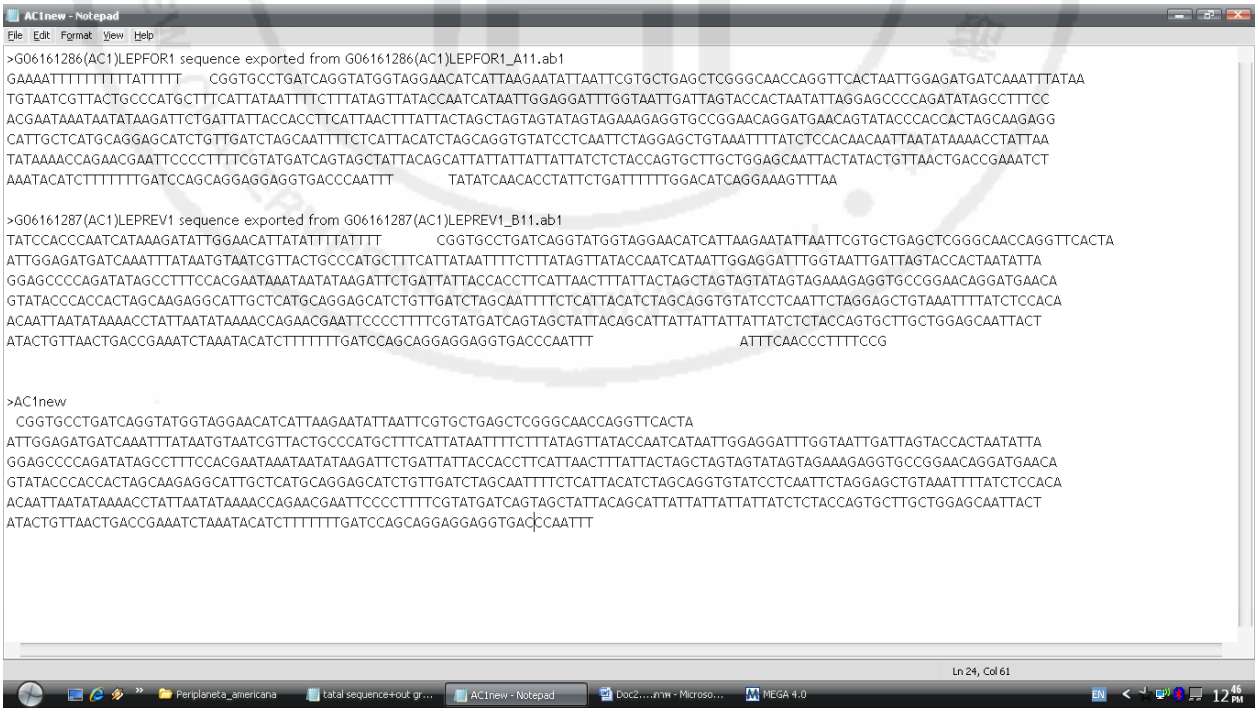
รูปที่ 4.3 Agarose gel electrophoresis ของยีน COI ที่ได้จากการทำ PCR ของ DNA ที่สกัดได้จากแมลงสาบ *Pycnocelus surinamensis* (lane 1-5) *Blatta lateralis* (lane 6-10) *Neostylopyga rhombitolta* (lane 11-15) DNA ที่ได้มีขนาด 700 base pairs เปรียบเทียบกับ 100 base pairs ladder DNA makers (lane M) lane N: negative control, lane P: positive control (*Anopheles epiroticus*)



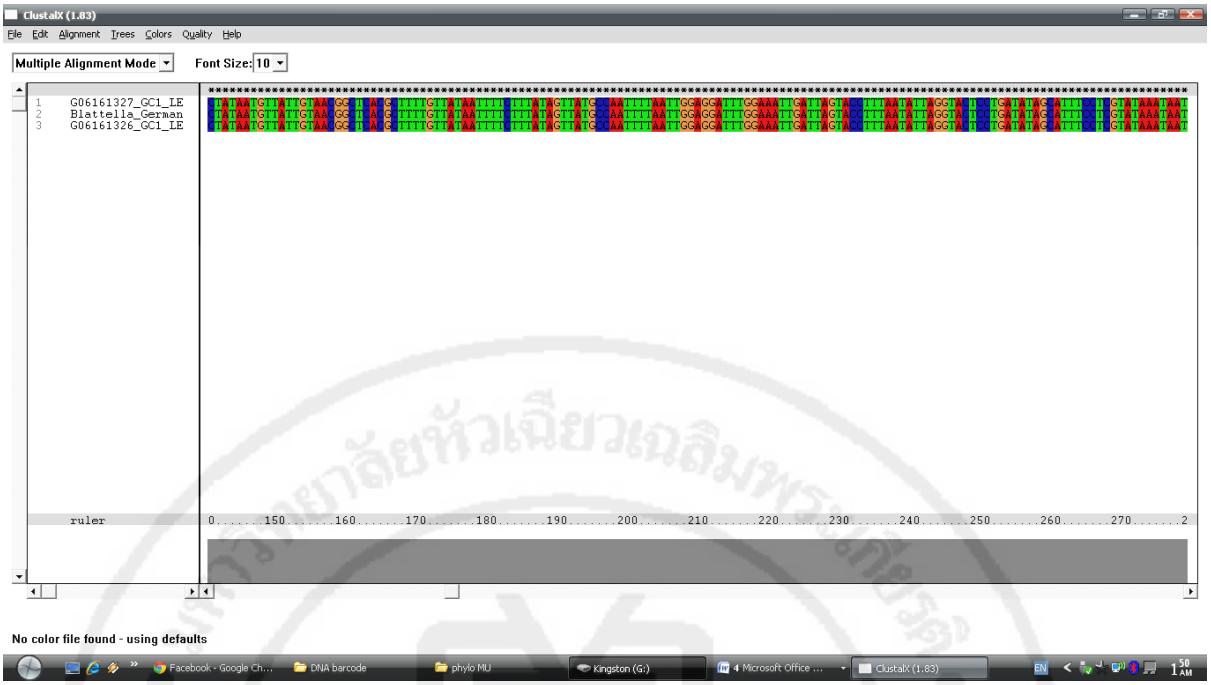
รูปที่ 4.4 Agarose gel electrophoresis ของยีน COI ที่ได้จากการทำ PCR ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแมลงสาบ unknown 1 (Lane 1-5) *Blettella germanica* (Lane 6-10), *Supella longipapa* (Lane 11-15) unknown 2 (Lane 16-20) และ *Periplaneta americana* (Lane 21-25) ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 700 base pairs เปรียบเทียบกับ 100 base pairs ladder DNA markers (lane M) lane N: negative control, lane P: positive control (*Anopheles epiroticus*)



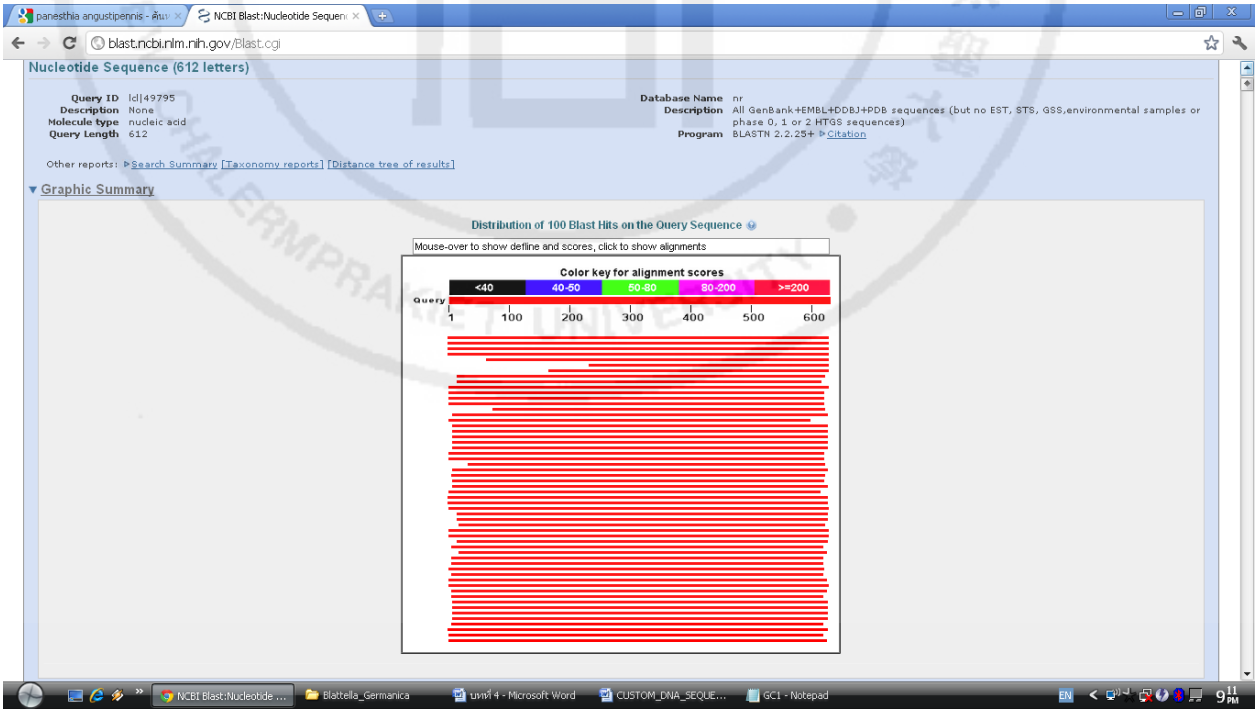
รูปที่ 4.5 Electrophelogram แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่ได้จาก forward primer และ reverse primer อ่านโดยใช้โปรแกรม Chromas เพื่อศึกษาลักษณะของ peak ของนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว



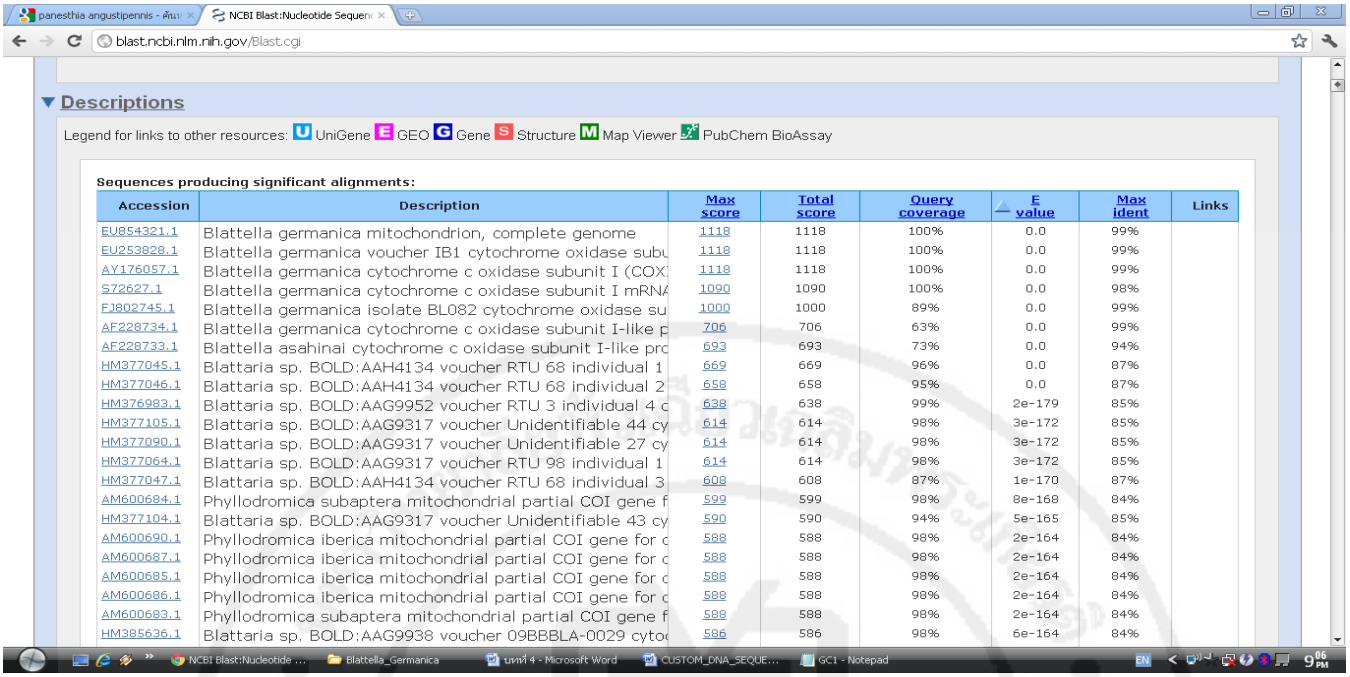
รูปที่ 4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Chromas และถูกบันทึกในโปรแกรม Note Pad



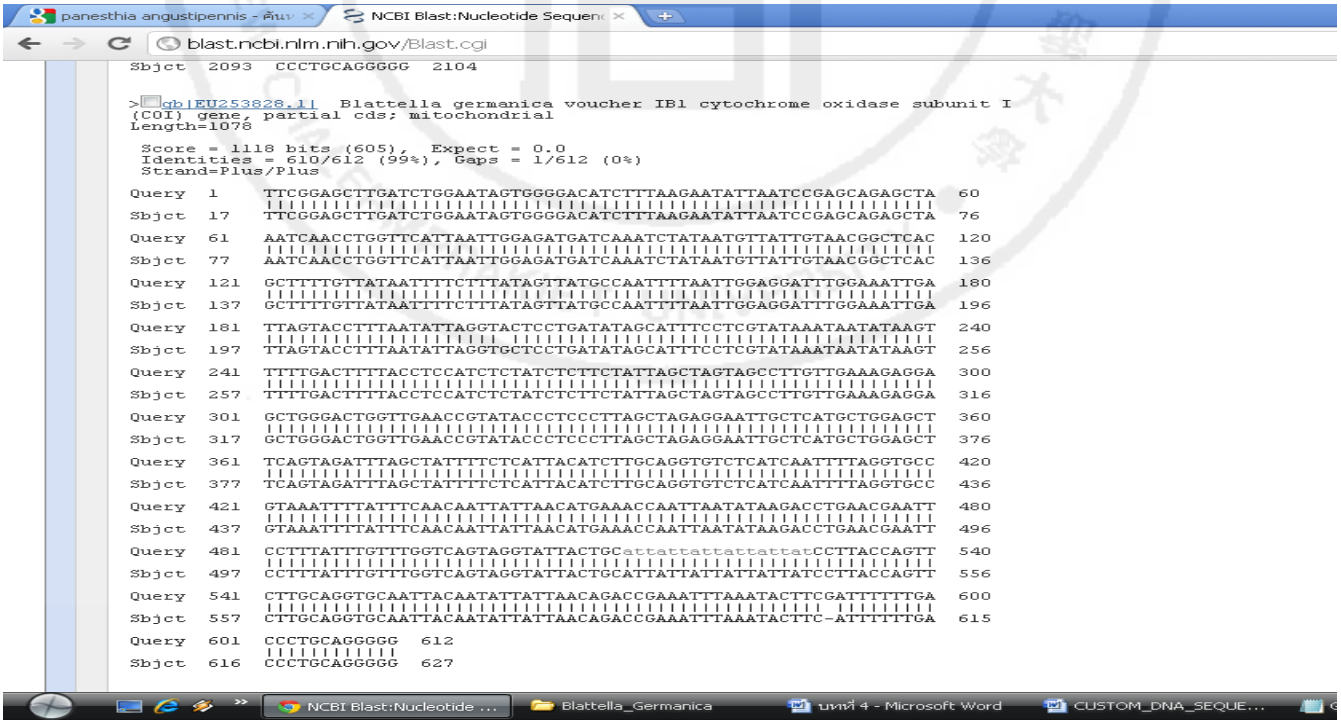
รูปที่ 4.7 Alignment ของ forward primer และ reverse primer ด้วยโปรแกรม ClustalX ของแมลงสาบแต่ละตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 เส้น



รูปที่ 4.8 เส้นที่มีความยาวต่างกันแสดงความความเป็นไปได้ของแมลงสาบจากใน Genblank เปรียบเทียบกับแมลงสาบที่ศึกษา

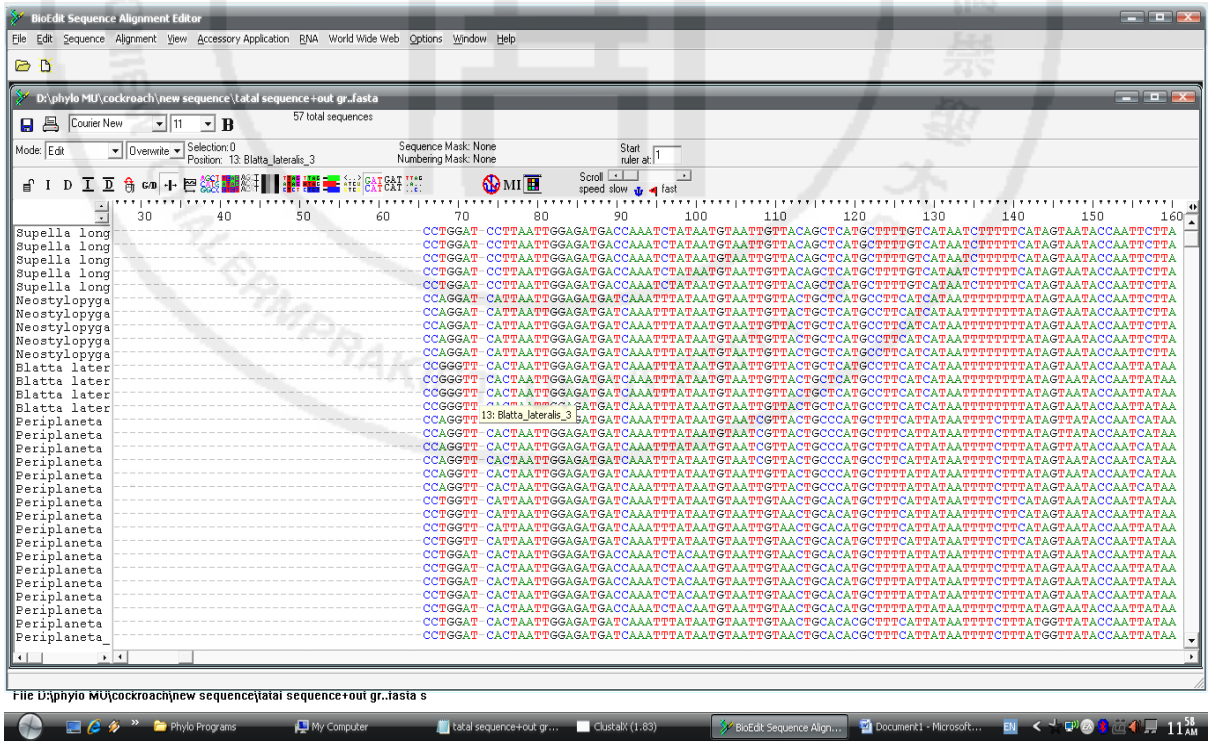


รูปที่ 4.9 ชนิดของแมลงสาบที่มีความเป็นไปได้มากที่สุดโดยดูจาก % Max identical และรายละเอียดของแมลงสาบประกอบกับยีนที่ใช้ในการวิจัย

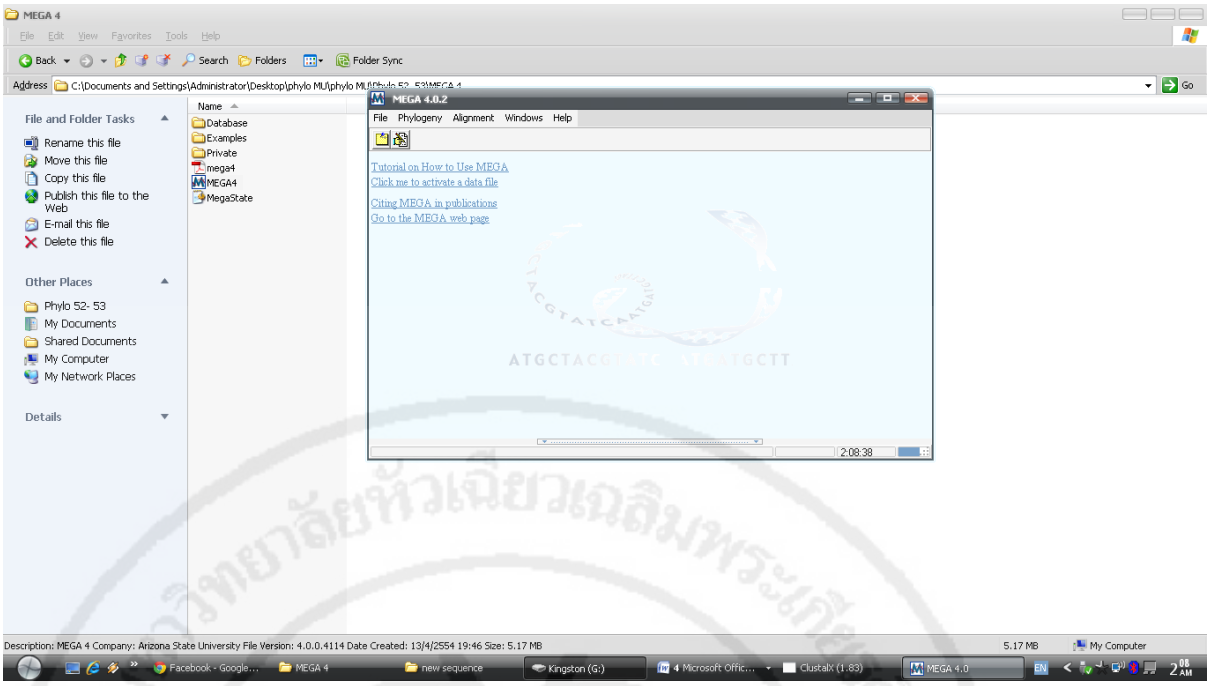


รูปที่ 4.10 การจับคู่กันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงสาบที่สนใจศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงสาบใน Genblank เพื่อเป็นการยืนยันชนิดของแมลงสาบชนิดนั้น ๆ

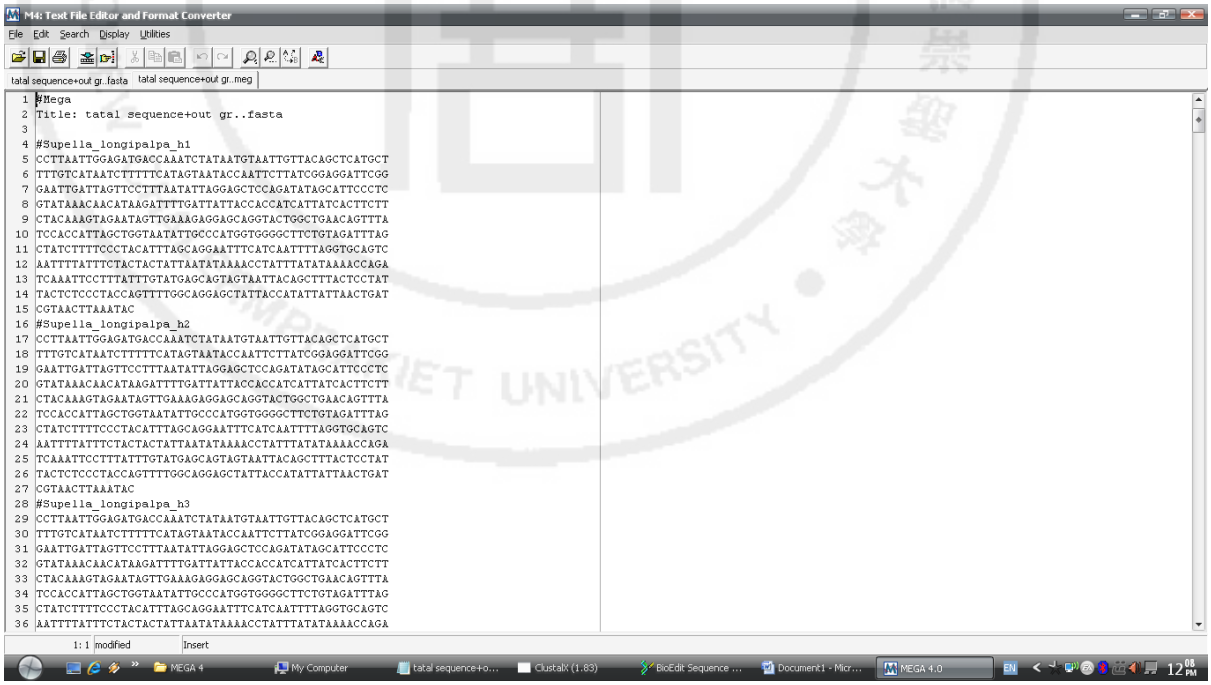
รูปที่ 4.11 ผลจากการใช้โปรแกรม ClustalX ในการทำ alignment แสดงให้เห็นถึงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ complete alignment เพื่อศึกษาความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงสาบแต่ละชนิด และชันโรง (*Trigona apicalis*) เป็น out group



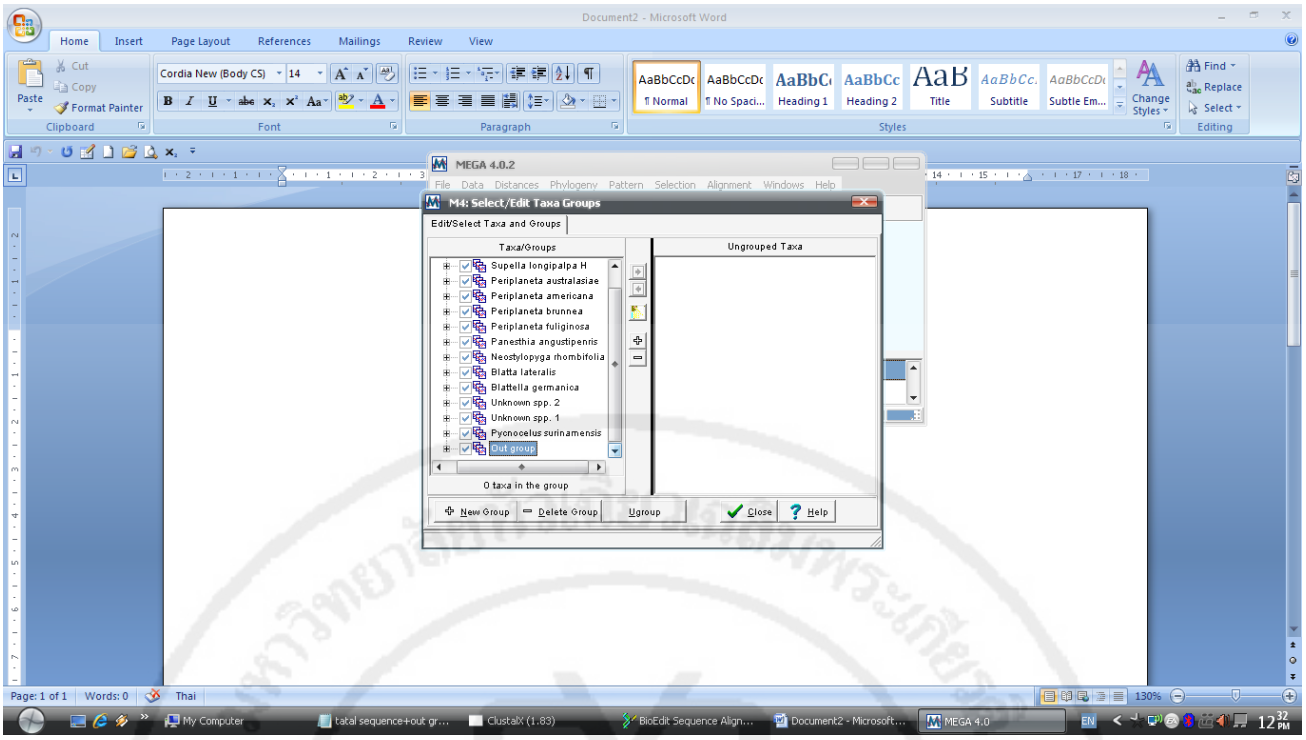
รูปที่ 4.12 การใช้โปรแกรม BioEdit ในการทำ complete alignment และตัดสายนิวคลีโอไทด์ให้มีขนาดเท่ากัน เพื่อนำไปสร้างแผนภาพวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic trees)



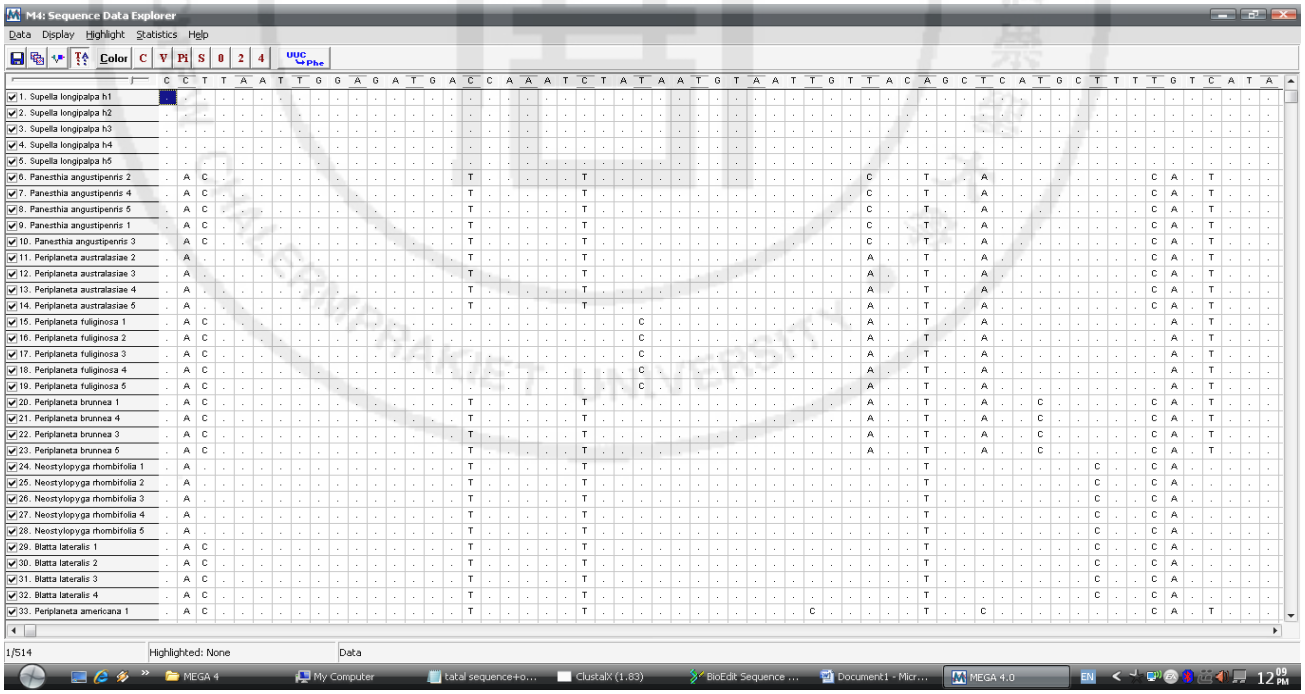
รูปที่ 4.13 หลังจากทำ complete alignment จะนำมาสร้างแผนภาพ phylogenetic trees โดยใช้โปรแกรม Mega 4.0.2



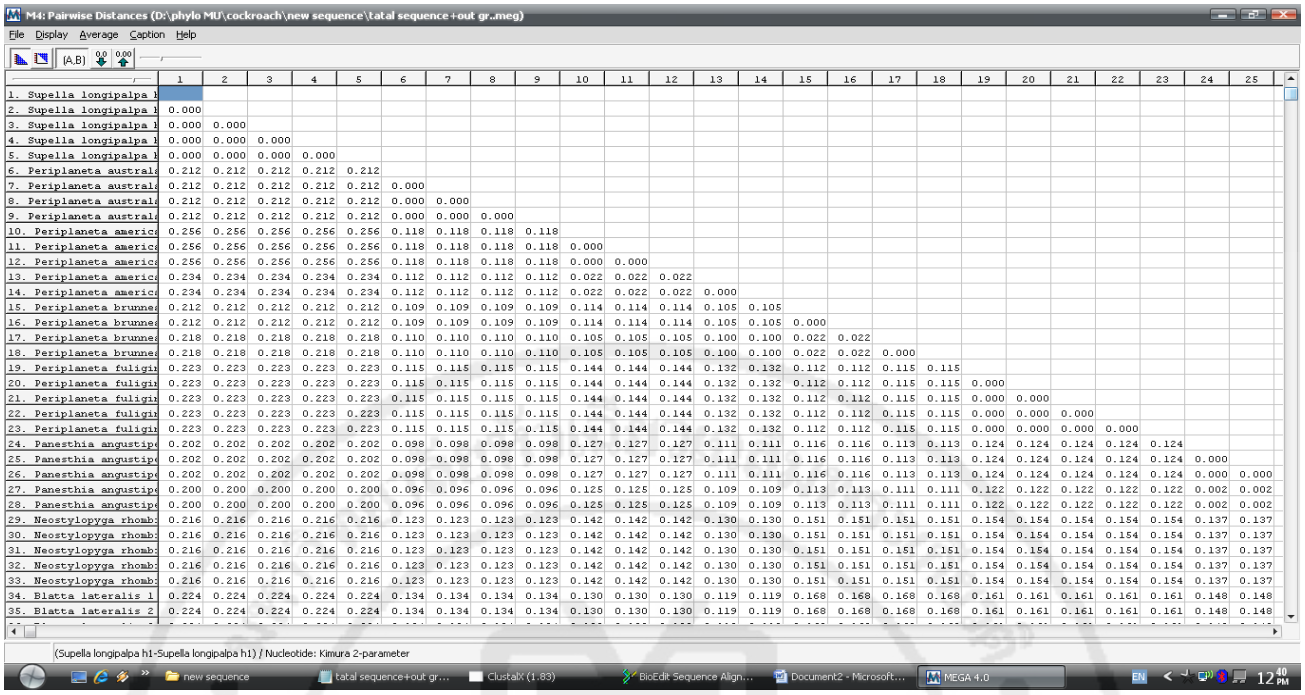
รูปที่ 4.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดก่อนที่จะนำไปสร้างแผนภาพ phylogenetic trees ต้องนำมาเปลี่ยนเป็นไฟล์ .meg ก่อนในโปรแกรม Mega 4.0.2



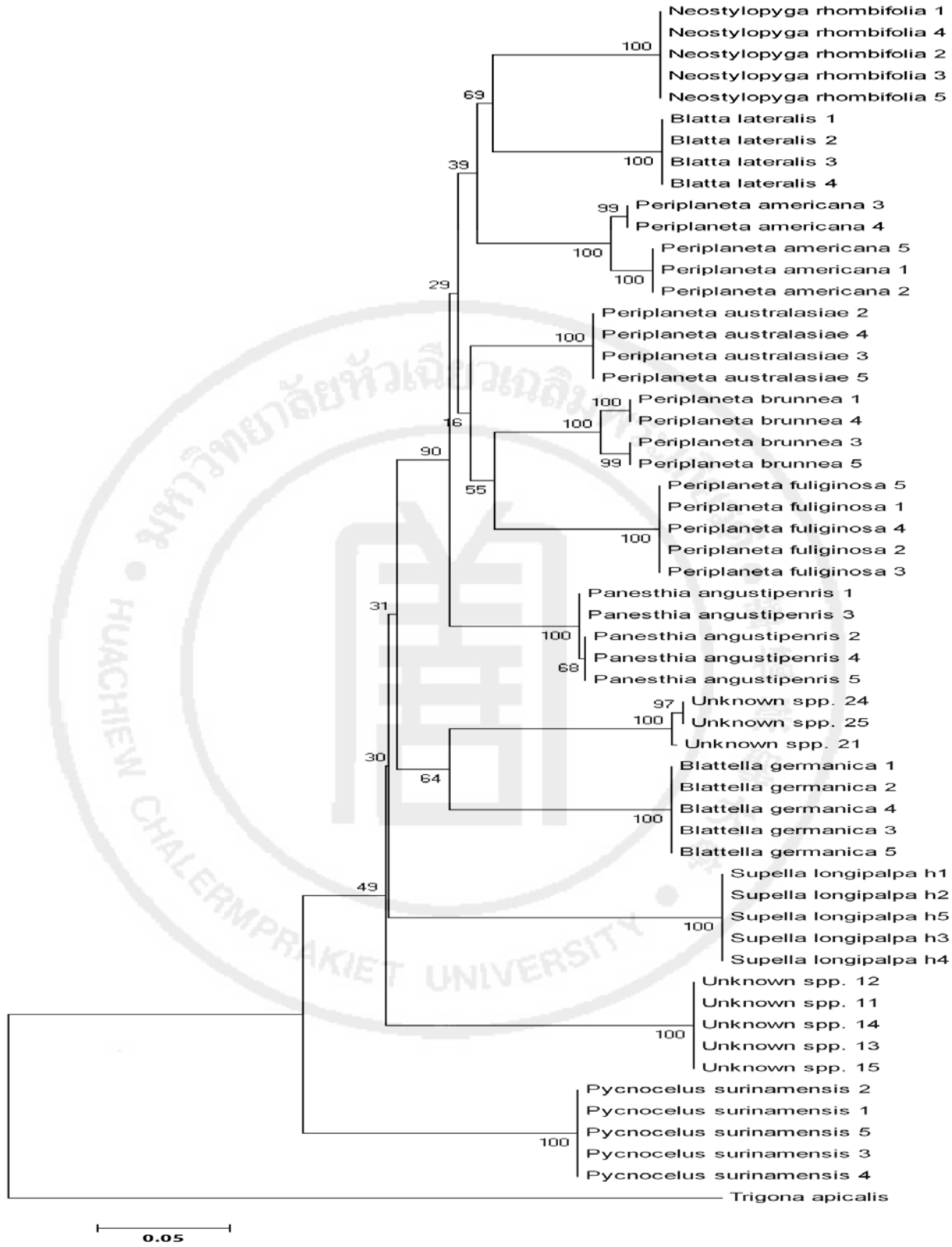
รูปที่ 4.15 เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทั้งสาย แสดงออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างไป



รูปที่ 4.16 ค่า distance pair wise (ระยะห่างทางพันธุกรรม) ของแมลงสาบทั้ง 55 ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม Mega 4.0.2



รูปที่ 4.17 การจัดกลุ่มของแมลงสาบทั้ง 12 ชนิด เพื่อนำไปหาค่าความสัมพันธ์ของแมลงสาบภายในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecifics) และ ความสัมพันธ์ของแมลงสาบที่อยู่ต่างสปีชีส์กัน (interspecifics)



รูปที่ 4.18 วงศ์วานวิวัฒนาการ (NJ phylogenetic tree) โดยคำนวณจากสถิติ Kimura two-parameter จากยีน COI ของแมลงสาบ

ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ของแมลงสาบภายในสปีชีส์เดียวกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง (intraspecifics) โดยใช้คำสั่ง distance pair wise บนโปรแกรม Mega 4.0.2

Species of cockroach	distance
1. *Supella longipalpa*	0.000
2. *Periplaneta australasiae*	0.000
3. *Periplaneta americana*	0.013
4. *Periplaneta brunnea*	0.015
5. *Periplaneta fuliginosa*	0.000
6. *Panesthia angustipennis*	0.001
7. *Neostylopyga rhombifolia*	0.000
8. *Blatta lateralis*	0.000
9. *Blattella germanica*	0.000
10. *Pycnocelus surinamensis*	0.000
11. Unknown 1	0.000
12. Unknown 2	0.004

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

ตารางที่ 4.3 ความแตกต่างของแมลงสาบแต่ละสปีชีส์ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงสาบแต่ละสปีชีส์ (interspecifics) โดยใช้คำสั่ง distance pair wise บนโปรแกรม 4.0.2

	S. longipalpa	*P. australasiae*	*P. americana*	*P. brunnea*	*P. fuliginosa*	*P. angustipenris*	*N. rhombifolia*	*B. lateralis*	*B. germanica*	Unk 1	Unk 2	*P. surinamensis*	*T. apicalis* (out group)
Supella longipalpa	0.000												
Periplaneta australasiae	0.212	0.000											
Periplaneta americana	0.248	0.116	0.013										
Periplaneta brunnea	0.215	0.110	0.107	0.015									
Periplaneta fuliginosa	0.223	0.115	0.140	0.113	0.000								
Panesthia angustipenris	0.201	0.097	0.120	0.114	0.123	0.001							
Neostylopyga rhombifolia	0.216	0.123	0.137	0.151	0.154	0.136	0.000						
Blatta lateralis	0.224	0.134	0.126	0.168	0.161	0.147	0.127	0.000					
Blattella germanica	0.226	0.177	0.200	0.195	0.200	0.186	0.197	0.200	0.000				
Unknown 1	0.230	0.170	0.216	0.207	0.206	0.169	0.201	0.192	0.171	0.000			
Unknown 2	0.248	0.197	0.210	0.203	0.234	0.189	0.223	0.205	0.226	0.220	0.000		
Pycnocelus surinamensis	0.265	0.221	0.228	0.222	0.235	0.195	0.235	0.229	0.250	0.268	0.260	0.000	
Trigona apicalis (out group)	0.503	0.487	0.531	0.521	0.537	0.525	0.547	0.512	0.477	0.533	0.483	0.485	0.000

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธี DNA barcodes มาใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงสาบในเบื้องต้นซึ่งยังไม่เคยมีการอ้างถึงวิธี DNA barcodes ในการใช้จำแนกชนิดของแมลงสาบมาก่อน จากการศึกษาพบว่าวิธี DNA barcodes ที่พัฒนาขึ้นมาโดยทำการ เพิ่มจำนวนยีน COI ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ LepF1 และ LepR1 primer จะได้ DNA product ที่มีขนาด 700 base pairs จากนั้นนำดีเอ็นเอ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ alignment และ phylogenetic trees โดยใช้โปรแกรม Chromas MFC Application, BioEdit, Clustal X และ MEGA 4.0 และยืนยันชนิดของแมลงสาบใน Genbank และ IBOL system พบว่าแมลงสาบ 8 ชนิด ได้แก่ *Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea*, *Periplaneta fuliginosa*, *Neostylopyga rhombifolia*, *Blettella germanica*, *Supella longipalpa*, *Pycnocelus surinamensis* ให้ผลสอดคล้องกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนอีก 2 ชนิด ได้แก่ *Blatta lateralis*, *Panesthia angustipennis* ให้ผลไม่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยา โดย *Blatta lateralis* ให้ผลการยืนยันอยู่ในอันดับ (order) Blattaria 100% และ *Panesthia angustipennis* ให้ผลการยืนยันตรงกับ *Periplaneta fuliginosa* ซึ่งอาจเนื่องมาจากลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Panesthia angustipennis* และ *Periplaneta fuliginosa* มีความคล้ายคลึงกันมากในลักษณะภายนอก ส่วน unknown 1 ให้ผลสอดคล้องกับอันดับ (order) *Blattaria* วงศ์ (family) Blattelladae และ unknown 2 ให้ผลสอดคล้องกับ Blattaria และเมื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของแมลงสาบ (interspecifics K2P values) และความแตกต่างภายในสปีชีส์ (intraspecifics K2P value) พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.097-0.268 และ 0.00-0.015 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.02 และ ไม่เกิน 0.02 ตามลำดับ

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าวิธี DNA barcodes โดยใช้ยีน COI สามารถนำมาใช้ในการจำแนกแมลงสาบได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาประมาณร้อยละ 80 โดย ยีนนี้เป็นหนึ่งในยีนที่นิยมใช้เพราะสามารถพบในสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด มีความหลากหลายน้อยในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แต่มีความหลากหลายสูงในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน เป็นยีนที่สามารถเพิ่มขยายชิ้นส่วนของ DNA ได้ด้วย universal primer จึงมีประโยชน์ในการใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต[16-30] นอกจากนี้ยังมีฐานข้อมูลที่จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงสาบไปเปรียบเทียบเพื่อยืนยันชนิดอีกด้วย อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาต่อไป อาจจะมีการพิจารณาใช้ยีนอื่นในการศึกษาเช่น ยีนในไรโบโซม 5S rRNA, 12S rRNA, 16S rRNA หรือยีนในนิวเคลียสส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS1, ITS2)[27-30] เป็นต้น

บรรณานุกรม

1. เวช ชูโชติ. กีฏวิทยาทางการแพทย์. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์อนรรฆนงค์; 2549.

2. ณัฐ มาลัยนวล. แมลงและสัตว์ขาข้อทางการแพทย์ (Medical Entomology). กรุงเทพมหานคร : เรือนแก้วการพิมพ์; 2540.

3. พิไล พูลสวัสดิ์. แมลงและสัตว์ขาปล้องที่สำคัญทางการแพทย์: ที.พี. พริ้นท์; 2538.

4. องุ่น เกียรติวุฒิ. หนอนพยาธิใบไม้ พยาธิตืด ปรสิตอื่น ๆ และแมลงที่สำคัญทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2542.

5. Allison L. Fundamental Molecular Biology. UK: Blackwell Publishing; 2007.

6. จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย. ดีเอ็นเอบาร์โคดและการประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางกีฏวิทยาการแพทย์. วารสารวิจัยรามคำแหง (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). 2555; 15(2) : 26-31.

7. ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. ดีเอ็นเอบาร์โคดในปลาและการประยุกต์ใช้. วารสารนเรศวร พะเยา . 2556; 6(3) : 174-184.

8. Jennifer E. Buhay. “COI like” sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. J of Crustacean Biology. 2009; 29(1): 96–110.

9. Wilson JJ. DNA barcodes for insects. Methods Mol Biol. 2012; 858 :17-46.

10. สุภัทร สุจริต. กีฏวิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: พิศิษฐ์การพิมพ์; 2531.

11. อภิวัฏ ธวัชสิน.ชีววิทยาและการควบคุมแมลงที่เป็นปัญหาสาธารณสุข. นนทบุรี: ดีไรซ์; 2544.

12. สุมาลี ตั้งประดับกุล. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แมคกรอฮิล; 2553.

13. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. ชีวสารสนเทศศาสตร์ Phylogenetics และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2544.

14. หัทยา กาวีวงศ์. อณูพันธุศาสตร์. กรุงเทพมหานคร : บุญไชยการพิมพ์; 2548.

15. Zhang A, Crozier R, Muster C, Zhu C. Estimating sample sizes for DNA barcoding : Molecular Phylogenetics and Evolution. 2008; 47(2) : 729-756.

16. Song H, Buhay J, Michael F, Whiting K, Crandall A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are co-amplified : Molecular Phylogenetics and Evolution. 2005 ; 30(2) : 225-242.

17. Cywinska A, Hunter F, Hebert P. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med. Vet. Entomol. 2006; 20 : 413-424.

18. Dawnay N, Ogden B, McEwing R, Carvalho G, Thorpe J. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. Forensic Science International. 2007; 173: 1-6.

19. Lineras M, Soto-Calderon I, Lees D, Anthomy N. High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar : A test of the DNA barcoding approach. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2009; 50(3): 485-495.

20. Kress W, Erickson D. Dna barcodes : genes genomeics and bioinformatics. PNAS. 2008; 105(8) : 2761-2762.

21. Kamar N, Srinivasan R, Jambulingam P. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera : Psychodidae) in India. Mol Ecol Resour. 2012; 12: 414-420.

22. Kumar S, Gadagkar S. Efficiency of the neighbor-Joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large Phylogenies. J Mol Evol. 2000; 51: 544–553.

23. Seifert K. Progress towards DNA barcoding of fungi. Mol Ecol Resour. 2009; 9: 83-89.

24. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. J Mol Evol. 1980; 16: 111-120.

25. Barcode of Life Data System; http://www.boldsystems.org

26. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

27. Kawata Y, Ishikawa H. Nucleotide sequence and thermal property of 5S rRNA from the elder aphid *Acyrthosiphon magnoliae*. Nucleic acid Res. 1982; 10(6) : 1833-1840.

28. Mandal A, Mohindra V, Singh R, Punia P, Singh A, Lal K. Mitochondrial DNA variation in natural populations of endangered Indian feather-back fish, *Chitala chitala*. Mol Biol Rep. 2012; 39: 1765-1775. Available from: DOI 10.1007/s11033-011-0917-9 Accessed February 21, 2013.

29. Hebert P, Cywinska A, Ball S, deWaard J. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2003; 270 (1512) : 313-321.

30. Hebert P, Penton E, Burns J, Janzen D, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerato*r. PNAS. 2004; 101(41): 14812-14817.

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. รองศาสตราจารย์อิสยา จันทร์วิทยานุชิต
   คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ผู้ร่วมวิจัย

1. อาจารย์ภาณุพงศ์ สหายสุข
   คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย
   คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
3. อาจารย์ ดร. สุชาดา สำรวยผล
   คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
4. อาจารย์ ดร. พัชรา ศรีวิชัย
   คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
5. อาจารย์ ดร. สังสิทธิ์ สังวรโยธิน
   คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
6. รองศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ อภิวัฒนศร
   คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล