



รายงานฉบับสมบูรณ์

1 ตุลาคม 2538 - 31 ธันวาคม 2541

การศึกษาชีววิทยาเชิงประชากร
ของแมลงวันผลไม้และยุงก้นปล่อง

*Population Biology of Fruit Flies
and Anopheline Mosquitoes*

โดย

ศาสตราจารย์ วิสุทธิ์ ใบไม้

หัวหน้าโครงการ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล



รายงานฉบับสมบูรณ์

1 ตุลาคม 2538 – 31 ธันวาคม 2541

การศึกษาชีววิทยาเชิงประชากร
ของแมลงวันผลไม้และยุงก้นปล่อง
Population Biology of Fruit Flies
and Anopheline Mosquitoes

โดย

ศาสตราจารย์ วิสุทธิ ไบไม้

หัวหน้าโครงการ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ธันวาคม 2541

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุน “เมธีวิจัยอาวุโส สกว. (TRF Senior Research Scholar)” รุ่นที่ 1 ปี 2538 (RTA 3880008) จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยได้ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2538 ถึงเดือนธันวาคม 2541

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่มีส่วนร่วมสร้างสรรค์บรรยากาศการวิจัยชีววิทยาพื้นฐานและผลิตผลงานวิชาการด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากรอย่างจริงจังและต่อเนื่อง รวมทั้งนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกคนที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางวิชาการในส่วนต่าง ๆ ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตามเป้าประสงค์

ขอขอบคุณนายอุดม กิจเจลา, นายสมศักดิ์ เทียงตรง, นางสาววันเพ็ญ เสือคำ, นางสาวโฉมฉาย ปิยศทิพย์ และผู้ช่วยวิจัยอีกหลายท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยดำเนินไปด้วยดีเสมอมา และขอขอบคุณ นางสาวแสงดาว ปิยศทิพย์ ที่จัดพิมพ์ต้นฉบับได้อย่างเรียบร้อยทุกประการ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RTA 3880008

ชื่อโครงการ : การศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรของแมลงวันผลไม้และยุงก้นปล่อง

ชื่อนักวิจัย : วิสุทธิ์ ไบไม้¹, ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์¹, สังวรณ์ กิจทวี¹, เนลิยา กุวั่งคะดิลก¹,
สุจินดา ชนะภูมิ¹, แสน ดิกวัฒนานนท์², Paul J. Grote³, อรพรรณ สัตยาลัย⁴
¹มหาวิทยาลัยมหิดล, ²สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
³มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ⁴จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : scvbm@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : ตุลาคม 2538-ธันวาคม 2541

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรและนิเวศวิทยาของแมลงที่มีความสำคัญทางการเกษตรและทางการแพทย์ในประเทศไทย ได้แก่ แมลงวันผลไม้และยุง รวมทั้งแมลงเบียนและริ้นดำด้วย โดยใช้วิธีการทางด้านสัณฐานวิทยา เซลล์พันธุศาสตร์ และอณูชีววิทยา เพื่อให้ได้องค์ความรู้พื้นฐานและความเข้าใจในกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการ ซึ่งจะเป็นรากฐานสำคัญสำหรับการหามาตรการควบคุมแมลงเหล่านี้โดยชีววิธี และเพื่อผลิตบัณฑิตปริญญาโทและปริญญาเอกด้านชีววิทยาเซตร้อน

ผลการศึกษา : การสำรวจในโครงการนี้พบแมลงวันผลไม้กว่า 87 ชนิด ใน 2 วงศ์ย่อย ใน 9 สกุล ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Bactrocera* และพบว่าเป็นชนิดใหม่มากถึง 50 ชนิด โดยเฉพาะในกลุ่ม *B. dorsalis* complex และ *B. tau* complex ซึ่งมีชนิดใหม่ 27 ชนิด และ 8 ชนิด ตามลำดับ บางชนิดมีความสำคัญทางการเกษตรด้วย การค้นพบแมลงวันผลไม้ชนิดใหม่เหล่านี้มาจากข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา, นิเวศวิทยา, เซลล์พันธุศาสตร์ และอิเล็กโทรฟอเรซิส ข้อมูลยังสะท้อนให้เห็นว่าสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันในกลุ่ม *B. tau* complex เป็นผลพวงจากกระบวนการแปรเปลี่ยนแปลกแยกทางพันธุกรรมที่เกิดจากปัจจัยด้านพืชอาศัยและ/หรือปัจจัยการแบ่งแยกทางภูมิศาสตร์ การค้นพบสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันในกลุ่ม *B. tau* complex นี้ได้รับการยืนยันจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของหน่วยพันธุกรรมสัณฐานกลุ่ม *hobo* แมลงวันผลไม้บางชนิดในกลุ่มนี้ยังเป็นศัตรูพืชผลที่สำคัญด้วย ดังนั้น *B. tau* complex จึงเป็นกลุ่มแมลงวันผลไม้ต้นแบบ (model) ที่ดีและน่าสนใจสำหรับการศึกษาหารายละเอียดเกี่ยวกับวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) โดยใช้วิธีการศึกษาด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุลต่อไป ส่วนกลุ่มซับซ้อน *B. dorsalis* complex นั้นมีหลากหลายชนิดและซับซ้อนยุ่งยากมากกว่ากลุ่ม *B. tau* complex จึงอาจไม่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษากระบวนการสปีชีเอชัน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ชัดว่า เฮเทอโรโครมาทินมีบทบาทสำคัญในวิวัฒนาการของโครโมโซมที่อาจเชื่อมโยงกับกระบวนการสปีชีเอชันของสมาชิกในกลุ่มซับซ้อนเหล่านี้

การศึกษาไมโททิกคาริโอไทป์ของแมลงเบียนชนิด *Diachasmimorpha longicaudata* นับว่าเป็นครั้งแรกในบ้านเรา และพบว่าโครโมโซมขนาดเล็กจำนวน $2n=40$ ข้อมูลจากการศึกษาอิเล็กโทรฟอเรซิสของแมลงเบียนชนิดนี้จากประชากรธรรมชาติบ่งชี้ว่าน่าจะมีสปีชีส์ใกล้ชิดกัน 2 ชนิด ที่ยัง

ไม่สามารถจำแนกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในทำนองเดียวกันการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของริ้นดำชนิด *Simulium feuerborni* ในพื้นที่ดอยอินทนนท์ ได้ข้อมูลที่สะท้อนให้เห็นว่ามีความหลากหลายของสปีชีส์ของริ้นดำมากมาย บางชนิดมีศักยภาพที่จะเป็นพาหะนำโรคเขตร้อนด้วย จึงสมควรศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรของริ้นดำในพื้นที่อื่น ๆ ของประเทศไทยให้มากขึ้น นอกจากนี้ยังได้จัดทำแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของ *S. feuerborni* เพื่อใช้อ้างอิงในการศึกษาในอนาคต

การศึกษาจุลินทรีย์กลุ่ม *Wolbachia* ที่มีชีวิตแบบ endosymbiont พบว่ามีอยู่ในแมลงวันผลไม้ 13 ชนิด และแมลงเบียน 2 ชนิด (*Diachasmimorpha* sp. และ *Biosteres* sp.) แต่ยังไม่พบในยุงก้นปล่อง จุลินทรีย์พวก *Wolbachia* ที่พบนี้อาจมีสายพันธุ์ใหม่ด้วย ซึ่งอาจมีประโยชน์สำหรับการพัฒนาหาวิธีการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญในประเทศไทยโดยชีววิธีต่อไป

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอพบว่ามีพันธุกรรมสัณญูจ *mariner* ในยุงก้นปล่องของไทย 9 ชนิดในจำนวน 23 ชนิดที่ตรวจสอบ และในจำนวน 9 ชนิดนี้มี 3 ชนิดที่เป็นสมาชิกของกลุ่มซับซ้อน *An. dirus* complex พันธุกรรมสัณญูจ *mariner* ที่พบนี้มีประโยชน์สำหรับใช้เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลเพื่อการจำแนกชนิดที่ใกล้เคียงกันของยุงก้นปล่องได้ดี และมีศักยภาพที่จะใช้ในการศึกษาแมลงกลุ่มซับซ้อนอื่น ๆ ในประเทศไทยต่อไป

Abstract

Project Code : RTA 3880008

Project Title : Population Biology of Fruit Flies and Anopheline Mosquitoes

Investigators : V. Baimai¹, P. Kittayapong¹, S. Kitthawee¹, C. Kuvangkadilok¹,
S. Thanaphum¹, S. Tigvatananont², Paul J. Grote³, O. Satayalai⁴
¹Mahidol University, ²King Mongkut Institute of Technology at Lat Krabang,
³Suranaree University of Technology, ⁴Chulalongkorn University

E-mail Address : scvbm@mahidol.ac.th

Project Period : October 1995 - December 1998

Objectives : To study the population genetics and ecology of important agricultural and medical insects in Thailand. The focus of study is mainly fruit flies and mosquitoes, but fruit fly parasitoids and blackflies are also included. Our methodology involves morphology, cytogenetics and molecular biology. Such an approach will provide basic knowledge for better understanding of evolutionary processes and for development of strategies for biological control of these pest and vector insects. This project also aims to train graduate students leading to master and doctoral degrees in tropical biology.

Results : A total of 87 species of fruit flies were recorded in 2 subfamilies and 9 genera. Most of these species belong to the genus *Bactrocera*. A total of 50 new species have been discovered including 27 new species in the *B. dorsalis* complex and 8 in the *B. tau* complex, based on morphological, ecological, cytogenetic and electrophoretic data. Most species of the *B. tau* complex that were distinguished by these methods have been confirmed by DNA analysis of the *hobo*-like transposable element. Some of these new species are important agricultural pests. Of particular interest, a phylogenetic tree of distinct but closely related species of the *B. tau* complex reflects the important role of genetic differentiation in adaptation to specific host-plant species and/or geographic isolation. Thus, the *B. tau* complex represents an excellent candidate for further detailed studies on coevolution, particularly by using molecular tools. In contrast, the many closely related but not clearly distinguishable species of the *B. dorsalis* complex make it more difficult to look into their speciation processes than those of the *B. tau* complex. However, the data obtained in this study suggest the significance of heterochromatin accumulation in chromosomal evolution and speciation of members of both these fruit fly complexes.

We reported, for the first time, the mitotic karyotype ($2n=40$) of *Diachasmimorpha longicaudata*, a *Bactrocera* parasitoid. Electrophoretic data of natural populations of

D. longicaudata have revealed at least 2 sibling species within this taxon. Likewise, a cytogenetic study of blackflies, *Simulium feuerborni*, from Doi Inthanon National Park, northern Thailand, shows the existence of species diversity in that area. Some of these blackfly species are potential vectors of tropical diseases and they warrant further investigation. A standard polytene chromosome map of *S. feuerborni* has been constructed as reference for future work.

The endosymbiotic microorganism, *Wolbachia*, has been found in 13 species of *Bactrocera* fruit flies and 2 species of parasitoid (*Diachasmimorpha* sp. and *Biosteres* sp.) but not in anopheline mosquitoes. Some of the *Wolbachia* found in Thai populations may represent new strains. The findings of *Wolbachia* could be useful for future biological control of some important pests in Thailand.

DNA analysis has revealed the presence of *mariner* transposable element in 9 of the 23 Thai *Anopheles* species. Three of the 9 species belong to the *An. dirus* complex. The *mariner* element was found to be useful as a molecular marker for separating closely related *Anopheles* species and has great potential for studying other complexes of insect species in Thailand.

สารบัญ

		หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	(ก)
	บทคัดย่อไทย	(ข)
	บทคัดย่ออังกฤษ	(ง)
	สารบัญตาราง	(ช)
	สารบัญภาพ	(ญ)
1	บทนำ	1
	1.1 วิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต	1
	1.2 ชีววิทยาเชิงประชากรและชีววิทยาเชิงโมเลกุล	3
2	การสำรวจเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย	8
3	ชีววิทยาเชิงประชากรกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex	24
	3.1 การสำรวจเก็บตัวอย่างจากประชากรธรรมชาติ	24
	3.2 การวิเคราะห์ไมโททิกโครโมโซม	28
	3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	32
	3.4 รูปแบบของแถบสีเอนไซม์	37
	3.5 การวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์	49
4	ชีววิทยาเชิงประชากรของกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera dorsalis</i> complex	50
	4.1 การศึกษาด้านสัณฐานวิทยาโดยการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์	50
	4.2 การวิเคราะห์ไมโททิกโครโมโซม	57
	4.3 อิเล็กโทรโฟรีซิส	69
5	ชีววิทยาเชิงประชากรของแมลงเบียน	73
	5.1 อิเล็กโทรโฟรีซิส	74
	5.1.1 แมลงเบียนชนิด <i>D. longicaudata</i>	74
	5.1.2 แมลงเบียนชนิด <i>B. arisanus</i>	77
	5.2 เมทาเฟสโครโมโซม	78
6	เซลล์พันธุศาสตร์และความหลากหลายของสปีชีส์ของวันดำ	79
	6.1 การสำรวจเก็บตัวอย่างวันดำ	79
	6.2 การศึกษาโพลีทิกโครโมโซม	79
7	จุลินทรีย์กลุ่ม <i>Wolbachia</i>	86
	7.1 ในแมลงวันผลไม้	87
	7.2 ในแมลงเบียน	88
	7.3 ในยุงก้นปล่อง	88

สารบัญ

	หน้า
8 พันธุกรรมสัญจร	100
8.1 <i>Hobo</i> -like element	100
8.2 <i>Mariner</i> transposable element	102
9 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	106
เอกสารอ้างอิง	108
ภาคผนวก	111

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงชื่อแมลงวันผลไม้ ชื่อพืชอาศัย และจังหวัดที่พบในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย [ตัวเอนบาง = ชื่อวิทยาศาสตร์ที่รู้จักกันแล้ว ; ตัวตรงหนา = ชื่อไม่เป็นทางการ (ชื่อย่อ) ของแมลงวันผลไม้ชนิดใหม่ที่ค้นพบในการศึกษานี้] ? = ไม่สามารถจำแนกพืชอาศัย	17
3.1	แสดงชนิดของพืชอาศัย สถานที่ และเวลาที่เก็บแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex (1 = North; 2 = Central; 3 = Northeast; 4 = South; 5 = West)	26
3.2	แสดงชื่อเอนไซม์และระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษา	37
3.3	แสดงค่าความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variability) ของแมลงวันผลไม้ <i>Bactrocera tau</i>	41
3.4	แสดงค่า Nei's (1978) unbiased genetic identity (อยู่เหนือแนวทแยงมุม) และค่า Nei's (1978) unbiased genetic distance (อยู่ใต้แนวทแยงมุม) ในประชากรของแมลงวันผลไม้ <i>Bactrocera tau</i> (สปีชีส์ A)	42
3.5	แสดงความถี่จีโนไทป์ของแมลงวันผลไม้ <i>Bactrocera tau</i> และกลุ่มสปีชีส์ใกล้เคียง	43
3.6	แสดงค่า Nei's (1978) unbiased genetic distance ของแมลงวันผลไม้ <i>Bactrocera tau</i> (สปีชีส์ A) และกลุ่มสปีชีส์ใกล้เคียง	45
4.1	ตัวอย่างของแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera dorsalis</i> complex จำนวน 8 ชนิด และ <i>B. tau</i> ที่เก็บมาจากประชากรธรรมชาติในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย (1 = North; 2 = Central; 3 = Northeast; 4 = South; 5 = West; 6 = East)	52
4.2	แสดงดัชนีที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้กลุ่ม <i>B. dorsalis</i> complex จำนวน 8 ชนิด	55
4.3	แสดงดัชนีที่ใช้ในการจำแนกตัวอย่างของ <i>B. dorsalis</i> ที่มีถิ่นอาศัยใน 6 ภาคของประเทศไทย (1 = North; 2 = Central; 3 = Northeast; 4 = South; 5 = West; 6 = East)	56
4.4	ตัวอย่างหนอนแมลงวันผลไม้จำนวน 29 ชนิดในกลุ่ม <i>Bactrocera dorsalis</i> complex ที่เก็บจากผลไม้สุกของพรรณพืชต่าง ๆ ในประเทศไทย (1 = North; 2 = Central; 3 = Northeast; 4 = South; 5 = West; 6 = East)	60

ตารางที่		หน้า
4.5	แสดงเอนไซม์โลกัสที่ใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม <i>B. dorsalis</i> complex และสปีชีส์อื่น ๆ	70
5.1	แสดงความถี่แถบสีเอนไซม์ (electromorph) ของประชากรแมลงเบียนเพศเมียชนิด <i>D. longicaudata</i> (forms A and B) โดย malic enzyme (Me) และ isocitrate dehydrogenase (Idh)	74
5.2	เปอร์เซ็นต์ polymorphism และ heterozygosity ของ <i>D. longicaudata</i> ประชากรจาก 6 จังหวัด	76
5.3	แสดงเปอร์เซ็นต์ polymorphism และค่า heterozygosity รวม 13 loci ของประชากรแมลงเบียนชนิด <i>B. arisanus</i> ในประเทศไทย	77
5.4	แสดง genetic identity (I) และ genetic distance (D) รวม 13 loci ของแมลงเบียนชนิด <i>B. arisanus</i> จากประชากร 4 จังหวัด	78
6.1	ความถี่ของอินเวอร์ชันในประชากรทั้ง 4 แห่งของ <i>Simulium feuerborni</i> จากดอยอินทนนท์ ; st = standard gene sequences	83
7.1	ผลการสำรวจหา <i>Wolbachia</i> ในแมลงวันผลไม้โดยเทคนิค PCR	89
7.2	ผลการสำรวจหา <i>Wolbachia</i> ในแมลงเบียนชนิด <i>D. longicaudata</i> และ <i>Biosteres arisanus</i> ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค PCR	93
7.3	ผลการสำรวจหา <i>Wolbachia</i> ในยุงก้นปล่องชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค PCR	94
8.1	ผลการตรวจสอบหา <i>mariner</i> element โดยใช้เทคนิค PCR จากดีเอ็นเอของยุงก้นปล่อง 23 ชนิด	104
8.2	แสดงค่า Kimura 2-parameter distance เปรียบเทียบระหว่างยุงก้นปล่องชนิดต่าง ๆ ทั้ง 8 ชนิด สังเกตความใกล้ชิดระหว่าง <i>An. dirus</i> A และ C	104

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	การเปลี่ยนแปลงแปรผันทางพันธุกรรมที่นำไปสู่ความหลากหลายทางชีวภาพตามกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นตามกาลเทศะ	2
1.2	การสูญพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรซึ่งจะหาข้อมูลได้จากการศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรและชีววิทยาเชิงโมเลกุล	4
2.1	แผนภาพแสดงการศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรของแมลงวันผลไม้และแมลงเบียนจากประชากรธรรมชาติในประเทศไทย ข้อมูลจาก ①—⑥ อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างผสมผสานกันช่วยให้ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับสถานภาพของสปีชีส์ได้ชัดเจนก่อนที่จะศึกษาอนุกรมวิธาน ⑦ อย่างเป็นทางการ	10
2.2	แมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่พบในโครงการวิจัยนี้และจัดจำแนกตามวงศ์และสกุลตามเกณฑ์ของ Drew (1989): ตัวเอนบาง = ชนิดที่ศึกษาทางอนุกรมวิธานแล้ว; ตัวตรงหนา = ชนิดที่ค้นพบใหม่และใช้ชื่ออย่างไม่เป็นทางการ (ชื่อย่อ) (*ไม่มีข้อมูลโครโมโซม)	14
2.3	แผนภาพแสดงการจำแนกกลุ่มของแมลงวันผลไม้ในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนชนิดของแมลงวันผลไม้ที่พบในการวิจัยครั้งนี้จัดจำแนกกลุ่มตามหลักการของ Drew (1989)	15
2.4	แผนที่ประเทศไทยแสดงเขตจังหวัดต่าง ๆ ทั้ง 76 จังหวัดพร้อมชื่อภาษาอังกฤษที่ใช้อ้างอิงในรายงานนี้	16
3.1	แผนที่แสดงสถานที่ที่มีการเก็บตัวอย่างจากประชากรธรรมชาติของสปีชีส์ต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex (เลข 1-26 เป็นประชากรของ <i>B. tau</i> (A) ที่ใช้ศึกษาหาความแปรผันทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส)	25
3.2	ภาพถ่ายไมโททิกคาริโอไทป์ที่ย้อมด้วยสี Giemsa ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex	29
3.3	ภาพถ่ายไมโททิกคาริโอไทป์ที่ย้อมด้วยสี Hoechst 33258 ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex	30
3.4	แผนภาพ idiogram ของคาริโอไทป์ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex	31

ภาพที่		หน้า
3.5	ภาพถ่ายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัย 6 ชนิดในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex คือ A (= <i>B. tau</i>), C, D, E, F และ G : แถวบนเป็นภาพเพศผู้, แถวกลางเป็นภาพเพศเมียและแถวล่างเป็นภาพผลไม้ของพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ทั้ง 6 ชนิด ตามลำดับแถวกลางเป็นภาพเพศเมียและแถวล่างเป็นภาพผลไม้ของพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ทั้ง 6 ชนิด ตามลำดับ	33
3.6	ภาพถ่าย SEM ของอวัยวะวางไข่ (ovipositor) ของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex ทั้งหมด 7 ชนิด คือ 1-2, A (= <i>B. tau</i>); 3-4, C; 5-6, D; 7-8, E; 9-10, F; 11-12, G; 13-14, I แถวซ้ายมือ คือ ส่วนปลายสุด (apex of aculeus) (Bar = 0.05 mm.) แถวขวามือ คือ ภาพขยายผิวนอก (spicule) ของเปลือกหุ้ม (eversible membrane) (Bar = 0.01 mm)	35
3.7	แถบสี eletromorph ของเอนไซม์ที่ใช้จำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex (สปีชีส์ A-I ยกเว้นสปีชีส์ B และ H เพราะไม่มีตัวอย่างเพื่อการศึกษา) R = <i>B. dorsalis</i> ที่ใช้เป็นแถบสีมาตรฐาน	38
3.8	ฟีโนแกรมแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของประชากรต่าง ๆ ของ <i>Bactrocera tau</i> (สปีชีส์ A) คำนวณโดยวิธี UPGMA clustering analysis จากค่า Nei's (1978) unbiased genetic distance	46
3.9	แสดงเอนไซม์โลกัสที่ใช้จำแนกสปีชีส์ของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera tau</i> complex ทั้ง 7 ชนิด	47
3.10	ฟีโนแกรมแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของประชากรต่าง ๆ ของ <i>Bactrocera tau</i> และกลุ่มสปีชีส์ใกล้เคียง คำนวณโดยวิธี UPGMA clustering analysis จากค่า Nei's (1978) unbiased genetic distance โดยมี <i>B. cucurbitae</i> เป็น outgroup species	48
4.1	ขั้นตอนการทำและการวัดเส้นปีกของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม <i>B. dorsalis</i> complex	53
4.2	ภาพปีกจากกล้อง digital image ในรูปแบบของ JPEG file format	54
4.3	แผนภาพแสดงเส้นต่าง ๆ ของปีกจำนวน 30 เส้นที่จะต้องวัดในปีกของแมลงกลุ่มซับซ้อน <i>B. dorsalis</i> complex	54
4.4	แผนที่ประเทศไทยแสดงการกระจายของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera dorsalis</i> complex	59
4.5	ภาพถ่ายไมโททิกคาริโอไทป์ที่ย้อมด้วยสี Giemsa ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera dorsalis</i> complex	64
4.6	ภาพถ่ายไมโททิกคาริโอไทป์ที่ย้อมด้วยสี Hoechst 33258 ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera dorsalis</i> complex	65

ภาพที่		หน้า
4.7	แผนภาพ idiogram ของคาริโอไทป์ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera dorsalis</i> complex	66
4.8	แผนภาพไมโททิกโครโมโซมของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน <i>Bactrocera dorsalis</i> complex ที่จัดจำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม (I-VI) ตามเกณฑ์ปริมาณและการกระจายของเฮเทโรโครมาทินในโครโมโซมเพศและในออโทโซม	68
5.1	แสดงวงจรชีวิตของแมลงเบียน (ครอบคลุม-เส้นประ) ที่เจริญเติบโตภายในตัวหนอนระยะปลายและระยะดักแด้ของแมลงวันผลไม้ (กรอบเหลี่ยม-เส้นทึบ)	73
5.2	แสดงระบบเอนไซม์ที่สามารถใช้จัดจำแนกและบอกความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงเบียนชนิด <i>D. longicaudata</i>	75
5.3	แสดง phylogenetic tree ของแมลงเบียน <i>D. longicaudata</i> จากประชากร 6 จังหวัด	76
5.4	แสดง phylogenetic tree ของแมลงเบียนชนิด <i>B. arisanus</i> จากประชากร 4 จังหวัด	77
5.5	คาริโอแกรมของ Haploid โครโมโซมใน <i>D. longicaudata</i>	78
5.6	แสดง haploid idiogram ของ <i>D. longicaudata</i>	78
6.1	แสดงแผนที่ตำแหน่งที่สำรวจเก็บตัวอย่างวันดำ <i>Simulium feuerborni</i>	82
6.2	ภาพถ่ายแผนที่โพลีทินโครโมโซมของ <i>Simulium feuerborni</i> : S = short arm; L = long arm; C = centromere; NO = nucleolar organizer; BR = Ring of Balbiani; db = double bubble. เส้นปีกแสดงขอบเขตของอินเวอร์ชัน	84
6.3	ภาพถ่ายแสดง heterozygous inversion ที่พบในประชากรธรรมชาติของ <i>Simulium feuerborni</i> : (a) IS-st/1, (b) IL-st/1, (c) IIL-st/1, (d) IIL-st/2, (e) IIIS-st/1, (f) IIIL-st/1, (g) IIL-st/1 and IIL-st/2 ลูกศรชี้ไปทางเซนโทรเมียร์	85
7.1	แสดงลำดับ DNA จากชิ้นส่วน outer surface protein gene ของ <i>Wolbachia</i> (wsp) ที่พบในแมลงวันผลไม้ชนิด <i>Bactrocera caudata</i> และ <i>B. modica</i> และในแมลงเบียนชนิด <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> และ <i>Biosteres arisanus</i> เปรียบเทียบกับลำดับ DNA ของ outer surface protein gene ของ <i>Wolbachia</i> ที่พบในแมลงชนิดอื่น ๆ	96
7.2	แสดงความสัมพันธ์ตามสายวิวัฒนาการของ <i>Wolbachia</i> สายพันธุ์ที่พบในแมลงวันผลไม้ชนิด <i>Bactrocera caudata</i> และ <i>Bactrocera modica</i> และที่พบในแมลงเบียนชนิด <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> และ <i>Biosteres arisanus</i> กับ <i>Wolbachia</i> สายพันธุ์ที่พบในแมลงชนิดอื่น ๆ โดยใช้ PAUP program	99
8.1	แผนภาพ phylogram ที่สร้างจากข้อมูลลำดับเบสที่พบใน <i>mariner</i> element ของยุงก้นปล่อง 9 ชนิดและจัดจำแนกอยู่ใน subfamily ทั้ง 3	105



บทนำ

1.1 วิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

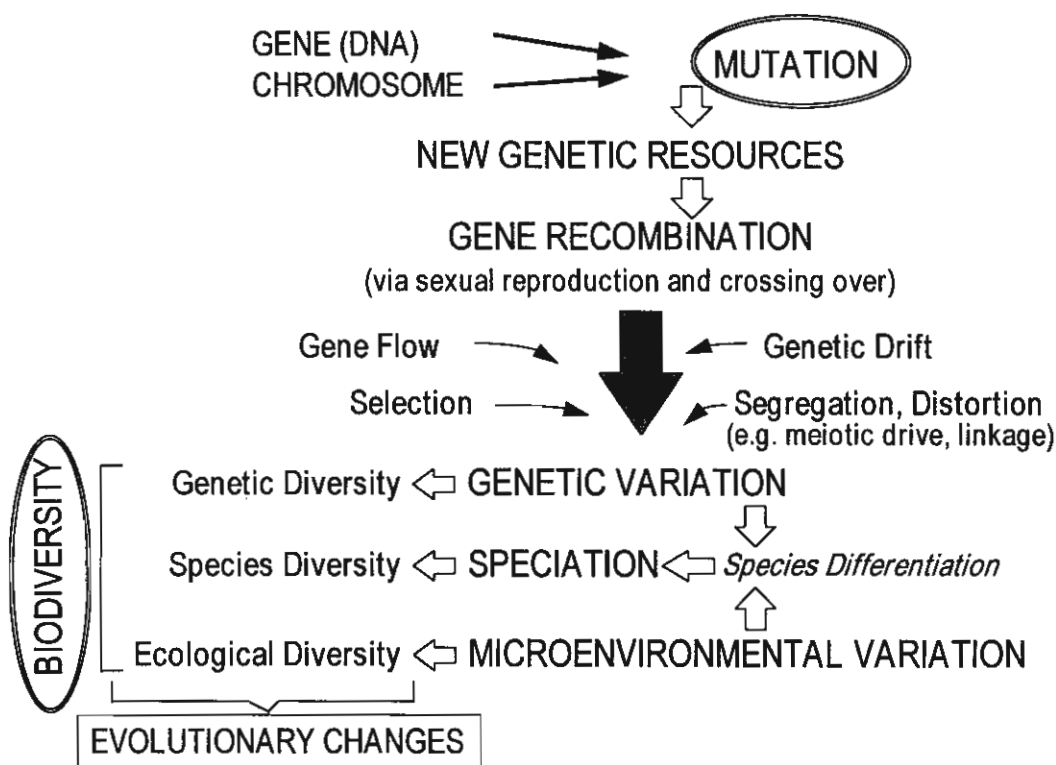
การเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตตามกาลเทศะเกิดจากปัจจัยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เรียกว่า มิวเทชัน ซึ่งเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอตามสภาพธรรมชาติทั้งในระดับโมเลกุลหรือระดับยีน (gene mutation) และในระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมควบคุมกับกระบวนการและกลไกการถ่ายทอดกรรมพันธุ์ในระบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เอื้ออำนวยให้เกิดยีนรีคอมบิเนชัน (gene recombination) รูปแบบต่างๆ ทางพันธุกรรมของประชากร ซึ่งถ่ายทอดไปสู่รุ่นถัด ๆ ไปภายใต้ปัจจัยที่เป็นผลผลักดันทางวิวัฒนาการ (evolutionary forces) เช่น การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพย้ายถิ่น ความผันผวนทางพันธุกรรม เป็นต้น เหตุการณ์เหล่านี้เกิดขึ้นในประชากรของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดในแต่ละท้องถิ่นยังผลให้เกิดความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) อย่างมากมาย ดังนั้นโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละถิ่นอาศัย (habitat) จะเปลี่ยนแปลงแปลกแยกแตกต่างกันออกไปตามกาลเวลาและตามสภาพแวดล้อมของสถานที่นั้นๆ นั่นคือ มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตเพื่อให้เกิดความพร้อมในการตอบสนองต่อความแปรผันด้านสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity)

การปรับตัวทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในประชากรต่างๆ ให้เหมาะสมและสอดคล้องกับระบบนิเวศของท้องถิ่นนั้น ๆ อย่างค่อยเป็นค่อยไป รวมทั้งโอกาสที่ไม่เหมือนกันในแต่ละท้องถิ่นที่อยู่ห่างไกลกันทางภูมิศาสตร์จะทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการไปตามสภาพสิ่งแวดล้อม เช่น ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงสภาพดินและลมฟ้าอากาศอย่างรวดเร็ว สปีชีส์ที่มีการแพร่กระจายกว้างขวางจนมีประชากรมากมายกระจายอยู่ทั่วไปจะมีโอกาสอยู่รอดด้วยการปรับตัวทางพันธุกรรมได้ดีกว่าสปีชีส์ที่มีประชากรเพียงแห่งเดียว นอกจากนั้นความแปลกแยกแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic differentiation) ระหว่างประชากรต่างๆ ของสปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่งยังช่วยเพิ่มโอกาสให้เกิดมีพืชพันธุ์ธัญญาหารสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีสมบัติทนทานต่อสภาพแห้งแล้งหรือต้านทานต่อแมลงศัตรูหรือเชื้อโรคได้ดี สิ่งเหล่านี้จะสั่งสมอยู่ใน “ห้องสมุดพันธุกรรม” ในประชากรท้องถิ่นต่าง ๆ อย่างยั่งยืน บนพื้นฐานของความจริงที่ว่าส่วนใหญ่แล้วประวัติศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ถูกบันทึกไว้ในสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอซึ่งเป็นตัวกำหนดว่าสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นชนิดใด มีลักษณะอย่างไร มีชีวิตอยู่มานานเท่าไร และมีความสัมพันธ์โยงใยกับพวกใดบ้างและอย่างไร

ทฤษฎีการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการบ่งชี้ว่ามีความแปลกแยกแตกต่างทางชีววิทยาระหว่างประชากรต่างๆ ที่แยกออกจากกันทางภูมิศาสตร์ เช่น บริเวณหุบเขากับบริเวณยอดเขา แม่น้ำลำคลองหรือทะเลที่แบ่งแยกประชากรทั้งสองฝั่งออกจากกัน เป็นต้น ประชากรที่แยกขาดออกจากกันทางภูมิศาสตร์เช่นนี้จะขาดการติดต่อไปมาหาสู่ระหว่างสมาชิกของแต่ละกลุ่ม ยังผลให้ขาดความต่อ

เนื่องทางการสืบพันธุ์และการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม (gene flow) ระหว่างกัน ถ้าสภาพการแบ่งแยกของประชากรดังกล่าวดำเนินไปเป็นเวลายาวนานพอสมควรจะทำให้ประชากรที่แยกออกจากกันนั้นพัฒนาและสั่งสมความแปลกแยกแตกต่างทางพันธุกรรมตามกาลเวลาและสถานที่ทำให้สปีชีส์บรรพบุรุษนั้นแปลกแยกแตกต่างกันทางชีววิทยา (species differentiation) จนกระทั่งประชากรเหล่านั้นไม่สามารถสืบพันธุ์และสืบสานเผ่าพันธุ์ระหว่างกันและกันได้ถึงแม้ว่าสมาชิกของแต่ละประชากรจะมีโอกาสกลับเข้ามาอยู่ร่วมกันในบริเวณถิ่นอาศัยเดียวกันอีกก็ตาม เมื่อมีเหตุการณ์เช่นนี้เกิดขึ้นก็ถือว่าประชากรที่แยกกันอยู่นั้นได้วิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงไปจนมีสถานภาพเป็นสปีชีส์หรือชนิดที่แตกต่างทางชีววิทยาโดยสิ้นเชิง เรียกกระบวนการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ว่า การแบ่งแยกสปีชีส์หรือสปีชีเอชัน (speciation) (ภาพที่ 1.1)

ความแปลกแยกแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรหรือระหว่างสปีชีส์ที่เราสนใจศึกษาอยู่นั้นจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะช่วยให้คำตอบได้ว่าประชากรหรือสปีชีส์เหล่านั้นมีความใกล้ชิดกันมากน้อยเพียงใด และได้แยกแตกแขนงออกจากบรรพบุรุษดั้งเดิมมานานเท่าไร การเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการเช่นนี้ทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ๆ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาล้ำคลึงกันมาก ยากต่อการจำแนกชนิด เรียกสปีชีส์ที่มีสมบัติเช่นนี้ว่า คริปติกสปีชีส์ (cryptic species) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันหรือสปีชีส์พี่น้องกันที่เรียกว่าซิบลิงสปีชีส์ (sibling species) ที่เพิ่งจะแตกแยกออกจากกันในช่วงเวลาไม่นานนัก ซึ่งส่วนมากแล้วมักจะมีโครงสร้างทางพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอที่คล้ายกันมาก



ภาพที่ 1.1 การเปลี่ยนแปลงแปรผันทางพันธุกรรมที่นำไปสู่ความหลากหลายทางชีวภาพตามกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นตามกาลเทศะ

กระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการดังกล่าวทำให้เกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่เพิ่มขึ้นมากมายหลากหลายชนิดที่เรียกว่า ความหลากหลายของสปีชีส์ (species diversity) สมบัติความหลากหลายด้านชีววิทยาของประชากรและชุมชนสิ่งมีชีวิตทั้งในเชิงสปีชีส์ พันธุกรรม และนิเวศวิทยาดังกล่าวเรียกโดยรวมว่า “ความหลากหลายทางชีวภาพ (biological diversity หรือ biodiversity)” (วิสุทธิ ไบไม้ 2538) ซึ่งนับว่าเป็นทรัพยากรชีวภาพ (bioresource) ที่ทรงคุณค่าและมีบทบาทสำคัญในการสร้างสรรค์บรรยากาศของโลกสิ่งมีชีวิตหรือชีวาลัย (biosphere) และมีประโยชน์ต่อมวลมนุษยชาติทั้งโดยตรงและทางอ้อม ดังนั้น ความหลากหลายทางชีวภาพจึงเป็นผลพวงจากการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของประชากรตามกาลเทศะดังสรุปไว้ในภาพที่ 1.1

การศึกษากลุ่มคริบทิกสปีชีส์และชิปลิงสปีชีส์มีความสำคัญอย่างไร และจะได้ประโยชน์อะไรและมากน้อยเพียงใดในการศึกษาทางชีววิทยาพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตดังกล่าว ข้อกังขาเช่นนี้เป็นเรื่องที่ค่อนข้างยากที่จะหาคำตอบได้ชัดเจนทันทีทันใดและตรงไปตรงมา เพราะว่าการวิจัยพื้นฐานส่วนมากมักจะให้ผลในระยะยาวก่อนที่จะนำผลการวิจัยและข้อมูลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางประยุกต์ แต่พอจะประเมินคุณค่าของการศึกษาดังกล่าวได้ดังนี้

1) การศึกษาองค์ความรู้เกี่ยวกับชิปลิงสปีชีส์หรือคริบทิกสปีชีส์จะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์โยงใยตามสายวิวัฒนาการของชนิดที่ใกล้ชิดกัน และจะทำให้เราเข้าใจกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปลกแยกแตกต่างของสปีชีส์ ตลอดจนการปรับตัวทางพันธุกรรมของสปีชีส์ที่เกี่ยวข้อง

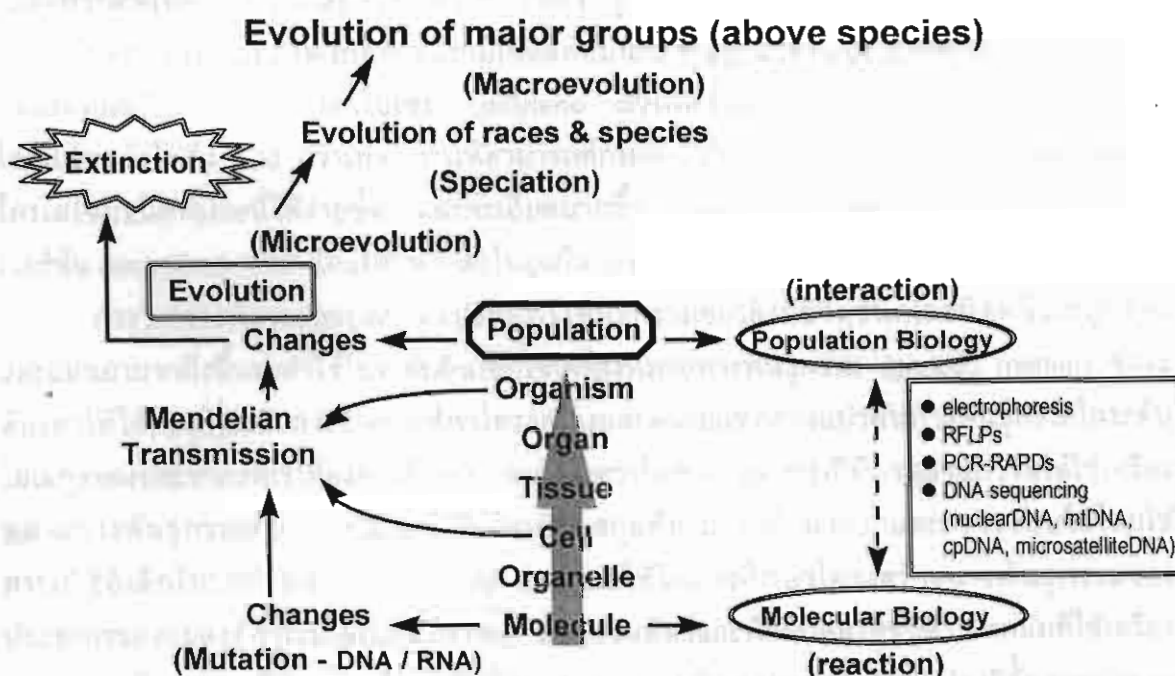
2) กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนและคริบทิกสปีชีส์บางกลุ่มมีบทบาทสำคัญทางด้านการแพทย์และการเกษตร ได้แก่ แมลงพาหะ แมลงศัตรูพืช และจุลชีพก่อโรค (pathogen) ที่วิวัฒนาการร่วมกันมาเป็นเวลายาวนาน ข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาจะสะท้อนให้เราทราบว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นมีกิจกรรมและการดำรงชีวิตร่วมกันอย่างสมดุลได้อย่างไรในประชากรธรรมชาติ เพื่อจะได้หามาตรการควบคุมแมลงพาหะหรือแมลงศัตรูพืชและจุลชีพก่อโรคได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสมดุลธรรมชาติ

3) ในกรณีของพืชหรือสัตว์ที่มีบทบาทต่อระบบนิเวศหรือมีประโยชน์ต่อการอยู่ดีกินดีของมนุษย์ เช่น สัตว์หรือพืชสมุนไพร สัตว์หรือพืชที่ให้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือเภสัชภัณฑ์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ และมีความจำเป็นต้องอนุรักษ์ไว้เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไปอย่างยั่งยืนนั้นจะต้องได้รับการตรวจสอบศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานอย่างชัดเจน เช่น ข้อมูลด้านชนิด การแพร่กระจาย และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันเพื่อจะช่วยให้การอนุรักษ์และการจัดการได้ผลดีและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

1.2 ชีววิทยาเชิงประชากรและชีววิทยาเชิงโมเลกุล

เนื่องจากการสูญพันธุ์ (extinction) และเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการ (evolution) ของสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นในระดับประชากร (ภาพที่ 1.2) ดังนั้นการศึกษาชีววิทยาเชิงประชากร (population biology) ไม่ว่าจะเป็นทางด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากร (population genetics) หรือทางด้านนิเวศวิทยาเชิงประชากร (population ecology) จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับความรู้ความเข้าใจในสิ่งมีชีวิตทั้ง

ระบบ ประชากรของสิ่งมีชีวิตทั่วไปไม่ว่าจะเป็นไวรัส จุลินทรีย์ พืช สัตว์ และมนุษย์ อาจมีลักษณะที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าว่ามีความแตกต่างแปรผันทางฟีโนไทป์ (phenotypic variation) หรือทางสัณฐานวิทยา (morphological variation) ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากพันธุกรรม ถึงแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างอาจได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมด้วย ดังนั้นความแตกต่างแปรผันทางสัณฐานวิทยาไม่ว่าจะตรวจสอบโดยวิธีการใดก็ตามจะสะท้อนให้เห็นถึงรากฐานที่แท้จริงของความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมที่มีอยู่หลากหลายในประชากร



ภาพที่ 1.2 การสูญพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรซึ่งจะหาข้อมูลได้จากการศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรและชีววิทยาเชิงโมเลกุล

วิธีการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมอาจทำได้หลายวิธี (วิสุทธิ์ ไบไม้ 2540) แต่ละวิธีจะมีความยากง่ายและความแม่นยำในระดับต่างๆ กัน วิธีที่ง่ายที่สุดคือสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ความสูง น้ำหนัก สี ถ้าจะให้ละเอียดลงไปอีกหน่อยก็ต้องอาศัยวิธีการตรวจสอบพันธุกรรมโดยตรง ซึ่งสามารถทำได้ทั้งในระดับโครโมโซมและในระดับยีนโดยใช้เทคนิคทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุล (molecular biology) (ภาพที่ 1.2)

การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซม (chromosomal variation) โดยทั่วไปจะสังเกตได้จากการศึกษาไมโททิกโครโมโซมซึ่งจะพบความแตกต่างแปรผันในเชิงจำนวนที่มากกว่าหรือน้อยกว่าจำนวนปกติ ($2n$) ในสิ่งมีชีวิตพวกดิพลอยด์ เช่น

(1) มีโครโมโซมชนิดพิเศษที่เรียกว่าซูเปอร์นิวเมอรัลโครโมโซม (supernumerary chromosome) หรือโครโมโซมบี (chromosome B)

(2) มีโครโมโซมใดโครโมโซมหนึ่งมากกว่าหรือน้อยกว่าปกติ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า แอนยูพลอยดี (aneuploidy)

(3) มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นมาเป็น 3 ชุด หรือ 4 ชุด แทนที่จะมี 2 ชุดตามปกติ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ยูพลอยดี (euploidy)

(4) ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในระดับไมโททิกโครโมโซมที่พบบ่อยที่สุดในประชากรธรรมชาติคือความแปรผันในเฮเทโรโครมาทิน (heterochromatin variation) สำหรับในแมลงพวกดีพเทอร่า (Diptera) เช่น พวกแมลงหวี่ ยุงก้นปล่อง หรือแมลงวันผลไม้ (Baimai, 1998)

นอกจากนั้นแมลงพวกดีพเทอร่ามีเซลล์ต่อมน้ำลายของตัวหนอนหรือตัวอ่อนที่มีโครโมโซมชนิดพิเศษที่เรียกว่าโพลีทีนโครโมโซม (polytene chromosome) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าไมโททิกโครโมโซมทั่วไปถึง 100 เท่า ทำให้สามารถศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมชนิดพิเศษนี้ได้ง่ายขึ้น และละเอียดมากขึ้น โดยเฉพาะความแปรผันในรูปแบบของอินเวอร์ชัน (inversion) เช่น ในแมลงหวี่และในยุงก้นปล่อง เป็นต้น

การวิเคราะห์ตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งให้ถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้นจะทำได้ในระดับยีนโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งจะต้องหาให้ได้ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างและความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของประชากรที่เราต้องการศึกษา จะสังเกตว่าในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมานักวิจัยได้ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็นโปรตีนหรือดีเอ็นเอโมเลกุลที่สามารถนำมาแยกและตรวจสอบได้โดยใช้กรรมวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส และนำเอามาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรของแมลงศัตรูพืชและแมลงพาหะ ตลอดจนสัตว์และพืชอีกหลายชนิด เทคนิคที่ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมมีประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจสอบติดตามการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของประชากรของสิ่งมีชีวิตที่พอจะสรุปได้ดังนี้

1. อัลโลไซม์ (allozyme) : อิเล็กโทรโฟริซิสเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงหวี่ แมลงวันผลไม้ ยุง หนู และสัตว์อื่นๆ รวมทั้งพืชพรรณต่างๆ ที่ใช้ศึกษาเพื่อความรู้ก้าวหน้าทางวิชาการตลอดจนการศึกษาพันธุศาสตร์ของมนุษย์ (Harris and Hopkinson, 1976) การศึกษาอัลโลไซม์ในการตรวจสอบหาความแตกต่างแปรผันของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนโมเลกุลที่มีสมบัติการทำงานเหมือนกัน ลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในโปรตีนโมเลกุลจะสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างของลำดับเบสในดีเอ็นเอโมเลกุลที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนั้นด้วย สมบัติของอัลโลไซม์จะแสดงออกเป็นแบบโคโดมิแนนต์ คือ เราจะสามารถแยกพวกที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกตออกจากพวกที่เป็นเฮเทโรไซโกตได้อย่างชัดเจน การวิเคราะห์อัลโลไซม์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสกระทำได้ง่ายและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายไม่มากนัก แต่ก็ยังคงมีข้อเสียเปรียบตรงที่เราจะศึกษาตรวจสอบยีนที่ควบคุมอัลโลไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในจำนวนจำกัดเพียงประมาณ 20-30 โลกัสนั้นในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ดังนั้น การศึกษาสิ่งมีชีวิตบางชนิดจึงจำเป็นต้องศึกษาหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมโดยการตรวจหาความแตกต่างแปรผันในระดับยีนหรือดีเอ็นเอโดยตรง

2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) : RFLP เป็นเทคนิคที่ช่วยตรวจหาความแตกต่างแปรผันในโมเลกุลดีเอ็นเอในส่วนของโครโมโซมที่เป็นโฮโมโลกัสกัน และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ทั้งในส่วนที่เป็น coding region และในส่วนที่เป็น noncoding region เทคนิค RFLP ใช้หลักการที่ทำให้ดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เข้าผสมกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอชิ้นย่อยๆ ที่ถูกตัดขาดโดยเอนไซม์จำเพาะชนิดต่างๆ กัน ซึ่งจะทำให้ชิ้นส่วนเล็กๆ เหล่านั้นแยกออกจากกันโดยวิธีการอิเล็กโทรโฟเรซิสบนแผ่นอะกาโรสเจล (Southern, 1975) วิธีการนี้มีความละเอียดและแม่นยำมากกว่าการตรวจสอบอัลโลไซม์ แต่ข้อเสียเปรียบคือต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะมากกว่าและมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีการอิเล็กโทรโฟเรซิสที่กล่าวมาข้างบน และต้องการผู้ชำนาญการที่ผ่านการฝึกฝนมานาน

3. RAPD-PCR : วิธีการนี้เป็นเทคนิคใหม่ที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะทำได้ง่ายในเวลาอันรวดเร็วและความแม่นยำสูงโดยอาศัยการใช้ดีเอ็นเอช่วงสั้นเพียงประมาณ 10 เบสเป็นต้นแบบ (primer) และต้องการใช้ดีเอ็นเอปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่น ดีเอ็นเอจากเซลล์รากขนสัตว์ หรือหยดเลือดที่เปื้อนบนบนเสื้อผ้า เป็นต้น เพื่อนำมาเลือกขยายปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มตลอดทั่วจีโนมทั้งหมด จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD (Williams *et al.*, 1990) และใช้กรรมวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างเป็นลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR) ความแปรผันทางพันธุกรรมจะมีมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับว่ามีหรือไม่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้ขยายปริมาณนั้น วิธีการนี้ใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่ก็ยังคงมีข้อเสียเปรียบตรงที่มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องใช้เครื่องมือพิเศษจำเพาะด้วย อย่างไรก็ตาม ถ้าทำดีเอ็นเอในปริมาณมากๆ จากตัวอย่างของประชากรที่มีขนาดใหญ่ก็จะทำให้ค่าใช้จ่ายนั้นคุ้มค่าเช่นเดียวกับเทคนิค RFLP และมีข้อได้เปรียบคือจะทำให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดมากขึ้น

4. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) : เทคนิคนี้ใช้ดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ที่สามารถจับคู่กับดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำซ้อนกันหลายๆ (repetitive DNA) ที่มีอยู่ทั่วไปในจีโนม ซึ่งยังผลให้มีรูปแบบการกระจายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอติดตามที่แตกต่างกันในสภาวะการที่คล้ายกับลายพิมพ์นิ้วมือของคนเรา เทคนิคนี้จึงได้ชื่อว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะและมีความเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละคนหรือของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวตนด้วย จากลักษณะจำเพาะตัวดังกล่าวจึงทำให้เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรของสัตว์อย่างกว้างขวาง เช่น ในกรณีของสุนัขจิ้งจอก (Gilbert *et al.* 1990) นอกจากนั้นเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังใช้ประโยชน์ในการตรวจหาหลักฐานทางวิชาการนิติเวช เช่น การพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูก และการพิสูจน์หลักฐานหาผู้ที่เป็นอาชญากรตัวจริงในกรณีข่มขืนหรือกรณีฆาตกรรมได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพยิ่ง

เทคนิคใหม่ทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมดังที่กล่าวมาข้างบนนี้นับว่ามีประโยชน์อย่างมากที่เอื้ออำนวยให้นักวิทยาศาสตร์สามารถค้นคว้าหาข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมที่นำไปสู่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ได้อย่างแม่นยำ จนทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจในกลไกการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการได้ละเอียดลึกซึ้งมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการ

การวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) หรือพันพ้องชีวิตที่หมุนบิดไปตามความสัมพันธ์ระหว่างแมลงพาหะ (vector) กับปรสิต (parasite) และระหว่างแมลงศัตรูพืช (pest) กับพืชอาศัย (host plant) รวมทั้งแบคทีเรียบางชนิดที่ดำรงชีวิตแบบ symbiosis ในแมลงเหล่านี้ กรณีแมลงวันผลไม้ที่วิวัฒนาการควบคู่กันมากับพืชอาศัยและแมลงเบียนรวมทั้งพวกเอนโดซิมไบออนต์ที่ใช้เป็นตัวอย่างการศึกษาในโครงการนี้

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรทั้งในด้านพันธุศาสตร์และนิเวศวิทยาของแมลงที่มีความสำคัญทางการเกษตรและทางการแพทย์ในประเทศไทย ได้แก่ แมลงวันผลไม้ และยุง รวมทั้งแมลงเบียนและไร้น้ำด้วย โดยใช้วิธีการทางด้านสัณฐานวิทยา เซลล์พันธุศาสตร์ และอณูพันธุศาสตร์
- เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่และความเข้าใจในกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเหล่านี้ ซึ่งจะเป็นพื้นฐานสำคัญที่อาจนำไปสู่การหามาตรการควบคุมแมลงศัตรูและแมลงพาหะโดยชีววิธีในอนาคต
- เพื่อผลิตบัณฑิตปริญญาโทและปริญญาเอกด้านชีววิทยาเซตร้อน

การสำรวจเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย

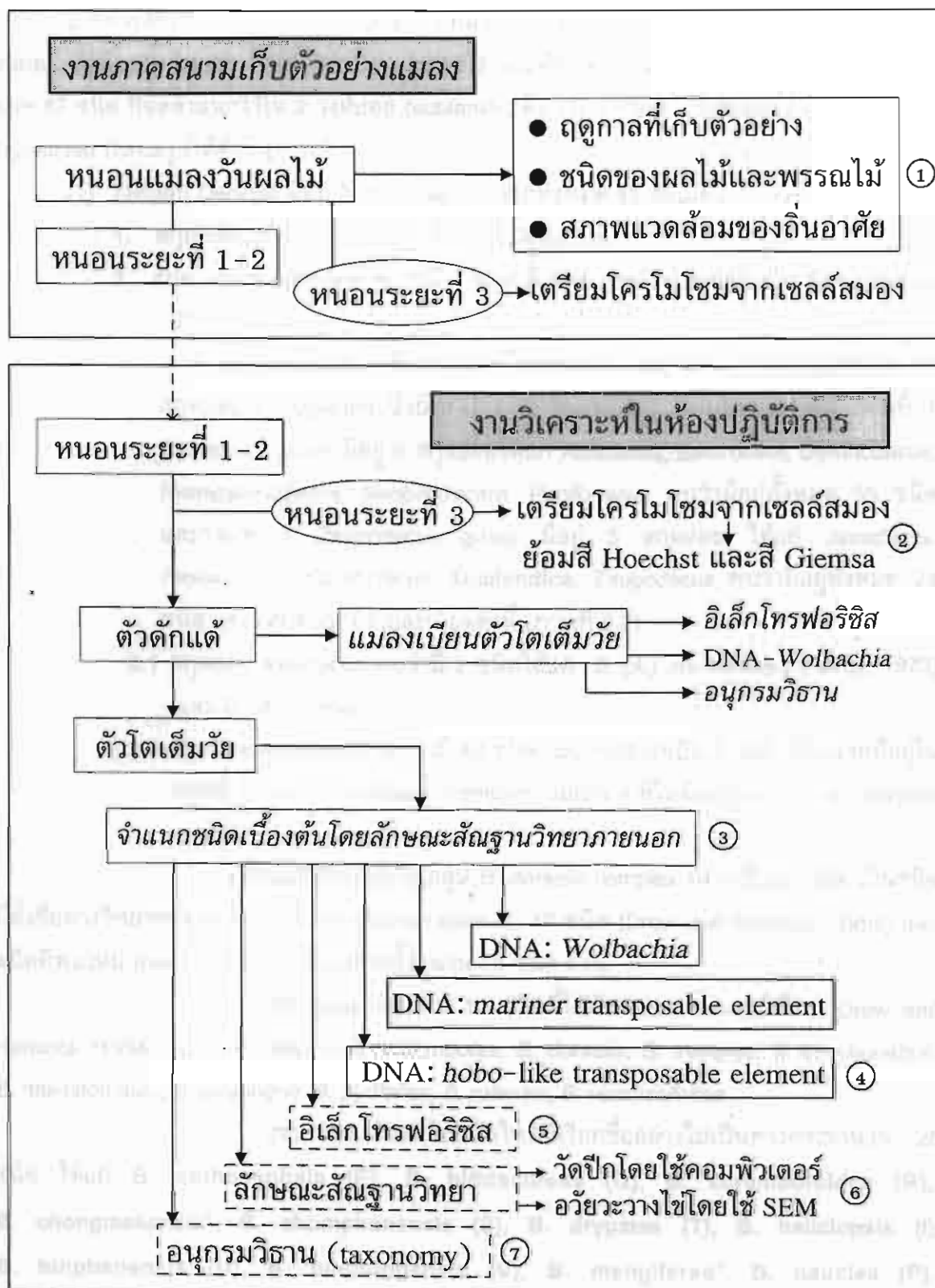
แมลงวันผลไม้ (fruit flies) หรือที่คนทั่วไปเรียกว่าแมลงวันทอง (Diptera: Tephritidae: Dacinae) มีอยู่มากมายประมาณ 4,000 ชนิด กระจายไปทั่วโลกรวมทั้งในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก ซึ่งคาดว่าจะมีไม่น้อยกว่า 1,000 สปีชีส์ (Hardy and Adachi 1954; Hardy 1973; Drew 1989, Drew and Hancock, 1994) ส่วนมากจัดอยู่ในสกุล (genus) *Bactrocera* และมีอยู่ไม่กี่ชนิดที่จัดอยู่ในสกุลอื่น ได้แก่ *Adrama*, *Anomoia*, *Carpomyia*, *Dacus*, *Euphranta* และ *Monacrostichus* สำหรับในประเทศไทยเข้าใจว่ามีแมลงวันผลไม้หลากหลายชนิดไม่น้อยกว่า 200 สปีชีส์ แต่ที่ศึกษาทางอนุกรมวิธานแล้วมีประมาณ 67 ชนิด แมลงวันผลไม้หลายชนิดที่แพร่กระจายอยู่ในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียอาคเนย์ สร้างปัญหาให้กับนักอนุกรมวิธานอย่างมาก เพราะแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดมีความแตกต่างแปรผันทางรูปร่างลักษณะภายนอกซึ่งยากต่อการตัดสินใจว่าจะเป็นความแตกต่างภายในสปีชีส์เดียวกันหรือเป็นความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ ปัญหาทางวิชาการอนุกรมวิธานดังกล่าวได้รับความสนใจจากนักอนุกรมวิธานด้านแมลงวันผลไม้ในภูมิภาคนี้โดยเฉพาะ Drew (1989) และ Drew and Hancock (1994) ได้ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ในภูมิภาคเอเชียอาคเนย์ ออสเตรเลีย และแปซิฟิก ทำให้ค้นพบแมลงวันผลไม้ชนิดใหม่ๆ จำนวนมากกว่าร้อยชนิดและจัดหมวดหมู่ใหม่ภายในจีนัสหรือสกุล *Bactrocera* และ *Dacus* ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 สกุลย่อยหรือซับจีนัส (subgenus) และ 5 สกุลย่อยตามลำดับ รวมทั้งการค้นพบสปีชีส์ใหม่ถึง 109 สปีชีส์ (Drew, 1989) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มสปีชีส์ซับซอน *Bactrocera dorsalis* complex ซึ่งมีสปีชีส์ที่คล้ายคลึงกันถึง 52 สปีชีส์ (Drew and Hancock, 1994) และในจำนวนนี้มีอยู่ 8 สปีชีส์ที่มีผลกระทบต่อการเศรษฐกิจของประเทศต่างๆ ในภูมิภาคนี้

แมลงวันผลไม้มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจการเกษตรอย่างมาก เพราะเป็นแมลงศัตรูพืชที่ร้ายแรงสามารถทำลายผลไม้และพืชผักได้หลายชนิด แมลงวันผลไม้เป็นต้นเหตุทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจในแง่ต่างๆ เพราะบาดแผลที่เกิดจากการวางไข่อาจทำให้ผลไม้เปลี่ยนสี หรือมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติรอบๆ บาดแผล เชื้อโรคต่างๆ อาจเข้าสู่ผลไม้ทางปากแผลและก่อให้เกิดการเน่าเสีย ผลไม้ทั้งผลอาจถูกหนอนกัดกินจะเป็นโพรงเสียหายได้ นอกจากนี้ยังมีการสูญเสียทางอ้อมที่เกิดจากการไม่สามารถผลิตผลไม้ส่งเป็นสินค้าออกไปยังประเทศต่างๆ เนื่องจากว่าแต่เดิมมาเราอาศัยวิธีการรมผลไม้ด้วยสารเคมีเพื่อกำจัดแมลงก่อนส่งออก แต่สารรมควันเพียงชนิดเดียวที่ใช้ได้ผล คือ ethylene dibromide นั้นถูกยกเลิกไปเพราะพบว่าเป็นสารก่อให้เกิดมะเร็ง วิธีการอื่นๆ ได้แก่ การใช้ความร้อน ความเย็น หรือรังสีนั้นยังไม่เป็นที่ยอมรับและไม่ได้ผลดีเพียงพอ ทางเลือกอีกทางหนึ่ง คือ การป้องกันไม่ให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลไม้ซึ่งดูเหมือนว่าจะเป็นวิธีการที่ดีที่สุดอีกวิธีหนึ่ง

สืบเนื่องจากความตื่นตัวของประชาชนในเรื่องพิษและผลเสียของการใช้ยาฆ่าแมลงอย่างมากมายรวมทั้งสารเคมีที่ทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยในขณะนี้

นักวิชาการจึงเริ่มหันเหความสนใจมาสู่การใช้วิธีแบบผสมผสานเพื่อควบคุมแมลงศัตรู โดยมีเป้าหมายเพื่อจะลดขนาดของประชากรของแมลงศัตรูให้อยู่ในระดับที่จะไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมากนัก ระดับดังกล่าวสำหรับแมลงวันผลไม้ นั้นเทียบได้กับการไม่มีแมลงเลยหรือมีอยู่เพียงไม่กี่ตัวเท่านั้น การจัดการแมลงวันผลไม้ให้ได้ผลดีจำเป็นต้องการข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาทั้งข้อมูลภาคสนามและข้อมูลในห้องปฏิบัติการเพื่อผสมผสานกับงานวิจัยด้านอื่นๆ ซึ่งจะนำไปสู่การจัดการแมลงศัตรูแบบบูรณาการ (integrated pest management หรือ IMP) ที่ถือปฏิบัติกันโดยทั่วไป ในยุคนี้ การศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งแมลงที่ศึกษาในโครงการนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 คือ (1) การศึกษาภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างแมลงจากประชากรธรรมชาติเพื่อเชื่อมโยงสภาพทั่วไปของถิ่นอาศัยในนิเวศวิทยาของพื้นที่นั้นที่อาจสะท้อนความสัมพันธ์โยงใยกับข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ทำการวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการ (2) การศึกษาหาข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาและด้านพันธุกรรมในระดับต่างๆ เพื่อหาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรตัวอย่างที่เก็บมาได้

การศึกษาแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยเท่าที่ผ่านมานับว่าอยู่ในระยะการสำรวจเบื้องต้น ปัญหาอยู่ที่แมลงวันผลไม้ที่ทำลายผลไม้และพืชผลอื่น ๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจำนวนมาก ได้ก่อให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนกชนิด เนื่องจากแมลงเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันหรือคล้ายคลึงกันมาก การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับแมลงวันผลไม้จากประชากรธรรมชาติในประเทศไทย (วิสุทธิ์ ใบไม้และคณะ 2538) บ่งชี้ว่ามีแมลงกลุ่มที่มีความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมและวิวัฒนาการที่ซับซ้อนอยู่หลายกลุ่ม ความซับซ้อนดังกล่าวส่งผลให้เกิดความยากลำบากในทางอนุกรมวิธาน จึงได้นำเอาเทคนิคในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมและวิวัฒนาการมาช่วยในการจัดจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้เพื่อเป็นพื้นฐานที่ชัดเจนสำหรับการศึกษาในด้านอื่นๆ เช่น การป้องกันและกำจัดการระบาดของแมลงวันผลไม้ เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าวได้แก่ การศึกษาทางสัณฐานวิทยา การแพร่กระจายและนิเวศวิทยาของแมลงที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งได้ทำการศึกษาไปพร้อมกับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล ดังนั้น งานศึกษาภาคสนามเพื่อสำรวจเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากประชากรธรรมชาติในห้องที่ต่างๆ ของประเทศไทยจึงเป็นภารกิจสำคัญอันดับแรกของการศึกษาในโครงการนี้ ซึ่งได้ดำเนินการเป็นประจำอย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้งตลอดโครงการ



ภาพที่ 2.1 แผนภาพแสดงการศึกษาวิทยาเชิงประชากรของแมลงวันผลไม้ และแมลงเบียนจากประชากรธรรมชาติในประเทศไทย ข้อมูลจาก ① – ⑥ อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างผสมผสานกันช่วยให้ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับสถานภาพของสปีชีส์ได้ชัดเจนก่อนที่จะศึกษาอนุกรมวิธาน ⑦ อย่างเป็นทางการ

จากการสำรวจแมลงวันผลไม้ในช่วง 3 ปีที่ผ่านมาในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยได้พบแมลงวันผลไม้ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์แล้วจำนวน 36 ชนิด และค้นพบสปีชีส์ใหม่จำนวน 51 ชนิด รวมทั้ง 87 ชนิด ที่จัดจำแนกไว้ใน 2 วงศ์ย่อย (subfamily) คือ (1) วงศ์ย่อย Dacinae และ (2) วงศ์ย่อย Trypetinae ที่พอสรุปได้ดังนี้ (ภาพที่ 2.2)

(1) วงศ์ย่อย Dacinae มีอยู่ 3 สกุล (Genus) รวมทั้ง 81 ชนิด คือ

1. สกุล *Dacus* พบว่ามี 1 ชนิด คือ *D. destillatoria*
2. สกุล *Monacrostichus* พบว่ามี 1 ชนิด คือ *M. citricola* (White and Elson-Harris, 1992)
3. สกุล *Bactrocera* พบว่ามี 79 ชนิด ในจำนวนนี้ยังแบ่งแมลงวันผลไม้ออกเป็น 11 สกุลย่อย (Subgenus) ซึ่งยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มที่ 1 *Bactrocera* group มีอยู่ 6 สกุลย่อย ได้แก่ *Asiadacus*, *Bactrocera*, *Gymnodacus*, *Hemigymnodacus*, *Neobactrocera*, *Pacifodacus* พบว่ามีอยู่ทั้งหมด 55 ชนิด และกลุ่มที่ 2 *Zeugodacus* group มีอยู่ 5 สกุลย่อย ได้แก่ *Javadacus*, *Papuodacus*, *Paratridacus*, *Thailandica*, *Zeugodacus* พบว่ามีอยู่ทั้งหมด 24 ชนิด แต่ละสกุลย่อยมีรายละเอียดดังนี้ (ภาพที่ 2.2)

3.1 สกุลย่อย *Asiadacus* พบว่ามี 2 ชนิด ได้แก่ *B. (A.) maculifacies* (Hardy, 1973) และ *B. (A.) modica*

3.2 สกุลย่อย *Bactrocera* พบว่ามี 49 ชนิด และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่อยู่ในกลุ่มซับซ้อน *B. dorsalis* complex และพวกที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex

3.2.1 แมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex พบว่ามี 38 ชนิด เป็นชนิดที่ตั้งชื่อทางวิทยาศาสตร์เรียบร้อยแล้ว (known species) 10 ชนิด (Drew and Hancock, 1994) และชนิดที่พบใหม่ (new species) ในโครงการนี้จำนวน 28 ชนิด ดังนี้

(ก) แมลงวันผลไม้ 10 ชนิดที่ได้ค้นพบและรายงานไว้โดย Drew and Hancock (1994) ได้แก่ *B. arecae*, *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *B. irvingiae*, *B. kanchanaburi*, *B. melastomatos*, *B. propinqua*, *B. pyrifoliae*, *B. raiensis*, *B. verbascifoliae*

(ข) แมลงวันผลไม้ชนิดใหม่ที่เรียกชื่ออย่างไม่เป็นทางการจำนวน 28 ชนิด ได้แก่ *B. anthocephala* (E), *B. bifidaculeus* (Q), *B. caramboloides* (R), *B. chongmekensis**, *B. chumphonensis* (S), *B. drypetes* (T), *B. heliciopsis* (I), *B. hinphanensis* (U), *B. hinphingensis* (V), *B. mangiferae**, *B. nauclea* (P), *B. nigroceromata**, *B. nonkoensis**, *B. nongmaenaensis**, *B. operculata* (J), *B. osbeckiae**, *B. payena* (K), *B. near papayae* (O), *B. phanensis* (M), *B. salaciae* (W),

B. thaiensis (N), B. tonbaoensis (X), B. tonrianensis (L), B. undulata*, B. walsurae (Y), B. yaikhamensis*, B. near thailandica*, *Bactrocera* sp. RN(M/2) 669 (Z)

3.2.2 แมลงวันผลไม้ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex พบว่ามี 11 ชนิด ในจำนวนนี้จัดอยู่ในกลุ่ม *B. limbifera* complex 4 ชนิด และชนิดที่ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มซับซ้อน (complex species) จำนวน 7 ชนิด อย่างไรก็ตามมีอยู่ 5 ชนิดที่ได้เคยรายงานไว้แล้วโดย Hardy (1973) ได้แก่ *B. limbifera* (อยู่ในกลุ่มซับซ้อน), *B. correcta*, *B. latifrons*, *B. tuberculata* และ *B. umbrosa* ส่วนที่เหลืออีก 6 ชนิดเป็นสปีชีส์ใหม่ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ที่เรียกชื่ออย่างไม่เป็นทางการ คือ **B. edangensis (B), B. laurea (C), B. tonsiaensis (D), B. cerasoides*, B. bangphongensis*, B. nayokensis** (ภาพที่ 2.2)

3.3 สกุลย่อย *Gymnodacus* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ **B. axillaris**

3.4 สกุลย่อย *Hemigymnodacus* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ *B. diversa*

3.5 สกุลย่อย *Neobactrocera* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ **B. yongensis**

3.6 สกุลย่อย *Pacifodacus* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ *B. infesta*

3.7 สกุลย่อย *Javadacus* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ **B. xanthofacies***

3.8 สกุลย่อย *Papuodacus* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ **B. hualphluensis***

3.9 สกุลย่อย *Paratridacus* พบว่ามี 2 ชนิด ได้แก่ *B. aptata* (Hardy, 1973) และ *B. expandens melania* (Hardy & Adachi 1954)

3.10 สกุลย่อย **Thailandica** พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ **B. chabunensis**

3.11 สกุลย่อย *Zeugodacus* พบว่ามี 19 ชนิด แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่อยู่ในกลุ่มซับซ้อน *B. tau* complex และพวกที่ไม่อยู่ในกลุ่ม *B. tau* complex (ภาพที่ 2.2)

3.11.1 แมลงวันผลไม้ที่จัดอยู่ในกลุ่มซับซ้อน *B. tau* complex พบว่ามี 10 ชนิด เป็นชนิดที่รู้ชื่อทางวิทยาศาสตร์แล้ว 2 ชนิด คือ *B. tau* (species A) และ *B. isolata* ส่วนอีก 8 ชนิด เพิ่งค้นพบใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ คือ **B. celastrinea (B), B. hydnocarpa (F), B. hydnocarpoides (G), B. naraie (J), B. nongensis (E), B. samlanensis (C), B. songkhlaensis (I), B. trichosanthes (D)**

3.11.2 แมลงวันผลไม้ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่ม *B. tau* complex พบว่ามี 9 ชนิด เป็นชนิดที่รู้ชื่อทางวิทยาศาสตร์แล้ว 4 ชนิด คือ *B. caudata*, *B. cucurbitae*, *B. maculata*, *B. scutellaris* และ ที่ค้นพบใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ 5 ชนิด คือ **B. angkhangensis, B. diaphoropsis*, B. laurifoliae, B. wanthongensis*, B. near ascita***

(2) วงศ์ย่อย Trypetinae พบว่ามี 6 สกุลดังนี้

2.1 สกุล *Acanthonevra* sp. พบว่ามี 1 ชนิดที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ในขณะนี้

2.2 สกุล *Adrama* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ *A. determinata*

2.3 สกุล *Anomoia* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ *A. kraussi*

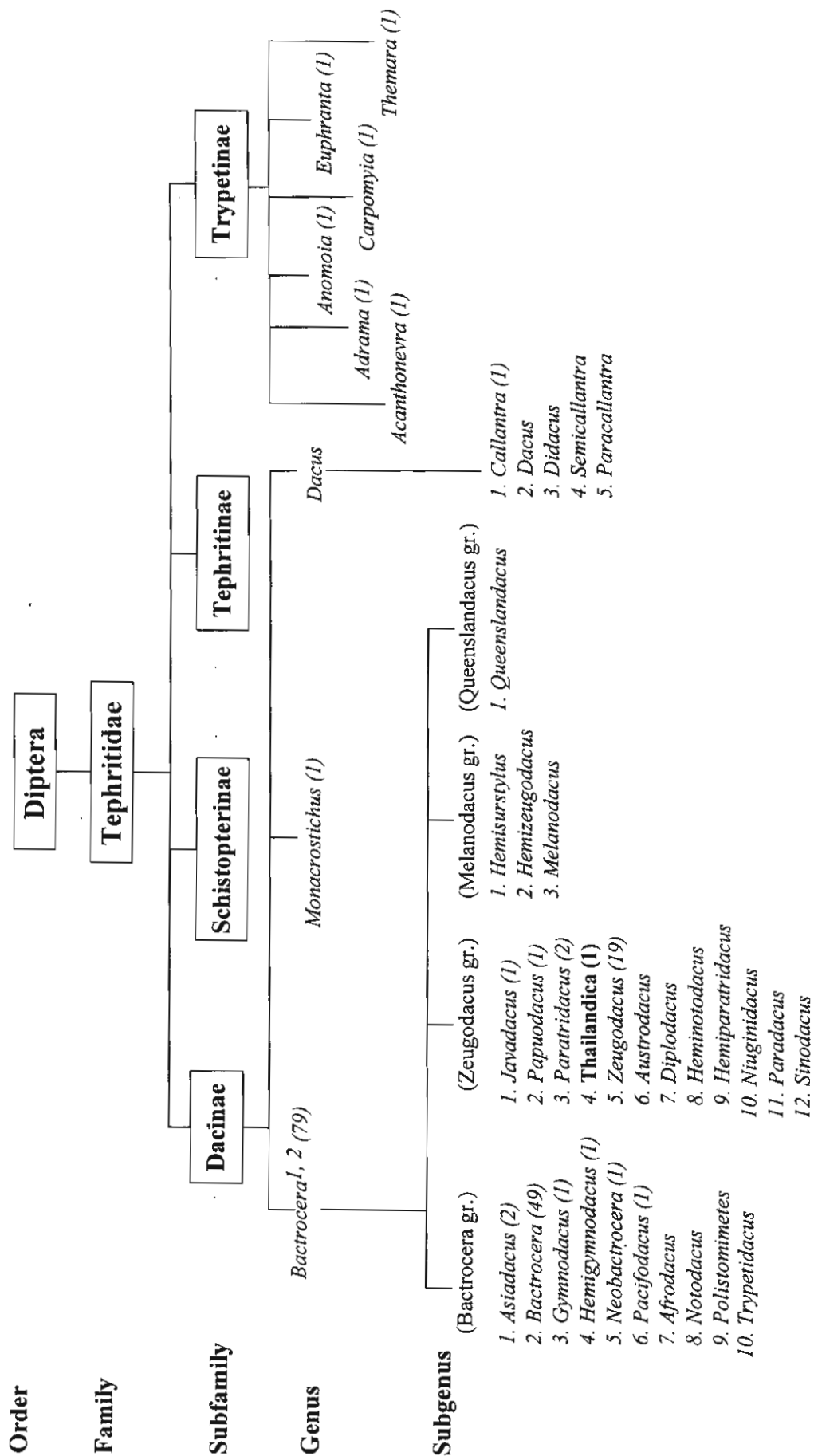
2.4 สกุล *Carpomyia* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ *C. vesuviana*

2.5 สกุล *Euphranta* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ *E. cassiae*

2.6 สกุล *Themara* พบว่ามี 1 ชนิด ได้แก่ *T. hirtipes*

โดยสรุปแล้วแมลงวันผลไม้ที่พบในช่วงระยะเวลา 3 ปีที่ผ่านมา (ตุลาคม 2538-ธันวาคม 2541) มีทั้งหมด 87 ชนิด ใน 2 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Dacinae (81 ชนิด) และวงศ์ย่อย Trypetinae (6 ชนิด) แมลงวันผลไม้หลายชนิดในวงศ์ย่อย Dacinae มีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งส่วนมากจะอยู่ในสกุลย่อย *Bactrocera* กับ *Zeugodacus* ดังรายชื่อที่แสดงไว้ข้างบน ผลที่ได้จากการสำรวจแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยพอจะสรุปภาพรวมได้ในภาพที่ 2.3 แมลงวันผลไม้แต่ละชนิดพบในพืชอาศัย (host plant) ชนิดต่าง ๆ กันที่ระบุไว้ตามชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อไทย (ตารางที่ 2.1) ที่แพร่กระจายอยู่ในจังหวัดต่าง ๆ ในทุกภาคของประเทศไทย (ภาพที่ 2.4)

ความจำเป็นเบื้องต้นก่อนที่จะทำการศึกษาวิทยา พันธุศาสตร์และซิสเตเมติกส์ (systematics) ของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* ได้อย่างมีความหมายแท้จริง คือ การศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอกเพื่อบ่งบอกชนิดหรือสปีชีส์ของสิ่งที่เราต้องการศึกษาให้ชัดเจนเสียก่อน มีแมลงวันผลไม้หลายชนิดในสกุลนี้ที่สามารถจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจนโดยอาศัยลักษณะรูปร่างภายนอก อย่างไรก็ตามในบางกรณีพบว่าเป็นสปีชีส์ซับซ้อนหรือที่เรียกว่าซิมพลีสปีชีส์โดยเฉพาะในกลุ่ม *Bactrocera tau* complex และ *B. dorsalis* complex ที่ยากจะจำแนกได้โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว แต่ต้องอาศัยข้อมูลทางด้านโครโมโซม อิเล็กโทรมอร์ฟหรือแม้กระทั่งดีเอ็นเอช่วยในการบ่งบอกสปีชีส์ ซึ่งก็อยู่ในกระบวนการศึกษาของโครงการนี้ เมื่อมีข้อมูลทางพันธุกรรมยืนยันแน่ชัดแล้วว่าเป็นชนิดที่ต่างกัน จากนั้นจึงจะนำตัวอย่างสปีชีส์นั้นมาศึกษาหารายละเอียดทางลักษณะสัณฐานวิทยาเพื่อหาลักษณะรูปร่างภายนอกบางอย่างที่จะสามารถใช้เป็นลักษณะจำเพาะเพื่อเป็นกุญแจสำหรับการจำแนกสปีชีส์ได้ต่อไป เราได้ศึกษาด้านลึกในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มซับซ้อน 2 กลุ่ม คือ *B. tau* complex และ *B. dorsalis* complex ดังผลที่ปรากฏในบทที่ 3 และบทที่ 4



ภาพที่ 2.3 แผนภาพแสดงการจำแนกกลุ่มของแมลงวันผลไม้ในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนชนิดของแมลงวันผลไม้ที่พบในการวิจัยครั้งนี้
จัดจำแนกกลุ่มตามหลักการทำงานของ Drew (1989)



- | | | | |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1. Mae Hong Son | 20. Nakhon Sawan | 39. Udon Thani | 58. Chachoengsao |
| 2. Chiang Mai | 21. Uthai Thani | 40. Sakon Nakhon | 59. Chon Buri |
| 3. Chiang Rai | 22. Chai Nat | 41. Nong Khai | 60. Rayong |
| 4. Lamphun | 23. Suphan Buri | 42. Nakhon Phanom | 61. Chanthaburi |
| 5. Lampang | 24. Ang Thong | 43. Mukda Han | 62. Trat |
| 6. Phayao | 25. Sing Buri | 44. Kalasin | 63. Chumphon |
| 7. Nan | 26. Lop Buri | 45. Khon Kaen | 64. Ranong |
| 8. Phrae | 27. Saraburi | 46. Chaiyaphum | 65. Surat Thani |
| 9. Uttaradit | 28. Phra Nakhon Si Ayutthaya | 47. Maha Sarakham | 66. Phangnga |
| 10. Tak | 29. Nakhon Pathom | 48. Roi Et | 67. Phuket |
| 11. Kanchanaburi | 30. Nonthaburi | 49. Yaso Thon | 68. Krabi |
| 12. Ratchaburi | 31. Pathum Thani | 50. Umnajareon | 69. Nakhon Si Thammarat |
| 13. Phetchaburi | 32. Nakhon Nayok | 51. Nakhon Ratchasima | 70. Trang |
| 14. Prachuap Khiri Khan | 33. Samut Songkhram | 52. Buri Ram | 71. Phatthalung |
| 15. Sukhothai | 34. Samut Sakhon | 53. Surin | 72. Satun |
| 16. Phitsanulok | 35. Bangkok | 54. Si Sa Ket | 73. Songkhla |
| 17. Kamphaeng Phet | 36. Samut Prakan | 55. Ubon Ratchathani | 74. Pattani |
| 18. Phichit | 37. Loei | 56. Prachin Buri | 75. Yala |
| 19. Phetchabun | 38. Nong Bua Lumpoo | 57. Srakaew | 76. Narathiwat |

แผนภาพที่ 2.4 แผนที่ประเทศไทยแสดงเขตจังหวัดต่าง ๆ ทั้ง 76 จังหวัด
พร้อมชื่อภาษาอังกฤษที่ใช้อ้างอิงในรายงานนี้

ภาพที่ 2.1 แสดงชื่อแมลงวันผลไม้ ชื่อพืชอาศัย และจังหวัดที่พบในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย [ตัวเอนบาง = ชื่อวิทยาศาสตร์ที่รู้จักกันแล้ว ; ตัวตรงหนา = ชื่อไม่เป็นทางการ (ชื่อย่อ) ของแมลงวันผลไม้ชนิดใหม่ที่กำลังพบในการศึกษานี้] ? = ไม่สามารถจำแนกพืชอาศัย

ชื่อแมลงวันผลไม้ (species)	พืชอาศัย (Host Plants)		สถานที่พบ
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญไทย	
<i>Stethomyia</i> sp.	?	ไม้ป่า	ระนอง
<i>Stethomyia determinata</i>	?	แซะ	ระนอง
<i>Stethomyia kraussi</i>	<i>Gmelina philippensis</i> (Verbenaceae)	ช้องแมว	สระบุรี, กระบี่, พัทลุง, สุราษฎร์ธานี
<i>Stethomyia vesuviana</i>	<i>Ziziphus mauritiana</i> (Verbenaceae)	พุทรา	เชียงใหม่, เชียงราย, เพชรบูรณ์, สระบุรี, นนทบุรี, กาญจนบุรี, ระนอง, อุบลราชธานี, ยโสธร
<i>Stethomyia cassiae</i>	<i>Cassia fistula</i> (Caesalpineaceae)	คูน	เพชรบุรี
<i>Stethomyia hirtipes</i>	?	ตอด้ง	ระนอง
<i>Stethomyia (C.) destillatoria</i>	<i>Luffa acutangula</i> (Cucurbitaceae)	บวบเหลี่ยม	เชียงราย, เชียงใหม่, แม่ฮ่องสอน
	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	บวบหอม	กาฬสินธุ์, อุบลราชธานี, ตาก
	<i>Coccinia grandis</i> (Cucurbitaceae)	ตำลึง	กาญจนบุรี, ประจวบคีรีขันธ์
	<i>Trichosanthes arguina</i> (Cucurbitaceae)	บวบงู	สระแก้ว, เพชรบูรณ์
	<i>Trichosanthes cucumerina</i> (Cucurbitaceae)	บวบขม	เลย, ศรีสะเกษ, บุรีรัมย์
<i>Stethomyia citricola</i>	<i>Citrus aurantifolia</i> (Rutaceae)	มะนาว	ระนอง, ประจวบคีรีขันธ์, สุราษฎร์ธานี
	<i>Citrus hystrix</i> (Rutaceae)	มะกรูด	ระนอง, ชุมพร, อุทัยธานี
	<i>Citrus</i> sp. (Rutaceae)	ส้มโอป่า	ระนอง
Genus <i>Bactrocera</i> : <i>Zeugodacus</i> group			
Subgenus <i>Javadacus</i>			
<i>B. xanthofacies</i>	?	ไม้ป่า	ระนอง
Subgenus <i>Papadacus</i>			
<i>B. huaihuensis</i>	?	ไม้ป่า	ระนอง
Subgenus <i>Paratridacus</i>			
<i>B. aptata</i>	<i>Garcinia costata</i>	มังคุดป่า	กำแพงเพชร, กาญจนบุรี, ประจวบคีรีขันธ์
	<i>Garcinia xanthochyma</i>	มะพุด	กำแพงเพชร, อุทัยธานี
	<i>Garcinia</i> sp.	ไม้ป่า	เพชรบูรณ์
Subgenus <i>Thailandica</i>			
<i>B. chabunensis</i>	<i>Zehneria</i> sp. (Cucurbitaceae)	แดงขี้ไก่	เชียงใหม่
Subgenus <i>Zeugodacus</i> : <i>B. tau</i> complex			
<i>B. isolata</i> (H)	?	กุ่มน้ำ	พิษณุโลก
<i>B. tau</i> (A)	<i>Coccinia grandis</i> (Cucurbitaceae)	ตำลึง	ระนอง
	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	ฟักทอง	เชียงใหม่
	<i>Diplocyclos palmatus</i> (Cucurbitaceae)	ขี้กาลาย	เพชรบูรณ์

รูปที่ 2.1 (ต่อ)

สกุล/สกุลย่อย ชนิด (species)	พืชอาศัย (Host Plants)		
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญไทย	สถานที่พบ
	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	บวบหอม	มุกดาหาร, อุบลราชธานี, อุดรธานี, เชียงใหม่
	<i>Momordica charantia</i> (Cucurbitaceae)	มะระจีน	เชียงใหม่
	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)	ผลผักขำ	กาญจนบุรี, เพชรบุรี, ราชบุรี, ระนอง
	<i>Trichosanthes cordata</i> (Cucurbitaceae)	ขี้กาขาว	เชียงใหม่, น่าน, เพชรบูรณ์, ระนอง, สงขลา, พัทลุง
	<i>Trichosanthes cucumerina</i> (Cucurbitaceae)	มะนอยปลา	น่าน
	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	ขี้กาแดง	น่าน, เชียงใหม่, อุบลราชธานี, เพชรบุรี, ระนอง, ชุมพร, สุราษฎร์- ธานี, นครศรีธรรมราช, สงขลา, พัทลุง, พังงา
	<i>Zehneria</i> sp. (Cucurbitaceae)	แดงขี้ไก่	เชียงใหม่
	<i>Prunus persica</i> (Rosaceae)	ท้อพันธุ์เนคาลิน	เชียงใหม่
	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่งคั้นน้ำ	เชียงใหม่
<i>Celastrina</i> (B)	<i>Siphonodon celastrineus</i> (Celastraceae)	มะตุ๊ก	สระบุรี
<i>Hydnocarpa</i> (F)	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> (Flacourtiaceae)	กระเบาใหญ่	ระนอง
<i>Hydnocarpoides</i> (G)	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> (Flacourtiaceae)	กระเลากลัก	ระนอง
<i>Nariae</i> (J)	? (Araliaceae)	นารายณ์	ระนอง
<i>Nongensis</i> (E)	<i>Strychnos thorelii</i> (Strychnaceae)	สตักนิเนตา	ระนอง
<i>Samianensis</i> (C)	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)	ผักขำ	กาญจนบุรี, เพชรบุรี, ราชบุรี
<i>Songkhlaensis</i> (I)	<i>Trichosanthes cordata</i> (Cucurbitaceae)	ขี้กาขาว	สงขลา, ปัตตานี, ยะลา
	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	ขี้กาแดง	สงขลา, ปัตตานี
<i>Trichosanthes</i> (D)	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)	ผักขำ	ระนอง
	<i>Trichosanthes cordata</i> (Cucurbitaceae)	ขี้กาขาว	ระยอง, พัทลุง, พังงา
Species not placed in complex			
<i>Caudata</i>	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	ดอกฟักทอง	ระนอง
	<i>Dyplocyclos palmatus</i> (Cucurbitaceae)	ดอกขี้กาตาย	ระนอง
<i>Cucurbitae</i>	<i>Trichosanthes cucumerina</i> (Cucurbitaceae)	บวมขม	สระแก้ว
	<i>Coccinia grandis</i> (Cucurbitaceae)	ตำลึง	อุบลราชธานี
	<i>Cucurbita sativus</i> (Cucurbitaceae)	แตงกวา	ระนอง
<i>Phoropsis</i>	<i>Strychnos nux-vomica</i> (Strychnaceae)	แสลงใจ	กำแพงเพชร, อุบลราชธานี
<i>Muculata</i>	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	ดอกฟักทอง	เพชรบูรณ์, นครราชสีมา
	<i>Lagenaria siceraria</i> (Cucurbitaceae)	ดอกฟัก	แม่ฮ่องสอน, เชียงใหม่
<i>Outellaris</i>	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	ดอกฟักทอง	แม่ฮ่องสอน, น่าน, เชียงใหม่
	<i>Lagenaria siceraria</i> (Cucurbitaceae)	ดอกฟัก	เชียงใหม่
<i>Angkhangensis</i>	<i>Cucurbita</i> sp.	แตงหนูขน	เชียงใหม่
<i>Taurifoliae</i>	(Euphorbiaceae)	งาช้าง	ระนอง

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สกุล/สกุลย่อย ชนิด (species)	พืชอาศัย (Host Plants)		สถานที่พบ
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญไทย	
<i>B. wanthongensis</i>	?	ไม้ป่า	กาญจนบุรี
<i>B. near ascita</i>	<i>Lagenaria siceraria</i> (Cucurbitaceae)	น้ำเต้า	อุทัยธานี, สงขลา
Genus <i>Bactrocera</i> : <i>Bactrocera</i> group:			
Subgenus <i>Asiadacus</i>			
<i>B. maculifacies</i>	<i>Siphonodon celastrineus</i> (Celastraceae)	มะตูม	สระบุรี
<i>B. modica</i>	<i>Diplocyclos palmatus</i> (Cucurbitaceae)	ขี้กาตาย	น่าน, เพชรบูรณ์, สระบุรี, ฉะเชิงเทรา, หนองคาย, สงขลา
Subgenus <i>Gymnodacus</i>			
<i>B. axillaris</i>	<i>Spondias pinnata</i> (Anacardiaceae)	มะกอกป่า	ระนอง, กาญจนบุรี, ลำพูน, อุบลราชธานี, เพชรบูรณ์, อุดรธานี
	<i>Chocrospondias axillaris</i> (Anacardiaceae)	มะกอกหนัง	กาญจนบุรี, ลำพูน, กำแพงเพชร
Subgenus <i>Hemigymnodacus</i>			
<i>B. diversa</i>	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	ดอกฟักทอง	เชียงใหม่, ระนอง
	<i>Lagenaria siceraria</i> (Cucurbitaceae)	ดอกน้ำเต้า	เพชรบูรณ์
	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	ดอกขี้กาแดง	กาญจนบุรี
Subgenus <i>Neobactrocera</i>			
<i>B. yongensis</i>	?	ไม้ป่า	ระนอง
Subgenus <i>Pacifodacus</i>			
<i>B. infesta</i>	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	บวบหอม	เชียงราย, อุทัยธานี
	<i>Trichosanthes cucumerina</i> (Cucurbitaceae)	บวบขม	เชียงราย, อุทัยธานี
Subgenus <i>Bactrocera</i> : <i>B. dorsalis</i> complex:			
<i>B. dorsalis</i> (A)	<i>Garcinia costata</i> (Clusiaceae)	มังคุดป่า	ฉะเชิงเทรา
	<i>Litchi chinensis</i> (Sapindaceae)	ลิ้นจี่	เชียงใหม่
	<i>Prunus persica</i> (Rosaceae)	ท้อพันธุ์เนคาลิน	เชียงใหม่
	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่ง	เชียงราย
	<i>Ficus lepicarpa</i> (Moraceae)	ชำลูกโพ	นครนายก
	<i>Sandoricum koetjape</i> (Meliaceae)	กระท้อน	นครนายก
	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	มะม่วง	นครนายก
	<i>Annona squamosa</i> (Annonaceae)	น้อยหน่า	นครราชสีมา
	<i>Averrhoa carambola</i> (Oxalidaceae)	มะเฟือง	นราธิวาส
	<i>Terminalia catappa</i> (Combretaceae)	ทุรวาง	นราธิวาส
	<i>Diospyros dasyphylla</i> (Ebenaceae)	จันทง	นราธิวาส
	<i>Polyalthia longifolia</i> (Annonaceae)	โศกอินเดีย	พังงา
	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่ง	พังงา
	<i>Musa acuminata</i> (Musaceae)	กล้วยหอม	เพชรบุรี

ภาพที่ 2.1 (ต่อ)

พืชสกุลย่อย (species)	พืชอาศัย (Host Plants)		
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญไทย	สถานที่พบ
	<i>Zizyphus mauritiana</i> (Rhamnaceae)	พุทรา	เพชรบูรณ์
	<i>Irvingia malayana</i> (Irvingiaceae)	กระบก	ปราจีนบุรี
	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae)	ชมพู่	ประจวบคีรีขันธ์
	<i>Annona squamosa</i> (Annonaceae)	น้อยหน่า	ภูเก็ต
	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่ง	ระนอง
	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	มะม่วง	ราชบุรี
	<i>Salacia verrucosa</i> (Celastraceae)	ตากวาง	สระแก้ว
	<i>Siphonodon celastrius</i> (Celastraceae)	มะตุ๊ก	สระบุรี
	<i>Artabotrys siamensis</i> (Annonaceae)	การเวก	สงขลา
	<i>Areca catechu</i> (Palmae)	หมาก	อุทัยธานี
	<i>Zizyphus mauritiana</i> (Rhamnaceae)	พุทรา	ยโสธร
	<i>Artabotrys siamensis</i> (Annonaceae)	การเวก	ฉะเชิงเทรา
	<i>Artabotrys siamensis</i> (Annonaceae)	การเวก	สระบุรี
	<i>Sandoricum koetjape</i> (Meliaceae)	กระท้อน	นครนายก
	<i>Artocarpus lakoocha</i> (Moraceae)	มะหาด	สระบุรี
	<i>Artocarpus lakoocha</i> (Moraceae)	มะหาด	นครศรีธรรมราช
	<i>Artocarpus heterophyllus</i> (Moraceae)	ขนุน	สุราษฎร์ธานี
	<i>Solanum erianthum</i> (Solanaceae)	ดัดยง	เชียงใหม่
	<i>Solanum erianthum</i> (Solanaceae)	ดัดยง	เพชรบุรี
	<i>Solanum erianthum</i> (Solanaceae)	ดัดยง	นครราชสีมา
	<i>Anthocephalus chinensis</i> (Rubiaceae)	ท่อมหมู	มุกดาหาร
	<i>Anthocephalus chinensis</i> (Rubiaceae)	ท่อมหมู	สกลนคร
	<i>Anthocephalus chinensis</i> (Rubiaceae)	ท่อมหมู	นครศรีธรรมราช
	<i>Anthocephalus chinensis</i> (Rubiaceae)	ท่อมหมู	ระนอง
	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่งคั้นน้ำ	เชียงใหม่
	<i>Prunus persica</i> (Rosaceae)	ท้อพันธุ์เนกาลิน	เชียงใหม่
	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่งไทย	เพชรบูรณ์
	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	มะม่วง	เพชรบูรณ์
	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	ดอกฟักทอง	อุทัยธานี
	<i>Areca catechu</i> (Palmae)	หมาก	ระนอง, ชุมพร, สุราษฎร์ธานี, สตูล, สงขลา, ปัตตานี, ยะลา, นราธิวาส
	<i>Veitchia merrilli</i> (Palmae)	หมากนวล	ระนอง, ชุมพร, สุราษฎร์ธานี
	<i>Pinanga limosa</i> (Palmae)	หมากเทา	พังงา, กระบี่, ตรัง
	<i>Irvingia malayana</i> (Irvingiaceae)	กระบก	ชัยภูมิ, สกลนคร, ปราจีนบุรี, สระแก้ว, จันทบุรี
	<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	มะม่วงหิมพานต์	ระนอง
	<i>Capparis micracantha</i> (Capparaceae)	ท้อป่า	ระนอง
	<i>Chrysophyllum cainito</i> (Sapotaceae)	สตาร์แอปเปิ้ล	ระนอง
	<i>Diospyros wallichii</i> (Ebenaceae)	ไหม้	ระนอง

รูปที่ 2.1 (ต่อ)

สกุลกล้วยย่อย (species)	พืชอาศัย (Host Plants)		
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญไทย	สถานที่พบ
	<i>Elaeocarpus rugosus</i> (Elaeocarpaceae)	มะมุ่น	ระนอง
	<i>Elaeocarpus</i> sp. (Elaeocarpaceae)	เปล้า	ระนอง
	<i>Garcinia hanburyi</i> (Guttiferae)	รง	ระนอง
	<i>Garcinia</i> sp. (Guttiferae)	ชะมวง	ระนอง
	<i>Gnetum montanum</i> (Gnetaceae)	เมื่อยใหญ่	ระนอง
	<i>Manilkara</i> sp. (Sapotaceae)	ละมุดป่า	ระนอง
	<i>Melientha suavis</i> (Opiliaceae)	ผักหวานป่า	ระนอง
	<i>Payena</i> sp. (Sapotaceae)	พิกุลป่า	ระนอง
	<i>Platea latifolia</i> (Icacaceae)	มันหมู(ต้น)	ระนอง
	<i>Polyalthia</i> sp. (Annonaceae)	ยางดง	ระนอง
	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่ง	ระนอง
	<i>Syzygium claviflora</i> (Myrtaceae)	หว้าเลือด	ระนอง
	<i>Syzygium</i> sp. (Myrtaceae)	ชมพูเขา	ระนอง
	<i>Zizyphus</i> sp. (Rhamnaceae)	สังข์ชันช้าง	ระนอง
	<i>Elaeocarpus</i> sp. (Elaeocarpaceae)	เปล้า	อุบลราชธานี
	<i>Gnetum macrostachyum</i> (Gnetaceae)	เมื่อย	อุบลราชธานี
<i>L. propinqua</i>	<i>Garcinia</i> sp. (Guttiferae)	ชะมวง	ระนอง
<i>L. melastomatos</i>	<i>Melastoma malabathricum</i> (Melastomataceae)	โคลงเคลงขึ้นก	ชุมพร
	<i>Melastoma malabathricum</i> (Melastomataceae)	โคลงเคลงขึ้นก	ระนอง
	<i>Melastoma malabathricum</i> (Melastomataceae)	โคลงเคลงขึ้นก	น่าน
	<i>Melastoma</i> sp. (Melastomataceae)	โคลงเคลงป่า	เลย
<i>L. heliciopsis</i> (I)	<i>Heliciopsis terminalis</i> (Proteaceae)	เหมือดคน	เชียงใหม่
	<i>Heliciopsis terminalis</i> (Proteaceae)	เหมือดคน	เพชรบูรณ์
<i>L. operculata</i> (J)	<i>Cleistocalyx operculatus</i> (Myrtaceae)	หว้าส้ม	ระนอง
	<i>Syzygium claviflora</i> (Myrtaceae)	หว้าเลือด	ระนอง
<i>L. payena</i> (K)	<i>Payena</i> sp. (Sapotaceae)	พิกุลป่า	ระนอง
<i>L. tonrianensis</i> (L)	<i>Platea latifolia</i> (Icacaceae)	มันหมู (ต้น)	ระนอง
	<i>Syzygium siamensis</i> (Myrtaceae)	ชมพูน้ำ	ระนอง
	<i>Syzygium</i> sp. (Myrtaceae)	ชมพูเขา	ระนอง
<i>L. phanensis</i> (M)	<i>Fibraurea tinctoria</i> (Menispermaceae)	ขบดั่ง	ระนอง
<i>L. thaiensis</i> (N)	<i>Dracontomelon dao</i> (Anacardiaceae)	พระเจ้าห้าพระองค์	เพชรบูรณ์
<i>L. near papayae</i> (O)	<i>Chrysophyllum cainito</i> (Sapotaceae)	สตาร์แอปเปิ้ล	ชุมพร
	<i>Artocarpus rigidus</i> (Moraceae)	ขนุนป่าน	ระนอง
	<i>Bouea oppositifolia</i> (Anacardiaceae)	มะยง	ระนอง
	<i>Chrysophyllum cainito</i> (Sapotaceae)	สตาร์แอปเปิ้ล	ระนอง
	<i>Garcinia comea</i> (Guttiferae)	ชะมวง	ระนอง
	<i>Gnetum</i> sp. (Gnetaceae)	เมื่อยป่า	ระนอง
	<i>Nephelium mutabile</i> (Sapindaceae)	เงาะขนสั้น	ระนอง
	<i>Sandoricum</i> sp. (Meliaceae)	ไม้ป่าผลคล้ายกะท้อน	ระนอง

ที่ 2.1 (ต่อ)

ชื่อสกุลย่อย (species)	พืชอาศัย (Host Plants)		
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญไทย	สถานที่พบ
Nauclea (P)	<i>Willughbela firma</i> (Apocynaceae)	เทพรส	ระนอง
	<i>Nauclea brunnea</i> (Rubiaceae)	ขี้มัน	พังงา
Bifidaculeus (Q)	<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	สะเดาช้าง	นราธิวาส
	<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	สะเดาช้าง	ปัตตานี
	<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	สะเดาช้าง	ระนอง
	<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	สะเดาช้าง	ยะลา
Caramboloides (R)	<i>Annona siamensis</i> (Annonaceae)	การเวก	สุราษฎร์ธานี
Chumphonensis (S)	<i>Aglaia domestica</i> (Meliaceae)	ลางสาต	ชุมพร
	<i>Aglaia</i> sp. (Meliaceae)	สังเคียด	ระนอง
	<i>Aglaia andamanica</i> (Meliaceae)	สังโด้ง	ระนอง
	<i>Aglaia</i> sp. (Meliaceae)	สังโด้ง	ระนอง
Drypetes (T)	<i>Drypetes roxburghii</i> (Euphorbiaceae)	มะค่าไก่	กาญจนบุรี
	<i>Polyalthia longifolia</i> (Annonaceae)	โศกอินเดีย	กาญจนบุรี
	<i>Polyalthia longifolia</i> (Annonaceae)	โศกอินเดีย	ระนอง
Hinphanensis (U)	?	ไม้ป่า	ชุมพร
	?	ไม้ป่า	ระนอง
Hinphingensis (V)	<i>Polyalthia</i> sp. (Annonaceae)	ไม้ป่า	ประจวบคีรีขันธ์
	<i>Polyalthia</i> sp. (Annonaceae)	ไม้ป่า	ระนอง
	? (Annonaceae)	ไม้ป่า	ระนอง
	? (Annonaceae)	ไม้ป่า	ระนอง
	? (Annonaceae)	ไม้ป่า	ระนอง
Salacia (W)	<i>Salacia chinensis</i> (Celastraceae)	กำแพงเจ็ดชั้น	พังงา
	<i>Salacia chinensis</i> (Celastraceae)	กำแพงเจ็ดชั้น	ระนอง
Lonbaoensis (X)	? (Strychnaceae)	สตึกนิมเฒ่า	ระนอง
Walsurae (Y)	<i>Walsura</i> sp. (Meliaceae)	ร่ายง	นครนายก
	<i>Walsura</i> sp. (Meliaceae)	ร่ายง	นครนายก
RN(M/2)669 (Z)	?	ไม้ป่า	ระนอง
Genus <i>Bactrocera</i> : <i>B. limbifera</i> complex			
limbifera (A)	<i>Dracontomelon mangiferum</i> (Anacardiaceae)	พระเจ้าห้าพระองค์	ระนอง, สงขลา, ยะลา
edangensis (B)	? Strychnaceae	เถาสี	อุบลราชธานี
laurea (C)	? Lauraceae	แหล่ขี้ควาย	ระนอง
tonsiaensis (D)	<i>Manilkara</i> sp. (Sapotaceae)	มังลิศู (ละมุดป่า)	ระนอง
Species not placed in complex			
correcta	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่ง	ระนอง, พังงา, ประจวบคีรีขันธ์
	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae)	ชมพู่	ระนอง, ชุมพร, กรุงเทพฯ
	<i>Terminalia catappa</i> (Combretaceae)	हुกวาง	ระยอง, ระนอง, พังงา, สุราษฎร์ธานี

รูปที่ 2.1 (ต่อ)

กลุ่ม/สกุลย่อย ชนิด (species)	พืชอาศัย (Host Plants)		
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญไทย	สถานที่พบ
Nauclea (P)	<i>Willughbeia firma</i> (Apocynaceae)	เทพรส	ระนอง
	<i>Nauclea brunnea</i> (Rubiaceae)	ขี้มัน	พังงา
bifidaculeus (Q)	<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	สะเดาช้าง	นราธิวาส
	<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	สะเดาช้าง	ปัตตานี
	<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	สะเดาช้าง	ระนอง
	<i>Azadirachta excelsa</i> (Meliaceae)	สะเดาช้าง	ยะลา
caramboloides (R)	<i>Annona siamensis</i> (Annonaceae)	การเวก	สุราษฎร์ธานี
chumphonensis (S)	<i>Aglaiia domestica</i> (Meliaceae)	ลางสาด	ชุมพร
	<i>Aglaiia</i> sp. (Meliaceae)	สังเคียว	ระนอง
	<i>Aglaiia andamanica</i> (Meliaceae)	สังโด้ง	ระนอง
	<i>Aglaiia</i> sp. (Meliaceae)	สังโด้ง	ระนอง
drypetes (T)	<i>Drypetes roxburghii</i> (Euphorbiaceae)	มะค่าไก่	กาญจนบุรี
	<i>Polyalthia longifolia</i> (Annonaceae)	โศกอินเดีย	กาญจนบุรี
	<i>Polyalthia longifolia</i> (Annonaceae)	โศกอินเดีย	ระนอง
hinphanensis (U)	?	ไม้ป่า	ชุมพร
	?	ไม้ป่า	ระนอง
hinphingensis (V)	<i>Polyalthia</i> sp. (Annonaceae)	ไม้ป่า	ประจวบคีรีขันธ์
	<i>Polyalthia</i> sp. (Annonaceae)	ไม้ป่า	ระนอง
	? (Annonaceae)	ไม้ป่า	ระนอง
	? (Annonaceae)	ไม้ป่า	ระนอง
	? (Annonaceae)	ไม้ป่า	ระนอง
salaciae (W)	<i>Salacia chinensis</i> (Celastraceae)	กำแพงเจ็ดชั้น	พังงา
	<i>Salacia chinensis</i> (Celastraceae)	กำแพงเจ็ดชั้น	ระนอง
tonbaoensis (X)	? (Strychnaceae)	สติ๊กนินเถา	ระนอง
walsurae (Y)	<i>Walsura</i> sp. (Meliaceae)	ร่ายง	นครนายก
	<i>Walsura</i> sp. (Meliaceae)	ร่ายง	นครนายก
RN(M/2)669 (Z)	?	ไม้ป่า	ระนอง
Subgenus <i>Bactrocera</i> : <i>B. limbifera</i> complex			
limbifera (A)	<i>Dracontomelon mangiferum</i> (Anacardiaceae)	พระเจ้าห้าพระองค์	ระนอง, สงขลา, ยะลา
adangensis (B)	? <i>Strychnaceae</i>	เถาสี	อุบลราชธานี
laurea (C)	? <i>Lauraceae</i>	แหล่ขี้ควาย	ระนอง
tonsiaensis (D)	<i>Manilkara</i> sp. (Sapotaceae)	มังสี (ละมุดป่า)	ระนอง
Species not placed in complex			
correcta	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	ฝรั่ง	ระนอง, พังงา, ประจวบคีรีขันธ์
	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae)	ชมพู่	ระนอง, ชุมพร, กรุงเทพฯ
	<i>Terminalia catappa</i> (Combretaceae)	ทุกลาง	ระยอง, ระนอง, พังงา, สุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

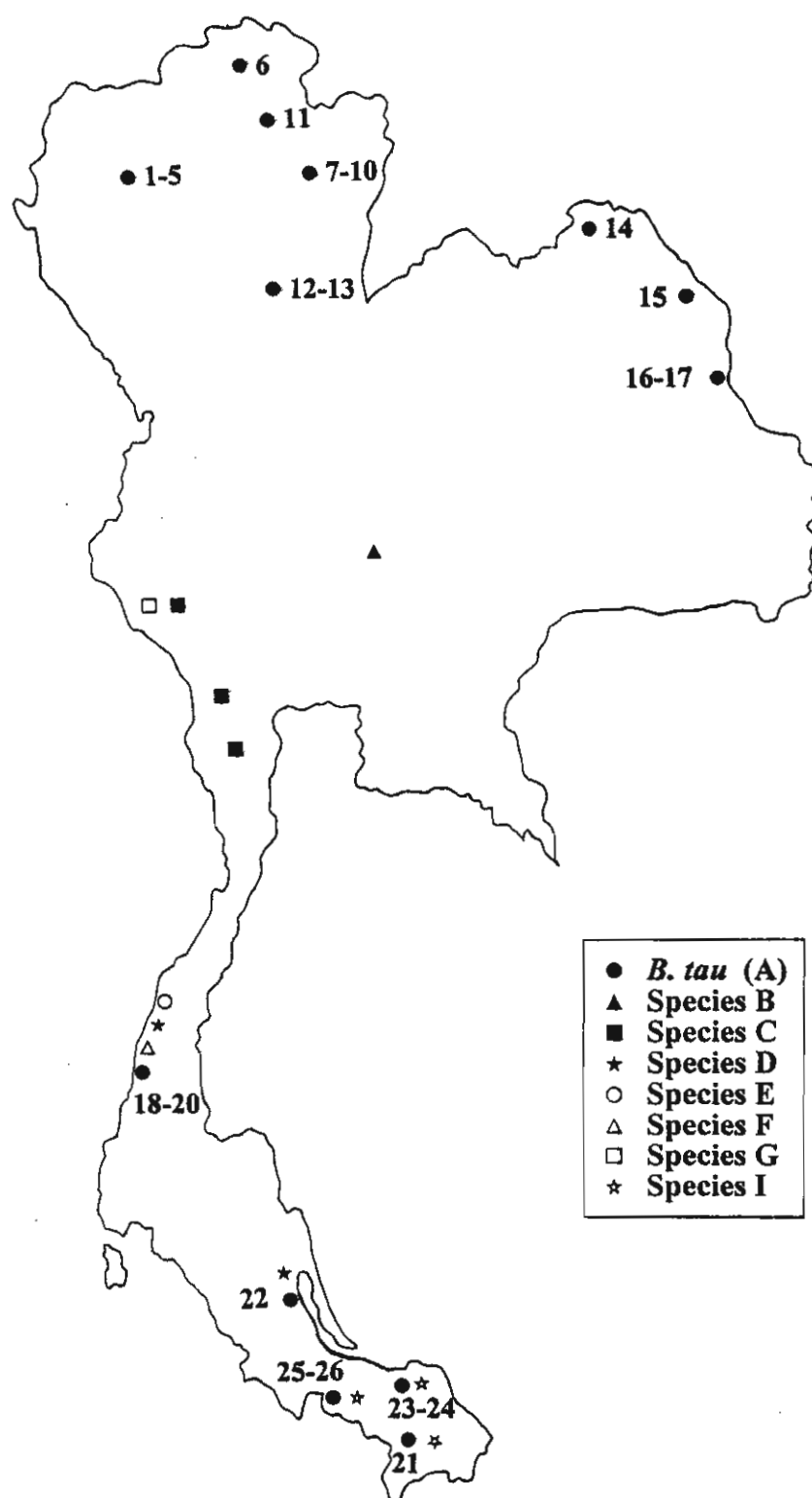
สกุล/สกุลย่อย ชนิด (species)	พืชอาศัย (Host Plants)		
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญไทย	สถานที่พบ
<i>B. latifrons</i>	<i>Solanum torvum</i> (Solanaceae)	มะเขือพวง	อุบลราชธานี
	<i>Solanum indicum</i> (Solanaceae)	มะแว้งต้น	อุบลราชธานี
<i>B. tuberculata</i>	<i>Careya sphaerica</i> (Barringtoniaceae)	กระโดน	ชุมพร, ระนอง, ตรัง, สกลนคร, เชียงใหม่
<i>B. umbrosa</i>	<i>Artocarpus heterophyllus</i> (Moraceae)	ขนุน	ระนอง, พังงา
	<i>Artocarpus integer</i> (Moraceae)	จำปาตะ	ระนอง
	<i>Artocarpus rigidus</i> (Moraceae)	ขนุนปาน	ระนอง
<i>B. cerasoides</i>	<i>Prunus cerasoides</i> (Rosaceae)	นางพญาเสือโคร่ง	เชียงใหม่
<i>B. bangphongensis</i>	<i>Gnetum</i> sp. (Gnetaceae)	มะเมื่อย	ระนอง
	<i>Aglaia</i> sp. (Melaceae)	สังเคียวดป่า	ระนอง
<i>B. nayokensis</i>	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae)	ชมพู่	ระนอง
	<i>Platlea montanum</i> (Icacinales)	เมื่อย	ระนอง

ชีววิทยาเชิงประชากรของกลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex

Bactrocera tau (Walker) เป็นแมลงวันผลไม้ที่รู้จักกันดีในหมู่นักวิชาการด้านเกษตรกรรมเพราะแมลงชนิดนี้เป็นศัตรูทำลายพืชผักผลไม้หลายชนิดในประเทศไทยโดยเฉพาะพืชวงศ์ Cucurbitaceae เช่น พริก พริกแห้ง แตงกวา แตงโมอ่อน เป็นต้น (Tigvattananont 1986, Meksongsee *et al.* 1991) แมลงชนิดนี้ยังแพร่กระจายทั่วไปในภูมิภาคเอเชียอาคเนย์ เนื่องจาก *B. tau* sensu lato จากประชากรธรรมชาติมีความแปรผันทางด้านสัณฐานวิทยาจนยากต่อการจำแนกชนิดให้ชัดเจนทำให้ Drew and Romig (1997) ให้ความเห็นว่า *B. tau* s.l. น่าจะเป็นกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนที่น่าสนใจและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกกลุ่มหนึ่งนอกเหนือจากกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนอื่น ๆ อย่างเช่น *B. dorsalis* complex ที่ทราบกันดี (Drew and Hancock 1994) แต่ก็ยังไม่มีการศึกษาชีววิทยาพื้นฐานเพื่อหาข้อมูลรายละเอียดกันอย่างจริงจังในกลุ่ม *B. tau* complex ดังนั้น *B. tau* complex จึงเป็นกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนที่สมควรได้รับความสนใจในการศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรอย่างครบวงจรดังที่ระบุไว้ในตอนต้น (ดูภาพที่ 2.1) นักวิจัยในกลุ่มของเราจึงได้เริ่มต้นศึกษาหาข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยา ถิ่นอาศัย การแพร่กระจาย ชนิดของพืชอาศัย (host plant) ผสมผสานกับการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานควบคู่กับข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับโครโมโซม ระดับโปรตีนและเอนไซม์ และระดับดีเอ็นเอ ผลการศึกษาที่ดำเนินการมาในระยะเวลา 3 ปีได้ผลดียิ่ง ทำให้ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายของชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางนิเวศวิทยาตลอดจนได้ข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์โยงใยตามสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของสปีชีส์ต่าง ๆ ที่ใกล้ชิดกันภายในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* complex อย่างชัดเจน และเป็นตัวอย่างของกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนที่ดีที่แสดงให้เห็นถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการร่วมกันระหว่างแมลงศัตรูกับพืชอาศัยตลอดจนกลไกการปรับตัวทางพันธุกรรมและกลไกการแปลกแยกแตกต่างของสปีชีส์ (species differentiation) ตามกระบวนการสปีชีเอชัน (speciation) เราพบว่าแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อนนี้มีสปีชีส์ใหม่ (new species) ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปคล้ายกับ *B. tau* sensu stricto แต่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมชัดเจนแมลงที่ค้นพบใหม่นี้มี 7 ชนิดเรียกชื่ออย่างไม่เป็นทางการว่า ชนิด B, C, D, E, F, G และ I โดยอิงกับสปีชีส์ต้นแบบ คือ *B. tau* (= ชนิด A) ผลการศึกษาแมลงกลุ่มซับซ้อน *B. tau* complex พอสรุปได้ดังนี้

3.1 การสำรวจเก็บตัวอย่างจากประชากรธรรมชาติ

ตัวหนอนของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. tau* complex เก็บได้จากผลไม้สุกบนต้นหรือที่หล่นลงตามพื้นดินของพืชหลายชนิดที่จัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae, Celastraceae, Strychnaceae และ Flacourtiaceae ที่กระจายอยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย (ภาพที่ 3.1 และตารางที่ 3.1) หนอน (larva) ที่ซ่อนไขอยู่ในเนื้อผลไม้มีหลายขนาดตั้งแต่ตัวเล็กระยะที่ 1 จนถึงหนอนตัวใหญ่ในระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายก่อนที่จะเข้าสู่ระยะดักแด้ (pupa) เก็บหนอนที่ซ่อนไขอยู่ในเนื้อผลไม้ไว้ในกล่องพลาสติกและนำกลับมาย้งห้องปฏิบัติการเพื่อให้หนอนเจริญเติบโตเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย (adult) เพื่อใช้ในการศึกษาหาข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาและการศึกษาทางพันธุศาสตร์ตามขั้นตอนต่อไปดังแสดงไว้ในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 3.1 แผนที่แสดงสถานที่ที่มีการเก็บตัวอย่างจากประชากรธรรมชาติของสปีชีส์ต่าง ๆ ในกลุ่ม
 ซับซ้อน *Bactrocera tau* complex (เลข 1-26 เป็นประชากรของ *B. tau* (A) ที่ใช้ศึกษาหา
 ความแปรผันทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส)

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดของพืชอาศัย สถานที่ และเวลาที่เก็บแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex
(1 = North; 2 = Central; 3 = Northeast; 4 = South; 5 = West)

Species	Population number	Locality	Host plant species (Family)	Number of adults	Date of collection
A (<i>B. tau</i>)	1	Chiang Mai ¹	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	20	Dec. 96
	2	Chiang Mai ¹	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	10	Dec. 96
	3	Chiang Mai ¹	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	60	Dec. 96
	4	Chiang Mai ¹	<i>Trichosanthes cucumerina</i> (Cucurbitaceae)	50	Dec. 96
	5	Chiang Mai ¹	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	60	Dec. 96
	6	Chiang Rai ¹	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	40	Dec. 96
	7	Nan ¹	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	111	Dec. 96
	8	Nan ¹	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	20	Dec. 96
	9	Nan ¹	<i>Trichosanthes cucumerina</i> (Cucurbitaceae)	60	Dec. 96
	10	Nan ¹	<i>Trichosanthes cucumerina</i> (Cucurbitaceae)	60	Dec. 96
	11	Phayao ¹	<i>Lagenaria siceraria</i> (Cucurbitaceae)	60	Dec. 96
	12	Uttaradit ¹	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	60	Dec. 96
	13	Uttaradit ¹	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	69	Dec. 96
	14	Nong Khai ³	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	40	Oct. 97
	15	Nakhon Phanom ³	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	38	Oct. 97
	16	Mukda Han ³	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)	40	Oct. 97
	17	Mukda Han ³	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	40	Oct. 97
	18	Ranong ⁴	<i>Trichosanthes cordata</i> (Cucurbitaceae)	21	Feb. 96
	19	Ranong ⁴	<i>Dioscorea membranacea</i> (Dioscoreaceae)	21	Feb. 97
	20	Ranong ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	23	Feb. 97
	21	Yala ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	84	Nov. 97
	22	Phatthalung ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	28	Nov. 97
	23	Puttani ⁴	<i>Trichosanthes cordata</i> (Cucurbitaceae)	29	Nov. 97
	24	Puttani ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	85	Nov. 97
	25	Songkhla ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	50	Nov. 97
	26	Songkhla ⁴	<i>Trichosanthes cordata</i> (Cucurbitaceae)	90	Nov. 97
C	27	Kanchanaburi ⁵	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)	48	Nov. 97
	28	Phetchaburi ²	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)	71	Dec. 97
	29	Ratchaburi ²	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)	70	Dec. 97
D	30	Phatthalung ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	7	Nov. 97
	31	Ranong ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	18	Jan. 97
E	32	Ranong ⁴	<i>Strychnos thorelii</i> (Strychnaceae)	60	Feb. 97
	33	Ranong ⁴	<i>Strychnos thorelii</i> (Strychnaceae)	18	Jan. 97
F	34	Ranong ⁴	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> (Flacourtiaceae)	15	Apr. 96

ตารางที่ 3.1 ต่อ

Species	Population number	Locality	Host plant species (Family)	Number of adults	Date of collection
G	35	Kanchanaburi ⁵	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> (Flacourtiaceae)	33	Feb. 97
I	36	Yala ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	58	Nov. 97
	37	Pattani ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	60	Nov. 97
	38	Songkhla ⁴	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	47	Nov. 97
B	39	Saraburi ²	<i>Siphonodon celastrineus</i> (Celastraceae)	-	Jun. 93

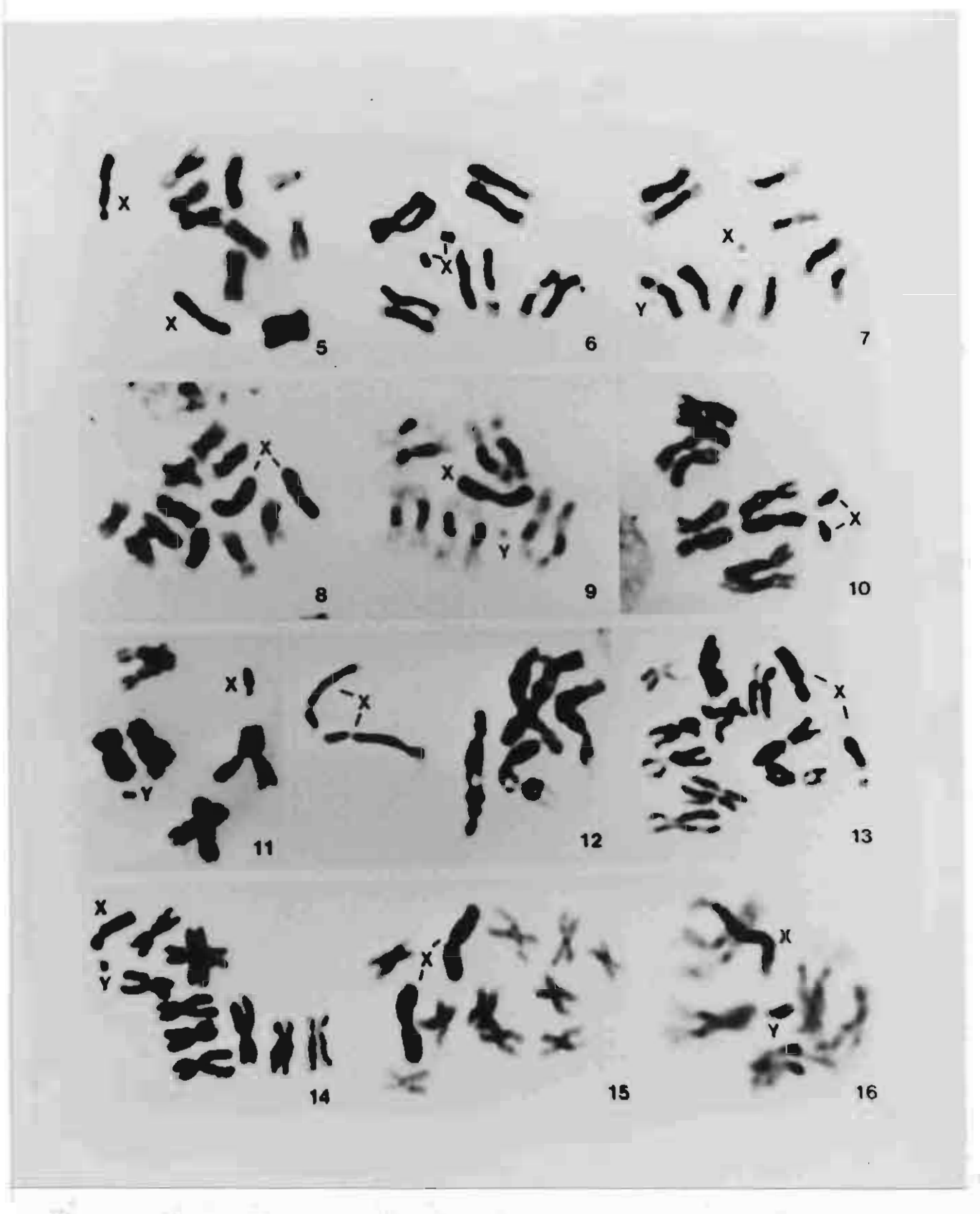
Genus: C = *Cucurbita*, D = *Dioscorea*, H = *Hydnocarpus*, L = *Luffa*, S = *Strychnos*, T = *Trichosanthes*

3.2 การวิเคราะห์ไมโททิกโครโมโซม

หนอนระยะที่ 3 เป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมไมโททิกโครโมโซมจากเซลล์สมองตามวิธีการของ Baimai (1977) และ Baimai *et al.* (1995) ทำให้ได้โครโมโซมแบบ air-dried ติดอยู่บนแผ่นสไลด์ที่สะอาด เซลล์สมองของหนอนหนึ่งตัวจะสามารถเตรียมโครโมโซมบนแผ่นสไลด์ได้ 2 ชุดเพื่อเก็บไว้อย่างดี Hoechst 33258 และสี Giemsa ตามวิธีการที่ใช้อยู่เป็นประจำในห้องปฏิบัติการของเรา ไมโททิกโครโมโซมที่มีคุณภาพดีและกระจายเสมอกันก็จะถูกบันทึกไว้ในฟิล์มขาวดำและนำมาผ่านขั้นตอนจนได้รูปภาพที่เหมาะสมเพื่อการวิเคราะห์หารูปร่างและขนาดของโครโมโซมรวมทั้งปริมาณและการกระจายของส่วนที่เป็นเฮเทโรโครมาทินในโครโมโซมเพศ (X และ Y) ซึ่งถือว่าเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และที่บริเวณรอบเซนโทรเมียร์ของออโทโซม 2 ถึง 6 ซึ่งจัดลำดับจากขนาดใหญ่ไปหาขนาดเล็ก (ภาพที่ 3.2 และ 3.3) จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณและการกระจายของเฮเทโรโครมาทินดังกล่าวได้ผลชัดเจนว่ามีรูปแบบของไมโททิกโครโมโซมต่างกัน 8 รูปแบบ (ภาพที่ 3.4) คาริโอไทป์ของแต่ละรูปแบบแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในระดับสปีชีส์

จากแผนภาพที่ 3.4 ที่แปลผลจากภาพถ่ายไมโททิกโครโมโซมจะเห็นได้ชัดเจนคาริโอไทป์ในแต่ละรูปแบบมีความแตกต่างกันในรูปร่าง ขนาด ปริมาณและการกระจายของเฮเทโรโครมาทินในโครโมโซมเพศโดยเฉพาะในโครโมโซม X จะเห็นว่าสปีชีส์ C มีโครโมโซม X เล็กที่สุด สปีชีส์ E มีโครโมโซม X ใหญ่ขึ้นและมีรูปร่างเป็นแบบ submetacentric เนื่องจากมีปริมาณเฮเทโรโครมาทินเพิ่มขึ้นมาที่บริเวณเซนโทรเมียร์ นอกจากนั้นบริเวณเซนโทรเมียร์ของออโทโซม 2-6 ของสปีชีส์ C มีเฮเทโรโครมาทินปริมาณมากอย่างเห็นได้ชัดคล้ายกับของสปีชีส์ D โครโมโซม X ของ *B. tau* s.s. (=สปีชีส์ A) มีขนาดใหญ่และเป็นแบบ metacentric โดยที่แขนข้างหนึ่งเป็นยูโครมาทิน (euchromatin) ส่วนแขนอีกข้างหนึ่งเป็นเฮเทโรโครมาทิน (heterochromatin) โครโมโซม X ของสปีชีส์ B, D และ G มีขนาดใกล้เคียงกันและเป็นแบบ metacentric แต่แตกต่างกันที่ตำแหน่งของยูโครมาทินและเฮเทโรโครมาทินอย่างชัดเจน นอกจากนั้นเฮเทโรโครมาทินที่เซนโทรเมียร์ของออโทโซม 2-6 มีน้อยมากเมื่อเทียบกับของสปีชีส์ D แต่จะคล้ายกับออโทโซมของสปีชีส์ G ยกเว้นที่ออโทโซมคู่ที่ 4 ของสปีชีส์ G ที่มีเฮเทโรโครมาทินมากเมื่อเทียบกับของออโทโซมคู่ที่ 4 ของสปีชีส์ B นอกจากนั้นโครโมโซม X ของสปีชีส์ B และ G ยังต่างกันชัดเจนพอสมควร สำหรับสปีชีส์ F มีออโทโซม 2-6 คล้ายกับของ สปีชีส์ B แต่มีโครโมโซม X เล็กกว่าและเป็นแบบ submetacentric

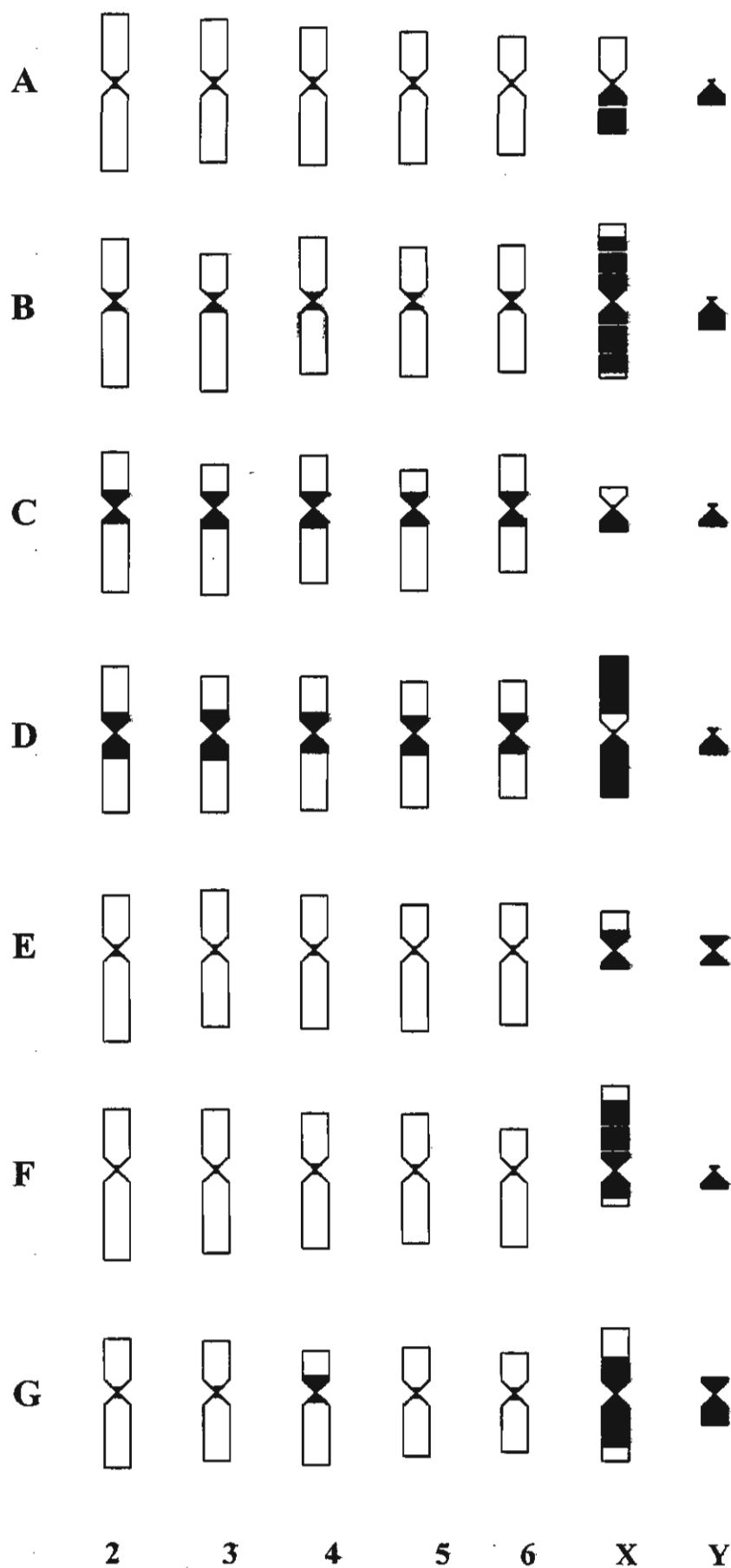
โดยภาพรวมแล้วอาจแบ่งไมโททิกโครโมโซมของสปีชีส์ต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน *B. tau* complex ออกเป็น 3 กลุ่ม บนพื้นฐานของปริมาณเฮเทโรโครมาทินในโครโมโซม X และในออโทโซม คือ กลุ่มที่ 1 มีสปีชีส์ A และ E กลุ่มที่ 2 มีสปีชีส์ B, F และ G ส่วนกลุ่มที่ 3 มีสปีชีส์ C และ D ข้อมูลทางด้านไมโททิกโครโมโซมดังกล่าวสอดคล้องกับความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุลที่น่าเสนอไว้ข้างล่างนี้



ภาพที่ 3.2 ภาพถ่ายไมโททิกคาริโอไทป์ที่ย้อมด้วยสี Giemsa ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ
ในกลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex



ภาพที่ 3.3 ภาพถ่ายไมโททิกคาริโอไทป์ที่ย้อมด้วยสี Hoechst 33258 ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ
ในกลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex



ภาพที่ 3.4 แผนภาพ idiogram ของคาริโอไทป์ของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex

3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่เจริญมาจากหนอนกลุ่มเดียวกันกับพวกที่นำไปศึกษาไมโททิกโครโมโซม ดังที่กล่าวไว้ข้างบนนั้นก็นำไปศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาและทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุล ในส่วนของการศึกษาด้านสัณฐานวิทยานั้นสามารถศึกษาได้ ดังนี้

3.3.1 ลักษณะภายนอกศึกษาได้จากลักษณะแถบสีในส่วนหัว ส่วนทอแรกซ์ ส่วนลำตัวและส่วนปีก ตามหลักอนุกรมวิธาน ควบคู่กับพันธุ์พืชอาศัยและแหล่งแพร่กระจายในประเทศไทย (ภาพที่ 3.5) จากภาพถ่ายแมลงตัวเต็มวัยจะสังเกตเห็นความแตกต่างทางลักษณะภายนอก โดยเฉพาะแถบสีเหลืองที่ปรากฏบนหัว และทอแรกซ์รวมทั้งแถบสีดำที่ปรากฏบนลำตัว เช่น สปีชีส์ A กับ C มีแถบสีดำที่ลำตัวต่างกัน แต่แถบสีเหลืองบนทอแรกซ์และหัวจะไม่ต่างกันมากนัก แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ D จะเห็นได้ชัดว่าแถบสีเหลืองเส้นกลางยาวกว่าของสปีชีส์ A และ C ไปเกือบถึงส่วนหัวอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 3.5) ในทำนองเดียวกัน สปีชีส์ E และ F มีแถบดำแถบที่ 2 ยาวไปถึงสองข้างของลำตัว เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ G ที่มีแถบดำแถบที่ 2 สั้นไม่ถึงขอบทั้งสองข้างของลำตัว แต่แถบดำใต้แถบดำตัว T ของสปีชีส์ E เป็นเส้นเล็กบางเมื่อเปรียบเทียบกับแถบดำอย่างเดียวกันในสปีชีส์ F และ G ความแตกต่างของลักษณะภายนอกดังกล่าวสอดคล้องกับความแตกต่างทางไมโททิกโครโมโซมและทางพันธุกรรมที่ตรวจสอบได้จากเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสและเทคนิคดีเอ็นเอ นอกจากนี้ แมลงวันผลไม้ชนิดที่ต่างกันนี้ยังมีพืชอาศัยและหรือการแพร่กระจายต่างกันด้วย (ภาพที่ 3.5, ตารางที่ 3.1) จะเห็นได้ว่า *B. tau* s.s. มีพืชอาศัยหลากหลายชนิด และแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย แต่สปีชีส์ B พบเฉพาะในพืชอาศัยชนิด *S. celastrineus* ที่จังหวัดสระบุรี ส่วนสปีชีส์ C พบเฉพาะในพืชอาศัยชนิด *M. cochinchinensis* ในภาคตะวันตก และสปีชีส์ E พบในพืชอาศัยชนิด *S. thorelii* ในจังหวัดระนอง สำหรับสปีชีส์ D และ I พบในพืชอาศัยสกุล *Trichosanthes* ในภาคใต้ตอนกลาง และตอนล่างตามลำดับ ข้อมูลที่น่าสนใจ คือ สปีชีส์ F และ G มีพืชอาศัยชนิดเดียวกันคือ *H. anthelminthicus* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง แต่สปีชีส์ G พบ เฉพาะที่จังหวัดกาญจนบุรี ส่วนสปีชีส์ F พบเฉพาะที่จังหวัดระนอง ซึ่งถือว่าเป็น *allopatric species* ที่ค่อนข้างชัดเจน

3.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของอวัยวะวางไข่ (ovipositor) : ศึกษาหาข้อมูลรายละเอียดได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope หรือ SEM) จากภาพถ่าย SEM จะสังเกตความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ในกลุ่มซับซ้อนนี้ได้ค่อนข้างชัดเจนพอสมควร (ภาพที่ 3.6)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 2 แบบนี้บ่งชี้ชัดว่ากลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* complex นี้มีสมาชิกที่มีรูปร่างภายนอกคล้ายคลึงกันถึง 8 ชนิดซึ่งสอดคล้องต้องกันกับข้อมูลทางด้านไมโททิกโครโมโซมและข้อมูลทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุลที่จะกล่าวต่อไป

ภาพที่ 3.5 ภาพถ่ายของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัย 6 ชนิดในกลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex คือ A (= *B. tau*), C, D, E, F และ G : แถวบนเป็นภาพเพศผู้, แถวกลางเป็นภาพเพศเมียและแถวล่างเป็นภาพผลไม้ของพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ทั้ง 6 ชนิด ตามลำดับ

D



C



A



G

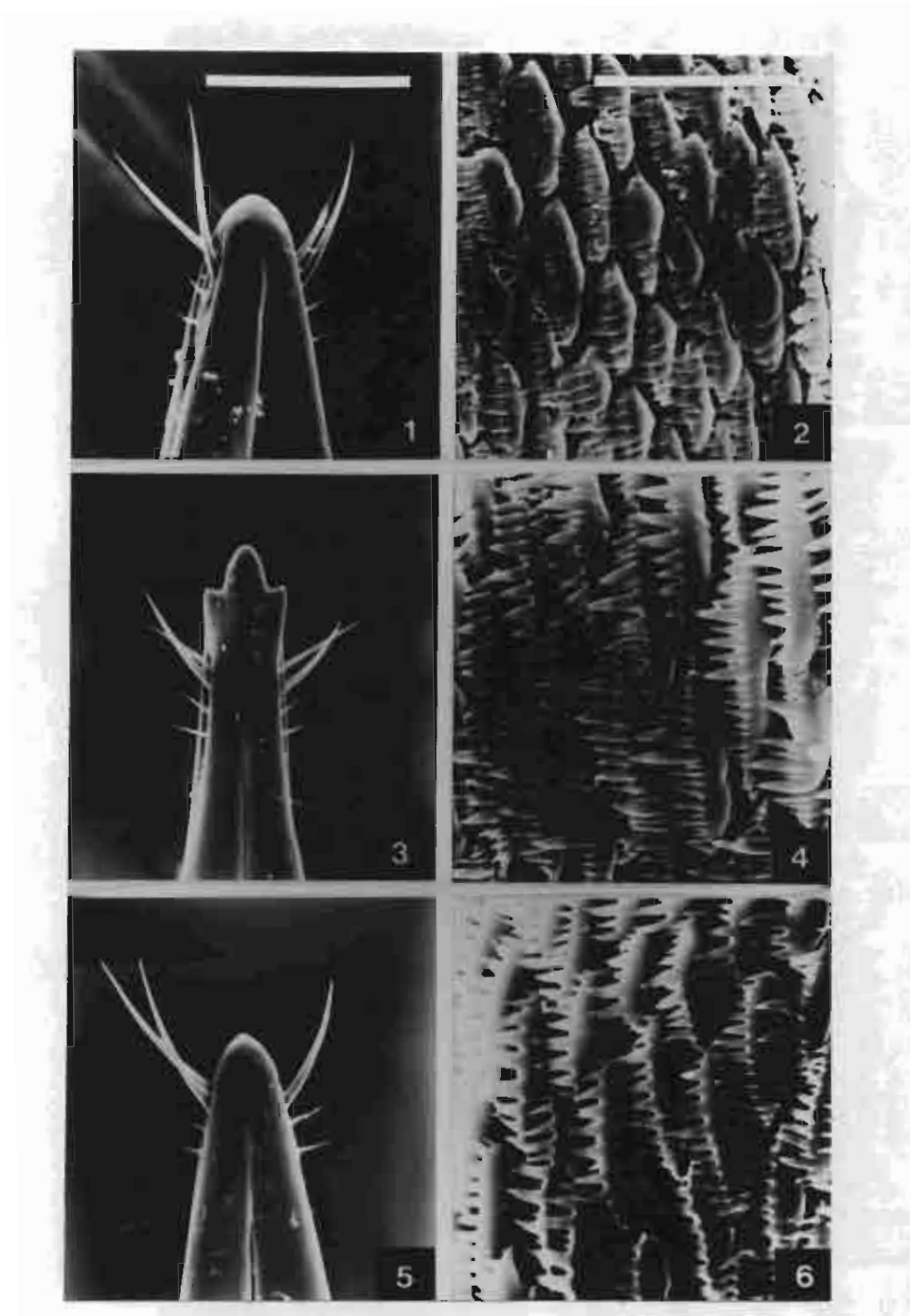


F

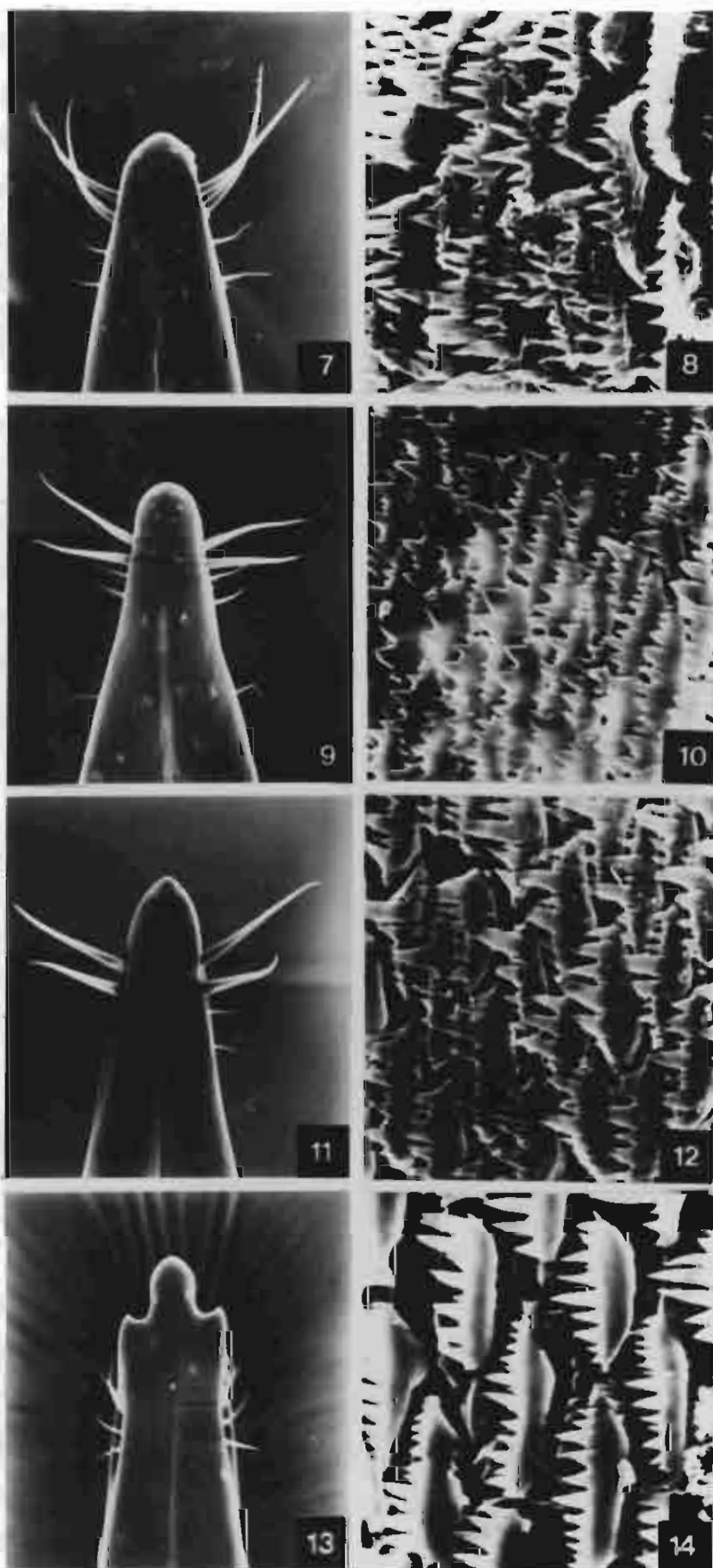


E





ภาพที่ 3.6 ภาพถ่าย SEM ของอวัยวะวางไข่ (ovipositor) ของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex ทั้งหมด 7 ชนิด คือ 1-2, A (= *B. tau*); 3-4, C; 5-6, D; 7-8, E; 9-10, F; 11-12, G; 13-14, I แฉกซ้ายมือ คือ ส่วนปลายสุด (apex of aculeus) (Bar = 0.05 mm) แฉกขวามือ คือ ภาพขยายผิวนอก (spicule) ของเปลือกหุ้ม (eversible membrane) (Bar = 0.01 mm)



ภาพที่ 3.6 (ต่อ)

3.4 รูปแบบของแถบสีเอนไซม์ (electromorph)

นำตัวเต็มวัยของแมลงกลุ่มเดียวกันนี้ไปศึกษาหาข้อมูลทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรฟอรีซิส (electrophoresis) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในประชากรธรรมชาติของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยได้มีการปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคอิเล็กโทรฟอรีซิสแนวราบ โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจล (horizontal polyacrylamide gel electrophoresis) เพื่อใช้วิเคราะห์เอนไซม์โดยการย้อมแถบสีภายหลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส วิธีการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสและเครื่องมือต่าง ๆ ได้ปรับปรุงมาจาก Green *et al.* (1990) ส่วนวิธีการย้อมสีเอนไซม์ดัดแปลงมาจาก Harris and Hopkinson (1976) และ Berlocher (1980)

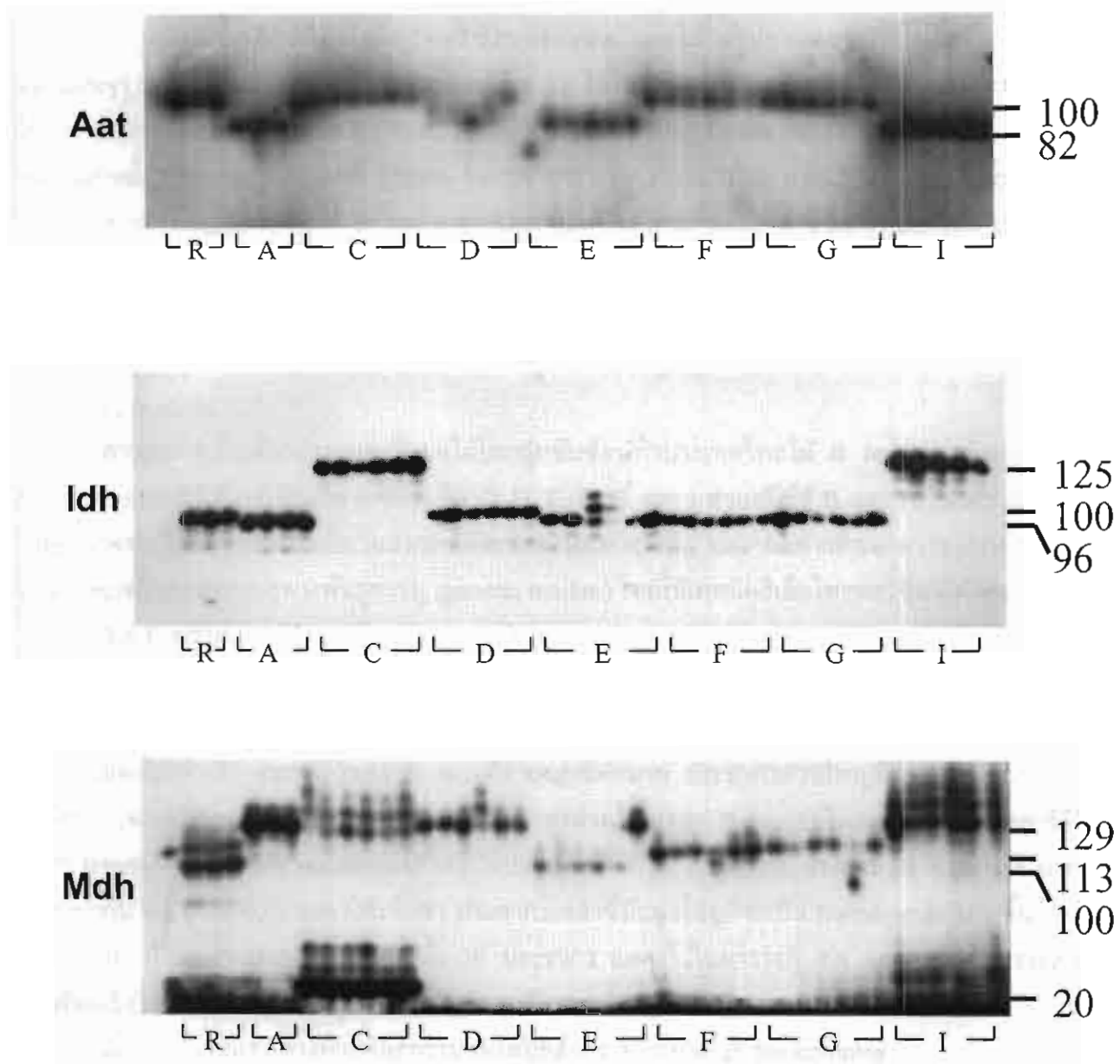
เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีทั้งหมด 9 ระบบ ได้แก่ aspartate aminotransferase (AAT), alcohol dehydrogenase (ADH), glyceral-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), glucose phosphate isomerase (GPI), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME) and phosphogluconate dehydrogenase (PGD) และ superoxide dismutase (SOD) ดังตัวอย่างแถบสีเอนไซม์ AAT, Idh และ Mdh ที่แสดงในภาพที่ 3.7 รายละเอียดเกี่ยวกับเปอร์เซ็นต์เจลและ pH ของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงชื่อเอนไซม์และระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อเอนไซม์	E.C. Number	ชื่อย่อ	pH ของบัฟเฟอร์
1. Aspartate aminotransferase	2.6.1.2	AAT	TEB pH 8.5
2. Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	ADH	TEB pH 8.5
3. Glyceral-3-phosphate dehydrogenase	1.1.1.8	G3PDH	TC pH 7.1
4. Glucose phosphate isomerase	1.3.1.9	GPI	TC pH 7.1
5. Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	IDH	TC pH 7.1
6. Malate dehydrogenase	1.1.1.37	MDH	TC pH 7.1
7. Malic enzyme	1.1.1.4	ME	TC pH 7.1
8. Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44	PGD	TC pH 7.1
9. Superoxide dismutase	1.15.1.1	SOD	TEB pH 8.5

TC = Tris-Citric acid, TEB = Tris-EDTA-Boric acid

ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้มาจากแมลงวันผลไม้กลุ่มเดียวกันกับพวกที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซมและสัณฐานวิทยาที่กล่าวไว้ข้างบน แมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่ฟักออกมาจะได้รับน้ำและอาหาร (น้ำตาลทรายผสมกับ yeast hydrolyzate) ประมาณ 2-3 สัปดาห์ ก่อนที่จะนำมาศึกษาโดยเทคนิคอิเล็กโทรฟอรีซิสเพื่อผลการทดลองที่ชัดเจน ทั้งนี้เพราะแมลงตัวเต็มวัยที่ยังไม่เจริญเต็มที่จะแสดงแถบสีเอนไซม์ไม่ชัดเจนสำหรับเอนไซม์บางระบบ เช่น glucose phosphate isomerase (GPI) และ phosphogluconate dehydrogenase (PGD) เป็นต้น ตัวเต็มวัยทุกตัวจะต้องจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะ



ภาพที่ 3.7 แถบสี electromorph ของเอนไซม์ที่ใช้จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ในกลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex (สปีชีส์ A-I ยกเว้นสปีชีส์ B และ H เพราะไม่มีตัวอย่างเพื่อการศึกษา); R = *B. dorsalis* ที่ใช้เป็นแถบสีมาตรฐาน

ทางสัตวศาสตร์ก่อนที่จะนำมาศึกษาโดยเทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิส เพื่อใช้เป็นหลักฐานในการสนับสนุนผลการศึกษาต่อไป

ข้อมูลจากการศึกษาอิเล็กโทรฟอเรซิสของแมลงวันผลไม้ในรูปของความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ของเอนไซม์ 9 ระบบ ซึ่งประกอบด้วย 12 โลไซ (loci) จากประชากรต่าง ๆ และนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ POPGENE เวอร์ชัน 1.1 จัดทำโดย University of Alberta and Center for International Forestry Research (1996) ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) ของประชากรของแมลงวันผลไม้ *B. tau* s.s. และกลุ่มสปีชีส์ใกล้เคียงอีก 6 ชนิด เพื่อให้ได้ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อโลไกส (A), เปอร์เซนต์โพลิมอร์ฟิซึม (P), ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตี (H), ค่าเฉลี่ย fixation index (F), ค่าคล้ายกันทางพันธุกรรม (genetic identity หรือ I), ค่าห่างกันทางพันธุกรรม (genetic distance หรือ D) และการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในรูปแบบ phylogenetic tree โดยวิธีวิเคราะห์ UPGMA clustering analysis

การสำรวจเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ในกลุ่มซับซ้อนทั่วประเทศไทยได้ *B. tau* s.s. ทั้งหมดจาก 26 ประชากร และสปีชีส์ใกล้เคียงอีก 6 ชนิด คือ C, D, E, F, G และ I ส่วนสปีชีส์ B และ H ไม่ได้รวมอยู่ในการศึกษานี้เพราะไม่มีตัวอย่างตัวเต็มวัยมากพอที่จะแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 ผลการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิส มีดังต่อไปนี้

3.4.1 ความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรของ *B. tau* s.s

ความแปรผันทางพันธุกรรมของ *B. tau* ทั้ง 26 ประชากร แสดงไว้ในตารางที่ 3.3 ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อโลไกส ($A = 1.71$), ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์โพลิมอร์ฟิซึม ($P = 46.80$) และ ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตี ($H = 0.05$) แสดงให้เห็นว่า ประชากรของ *B. tau* มีค่าเหล่านี้ต่ำมาก ประชากรส่วนใหญ่มีค่า F เป็นบวกและเข้าใกล้ศูนย์ (ค่าเฉลี่ย = 0.06) แสดงให้เห็นว่า ประชากรส่วนใหญ่ของ *B. tau* อยู่ในสภาพสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy - Wienberg equilibrium) ยกเว้นประชากรที่ 1, 3, 7, 16, 20, 21 และ 25 ซึ่งมีค่า F มากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ($F \geq 0.1$) แสดงให้เห็นว่า ประชากรเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะเป็น homozygote มากขึ้น

ค่า I และค่า D ของ *B. tau* ทั้ง 26 ประชากร แสดงไว้ในตารางที่ 3.4 และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงในรูปแบบฟีโนแกรม ดังภาพที่ 3.8

3.4.2 ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสปีชีส์ต่าง ๆ ในกลุ่ม *B. tau* complex

การศึกษาอิเล็กโทรฟอเรซิสพบว่าแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. tau* complex นี้มีสปีชีส์ใกล้เคียงกันอย่างน้อย 7 ชนิดที่สอดคล้องกับผลการศึกษาทางด้านสัตวศาสตร์ทางโมโทติกโครโมโซม และพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุล

ความถี่จีโนไทป์ของแต่ละสปีชีส์แสดงไว้ในตารางที่ 3.5 บ่งชี้ให้เห็นว่าสปีชีส์ D มีอัลลีลที่จำเพาะซึ่งสามารถใช้แยกสปีชีส์นี้ออกจากสปีชีส์อื่น ๆ ได้ชัดเจนโดยใช้อัลลีลไดอัลลีลหนึ่ง คือ Gpi^{100} หรือ Idh^{100} หรือ Me^{100} ส่วนอัลลีล Mdh^{100} หรือ Sod^{110} สามารถใช้จำแนกสปีชีส์ E ออกจากสปีชีส์อื่นได้เช่นกัน สำหรับสปีชีส์ A, C, F, G และ I นั้น นั้นถึงแม้จะมีอัลลีลบางอัลลีลที่ปรากฏร่วมกัน แต่สามารถใช้ความถี่จีโนไทป์ที่แตกต่างกันของอัลลีลมากกว่าหนึ่งอัลลีลเพื่อการจำแนกสปีชีส์ได้ โดยในขั้นแรกสามารถแยกได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1

ซึ่งมีสปีชีส์ C และ I โดยใช้อัลลีล Gpi^{122} , Idh^{125} , Me^{122} และ $Pgd-2^{122}$ ปรากฏร่วมกันและสามารถใช้อัลลีลทั้งสี่นี้แยกสปีชีส์ C และ I ออกจากสปีชีส์อื่นได้ หลังจากนั้นก็ใช้อัลลีล Sod^{272} เพื่อแยกสปีชีส์ C และอัลลีล $Sod^{232,176}$ เพื่อแยกสปีชีส์ I ออกจากกันได้ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสปีชีส์ A, F และ G ซึ่งสามารถแยกออกจากสปีชีส์อื่นได้โดยใช้อัลลีล $Adh-1^{66,69}$ หรือ อัลลีล $Adh-2^{71,74}$ จากนั้นก็ใช้อัลลีล Aat^{82} และ Mdh^{129} เพื่อแยกสปีชีส์ A ออกจากสปีชีส์ F และ G ซึ่งมีอัลลีล Aat^{100} และ Mdh^{113} และใช้อัลลีล $Adh-3^{-20,-71}$ เพื่อจำแนกสปีชีส์ F ออกจากสปีชีส์ G ซึ่งมีอัลลีล $Adh-3^{-129,-100,-71}$ (ภาพที่ 3.9)

ตารางที่ 3.6 แสดงค่า I และค่า D ของประชากรต่าง ๆ ของ *B. tau* s.s. และสปีชีส์อื่น ๆ ในกลุ่มนี้ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในรูปแบบฟีโนแกรมแสดงไว้ในภาพที่ 3.10 โดยมีแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* จาก 3 ประชากรเป็นชนิดนอกกลุ่ม (outgroup species) เพื่อการเปรียบเทียบ

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variability) ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera tau*

ประชากร	N	A	P	H	F
1	20	1.50	50.00	0.07	0.13
2	10	1.42	41.67	0.10	0.05
3	60	1.83	75.00	0.06	0.10
4	50	1.25	25.00	0.03	-0.01
5	60	1.70	41.67	0.04	0.02
6	40	1.58	50.00	0.05	0.01
7	111	3.08	83.33	0.07	0.13
8	20	1.67	50.00	0.05	-0.01
9	60	1.92	58.33	0.05	0.01
10	60	2.17	83.33	0.04	0.08
11	60	1.83	50.00	0.05	0.01
12	60	2.00	66.67	0.09	0.06
13	69	1.33	25.00	0.01	0.08
14	40	1.22	16.67	0.03	-0.01
15	38	1.33	16.67	0.03	-0.01
16	40	1.33	33.33	0.03	0.10
17	40	1.25	25.00	0.03	-0.01
18	21	1.67	8.33	0.05	0.06
19	21	1.83	75.00	0.08	0.06
20	23	1.67	58.33	0.06	0.10
21	84	2.33	75.00	0.07	0.10
22	28	1.33	16.67	0.05	0.07
23	29	1.25	16.67	0.03	0.07
24	85	2.25	75.00	0.07	0.08
25	50	1.75	33.33	0.07	0.14
26	90	2.00	66.67	0.05	0.06
ค่าเฉลี่ย	48.81	1.71	46.80	0.05	0.06

ตารางที่ 3.4 แสดงค่า Nei's (1978) unbiased genetic identity (อยู่เหนือแนวทแยงมุม) และค่า Nei's (1978) unbiased genetic distance (อยู่ใต้แนวทแยงมุม) ในประชากรของแบล็กวันผลไม้ *Bactrocera tau* (สปีชีส์ A)

ประชากร	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	***	0.9912	0.9955	0.9948	0.9955	0.9948	0.9958	0.9958	0.9987	0.9955	0.9902	0.9963	0.8707	0.9956	0.9966	0.9953	0.9888	0.9954	0.9949	0.9962	0.9938	0.9957	0.9949	0.9954	0.9950	0.9950
2	0.0099	***	0.9955	0.9913	0.9916	0.9927	0.9940	0.9915	0.9911	0.9935	0.9922	0.9946	0.9919	0.8630	0.9941	0.9941	0.9913	0.9741	0.9949	0.9950	0.9866	0.9835	0.9839	0.9859	0.9964	0.9926
3	0.0045	0.0045	***	0.9967	0.9969	0.9988	0.9994	0.9965	0.9977	0.9981	0.9987	0.9942	0.9972	0.8651	0.9973	0.9988	0.9972	0.9758	0.9980	0.9998	0.9993	0.9539	0.9997	0.9997	0.9993	0.9986
4	0.0052	0.0088	0.0033	***	0.9989	0.9976	0.9979	0.9980	0.9985	0.9989	0.9979	0.9875	0.9989	0.8606	0.9983	0.9988	0.9993	0.9743	0.9952	0.9966	0.9964	0.9962	0.9980	0.9957	0.9956	0.9977
5	0.0045	0.0084	0.0031	0.0011	***	0.9981	0.9983	0.9988	0.9991	0.9994	0.9985	0.9972	0.9996	0.8597	0.9992	0.9992	0.9996	0.9748	0.9951	0.9965	0.9972	0.9972	0.9983	0.9980	0.9958	0.9985
6	0.0052	0.0073	0.0012	0.0024	0.0019	***	0.9994	0.9978	0.9987	0.9983	0.9987	0.9889	0.9979	0.8579	0.9982	0.9987	0.9984	0.9722	0.9853	0.9989	0.9978	0.9975	0.9983	0.9981	0.9972	0.9985
7	0.0042	0.0060	0.0006	0.0021	0.0017	0.0006	***	0.9976	0.9987	0.9989	0.9994	0.9917	0.9982	0.8620	0.9983	0.9983	0.9985	0.9757	0.9870	0.9994	0.9990	0.9974	0.9997	0.9990	0.9984	0.9993
8	0.0043	0.0085	0.0035	0.0020	0.0012	0.0023	0.0024	***	0.9991	0.9991	0.9983	0.9870	0.9992	0.8574	0.9992	0.9988	0.9985	0.9741	0.9949	0.9959	0.9967	0.9971	0.9979	0.9956	0.9952	0.9979
9	0.0040	0.0089	0.0023	0.0015	0.0009	0.0013	0.0013	0.0009	***	0.9993	0.9994	0.9978	0.9992	0.8566	0.9988	0.9992	0.9991	0.9742	0.9957	0.9975	0.9972	0.9969	0.9988	0.9967	0.9961	0.9989
10	0.0034	0.0065	0.0019	0.0011	0.0006	0.0017	0.0011	0.0009	0.0007	***	0.9988	0.9908	0.9998	0.8651	0.9993	0.9999	0.9993	0.9774	0.9973	0.9976	0.9983	0.9973	0.9990	0.9973	0.9973	0.9986
11	0.0045	0.0078	0.0013	0.0021	0.0015	0.0003	0.0006	0.0017	0.0006	0.0012	***	0.9987	0.9984	0.8584	0.9985	0.9991	0.9989	0.9730	0.9957	0.9987	0.9979	0.9875	0.9994	0.9979	0.9970	0.9996
12	0.0098	0.0054	0.0058	0.0125	0.0129	0.0111	0.0084	0.0131	0.0122	0.0083	0.0113	***	0.9885	0.8765	0.9879	0.9914	0.9877	0.9797	0.9970	0.9935	0.9950	0.9869	0.9911	0.9949	0.9958	0.9885
13	0.0037	0.0081	0.0028	0.0011	0.0004	0.0021	0.0018	0.0008	0.0008	0.0002	0.0016	0.0116	***	0.8652	0.9994	0.9996	0.9983	0.9766	0.9962	0.9865	0.9975	0.9971	0.9986	0.9962	0.9962	0.9984
14	0.1385	0.1474	0.1450	0.1501	0.1511	0.1533	0.1485	0.1539	0.1525	0.1449	0.1527	0.1318	0.1449	***	0.8612	0.8669	0.9611	0.8866	0.8806	0.8633	0.8687	0.8562	0.8646	0.8656	0.8710	0.8632
15	0.0044	0.0060	0.0027	0.0017	0.0008	0.0018	0.0017	0.0008	0.0012	0.0007	0.0015	0.0122	0.0006	0.1494	***	0.9993	0.9988	0.9746	0.9953	0.9967	0.9977	0.9982	0.9986	0.9965	0.9964	0.9986
16	0.0034	0.0060	0.0012	0.0012	0.0008	0.0013	0.0007	0.0012	0.0008	0.0001	0.0009	0.0086	0.0004	0.1429	0.0007	***	0.9992	0.9773	0.9976	0.9983	0.9888	0.9976	0.9995	0.9982	0.9980	0.9990
17	0.0047	0.0087	0.0028	0.0007	0.0004	0.0016	0.0015	0.0015	0.0009	0.0007	0.0011	0.0124	0.0007	0.1495	0.0012	0.0008	***	0.9748	0.9955	0.9971	0.9972	0.9967	0.9985	0.9962	0.9960	0.9987
18	0.0113	0.0262	0.0245	0.0260	0.0256	0.0282	0.0246	0.0262	0.0262	0.0228	0.0274	0.0206	0.0236	0.1204	0.0257	0.0230	0.0255	***	0.9806	0.9745	0.9788	0.9712	0.9751	0.9760	0.9786	0.9727
19	0.0046	0.0051	0.0020	0.0048	0.0049	0.0047	0.0030	0.0052	0.0043	0.0027	0.0043	0.0030	0.0038	0.1272	0.0048	0.0024	0.0045	0.0196	***	0.9974	0.9983	0.9936	0.9970	0.9979	0.9983	0.9958
20	0.0051	0.0050	0.0002	0.0034	0.0035	0.0011	0.0006	0.0041	0.0025	0.0024	0.0013	0.0066	0.0035	0.1470	0.0033	0.0017	0.0029	0.0259	0.0026	***	0.9989	0.9966	0.9992	0.9995	0.9990	0.9986
21	0.0038	0.0034	0.0007	0.0036	0.0028	0.0022	0.0010	0.0033	0.0028	0.0017	0.0021	0.0050	0.0025	0.1408	0.0023	0.0012	0.0028	0.0214	0.0017	0.0011	***	0.9670	0.9989	0.9993	0.9985	0.9981
22	0.0063	0.0065	0.0031	0.0038	0.0028	0.0025	0.0026	0.0029	0.0031	0.0027	0.0025	0.0131	0.0029	0.1552	0.0018	0.0024	0.0033	0.0282	0.0065	0.0034	0.0030	***	0.9878	0.9964	0.9961	0.9979
23	0.0043	0.0061	0.0007	0.0020	0.0017	0.0007	0.0003	0.0021	0.0012	0.0010	0.0006	0.0090	0.0014	0.1455	0.0014	0.0005	0.0015	0.0252	0.0030	0.0008	0.0011	0.0022	***	0.9989	0.9984	0.9995
24	0.0052	0.0041	0.0003	0.0043	0.0040	0.0019	0.0010	0.0044	0.0033	0.0027	0.0021	0.0051	0.0038	0.1443	0.0035	0.0018	0.0038	0.0243	0.0021	0.0005	0.0007	0.0036	0.0011	***	0.9994	0.9980
25	0.0046	0.0036	0.0007	0.0044	0.0042	0.0028	0.0016	0.0048	0.0039	0.0027	0.0030	0.0042	0.0038	0.1381	0.0037	0.0020	0.0041	0.0216	0.0017	0.0010	0.0005	0.0039	0.0018	0.0006	***	0.9973
26	0.0050	0.0074	0.0014	0.0023	0.0015	0.0005	0.0007	0.0021	0.0011	0.0014	0.0004	0.0116	0.0017	0.1471	0.0014	0.0010	0.0013	0.0277	0.0042	0.0014	0.0019	0.0021	0.0005	0.0020	0.0027	***

ตารางที่ 3.5 แสดงความถี่โนไทป์ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera tau* และกลุ่มสปีชีส์ใกล้เคียง

Locus	Species						
	A	C	D	E	F	G	I
N	1,269	189	25	78	15	33	165
Aat							
100	0.000	0.751	0.460	0.000	0.967	0.985	0.000
90	0.000	0.213	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
82	0.983	0.000	0.520	0.968	0.000	0.000	0.982
Rare alleles	0.017	0.036	0.020	0.032	0.033	0.015	0.018
Adh-1							
100	0.000	*	1.000	1.000	0.000	0.000	*
69	0.000	*	0.000	0.000	0.000	0.515	*
66	0.992	*	0.000	0.000	1.000	0.485	*
Rare alleles	0.008	*	0.000	0.000	0.000	0.000	*
Adh-2							
100	0.000	*	1.000	1.000	0.000	0.000	*
74	0.000	*	0.000	0.000	0.000	0.515	*
71	0.992	*	0.000	0.000	1.000	0.485	*
Rare alleles	0.008	*	0.000	0.000	0.000	0.000	*
Adh-3							
150	0.000	0.111	*	0.000	0.000	0.000	0.000
-20	0.000	0.000	*	0.051	0.889	0.000	0.000
-71	0.000	0.000	*	0.000	0.111	0.094	0.000
-100	0.000	0.000	*	0.000	0.000	0.063	0.000
-129	0.936	0.889	*	0.096	0.000	0.750	0.000
-171	0.000	0.000	*	0.827	0.000	0.094	0.964
Rare alleles	0.064	0.000	*	0.026	0.000	0.000	0.036
G3pdh							
87	0.988	0.997	1.000	0.974	1.000	1.000	0.973
Rare alleles	0.012	0.003	0.000	0.026	0.000	0.000	0.027
Gpi							
122	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.988
108	0.000	0.000	0.000	0.058	0.000	0.515	0.000
100	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
95	0.992	0.000	0.000	0.930	1.000	0.485	0.000
Rare alleles	0.008	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.012
Idh							
125	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
109	0.000	0.000	0.000	0.064	0.000	0.000	0.000
100	0.000	0.000	0.980	0.000	0.000	0.000	0.000
96	0.985	0.000	0.000	0.910	1.000	0.970	0.000
Rare alleles	0.015	0.000	0.020	0.026	0.000	0.030	0.000

ตารางที่ 3.5 ต่อ

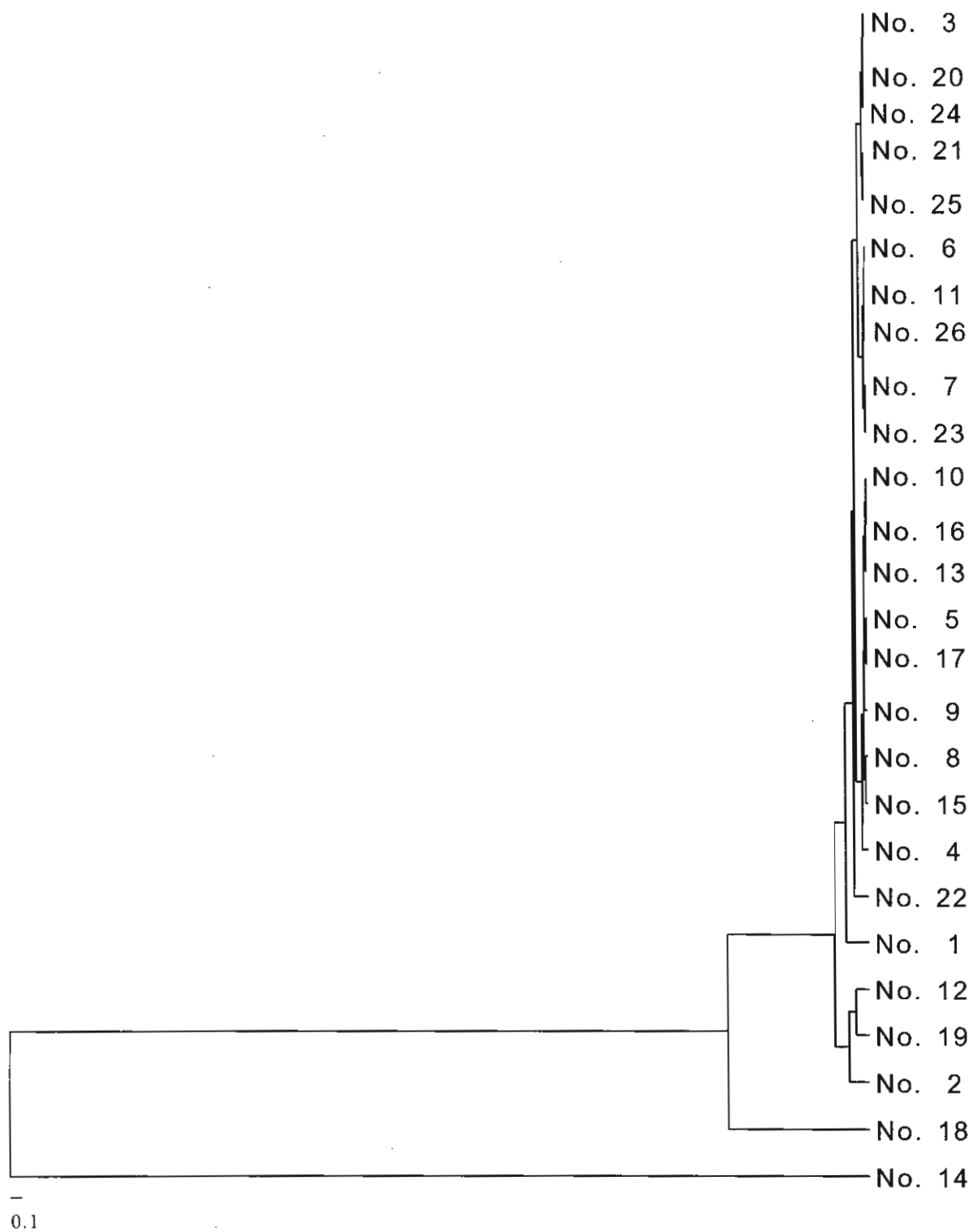
Locus	Species						
	A	C	D	E	F	G	I
Mdh							
163	0.000	0.000	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000
129	0.976	0.000	0.940	0.000	0.067	0.000	0.992
113	0.000	0.000	0.000	0.000	0.900	0.849	0.000
100	0.000	0.000	0.000	0.948	0.000	0.000	0.000
88	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.152	0.000
20	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Rare alleles	0.024	0.000	0.000	0.052	0.033	0.000	0.008
Me							
122	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.991
100	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
97	0.997	0.000	0.000	0.949	1.000	1.000	0.000
Rare alleles	0.003	0.000	0.000	0.051	0.000	0.000	0.009
PgD-1							
114	0.000	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
108	0.000	0.156	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.963	0.551	0.900	0.974	1.000	1.000	0.973
90	0.000	0.161	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000
Rare alleles	0.037	0.074	0.000	0.026	0.000	0.000	0.027
PgD-2							
122	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
113	0.000	0.000	0.000	0.091	0.000	0.000	0.000
97	0.985	0.000	1.000	0.909	1.000	1.000	0.000
Rare alleles	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Sod							
272	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
232	0.840	0.000	0.960	0.000	0.000	0.000	0.685
176	0.145	0.000	0.000	0.000	1.000	0.970	0.267
110	0.000	0.000	0.000	0.769	0.000	0.000	0.000
100	0.000	0.000	0.000	0.231	0.000	0.030	0.000
Rare alleles	0.015	0.000	0.040	0.000	0.000	0.030	0.049

* ไม่ปรากฏแถบสี

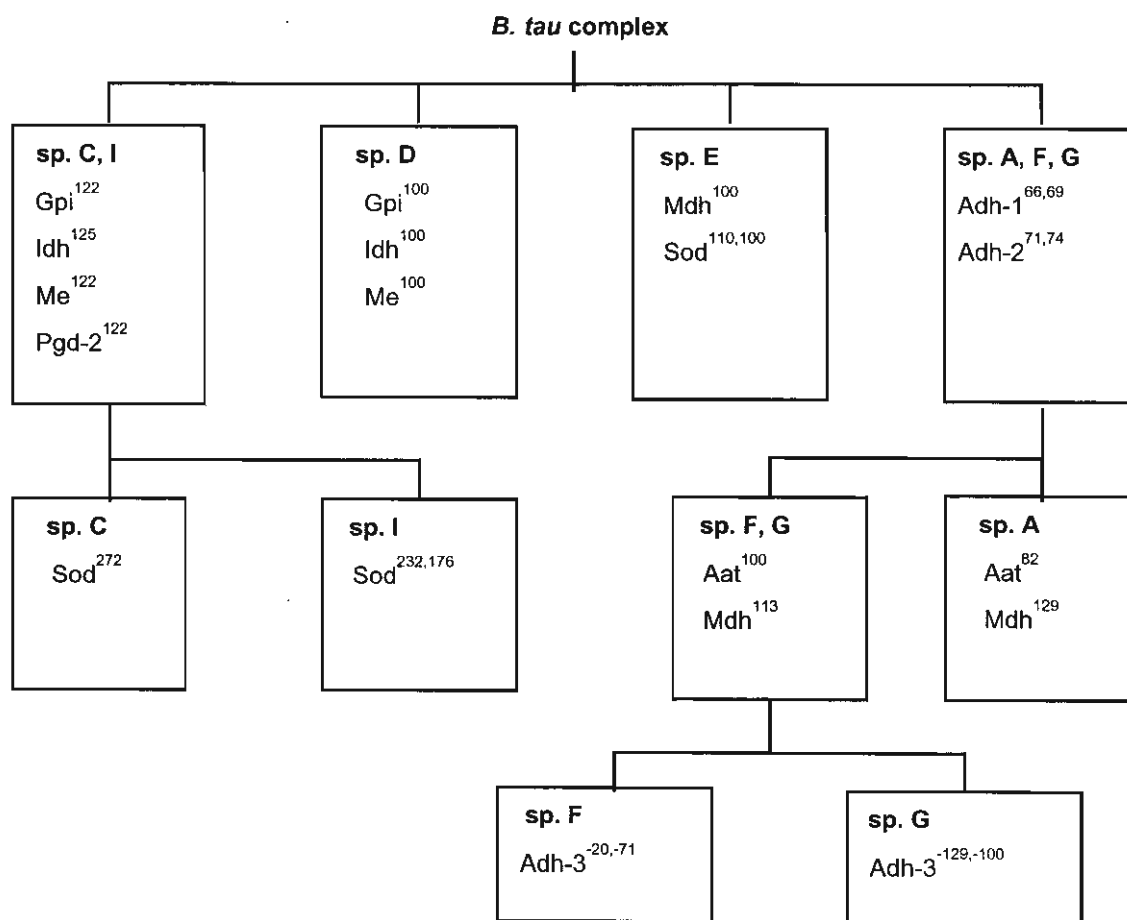
Rare alleles = ผลรวมค่าความถี่จีโนไทป์ของอัลลีลที่แสดงค่าความถี่น้อยกว่า 0.05

ตารางที่ 3.6 แสดงค่า Nei's (1978) unbiased genetic distance ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera tau* (สปีชีส์ A) และกลุ่มสปีชีส์ใกล้เคียง

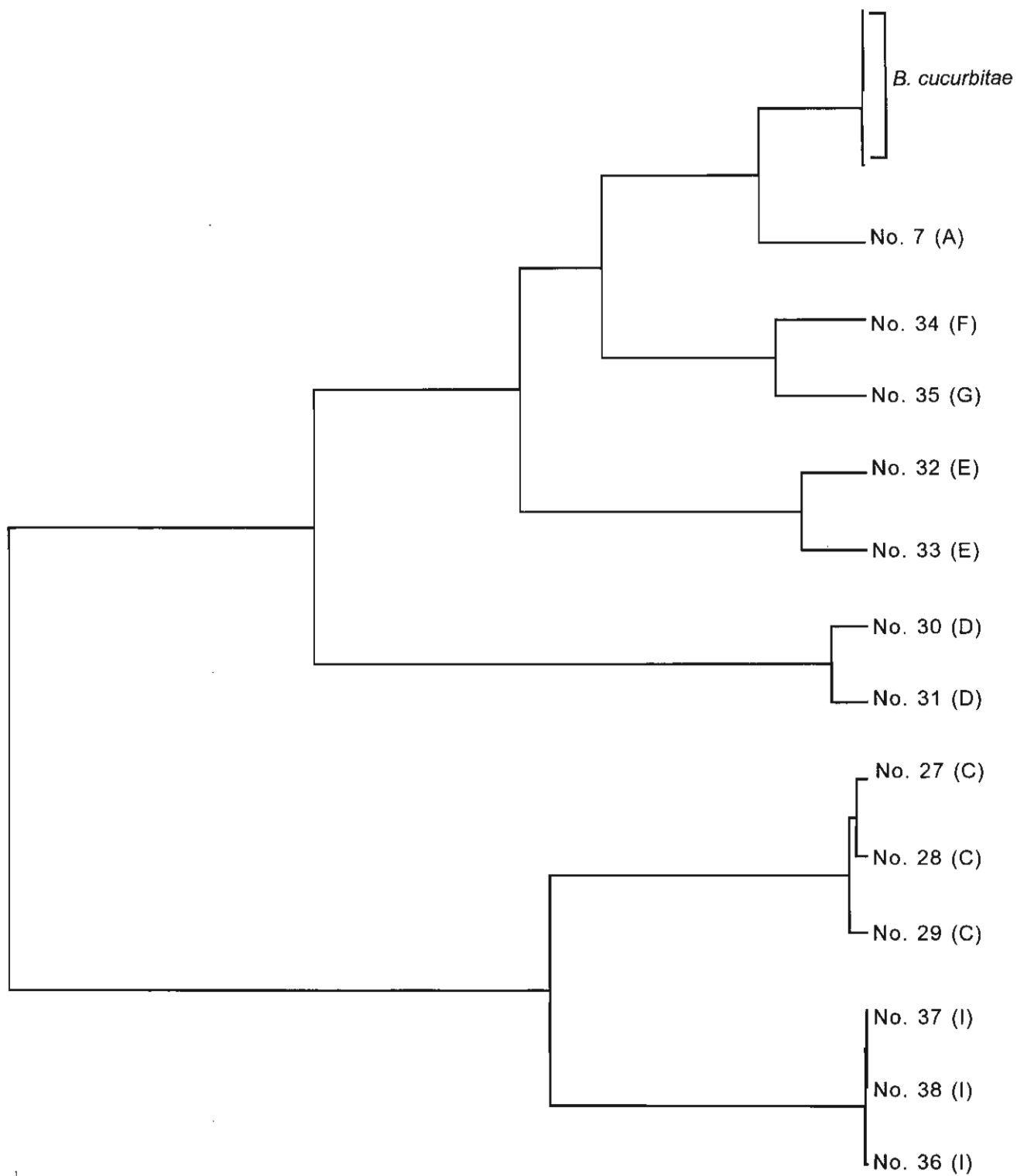
Species	A	C	D	E	F	G	I
A	****						
C	1.474	****					
D	0.736	1.826	****				
E	0.494	1.893	0.667	****			
F	0.343	1.574	1.229	0.659	****		
G	0.383	1.193	1.167	0.637	0.146	****	
I	0.825	0.520	0.887	1.007	1.498	1.399	****



ภาพที่ 3.8 ฟิโลแกรมแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของประชากรต่าง ๆ ของ *Bactrocera tau* (สปีชีส์ A) คำนวณโดยวิธี UPGMA clustering analysis จากค่า Nei's (1978) unbiased genetic distance



ภาพที่ 3.9 แสดงเอนไซม์โลกัสที่ใช้จำแนกสปีชีส์ของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มซับซ้อน *Bactrocera tau* complex ทั้ง 7 ชนิด



1

ภาพที่ 3.10 ฟิโลแกรมแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของประชากรต่าง ๆ ของ *Bactrocera tau* และกลุ่มสปีชีส์ใกล้เคียง คำนวณโดยวิธี UPGMA clustering analysis จากค่า Nei's (1978) unbiased genetic distance โดยมี *B. cucurbitae* เป็น outgroup species

3.5 การวิเคราะห์ทางอนุพันธุศาสตร์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์โดยการพัฒนาแบบ PCR ที่สามารถขยายส่วนของ ยีนฮีตช็อก (heat shock gene) ชนิดหนึ่งจากแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* ได้ (ดูรายงานฉบับ สมบูรณ์ทุนเมธีวิจัย : สุจินดา ฐานะภูมิ) เมื่อนำรหัสพันธุกรรมของยีนช็อคมาเปรียบเทียบเรียงกันและ คำนวณหาระยะห่างทางพันธุกรรม และนำรหัสพันธุกรรมมาสร้างแผนผังตามสายวิวัฒนาการด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่ารหัสพันธุกรรมบริเวณนี้ของยีนฮีตช็อกสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแมลงผลไม้กลุ่มซับซ้อน *B. tau* complex ได้สอดคล้องกับการจัดกลุ่ม โดยลักษณะอื่น ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา, ไมโททิกโครโมโซม, และรูปแบบ ของแถบสีเอ็นไซม์

แมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน *B. tau* complex ยังสามารถแบ่งออกเป็นแมลงกลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ตามสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกันที่สุดได้อีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วยชนิด B, F และ G โดยมีชนิด E อยู่ห่างออกไป กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยชนิด C และ D โดยที่กลุ่มย่อยนี้ไม่ได้ใกล้ชิดกันมากเหมือนกลุ่มแรก และมีความเชื่อถือทางสถิติน้อยกว่ากลุ่มแรก ส่วน *B. tau* s.s (ชนิด A) นั้นมีลักษณะเป็นกลุ่มภายนอกสุด (outgroup) ของกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนนี้ แต่ก็ยังจัดอยู่ในกลุ่มมากกว่าสปีชีส์นอกกลุ่มชนิดอื่น เช่น อยู่ในสกุลย่อย *Zeugodacus* เดียวกัน *B. cucurbitae* ซึ่งมีความแตกต่างกันชัดเจนถึงแม้ว่าจะจัดบนพื้นฐานความรู้ทางด้านอนุกรมวิธาน อย่างไรก็ตามระบบ DNA เครื่องหมายบริเวณยีนฮีตช็อกนี้น่าจะใช้เป็นระบบบ่งชี้สปีชีส์ต่าง ๆ ของแมลงในกลุ่มซับซ้อน *B. tau* complex ได้

DNA เครื่องหมายบริเวณยีนฮีตช็อกนี้ยังสามารถรวมกลุ่มประชากรธรรมชาติของ *B. tau* (ชนิด A) จากแหล่งต่าง ๆ 10 แห่ง ไว้ในสายเดียวกันตามสายวิวัฒนาการ (monophyletic) แต่ไม่สามารถแยกประชากรเหล่านี้ออกจากกันได้เพราะประชากรจากภูมิภาคหนึ่งอาจแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับประชากรจากภูมิภาคอื่นที่ห่างไกลทางภูมิศาสตร์ ลักษณะทางพันธุกรรมเช่นนี้อาจแสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรต่าง ๆ มีมากและการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมบริเวณฮีตช็อกนี้วิวัฒนาการช้ากว่าการกระจายทางพันธุกรรมด้วยกลไกและเหตุการณ์อื่น ๆ ปรากฏการณ์การเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของยีนฮีตช็อกนี้น่าสนใจอย่างยิ่งและควรจะได้มีการศึกษาหาข้อมูลละเอียดต่อไปเพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อนกลุ่มนี้

ชีววิทยาเชิงประชากรของกลุ่มซับซ้อน *B. dorsalis* complex

แมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน *B. dorsalis* complex จัดเป็นกลุ่มแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นตัวทำลายผลไม้ และส่งผลกระทบต่อ การส่งออก ซึ่งสามารถพบแมลงวันกลุ่มนี้ได้ ในแถบภูมิภาคเขตร้อน และกึ่งเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศในแถบเอเชีย และเอเชียอาคเนย์ รวมทั้งในประเทศไทย สำหรับประเทศไทยมีการสำรวจและศึกษาด้านอนุกรมวิธานของแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อนนี้ และพบว่า มีสมาชิกในกลุ่มมากถึง 14 ชนิด ที่ตั้งชื่อจากวิทยาศาสตร์แล้ว คือ *B. arecae*, *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *B. irvingiae*, *B. kanchanaburi*, *B. melastomatos*, *B. osbeckiae*, *B. papayae*, *B. propinqua*, *B. pyrifoliae*, *B. raiensis*, *B. thailandica*, *B. unimacula* และ *B. verbascifoliae* (Drew and Honcock 1994) แต่ยังไม่มีความรู้ทางด้านชีววิทยาเชิงประชากรของแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อนนี้มากนัก เช่น การแพร่กระจายของแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้ ซึ่งขึ้นกับลักษณะทางกายภาพ ภูมิอากาศ ชนิดของพืชอาศัย และพันธุศาสตร์เชิงประชากร ดังนั้น กลุ่มนักวิจัยของเราจึงเริ่มการศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรอย่างเป็นระบบจนได้ข้อมูลเบื้องต้นที่น่าสนใจ และได้ค้นพบสปีชีส์ใหม่ในกลุ่มนี้ (Baimai et al. 1995, วิสุทธิ ไข่ม้วน และคณะ 2538, Satayalai 1995) ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการและมีข้อมูลมากเพียงพอที่จะนำมาหามาตรการควบคุมแมลงศัตรูพืชเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.1 การศึกษาด้านสัณฐานวิทยาโดยการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์

การจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้เป็นความจำเป็นเบื้องต้นสำหรับการค้นคว้าวิจัยในแนวลึก และเนื่องจากว่าแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน *B. dorsalis* complex นี้บางชนิดมีลักษณะรูปร่างภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก ก่อนข้างยากที่จะจำแนกชนิดได้โดยนักวิจัยที่ไม่ชำนาญทางด้านอนุกรมวิธานและด้านสัณฐานวิทยา จึงน่าที่จะพัฒนาหาวิธีการใหม่ๆ สำหรับจำแนกชนิดได้ถูกต้องและรวดเร็ว การศึกษาวิธีการจำแนกชนิดแมลงโดยใช้หลักการวัดลักษณะปีกในแง่มุมต่างๆ แล้วนำมาคำนวณหาค่าจำเพาะที่จะใช้บ่งบอกถึงความแตกต่างของสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันได้มีการศึกษามาบ้างแล้วจนได้ผลดีในแมลงพวกแตนเบียนบางชนิด (Yu et al. 1992) แต่ยังไม่มีการศึกษากันในกลุ่มแมลงวันผลไม้ในบ้านเรา

การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษานำร่องที่จะทดลองนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน *B. dorsalis* complex โดยการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา (morphometric analysis) จากการวัดรูปร่างของปีกโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

แมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อนที่ใช้เป็นตัวอย่างสำหรับศึกษานี้มี 8 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ศึกษาทางอนุกรมวิธานเรียบร้อยแล้ว 5 ชนิด คือ *B. dorsalis*, *B. arecae*, *B. propinqua*, *B. pyrifoliae*, *B. verbascifoliae*, และชนิดที่ค้นพบใหม่ในโครงการวิจัยต่อเนื่องนี้อีก 3 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ E, K และ P

แมลงวันผลไม้บางชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มาจากประชากรธรรมชาติหลายปีแล้วและเก็บไว้ในตู้เก็บแมลงอย่างดีเพื่อใช้ในการศึกษาด้านสัณฐานวิทยา โดยใช้ *Bactrocera tau* (Walker) จากกลุ่มอื่นที่ห่างไกลกันตามสายวิวัฒนาการเป็นชนิดนอกกลุ่ม (outgroup species) เพื่อการเปรียบเทียบตัวอย่างปีกแมลงวันผลไม้ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มาจากหนอนที่เก็บมาจากประชากรธรรมชาติ (ตารางที่ 4.1) แล้วนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเจริญเป็นตัวเต็มวัยและจำแนกสปีชีส์ได้ชัดเจนแล้วโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์

นำแมลงที่จำแนกสปีชีส์ชัดเจนแล้วมาแยกปีกออกจากลำตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereomicroscope แล้ววางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและรักษาไว้โดยใช้ Canada Balsam ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (coverslip) จัดเก็บข้อมูลภาพปีกด้วยกล้องถ่ายภาพ (digital camera) ในรูปแบบของ JPEG (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) และแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบของ BitMaP จากนั้นก็ทำการประมวลผลต่อจนสุดท้ายได้ความยาวของเส้นภายในปีกทั้งหมด 30 เส้น (ภาพที่ 4.3)

การศึกษานี้ใช้สถิติการวิเคราะห์การจำแนกประเภท (discriminant analysis) และการวิเคราะห์แบบขั้นตอน (stepwise analysis) ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติดังกล่าวทำให้ได้สมการที่ใช้ในการจำแนกชนิดระหว่างกลุ่ม *B. dorsalis* complex กับ *B. tau* ที่ให้ความถูกต้อง 100% คือ

$$Y = 2.76 X_1 + 9.85 X_2 - 16.74$$

โดยที่ X_1 = ความยาวเส้นภายในปีกเส้นที่ 2 หาด้วยความยาวเส้นภายในปีกเส้นที่ 22,

X_2 = ความยาวเส้นภายในปีกเส้นที่ 3 หาด้วยความยาวเส้นภายในปีกเส้นที่ 8

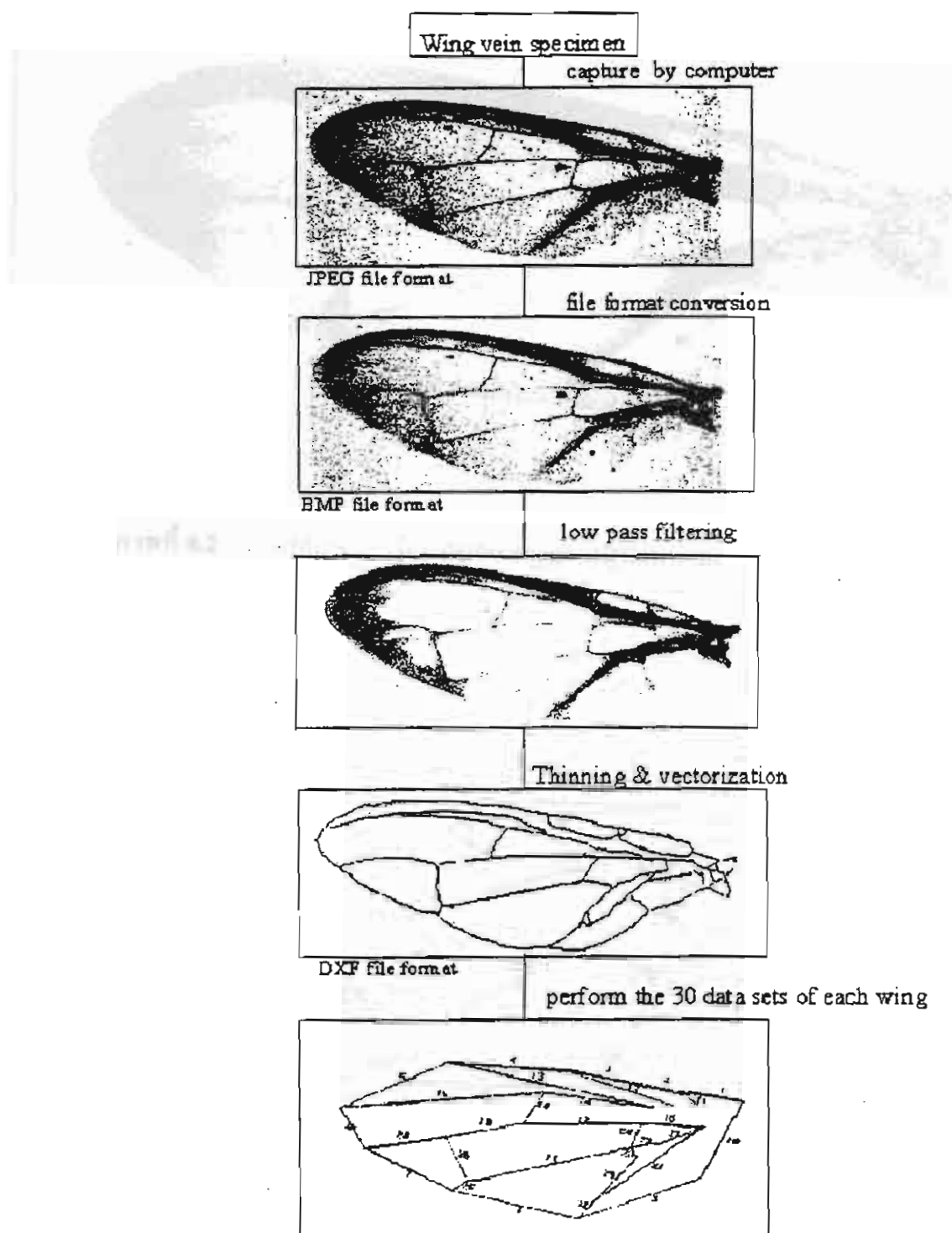
จากสมการ: ถ้า $Y < 0$ เป็น *B. dorsalis* complex

ถ้า $Y > 0$ เป็น *B. tau*

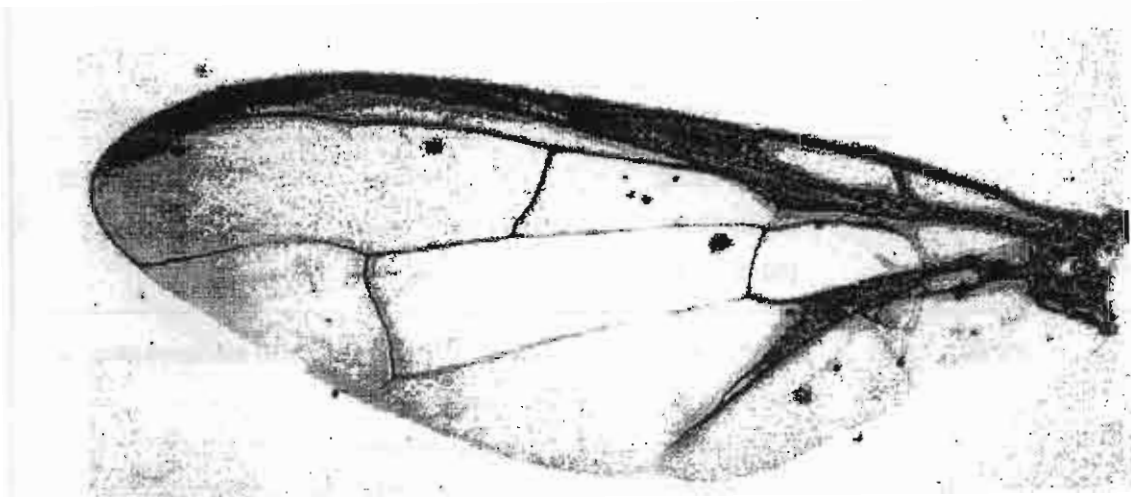
สำหรับการเปรียบเทียบระหว่าง *B. arecae* กับสปีชีส์ E, ระหว่าง *B. dorsalis* กับ *B. verbascifoliae*, ระหว่าง *B. pyrifoliae* กับ *B. propinqua* และระหว่างสปีชีส์ K กับ P มีดัชนีที่สามารถใช้ในการจำแนกได้ถูกต้อง 98.9%, 98.1%, 95.2% และ 84.6%, ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.2 สำหรับ *B. dorsalis* ที่เก็บมาจากภาคต่าง ๆ ทั้ง 4 ภาคของประเทศไทยที่ทำการศึกษาในเชิงการแปรผันตามสภาพภูมิประเทศได้ผลที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 ดังนั้น หลักการวิเคราะห์ลักษณะเส้นในปีกแมลงวันผลไม้ดังกล่าวนี้คงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ได้ นอกจากนั้นวิธีการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาของปีกแมลงที่แสดงไว้ในการศึกษานี้ยังมีความสะดวก รวดเร็ว และเป็นระบบมากกว่าวิธีการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้แบบดั้งเดิม วิธีการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่แสดงไว้เป็นต้นแบบนี้จะนำไปประยุกต์ใช้ได้ดีในทางปฏิบัติกับแมลงชนิดอื่น ๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและการแพทย์ในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียด้วยในอนาคต

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างของแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* complex จำนวน 8 ชนิด และ *B. tau* ที่เก็บมาจากระชากรธรรมชาติในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย (1 = North; 2 = Central; 3 = Northeast; 4 = South; 5 = West; 6 = East)

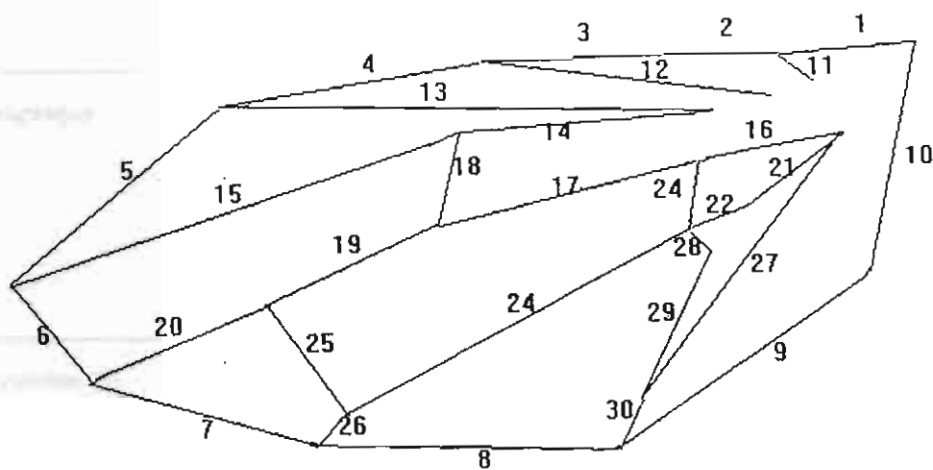
Species	Host plant species	Wings of females	Wings of males	Locality	Date of collection
<i>B. dorsalis</i>	<i>Syzygium malaccense</i>	21	29	Bangkok ²	10.10.1996
<i>B. dorsalis</i>	<i>Artocarpus chaplasha</i> Roxb.	24	26	Chiang Mai ¹	16.03.1995
	<i>Syzygium malaccense</i>			Chiang Rai ¹	12.02.1994
	<i>Citrus grandis</i>			Mae Hong Son ¹	22.12.1995
<i>B. dorsalis</i>	<i>Prunus persica</i>	20	30	Chachoengsao ²	06.10.1992
	<i>Psidium guajava</i>			Chanthaburi ⁶	20.03.1993
	<i>Psidium guajava</i>			Chanthaburi ⁶	22.03.1993
<i>B. dorsalis</i>	<i>Garcinia</i> sp.	28	22	Kanchanaburi ⁵	28.12.1992
	<i>Psidium guajava</i>			Kanchanaburi ⁵	26.12.1992
	<i>Terminalia catappa</i>			Kanchanaburi ⁵	25.12.1993
<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa</i>	29	21	Narathiwat ⁴	17.06.1994
	<i>Psidium guajava</i>			Phuket ⁴	18.01.1994
	<i>Psidium guajava</i>			Phuket ⁴	18.01.1994
	<i>Averrhoa carambola</i>			Phuket ⁴	19.01.1994
<i>B. arecae</i> (G)	<i>Areca catechu</i>	30	30	Surat Thani ⁴	05.03.1994
	<i>Areca catechu</i>			Surat Thani ⁴	04.03.1994
	<i>Areca catechu</i>			Narathiwat ⁴	17.06.1994
	<i>Areca catechu</i>			Songkhla ⁴	18.06.1994
<i>B. propinqua</i>	<i>Garcinia</i> sp.	27	25	Ranong ⁴	16.04.1996
<i>B. pyrifoliae</i> (F)	<i>Artocarpus chaplasha</i>	22	28	Chiang Mai ¹	23.11.1995
<i>B. verbascifoliae</i> (D)	<i>Solanum erianthum</i>	26	28	Surat Thani ⁴	05.03.1994
	<i>Solanum erianthum</i>			Narathiwat ⁴	17.06.1994
	<i>Solanum erianthum</i>			Songkhla ⁴	18.07.1994
B. anthocephala (E)	<i>Nauclea</i> sp.	19	10	Saraburi ²	05.10.1994
B. payena (K)	<i>Payena</i> sp.	21	29	Ranong ⁴	19.04.1996
B. nauclea (P)	<i>Nauclea brunnea</i>	9	13	Phangnga ⁴	14.08.1994
<i>B. tau</i>	<i>Trichosanthes cordata</i>	20	30	Ranong ⁴	23.11.1995
	<i>Cucurbita moschata</i>			Chiang Mai ¹	25.11.1995
	<i>Psidium guajava</i>			Phetchabun ²	22.01.1996



ภาพที่ 4.1 ขั้นตอนการทำและการวัดเส้นปีกของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex



ภาพที่ 4.2 ภาพปีกจากกล้อง digital image ในรูปแบบของ JPEG file format



ภาพที่ 4.3 แผนภาพแสดงเส้นต่าง ๆ ของปีกจำนวน 30 เส้นที่จะต้องวัดในปีกของแมลงกลุ่มซับซ้อน *B. dorsalis* complex