that the PCR products were digested with 3 restriction enzyme (*Dde* I, *Alu* I, *Hinf* I). The results of these samples showed 13 composite haplotypes as AAA, BBB, CCC, DDD, EEE, FJF, GFG, HGH, IHI, JII, KJI, LJI and MJI. The UPGMA dendrogram of restriction pattern was analyzed using NTSYSpc version 2.10p. The earthworms were divided into 2 groups as group 1 consisting of *Dichogaster bolaui* and group 2 consisted of *Metaphire peguana, M. bahli*, *M. houlleti*, *M. bipora*, *M. anomala*, *M. planata*, *M. posthuma*, *M.* sp. 1, *M.* sp. 2, *M.* sp. 3, *Amynthas seiboldi* and unknown species. The similarity coefficient between 2 groups was 0.66.

Keywords: earthworm, genetic diversity, PCR-RFLP, Megascolecidae

บทนำ

ไส้เดือนดิน (earthworm) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อยู่ในไฟลัมแอนนิลิดา (Phylum annelida) คลาสโอลิโกซีตา (Class Oligocheata) มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกระบอก ด้านท้องแบนเล็กน้อย และมีสีซีดกว่าด้านหลัง ลำตัวมีปล้องขนาดเท่ากัน อาศัยอยู่ในดินหรือมูลสัตว์ ปัจจุบันไส้เดือนดินมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั่วภูมิภาคเอเชีย โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อไส้เดือนดินจึงทำให้มีการแพร่กระจายอย่างมาก นอกจากนี้ไส้เดือนดินยังมีบทบาทที่สำคัญในระบบนิเวศอย่างมากซึ่งเป็นสัตว์ที่สามารถช่วยย่อยสลายขยะอินทรีย์ ซากพืช ซากสัตว์ในดิน และยังมีความสำคัญในการช่วยผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณค่าต่อพืช อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์อีกด้วย[1] ไส้เดือนดินถูกจัดจำแนกออกเป็น 21 วงศ์ และมีมากกว่า 8,000 สายพันธุ์[2] ซึ่งในการจัดจำแนกสามารถสังเกตได้จาก ขนาดและความยาวของลำตัว สีหรือสีแถบข้างลำตัว และแหล่งที่อยู่อาศัย แต่ไส้เดือนดินนั้นสามารถมีสี หรือขนาดความยาวของลำตัวที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับความลึกของชั้นดิน และสภาพแวดล้อมของบริเวณที่ไส้เดือนดินอาศัยอยู่[3] ไส้เดือนดินได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากโดยเฉพาะในการนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นผู้ย่อยสลายขยะอินทรีย์ตามบ้านเรือน ขยะเทศบาล หรือขยะโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ และนำมาเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์จึงทำให้ประชาชนทำการเพาะเลี้ยงไส้เดือนดินมากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเพาะเลี้ยงไส้เดือนดินไปนานๆ อาจทำให้ไส้เดือนดินมีลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปจึงทำให้สับสนเกี่ยวกับสายพันธุ์ของไส้เดือนดิน[4] งานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษาไส้เดือนดินวงศ์Megascolecidae เนื่องจากพบการกระจายตัวมากที่สุด การคัดเลือกพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ของไส้เดือนดินในปัจจุบันนิยมใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก ซึ่งลักษณะภายนอกสามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม จึงควรมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อให้สามารถจัดจำแนกได้อย่างถูกต้องยิ่งขึ้น ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคต่างๆ ในการหาความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอได้แก่ Restriction Fragment Length-Polymorphism (RFLP) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) และ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เทคนิคเหล่านี้ทำให้เห็นความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งช่วยในการบ่งชี้และจัดจำแนกพันธุ์ได้ ชิ้นดีเอ็นเอถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายระดับโมเลกุล (Molecular marker) ของลักษณะใดลักษณะหนึ่งโดยใช้ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น[5] การศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลทางพันธุกรรมของไส้เดือนดินในประเทศไทยยังมีการศึกษาน้อยมาก และยังไม่มีข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากรของไส้เดือนดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไส้เดือนดิน โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อใช้เป็นแนวทางในการสืบค้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการแยกไส้เดือนดิน เนื่องจากสะดวก รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี ปริมาณตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยก็เพียงพอที่จะศึกษาได้และข้อมูลก็น่าเชื่อถือมากกว่าเทคนิค PCR-RAPD เพราะเทคนิค PCR-RAPDไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง homozygotes และ heterozygoes และมีความไวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนไป และเพื่อเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรและประชาชนในการเพาะเลี้ยงไส้เดือนดินในเชิงพาณิชย์อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไส้เดือนดินวงศ์ Megascolecidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่างไส้เดือนดิน

เก็บตัวอย่างไส้เดือนดินโดยการขุด จากนาข้าว สวน ป่า และเขา ในพื้นที่ 7 จังหวัด ได้แก่จังหวัดกาฬสินธุ์ นครพนม บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ สกลนคร และหนองบัวลำภู ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก และลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน

นำไส้เดือนดินที่เก็บได้มาล้างทำความสะอาดแล้วนำไปดองด้วย ethanol 95% จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก ได้แก่ ลักษณะสี ของลำตัว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำตัว และความยาวของลำตัว ส่วนลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน ศึกษาโดยการผ่าตามยาวทางด้านบนของลำตัวแล้วดูอวัยวะภายในของไส้เดือนดิน ตามวิธีการของ Gates[6] และSims and Easton[7] ได้แก่ ลักษณะของสีลำตัว ความยาว จำนวนปล้อง ช่องเปิดเพศผู้ ช่องเปิดเพศเมีย ไคลเทลลัม ต่อมลูกหมาก ซีกั้ม เป็นต้น

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของลำตัวไส้เดือนดินโดยวิธี CTAB Phenol chloroform Proteinase K ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Thaewnon-ngiw[8] โดยตัดกล้ามเนื้อบริเวณผิวหนังปริมาตร 0.5 cm^3 ใส่ใน Centrifuge tube นำไปเติม CTAB buffer 500 µl (CTAB ต้องนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาใช้) เติม Proteinase K (20 mg/ml) 10-12 µl นำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 300 µl กลับหลอดไปมาให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาของเหลวที่แยกชั้นอยู่ด้านบนใส่หลอด Centrifuge tube หลอดใหม่ (โดยใช้ Tip ปลายตัด) จากนั้นก็เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 300 µl เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาของเหลวที่แยกชั้นอยู่ด้านบนใส่ในหลอด Centrifuge tube หลอดใหม่ (โดยใช้ Tip ปลายตัด) ทำซ้ำอีก 1 รอบ เติม Absolute ethanol (ที่เย็นจัด) 2 เท่าของปริมาตรรวม ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดหรือเทส่วนบนทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้งคว่ำลงบนกระดาษทิชชูประมาณ 30 นาที แล้วหงายหลอดขึ้นเพื่อให้เอทานอลระเหยออกให้หมด จากนั้นจึงละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 100 µl (10 mM Tris-HCL, pH 7.4 และ 1 mM EDTA) นำ DNA solution ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธี electrophoresis

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน COI โดยเทคนิค PCR-RFLP

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไส้เดือนดินด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction โดยใช้ไพรเมอร์ COI (F) 5' TCA-ACC-AAC-CAC-AAA-GAC-ATT-GGC-AC 3' และ COI (R) 5' TAG-ACT-TCT-GGG-TGG-CCA-AAG-AAT-CA 3' Ward *et al*.[9] โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl ซึ่งประกอบด้วย dH_2O, 10X buffer (1X), 50mM $MgCL_2$ (2mM), 10mM dNTP (0.1mM), *Taq* DNA polymererase, COI [F] และ COI [R] และ DNA sample (5 mg/µl) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิ Predenaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที 45 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 10 วินาที Annealing ที่ 54 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 10 วินาที Extention ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR มาทำการตรวจสอบขนาดโดยเทคนิค Agrarose gel Electrophoresis โดยใช้ Agrarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5% ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วย้อมด้วย ethidium bromide และนำเจลไปตรวจสอบภายใต้แสง UV เพื่อตรวจสอบผลผลิตที่ได้ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดคัดเลือกหาเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 10 เอนไซม์ โดยมีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาดังนี้ dH_2O, 10X buffer, 10X BSA, 40 mM Spermidine และrestriction enzyme เขย่าให้เข้ากัน เติม PCR จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ผลการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค agrarose gel electrophoresis ใช้ agrarose gel ที่มีความเข้มข้น 2% และกระแสไฟฟ้า 80 โวลล์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide (10 µl/ml) นาน 10 นาที ล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำไปตรวจดูใต้แสง UV และบันทึกภาพ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำรูปแบบของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 เอนไซม์ มาวิเคราะห์หา ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์โดยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10p เพื่อสร้างเป็น dendrogram โดยใช้ไส้เดือนดินวงศ์ Octochaetidae (*Dichogaster bolaui*) เป็น outgroup

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในของไส้เดือนดิน

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและสัณฐานวิทยาภายใน เพื่อจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนดินจากพื้นที่ 7 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ทั้งหมด 2 สกุล คือ *Metaphire* และ*Amynthas* ซึ่งมี 8 ชนิดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ *Metaphire peguana*, *M. bahli*, *M. houlleti*, *M. bipora*, *M. anomala*, *M. planata*, *M. posthuma* และ *A. seiboldi* ส่วนอีก 3 ชนิด จัดจำแนกได้ในระดับสกุลแต่ในระดับชนิดยังไม่สามารถระบุได้จึงจำแนกเป็น *M*. sp.1, *M*. sp.2, *M*. sp.3 และอีก 1 ชนิด มีลักษณะที่แตกต่างจากระดับสกุล *Metaphire* และ *Amynthas* โดยให้เป็น unknown (Table 1)

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของไส้เดือนดินโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

จากการนำโมเลกุลดีเอ็นเอของไส้เดือนดินทั้งหมด 12 ชนิด ที่ได้การเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction โดยใช้ไพรเมอร์ COI (F) และCOI (R) ซึ่งพบว่า PCR product ของไส้เดือนดินทั้งหมดมีขนาดเท่ากับ 710 bp เมื่อนำ PCR product มาคัดเลือกหาเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่ามี 3 เอนไซม์ คือ *Dde* I, *Alu* I และ*Hinf* I เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความเหมาะสมสามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 710 bp ของไส้เดือนดิน 12 ชนิด และไส้เดือนดินตัวเปรียบเทียบได้โดยพบว่า *Dde* I สามารถตัดโมเลกุลดีเอ็นเอ ซึ่งได้ single haplotype 13 รูปแบบ (Figure 1 และ Table 2) *Alu* I สามารถตัดโมเลกุลดีเอ็นเอ ซึ่งได้ single haplotype 10 รูปแบบ (Figure 2 และ Table 2) และ*Hinf* I สามารถตัดโมเลกุลดีเอ็นเอ และผลของลักษณะ composite haplotype พบได้ทั้งหมด 13 รูปแบบ ได้แก่ AAA, BBB, CCC, DDD, EEE, FJF, GFG, HGH, IHI, JII, KJI, LJI และMJI

ขนาด 710 bp ซึ่ง พบว่าได้ single haplotype 8 รูปแบบ (Figure3 และTable 2)

Table 1 Morphological characteristics comparison of family Megascolecidae in northeastern Thailand

Characters / Species	Bl	Ns	Sc pore	Sc	Gm	Cs	Fp	Mp	Pg	Sv
M. peguana	115	107-116	5/6/7/8	3 pair 6/7-8/9	17/18-18/19	14-16	14	18	17-20	11-12
M.bahli	104	103-110	5/6/7/8	3 pair 6/7-8/9	17/18-18/19	14-16	14	18	17-20	11-12
M. houlleti	125	101-108	5/6/7/8	3 pair 6/7-8/9	absent	14-16	14	18	17-20	11-12
M. bipora	135	155-158	5/6/7/8/9	4 pair 5/6-8/9	18/19-19/20	14-16	14	18	17-21	11-12
M. anomala	140	135-141	5/6/7/8	3 pair 6/7-8/9	absent	14-16	14	18	absent	11-12
M. planata	155	163-170	6/7/8	2 pair 7/8-8/9	absent	14-16	14	18	17-22	11-12
M. posthuma	110	116-120	5/6/7/8/9	4 pair 5/6-8/9	absent	14-16	14	18	18-20	11-12
M. sp 1	240	165-173	5/6/7/8	3 pair 6/7-8/9	18-20	14-16	14	18	15-21	11-12
M. sp 2	125	113-116	5/6/7/8	3 pair 6/7-8/9	17-20	14-16	14	18	17-20	11-12
M. sp 3	230	156-163	5/6/7/8	3 pair 6/7-8/9	18-20	14-16	14	18	16-22	11-12
A. seiboldi	160	116-120	6/7/8	2 pair 7/8-8/9	absent	14-16	14	18	17-22	11-12
unknown	180	122-135	absent	3 pair 6/7-8/9	absent	14-16	14	18	18-22	11-12

* Bl = Body length (mm), Ns = Number of segment, Sc pore = Spermathecal pore, Sc = Spermathecae, GM = Genital marking, Cs = Clitellum segment, Fp = Female pore, Mp = Male pore, Pg = Prostate gland, Sv = Seminal vesicle

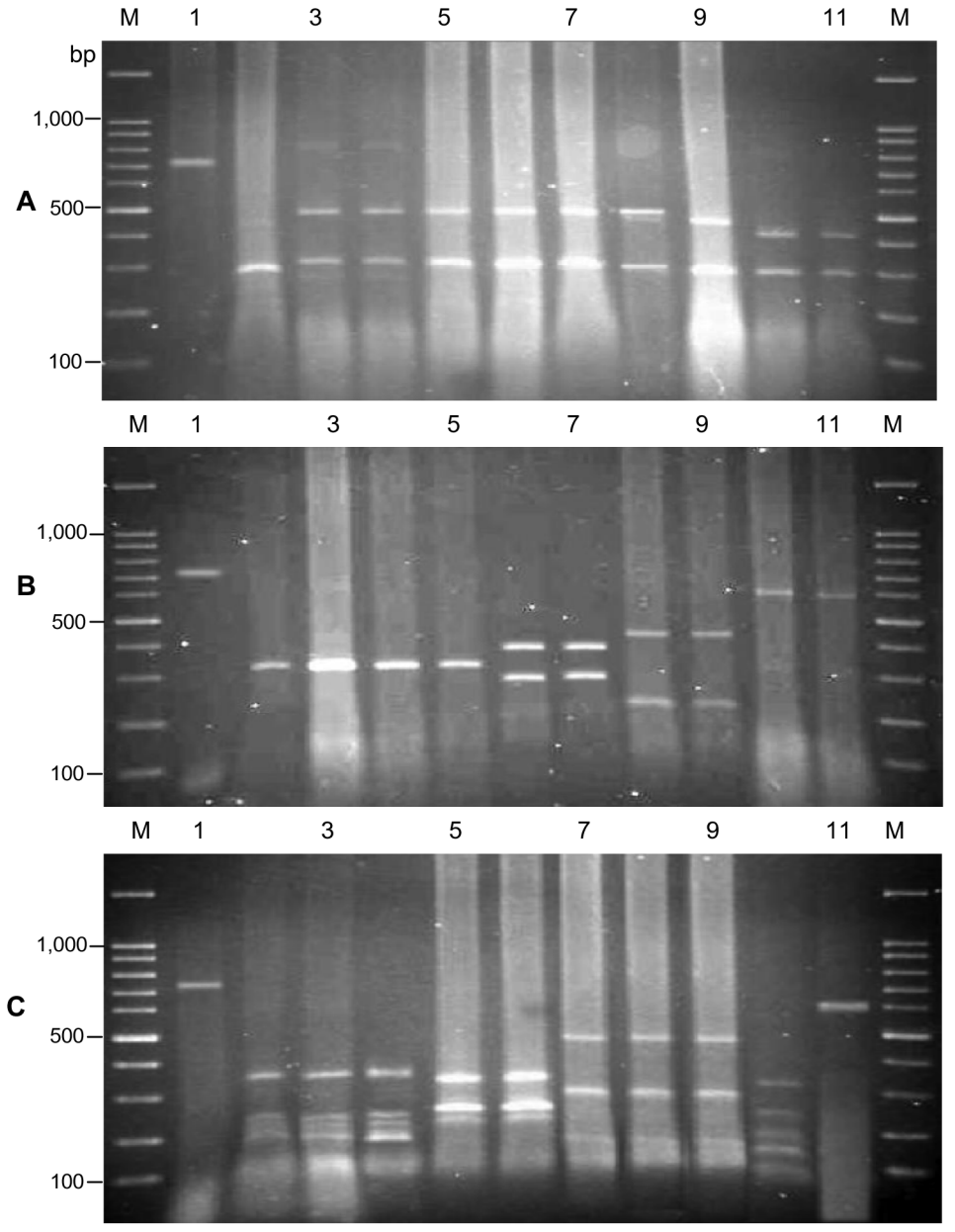

Figure 1 RFLP patterns by digestion of *Dde* I restriction enzyme.

A. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (*M. bahli*), Lane 2 = outgroup, Lane 3-8 = *Metaphire peguana*, Lane 9 = *M. bahli*, Lane 10-11 = *M. anomala*

B. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (PCR product), Lane 2-5 = *M. planata*, Lane 6-7 = *Amynthas seiboldi*, Lane 8-9 = *M. posthuma*, Lane 10-11 = unknown

C. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (PCR product), Lane 2-4 = *M. houlleti*, Lane 5-6 = *M.* sp1, Lane 7-9 = *M.* sp2, Lane 10 = *M.* sp3, Lane 11 = *M. bipora*

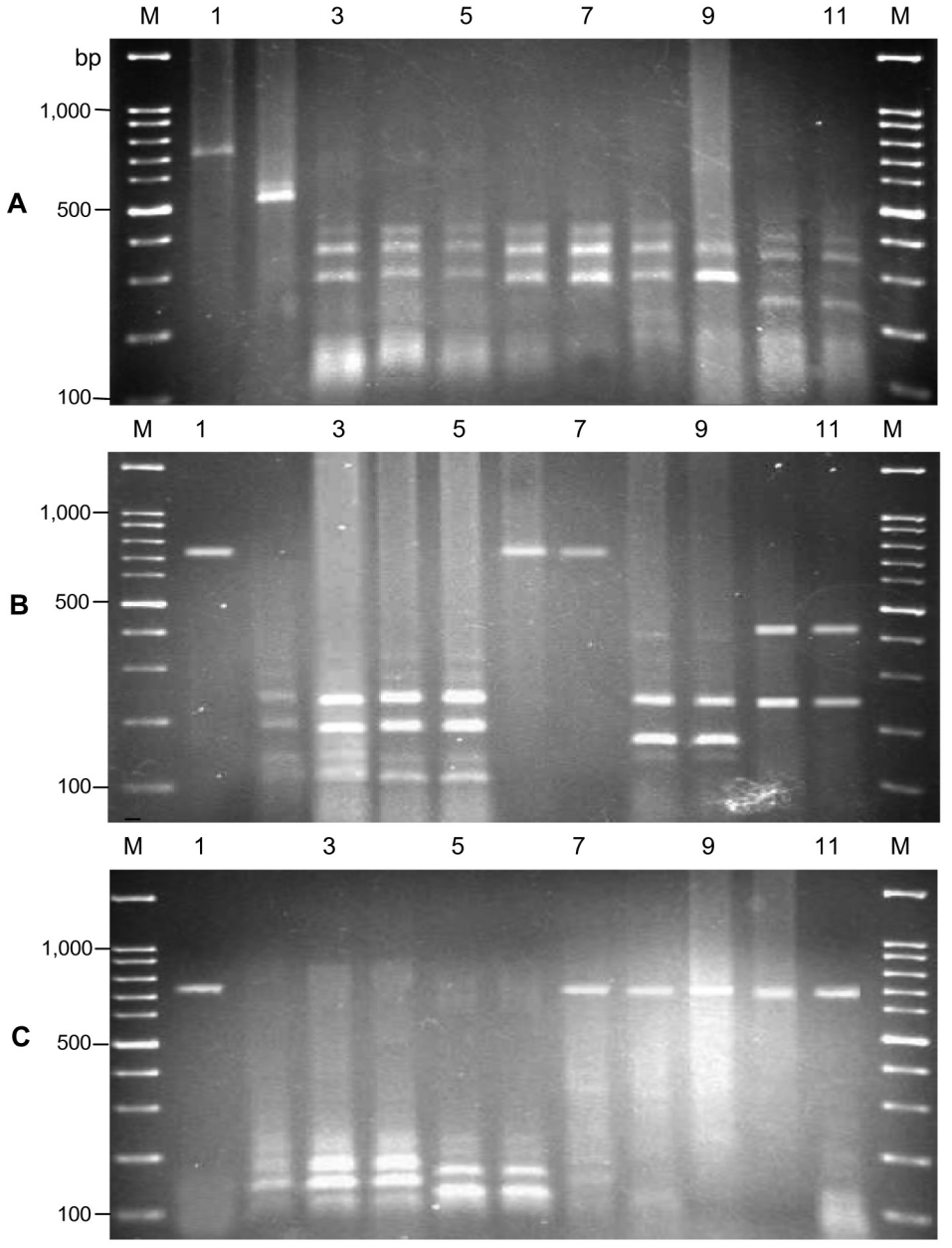

Figure 2 RFLP patterns by digestion of *Alu* I restriction enzyme.

A. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (*M. bahli*), Lane 2 = outgroup, Lane 3-8 = *Metaphire peguana*, Lane 9 = *M. bahli*, Lane 10-11 = *M. anomala*

B. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (PCR product), Lane 2-5 = *M. planata*, Lane 6-7 = *Amynthas seiboldi*, Lane 8-9 = *M. posthuma*, Lane 10-11 = unknown

C. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (PCR product), Lane 2-4 = *M. houlleti*, Lane 5-6 = *M.* sp1, Lane 7-9 = *M.* sp2, Lane 10 = *M.* sp3, Lane 11 = *M. bipora*

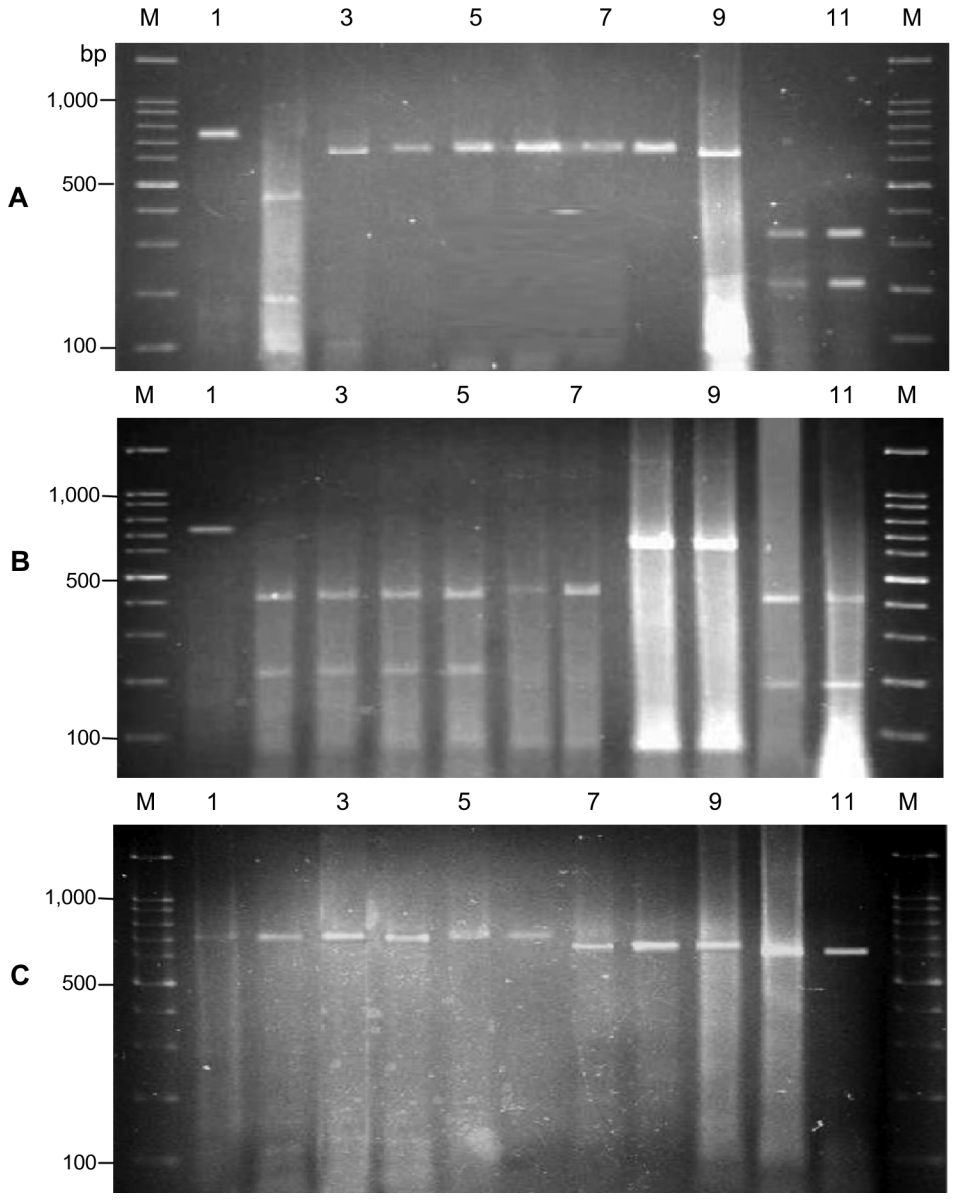

Figure 3 RFLP patterns by digestion of *Hinf* I restriction enzyme.

A. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (*M. bahli*), Lane 2 = outgroup, Lane 3-8 = *Metaphire peguana*, Lane 9 = *M. bahli*, Lane 10-11 = *M. anomala*

B. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (PCR product), Lane 2-5 = *M. planata*, Lane 6-7 = *Amynthas seiboldi*, Lane 8-9 = *M. posthuma*, Lane 10-11 = unknown

C. Lane M = 100bp Ladder marker, Lane 1 = uncut (PCR product), Lane 2-4 = *M. houlleti*, Lane 5-6 = *M.* sp1, Lane 7-9 = *M.* sp2, Lane 10 = *M.* sp3, Lane 11 = *M. bipora*

Table 2 Restriction fragment patterns resulted from digestion of COI

Enzyme	Pattern observed (bp)	Species
Dde I	A: 300	*Dichogaster bolaui* (outgroup)
	B: 490, 310	*Metaphire peguana*
	C: 480, 300	*M. bahli*
	D: 410, 300	*M. anomala*
	E: 350, 350	*M. planata*
	F: 400, 300	*Amynthas seiboldi*
	G: 460, 250	*M. posthuma*
	H: 590	unknown
	I: 370, 260, 240, 210	*M. houlleti*
	J: 350, 280, 250	*M.* sp1
	K: 500, 320, 200, 110	*M.* sp2
	L: 340, 250, 200, 150, 100	*M.* sp3
	M: 600	*M. bipora*
Alu I	A: 550	*Dichogaster bolaui* (outgroup)
	B: 440, 390, 300	*M. peguana*
	C: 380, 300	*M. bahli*
	D: 410, 370, 250	*M. anomala*
	E: 250, 200, 140, 110	*M. planata*
	F: 230, 180	*M. posthuma*
	G: 400, 220	unknown
	H: 220, 190, 160, 120	*M. houlleti*
	I: 230, 210, 180, 150	*M.* sp1
	J: 710	*M.* sp2, *M.* sp3, *M. bipora, Amynthas seiboldi*
Hinf I	A: 460, 180	*Dichogaster bolaui* (outgroup)
	B: 650	*M. peguana*
	C: 630, 220	*M. bahli*
	D: 340, 220	*M. anomala*
	E: 430, 230	*M. planata*
	F: 450	*Amynthas seiboldi*
	G: 680	*M. posthuma*
	H: 400, 190	unknown
	I: 710	*M. houlleti, M.* sp1, *M.* sp2, *M*. sp3, *M. bipora*

ผลการวิเคราะห์รูปแบบโมเลกุลดีเอ็นเอภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย NTSYSpc version 2.10p

เมื่อนำเอารูปแบบจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde I*, *Alu I* และ*Hinf I* มาวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไส้เดือนดินทั้ง 12 ชนิด ออกเป็น 2 จากทุกพื้นที่มีความเหมือนทางพันธุกรรม และมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 1 และยังพบว่า unknown ที่แยกออกจากชนิดอื่นอย่างชัดเจนแต่มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเหมือน *M. bipora* และ *A. seiboldi* โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.89 ส่วน M. sp1, M. sp2, M. sp3 แยกออกจากกันอย่างชัดเจน แต่ M. sp2 มีความสัมพันธ์ทางกลุ่มใหญ่ โดยไส้เดือนดินวงศ์ Octochaetidae (*Dichogaster bolaui*) ถูกแยกออกจากไส้เดือนดินวงศ์ Megascolecidae อย่างชัดเจนและพบว่า *M. peguana* พันธุกรรมกับ *M. planata* โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.84 (Figure 4)

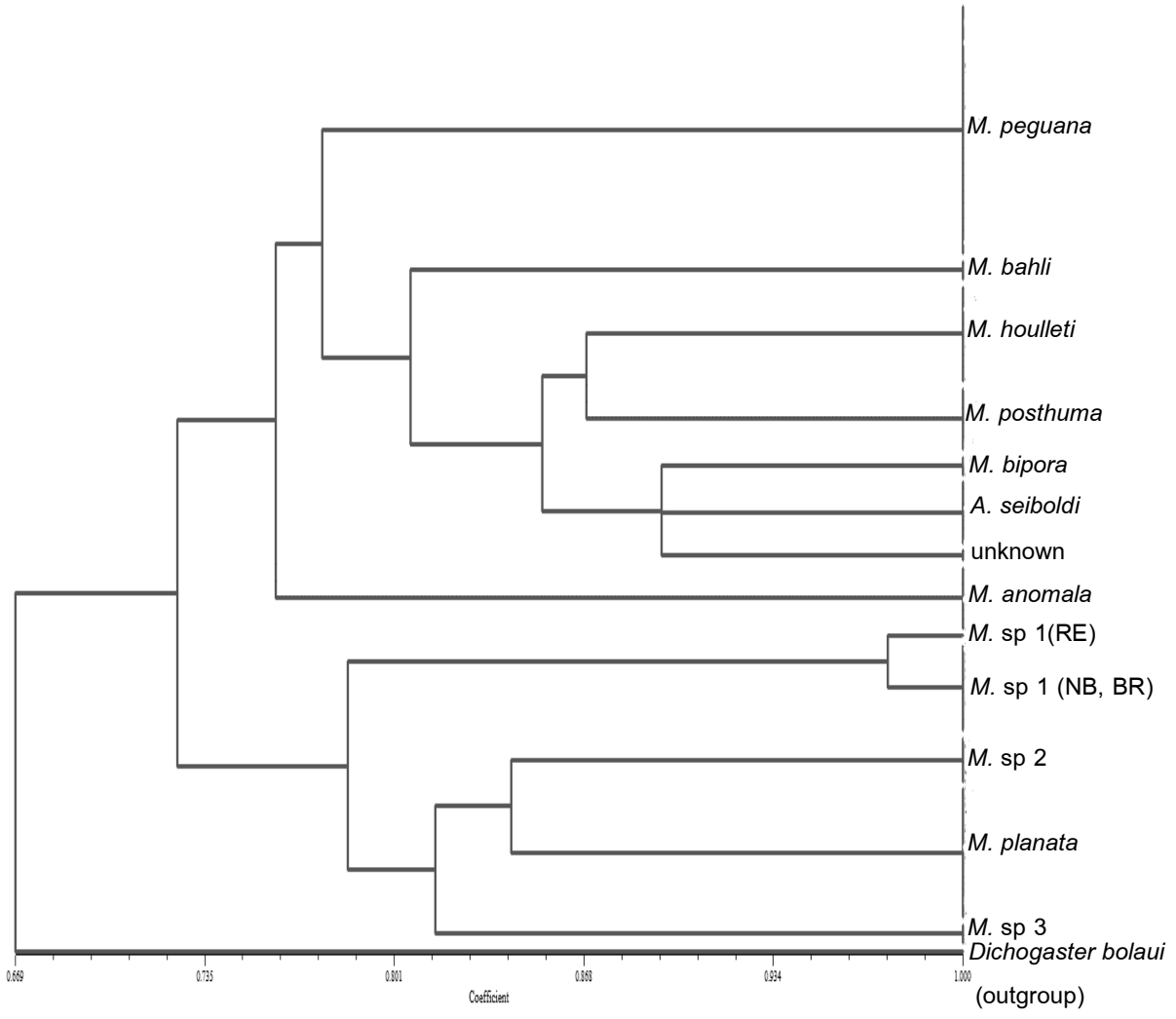

Figure 4 Dendrogram of Family Megascolecidae and outgroup constructed from restriction analysis of COI [F] and COI [R] primer

* RE = Roi Et, NB = Nongbua Lamphu, BR = Buri Ram

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาไส้เดือนดินวงศ์ Megascolecidae เนื่องจากไส้เดือนดินวงศ์นี้พบการกระจายตัวมากที่สุดในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและภายใน จากพื้นที่ 7 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมตัวอย่างทั้งหมด 275 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจัดจำแนกในระดับสกุลได้ 2 สกุล คือ *Amynthas* และ*Metaphire* จากนั้นนำมาจัดจำแนกในระดับชนิดสามารถจัดจำแนกได้ 8 ชนิด ได้แก่ *Metaphire peguana, M. bahli*, *M. houlleti*, *M. bipora*, *M. anomala*, *M. planata*, *M. posthuma* และ*Amynthas seiboldi* นอกจากนี้ยังพบสกุล *Metaphire* อีก 3 ชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ *M.* sp 1, *M.* sp 2 และ *M.* sp 3 โดยทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันบริเวณช่องเปิดเพศผู้ นอกจากนี้ยังพบไส้เดือนดินอีก 1 ชนิด ที่ไม่สามารถจัดจำแนกในระดับสกุล และชนิดได้ (unknown) ซึ่งเป็นไส้เดือนดินที่แตกต่างจากไส้เดือนดินทั้ง 11 ชนิด ตามที่กล่าวมาซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จากงานวิจัยในครั้งนี้พบไส้เดือนดินวงศ์ Megascolecidae ทั้งหมด 12 ชนิด ซึ่งน้อยกว่าการรายงานของ blackmore[10] ที่พบว่าไส้เดือนดินวงศ์ Megascolecidae ที่พบในประเทศไทยมีทั้งหมด 23 ชนิด เนื่องมาจากการกระจายตัวของไส้เดือนดินขึ้นอยู่กับความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส ผลของรูปแบบการปลูกพืช ผลของการใช้ปุ๋ย ประเภทของดิน และแหล่งอาหาร[4]

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าไพรเมอร์ COI สามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอของไส้เดือนดินวงศ์ Megascolecidae และไส้เดือนดินเปรียบเทียบได้โดยมีขนาดเท่ากัน คือ 710 bp ซึ่งในงานวิจัยของ Loongyai *et al*.[11] ได้จัดจำแนกไส้เดือนดิน 4 ชนิด ซึ่งเป็นชนิด *Pheretima peguana Eudrilus eugeniae Perionyx excavatus* และ *P. excavates* โดยใช้ไพรเมอร์ COI ซึ่งพบว่าขนาดของผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเท่ากับ 657 bp ซึ่งต่างจากในงานวิจัยนี้ที่มีขนาด 710 bp

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ของไส้เดือนดินมาทำการคัดเลือกหาเอนไซม์ตัดจำเพาะจากทั้งหมด 13 ชนิด พบว่าเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอของไส้เดือนดินวงศ์ Megascolecidae และไส้เดือนดินเปรียบเทียบมี 3 ชนิด คือ *Dde* I, *Alu* I และ*Hinf* I พบว่าเอนไซม์ 3 ชนิดนี้สามารถแบ่งแยกความแตกต่างของแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน และได้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกันออกไป เมื่อนำมาสร้าง Composite haplotype พบทั้งหมด 13 รูปแบบ ได้แก่ AAA, BBB, CCC, DDD, EEE, FJF, GFG, HGH, IHI, JII, KJI, LJI และMJI ซึ่งพบว่า Composite haplotype สามารถแยกชนิดที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน เช่น รูปแบบ AAA ได้แก่ *Dichogaster bolaui* (outgroup) รูปแบบ BBB ได้แก่ *M. peguana* รูปแบบ CCC ได้แก่ *M. bahli* รูปแบบ DDD ได้แก่ *M. anomala* รูปแบบ EEE ได้แก่ *M. planata* รูปแบบ FJF ได้แก่ *A. seiboldi* รูปแบบ GFG ได้แก่ *M. posthuma* รูปแบบ HGH ได้แก่ unknown รูปแบบ IHI ได้แก่ *M. houlleti* รูปแบบ JII ได้แก่ *M.* sp1 รูปแบบ KJI ได้แก่ *M.* sp2 รูปแบบ LJI ได้แก่ *M.* sp3 และรูปแบบ MJI ได้แก่ *M. bipora* เมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของไส้เดือนดินวงศ์ Megascolecidae และไส้เดือนดินเปรียบเทียบด้วยเทคนิค PCR-RFLP ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.1p โดยพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 *Dichogaster bolaui* (outgroup) และกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย *M. peguana, M. bahli, M. houlleti, M. posthuma, M. bipora, M. anomala, A. seiboldi* และunknown ส่วนกลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วย *M*. sp1, *M*. sp2, *M.* sp3 และ *M. Planata* ซึ่งพบว่าทั้ง 2 กลุ่มใหญ่นี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.66 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sharma *et al*.[12] ได้หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไส้เดือนดิน *Eisenia fetida* ที่มาจากแต่ละพื้นที่พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.6 ดังนั้นจะเห็นได้แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกจะคล้ายคลึงกันแต่ลักษณะทางพันธุกรรมอาจแตกต่างกันซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมจึงมีความน่าเชื่อถือมากกว่าข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

การทำงานวิจัยในครั้งต่อไปอาจนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้นำไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของไส้เดือนดิน และตัวอย่างที่นำมาศึกษาควรเก็บให้มากกว่านี้ และครอบคลุมในทุกพื้นที่เพื่อช่วยในการจัดจำแนกได้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนสนับสนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2556 จากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

1. อานัฐ ตันโช. ไส้เดือนดิน. ปทุมธานี: สำนักพิมพ์พัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; 2549.
2. Edward CA and Bohlen PJ. Biology and ecology of earthworm. 3rd ed. London: chapman and Hall; 1996.
3. Levelle P, Brussaard L and Hendrix P. Earthworm management in tropical a Groecosystem. New York: CABI; 1999.

4. Somniyam P. The population dynamics and Distribution of terrestrial earthworm at Sakaerat Environmental Research station and adjacent Areas, Nakhon Ratcha sima Province. Ph.D. Thesis. Suranaree University of Technology; 2008.
5. สิริพร พงษ์สมบูรณ์. การตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรกุ้งกุลาดำ Penaeus momo-don โดยการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2539.
6. Gates GE. Burmese earthworm: An introduction To the systematic and biology of Megadrile Oligochaetes with special reference to Southeast Asia. Transactions of the American Philosophical society 1972; 62: 326.
7. Sims RW and Easton EG. A numerical revision of the earthworm genus *Pheretima* (Megascolecidae: Oligochaeta) with the recognition of new genera and an appendix on the earthworms collected by the royal society North Borneo Expedition. Biological Journal of the Liennean Society 1972; 4: 169-268.
8. Thaewnon-ngiw B, Klinbunga S, Phanwichien K, Sangduen N, Lauhachinda N andMenasveta P. Genetic diversity and Molecular Markers in Introduction and Thai Native Apple Snail (Pomacea and Pila). Biochemistry and Molecular Biology 2004, 37: 493-502.
9. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR and Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical transaction the royal society biological sciences 2005, 360: 1847-1857.
10. Blakmore RT. Checklist of Thailand taxa updated from Gates' (1939): "Thai Earthworm''. [Serial online] 2006. Available from: http:// www. annelida. Net/ earthworm/ Thailand%20taxa%20updated%20 from%20Gates.pdf. Accessed April 5, 2013.
11. Loongyai W, Bangrak P and Chantsarang S. External morphological comparison, Taxonomic revision and molecular of earthworm in Thailand. Agriculture & Biology 2011;13: 553-558.
12. Sharma A, Sonah H, Deshmukh RK, Singh NK and Sharma TR. Analysis of genetic diversity in earthworm using DNA markers. Zoological Science 2011; 28: 25-31.