



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

พันธุศาสตร์เชิงประชากรของ (1) แมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
ที่สัมพันธ์กับ *Wolbachia* และ (2) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก
*Population Genetics of (1) Economically Important
Insects in Relation to Wolbachia, and (2) Amphibians*

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. วิสุทธิ์ ใบไม้ และคณะ

25 กันยายน 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “พันธุศาสตร์เชิงประชากรของ (1) แมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
ที่สัมพันธ์กับ *Wolbachia* และ (2) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก”

Population Genetics of (1) Economically Important
Insects in Relation to *Wolbachia*, and (2) Amphibians

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ศ.ดร.วิสุทธิ์ ใบไม้

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รศ.ดร.เจลิยว กุวังคะติลล

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รศ.ดร.เป็ทมากรณ์ กฤตยพงษ์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รศ.ดร.สังวรณ์ กิจทวี

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร.จอห์น มิลน์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ.ดร.ปรีชา ประเทพา

คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

อจ.ถาวร สุภาพรม

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณาจารย์และผู้ร่วมวิจัยในโครงการนี้ทุกท่านที่มีส่วนร่วมสร้างสรรค์บรรยากาศการวิจัยชีววิทยาพื้นฐานและผลิตผลงานวิชาการพื้นฐานด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงและสัตว์อื่นบางชนิดอย่างจริงจังและต่อเนื่อง รวมทั้งนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกคนที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางวิชาการในส่วนต่าง ๆ ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีตามเป้าประสงค์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.แสน ดิถวิพัฒน์ นันทน์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง น.ส.อัญชลี แซ่หลี่ และนายเจลา สำราญดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้และแมลงเบียน คุณศิริณี พูนไชยศรีและคณะ กรมวิชาการเกษตร และ Dr. Paul De Barro, CSIRO, ประเทศออสเตรเลีย ที่ช่วยจำแนกแมลง สัตว์ขาปล้อง และแมลงหี้น้ำ Prof. Hiroyuki Takaoka จากมหาวิทยาลัยแพทย์ Oita ประเทศญี่ปุ่น และ Dr. Don Colgan พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติออสเตรเลีย ประเทศออสเตรเลีย ที่ช่วยยืนยันสปีชีส์ของวันดำและการศึกษาด้านอนุพันธุศาสตร์ตามลำดับ ผศ.ดร.นฤมล แสงประดับ และ รศ.ดร.ชุติมา หาญจวนิช จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยแนะนำวิธีวิเคราะห์ข้อมูลคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี นายสิงโต บุญโรจน์พงศ์ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยเก็บตัวอย่างวันดำจากภาคใต้ อาจารย์จารุจินต์ นภิตะภักดิ์ อาจารย์ธัญญา จันอาจ และคุณยอดชาย ช่วยเงิน จากพิพิธภัณฑสถานชาติวิทยา องค์การพิพิธภัณฑสถานวิทยาาสตร์แห่งชาติ ที่ได้ช่วยตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุน “เมธีวิจัยอาวุโส สกว. (TRF Senior Research Scholar)” ปี 2542 (RTA 4280001) จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยได้ดำเนินการระหว่างเดือนมิถุนายน 2542 ถึงเดือนสิงหาคม 2545

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RTA4280001

ชื่อโครงการ: พันธุศาสตร์เชิงประชากรของ (1) แมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่สัมพันธ์กับ *Wolbachia* และ (2) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

ชื่อนักวิจัย: วิสุทธิ์ ไข่มไ้ม¹, เฉลียว กุวัจนะดิกล¹, ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์¹, สวรรณ กิจทวี¹,
จอห์น มิลน์¹, ปรีชา ประเทพา², ถาวร สุภาพรม³

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

²ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

³ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

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

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย: 1 มิถุนายน 2542 ถึง 30 สิงหาคม 2545

วัตถุประสงค์ ศึกษาโครงสร้างและสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในประชากรของริ้นดำ แมลงวันผลไม้, แมลงเบียนและ *Wolbachia* และความแตกต่างทางโครโมโซมของกบและคางคกในประเทศไทย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* และแมลงเบียน (parasitoids) จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย พบแมลงวันผลไม้หลายชนิดที่มีสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมชัดเจนโดยเฉพาะในกลุ่ม *B. dorsalis* และ *B. tau* complex บางชนิดเป็นศัตรูพืชทำความเสียหายให้กับไม้ผลและพืชป่าอย่างมาก และพบแมลงเบียนอย่างน้อย 6 ชนิดที่มีสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสอดคล้องกับข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา และโครโมโซมซึ่งจำแนกออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *Diachasmimorpha*, *Fopius* และ *Psytalia* การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 28S ribosomal RNA gene ได้ข้อมูลที่บ่งชี้ว่าแมลงเบียนชนิด *F. arisanus* เป็นสปิซิสซิมชันและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมตามสภาพภูมิศาสตร์ ข้อมูลพื้นฐานนี้มีประโยชน์สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงวันผลไม้หรือแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในจุลินทรีย์กลุ่ม *Wolbachia* กับแมลงวันผลไม้และแมลงเบียน โดยการหาลำดับเบสของยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มเปลือกนอกของจุลินทรีย์และยีนไซโตโครมออกซิเดส I พบว่าแมลงวันผลไม้มีจุลินทรีย์ชนิดนี้อาศัยอยู่ประมาณ 22% และบางชนิดมี *Wolbachia* มากถึง 5 สายพันธุ์ ในขณะที่แมลงเบียนทั้ง 6 ชนิดมี *Wolbachia* อาศัยอยู่ แต่เป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างไปจากพวกที่พบในแมลงวันผลไม้ การตรวจหา *Wolbachia* ในแมลงและสัตว์ขาปล้องจำนวน 62 ชนิดที่เก็บจากฟักทองและบวบหอมพบจุลินทรีย์นี้ใน 12 ชนิด ในจำนวนนี้มีแมลง 2 ชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการกินพืชอาศัยที่อาจเป็นทางถ่ายทอดเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างแมลง 2 ชนิดนี้ การตรวจหา *Wolbachia* โดยใช้วิธีการ PCR ของ

ftsZ gene ในแมลง 4 ชนิด เป็นประจำทุกเดือนพบว่าการติดเชื้อจุลินทรีย์ในแมลงแต่ละชนิดมีรูปแบบที่แตกต่างกันชัดเจน ผลกระทบในการสืบพันธุ์จากการติดเชื้อ *Wolbachia* 3 รูปแบบ คือ thelytokous parthenogenesis, cytoplasmic incompatibility และ fecundity enhancement ไม่ปรากฏชัดเจนในแมลงเบียนชนิด *D. longicaudata* ที่ติดเชื้อ *Wolbachia*

แมลงริ้นดำในประเทศไทยมีมากกว่า 42 ชนิด มีสปีชีส์ใหม่ 6 ชนิด ริ้นดำเหล่านี้แพร่กระจายในภูมิภาคต่างๆ ตามแหล่งน้ำไหลและน้ำตกและมีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำและสิ่งแวดล้อม การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์และดีเอ็นเอตรงบริเวณ ITS2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอสามารถแยกชนิดของริ้นดำได้ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วมากกว่าการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ลำดับเบสของยีนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (COI, ND4, 16S) และนิวเคลียร์ยีนไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (28SD2) ทำให้ทราบสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามสายวิวัฒนาการของริ้นดำกลุ่มต่างๆ ได้ชัดเจน ข้อมูลด้านนิเวศวิทยาเชิงโมเลกุล (molecular ecology) จะช่วยให้ความรู้และความเข้าใจในการปรับตัวของริ้นดำในระบบนิเวศต่างๆ ซึ่งจะช่วยเป็นแนวทางในการหามาตรการควบคุมริ้นดำได้ในประชากรธรรมชาติ

การศึกษาไมโททิกคาริโอไทป์ของกบและคางคกรวม 37 ชนิด พบว่ามีคาริโอไทป์แตกต่างกันทั้งในจำนวนโครโมโซม ขนาดและรูปร่างของโครโมโซม และโครโมโซม 5 คู่แรกมีขนาดใหญ่ ส่วนคู่อื่นๆ มีขนาดเล็กและมีรูปร่างแตกต่างกัน และพบ chromosome marker ที่ชัดเจนด้วย โครงสร้างทางพันธุกรรมของสัตว์กลุ่มนี้ยังคงมีลักษณะอนุรักษ์สูง โดยเฉพาะในพวก อึ่งกราย และคางคก

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ผลจากการศึกษานี้ทำให้เราเข้าใจความหลากหลายทางชีวภาพที่เกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการร่วม (coevolution) ระหว่างแมลงวันผลไม้ แมลงเบียน และ *Wolbachia* รวมทั้งสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มริ้นดำ ความรู้พื้นฐานนี้จะช่วยในการศึกษาเจาะลึกชีววิทยาระดับโมเลกุลและนิเวศวิทยาของแมลงและจุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและแมลงพาหะได้ในอนาคต สำหรับการศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกให้ลึกลงไปในด้านชีววิทยาเชิงประชากรและพลวัตของประชากรก็จะทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการติดตามตรวจสอบสภาพแวดล้อมและคุณภาพน้ำในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

Project Code: RTA4280001

Project Title: Population Genetics of (1) Economically Important Insects in Relation to *Wolbachia*, and (2) Amphibians

Investigators: Visut Baimai¹, Chaliow Kuvangkadilok¹, Pattamaporn Kittayapong¹, Sangvorn Kitthawee¹, John Milne¹, Preecha Prathepha², Thavorn Supaprom³

¹Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, ²Biotechnology Department, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Muang District, Mahasarakham, ³Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Warin-Dejudom Road, Warinchamrap, Ubon Ratchathani

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

Project Period: 1 June 1998 - 30 August 2002

Objectives: To study the population genetics and evolutionary relationships of blackflies, tephritid fruit flies, tephritid parasitoids and the reproduction-modifying bacteria of insects, *Wolbachia*. To investigate chromosomal differences and determine chromosomal markers for frogs and toads of Thailand.

Methodology and Results:

Tephritid fruit flies of the genus *Bactrocera* and their parasitoids were sampled from several locations in Thailand. Distinct genetic differences were found among tephritid fruit flies, especially among those in the two species complexes, *B. dorsalis* and *B. tau*, of which some species cause severe damage to economic as well as wild fruits. There was concordance among genetic, morphological and chromosomal methods in the separation of tephritid fruit fly parasitoids into 3 groups, i.e., *Diachasmimorpha*, *Fopius*, and *Psytalia*. Differences in nucleotide sequence data of the 16S and 28S ribosomal RNA genes in *F. arisanus* parasitoids from different geographical areas indicated that this parasitoid taxon forms a species complex.

A phylogenetic study of the endosymbiotic bacteria, *Wolbachia*, in tephritid fruit fly and parasitoid hosts was conducted using the *Wolbachia* outer surface protein gene. Approximately, 22% of surveyed tephritid fruit fly species were infected with *Wolbachia*. Individual flies of some species were infected with as much as 5 *Wolbachia* strains. Six fruit fly parasitoid species were found infected with *Wolbachia*. *Wolbachia* strains found in parasitoids were different to those

found in their fruit fly hosts. A PCR-based survey based on the *Wolbachia* *ftsZ* cell cycle gene detected *Wolbachia* in 12 of 62 arthropod species from pumpkin and loofah plants. Two of the 12 infected species had a feeding relationship that is a potential route for *Wolbachia* horizontal transmission between the two species. Monthly *Wolbachia* prevalence within populations of 4 insect species showed very different patterns depending on the insect species. The three reported reproductive effects of *Wolbachia* infection on parasitoid wasps, that of thelytokous parthenogenesis, cytoplasmic incompatibility and fecundity enhancement, were not found in the *Wolbachia*-infected parasitoid *D. longicaudata*.

Over 42 species of black flies, including 6 new species, were found in Thailand during this study. In relation to water and environmental quality, such black flies have been found widely distributed in streams and waterfalls in several regions of Thailand. We found that cytological methods and nucleotide sequence methods based on ITS2, ribosomal DNA, were faster and more precise techniques for black fly identification than morphological methods. Nucleotide sequences of mitochondrial DNA (COI, ND4, 16S) and nuclear ribosomal DNA (28SD2) clarified phylogenetic relationships among black fly species. Moreover, molecular ecological data may allow a better understanding of black fly adaptations in several habitats. Such knowledge might be useful for developing strategies for the future control of black fly populations in their natural habitats.

Mitotic studies of 37 amphibian species revealed differences in sizes and shapes of chromosomes. The first 5 chromosome pairs were found to be larger than other chromosome pairs. Several chromosomal markers that can be used to distinguish species were found. Genetic structure within these amphibians was found to be highly conserved.

Suggestions

Our findings provide a better understanding of the biological diversity, which has resulted from coevolutionary processes, of fruit flies, parasitoids and *Wolbachia*. In addition, our study has clarified phylogenetic relations among black flies. Such knowledge sets the basis for future detailed study of the molecular biology and ecology of these organisms. It also benefits the development of future measures for the control of these insect pests and vectors. Likewise, further study of the population biology and population dynamics of amphibians will provide fundamental knowledge for the effective monitoring of water quality and the environment in Thailand.

นี้มีเพียงแมลงหวี่ขาว (whitefly) ชนิด *Bemisia tabaci* ที่ติดเชื้อมากและสม่ำเสมอ จึงเชื่อว่า *Wolbachia* น่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสืบพันธุ์ของแมลงกลุ่มนี้หรืออย่างน้อยก็ช่วยควบคุมแมลงหวี่ขาวในประชากรธรรมชาติได้ ส่วนในแมลงอีก 3 ชนิดนั้นบทบาทของ *Wolbachia* อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามผลกระทบของการติดเชื้อ *Wolbachia* ที่มีต่อการสืบพันธุ์ของแมลงเบียน *D. longicaudata* ไม่ปรากฏชัดเจนนัก การศึกษาขั้นต่อไปในด้านที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ของแมลงเบียนอาจช่วยให้ทราบผลกระทบแบบใหม่ของ *Wolbachia* ที่มีต่อแมลงเบียน *D. longicaudata* ได้

แมลงวันดำ (*Simulium*) ตัวเมียมีความสำคัญทางการแพทย์และเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นอันตรายต่อคนและสัตว์โดยเป็นพาหะสำคัญของพยาธิชนิด *Onchocerca volvulus* แต่การศึกษาเกี่ยวกับสปีชีส์และการกระจายของวันดำยังมีน้อยมากในประเทศไทย ในโครงการวิจัยนี้ใช้วิธีวิเคราะห์ทางด้านสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนและดักแด้พบวันดำอย่างน้อย 42 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นสปีชีส์ใหม่ 6 ชนิด แพร่กระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆ โดยเฉพาะในภาคเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย วันดำบางชนิดมีแหล่งเพาะพันธุ์จำเพาะในที่ใดที่หนึ่งเท่านั้น โดยมีการแพร่กระจายที่สัมพันธ์กับความสูงและตัวแปรของสิ่งแวดล้อมทางด้านกายภาพและทางเคมี เช่น อุณหภูมิของน้ำ และความกระด้างของน้ำ การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของตัวอ่อนวันดำจำนวน 18 ชนิด พบว่ามีโครโมโซม 3 คู่ ($2n=6$) และแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ในโพลีทินโครโมโซมเป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้วินิจฉัยเพื่อแยกชนิดที่เคลือบแฝง (cryptic species) ของวันดำได้ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเครื่องหมายทางโมเลกุลโดยวิธี allele-specific PCR (ASPCR) ตรงบริเวณ ITS2 ของไรโบโซมดีเอ็นเอ (rDNA) และยังสามารถศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 28SD2 กับ ITS2 และ ND3 subunit ของ NADH dehydrogenase, COI subunit ของ cytochrome oxidase และ large ribosomal subunit (16S) ของ mtDNA เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างวันดำชนิดต่างๆ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการ Maximum Parsimony และ Neighbor-Joining

การวิเคราะห์โครโมโซมของตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยได้จำนวน 37 ชนิด จำแนกออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ 1) อึ่งกราย (megophryid frogs) 5 ชนิด, 2) คางคก (bufonid frogs) 5 ชนิด, 3) กบเขียด (ranid frogs) 17 ชนิด, 4) ปาด (tree frogs) 2 ชนิด, 5) อึ่ง (microhylid frogs) 8 ชนิด ในจำนวนนี้มีคาริโอไทป์ ($2n$) 4 กลุ่ม คือ 22, 24, 26 และ 28 การศึกษาโครโมโซมอย่างละเอียดทั้งหมด 33 ชนิด พบว่ามีความผันแปรในขนาด รูปร่าง และตำแหน่งของ chromosome marker ในแต่ละชนิด โครโมโซมคู่ที่ 1-5 ส่วนมากมีขนาดใหญ่และมีลักษณะอนุรักษ์ทางด้านรูปร่างค่อนข้างสูง (highly conservative) ส่วนโครโมโซมคู่อื่นๆ มีขนาดเล็กและมีรูปร่างแตกต่างกันออกไป และพบ chromosome marker ที่มีความจำเพาะในแต่ละชนิดในรูปแบบ secondary constriction หรือโครงสร้างพิเศษ เช่น ปุ่มยื่น (knob-like) ทั้งในกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่และขนาดเล็ก โครงสร้างทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยยังอยู่ในสภาพอนุรักษ์สูงมาก โดยเฉพาะในพวกอึ่งกรายและคางคก นอกจากนี้ยังพบความผันแปรของโครโมโซมภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) ในประชากรธรรมชาติด้วย

Executive Summary

Fruit flies of the genus *Bactrocera* are of major importance to the Oriental area because of their impact on agriculture. Classical biological control using parasitoids provides an important means for protecting fruit crops in other parts of the world and may also do so for this region. In this study, six parasitoid species, all with potential as fruit fly biological control agents, were collected and identified. Mitotic karyotypes and morphological data have confirmed the existence in Thailand of the 3 genera: (1) *Diachasmimorpha* (*D. longicaudata* and *D. dacusii*), (2) *Fopius* (*F. arisanus* and *F. vandenboschi*), and (3) *Psytalia* (*P. fletcheri* and *P. incisi*). A molecular approach was developed to study the phylogenetic relationships and biosystematics of these parasitoids. Sequence analysis of the 16S and 28S ribosomal RNA genes revealed that *F. arisanus* consists of 2 allopatric subspecies (northern and central subspecies). Internal transcribed spacer (ITS) regions were investigated for their utility in distinguishing species and for determining phylogenetic relationships among these closely related species.

Studies of the evolutionary relationships between *Wolbachia* and two types of host, i.e., tephritid fruit flies and tephritid fruit fly parasitoids, were conducted by sequencing the *Wolbachia* outer surface membrane gene and the host insect cytochrome oxidase subunit I gene. From our studies, 22% of tephritid fruit fly species and all tested parasitoid species were infected with *Wolbachia*. Most tephritid flies had one *Wolbachia* strain but some individuals had two strains and others harbored five strains. There is, thus, the possibility to modify and use more than one *Wolbachia* strain for controlling economic insects. *Wolbachia* strains in parasitoids differed from those found in their fruit fly hosts. Moreover, *Wolbachia* infections were found in insects reared from some host fruits from certain areas but not in insects from other fruits and areas. This suggests that these bacterial endosymbionts might be specific not only to their host insects but also to the plants on which the insect hosts develop. The influence of host plants on the coevolution of *Wolbachia* with their host insects would be an interesting area for future research. DNA sequence data showed that individuals of the same host insect species were infected with the same *Wolbachia* strain whereas different *Wolbachia* strains were observed in different host insect species. This is suggestive of an important role for *Wolbachia* in the speciation of tephritid fruit flies and their parasitoids.

Wolbachia was also surveyed and found to be widely distributed (12 of 62 tested species) in arthropods of loofah and pumpkin plants. Only two of the infected species had a direct feeding

relationship through which *Wolbachia* could possibly be transmitted, i.e., the parasitoid *D. longicaudata*, which fed on the tephritid fruit fly, *B. tau*. Patterns of monthly *Wolbachia* prevalences in populations of 4 insect species differed markedly depending on the insect species. Only *Wolbachia* prevalence in one species, the whitefly, *Bemisia tabaci*, was high and stable. *Wolbachia* could, therefore, possibly have a role in speciation or pest control within populations of this whitefly species. In the other 3 species, a *Wolbachia* role may depend on the factors that influence *Wolbachia* prevalence. The reported effects of *Wolbachia* infection on parasitoid wasp reproduction were not evident in *Wolbachia*-infected *D. longicaudata*. Investigations of other aspects of this parasitoid's reproduction may reveal the effects of *Wolbachia* on *D. longicaudata*.

Female black flies are important insect pests of humans and animals because of their roles as vectors of filarial nematodes (*Onchocerca volvulus*). Yet, very little is known about the species present in Thailand or their distributions. On the basis of external larval and pupal morphological characters, a total of 42 *Simulium* species, including 6 new species, were collected from various localities in Thailand. Most *Simulium* species occurred in northern and southern Thailand. The distribution of some species was restricted to certain localities apparently in relation to altitude and to physico-chemical parameters such as water temperature and hardness. Eighteen *Simulium* species within 4 subgenera had 3 pairs of chromosomes ($2n=6$). The polytene chromosome banding patterns of these species were species-specific, thus indicating that these chromosomes can be used for identifying cryptic species within black fly taxa. A molecular marker based on allele-specific PCR (ASPCR) of the ITS2 region of ribosomal DNA (rDNA) was developed for species identification. This identification method is rapid, reliable and extremely sensitive. Moreover, sequences of the 28SD2 and ITS2 genes, the ND3 subunit of NADH dehydrogenase, the COI subunit of cytochrome oxidase and the large ribosomal subunit (16S) of mtDNA were compared in order to assess interspecific relationships. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using the Maximum Parsimony and Neighbor-Joining methods.

Chromosome analysis of 37 anuran frog species from Thailand was conducted. These species were classified into 5 groups: 1) 5 species of megophryid frogs; 2) 5 species of bufonid frogs; 3) 17 species of ranid frogs; 4) 2 species of tree frogs; and 5) 8 species of microhylid frogs. There were 4 karyotype groups ($2n$): 22, 24, 26 and 28. Detailed study of metaphase chromosomes of 33 species showed variation in size, shape and position of chromosome markers. Chromosome nos. 1-5 were mostly large in size and appeared to be highly conserved. The

remaining mitotic chromosomes were relatively small and variable in size. Species-specific chromosome markers were determined and included secondary constrictions or special structures, such as knob-like projections, on both large and small chromosomes. The genetic structure of anuran amphibians at the chromosome level was found to be highly conserved, especially in megophryid and bufonid frogs. Moreover, intraspecific variation in chromosome structure was observed in some species.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(ก)
บทคัดย่อไทย	(ข)
บทคัดย่ออังกฤษ	(ง)
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	(ฉ)
Executive Summary	(ช)
สารบัญตาราง	(ฎ)
สารบัญภาพ	(จ)
1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยในภาพรวม	1
2 วัตถุประสงค์โครงการโดยรวม	10
3 วิวัฒนาการร่วมระหว่างแมลงเบียน แมลงวันผลไม้ และจุลินทรีย์ <i>Wolbachia</i>	11
3.1 แมลงเบียน	11
3.2 จุลินทรีย์ <i>Wolbachia</i>	26
3.3 การกระจายตัว ความถี่ในการพบและผลกระทบของ จุลินทรีย์ <i>Wolbachia</i> ต่อสัตว์ขาปล้องที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ	57
4 การแพร่กระจาย สัตฐานวิทยา นิเวศวิทยา เซลล์พันธุศาสตร์และอณูพันธุศาสตร์ ของแมลงวันด้า	80
5 การศึกษาพันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	119
6 รายชื่อคณะผู้ร่วมวิจัย	163
7 ผลงานตีพิมพ์	166

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1.1 ผลการสำรวจเก็บตัวอย่างแมลงเบียนและแมลงวันผลไม้	13
3.1.2 ค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm SD$) ของแมลงวันผลไม้ที่ถูกโจมตีโดยแมลงเบียนชนิด <i>S. endius</i> ที่ความหนาแน่นต่างๆ ของแมลงวันผลไม้	22
3.2.1 แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	28
3.2.2 แสดงสปีชีส์ของแมลงวันผลไม้ <i>Bactrocera</i> ที่ใช้ในการศึกษา	29
3.2.3 แสดงผลการตรวจหาจุลินทรีย์ <i>Wolbachia</i> ในแมลงวันผลไม้โดยเทคนิค PCR	31
3.2.4 แสดงผลการตรวจหาจุลินทรีย์ <i>Wolbachia</i> ในแมลงเบียนโดยเทคนิค PCR	35
3.2.5 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน <i>B. dorsalis</i>	41
3.2.6 แสดงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ <i>B. dorsalis</i>	41
3.2.7 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน <i>B. tau</i>	44
3.2.8 แสดงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ <i>B. tau</i>	45
3.2.9 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้จีนัส <i>Bactrocera</i>	46
3.2.10 แสดงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้จีนัส <i>Bactrocera</i>	47
3.3.1 การกระจายตัวของการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ในสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับฟักทอง โดยตัวอย่างของสัตว์ขาปล้องทำการสกัด DNA ด้วยวิธีของ O'Neill et al. (1992) ยกเว้นบางชนิดที่มีเครื่องหมายดอกจันจะทำการสกัด DNA ด้วยวิธีที่เรียกว่า phenol-chloroform extraction ขึ้นส่วนของ DNA ขึ้นกับขนาดของตัวอย่าง (A = whole inside abdomen B = whole abdomen C = whole individual)	65
3.3.2 การกระจายตัวของการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ในสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับบวบหอม โดยตัวอย่างของสัตว์ขาปล้องทำการสกัด DNA ด้วยวิธีของ O'Neill et al. (1992) ขึ้นส่วนของ DNA ขึ้นกับขนาดของตัวอย่าง (A = whole inside abdomen B = whole abdomen C = whole individual)	69

สารบัญญัตินี้ (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.3.3	ชนิดของแมลงที่มีการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ทดสอบโดยเทคนิค PCR และตรวจสอบการติดเชื้อ โดยการหาลำดับเบส โดยใช้ไพรเมอร์ <i>wsp</i> ; พืชอาศัย : ✓ = มีแมลงชนิดนั้น, ✕ = ไม่มีแมลงชนิดนั้น; วิธีการตรวจสอบ : ✓ = ได้รับการตรวจสอบ, ✕ = ไม่ได้ตรวจสอบ)	70
3.3.4	จำนวนและอัตราการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ในแต่ละอันดับของสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับ ฟักทองและบวบหอม	70
3.3.5	ลูกเพศผู้และเพศเมียของแตนเบียนแมลงวันผลไม้ <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	72
3.3.6	ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของแตนเบียนกับโอกาสในการผสมพันธุ์	73
3.3.7	จำนวนและอัตราส่วนเพศของลูกที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเบียน <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> เพศผู้และเพศเมียที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ <i>Wolbachia</i>	73
3.3.8	ความสัมพันธ์ทางด้านการกินของสัตว์ขาปล้องที่ติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ที่มีความสัมพันธ์กับฟักทอง และบวบหอม	75
4.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มดีเอ็นเอและหาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ และไรโบโซมัลดีเอ็นเอ	87
4.2	องค์ประกอบ PCR และโปรแกรมอุณหภูมิของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและไรโบโซมัลดีเอ็นเอ	87
4.3	การแพร่กระจายของตัวอ่อนริ้นดำในเขตภาคใต้ของประเทศไทย	89
4.4	เปอร์เซ็นต์ความยาวของแขนโครโมโซม (±SD) และจำนวนส่วนย่อยที่แบ่งในแต่ละแขน โครโมโซมของแมลงริ้นดำใน Subgenera <i>Gomphostilbia</i> Enderlein และ <i>Simulium</i> Latreille	99
4.5	แสดงความยาว และเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงริ้นดำใน กลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> Enderlein	104
4.6	เปรียบเทียบความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่างแมลง ริ้นดำในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> Enderlein	108
5.1	หลักการจำแนกรูปร่างโครโมโซมโดยอาศัย CR และ/หรือ CI เพื่อกำหนดตำแหน่งของ เซนโตรเมียร์บนโครโมโซม (Green and Sessions, 1991)	124
5.2	ชื่อ จำนวนที่เก็บ และสถานที่เก็บของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่สำรวจพบในการศึกษครั้งนี้มี ทั้งหมด 42 ชนิด	130
5.3	จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ chromosome marker และคาริโอไทป์ ของสัตว์สะเทินน้ำ สะเทินบก จำนวน 33 ชนิด (p=short arm; q=long arm; sat=satellite; ter=terminal; cen=centromere)	132

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 การสูญพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรซึ่งจะหาข้อมูลได้จากการศึกษาชีววิทยาเชิงโมเลกุลและชีววิทยาเชิงประชากร โดยเฉพาะการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์เชิงประชากร	2
1.2 แสดงบทบาทและความสัมพันธ์ของการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรกับการใช้ประโยชน์ทางวิชาการพื้นฐานด้านวิวัฒนาการ และการประยุกต์ใช้ในด้านการจัดการอนุรักษ์ การเกษตร และการแพทย์	4
3.1.1 RAPD band ของแมลงเบียน 6 ตัวในกลุ่ม <i>Fopius</i>	16
3.1.2 แสดงแถบ DNA ขนาด 250 bp (16S rDNA), 500 bp (28S rDNA) และ 1 Kb (marker)	16
3.1.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S ในแมลงเบียน	17
3.1.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 28S ในแมลงเบียน	18
3.1.5 แสดง cladogram ของแมลงเบียนที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S	19
3.1.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแมลงเบียนกับประสิทธิภาพในการค้นหาโฮสต์ (area of discovery)	22
3.2.1 แสดงลำดับดีเอ็นเอของสายพันธุ์ <i>Wolbachia</i> ที่พบในแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย	37
3.2.2 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของ <i>Wolbachia</i> สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในแมลงวันผลไม้	40
3.2.3 (A) แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน <i>B. dorsalis</i> โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining (B) รูปแบบต้นไม้เดิมเมื่อโยงถึงวิวัฒนาการที่มีค่า bootstrap support น้อยกว่า 50	42
3.2.4 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน <i>B. dorsalis</i> โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Maximum Parsimony	42
3.2.5 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน <i>B. dorsalis</i> โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Maximum Likelihood	42
3.2.6 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน <i>B. tau</i> โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining	44
3.2.7 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน <i>B. tau</i> โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Maximum Parsimony (A) และ Maximum Likelihood (B)	45
3.2.8 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้จิ้งนัส <i>Bactrocera</i> โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining	46
3.2.9 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแมลงวันผลไม้และแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i>	47
3.2.10 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของ <i>Wolbachia</i> สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในแมลงเบียน	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.2.11	แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงเบียนโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I คำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining	50
3.2.12	แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแมลงเบียนและแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i>	53
3.3.1	ความคาดหวังเมื่อเกิดความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมโดยสมบูรณ์ (Complete cytoplasmic incompatibility) ในแมลงเบียน <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	64
3.3.2	ความถี่ในการพบจุลินทรีย์ <i>Wolbachia</i> ในประชากรของแมลง 4 ชนิด	71
4.1	แผนภาพแสดงการกระจายของตัวอ่อนวันดำสปีชีส์ต่างๆ ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย	88
4.2	a) การจัดอันดับน้ำตกโดยใช้ Semi-Strong Hybrid Multidimensional Scaling (SSH) โดยใช้ข้อมูล การกระจายของตัวอ่อนวันดำ (Stress 0.098) b) ความสัมพันธ์ของสปีชีส์ของตัวอ่อนวันดำกับน้ำตก ต่างๆ โดยวิธี Principle Axis Correlation	94
4.3	แสดงการจัดกลุ่มของน้ำตกในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งโดยใช้ข้อมูลการกระจายของตัวอ่อนวันดำ โดยวิธี Gower Metric และ Classification แบบ FUSE Flexible-Beta (Belbin, 1995) ซึ่งสอดคล้อง กับวิธี SSH ในภาพที่ 2a	95
4.4	a) การจัดอันดับน้ำตกโดยใช้ Semi-Strong Hybrid Multidimensional Scaling (SSH) โดยใช้ค่า คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี (Stress 0.058) b) ความสัมพันธ์ของตัวแปรคุณภาพน้ำทางกาย ภาพและเคมีกับน้ำตกต่างๆ โดยวิธี Principal Axis Correlation	96
4.5	แสดงการจัดกลุ่มของน้ำตกในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งโดยใช้ค่าคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี โดยวิธี Gower Metric และ Classification แบบ FUSE Flexible-Beta (Belbin, 1995) ซึ่งสอดคล้อง กับวิธี SSH ในภาพที่ 3a	97
4.6	แผนที่มาตรฐานแสดงแบบแผนของแบนด์ของโพลีทินโครโมโซมของวันดำสปีชีส์ <i>Simulium nobile</i> . C = centromere; NO = nucleolar organizer; BR = Ring of Balbiani; db = double bubble	100
4.7	แผนที่มาตรฐานแสดงแบบแผนของแบนด์ของโพลีทินโครโมโซมของวันดำสปีชีส์ <i>Simulium nodosum</i> พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งและจุดแยกของอินเวอร์ชันบนแขน IIL และ IIIL. C=centromere; NO=nucleolar organizer; BR=Ring of Balbiani; db=double bubble	100
4.8	แผนที่มาตรฐานแสดงแบบแผนของแบนด์ของโพลีทินโครโมโซมของวันดำสปีชีส์ <i>Simulium asakoe</i> พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งและจุดแยกของอินเวอร์ชันบนแขน IL, IIL และ IIIL. C = centromere; NO = nucleolar organizer; BR = Ring of Balbiani; db = double bubble	101
4.9	โพลีทินโครโมโซมของวันดำสปีชีส์ <i>Simulium nodosum</i> ที่เซนโทรเมียร์มารวมกันฟอร์มเป็นซูโดโคร โมเซนเตอร์ (a), เฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชันแบบ IIL-st/1 (b) และ IIL-st/1 (c) ในประชากรวันดำ <i>S. nodosum</i> ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์	101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.10	แสดงแบนด์ที่มีลักษณะเหมือนกันบนโครโมโซม IIS และ IIIS ของริ้นดำในสกุลย่อย <i>Simulium</i> จำนวน 8 สปีชีส์ ดังนี้ <i>Simulium chainarongi</i> (a), <i>S. nobile</i> (b), <i>S. nodosum</i> (c), <i>S. tani</i> (d), <i>S. Chiangmaiense</i> (e), <i>S. quinquestriatum</i> (f) และ <i>S. rudnicki</i> (g) ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์ เส้นประแสดงขอบเขตของแบนด์ที่มีลักษณะเหมือนกัน	102
4.11	ภาพแสดงเฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชันที่พบในประชากรของริ้นดำสปีชีส์ <i>Simulium asakoe</i> (a). IL-st/1. (b). IIL-st/1 and (c). IIIL-st/1. <i>S. decuplum</i> (d). IIL-st/1. <i>S. angulistylum</i> (e). IIL-st/1 and (f). IIIL-st/1. and <i>S. siamense</i> (g). IS-st/1. (h). IL-st/1 and (i). IIL-st/1. ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์	103
4.12	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงริ้นดำในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> Enderlein จำนวน 8 สปีชีส์ โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.81 (Thompson et al., 1997)	107
4.13	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มต่างๆ ของแมลงริ้นดำในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 โดยวิธี Neighbor-Joining ของโปรแกรม MEGA (version 2.1) (1,000 bootstraps replication) โดยมี <i>Simulium exiguum</i> เป็น outgroup species	110
4.14	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> และ <i>Simulium</i> วิเคราะห์จากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28SD2 โดยวิธี Maximum Parsimony ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b1) โดยมี <i>Simulium exiguum</i> เป็น outgroup species	110
4.15	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> และ <i>Simulium</i> วิเคราะห์จากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI โดยวิธี Maximum Parsimony ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b1) โดยมี <i>Simulium exiguum</i> เป็น outgroup species	110
4.16	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> และ <i>Simulium</i> วิเคราะห์จากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ND4 โดยวิธี Maximum Parsimony ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b1) โดยมี <i>Simulium exiguum</i> เป็น outgroup species	111
4.17	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> และ <i>Simulium</i> วิเคราะห์จากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยวิธี Maximum Parsimony ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b1) โดยมี <i>Simulium exiguum</i> เป็น outgroup species	111
5.1	สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ทำการศึกษทั้งหมด 41 ชนิด *ไม่มีภาพของกบน้ำเค็ม (<i>F. cancrivora</i>)	126
5.2	คาริโอไทป์ของอึ่งกราย 4 ชนิด a) อึ่งกรายลายเลอะ (<i>L. smithi</i>) เพศเมีย b) อึ่งกรายหัวเล็ก (<i>X. parva</i>) เพศเมีย c) อึ่งกรายข้างแถบ (<i>B. carinensis</i>) เพศผู้ d) อึ่งกรายหัวแหลม (<i>M. nasuta</i>) เพศผู้ ลูกศรชี้ตำแหน่งรอยคอด secondary constriction (กำลังขยาย 5000 เท่า)	137

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
5.3	การโอไทป์ของคางคก 4 ชนิด a) คางคกบ้าน (<i>B. melanostictus</i>) เพศผู้ b) คางคกแคระ (<i>B. parvus</i>) เพศผู้ c) จงโคร่ง (<i>B. asper</i>) เพศเมีย d) คางคกขายาว (<i>L. borbonica</i>) เพศเมีย ลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง satellite ในคางคกบ้าน (กำลังขยาย 5000 เท่า)	138
5.4	การโอไทป์ของกบ 15 ชนิด a) เขียดจระนา (<i>O. lima</i>) เพศเมีย b) เขียดหลังป้อม (<i>O. martensii</i>) เพศเมีย c) กบหลังไหล (<i>R. lateralis</i>) เพศเมีย d) กบบัว (<i>R. erythraea</i>) เพศผู้ e) กบหลังขีด (<i>R. macrodactyla</i>) เพศเมีย f) กบชะง่อนหินเมืองเหนือ (<i>R. livida</i>) เพศเมีย g) กบอ่อง (<i>R. nigrovittata</i>) เพศผู้ h) กบนา (<i>H. rugulosus</i>) เพศผู้ i) กบอกหนาม (<i>P. fasciculispina</i>) เพศผู้ j) เขียดอีโม้หิน (<i>F. limnocharis</i>) เพศเมีย k) กบหนอง (<i>L. limnocharis</i>) เพศเมีย l) กบหงอน (<i>L. pileatus</i>) เพศเมีย m) กบเกาะช้าง (<i>L. kohchangae</i>) เพศผู้ n) กบภูเขา (<i>L. blythii</i>) เพศเมีย o) กบหัวขานป้อม (<i>L. kuhlii</i>) (กำลังขยาย 5000 เท่า)	139
5.5	การโอไทป์ของปาด 2 ชนิด a) ปาดตีนเหลืองอีสาน (<i>R. orlovi</i>) เพศเมีย b) ปาดบ้าน (<i>R. leucomystax</i>) เพศเมีย ลูกศรชี้ตำแหน่งรอยคอด secondary constriction (กำลังขยาย 5000 เท่า)	140
5.6	การโอไทป์ของอึ่ง 8 ชนิด a) อึ่งอ่างกันขีด (<i>K. melanostictus</i>) เพศผู้ b) อึ่งอ่างบ้าน (<i>K. pulchra</i>) เพศเมีย c) อึ่งป้อม (<i>K. pleurostigma</i>) เพศเมีย d) อึ่งลาย (<i>C. guttulata</i>) เพศเมีย e) อึ่งอ่างปากขวด (<i>G. molossus</i>) เพศเมีย f) อึ่งขาคำ (<i>M. pulchra</i>) เพศเมีย g) อึ่งแม่หนาว (<i>M. berdmorei</i>) เพศผู้ h) อึ่งลายแต้ม (<i>M. butleri</i>) เพศผู้ ลูกศรชี้ตำแหน่งรอยคอด secondary constriction (กำลังขยาย 5000 เท่า)	142
5.7	G-banded karyotypes ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 6 ชนิด a) คางคกบ้าน (<i>B. melanostictus</i>) เพศผู้ b) กบหลังไหล (<i>R. lateralis</i>) เพศผู้ c) กบหนอง (<i>L. limnocharis</i>) เพศเมีย d) กบหงอน (<i>L. pileatus</i>) เพศผู้ d) ปาดบ้าน (<i>R. leucomystax</i>) เพศเมีย และ e) อึ่งปากขวด (<i>G. molossus</i>) เพศเมีย โครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีการหดตัวมาก ทำให้การชักนำให้เกิดแถบบนโครโมโซมด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) เกิดได้ไม่ดี (กำลังขยาย 5000 เท่า)	143
5.8	C-banded karyotypes ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 4 ชนิด a) กบหลังไหล (<i>R. lateralis</i>) เพศผู้ b) กบหงอน (<i>L. pileatus</i>) เพศผู้ c) ปาดบ้าน (<i>R. leucomystax</i>) เพศเมีย และ e) อึ่งปากขวด (<i>G. molossus</i>) เพศเมีย แต่ละชนิดจะมีบริเวณติด C-band positive ในโครโมโซมแตกต่างกัน (ลูกศรชี้) ซึ่งสามารถใช้ตำแหน่งดังกล่าวบอกความแตกต่างและเอกลักษณ์ของสัตว์แต่ละชนิดได้ (กำลังขยาย 5000 เท่า)	144
5.9	Somatic metaphases ที่ย้อมแถบสีแบบซี (C-banding) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 6 ชนิด บริเวณที่ติด C-band heterochromatin ชัดเจนคือ ตำแหน่งเซนโตรเมียร์ (centromere) และส่วนปลายสุดของแขนโครโมโซม (telomere) (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 5000 เท่า)	145
5.10	Somatic metaphases ที่ย้อมแถบแบบเอ็นโออาร์ (NOR-banding) ด้วย silver nitrate และย้อมสีจิมซำธรรมดาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 4 ชนิด บริเวณที่ติด NOR-positive จะเป็นบริเวณรอยคอด secondary constriction (ลูกศรชี้) ที่ทำหน้าที่สร้าง ribosome RNA และ nucleous (กำลังขยาย 5000 เท่า)	146

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
5.11	เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบหลังขีด (<i>R. macrodactyla</i>) ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างกันจะมีความผันแปรในรูปร่างโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่กิ่ง อ.นาเยีย จ.อุบลราชธานี b) เก็บที่บ้านน้ำปลีก อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c,d) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ ซึ่งพบว่า chromosome marker คู่ที่ 8 จะไม่พบในกบหลังขีดที่เก็บจากบ้านน้ำปลีก อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ (กำลังขยาย 5000 เท่า)	147
5.12	เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบทองน (<i>L. pileatus</i>) ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างกัน ซึ่งไม่มีความผันแปรในรูปร่างโครโมโซม และ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านห้วยโรงใน อ.ร่องขวาง จ.แพร่ b) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c) เก็บที่บ้านโสกกระแต อ.ชานุมาน จ.อำนาจเจริญ	148
5.13	คาริโอไทป์ของกบบัว (<i>R. erythraea</i>) เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างกัน ซึ่งไม่มีความผันแปรในรูปร่างของโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านโนนม่วง อ.เมือง จ.ขอนแก่น b) เก็บที่บ้านป่าโง อ.เดชอุดม จ.อุบลราชธานี c) เก็บที่ บ้านดอนญู กิ่ง อ.นาเยีย จ.อุบลราชธานี และ d) เก็บที่บ้านคลองตะเคียน อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี (กำลังขยาย 5000 เท่า)	149
5.14	เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบหนอง (<i>L. limnocharis</i>) ที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานที่ต่างกัน ไม่พบความผันแปรในรูปร่างโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านโนนม่วง อ.เมือง จ.ขอนแก่น b) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c) เก็บที่บ้านคันท่าเกวียน อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี d) เก็บที่บ้านดอนญู กิ่ง อ.นาเยีย จ.อุบลราชธานี e) เก็บที่บ้านภูเตย อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี (กำลังขยาย 5000 เท่า)	150
5.15	เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบอ่อง (<i>R. nigrovittata</i>) ที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานที่ต่างกันไม่พบความแตกต่างในรูปร่างโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านคลองตะเคียน อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี b) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c) เก็บที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย อ.นาจะหลวย จ.อุบลราชธานี d) เก็บที่บ้านปากลา อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี (กำลังขยาย 5000 เท่า)	151
5.16	เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของปลาบ้าน (<i>R. leucomystax</i>) ที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานที่ต่างกันไม่พบความแตกต่างในรูปร่างโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านน้ำปลีก อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ b) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c) เก็บที่บ้านธาตุ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี d) เก็บที่บ้านมึงแก อ.มหาชนะชัย จ.ยโสธร e) เก็บที่บ้านคลองตะเคียน อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี (กำลังขยาย 5000 เท่า)	152
5.17	เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของอึ่งแม่หนาว (<i>M. berdmorei</i>) ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างกัน ไม่มีความแตกต่างในรูปร่างโครโมโซม แต่มีความแตกต่างใน chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านโสกกระแต อ.ชานุมาน จ.อำนาจเจริญ พบ chromosome marker ที่โครโมโซมคู่ที่ 8 b) เก็บที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย อ.นาจะหลวย จ.อุบลราชธานี ไม่พบ chromosome marker c-e) เก็บที่บ้านภูเตย อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี จะเห็นความผันแปรลักษณะ chromosome marker ในโครโมโซมคู่ที่ 9 (กำลังขยาย 5000 เท่า)	153

1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยในภาพรวม

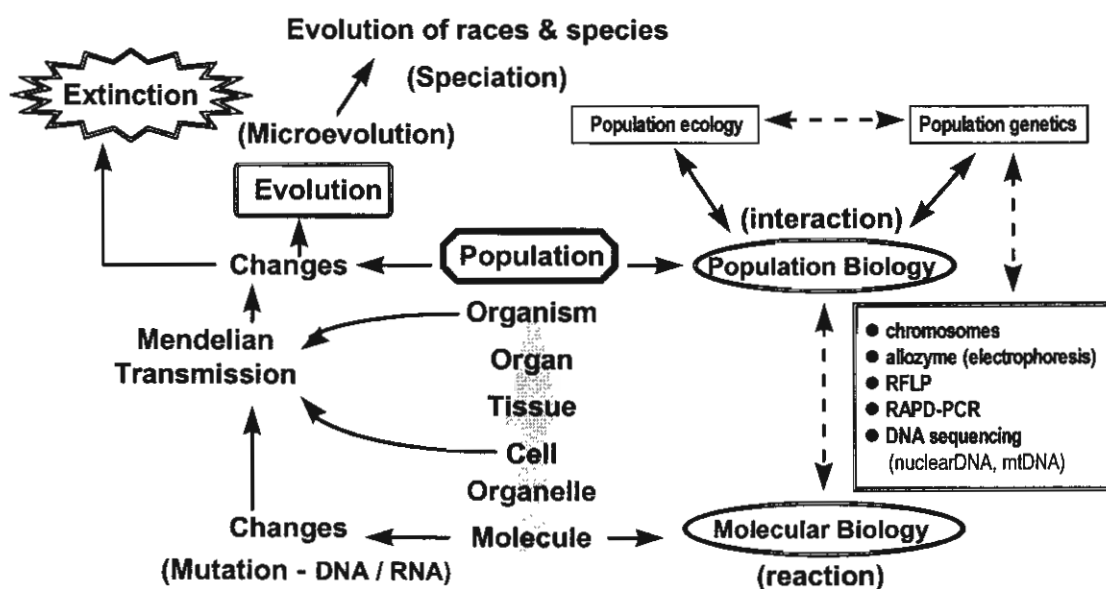
1.1 วิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีสมบัติที่สำคัญ คือ การสืบพันธุ์ซึ่งเป็นกลไกที่สามารถทำให้สิ่งมีชีวิตถ่ายทอดพันธุกรรมและจรรโลงเผ่าพันธุ์ต่อไปได้ยาวนาน กระบวนการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งเปิดโอกาสให้มีการเปลี่ยนแปลงแปรผันทางด้านพันธุกรรมซึ่งเป็นรากฐานสำคัญของวิวัฒนาการ การเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตตามกาลเทศะเกิดจากปัจจัยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เรียกว่า มิวเทชัน ซึ่งเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอตามสภาพธรรมชาติทั้งในระดับโมเลกุลหรือระดับยีน (gene mutation) และในระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมควบคู่กับกระบวนการและกลไกการถ่ายทอดกรรมพันธุ์ในระบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เอื้ออำนวยให้เกิด ยีนรีคอมบิเนชัน (gene recombination) รูปแบบต่างๆ ทางพันธุกรรมของประชากรซึ่งถ่ายทอดไปสู่รุ่นถัดๆ ไปภายใต้ปัจจัยที่เป็นผลผลักดันทางวิวัฒนาการ (evolutionary forces) เช่น การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพย้ายถิ่น ความผกผันทางพันธุกรรม เป็นต้น เหตุการณ์เหล่านี้เกิดขึ้นในประชากรของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดในแต่ละท้องถิ่นยังผลให้เกิดความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) อย่างมากมาย ดังนั้นโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละถิ่นอาศัย (habitat) จะเปลี่ยนแปลงแปลกแยกแตกต่างกันออกไปตามกาลเวลาและตามสภาพแวดล้อมของสถานที่นั้นๆ นั่นคือ มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตเพื่อให้เกิดความพร้อมในการตอบสนองต่อความแปรผันด้านสิ่งแวดล้อมในถิ่นอาศัยที่มีความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity)

การปรับตัวทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในประชากรต่างๆ ให้เหมาะสมและสอดคล้องกับระบบนิเวศของท้องถิ่นๆ อย่างค่อยเป็นค่อยไป รวมทั้งโอกาสที่ไม่เหมือนกันในแต่ละท้องถิ่นที่อยู่ห่างไกลกันทางภูมิศาสตร์จะทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการไปตามสภาพสิ่งแวดล้อม เช่น ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงสภาพดินและลมฟ้าอากาศอย่างรวดเร็ว สปีชีส์ที่มีการแพร่กระจายกว้างขวางจนมีประชากรมากมายกระจายอยู่ทั่วไปจะมีโอกาสอยู่รอดด้วยการปรับตัวทางพันธุกรรมได้ดีกว่าสปีชีส์ที่มีประชากรเพียงแห่งเดียว นอกจากนั้นความแปลกแยกแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic differentiation) ระหว่างประชากรต่างๆ ของสปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่งยังช่วยเพิ่มโอกาสให้เกิดมีพืชพันธุ์ธัญญาหารสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีสมบัติทนทานต่อสภาพแห้งแล้งหรือต้านทานต่อแมลงศัตรูหรือเชื้อโรคได้ดี สิ่งเหล่านี้จะสั่งสมอยู่ใน “ห้องสมุดพันธุกรรม” ในประชากรท้องถิ่นต่างๆ อย่างยั่งยืนบนพื้นฐานของความจริงที่ว่าส่วนใหญ่แล้วประวัติศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ถูกบันทึกไว้ในสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอซึ่งเป็นตัวกำหนดว่าสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นชนิดใด มีลักษณะอย่างไร มีชีวิตอยู่มานานเท่าไร และมีความสัมพันธ์โยงใยกับพวกใดบ้างและอย่างไร

ทฤษฎีการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการบ่งชี้ว่ามีความแปลกแยกแตกต่างทางชีววิทยาระหว่างประชากรต่างๆ ที่แยกออกจากกันทางภูมิศาสตร์ เช่น บริเวณหุบเขากับบริเวณยอดเขา แม่น้ำลำคลอง

หรือทะเลที่แบ่งแยกประชากรทั้งสองฝั่งออกจากกัน เป็นต้น ประชากรที่แยกขาดออกจากกันทางภูมิศาสตร์ เช่นนี้จะขาดการติดต่อไปมาหาสู่ระหว่างสมาชิกของแต่ละกลุ่ม ยังผลให้ขาดความต่อเนื่องทางการสืบพันธุ์และการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม (gene flow) ระหว่างกัน ถ้าสภาพการแบ่งแยกของประชากรดังกล่าวดำเนินไปเป็นเวลายาวนานพอสมควรจะทำให้ประชากรที่แยกออกจากกันนั้นพัฒนาและสั่งสมความแปลกแยกแตกต่างทางพันธุกรรมตามกาลเวลาและสถานที่ทำให้สปีชีส์บรรพบุรุษนั้นแปลกแยกแตกต่างกันทางชีววิทยา (species differentiation) จนกระทั่งประชากรเหล่านั้นไม่สามารถสืบพันธุ์และสืบสานเผ่าพันธุ์ระหว่างกันและกันได้ถึงแม้ว่าสมาชิกของแต่ละประชากรจะมีโอกาสกลับเข้ามาอยู่ร่วมกันในบริเวณถิ่นอาศัยเดียวกันอีกก็ตาม เมื่อมีเหตุการณ์เช่นนี้เกิดขึ้นก็ถือว่าประชากรที่แยกกันอยู่นั้นได้วิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงไปจนมีสถานภาพเป็นสปีชีส์หรือชนิดที่แตกต่างกันทางชีววิทยาโดยสิ้นเชิง เรียกกระบวนการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ว่า การแบ่งแยกสปีชีส์หรือสปีชีเอชัน (speciation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสปีชีส์ (species diversity) (วิสุทธิ ไบไม้, 2538) ดังนั้นกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรตามกาลเทศะ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1.1 การสูญพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรซึ่งจะหาข้อมูลได้จากการศึกษาชีววิทยาเชิงโมเลกุลและชีววิทยาเชิงประชากร โดยเฉพาะการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์เชิงประชากร

1.2 คริบทิกสปีชีส์และซิบลิงสปีชีส์

ความแปลกแยกแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรหรือระหว่างสปีชีส์ที่เราสนใจศึกษาอยู่นั้นจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะช่วยให้คำตอบได้ว่าประชากรหรือสปีชีส์เหล่านั้นมีความใกล้ชิดกันมากน้อยเพียงใด และได้แยกแตกแขนงออกจากบรรพบุรุษดั้งเดิมมานานเท่าไร การเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการเช่นนี้ทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ๆ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ยากต่อการ

จำแนกชนิด เรียกสปีชีส์ที่มีสมบัติเช่นนี้ว่า คริปติกสปีชีส์ (cryptic species) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันหรือสปีชีส์พี่น้องกันที่เรียกว่าซิบลิงสปีชีส์ (sibling species) ที่เพิ่งจะแตกแยกออกจากกันในช่วงเวลาไม่นานนัก ซึ่งส่วนมากแล้วมักจะมีโครงสร้างทางพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอที่คล้ายกันมาก

การศึกษาของกลุ่มคริปติกสปีชีส์และซิบลิงสปีชีส์มีความสำคัญอย่างไร และจะได้ประโยชน์อะไร และมากน้อยเพียงใดในการศึกษาทางชีววิทยาพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตดังกล่าว ข้อกังขาเช่นนี้เป็นเรื่องที่ยากที่จะหาคำตอบได้ชัดเจนทันทีทันใดและตรงไปตรงมา เพราะว่าการวิจัยพื้นฐานส่วนมากมักจะให้ผลในระยะยาวก่อนที่จะนำผลการวิจัยและข้อมูลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางประยุกต์แต่พอจะประเมินคุณค่าของการศึกษาดังกล่าวได้ดังนี้

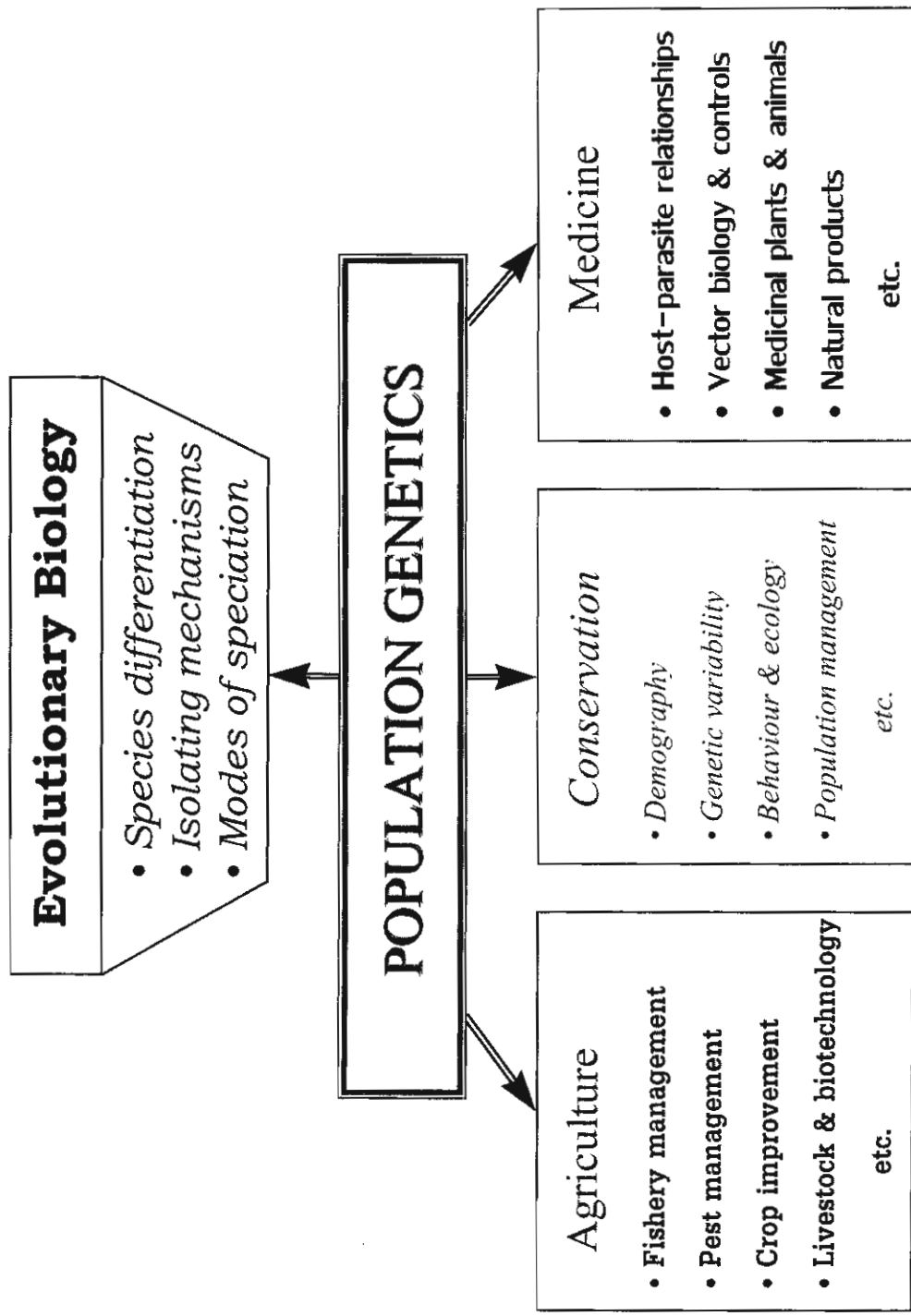
1.2.1 การศึกษาองค์ความรู้เกี่ยวกับซิบลิงสปีชีส์หรือคริปติกสปีชีส์จะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์โยงใยตามสายวิวัฒนาการของชนิดที่ใกล้เคียงกัน และจะทำให้เราเข้าใจกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงแตกต่างของสปีชีส์ ตลอดจนการปรับตัวทางพันธุกรรมของสปีชีส์ที่เกี่ยวข้อง

1.2.2 กลุ่มสปีชีส์ซิบซันและคริปติกสปีชีส์บางกลุ่มมีบทบาทสำคัญทางด้านการแพทย์และการเกษตร ได้แก่ แมลงพาหะ แมลงศัตรูพืช และจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ที่วิวัฒนาการร่วมกันมาเป็นเวลายาวนาน ข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาจะสะท้อนให้เราทราบว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นมีกิจกรรมและการดำรงชีวิตร่วมกันอย่างสมดุลได้อย่างไรในประชากรธรรมชาติ เพื่อจะได้หามาตรการควบคุมแมลงพาหะหรือแมลงศัตรูพืชและจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสมดุลธรรมชาติ

1.2.3 ในกรณีของพืชหรือสัตว์ที่มีบทบาทต่อระบบนิเวศหรือมีประโยชน์ต่อการอยู่ดีกินดีของมนุษย์ เช่น สัตว์หรือพืชสมุนไพร สัตว์หรือพืชที่ให้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือเภสัชภัณฑ์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ และมีความจำเป็นต้องอนุรักษ์ไว้เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไปอย่างยั่งยืนนั้นจะต้องได้รับการตรวจสอบและศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานอย่างชัดเจน เช่น ข้อมูลด้านชนิด การแพร่กระจาย และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันเพื่อจะช่วยให้การอนุรักษ์และการจัดการได้ผลดีและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

1.3 ความแปรผันของพันธุกรรมในประชากร

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นในระดับประชากรบนพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงและแปรผันทางพันธุกรรม ดังนั้นการศึกษาหาข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากร (population genetics) โดยใช้เทคนิคสมัยใหม่ในระดับโมเลกุล (ภาพที่ 1) จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับความรู้ความเข้าใจในสิ่งมีชีวิตทั้งระบบ โดยเฉพาะในกลุ่มสปีชีส์ซิบซันที่ประกอบด้วยซิบลิงสปีชีส์หลายชนิด ข้อมูลพื้นฐานด้านพันธุศาสตร์ดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในทางวิชาการด้านชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการ (evolutionary biology) ตลอดจนการนำไปใช้ในการจัดการควบคุมแมลงศัตรูพืช แมลงพาหะนำโรค รวมทั้งสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญทางด้านการเกษตร (agriculture) และทางด้านการแพทย์ (medicine) ไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ตลอดจนการวางแผนการอนุรักษ์ (conservation) สัตว์และพืชหายากและใกล้สูญพันธุ์อีกด้วย (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1.2 แสดงบทบาทและความสัมพันธ์ของการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรกับการใช้ประโยชน์ทางวิชาการพื้นฐานด้านวิวัฒนาการและการประยุกต์ใช้ในด้านการจัดการอนุรักษ์ การเกษตร และการแพทย์

ประชากรของสิ่งมีชีวิตทั่วไปไม่ว่าจะเป็นไวรัส จุลินทรีย์ พืช สัตว์ และมนุษย์ อาจมีลักษณะที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าว่ามีความแตกต่างแปรผันทางฟีโนไทป์ (phenotypic variation) หรือทางสัณฐานวิทยา (morphological variation) ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากพันธุกรรม ถึงแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างอาจได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมด้วย ดังนั้นความแตกต่างแปรผันทางสัณฐานวิทยาไม่一定会ตรวจสอบโดยวิธีการใดก็ตามจะสะท้อนให้เห็นถึงรากฐานที่แท้จริงของความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมที่มีอยู่หลากหลายในประชากร

วิธีการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมอาจกระทำได้หลายวิธี (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2540) แต่ละวิธีจะมีความยากง่ายและความแม่นยำในระดับต่าง ๆ กัน วิธีที่ง่ายที่สุดคือสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ความสูง น้ำหนัก สี ถ้าจะให้ละเอียดลงไปอีกหน่อยก็ต้องอาศัยวิธีการตรวจสอบพันธุกรรมโดยตรง ซึ่งสามารถกระทำได้ทั้งในระดับโครโมโซมและในระดับยีนโดยใช้เทคนิคทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุล (molecular biology) ที่พอสรุปได้ดังนี้:-

1.3.1 ระดับโครโมโซม

การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซม (chromosomal variation) โดยทั่วไปจะสังเกตได้จากการศึกษาโครโมโซม 2 ระดับ คือ

1.3.1.1 ไมโททิกโครโมโซม : การศึกษาไมโททิกโครโมโซมจะพบความแตกต่างแปรผันในเชิงจำนวนที่มากกว่าหรือน้อยกว่าจำนวนปกติ ($2n$) ในสิ่งมีชีวิตพวกดิพลอยด์ดังนี้

(ก) มีโครโมโซมชนิดพิเศษที่เรียกว่าซูเปอร์นิวเมอรัลโครโมโซม (supernumerary chromosome) หรือโครโมโซมบี (chromosome B) (Baimai et al., 1984)

(ข) มีโครโมโซมใดโครโมโซมหนึ่งมากกว่าหรือน้อยกว่าปกติ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า แอนยูพลอยดี (aneuploidy) (Baimai, 1983; Traipakvasin and Baimai, 1985)

(ค) มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นมาเป็น 3 ชุด หรือ 4 ชุด แทนที่จะมี 2 ชุดตามปกติ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ยูพลอยดี (euploidy) (Baimai et al., 1994)

(ง) ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในระดับไมโททิกโครโมโซมที่พบบ่อยที่สุดในประชากรธรรมชาติคือความแปรผันในเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin variation) สำหรับในแมลงพวกดิฟเทอร่า (Diptera) เช่น พวกแมลงหวี่ ยุงก้นปล่อง หรือแมลงวันผลไม้ (Baimai, 1998)

1.3.1.2 โพลีทีนโครโมโซม : แมลงบางกลุ่ม เช่น ดิฟเทอร่าและวันดำมีเซลล์ต่อมน้ำลายของตัวหนอนหรือตัวอ่อนที่มีโครโมโซมชนิดพิเศษเรียกว่าโพลีทีนโครโมโซม (polytene chromosome) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าไมโททิกโครโมโซมทั่วไปถึง 100 เท่า ทำให้สามารถศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมชนิดพิเศษนี้ได้ง่ายขึ้น และละเอียดมากขึ้น โดยเฉพาะความแปรผันในรูปแบบของอินเวอร์ชัน (inversion) และดิพลิเคชัน (duplication) เช่น ในแมลงหวี่ ยุงก้นปล่อง และวันดำ เป็นต้น (Baimai, 1970, 1988; Baimai et al., 1988; Kuvangkadilok et al., 1999)

1.3.2 ระดับโมเลกุล

การวิเคราะห์ตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งให้ถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้นจะทำได้ในระดับยีนโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งจะต้องหาให้ได้ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างและความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของประชากรที่เราต้องการศึกษา จะสังเกตว่าในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา นักวิจัยได้ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็นโปรตีนหรือดีเอ็นเอโมเลกุลที่สามารถนำมาแยกและตรวจสอบได้โดยใช้กรรมวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส และนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรของแมลงศัตรูพืชและแมลงพาหะ ตลอดจนสัตว์และพืชอีกหลายชนิด เทคนิคที่ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมมีประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจสอบติดตามการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของประชากรของสิ่งมีชีวิตที่พอจะสรุปได้ดังนี้ :-

1.3.2.1 อัลโลไซม์ (allozyme) : อิเล็กโทรโฟริซิสเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากสำหรับศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของพืชและสัตว์รวมทั้งแมลงพวกยุงและแมลงวันผลไม้ (Saelee et al., 1999; Green et al., 1992) ตลอดจนการศึกษาพันธุศาสตร์ของมนุษย์ (Harris and Hopkinson, 1976) การศึกษาอัลโลไซม์ในการตรวจสอบหาความแตกต่างแปรผันของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนโมเลกุลที่มีสมบัติการทำงานเหมือนกัน ลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในโปรตีนโมเลกุลจะสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างของลำดับเบสในดีเอ็นเอโมเลกุลที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนั้นด้วย สมบัติของอัลโลไซม์จะแสดงออกเป็นแบบโคโดมิแนนต์ คือ เราจะสามารถแยกพวกที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกตออกจากพวกที่เป็นเฮเทโรไซโกตได้อย่างชัดเจน การวิเคราะห์อัลโลไซม์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสกระทำได้ง่ายและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายไม่มากนัก แต่ก็ยังคงมีข้อเสียเปรียบตรงที่เราจะศึกษาตรวจสอบยีนที่ควบคุมอัลโลไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในจำนวนจำกัดเพียงประมาณ 20-30 โลกัสนั้นในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ดังนั้นการศึกษาลำดับยีนบางชนิดจึงจำเป็นต้องศึกษาหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมโดยการตรวจหาความแตกต่างแปรผันในระดับยีนหรือดีเอ็นเอโดยตรง

1.3.2.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) : RFLP เป็นเทคนิคที่ช่วยตรวจหาความแตกต่างแปรผันในโมเลกุลดีเอ็นเอในส่วนของโครโมโซมที่เป็นโฮโมโลกัสกัน และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ทั้งในส่วนที่เป็น coding region และในส่วนที่เป็น noncoding region เทคนิค RFLP ใช้หลักการที่ทำให้ดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เข้าผสมกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอชิ้นย่อยๆ ที่ถูกตัดขาดโดยเอนไซม์จำเพาะชนิดต่างๆ กัน ซึ่งจะทำให้ชิ้นส่วนเล็กๆ เหล่านั้นแยกออกจากกันโดยวิธีการอิเล็กโทรโฟริซิสบนแผ่นอะกาโรสเจล (Southern, 1975) วิธีการนี้มีความละเอียดและแม่นยำมากกว่าการตรวจสอบอัลโลไซม์ แต่ข้อเสียเปรียบคือต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะมากกว่าและมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีการอิเล็กโทรโฟริซิสที่กล่าวมาข้างบน และต้องการผู้ชำนาญการที่ผ่านการฝึกฝนมานาน

1.3.2.3 RAPD-PCR : วิธีการนี้เป็นเทคนิคใหม่ที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะทำได้ง่ายในเวลาอันรวดเร็วและมีความแม่นยำสูงโดยอาศัยการใช้ดีเอ็นเอช่วงสั้นเพียงประมาณ 10 เบส เป็นต้นแบบ (primer) และต้องการใช้ดีเอ็นเอปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่น ดีเอ็นเอจากเซลล์รากขนสัตว์ หรือ

หยาตเลือดที่เปื้อนบนเสื้อผ้า เป็นต้น เพื่อนำมาเลือกขยายปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มตลอดทั่วจีโนมทั้งหมด จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD (Williams et al., 1990) และใช้กรรมวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างเป็นลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR) ความแปรผันทางพันธุกรรมจะมีมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับว่ามีหรือไม่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้ขยายปริมาณนั้น วิธีการนี้ใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งในพืช (Prathepha and Baimai, 1999) และในยุงก้นปล่อง (Walton et al., 1999) แต่ก็ยังคงมีข้อเสียเปรียบตรงที่มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องใช้เครื่องมือพิเศษจำเพาะด้วย อย่างไรก็ตาม ถ้าทำดีเอ็นเอในปริมาณมากๆ จากตัวอย่างของประชากรที่มีขนาดใหญ่ก็จะทำให้ค่าใช้จ่ายนั้นคุ้มค่าเช่นเดียวกับเทคนิค RFLP และมีข้อได้เปรียบคือจะทำให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดมากขึ้น

เทคนิคทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมดังที่กล่าวมาข้างบนนี้ นับว่ามีประโยชน์อย่างมากที่เอื้ออำนวยให้นักวิทยาศาสตร์สามารถค้นคว้าหาข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมที่นำไปสู่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ได้อย่างแม่นยำ จนทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจในกลไกการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการได้ละเอียดลึกซึ้งมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) หรือพันพ้องชีวิตที่หมุนบิดไปตามความสัมพันธ์ระหว่างแมลงพาหะ (vector) กับปรสิต (parasite) และระหว่างแมลงเบียน (parasitoid) กับแมลงศัตรูพืช (pest) รวมทั้งพืชอาศัย (host plant) และจุลินทรีย์บางกลุ่ม เช่น *Wolbachia* ที่ดำรงชีวิตแบบ symbiosis ในแมลงบางชนิด ดังกรณีแมลงวันผลไม้ที่วิวัฒนาการควบคู่กันมากับพืชอาศัยและแมลงเบียนรวมทั้งพวกเอนโดซิมไบออนต์ที่ได้มีการศึกษาเบื้องต้นมาแล้ว (วิสุทธิ ไบไม้ 2541)

ดังนั้นการศึกษาวิชาการรายละเอียดในแนวลึกเพื่อหาข้อมูลพื้นฐานด้านความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรของแมลงวันผลไม้, แมลงเบียน, จุลินทรีย์ *Wolbachia* และพืชอาศัยเพื่อตรวจสอบว่ามีความสัมพันธ์โยงใยระหว่างสิ่งมีชีวิตเหล่านี้หรือไม่ (ภาพที่ 3 และ 4) โดยใช้กรรมวิธีทางชีววิทยาเชิงโมเลกุล ถ้ามีความสัมพันธ์กันจริงก็อาจค้นพบกลไกปฏิสัมพันธ์และกลไกการปรับตัวทางพันธุกรรมที่นำไปสู่การวิวัฒนาการร่วมกันของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ องค์ความรู้ใหม่ที่ได้รับจากการวิจัยในแนวลึกเช่นนี้จะมีความสำคัญยิ่งที่จะใช้เป็นต้นแบบ (model) ของความรู้ความเข้าใจในกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการร่วมกันของสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายในเขตร้อนอย่างเช่นในประเทศไทยและอาจนำไปใช้ในการประยุกต์หามาตรการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีในอนาคต

ในทำนองเดียวกันการศึกษาค้นคว้าหาข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติของริ้นดำสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคระดับโครโมโซม คือ ศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อน และระดับโมเลกุล คือ การศึกษาระดับอัลโลไซม์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสควบคู่กันไปกับการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากรเพื่อช่วยให้คำตอบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรที่พบนั้นเป็นความแตกต่างระหว่างประชากรริ้นดำของชนิดเดียวกัน (intraspecies variation) หรือเป็นความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกัน (interspecies variation)

การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์เชิงประชากร (population cytogenetics) โดยการศึกษา ไมโททิกคาริโอไทป์โดยเฉพาะการวิเคราะห์หาปริมาณและการกระจายของเฮเทโรโครมาทินประสบความสำเร็จอย่างดีในการศึกษาพวกคริบทิกสปีชีส์หรือซิบลิงสปีชีส์ในพวกแมลงหวี่ ยุงก้นปล่อง และแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย (Baimai, 1998) แต่ยังมีการศึกษาทางด้านนี้น้อยมากในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยทั้งๆ ที่คาดว่าจะมีความหลากหลายของสปีชีส์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์กลุ่มนี้สูงมาก นอกจากนั้นการศึกษาหาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในระดับไมโททิกโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะช่วยบ่งบอกได้ชัดเจนว่าเป็นความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด (interspecies variation) หรือเป็นความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (intraspecies variation) นอกจากนั้นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดกำลังถูกคุกคามจนเป็นอันตรายใกล้จะสูญพันธุ์ เนื่องจากการทำลายป่าซึ่งเป็นถิ่นอาศัยและการทำให้เกิดมลพิษทางน้ำ จึงสมควรได้รับความสนใจศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานดังกล่าว เพื่อให้ได้องค์ความรู้และความเข้าใจในสัตว์กลุ่มนี้ที่จะเป็นประโยชน์ทางวิชาการและการนำเอาไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์และในการอนุรักษ์สัตว์กลุ่มนี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- วิสุทธิ ไบไม้. 2538. สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรุงเทพฯ.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2540. ความแปรผันทางพันธุกรรม. วารสารราชบัณฑิตยสถาน. 22(2) : 112-120.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2541. การศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรของแมลงวันผลไม้และยุงก้นปล่อง. รายงานฉบับสมบูรณ์ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว.
- Baimai, V. 1970. Chromosomal polymorphism in *Drosophila birchii*. J. Hered. 61: 22-34.
- Baimai, V. 1983. Spontaneous aneuploidy in four species of the *D. montium* subgroup. Dros. Inf. Serv. 59: 15-16.
- Baimai, V. 1988. Population cytogenetics of the malaria vector *Anopheles leucosphyrus* group. Southeast Asian. J. Trop. Med. Publ. Hlth. 19: 667-680.
- Baimai, V. 1998. Heterochromatin accumulation and karyotypic evolution in some dipteran insects. Zool. Stud. 37(2): 75-88.
- Baimai, V., Poopittayasataporn, A. and Kijchalao, U. 1988. Cytological differences and chromosomal rearrangements in four members of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae). Genome 30: 372-379.
- Baimai, V., Treesucon, A. and Rattanarithikul, R. 1994. Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia. III. The Neocellia Series (*Cellia*). Mosq. Syst. 26: 116-124.

- Baimai, V., Wibowo, S. and Andre, R.G. 1984. Supernumerary (B) chromosome in *Anopheles indefinitus* (Diptera: Culicidae). *Experientia* 40: 749-750.
- Green, C.A., Munstermann, L.E., Tan, S.G., Panyim, S. and Baimai, V. 1992. Population genetic evidence for species A,B,C and D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electromorphs for their identification. *Med. Vet. Entomol.* 6: 29-36
- Harris, H. and Hopkinson, D.A. 1976. *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. North Holland Amsterdam.
- Kuvangkadilok, C., Phayuhassana, S. and Baimai, V. 1999. Population cytogenetic studies on *Simulium* species B (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Genome* 42: 80-86.
- Prathepha, P. and Baimai, V. 1999. Genetic differentiation in Thai populations of the rare species *Afgekia sericea* Craib (Leguminosae) revealed by RAPD-PCR assays. *Genetica* 105: 193-202.
- Saelee, A., Tigvatananont, S. and Baimai, V. 2002. Allozyme electrophoresis evidence for a complex of species within the *Bactrocera tau* group (Diptera: Tephritidae) in Thailand. (submitted).
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Traipakvasin, A. and Baimai, V. 1985. Spontaneous aneuploidy of chromosome 4 in *Drosophila kikkawai* in Thailand. *Experientia* 41: 104-105.
- Walton, C., Handley, J.M., Kuvangkadilok, C., Collins, F.H., Harbach, R.E., Baimai, V. and Butlin, R.K. 1999. Identification of cryptic species of the *Anopheles dirus* complex in Thailand using allele-specific polymerase chain reaction. *Med. Vet. Entomol.* 13: 24-32.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

2

วัตถุประสงค์โครงการโดยรวม

- เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรและนิเวศวิทยาของแมลงเบียน แมลงวันผลไม้และพืชอาศัยรวมทั้งจุลินทรีย์กลุ่ม *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในแมลงเหล่านี้โดยใช้วิธีการทางด้านอนุพันธุศาสตร์
- เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ทางด้านพันธุศาสตร์และความเข้าใจในกลไกและกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการร่วมกันรวมทั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะเป็นพื้นฐานสำคัญที่อาจนำไปสู่การหามาตรการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี
- เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรและอนุพันธุศาสตร์ของริ้นดำในประเทศไทยเพื่อให้ได้ข้อมูลทางด้านความหลากหลายของชนิดและความแปรผันทางพันธุกรรมในภาคต่างๆ ที่มีนิเวศวิทยาต่างกัน
- เพื่อศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยตลอดจนความหลากหลายของชนิดเพื่อให้ได้ความรู้ความเข้าใจในสถานภาพของสัตว์กลุ่มนี้ที่มีความไวต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม
- เพื่อผลิตบัณฑิตปริญญาโทและปริญญาเอกด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากรให้สอดคล้องกับความต้องการนักวิชาการด้านนี้ของประเทศ
- เพื่อสร้างเครือข่ายและขยายวงนักวิจัยด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากรและชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการ เพื่อให้เกิดความร่วมมือและประสานงานทางวิชาการมากขึ้นตลอดจนเชื่อมโยงข้อมูลพื้นฐานด้านต่างๆ ให้เกิดเป็นองค์ความรู้รวมที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

3

วิวัฒนาการร่วมระหว่างแมลงเบียน แมลงวันผลไม้ และจุลินทรีย์ *Wolbachia*

3.1 แมลงเบียน

3.1.1 บทนำ

แมลงเบียน (parasitoid) เป็นแมลงที่สามารถควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้ (fruit flies) โดยชีววิธี (biological control) แนวความคิดในการควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้โดยชีววิธีนี้เริ่มมานานเกือบ 100 ปี ในการค้นหาแมลงเบียน แรกเริ่มนั้นมีสาเหตุจากการระบาดของแมลงวันผลไม้พวก Mediterranean fruit flies (Medflies) ในประเทศออสเตรเลียในปี ค.ศ. 1907 จึงทำการสำรวจและค้นหาแมลงเบียนจากนอกประเทศเข้ามาเลี้ยงและขยายพันธุ์เพื่อปล่อยออกไปควบคุม แต่ไม่ปรากฏผลสำเร็จ (Wilson, 1960) ขณะเดียวกันก็มีการระบาดของแมลงวันผลไม้ในหลายๆ ประเทศ เช่น อิตาลี พบการระบาดของแมลงวันมะกอก (Olive fruit flies) สหรัฐอเมริกา ที่รัฐฮาวายพบการระบาดของแมลงวันผลไม้ (Oriental fruit flies) และพบการระบาดลักษณะเดียวกันประเทศในเขตเอเชียอาคเนย์ รวมทั้งประเทศไทยก็พบการระบาดของแมลงวันผลไม้ (Oriental fruit flies)

แมลงวันผลไม้ (Oriental fruit flies) จัดเป็นแมลงศัตรูผลไม้ที่สำคัญของประเทศไทย (แสน ดิกวัดนานนท์, 2529) การระบาดของแมลงวันผลไม้เข้ามาซึ่งความเสียหายกับพืชผล โดยแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจะใช้อวัยวะทางไขแทงลงไปใต้ผิวผลไม้ เมื่อไขฟักออกมาเป็นตัวหนอนจะซอนไชกินเนื้อผลไม้ ทำให้ผลไม้เน่าเสีย และร่วงหล่น ทำให้เกิดความเสียหาย คือ ผลผลิตที่ได้น้อยลง มีคุณภาพต่ำ และอาจถูกกีดกันการส่งออกในตลาดต่างประเทศ ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ การควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้มีหลายวิธีส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมใช้สารเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ทำความเสียหายต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอันตรายต่อสุขภาพของเกษตรกร และหากใช้ในระยะยาวก็จะทำให้แมลงศัตรูผลไม้มีดื้อต่อยา ทำให้การควบคุมกำจัดได้ยากขึ้น ส่งผลให้เกิดการระบาดที่รุนแรงขึ้น ดังนั้นการควบคุมประชากรของแมลงวันผลไม้โดยชีววิธี จึงได้รับความสนใจมากขึ้น

การควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้โดยชีววิธี โดยเฉพาะการนำแมลงเบียนมาช่วยควบคุมหรือลดการระบาดได้รับการสนับสนุนอย่างมาก (Clausen et al., 1965; Clausen, 1978; Gilstrap et al., 1987) โครงการการสำรวจแมลงเบียนจากถิ่นต่างๆ มาปล่อยในพื้นที่ที่ระบาดของแมลงวันผลไม้ ปรากฏว่าแมลงเบียนไม่สามารถอยู่รอดในธรรมชาติได้นัก (Clausen, 1978) โครงการการควบคุมการระบาดของแมลงวันผลไม้โดยชีววิธียังประสบผลสำเร็จน้อยมาก นักวิจัยหลายกลุ่มจึงหันมาศึกษารายละเอียดของแมลงเบียนและแมลงวันผลไม้เพื่อค้นหาข้อมูลสนับสนุนโครงการชีววิธีนี้ ดังตัวอย่างการศึกษาชีววิทยาประชากรของแมลงเบียนชนิด *Biosteses tryoni* (Ramadan et al., 1989a, b; Ramadan and Wong, 1990) การศึกษา

นิเวศวิทยาของแมลงเบียน *D. longicandata* ในรัฐอาวาย (Messing and Jang, 1992) การศึกษาพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของ *Fopius arisanus* ที่ออสเตรเลีย (Guimio, 2000) สำหรับในประเทศไทยพบบันทึกการยี่ห้อของแมลงเบียนที่มีผู้เข้ามาสำรวจ (พิมลพร และคณะ 2525; Chinajariyawong et al., 2000) นอกจากนี้ยังเริ่มมีการศึกษาความผันแปรของประชากรแมลงเบียนในฤดูกาลต่างๆ (Kitthawee, 2000) มีการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงเบียน (Kitthawee et al., 1999) และการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงเบียนชนิด *D. longicaudata* (Kitthawee et al., 1999) พบข้อมูลที่น่าสนใจหลายประการรวมทั้งข้อมูลที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน เช่น ลักษณะของกลุ่มสปีชีส์ใกล้เคียง สปีชีส์ซับซ้อน ฯลฯ ซึ่งต้องการการตรวจสอบที่ละเอียดยิ่งขึ้นต่อไป

ดังนั้นการควบคุมโดยชีววิธีโดยการเลือกใช้แมลงเบียนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ไม่อย่างมีประสิทธิภาพ ยังจำเป็นต้องทำการสำรวจ ตรวจสอบ ตลอดจนศึกษาความสัมพันธ์การศึกษาวิวัฒนาการและทางชีววิทยาของแมลงเบียน, แมลงให้อาศัย, พืชอาศัย ฯลฯ ต่อไปการศึกษาวิจัยดังกล่าวจะช่วยให้เข้าใจและนำวิธีทางชีววิธีไปใช้อย่างถูกวิธี การลดประชากรแมลงวันผลไม้โดยวิธีทางชีววิธีนี้จัดเป็นทางเลือกของเกษตรกรที่ประหยัด ถูกสุขลักษณะทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค รวมทั้งรักษาสมดุลย์ธรรมชาติ

3.1.2 วัตถุประสงค์

- 3.1.2.1 เพื่อทำการสำรวจและค้นหาแมลงเบียน
- 3.1.2.2 ทำการจัดจำแนกชนิดของพืชอาศัย แมลงวันผลไม้ และแมลงเบียนโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา (morphology)
- 3.1.2.3 ยืนยันการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงเบียน โดยวิธี mitotic chromosome และ molecular analysis
- 3.1.2.4 ศึกษาชีววิทยาของแมลงเบียนบางชนิดเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพ

3.1.3 วิธีการศึกษา

- 3.1.3.1 สำรวจและค้นหาแมลงเบียนจากการเก็บผลไม้ที่เน่าเสียจากการทำลายของแมลงวันผลไม้ โดยทำการสำรวจในเขตจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทย
- 3.1.3.2 ทำการจัดจำแนกชนิดของพืชที่ให้ผลตามที่สำรวจได้โดยใช้อนุกรมวิธานของ เต็มสมิตินันท์ (2523) การจัดจำแนกแมลงวันผลไม้ที่ทำลายพืชผลข้างต้นโดยอาศัยอนุกรมวิธานของ White and Elson - Harris (1992) และจัดจำแนกแมลงเบียนโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา อาศัยอนุกรมวิธานของ Wharton and Gilstrap (1983)
- 3.1.3.3 ศึกษา mitotic chromosome ของแมลงเบียนที่สำรวจเพื่อยืนยันการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา ตามวิธีของ Kitthawee et al. (1999) การศึกษาความผันแปรทางพันธุ

พันธุกรรมของแมลงเบียนโดยเทคนิค RAPD-PCR ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S, 28S ribosomal RNA gene และบริเวณ ITS

- 3.1.3.4 ศึกษาชีววิทยาของแมลงเบียน โดยเปรียบเทียบอัตราการโจมตีของแมลงเบียน ชนิด *Spalangia endius* ที่ระดับความหนาแน่นต่างๆ ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. correcta* นอกจากนี้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแมลงเบียน ต่อการค้นหาแมลงวันผลไม้โดยเปรียบเทียบที่ระดับความหนาแน่นต่างๆ ของแมลงเบียน

3.1.4 ผลการศึกษา

3.1.4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

ออกสำรวจเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้และแมลงเบียนจากจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ (CM), ชุมพร (CP) , กาญจนบุรี (KB), นครนายก (NN), นครปฐม (NP), นครราชสีมา (NR), ระนอง (RN), สุราษฎร์ธานี (SI), และ สงขลา (SO)

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างระหว่างปี 2542-44 ได้ผลดังตาราง 3.1.1

ตารางที่ 3.1.1 ผลการสำรวจเก็บตัวอย่างแมลงเบียนและแมลงวันผลไม้

Code	Date	Location	Host plant	Host fly	Parasitoid
CM(PG)-1	16 Sept. 1999	เชียงใหม่	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. pyrifoliae</i>	<i>F. arisanus</i> <i>F. vandenboschi</i>
CM(PG)-2	17 Sept. 1999	เชียงใหม่	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. pyrifoliae</i>	<i>F. arisanus</i> <i>F. vandenboschi</i>
CM(PG)-3	17 Sept. 1999	เชียงใหม่	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. pyrifoliae</i>	<i>F. arisanus</i> <i>F. vandenboschi</i> <i>D. longicaudata</i>
SO(AC)-1	13 Oct. 1999	สงขลา	<i>Averrhoa carambola</i>	<i>B. carambolae</i>	<i>F. arisanus</i> <i>F. vandenboschi</i> <i>P. incisi</i>
CM(PG)-4	29 Oct. 1999	เชียงใหม่	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. pyrifoliae</i>	<i>F. arisanus</i>
KB(SP)-18	12 Nov. 1999	กาญจนบุรี	<i>Spondias pinnata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>D. longicaudata</i> <i>P. incisi</i>
KB(ZM)-19	7 Feb. 2000	กาญจนบุรี	<i>Zizyphus mauritiana</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i>
KB(ZM)-21	18 Feb. 2000	กาญจนบุรี	<i>Zizyphus mauritiana</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i>
KB(MA)-22	25 Feb. 2000	กาญจนบุรี	<i>Musa acuminata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i>
NN(MA)-2	8 Apr. 2000	นครนายก	<i>Musa acuminata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>P. incisi</i>
KB(MI)-28	10 Apr. 2000	กาญจนบุรี	<i>Mangifera indica</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i> <i>F. vandenboschi</i>

ตารางที่ 3.1.1 (ต่อ)

Code	Date	Location	Host plant	Host fly	Parasitoid
KB(MA)-22	11 Apr. 2000	กาญจนบุรี	<i>Musa acuminata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i>
NN(MI)-7	2 May 2000	นครนายก	<i>Mangifera indica</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i> <i>P. incisi</i>
KB(GP)-38	15 June 2000	กาญจนบุรี	<i>Gmelina philippensis</i>	<i>B. spp.</i> <i>Anomoia kraussi</i>	<i>D. longicaudata</i> <i>F. arisanus</i> <i>F. vandenboschi</i>
KB(CG)-36	15 June 2000	กาญจนบุรี	<i>Coccinia grandis</i>	<i>B. diversa</i>	<i>P. incisi</i> group
KB(SK)-39	15 June 2000	กาญจนบุรี	<i>Sandoricum koetjape</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i>
CM(PG)-2	27 Oct. 2000	เชียงใหม่	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. pyrifoliae</i>	<i>F. arisanus</i>
KB(ZM)-51	2 Dec. 2000	กาญจนบุรี	<i>Zizyphus mauritiana</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i>
KB(ZM)-48	3 Dec. 2000	กาญจนบุรี	<i>Zizyphus mauritiana</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>F. arisanus</i>
CM(TT)-22	7 Dec. 2000	เชียงใหม่	<i>Trichosanthes tricuspidata</i>	<i>B. tau</i>	<i>Psytallia</i> sp.
RN(AC)-37	2 Feb. 2001	ระนอง	<i>Areca catchu</i>	<i>B. arecae</i>	<i>P. sp. B</i>
SI(MA)-8	3 Feb. 2001	สุราษฎร์ธานี	<i>Musa acuminata</i>	<i>B. dorsalis</i> <i>B. carambolae</i>	<i>F. arisanus</i>
SI(AS)-10	4 Feb. 2001	สุราษฎร์ธานี	<i>Artabotrys siamensis</i>	<i>B. dorsalis</i> sp. R	<i>F. arisanus</i> <i>F. vandenboschi</i>
KB(PG)-55	8 Feb. 2001	กาญจนบุรี	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. dorsalis</i> <i>B. correcta</i>	<i>P. sp. S</i>
RN(Gsp.)-47	17 Feb. 2001	ระนอง	<i>Gnetum</i> sp.	<i>B. carambolae</i>	<i>F. sp. B</i>
RN(Ssp.)-48	17 Feb. 2001	ระนอง	<i>Strychnos</i> sp.	<i>B. tau</i> sp. E	<i>D. longicaudata</i>
RN(TT)-49	20 Feb. 2001	ระนอง	<i>Trichosanthes tricuspidata</i>	<i>B. tau</i> <i>B. tau</i> sp. D	<i>F. sp. R</i>
RN(?) -54	20 Feb. 2001	ระนอง	ไม้ปาล์มสีเหลือง	<i>Bactrocera</i> sp.	<i>B. sp. F</i>
RN(Gsp.)-55	20 Feb. 2001	ระนอง	<i>Gnetum</i> sp.	<i>B. carambolae</i>	<i>B. sp. E</i>
SI(PG)-20	22 Feb. 2001	สุราษฎร์ธานี	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. dorsalis</i> C	<i>F. sp. R</i>
SI(AS)-23	23 Feb. 2001	สุราษฎร์ธานี	<i>Artabotrys siamensis</i>	<i>B. dorsalis</i> sp. R	<i>F. sp. B</i> <i>F. sp. S</i>
SI(MM)-27	23 Feb. 2001	สุราษฎร์ธานี	<i>Melastoma melabathricum</i>	<i>B. melastomatos</i>	<i>P. sp. N</i> <i>P. sp. B</i>
RN(CO)-56	23 Feb. 2001	ระนอง	<i>Cleistocalyx operculatus</i>	<i>B. dorsalis</i> sp. J	<i>B. sp. E</i> <i>P. sp. A</i>
NR(SS)-12	22 Mach 2001	นครราชสีมา	<i>Syzygium samarangense</i>	<i>B. dorsalis</i> <i>B. correcta</i>	<i>D. longicaudata</i> <i>F. sp. C</i> <i>P. sp. C</i>
CP(CO)-25	12 May 2001	ชุมพร	<i>Cleistocalyx operculatus</i>	<i>B. dorsalis</i> <i>B. dorsalis</i> sp. J	<i>P. sp. C</i>
CM(PG)-23	12 Aug. 2001	เชียงใหม่	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. pyrifoliae</i>	<i>F. arisanus</i>

3.1.4.2 การจัดจำแนกโดยวิธีสัณฐานวิทยา

ทำการจัดจำแนกพืชอาศัย (host plant), แมลงวันผลไม้ (host fly) และแมลงเบียน (parasitoid) โดยอาศัยอนุกรมวิธานของ เต็ม สมิตินันท์ (2523), White and Elson-Harris (1992) และ Wharton and Gilstrap (1983) ตามลำดับพบความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัย แมลงวันผลไม้ และแมลงเบียน ตลอดจนการแพร่กระจาย ดังตาราง 3.1.1

3.1.4.3 การศึกษาไมโททิกโครโมโซมของแมลงเบียน

(ก) การเตรียมโครโมโซมของแมลงเบียนที่เหมาะสมตามวิธีของ Kithawee et al. (1999) ถูกนำมาใช้ศึกษาไมโททิกโครโมโซมของแมลงเบียน 6 species จาก 3 genera ผลการศึกษาพบว่า จำนวนโครโมโซมสามารถจำแนกแมลงเบียนระดับ genus ได้ ดังนี้ *Psytalia* sp. (2n=34), *Diachasmimorpha* sp. (2n=40) และ *Fopius* sp. (2n=43) ส่วนขนาดและรูปร่างของคาริโอไทป์ สามารถจัดจำแนกแมลงเบียนระดับ species ได้ดังนี้

<i>Psytalia fletcheri</i>	(n=17) 7M, 6SM, 4ST
<i>Psytalia incisi</i>	(n=17) 5M, 9SM, 3ST
<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	(n=20) 5M, 13SM, 2ST
<i>Diachasmimorpha dacusii</i>	(n=20) 6M, 12SM, 2ST
<i>Fopius arisanus</i>	(n=23) 5M, 13SM, 5ST
<i>Fopius vandenboschi</i>	(n=23) 7M, 14SM, 2ST

(ข) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงเบียนโดยวิธีทางโมเลกุล

- โดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ primer 6 แบบ คือ OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-11 และ OPA-13 มาตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงเบียน ผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างของรูปแบบของแถบ DNA ในกลุ่มแมลงเบียน ดังภาพ 3.1.1

- โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 28S ribosomal RNA gene โดยการออกแบบ primer ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GeneFisher (<http://bibserv.techfak.uni-bielef>) ของ *F. arisanus* และ *D. longicaudata* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ได้เลือก primer เพื่อการทดลองดังนี้

ไพรเมอร์สำหรับ 16S ของ *Fopius* spp.

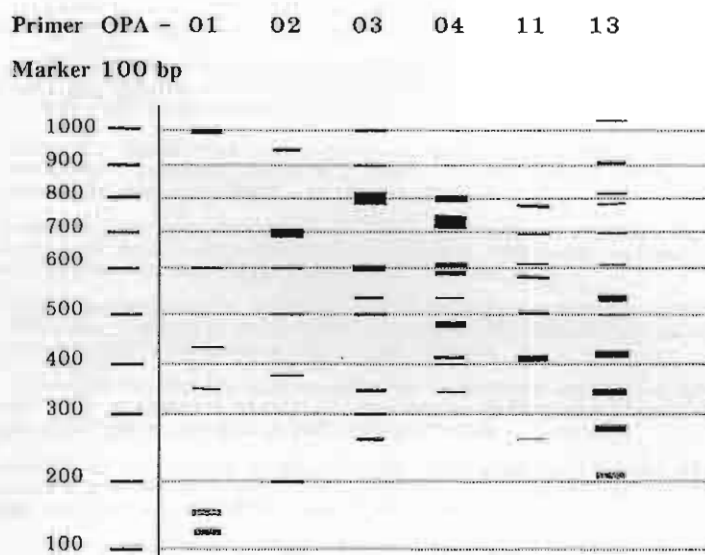
Forward Primer	Reverse Primer	Product Length	Tm Diff.	FPPos./RPPos.
AAGACGACAAGACCCTA	TCAACATAGAGGTCA	231	5	174/405

ไพรเมอร์สำหรับ 28S ของ *Fopius* spp.

Forward Primer	Reverse Primer	Product Length	Tm Diff.	FPPos./RPPos.
CCGTTTCAGGGGTAAACC	CCTGAAAGTACCCAAAGC	437	0	3/440

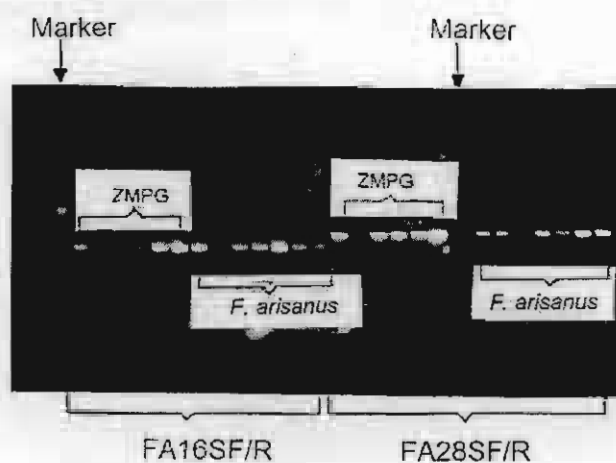
ไพรเมอร์สำหรับ 28S ของ *Diachasmimorpha longicaudata*

Forward Primer	Reverse Primer	Product Length	Tm Diff.	FPFPos./RPPos
GGGGAGATTCATCGTCAG	ATTATAGCGACGGCACT	309	2	0/309



ภาพที่ 3.1.1 RAPD band ของแมลงเบียน 6 ตัวในกลุ่ม *Fopius*

ผลการเพิ่มปริมาณ 16S และ 28S rRNA gene ของ *F. arisanus* 16S มีขนาด 250 bp และ 28S มีขนาด 500 bp *D. longicaudata* 28S มีขนาด 500 bp ดังภาพที่ 3.1.2



ภาพที่ 3.1.2 แสดงแถบ DNA ขนาด 250 bp (16S rDNA), 500 bp (28S rDNA) และ 1 Kb (marker)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 บริเวณได้ผลดังภาพที่ 3.1.3 และ 3.1.4

```

222
NN(MI)7
TAAAAATATA TTAACTTTAA CTTTTTAATA AATATA--T---TTT TAATAAATTT AATTGGGGAA ATTAAAAAAT TTAATAAATT T
TTTTATAAT AAAACATTAA TTTATGAATA AACAAATTCCT TTATTATTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAT CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTG-AA
CM(PG)-1-P1
TAAAAATATA TTAATTNAT -TTTTTAATA AATATA--T---TTT TAATAAATTT AATTGGGGAA ATTAAAAAAT TTATTAAATT T
TTTTATAAT AAAACATTAA TTTATGAATA -ATAATTCCT TTATTACTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAC CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTG-AA
CM(PG)1-P2
TAAAAAT-TA TTAATTAA TTTTTTAATA AATATA--T---TTT TAATAAATTT AATTGGGGAA ATTAAAAAAT TTATTAAATT T
TTTTATAAT AAAACATTAA TTTATGAATA -ATAATTCCT TTATTACTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAC CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTG-AA
CM(PG)-1-P5
TAGACGNCTA GNCCTTNG- ANGNNTTGAN CCNTAT-AT---NT TANTAAATTT AATGGGG'NA ATTAAAAAAT TTATTAAATT T
TTTTATAAT AAAACATTNN TTNATGAATA -ATAATTCCT TTATTACTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAC CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GCTG-AA
CM(PG)-1-P6
TAAAAATATA TTAATTCAA TTTTTTAATA AATATA--T---TTT TAATAAATTT AATTGGGGAA ATTAAAAAAT TTATTAAATT T
TTTTATAAT AAAACATTAA TTTATGAATA -ATAATTCCT TTATTACTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAC CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTGGAA
CM(PG)-1-P9
TAAAAATATA TTTTATTAA TTTATATATA AATATAAATA--TTT TAATAAATTT AATTGGGGNA ATTAAAAAAT TTAATAAATT T
TTTATTATT AATACATTAA TTTATGAATA -ATAATTCCT TAATTCTAAA ATTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAC CTAATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTGGAA
KB(2M)19-P1
TAAAAATATA TTAACTTTAA CTTTTTAATA AATATA--T---TTT TAATAAATTT AATTGGGGAA ATTAAAAAAT TTAATAAATT T
TTTTATAAT AAAACATTAA TTTATGAATA AACAAATTCCT TTATTATTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAT CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTGGAA
KB(2M)21-P1
TAAAAATATA TTAACTTTAA CTTTTTAATA AATATA--T---TTT TAATAAATTT AATTGGGGAA ATTAAAAAAT TTAATAAATT T
TTTCATAAT AAAACATTAA TTTATGAATA AACAAATTCCT TTATTATTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAT CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTG-AA
KB(MA)22(APR)
TAAAAATATA TTAACTTTAA CTTTTTAATA AATATA--T---TTT TAATAAATTT AATTGGGGAA ATTAAAAAAT TTAATAAATT T
TTTTATAAT AAAACATTAA TTTATGAATA AACAAATTCCT TTATTATTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAT CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GNTG-AA
KB(MA)22-1
TAAAAATATA TTAACTTTAA CTTTTTAATA AATATA--T---TTT TAATAAATTT AATTGGGGAA ATTAAAAAAT TTAATAAATT T
TTTTATAAT AAAACATTAA TTTATGAATA AACAAATTCCT TTATTATTAA TTTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAT CTTATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTGGAA
KB(MI)28-1
TAAAAATATA ATTTTATTAA ATTTTATATA TAAATATAAATTTT TAATAAATTT AATTGGGGNA ATTAAAAAAT TTAATAAATT T
TTTATTATT AATACATTAA TTTATGAATA ATAATTCCTT AATTTTAAAA -TTTAAAAAT AATTACCTTA GGGATAACAG CATAATT
TTT TTTAAAAGAC CTAATTAATA AAAAAGATTA TGACCTCGAT GTTG-AA

```

ภาพที่ 3.1.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S ในแมลงเบียน

297

CM (PG) -1-P1

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TATTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGT-GGTAG CCTTTAATTT -T-TATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATTT- -ATGCGTTCA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCG-C GCTATAA

CM (PG) -1-P2

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TATTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGT-GGTAG CCTTTAATTT -T-TATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATTT- -ATGCGTTCA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

CM (PG) -1-P5

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TATTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGT-GGTAG CCTTTAATTT -T-TATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATTT- -ATGCGTTCA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

CM (PG) -1-P6

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TATTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGT-GGTAG CCTTTAATTT -T-TATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATTT- -ATGCGTTCA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

KB (2M) 19-P1

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TATTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGT-GGTAG CCTTTAATTT ATTTATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATAT- -ATGCGTTTA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

KB (2M) 21-P1

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TTTTATATTT AATTGC---- AAGATGGCGT CAGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG TT-ACGGCTC AAGTTGGTAG CCTTTAATTT ATTTATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATAT- -ATGCGTTTA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCG-C GCTATAA

KB (MA) 22-1

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TTTTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGT-GGTAG CCTTTAATTT ATTTATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATAT- -ATGCGTTTA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCG-C GCTATAA

KB (MA) 22- (APR)

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TTTTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGT-GGTAG CCTTTAATTT ATTTATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATAT- -ATGCGTTTA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

NN (MI) 7

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TTTTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGTGGGAG CCTTTAATTT ATTTATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATAT- -ATGCGTTTA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

CM (PG) -1-P9

GTGATATGGG T-TACTACTT -TACGGAGTA TTGCCTATAC ATTCTTTTAT ATTTAATTGC AAGATTTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGAACGTC GCGACCCGTT GTGTGTTGG- TTTACGGCCC AAGTGGT-AG CCTTTAATTT TTTTATAAAA
 TTAAGACCC TTGGTGTGTTT -CTAAGTAAAC TACTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATTTT TATGCGTTTA
 TATTCGTAC AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

KB (MI) 28-1

GTGATATGGG T-TACTACTT -TACGGAGTA TTGCCTATAC ATTCTTTTAT ATTTAATTGC AAGATTTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGAACGTC GCGACCCGTT GTGTGTTGG- TTTACGGCCC AAGTGGT-AG CCTTTAATTT TTTTATAAAA
 TTAAGACCC TTGGTGTGTTT -CTAAGTAAAC TACTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATTTT TATGCGTTTA
 TATTCGTAC AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

NP (S) -1AL

ATGATATAGG TGTACTACTT GTAGTATTGC TTGTACATTC TTATATATTT ----TATTGC AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGAACGTC GCGACCCGTT GAGTGTCCGG- TCTATAGCCC GAGAGGT-AG CCTTTAATTT TTA----CAA
 TTAAGACCC TTGGTGTGTTT TCTGACTGGC TGCTCGATGG TATTCATAAG GTA----- ---A--TTTT -ATGCGTTTA
 TATCCGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGTAGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

NP (S) -2AL

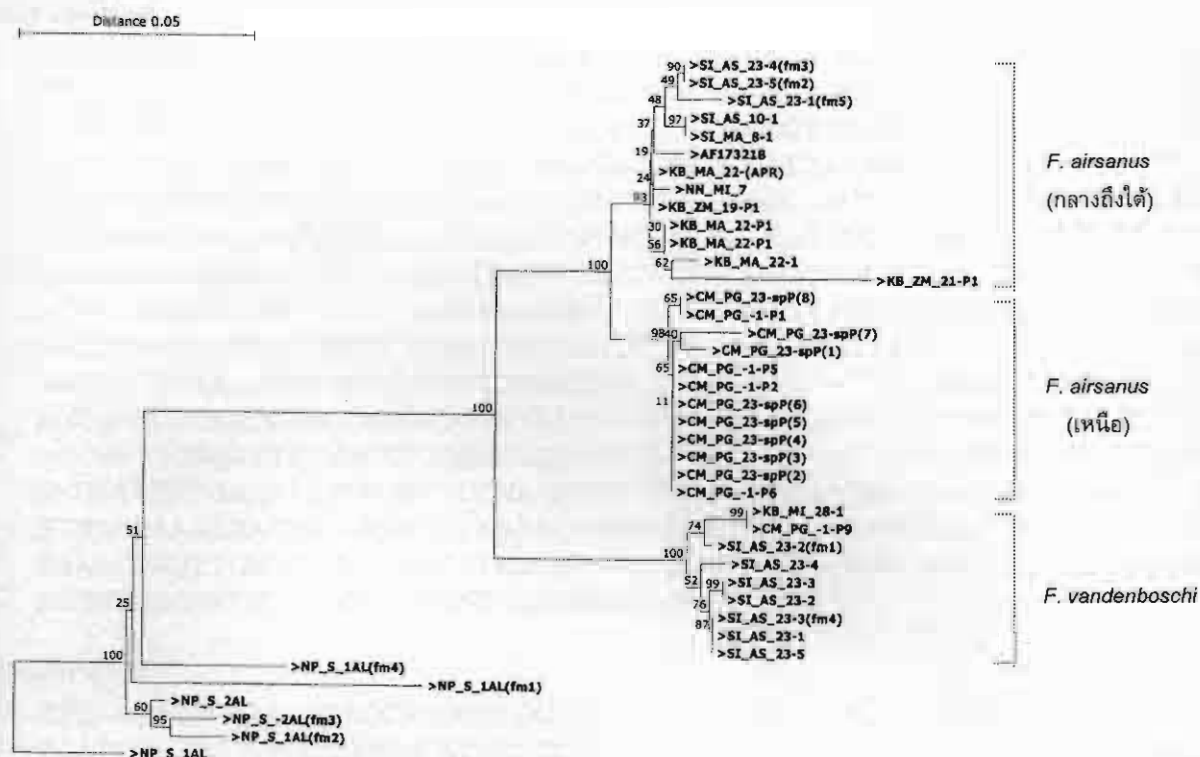
ATGATATAGG -GTACTACTT GTAGTATTGC TTGTACATTC TTATATATTT ----TATTGC AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGAACGTC GCGACCCGTT GAGTGTCCGG- TCTATAGCCC GAGAGGT-AG CCTTTAATTT TTA----CAA
 TTAAGACCC TTGGTGTGTTT TCTGACTGGC TGCTCGATGG TATTCATAAG GTATTAGGCC -CCATATTTT -ATGCGTTTA
 TATCCGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGTAGT AGTACGGACC TAGTGCCGTC GCTATAA

KB (MA) 22-P1

ATGATATGGG T-TACTACTT GTAGTATTGC CTGTACATTC TTTTATATTT AATTGC---- AAGATGTTGT CGGCGTGCAC
 TTCTCCCTTA GTAGGACGTC GCAACCCGTT GAGTGTCCGG- TTTACGGCTC AAGTGGTAG CCTTTAATTT ATTTATAAAT
 -TAAAGACCC TTGATGTTTT -CTAAGTGGC TGCTCGGCGG TATTCGTATG GTATTAGGCC -GCATATAT- -ATGCGTTTA
 TATCTGTGCG AAGCGCGGTC AATTTTGGT AGTACGGACC TAGTGCCG-C GCTATAA

ภาพที่ 3.1.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 28S ในแมลงเบียน

• โดยวิธีการจัดกลุ่ม cladogram ด้วยวิธีการของ Jukes and Cantor (1969) โดยใช้โปรแกรม Treecon version 1.3b ได้ผลดังภาพที่ 3.1.5



ภาพที่ 3.1.5 แสดง cladogram ของแมลงเบียนที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 28S ribosomal RNA gene พบว่า *F. vandenboschi* แยกจาก *F. arisanus* อย่างชัดเจน ขณะเดียวกันพบว่า *F. arisanus* แยกเป็น 2 กลุ่มย่อยตามสภาพภูมิศาสตร์

• โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ทำการสกัด DNA ของแมลงเบียนชนิดต่างๆ เช่น *D. longicaudata*, *F. vandenboschi*, *P. incisus* และ *Psytalia* spp. (ในรหัส BK(PL)2-PspM, KB(CG)101-PFF และ KB(GP)120-PspM) โดยใช้ DNeasy Tissue Kit และดูผลด้วยการทำ agarose gel electrophoresis

เพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ของ primers : "ITS 1F" และ "ITS 2R" ซึ่งจากการดูผลโดยการทำ agarose gel electrophoresis พบว่าได้แถบของ DNA ที่เป็น non-specific products ด้วย ดังนั้นจึงได้มีการค้นหา primers คู่ใหม่ ("ITS 18JF" และ "ITS 28ZR") ซึ่งดัดแปลงมาจาก primers ของ fruit fly และผลของการทำ PCR แสดงว่ามีแถบของ DNA ที่เป็น specific products เกิดขึ้นในแมลงเบียนบางชนิด เช่น BK(PL)2-PspM, KB(CG)101-PFF และ KB(GP)120-PspM

ในขณะที่ชนิดอื่นๆ ยังคงพบ non-specific products นำ specific PCR products ที่ได้จากแมลงเบียนชนิดต่างๆ มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ซึ่งได้ผลในขั้นต้นดังนี้

BK(PL)2-PspM

CACGGGGAACTACCAGGTCCANACAANATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGAT
CTTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGA
TAACGAACGAGACCTCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGCGTTTGCGGGCCGCTGGCTTCTTA
GGGGGACTATCGGCTCAAGCCGATGGAAGTGCGCGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAN
ATGTTCTGGGGCCGACGCGCGCTACACTGACAGGGCCAGCGAGTACATCACCTTGGCCGAGA
GGTCCGGGTAACTCTTGTTAAACCTGTCTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTT
CAACGAGGAATGCCTANTAGGCACNAGTCATCAGCTCGTGCCGATTACGTNCCTGCCTTTGT
ACACACCGCCCGTCTGCTACTACCGATTGAATGGCTCGGTGAGGCCTTCGGACTGGCCCGANGA
NGGTTGGCAACGACCCCCCANGGCCNGAAAGGTGGTCAAACCCCGTCATTTANANGAAGTAA
AAGTCGTACAAGGNTTNCCTANGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCCAATGTANGGTTCCCT
AGCGAGCCCAACCTNCCANCCGGGTTACTGTACCCTAATTGCTTCGGGGGGCCCCCTTTATG
GNCNCGGGGNTTTTNNCCCCGGGCCNNCCCCNCCGNAACCAANTTTNTTNNNNNTN
NNGAAANNNGANNTGNNGNTTCCNAANNNTAAAANTTTNACAATGGNTTTTTTGTTCGGG
NTNNNNAAAAAACNNCNAANGNNAANCNNNNNNNAATGNNAATNCNNNANNNTNNNNTTTT
NAANCNNNTTGNCCCCNGGTTTTNNGGGGGNTNCNTNCCNANNNTTTTTTNCNNAANN
NNGNTNGGNTTNGGGNGNNNNNNNNNNNGGGGA

KB(CG)101-PFF

TTTAACACGGGAACCTACCAGGCCCGGACACCGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCT
TGATTCCGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATT
CCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGGCGTACTTTCTGGTATCTTGAAGGCCCT
CGATTTCCGTGCGAGCGGTTTTTACTACCGACGTACAAACAAATCTTCTTAGAGGGACAGGCG
GCTTCTANCCGCACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCG
CACGCGCGCTACACTGAAGGAATCAGCGTGTCTTCCCTGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGC
TGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCA
GTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCGC
TACTACCGATTGAATGATTTANTGAGGTCTTCGGACTGGTGCGCGGCAATGTTTCGCATTGC
CGATGTTGCCNGGAAGATGACCAAACTTGATCATTTAGANGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGG
TTTCCGTANGTGAACCTGCNGAAGGATCATTAACGTATCACCAGAATAATAATATTTGGTT
TTATTCTTCATGANATTATCACATATGATGTGATGAAAAAATGTATTTGGACATGTAAATCA
TGTGAAAGCATGTTATTNCTAATACCCTTNAATATNTTTTNCAGAAATTCAATTTTTTTTA
AATCNTTTAATGTNTTAGCCTCCATTTTAAAATATTATTATTATGATTGCNGNAGGGGGGAA
CCCATGANAAATCTTTTTTATATGAAGGGGGGCTTAAAAACCCCCCANGGTTACATGANTTT
NCCCCCCCCCTTTCCCAAAATTTTGGGAGGATTTTTTGAATTCCAATGNAAAATTTNTTT
TNCCCAANAACNGGAAAGAACTTTTTTTTAACTTTAAATAAANTTATTTTTTTTTTNGGAC
GGNAAAGGNACCAATTGAAAAATTAAANTTTTTTNGGTNNTAGCGNTGGTTTTTAAN

KB(GP)120-PspM

CACGGGGAACTNCCAGGTCCAGACTTCTNCCGGATTGACGCATTGGCGATGCTTCATGATTA
 GAAGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTCTGTGACGTAAGTTGTCTGCCTTATCGCGATA
 ACGAGCGAGACCTCGGCCGCTAGTTGCTGAACTCACATTTTGTGGGTCTTCGGCTCTTAGC
 GGGACTACCGGAGACAATTCGGGGGAGGTTTCGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA
 CGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACGCAGCCAGCGAGTTTTTGGCCTTTTCCGAAAGG
 AATGGGTAACTCTTGTTAAACTGCGTCTGTGCTGGGGATAGAGCTTTGCAATTTTGTCTCTTGA
 ACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAACTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTA
 CACACCGCCCGTCGTTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGATCCTANGAGAAGTTTATGCA
 CGAGGGCAACCTCTANCAAGAAATTCGAATTCGATCAAACCTTGGTCATTTAGAGGAAGTACAA
 AGTCGTAACAAGGGTTNCGTAGGTGAACCTGCNGAAGGATCATTACTGAAGGCTACACGCCG
 ACATTGTGAAACGCTCCTCGGAGCACTACCTTGGTGTCTCCTCGGCCNCCCACGTTNAACTC
 TTATGTTATNTNTGCCACCAAAAATTTAAACTTCACACNGATCTNTGGTTTTGCATCGATGA
 AAACCCACCAAGCCCCATNGNAATGCGATTGCCACTGAGTCATTGATTTTGACCCCATTTGGC
 CATAGGTNTCTAAGGGATCTTGTGGAGCNCCTTTTCAACNACNTAATGGNNACANGTNG
 GTCNTTTAGGTNAAAAAATGAAGNCCCCTTNAACNNTTGCCGTCCTTCAAATTTTGGC
 CNCAAAANAGGGTCCCCTGANTTANCTTTTATTTNNNGGGAAAAAACCCCNCGTTTNTCTTT
 TTCGGGNCNAACGCNAAACNCAATTTAAACCCNCGGCCTTTTTTTAANCTGGCCNNNAAAAA
 GGGTAATTTTGGAAAGANCCCCNCGGGGGNACCCCCCAANCCCCCTTT

ข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปความแตกต่างได้ชัดเจน คงต้องรอการตรวจสอบเปรียบเทียบ
 ตัวอย่างเพิ่มเติมอีกในช่วงต่อไป

3.1.4.4 การศึกษาชีววิทยาเชิงประชากรของแมลงเบียน

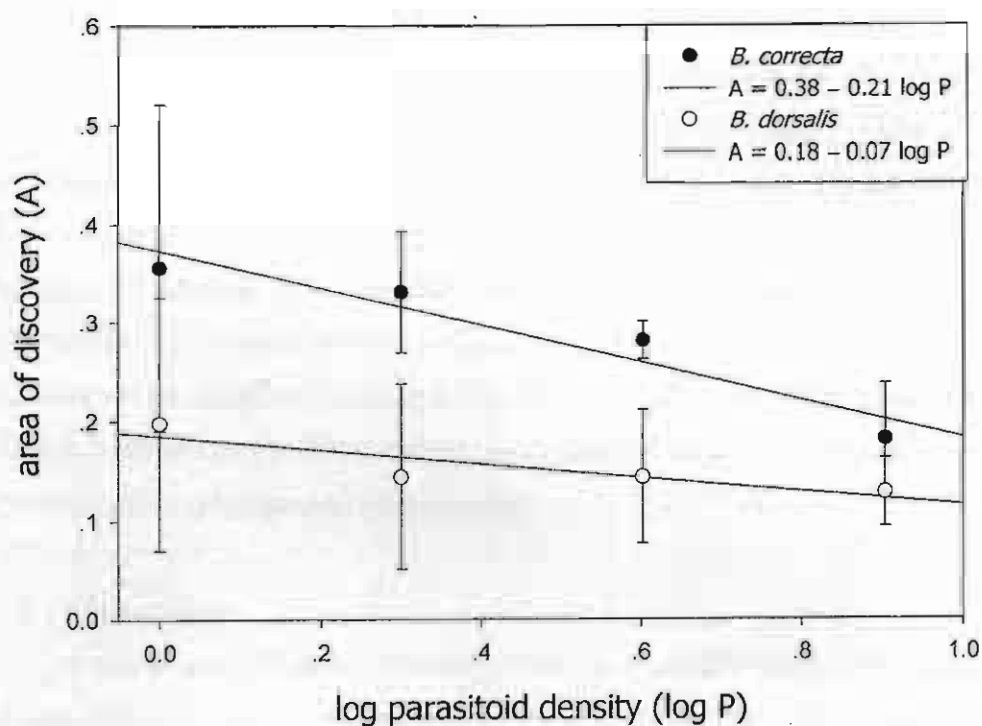
(ก) การศึกษาบทบาทของแมลงเบียน *Spalangia endius* ต่อแมลงวันผลไม้

● การทดลองนี้ใช้แมลงเบียนชนิด *Spalangia endius* โจมตีแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera dorsalis* และ *Bactrocera correcta* ในระยะดักแด้ ทำการศึกษา (a) การเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของแมลงวันผลไม้ (b) การเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของ *S. endius*

● ผลการทดลอง (a) เมื่อความหนาแน่นของแมลงวันผลไม้เพิ่มขึ้น จำนวนแมลงวันผลไม้ถูกทำลายมากขึ้น แต่เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายกลับลดลง (ตารางที่ 1.2) (b) เมื่อเพิ่มความหนาแน่นของแมลงเบียน *S. endius* พบว่าความสามารถในการค้นหาแมลงวันผลไม้ชนิด *B. correcta* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และสามารถอธิบายด้วยสมการ $A = 0.38 - 0.21 \log P$ ขณะที่แมลงเบียน *S. endius* ที่ความหนาแน่นเพิ่มขึ้น การค้นหาแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) และสามารถอธิบายด้วยสมการ $A = 0.18 - 0.007 \log P$ (หรือ $A = 0.18$ คงที่) ดังภาพที่ 3.1.6

หมายเหตุ: A = area discovery

P = จำนวนแมลงเบียน



ภาพที่ 3.1.6 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแมลงเบียนกับประสิทธิภาพในการค้นหาโฮสต์ (area of discovery)

ตารางที่ 3.1.2 ค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm \text{SD}$) ของแมลงวันผลไม้ที่ถูกโจมตีโดยแมลงเบียนชนิด *S. endius* ที่ความหนาแน่นต่างๆ ของแมลงวันผลไม้

Host density	Parasitoid: Host ratios	Mean* no. pupae parasitized per <i>S. endius</i>		Mean* % pupae parasitized	
		<i>B. corrceata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>B. corrceata</i>	<i>B. dorsalis</i>
10	1:2.5	2.00 $\pm$ 0.00	1.42 $\pm$ 0.14	80.0 $\pm$ 0.0	56.7 $\pm$ 5.8
20	1:5	3.58 $\pm$ 0.29	2.42 $\pm$ 0.63	71.7 $\pm$ 5.8	48.3 $\pm$ 12.6
40	1:10	7.08 $\pm$ 0.29	4.08 $\pm$ 1.18	70.8 $\pm$ 2.9	40.3 $\pm$ 11.8
80	1:20	10.75 $\pm$ 2.41	7.00 $\pm$ 0.66	53.7 $\pm$ 12.0 ^b	35.0 $\pm$ 3.3
Overall mean		5.85 $\pm$ 3.67	3.73 $\pm$ 2.30	69.1 $\pm$ 11.5	45.2 $\pm$ 11.6
Correlation		$r = 0.95; P < 0.05$	$r = 0.96; P < 0.05$	$r = -0.84; P < 0.05$	$r = -0.68; P < 0.05$

3.1.5 บทสรุป

การศึกษาแมลงวันผลไม้ (fruit flies) ในสกุล *Bactrocera* และแมลงเบียน (parasitoids) ของแมลงวันผลไม้จากเขตต่างๆ ทั่วประเทศไทย พบแมลงวันผลไม้หลายชนิดที่เป็นศัตรูของพืชทำความเสียหายให้กับไม้ผลและพืชป่าอย่างมาก และพบแมลงเบียนอย่างน้อย 6 ชนิดที่อาจเป็นประโยชน์ในการ

ควบคุมแมลงวันผลไม้ได้ดีในธรรมชาติ ในการสำรวจและจัดจำแนกแมลงเบียนโดยวิธีสัณฐานวิทยา (morphology) และวิธีไมโททิกคาริโอไทป์ (mitotic karyotype) สามารถแยกแมลงเบียนได้ 3 กลุ่ม คือ (ก) กลุ่ม *Diachasmimorpha* (ได้แก่ *D. longicaudata* และ *D. dacusii*) (ข) กลุ่ม *Fopius* (ได้แก่ *F. arisanus* และ *F. vandenboschi*) (ค) กลุ่ม *Psytalia* (ได้แก่ *P. incisi* และ *P. fletcheri*) การศึกษาโดยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 28S ribosomal RNA gene ได้ข้อมูลที่บ่งชี้ว่าแมลงเบียนชนิด *F. arisanus* เป็นกลุ่มสปิชีส์ซับซ้อน และมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมตามสภาพภูมิศาสตร์คือ *F. arisanus* จากภาคเหนือแยกจากกลุ่มภาคกลางและใต้อย่างชัดเจน การศึกษากลุ่มสปิชีส์ซับซ้อนของแมลงเบียนอื่นๆ อยู่ในช่วงการดำเนินการศึกษาโดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงขอบเขตการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มสปิชีส์ซับซ้อน (phylogenetic relationships)

3.1.6 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาแมลงเบียนเพื่อการควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้ยังต้องการศึกษาและตรวจสอบทั้งในระดับกว้างและลึกกล่าวคือ ต้องทำการสำรวจ, ศึกษาในเวศวิทยา, ชีววิทยา ทั้งระดับประชากรจนถึงโมเลกุล ตลอดจนการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างพืชอาศัย แมลงให้อาศัย แมลงเบียน ฯลฯ การศึกษาและติดตามผลการศึกษาสมาเสมอจะยังผลในการลดการระบาดของแมลงวันผลไม้อย่างจริงจัง

3.1.7 เอกสารอ้างอิง

- พิมลพร นันทะ, สกิต ปฐมรัตน์, รัตนา รุ่งฟ้า และรุจ มรกต. 2525. รายชื่อแมลงศัตรูธรรมชาติของพืชเศรษฐกิจบางชนิดในประเทศไทย การสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี ครั้งที่ 1 (2-4 มิถุนายน 2525) กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 121-1251.
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. (ชื่อพฤกษศาสตร์ - ชื่อพื้นบ้าน). กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ. 379 หน้า
- แสน ดิถวิพัฒน์. 2529. พืชอาหารของแมลงวันทองชนิดต่างๆ ในประเทศไทย. ว. เกษตรพระจอมเกล้า 4: 1.15.
- Chinajariyawong A., Clarke, A.R., Tirasurat, M., Kritsaneepiboon, S., Lahey, H. A., Vijaysegaran, S. and Walter, G.H. 2000. Survey of opiine parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand and Malaysia. The Raffles Bulletin of Zoology 48: 71-101.
- Clausen, C.P. 1978. Tephritidae (Trypetidae, Trupaneidae). In: C.P. Clausen (Editor), Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds.: a world review. U.S. Dep. Agric. Handb. 480: 320-325.

- Clausen, C.P., Clancy, D.W. and Chock, Q.C. 1965. Biological control of the Oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1322: 1-102.
- Gilstrap, F.E. and Hart, W.G. 1987. Biological control of the Mediterranean fruit fly in the United States and Central America. U.S. Dep. Agric. ARS-56: 1-64.
- Guimio, G.M. 2000. Swarming, delayed sexual maturation of males, and mating behavior of *Fopius arisanus* (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae). Insect. Behav. 20: 423-438.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro H.H. (ed.), Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, pp. 21-132.
- Kitthawee, S., Singhapong, S. and Baimai, V. 1999. Metaphase chromosomes of parasitic wasp, *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera : Braconidae) in Thailand. Cytologia 64: 111-115.
- Kitthawee, S., Julsilikul, D., Sharpe, R.G. and Baimai, V. 1999. Protein polymorphism in natural populations of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera : Braconidae) in Thailand. Genetica 105: 125-131.
- Kitthawee, S. 2000. Seasonal occurrence of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera : Braconidae), a parasitoid of *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera : Tephritidae) in a guava orchard in central Thailand. Science Asia 26: 87-92.
- Messing R.H. and Jang, E.B. 1992. Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) to host-fruit stimuli. Environ Entomol. 21: 1189-1195.
- Ramadan, M.M., Wong, T. T.Y. and Beardsley, J.W. 1989a. Survivorship, potential and realized fecundity of *Biosteres tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) a larval parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Entomophaga 34: 291-297.
- Ramadan, M.M., Wong, T. T.Y. and Beardsley, J. W. 1989b. Insectary production of *Biosteres tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) a larval parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Proc. Hawaii. Entomol. Soc. 29: 41-48.
- Ramadan, M.M. and Wong, T. T.Y. 1990. Biological observations on *Tetrastichus giffardianus* (Hymenoptera: Eulophidae), a gregarious endoparasitoid of the Mediteranian fruit fly and the Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). Proc. Hawaii. Entomol. Soc. 30: 59-62.

- Wharton, R.A. and Gilstrap, F.E. 1983. Key to and status of opiine braconid (Hymenoptera) parasitoid used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* s.l. (Diptera: Tephritidae) Ann. Entomol. Soc. Am. 76: 721-742.
- White, I.M. and Elson-Harris, M.M. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: their identification and bionomics. Centre for Agriculture and Biosciences International, Wallingford Oxon, UK.
- Wilson, F. 1960. A review of the biological control of insects and weeds in Australia and Australian New Guinea. Commonwealth Institute of Biological Control Technical Communication. 1: 24-26.

3.2 จุลินทรีย์ *Wolbachia*

3.2.1 บทนำ

ตามหลักพันธุศาสตร์การเกิดสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ใหม่เป็นผลจากปฏิกริยาร่วมระหว่างพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อมของประชากรนั้นๆ ลักษณะทางพันธุกรรมของบรรพบุรุษย่อมถ่ายทอดให้ลูกหลานสปีชีส์ทางชีววิทยา หมายถึง กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทั่วไปและลักษณะทางกรรมพันธุ์คล้ายคลึงกันสามารถผสมพันธุ์กันได้และสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมให้ลูกหลานได้เป็นปกติ หรืออาจกล่าวว่สปีชีส์เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีกลุ่มยีนหรือยีนพูล (gene pool) ของประชากรจากบรรพบุรุษเดียวกัน

การที่สิ่งมีชีวิตชนิดใหม่สามารถดำรงอยู่ได้ก็เนื่องจากมีกลไกของการแยกกันในเชิงพันธุศาสตร์ (genetic isolation) บางกรณีอาจเป็นเพราะต่างก็แยกกันอยู่คนละที่ (geographic isolation) และในบางกรณีก็เป็นเพราะมีกลไกที่แยกกันอย่างเด่นชัด เพื่อป้องกันการผสมพันธุ์กันระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกัน (reproductive isolation) โดยกลไกที่ป้องกันการผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์กันนั้น สามารถเกิดจากปัจจัยหลายชนิด เช่น ความแตกต่างกันของฤดูกาลผสมพันธุ์ ฤดูกาลวางไข่ หรือเกิดจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรียหรือไวรัส ที่ก่อให้เกิดการเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน ซึ่งนับเป็นปรากฏการณ์ที่เอื้อให้ทั้งสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านและสิ่งมีชีวิตร่วมอาศัยสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นต่อไปได้ จัดว่าเป็นภาวะที่สิ่งมีชีวิตทั้งสองอาศัยอยู่ร่วมกันในเชิงพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันที่เรียกว่า ซิมไบโอซิส (symbiosis) โดยเรียกสิ่งมีชีวิตร่วมอาศัยว่า ซิมไบออน (symbiont)

ได้มีการรายงานการพบซิมไบออนในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ขาปล้องชนิดต่างๆ โดยเฉพาะในแมลง ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มของซิมไบออนได้หลายกลุ่มตามอวัยวะที่พบ เช่น กลุ่มที่พบในอวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive symbionts) กลุ่มที่พบในทางเดินอาหาร (extracellular nutritional symbionts) เป็นต้น โดยแบคทีเรียนับว่าเป็นซิมไบออนกลุ่มใหญ่ที่สุดที่มีการศึกษาวิจัย

แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นซิมไบออนที่พบในสัตว์ขาปล้องรวมทั้งหนอนพยาธิ ซึ่งจะพบทั้งในอวัยวะสืบพันธุ์และอวัยวะอื่นๆ ของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน โดยแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถทำให้เกิดการผันแปรของการสืบพันธุ์ (reproductive alteration) ในสัตว์ขาปล้อง เช่น ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เกี่ยวข้องกับความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมของแมลงเจ้าบ้าน (cytoplasmic incompatibility) รวมทั้งปรากฏการณ์ที่แมลงเจ้าบ้านจำพวก ต่อ แตน สามารถมีลูกเพศเมียได้ โดยไม่ต้องมีการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเพศผู้และเพศเมีย (parthenogenesis) ปรากฏการณ์ที่สิ่งมีชีวิตจำพวก Isopod มีลูกเพศเมียมากกว่าเพศผู้ (feminization) และในพยาธิหนอนตัวกลมแบคทีเรีย *Wolbachia* ยังมีความสัมพันธ์แบบ mutualistic อีกด้วย

ปรากฏการณ์ที่เกิดจากความผิดปกติในการผสมพันธุ์ของแมลงและมีผลให้ลูกผสมที่ได้ไม่สามารถเจริญตามปกติซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้น จัดเป็นการแยกผสมพันธุ์แบบหนึ่งโดยไม่ได้เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดหน่วยพันธุกรรม ในกรณีการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเจ้าบ้านที่เพศผู้มีแบคทีเรียแต่เพศเมียไม่มีแบคทีเรียจะมีผลให้ไข่ที่ไม่สามารถเจริญตามปกติ แต่ในทางกลับกันถ้าเพศผู้ไม่มีแบคทีเรียแต่เพศเมียมีแบคทีเรีย เมื่อผสมพันธุ์กันจะได้ไข่ที่มีแบคทีเรียอยู่และสามารถเจริญตามปกติ

ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่าความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมแบบทางเดียว (unidirectional cytoplasmic incompatibility)

ดังนั้น แมลงเจ้าบ้านที่มีแบคทีเรียอยู่ในเซลล์สืบพันธุ์จะได้เปรียบในการถ่ายทอดหน่วยพันธุกรรมไปยังรุ่นต่อไป จนในที่สุดประชากรแมลงเจ้าบ้านที่มีแบคทีเรียอยู่ซึ่งมีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะเข้าแทนที่ประชากรแมลงเจ้าบ้านที่ไม่มีแบคทีเรียในสภาพธรรมชาติ คุณสมบัตินี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นพาหะนำยีนที่เป็นประโยชน์ต่อการควบคุมประชากรแมลงพาหะนำโรคเข้าไปในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะซึ่งเป็นแมลงเจ้าบ้านได้ นอกจากนี้ยังมีปรากฏการณ์ความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมแบบสองทาง (bidirectional cytoplasmic incompatibility) ซึ่งปรากฏการณ์นี้จะเกิดเมื่อมีการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเจ้าบ้านเพศผู้ และ เพศเมียที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างชนิดกัน ดังนั้น ด้วยปรากฏการณ์นี้สามารถทำให้เกิดกลไกที่ป้องกันการผสมพันธุ์กันระหว่างประชากรของแมลงเจ้าบ้านที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างชนิดกัน เมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ได้

การศึกษาการวิวัฒนาการเชิงชีวโมเลกุลของแบคทีเรีย *Wolbachia* และแมลงเจ้าบ้านชนิดต่างๆ จะเปิดโอกาสให้เราเข้าใจวิวัฒนาการร่วมกัน ระหว่างแบคทีเรียและแมลงเจ้าบ้านมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีความหลากหลายของแมลง เช่น แมลงในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน ความรู้ความเข้าใจในชีววิทยาระดับพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการร่วมกันมาเช่นนี้จะช่วยให้นักวิทยาศาสตร์แสวงหามาตรการควบคุม และการจัดการกับแมลงศัตรูและแมลงพาหะอย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากร ยังช่วยให้การอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพและความหลากหลายทางชีวภาพดำเนินไปในทิศทางที่ถูกต้องและสอดคล้องกับธรรมชาติของท้องถิ่นไทยต่อไป

3.2.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ที่อยู่ในแมลงวันผลไม้ที่ติดเชื้อ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* และ *Bactrocera tau*
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้จิ้งนัส *Bactrocera* ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Wolbachia* และแมลงวันผลไม้ให้อาศัย
5. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Wolbachia* ที่อยู่ในแมลงเบียนของแมลงวันผลไม้
6. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงเบียนของแมลงวันผลไม้
7. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Wolbachia* และแมลงเบียนให้อาศัย

3.2.3 วิธีการศึกษา

3.2.3.1 *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้

(ก) การศึกษานี้ได้ใช้ตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากการศึกษาครั้งที่แล้ว นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับยีนโปรตีนหุ้มเปลือกนอก (*Wolbachia* outer surface protein gene, *wsp*) (Zhou, et al., 1998) และ UEA 7 และ UEA10 (Lunt et al., 1995) ดังลำดับเบสที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.1 โดยใช้ไพรเมอร์ UEA 7 และ UEA10 นั้นมีความจำเพาะต่อยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ของไมโทคอนเดรีย ลำดับเบสที่ได้สามารถนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ รวมทั้งในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* complex และ *Bactrocera tau* complex ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.2.2

ตารางที่ 3.2.1 แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Primer name	Sequence (5'→3')	Reference
UEA7	TAC AGT TGG AAT AGA CGT TGA TAC	Lunt et al. (1995)
UEA10	TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATTA	Lunt et al. (1995)
<i>wsp</i> F	TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC	Zhou et al. (1998)
<i>wsp</i> R	AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA	Zhou et at. (1998)
<i>fts</i> z F	GGA CCG GAT CCG TAT GCC CAT TGC AGA GCT TG	Holden et al. (1993)
<i>fts</i> z R	GGA CCG AAT TCG CCA TGA GTA TTC ACT TGG CT	Holden et al. (1993)

(ข) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *wsp* ซึ่งมีขนาด 606 bp และ Cytochrome Oxidase Subunit I ซึ่งมีขนาด 636 bp โดยวิธี PCR ได้ทำในสารละลายปฏิกิริยาขนาด 20 μ l โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ : 12.5 μ l dd H₂O, 2 μ l 10x PCR buffer (Promega), 2 μ l 25 mM MgCl₂, 0.5 μ l dNTPs (เบสละ 10 mM), 0.5 μ l 20 uM ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง *wsp* F และ *wsp* R (สำหรับ *Wolbachia*) และ UEA 7 และ UEA10 (สำหรับ Cytochrome Oxidase Subunit I) และ 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงวันผลไม้ จำนวน 2 μ l จากนั้นสารละลายที่ได้ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Hybaid, UK) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ : ที่ 94°C นาน 3 นาทีจำนวน 1 รอบและ ที่ 94°C นาน 1 นาที , 50°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาทีจำนวน 35 รอบ

(ค) PCR product จำนวน 10 μ l ถูกนำมาวิ่งบน gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ที่ต้องการ จากนั้นได้ทำการเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้ากับ pGEM-T vector (promega) โดยใช้ 1 μ l ของ PCR product incubate ที่ 4°C นาน 14-16 ชั่วโมง และทำการโคลน pGEM-T vector โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่พลาสมิดของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5- α จากนั้นนำพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอของยีน *wsp* และ Cytochrome Oxidase Subunit I มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Qiaprep Plasmid Miniprep Kit (Qiagen)

และพลาสมิดจำนวน 3 โคลนได้นำไปหาลำดับเบสด้วยวิธีหาลำดับแบบอัตโนมัติ (Automate Sequencing) โดยหน่วยบริการชีวภาพ, สวทช

ตารางที่ 3.2.2 แสดงสปีชีส์ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera* ที่ใช้ในการศึกษา

Taxon name	Location	Plant Host species (Family)
<i>B. arecae</i> (Drew and Hancock)	Chumporn	<i>Areca catechu</i> (Palmae)
<i>B. carambolae</i> (Drew and Hancock)	Ranong	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)
<i>B. dorsalis</i> (Hendel)	Ranong	<i>Sandorium koetjape</i> (Meliaceae)
<i>B. dorsalis</i> sp. L	Ranong	<i>Platea</i> sp. (Icaninaceae)
<i>B. dorsalis</i> sp. O	Ranong	<i>Willughbeia firma</i> (Aponaceae)
<i>B. pyrifoliae</i> (Drew and Hancock)	Chiangmai	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)
<i>B. raiensis</i> (Drew and Hancock)	Ranong	<i>Sandorium koetjape</i> (Meliaceae)
<i>B. tau</i> (Walker)	Kanchanaburi	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. tau</i> sp. B	Kanchanaburi	<i>Siphonodosa celastrineus</i> (Celastraceae)
<i>B. tau</i> sp. C	Kanchanaburi	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. tau</i> sp. D	Ranong	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. tau</i> sp. E	Kanchanaburi	<i>Strychnos thorelii</i> (Strychnaceae)
<i>B. tau</i> sp. F	Ranong	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> (Flacouriaceae)
<i>B. tau</i> sp. I	Songkhla	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Bactrocera) dorsalis</i> (Hendel)	Ranong	<i>Sandorium koetjape</i> (Meliaceae)
<i>B. (Bactrocera) dorsalis</i> sp. A1	Ranong	<i>Siphonodon celastrineus</i> (Celastraceae)
<i>B. (Bactrocera) correcta</i> (Bezzi)	Ranong	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae)
<i>B. (Bactrocera) correcta</i> sp. B	Ranong	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae)
<i>B. (Bactrocera) latifrons</i> (Hendel)	Chiangmai	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Solanaceae)
<i>B. (Bactrocera) tuberculata</i> (Bezzi)	Ranong	<i>Careya sphaerica</i> (Barringtoniaceae)
<i>B. (Asiadacus) modica</i> (Hardy)	Phetchaburi	<i>Diplocyclos palmatus</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Hemigymnodacus) diversa</i> (Coquillett)	Amnat Charoen	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Zeugodacus) ascita</i> (Hardy)	Kanchanaburi	<i>Lagenaria siceraria</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Zeugodacus) ascita</i> sp. B	Maehongsorn	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Zeugodacus) caudate</i> (Fabricius)	Ranong	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Zeugodacus) cucurbitae</i> (Coquillett)	Chiangmai	<i>Lycopersicon seculentum</i> (Solanaceae)
<i>B. (Zeugodacus) tau</i> (Walker)	Kanchanaburi	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)

(ง) ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธี Maximum Parsimony, Neighbor-Joining และ Maximum Likelihood ด้วยโปรแกรม PAUP version 2 beta 2 (Swofford, 1997) โดยค่า bootstrap value ซึ่งสนับสนุนแต่ละกิ่งของต้นไม้วิวัฒนาการ ได้คำนวณ 1,000 ซ้ำ ในการคำนวณแบบ Maximum Parsimony และ Neighbor-Joining และได้คำนวณ 100 ซ้ำ ในการคำนวณแบบ Maximum Likelihood นอกจากนี้ความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *wsp* และ ยีน *Cytochrome*

Oxidase Subunit I ของไมโทคอนเดรียในแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ ยังถูกนำมาคำนวณโดยวิธี Kimura2-parameter (Kimura,1980)

(จ) ได้ทำการสำรวจหาแมลงวันผลไม้ที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* อาศัยอยู่ด้วยเพิ่มเติม โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้เพิ่ม 11 ชนิด จาก 11 จังหวัด ดังแสดงในตารางที่ 3.2.3 ซึ่งผลไม้ที่มีตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ ได้ถูกนำมาเก็บไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล จากนั้นจึงทำการจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการ ต่อมาได้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้โดยใช้สารละลาย STE (100 mM NaCl , 10 mM Tris Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH8.0; O'Neill et al., 1992) สารละลายที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอถูกนำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *wsp* (Zhou et al.,1998) ซึ่งเป็นไพรเมอร์จำเพาะ โดยลำดับเบสที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.1

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *wsp* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ทำโดยวิธี PCR ดังรายละเอียดในข้อ 2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ซึ่งมีขนาด 636 bp โดยวิธี PCR ได้ทำในสารละลายปฏิกิริยาขนาด 20 μ l โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ : 12.5 μ l dd H₂O, 2 μ l 10x PCR buffer (Promega), 2 μ l 25 mM MgCl₂, 0.5 μ l dNTPs (เบสละ 10 mM), 0.5 μ l 20 uM ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง UEA 7 และ UEA10 และ 1 unit Tag DNA polymerase (Promega) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงวันผลไม้ จำนวน 2 μ l จากนั้นสารละลายที่ได้ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Hybaid , UK) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ : ที่ 94°C นาน 3 นาทีจำนวน 1 รอบ และ ที่ 94°C นาน 1 นาที, 50°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาทีจำนวน 35 รอบ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จำนวน 10 μ l มาวิ่งบน gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้ที่ตรวจสอบ

ตารางที่ 3.2.3 แสดงผลการตรวจหาจุลินทรีย์ *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้โดยเทคนิค PCR

Date	Population code	Province	Plant host	Insect species	PCR results	
					No. tested	No. infected
18 – Feb.	KB(ZM) 20	Kanchanaburi	<i>Zizyphus mauritiana</i>	<i>B. dorsalis</i>	6	-
18 – Feb.	KB(ZM)21	Kanchanaburi	<i>Zizyphus mauritiana</i>	<i>B. dorsalis</i> (abdomen M)	7	-
25 – Feb.	KB(SC)25	Kanchanaburi	<i>Siphonodon celastreus</i>	<i>B. tau</i> complex species B	18	-
7 – Mar.	KB(MA)23	Kanchanaburi	<i>Musa acuminata</i>	<i>B. dorsalis</i>	10	-
7 – Mar.	KS(Ssp)26	Kallasin	<i>Strychnos</i> sp.	<i>B. nongensis</i>	2	-
8 – Mar.	KB(SA)27	Kanchanaburi	<i>Solanum aculeatissimum</i>	<i>B. latifrons</i>	11	-
13 – Mar.	CP(CG)2	Chumporn	<i>Coccinia grandis</i>	<i>B. cucurbitae</i>	4	-
13 – Mar.	CP(PG)1	Chumporn	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. dorsalis</i>	10	-
13 – Mar.	CP(PG)1	Chumporn	<i>Psidium guajava</i>	<i>B. dorsalis</i> complex (<i>B. carambolae</i>)	4	-
13 – Mar.	CP(CG)2	Chumporn	<i>Coccinia grandis</i>	<i>B. tau</i>	2	-
14 – Mar.	RN(AL)1	Ranong	<i>Artocarpus lakoocha</i>	<i>B. dorsalis</i> complex (<i>B. carambolae</i>)	10	-
30 – Mar.	CM(LE)1	Chiangmai	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>B. latifrons</i>	6	-
30 – Mar.	CM(LE)1	Chiangmai	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>B. cucurbitae</i>	3	-
31 – Mar.	CR(PP)1	Chiangmai	<i>Prunus persica</i>	<i>B. dorsalis</i>	2	-
31 – Mar.	CR(PP)1	Chiangmai	<i>Prunus persica</i>	<i>B. pyrifoliae</i>	10	-
31 – Mar.	CR(PC)2	Chiangmai	<i>Prunus cerasoides</i>	<i>B. pyrifoliae</i>	10	-
8 – Apr.	NN(MI)1	Nakorn Nayok	<i>Mangifera indica</i>	<i>B. dorsalis</i>	10	-
15 – Apr.	RN(WF)2	Ranong	<i>Willughbeia firma</i>	<i>B. dorsalis</i> complex species O	10	-
15 – Apr.	WNR(CA)1	Nakorn Ratchasima	<i>Capsicum annuum</i>	<i>B. latifrons</i>	6	-
15 – Apr.	WNR(SS)1	Nakorn Ratchasima	<i>Syzygium samarangense</i>	<i>B. dorsalis</i>	6	-

ตารางที่ 3.2.3 (ต่อ)

Date	Population code	Province	Plant host	Insect species	PCR results	
					No. tested	No. infected
15 – Apr.	WNR(CG)1	Nakorn Ratchasima	<i>Coccinia grandis</i>	<i>B. cucurbitae</i>	6	-
15 – Apr.	WNR(CG)1	Nakorn Ratchasima	<i>Coccinia grandis</i>	<i>B. dorsalis</i>	2	-
15 – Apr.	WNR(CG)1	Nakorn Ratchasima	<i>Coccinia grandis</i>	<i>B. correcta</i>	1	-
22 – Apr.	WSB(AS)1	Saraburi	<i>Artabotrys siamensis</i>	<i>B. dorsalis</i>	12	-
22 – Apr.	WSB(AS)1	Saraburi	<i>Artabotrys siamensis</i>	<i>B. carambolae</i>	8	-
23 – Apr.	KB(LS)31	Kanchanaburi	<i>Lagenaria siceraria</i>	<i>B. ascita</i>	10	-
26 – Apr.	WNP(SS)2	Nokorn Pathom	<i>Syzygium samarangense</i>	<i>B. correcta</i>	10	-
2 – May	NN(SK)9	Nakorn Nayok	<i>Sandoricum koetjape</i>	<i>B. dorsalis complex (B. raiensis)</i>	10	-
6 – May	WNR(SS)2	Nakorn Ratchasima	<i>Syzygium samarangense</i>	<i>B. correcta</i>	12	-
6 – May	WNR(CG)2	Nakorn Ratchasima	<i>Coccinia grandis</i>	<i>B. cucurbitae</i>	26	-
14 – May	RN(GH)3	Ranong	<i>Garcinia hanburyi</i>	<i>B. dorsalis complex (B. carambolae)</i>	4	-
14 – May	RN(GH)3	Ranong	<i>Garcinia hanburyi</i>	<i>B. dorsalis</i>	10	-
15 – May	WBK(TC)1	Bangkok	<i>Terminalia catappa</i>	<i>B. dorsalis</i>	30	-
17 – May	CP(CP)18	Chumpom	<i>Carica papaya</i>	<i>B. tau</i>	5	-
21 – May	WBK(SK)2	Bangkok	<i>Sandoricum koetjape</i>	<i>B. dorsalis</i>	30	-
21 – May	WNP(LA)2	Nakorn Pathom	<i>Luffa acutangula</i>	<i>B. cucurbitae</i>	30	-
24 – May	WBK(PL)3	Bangkok	<i>Polyalthia longifolia</i>	<i>B. dorsalis</i>	30	-
27 – May	WBK(SK)3	Bangkok	<i>Sandoricum koetjape</i>	<i>B. dorsalis</i>	30	-
4 – Jun	WNR(MC)3	Nakorn Ratchasima	<i>Momordica charantia</i>	<i>B. cucurbitae</i>	10	-
8 – Jun	KB(ZM)22	Kanchanaburi	<i>Musa acuminata</i>	<i>B. dorsalis (abdomen M)</i>	17	-

3.2.3.2. *Wolbachia* ในแมลงเบียน

(ก) การศึกษานี้ได้ใช้ตัวอย่างแมลงเบียนจากการศึกษาครั้งที่แล้ว นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับโปรตีนหุ้มเปลือกนอกของแบคทีเรีย *Wolbachia* (*wsp*) และ UEA 7 และ UEA10 (Lunt et al., 1995) ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวจะมีความจำเพาะต่อยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ของไมโทคอนเดรีย ดังแสดงลำดับเบสไว้ในตารางที่ 3.2.1 และลำดับเบสที่ได้สามารถนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแมลงเบียนชนิดต่างๆ รวมทั้งในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Biosteres arisanus* อีกทั้งความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงเจ้าบ้านด้วย

(ข) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *wsp* ซึ่งมีขนาด 606 bp และ Cytochrome Oxidase Subunit I ซึ่งมีขนาด 636 bp โดยวิธี PCR ได้ทำในสารละลายปฏิกิริยาขนาด 20 μ l โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ : 12.5 μ l dd H₂O, 2 μ l 10x PCR buffer (Promega), 2 μ l 25 mM MgCl₂, 0.5 μ l dNTPs (เบสละ 10 mM), 0.5 μ l 20 uM ไพรเมอร์จำเพาะของทั้งสองยีน และ 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงเบียนจำนวน 2 μ l จากนั้นสารละลายที่ได้ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Hybaid, UK) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้: ที่ 94°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบและ ที่ 94°C นาน 1 นาที, 50°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ

(ค) PCR product จำนวน 10 μ l ถูกนำมาวิ่งบน gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ที่ต้องการ จากนั้นได้ทำการเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้ากับ pGEM-T vector (promega) โดยใช้ 1 μ l ของ PCR product incubate ที่ 4°C นาน 14-16 ชั่วโมง และทำการโคลน pGEM-T vector ซึ่งมีดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่พลาสมิดของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5- α จากนั้นนำพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอของยีน *wsp* และ ยีน Cytochrome Oxidase Subunit I มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Qiaprep Plasmid miniprep Kit (Qiagen) และพลาสมิดจำนวน 3 โคลนได้นำไปหาลำดับเบสด้วยวิธีหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (Automate Sequencing) โดยหน่วยบริการชีวภาพ, สวทช

(ง) ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธี Maximum Parsimony, Neighbor-Joining และ Maximum Likelihood ด้วยโปรแกรม PAUP version 2 beta 2 (Swofford, 1997) โดยค่า bootstrap value ซึ่งสนับสนุนแต่ละกิ่งของต้นไม้วิวัฒนาการ ได้คำนวณ 1,000 ซ้ำ ในการคำนวณแบบ Maximum Parsimony และ Neighbor-Joining และได้คำนวณ 100 ซ้ำ ในการคำนวณแบบ Maximum Likelihood นอกจากนี้ความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ของไมโทคอนเดรียในแมลงเบียนชนิดต่างๆ ยังถูกนำมาคำนวณโดยวิธี Kimura2-parameter (Kimura, 1980)

(จ) ได้ทำการสำรวจหาแมลงเบียนที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* อาศัยอยู่ด้วย โดยเก็บตัวอย่างแมลงเบียนเพิ่ม 16 ชนิด จากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทยดังแสดงในตารางที่ 3.2.4 ซึ่งผลไม้ที่มีตัวอ่อนของแมลงเบียนได้ถูกนำมาเก็บไว้ที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล จากนั้นได้ทำการจำแนกชนิดของแมลงเบียนโดยวิธีทางสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการ ต่อมาได้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมลงเบียนโดยใช้สารละลาย STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0;

O'Neill et al., 1992) สารละลายที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอถูกนำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *wsp* (Zhou et al., 1998) ซึ่งเป็นไพรเมอร์จำเพาะ โดยลำดับเบสได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.1

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *wsp* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ทำโดยวิธี PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ซึ่งมีขนาด 636 bp โดยวิธี PCR ได้ทำในสารละลายปฏิกิริยาขนาด 20 μ l โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ : 12.5 μ l dd H₂O, 2 μ l 10x PCR buffer (Promega), 2 μ l 25 mM MgCl₂, 0.5 μ l dNTPs (เบสละ 10 mM), 0.5 μ l 20 uM ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง UEA 7 และ UEA10 และ 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงเบียน จำนวน 2 μ l จากนั้นสารละลายที่ได้ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Hybaid , UK) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ : ที่ 94°C นาน 3 นาทีจำนวน 1 รอบและที่ 94°C นาน 1 นาที , 50°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาทีจำนวน 35 รอบ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จำนวน 10 μ l ถูกนำมาวิ่งบน gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแมลงเบียนที่ตรวจสอบ

ตารางที่ 3.2.4 แสดงผลการตรวจหาจุลินทรีย์ *Wolbachia* ในแมลงเบียนโดยเทคนิค PCR

Parasitoid Species	Population code	Province	Host Plant	No. Tested	Min. Infect Freq. (%)	Total No. per Species	Min. Infect Freq. (%) per species
<i>F. arisanus</i>	KB(ZM) 19	Kanchanaburi	<i>Zizyphus mauritiana</i>	10	90.0(9)	63	71.42(45)
	KB(ZM)21	Kanchanaburi	<i>Zizyphus mauritiana</i>	9	55.6(5)		
	KB(MA)22	Kanchanaburi	<i>Musa acuminata</i>	13	92.3(12)		
	KB(MA)22	Kanchanaburi	<i>Musa acuminata</i>	1	100.0(1)		
	NN(MI)7	Nakorn Nayok	<i>Mangifera indica</i>	1			
	CM(PG)1	Chiangmai	<i>Psidium guajava</i>	5	40.0(2)		
	PE(U)42	Phetchaboon	<i>Areca catechu</i>	8	62.5(5)		
	MS(E)17	Maehongsom	<i>Psidium guajava</i>	3	100.0(3)		
	MS(E)20	Maehongsom	<i>Choerospondias asilaris</i>	7	42.86(3)		
	CP(K)1	Chumphon	<i>Averrhoa carambola</i>	6	83.3(5)		
	KB(MI)28	Kanchanaburi	<i>Mangifera indica</i>	2	100.0(2)	2	100.0(2)
	CP(I)31	Chumphon	<i>Gynopetalum cochinchinense</i>	11	90.90(10)	11	90.90(10)
	WNP(SS)2	Nakorn Pathom	<i>Syzygium samarangense</i>	7		38	23.68(9)
	WSB(AS)2	Saraburi	<i>Artabotrys siamensis</i>	5			
<i>Psytallia incisi</i>	MS(S)4	Maehongsom	<i>Trichosanthes tricuspidata</i>	7	28.58(2)		
	PS	Phisanulok	<i>Gmelina philippensis</i>	9	11.11(1)		
	KB(S)39	Kanghanaburi	<i>Spondias pinnata</i>	10	60.0(6)		
	NN(MA)2	Nakorn Nayok	<i>Musa acuminata</i>	2	50.0(1)	18	16.66(3)
	NN(MI)7	Nakorn Nayok	<i>Mangifera indica</i>	6			
	NN(MA)2	Nakorn Nayok	<i>Musa acuminata</i>	2			
	NN(SS)8	Nakorn Nayok	<i>Syzygium samarangense</i>	4			
	SO(CS)1	Songkhla	<i>Careya sphaerica</i>	4	50.0(2)		

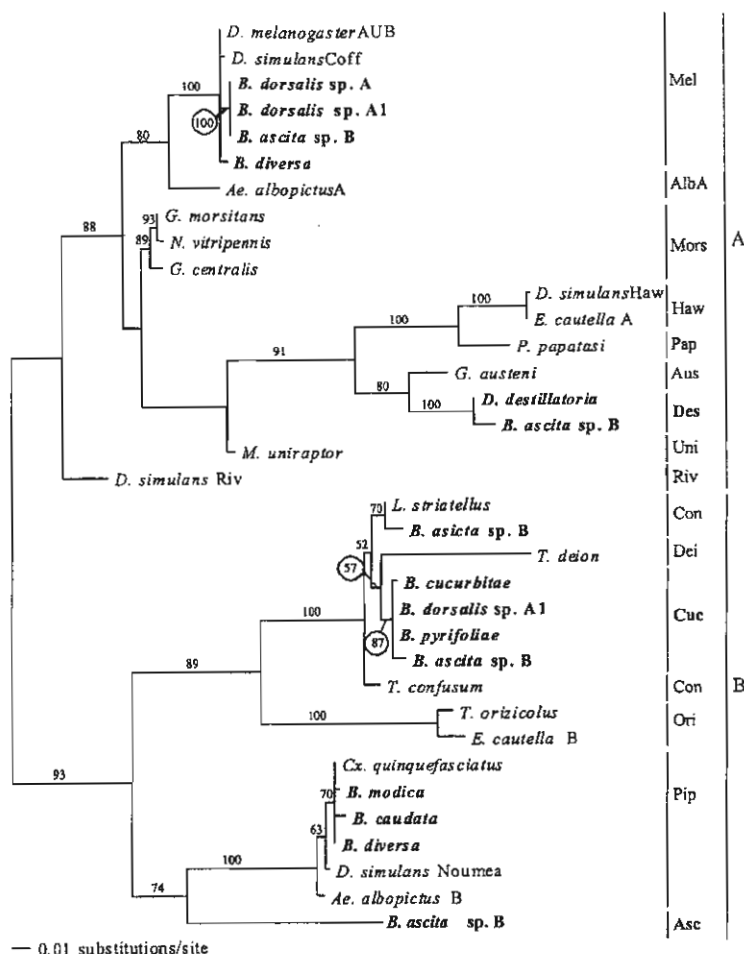
3.2.4 ผลการศึกษา

3.2.4.1 *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้

คณะผู้วิจัยได้ทำการเพิ่มจำนวน DNA (cloning) และหาลำดับ DNA (sequencing) ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงวันผลไม้เพิ่มเติมจากตัวอย่างที่ได้ในการศึกษาช่วง 3 ปีแรก (2539-2542) โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนหุ้มเปลือกนอกของแบคทีเรีย *Wolbachia* (*wsp*) งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ปริญญาเอกของ น.ส.วันวิสาข์ จำนงค์ลักษณ์ ผลการวิจัยพบแมลงวันผลไม้บางชนิดที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* 2 สายพันธุ์อาศัยร่วมอยู่ด้วยกันได้แก่ *Bactrocera* sp. 8 (*B. dorsalis* sp. A1) และ *B. diversa* นอกจากนี้ยังพบว่า *Bactrocera* sp. 1 (*B. ascita* sp. B) มีแบคทีเรีย *Wolbachia* อาศัยร่วมด้วยถึง 5 สายพันธุ์ ซึ่งจัดเป็นการรายงานการพบ multiple infection ในแมลงให้อาศัยที่มากที่สุดเท่าที่เคยรายงานมาแมลงวันผลไม้ชนิดนี้เป็น new species ซึ่งยังไม่ได้มีการรายงานเป็นทางการ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด species ใหม่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างสายพันธุ์กันใน *B. dorsalis* และ *B. pyrifoliae* จากกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* complex ซึ่งอยู่ในผลฝรั่งเช่นเดียวกัน ดังนั้น *Wolbachia* จึงอาจจะเป็นสาเหตุให้เกิดการแยกชนิดของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* complex ดังกล่าว เนื่องจากแมลงวันผลไม้ชนิดเดียวกันที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างชนิดกันผสมพันธุ์กันจะได้ลูกที่เป็นหมัน มีผลให้เกิดการแยกผสมพันธุ์โดยคุณสมบัติของ *Wolbachia* ที่เรียกว่า bidirectional cytoplasmic incompatibility ภาพที่ 3.2.1 แสดงลำดับ DNA ของสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่พบในแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับลำดับ DNA ของสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่พบในแมลงชนิดอื่นๆ ในต่างประเทศ ส่วนความสัมพันธ์ของสายการวิวัฒนาการของ *Wolbachia* สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในแมลงวันผลไม้ได้แสดงไว้ในภาพที่ 3.2.2 โดยเปรียบเทียบกับ *Wolbachia* สายพันธุ์จากต่างประเทศที่ได้รายงานไว้แล้ว จากการเปรียบเทียบลำดับ DNA กับแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานไว้แล้วพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่อาศัยร่วมกับแมลงวันผลไม้มีกลุ่มสายพันธุ์ใหม่ถึง 3 กลุ่มด้วยกัน คือ กลุ่ม *Asc* พบใน *B. ascitoides* กลุ่ม *Cuc* พบใน *B. cucurbitae* นอกจากนี้ยังพบใน *B. ascita* sp. B, *B. pyrifoliae* และ *B. dorsalis* sp. A1 และกลุ่ม *Des* พบใน *D. destillatoria* และ *B. ascitoides*

ผลการสำรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.3 จากการสำรวจแมลงวันผลไม้ 11 ชนิดจาก 11 จังหวัด ซึ่งอาศัยอยู่ในพืชอาศัย 27 ชนิด พบแมลงวันผลไม้ที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* อาศัยอยู่ด้วย สาเหตุที่ไม่พบ *Wolbachia* ในการสำรวจอาจเกิดจากช่วงเวลาหรือฤดูกาลในการสำรวจซึ่งมีความถี่ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ไม่เท่ากัน บางฤดูกาลอาจจะมีความถี่ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่ำในประชากรธรรมชาติของแมลงวันผลไม้ ดังนั้นจึงต้องทำการสำรวจต่อไปในช่วงฤดูกาลอื่น

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในแมลงวันผลไม้ที่พบในประเทศไทย 25 ชนิด ดังตารางที่ 3.2.2 โดยใช้ยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ได้แบ่งกลุ่มแมลงวันผลไม้ที่ศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม คือ แมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* แมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* และแมลงวันผลไม้อื่นๆ ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน



ภาพที่ 3.2.2 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของ *Wolbachia* สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในแมลงวันผลไม้

ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ *B. dorsalis* จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสโดยใช้วิธี Kimura2-parameter ระหว่างแมลงวันผลไม้ทั้ง 7 สปีชีส์ พบว่ามีความแตกต่างตั้งแต่ 1% ถึง 16.9% จากจำนวนที่ใช้ศึกษาทั้งสิ้น 638 bp ดังแสดงในตารางที่ 3.2.5 โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* sp. A และ *B. carambolae* มีความแตกต่างของลำดับเบสน้อยที่สุดและแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* sp. L และ *B. arecae* มีความแตกต่างของลำดับเบสมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกรดอะมิโนพบว่ามีความแตกต่างกัน 13 ตำแหน่ง จาก จำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 213 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 3.2.6 โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. arecae* และ *B. dorsalis* sp. L มีความแตกต่างของกรดอะมิโนมากกว่าแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ *B. dorsalis*

เมื่อทำการศึกษาด้านสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ *B. dorsalis* โดยใช้ แมลงวันผลไม้ *B. tau*, *Ceratitis capitata*, ยุงก้นปล่อง *Anopheles gambiae*, แมลงชนิด *Compsomyiops callipes* และแมลง *Locusta migratoria* เป็น Outgroup จากการคำนวณด้วยวิธี neighbor-joining พบว่าลำดับเบสที่ได้สามารถแบ่งแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ *B. dorsalis* ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 3.2.3 โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย

แมลงวันผลไม้ชนิด *B. pyrifoliae* และ *B. dorsalis* sp. L ซึ่งมีค่า bootstrap support เท่ากับ 100 ซึ่งแมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดมีลำดับเบสที่ต่างกันเพียง 1.1% (7 เบส) กลุ่มที่สองประกอบด้วย แมลงวันผลไม้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *B. dorsalis* sp. A, *B. dorsalis* sp. O, *B. carambolae* และ *B. raiensis* ซึ่งมีค่า bootstrap support เท่ากับ 71% ซึ่งความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้มีค่าตั้งแต่ 0.6% (4 เบส) ถึง 2% (12 เบส) และในกลุ่มสุดท้าย ประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. arecae* เพียงสปีชีส์เดียว ซึ่งมีความแตกต่างของลำดับเบสต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนเดียวกัน 12.1% ถึง 15.4%

ตารางที่ 3.2.5 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis*

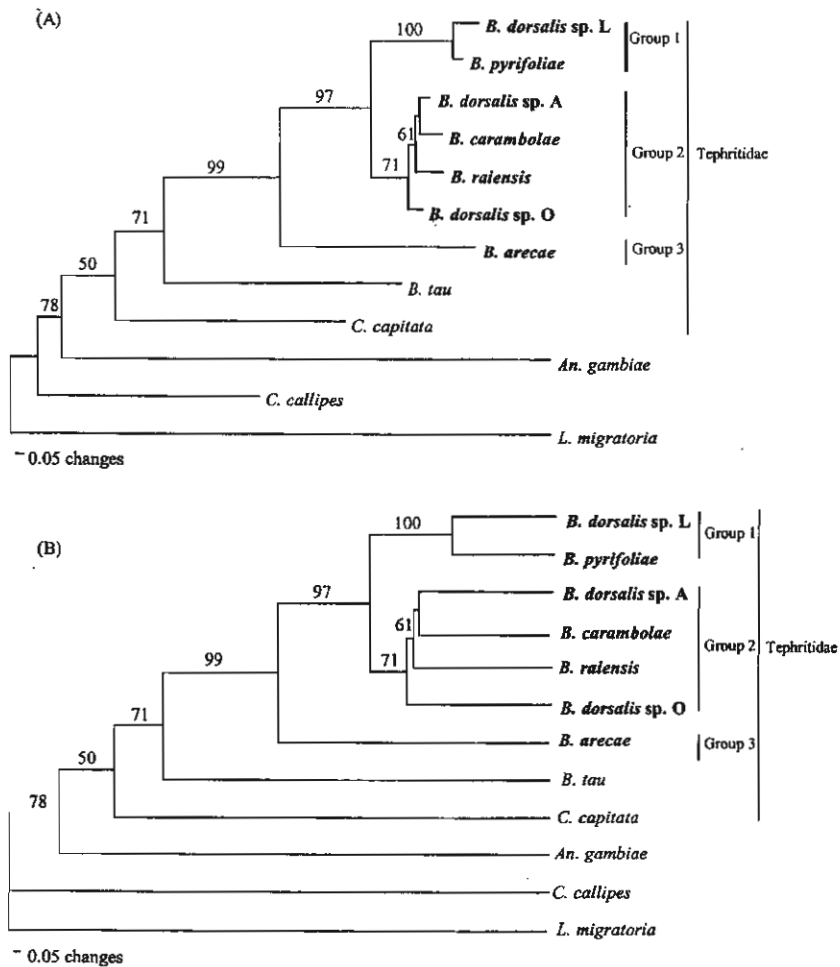
Species	1	2	3	4	5	6
1. <i>B. dorsalis</i> sp. A						
2. <i>B. dorsalis</i> sp. O	0.011					
3. <i>B. pyrifoliae</i>	0.053	0.053				
4. <i>B. arecae</i>	0.138	0.131	0.158			
5. <i>B. carambolae</i>	0.010	0.015	0.059	0.154		
6. <i>B. raiensis</i>	0.013	0.015	0.055	0.163	0.017	
7. <i>B. dorsalis</i> sp. L	0.058	0.058	0.011	0.169	0.060	0.060

ตารางที่ 3.2.6 แสดงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ *B. dorsalis*

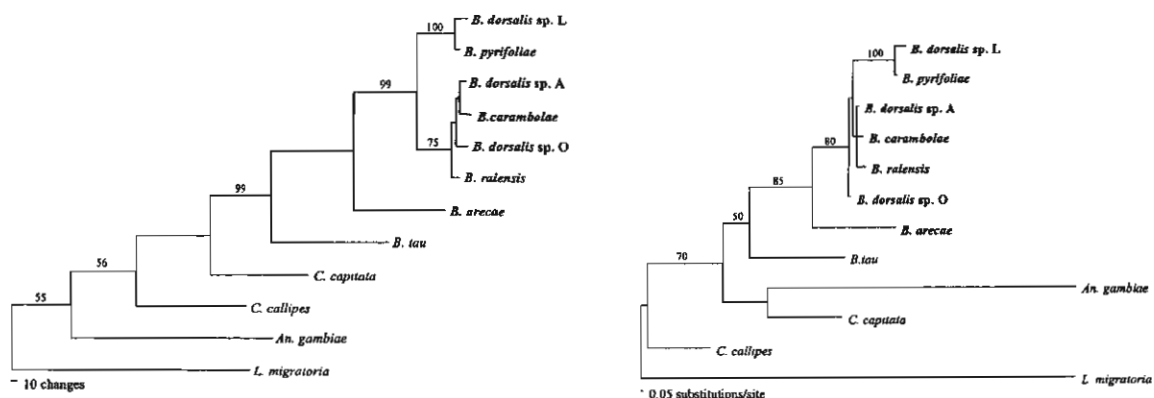
Species	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
	6	6	6	8	8	8	8	9	9	9	9	9	0
	2	7	9	2	2	9	9	1	5	5	8	9	0
	6	8	1	2	4	6	9	4	0	6	9	5	5
<i>B. dorsalis</i> sp. A	F	V	K	V	V	V	T	I	L	N	L	L	N
<i>B. dorsalis</i> sp. O	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. carambolae</i>	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. raiensis</i>	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. pyrifoliae</i>	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	T
<i>B. dorsalis</i> sp. L	.	.	.	.	.	.	P	V	.	D	M	.	T
<i>B. arecae</i>	.	T	N	.	.	I	.	V	F	.	.	I	.

ภาพที่ 3.2.4 แสดงตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* คำนวณโดยวิธี Maximum Parsimony มีรูปแบบของตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมแบบเดียวกันกับภาพที่ 3.2.2 เมื่อคำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining ในขณะที่เมื่อคำนวณด้วยวิธี Maximum Likelihood พบว่า แมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* sp. O ได้

แยกออกจากกลุ่มที่ 2 ซึ่งรูปแบบตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมได้ต่างจากเมื่อคำนวณด้วยอีกสองวิธีที่กล่าวแล้วข้างต้น (ภาพที่ 3.2.5)



ภาพที่ 3.2.3 (A) แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining (B) รูปแบบต้นไม้เดิมเมื่อยกถึงวิวัฒนาการที่มีค่า bootstrap support น้อยกว่า 50



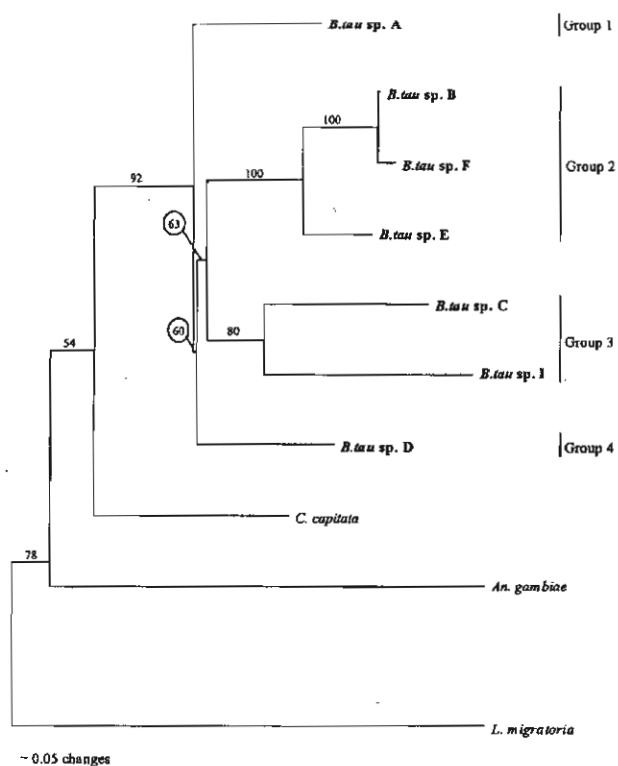
ภาพที่ 3.2.4 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Maximum Parsimony

ภาพที่ 3.2.5 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Maximum Likelihood

ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสโดยใช้วิธี Kimura2-parameter ระหว่างแมลงวันผลไม้ทั้ง 7 สปีชีส์ พบว่ามีความแตกต่างตั้งแต่ 0.6% ถึง 17.9% จากจำนวนที่ใช้ศึกษาทั้งสิ้น 638 bp ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7 โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. B และ *B. tau* sp. F มีความแตกต่างของลำดับเบสน้อยที่สุดและแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. F และ *B. tau* sp. I มีความแตกต่างของลำดับเบสมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกรดอะมิโนพบว่ามีความแตกต่างกัน 9 ตำแหน่งจากจำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 213 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 3.2.8 โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. F และ *B. tau* sp. I มีความแตกต่างของกรดอะมิโนมากกว่าแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau*

เมื่อทำการศึกษาด้านสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* โดยใช้แมลงวันผลไม้ *Ceratitidis capitata*, ยุงก้นปล่อง *Anopheles gambiae* และแมลง *Locusta migratoria* เป็น outgroup จากการคำนวณด้วยวิธี Neighbor-Joining, Maximum Likelihood และ Maximum Parsimony พบว่า ตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้มีรูปแบบเดียวกัน อีกทั้งลำดับเบสที่ได้สามารถแบ่งแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 3.2.6 และ 3.2.7 โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย แมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. A โดยจากตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมอาจจัดให้แมลงวันผลไม้ชนิดนี้เป็นแมลงวันผลไม้ที่เก่าแก่ที่สุดในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน กลุ่มที่สองประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *B. tau* sp. B , *B. tau* sp. E และ *B. tau* sp. F ซึ่งมีค่า bootstrap support เท่ากับ 100% และความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้มีค่าตั้งแต่ 0.6% (4 เบส) ถึง 5.2% (32 เบส) กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *B. tau* sp. C และ *B. tau* sp. I ซึ่งมีค่า bootstrap support เท่ากับ 80% และมีความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้เท่ากับ 13.5% (77 เบส) และในกลุ่มสุดท้ายประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. D เพียงสปีชีส์เดียวซึ่งมีความแตกต่างของลำดับเบสต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนเดียวกัน 9.6% ถึง 14.7%

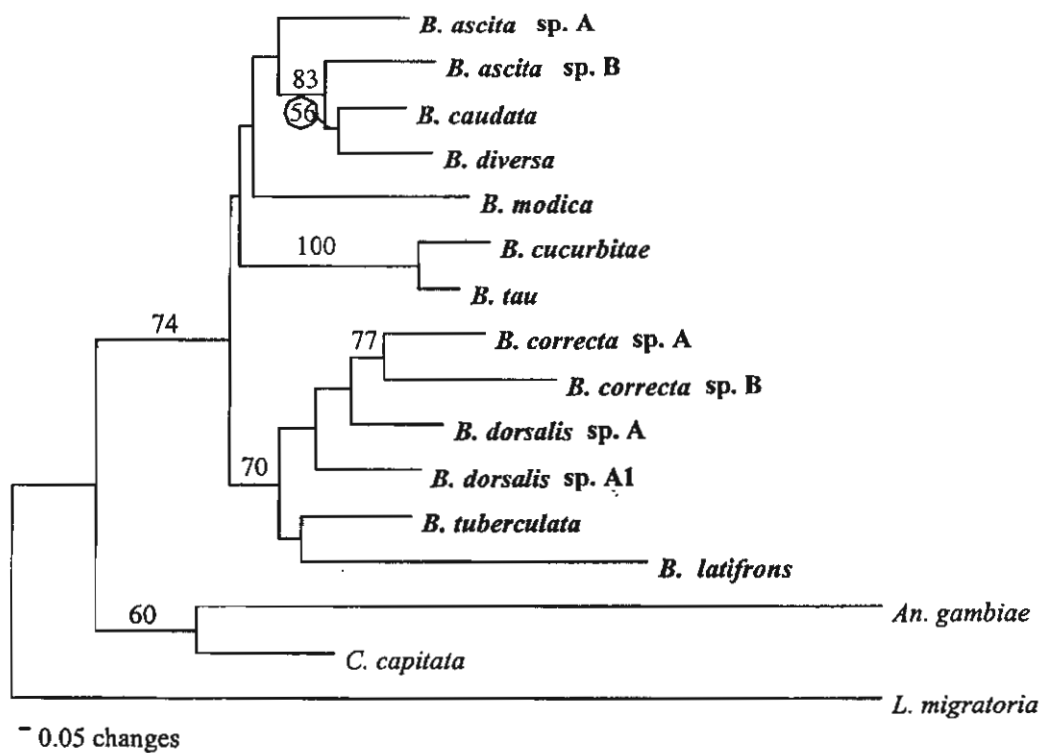
จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนจาก 4 อันดับของยีน *Bactrocera* พบว่าแมลงวันผลไม้เหล่านี้มีความแตกต่างของลำดับเบสเฉลี่ยเท่ากับ 13.6% โดยลำดับเบสที่ต่างกันได้ แสดงในตารางที่ 3.2.9 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างแมลงวันผลไม้ที่อยู่ในอันดับที่ต่างกันพบว่าแมลงวันผลไม้ในอันดับยีน *Bactrocera* และ *Asiadacus* มีความแตกต่างของลำดับเบสสูงที่สุด (15.7%) และแมลงวันผลไม้ในอันดับยีน *Hemigymnodacus* และ *Zeugodacus* มีความแตกต่างของลำดับเบสน้อยที่สุด (11.2%) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.10 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกรดอะมิโน พบว่ามีความแตกต่างกัน 18 ตำแหน่งจากจำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 213 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 3.2.10 โดยแมลงวันผลไม้ในอันดับยีน *Bactrocera* มีความแตกต่างของกรดอะมิโนเท่ากับ 12 ตำแหน่ง และแมลงวันผลไม้ในอันดับยีน *Zeugodacus* มีความแตกต่างของกรดอะมิโนเท่ากับ 6 ตำแหน่ง



ภาพที่ 3.2.6 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining

ตารางที่ 3.2.7 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau*

Species	1	2	3	4	5	6
1. <i>B. tau</i> sp. A						
2. <i>B. tau</i> sp. B	0.105					
3. <i>B. tau</i> sp. C	0.144	0.124				
4. <i>B. tau</i> sp. D	0.096	0.123	0.132			
5. <i>B. tau</i> sp. E	0.104	0.052	0.130	0.106		
6. <i>B. tau</i> sp. F	0.113	0.006	0.132	0.123	0.059	
7. <i>B. tau</i> sp. I	0.145	0.171	0.135	0.147	0.164	0.179



ภาพที่ 3.2.8 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้จีส *Bactrocera* โดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และคำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining

ตารางที่ 3.2.9 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้จีส *Bactrocera*

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>B. dorsalis</i> sp. A												
2. <i>B. dorsalis</i> sp. A 1	0.069											
3. <i>B. correcta</i> sp. A	0.088	0.109										
4. <i>B. correcta</i> sp. B	0.099	0.133	0.097									
5. <i>B. latifrons</i>	0.156	0.186	0.152	0.162								
6. <i>B. tuberculata</i>	0.104	0.078	0.124	0.137	0.147							
7. <i>B. modica</i>	0.139	0.128	0.156	0.174	0.180	0.135						
8. <i>B. diversa</i>	0.139	0.130	0.147	0.182	0.180	0.130	0.130					
9. <i>B. ascita</i> sp. A	0.137	0.135	0.149	0.160	0.174	0.126	0.132	0.108				
10. <i>B. ascita</i> sp. B	0.141	0.128	0.154	0.192	0.133	0.119	0.078	0.100				
11. <i>B. caudata</i>	0.133	0.122	0.132	0.152	0.170	0.122	0.124	0.062	0.093	0.076		
12. <i>B. cucurbitae</i>	0.156	0.143	0.156	0.170	0.188	0.152	0.154	0.143	0.135	0.132	0.133	
13. <i>B. tau</i>	0.152	0.139	0.162	0.168	0.180	0.133	0.149	0.135	0.124	0.132	0.126	0.045

เมื่อทำการศึกษาด้านสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้ โดยใช้แมลงวันผลไม้ชนิด *Ceratitis capitata*, ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles gambiae* และแมลงชนิด *Locusta migratoria* เป็น outgroup จากการคำนวณด้วยวิธี Neighbor-Joining พบว่าลำดับเบสที่ได้จัดให้แมลงวันผลไม้ในอันดับจิ้งนัส *Bactrocera* อยู่ในกลุ่มแยกจากแมลงวันผลไม้ในอันดับอื่น โดยมีค่า bootstrap support เท่ากับ 70% ดังแสดงในภาพที่ 3.2.8 อย่างไรก็ตามจากการผลที่ได้ยังไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ระหว่างแมลงวันผลไม้สปีชีส์ต่างๆ ในอันดับจิ้งนัส *Bactrocera* เนื่องจากค่า bootstrap value ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 50% ยกเว้นในกลุ่มของ *B. correcta* sp. A และ *B. correcta* sp. B ซึ่งมีค่า bootstrap value เท่ากับ 77% และตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้พบว่าแมลงวันผลไม้ในอันดับจิ้งนัส *Hemigymnodacus* และ *Asiadacus* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแมลงวันผลไม้ในอันดับจิ้งนัส *Zeugodacus* มากกว่าแมลงวันผลไม้ในอันดับจิ้งนัส *Bactrocera* อีกทั้งยังพบว่าแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. A และ *B. cucurbitae* ซึ่งอยู่ในอันดับจิ้งนัส *Zeugodacus* และทำลายพืชในตระกูลแตงเหมือนกัน ได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันบนตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมโดยมีค่า bootstrap support เท่ากับ 100% ยิ่งไปกว่านั้น ต้นไม้วิวัฒนาการที่ได้จัดให้แมลงวันผลไม้ชนิด *B. ascita* sp. A และ *B. ascita* sp. B ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันอยู่ในกลุ่มที่ต่างกับบนตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรม โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. ascita* sp. B อยู่ในกลุ่มเดียวกับแมลงวันผลไม้ชนิด *B. caudata* และ *B. diversa* โดยมีค่า bootstrap support เท่ากับ 83% ในขณะที่แมลงวันผลไม้ชนิด *B. ascita* sp. A ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแยกจากกลุ่มของ *B. ascita* sp. B เมื่อคำนวณตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 อันดับด้วยวิธี Maximum Parsimony และ Maximum Likelihood พบว่าแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* และ *B. cucurbitae* ได้แยกกลุ่มออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 100% อย่างไรก็ตามจากการคำนวณด้วยวิธีทั้งสองนี้สามารถแยกแมลงวันผลไม้ในอันดับจิ้งนัส *Bactrocera* ออกจากแมลงวันผลไม้ในอันดับอื่นได้

คณะผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้จิ้งนัส *Bactrocera* โดยเปรียบเทียบกับสายวิวัฒนาการของยีนโปรตีนหุ้มเปลือกนอก *wsp* (outer surface protein gene) ในแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยของแมลงวันผลไม้ พบว่าในแมลงวันผลไม้ กลุ่ม *Zeugodacus* ซึ่งประกอบด้วย อันดับจิ้งนัส *Zeugodacus*, *Hemigymnodacus* และ *Asiadacus* มีการติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม B ยกเว้นใน *B. ascita* sp. B และ *B. diversa* ซึ่งติดเชื้อ *Wolbachia* มากกว่า 1 สายพันธุ์ (ภาพที่ 3.2.9) ส่วนสายพันธุ์แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงวันผลไม้ กลุ่ม *Zeugodacus* นั้นอยู่ในกลุ่มย่อย Pip ยกเว้นแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* ซึ่งอยู่ในกลุ่มย่อย *Cuc* จึงอาจกล่าวได้ว่าการถ่ายทอด *Wolbachia* สายพันธุ์ *Cuc* จากแมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera* เข้าสู่แมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae*

คณะผู้วิจัยได้พบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* complex ซึ่งประกอบด้วย *B. dorsalis* s.s.(sp. A), *B. dorsalis* sp. A1 และ *B. pyrifoliae* โดยใน *B. dorsalis* sp. A1 พบการติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ *Cuc* และ *Mel* อีกทั้งยังพบเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์เดียวกันนี้ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis*

อีก 2 ชนิดด้วย โดย *B. dorsalis* sp.A มีการติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ *Mel* และ *B. pyrifoliae* มีการติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ *Cuc* (ภาพที่ 3.2.9)

3.2.4.2 *Wolbachia* ในแมลงเบียน

คณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างแมลงเบียนเพื่อตรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* เพิ่มเติมจากรายงานการวิจัยครั้งที่ผ่านมา โดยการสุ่มเก็บผลไม้ที่มีหนอนแมลงวันผลไม้อาศัยอยู่ตามจังหวัดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.2.3

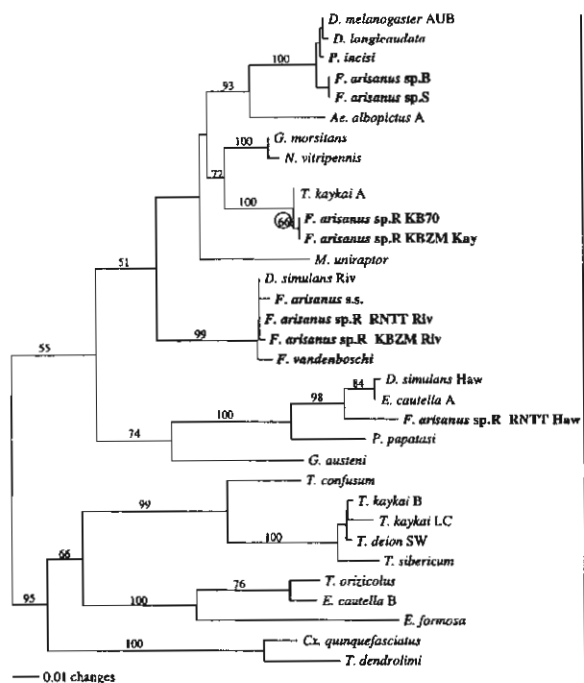
นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และหาลำดับดีเอ็นเอสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงเบียนสปีชีส์ต่างๆ จำนวน 9 สปีชีส์ โดยเป็นแมลงเบียนในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Biosteres arisanus* จำนวน 4 สปีชีส์ จากการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงเบียนที่ทำการศึกษานี้อยู่ในกลุ่ม A เพียงกลุ่มเดียว และจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 3.2.10

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงเบียน พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงเบียนจัดได้เป็น 2 กลุ่มโดยกลุ่มแรกคือ แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงเบียน ชนิด *Diachasmimorpha longicaudata*, *Psytallia incisi*, *Fopius arisanus* sp. B และ sp. R จัดอยู่ในกลุ่ม *Mel* ในขณะที่แมลงเบียนชนิด *B. arisanus* sp. R ที่อยู่ในพืชอาศัยต่างชนิดกัน คือในผลพุทราและพุทราป่า ส่วนแมลงเบียนชนิด *F. vandenboschi*, *F. arisanus* sp. R ที่อยู่ในพืชอาศัยต่างชนิดกัน คือในผลพุทราและดอกชี่กาแดง และกลุ่มสุดท้ายคือ แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงเบียนชนิด *B. arisanus* sp. R ที่อยู่ในดอกชี่กาแดง

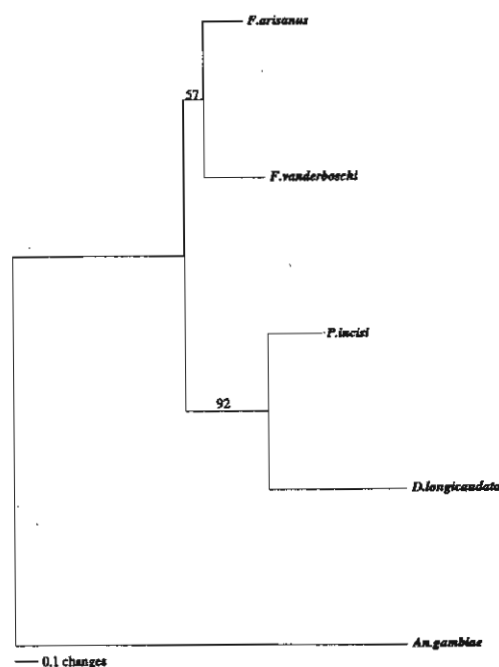
ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่าในแมลงเบียนชนิด *F. arisanus* sp. R ที่อยู่ในพืชอาศัยต่างชนิดกัน 2 ตัว คือ *F. arisanus* sp. R ที่อยู่ในผลพุทรา (KBZM) และดอกชี่กาแดง (RNTT) ได้ติดเชื้อ *Wolbachia* 2 สายพันธุ์ และได้ติดเชื้อ *Wolbachia* ต่างสายพันธุ์กัน 1 สายพันธุ์และ ติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน อีกทั้ง แมลงเบียน *F. arisanus* sp. R ที่อยู่ในผลพุทราป่า (KB70) มีการติดเชื้อ *Wolbachia* เพียงสายพันธุ์เดียวและมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่อยู่ในผลพุทรา (KBZM) ดังแสดงในภาพที่ 3.2.10

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในแมลงเบียนที่พบในประเทศไทย 4 ชนิดได้แก่ *F. arisanus*, *F. vandenboschi*, *D. longicaudata* และ *P. incisi* โดยใช้ยีน Cytochrome Oxidase subunit I พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของแมลงเบียนทั้ง 4 ชนิดได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มของ *Fopius* spp. และ 2) กลุ่มของ *D. longicaudata* (ภาพที่ 3.2.11) โดยแต่ละกลุ่มมีค่า bootstrap support เท่ากับ 63 และ 92 ตามลำดับ (เมื่อคำนวณโดยใช้วิธี Neighbor-Joining)

จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงเบียน โดยใช้วิธี Kimura2-parameter พบว่าแมลงเบียนชนิด *D. longicaudata* นั้นมีความแตกต่างของลำดับเบสจากแมลงเบียนชนิดอื่นๆ ตั้งแต่ 117 (ใน *P. incisi*) ถึง 162 เบส (ใน *Fopius* spp.) จากจำนวนที่ศึกษาทั้งสิ้น 639 เบส อย่างไรก็ตามยังไม่พบความแตกต่างของลำดับเบสเมื่อทำการศึกษาแมลงเบียนที่มาจากกลุ่มประชากรที่ต่างกัน



ภาพที่ 3.2.10 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของ *Wolbachia* สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในแมลงเบียน



ภาพที่ 3.2.11 แสดงความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของแมลงเบียนโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I คำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในแมลงเบียนในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *F. arisanus* 3 ชนิด จำนวน 5 ตัวอย่างที่ติดเชื้อ *Wolbachia* โดยเป็นแมลงเบียน *F. arisanus* sp. R ที่เก็บได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกัน พบว่าแมลงเบียน *F. arisanus* sp. B ได้จัดอยู่ในกลุ่มที่แยกออกจาก แมลงเบียน *B. arisanus* ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนชนิดอื่น (ภาพที่ 3.2.11) โดยแมลงเบียน *F. arisanus* sp. B มีความแตกต่างของลำดับเบสจาก แมลงเบียน *F. arisanus* ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนชนิดอื่น สูงสุดเท่ากับ 70 เบส (10%) และจากการเปรียบเทียบลำดับเบสในแมลงเบียน *F. arisanus* sp. R ซึ่งพบในผลไม้ต่างชนิดกัน พบว่า แมลงเบียน *F. arisanus* sp. R ซึ่งพบในผลไม้ฝรั่งมีความแตกต่างของลำดับเบสสูงสุดเมื่อเทียบกับแมลงเบียนในสปีชีส์เดียวกัน เท่ากับ 6 เบส (0.8%)

3.2.5 บทสรุป

3.2.5.1 *Wolbachia* แมลงวันผลไม้

การปรากฏขึ้นและการเพิ่มจำนวนความหลากหลายของชนิดของพืชมีดอก นับว่าเป็นสมมุติฐานหนึ่งที่ช่วยเร่งอัตราการเกิดวิวัฒนาการในแมลงกินพืชหลายกลุ่มรวมทั้งในกลุ่ม Diptera (Strong et al., 1984) จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้จำพวก Tephritid จากจีนัสต่างๆ โดย Han และ McPherson ในปี 1998 พบว่า แมลงวันจำพวกนี้น่าจะมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่รวดเร็วมาก ในการศึกษาวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงชีวโมเลกุลของแมลงวันผลไม้ในจีนัส *Bactrocera* จำนวนทั้งสิ้น 31 ชนิด โดยมี

แมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* จำนวน 7 ชนิด, แมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* จำนวน 7 ชนิด และแมลงวันผลไม้อื่นๆ นอกกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน จำนวน 13 ชนิด พบว่าแมลงวันในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนทั้งสองมีค่าความแตกต่างของลำดับเบสสูงกว่าค่าความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงวันกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนอื่นๆ เช่น ตัวกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Pissodes strobi* (Langor และ Sperling, 1997) และผีเสื้อกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Choristoneura* (Sperling และ Hickey, 1994)

จากตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้พบว่าแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* อาจจำแนกได้ตามรูปแบบการทำลายพืช (host preference) โดยจำแนกเป็นแมลงวันผลไม้ที่พบการทำลายพืชหลายชนิด (generalist) และแมลงวันผลไม้ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืช (specialist) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ แมลงวันผลไม้ชนิด *B. arecae* จัดว่าเป็นแมลงวันผลไม้ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืช ได้อยู่ในกลุ่มแยกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนเดียวกัน อย่างไรก็ตามจากการคำนวณหาต้นไม้ทางสายวิวัฒนาการได้จัดให้แมลงวันผลไม้ชนิด *B. pyrifoliae* ซึ่งเป็นแมลงวันผลไม้ที่ทำลายพืชหลายชนิดและแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* sp. L. ซึ่งเป็นแมลงวันผลไม้ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืช อยู่ในกลุ่มเดียวกันซึ่งผลการศึกษาที่ได้สนับสนุน ผลการวิจัยจากไมโททิกโครโมโซม (Baimai et al., 1999 a และ b)

ในการศึกษาตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* โดยพบว่ารูปแบบตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้มีลักษณะตรงกันกับผลทางโครโมโซม (Baimai et al., 2000 b) และผลทางอิลเล็กโตรโฟรีซิส (Saelee, 1999) อีกทั้งยังพบว่าแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนนี้มีค่าความแตกต่างของลำดับเบสสูงโดยค่าที่ได้นี้ตรงกันกับผลการศึกษาจากวิธีอิลเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งจากวิธีดังกล่าวได้พบว่าการถ่ายทอดของยีน (gene flow) ระหว่างแมลงวันผลไม้สปีชีส์ต่างๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* เป็นอัตราที่ต่ำจึงอาจเป็นไปได้ว่าการขาดการถ่ายทอดของยีนระหว่างสปีชีส์ของแมลงวันผลไม้ ทำให้เกิดการแยกกันของการสืบพันธุ์ (reproductive isolation) ของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ได้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้จีนัส *Bactrocera* ทั้งสิ้น 13 สปีชีส์ พบว่ายีน Cytochrome Oxidase Subunit I ของไมโทคอนเดรีย สามารถแยกแมลงวันผลไม้ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย แมลงวันผลไม้จีนัส *Bactrocera* และกลุ่มที่สองประกอบด้วยแมลงวันผลไม้จีนัส *Asiadacus*, *Hemigymnodacus* และ *Zeugodacus* จากการศึกษาของ Brower ในปี 1994 พบว่าเราสามารถหาค่าความแตกต่างของลำดับเบสประมาณเวลาของชีวโมเลกุล (molecular clock) หรือ สิ่งมีชีวิตจากกลุ่มบนต้นไม้วิวัฒนาการต่างๆ ใช้ในการแยกออกจากกัน โดยเวลาของชีวโมเลกุลสามารถประมาณเท่ากับ 1 ล้านปี หากความแตกต่างของลำดับเบสมีค่าเท่ากับ 2.3 % ดังนั้น แมลงวันผลไม้ทั้งสองกลุ่มอาจแยกออกจากกันเมื่อ 6.69 ล้านปีที่แล้ว อีกทั้งผลจากการศึกษาวิจัยพบว่าตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้มีความสอดคล้องกับผลจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา โดย Hardy (1973)

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Wolbachia* และแมลงวันผลไม้พบว่าตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมทั้งสองมีความสอดคล้องกัน (ภาพที่ 3.2.9) โดย

พบว่าแมลงวันผลไม้กลุ่ม *Zeugodacus* ต่างติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม B ยกเว้นใน *B. diversa* และ *B. ascita* sp. B ซึ่งติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มากกว่า 1 สายพันธุ์ อีกทั้งยังพบว่าสายพันธุ์แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงวันผลไม้กลุ่ม *Zeugodacus* ได้จัดอยู่ในกลุ่มบนตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมกลุ่มเดียวกันกลุ่ม *Pip* ยกเว้น *B. cucurbitae* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Cuc* จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีการถ่ายทอดแบคทีเรีย *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ในแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae*

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* อาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ในแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera* การค้นพบว่าแมลงวันผลไม้สองชนิดในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* (*B. dorsalis* sp. A และ *B. pyrifoliae*) มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างสายพันธุ์กัน อีกทั้งแมลงวันผลไม้สปีชีส์ *B. dorsalis* sp. A1 ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สองสายพันธุ์ (*Mel*, *Cuc*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้สปีชีส์ *B. dorsalis* sp. A (*Mel*) และ *B. pyrifoliae* (*Cuc*) นอกจากนี้การวิจัยครั้งนี้ได้พบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* อาจทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ในแมลงวันผลไม้สปีชีส์ *B. ascita* sp. A และ *B. ascita* sp. B ได้ เนื่องจากแมลงวันผลไม้สปีชีส์ *B. ascita* sp. A ไม่พบรายงานการติดเชื้อ *Wolbachia* ในขณะที่แมลงวันผลไม้สปีชีส์ *B. ascita* sp. B มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ถึง 5 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสปีชีส์ของแมลงให้อาศัย รวมถึงแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera* ที่ได้ทำการศึกษาด้วย

การศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้พบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ถึง 5 สายพันธุ์ในแมลงวันผลไม้ชนิด *B. ascita* sp. B ซึ่งนับว่าเป็นการค้นพบจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านที่สูงที่สุด จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงอาจเป็นไปได้ที่จะใช้แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นพาหะในการนำยีนที่เป็นประโยชน์ถ่ายทอดลงไปในประชากรของแมลงพาหะและแมลงศัตรูพืชได้ในอนาคต

3.2.5.2 *Wolbachia* ในแมลงเบียน

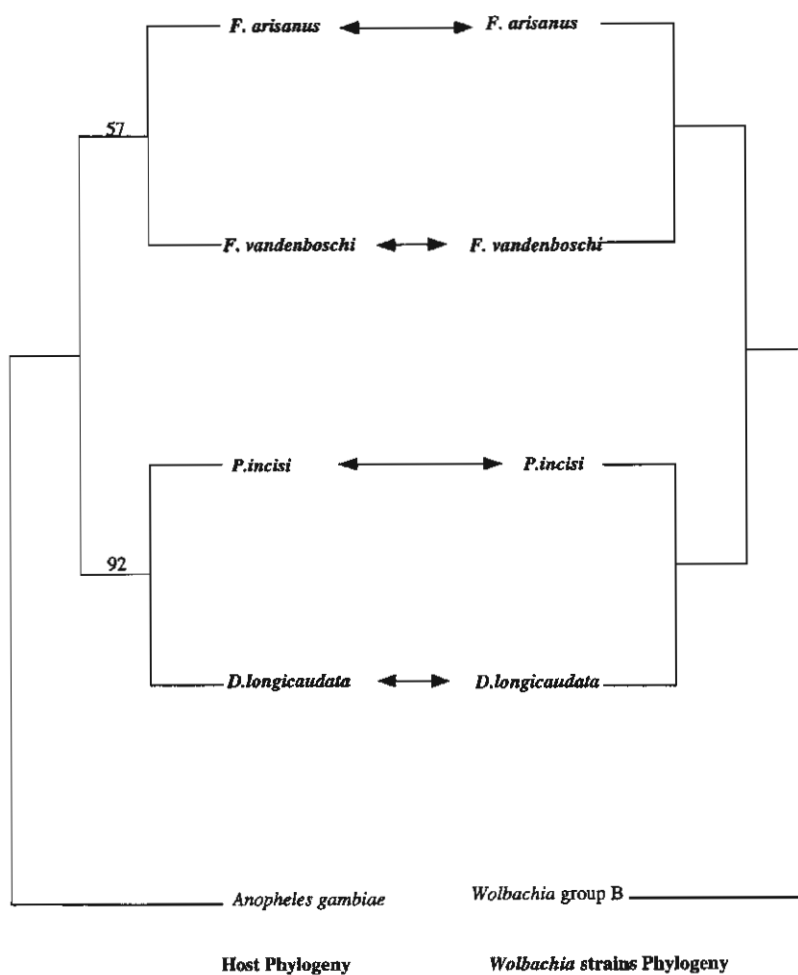
เมื่อเปรียบเทียบกับสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase subunit I ในแมลงเบียนและสายวิวัฒนาการของยีน *wsp* ในแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยในแมลงเบียนพบที่มีความสอดคล้องกัน (ภาพที่ 3.2.12) จึงอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้อาศัยร่วมกับแมลงเบียนเป็นเวลานาน ก่อนที่จะมีการแยกสปีชีส์ใหม่ และอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ในแมลงเบียนก็เป็นได้

จากการค้นพบสายพันธุ์แบคทีเรีย *Wolbachia* มากกว่า 1 สายพันธุ์ในแมลงเบียน 1 ตัว และการที่แมลงเบียนจากพืชอาศัยต่างกันมีต่างสายพันธุ์ ทั้งที่มีสายพันธุ์ร่วมกันและสายพันธุ์ต่างกลุ่มกัน อาจเป็นอีกหลักฐานหนึ่งที่สนับสนุนว่า แบคทีเรีย *Wolbachia* อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดความหลากหลายของชนิดของแมลงเบียนในประเทศไทย

3.2.6 ข้อเสนอแนะ

การค้นพบจุลินทรีย์ *Wolbachia* มากถึง 5 สายพันธุ์ในแมลงวันผลไม้สปีชีส์ *Bactrocera ascita* sp. B นั้นแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่จะนำจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงที่สำคัญทางเศรษฐกิจได้ และพบว่าจุลินทรีย์ *Wolbachia* อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* จึงควรที่จะได้มีการทำการศึกษาอิทธิพลของจุลินทรีย์ *Wolbachia* และแมลงวันผลไม้จีนัส *Bactrocera* ต่อไป

จากการศึกษาพบว่า ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ *Wolbachia* และแมลงเบียนของแมลงวันผลไม้มีความสอดคล้องกัน อีกทั้งยังพบว่าจุลินทรีย์ *Wolbachia* อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดความหลากหลายของชนิดของแมลงเบียนในประเทศไทย



ภาพที่ 3.2.12 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแมลงเบียนและแบคทีเรีย *Wolbachia*

3.2.7 เอกสารอ้างอิง

- Baimai V., Trinachartvanit, W., Tigvattananont, S., Grote, P.J., Poramacom, R. and Kijchalao, U. 1995. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. I. Five sibling species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Genome* 38: 1015-1022.
- Baimai V., Phinchogsakuldit, J. and Trinachartvanit, W. 1999a. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand (III): Six members of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Zool. Stud.* 38: 110-118.
- Baimai V., Phinchogsakuldit, J. and Tigvattananont, S. 1999b. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. IV. Evidence for six new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia* 64: 371-377.
- Baimai V., Samrandee, C., Tigvattananont, S. and Trinachartvanit, W. 2000a. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. V. Cytotaxonomy of ten additional new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia* 65: 409-417.
- Baimai, V., Phinchongsakuldit, J., Sumrandee, C. and Tigvattananont, S. 2000b. Cytological evidence for a complex of species within the taxon *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Biol. J. Linn. Soc.* 69: 399-409.
- Beard, C.B., Hamm, D.M. and Collins, F. H. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.* 2: 103-124.
- Beckenbach, A.T., Wei, Y.W. and Liu, H. 1993. Relationships in the *Drosophila obscura* species group, inferred from mitochondrial cytochrome oxidase II sequences. *Mol. Biol. Evol.* 10: 619-634.
- Brower, A.V.Z. 1994. Phylogeny of *Heliconius* butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 3: 159-174.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. and Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.
- DeSalle, R., Freedman, T., Prager, E.M. and Wilson, A.C. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 26: 157-164.
- Drew, R.A.I. 1989. The tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australasian and Oceanian regions. *Mem. Queensl. Museum* 26: 1-521.
- Drew, R.A.I. and Romig, A.C. 1997. Overview-Tephritidae in the Pacific and Southeast Asia. *In* Management of fruit flies in the Pacific: a regional symposium. *Edited by A.J.*

- Allwood, and R.A.I. Drew. Australian Center for International Agriculture Research Proceeding Number 76, Canberra. pp. 46-53.
- Farrell, B.D. 1998. "Inordinate foundness" explained: Why are there so many beetles? *Science* 281: 555-558.
- Feder, J.L., Chilcote, C.A. and Bush, G.L. 1988. Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature* 336: 61-64.
- Flook, P. K., Rowell, C.H. and Gellissen, G. 1995. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* genome. *J. Mol. Evol.* 41: 928-941.
- Foote, R.H., Blanc, F.L. and Norrbom, A.L. 1993. Handbook of the Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico. Comstock, Ithaca, NY.
- Han, H. and McPheron, B.A. 1997. Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta: Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 17-32.
- Hardy, D.E. 1974. The fruit flies (Tephritidae-Diptera) of Thailand and bordering countries. *Pac. Insect Monograph* 62: 1-353.
- Holden, P.R., Brookfield, J.F.Y. and Jones, P. 1993. Cloning and characterization of an *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 240: 213-220.
- Jamnongluk, W. 2001. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* and their *Wolbachia* endosymbionts. Ph.D. thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Kittayapong P., Milne, J.R., Tigvattananont, S. and Baimai, V. 2000. Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. *Sci. Asia* 26: 93-103.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kumar, S., Tamura, K. Jakobsen, I.B. and Nei, M. 2001. *MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software*. Bioinformatics (submitted).
- Langor, D.W. and Sperling, F.A.H. 1997. Mitochondrial DNA sequence divergence in weevils of the *Pissodes strobi* complex (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Mol. Biol.* 6: 255-265.
- Lunt, D.H., Zhang, D.-X., Szymura, J.M. and Hewitt, G.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5: 153-165.
- McPheron, B.A., Smith, D.C. and Berlocher, S.H. 1988. Genetic differences between host races of *Rhagoletis pomonella*. *Nature* 336: 61-64.

- Meksongsee, M., Liewvanich, A. and Jirasuratana, M. 1991. Fruit flies in Thailand. In 1st International symposium on fruit flies in the tropics. Edited by S. Vijayasegaran and A.G. Ibrahim. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MRDI), Selangor. pp. 83-98.
- Nei, M. and Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M.E., Karr, T.L. and Robertson, H.M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2699-2702.
- Posada, D. and Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9), 817-818.
- Saelee, A. 1999. Electrophoretic study of *Bactrocera tau* complex (Diptera: Tephritidae) in certain populations in Thailand. M.Sc. thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Spanos, L., Koutroumbas, G., Kotsyfakis, M. and Louis, C. 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 9: 139-144.
- Sperling, F.A.H. and Hickey, D.A. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.* 11: 656-665.
- Swofford, D.L. 1999. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 beta 1. Champaign, IL: Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey.
- Tigvattananont, S. 1986. The importance of *Dacus tau* (Walker) in Thailand. *Kaen Kaset* 14: 114-118.
- White, I.M. and Elson-Harris, M.M. 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Centre for Agriculture and Biosciences International.
- Wood, T.K. and Keese, M.C. 1990. Host-plant-induced assortative mating in *Echenopa* tree hoppers. *Evolution* 44: 619-928.
- Yang, Z. 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J. Mol. Evol.* 39: 105-111.
- Zhou, W.G., Rousset, F. and O'Neill, S.L. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 265: 509-515.

3.3 การกระจายตัว ความถี่ในการพบ และผลกระทบของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ต่อสัตว์ขาปล้องที่มี ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

3.3.1 บทนำ

Wolbachia เป็นแบคทีเรียชนิดที่อาศัยอยู่ร่วม (endosymbiosis) กับสัตว์ขาปล้อง (โดยเฉพาะ แมลง และ crustacean) และพบที่บริเวณเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ (reproductive tissues) จากการศึกษาลำดับเบส (sequencing) โดยใช้ยีน 16S rRNA พบว่า *Wolbachia* จัดอยู่ในกลุ่ม α -Proteobacteria เป็น subdivision ของ purple bacteria (O'Neill et al., 1992) และมีความใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่อาศัยสัตว์ขาปล้องเป็น พาหะนำโรค กลุ่ม *Escherichia* และ *Rickettsia* (O'Neill et al., 1992; Rousset et al., 1992)

ความสำเร็จในวิวัฒนาการของแบคทีเรียชนิดนี้คือ ความสามารถในการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก (maternally) และการถ่ายทอดข้ามสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความหลากหลายของผลกระทบต่อ ขบวนการสืบพันธุ์ของสัตว์อาศัยของแบคทีเรีย ซึ่งประกอบด้วย การเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic Incompatibility) หรือ CI (Bourtzis and O'Neill, 1998; Zhou et al., 1998) การชักนำให้ เกิดลูกเพศเมียทั้งหมด และการดัดแปลงการวางไข่และการฟักไข่ (fecundity และ fertility) (Stouthamer et al., 1999)

การเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมหรือ CI คือการที่ไซโตพลาสซึมในไข่และสเปิร์มเข้ากันไม่ได้ ทำให้ตัวอ่อนเสียชีวิต (Werren, 1997a) CI อาจเกิดแบบ unidirectional CI เกิดขึ้นเมื่อเพศผู้ที่ติดเชื้อ ผสมกับเพศเมียที่ไม่ติดเชื้อ แล้วไม่เกิดลูก (ในแมลงอาศัยที่มีระบบสืบพันธุ์แบบ diploid) หรือให้ลูกที่เป็น เพศผู้ทั้งหมด (ในแมลงอาศัยที่มีระบบสืบพันธุ์แบบ haplo-diploid) ในขณะที่เพศเมียที่ติดเชื้อผสมพันธุ์กับ เพศผู้ที่ไม่ติดเชื้อ ไซโตพลาสซึมสามารถเข้ากันได้และให้ลูกตามปกติ (Stouthamer et al., 1999) หรือ bidirectional CI เกิดขึ้นเมื่อมีการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้หรือเพศเมียที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ที่มีสายพันธุ์ที่ ต่างกัน ดังนั้น หากเพศเมียติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ A ผสมกับเพศผู้ติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ B จะเกิดการเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึม ในทางตรงข้าม เพศเมียติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ B ผสมกับ เพศผู้ติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ A ไม่ให้ลูกเช่นกัน หากเกิดการผสมระหว่างเพศเมียและเพศผู้ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์เดียวกันจะให้ลูกที่ติดเชื้อสายพันธุ์นั้น (Werren, 1997a) *Wolbachia* อาจจะมีบทบาท สำคัญในการเกิดแมลงชนิดใหม่ๆ (speciation) โดยอาจทำให้เกิดแบ่งแยกขบวนการสืบพันธุ์ระหว่าง ประชากรที่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ที่ต่างสายพันธุ์กัน (Hurst and Schilthuisen, 1998; Werren, 1997b)

ผลกระทบต่อขบวนการสืบพันธุ์แบบที่สอง คือ การชักนำให้เกิด Parthenogenesis (PI) ใน แมลงอันดับ Hymenoptera โดยชักนำให้เกิดการสืบพันธุ์ที่เรียกว่า Thelytokous Parthenogenesis ซึ่งทำ ให้เพศเมียให้กำเนิดลูกทั้งหมดเป็นเพศเมียโดยไม่ต้องได้รับการผสมพันธุ์ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงระหว่าง การแบ่งเซลล์แบบไมโทติก (mitotic) ครั้งแรก และพบในแมลงเบียนชนิด haplo-diploid หลายๆ ชนิด (Bourtzis and O'Neill, 1998) มีหลักฐานยืนยันว่าการสืบพันธุ์แบบดังกล่าวของแมลงอย่างน้อย 40 ชนิด จะมี *Wolbachia* มาเกี่ยวข้อง (Stouthamer, 1997)

ผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์แบบที่สาม คือ Feminization ใน genetic male ในสัตว์ขาปล้องกลุ่ม isopods โดย *Wolbachia* เปลี่ยนขบวนการสืบพันธุ์ปกติของการกำหนดเพศโดยทำให้ตัวอ่อนที่จะเจริญเป็นเพศผู้ทั้งหมดเจริญไปเป็นเพศเมีย พบในแมลงหนึ่งชนิดคือ *Ostrinia furnicalis* (Asian corn borer) (Stouthamer et al., 1999)

ผลกระทบต่อขบวนการสืบพันธุ์แบบที่สี่ คือ การฆ่าลูกเพศผู้ (Male killing) ซึ่ง *Wolbachia* จะทำให้ลูกเพศผู้ทั้งหมดตายในระยะเจริญเป็นตัวอ่อน พบในแมลง 2 ชนิดคือ *Adalia bipunctata* (spot ladybird beetle) และ *Acraea encedon* (African butterfly) (Zchori-Fein et al., 1995; Rigaud et al., 1997; Hurst et al., 1999a, b)

แบบที่ห้า คือ การเพิ่มการวางไข่ (Fecundity enhancing) โดยพบว่าใน *Trichogramma bourarachae* เพศเมียที่ติดเชื้อสามารถให้ลูกมากกว่าเพศเมียที่ไม่ติดเชื้อ (Girin and Bouretreau, 1995)

จากผลกระทบดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ว่า *Wolbachia* น่าจะแพร่กระจายโดยผ่านทางระบบสืบพันธุ์ระหว่างประชากรของแมลงชนิดต่างๆ (Orr, 1989; Breeuwer and Werren, 1990; Shoemaker et al., 1999; Stouthamer et al., 1999) ซึ่งอาจจะชักนำให้เกิดแมลงชนิดใหม่ๆ (speciation) อย่างรวดเร็วในธรรมชาติ (Bush and Smith, 1998; Heath et al., 1999) การศึกษาถึงแนวทางในการถ่ายทอด *Wolbachia* ไปสู่แมลงอาศัยชนิดใหม่ๆ (Laven, 1967; Shoemaker et al., 1999) ร่วมกับการศึกษาถึงผลกระทบของ *Wolbachia* ต่อแมลงอาศัยอย่างถ่องแท้อาจจะใช้เป็นเครื่องมือในการจัดการแมลงศัตรูพืชและแมลงพาหะโดยชีววิธี (Laven, 1967, Sinkins et al., 1997)

จากการศึกษาทาง Phylogeny พบว่า *Wolbachia* กระจายอยู่ทั่วไปในแมลงอาศัยหลายๆ ชนิด (Werren et al., 1995; West et al., 1998) ซึ่งน่าจะเป็นการบ่งชี้ว่ามีการถ่ายทอด *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ (horizontal transmission) และระหว่างชนิดของแมลงอาศัย (West et al., 1998)

การศึกษาและทำความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแมลงที่มีผลทำให้เกิดการแพร่กระจาย *Wolbachia* โดยวิธี micro-injection (Boyle et al., 1993; Chang and Wade, 1994) และวิธีธรรมชาติ จากแมลงอาศัย *Drosophila simulans* ที่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* สู่แมลงเบียน *Leptopilina boulardi* (Heath et al., 1999) จะทำให้เข้าใจถึงการเกิดแมลงชนิดใหม่ และอาจใช้ประโยชน์ในการจัดการศัตรูพืชและแมลงพาหะ (Laven, 1967)

จากความสัมพันธ์ทางด้านนิเวศวิทยาของแมลง โดยเฉพาะทางด้านการกินของแมลงซึ่งอยู่ในชุมชน (community) เดียวกัน อาจเป็นปัจจัยหลักอันหนึ่งในการทำให้เกิดการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ (horizontal transmission) ของ *Wolbachia* ดังนั้นการที่สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งกินสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่ติดเชื้อ *Wolbachia* สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นก็อาจจะติดเชื้อ *Wolbachia* ไปด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะเน้นไปที่ความสัมพันธ์ของแมลงอาศัยและแมลงเบียน (parasite / host) (West et al., 1998) ดังนั้นในการศึกษารังนี้จึงเน้นไปที่ประชากรของสัตว์ขาปล้องที่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ที่มีความสัมพันธ์กันในชุมชน เพื่อที่จะตรวจสอบความสัมพันธ์ด้านการกินที่เป็นไปได้ ไม่เฉพาะแต่ความสัมพันธ์ระหว่างแมลงเบียนกับแมลงอาศัย

ที่มีความเป็นไปได้ในการที่จะเกิดการติดเชื้อดังกล่าวเท่านั้น แต่ได้ศึกษาถึงการกระจายของ *Wolbachia* ในสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับพืชตระกูลแตง 2 ชนิด คือ บวบหอม (*Luffa cylindrica*) และฟักทอง (*Cucurbita moschata*) ทางภาคตะวันตกของประเทศไทย

ในการศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเกิดชนิดใหม่ และการใช้ *Wolbachia* สำหรับโครงการจัดการศัตรูพืชและแมลงพาหะโดยชีววิธีนั้น ประชากรของแมลงชนิดนั้นๆ จะต้องมียัตราการติดเชื้อของ *Wolbachia* สูงสม่ำเสมอและคงที่ในประชากร (Werren and O'Neill, 1997) การสำรวจอัตราการติดเชื้อของแมลงจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าแมลงมีการติดเชื้อ *Wolbachia* น้อยกว่า 100% (Hoshizaki and Shimada, 1995; Wenseleers et al., 1998; Kittayapong et al., 2000b) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการติดเชื้อยังมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา เช่น ที่พบในประชากรของ *Drosophila melanogaster* (Turelli and Hoffmann, 1991) ซึ่งเป็นข้อจำกัดทางคุณสมบัติของการเกิดชนิดใหม่ และการจัดการศัตรูพืชและแมลงพาหะโดยชีววิธีดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ จึงได้สำรวจอัตราการติดเชื้อในประชากรที่พบในแต่ละเดือนจากการสุ่มตัวอย่างของแมลง 4 ชนิด ใน 5 ประชากร ที่มีความสัมพันธ์กับพืชตระกูลแตงทั้ง 2 ชนิด เป็นเวลา 12 เดือน

จากรายงานการศึกษาพบว่าการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงเบียนชนิด *Diachasmimorpha longicaudata* ซึ่งเป็นแมลงจัดอยู่ในอันดับ Hymenoptera วงศ์ (family) Braconidae ซึ่งเป็นแมลงเบียนของแมลงวันผลไม้ (Kitthawee, 2000) แมลงชนิดนี้เป็นแมลงเบียนชนิด solitary โดยจะเบียนหนอนแมลงวันผลไม้ในระยะที่ 3 พบแพร่กระจายทั่วไปอยู่ทั่วโลก และทำการเบียนแมลงวันผลไม้ที่ทำลายผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดและได้ใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมประชากรของแมลงวันผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจ (Montoya et al., 1999) มีการสืบพันธุ์แบบ haplo-diploid โดยเพศเมียจะเจริญมาจากไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ (2n) และเพศผู้มาจากไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (n) (Quicke, 1997) ดังนั้นผลกระทบที่เกิดจากการติดเชื้อ *Wolbachia* กับแมลงที่มีลักษณะการสืบพันธุ์เช่นนี้จึงเป็นที่น่าสนใจยิ่ง ได้มีการศึกษาพบว่าการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงเบียนกลุ่ม Hymenoptera หลายชนิด (Cook and Butcher, 1999) แต่การศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของ *Wolbachia* ต่อการสืบพันธุ์ของแมลงกลุ่มนี้ยังมีค่อนข้างน้อย โดยพบว่ามีผลกระทบ 3 แบบ แต่ละแบบขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงอาศัย เช่น PI {เกิดใน *Trichogramma deion* (Stouthamer and Werren, 1993)}, CI {เช่นใน *Nasonia vitripennis* (Breeuwer and Werren, 1990; Ryan and Saul, 1968)} และเพิ่มการวางไข่ {(เช่น *T. bourarachae* (Girin and Bouletreau, 1995))}

ผลกระทบของการติดเชื้อ *Wolbachia* ต่อแมลงเบียน *D. longicaudata* ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด ถ้าการติดเชื้อ *Wolbachia* มีความสัมพันธ์กับการเกิด PI และ CI อาจใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาเรื่องการเกิดสปีชีส์ใหม่ และงานทางด้านจัดการทางชีววิธีสำหรับแมลงวันผลไม้ การศึกษาจึงเน้นถึงผลกระทบของการติดเชื้อ *Wolbachia* ต่อแมลงเบียน *D. longicaudata* ในประเทศไทย

3.3.2 วัตถุประสงค์

3.3.2.1 ตรวจสอบการกระจายตัวของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ในสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับพืชตระกูลแตง 2 ชนิด คือ ฟักทอง (*Cucurbita moschata*) และบวบหอม (*Luffa cylindrica*) ในพื้นที่ทำการทดลอง ในประเทศไทย

3.3.2.2 ตรวจสอบความผันแปรของความสัมพันธ์ในการพบจุลินทรีย์ *Wolbachia* ในสัตว์ขาปล้อง ความสัมพันธ์กับพืชตระกูลแตง 2 ชนิด คือ ฟักทองและบวบหอม ในพื้นที่ทำการทดลองเป็นเวลา 1 ปี

3.3.2.3 ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ *Wolbachia* กับการผสมพันธุ์แบบแม่ให้ลูกเพศเมียโดยไม่ต้องได้รับการผสมพันธุ์ (Thelytokous Parthenogenesis) ของแมลงเบียน *Diachasmimorpha longicaudata*

3.3.2.4 ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ *Wolbachia* กับปรากฏการณ์การเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึม (cytoplasmic incompatibility) ของแมลงเบียน *D. longicaudata*

3.3.3 วิธีการศึกษา

3.3.3.1 การกระจายตัว และความผันแปรของความสัมพันธ์ในการพบเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* ในสัตว์ขาปล้อง (arthropod) ที่มีความสัมพันธ์กับพืชตระกูลแตง 2 ชนิด คือ ฟักทอง และบวบหอม

(ก) การเก็บตัวอย่างสัตว์ขาปล้อง และการจำแนกชนิด

- การเก็บตัวอย่างสัตว์ขาปล้อง

สุ่มเก็บตัวอย่างสัตว์ขาปล้องจากแปลงฟักทองและบวบหอมจากอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเดือนละครั้ง เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2542 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 วิธีการสุ่มจะเก็บแมลงที่พบที่บนต้นฟักทองและบวบหอม แล้วนำไปเลี้ยงในห้องทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ที่ 24-29°C ความชื้นสัมพัทธ์ 50-75% แมลงวันผลไม้ที่เจริญเป็นตัวเต็มวัยจะให้น้ำและอาหาร (1:2; yeast hydrolyzed : sugar) เพื่อให้แมลงวันผลไม้ได้เจริญเติบโตอย่างเต็มที่ เป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน เพื่อให้สีและลักษณะทางกายภาพ (morphology) เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดต่อไป

สัตว์ขาปล้องทุกชนิดที่ทำการสุ่มจับมาได้ และที่นำมาเลี้ยงเป็นตัวเต็มวัยในห้องทดลอง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับการจำแนกชนิด และการสกัด DNA

- การจำแนกชนิด

สัตว์ขาปล้องทุกชนิดที่ได้ทำการสุ่มจับจากแปลงทดลอง และที่นำมาเลี้ยงเป็นตัวเต็มวัยในห้องทดลอง ทำการจำแนกชนิดเบื้องต้นในครั้งแรกโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพภายนอก (morphology) และลักษณะสี แล้วจึงแบ่งเป็น 2 กลุ่ม เพื่อใช้สำหรับการศึกษา *Wolbachia* และการจำแนกชนิด

การจำแนกชนิดของสัตว์ขาปล้องใช้วิธีการของ Upton (1991) การจำแนกเป็นวงศ์ (family) โดยใช้วิธีการของ Naumann et al. (1991a, b) ชนิดของสัตว์ขาปล้องที่ทำการจำแนก จะต้องส่งไปตรวจสอบอีกครั้งโดยผู้เชี่ยวชาญที่หน่วยงานอนุกรมวิธาน กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ประเทศไทย

(ข) การตรวจสอบจุลินทรีย์ *Wolbachia* โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

สัตว์ขาปล้องที่แยกไว้สำหรับการศึกษา *Wolbachia* นำมาสกัด DNA โดยใช้วิธี crude boiling method (O'Neill et al., 1992) จากนั้นนำ DNA ที่ได้มาทำการตรวจสอบหา *Wolbachia* โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มขยายชิ้นส่วนของ *ftsZ* gene ของ *Wolbachia* (Kittayapong et al., 2000a)

(ค) การตรวจสอบ *Wolbachia* โดยวิธีการเพิ่มจำนวน DNA (DNA cloning) และตรวจหาลำดับเบส (sequencing)

DNA ของสัตว์ขาปล้องที่มีการตรวจพบ *Wolbachia* ถูกนำมาตรวจสอบอีกครั้งเพื่อยืนยันการตรวจพบโดยใช้วิธีการเพิ่มจำนวน DNA (DNA cloning) และการตรวจหาลำดับเบส (sequencing) โดยใช้คู่ของ primer คือ wsp81F และ wsp691R ซึ่งมีจำนวนคู่เบสอยู่ระหว่าง 590-632 bp (Zhou et al., 1998) ตรวจหาลำดับเบส โดยวิธี dideoxy chain termination โดยใช้เครื่องมือ ABI automated sequencer (หน่วย BioService สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ ประเทศไทย) เครื่องมือดังกล่าว จะทำการหาลำดับเบส การศึกษาทาง electrophoresis การตรวจดูแถบ DNA และการวิเคราะห์แถบ DNA ทำการตรวจหาลำดับเบส 3 ครั้งต่อสัตว์ขาปล้อง 1 ชนิดเพื่อใช้ในการตรวจสอบความแม่นยำ

3.3.3.2 ผลกระทบของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ต่อแมลงเบียน *Diachasmimorpha longicaudata*

(ก) แหล่งที่มาของแมลงเบียน *D. longicaudata* การเพาะเลี้ยง และการตรวจหาการติดเชื้อ *Wolbachia*

เก็บตัวอย่างผลไม้ที่มีหนอนของแมลงวันผลไม้ทั่วประเทศไทย ผลไม้แต่ละชนิดถูกแยกใส่กล่องพลาสติกที่มีฟารายอากาศและมีขี้เลื่อยหนาประมาณ 1 ซม. สำหรับให้แมลงเข้าดักแด้ หลังจากนั้นประมาณ 7 วัน จึงย้ายดักแด้ใส่กล่อง เลี้ยงจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้และแมลงเบียน *D. longicaudata* แมลงเบียนเพศเมียถูกจำแนกชนิดตามวิธีการของ (Kitthawee, unpublished data) เพศผู้ที่เกิดพร้อมกันถือว่าเป็นแมลงชนิดเดียวกัน แมลงวันผลไม้ถูกจำแนกชนิดตามวิธีการของ White and Elson-Harris (1992)

ทำการสุ่มและทดสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในประชากรแมลงวันผลไม้และแมลงเบียน *D. longicaudata* จากตัวอย่างในธรรมชาติที่มีจำนวนมาก และหากมีจำนวนไม่มากพอประชากรนั้นจะถูก

เลี้ยงต่อเพื่อขยายจำนวนจนเพียงพอต่อการทดสอบ โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ช่วงเวลาที่มีแสง: ไม่มีแสงเท่ากับ 10:14 ชม. แมลงเบียนตัวเต็มวัยถูกเลี้ยงในกล่องเลี้ยง ที่มีสำลีชุบน้ำฝึ้งเข้มข้น 50% และ ถ้วยใส่น้ำที่มีไส้ฟองน้ำ พร้อมทั้งวางผ้าชุบน้ำบนฝากล่องเพื่อรักษาความชื้น แมลงวันผลไม้ถูกเลี้ยงในกล่องที่มียีสต์และน้ำตาลทราย อัตราส่วน 1:2 เป็นอาหาร และให้น้ำในลักษณะเดียวกัน เมื่อแมลงวันผลไม้ อายุประมาณ 21 วัน ให้วางไข่บนกล้วยน้ำว้า ในอัตราส่วนแมลงวันผลไม้ตัวเมีย 25 ตัวต่อกล้วยน้ำว้า 1 ผล ในการป้องกันการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* แบบ horizontal แมลงเบียนจะได้รับหนอนของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera correcta* ที่ปราศจากเชื้อ *Wolbachia* เท่านั้น ซึ่งทั้งแมลงเบียนและแมลงวันผลไม้ได้รับการตรวจหาการติดเชื้อ *Wolbachia* เป็นระยะๆ

(ข) การศึกษาการเกิดลูกเพศเมียโดยแม่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ (Thelytokous Parthenogenesis)

ในแมลงเบียน *D. longicaudata*

ทำการตรวจหาสัดส่วนการให้ลูกเพศเมียจากแม่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ในประชากรแมลงเบียน *D. longicaudata* ซึ่งแมลงเบียนตัวแม่ถูกนำมาตรวจหาการติดเชื้อ *Wolbachia* หลังจากรวบรวมไข่แล้ว เพื่อเป็นการหาปัจจัยที่ทำให้เกิดการให้ลูกเพศเมียโดยไม่ต้องผสมพันธุ์ซึ่งสามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้ โดยทำการศึกษาทั้งแมลงที่ได้จากการเลี้ยงในห้องทดลองและที่เก็บมาจากธรรมชาติ และให้แมลงเบียนเพศเมียนั้นวางไข่บนหนอนของแมลงวันผลไม้ระยะที่ 3 ซึ่งเลี้ยงบนกล้วยน้ำว้า จนกระทั่งแมลงเบียนเพศเมียนั้นตาย แล้วจึงเก็บไว้ในหลอดพลาสติกขนาดเล็กที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะต้องการตรวจหา *Wolbachia*

ทำการเก็บลูกแมลงเบียนที่เกิดมา และทำการแยกเพศทุกวัน หลังจากนั้นนำไปเก็บในหลอดพลาสติกเล็กๆ ที่อุณหภูมิ -20°C ลูกเพศเมียที่เกิดมาโดยไม่มีลูกเพศผู้เกิดมาพร้อมกันในวันนั้นจะถูกคัดเลือกไว้สำหรับการทดลองเพศเมียสายเดี่ยว (isofemale line) ต่อไป

- การเพาะเลี้ยงแมลงเบียนเพศเมียที่ให้ลูกโดยไม่ได้รับการผสมพันธุ์แบบสายเดี่ยว (isofemale line)

ลูกแมลงเบียนเพศเมียที่เกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์จากรุ่นที่ 1 จะไม่ได้รับการผสมพันธุ์และให้วางไข่ที่มีหนอนแมลงวันผลไม้ระยะที่ 3 ซึ่งเลี้ยงบนกล้วยน้ำว้า เปลี่ยนกล้วยน้ำว้าทุก 3 วัน ตลอดชีวิตของแมลงเบียนเพศเมียนั้น รวบรวมเก็บดักดักทั้งหมดโดยแยกดักใส่หลอดพลาสติกขนาดเล็กหลอดละ 1 ตัว เพื่อให้ลูกแมลงเบียนที่เกิดขึ้นมาไม่มีโอกาสผสมพันธุ์กันได้ จดบันทึกอายุของแมลงเบียนเพศเมียจำนวนดักดักทั้งหมด ทำการแยกเพศและนับจำนวนลูกทั้งหมด เก็บลูกเพศผู้และลูกเพศเมียที่ตายตั้งแต่วันที่แรกที่เกิดไว้ในหลอดพลาสติกขนาดเล็กที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C การทดลองนี้จะทำซ้ำเมื่อได้ลูกเพศเมียจากแม่เพศเมียในการทดลองนี้

(ค) การศึกษาพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของแมลงเบียน *D. longicaudata*

การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมในการวางแผนการทดลองความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic incompatibility) โดยแบ่งการทดลองนี้ออกเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

- ความสัมพันธ์ระหว่างการผสมพันธุ์กับการถ่ายเทสเปิร์ม (insemination)

แมลงเบียนเพศผู้และเพศเมียถูกจัดให้ผสมพันธุ์เพื่อศึกษาพฤติกรรมการผสมพันธุ์ แมลงเบียนเพศเมียแต่ละตัวที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วถูกแยกออกให้วางไข่บนหนอนแมลงวันผลไม้ระยะที่ 3 ที่เลี้ยงบนกล้วยน้ำว้า จนกระทั่งเพศเมียตาย การที่แมลงเบียนเพศเมียให้กำเนิดลูกเพศเมียแสดงถึงว่ามี การถ่ายเทสเปิร์มจากแมลงเบียนเพศผู้ไปยังแมลงเบียนเพศเมีย ซึ่งถือเป็นความสำเร็จในการผสมพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการผสมพันธุ์ และอายุของแมลงที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์ด้วย

- การผสมพันธุ์สองครั้งของแมลงเบียนเพศเมียในระยะเวลาที่กำหนด

แมลงเบียนเพศเมียถูกจัดให้ผสมพันธุ์กับแมลงเบียนเพศผู้ 2 ตัว เพื่อศึกษาว่าแมลงเบียนเพศเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์ไปแล้วนั้นสามารถผสมพันธุ์อีกครั้งได้หรือไม่ภายในระยะเวลาที่กำหนด และมีระยะเวลาห่างจากครั้งแรกเท่าใด

- อิทธิพลของจำนวนของแมลงเบียนเพศผู้ต่อโอกาสในการเกิดการผสมพันธุ์

ศึกษาถึงความถี่ในการผสมพันธุ์ ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการผสมพันธุ์ ระยะห่างจากการผสมพันธุ์ครั้งแรก และพฤติกรรมการแข่งขันเพื่อการผสมพันธุ์ แมลงเบียนเพศเมียถูกจัดให้อยู่ในจานเพาะเชื้อพลาสติกขนาดเล็กพร้อมด้วยแดนเบียนเพศผู้ที่มีอัตราส่วนเพศเมียต่อเพศผู้ คือ 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:10 ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ

- การทดสอบความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic incompatibility) อันเกิดจากการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงเบียน *D. longicaudata*

แมลงเบียนเพศเมียและแมลงเบียนเพศผู้จากประชากรที่ติดเชื้อและปลอดเชื้อโดยการทำให้ปราศจากเชื้อ (Antibiotic curing) ถูกจัดให้ผสมพันธุ์ในแบบต่างๆ ดังนี้

1. แมลงเบียนเพศเมียที่ติดเชื้อ ผสมพันธุ์กับ แมลงเบียนเพศผู้ที่ติดเชื้อ ($I\varphi \times I\sigma$)
2. แมลงเบียนเพศเมียที่ติดเชื้อ ผสมพันธุ์กับ แมลงเบียนเพศผู้ปลอดเชื้อ ($I\varphi \times U\sigma$)
3. แมลงเบียนเพศเมียปลอดเชื้อ ผสมพันธุ์กับ แมลงเบียนเพศผู้ปลอดเชื้อ ($U\varphi \times U\sigma$)
4. แมลงเบียนเพศเมียที่ปลอดเชื้อ ผสมพันธุ์กับ แมลงเบียนเพศผู้ติดเชื้อ ($U\varphi \times I\sigma$)

หลังจากที่เพศเมียได้รับการผสมพันธุ์แล้ว แต่ละตัวจะถูกแยกให้วางไข่เป็นเวลา 3 วัน

จากคุณสมบัติของ *Wolbachia* ในการทำให้เกิดความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึม ทำให้คาดหวังผลของการทดลองนี้เมื่อเกิดความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมโดยสมบูรณ์ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3.3.1

$I♀ \times I♂$	$I♀ \times U♂$	$U♀ \times U♂$	$U♀ \times I♂$
↓	↓	↓	↓
$I♀, I♂$	$I♀, I♂$	$U♀, U♂$	$I♂$
(เข้ากันได้, ลูกทั้งสองเพศ)	(เข้ากันได้, ลูกทั้งสองเพศ)	(เข้ากันได้, ลูกทั้งสองเพศ)	(เข้ากันไม่ได้, ลูกเพศผู้เท่านั้น)
$I♀$ = แมลงเบียนเพศเมียที่ติดเชื้อ $I♂$ = แมลงเบียนเพศเมียที่ติดเชื้อ $U♀$ = แมลงเบียนเพศเมียที่ติดเชื้อ $U♂$ = แมลงเบียนเพศเมียที่ติดเชื้อ			

ภาพที่ 3.3.1 ความคาดหวังเมื่อเกิดความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมโดยสมบูรณ์ (Complete cytoplasmic incompatibility) ในแมลงเบียน *Diachasmimorpha longicaudata*

3.3.4 ผลการศึกษา

3.3.4.1 การกระจายตัว และความผันแปรของความถี่ในการพบจุลินทรีย์ *Wolbachia* ในสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับพืชตระกูลแดง 2 ชนิด คือ พักทองและบวบหอม

(ก) การกระจายตัวของ *Wolbachia*

จากการสุ่มจับสัตว์ขาปล้องในแปลงพักทองและบวบหอม พบสัตว์ขาปล้องจำนวน 62 ชนิด (แมลง 60 ชนิด และไร 2 ชนิด) (ตารางที่ 3.3.1 และ 3.3.2) ในจำนวนนี้มี 7 ชนิดที่พบทั้งในพักทองและบวบหอม เมื่อนำสัตว์ขาปล้องดังกล่าวมาตรวจสอบหาการติดเชื้อ *Wolbachia* โดยใช้เทคนิค PCR พบว่าสัตว์ขาปล้องที่ตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* เป็นแมลงทั้งหมด 12 ชนิดจากพักทอง (ตารางที่ 3.3.1) และในจำนวนนี้มี 2 ชนิดที่พบในบวบหอมด้วย (ตารางที่ 3.3.2)

จากแมลง 12 ชนิดที่พบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในพักทอง 6 ชนิดเก็บได้จากใบ 2 ชนิด เก็บได้จากดอก และ 4 ชนิดเก็บได้จากผล (ตารางที่ 3.3.1) แมลง 2 ชนิดที่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ในบวบหอม นั้น 1 ชนิดพบในดอกและอีก 1 ชนิดพบในผล (ตารางที่ 3.3.2)

แมลงที่พบการติดเชื้อ *Wolbachia* จากพืชทั้งสองชนิดได้นำมาทำการยืนยันผลการติดเชื้ออีกครั้งโดยใช้วิธีการตรวจหาลำดับเบส (sequencing) และพบว่าสามารถยืนยันการติดเชื้อ *Wolbachia* 7 ชนิดจาก 12 ชนิด (ตารางที่ 3.3.3)

สัตว์ขาปล้องที่เก็บจากพักทองและบวบหอมประกอบด้วยแมลงจำนวน 9 และ 5 อันดับ (order) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.3.4) ซึ่งแมลง 6 จาก 9 อันดับ que เก็บจากพักทอง และ 2 จาก 5 อันดับ que เก็บจากบวบหอมพบการติดเชื้อ *Wolbachia* อัตราส่วนชนิดที่ติดเชื้อ (species infection rate) มีความแตกต่างในแต่ละอันดับ โดยพบอัตราการติดเชื้อ 15% ในอันดับ Coleoptera, 27.4% ในอันดับ Diptera, 12.5% ในอันดับ Hemiptera, 30% ในอันดับ Homoptera และ 16.7% ในอันดับ Hymenoptera โดยที่อัตราการติดเชื้อคำนวณจากตัวอย่างของแมลงที่มีการติดเชื้อมากกว่า 4 ตัวอย่างของแมลง que ทำการทดสอบ ดังนั้นอัตราการติดเชื้อในบวบหอมจึงไม่มีการคำนวณเนื่องจากตัวอย่างของแมลงที่มีการติดเชื้อน้อยกว่า 4 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.3.1 การกระจายตัวของสารสกัดเชื้อ *Wolbachia* ในสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับพืชทอง โดยตัวอย่างของสัตว์ขาปล้องทำการสกัด DNA ด้วยวิธีของ O'Neill et al. (1992) ยกเว้นบางชนิดที่มีเครื่องหมายยีนดื้อการใช้การสกัด DNA ด้วยวิธีที่เรียกว่า phenol-chloroform extraction ซึ่งส่วนของ DNA ขึ้นกับขนาดของตัวอย่าง (A = whole inside abdomen B = whole abdomen C = whole individual)

Plant part	Species	Order	Body part used for DNA extraction	Common name	Wolbachia	
					No. tested	No. positive (%)
LEAF	CLASS ARACHNIDA					
	Unk. sp. (F. Parasitidae)	PROSTIGMATA	C	Mite	23	0
	Unk. sp. (F. Parasitidae)*	PROSTIGMATA	C	Mite	1	0
LEAF	CLASS INSECTA					
	<i>Blattella germanica</i> (Linnaeus)	BLATTARIA	A	German cockroach	1	0
	<i>Aulacophora frontalis</i> Baly	COLEOPTERA	A	Black pumpkin beetle	4	0
	<i>Aulacophora indica</i> Gmelin	COLEOPTERA	A	Red pumpkin beetle	46	0
	<i>Blasyrus herthus</i> Hbst.	COLEOPTERA	A	Weevil	1	0
	<i>Calomyeterus</i> sp.	COLEOPTERA	A	Ground weevil	2	0
	<i>Coccinella transversalis</i> Fabricius	COLEOPTERA	A	Ladybeetle	7	0
	<i>Coelophora bisellata</i> Mulsant	COLEOPTERA	A	Ladybeetle	5	0
	<i>Epilachna indica</i> *	COLEOPTERA	A	16-spotted beetle	1	0
	<i>Epilachna vigintioctopunctata</i> Fabricius	COLEOPTERA	A	28-spot beetle	11	0
	<i>Lycostomus lateritius</i> Gorham	COLEOPTERA	A	Lycid beetle	1	0
	<i>Lygaria westermanni</i> Stal.	COLEOPTERA	A	Ladybeetle	2	0
	<i>Micraspis discolor</i> (Fabricius)	COLEOPTERA	A	Beetle	1	0
	<i>Monolepta signata</i> (Olivier)	COLEOPTERA	A	4-spot beetle	10	1 (10)
	<i>Monolepta signata</i> *	COLEOPTERA	A	4-spotted beetle	9	0
	<i>Phrixopogen hausti</i> Marshall	COLEOPTERA	A	Weevil	1	0
	<i>Phyllotreta sinuata</i> (Stephens)	COLEOPTERA	B	Striped flea beetle	4	1 (25)

ตารางที่ 3.3.1 (ต่อ)

Plant part	Species	Order	Body part used for DNA extraction	Common name	Wolbachia	
					No. tested	No. positive (%)
	Unk. sp. (F. Carabidae) *	COLEOPTERA	C	Ground beetle	4	0
	Unk. sp. (F. Curculionidae) *	COLEOPTERA	A	Green weevil	1	0
	Unk. sp. (F. Curculionidae) *	COLEOPTERA	A	Striped weevil	1	0
	Unk. sp. (O. Dermaptera) *	DERMAPTERA	A	Earwigs	2	0
	Unk. sp. (F. Drosophilidae) *	DIPTERA	C	Drosophilid fly	2	0
	<i>Cletus trigonus</i> Thunberg	HEMIPTERA	A	Bug	6	0
	<i>Dysdercus cingulatus</i> (Fabricius)	HEMIPTERA	A	Red cotton beetle	1	0
	<i>Halticus minutus</i> Reater	HEMIPTERA	C	Mirid bug	106	47 (44)
	<i>Halticus minutus</i> *	HEMIPTERA	C	Mirid bug	23	2(7)
	<i>Leptocoris oratorius</i> (Fabricius)	HEMIPTERA	A	Alysid beetle	1	0
	<i>Leptoglossus gonagra</i> (Fabricius)	HEMIPTERA	A	Squash beetle	3	0
	<i>Malcus scutellatus</i> Distant	HEMIPTERA	A	Bug	1	0
	<i>Malcus scutellatus</i> *	HEMIPTERA	A	Bug	4	0
	Unk. sp. (F. Miridae) *	HEMIPTERA	B	Big mirid bug	5	0
	Unk. sp. (F. Plataspididae)	HEMIPTERA	A	Green beetle	3	0
	<i>Aphis craccivora</i> Koch	HOMOPTERA	C	Cowpea aphid	17	7 (41)
	<i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	HOMOPTERA	C	Whitefly	172	127(72)
	<i>Botrogonia indistincta</i> Walker	HOMOPTERA	A	Leafhopper	7	0
	<i>Callitettix versicolor</i> Fabricius	HOMOPTERA	A	Sugarcane spittlebug	10	0
	Unk. sp. (F. Aphididae) *	HOMOPTERA	C	Aphid	2	0
	Unk. sp. (F. Lygaeidae) *	HOMOPTERA	A	Bug	2	0

ตารางที่ 3.3.1 (ต่อ)

Plant part	Species	Order	Body part used for DNA extraction	Common name	Wolbachia	
					No. tested	No. positive (%)
	Unk. sp.1 (F. Cicadellidae)	HOMOPTERA	A	Leafhopper	1	0
	Unk. sp.1 (F. Cicadellidae) *	HOMOPTERA	A	Leafhopper	1	0
	Unk. sp.2 (F. Cicadellidae) *	HOMOPTERA	C	Leafhopper	2	0
	Nisia nrvosa (F. Cicadellidae)	HOMOPTERA	C	Leafhopper	5	1
	Celyphus scutatus*	HYMENOPTERA	C	Wasp	1	0
	Unk. sp. (F. Formicidae) *	HYMENOPTERA	C	Ant	5	0
	Unk. sp.1 (F. Tachinidae) *	HYMENOPTERA	C	Small wasp	3	0
	Ischnura sp.	ODONATA	A	Damselfly	3	0
	Frankliniella schultzei Trybom	THYSANOPTERA	C	Flower thrips	8	0
FLOWER	Aulacophora frontalis Baly	COLEOPTERA	A	Black pumpkin beetle	3	0
	Aulacophora indica Gmelin	COLEOPTERA	A	Red pumpkin beetle	24	0
	Aulacophora similis (Olivier)	COLEOPTERA	A	Red pumpkin beetle	1	0
	Haptoncus sp.	COLEOPTERA	C	Beetle	10	0
	Unk. sp. (Subfamily Pterostichini, F. Carabidae)	COLEOPTERA	C	Ground beetle	10	0
	Melanagromyza sp.	DIPTERA	C	Stem miner	2	2(100)
	Unk. sp. (F. Agromyzidae)	DIPTERA	C	Leaf minor	1	0
	Apis florea Fabricius	HYMENOPTERA	A	Bee	1	0
	Celyphus scutatus Wiedeman	HYMENOPTERA	C	Wasp	2	0
	Unk. sp. (F. Apidae)	HYMENOPTERA	C	Sting less bee	1	0
	Ischnura sp.	ODONATA	A	Pond damselfly	2	0
	Frankliniella schultzei Trybom	THYSANOPTERA	C	Thrips	3	1 (33)
FRUIT	Blattella germanica (Linnaeus)	BLATTARIA	A	German cockroach	3	0
	Onthophagus vaulonger Bouche	COLEOPTERA	A	Scarab beetle	6	1 (16)

ตารางที่ 3.3.1 (ต่อ)

Plant part	Species	Order	Body part used for DNA extraction	Common name	Wolbachia	
					No. tested	No. positive (%)
	<i>Bactrocera cucurbitae</i> (Coquillett)	DIPTERA	A	Tephritid fruit fly	1	0
	<i>Bactrocera diversa</i> (Coquillett)	DIPTERA	A	Tephritid fruit fly	1	0
	<i>Bactrocera tau</i> (Walker)	DIPTERA	A	Tephritid fruit fly	44	3 (7)
	<i>Sarcophaga drosophila</i> sp.	DIPTERA	A	Fly	1	0
	<i>Sympycnus</i> sp.	DIPTERA	A	Seiid fly	13	0
	<i>Graptomyza bruijstii</i> (F. Tachinidae)	DIPTERA	C	Rounded head fly	5	3(60)
	Unk. sp.2 (F. Drosophilidae) *	DIPTERA	C	Drosophilid flies	5	0
	Unk. sp.3 (F. Drosophilidae) *	DIPTERA	C	Black drosophilid flies	1	0
	<i>Diachasma mimorpha longicauda</i> (Ashmead) ¹	HYMENOPTERA	B	Parasitoid	1	0
	<i>Diachasma mimorpha longicauda</i> (Ashmead) ²	HYMENOPTERA	B	Parasitoid	18	15 (83)
	TOTAL				673	211

¹ Adult collected from fruit in the field.

² Adults reared from fruits collected in the field.

ตารางที่ 3.3.2 การกระจายตัวของ การติดเชื้อ *Wolbachia* ในสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับบวมหม โดยตัวอย่างของสัตว์ขาปล้องทำการสกัด DNA ด้วยวิธีของ O'Neill et al. (1992) ชิ้นส่วนของ DNA ขึ้นกับขนาดของตัวอย่าง (A = whole inside abdomen B = whole abdomen C = whole individual)

Plant part	Species	Order	Body part used for DNA extraction	Common name	<i>Wolbachia</i>	
					No. tested	No. positive (%)
	CLASS INSECTA					
LEAF	<i>Aulacophora frontalis</i> Baly	COLEOPTERA	A	Black pumpkin beetle	10	0
	<i>Aulacophora indica</i> Gmelin	COLEOPTERA	A	Red pumpkin beetle	1	0
	<i>Epilachna indica</i> Mulsant	COLEOPTERA	A	16-spot beetle	1	0
	<i>Epilachna vigintioctopunctata</i> Fabricius	COLEOPTERA	A	28-spot beetle	5	0
	<i>Botrogonia indistrincta</i> Walker	HOMOPTERA	A	Leafhopper	2	0
	<i>Callitettix versicolor</i> Fabricius	HOMOPTERA	A	Sugarcane spittlebug	7	0
FLOWER	<i>Blattella germanica</i> (Linnaeus)	BLATTARIA	A	German cockroach	1	0
	<i>Aulacophora indica</i> Gmelin	COLEOPTERA	A	Red pumpkin beetle	3	0
	<i>Aphis craccivora</i> Koch	HOMOPTERA	C	Cowpea aphid	10	1 (10)
	<i>Frankliniella schultzei</i> Trybom	THYSANOPTERA	C	Flower thrips	9	0
FRUIT	<i>Bactrocera tau</i> (Walker)	DIPTERA	A	Tephritid fruit fly	222	13 (6)
TOTAL					271	14

ตารางที่ 3.3.3 ชนิดของแมลงที่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ทดสอบโดยเทคนิค PCR และตรวจสอบการติดเชื้อ โดยการหาลำดับเบส โดยใช้ไพรเมอร์ *wsp*; พืชอาศัย : ✓ = มีแมลงชนิดนั้น, ✗ = ไม่มีแมลงชนิดนั้น; วิธีการตรวจสอบ : ✓ = ได้รับการตรวจสอบ, ✗ = ไม่ได้ตรวจสอบ.)

Plant part	Insect species	Host plant		Testing method	
		Pumpkin	Loofah	PCR	Sequencing
Leaf	<i>Aphis craccivora</i>	✓	✓	✓	✗
	<i>Halticus minutus</i>	✓	✗	✓	✓
	<i>Monolepta signata</i>	✓	✗	✓	✗
	<i>Phyllotreta sinuata</i>	✓	✗	✓	✓
	<i>Bemisia tabaci</i>	✓	✗	✓	✓
	Unk. sp.3 (F. Cicadellidae)	✓	✗	✓	✓
Flower	<i>Frankliniella schultzei</i>	✓	✗	✓	✗
	<i>Melanagromyza</i> sp.	✓	✗	✓	✗
Fruit	<i>Bactrocera tau</i>	✓	✓	✓	✗
	<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	✓	✗	✓	✓
	<i>Onthophagus vaulongeri</i>	✓	✗	✓	✓
	Unk. sp. (F. Tachinidae)	✓	✗	✓	✓

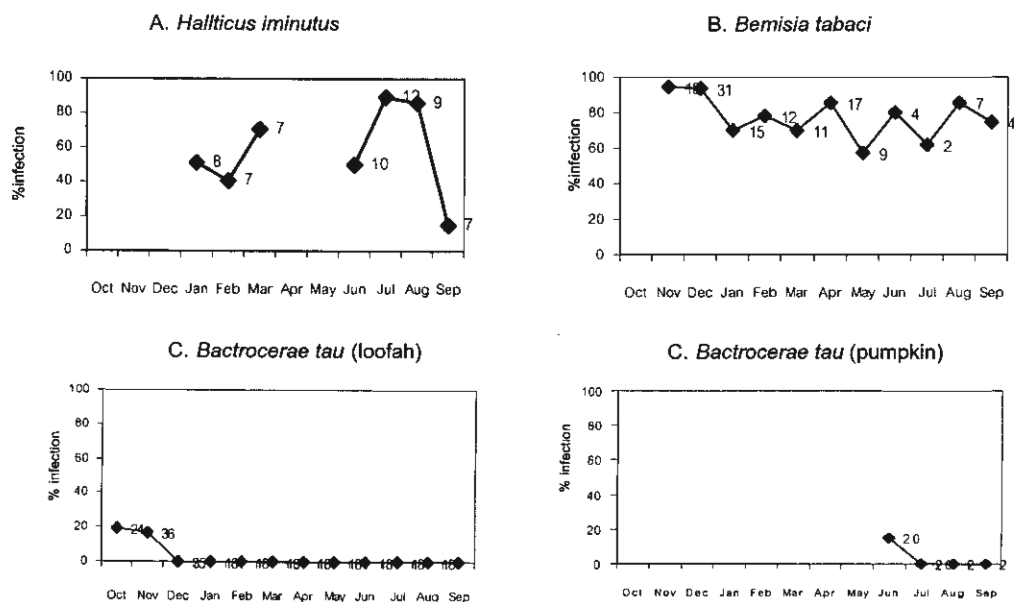
ตารางที่ 3.3.4 จำนวนและอัตราการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแต่ละอันดับของสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับ พักทองและบวบหอม

Order	Pumpkin		Loofah	
	No. infected / No. tested	% Infection	No. infected / No. tested	% Infection
ARACHNIDA				
Prostigmata	0/2	0.0	0/0	0.0
INSECTA				
Blattaria	0/1	0.0	0/1	0.0
Coleoptera	3/20	15.0	0/4	0.0
Diptera	3/11	27.3	1/1	100.0
Hemiptera	1/8	12.5	0/0	0.0
Homoptera	3/10	30.0	1/3	33.3
Hymenoptera	1/6	16.7	0/0	0.0
Odonata	0/1	0.0	0/0	0.0
Thysanoptera	1/1	100.0	0/1	0.0
TOTAL	12/60		2/10	

(ข) ความผันแปรของความถี่ในการพบจุลินทรีย์ *Wolbachia*

ความผันแปรตามฤดูกาลของความถี่ในการพบจุลินทรีย์ *Wolbachia* ซึ่งศึกษาในช่วงเวลา 12 เดือน จากแมลง 4 ชนิด ใน 5 ประชากร ประกอบด้วย แมลงวันผลไม้ *Bactrocera tau* 2 ประชากร (จากฟักทองและบวบหอม) และในแต่ละประชากรของมวนหญา *Halticus minutus* ตัวง่าเต่าแดง *Aulacophora indica* และแมลงหรีขาว *Bemisia tabaci*

อัตราการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงหรีขาว *B. tabaci* มีความถี่ในการติดเชื้อที่สูงและสม่ำเสมอ โดยอัตราการติดเชื้ออยู่ในช่วง 57-95% ตลอดช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 3.3.2B) โดยอัตราการติดเชื้อ *Wolbachia* ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\chi^2 = 14.89$, d.f. = 10, $p = 0.137$) ในทางตรงข้ามการติดเชื้อ *Wolbachia* ในมวนหญา *H. minutus* มีความผันแปรสูง (อัตราการติดเชื้อ 16-90%) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($\chi^2 = 17.59$, d.f. = 6, $p = 0.007$) ดังภาพที่ 3.3.2A ในแมลงวันผลไม้ *B. tau* อัตราการติดเชื้อ *Wolbachia* ส่วนใหญ่จะเท่ากับศูนย์ โดยพบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในประชากรของแมลงวันผลไม้ *B. tau* จากบวบหอมใน 2 เดือนแรกจาก 12 เดือน (ภาพที่ 3.3.2C) และจากฟักทองพบ 1 เดือนแรกจาก 4 เดือน (รูปที่ 3.3.2D) แต่อัตราการติดเชื้อดังกล่าวจะมีค่าค่อนข้างต่ำ คือ น้อยกว่าร้อยละ 20 และไม่พบอัตราการติดเชื้อในตัวง่าเต่าแดง *A. indica* ตลอดช่วงเวลากการสำรวจ



ภาพที่ 3.3.2 ความถี่ในการพบจุลินทรีย์ *Wolbachia* ในประชากรของแมลง 4 ชนิด

3.3.4.2 ผลกระทบของเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* ต่อแมลงเบียน *D. longicaudata*

(ก) การให้ลูกเพศเมียโดยไม่ได้รับการผสมพันธุ์ (Thelytokous Parthenogenesis) ในแมลงเบียน *D. longicaudata*

จากการให้แมลงเบียนเพศเมียจำนวน 50 ตัว ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง 4 กลุ่ม วางไข่บนหนอนของแมลงวันผลไม้ *B. correcta* ซึ่งเลี้ยงบนกล้วยน้ำว้า พบว่าแมลงเบียนเพศเมีย 200 ตัวให้ลูก 5,047 ตัว (ตารางที่ 3.3.5) เป็นลูกเพศเมีย 5 ตัวหรือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนนี้มีลูกเพศเมีย 2 ตัวเกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์จากประชากรที่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ในอัตราสูง (ติดเชื้อ 83%) และลูกเพศเมีย 1 ตัวเกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ของประชากรที่ไม่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* อีก 2 ตัว เกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ของประชากรที่ไม่ทราบอัตราการติดเชื้อ สำหรับแม่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ของประชากรที่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ในอัตราต่ำ (ติดเชื้อ 33%) ไม่มีการให้ลูกเพศเมีย

ตารางที่ 3.3.5 ลูกเพศผู้และเพศเมียของแตนเบียนแมลงวันผลไม้ *Diachasmimorpha longicaudata*

จากตัวแม่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ ของประชากรจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง			
ประชากร	การติดเชื้อ <i>Wolbachia</i>	จำนวนลูกเพศผู้	จำนวนลูกเพศเมีย
WNN(ZM)6F1	ไม่ติดเชื้อ	1754	1
WSB(AS)2F10	ติดเชื้อ	867	0
WNR(ZM)5F11	ติดเชื้อ	1276	2
WNR(SS)1F11	ไม่ได้ตรวจลอบ	1145	2
รวม		5042	5

(ข) การศึกษาพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของแมลงเบียน *D. longicaudata*

- ความสัมพันธ์ระหว่างการผสมพันธุ์กับการถ่ายเทสเปิร์ม

พบว่าแมลงเบียนเกิดการผสมพันธุ์ จำนวน 21 คู่ จาก 31 คู่ ใช้ระยะเวลาในการผสมพันธุ์เฉลี่ย $\pm$ SD เท่ากับ 12.95 ± 3.43 วินาที และแมลงเบียนเพศผู้และเพศเมียอายุ 1-2 วันมีการผสมพันธุ์มากกว่าแมลงเบียนอายุ 3-4 วัน (ตารางที่ 3.3.6) โดยผลการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอาจเนื่องมาจากมีจำนวนซ้ำที่ไม่มากพอ แมลงเบียนเพศเมียทุกตัวที่ได้รับการผสมพันธุ์ให้กำเนิดลูกเพศเมียและเพศผู้โดยเฉลี่ย $\pm$ SD เท่ากับ 33.75 ± 17.79 และ 17.35 ± 7.86 ตามลำดับ

- การผสมพันธุ์สองครั้งของแมลงเบียนเพศเมียในระยะเวลาที่กำหนด

แมลงเบียนเพศเมียได้รับการผสมพันธุ์จำนวน 9 ตัว จาก 22 ตัว และในจำนวนนี้มีแมลงเบียนเพศเมียจำนวน 4 ตัว มีการผสมพันธุ์ 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้เวลาใกล้เคียงกัน คือ 17.9 ± 11.0 และ 14.8 ± 7.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของแตนเบียนกับโอกาสในการผสมพันธุ์

เพศ	การผสมพันธุ์	อายุ	
		1-2 วัน	3-4 วัน
เพศเมีย	ได้รับการผสมพันธุ์	11	9
	ไม่ได้รับการผสมพันธุ์	4	7
เพศผู้	ได้รับการผสมพันธุ์	17	3
	ไม่ได้รับการผสมพันธุ์	8	3

หมายเหตุ *1 หมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.05$)

*2 หมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.05$)

• อิทธิพลของจำนวนของแมลงเบียนเพศผู้ต่อโอกาสในการเกิดการผสมพันธุ์

แมลงเบียนเพศเมียในกลุ่มที่มีอัตราส่วนเพศเมียต่อเพศผู้เป็น 1:6 ไม่ได้รับการผสมพันธุ์จากการทดลองทั้ง 4 ซ้ำ ในขณะที่กลุ่มผสมพันธุ์อัตราส่วนอื่นๆ มีแมลงเบียนเพศเมียที่เกิดการผสมพันธุ์อย่างน้อยหนึ่งตัวจากการทดลอง 4 ซ้ำ โดยที่ไม่มีกลุ่มอัตราส่วนใดเลยที่แมลงเบียนเพศเมียมีการผสมพันธุ์ทั้ง 4 ซ้ำ แมลงเบียนเพศเมียหนึ่งตัวจากกลุ่มอัตราส่วน 1:5 และ 2 ตัว จากกลุ่มอัตราส่วน 1:10 มีการผสมพันธุ์ 2 ครั้ง

• การทดสอบความเข้ากันได้ของไซโตพลาสซึมอันเกิดจากการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงเบียน *D. longicaudata*

แมลงเบียนเพศเมียทุกตัวจากทุกรูปแบบการผสมพันธุ์ให้ลูกทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ตารางที่ 3.3.7) ค่าเฉลี่ยของจำนวนของลูกและอัตราส่วนเพศมีความใกล้เคียงกันใน 3 รูปแบบ คือ รูปแบบที่ 1 (I♀xI♂), 2 (I♀xU♂) และ 3 (U♀xU♂) ส่วนการผสมพันธุ์รูปแบบที่ 4 (U♀xI♂) มีค่าเฉลี่ยของจำนวนของลูกสูงและอัตราส่วนเพศต่ำเมื่อเทียบกับอีก 3 กลุ่มที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามความผันแปรในแต่ละกลุ่มมีค่าสูงและมีจำนวนซ้ำน้อย ดังนั้นจึงไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 3.3.7 จำนวนและอัตราส่วนเพศของลูกที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเบียน *Diachasmimorpha longicaudata* เพศผู้และเพศเมียที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *Wolbachia*

	I♀xI♂	I♀xU♂	U♀xU♂	U♀xI♂
ค่าเฉลี่ยของจำนวนลูกเพศเมีย $\pm$ SD	14.3 $\pm$ 13.1	11.5 $\pm$ 14.2	9.4 $\pm$ 7.4	23.5 $\pm$ 16.1
ค่าเฉลี่ยของจำนวนลูกเพศผู้ $\pm$ SD	12 $\pm$ 6.3	10.5 $\pm$ 7.3	11.6 $\pm$ 5.7	14.8 $\pm$ 6.3
ค่าเฉลี่ยของจำนวนลูกทั้งหมด	26.3 $\pm$ 17.8	22 $\pm$ 21.2	21 $\pm$ 13	38.3 $\pm$ 22
ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนเพศ (สัดส่วนจำนวนเพศผู้ต่อจำนวนลูกทั้งหมด)	0.54 $\pm$ 0.2	0.62 $\pm$ 0.3	0.61 $\pm$ 0.1	0.43 $\pm$ 0.1

3.3.5 บทสรุป

จากการศึกษา ณ อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า *Wolbachia* มีการกระจายอยู่ทั่วไปในสัตว์ขาปล้องที่มีความสัมพันธ์กับพืชตระกูลแตงทั้งสองชนิด (ฟักทอง และบวบหอม) สัตว์ขาปล้อง 62 ชนิด พบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแมลง 12 ชนิดจาก 6 อันดับ ในจำนวนนี้มี 2 อันดับที่เป็นแมลงที่ไม่เคยตรวจพบ *Wolbachia* จากพืชทั้งสองชนิดนี้และ 6 ชนิดที่ไม่มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* มาก่อน คือ เพลี้ยไฟ *F. schultzei* มวนหญา *H. minutus* แมลงวันเจาะลำต้น *Melanagromyza* sp. ตัวงเต่า 4 จุด *M. signata*, ตัวงมูลสัตว์ *O. vaulongeri*, และ ตัวงหมัด *P. sinuala* รวมทั้ง อีก 2 ชนิดที่คาดว่าจะจะเป็นชนิดที่เพิ่งมีการตรวจพบการติดเชื้อ *Wolbachia* เป็นครั้งแรกเช่นกัน แต่ต้องได้รับการยืนยันชนิดจากการจำแนกก่อน คือ เพลี้ยจักจั่น และแมลงวันก้นขน

การศึกษาความถี่ของการติดเชื้อในแมลง 4 ชนิด ใน 5 ประชากร ในระยะเวลา 12 เดือน พบว่าอัตราการติดเชื้อในทุกประชากรน้อยกว่า 100% และมีรูปแบบที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนในแต่ละประชากร แต่มีเพียงชนิดเดียว คือ แมลงหรีวขาว *B. tabaci* ที่อัตราการติดเชื้อคงที่และสูงตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่จะทำให้มีการดำรงอยู่ของการติดเชื้อ *Wolbachia* ในประชากร สำหรับชนิดอื่นๆ อัตราการติดเชื้อในแต่ละเดือนมีความแปรปรวนสูง (ในมวนหญา *H. minutus*) หรือพบการติดเชื้อต่ำในช่วงแรกๆ ที่ทำการศึกษาและหายไปจากประชากรในช่วงเวลาการศึกษาที่เหลือ (แมลงวันผลไม้ *B. tau*) หรือไม่พบอัตราการติดเชื้อเลย (ตัวงเต่าแดง *A. indica*)

ไม่พบหลักฐานว่าผลกระทบ 2 ชนิด ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงเบียนคือการชักนำให้เกิดลูกเพศเมียโดยไม่ได้รับการผสมพันธุ์ (PI) และความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึม (CI) ในแมลงเบียน *D. longicaudata* แม้จะพบการชักนำให้เกิดลูกเพศเมียโดยแม่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ (PI) ในแมลงเบียนชนิดนี้ แต่ก็พบได้น้อยและไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Wolbachia*

ไม่พบการเกิดการเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมโดยสมบูรณ์ (Complete CI) ในแมลงเบียนชนิดนี้ แต่อาจเป็นไปได้ว่าเกิดความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมโดยไม่สมบูรณ์ (Partial CI) ซึ่งควรทำการศึกษารื่องนี้เพิ่มเติมต่อไป

3.3.6 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาความถี่ของการติดเชื้อในแมลง 4 ชนิด ใน 5 ประชากร ในระยะเวลา 12 เดือน นั้น ทำให้ทราบว่าจำเป็นต้องมีการสำรวจการติดเชื้อ *Wolbachia* และการเปลี่ยนแปลงของ *Wolbachia* ในประชากรแมลงชนิดต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับพืชทั้งสองชนิด (ฟักทอง และบวบหอม) ให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ รวมทั้งศึกษารูปแบบความถี่ของการพบจุลินทรีย์ชนิดนี้ที่แน่นอนแบบปีต่อปีเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ปี เพื่อประโยชน์ในการศึกษาแนวทางที่เป็นไปได้ในการถ่ายทอด *Wolbachia* (*Wolbachia* transmission) (ตารางที่ 3.3.8)

ตารางที่ 3.3.8 ความสัมพันธ์ทางด้านการกินของสัตว์ขาปล้องที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ที่มีความสัมพันธ์กับผักทองและบวบหอม

Plant species	Plant part	Arthropod species	Type of mouthparts	Likely food
Pumpkin	Leaf	<i>Aphis craccivora</i>	Sucking	Phloem
		<i>Halticus minutus</i>	Sucking	Phloem
		<i>Monolepta signata</i>	Chewing	Leaf
		<i>Phyllotreta sinuata</i>	Chewing	Leaf
		<i>Bemisia tabaci</i>	Sucking	Phloem
		Unk. sp.3 (Cicadellid leafhopper)	Sucking	Phloem
	Flower	<i>Frankliniella schultzei</i>	Sucking	Pollen, leaves, spider mite eggs
		<i>Melanagromyza</i> sp.	Sucking	Larvae feed on soft part under epidermis of plants, adults feed on nectar
	Fruit	<i>Bactrocera tau</i>	Chewing	Fruits
		<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	Chewing	Parasitoid - Larvae feed on <i>Bactrocera</i> sp. larvae and pupae
		<i>Onthophagus vaulongerii</i>	Chewing	Scavenger
		<i>Graptomyza brvirostis</i> (Tachinid fly)	Chewing	Parasitoid - Larvae feed on other insects
Loofah	Flower	<i>Aphis craccivora</i>	Sucking	Phloem
	Fruit	<i>Bactrocera tau</i>	Chewing	Fruits

จากที่พบว่ามีแมลงเพียง 2 ชนิด ที่มีความสัมพันธ์ทางด้านการกิน (feeding relationship) ซึ่งน่าจะมีการถ่ายทอด *Wolbachia* จากชนิดหนึ่งไปสู่อีกชนิด (horizontal transmission) โดยอาจเป็นไปได้ว่าแมลงเบียน *D. longicaudata* อาจติดเชื้อ *Wolbachia* จากการเบียน (parasite) หนอนของแมลงวันผลไม้ *B. tau* ที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามก็ตีความความสัมพันธ์อื่นๆ ของแมลงนอกเหนือจากความสัมพันธ์ทางด้านการกิน อาจมีความสำคัญต่อการการแพร่กระจายของ *Wolbachia* ระหว่างชนิดแมลงได้เช่นกัน ซึ่งจะต้องทำการตรวจสอบโดยวิธีการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ระหว่างสายพันธุ์ของ *Wolbachia* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และการแพร่กระจายที่เป็นไปได้ระหว่างแมลงชนิดต่างๆ

การศึกษาผลกระทบของ *Wolbachia* ต่อการสืบพันธุ์ของแมลงเบียน *D. longicaudata* นอกจากจะศึกษาถึงการให้กำเนิดลูกและอัตราส่วนเพศ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลกระทบที่เกิดจากการติดเชื้อ *Wolbachia* ต่อการสืบพันธุ์ทางด้านอื่นๆ เช่น ผลกระทบต่อพฤติกรรมการสืบพันธุ์ การคัดเลือกเพื่อสืบพันธุ์ (mate choice) และการแข่งขันของสเปิร์มในการปฏิสนธิ

แม้ว่าความแตกต่างระหว่างแมลงเบียนแต่ละตัวอาจเกิดจากความแตกต่างทางด้านพันธุกรรม สรีรวิทยา หรือสภาพแวดล้อมนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ความผันแปรระหว่างแมลงเบียนแต่ละตัวซึ่งได้ทำการบันทึกผลทางด้านพฤติกรรมและสรีรวิทยา อาจเป็นผลมาจากการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแต่ละตัวนั่นเอง จากการทดลองที่ไม่พบการติดเชื้อ *Wolbachia* อาจเนื่องมาจากจำนวนซ้ำในการทดลองไม่เพียงพอ ซึ่งหากมีการเพิ่มจำนวนซ้ำให้มากขึ้นอาจพบแนวโน้มของผลกระทบของ *Wolbachia* ต่อประชากรของแมลงเบียนชนิดนี้ วิธีการศึกษาและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของประชากรของ *Wolbachia* น่าจะสามารถคำนวณได้จากวิธีการและการวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นโดย Judson, 1994 และ Grimm, 1999

3.3.7 เอกสารอ้างอิง

- Bourtzis, K. and O'Neill S.L. 1998. *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. *BioScience* 48(4): 287-293.
- Boyle, L., O'Neill, S.L., Robertson H.M.P and Karr, T.L. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-99.
- Breeuwer, J.A.J. and Werren, J.H. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* 346: 558-60.
- Bush, G.L. and Smith, J.J. 1998. The genetics and ecology of sympatric speciation: A case study. *Res. Popul. Ecol.* 40(2): 175-187.
- Chang, N.W. and Wade, M.J. 1994. The transfer of *Wolbachia pipientis* and reproductive incompatibility between infected and uninfected strains of the flour beetle, *Tribolium confusum*, by microinjection. *Can. J. Microbiol.* 40: 978-81.
- Cook, J.M. and Butcher, R.D.J. 1999. The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. *Researches in Population Ecology* 41: 15-28.
- Girin, C. and Bouletreau, M. 1995. Microorganism associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp *Trichogramma bourarachae*. *Experientia* 52: 398-402.
- Grimm, V. 1999. Ten years of individual-based modelling in Ecology: What have we learned and what could we learn in the future? *Ecological Modelling* 115(2-3): 129-148.
- Heath, B.D., Butcher, R.D.J, Whitfield, W.G.F. and Hubbard, S.F. 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology* 9: 313-316.
- Hoshizaki, S. and Shimada, T. 1995. PCR-detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infecting natural populations of *Laodelphax striatellus*

- (Homoptera:Delphacidae) in central Japan: Has the distribution of *Wolbachia* spread recently? Insect Molecular Biology 4: 237-43.
- Hurst, G.D.D., Graf von der Schulenberg, J.H., Majerus, T.M.O., Bertrand, D., Zakharov, I.A., Baungaard, J., Volkl W., Stouthamer R. and Majerus, M.E.N. 1999a Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. Insect Molecular Biology 8: 133-39.
- Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M., Graf von der Schulenberg, J.H., Bertrand, D., West, S.A., Goriacheva, I.I., Zakharov, I.A., Werren, J.H., Stouthamer, R. and Majerus M.E.N. 1999b. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. Proceedings of the Royal Society of London Series B 266: 735-40.
- Hurst, G.D.D. and Schilthuisen, M. 1998. Selfish genetic elements and speciation. Heredity 80: 2-8.
- Judson, O.P. 1994. The rise and fall of the individual-based model in Ecology. Trends in Ecology & Evolution 9(1): 9-14.
- Kittayapong, P., Baisley, K.J., Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2000a. The distribution and diversity of *Wolbachia* infections in tropical mosquitoes (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 37: 340-345.
- Kittayapong, P., Milne, J.R., Tigvattananont, S. and Baimai, V. 2000b. Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit fly hosts in Thailand. Science Asia 26: 1-11.
- Kitthawee, S. 2000. Seasonal occurrence of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera:Tephritidae) in a guava orchard in central Thailand. Science Asia 26: 1-6.
- Laven, H. 1967. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. Nature 216: 383-84.
- Montoya, P., Liedo, P., Cancino, J., Benrey, B., Barrera, J., Sivinski, J.M. and Aluja, M. 1999. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service.
- Naumann, I.D., Carne, P.B., Lawrence, J.F., Nielsen, E.S., Spradbery, J.P., Taylor, R.W., Whitten, M.J. and Littlejohn, M.J. 1991a. The Insects of Australia. Vol. 1 Melbourne University Press, Melbourne.

- Naumann, I.D., Carne, P.B., Lawrence, J.F., Nielsen, E.S., Spradbery, J.P., Taylor, R.W., Whitten, M.J., and Littlejohn, M.J. 1991b. *The Insects of Australia*. Vol. 2 Melbourne University Press, Melbourne.
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M.E., Karr, T.L. and Robertson, H.M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2699-2702.
- Orr, H.A. 1989. Genetics of sterility in hybrids between two subspecies of *Drosophila*. *Evolution* 43: 180-89.
- Quicke, D.L.J. 1997. *Parasitic wasps*. Cambridge University Press.
- Rigaud, T., Juchault P. and Mocquard, J.P. 1997. The evolution of sex determination in isopod crustaceans. *BioEssays* 19: 409-416.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. and Solignac, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 250: 91-98.
- Ryan, S.L. and Saul, G.B.H. 1968. Post-fertilization effect of incompatibility factors in *Mormoniella*. *Molecular and General Genetics* 1 03: 29-36.
- Shoemaker, D.D., Katju, V. and Jaenike, J. 1999. *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. *Evolution* 53: 1157-64.
- Sinkins, S.P., Curtis, C.F. and O'Neill, S.L. 1997. The potential application of inherited symbiont systems to pest control. pp 155-175 *In* O'Neill SL, Werren JH, Hoffmann AA, eds. *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford: Oxford University Press.
- Stouthamer, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. pp. 102-24. *In*: O'Neill SL, Hoffmann AA and Werren JH [eds],. *Influential Passengers. Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction* Oxford University Press, Oxford.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J. and Hurst, G.D.D. 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 71-102.
- Stouthamer, R. and Werren, J.H. 1993. Microorganisms associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 6-9.
- Turelli, M. and Hoffmann, A.A. 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in Californian *Drosophila*. *Nature* 353: 440-42.

- Upton, M.S. 1991. Methods for collecting, preserving and studying insects and allied forms. The Australian Entomological Society, Brisbane.
- Wenseleers, T., Ito F., van Borm, S., Huybrechts, R. and Volckaert, F. 1998. Widespread occurrence of the microorganism *Wolbachia* in ants. Proc. R. Soc. London. Ser. B. 265: 1447-1452.
- Werren, J.H. 1997a. Biology of *Wolbachia*. Annu. Rev. Entomol. 42: 587-609.
- Werren, J.H. 1997b. *Wolbachia* and speciation. In: Howard D and Berlocher S. [eds]. Endless forms: Species and speciation. Oxford University Press, New York.
- Werren, J.H. and O'Neill, S.L. 1997. The evolution of heritable symbionts. pp. 1-41 In O'Neill SL, Werren JH, Hoffmann AA, [eds]. Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction. Oxford: Oxford University Press.
- Werren, J.H., Windsor, D. and Guo, L. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc. R. Soc. Lond. B. 262: 197-204.
- West, S.A., Cook, J.M., Werren, J.H. and Godfray, C.J. 1998. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. Molecular Ecology 7: 1457-1465.
- White, I.M. and Elson-Harris, M.M. [eds]. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. pp. 601. Redwood Press. London.
- Zchori-Fein, E., Faktor, O., Zeidan, M., Gottlieb, Y., Czosnek, H. and Rosen, D. 1995. Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). Insect Molecular Biology 4: 173-178.
- Zhou, W, Rousset, F. and O'Neill, S 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proc. R. Soc. Lond. B. 265: 509-515.

4

การแพร่กระจาย สัตว์น้ำวิทยา นิเวศวิทยา เชลล์พันธุศาสตร์ และอนุพันธุศาสตร์ของแมลงวันดำ

4.1 บทนำ

วันดำ (Black flies) เป็นแมลงมีปีกขนาดเล็ก รูปร่างอ้วนสั้น และมีสีลำตัวแตกต่างกัน ตั้งแต่สีน้ำตาลเข้ม น้ำตาลแดง เทา ส้ม ไปจนถึงเหลือง แต่ส่วนมากมีสีค่อนข้างดำ แมลงวันดำจัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Simuliidae สกุล *Simulium* ในปี ค.ศ. 1991 มีรายงานการค้นพบวันดำทั้งหมดจำนวน 1,570 สปีชีส์ จำแนกอยู่ใน 24 สกุล (Crosskey, 1993) ปัจจุบันมีการค้นพบวันดำสปีชีส์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้นอีกจำนวนมาก โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย (Takaoka, personal communication) วันดำตัวเมียที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจในหลายประเทศตามแถบภูมิภาคต่างๆ ของโลกมี 4 สกุล คือ *Simulium*, *Austrosimulium*, *Prosimulium* และ *Cnephia* สกุลที่ใหญ่ที่สุดและมีความสำคัญมากที่สุดคือ สกุล *Simulium* ซึ่งประกอบด้วยวันดำประมาณ 1,203 สปีชีส์ จำแนกอยู่ใน 46 สกุลย่อย (Crosskey, 1993) แมลงวันดำในสกุล *Simulium* แพร่กระจายในภูมิภาคต่างๆ ของโลกที่มีน้ำไหลถาวรและเพียงพอต่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อน แมลงวันดำส่วนใหญ่ที่พบในภูมิภาคเอเชียและในประเทศไทยเป็นวันดำสกุล *Simulium* ซึ่งในอดีตได้มีรายงานการค้นพบเพียง 110 สปีชีส์ แต่ปัจจุบันมีการค้นพบประมาณ 300 สปีชีส์ ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ได้รายงานแล้วจำนวน 240 สปีชีส์ และที่ยังไม่ได้รายงานและเป็นสปีชีส์ใหม่ 60 สปีชีส์ (Takaoka, unpublished data) Takaoka (1996) ได้รายงานการศึกษาแบบแผนการกระจายของวันดำกลุ่มย่อยและสกุลย่อยในสกุล *Simulium* ในภูมิภาคตะวันออกไกล (อินเดีย อินโดจีน จีนตอนใต้ ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย) และภูมิภาคออสเตรเลีย (ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์) อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษารันดำค่อนข้างน้อยในประเทศอินโดนีเซีย พม่า จีนตอนใต้ และประเทศในแถบอินโดจีน รวมทั้งประเทศไทย

ในอดีตมีรายงานเกี่ยวกับวันดำในประเทศไทยน้อยมาก Summer (1911) ได้รายงานวันดำสปีชีส์ *Simulium nigrogilvum* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ต่อมา Edwards (1928) ได้รายงานเพิ่มอีก 2 สปีชีส์ คือ *S. hackeri* และ *S. digrammicum* หลังจากนั้นไม่มีผู้ใดศึกษารันดำในประเทศไทยอีกจนกระทั่ง Takaoka and Suzuki (1984) ได้รายงานการศึกษารันดำที่เก็บจากบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยเป็นครั้งแรกจำนวน 19 สปีชีส์ ต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มขึ้นอีก 7 สปีชีส์ รวมเป็น 26 สปีชีส์ (Takaoka and Saito, 1996; Takaoka and Alder, 1997) ปัจจุบันได้มีการศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของวันดำ โดยการศึกษารูปร่างลักษณะของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย ได้พบวันดำในสกุล *Simulium* อย่างน้อยที่สุด 42 สปีชีส์ โดย 30 สปีชีส์ ได้เคยพบและตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว อีก 6 สปีชีส์ อาจเคยพบแต่มีรูปร่างเปลี่ยนไปจากเดิม และยังไม่ได้ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ยังพบสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนอีก 6 สปีชีส์ คือ *S. chaliowae*, *S. chainarongi*, *S. triglobus*, *S. baimaii*,

S. chumpornense และ *S. sp.G* (เจลิยวและคณะ, 2544a, Kuvangkadilok et al., 1999a; Takaoka and Kuvangkadilok, 1999; Kuvangkadilok and Takaoka, 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการจัดจำแนกสปีชีส์ของริ้นดำในเขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยอาศัยรูปแบบของโพสทีนโครโมโซมของตัวอ่อน (Kuvangkadilok et al., 1998; Kuvangkadilok et al., 1999b, c) ริ้นดำบางสปีชีส์มีแหล่งเพาะพันธุ์จำเพาะในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ที่มีระดับความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่างกัน (Kuvangkadilok et al., 1999a)

ริ้นดำเป็นแมลงที่มีความสำคัญทั้งทางด้านการแพทย์และด้านเศรษฐกิจ ทั้งนี้เนื่องจากริ้นดำตัวเมียเป็นพาหะของพยาธิ *Onchocerca volvulus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค onchocerciasis หรือโรค river blindness ประมาณว่ามีคน 30 ล้านคนที่ป่วยเป็นโรคนี้ซึ่งส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคม นอกจากนี้ริ้นดำยังสามารถถ่ายทอดพยาธิดังกล่าวไปสู่สัตว์ เช่น วัว ควาย เป็ด และไก่ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ รวมทั้งสัตว์ป่า เช่น กวาง ริ้นดำที่พบว่าเป็นพาหะของโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรค onchocerciasis ได้แก่ ริ้นดำในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Simulium damnosum* (Crosskey, 1981) นอกจากนี้ยังมีริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ที่เป็นพาหะที่ทำให้เกิดโรคนี้ ได้แก่ ริ้นดำสปีชีส์ *S. amazonicum*, *S. metallicum*, *S. ochraclum*, *S. sanguineum* และ *S. callidum* นอกจากเป็นพาหะของโรค onchocerciasis แล้วยังพบว่าแมลงริ้นดำยังเป็นตัวกลางในการถ่ายทอดโปรโตซัวสกุล *Trypanosoma* และ *Leucocytozoon* รวมทั้งไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ในสัตว์หลายชนิด จากความสำคัญของริ้นดำดังกล่าวทำให้องค์การอนามัยโลกได้ทำการจัดตั้งโครงการเพื่อควบคุมการระบาดของโรค Onchocerciasis ขึ้นภายใต้ชื่อ Onchocerciasis Control Program (OCP) ในปี ค.ศ. 1975 โดยใช้เงินงบประมาณสูงถึง 250,000,000 ดอลลาร์สหรัฐ ภายในระยะเวลา 20 ปี โดยโครงการนี้มุ่งเน้นกำจัดแมลงริ้นดำที่เป็นพาหะของโรคในทวีปแอฟริกาซึ่งมีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง (Walsh et al., 1981)

สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการเกิดโรค Onchocerciasis แต่ได้มีรายงานการพบพยาธิ *Onchocerca* sp. ในตัวเต็มวัยริ้นดำสปีชีส์ *S. nodosum* 11 ตัว จาก 273 ตัวที่ดูลือดคนและสัตว์บริเวณดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ (Takaoka et al., 2002) นอกจากนี้จากการสำรวจริ้นดำบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าริ้นดำก่อให้เกิดความรำคาญแก่คนในท้องถิ่น รวมทั้งนักท่องเที่ยวซึ่งพบว่าคนที่ถูกริ้นดำกัดมากจะเกิดอาการแพ้ ผิวหนังเป็นแผล อักเสบ และเกิดอาการไข้ที่เรียกว่า “ไข้ริ้นดำ”

ความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจพบว่ามีริ้นดำหลายสปีชีส์ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อปศุสัตว์ เนื่องจากฝูงริ้นดำจะโจมตีสัตว์เลี้ยง ตัวอย่างเช่น ริ้นดำสปีชีส์ *S. vittatum* ก่อความรำคาญให้แก่ฝูงสัตว์เลี้ยงอย่างมาก เนื่องจากมันจะไชตามบาดแผลของสัตว์ ริ้นดำสปีชีส์ *S. arcticum* ที่แพร่กระจายในแถบตะวันตกของประเทศแคนาดาก่อความรำคาญต่อคนและเป็นสาเหตุการตายของสัตว์เลี้ยง และมีผลทำให้ผลผลิตของปศุสัตว์เหล่านี้ลดลงก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ (Fredeen, 1969)

การจัดจำแนกริ้นดำส่วนใหญ่ใช้หลักอนุกรมวิธานทางด้านสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ค่อนข้างยุ่งยากและเป็นปัญหามาก เนื่องจากริ้นดำมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมากโดยเฉพาะริ้นดำบางสปีชีส์ในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* และริ้นดำกลุ่มสปีชีส์

ซับซ้อนซึ่งรันทำเหล่านี้ไม่สามารถแยกออกจากกันโดยใช้รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงต้องอาศัยข้อมูลจากโพลีทินโครโมโซมเพื่อแยกสปีชีส์ของรันทำให้แม่นยำขึ้น รันทำมีโพลีทินโครโมโซมจำนวน 3 คู่ ($2n=6$) รันทำแต่ละสปีชีส์มีแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์บนโพลีทินโครโมโซมจำเพาะ (Kuvangkadilok et al., 1999b, c) แต่การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์โดยอาศัยแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์บนโพลีทินโครโมโซมของตัวอ่อนรันทำมีปัญหาและอุปสรรคหลายประการ โดยเฉพาะวิธีการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนรันทำที่ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องแช่หลอดตัวอย่างรันทำที่ต้องในน้ำยา fixative ในน้ำแข็งตลอดเวลา อีกทั้งขั้นตอนในการเตรียมโครโมโซมให้เห็นแบนด์ชัดเจนพอที่จะถ่ายรูปเพื่อทำแผนที่มาตรฐานโครโมโซมค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน ดังนั้นการศึกษาด้านอณูพันธุศาสตร์ โดยใช้เทคนิค PCR, DNA cloning และ DNA sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) และไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) จะช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยสปีชีส์ของรันทำให้ถูกต้องและแม่นยำ นอกจากนี้ข้อมูลด้านอณูพันธุศาสตร์จะทำให้รู้โครงสร้างและความแปรผันทางพันธุกรรม รวมทั้งสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของรันทำสปีชีส์ต่างๆ ด้วย

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีประโยชน์ในการศึกษาพันธุศาสตร์ของแมลงอันดับ Diptera เป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถใช้ในการวินิจฉัยสปีชีส์และความแปรผันภายในสปีชีส์ของแมลง เช่น แมลงวัน (Malgorn and Coquoz, 1999) นอกจากนี้ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังเหมาะสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในแมลงต่างๆ เช่น แมลงหวี่ (O'Grady, 1999; Spicer and Pitnick, 1996) ยุง (Conn et al., 1997; Caccone et al., 1996) และแมลงวัน (Bernasconi et al., 2000; Well and Sperling, 1999) ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม (Lehmann et al., 1997) การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Mukabayire et al., 1999) และศึกษาอินโฟลว์ในยุง (Behansky et al., 1997) อย่างไรก็ตามการศึกษาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในพวกแมลงรันทำมีค่อนข้างน้อย

จากการศึกษาของ Xiong & Kocher (1991) ได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในรันทำ 7 สปีชีส์ และพบว่ายีนที่ตำแหน่งดังกล่าวมีส่วนประกอบของ A+T สูงเช่นเดียวกับใน *Drosophila* และเกิดการสลับที่คู่เบสแบบทรานสเวอร์ชัน (transversion) มากกว่าทรานสิชัน (transition) นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าความแตกต่างของการสลับที่คู่เบสแบบทรานสเวอร์ชันสามารถยืนยันการจำแนกสปีชีส์ของรันทำได้ ต่อมา Tang et al. (1995) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีน 16S rRNA และ ND4 ของรันทำ 6 สปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* พบว่ายีนทั้งสองตำแหน่งสามารถบอกความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการได้ ผลการศึกษาพบว่ารันทำในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* จากทวีปแอฟริกาตะวันตกไม่ได้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรันทำจากอเมริกาเหนือ และเนื่องจากยีน 16S rRNA มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน จึงไม่สามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของรันทำในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* ได้แต่ยีน ND4 สามารถใช้แยกรันทำทั้ง 6 สปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* นอกจากนี้ยังได้ศึกษา ยีน 16S rRNA ในรันทำที่เป็นพาหะของพยาธิ *Onchocerca* ที่ทำให้เกิดโรค Onchocerciasis พบว่ารันทำกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* จากทวีปแอฟริกาตะวันตก, กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. metallicum* จากทวีปออสเตรเลีย และกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน

S. ochraceum จากทวีปอเมริกาเหนือมี interspecific polymorphism แสดงว่ายีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA สามารถบอกความแตกต่างของริ้นดำในระดับสปีชีส์ซับซ้อนได้ จากการศึกษาดังกล่าวยังพบอีกว่าคุณสมบัติในการเป็นพาหะของริ้นดำไม่ได้สัมพันธ์กับความสัมพันธ์ในแง่วิวัฒนาการเมื่อดูจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (Tang et al., 1996) และเมื่อเร็วๆ นี้ Krüger et al. (2000) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในริ้นดำกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* พบว่าริ้นดำจากทวีปแอฟริกาตะวันออกและตะวันตกแตกต่างกันในสายวิวัฒนาการ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA 10 ชนิดในริ้นดำ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA ของริ้นดำ *S. vittatum* เหมือนกับในยุง *A. albopictus* และแมลงหวี่ *D. yakuba* ประมาณ 86% และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA ดังกล่าวพบว่าริ้นดำและยุงมีวิวัฒนาการแยกออกจากกันและแยกออกจากแมลงหวี่ (Pruess et al., 1992) จากการศึกษาเปรียบเทียบแมลงต่างๆ ที่อยู่ในอันดับ Diptera พบว่าความแตกต่างของลำดับยีนและทิศทาง และความแตกต่างแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ช่วยทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับวงศ์สกุล และสปีชีส์ (Dubin et al., 1986; Xiong and Kocher, 1991; Pruess et al., 1992)

โครงสร้างนิวเคลียร์ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแมลงประกอบด้วยหน่วยที่มีการเรียงตัวของยีนซ้ำกันเป็นจำนวนหลายหน่วย ตัวอย่างเช่นในแมลงสปีชีส์ *Sciara coprophila* มีประมาณ 100 หน่วย และ *Calliphora erythrocephala* มีมากกว่าพันหน่วย (Beckingham, 1982) ไรโบโซมัลดีเอ็นเอแต่ละหน่วยประกอบด้วยยีน 18S, 5.8S และ 28S ซึ่งเป็นยีนที่มีการถอดรหัส และมีการเรียงลำดับเบสค่อนข้างคงที่ไม่แปรผันมาก (conserved regions) นอกจากนี้ยังมีช่องว่าง (Internal transcribed spacer) ระหว่างยีน 18S และ 5.8S เรียกว่า ITS1 สำหรับช่องว่างระหว่างยีน 18S และ 28S คือ ITS2 และช่องว่างที่อยู่นอกยีนตรงบริเวณปลาย 5' ของยีน 18S คือ External transcribed spacer (ETS) ไรโบโซมัลดีเอ็นเอแต่ละหน่วยจะเชื่อมต่อกันด้วยช่องว่างเรียกว่า Nontranscribed intergenic spacers (IGS) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสและความยาวแปรผันมากทั้งภายในตัวเดียวกันและต่างกัน เนื่องจากมีความแตกต่างของจำนวนหน่วยที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน (Beach et al., 1989; Collins et al., 1989; Gale and Crampton, 1989) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ ITS2 มีอัตราการแปรผันค่อนข้างสูง จึงนิยมนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกัน (Baldwin, 1992; Wesson et al., 1992, 1993) การจำแนกสปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน ตัวอย่างเช่น กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนของยุงก้นปล่อง *Anopheles maculipennis* (Porter and Collins, 1991) และกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *An. gambiae* (Collins et al., 1989) นอกจากนี้ยังใช้ในการศึกษาดีฟเฟอเรนทีเอชันของประชากร (Schlotterer et al., 1994; Vogler and De Salle, 1994) ในทางตรงข้ามยีน 28SD2 มีความแปรผันน้อยมาก จึงนิยมนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ห่างไกลกันทางสายวิวัฒนาการ

เมื่อตัวอ่อนและตัวดักแด้ของริ้นดำดำรงชีวิตอยู่ในน้ำไหล ดังนั้นตัวแปรทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำ เช่น ปริมาณแร่ธาตุ ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิของน้ำ และความเร็วของกระแสไหลจะมีผลต่อการดำรงชีวิต โครงสร้างของประชากร และการแพร่กระจายของตัวอ่อนและตัวดักแด้ของริ้นดำ

แบบ macrodistribution และ microdistribution ตัวแปรที่สำคัญที่เป็นตัวตัดสินการกระจายตัวของตัวอ่อนรินดำแบบ macrodistribution คือขนาด และ substrate ของแหล่งน้ำ นอกจากนี้ความลึก substrate และการดำรงชีวิตร่วมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่นเป็นตัวแปรสำคัญในการกระจายแบบ microdistribution จากการศึกษาในเวศวิทยาจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรกับการกระจายของสปีชีส์ของรินดำ ตัวอย่างเช่นการศึกษาการแบ่งแยกกลุ่มทางนิเวศวิทยา (ecological segregation) ของตัวอ่อนรินดำ 14 กลุ่ม ในลำธาร 20 แห่งในประเทศแคนาดา พบว่าการกระจายของแมลงรินดำสัมพันธ์กับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำ เช่น ความกว้างของลำธาร ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าการนำไฟฟ้า ความขุ่น ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ และความเร็วของกระแส น้ำ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Principle component analysis (PCA) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (Cluster analysis) พบว่าแมลงรินดำแต่ละกลุ่มมีการกระจายที่แตกต่างกันเพื่อปรับตัวให้เหมาะสมกับการดำรงชีวิต (Ciborowski and Adler, 1990; McCreadie et al., 1995)

4.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการกระจายและความหนาแน่นของตัวอ่อนรินดำในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย พร้อมทั้งศึกษาตัวแปรคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีของแหล่งเพาะพันธุ์ของตัวอ่อน
2. ศึกษาอนุกรมวิธานแยกสปีชีส์ของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยโดยการศึกษาลักษณะรูปร่างลักษณะพื้นฐานวิทยา และแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์บนโพลีทีนโครโมโซมจากต่อมน้ำลายของตัวอ่อน
3. ศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงรินดำในระดับสปีชีส์ กลุ่ม และสกุลย่อย โดยศึกษาความแตกต่างของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณยีน COI, ND4 และ 16S rRNA และบริเวณยีน 28SD2 และ ITS2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

4.3 วิธีการศึกษา

4.3.1 แหล่งที่เก็บและวิธีการจับรินดำ

ทำการจับตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของรินดำ ในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย วิธีการจับตัวอ่อนจับโดยใช้ปากคีบเล็กคีบตัวอ่อนที่เกาะตามก้อนหิน เศษวัตถุต่างๆ ดันหญ้าและใบพืชที่ลอยในน้ำไหล ทำการแบ่งตัวอ่อนรินดำที่จับได้ออกเป็น 3 ส่วน โดยดองตัวอ่อนส่วนหนึ่งไว้ใน Carnoy's fixative (3 ส่วน absolute ethanol : 1 ส่วน glacial acetic acid) สำหรับศึกษาโพลีทีนโครโมโซม ตัวอ่อนส่วนที่สองดองใน 80% ethanol เพื่อศึกษาพื้นฐานวิทยา ตัวอ่อนส่วนที่สามดองใน absolute ethanol เพื่อศึกษาอนุพันธูศาสตร์ การเก็บรักษาต่อมน้ำลายและโพลีทีนโครโมโซมให้อยู่ในสภาพดีต้องเปลี่ยนน้ำยา fixative หลังจากใส่ตัวอ่อน 2 นาที และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เก็บหลอดที่ใส่ตัวอ่อนในน้ำแข็งเป็นการชั่วคราว หลังจากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับตัวดักแด้ได้ทำการเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อให้เจริญเป็นตัวเต็มวัยเพื่อวินิจฉัยสปีชีส์ของรินดำ

4.3.2 การศึกษาลักษณะรูปร่างของตัวอ่อน ตัวดักแด่ และตัวเต็มวัย

ในการศึกษาแยกสปีชีส์ของตัวอ่อนและตัวดักแด่ ทำโดยการเปรียบเทียบกับรูปร่างลักษณะของตัวอ่อน และตัวดักแด่ที่ได้มีรายงานการศึกษาในประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย ดังนี้คือ ประเทศไทย (Takaoka and Suzuki, 1984; Takaoka and Saito, 1996; Takaoka and Alder, 1997), มาเลเซีย (Takaoka and Davies, 1995), อินเดีย (Datta, 1973, 1974a, 1974b; Puri 1932, 1933a, 1933b, 1933c), อินโดนีเซีย (Takaoka and Robert, 1988; Takaoka and Hadi, 1991; Takaoka and Sigit, 1992, 1997; Takaoka and Davies, 1996), ไต้หวัน (Takaoka, 1979) และญี่ปุ่น (Takaoka, 1972, 1977) นอกจากนั้นผู้วิจัยยังได้รับความช่วยเหลือจาก Professor Hiroyuki Takaoka ภาควิชาควบคุมโรคติดต่อ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยแพทย์ Oita ประเทศญี่ปุ่น ในการวินิจฉัยและยืนยันตัวอย่างตัวอ่อน ตัวดักแด่ และตัวเต็มวัย ของวันดำสปีชีส์ใหม่และที่ทราบสปีชีส์แล้ว

4.3.3 วิธีการเตรียมโพลีทีนโครโมโซมเพื่อศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์

วันดำที่นำมาศึกษาโพลีทีนโครโมโซมมีทั้งหมด 12 สปีชีส์ ซึ่งจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Simulium* โพลีทีนโครโมโซมของวันดำเตรียมได้จากต่อมน้ำลายของตัวอ่อนที่อยู่ในช่วงสุดท้ายของการเจริญเติบโต (สังเกตจาก gill spot สีดำ ตรงบริเวณด้านข้างของปล้องอก) ทำการเขี่ยต่อมน้ำลาย (silk gland) ของตัวอ่อนที่ดองในน้ำยา fixative ภายใต้อ่างกล้องผ่าตัด หลังจากนั้นย้อมสีโพลีทีนโครโมโซมด้วยสี 1.6% lacto propionic orcein ตามวิธีของ Porter และ Martin (1977) ศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์ ถ่ายรูปโครโมโซม ถ้ามีอินเวอร์ชันได้ศึกษาจุดแยกของอินเวอร์ชันด้วย

4.3.4 วิธีแยกเพศวันดำ

หลังจากเขี่ยต่อมน้ำลายออกจากตัวอ่อนแล้ว นำตัวอ่อนนั้นมาแยกเพศผู้หรือเพศเมีย เพื่อประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง sex-linked inversion กับเพศ เนื่องจากอวัยวะเพศของตัวอ่อนวันดำอยู่ภายในไขมัน ดังนั้นจึงยากที่จะวินิจฉัยเพศของตัวอ่อนที่ไม่ได้ย้อมสี วิธีการแยกเพศจะทำตามวิธีของ Bedo (1977) จากนั้นตรวจลักษณะรูปร่างอวัยวะเพศ ซึ่งอยู่ด้านบนของปล้องท้องที่ 6 ภายใต้อ่างกล้องผ่าตัด อวัยวะเพศจะฝังอยู่ในไขมัน โดยอวัยวะของตัวผู้จะมีลักษณะกลม เล็ก และรังไข่ของตัวเมียมีลักษณะยาว รี

4.3.5 การทำแผนภาพโครโมโซม

นำภาพโพลีทีนโครโมโซมที่เห็นแบนด์ชัด มาตัดต่อเพื่อทำแผนภาพโครโมโซมของวันดำ วิธีการทำแผนภาพและการจัดเรียงโครโมโซมจะทำตามวิธีของ Bedo (1977) ดังนี้ จัดเรียงโครโมโซมตามลำดับความยาวจากแก่งยาวไปหาแก่งสั้น และเรียกเป็นโครโมโซม I, II และ III ตามลำดับ สำหรับโครโมโซมแขนยาวจะใช้สัญลักษณ์เป็น L และ S สำหรับโครโมโซมแขนสั้น เช่น IS หรือ IIIL ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมจะแยกออกเป็น 100 ส่วน โดยแต่ละส่วนจะเรียงจากปลายแขนสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 (IS) เรียงผ่านเซนโทรเมียร์ไปยังโครโมโซมแขนยาว และเรียงต่อไปยังโครโมโซมแท่งที่ 2 และ 3 จนถึงปลายแขนยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 (IIIL) จากนั้นแบ่งโครโมโซมแต่ละส่วนออกเป็น 2 ส่วน

ย่อย (A และ B) หรือ 3 ส่วนย่อย (A , B และ C) แบบใดของโครโมโซมภายในส่วนย่อย A, B และ C สามารถแบ่งได้โดยเขียนเบอร์ของโครโมโซมส่วนใหญ่ พร้อมทั้งอักษรของส่วนย่อยและตำแหน่งของแบนด์ภายในส่วนย่อย เช่น 45B3 หมายถึงแบนด์ที่ 3 จากจุดเริ่มต้นของส่วนย่อย B ในโครโมโซมส่วนที่ 45

4.3.6 วิธีศึกษาตัวแปรคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีและวิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานิเวศวิทยาของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์รังดำได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ เช่น แอมโมเนีย ไนเตรท และไนไตรท์ โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ของบริษัท Lamotte ชนิด Smart Colorimeter ศึกษาอัตราความเร็วของกระแสน้ำโดยใช้เครื่องมือวัดชนิด Global Flow Probe FP201 และตรวจสอบปริมาณออกซิเจนในน้ำและอุณหภูมิของน้ำโดยใช้เครื่องมือ YSI 55 การวิเคราะห์ข้อมูลได้ใช้โปรแกรม PATN Package (Belbin, 1995) และโปรแกรม SPSS

4.3.7 วิธีการศึกษาอนุพันธุศาสตร์

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของรังดำสปีชีส์ต่างๆ ที่จัดจำแนกอยู่ในสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Simulium* ตามวิธีการของ Collins et al. (1987) บดตัวอย่างใน 100 ไมโครลิตรของ Grind buffer โดยใช้ Kontes pestle หลังจากตักตะกอนโปรตีน และชิ้นส่วนตัวอย่างด้วย 8M Potassium acetate แล้วนำหลอดตัวอย่างไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และนำส่วนของน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอไปตักตะกอนด้วย absolute ethanol ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากปั่นจนดีเอ็นเอตกตะกอนแล้ว ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% และ 100% แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE pH 8.0 จำนวน 100 ไมโครลิตร และใส่เอนไซม์ RNAase (10 mg/ml) 2 ไมโครลิตร เพื่อทำลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COI, ND4 และ 16S rRNA ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ และบริเวณยีน 28SD2 และ ITS2 ของไรโบโซมดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ โดยใช้คิวโพรเมอร์ที่จำเพาะของยีน (ตารางที่ 4.1) และใช้โปรแกรมอุณหภูมิและองค์ประกอบของสารละลายที่ใช้ทำ PCR ของแต่ละยีนต่างกัน (ตารางที่ 4.2) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้เพิ่มปริมาณแล้วมาตรวจสอบโดยเทคนิค gel electrophoresis ตามวิธีการของ Sambrook et al. (1989) โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.7-1.2 % (ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ) และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30-40 นาที นำดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ GENE CLEAN II Kit (Bio 101)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI, ND4, 16S rRNA และ 28S rRNA ทำโดยนำดีเอ็นเอของรังดำบางสปีชีส์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาการเรียงลำดับที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ดีเอ็นเอของรังดำบางสปีชีส์ถูกนำไปศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Evolutionary Biology Unit of Australian Museum สำหรับ ITS2 ได้ทำการ cloning โดยใช้ pGEM-Easy Vector และอย่างน้อย 2 clones ของแต่ละสปีชีส์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ BSU

ศึกษาเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA alignment) ของรังดำสปีชีส์ต่างๆ โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.81 (Thompson et al., 1997) และเปรียบเทียบสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์โดยวิธี Maximum Parsimony ของโปรแกรม PAUP version 4.0b1 (Swofford, 1998) สำหรับ ITS2 ได้ใช้วิธี Neighbor-Joining ของโปรแกรม MEGA version 2.1

(Kumar et al., 2001) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์ในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*

ตารางที่ 4.1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มดีเอ็นเอและหาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

ยีน	ไพรมเมอร์	ตำแหน่ง*	ขนาด (bp)	ลำดับเบส (5'→3')	เอกสารอ้างอิง
mtDNA					
COI	COF1	1763	24	TATAGCATTCACGAAATAAATAA	Xhang & Hewitt (1997)
	COB2	2329	23	ACTGTAAATATATGATGAGCTCA	Simon et al. (1994)
	COF3	2159	24	TTGATTTTTGGTCATCCAGAAGT	
	COB4	3014	25	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	
ND4	NDF1	8941	16	AA(AG)GCTCATGTTGAAGC	Soto et al. (2001)
	NDB2	8281	22	ATTTAAAGG(TC)AATCAATGTAA	
16S rRNA	16SF1	12883	20	CTCCGGTTTGAAGTCAGATC	Xiong & Kocher (1991)
	16SB2	13398	20	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	
	16SF3	13323	20	ACTAATGATTATGCTACCTT	Han & McPherson (1997)
	16SB4	13770	20	AGAAATGAAATGTTATTCGT	
rDNA					
28SD2	CP12	-	31	GTGGATCCAGTCGTGTTGCTTGATAGTCAG	Porter & Collins (1996)
	CP15	-	30	GTGAATCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG	
ITS2	CP16	-	29	GCGGGTACCATGCTTAAATTTAGGGGTA	Porter & Collins (1991)
	CP17	-	29	GCGCCGCGGTGTGAAGTGCAGGACACATG	

* เป็นตำแหน่งที่ตรงกับปลาย 3' ของลำดับไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของ *Drosophila yakuba*

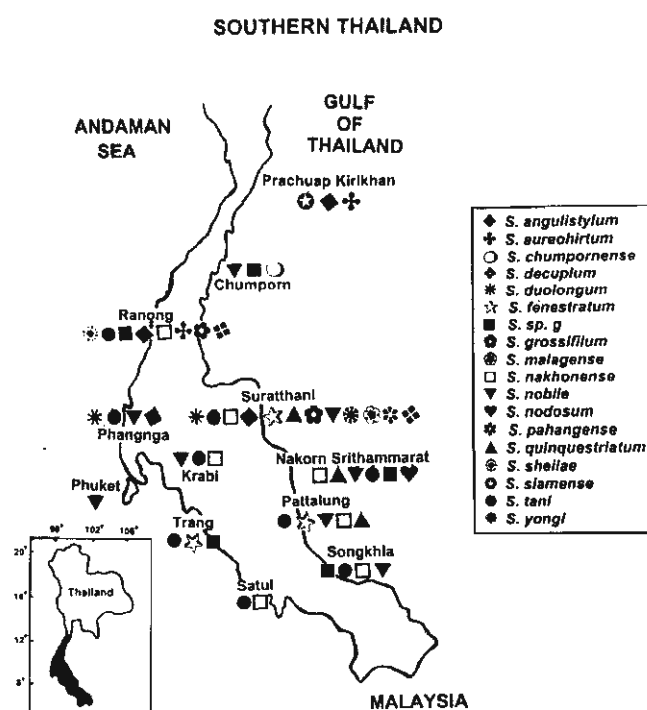
ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบ PCR และโปรแกรมอุณหภูมิของไพรมเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

ยีนและไพรมเมอร์	องค์ประกอบ PCR						โปรแกรมอุณหภูมิ		
	10X buffer	MgCl ₂	dNTPs	Primers	Taq DNA polymerase	DNA template	Denaturation	Annealing	Extension
mtDNA									
COI									
COF1+COB2	1X	1.5mM	0.2mM	1μM	5U	2μl	94°C 30 sec	48°C 45 sec	72°C 60 sec
COF3+COB4	1X	1.5mM	0.2mM	1μM	5U	2μl	94°C 40 sec	45°C 45 sec	72°C 60 sec
ND4									
NDF1+NDB2	1X	2mM	0.2mM	0.4μM	2.5U	2μl	94°C 40 sec	45°C 50 sec	72°C 60 sec
16S rRNA									
16SF1+16SB2	1X	2mM	0.2mM	0.4μM	2.5U	2μl	94°C 30 sec	55°C 50 sec	72°C 60 sec
16SF3+16SB4	1X	2mM	0.2mM	0.4μM	2.5U	2μl	94°C 40 sec	45°C 50 sec	72°C 90 sec
rRNA									
28SD2									
CP12+CP15	1X	2mM	0.2mM	1μM	2.5U	2μl	94°C 40 sec	50°C 120 sec	72°C 120 sec
ITS2									
CP16+CP17	1X	2mM	0.5mM	0.5μM	1.25U	2μl	94°C 60 sec	50°C 120 sec	72°C 120 sec

4.4 ผลการศึกษา

4.4.1 สปีชีส์ จำนวน และการแพร่กระจายของตัวอ่อนริ้นดำในเขตภาคใต้ของประเทศไทย

ในบริเวณแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ 34 แห่งในเขต 12 จังหวัดภาคใต้ ได้พบริ้นดำจำนวน 20 สปีชีส์ที่ยังไม่ได้ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ 1 สปีชีส์ คือ *S. sp. g* และเป็นสปีชีส์ใหม่ 1 สปีชีส์ คือ *S. chumpornense* (ตารางที่ 4.3 ภาพที่ 4.1) สปีชีส์ส่วนใหญ่ที่พบในภาคใต้เป็นสปีชีส์ที่พบในภาคอื่นๆ เช่นกัน ยกเว้นริ้นดำ 7 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในแหล่งน้ำไหลของภาคใต้ คือ *S. sheilae*, *S. nobile*, *S. yongi* (พบเฉพาะตัวดักแด้), *S. malagense* (พบเฉพาะตัวดักแด้), *S. grossifilum*, *S. pahangense* และสปีชีส์ใหม่ *S. chiangmaiense* ซึ่งพบตัวอ่อนและดักแด้ที่น้ำตกกะเปาะ จังหวัดชุมพร ริ้นดำที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในภาคนี้ คือ *S. nobile* และ *S. tani* จากการศึกษาจะเห็นว่าภาคใต้มีความหลากหลายของสปีชีส์และการแพร่กระจายของตัวอ่อนริ้นดำเช่นเดียวกับภาคเหนือ เนื่องจากมีแหล่งน้ำไหลที่มีสภาวะแวดล้อมเหมาะต่อการเพาะพันธุ์ของริ้นดำเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีริ้นดำบางสปีชีส์ที่มีแหล่งเพาะพันธุ์จำเพาะในภูมิภาคใดภูมิภาคหนึ่งเท่านั้น ตัวอย่างเช่น *S. chiangmaiense* และ *S. nigrogilvum* พบเฉพาะในภาคเหนือ *S. nobile*, *S. pahangense* และ *S. grossifilum* พบเฉพาะในภาคใต้ จากผลนี้ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของสปีชีส์และการแพร่กระจายของตัวอ่อนริ้นดำบางสปีชีส์กับคุณภาพทางกายภาพและเคมีของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์ ดังนั้นคณะวิจัยจึงได้ทำการศึกษาวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์ของตัวอ่อนริ้นดำในเขตภาคใต้



ภาพที่ 4. 1 แผนภาพแสดงการกระจายของตัวอ่อนริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย

ตารางที่ 4.3 การแพร่กระจายของตัวอ่อนริ้นดำในเขตภาคใต้ของประเทศไทย

แหล่งเพาะพันธุ์	วันเดือนปี	จำนวนที่เก็บ	ชุมพร																		ระนอง																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
			<i>S. angulistylum</i>	<i>S. aureohirtum</i>	<i>S. chumpomense</i>	<i>S. decuplum</i>	<i>S. duolongum</i>	<i>S. fenestratum</i>	<i>S. glossifilum</i>	<i>S. nakhonense</i>	<i>S. nobile</i>	<i>S. nodosum</i>	<i>S. pahangense</i>	<i>S. parahiyangum</i>	<i>S. quinquestriatum</i>	<i>S. rudnicki</i>	<i>S. sheilae</i>	<i>S. siamense</i>	<i>S. tani</i>	<i>S. sp. g</i>	<i>S. angulistylum</i>	<i>S. aureohirtum</i>	<i>S. chumpomense</i>	<i>S. decuplum</i>	<i>S. duolongum</i>	<i>S. fenestratum</i>	<i>S. glossifilum</i>	<i>S. nakhonense</i>	<i>S. nobile</i>	<i>S. nodosum</i>	<i>S. pahangense</i>	<i>S. parahiyangum</i>	<i>S. quinquestriatum</i>	<i>S. rudnicki</i>	<i>S. sheilae</i>	<i>S. siamense</i>	<i>S. tani</i>	<i>S. sp. g</i>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
- น้ำตกกะปาะ (40 ม.)	4 มิ.ย. 42	262	-	-	39	-	-	1	-	-	221	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.3. (ต่อ)

แหล่งเพาะพันธุ์	วันเดือนปี	จำนวนที่เก็บ	จำนวนที่พบ													
			<i>S. sp. g</i>	<i>S. tani</i>	<i>S. siamense</i>	<i>S. sheilae</i>	<i>S. rudnicki</i>	<i>S. quinquestriatum</i>	<i>S. parahiyangum</i>	<i>S. pahangense</i>	<i>S. nodosum</i>	<i>S. nobile</i>	<i>S. nakhonense</i>	<i>S. glossifilum</i>	<i>S. fenestratum</i>	<i>S. duolongum</i>
น้ำตกเหมืองหวด (100 ม.)	3 ส.ค. 42	892	29	-	-	-	-	-	10	-	-	-	412	1	-	-
	4 พ.ย. 42	1093	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	1	34	5
	12 มี.ค. 43	62	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
	24 มี.ค. 43	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
	29 ก.ค. 43	1363	7	-	-	-	-	-	14	-	-	-	24	-	55	-
	3 พ.ย. 43	1413	47	-	-	-	-	-	3	-	-	-	105	-	-	4
	3 ก.พ. 44	635	92	-	-	-	-	-	1	-	-	-	139	-	4	1
	11 พ.ค. 44	526	20	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	20	-
	17 ส.ค. 44	756	91	-	-	-	-	-	6	-	-	-	17	2	16	3
	19 เม.ย. 42	680	-	-	-	-	-	28	-	-	-	174	476	-	-	-
	19 เม.ย. 42	1342	-	-	-	-	-	3	-	-	-	1	1301	-	37	-
	19 เม.ย. 42	25	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	8	-	-	-
	19 เม.ย. 42	25	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	-	-	-
น้ำตกแม่เตวซู้ (75 ม.)	19 เม.ย. 42	545	-	-	-	-	-	545	-	-	-	-	-	-	-	-
	20 เม.ย. 42	173	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
	2 มิ.ย. 42	413	1	-	-	-	-	12	1	-	-	73	33	-	191	-
น้ำตกไพรวัลย์ (50 ม.)	2 มิ.ย. 42	91	1	-	-	-	-	9	-	-	-	-	18	-	1	-
	2 มิ.ย. 42	91	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

นครศรีธรรมราช

น้ำตกกระโรม (50 ม.)

น้ำตกพรหมโลก (50 ม.)

น้ำตกปลิว (125 ม.)

น้ำตกโยง (120 ม.)

น้ำตกแม่เตวซู้ (75 ม.)

น้ำตกขุนเขา (50 ม.)

พัทลุง

น้ำตกชะโหมด (50 ม.)

น้ำตกไพรวัลย์ (50 ม.)

4.4.2 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีของแหล่งเพาะพันธุ์ของตัวอ่อนรินดำ

จากการศึกษาการกระจายของสปิชีส์และจำนวนของตัวอ่อนรินดำและการวิเคราะห์ตัวแปร คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีของน้ำตกจำนวน 9 แห่งใน 6 จังหวัดภาคใต้ คือ น้ำตกกะเปาะ จังหวัดชุมพร น้ำตกปยุตญบาลและน้ำตกหงาว จังหวัดระนอง น้ำตกดาดฟ้าและน้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี น้ำตกอ่าวลึกและน้ำตกสระนางมโนราห์ จังหวัดกระบี่ น้ำตกตำหนิง จังหวัดพังงา และน้ำตกบางแป จังหวัดภูเก็ต ได้ผลดังนี้ การจัดกลุ่มน้ำตกในการเก็บตัวอย่างจำนวน 35 ครั้ง จาก น้ำตก 9 แห่ง โดยใช้ข้อมูลการกระจายของตัวอ่อนรินดำและวิเคราะห์โดยวิธีการจัดอันดับ (ordination) ของ Semi-Strong Hybrid Multidimensional Scaling (SSH) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มน้ำตกที่ไปเก็บ ตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 4.2a) ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มน้ำตกโดยใช้ Gower Metric และ Classification แบบ Fuse Flexible-Beta (ภาพที่ 4.3) ดังนี้ น้ำตกกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยน้ำตกกะเปาะ น้ำตกอ่าวลึก น้ำตกสระนางมโนราห์ และน้ำตกบางแป จากการหาความสัมพันธ์ของน้ำตกเหล่านี้กับ สปิชีส์ของตัวอ่อนรินดำโดยวิธี Principal Axis Correlation พบรินดำสปิชีส์ *S. nobile* มีความสัมพันธ์ กับกลุ่มน้ำตกนี้ (ภาพที่ 4.2b) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยน้ำตกดาดฟ้า น้ำตกเหมืองทวด น้ำตกปยุตญบาล และน้ำตกหงาว (เฉพาะตัวอ่อนที่เก็บเดือนกรกฎาคม และพฤศจิกายน 2543) น้ำตกในกลุ่มนี้มีความ สัมพันธ์กับตัวอ่อนรินดำสปิชีส์ *S. tani*, *S. nakhonense* และ *S. fenestratum* น้ำตกกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยน้ำตกหงาว (ยกเว้นเดือนกรกฎาคม และพฤศจิกายน 2543) มีความสัมพันธ์กับ *S. sp. g*

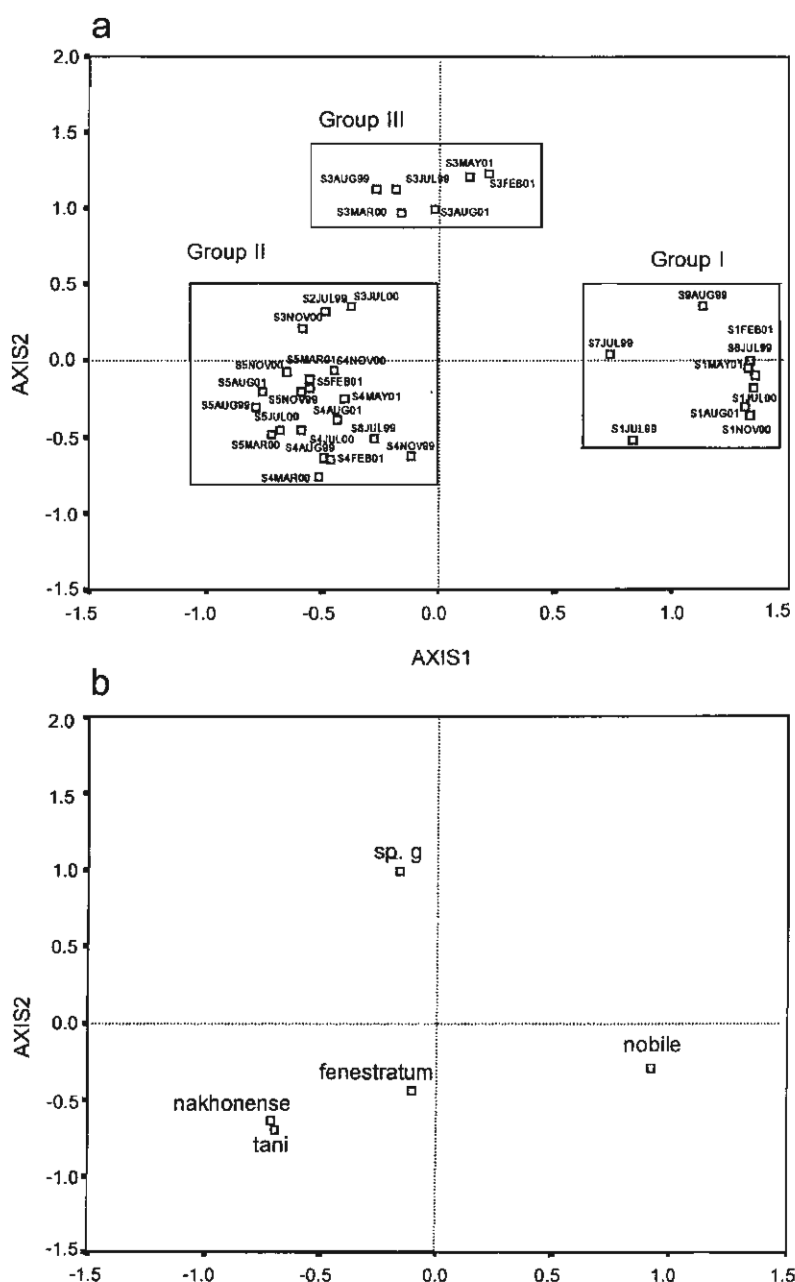
ในการวิเคราะห์จัดกลุ่มน้ำตกต่างๆ โดยใช้ค่าตัวแปรคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีโดยวิธี SSH (ภาพที่ 4.4) และวิธี Gower Metric และ Classification แบบ Fuse Flexible-Beta (ภาพที่ 4.5) ได้ผลแบบเดียวกันคือ สามารถแยกน้ำตกออกเป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 4.4a) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย น้ำตกกะเปาะ (ยกเว้นเดือนพฤศจิกายน 2543) น้ำตกอ่าวลึก และน้ำตกสระนางมโนราห์ จากการ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรคุณภาพน้ำกับน้ำตกเหล่านี้โดยวิธี Principle Axis Correlation พบว่า ค่าความกระด้างของน้ำ (hardness > 44 mg/ml) และความเป็นกรดเป็นด่าง (pH > 8.5) มีความ สัมพันธ์กับน้ำตกเหล่านี้ (ภาพที่ 4.4b) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยน้ำตกกะเปาะเฉพาะเดือนพฤศจิกายน 2543 น้ำตกหงาว น้ำตกปยุตญบาล และน้ำตกตำหนิง ไม่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรใดชัดเจน น้ำตก เหล่านี้มีค่าความกระด้างของน้ำค่อนข้างต่ำ (ค่าระหว่าง 0-20 mg/ml) กลุ่มที่ 3 มีแต่ตัวอย่างจากน้ำตก ดาดฟ้า และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยน้ำตกเหมืองทวด และน้ำตกบางแป น้ำตกทั้งสองกลุ่มมีความ สัมพันธ์กับความสูงเหนือระดับน้ำทะเล โดยน้ำตกดาดฟ้ามีความสูงตั้งแต่ 200 เมตรขึ้นไป ส่วนน้ำตก เหมืองทวด และน้ำตกบางแปมีความสูงระหว่าง 100-120 เมตร

ในการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างสปิชีส์ของรินดำกับตัวแปรคุณภาพน้ำทางกายภาพและ เคมีโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS ศึกษาความสัมพันธ์สหสัมพันธ์ r ถ้าค่า r สูง แสดงว่ามีความ สัมพันธ์กันมาก และใช้ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p=0.05$) คือถ้า p น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ารินดำสปิชีส์ นั้นมีความสัมพันธ์กับตัวแปรนั้นอย่างมีนัยสำคัญ

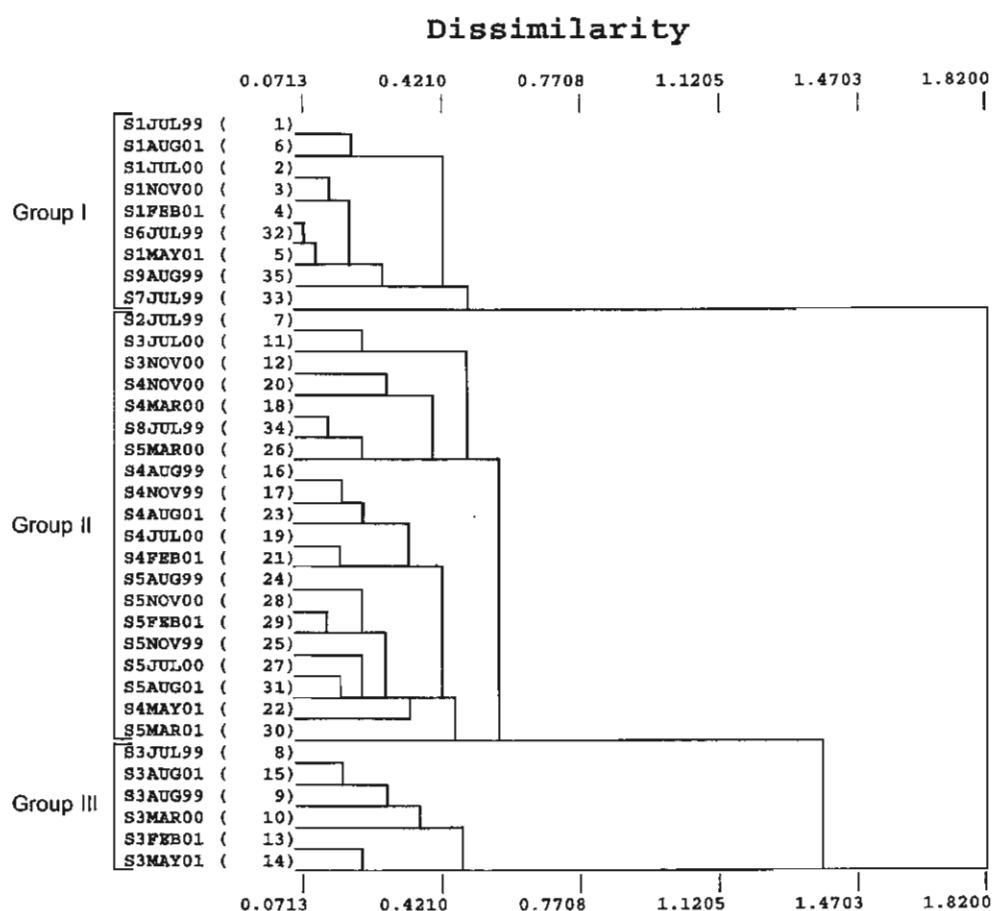
จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าความสูงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ *S. angulistylum*, *S. nakhonense*, *S. aureohirtum* และ *S. sp.g* อุณหภูมิมีความสัมพันธ์อย่างมี

นัยสำคัญกับ *S. tani* ความเป็นกรดและเป็นด่างมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ *S. nakhonense*, *S. tani* และ *S. chumpornense* ความกระต้างน้ำมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ *S. nakhonense* และ *S. angulistylum* และไนเตรทมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ *S. fenestratum*, *S. nakhonense*, *S. angulistylum* และ *S. sp.g*

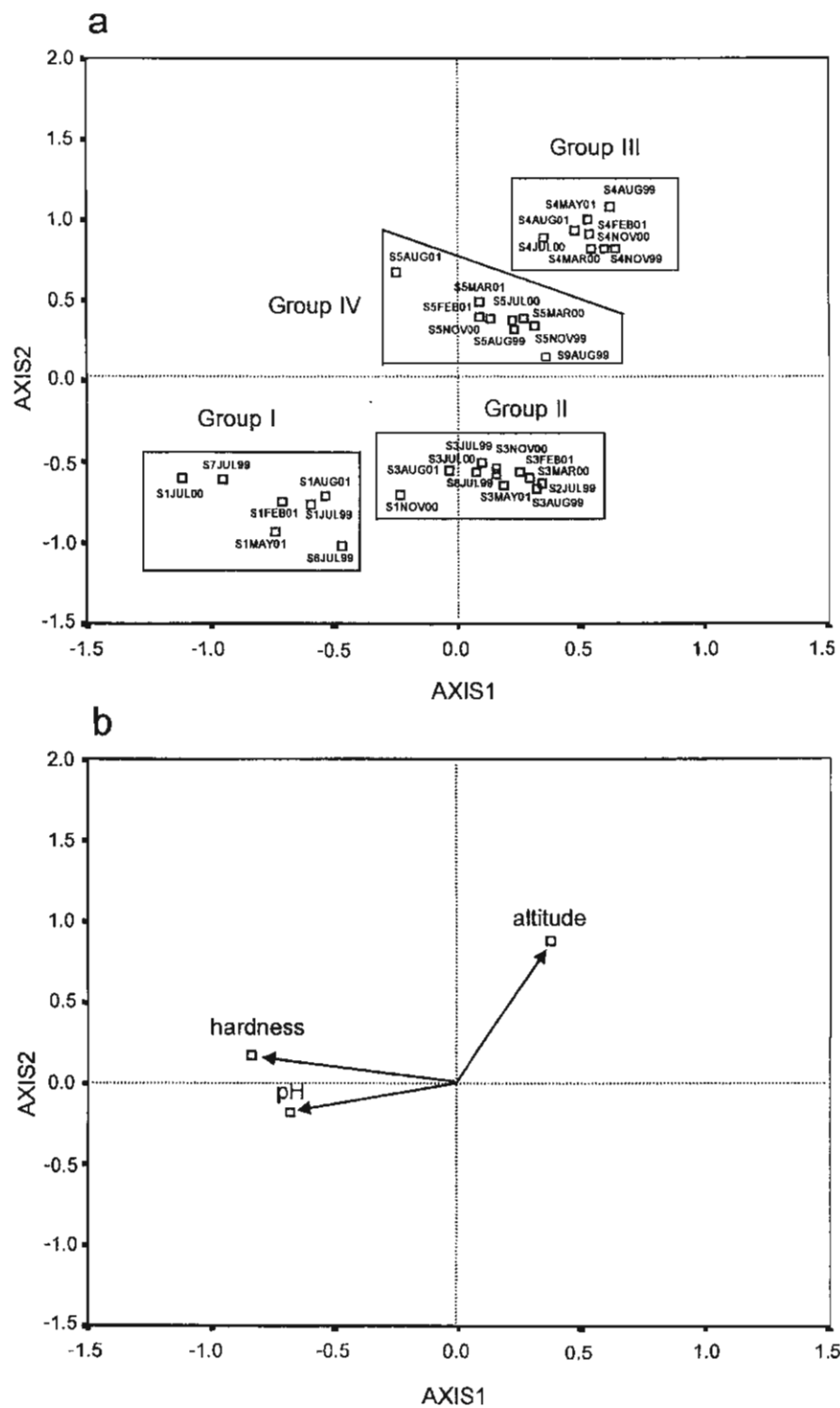
จากการศึกษาจะเห็นว่าตัวแปรคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีสามารถแบ่งน้ำตกออกเป็นกลุ่มๆ ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความสัมพันธ์กับการกระจายของสปีชีส์ในดำนต่างกัน นอกจากนี้รันดำนบางสปีชีส์มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับตัวแปรคุณภาพน้ำชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการควบคุมและกำจัดตัวอ่อนรันดำนที่เป็นพาหะนำพยาธิและไวรัสไปสู่สัตว์เลี้ยงหรือสูคนในอนาคต



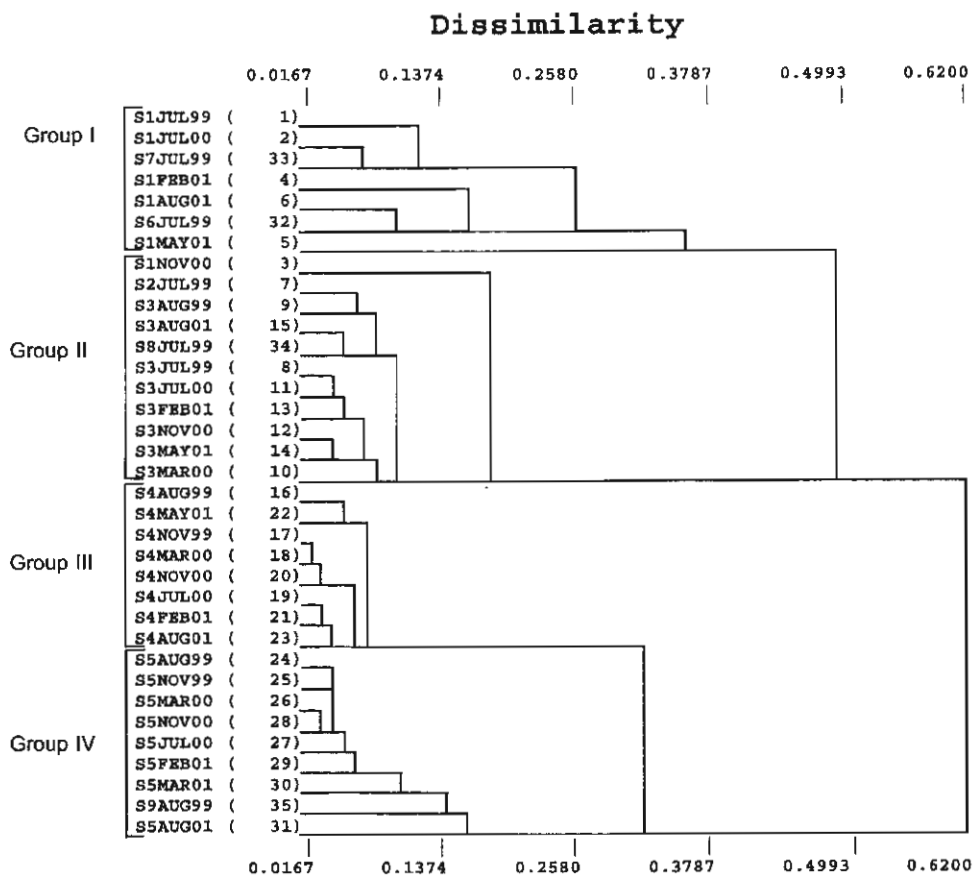
ภาพที่ 4.2. a) การจัดอันดับน้ำตกโดยใช้ Semi-Strong Hybrid Multidimensional Scaling (SSH) โดยใช้ข้อมูลการกระจายของตัวอ่อนรันดำน (Stress 0.098) b) ความสัมพันธ์ของสปีชีส์ของตัวอ่อนรันดำนกับน้ำตกต่างๆ โดยวิธี Principle Axis Correlation



ภาพที่ 4.3 แสดงการจัดกลุ่มของน้ำตกในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งโดยใช้ข้อมูลการกระจายของตัวอ่อนริ้นดำโดยวิธี Gower Metric และ Classification แบบ FUSE Flexible-Beta (Belbin, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับวิธี SSH ในภาพที่ 2a



ภาพที่ 4.4 a) การจัดอันดับน้ำตกโดยใช้ Semi-Strong Hybrid Multidimensional Scaling (SSH) โดยใช้ค่าคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี (Stress 0.058) b) ความสัมพันธ์ของตัวแปรคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีกับน้ำตกต่างๆ โดยวิธี Principal Axis Correlation



ภาพที่ 4.5 แสดงการจัดกลุ่มของน้ำตกในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งโดยใช้ค่าคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี โดยวิธี Gower Metric และ Classification แบบ FUSE Flexible-Beta (Belbin, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับวิธี SSH ในภาพที่ 3a

4.4.3 เซลล์พันธุศาสตร์ของตัวอ่อนรินดำ

ในการศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทินโครโมโซมที่มาจากต่อมน้ำลายของตัวอ่อนจำนวน 12 สปีชีส์ ซึ่งจัดอยู่ใน 2 สกุลย่อย (subgenus) สกุลย่อยที่หนึ่ง คือ *Gomphostilbia* Enderlein ประกอบด้วยรินดำจำนวน 5 สปีชีส์ แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มย่อย *batoense* มี 3 สปีชีส์ (*Simulium angulistylum*, *S. decuplum* และ *S. siamense*) และกลุ่มย่อย *ceylonicum* มี 2 สปีชีส์ (*S. asakoe* และ *S. sp. g*) สำหรับสกุลย่อยที่สองคือ *Simulium* Latreille มี 7 สปีชีส์ แบ่งเป็น 5 กลุ่มย่อยดังนี้ กลุ่มย่อย *multistriatum* มี 1 สปีชีส์ (*S. chainarongi*) กลุ่มย่อย *nobile* มี 2 สปีชีส์ (*S. nodosum* และ *S. nobile*) กลุ่มย่อย *striatum* มี 2 สปีชีส์ (*S. chiangmaiense* และ *S. quinquestriatum*) กลุ่มย่อย *tuberosum* มี 1 สปีชีส์ (*S. tani*) และกลุ่มย่อยที่ไม่มีชื่ออีก 1 สปีชีส์ (*S. rudnicki*) รินดำทั้ง 12 สปีชีส์ มีจำนวนโครโมโซม 3 คู่ ($2n=6$) โครโมโซมแท่งที่ 1 ยาวที่สุด รองลงมาคือ โครโมโซมแท่งที่ 2 และโครโมโซมแท่งที่ 3 สั้นที่สุด แต่ละโครโมโซมประกอบด้วยแขน

สองแขนที่มีความยาวเท่ากันหรือไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (ตารางที่ 4.4) การเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมและลักษณะอื่นๆ เช่น ตำแหน่งและลักษณะของเซนโทรเมียร์ ตำแหน่งของนิวคลีโอไลอาร์อาร์แกในเซอร์และพัพปี (วงแหวนบัลบิอะนิ) เป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละสปีชีส์ (ภาพที่ 4.6 และ 4.7) และมีความแตกต่างกันแม้ว่าสปีชีส์เหล่านั้นจะอยู่กลุ่มย่อยและสกุลย่อยเดียวกัน ตัวอย่างเช่น นิวคลีโอไลอาร์อาร์แกในเซอร์ของ *S. nobile* อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 (ภาพที่ 4.6) แต่ *S. nodosum* ซึ่งจัดอยู่กลุ่มย่อยเดียวกับ *S. nobile* มีนิวคลีโอไลอาร์อาร์แกในเซอร์อยู่ปลายสุดของโครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพที่ 4.7) บริเวณเซนโทรเมียร์บนโครโมโซมของ *S. nobile*, *S. chainarongi* และ *S. rudnicki* ซึ่งอยู่คนละกลุ่มในสกุลย่อย *Simulium* มีลักษณะโป่งพองออกมาเห็นชัดเจน ซึ่งต่างจากรันด้าสปีชีส์อื่นที่อยู่ในสกุลย่อย *Simulium* เช่น *S. quinquestriatum* และรันด้าที่อยู่ในสกุลย่อย *Gomphostilbia* เช่น *S. asakoe* (ภาพที่ 4.8) ที่บริเวณเซนโทรเมียร์ของรันด้าพวกนี้ไม่โป่งพอง

นอกจากนี้เซนโทรเมียร์ของรันด้าสปีชีส์ *S. nodosum* บางตัวมารวมกันฟอร์มเป็นชุดโครโมเซนเตอร์ (pseudochromocenter) ที่มีคอนสทิทิวทีฟเฮเทโรโครมาตินย้อมติดสีเข้ม (ภาพที่ 4.9) ดังนั้นตำแหน่งและลักษณะของเซนโทรเมียร์ นิวคลีโอไลอาร์อาร์แกในเซอร์และวงแหวนบัลบิอะนิเป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละสปีชีส์ไม่ใช่ลักษณะจำเพาะของแต่ละกลุ่มหรือแต่ละสกุลย่อย อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการเรียงลำดับของแบนด์ของรันด้าใน 2 สกุลย่อย พบว่าแบนด์บางแบนด์บนแขนโครโมโซม IIS และ IIIS ของรันด้าในสกุลย่อยเดียวกันหรือต่างกันมีลักษณะเหมือนกัน (ภาพที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่าแบนด์ที่เหมือนกันเหล่านี้มาจากบรรพบุรุษร่วม (common ancestor) ซึ่งถูกถ่ายทอดไปยังรันด้าแต่ละสปีชีส์ในสกุลย่อยเดียวกันหรือต่างกัน

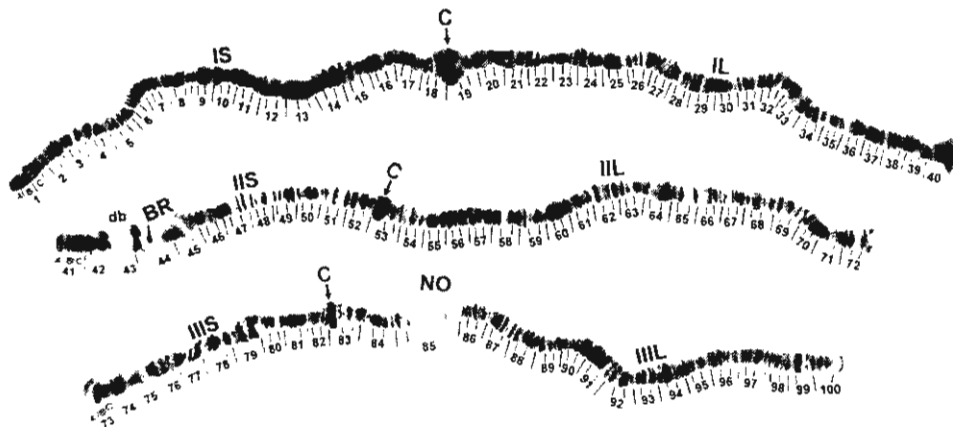
ในการศึกษาที่ยังพบพาราเซนทริกอินเวอร์ชัน (paracentric inversion) ในประชากรรันด้า 7 สปีชีส์ที่เก็บมาจากแหล่งน้ำไหลต่างกัันดังนี้ พบพาราเซนทริกอินเวอร์ชัน 3 แบบ (IL-1, IIIL-1 และ IIIL-2) ในประชากรรันด้าสปีชีส์ *S. tani* สำหรับประชากรของ *S. nodosum* มี 2 แบบ (IIL-1 และ IIIL-1) (ภาพที่ 4.9) *S. Chiangmaiense* มี 3 แบบ (IS-1, IIL-1 และ IIIL-1) *S. asakoe* มี 3 แบบ (IL-1, IIL-1 และ IIIL-1) *S. siamense* มี 3 แบบ (IS-1, IL-1 และ IIL-1) *S. angulistylum* มี 2 แบบ (IIL-1 และ IIIL-1) และ *S. decuplum* (ภาพที่ 4.11) มีเพียงแบบเดียวคือ IIIL-1 จากการทดสอบสถิติโดยวิธี χ^2 พบว่าอินเวอร์ชันทั้งหมดอยู่ในสถานะสมดุลภายใต้กฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และอินเวอร์ชันเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ ดังนั้นจึงไม่ทราบว่าโครโมโซมแท่งใดเป็นโครโมโซมเพศ (X หรือ Y) ในประชากรรันด้าเหล่านี้

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบความยาวของแขนโครโมโซม ($\pm$ SD) และจำนวนส่วนย่อยที่แบ่งในแต่ละแขนโครโมโซมของแมลงวันดำใน Subgenera *Gomphostilbia* Enderlein และ *Simulium* Latreille

Species	Chromosome I			Chromosome II			Chromosome III		
	S*	L*	R**	S	L	R	S	L	R
<i>S. (G.) angulistylum</i>	18.08 $\pm$ 1.1 (18)	22.69 $\pm$ 0.7 (23)	1.3 (M)	10.23 $\pm$ 0.5 (10)	20.65 $\pm$ 0.7 (21)	2.1 (SM)	11.25 $\pm$ 1.1 (11)	17.40 $\pm$ 0.89 (17)	1.6 (SM)
<i>S. (G.) asakoe</i>	18.85 $\pm$ 0.6 (19)	21.40 $\pm$ 1.2 (21)	1.1 (M)	13.32 $\pm$ 0.4 (13)	17.52 $\pm$ 0.8 (18)	1.4 (SM)	11.30 $\pm$ 0.5 (11)	17.60 $\pm$ 0.8 (18)	1.6 (SM)
<i>S. (G.) decuplum</i>	15.30 $\pm$ 1.1 (15)	25.68 $\pm$ 1.1 (26)	1.7 (SM)	14.80 $\pm$ 0.8 (15)	16.35 $\pm$ 0.8 (16)	1.1 (M)	7.25 $\pm$ 0.9 (7)	20.90 $\pm$ 0.9 (21)	3.0 (SM)
<i>S. (G.) siamense</i>	19.80 $\pm$ 0.6 (20)	22.29 $\pm$ 0.9 (22)	1.1 (M)	12.65 $\pm$ 0.6 (13)	17.80 $\pm$ 0.7 (18)	1.4 (M)	10.40 $\pm$ 0.8 (10)	17.22 $\pm$ 0.8 (17)	1.7 (SM)
<i>S. (G.) sp. g</i>	18.40 $\pm$ 0.8 (18)	24.72 $\pm$ 1.0 (25)	1.4 (M)	11.35 $\pm$ 0.4 (11)	17.65 $\pm$ 0.7 (18)	1.6 (SM)	10.32 $\pm$ 0.5 (10)	18.42 $\pm$ 0.9 (18)	1.8 (SM)
<i>S. (S.) chainarongi</i>	18.60 $\pm$ 1.2 (19)	24.53 $\pm$ 1.3 (25)	1.3 (M)	13.38 $\pm$ 0.9 (13)	19.10 $\pm$ 1.1 (19)	1.4 (M)	8.40 $\pm$ 0.9 (8)	16.30 $\pm$ 1.3 (16)	1.9 (SM)
<i>S. (S.) chiangmaiense</i>	20.28 $\pm$ 1.3 (20)	22.61 $\pm$ 0.8 (23)	1.2 (M)	13.15 $\pm$ 1.2 (13)	17.10 $\pm$ 1.2 (17)	1.3 (M)	10.04 $\pm$ 0.8 (10)	16.82 $\pm$ 0.9 (17)	1.7 (SM)
<i>S. (S.) nobile</i>	18.13 $\pm$ 1.1 (18)	21.90 $\pm$ 1.1 (22)	1.2 (M)	12.30 $\pm$ 0.9 (12)	19.90 $\pm$ 0.9 (20)	1.6 (SM)	9.50 $\pm$ 0.8 (10)	17.80 $\pm$ 0.8 (18)	1.9 (SM)
<i>S. (S.) nodosum</i>	18.17 $\pm$ 1.4 (18)	20.11 $\pm$ 1.3 (20)	1.1 (M)	13.80 $\pm$ 1.1 (14)	18.40 $\pm$ 1.3 (18)	1.3 (M)	9.56 $\pm$ 0.7 (10)	19.80 $\pm$ 1.4 (20)	2.0 (SM)
<i>S. (S.) quinquestriatum</i>	19.45 $\pm$ 1.0 (19)	22.60 $\pm$ 0.6 (23)	1.2 (M)	8.31 $\pm$ 0.4 (8)	21.54 $\pm$ 1.4 (22)	2.6 (SM)	11.40 $\pm$ 0.6 (11)	17.35 $\pm$ 0.4 (17)	1.5 (SM)
<i>S. (S.) rudnicki</i>	18.50 $\pm$ 1.1 (19)	19.50 $\pm$ 0.9 (20)	1.0 (M)	12.40 $\pm$ 1.0 (12)	19.85 $\pm$ 1.3 (20)	1.6 (SM)	11.51 $\pm$ 0.8 (12)	16.95 $\pm$ 0.8 (17)	1.5 (SM)
<i>S. (S.) tani</i>	17.62 $\pm$ 1.1 (18)	20.21 $\pm$ 1.2 (20)	1.1 (M)	13.10 $\pm$ 0.7 (13)	18.55 $\pm$ 1.3 (19)	1.5 (SM)	12.40 $\pm$ 0.9 (12)	18.10 $\pm$ 1.0 (18)	1.5 (SM)

* S and L indicated short and long arms, respectively.

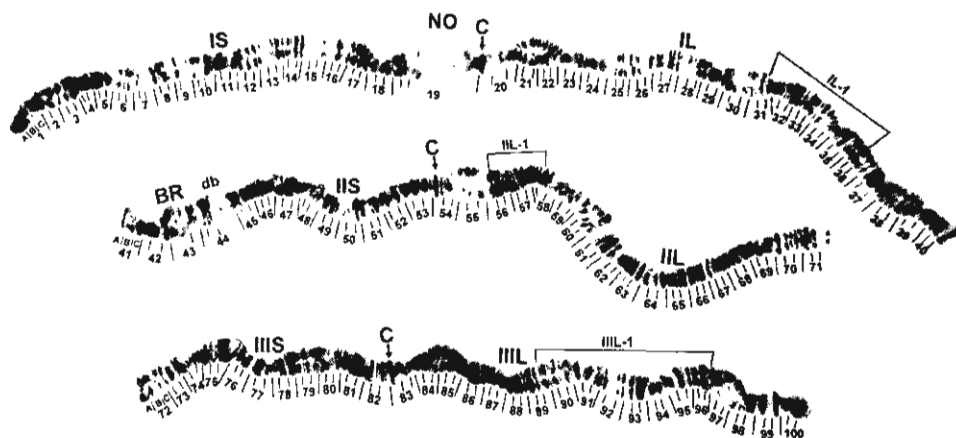
** R indicated arm ratio (long arm/short arm), metacentric (M) or submetacentric (SM) is shown in brackets.



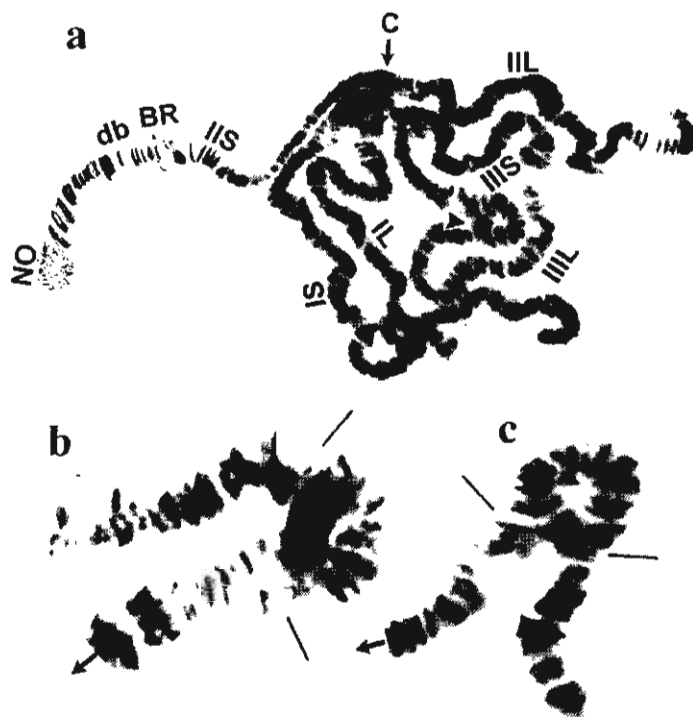
ภาพที่ 4.6 แผนที่มาตรฐานแสดงแบบแผนของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมของริ้นดำสปีชีส์ *Simulium nobile*. C = centromere; NO = nucleolar organizer; BR = Ring of Balbiani; db = double bubble



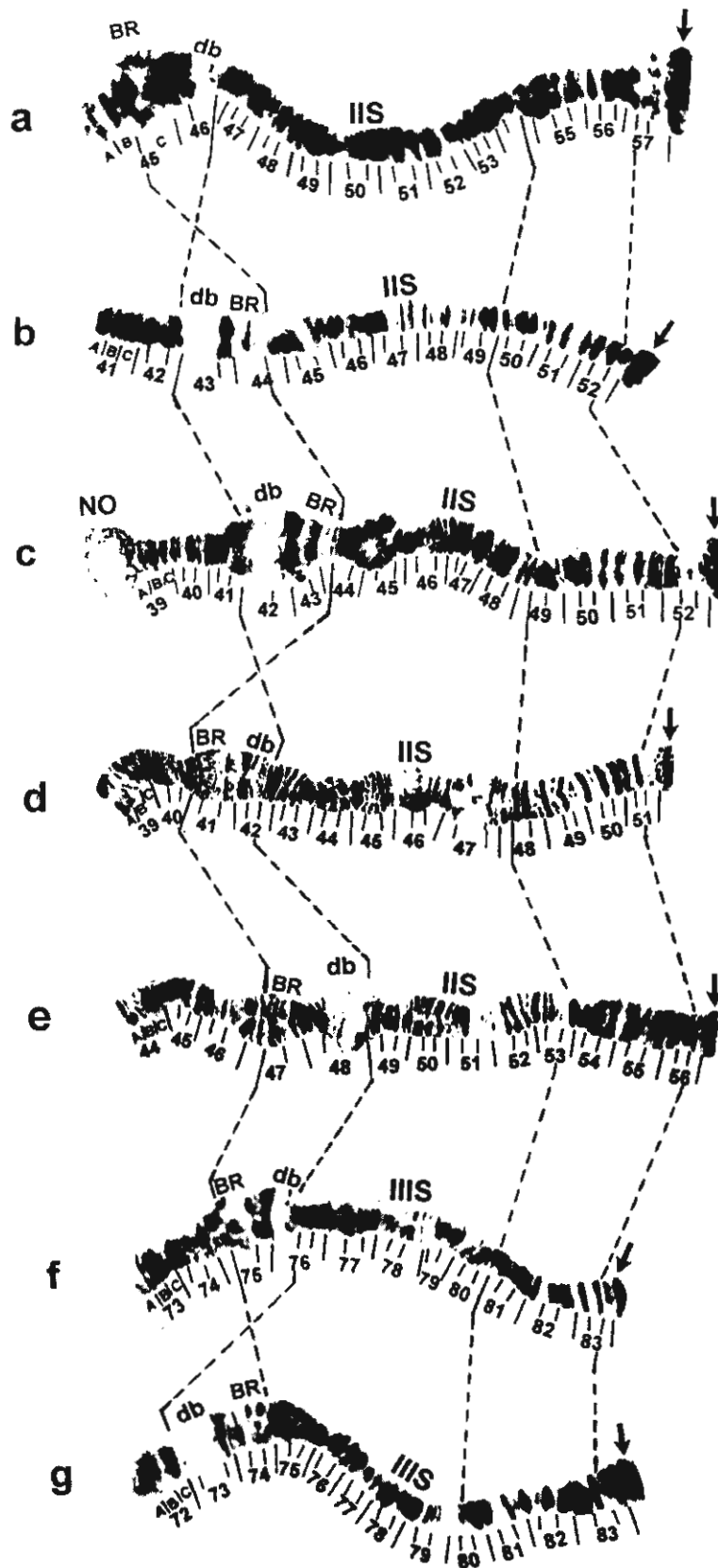
ภาพที่ 4.7 แผนที่มาตรฐานแสดงแบบแผนของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมของริ้นดำสปีชีส์ *Simulium nodosum* พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งและจุดแยกของอินเวอร์ชันบนแขน IIL และ IIIL. C=centromere; NO=nucleolar organizer; BR=Ring of Balbiani; db=double bubble



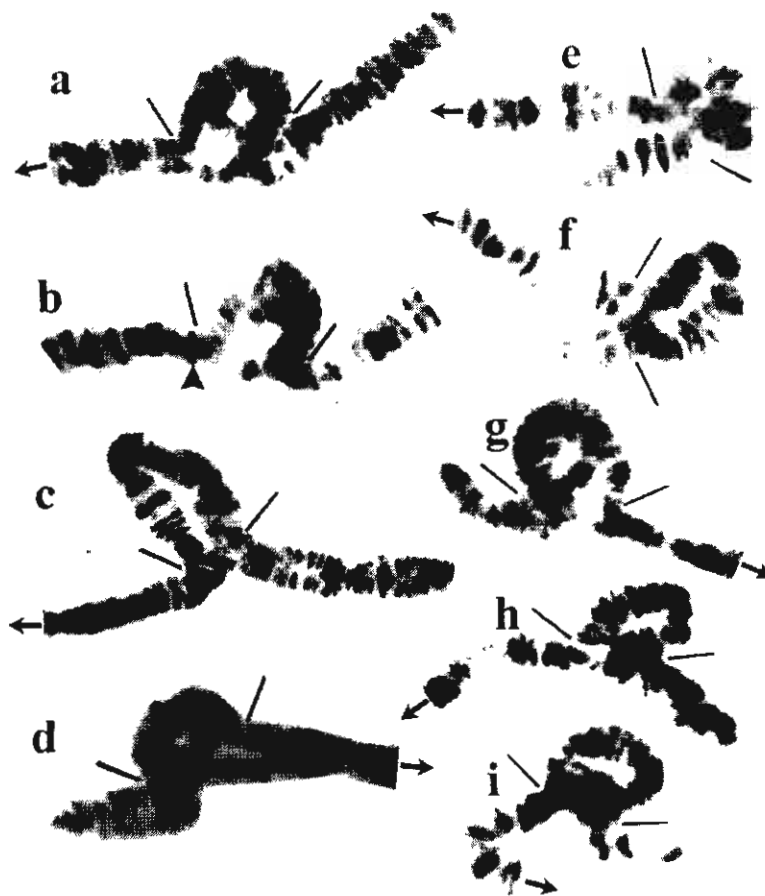
ภาพที่ 4.8 แผนที่มาตรฐานแสดงแบบแผนของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมของริ้นดำสปีชีส์ *Simulium asakoe* พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งและจุดแยกของอินเวอร์ชันบนแขน IL, IIL และ IIIL. C = centromere; NO = nucleolar organizer; BR = Ring of Balbiani; db = double bubble



ภาพที่ 4.9 โพลีทีนโครโมโซมของริ้นดำสปีชีส์ *Simulium nodosum* ที่เซนโทรเมียร์มารวมกันฟอร์มเป็นซูโดโครโมเซนเตอร์ (a), เฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชันแบบ IIL-sV1 (b) และ IIL-sV1 (c) ในประชากรริ้นดำ *S. nodosum* ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์



ภาพที่ 4.10 แสดงแบนด์ที่มีลักษณะเหมือนกันบนโครโมโซม IIS และ IIIIS ของริ้นดำในสกุล ย่อย *Simulium* จำนวน 8 สปีชีส์ ดังนี้ *Simulium chainarongi* (a), *S. nobile* (b), *S. nodosum* (c), *S. tani* (d), *S. Chiangmaiense* (e), *S. quinquestratum* (f) และ *S. rudnicki* (g) ลูกศร แสดงทิศทางของเซนโทรเมอร์ เส้นประแสดงขอบเขตของแบนด์ที่มีลักษณะเหมือนกัน



ภาพที่ 4.11 ภาพแสดงเฮเทอโรไซกัสอินเวอร์ชันที่พบในประชากรของริ้นดำสปีชีส์ *Simulium asakoe* (a). IL-st/1. (b). IIL-st/1 and (c). IIIL-st/1. *S. decuplum* (d). IIIL-st/1. *S. angulistylum* (e). IIL-st/1 and (f). IIIL-st/1. and *S. siamense* (g). IS-st/1. (h). IL-st/1 and (i). IIL-st/1. ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์

4.4.4 อนุพันธุศาสตร์ของแมลงริ้นดำโดยการศึกษาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

4.4.4.1 การศึกษา ITS2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอในแมลงริ้นดำกลุ่มสกุลย่อย

Gomphostilbia

(ก) องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงริ้นดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงริ้นดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* Enderlein จำนวน 8 สปีชีส์ พบว่ามีความยาวของนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 356-401 คู่ (ตารางที่ 4.5) โดยมีความยาวของนิวคลีโอไทด์ดังนี้ *S. (G.) parahiyangum* เท่ากับ 388 คู่, *S. (G.) siamense* เท่ากับ 365 คู่, *S. (G.) decuplum* เท่ากับ 403 คู่, *S. (G.) sp. g* เท่ากับ 375 คู่, *S. (G.) sheilae* เท่ากับ 375 คู่, *S. (G.) inthanonense* เท่ากับ 356 คู่ และ *S. (G.) chumpornense* เท่ากับ 401

คู่ และมีองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ A และนิวคลีโอไทด์ T อยู่ระหว่าง 69.3 – 73.6% มีค่าเฉลี่ย นิวคลีโอไทด์ A เท่ากับ 34.7 (33.2-36.5%), นิวคลีโอไทด์ T เท่ากับ 36.3 (35.4-37.2%), นิวคลีโอไทด์ C เท่ากับ 12.9 (12.0-14.0%) และนิวคลีโอไทด์ G เท่ากับ 16.0 (14.4-17.0%) (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 แสดงความยาว และเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* Enderlein

Species	Sequence length	Adenine	Thymine	Guanine	Cytosine	%AT
<i>S. (G.) para_MT</i>	388	33.8	37.1	16.5	12.6	70.9
<i>S. (G.) siam_ST</i>	365	33.7	35.6	17.0	13.7	69.3
<i>S. (G.) decu_MTH</i>	403	35.0	36.2	15.4	13.4	71.2
<i>S. (G.) angu_MT</i>	395	33.2	37.2	17.0	12.7	70.4
<i>S. (G.) sp.g_NG</i>	375	36.5	37.1	14.4	12.0	73.6
<i>S. (G.) shei_BR</i>	375	36.5	36.5	14.7	12.3	73.0
<i>S. (G.) intha_MTH</i>	356	34.3	35.4	16.3	14.0	69.7
<i>S. (G.) chum_KP</i>	401	34.9	35.7	16.5	13.0	70.6
Average	382.2	34.7	36.3	16.0	12.9	71.1

(ข) โพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่างโคลนของวันดำ

จากการทดลองพบว่า มีความแตกต่างของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่างโคลนต่างๆ ของแมลงวันดำภายในตัวเดียวกันและต่างกันดังนี้ ตัวอ่อนของแมลงวันดำสปีชีส์ *S. (G.) parahiyangum* (L4) ที่เก็บมาจากน้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงราย มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 388 คู่ ทั้งสามโคลน (โคลน 2, โคลน 3, โคลน 6) โดยสองโคลน (โคลน 3 และ โคลน 6) มีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน แต่มี 2 คู่ นิวคลีโอไทด์ต่างจากอีกโคลน (โคลน 2) แบบ transition และ transversion ในทำนองเดียวกันสองโคลน (โคลน 1 และโคลน 3) ของตัวอ่อนแมลงวันดำ *S. (G.) sheilae* (L8) ที่เก็บมาจากน้ำตกหงาว จ. ระนอง มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 375 คู่เท่ากัน แต่มีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่างกัน โดยเกิด transition 1 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามความยาวและการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน 3 เหมือนกับหนึ่งโคลนของตัวเต็มวัยตัวเมีย (A2) ที่เก็บมาจากน้ำตกบิพัตร์ จ. สงขลา สำหรับตัวอ่อนของแมลงวันดำ *S. (G.) sp.g* ที่เก็บมาจากน้ำตกหงาว จ. ระนอง ทั้งสามโคลนมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 375 คู่เท่ากัน แต่มีความแตกต่างระหว่างโคลน โดยมีความแตกต่างแบบ transition และ transversion 2-3 คู่ นิวคลีโอไทด์ และทั้งสามโคลนมีนิวคลีโอไทด์ 1 คู่ ต่างจากโคลนของตัวเต็มวัยตัวผู้ (A1) ที่เก็บมาจากแหล่งเดียวกัน แต่เก็บในช่วงเวลาที่ต่างกัน ในทำนองเดียวกันสามโคลนของตัวอ่อนวันดำ *S. (G.) angulistylum* (L5) จากน้ำตกขุนกรณ์ จ. เชียงราย (โคลน 1, โคลน 2 และโคลน 3) มีความยาวเท่ากับ 396, 395 และ 394 คู่ตามลำดับ และมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเล็กน้อย อย่างไรก็ตามหนึ่งในสามโคลนนี้ (โคลน 2) มีความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับสองโคลน (โคลน 1 และโคลน 3)

ของตัวเต็มวัยตัวผู้ (A3) จากน้ำตกเหมืองหวด จ. สุราษฎร์ธานี และสองโคลนของตัวด้กแด่ (P1) จาก น้ำตกวังตะไคร้ จ. นครนายก นอกจากนี้หนึ่งในสามโคลน (โคลน 3) ของ *S. (G.) angulistylum* จาก น้ำตกขุนกรณ์ จ. เชียงราย ที่มีความยาวเท่ากับ 394 คู่ มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับหนึ่ง โคลนของตัวอ่อน (L6) จากน้ำตกห้วยหลวง จ. อุบลราชธานี ดังนั้น *S. (G.) angulistylum* มีความ แตกต่างและความเหมือนของความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS2 ระหว่างโคลนภายในรุ่นตัวเต็มวัย กันหรือต่างกัน ความแตกต่างของความยาวและการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างโคลนของรุ่นตัวนี้ อาจเนื่องจากเกิดโพลีเมอร์ฟิซึมของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS2 หรืออาจเป็นผลจากการทำงานผิดพลาด ของเอนไซม์ *Taq Polymerase* ขณะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามสามารถจะวัดความ แปรผันภายในรุ่นตัวเต็มวัยได้โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 หลายๆ โคลน ถ้าความแปรผัน เกิดเนื่องจากความผิดพลาดของเอนไซม์ *Taq Polymerase* ให้ผลมากกว่า 10% ของความแปรผัน ระหว่างสองสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการควรจะต้องใช้ผลผลิตของ PCR มาหาลำดับ นิวคลีโอไทด์แทนที่การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนต่างๆ ในการทดลองนี้ผลความแตกต่างระหว่าง โคลนของรุ่นตัวภายในตัวเดียวกันและต่างกันมีเพียงเล็กน้อย จึงยังคงหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลน ต่างๆ ของรุ่นตัวที่ศึกษา อย่างไรก็ตามควรจะได้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนและจากผลผลิต ของ PCR ว่าจะเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไรจะได้ยืนยันผลความแตกต่างระหว่างโคลนว่าเกิดโพลีเมอร์ฟิซึม ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 หรือเกิดเนื่องจากความผิดพลาดของ *Taq Polymerase*

ในการวิจัยนี้ได้พบแมลงรุ่นตัวจำนวน 4 สปีชีส์ที่เก็บมาจากแหล่งเดียวหรือหลายแหล่ง ไม่มีความแตกต่างระหว่างโคลนภายในสปีชีส์ของรุ่นตัวเหล่านั้น ได้แก่ สองโคลน (โคลน 2 และ โคลน 3) ของรุ่นตัวตัวเมีย (A4) สปีชีส์ *S. (G.) chumpornense* จากน้ำตกกะเปาะ จ. ชุมพร มีความยาวเท่ากับ 401 คู่ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน ในทำนองเดียวกันไม่มีความแตกต่างของความยาวและ ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างโคลนของตัวอ่อนรุ่นตัว *S. (G.) inthanonense* ที่เก็บมาจากสถานที่ต่างๆ ดังนี้ จากบ้านแม่โถ จ. เชียงราย (L10, จำนวน 2 โคลน) จากน้ำตกหวาง จ. ระนอง (L12, จำนวน 1 โคลน) และจากน้ำตกลีวีภูมิ จ. เชียงใหม่ (L13, จำนวน 2 โคลน และ L14 จำนวน 2 โคลน) นอกจากนี้ ยังไม่พบความแตกต่างของความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสองโคลนของตัวอ่อนรุ่นตัว *S. (G.) decuplum* จากบ้านแม่โถ จ. เชียงราย และหนึ่งโคลนของตัวอ่อนจากน้ำตกเหมืองหวด จ. สุราษฎร์ธานี นอกจากนี้หนึ่งโคลนของตัวเต็มวัยตัวผู้ (A5) ของ *S. (G.) siamense* จากน้ำตกไทรทอง จ. ชัยภูมิ มีความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับหนึ่งโคลนของตัวอ่อน (L7) ที่เก็บจากน้ำตกเหวสุวัต จ. นครราชสีมา

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า โพลีเมอร์ฟิซึมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ของ รุ่นตัวเกิดเฉพาะบางสปีชีส์เท่านั้น

(ค) ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จำนวน 8 สปีชีส์ โดยศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จำนวน 8 สปีชีส์ โดยใช้โปรแกรม ClustalX ซึ่งมี *Simulium exiguum* เป็น outgroup (ภาพที่ 4.12) ข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำถูกนำไปสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic trees) โดยใช้โปรแกรม MEGA ด้วยวิธี Neighbor-Joining (ทำ bootstrap 1000 ครั้ง) พบว่าแมลงวันดำถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4.13) กลุ่ม A ประกอบด้วยแมลงวันดำ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *S. (G.) chumpornense* ซึ่งอยู่ในกลุ่มย่อย *varicorne* และ *S. (G.) parahiyangum*, *S. (G.) decuplum* และ *S. (G.) angulistylum* ซึ่งจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มย่อย *batoense* ภายในกลุ่ม A ประกอบด้วยกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกประกอบด้วยแมลงวันดำสปีชีส์ *S. (G.) decuplum* และ *S. (G.) angulistylum* ซึ่ง *S. (G.) decuplum* กับ *S. (G.) angulistylum* มีค่าเฉลี่ยที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันเท่ากับ 96% (จากการทำ bootstraps 1,000 ครั้ง) (ภาพที่ 4.13) และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างแมลงวันดำสองสปีชีส์เท่ากับ 88.72 (ตารางที่ 4.6) กลุ่มย่อยที่สอง ประกอบด้วยแมลงวันดำสปีชีส์ *S. (G.) chumpornense* และ *S. (G.) parahiyangum* ซึ่งมีค่าเฉลี่ยที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันเท่ากับ 56% ทั้งสองกลุ่มย่อยมีค่าเฉลี่ยที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันเท่ากับ 91% ภายในกลุ่ม B ประกอบด้วยแมลงวันดำ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *S. (G.) siamense* ซึ่งอยู่ในกลุ่มย่อย *batoense* และ *S. (G.) inthanonense*, *S. (G.) sp. g* และ *S. (G.) sheilae* ซึ่งจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มย่อย *ceylonicum* แมลงวันดำสปีชีส์ *S. (G.) sp. g* มีค่าเฉลี่ยที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับ *S. (G.) sheilae* มาก (100%) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างแมลงวันดำสองสปีชีส์เท่ากับ 99.20% และ *S. (G.) inthanonense* มีค่าเฉลี่ยที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับ *S. (G.) sp. g* และ *S. (G.) sheilae* เท่ากับ 86% สำหรับแมลงวันดำสปีชีส์ *S. (G.) siamense* ซึ่งจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มย่อย *batoense* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับแมลงวันดำในกลุ่มย่อย *ceylonicum* ด้วยค่าเฉลี่ยที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิด เท่ากับ 99%

จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าวันดำสปีชีส์ *S. (G.) chumpornense* ซึ่งอยู่ในกลุ่มย่อย *varicorne* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับวันดำในกลุ่มย่อย *batoense* โดยเฉพาะ *S. (G.) parahiyangum* มากกว่าวันดำในกลุ่มย่อย *ceylonicum* นอกจากนี้วันดำทั้งหมด (ยกเว้น *S. (G.) siamense*) จะอยู่รวมภายในกลุ่มย่อยเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกกลุ่มย่อยโดยอาศัยข้อมูลทางลักษณะรูปร่างสัณฐานวิทยาของวันดำ

```

S.(G.) exiguum AACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATG 60
S.(G.) para_MF .....A... 60
S.(G.) siam_ST .....A... 60
S.(G.) decu_MTH .....C.C...A... 60
S.(G.) angu_MT .....A... 60
S.(G.) sp.g_NG .....A...A... 60
S.(G.) shei_BR .....A...A... 60
S.(G.) intha_MTH .....A... 60
S.(G.) chump_KP .....A... 60
*****

S.(G.) exiguum GCTTGAGGTTTCATATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACTGTTCTT----- 111
S.(G.) para_MF .....TTTATTAC 120
S.(G.) siam_ST .....ATT----- 114
S.(G.) decu_MTH .....C...GCTCAAAAC 120
S.(G.) angu_MT .....ATTTAATGC 120
S.(G.) sp.g_NG .....T.....CAT----- 113
S.(G.) shei_BR .....T.....CAT----- 113
S.(G.) intha_MTH .....C----- 111
S.(G.) chump_KP .....ATTATATAT 120
*****

S.(G.) exiguum --TTATTCGTAAGA----GACGTACGTATCAACTATGAGATTTCTTGAAAATT-----T 159
S.(G.) para_MF TT...G.A...CG---AA.....G.....AGC.GA.GT...A.CAGAA. 177
S.(G.) siam_ST -T...A.AA.....C...G.....GAGC.GAAGT...TAGAAC 166
S.(G.) decu_MTH TAA.T..T..GT.----AT.....G.....A..T.GGA.GT...A.CAAAC. 176
S.(G.) angu_MT TT.A...CG.C...GGGTAA.....G.....A.AGC.GA.GT...A.CAGAA. 180
S.(G.) sp.g_NG --.C.A.--G.....G.....AGC.AAAGT...TAGTA. 162
S.(G.) shei_BR --.C.A.--G.....G.....AGC.AAAGT...TAGTA. 162
S.(G.) intha_MTH --.A.--G.-----C...G.....AGC.GAAGT...CAGAA. 160
S.(G.) chump_KP TC.....A...TG---A.....G.....AGC.GAAGT...CAGAA. 174
*****

S.(G.) exiguum CATATTGATTAAATCTAGAGATATGAA---ACAATTCAAATATGGTTT-----ACTTA 211
S.(G.) para_MF .....A.....--A..A..G...C.A.CACA----T..T 228
S.(G.) siam_ST .....A.....--G...CA..GACT-----G 213
S.(G.) decu_MTH T.....A.....--A..A..G...A..A.AACAA...G 231
S.(G.) angu_MT T.....AC.....--A..ATG...A..CA-----G 229
S.(G.) sp.g_NG .....A.....--G...CTA.AG.T---G.A.T 209
S.(G.) shei_BR .....A.....--G...CTA.AG.T---G.A.T 209
S.(G.) intha_MTH .....A.....--G...CA..AACA-----G 207
S.(G.) chump_KP .....A.....AAAAAA..A..G...C...AACC----TA.T 230
*****

S.(G.) exiguum TACG--GTAGCCTATTACTATTTTATA-TAAAATAATCATTCTTAA-AACATTTGAT 266
S.(G.) para_MF T.TTGTGTAT...C.A..C.....T.CT.....G.TTGT.AGC... 286
S.(G.) siam_ST CTA--TA.A.T.TTG..C.A...C..C...T.CT.....TTGT...A.. 271
S.(G.) decu_MTH CTT.-TT.A...TT...C.A..C.....T.CT.....G.TTT.TAGC... 289
S.(G.) angu_MT CTT.-TT.A...TT...C...C.....T.CT.....G.TGG.TAGA.-. 286
S.(G.) sp.g_NG GTA--TA...A.TT...C.A.....A..T.CT.....TTG..A.GA.A 267
S.(G.) shei_BR GTA--TA...A.TT...C.A.....A..T.CT.....TTG..A.GA.A 267
S.(G.) intha_MTH CTT.TTA...TTG..C.A...A...TT...TTCT.....TTGTCA.GA.. 267
S.(G.) chump_KP T.TTATG.A...TT...C.A..C.....T.CT.....G.TGG.TAGC... 289
* ** * * * *

S.(G.) exiguum GCATTATATATA-----AAAATAAGAAATAAGC--GTGTTAGTAAATATAT----- 311
S.(G.) para_MF .A..G.G.TGT-TATAGAGT..ATGT..T.G.ATGGC--G..GAT...A.A----- 333
S.(G.) siam_ST .-G.A.T..GT-----TGTTAG.T.G.AT-GA-.A.GG.C.G--C.A----- 311
S.(G.) decu_MTH .A..A.G...TTATAGAGT...TGT-.C.G.ATAA...A.AGATG.GT..A.GTGAAAT 348
S.(G.) angu_MT .A...-G...TTATAGAGT...TGT-.C.G.ATAA...A.AGATG.GTC.AT-TGA--- 339
S.(G.) sp.g_NG ATG.G...TATATATTGT..G.A..T..T.G.ATTGA-.GA.AC...-C.A.G----- 318
S.(G.) shei_BR ATG.G...TATATATTGT..G.A..T..T.G.ATTGA-.GA.AC...-C.A.G----- 318
S.(G.) intha_MTH ATGAA-----G.AT.A..T.G.ATTGA-.CGA..C...-GC.A----- 304
S.(G.) chump_KP .A..G...-AT-TATAGGGT...CGT..T.G.ATAG...G.ACAT.C---A..GCATTT 344
* * *

S.(G.) exiguum CAAGAATTGTGAAT----ATACTATAAAATTATACATAGCCTCAACTCATGTGAGAC 363
S.(G.) para_MF TTCT.....ATT.-GAA.....A.TTG..... 388
S.(G.) siam_ST A.C.....TG.TCAAA...A.A.-TG..... 365
S.(G.) decu_MTH TTTC..C.A.AT..C--GT.....A.G..... 403
S.(G.) angu_MT TTTTTCG.C.A.ATT.TT-GA.....A..... 395
S.(G.) sp.g_NG ..TAT...TA.T..TTAAT.CTTA.A.GTG..... 375
S.(G.) shei_BR ..CAT...TA.T..TTAAT.CTTA.A.GTG..... 375
S.(G.) intha_MTH AT.AT...-T..TCAAT.CTTG.A--G..... 356
S.(G.) chump_KP TTGTG.C...ATT.CGGAA.....A..... 401
* * *

```

ภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* Enderlein จำนวน 8 สปีชีส์ โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.81 (Thompson et al., 1997)

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่างแมลงรึ้นดำในกลุ่มสกุลย่อย Gomphostilbia Enderlein

8 Species Domain	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG	Total	% homology
para_MF:gomb_RT	308	33	23	1.4	114	6	5	4	7	41	1	1	6	0	106	11	5	1	9	47	364.0	84.61
para_MF:decu_MTH	324	34	29	1.2	123	9	7	5	9	40	3	2	7	0	114	10	5	0	6	47	387.0	83.72
para_MF:angu_MT	326	28	30	0.9	124	7	7	4	6	39	3	1	8	2	111	7	5	0	8	52	384.0	84.89
para_MF:sp.g_NG	303	32	33	1.0	116	8	8	7	7	36	1	1	11	3	107	10	1	1	7	44	368.0	82.34
para_MF:shel_BR	300	34	34	1.0	114	8	8	7	8	36	1	1	12	3	106	10	1	1	8	44	368.0	81.52
para_MF:intha_MTH	307	25	21	1.2	114	6	6	2	4	40	3	0	4	2	106	8	3	1	7	47	353.0	86.97
para_MF:chum_KP	344	15	24	0.6	127	3	6	1	4	43	2	1	9	1	118	5	2	2	3	56	383.0	89.82
siam_ST:decu_MTH	294	40	31	1.3	111	11	11	5	9	38	2	2	6	1	101	11	4	0	9	44	365.0	80.55
siam_ST:angu_MT	305	28	30	0.9	115	8	7	8	5	38	2	1	4	1	106	7	5	2	8	46	363.0	84.02
siam_ST:sp.g_NG	307	33	20	1.6	117	8	8	2	4	40	1	0	5	1	106	15	2	1	6	44	360.0	85.28
siam_ST:shel_BR	307	32	21	1.5	116	7	8	2	4	41	1	0	6	1	106	15	2	1	6	44	360.0	85.28
siam_ST:intha_MTH	311	25	17	1.5	112	5	5	4	5	44	0	0	5	1	106	5	2	0	10	49	353.0	88.10
siam_ST:chum_KP	311	30	23	1.3	115	8	6	2	5	40	3	0	4	2	107	10	6	0	7	49	364.0	85.44
decu_MTH:angu_MT	346	19	25	0.8	128	7	9	1	5	43	2	0	6	2	119	4	4	1	3	56	390.0	88.72
decu_MTH:sp.g_NG	301	36	36	1.0	114	10	12	3	7	36	2	0	12	5	108	11	2	0	8	43	373.0	80.70
decu_MTH:shel_BR	299	37	37	1.0	112	10	12	3	8	36	2	0	13	4	108	11	2	1	8	43	373.0	80.16
decu_MTH:intha_MTH	293	37	25	1.5	106	9	10	2	10	39	1	1	8	0	104	11	1	2	7	44	355.0	82.53
decu_MTH:chum_KP	333	28	34	0.8	126	6	7	4	5	42	2	2	5	4	119	9	9	1	8	46	395.0	84.30
angu_MT:sp.g_NG	309	27	34	0.8	122	4	8	4	5	37	3	0	11	5	107	11	3	0	7	43	370.0	83.51
angu_MT:shel_BR	307	28	35	0.8	120	4	8	4	6	37	3	0	12	4	107	11	3	1	7	43	370.0	82.97
angu_MT:intha_MTH	305	27	20	1.4	114	9	7	3	3	41	2	0	6	0	104	9	2	0	6	46	352.0	86.65
angu_MT:chum_KP	345	20	23	0.9	132	3	3	2	6	41	2	3	5	4	118	5	4	0	6	54	388.0	88.92
sp.g_NG:shel_BR	372	2	1	2.0	137	0	0	0	1	45	0	0	1	0	136	0	0	0	1	54	375.0	99.20
sp.g_NG:intha_MTH	312	22	20	1.1	114	6	7	1	3	41	1	0	8	2	110	9	1	0	4	47	354.0	88.23
sp.g_NG:chum_KP	317	28	23	1.2	119	3	9	2	6	41	1	1	5	1	112	5	4	0	14	45	368.0	86.14
shel_BR:intha_MTH	312	21	21	1.0	113	6	6	1	3	41	2	0	9	2	110	8	1	0	4	48	354.0	88.13
shel_BR:chum_KP	317	27	24	1.1	118	3	9	3	5	42	1	1	5	1	112	5	4	0	14	45	368.0	86.14
intha_MTH:chum_KP	351	23	20	1.1	122	8	5	3	3	52	1	1	9	0	120	4	1	0	8	57	394.0	89.0

ii = Identical Pairs; sv = Transversional Pairs; si = Transitions Pairs; R = s/sv

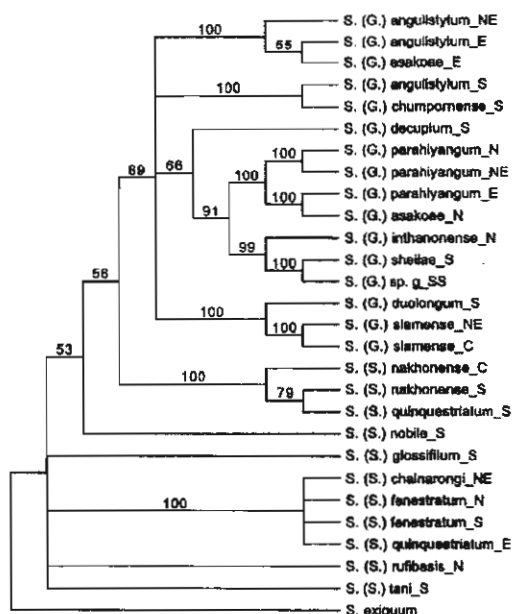
4.4.4.2 การศึกษายีน COI, ND4, 16S rRNA ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และ 28SD2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ในแมลงวันตำากลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Simulium*

(ก) องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ของ COI, ND4, 16S rRNA และ 28SD2

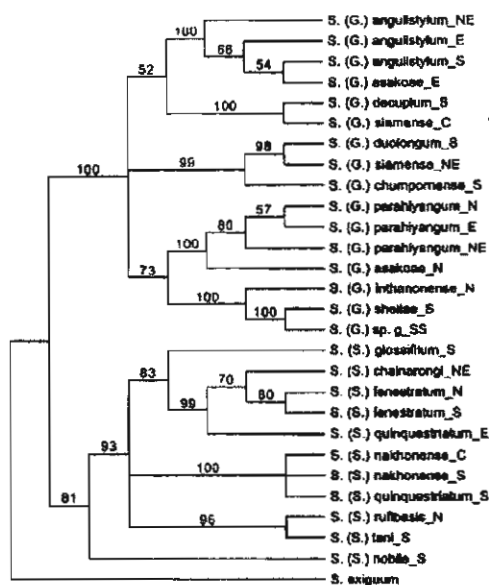
ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (COI, ND4 และ 16S rRNA) และบริเวณ 28SD2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอในแมลงวันตำากลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จำนวน 10 สปีชีส์ (15 ตัวอย่าง) และสกุลย่อย *Simulium* จำนวน 9 สปีชีส์ (12 ตัวอย่าง) ซึ่งเก็บมาจากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยได้ผลดังนี้ COI มีความยาวเท่ากับ 1194 คู่ จำนวนนิวคลีโอไทด์โดยเฉลี่ย A=45.029, C=12.403, G=7.166, T=35.402 โดยมี 790 นิวคลีโอไทด์ที่ invariant, 49 นิวคลีโอไทด์ที่เป็น parsimony uninformative (PU) และ 355 นิวคลีโอไทด์เป็น parsimony informative (PI) ND4 มีความยาวนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 513 คู่ จำนวนนิวคลีโอไทด์โดยเฉลี่ย A=26.678, C=11.062, G=17.356, T=44.904 โดยมีนิวคลีโอไทด์โดยเฉลี่ยที่ constant 322 นิวคลีโอไทด์, PU 44 นิวคลีโอไทด์ และ PI 147 นิวคลีโอไทด์ 16S มีความยาวนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 916 คู่ โดยมี 713 นิวคลีโอไทด์ที่ constant, UP 51 นิวคลีโอไทด์ และ PI 152 นิวคลีโอไทด์ จำนวนนิวคลีโอไทด์โดยเฉลี่ย A=45.029, C=12.403, G=7.166, T=35.402 และ 28SD2 ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 427 คู่ โดยมีนิวคลีโอไทด์ที่ constant, UP และ PI เท่ากับ 366, 10 และ 51 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ จำนวนนิวคลีโอไทด์โดยเฉลี่ย A=31.290, C=14.102, G=21.571, T=33.038

(ข) ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันตำากลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Simulium* โดยศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI, ND4, 16S rRNA และ 28 SD2

ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันตำาโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI, ND4, 16S rRNA และ 28SD2 และใช้โปรแกรม PAUP มาสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ Maximum Parsimony พบว่าเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28SD2 สายวิวัฒนาการของแมลงวันตำาในแมลงวันตำากลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* ทั้งหมดเป็น monophyletic group และแยกจากกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* เป็นคนละกลุ่ม (ภาพที่ 4.14) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของแมลงวันตำาทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI (ภาพที่ 4.15) ND4 (ภาพที่ 4.16) และ 16S (ภาพที่ 4.17) แมลงวันตำาในแมลงวันตำากลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* เป็น sister group กับแมลงวันตำาในแมลงวันตำากลุ่ม *Simulium* เมื่อศึกษาระดับสปีชีส์ซึ่งเก็บจากภาคต่างๆ ของประเทศไทยพบว่าแมลงวันตำาสปีชีส์เดียวกันจะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น *S. angulistylum*, *S. parahiyangum* ในขณะที่ *S. quinquestriatum*, *S. fenestratum* และ *S. nakhonense* ยังคลุมเครืออยู่ซึ่งควรจะได้อีกการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันตำาในแมลงวันตำากลุ่มเหล่านี้ โดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบอื่นๆ เช่น Maximum likelihood และเฉลี่ยค่า weight ของเบสรวมทั้ง exclude/include ตำแหน่งเบสที่เป็น hypervariable เช่น ตำแหน่งที่ 3 ของ codon และ protein coding region ซึ่งอาจได้ภาพความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันตำาสปีชีส์ต่างๆ ในแมลงวันตำากลุ่มย่อยทั้งสองชัดเจนและถูกต้องมากขึ้น และสามารถนำไปเปรียบเทียบกับสายวิวัฒนาการที่ได้จากการศึกษารูปร่างสัณฐานวิทยาได้



ภาพที่ 4.16 แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Simulium* วิเคราะห์จากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ND4 โดยวิธี Maximum Parsimony ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b1) โดยมี *Simulium exiguum* เป็น outgroup species



ภาพที่ 4.17 แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Simulium* วิเคราะห์จากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยวิธี Maximum Parsimony ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b1) โดยมี *Simulium exiguum* เป็น outgroup species

4.5 บทสรุป

1. งานวิจัยนี้ได้ใช้หลักอนุกรมวิธานศึกษารูปร่างลักษณะพื้นฐานวิทยาของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยควบคู่ไปกับการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์โดยศึกษาลักษณะและแบบแผนของโพลีทินโครโมโซมเพื่อใช้วินิจฉัยสปีชีส์ของริ้นดำที่แพร่กระจายอยู่ในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติต่างๆ ของประเทศไทย ผลการศึกษาพบริ้นดำจำนวน 20 สปีชีส์ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย ในจำนวนนี้เป็นริ้นดำสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน 1 สปีชีส์ คือริ้นดำสปีชีส์ *S. chumpornense*

2. การแพร่กระจายและความหนาแน่นของตัวอ่อนริ้นดำบางสปีชีส์ในเขตภาคใต้มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ทางเคมีและฟิสิกส์ของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์ของตัวอ่อน เช่น ความกระด้างของน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง และระดับความสูงเหนือระดับน้ำทะเล

3. ผลการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างและความเหมือนของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI, ND4 และ 16S rRNA ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และยีน 28SD2 และ ITS2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอของริ้นดำสปีชีส์ต่างๆ ในสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Simulium* สนับสนุนการจัดจำแนกริ้นดำออกเป็นกลุ่มและสกุลย่อยที่อาศัยหลักอนุกรมวิธานรูปร่างลักษณะพื้นฐานวิทยา เนื่องจากริ้นดำที่อยู่ในกลุ่มหรือพวกสกุลย่อยเดียวกันจะอยู่รวมกลุ่มกันและมี

ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการมากกว่ารุ่นต่ำที่เป็นสปีชีส์นอกกลุ่มหรือนอกสกุลย่อย อย่างไรก็ตามยังมีรุ่นต่ำบางสปีชีส์ที่ให้ผลไม่ชัดเจนซึ่งต้องรอจนกว่าจะได้ผลงานสมบูรณ์จึงจะสรุปได้

4.6 ข้อเสนอแนะ

ในการแยกสปีชีส์ของแมลงวันต่ำโดยการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย ยังให้ผลไม่แม่นยำเนื่องจากตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของรุ่นต่ำบางสปีชีส์มีรูปร่างคล้ายคลึงกันมากจึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัยรุ่นต่ำ ดังนั้นควรได้มีการประยุกต์ใช้ข้อมูลเชิงปริมาณวัดและวิเคราะห์รูปร่างลักษณะสัณฐาน (morphometric) โดยใช้วิธีการสถิติ คณิตศาสตร์ และเทคโนโลยีคอมพิวเตอร์มาช่วยจะทำให้การจำแนกชนิดของแมลงวันต่ำมีความถูกต้องมากขึ้น แม้ว่ารูปร่างลักษณะแบบแผนของโพลีทีนโครโมโซมจากต่อมน้ำลายของแมลงวันต่ำเป็นลักษณะจำเพาะของสปีชีส์ซึ่งสามารถช่วยในการวินิจฉัยสปีชีส์ได้ แต่วิธีการเก็บรักษาตัวอ่อนขณะออกพื้นที่ภาคสนามยังไม่สะดวกและยุ่งยากเพราะต้องเก็บตัวอ่อนไว้ในอุณหภูมิต่ำตลอดเวลาจึงจะรักษาสภาพเซลล์และโครโมโซมไว้ได้ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นอุปสรรคในการเก็บรุ่นต่ำในแหล่งทุรกันดารและทำให้ต้องจำกัดสถานที่ในการเก็บตัวอย่างซึ่งมีผลต่อการศึกษาการแพร่กระจายของรุ่นต่ำ ประกอบกับเทคนิคในการทำโครโมโซมต้องใช้ตัวอย่างของตัวอ่อนรุ่นต่ำจำนวนมากและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญจึงจะได้โครโมโซมดีและสวยสำหรับทำแผนที่มาตรฐานโครโมโซมได้ ดังนั้นควรจะได้ศึกษาชีววิทยาเชิงโมเลกุลเพื่อหา DNA markers ช่วยวินิจฉัยสปีชีส์ของรุ่นต่ำเพื่อให้ถูกต้อง แม่นยำ สะดวก และรวดเร็วขึ้น สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI, ND4, 16S rRNA และ 28SD2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างรุ่นต่ำที่เป็นพาหะนำโรคมาสู่คนและสัตว์ของงานวิจัยนี้ยังได้ผลไม่สมบูรณ์ซึ่งต้องดำเนินการวิจัยต่อไป ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ร่วมกับข้อมูลการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมและข้อมูลความหลากหลายทางนิเวศวิทยาของรุ่นต่ำซึ่งเป็นโครงการที่จะศึกษาต่อไปจะเป็นฐานในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อโรคต่าง ๆ ที่ซ่อนเร้นอยู่ในแมลงชนิดนี้ในอนาคต

4.7 เอกสารอ้างอิง

- เจลิเยว กุวังคะดิลก, สุวรรณี พยุหเสนา, ชัยณรงค์ บุญเข็มทอง และวิสุทธิ์ ใบไม้. 2544. การแพร่กระจาย สัณฐานวิทยา และเซลล์พันธุศาสตร์ของตัวอ่อนรุ่นต่ำในภาคใต้ของประเทศไทย ใน : พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. จัดพิมพ์โดยบริษัทเท็กซ์ แอนด์ พับลิเคชั่น จำกัด กรุงเทพฯ. หน้า 123-130.
- Backingham, K. 1982. Insect rDNA. In H. Busch and L. Rothblum (eds). pp. 205-209. Academic Press, New York.
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. Mol. Phylogenet. Evol. 1: 3-16.
- Beach, R.F., Mills, D. and Collins, F.H. 1989. Structure of ribosomal DNA in *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Ann. Entomol. Soc. Amer. 82: 641-648.

- Bedo, D.G. 1977. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). I. Sibling speciation. *Chromosoma* 64: 37-65.
- Behansky, N.J., Lehmann, T., Fahey, G.T., Fontenille, D., Braock, L.E., Haweley, W.A. and Collins, F.H. 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. *Genetics* 147: 1817-1828.
- Belbin, L. 1995. Pattern Analysis Package. Division of Wildlife and Ecology, CSIRO, Australia.
- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Piffaretti, J.C. and Ward, P.I. 2000. Phylogenetic relationships among Muscoidea (Diptera: Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 9: 67-74.
- Caccone, A., Garcia, B.A. and Powell, J.R. 1996. Evolution of mitochondrial DNA control region in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol. Biol.* 5: 51-59.
- Ciborowski, J. J. H. and Adler, P.H. 1990. Ecological segregation of larval black flies (Diptera: Simuliidae) in northern Saskatchewan, Canada. *Can J. Zool.* 68: 2113-2122.
- Collins, F.H., Mendez, M.A., Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Beasansky, N.J. and Finnerty, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiation member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 37-41.
- Collins, F.H., Paskewitz, S.M. and Finnerty, V. 1989. Ribosomal RNA genes of the *Anopheles gambiae* species complex. *Adv. Dis. Vector Res.* 6: 1-28.
- Conn, J.E., Mitchell, S.E. and Cockburn, A.F. 1997. Mitochondrial DNA variation within and between two species of neotropical anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Heredity* 88: 98-107.
- Crosskey, R.W. 1981. A review of *Simulium damnosum* s. l. and human onchocerciasis in Nigeria, with species reference to geographical distribution and development of Nigerian National Campaign. *Tropenmed. Parasit.* 32: 2-16.
- Crosskey, R.W. 1993. Black flies (Simuliidae). In R.P. Lane and R.W. Crosskey (eds.), *Medical Insects and Arachnids*, pp. 241-287. Chapman and Hall, New York.
- Datta, M. 1973. New species of black flies (Diptera: Simuliidae) of the subgenera *Eusimulium* Roubaud and *Gomphostibia* Enderlien from the Darjeeling area, India. *Oriental Insects* 7: 363-402.
- Datta, M. 1974a. Some black flies (Diptera: Simuliidae) of the subgenus *Simulium* Latreille (s.str.) from the Darjeeling area, India. *Oriental Insects* 8: 15-27.
- Datta, M. 1974b. New species black flies (Diptera: Simuliidae) from the Darjeeling area, India. *Oriental Insects* 8: 457-468.

- Dubin, D.T., HsuChen, C.C. and Tillotson, L.E. 1986. Mosquito mitochondrial transfer RNAs for valine, glycine and glutamine: RNA and gene sequences and vicinal genome organization. *Current Genet.* 10: 701-707.
- Edwards, F.W. 1928. Diptera Nematocera from the Federated Malay States Museums. *J. Fed. Malay States Mus.* 14: 1-139.
- Fredeen, F.J.H. 1969. Outbreaks of the black fly *Simulium arcticum* Malloch in Alberta. *Quaest. Ent.* 5: 341-372.
- Gale, K. and Crampton, J. 1989. The ribosomal genes of mosquito, *Aedes aegypti*. *Eur. J. Biochem.* 185: 311-317.
- Han, H.Y. and McPherson, B.A. 1997. Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta:Diptera) using Partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 17-32.
- Krüker, A., Gelhaus, A. and Garms, R. 2000. Molecular identification and phylogeny of East African *Simulium damnosum* s.l. and their relationship with West African species of the complex (Diptera:Simuliidae). *Insect Mol. Biol.* 9: 101-108.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. 2001. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Kuvangkadilok, C. and Takaoka, H. 2000. Taxonomic notes on Simuliidae (Diptera) from Thailand: Description of a new species and new species distributional records of nine known species. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 167-175.
- Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C. and Phayuhasena, S. 1998. C-banding in polytene chromosomes of six *Simulium* species (Diptera: Simuliidae) from Doi Inthanon National Park, northern Thailand. *J. Sci. Soc. Thailand* 24: 215-230.
- Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C. and Phayuhasena, S. 1999a. Distribution of the larvae of black flies (Diptera: Simuliidae) at Doi Inthanon National Park, northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 30: 328-337.
- Kuvangkadilok, C., Phayuhasena, S. and Boonkemtong, C. 1999b. Larval polytene chromosomes of five *Simulium* species (Diptera: Simuliidae) from Doi Inthanon National Park, northern Thailand. *Cytologia* 64: 197-207.
- Kuvangkadilok, C., Phayuhasena, S. and Baimai, V. 1999c. Population cytogenetic studies on *Simulium feuerborni* Edwards (Diptera:Simuliidae) from northern Thailand. *Genome* 42: 80-86.

- Lehmann, T., Besansky, N.J., Hawley, W.A., Fahey, T.G., Kamau, L. and Collins, F.H. 1997. Microgeographic structure of *Anopheles gambiae* in western Kenya based on mtDNA and microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 6: 243-253.
- Malgorn, Y. and Coquoz, R.. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. *Forensic Sci. Inter.* 102: 111-119.
- McCreadie, J.W., Adler, P.H. and Colbo., M.H. 1995. Community structure of Larval Black flies (Diptera: Simuliidae) from the Avalon Peninsula, Newfoundland. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 51-57
- Mukabayire, O., Boccolini, D., Lochouart, L., Fontenille, D. and Besansky, N.J. 1999. Mitochondrial and Ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the Africa malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol. Ecol.* 8: 289-297.
- O'Grady, P.M. 1999. Reevaluation of phylogeny in the *Drosophila obscura* species group based on combined analysis of nucleotide sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12: 124-139.
- Porter, C.H. and Collins, F.H. 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 271-279.
- Porter, C.H. and Collins, F.H. 1996. Phylogeny of nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6: 178-188.
- Porter, D.L. and Martin, J. 1977. The cytology of *Polypedilum nubifer* (Diptera: Simuliidae). *Caryologia* 30: 41-62.
- Pruess, K.P., Zhu, X. and Powers, T.O. 1992. Mitochondrial transfer RNA genes in a black fly, *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J. Mol. Entomol.* 29: 644-651.
- Puri, I.M. 1932. Studies on Indian Simuliidae. Part V. Species and varieties of the *striatum* series. *Indian J. Med. Res.* 19: 899-915.
- Puri, I.M. 1933a. Studies on Indian Simuliidae. Part VI. Descriptions of males, females and pupae of two new species from Palni Hill and of male and pupa of *S. tenuitaesus* sp.n. from Bengal Terai *Indian J. Med. Res.* 20: 803-812.
- Puri, I.M. 1933b. Studies on Indian Simuliidae. Part VII. Descriptions of larva, pupa and female of *Simulium* sp. nov., with *S. novolineatum* nov. nom. (= *S. lineatum* Puri). *Indian J. Med. Res.* 20: 813-817.
- Puri, I.M. 1933c. Studies on Indian Simuliidae. Part VIII. Descriptions of larvae, pupae, males and females of *S. aureohirtum* Brunetti and *S. aureum* Fries. *Indian J. Med. Res.* 21: 1-9.

- Sambrook J., Fritsch, E.F. and Manniatis, T. 1989. Molecular cloning :a laboratory manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schlotter, C., Hauser, M-T., Haeseler, A. V. and Tautz, D. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 11: 513-522.
- Simmon C., Frati, F., Beckenbach, A., Crepi, B., Liu, H. and Flook, P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomal. Soc. Am. 87: 651-701.
- Soto SIU, Lehmann, T, Bowton, E.D., Velez, B.I.D. and Poter, C.H. 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz&Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. Mol. Phylogenet. Evol. 18: 84-93.
- Spicer, G.S. and Pitnick, S. 1996. Molecular systematics of the *Drosophila hydei* subgroup as inferred from mitochondrial DNA sequence. J. Mol. Evol. 43: 281-286.
- Summer, S.L.M. 1911. Notes from the Entomological Department of the London School of Tropical Medicine. No. II. Description of a new species of *Simulium* from the Siamese hills. Ann. Mag. Nat. Hist. 8: 586-588.
- Swofford., D.L. 1998. PUAP. Phylogenetic Analysis using Parsimony version 4.0b1. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takaoka, H. 1972. A new species of Simuliidae from Yonakuni Island, Ryukyu Islands, Japan (Diptera: Simuliidae). J. Med. Ent. 9: 521-523.
- Takaoka, H. 1977. Studies on black flies of the Namsei Islands, Japan (Simuliidae: Diptera) III. In six species of the subgenus *Simulium* Latreille. Jpn. J. Sanit. Zool. 28: 193-217.
- Takaoka, H. 1979. The black flies of Taiwan (Diptera: Simuliidae). Proc. Insects. 20: 365-403.
- Takaoka, H. 1996. The geographical distribution of the genus *Simulium* Latreille in the Oriental and Australasian regions. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 24: 113-124.
- Takaoka, H. and Alder, P.H. 1997. A new subgenus, *Simulium* (*Daviesellum*), and a new species, *S. (D.) courtneyi*, (Diptera: Simuliidae) from Thailand and Peninsular Malaysia. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 25: 17-27.
- Takaoka, H. and Davies, D.M. 1995. The black flies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia. Kyushu University Press, Fukuoka.
- Takaoka, H. and Davies, D.M. 1996. The black flies (Diptera: Simuliidae) of Java, Indonesia. Bishop Museum Press, Honolulu USA.
- Takaoka, H and Davies, D.M. 1997. *Simulium* (*Simulium*) *yongi* sp. nov. (Diptera: Simuliidae) from Peninsular Malaysia. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 25: 11-16.

- Takaoka, H. and Hadi, U.K. 1991. Two new blackfly species of *Simulium* (*Simulium*) from Java, Indonesia (Diptera: Simuliidae). Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 19: 357-370.
- Takaoka, H. and Kuvangkadilok, C. 1999. Four new species of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 27: 497-509.
- Takaoka, H. and Roberts, D.M. 1988. Notes on black flies (Diptera: Simuliidae) from Sulawesi, Indonesia. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 16: 191-219.
- Takaoka, H. and Saito, K. 1996. A new species and new records of black flies of (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 24: 163-169.
- Takaoka, H. and Sigit, S.H. 1992. A new black fly species of *Simulium* (*Gomphostilbia*) from Java, Indonesia (Diptera: Simuliidae). Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 20: 135-142.
- Takaoka, H. and Sigit, S.H. 1997. Three new black fly species of *Simulium* (Diptera: Simuliidae) from Sumatra, Indonesia. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 25: 69-80.
- Takaoka, H. and Suzuki, H. 1984. The black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Jpn. J. Sanit. Zool. 35: 7-45.
- Takaoka, H., Aoki, C., Fukuda, M., Choochote, W. and Atchariya, J. 2002. Collections of adult black flies attached to human and to buffalo in Chiang Mai, northern Thailand. Med. Entomol. Zool. 53: 42. (abstract)
- Tang, J., Pruess, K., Cupp, E.W. and Unnasch, T.R. 1996. Molecular phylogeny and typing of black flies (Diptera: Simuliidae) that serve as vector of human or bovine onchocerciasis. Med. Vet. Entomol. 10: 228-234.
- Tang, J., Toe, L., Back, C., Zimmerman, T.A., Pruess, K. and Unnasch, T.R. 1995. The *Simulium damnosum*, species complex: phylogenetic analysis and molecular identification based upon mitochondrially encoded gene sequences. Insect Mol. Biol. 4: 79-88.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24: 4876-4882.
- Vogler, A.P. and DeSalle, R. 1994. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. Mol. Biol. Evol. 11: 393-405.
- Walsh, J.F., Davies, J.B. and Ciff, B. 1981. World Health Organization Onchocerciasis Control Programme in the Volta River basin. In E.M. Laird (ed.), Black flies. The future for biological methods in integrated control. pp 85-103. Academic Press, New York.
- Well, J.D. and Sperling, F.A. 1999. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). J. Mol. Ent. 36: 222-226.

- Wesson, D.M., Porter, C.H. and Collins, F.H. 1992. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 53-59.
- Wesson, D.M., McLain, D.K., Oliver, J.H., Piesman, J. and Collins, F.H. 1993. Investigation of the validity of species studies of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 10221-10225.
- Xiong, B. and Kocher, T.D. 1991. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome* 34: 306-311.
- Xhang, D.X. and Hewitt, G.M. 1977. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insect. *Insect Mol. Biol.* 6: 143-150.

5

การศึกษาพันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

5.1 บทนำ

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังพวกแรกที่วิวัฒนาการเพื่อที่จะอาศัยอยู่บนบก และเป็นตัวเชื่อมระหว่างสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำกับสัตว์ที่อาศัยอยู่บนบก ทำให้วงจรชีวิตของสัตว์กลุ่มนี้ช่วงหนึ่งจะอาศัยอยู่ในน้ำและอีกช่วงหนึ่งจะอาศัยอยู่บนบก คำว่า amphibians จึงมีความหมายว่ามีชีวิตอยู่ได้สองแบบทั้งบนบกและในน้ำ (biphasic life cycle)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นสัตว์เลือดเย็น (poikilothermic animal) เช่นเดียวกับพวกปลาและสัตว์เลื้อยคลาน มีระยะ 2 คู่ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ฐานกะโหลกมี occipital condyle 2 คู่ ผิวหนังเปื่อยชื้น ไม่มีขนหรือเกล็ดปกคลุมภายนอก แต่จะเต็มไปด้วยต่อมเมือกและเส้นเลือด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการแลกเปลี่ยนก๊าซ บางชนิดมีต่อมพิษที่ผิวหนัง มีจมูก 2 รู เปิดเข้าสู่ภายในโพรงปาก มีตา 1 คู่ รูม่านตา (pupil) ปิดเปิดในแนวนอน มีเยื่อแก้วหู (tympanum) อยู่ด้านข้างหลังตา มีหัวใจ 3 ห้อง เม็ดเลือดแดงมีนิวเคลียสรูปไข่ หายใจโดยใช้เหงือก ปอด ผิวหนังและผนังปาก ส่วนใหญ่ปฏิสนธิภายนอก ร่างกาย ตัวอ่อน (tadpoles) อยู่ในน้ำ มีการเปลี่ยนแปลงร่างกายเป็นตัวเต็มวัยโดยกระบวนการ metamorphosis

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นของโลกและมีความหลากหลายของสัตว์กลุ่มนี้สูง แต่ละชนิดมีการปรับตัวเพื่อที่จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ในแหล่งที่อยู่อาศัยหลายแบบ ทำให้มีรูปร่างลักษณะและพฤติกรรมแตกต่างกันไป สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจัดอยู่ใน Kingdom : **Animalia**, Phylum : **Chordata**, Subphylum : **Vertebrata**, Superclass : **Tetrapoda**, Class : **Amphibia** ปัจจุบันมีสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยไม่น้อยกว่า 115 ชนิด (กำธร, 2543) จัดอยู่ใน 3 อันดับ (Order) และ 8 วงศ์ (Family) คือ

Order Caudata (Urodela) มี 1 วงศ์

Family Salamandridae (วงศ์กระต่าย หรือ จิ้งจกน้ำ) มีอยู่ 1 ชนิด

Order Anura (Salientia) มี 6 วงศ์

Family Megophryidae (วงศ์อีกราย) มีอยู่ 12 ชนิด

Family Bufonidae (วงศ์คางคก) มีอยู่ 9 ชนิด

Family Hylidae (วงศ์ปาดเมืองจีน) มีอยู่ 1 ชนิด

Family Ranidae (วงศ์กบเขียว) มีอยู่ 46 ชนิด

Family Rhacophoridae (วงศ์ปาด) มีอยู่ 27 ชนิด

Family Microhylidae (วงศ์อี้ง) มีอยู่ 15 ชนิด

Order Gymnophiona (Apoda) มี 1 วงศ์

Family Ichthyophiidae (วงศ์เขียดงู) มีอยู่ 5 ชนิด

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมีความหลากหลายสูง มีความสำคัญต่อระบบนิเวศและสมดุลของสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ สภาพของกลุ่มประชากรสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสามารถบ่งบอกหรือเตือนล่วงหน้าให้ทราบถึงสภาวะการณ์ของสิ่งแวดล้อมที่กำลังสูญเสียสมดุลได้ เปรียบเสมือนมาตรวัดสุขภาพของโลก (world health indicator) เพราะผิวหนังที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรงปราศจากสิ่งห่อหุ้ม และมีวงจรชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันถึงสองแบบดังที่กล่าวมาแล้ว ปัจจุบันสถานภาพของสัตว์ในกลุ่มนี้เป็นที่น่าวิตกมาก บางชนิดมีจำนวนลดลงจนอาจสูญพันธุ์ได้ ทั้งนี้เพราะถิ่นอาศัยอยู่ในภาวะวิกฤตเนื่องจากการบุกรุกทำลายป่า การใช้สารเคมี ยาปราบศัตรูพืชและแมลงอย่างแพร่หลาย การฆ่าเพราะความกลัวหรือเกลียดชัง การล่าเพื่อการค้าอย่างไร้ขอบเขต ตลอดจนการขาดข้อมูลหรือความรู้พื้นฐานของสัตว์กลุ่มนี้เนื่องจากการละเลยและมองข้ามความสำคัญของกลุ่มนักวิชาการไทยและไม่ได้ทำการศึกษาค้นคว้าองค์ความรู้ใหม่เองตั้งแต่ต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิจัยสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับสัตว์ในกลุ่มนี้ให้เพียงพอและครบถ้วน เพื่อนำมาประกอบและประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์ การจัดการ และการใช้ประโยชน์อย่างเหมาะสม ยั่งยืนและรู้คุณค่าในอนาคต

เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมต่างๆ ทำให้สิ่งมีชีวิตต้องมีการเปลี่ยนแปลงและมีวิวัฒนาการอยู่ตลอดเวลาภายใต้พลังการคัดเลือกโดยธรรมชาติ โดยการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยมีอิทธิพลทั้งจากภายในและภายนอกเป็นตัวกระตุ้น สมบัติและลักษณะเฉพาะของโครโมโซม สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิวัฒนาการและการจัดจำแนกกลุ่มหรือชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ โครโมโซมเป็นโครงสร้างทางพันธุกรรม (hereditary structure) ที่ประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ (DNA) จับอยู่กับโปรตีนและพันซ้อนกันไปมาอย่างซับซ้อนอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ รูปร่างของโครโมโซมจะเปลี่ยนแปลงตามวัฏจักรของเซลล์ในระหว่างการแบ่งเซลล์ โครโมโซมที่อยู่ในรูปแบบสายใยโครมาติน (chromatin) จะหดสั้นเข้าจนเห็นเป็นรูปร่างทรงกระบอกในระยะเมตาเฟส ทำให้มองเห็นรูปร่างชัดเจน ดังนั้นจึงมักศึกษาโครโมโซมในระยะนี้ โครโมโซมแต่ละแท่งจะต้องมีรอยคอดตำแหน่งที่ 1 (primary constriction) ที่เรียกว่าเซนโตรเมียร์ (centromere) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อการคงอยู่ของโครโมโซมภายในเซลล์ ในโครโมโซมบางแท่งอาจจะพบโครงสร้างพิเศษ (specialized structure หรือ chromosome marker) อื่นๆ เช่น รอยคอดตำแหน่งที่ 2 (secondary constriction) หรือ โครงสร้างที่เป็นดิ่งเล็กๆ (satellite) ยื่นออกมาจากโครโมโซมต่อจากรอยคอด secondary constriction หรือบางครั้งอาจจะพบปุ่มที่มีขนาดเล็กมาก (knob) ยื่นออกมาจากส่วนปลายของโครโมโซม ตำแหน่งหรือบริเวณ nucleolar organizer region (NOR) ที่ทำหน้าที่สร้าง ribosomal RNA และ nucleolus มักจะเป็นตำแหน่งเดียวกับรอยคอด secondary constriction อาจจะพบในโครโมโซมมากกว่า 1 คู่ โดยอาศัยตำแหน่งเซนโตรเมียร์ทำให้แบ่งโครโมโซมออกเป็น 2 ส่วน เรียกว่า แขนของโครโมโซม (chromosome arms) ข้างที่สั้นกว่าเรียกว่า แขนสั้น (short arm : p) และข้างที่ยาวกว่าจะเรียก แขนยาว (long arm : q) สามารถจำแนกรูปร่างโครโมโซมออกเป็น 4 แบบ ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเซนโตรเมียร์ ดังนี้

1. โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่ตรงกลาง ทำให้แขนยาวและแขนสั้นมีขนาดเท่ากัน หรือใกล้เคียงกัน เรียกว่า metacentric (m)
2. โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่ค่อนข้างไปทางด้านใดด้านหนึ่ง ทำให้แขนสั้นมีความยาวน้อยกว่าแขนยาว เรียกว่า submetacentric (sm)
3. โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่ค่อนข้างไปทางด้านใดด้านหนึ่งมากจนทำให้แขนสั้นมีความยาวสั้นกว่าแขนยาวมาก เรียกว่า subtelocentric (st) หรือ acrocentric (ac)
4. โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่ปลายสุดของแท่งโครโมโซมทำให้ไม่มีแขนสั้นมีแต่แขนยาว เรียกว่า telocentric (t)

โครโมโซมจะย้อมติดสีออร์ซีน (Orcein) สีคาร์มีน (Carmin) หรือสีจีมาซ่า (Giemsa) ทำให้ศึกษารูปร่าง จำนวน และพฤติกรรมโครโมโซมได้สะดวกยิ่งขึ้น การศึกษารายละเอียดของโครโมโซมแต่ละชนิดโดยศึกษาทั้งจำนวน ขนาด และรูปร่างแล้วทำการจับคู่โฮโมโลกัสโครโมโซม (homologous chromosome) เรียงจากขนาดใหญ่ไปหาเล็ก เรียกว่า คาริโอไทป์ (karyotype) การจัดเรียงโครโมโซมในคาริโอไทป์จะอาศัยค่าความยาว relative length (RL) และการกำหนดรูปร่างของโครโมโซมในคาริโอไทป์จะอาศัยค่า centromeric ratio (CR) ทำให้การจัดเรียงโครโมโซมมีความถูกต้อง การจำแนกและวิเคราะห์โครโมโซมให้มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้นจะต้องอาศัยเทคนิคการย้อมแถบโครโมโซม (chromosome banding techniques) ลักษณะ รูปแบบ และลำดับของแถบที่ติดสีของโครโมโซมแต่ละคู่จะมีความจำเพาะและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม โครโมโซมที่ผ่านการย้อมด้วยเอนไซม์แล้วย้อมด้วยสีจีมาซ่า จะเรียกว่า การย้อมแถบแบบจี (G-banding) หรือเมื่อทำให้โครโมโซมสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยการด่างและด่าง แล้วย้อมสีจีมาซ่าเรียกว่า การย้อมแถบแบบซี (C-banding) โครโมโซมที่ย้อมด้วยสีเรืองแสง เช่น Quinacrine mustard หรือ Hoechst 33258 แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) จะเรียกว่า ย้อมแถบแบบคิว (Q-banding) หรือแบบเอช (H-banding) หรือการย้อมแถบโครโมโซมเพื่อตรวจสอบตำแหน่ง nucleolar organizer region โดยการย้อมด้วยไนเตรทของเงิน (AgNO_3) ซึ่งจะปรากฏแถบดำของ AgNO_3 ที่ตำแหน่ง NOR เรียกว่า การย้อมแถบแบบเอ็นโออาร์ (NOR-banding) จำนวน ขนาด และรูปร่างของโครโมโซมตลอดจนรูปแบบของแถบบนโครโมโซม (banding pattern) ในคาริโอไทป์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะมีลักษณะคงที่ มีจำนวนที่แน่นอน และมีเอกลักษณ์เฉพาะประจำสปีชีส์นั้นๆ ดังนั้นจึงสามารถใช้สมบัติและลักษณะดังกล่าวมาใช้ตรวจยืนยันและจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ และยังสามารถนำไปประกอบกับข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเพื่อเชื่อมโยงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ละเอียดแม่นยำมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันโลกกำลังประสบปัญหาวิกฤตด้านสิ่งแวดล้อมที่มาจากสาเหตุหลัก 4 ประการ คือ ประชากรมนุษย์เพิ่มมากขึ้น การปล่อยของเสียสู่สิ่งแวดล้อมที่เพิ่มขึ้น อุณหภูมิโลกเพิ่มขึ้นเนื่องจากภาวะเรือนกระจกและการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพและการสูญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากกิจกรรมและการรบกวนของมนุษย์ (human disturbance) และที่สำคัญคือ การขาดข้อมูลและความรู้พื้นฐานที่จะนำไปประกอบและประยุกต์ใช้เพื่อการจัดการที่เหมาะสมและวางแนวทางอนุรักษ์ตลอดจนการใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ คุ่มค่าและยั่งยืน ดังนั้นการศึกษา

เซลล์พันธุศาสตร์เชิงประชากร (population cytogenetics) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย ครั้งนี้ จึงเป็นการสำรวจชนิดของสัตว์ในธรรมชาติ ศึกษา ค้นคว้าและนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับจำนวน ขนาดและรูปร่างของโครโมโซม chromosome marker และคาริโอไทป์ของสัตว์กลุ่มนี้ อันจะนำไปสู่การพัฒนาความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ละเอียดมากยิ่งขึ้น ข้อมูลพื้นฐานที่ได้มีความสำคัญและจำเป็นต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์ การปรับปรุงพันธุ์ และใช้เป็นข้อมูลประกอบในการจัดจำแนกชนิดตลอดจนช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสัตว์ในกลุ่มนี้

5.2 วัตถุประสงค์

การวิจัยครั้งนี้มุ่งหวังที่จะศึกษาค้นคว้าข้อมูลพื้นฐานทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์เชิงประชากร (population cytogenetics) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย โดยเน้นศึกษาจำนวน ขนาด และรูปร่างของโครโมโซมในคาริโอไทป์ (standard karyotype) ของสัตว์ในกลุ่มนี้ ตลอดจนศึกษาเครื่องหมายพิเศษที่พบบนโครโมโซม (chromosome marker) โดยการใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซมแบบต่างๆ เช่น การย้อมแถบแบบซี (C-banding) แบบจี (G-banding) และแบบเอ็นโออาร์ (NOR-banding) เป็นต้น

5.3 วิธีการศึกษา

5.3.1 ตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่จับได้ในการศึกษานี้มีทั้งหมด 42 ชนิด โดยจับได้จากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติในแต่ละฤดูกาล ในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตกและภาคใต้ จากการออกสำรวจและเก็บตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 37 ครั้ง (ดูภาคผนวก) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทุกชนิดมีการจดบันทึกข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ สถานที่เก็บ วันเดือนปีที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ และมีการบันทึกภาพก่อนที่จะนำสัตว์มาเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ไขกระดูก ตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้งหมดจะถูกดองด้วยแอลกอฮอล์ 95% และเก็บไว้ที่หน่วยปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

5.3.2 การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกคณะผู้วิจัยได้ใช้เอกสารตำราของ Taylor (1962), Chan-Ard (1999) และ Frost (2000) ประกอบการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์เป็นหลัก ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจสอบด้วยตนเองได้หรือกรณีที่มีข้อสงสัย จะนำสัตว์ตัวอย่างไปให้ผู้เชี่ยวชาญ คือ อาจารย์จารุจินต์ นภิตะภักดิ์ อาจารย์รัชฎา จันอาจ และคุณยอดชาย ช่วยเงิน ซึ่งเป็นนักวิชาการด้านการจำแนก ช่วยตรวจสอบชื่อให้ที่พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยา องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ

5.3.3 การเตรียมโครโมโซมจากเซลล์ไขกระดูก

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทุกชนิดจะถูกนำมาเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ไขกระดูก โดยวิธี in vivo colcemid treatment โดยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. ฉีด colcemid (0.2 mg/ml) ประมาณ 0.1 ml/100 กรัม น้ำหนักตัว เข้าที่บริเวณช่องท้อง (intraperitoneal cavity) ของสัตว์ตัวอย่างเพื่อหยุดกระบวนการแบ่งเซลล์ที่ระยะเมตาเฟส ปล่อยให้ทิ้งไว้ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

2. ทำให้สัตว์ตัวอย่างสลบด้วยอีเทอร์ จากนั้นตัดเอากระดูกขาหน้าและขาหลัง แล้วพยายามตัดเอากล้ามเนื้อออกจากกระดูกให้หมด จากนั้นตัดปลายกระดูกทั้งสองด้านออกด้วยกรรไกรตัดเอาไขกระดูกมาจากโพรงกระดูกด้วยสารละลายเกลือเจือจาง (0.075 M KCl) ที่บรรจุในกระบอกฉีดยาที่มีเข็มติดอยู่ บดไขกระดูกในสารละลายเกลือเจือจาง โดยตอนแรกบดไขกระดูกในสารละลายเกลือเจือจางในปริมาณเล็กน้อย (ประมาณ 1 ml) เมื่อไขกระดูกละเอียดดีแล้วจึงเติมสารละลายเกลือเจือจางลงไปให้ได้ปริมาณ 10 ml ผสมตะกอนเซลล์ให้เข้ากับสารละลายเกลือเจือจาง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที เพื่อให้เซลล์บวม

3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนที่ใส (supernatant) ทิ้งไว้ให้เหลือปริมาตร 1-2 ml จากนั้นผสมตะกอนเซลล์ให้เข้ากับสารละลายที่เหลืออยู่ (resuspension) ด้วย Pasteur pipette หรือ vortex mixer จากนั้นตรึงเซลล์ (fix) ด้วยน้ำยา fixative (metanol : acetic acid = 3:1) ที่เตรียมใหม่และเย็นที่ละลายพร้อมกันกับเขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixer เติมน้ำยา fixative จนได้ปริมาตร 5 ml ขั้นตอนนี้จะต้องทำการ resuspension ตะกอนให้ดี มิฉะนั้นเมื่อหยดน้ำยา fixative เซลล์จะเกาะกลุ่มกัน ซึ่งอาจจะทำให้การเตรียมโครโมโซมประสบความสำเร็จได้

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนที่ใสทิ้ง เติมน้ำยา fixative ใหม่ ทำซ้ำ 3 ซ้ำอย่างน้อย 2-3 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาด จนกระทั่งได้ตะกอนเซลล์สีขาวที่ก้นหลอดในการปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้ายให้ดูดน้ำยา fixative เก่าออกจนหมด แล้วเติมน้ำยา fixative ใหม่ลงไปประมาณ 1-2 ml ขึ้นกับปริมาณตะกอนเซลล์ที่ได้ แล้วนำไปเตรียมโครโมโซมบนสไลด์ ถ้าหากจะเก็บตะกอนไว้ให้ปิดฝาหลอดให้แน่นหรือปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) หนาหลายชั้นแล้วเก็บในตู้เย็นช่องแช่แข็ง

5.3.4 การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์

ก่อนเตรียมโครโมโซมบนสไลด์ให้ resuspension ตะกอนให้เข้ากับน้ำยา fixative อย่างดี จากนั้นหยดสารละลายตะกอนที่เตรียมได้ลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็น โดยหยดให้สูงจากสไลด์ประมาณ 2-3 ฟุต เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัวดี วางสไลด์ลงบนภาชนะความร้อน (hot plate) หรือผ่านเปลวไฟเพื่อให้โครโมโซมมีความคงตัว (ageing) สัตว์ตัวอย่าง 1 ตัว อาจจะต้องเตรียมสไลด์ 3-4 แผ่น เพื่อนำไปย้อมสีและย้อมแถบโครโมโซมแบบต่าง ๆ

5.3.5 การย้อมสีและย้อมแถบโครโมโซม

สไลด์ที่เตรียมได้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะนำไปย้อมสี Giemsa (conventional staining) โดยย้อมโครโมโซมด้วยสีจิมซ่า 15% (15 % Giemsa) ในสารละลาย phosphate buffer pH 6.8 นาน 15 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด ปล่อยให้แห้ง (air dry) อีกกลุ่มหนึ่งจะนำไปย้อมแถบโครโมโซมแบบต่าง ๆ เช่น แบบซี (C-banding : constitutive heterochromatin banding) แบบเอ็นโออาร์ (NOR-banding : nucleolar organizer region banding) แบบจี (G-banding : Giemsa banding)

โดยการย้อมแถบแบบซี คณะผู้วิจัยดัดแปลงตามวิธีของ Sumner (1972) แบบเอ็นโออาร์ดัดแปลงตามวิธีของ Goodpasture and Bloom (1975) แบบจี ดัดแปลงตามวิธีของ Seabright (1971)

5.3.6 การวิเคราะห์โครโมโซมและการจัดทำคาริโอไทป์

การวิเคราะห์โครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำโดยตรวจนับและคัดเลือกเมตาเฟส (metaphase) ที่มีสภาพดี ขนาดของโครโมโซมไม่สั้นหรือยาวเกินไป มีการกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน ประมาณอย่างน้อย 25 เมตาเฟสต่อสัตว์ตัวอย่าง 1 ตัว เลือกเมตาเฟสที่มีคุณภาพดีอย่างน้อย 10 เมตาเฟส เพื่อถ่ายรูป อัดขยายรูป จากนั้นวัดขนาดและความยาวของโครโมโซมเพื่อคำนวณหาค่า relative length (RL) และค่า centromeric ratio (CR) แล้วนำค่าทั้งสองมาใช้จำแนกรูปร่างของโครโมโซม (ตารางที่ 5.1) แล้วจัดทำคาริโอไทป์

ตารางที่ 5.1 หลักการจำแนกรูปร่างโครโมโซมโดยอาศัย CR และ/หรือ CI เพื่อกำหนดตำแหน่งของเซนโตรเมียร์บนโครโมโซม (Green and Sessions, 1991)

Chromosome Type	Abbreviation	Centromeric Ratio (CR) ¹	Centromeric Index (CI) ²
metacentric	m	1.00-1.67	0.500-0.375
submetacentric	sm	1.68-3.00	0.374-0.250
subtelocentric (acrocentric)	st (ac)	3.01-7.00	0.249-0.125
telocentric	t	7.01-∞	0.124-0.000

หมายเหตุ : centromeric ratio (CR) หรือ arm ratio

¹ อัตราส่วนของความยาวของแขนยาว (q) ต่อความยาวของแขนสั้น (p) ของโครโมโซมแต่ละแท่ง

² อัตราส่วนของความยาวของแขนสั้นต่อความยาวทั้งหมดของโครโมโซม

5.3 ผลการศึกษา

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ รวม 37 ครั้ง คณะผู้วิจัยสามารถจับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้ทั้งสิ้นจำนวน 42 ชนิด จำแนกเป็น 2 อันดับ 6 วงศ์ 22 สกุล (ภาพที่ 5.1 และตารางที่ 5.2) คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (diploid chromosome number) จำนวน 36 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 86 แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการเตรียมโครโมโซมอีก 6 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ 14) ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการเดินทางไปเก็บตัวอย่างสัตว์ในสถานที่ไกลๆ แล้วนำสัตว์กลับมายังห้องปฏิบัติการที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ต้องใช้เวลานานหลายวัน ทำให้สัตว์ตายก่อนถึงห้องปฏิบัติการ หรือสัตว์มีอาการเครียด อดอาหาร และอ่อนแอ เมื่อเตรียมโครโมโซมทำให้ไม่พบเมตาเฟส (metaphase) อีกสาเหตุหนึ่ง คือ สัตว์ตัวอย่างที่จับได้มีจำนวนน้อยหรือมีขนาดเล็ก ทำให้ประสบความสำเร็จยากลำบากในการเตรียมโครโมโซม ในจำนวนสัตว์ที่สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้ทั้ง 36 ชนิด นั้น คณะผู้วิจัยสามารถวิเคราะห์รูปร่างโครโมโซมและจัดทำคาริโอไทป์ได้ทั้งสิ้น จำนวน 33 ชนิด (ตารางที่ 5.3) อีก 3 ชนิด คือ *Bufo biporcatus* (2n=22), กบน้ำเค็ม (*Fejervarya cancrivora*, 2n=26) และกบหลังตาพับ (*Limnonectes laticeps*, 2n=26)

ยังไม่สามารถจัดทำคาริโอไทป์และวิเคราะห์รูปร่างโครโมโซมได้ เพราะจำนวนเมตาเฟสที่เตรียมได้มีน้อย และคุณภาพของโครโมโซมที่ได้ยังไม่ดีพอ

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่สำรวจพบน้อยที่สุด คือ พวกเขียดงู (caecilian) ซึ่งพบเพียง 1 ชนิด คือ เขียดงูเกาะเต่า (*I. kohtaoensis*) จากที่มีอยู่ทั้งหมด 5 ชนิดในประเทศ ส่วนสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่สำรวจพบมากที่สุด คือ พวกกบเขียด (ranid frogs) พบทั้งหมด 18 ชนิด ในจำนวนนี้มีเขียดอีโมหิน (*F. limnocharis*) และปาดตีนเหลืองอีสาน (*R. orlovi*) เป็นชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และเป็นครั้งแรกที่รายงานพบ กบเกาะช้าง (*L. kohchangae*) ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในเขตอุทยานแห่งชาติภูจองนายอย อำเภอนาจะหลวย จังหวัดอุบลราชธานี และสำรวจพบพวกคางคก (bufonid frogs) 6 ชนิด จากที่มีอยู่ทั้งหมด 9 ชนิดในประเทศ คางคกตันไม้ (*P. hosii*) เป็นชนิดที่หายากมาก อาศัยบนต้นไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฮาลา-บาลา จังหวัดยะลา สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีรูปร่างหน้าตาแปลก และเป็นพวกที่หายาก คือ พวกอึ่งกราย (megophryid frogs) คณะผู้วิจัยสำรวจพบ 6 ชนิด จากที่มีอยู่ในประเทศไทยทั้งหมด 12 ชนิด สัตว์พวกนี้จะไม่แข็งแรง เคลื่อนไหวเชื่องช้า ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไปได้ สามารถพรางตัวหลบซ่อนอยู่ตามพื้นป่าได้ดี อึ่งกรายหัวแหลม (*M. nasuta*) เป็นชนิดที่จัดว่ามีหน้าตาแปลกประหลาด และเป็นเอกลักษณ์มากที่สุด ในบรรดาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศ คณะผู้วิจัยสำรวจพบพวกอึ่ง (microhylid frogs) 9 ชนิด จากที่มีอยู่ในประเทศทั้งหมด 15 ชนิด และพบพวกปาด (tree frogs) เพียง 2 ชนิด จากทั้งหมด 27 ชนิด ที่มีอยู่ในประเทศ เพราะถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์พวกนี้อยู่บนต้นไม้จึงสำรวจได้ลำบาก ส่วนพวกปาดเมืองจีน (hylid frog) ที่มีอยู่ 1 ชนิด ในประเทศสำรวจไม่พบเลย ปาดเมืองจีนเป็นสัตว์หายากมีรายงานพบทางภาคเหนือเท่านั้น จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จำนวน 36 ชนิด แบ่งได้ 4 แบบ คือ แบบ $2n=22$ พบในพวกคางคกทั้งหมด, กบหัวชาปุม (*L. kuhlii*) และในอึ่งลายแต้ม (*M. butleri*) แบบ $2n=24$ พบในอึ่งกรายลายเลอะ (*L. smithi*) อึ่งชาดำ (*M. pulchra*) อึ่งแม่หนาว (*M. berdmorei*) และกบภูเขา (*L. blythii*) แบบ $2n=26$ พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกพวกที่เหลือเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะพวกกบเขียด และแบบ $2n=28$ พบในพวกอึ่งบางชนิด คือ อึ่งอ่างก้นขีด (*K. mediolineata*) และอึ่งอ่างบ้าน (*K. pulchra*)

รูปร่างโครโมโซมที่พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้ง 33 ชนิด พบทั้ง 4 ชนิด แบบเมตาเซนตริก และสับเมตาเซนตริกเป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุด และแบบสับทีโลเซนตริกพบน้อยที่สุดโดยพบในกบพวกกบเขียดบางชนิดและปาดตีนเหลืองอีสาน แต่ในพวกอึ่งไม่พบรูปร่างโครโมโซมแบบนี้เลย ส่วนแบบทีโลเซนตริกพบเฉพาะในพวกอึ่งกรายเท่านั้น โครงสร้างพิเศษบนโครโมโซม หรือ chromosome maker ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นรอยคอด secondary constriction พบ chromosome marker ที่มีลักษณะเป็นดิ่งขนาดเล็ก (satellite) ยื่นออกมาจากแขนโครโมโซมในคางคกบ้าน (*B. melanostictus*) และ เขียดหลังปุม (*O. martensii*) เท่านั้น รอยคอด secondary constriction เป็นบริเวณที่ย้อมไม่ติดสี Giemsa ทำให้มองเห็นคล้ายช่องว่าง (gap) ความกว้างของช่องว่างนี้มีความผันแปรตามระดับการหดตัวของโครโมโซม (chromosome condensation) และอาจจะไม่พบหรือไม่สามารถสังเกตเห็นในบางเซลล์หากโครโมโซมมีการหดตัวมากเกินไป และในโครโมโซมที่เป็นคู่กัน (homologous chromosome)

จะพบรอยคอดนี้เหมือนกัน ซึ่งความกว้างของรอยคอดอาจจะเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้ ตำแหน่งรอยคอด secondary constriction ส่วนใหญ่จะเป็นตำแหน่งเดียวกับตำแหน่ง nucleolar organizer region ซึ่งสามารถตรวจสอบตำแหน่งนี้ได้โดยการย้อมแถบโครโมโซมแบบเอ็นโออาร์ โครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้ง 33 ชนิด พบว่ามีเพียง 7 ชนิดเท่านั้นที่ไม่พบรอยคอด secondary constriction อีก 26 ชนิด จะพบตำแหน่งนี้ โดยส่วนใหญ่จะพบในโครโมโซมเพียงคู่เดียว แต่ก็มีหลายชนิดที่พบตำแหน่งนี้ในโครโมโซมมากกว่า 1 คู่ เช่น ปาดบ้านพบ 3 ตำแหน่ง กบเกาะช้างและอึ่งลายพบ 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งที่พบ chromosome marker ในสัตว์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันเป็นส่วนใหญ่ จึงสามารถใช้ตำแหน่งนี้เป็นจุดสังเกต (landmark) หรือเครื่องหมายที่ใช้ประกอบในการกำหนด และระบุชนิดของสัตว์แต่ละชนิดได้



อึ่งกรายลายจุด : *Leptobrachium hendricksoni*
อ.สุศิริน จ.นราธิวาส



อึ่งกรายลายเลอะ : *Leptobrachium smithi*
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี



อึ่งกรายหนังปุ่ม : *Leptolalax heteropus*
อ.สุศิริน จ.นราธิวาส



อึ่งกรายหัวเล็ก : *Xenophrys parva*
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี



อึ่งกรายหัวแหลม : *Megophrys nasuta*
อ.บันนังสตา จ.ยะลา



อึ่งกรายข้างแถบ : *Brachytarsophrys carinensis*
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี



คางคกบ้าน : *Bufo melanostictus*
อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี



คางคกแคระ : *Bufo parvus*
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี



จิ้งโคร่ง : *Bufo asper*
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี

ภาพที่ 5.1 สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ทำการศึกษาทั้งหมด 41 ชนิด

*ไม่มีภาพของกบน้ำเต้า (F. cancrivora)



Bufo biporcatus

อ.บันนังสตา จ.ยะลา



คางคกขายาว : *Leptophryne borbonica*

อ.บันนังสตา จ.ยะลา



คางคกคันไม้ : *Pedostibes hosii*

อ.บันนังสตา จ.ยะลา



เขียดจระนา : *Occidozyga lima*

อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



เขียดหลังปุ่ม : *Occidozyga martensii*

อ.ชานุมาน จ.อำนาจเจริญ



กบหลังไพล : *Rana lateralis*

อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



กบบัว : *Rana erythraea*

อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี



กบหลังขีด : *Rana macrodactyla*

อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



กบชะง่อนหินเมืองเหนือ : *Rana livida*

อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี



กบอ่อง : *Rana nigrovittata*

อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



กบหลังจุด : *Rana signata*

อ.บันนังสตา จ.ยะลา



กบนา : *Hoplobatrachus rugulosus*

อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี

ภาพที่ 5.1 (ต่อ)



กบหนอง : *Limnonectes limnocharis*
อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี



กบหงอน : *Limnonectes pileatus*
อ.ขามเฒ่า จ.อำนาจเจริญ



กบภูเขา : *Limnonectes blythii*
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี



กบหัวขำปุม : *Limnonectes kuhlii*
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี



กบเกาะช้าง : *Limnonectes kohchangae*
อ.นาจะหลวย จ.อุบลราชธานี



กบหลังตาพับ : *Limnonectes laticeps*
อ.สุคิริน จ.นราธิวาส



เขียดอีโม้หิน : *Fejervarya limnonectes*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



กบอกหนาม : *Paa fasciculispina*
อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี



ปาดตีนเหลืองอีสาน : *Rhacophorus orlovi*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



ปาดขนาน : *Rhacophorus leucomystax*
อ.แว้ง จ.นราธิวาส



อึ่งลาย : *Calluella guttulata*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



อึ่งปากขวด : *Glyphoglossus molossus*
อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี



อึ่งอ่างก้นขีด : *Kaloula medilineata*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



อึ่งอ่างบ้าน : *Kaloula pulchra*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



อึ่งป้อม : *Kalophrynus pleurostigma*
อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี



อึ่งขาคำ : *Microhyla pulchra*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



อึ่งแม่หนาว : *Microhyla berdmorei*
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี



อึ่งลายแต้ม : *Microhyla butleri*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



อึ่งลายจุด : *Micryletta inornata*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ



เขียดงูเกาะเต่า : *Ichthyophis kohtaoensis*
อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ

ภาพที่ 5.1 (ต่อ)

ตารางที่ 5.2 ชื่อ จำนวนที่เก็บ และสถานที่เก็บของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่สำรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 42 ชนิด

Order/Family	Species	จำนวนที่เก็บ (ตัว)	สถานที่เก็บตัวอย่าง
Anura			
Megophryidae	1. อึ่งกรายลายจุด (<i>Leptobrachium hendricksoni</i>)*	2	ยะลา
	2. อึ่งกรายลายเลอะ (<i>Leptobrachium smithi</i>)	13	กาญจนบุรี
	3. อึ่งกรายหนังปุ่ม (<i>Leptolalax heteropus</i>)*	1	นราธิวาส
	4. อึ่งกรายหัวเล็ก (<i>Xenophrys parva</i>)	8	กาญจนบุรี
	5. อึ่งกรายหัวแหลม (<i>Megophrys nasuta</i>)	1	ยะลา
	6. อึ่งกรายข้างแถบ (<i>Brachytarsophrys carinensis</i>)	4	กาญจนบุรี
Bufonidae	1. คางคกบ้าน (<i>Bufo melanostictus</i>)	11	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี, ขอนแก่น
	2. คางคกแคระ (<i>Bufo parvus</i>)	4	กาญจนบุรี
	3. จิ้งโคร่ง (<i>Bufo asper</i>)	3	กาญจนบุรี
	4. <i>Bufo biporcatus</i>	7	ยะลา
	5. คางคกขายาว (<i>Leptophryne borbonica</i>)	2	ยะลา
	6. คางคกต้นไม้ (<i>Pedostibes hosii</i>)*	2	ยะลา
Ranidae	1. เขียดจระนา (<i>Occidozyga lima</i>)	5	อำนาจเจริญ
	2. เขียดหลังปุ่ม (<i>Occidozyga martensii</i>)	31	อำนาจเจริญ
	3. กบหลังไพล (<i>Rana lateralis</i>)	30	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี
	4. กบบัว (<i>Rana erythraea</i>)	36	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี, หนองคาย, จันทบุรี
	5. กบหลังขีด (<i>Rana macrodactyla</i>)	25	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี
	6. กบชะง่อนหินเมืองเหนือ (<i>Rana livida</i>)	10	กาญจนบุรี
	7. กบอ่อง (<i>Rana nigrovittata</i>)	43	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี, จันทบุรี, กาญจนบุรี
	8. กบหลังจุด (<i>Rana signata</i>) *	2	ยะลา
	9. กบนา (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>)	19	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี, สระแก้ว, หนองคาย

ตารางที่ 5.2 (ต่อ)

Order/Family	Species	จำนวนที่เก็บ (ตัว)	สถานที่เก็บตัวอย่าง
	10. กบหนอง (<i>Limnonectes limnocharis</i>)	27	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี, แพร่, กาญจนบุรี, ขอนแก่น
	11. กบหงอน (<i>Limnonectes pileatus</i>)	37	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี, จันทบุรี, แพร่
	12. กบภูเขา (<i>Limnonectes blythii</i>)	12	กาญจนบุรี
	13. กบห้วยขาปุม (<i>Limnonectes kuhlii</i>)	12	กาญจนบุรี
	14. กบเกาะช้าง (<i>Limnonectes kohchangae</i>)	24	อุบลราชธานี
	15. กบหลังดาพับ (<i>Limnonectes laticeps</i>)	2	นราธิวาส
	16. เขียดอีโม่หิน (<i>Fejervarya limnocharis</i>)	10	อำนาจเจริญ
	17. กบน้ำเค็ม (<i>Fejervarya cancrivora</i>)	4	ชุมพร
	18. กบอกหนาม (<i>Paa fasciculispina</i>)	5	จันทบุรี
Rhacophoridae	1. ปาดตีนเหลืองอีสาน (<i>Rhacophorus orlovi</i>)	21	อำนาจเจริญ
	2. ปาดบ้าน (<i>Rhacophorus leucomystax</i>)	19	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี, จันทบุรี, หนองคาย, นราธิวาส
Microhylidae	1. อึ่งลาย (<i>Callueta guttulata</i>)	9	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี
	2. อึ่งปากขวด (<i>Glyphoglossus molossus</i>)	3	อำนาจเจริญ
	3. อึ่งอ่างกันขี้ด (<i>Kaloula mediolineata</i>)	8	อำนาจเจริญ
	4. อึ่งอ่างบ้าน (<i>Kaloula pulchra</i>)	3	อำนาจเจริญ
	5. อึ่งปุม (<i>Kalophrynus pleurostigma</i>)	3	อำนาจเจริญ
	6. อึ่งขาคำ (<i>Microhyla pulchra</i>)	5	อำนาจเจริญ
	7. อึ่งแม่หนาว (<i>Microhyla berdmorei</i>)	20	อำนาจเจริญ, อุบลราชธานี
	8. อึ่งลายแต้ม (<i>Microhyla butleri</i>)	20	อำนาจเจริญ
	9. อึ่งลายจุด (<i>Micryletta inornata</i>)*	3	อำนาจเจริญ
Gymnophiona Ichthyophiidae	1. เขียดงูเกาะเต่า (<i>Ichthyophis kohtaoensis</i>)*	2	อำนาจเจริญ

* เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ไม่ประสบผลสำเร็จในการเตรียมโครโมโซม

ตารางที่ 5.3 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ chromosome marker และคาริโอไทป์ ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จำนวน 33 ชนิด (p=short arm; q=long arm; sat=satellite; ter= terminal; cen=centromere)

Common name and scientific name	2n	Karyotype and chromosome shapes
1. อึ่งกรายลายเลอะ (<i>Leptobrachium smithi</i>)	24	Metacentric : 1, 7, 8, 9,10, 11, 12 Submetacentric : 2, 3, 4, 5, 6 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 5q
2. อึ่งกรายหัวเล็ก (<i>Megophrys parva</i>)	26	Metacentric : 1, 5, 7, 11, 13 Submetacentric : 2, 3, 4, 6, 8 Subtelocentric : - Telocentric : 9, 10, 12 Marker chromosome : 2p
3. อึ่งกรายหัวแหลม (<i>Megophryn nasuta</i>)	26	Metacentric : 1, 5, 8, 12 Submetacentric : 2, 3, 4, 6, 7, 9 Subtelocentric : - Telocentric : 10, 11, 13 Marker chromosome :
4. อึ่งกรายข้างแถบ (<i>Brachytarsophrys carinensis</i>)	26	Metacentric : 1, 7, 8 Submetacentric : 2, 3, 4, 5, 6 Subtelocentric : - Telocentric : 9, 10,11, 12, 13 Marker chromosome : 1q
5. คางคกบ้าน (<i>Bufo melanostictus</i>)	22	Metacentric : 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11 Submetacentric : 4, 8 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : sat.11p
6. คางคกแคระ (<i>Bufo parvus</i>)	22	Metacentric : 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 Submetacentric : 3, 4, 10 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome :

ตารางที่ 5.3 (ต่อ)

Common name and scientific name	2n	Karyotype and chromosome shapes
7. จงโคร่ง (<i>Bufo asper</i>)	22	Metacentric : 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11 Submetacentric : 2, 4, 8 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : -
8. คางคกขายาว (<i>Leptophryne borbonica</i>)	22	Metacentric : 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 Submetacentric : 4 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : -
9. เขียดจะนา (<i>Occidozyga lima</i>)	26	Metacentric : 1,5, 6, 7, 10, 11 Submetacentric : 2, 3, 4, 8, 9, 12, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : -
10. เขียดหลังป้อม (<i>Occidozyga martensii</i>)	26	Metacentric : 1, 5, 6, 10, 11, 12, 13 Submetacentric : 2, 3, 4, 7, 8, 9 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 3qter
11. กบหลังไพล (<i>Rana lateralis</i>)	26	Metacentric : 1, 4, 5, 6, 7, 8 Submetacentric : 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 10q
12. กบบัว (<i>Rana erythraea</i>)	26	Metacentric : 1, 4, 5, 6, 7, 9, 12 Submetacentric : 2, 3, 8, 10, 11, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 10q
13. กบหลังขีด (<i>Rana macrodactyla</i>)	26	Metacentric : 1,4 ,5 ,6, 7, 8, 9, 12 Submetacentric : 2, 3, 10, 11, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 8p

ตารางที่ 5.3 (ต่อ)

Common name and scientific name	2n	Karyotype and chromosome shapes
14. กบชะง่อนหินเมืองเหนือ (<i>Rana livida</i>)	26	Metacentric : 1, 5, 7, 11, 12 Submetacentric : 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13 Subtelocentric : 9 Telocentric : - Marker chromosome : 10q
15. กบอ่อง (<i>Rana nigrovittata</i>)	26	Metacentric : 1, 4, 5, 6, 7 Submetacentric : 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 11q
16. กบนา (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>)	26	Metacentric : 1, 5, 8, 10, 12, 13 Submetacentric : 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 6q
17. กบหนอง (<i>Limnonectes limnocharis</i>)	26	Metacentric : 1, 9, 10, 12, 13 Submetacentric : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 8p
18. กบทอง (<i>Limnonectes pileatus</i>)	26	Metacentric : 1, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13 Submetacentric : 2, 3, 4, 8, 9 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 9q
19. กบภูเขา (<i>Limnonectes blythii</i>)	24	Metacentric : 1, 5, 8 Submetacentric : 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12 Subtelocentric : 9 Telocentric : - Marker chromosome : 9q
20. กบหัวขำป๋ม (<i>Limnonectes kuhlii</i>)	22	Metacentric : 1, 8, 9, 11 Submetacentric : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 10q

ตารางที่ 5.3 (ต่อ)

Common name and scientific name	2n	Karyotype and chromosome shapes
21. กบเกาะช้าง (<i>Limnonectes kohchangae</i>)	26	Metacentric : 1, 5, 6, 7, 10, 12 Submetacentric : 2, 3, 4, 9, 11, 13 Subtelocentric : 8 Telocentric : - Marker chromosome : 9q, 12cen
22. เขียดอีโมหิน (<i>Fejervarya limnocharis</i>)	26	Metacentric : 1, 2, 5, 6, 10, 11, 12, 13 Submetacentric : 3, 4, 7, 8, 9 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : -
23. กบอกหนาม (<i>Paa fasciculispina</i>)	26	Metacentric : 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 Submetacentric : 2, 3, 4, 9, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 6p
24. ปาดตีนเหลืองอีสาน (<i>Rhacophorus orlovi</i>)	26	Metacentric : 5, 6, 9, 10, 12 Submetacentric : 1, 2, 3, 4, 7, 11, 13 Subtelocentric : 8 Telocentric : - Marker chromosome : 1p
25. ปาดบ้าน (<i>Rhacophorus leucomystax</i>)	26	Metacentric : 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 Submetacentric : 3, 6, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 6q, 8p, 12p
26. อึ่งลาย (<i>Calluella guttulata</i>)	26	Metacentric : 1, 2, 5, 7, 8, 9, 11, 13 Submetacentric : 3, 4, 6, 10, 12 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 6q, 7p
27. อึ่งปากขวด (<i>Glyphoglossus molossus</i>)	26	Metacentric : 1, 2, 5, 7, 8, 10, 13 Submetacentric : 3, 4, 6, 9, 11, 12 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 6q

ตารางที่ 5.3 (ต่อ)

Common name and scientific name	2n	Karyotype and chromosome shapes
28. อี้อ่างกันขี้ด (<i>Kaloula mediolineata</i>)	28	Metacentric : 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 14 Submetacentric : 3, 6, 8, 10, 12, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 6q
29. อี้อ่างบ้าน (<i>Kaloula pulchra</i>)	28	Metacentric : 1, 2, 4, 6, 9, 10, 11, 14 Submetacentric : 3, 5, 7, 8, 12, 13 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 5q
30. อี้อูม (<i>Kalophrynus pleurostigma</i>)	26	Metacentric : 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13 Submetacentric : 3, 7, 8, 11 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 7p
31. อี้อาชา (<i>Microhyla pulchra</i>)	24	Metacentric : 1, 5, 6, 9, 11, 12 Submetacentric : 2, 3, 4, 7, 8, 10 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 9q
32. อี้อแม่หนาว (<i>Microhyla berdmorei</i>)	24	Metacentric : 1, 5, 6, 9, 12 Submetacentric : 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : 8cen
33. อี้อลายแต้ม (<i>Microhyla butleri</i>)	22	Metacentric : 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11 Submetacentric : 2, 3, 9, 10 Subtelocentric : - Telocentric : - Marker chromosome : -

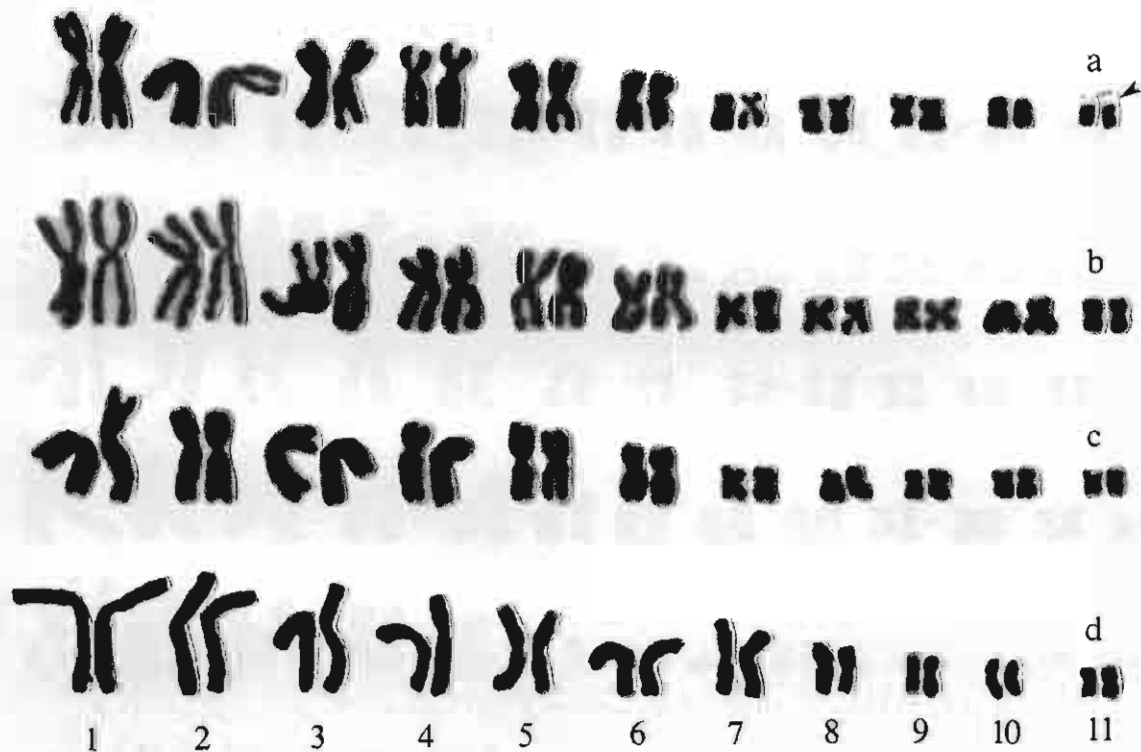
คาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้ง 33 ชนิด จะเป็นแบบ asymmetric karyotype กล่าวคือ รูปร่างของโครโมโซมภายในคาริโอไทป์จะมีหลายแบบ ขนาดของโครโมโซมจะเรียงลดหลั่นกันไปจากขนาดใหญ่จนถึงขนาดเล็กตามค่า relative length จากมากไปหาน้อย คาริโอไทป์ของพวกอึ่งกราย (ภาพที่ 5.2) อึ่งกรายลายเลอะ ($2n=24$) และอึ่งกรายหัวเล็ก ($2n=26$) จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 6 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 6) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 6 คู่ ในอึ่งกรายลายเลอะ และ 7 คู่ในอึ่งกรายหัวเล็ก ส่วนอึ่งกรายข้างแถบ ($2n=26$) และอึ่งกรายหัวแหลม ($2n=26$) จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 5) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ และพบ chromosome marker ที่เป็นรอยคอด secondary constriction ในกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ในอึ่งกราย 3 ชนิด ไม่พบ chromosome marker ในอึ่งกรายหัวแหลมพบโครโมโซมรูปร่างทีโลเซนตริกในอึ่งกรายหัวเล็ก อึ่งกรายหัวแหลม และอึ่งกรายข้างแถบ 3 คู่ 3 คู่ และ 5 คู่ ตามลำดับ ตำแหน่งของรอยคอด secondary constriction จะอยู่ใกล้ๆ ตำแหน่งเซนโตรเมียร์ในอึ่งกรายทั้ง 3 ชนิด



ภาพที่ 5.2 คาริโอไทป์ของอึ่งกราย 4 ชนิด a) อึ่งกรายลายเลอะ (*L. smithi*) เพศเมีย b) อึ่งกรายหัวเล็ก (*X. parva*) เพศเมีย c) อึ่งกรายข้างแถบ (*B. carinensis*) เพศผู้ d) อึ่งกรายหัวแหลม (*M. nasuta*) เพศผู้ ลูกศรชี้ตำแหน่งรอยคอด secondary constriction (กำลังขยาย 5000 เท่า)

คาริโอไทป์ของคางคกทั้ง 4 ชนิด ($2n=22$) (ภาพที่ 5.3) มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 6 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 6) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 5 คู่ ยกเว้นในคางคกขา ยาว คาริโอไทป์จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 7 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 7) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 4 คู่ รูปร่างโครโมโซมในคาริโอไทป์มี 2 แบบ คือ เมตาเซนตริกและสับเมตาเซนตริกเท่านั้น พบ

chromosome marker เฉพาะในคางคกบ้าน มีลักษณะเป็น satellite บนปลายแขนสั้นของโครโมโซม คู่ที่ 11 ซึ่งเป็นเอกลักษณ์และลักษณะพิเศษของคางคกชนิดนี้

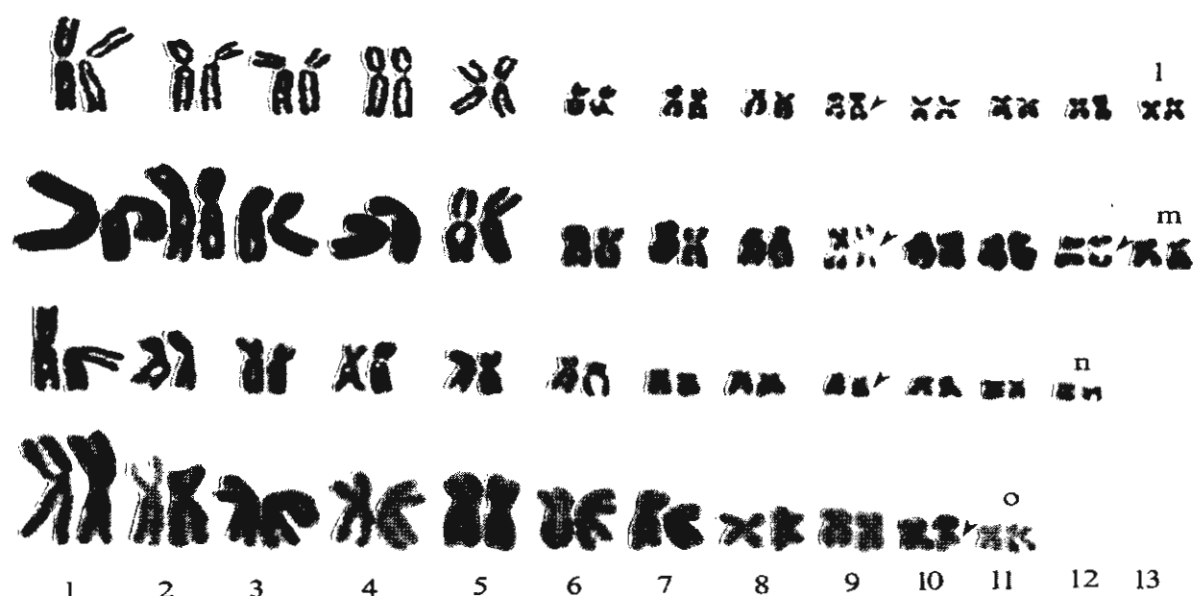


ภาพที่ 5.3 คาริโอไทป์ของคางคก 4 ชนิด a) คางคกบ้าน (*B. melanostictus*) เพศผู้ b) คางคกแคระ (*B. parvus*) เพศผู้ c) จงโคร่ง (*B. asper*) เพศเมีย d) คางคกขายาว (*L. borbonica*) เพศเมีย ลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง satellite ในคางคกบ้าน (กำลังขยาย 5000 เท่า)

คาริโอไทป์ของพวกกบเขียดทั้ง 15 ชนิด ($2n=26$) (ภาพที่ 5.4) ก็มีลักษณะคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 5) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ แต่ในกบภูเขา ($2n=24$) คาริโอไทป์ประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 7 คู่ และกบหัวขำป๋ม ($2n=22$) คาริโอไทป์จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 7 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 7) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 4 คู่ ไม่พบ chromosome marker ในเขียดจะนา และเขียดอีโม้หินเท่านั้น ที่เหลืออีก 13 ชนิดจะพบ chromosome marker ที่เป็นลักษณะรอยคอด secondary constriction ยกเว้นในเขียดหลังป๋มจะเห็น chromosome marker ที่เป็นลักษณะปุ่มเล็กๆ (knob-like structure) บนปลายแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 3 ในกบเกาะช้างจะเห็น chromosome marker บนโครโมโซม 2 คู่ คือ คู่ที่ 9 และ 12 ตำแหน่งของ chromosome marker และรูปร่างของโครโมโซมภายในคาริโอไทป์จะสามารถใช้ระบุชนิด และบอกความแตกต่างของกบเขียดแต่ละชนิดได้ กบหนองหรือเขียดอีโม้นากับเขียดอีโม้หินจะมีลักษณะภายนอก (morphological characters) รวมทั้งเสียงร้องคล้ายคลึงกันมาก แต่จะมีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

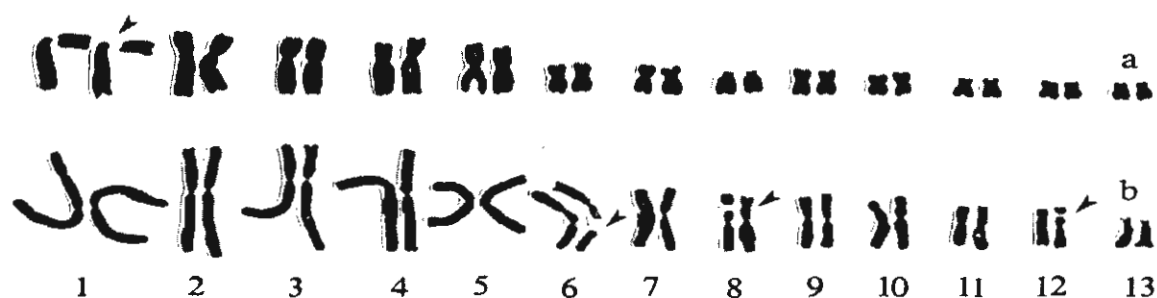


ภาพที่ 5.4 คาริโอไทป์ของกบ 15 ชนิด a) เชียดจะนา (*O. lima*) เพศเมีย b) เชียดหลังปุม (*O. martensii*) เพศเมีย c) กบหลังไพล (*R. lateral*) เพศเมีย d) กบบัว (*R. erythraea*) เพศผู้ e) กบหลังขีต (*R. macrodactyla*) เพศเมีย f) กบชะง่อนหินเมืองเหนือ (*R. livida*) เพศเมีย g) กบอ่อง (*R. nigrovittata*) เพศผู้ h) กบนา (*H. rugulosus*) เพศผู้ i) กบอกหนาม (*P. fasciculispina*) เพศผู้ j) เชียดอีโมหิน (*F. limnocharis*) เพศเมีย k) กบหนอง (*L. limnocharis*) เพศเมีย l) กบหงอน (*L. pileatus*) เพศเมีย m) กบเกาะช้าง (*L. kohchangae*) เพศผู้ n) กบภูเขา (*L. blythii*) เพศเมีย o) กบห้วยขาปุม (*L. kuhlii*) (กำลังขยาย 5000 เท่า)



ภาพที่ 5.4 (ต่อ)

คาริโอไทป์ของพวกปลา (2n=26) (ภาพที่ 5.5) ในปลาบ้านจะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 6 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 6) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 7 คู่ แต่คาริโอไทป์ของปลาตีนเหลืองอีสานจะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 5) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ พบ chromosome marker ที่เป็นลักษณะรอยคอด secondary constriction ในปลาบ้านถึง 3 คู่ โดยเฉพาะที่แขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 จะเห็นตำแหน่งนี้เป็นช่องว่างที่กว้างมาก ในขณะที่ปลาตีนเหลืองอีสานจะเห็นรอยคอดนี้ชัดเจนที่แขนสั้นเหนือตำแหน่งเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 1 นอกจากนี้ยังพบโครโมโซมรูปร่างสับทีโลเซนตริกในโครโมโซมคู่ที่ 8 ของปลาตีนเหลืองอีสานด้วย



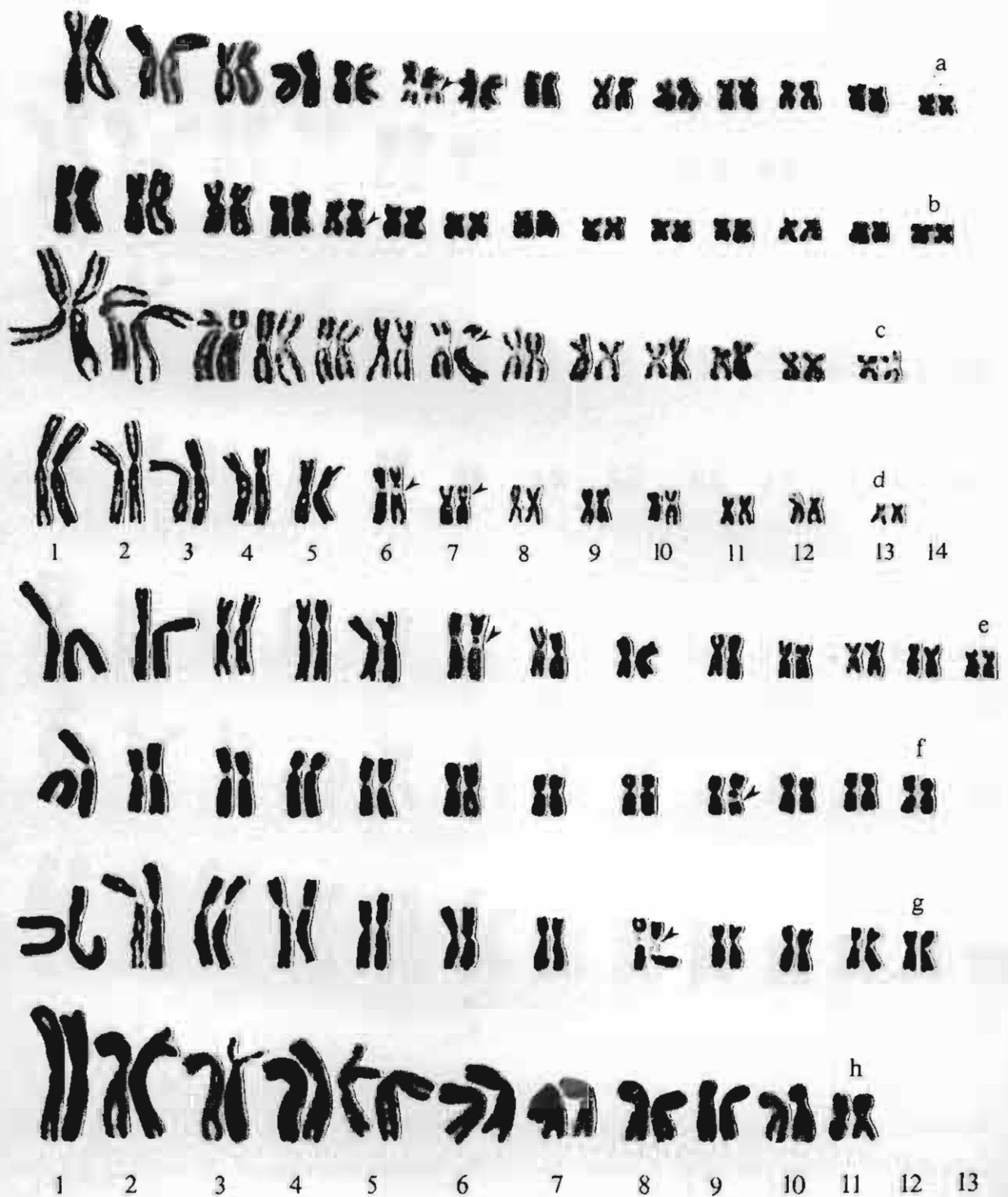
ภาพที่ 5.5 คาริโอไทป์ของปลา 2 ชนิด a) ปลาตีนเหลืองอีสาน (*R. orlovi*) เพศเมีย b) ปลาบ้าน (*R. leucomystax*) เพศเมีย ลูกศรชี้ตำแหน่งรอยคอด secondary constriction (กำลังขยาย 5000 เท่า)

คาริโอไทป์ของอีก 8 ชนิด (ภาพที่ 5.6) จำนวนโครโมโซมของพวกนี้จะผันแปรมากตั้งแต่ 2n=22 ถึง 28 ในอ่างกันขิดและอ่างบ้าน (2n=28) คาริโอไทป์จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ (คู่ที่ 1 ถึง 5) และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 9 คู่ ในอ่างปุม อ่างลาย และอ่างปากขวด (2n=26) คาริโอไทป์จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 6 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 7 คู่ ในอ่างชาคำ

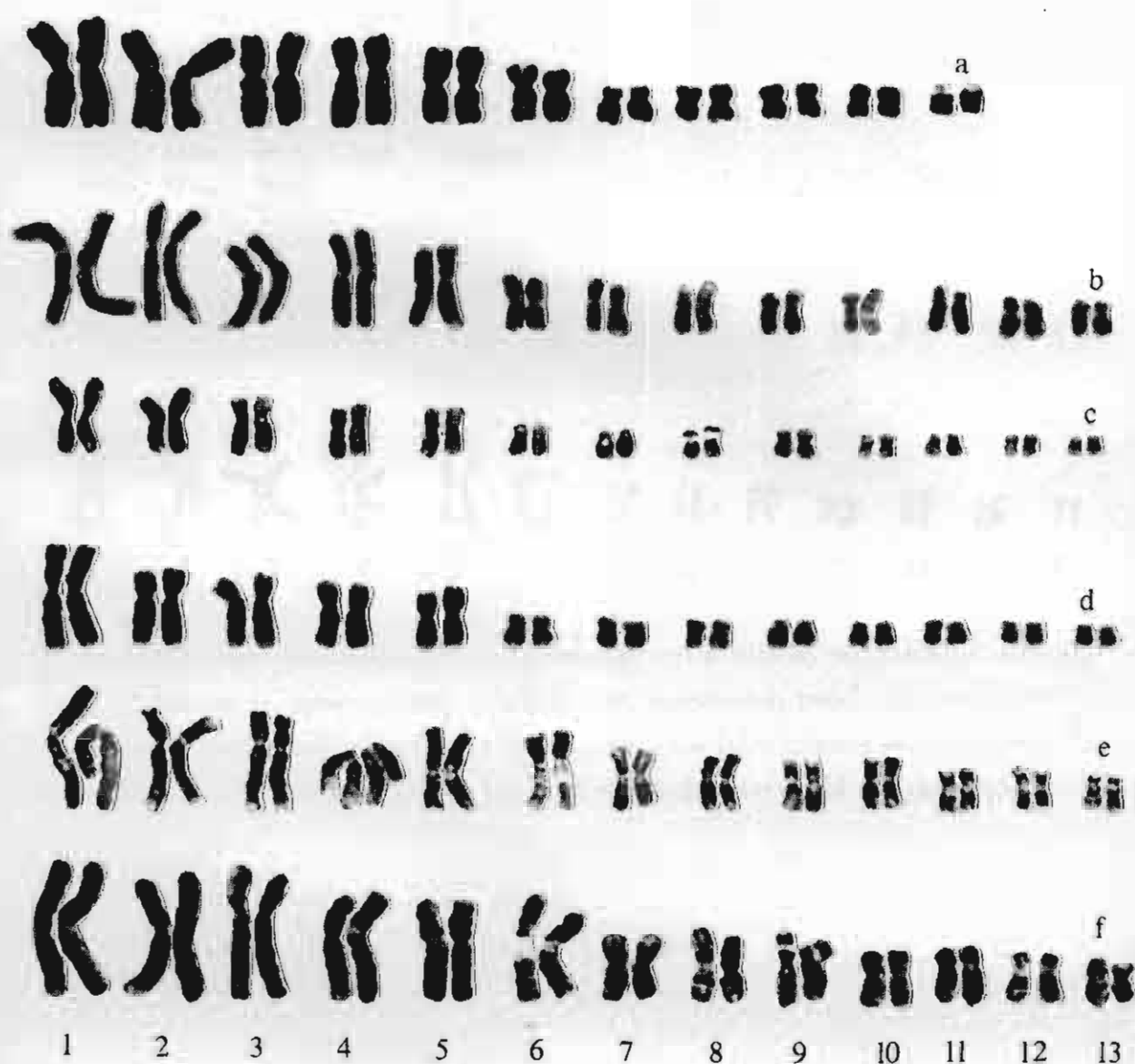
และอึ่งแม่นาว ($2n=24$) คาริโอไทป์จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 6 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 6 คู่ ส่วนอึ่งลายแต้ม ($2n=22$) คาริโอไทป์จะประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 7 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 4 คู่ พบ chromosome marker ที่เป็นลักษณะรอยคอด secondary constriction ในอึ่งทั้ง 7 ชนิด ยกเว้นในอึ่งลายแต้ม อึ่งลายจะเห็น chromosome marker 2 ตำแหน่ง คือ บนโครโมโซมคู่ที่ 6 และ 7 ในอึ่งปุมและอึ่งแม่นาว ตำแหน่ง chromosome marker จะอยู่รอบๆ หรือใกล้ตำแหน่งเซนโตเมียร์แต่ในอึ่งปากขวดตำแหน่ง chromosome marker บนโครโมโซมคู่ที่ 6 จะคล้ายคลึงกับของอึ่งลายมาก แต่พบเฉพาะที่โครโมโซมคู่ที่ 6 นี้เท่านั้น

การย้อมแถบแบบจี (G-banding) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (ภาพที่ 5.7) ยังได้คุณภาพแถบ (band) ไม่ชัดเจน ทั้งนี้เพราะโครโมโซมของสัตว์พวกนี้มีการหดตัวมากเกินไป (high condensation) ทำให้การย่อยเพื่อชักนำให้เกิดแถบบนโครโมโซมด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) เกิดได้ไม่ดี ความแตกต่าง หรือการแยกแถบมืด (dark band) และแถบสว่าง (light band) เห็นไม่ชัดเจน ในปาดบ้านและอึ่งปากขวด (ภาพที่ 5.7e และ f) โครโมโซมยังหดตัวไม่มาก การชักนำให้เกิดแถบจะเกิดได้ง่ายกว่าเมื่อโครโมโซมหดตัวมาก และเมื่อย้อมแถบโครโมโซมแบบซี (C-banding) (ภาพที่ 5.8 และ 5.9) ตำแหน่งที่ติด C-positive บนโครโมโซมมี 3 บริเวณ คือ ตำแหน่งเซนโตเมียร์ (centromeric) ตำแหน่งปลายสุดของแขนโครโมโซม (telomeric) และตำแหน่งภายในแขนของโครโมโซม (interstitial) รูปแบบของ C-positive บนโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และยังพบ C-band heterochromatin บนโครโมโซมต่างคู่กัน ในกบหลังไพลพบที่แขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 2 (ภาพที่ 5.8a) กบหนองพบที่แขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 5 (ภาพที่ 5.8b) ปาดบ้านและอึ่งปากขวดพบที่แขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และยังพบที่แขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 ของอึ่งปากขวดด้วย ในกบชะง่อนหินเมืองเหนือ (*R. livida*) พบ C-band heterochromatin ในโครโมโซมคู่ที่ 10 (ภาพที่ 5.9) การย้อมแถบแบบเอ็นโออาร์ (NOR-banding) (ภาพที่ 5.10) ยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก ในกบหลังไพล ปาดบ้านและอึ่งกรายข้างแถบเห็น Ag spot หรือ NOR-positive บนโครโมโซมตรงตำแหน่งเดียวกันกับที่ปรากฏรอยคอด secondary constriction จึงเป็นการยืนยันว่า บริเวณ NOR กับรอยคอด secondary constriction มักจะเป็นตำแหน่งเดียวกัน

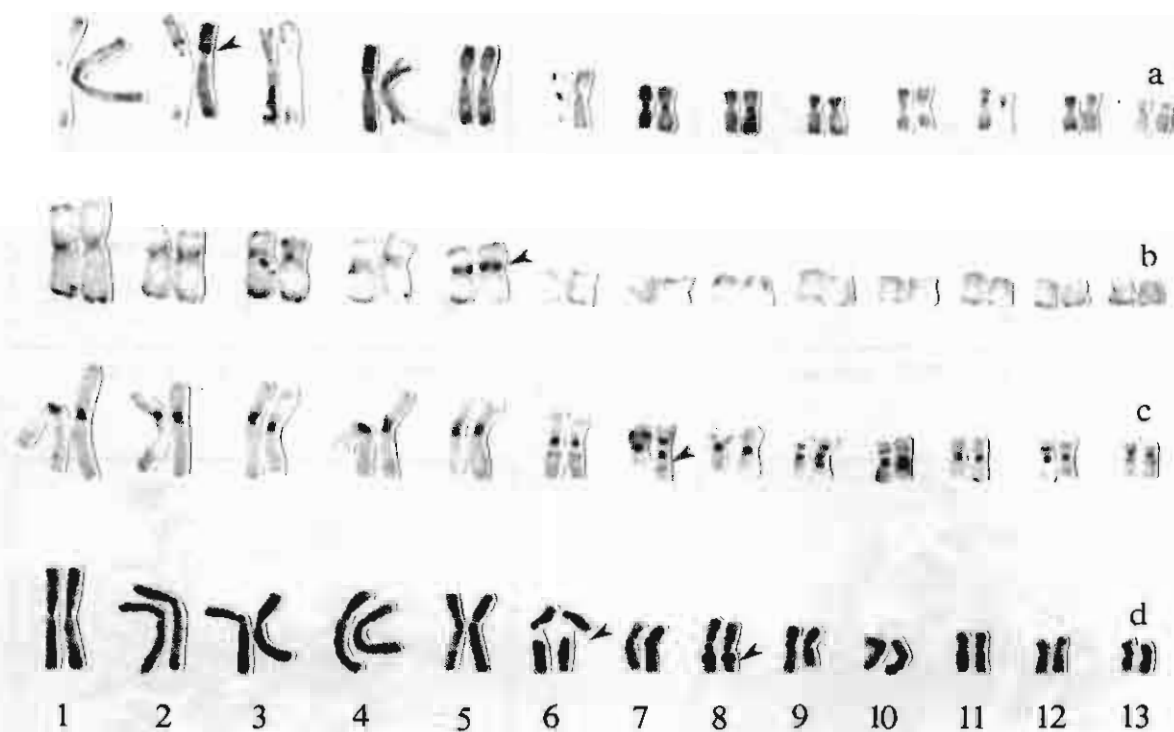
เมื่อเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดเดียวกันแต่จับมาจากต่างแหล่งกัน เพื่อศึกษาความผันแปรของรูปร่างและจำนวนของโครโมโซม (intraspecific variation) พบว่าจำนวนโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนที่มีความผันแปรทางด้านรูปร่างและตำแหน่ง chromosome marker พบในกบหลังขีด (ภาพที่ 5.11) และที่มีความผันแปรเฉพาะตำแหน่ง chromosome marker พบในอึ่งแม่นาว (ภาพที่ 5.17) แต่ในกบหนอง (ภาพที่ 5.12) กบบัว (ภาพที่ 5.13) กบหนอง (ภาพที่ 5.14) กบอ่อง (ภาพที่ 5.15) และปาดบ้าน (ภาพที่ 5.16) ไม่พบความผันแปรในรูปร่างของโครโมโซม และ chromosome marker เลย แสดงว่าคาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมีความอนุรักษ์ในสายวิวัฒนาการค่อนข้างสูง (high conservative karyotype) คณะผู้วิจัยไม่พบโครโมโซมเพศ (sex chromosome) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ทำการศึกษา



ภาพที่ 5.6 คาร์ิโอไทป์ของอึ่ง 8 ชนิด a) อึ่งอ่างกันซิด (*K. melanostictus*) เพศผู้ b) อึ่งอ่างบ้าน (*K. pulchra*) เพศเมีย c) อึ่งปุม (*K. pleurostigma*) เพศเมีย d) อึ่งลาย (*C. guttulata*) เพศเมีย e) อึ่งอ่างปากขวด (*G. molossus*) เพศเมีย f) อึ่งขาคำ (*M. pulchra*) เพศเมีย g) อึ่งแม่หนาว (*M. berdmorei*) เพศผู้ h) อึ่งลายแต้ม (*M. butleri*) เพศผู้ ลูกศรชี้ตำแหน่งรอยคอด secondary constriction (กำลังขยาย 5000 เท่า)



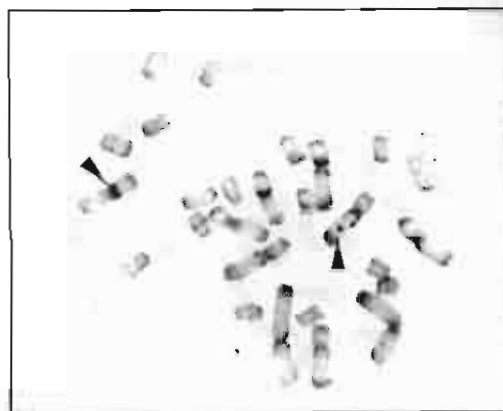
ภาพที่ 5.7 G-banded karyotypes ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 6 ชนิด a) คางคกบ้าน (*B. melanostictus*) เพศผู้ b) กบหลังโพล (*R. lateralis*) เพศผู้ c) กบหนอง (*L. limnocharis*) เพศเมีย d) กบหงอน (*L. pileatus*) เพศผู้ e) ปาดบ้าน (*R. leucomystax*) เพศเมีย และ f) อึ่งปากขวด (*G. molossus*) เพศเมีย โครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีการหดตัวมาก ทำให้การชักนำให้เกิดแถบบนโครโมโซมด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) เกิดได้ไม่ดี (กำลังขยาย 5000 เท่า)



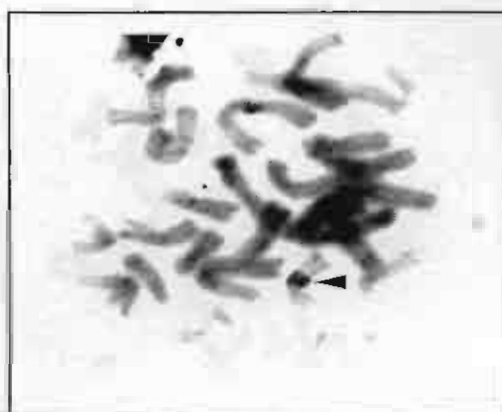
ภาพที่ 5.8 C-banded karyotypes ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 4 ชนิด a) กบหลังไพล (*R. lateralis*) เพศผู้ b) กบทองน (*L. pileatus*) เพศผู้ c) ปาดบ้าน (*R. leucomystax*) เพศเมีย และ e) อึ่งปากขวด (*G. molossus*) เพศเมีย แต่ละชนิดจะมีบริเวณติด C-band positive ในโครโมโซมแตกต่างกัน (ลูกศรชี้) ซึ่งสามารถใช้ตำแหน่งดังกล่าวบอกความแตกต่างและเอกลักษณ์ของสัตว์แต่ละชนิดได้ (กำลังขยาย 5000 เท่า)



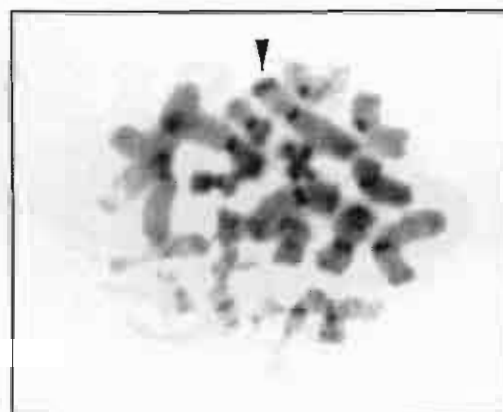
C-banding กบหลังไฟล (R. lateralis)



C-banding กบทอง (L. pileatus)



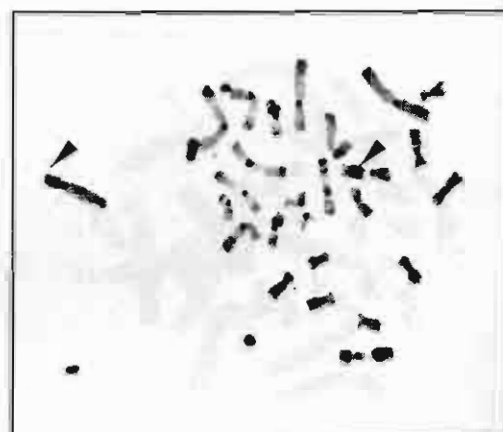
C-banding กบชะง่อนหินเมืองเหนือ (R. livida)



C-banding กบหัวขำปุม (L. kuhlii)

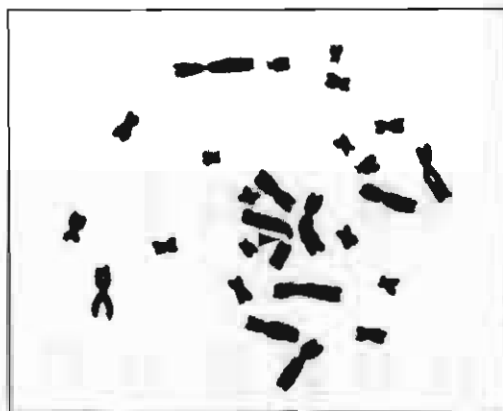
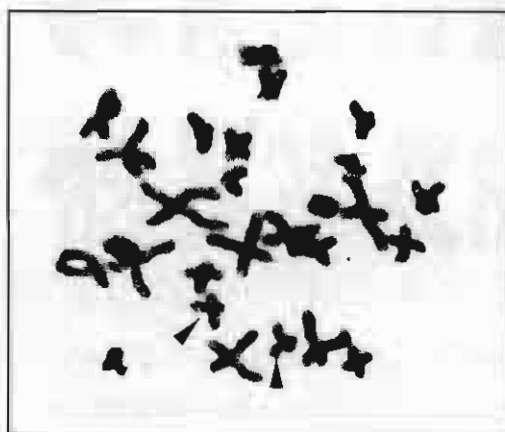
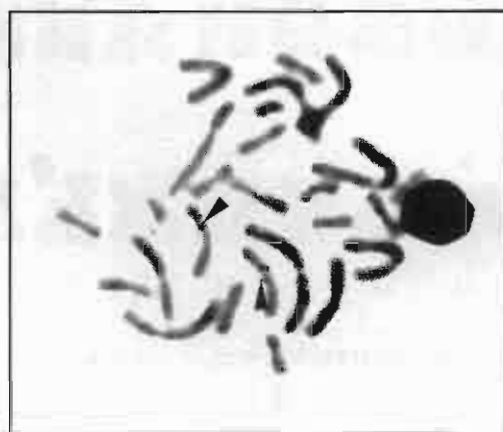
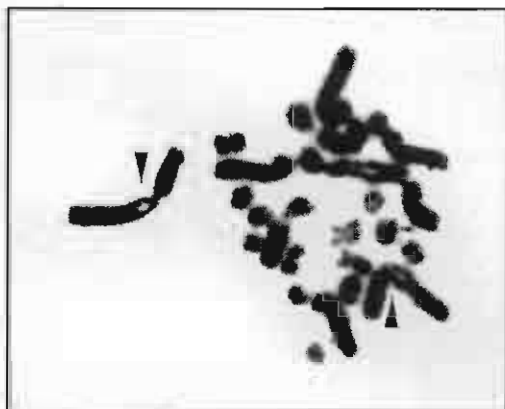
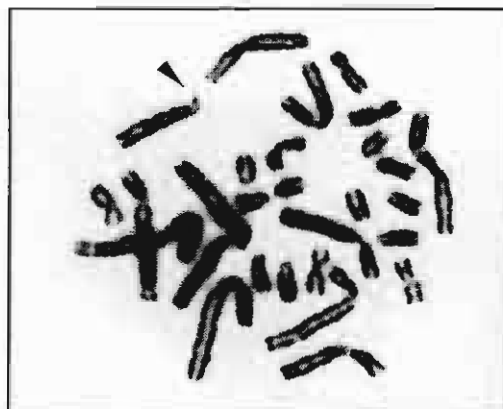


C-banding ปาดบ้าน (R. leucomystax)



C-banding อึ่งปากขวด (G. molossus)

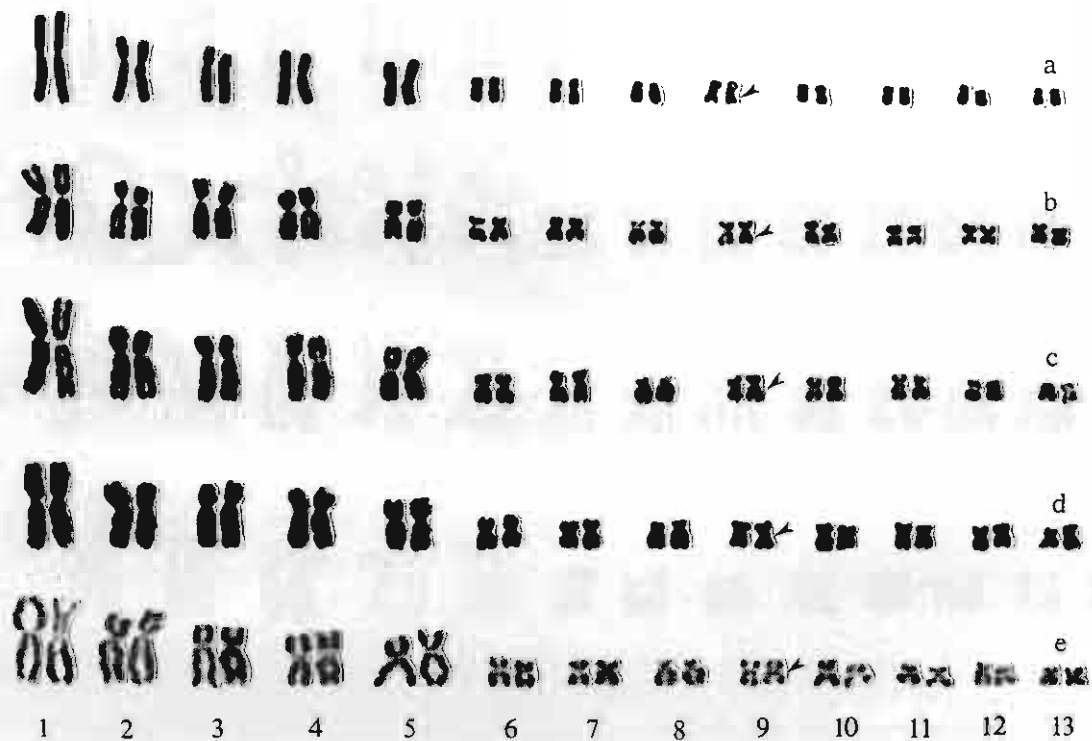
ภาพที่ 5.9 Somatic metaphases ที่ย้อมแถบสีแบบซี (C-banding) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 6 ชนิด บริเวณที่ติด C-band heterochromatin ชัดเจนคือ ตำแหน่งเซนโตรเมียร์ (centromere) และส่วนปลายสุดของ แขนโครโมโซม (telomere) (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 5000 เท่า)

C-banding ปาดตีนเหลืองอีसान (*R. orlovi*)Conventional staining ปาดตีนเหลืองอีसान (*R. orlovi*)NOR-banding กบหลังไฟล (*R. lateralis*)NOR-banding ปาดบ้าน (*R. leucomystax*)NOR อึ่งกรายข้างแถบ (*B. carinensis*)Conventional staining อึ่งกรายข้างแถบ
(*B. carinensis*)

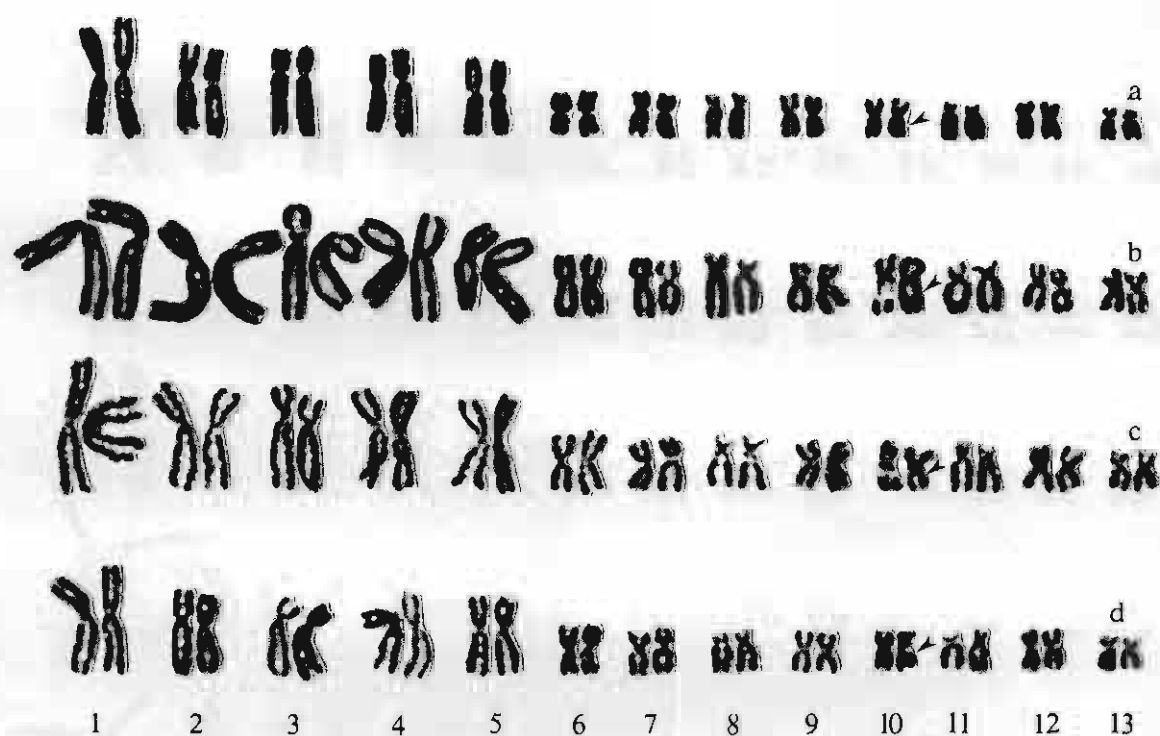
ภาพที่ 5.10 Somatic metaphases ที่ย้อมแถบแบบเอ็นโออาร์ (NOR-banding) ด้วย silver nitrate และย้อมสีจิมซ่า ธรรมชาติของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 4 ชนิด บริเวณที่ติด NOR-positive จะเป็นบริเวณรอยคอด secondary constriction (ลูกศรชี้) ที่ทำหน้าที่สร้าง ribosome RNA และ nucleous (กำลังขยาย 5000 เท่า)



ภาพที่ 5.11 เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบหลังขีด (*R. macrodactyla*) ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างกันจะมีความผันแปรในรูปร่างโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่กิ่ง อ.นาเยีย จ.อุบลราชธานี b) เก็บที่บ้านน้ำปลีก อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c,d) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ ซึ่งพบว่า chromosome marker คู่ที่ 8 จะไม่พบในกบหลังขีดที่เก็บจากบ้านน้ำปลีก อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ (กำลังขยาย 5000 เท่า)



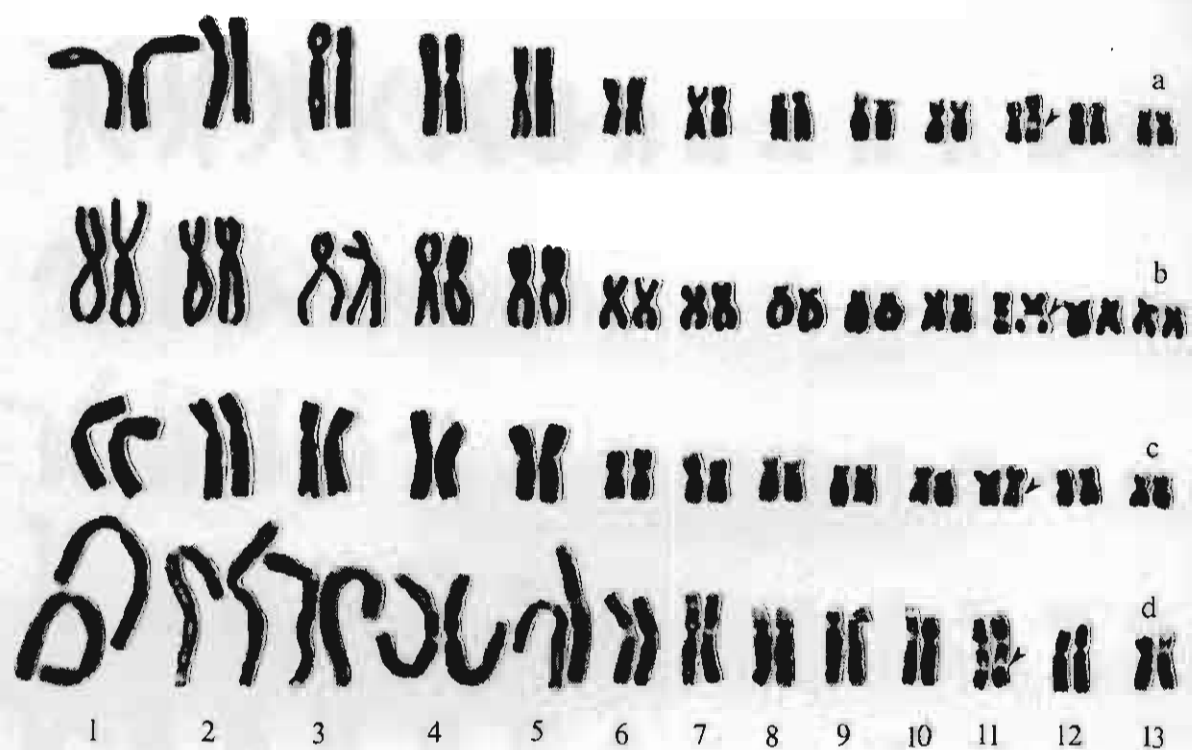
ภาพที่ 5.12 เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบหงอน (*L. pileatus*) ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างกัน ซึ่ง
 ไม่มีความผันแปรในรูปร่างโครโมโซม และ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านห้วยโรงใน
 อ.ร้องกวาง จ.แพร่ b) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c) เก็บที่บ้านโสกกระแต
 อ.ชานุมาน จ.อำนาจเจริญ



ภาพที่ 5.13 คาร์ิโอไทป์ของกบบัว (*R. erythraea*) เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างกัน ซึ่งไม่มีความผันแปรในรูปร่างของโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านโนนม่วง อ.เมือง จ.ขอนแก่น b) เก็บที่บ้านป่าโมง อ.เดชอุดม จ.อุบลราชธานี c) เก็บที่ บ้านดอนยู กิ่ง อ.นาเยี่ย จ.อุบลราชธานี และ d) เก็บที่บ้านคลองตะเคียน อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี (กำลังขยาย 5000 เท่า)



ภาพที่ 5.14 เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบหนอง (*L. limnocharis*) ที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานที่ต่างกัน ไม่พบความผันแปรในรูปร่างโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านโนนม่วง อ.เมือง จ.ขอนแก่น b) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c) เก็บที่บ้านคันท่าเกวียน อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี d) เก็บที่บ้านดอนยู กิ่ง อ.นาเยีย จ.อุบลราชธานี e) เก็บที่บ้านภูเตย อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี (กำลังขยาย 5000 เท่า)



ภาพที่ 5.15 เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบอ่อง (*R. nigrovittata*) ที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานที่ต่างกันไม่พบความแตกต่างในรูปร่างโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านคลองตะเคียน อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี b) เก็บที่บ้านเหล่าพรหม อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c) เก็บที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย อ.นาจะหลวย จ.อุบลราชธานี d) เก็บที่บ้านปากลา อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี (กำลังขยาย 5000 เท่า)



ภาพที่ 5.16 เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของปาดบ้าน (*R. leucomystax*) ที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานที่ต่างกัน ไม่พบความแตกต่างในรูปร่างโครโมโซมและ chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านน้ำปลีก อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ b) เก็บที่บ้านเหล่าพรวน อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ c) เก็บที่บ้านธาตุ อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี d) เก็บที่บ้านบึงแก อ.มหาชนะชัย จ.ยโสธร e) เก็บที่บ้านคลองตะเคียน อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี (กำลังขยาย 5000 เท่า)



ภาพที่ 5.17 เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของอี้งแม่นาว (*M. berdmorei*) ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างกัน ไม่มีความแตกต่างในรูปร่างโครโมโซม แต่มีความแตกต่างใน chromosome marker (ลูกศรชี้) a) เก็บที่บ้านโสกกกระแต่ อ.ชานุมาน จ.อำนาจเจริญ พบ chromosome marker ที่โครโมโซมคู่ที่ 8 b) เก็บที่อุทยานแห่งชาติภูจองนายอย อ.นาจะหลวย จ.อุบลราชธานี ไม่พบ chromosome marker c-e) เก็บที่บ้านภูเตย อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี จะเห็นความผันแปรลักษณะ chromosome marker ในโครโมโซมคู่ที่ 9 (กำลังขยาย 5000 เท่า)

5.5 บทสรุป

ผลการจากการสำรวจอย่างจริงจัง และกว้างขวางมากขึ้นของนักวิชาการชาวไทย และชาวต่างประเทศทำให้มีการค้นพบจำนวนชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศมากขึ้น จากเดิมมีรายงานพบ 100 ชนิด (Taylor, 1962) 107 ชนิด (จารุจินต์ และวิเชียร, 2536), 105 ชนิด (Chan-Ard et al., 1999) และล่าสุดมีรายงานว่าพบถึง 130 ชนิด (Khonsue and Thirakhupt, 2001) จำนวนชนิดที่เพิ่มขึ้นมีทั้งเป็นชนิดใหม่ (new species) เช่น *Rana archotaphus* (Inger and Chan-Ard, 1997), *Ansonia inthanon* (Matsui et al., 1998), *Rhacophorus cyanopunctatus* (Manthey and Steiof, 1998) และ *Leptobrachium smithi* (Matsui et al., 1999) และได้รวมเอาขอบต่างประเทศที่นำเข้ามาเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า คือ กบบูลฟร็อก (*Rana catesbeiana*) เข้าไว้ด้วย ในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้สำรวจพบเขียด 1 ชนิด และปาด 1 ชนิดที่อาจจะเป็นการรายงานครั้งแรกในประเทศ (new record) คือ เขียดอีโม้หิน (*F. limnocharis*) และปาดตีนเหลืองอีสาน (*R. orlovi*) ที่มีเขตการแพร่กระจายอยู่ตามแนวเทือกเขาภูพาน คณะผู้วิจัยสำรวจพบสัตว์ทั้ง 2 ชนิดที่เขตนอุทยานภูสิงห์-ภูผาผึ้ง อำเภอเมืองจังหวัดอำนาจเจริญ และยังค้นพบกบเกาะช้าง (*L. kohchangae*) ในเขตอุทยานแห่งชาติภูจองนายอย อำเภอนาจะหลวย จังหวัดอุบลราชธานี จากเดิมที่เคยรายงานพบเฉพาะที่เกาะช้าง จังหวัดตราด เท่านั้น สัตว์ทั้ง 3 ชนิด ถูกตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ โดยนักวิชาการกองวิจัยธรรมชาติวิทยา พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยา องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ และตัวอย่างสัตว์ส่วนหนึ่งเก็บไว้ที่นั่นด้วย มีสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกไม่น้อยกว่า 34 ชนิดที่ยังมีข้อมูลด้านอนุกรมวิธานไม่ครบถ้วนชัดเจน ต้องการการจัดจำแนกที่ถูกต้อง (กำธร, 2543) ในรายงานฉบับนี้ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ตามพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยา องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ การเน้นศึกษารายละเอียดเฉพาะกลุ่มหรือเฉพาะแหล่งทำให้สถานภาพความรู้ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศดีขึ้น แม้กระนั้นก็ยังไม่มีต่ำกว่า 41 ชนิด ที่มีข้อมูลด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาน้อยมากหรือไม่มีเลย (กำธร, 2543) จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของไทยมีตั้งแต่ $2n=22$ ถึง 28 คณะผู้วิจัยไม่พบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น polyploid เลย เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Kuramoto (1990) พบว่าจำนวนโครโมโซมของอีกรายหัวแหลม ($2n=26$), จงโคร่ง ($2n=22$), คางคกบ้าน ($2n=22$), คางคกแคระ ($2n=22$), อึ่งปุม ($2n=26$), อึ่งอ่างบ้าน ($2n=28$), เขียดจะนา ($2n=26$), เขียดหลังปุม ($2n=26$), กบภูเขา ($2n=24$), กบบัว ($2n=26$), กบห้วยขาปุม ($2n=22$), กบหนอง ($2n=26$), กบชะง่อนหินเมืองเหนือ ($2n=26$), กบอ่อง ($2n=26$), กบนา ($2n=26$) และปาดบ้าน ($2n=26$) ตรงและสอดคล้องกับการรายงานของ Kuramoto มีสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 20 ชนิด ในรายงานครั้งนี้ไม่ปรากฏในรายงานวารสารต่างประเทศใดมาก่อน คือ อีกรายลายละเอียด ($2n=24$), อีกรายหัวเล็ก ($2n=26$), อีกรายช้างแถบ ($2n=26$), *Bufo biporcatus* ($2n=22$), คางคกขายาว ($2n=22$), กบหลังไพล ($2n=26$), กบหนอง ($2n=26$), กบหลังขี้ด ($2n=26$), กบเกาะช้าง ($2n=26$), กบหลังตาพับ ($2n=26$), เขียดอีโม้หิน ($2n=26$), กบน้ำเค็ม ($2n=26$), กบอกลนาม ($2n=26$), ปาดตีนเหลืองอีสาน ($2n=26$), อึ่งลาย ($2n=26$), อึ่งปากขวด ($2n = 26$), อึ่งอ่างกันขี้ด ($2n=28$), อึ่งชาคำ ($2n=24$), อึ่งแม่หนาว ($2n=24$) และอึ่งลายแต้ม ($2n=22$)

อิงกรายเป็นกลุ่มเดียวที่โครโมโซมในคาริโอไทป์มีรูปร่างที่โลเซนตริกหลายคู่ และพบ chromosome marker ในกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่อยู่ใกล้ๆ บริเวณตำแหน่งเซนโตรเมียร์ ซึ่งโครโมโซมรูปร่างที่โลเซนตริกนี้พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มอื่นๆ ที่ไม่มีในประเทศไทย คือ Family Leptodactylidae สกุล *Eleutherodactylus* และ Family Dendrobatidae (Bogart, 1991) ซึ่งทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมอันเนื่องมาจากการเกิด centric fusion หรือ centric fission ในสัตว์กลุ่มนี้ ในอิงกรายหลายและจะไม่พบโครโมโซมรูปร่างนี้ และมีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าอิงกรายชนิดอื่น จึงมีความเป็นไปได้ที่เกิดเหตุการณ์ดังกล่าว ซึ่งควรมีการศึกษารายละเอียดต่อไป ข้อมูลทางเซลล์พันธุศาสตร์และรูปร่างโครโมโซมในคาริโอไทป์สนับสนุนว่าพวกอิงกรายเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่โบราณ เพราะมีโอกาสสูงที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม และรูปร่างของโครโมโซมในคาริโอไทป์ โดยปรากฏการณ์ centric fusion เหมือนที่เกิดในพวก *Eleutherodactylus* (Bogart, 1991)

คาริโอไทป์ของคางคกทั้ง 4 ชนิด มีความคล้ายคลึงกันมากมีรูปร่างโครโมโซมเพียง 2 แบบ คือแบบเมตาเซนตริก และสับเมตาเซนตริกเท่านั้น และขนาดของโครโมโซมแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มขนาดใหญ่กับกลุ่มขนาดเล็ก สอดคล้องกับการศึกษาคางคกในเยอรมันและญี่ปุ่น โดย Ullerich (1996), Schmid (1978a), Birstein and Mazin (1982) และ Matsui et al. (1985) ตามลำดับ คาริโอไทป์ของคางคกยาวมีรายละเอียดแตกต่างไปจากคางคกอีก 3 ชนิด เพราะกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่มี 7 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็กมีเพียง 4 คู่เท่านั้น ส่วนคางคกแคระมีคาริโอไทป์สอดคล้องกับการรายงานของ Schmid (1978a) ที่ศึกษาคางคกแคระที่ยุโรป เฉพาะคางคกบ้านเท่านั้นที่พบ chromosome marker บนโครโมโซมคู่ที่ 11

คาริโอไทป์ของพวกกบเขียดมีความคล้ายคลึงกัน โครโมโซมคู่ที่ 1 ถึง 5 มีขนาดใหญ่ และคู่ที่ 6 ถึง 13 มีขนาดเล็ก สอดคล้องกับการศึกษาของ Seto (1965), Kuramots (1980), Matsui and Seto (1985) และ Matsui et al. (1995) chromosome marker จะพบแต่เฉพาะในกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็กเท่านั้น โดยเฉพาะในคู่ที่ 10 พบในกบหลังไฟล กบบัว กบชะง่อนหินเมืองเหนือ และกบหัวขาปุม สอดคล้องกับการศึกษาในสกุล *Rana* หลายชนิดของ Schmid (1978b) ที่พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 10 จะมีรอยคอด secondary constriction ที่ติด NOR positive และเรียกตำแหน่งนี้ว่า Standard-NOR และ Schmid ยังได้ชี้ให้เห็นว่าตำแหน่งดังกล่าวถูกอนุรักษ์ไว้ในสายวิวัฒนาการของพวกสกุล *Rana* โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง กบหัวขาปุมที่ศึกษาครั้งนี้มีคาริโอไทป์เหมือนกับกบหัวขาปุมของไต้หวันที่ศึกษาโดย Kuramoto (1980) และคาริโอไทป์ของกบชะง่อนหินเมืองเหนือของไทยก็มีคาริโอไทป์เหมือนกับกบชะง่อนหินเมืองเหนือของฮ่องกงที่ศึกษาโดย Matsui et al. (1995) เมื่อเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของพวกกบเขียดที่จับตัวอย่างมาจากต่างแหล่งกันพบว่าส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างในรูปร่างของโครโมโซมและตำแหน่ง chromosome marker ยกเว้นในกบหลังซิดที่เก็บตัวอย่างจากอำเภอเมืองจังหวัดอำนาจเจริญ จะมีคาริโอไทป์ต่างไปจากกบหลังซิดที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่อื่น แสดงว่าคาริโอไทป์ของพวกกลุ่มกบเขียดมีลักษณะอนุรักษ์เช่นเดียวกับพวกกลุ่มคางคก

คาริโอไทป์ของปาดตีนเหลืองอีสานประกอบด้วย 5 คู่ใหญ่ 8 คู่เล็ก คล้ายกับ *Rhacophorus arvalis* จากไต้หวัน แต่มีรูปร่างของโครโมโซมแตกต่างกันอย่างชัดเจน (Lue et al., 1995) โดยเฉพาะในปาดตีนเหลืองอีสานพบ chromosome marker ขนาดใหญ่บนแขนสั้นเหนือตำแหน่งเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่ 8 มีรูปร่างเป็นสับทึลเซนตริก ปากบ้านมีคาริโอไทป์ต่างจากปาดตีนเหลือง โดยเฉพาะพบตำแหน่งของ chromosome marker บนโครโมโซม 3 คู่ คือ คู่ที่ 6 8 และ 12 เมื่อเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของปากบ้านที่เก็บตัวอย่างมาจากต่างแหล่งกัน ไม่พบความผันของรูปร่างโครโมโซม และตำแหน่งของ chromosome marker เลย แสดงว่าปาดบ้านที่มีเขตกระจายทั่วทางภูมิภาคของประเทศยังคงมีความเหมือนกันในองค์ประกอบของโครงสร้างทางพันธุกรรม(homokaryotype)

คาริโอไทป์ของอิงอ่างกันขิดและอิงอ่างบ้านมีลักษณะคล้ายกัน ประกอบด้วย กลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 4 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 10 คู่ แต่ตำแหน่งที่พบ chromosome marker แตกต่างกันในอิงอ่างบ้านผลการศึกษาสอดคล้องกับการรายงานของ Morescalchi (1968) และ Schmid (1978b) แต่แตกต่างจากผลการศึกษาของ Bogart and Nelson (1976) ที่รายงานว่าจำนวนโครโมโซมของอิงอ่างบ้าน $2n=24$ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจจะมาจากความผันแปรของจำนวนโครโมโซมภายในอิงอ่างชนิดนี้ (intraspecific chromosomal variation) (Supaprom and Baimai, inpress) หรืออาจจะมาจากความแตกต่างของกลุ่มสปีชีส์ที่ซับซ้อน (*K. pulchra* complex) ก็ได้ (Kasahara and Haddai, 1997) คาริโอไทป์ของอิงปุมมีลักษณะคล้ายคลึงกับคาริโอไทป์ของอิงอ่างกันขิดและอิงอ่างบ้าน มีความแตกต่างที่ตำแหน่งของ chromosome marker และจำนวนโครโมโซมเท่านั้น ทั้ง Bogart and Nelson (1976) ได้รายงานคาริโอไทป์ของอิงจากอเมริกาใต้ และ Kuramoto and Allison (1989) ที่ศึกษาคาริโอไทป์ของอิงจากปาปัวนิวกินีพบว่า คาริโอไทป์ของพวกอิงทั้งจากอเมริกาใต้และจากปาปัวนิวกินีล้วนประกอบด้วย กลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ แต่ผลจากการศึกษาคาริโอไทป์ของอิงในประเทศไทยมีความแตกต่างไปจากที่กล่าวมาคือ คาริโอไทป์ของอิงลายและอิงปากขาว ประกอบด้วย โครโมโซมขนาดใหญ่ 6 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 7 คู่ ในขณะที่คาริโอไทป์ของอิงปุมประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ 4 คู่ และกลุ่มโครโมโซมขนาดเล็ก 9 คู่ ดังนั้นข้อมูลทางเซลล์พันธุศาสตร์นี้ชี้ให้เห็นว่าอิงจากประเทศไทยแตกต่างและไม่มีความสัมพันธ์กับอิงจากอเมริกาใต้ และจากปาปัวนิวกินี ในอิงขา คำ อิงแม่หนาว และอิงลายแต้ม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลักษณะของกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่แล้ว ทำให้เชื่อว่าเป็นไปได้ที่โครโมโซมขนาดใหญ่บางแท่งของอิงลายแต้มเกิดจาก chromosomal rearrangement ในสายบรรพบุรุษของสกุล *Microhylla* เพราะจำนวนโครโมโซมของอิงลายแต้มมีน้อยที่สุดในบรรดาอิงที่พบในประเทศไทย คือ $2n=22$ (Supaprom and Baimai, inpress) เมื่อเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของอิงแม่หนาวที่เก็บตัวอย่างจากต่างแหล่งกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างในรูปร่างโครโมโซม แต่มีความแตกต่างกันในแง่มีหรือไม่มีตำแหน่ง chromosome marker

ผลการย้อมแถบโครโมโซมแบบต่างๆ ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกพบว่า คุณภาพของแถบที่ได้และความคงตัวของแถบ มีความผันแปรมากในแต่ละกลุ่มของสัตว์พวกนี้ ทั้งนี้เพราะโครโมโซมของสัตว์พวกนี้มีการหดตัวมาก สอดคล้องกับการรายงานของ Schmid (1978a) เช่น กรณีชักนำให้เกิดแถบ

จี(G-banding) เพื่อให้ได้แถบโครโมโซมที่ชัดเจนโดยเอ็นไซม์ทริปซิน (trypsinization) ด้วยระยะเวลา นาน จะกระทำไม่ได้เลย ในโครโมโซมของสัตว์พวกนี้ และการย้อมแถบแบบซี (C-banding) ถ้าหากแช่ สไลด์ในสารละลาย $Ba(OH)_2$ ที่เข้มข้นเกินไป จะทำให้ส่วนปลายสุดของโครโมโซม (telomere) ย้อม ไม่ติดสี และทำให้ตำแหน่งเซนโตรเมียร์และบริเวณ NOR ย้อมติดสีจาง (Schmid, 1978b) ปัจจัยเหล่านี้ คือสาเหตุของการไม่ประสบผลสำเร็จในการย้อมแถบโครโมโซมของสัตว์พวกนี้ คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการย้อมแถบโครโมโซมแบบต่างๆ โดยเฉพาะแบบซีในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดเท่า นั้น ทำให้ข้อมูลทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์บางส่วนไม่สมบูรณ์ครบถ้วน อย่างไรก็ตามข้อมูลพื้นฐานทาง ด้านจำนวนรูปร่างของโครโมโซม ตำแหน่ง chromosome marker และรูปแบบของคาริโอไทป์ของสัตว์ สะเทินน้ำสะเทินบกจำนวน 33 ชนิด ของประเทศในรายงานเล่มนี้จัดเป็นฐานองค์ความรู้เบื้องต้นที่จะนำ ไปสู่การศึกษาในเชิงลึกและเชิงกว้างต่อไป

5.6 ข้อเสนอแนะ

1. ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิภาคที่มีความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสูงมาก มีราย งานว่าพบมากถึง 130 ชนิด แต่สถานภาพความรู้ด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และเซลล์พันธุศาสตร์ยังมี น้อยมาก ข้อมูลมีปรากฏบ้างในสัตว์บางชนิดเท่านั้น แต่ส่วนใหญ่จะไม่มีเลยหากเปรียบเทียบกับ ประเทศในเขตอบอุ่น ซึ่งมีความหลากหลายน้อยกว่ามาก แต่ข้อมูลด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศ วิทยา พันธุศาสตร์ และวิวัฒนาการ ตลอดจนการอนุรักษ์ นับว่าก้าวหน้าไปมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็น ที่จะต้องมีการวางแผน สร้างนักวิชาการ สร้างองค์ความรู้ของตนเอง สนับสนุนให้มีหน่วยงานที่มี ศักยภาพ จัดทำวารสารด้านความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อรวบรวมและเผยแพร่ข้อมูลที่มีประโยชน์ และสำคัญไม่ให้สูญหายไป สนับสนุนให้มีการจัดทำพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติ ที่ได้มาตรฐาน เพื่อรวบ รวมตัวอย่างสัตว์ จะได้ใช้เป็นที่ยอ้างอิง ฝึกอบรม และเผยแพร่ข้อมูลเพื่อให้คนไทยและเยาวชนรับรู้เรื่อ รวของสัตว์กลุ่มนี้มากขึ้น อันจะนำไปสู่การวางแผนเพื่อการอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์อย่างเหมาะสมต่อไป

2. ความรู้เกี่ยวกับสัตว์ในกลุ่มนี้ ยังไม่แพร่หลายในกลุ่มนักวิชาการชาวไทย เนื่องจากได้มองข้ามความสำคัญของสัตว์กลุ่มนี้ไป และไม่ได้ทำการศึกษาเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ของตนเองตั้งแต่ต้น ตลอดจนไม่มีการถ่ายทอดและแลกเปลี่ยนความรู้ให้กันอย่างต่อเนื่อง จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ จะต้องสนับสนุน และกระตุ้นให้มหาวิทยาลัย สถาบันวิจัยต่างๆ ทำการศึกษาวิจัย และสร้างนักวิชาการ ทางด้านนี้อย่างเพียงพอ ตลอดจนการจัดประชุมทางวิชาการเพื่อถ่ายทอดและแลกเปลี่ยนความรู้ กันอย่างสม่ำเสมอ

3. การศึกษาวิจัยสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอนาคต ควรเน้นรายละเอียดในสัตว์เฉพาะชนิด หรือเฉพาะกลุ่ม หรือเฉพาะแหล่งมากขึ้น เพื่อจะได้ความรู้ที่ครบถ้วน สมบูรณ์และนำไปใช้ประโยชน์ได้ อย่างแท้จริง เช่น พวกอึ่งกราย ที่แทบจะไม่มีความรู้เกี่ยวกับสัตว์พวกนี้เลย พวกปาดซึ่งอาศัยอยู่ตาม ต้นไม้ ช่วยควบคุมจำนวนแมลงในระบบนิเวศที่อยู่เหนือดิน และพบถึง 27 ชนิด แต่ในรายงานนี้มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเร่งศึกษาสัตว์กลุ่มนี้

5.7 เอกสารอ้างอิง

- กำธร ชีรคุปต์. 2543. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน ใน : บทความปริทัศน์งานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. โครงการพัฒนาองค์ความรู้ และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (Biodiversity Research and Training Program : BRT). หน้า 149-179.
- จารุจินต์ นฤตะภักดิ์ และ รัชญา จันทอจ. 2542. การสำรวจและติดตามผลความหลากหลายของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน ใน: แนวทางการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ. อักษรสยามการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- จารุจินต์ นฤตะภักดิ์ และ วิเชียร คงทอง. 2536. วิกฤตการณ์การสูญเสียมความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์ป่าและแนวทางแก้ไขที่ยั่งยืน ใน : คนกับธรรมชาติ : วิกฤตการณ์การสูญเสียมความหลากหลายทางชีวภาพและแนวทางการแก้ไขที่ยั่งยืน ณ ดิกลสันติไมตรี ทำเนียบรัฐบาล คณะอนุกรรมการว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย ร่วมกับคณะกรรมการสาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา สภาวิจัยแห่งชาติ. หน้า 129-219.
- ถาวร สุภาพรม, ขนิษฐา ทุมมากรณ์, ประจักษ์ จันทร์ตรี และวิสูตร ไบไม้. 2543. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของกบอักษนามและเขียดหลังป้อม. รวมบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26. 18-20 ตุลาคม 2543. หน้า 395
- ถาวร สุภาพรม, ประจักษ์ จันทร์ตรี และวาริณี พลเสนา. 2542. รายงานวิจัยเรื่องการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 36 หน้า.
- ถาวร สุภาพรม และประภาพร กัลยาประสิทธิ์. 2533. การศึกษาโครโมโซมของอีงอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*) และคางคกบ้าน (*Bufo melanostictus*) กำหนดการและบทคัดย่อในการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 7 เรื่องพันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิต 21-23 พฤศจิกายน 2533. โรงแรมขอนแก่น ไฮเต็ล ขอนแก่น. หน้า 107-109.
- ถาวร สุภาพรม, นงเยาว์ ฉาโธสง และนิยะดา ห่อนาค. 2534. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดจิกและเขียดอีโม รวมบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17 24-26 ตุลาคม 2534. หน้า B-060.
- ถาวร สุภาพรม, บุษกร อารยางกูร, แก้ว อุดมศิริชาคร และวาริณี อรุณมวงผล. 2536. การศึกษาคาริโอไทป์และการย้อมแถบโครโมโซมแบบซีของกบจุก (*Rana pileata* Boulenger) ใน : พันธุศาสตร์ยุคใหม่ รวมผลงานสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 8. ดาวรุ่ง กังวานพงศ์ วิสุทธิ์ ไบไม้ (บรรณาธิการ). นิวธรรมดาการพิมพ์. หน้า 212-220.
- รัชญา จันทอจ. 2530. การสำรวจชนิดสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำในเขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานีและจังหวัดตาก วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- นงลักษณ์ นาคเกษม. 2518. การศึกษาการเจริญเติบโตและคาร์ิโอไทป์ของกบ อีงอ่าง และคางคกไทย
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล, ผุสดี ปริยานนท์ และเพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ. 2541. การศึกษาโครโมโซม
เพศของกบบลูฟล็อก (*Rana catesbeiana*) ประมวลผลงานวิจัย เล่ม 2 ในการประชุมเสนอผล
งานวิจัยเฉลิมฉลอง 80 ปี แห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 735-742.
- วัชร สวณสมบัติ. 2544. สะเทินน้ำสะเทินบก : ชีวิตครึ่ง ๆ ของเจ้าเลือดเย็น. Advanced Thailand
Geographic. 47: 112-146.
- สุดสนอง ผาตินาวิน. 2531. คาร์ิโอไทป์ของกบน้ำเค็ม ในสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 6 เรื่องความ
ก้าวหน้าทางพันธุศาสตร์ โรงแรมนารายณ์ กรุงเทพฯ . หน้า 57
- อรอนงค์ กฤษเพชรรัตน์, ขวลิติ กฤษเพชรรัตน์ และอำพา เหลืองภิรมย์. 2541. คาร์ิโอไทป์ของสัตว์
สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์กบเขียดที่พบในอุทยานแห่งชาติภูพาน จ.สกลนคร และ จ.
กาฬสินธุ์. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24 ณ ศูนย์
ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์. กรุงเทพฯ. หน้า 530-531.
- Birstein, V.J. and Mazin, A.L. 1982. Chromosomal polymorphism of *Bufo bufo* : Karyotype and
C-banding pattern of B. b Verrucosissima. Genetica 59: 93-98.
- Blommers-Schlösser, R.M.A. 1976. 6 chromosome analysis of twelve species of Microhylidae
(Anura) from Madagascar. Genetica 46: 199-210.
- Bogart, J. 1991. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. Pp.233-258. In :
Amphibians cytogenetics and evolution, edited by D.M. Green and S.T. Sessions.
Academic Press, New York.
- Bogart, J.P. and Nelson C.E. 1976. Evolutionary implications from karyotypic analysis of frogs
of the families Microhylidae and Rhinophrynidae. Herpetologica 32: 199-209.
- Campbell, J.A. and Clarke, B.T. 1998. A review of frogs of the genus *Otophryne* (Microhylidae)
with the Description of a new species. Hepetologica 54: 301-317.
- Chan-Ard, T., Grossmann, W., Gumprecht, A. and Schulz, K.D. 1999. Amphibians and Reptiles
of Peninsular Malaysia and Thailand (an illustrated checklist). Germany, Wuerselen,
Busmaster Publications,
- Dubois, A. and Ohler, A. 1998. A new species of *Leptobrachium* (*Vibrissaphora*) from northern
Vietnam, with a review of the taxonomy of the genus *Leptobrachium* (Pelobatidae,
Megophryinae). Dumérilia 4: 1-32.
- Dubois, A. and Ohler, A. 2000. Systematics of *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829).
(Amphibian ; Anura, Ranidae) and related species. 1. Nomenclatural status and type-
specimens of the nominal species *Rana limnocharis* Gravenhorst (1929). Alytes 18: 15-50.

- Goodpasture, C. and Bloom, S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosome using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Green, D.M. and Sessions, S.K. 1991. Nomenclature for chromosomes. pp. 431-432. In : *Amphibian Cytogenetics and evolution* edition by D.M. Green and S.K. Sessions. Academic Press. New York.
- Inger, R.F. 1970. A new species of frog of the genus *Rana* from Thailand. *Fieldiana. Zoology* 51: 169-174.
- Inger, R.F. and Chan-Ard, T. 1997. A new species of Ranid frog from Thailand, with comments on *Rana livida* Blyth. *Nat. Hist. Bull. Siam. Soc.* 45: 65-70.
- Kasahara, S. and Haddad, C.F.B. 1997. Karyotypes of two Brazilian microhylid frogs of the Genus *Chiasmocleis*, including a new case of polyploidy. *J. Herpetol.* 31: 139-142.
- Kezer, J. and Sessions S.K. 1979. Chromosome Variation in the Plethodontid Salamander, *Aneides ferreus*. *Chromosoma* 71: 65-80.
- Khonsue, W. and Thirakhupt, K. 2001. A checklist of the amphibians in Thailand. *Nat. Hist. J. Chulalongkorn Univ.* 1: 69-82.
- Kiew, B.H. 1984. A new species of toad, *Ansonia siamensis* (Bufonidae), from the Isthmus of Kra, Thailand. *Nat. Hist. Bull. Siam Soc.* 32: 111-115.
- King, M. 1980. C-banding studies in Australian hylid frogs : secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191-217.
- Kraus, F. and Allison, A. 2001. A review of the edemic New Guinea Microhylid frog genus *Choerophryne*. *Hepetologica* 57: 214-232.
- Kuramoto, M. 1980. Karyotypes of several frogs from Korea, Taiwan and the Phillipines. *Experientia* 36: 826-828.
- Kuramoto, M. 1990. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. *Bull. Fukuoka Univ. Educ.* 39: 83-127.
- Kuramoto, M. and Allison, A. 1989. Karyotypes of microhylid frogs of Papua New Guinea and their systematic implications. *Herpetologica* 45: 250-259.
- Liu, W. and Yang D. 2000. A new species of *Amolops* (Anura, Ranidae) from Yunnan, China, with a discussion of karyological Diversity in *Amolops*. *Herpetologica* 56: 231-238.
- Lizuka, K., Kezer, J. and Seto, T. 1989. Karyotypes of two rare species of hynobiid salamanders from Taiwan, *Hynobius sonani* (Maki) and *Hynobius formosanus* Maki (Urodela). *Genetica* 78: 105-110.
- Lötter, S. and Henzl, M.J. 2000. A new species of *Atelopus* (Anura : Bufonidae) from the Serrania de Sira, Amasonain Peru. *J. Hepetol.* 34: 169-173.

- Lue, K. -Y., Lai, J. -So and Y. -S. chen. 1995. A New *Rhacophorus* (Anura : Rhacophoridae) from Taiwan.
- Matsui, M. 1997. Call characteristics of Malaysian *Leptolalax* with a description of two new species (Anura : Pelobatidae). *Copeia* 1: 158-165.
- Matsui, M., Chan-Ard, T. and Nabhitabhata, J. 1996. District specific status of *Kalophrynus pleurostigma interlineatus* (Anura : Microhylidae). *Copeia* 2: 440-445.
- Matsui, M., Nabhitabhata, J. and S. Panha. 1998. A new *Ansonia* from northern Thailand (Anura : Bufonidae). *Herpetologica* 54: 448-454.
- Matsui, M., Nabhitabhata J. and Panha, S. 1999. On *Leptobrachium* from Thailand with a description of a new species (Anura : Pelobatidae). *Jpn. J. Herpetol.* 18: 19-29.
- Matsui, M. and Ota, H. 1984. Parameters of Fecundity in *Microhyla ornata* from yaeyama groups of the Ryukyu Archipelago. *Jpn. J. Hepetol.* 10: 73-79.
- Matsui, M. and Ota, H. 1995. *Rana ijimae* (Stejneger, 1901), a junior Synonym of *Rana narina* Stejneger, 1901 (Amphibia, Anura, Ranidae). *Spec. Bull. Jpn. Soc. Coleopterol.*, Tokyo. 4: 491-496.
- Matsui, M., Ota, H., Lau, M.N. and Bogadek, A. 1995. Cytotaxonomic studies of three ranid species (Amphibia: Anura) from Hong Kong. *Jpn. J. Herpetol.* 16: 12-18.
- Matsui, M. and Seto, T. 1985. Karyotype of an Asian ranid frog, *Staurois latopamatus*. *Jpn. J. Herpetol.* 11: 1-4.
- Matsui, M., Seto, T., Hohsaka, Y. and Borkin, L.J. 1985. Bearing of chromosome C-banding patterns on the Classification of Eurasian Toads of the *Bufo bufo* complex. *Amphibia-Reptilia* 6: 23-33.
- Mendelson, J.R. III. 1997. A new species of toad (Anura : Bufonidae) from Oaxaca, Mexico with comments on the status of *Bufo cavirostris* and *Bufo cristatus*. *Hepetologica* 53: 268-286.
- Mijares-Urrutia, A. and Arends, A. 2001. A new toad of the *Bufo margaritifera* complex (Amphibia : Bufonidae) from Northwestern Venezuela. *Herpetologica* 57: 523-531.
- Ota, H. and Matsui, M. 1995. Karyotype of a Ranid frog ; *Platymantis pelewensis*, from Belau, Micronesia, with comments on its systematic implications. *Pacific Science* 49: 296-300.
- Scheel, J.J. 1971. The seven-chromosome karyotype of the african frog *Arthroleptis*, a probable derivative of the thirteen chromosome karyotype of *Rana* (Ranidae, Anura). *Hereditas* 67: 287-290.
- Schmid, M. 1978a. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-388.

- Schmid, M. 1978b. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma* 68: 131-148.
- Schmid, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome Regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103.
- Schmid, M. 1982. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-344.
- Schmid, M., Haaf, T., Geile, B. and Sims, S. 1983. Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX - sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura: Hylidae). *Chromosoma* 88: 69-82.
- Schmid, M., Steinlein, C., Friedl, R., Almeida, C.G. de, Haaf, T., Hillis, D.M. and Duellman, W.E. 1990. Chromosome banding in Amphibia XV. Two types of Y chromosome and heterochromatin hypervariability *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 98: 413-423.
- Schmid, M., Steinlein, C. and Feichtinger, W. 1989. Chromosome banding in Amphibia XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). *Chromosoma* 78: 434-438.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger W., Almeida, C.G. de and Duellman, W.E. 1988. Chromosome banding in Amphibia XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 97: 33-42.
- Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
- Seto, T. 1965. Cytogenetic studies in lower vertebrates. II. Karyological studies of several species of frogs (Ranidae). *Cytologia* 30: 437-446.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.
- Supaprom, T. and Baimai, V. 2002. Mitotic karyotypes eight microhylid frogs from Thailand (Anura : Microhylidae). *Amphibia-Reptilia* (in press)
- Ullerich, F.H. 1966. Karyotype und Dns-Gehalt von *Bufo bufo*; *B. viridis*, *B. Bufo* X *B. Viridis* Und *B. calamita* (Amphibia, Anura). *Chromosoma* 18: 316-342.
- Zbozeń, J. and Rafiński, J. (1993): A comparative study of mitotic and meiotic chromosomes of the Montandon's newt, *Triturus montandoni* (Urodela : Salamandridae) from Poland and Rumania. *Genetica* 88: 69-77.
- Ziegler, T and Köhler, J. 2001. *Rhacophorus orlovi* sp. n., ein neuer Ruderfrosch aus Vietnam (Amphibia : Anura : Rhacophoridae). *Sauria* 23: 37-46.

รายชื่อคณะกรรมการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งใน โครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	สถาบันปัจจุบัน
1. นายวิสุทธิ์ ไชยไม่	ศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	หัวหน้าโครงการ	ศ.ดร.	ศูนย์วิจัยเพื่อความ น่าโดยพาหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
2. น.ส. เจลียว กุวงศ์ดิลก	ผศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักวิจัย	รศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
3. นางปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์	รศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักวิจัย	รศ.ดร.	ศูนย์วิจัยเพื่อความ น่าโดยพาหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
4. น.ส. สังวรรณ กิจทวี	รศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักวิจัย	รศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
5. นายอหั่น มินัน	อ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักวิจัย	อ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
6. นายปรีชา ประเทพา	ผศ.ดร.	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี ม.มหาสารคาม	นักวิจัย	ผศ.ดร.	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี ม.มหาสารคาม	
7. นายถาวร สุภาพรม	อาจารย์	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม.อุบลราชธานี	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	-	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม.อุบลราชธานี	นักศึกษาระดับปริญญาเอก (ทุนพัฒนาอาจารย์ ทบวงมหาวิทยาลัย)
8. น.ส. สำเนียง ผลานุสนธิ์	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	ผู้ช่วยนักวิจัย	-	ศูนย์วิจัยเพื่อความ น่าโดยพาหะ	
9. น.ส. นุจิรินทร์ ถิ่นทิพย์ไทย	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	ผู้ช่วยนักวิจัย	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	ปริญญาโท-เอก

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งใน โครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	สภาพปัจจุบัน
10. นายนิวัฒน์ กังวานรังสรรค์	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	ผู้ช่วยนักวิจัย	-	ภาควิชาพหุวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	ต่อ โท-เอก
11. น.ส. กัทลี งามทวี	-	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี ม. มหาสารคาม	ผู้ช่วยนักวิจัย	-	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี ม. มหาสารคาม	
12. น.ส. มุกดา บุตรวงศ์	-	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม. อุบลราชธานี	ผู้ช่วยนักวิจัย	-	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม. อุบลราชธานี	
13. น.ส. วิยะดา ถมยา	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	ผู้ช่วยนักวิจัย	-	-	ลาออก
14. น.ส. กมลวรรณ ศรีปลั่ง	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาตรี	-	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	นักศึกษาระดับปริญญาโท
15. น.ส. จุลลดา เหล่าถาวรกิจกุล	-	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาตรี	-	ศูนย์วิจัยเพื่อความเปลี่ยนแปลง นำโดยพาหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก (ทุน คปภ.)
16. น.ส. เสน่ห์ จิตต์กลาง	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก (ทุน คปภ.)
17. น.ส. อัญชลี ฐานวิสัย	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท
18. น.ส. อัญชลี เหลืออัน	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท
19. นายปิติ มังครางกู	-	ฝ่ายปฏิบัติการ กองมอลาเรีย กระทรวงสาธารณสุข	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	ฝ่ายปฏิบัติการ กองมอลาเรีย กระทรวงสาธารณสุข	จบปริญญาโท
20. น.ส. สิริลักษณ์ สินธุพาณี	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	-	จบปริญญาโท
21. น.ส. ทองดี ดุลพินิจตระกูล	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท
22. น.ส. กัลยาณี แดงมณี	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งใน โครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	สภาพปัจจุบัน
23. นายเฉลา ส้ารายดี	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	ศูนย์วิจัยเพื่อความมั่นคงและโรคที่ นำโดยพาหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	จบปริญญาโท
24. นายสิริพงษ์ สิงห์พงษ์	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	-	ลาออก
25. น.ส. สุวรรณี พยุหเสนา	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก (ทุน คปก. และ วปก.)
26. นายไพโรจน์ ประมวล	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก (ทุน คปก. และ วปก.)
27. น.ส. อัญชลี แซ่หลี่	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	-	-	ลาออก
28. น.ส. วันวิสาข์ จันทลักษ์พันธ์	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	-	ศูนย์วิจัยเพื่อความมั่นคงและโรคที่ นำโดยพาหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักวิจัยหลังปริญญาเอก
29. นายดุษฎี เรืองอารีรัชต์	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	-	ศูนย์วิจัยเพื่อความมั่นคงและโรคที่ นำโดยพาหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก (ทุน คปก.)
30. น.ส. อัญชนา ทานเจริญ	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาโท	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก (ทุน คปก.)
31. น.ส. สมจิตต์ ทิณกระโทก	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล	นักศึกษาระดับปริญญาเอก (ทุนพัฒนาอาจารย์ ทบวงมหาวิทยาลัย)

7

ผลงานตีพิมพ์

A. Publications ในวารสารวิชาการ

(ก.) ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่แล้ว (published)

1. Adsavakulchai, S., Baimai, V., Prachyaprued, W., Grote, P.J. and Lertlum, S. 1999. Morphometric study for identification of the *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) using wing image analysis. *Biotropia* 13: 37-48.
2. Baimai, V., Samrandee, C., Tigvattananont, S. and Trinachartvanit, W. 2000. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. V. Cytotaxonomy of ten additional new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia* 65: 409-417.
3. Imwong, M., Sharpe, R.G., Kittayapong, P. and Baimai, V. 2000. Distribution of the transposable element *mariner* in anopheline mosquitoes. *Heredity* 85: 271-276. (JIF = 2.297)
4. Kittayapong, P., Baisley, K.J., Sharpe, R.G., Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2002. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(1): 103-107. (JIF = 1.126)
5. Kittayapong, P., Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2002. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(1): 108-111. (JIF = 2.126)
6. Kittayapong, P., Mongkalagoon, P., Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2002. Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of *Wolbachia*-superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* 88: 270-274. (JIF = 2.297)
7. Jamnongluk, W., Kittayapong, P., Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2002. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains a single host species. *Current Microbiol.* 45: 255-260. (JIF = 1.059)
8. Kuvangkadilok, C., Boonkemton, C., Phayuhasena, S., and Baimai, V. 2002. Larval polytene chromosomes of black flies (*Simulium*) from Thailand. I. Comparison among five species in the subgenus *Gomphostilbia* Enderlein. *Genetica* (in press). (impact factor = 0.916)

9. Ruang-areerate, T., Kittayapong, P., Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2002. Molecular phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts in Southeast Asian mosquitoes based on *wsp* gene sequences. J. Med. Entomol. (in press) (JIF = 0.949)
10. Supapoon, T. and Baimai, V. 2002. Mitotic karyotypes of eight species of microhylid frogs from Thailand (Anura : Microhylirdeu) Amphibia-Reptilia (in press) (JIF = 0.469)

(ข.) ผลงานวิจัยที่ส่งพิจารณาเพื่อตีพิมพ์ (submitted)

1. Jamnongluk, W., Baimai, V. and Kittayapong, P. 2002. Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial COI sequences Genetica (JIF = 0.916)
2. Jamnongluk, W., Baimai, V. and Kittayapong, P. 2002. Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial COI sequences. Genome (JIF = 1.710)
3. Jamnongluk, W., Baimai, V. and Kittayapong, P. 2002. Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera dorsalis* complex using the mitochondrial COI sequences. Heredity (JIF = 2.297)
4. Supaprom, T. and Baimai, V. 2002. Karyotypes of ten species of ranid frogs (Anuran, Ranidae) from Thailand. Amphibia-Reptilia (JIF = 0.469)

(ค.) ผลงานวิจัยที่อยู่ในรูปแบบต้นฉบับ (in manuscript)

1. Kitthawee, S., Sriplang, K., Brockelman, W.Y. and Baimai, V. 2002. Laboratory evaluation in density relationships of the parasitoid, *Spalangia endius* (Hymenoptera: Pteromalidae), with two species of tephritid fruit fly pupal hosts in Thailand.
2. Kitthawee, S., S. Singhapong and V. Baimai. 2002. Karyotypes of five species of tephritid fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) in Thailand.
3. Kuvangkadilok, C., Phayahasena, S., Boonkemtong C. and Baimai, V. 2002. Distribution of the larvae of blackflies (Diptera: Simuliidae) in southern Thailand.
4. Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C., Phayahasena, S. and Baimai, V. 2002. Larval polytene chromosomes of seven species of black flies (Diptera: Simuliidae) in subgenus *Simulium*.

5. Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C., Phattravichien, P., Sridulyakul, P. and Baimai, V. 2002. Larval polytene chromosomes of black flies (*Simulium*) from Thailand. II. Comparison among seven species in the subgenus *Simulium* Latreille s. str.
6. Sintupachee, S. Milne, J.R., Poonchaisri, S., Baimai, V. and Kittayapong, P. 2002. Seasonal distribution and phylogenetic relationship of *Wolbachia* within arthropod communities associated with cucurbit crops.
7. Ruang-areerate, T., Kittayapong, P. Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2002. Evidence for host- parasite coevolution: *Wolbachia* replication follows the development of their mosquito host.
8. Supaprom, T., Baimai, V. and Chan-Ard, T. 2002. Mitotic karyotypes of four Megophryid frogs (Anura: Bufonidae) from Thailand.
9. Supaprom, T. and Baimai, V. 2002. Characterization of C-banded mitotic chromosome for four species of anuran amphibians from Thailand.

(ง) ผลงานวิจัยที่กำลังเตรียมต้นฉบับ (in preparation)

1. Kittayapong, P., Theinthong, S., Jamnongluk, W. and Baimai, V. Natural *Wolbachia* infections and molecular phylogenetic relationship with their tephritid fruit fly parasitoid hosts.
2. Kittayapong, P., Klinpikul, N., Jamnongluk, W. and Baimai, V. Molecular phylogenetic relationship of *Wolbachia* and their fruit fly parasitoid hosts in the *Fopius arisanus* complex.
3. Prathepha, P., Kitthawee, S. and Baimai, V. Molecular systematics of *Fopius* (Hymenoptera: Braconidae) based on 16S and 28S rRNA gene.
4. Supaprom, T., Baimai, V. and Chan-Ard, T. Mitotic karyotypes of seven ranid frogs (Anura: Ranidae) from Thailand.
5. Supaprom, T. and Baimai, V. Mitotic karyotypes of four bufonids frogs (Anura: Bufonidae) from Thailand.
6. Supaprom, T., and Baimai, V. Mitotic karyotypes of two tree frogs (Anura :Rhacophoridae) from Thailand.

B. ความร่วมมือกับนักวิชาการในสถาบันวิจัยต่างประเทศ

โครงการนี้ได้มีนักวิชาการหลายท่านร่วมเป็นอาจารย์ที่ปรึกษานักศึกษาระดับปริญญาเอก พร้อมทั้งให้การช่วยเหลือ และแนะนำงานวิจัยซึ่งเป็นประโยชน์ต่อโครงการเป็นอย่างมาก ดังนี้

Professor Hiroyuki Takaoka, Department of Infectious Disease Control, Faculty of Medicine, Oita Medical University, Japan ผู้เชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของริ้นดำ

Dr. Don Colgan, Head of Evolutionary Biology Unit, The Australian Museum, Sydney, Australia ผู้เชี่ยวชาญด้านชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

Dr. Catherine Walton, Ecology and Evolution Group, School of Biology, University of Leeds, Leeds, England ผู้เชี่ยวชาญด้านประชากรพันธุศาสตร์ และชีววิทยาเชิงโมเลกุลของแมลง

Dr. Scott O'Neill, Head of Department of Zoology and Entomology, University of Queensland, Brisbane, Australia ผู้เชี่ยวชาญด้านจุลินทรีย์ *Wolbachia*

C. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ การบรรยาย และการอบรมดูงานต่างประเทศ

(1) การบรรยายวิชาการและการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการในประเทศ

พ.ศ. 2543

ศาสตราจารย์ ดร. วิสุทธิ ไบไม้ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายในการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง "Dynamics of Biodiversity from Gene to Ecology" ระหว่างวันที่ 2-5 กรกฎาคม 2543 ณ โรงแรมริเจนท์ชะอำบีชรีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

รองศาสตราจารย์ ดร. ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์ ได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง "Dynamics of Biodiversity from Gene to Ecology" ระหว่างวันที่ 2-5 กรกฎาคม 2543 ณ โรงแรมริเจนท์ชะอำบีชรีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

Dr. John R. Milne ได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง "Dynamics of Biodiversity from Gene to Ecology" ระหว่างวันที่ 2-5 กรกฎาคม 2543 ณ โรงแรมริเจนท์ชะอำบีชรีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

นางสาวอัญชลี แซ่หลี่ ได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง "Dynamics of Biodiversity from Gene to Ecology" ระหว่างวันที่ 2-5 กรกฎาคม 2543 ณ โรงแรมริเจนท์ชะอำบีชรีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

Supaprom, T., The diploid chromosome complements and standard karyotypes of two ranid frogs : *Paa fasciculispina* and *Occidozyga martensii*. 26th Congress on Science and Technology of Thailand. 18 –20 October 2000, Bangkok.

โครงการวิจัยนี้ได้จัดให้มีการประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 1 ในวันที่ 28 สิงหาคม 2543 ตั้งแต่เวลา 9.00 น. ถึง 17.00 น. โดยมีผู้เข้าร่วมประชุมทั้งหมด 22 ท่าน นักศึกษา 33 คน (ดังรายชื่อแนบ) ได้มีการนำเสนอผลงานของผู้ร่วมวิจัยจำนวน 5 เรื่อง ดังนี้

1. บรรยายพิเศษเรื่อง "วิวัฒนาการร่วมกับความหลากหลายทางชีวภาพ" โดย ศ.ดร.วิสุทธิ์ ไบไม่ หัวหน้าโครงการฯ
2. พันธุศาสตร์เชิงประชากรของรินดำ โดย รศ.ดร.เจสสิยา กุวังคะดิลก
3. เซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก โดย อจ.ถาวร สุภาพรม
4. ชีววิทยาของแมลงเบียนและแมลงวันผลไม้ โดย รศ.ดร.สังวรณ์ กิจทวี และ ผศ.ดร.ปรีชา ประเทพา
5. *Wolbachia* ในกระบวนการ speciation โดย รศ.ดร.ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์ และ Dr. John Milne

พ.ศ. 2544

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ไบไม่ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง "Biodiversity Research and Training Program in Thailand" ในการประชุมวิชาการ "International Symposium "A centenary celebration of Thai-Danish co-operation in biodiversity" ระหว่างวันที่ 10-11 กุมภาพันธ์ 2544 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ไบไม่ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง "ทิศทางการทำวิจัยการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของสถาบันราชภัฏ" ในการประชุมโครงการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพและสิ่งแวดล้อม ในวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2544 ณ อาคารจันทระเกษมปาร์ค สถาบันราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพฯ

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ไบไม่ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง "การเขียนโครงการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี" ในโครงการ "การฝึกอบรมการเขียนโครงการงานวิจัยและการเขียนบทความงานวิจัย" ในวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2544 ณ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ไบไม่ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง "Genetics and Evolutionary Processes" ในโครงการอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิคเพื่อการศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล ระหว่างวันที่ 19-23 มีนาคม 2544 ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ไบไม่ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง "ความหลากหลายทางชีวภาพ" ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์คณิตศาสตร์ในโรงเรียนครั้งที่ 11 เรื่อง วิทยาศาสตร์

คณิตศาสตร์และเทคโนโลยีกับการปฏิรูปการศึกษา ระหว่างวันที่ 21-23 มีนาคม 2544 ณ สถาบันราชภัฏนครศรีธรรมราช

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ใบไม้ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง “ความหลากหลายทางชีวภาพเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืนและแนวทางการศึกษาวิจัยแบบมีส่วนร่วมในชุมชน” ในการประชุมเชิงปฏิบัติการเพื่อระดมความคิดให้เกิดโครงการศึกษาวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและสิ่งแวดล้อมใน 1 ตำบล วันที่ 28 มีนาคม 2544 ณ วิทยาลัยการอาชีพ ตำบล ท่งก่อ กิ่งอำเภอเวียงเชียงรุ้ง จังหวัดเชียงราย

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ใบไม้ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง “ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย” ในการจัดฝึกอบรมหลักสูตร “ความหลากหลายทางชีวภาพและอนุกรมวิธานพืชและสัตว์ในระบบนิเวศวิทยาเขตร้อนชื้น” ในวันที่ 23 เมษายน 2544 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ใบไม้ ได้รับเชิญให้ไปอภิปรายจิตสำนึกแก่นักวิจัยไทย ในการประชุมวิชาการ “การแสดงผลงานวิทยากรไทย งานอนุรักษ์และพัฒนาด้วยจิตสำนึกแก่นักวิจัยไทย” ในวันที่ 23 มิถุนายน 2544 ณ ศูนย์สารสนเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ใบไม้ ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง “Bio-Diversity (ความหลากหลายทางชีวภาพ)” ในวันที่ 27 มิถุนายน 2544 ณ สมาคมศิษย์เก่าแพทย์ศิริราช โรงพยาบาลศิริราช

ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ใบไม้ ได้รับเชิญเป็นองค์ปาฐก ในหัวข้อ “บทบาทของเกษตรกรและชุมชนในฐานะผู้ปลูกความหลากหลายให้ออกงาม” ในงานประชุมแลกเปลี่ยนประสบการณ์ของเกษตรกรและชุมชนในเวที “ปลูกความหลากหลายให้ออกงาม” ในวันที่ 29 มิถุนายน 2544 ณ ศูนย์ฝึกอบรมสมาคมส่งเสริมสถานภาพสตรี (วិเทรน) ดอนเมือง กรุงเทพฯ

รองศาสตราจารย์ ดร.เจลิยว กุวังคะติลิก บรรยายผลงานวิจัยเรื่อง “การแพร่กระจาย สัตว์ชนิดวิทยา และเซลล์พันธุศาสตร์ของตัวอ่อนรึ้นดำในภาคใต้ของประเทศไทย” ในสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 12 ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2544 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

Kittayapong, P., D. Strickman, S. Yoksan, J.P. Gonzalez and S.L. O'Neill. Current and future approaches in dengue vector control. The International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, November 2000, Chiang Mai, Thailand. (invited by the Organizing Committee and sponsored by WRAIR).

Baimai, V. 2001. Molecular identification of species complexes of *Anopheles malaria* vectors in Thailand and Southeast Asia. The 1st French-Thai Seminar on “New Technologies Applied to Medical Entomology”, 13-15 November, 2001, Mahidol

Univeristy at Salaya Campus, Nakorn Pathom, Thailand. (invited and sponsored by IRD).

Kittayapong, P. 2001. Potential approaches for controlling dengue vectors. The 1st French-Thai Seminar on "New Technologies Applied to Medical Entomology", 13-15 November, 2001, Mahidol Univeristy at Salaya Campus, Nakorn Pathom, Thailand. (invited and sponsored by IRD).

Kittayapong, P. Potential approaches in controlling dengue vectors. The French-Thai Regional Seminar on New Technologies Applied to Medical Entomology. Mahidol University, Salaya Campus, Thailand, November, 2001. (invited by IRD).

Kittayapong, P. Ecological studies of immature vectors and implication for predicting dengue risk. The 2nd French-Thai Regional Seminar on Optimization of Surveillance and Control of Dengue Vectors. Mahidol University, Salaya Campus, Thailand, May, 2002. (invited by IRD).

Kittayapong, P. Community-based dengue vector control: Identification of key factors for success. The 2nd French-Thai Regional Seminar on Optimization of Surveillance and Control of Dengue Vectors. Mahidol University, Salaya Campus, Thailand, May, 2002. (invited by IRD).

2 การบรรยายวิชาการและการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการต่างประเทศ

Jamnongluk, W., P. Kittayapong, V. Baimai, S.L. O'Neill. Molecular phylogeny of *Wolbachia* in insects sampled from rice paddies in Thailand. 2000. The 1st International Conference on Wolbachia, June 2000, Kolymbari, Crete, Greece.

Kittayapong, P., P. Mongkalagoon, T. Ruang-areerate, V. Baimai, K.J. Baisley, R.G. Sharpe and S.L. O'Neill. *Wolbachia* infection in mosquito vectors with emphasis on factors effecting its spreading dynamics. The 1st International Conference on Wolbachia, June 2000, Kolymbari, Crete, Greece.

Kittayapong, P. Practical vector control approaches during dengue outbreak. The meeting for Bangladesh Government Agencies responsible for dengue control, August 2000, Dhaka City, Bangladesh. (invited and sponsored by the ICDDR, B as a short-term consultant during dengue outbreak in Bangladesh).

Baimai, V. The *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. The INCO-Coordination Meeting, 9-12 Janurary 2001, Phnom Penh, Cambordia.

- Kittayapong, P., W. Jamnongluk and V. Baimai. Diversity and distribution of *Wolbachia* infections among tropical tephritid fruit fly parasitoids. The^{2nd} International Conference on *Wolbachia*, June 2002, Kolymbari, Crete, Greece.
- Jamnongluk, W., P. Kittayapong, V. Baimai and S.L. O'Neill. Five distinct *Wolbachia* strains in individual tephritid fruit flies and the phylogenetic relationship between *Wolbachia* and their tephritid hosts. The^{2nd} International Conference on *Wolbachia*, June 2002, Kolymbari, Crete, Greece.
- Ruang-areerate, T., P. Kittayapong and S.L. O'Neill. Horizontal transfer of *Wolbachia* into *Aedes aegypti*, a novel dengue vector host, using direct microinjection. The^{2nd} International Conference on *Wolbachia*, June 2002, Kolymbari, Crete, Greece.
- Wiwattanaratnabutr, S., T. Ruang-areerate and P. Kittayapong. Application of *groE*-homologous gene sequences in *Wolbachia* strain grouping: An example from mosquito hosts. The^{2nd} International Conference on *Wolbachia*, June 2002, Kolymbari, Crete, Greece.
- Kittayapong, P., L. Sanoamuang and W. Jamnongluk. *Wolbachia* infections in tropical fresh water crustaceans: Strain diversity, feminization effect and horizontal transfer between hosts. The^{2nd} International Conference on *Wolbachia*, June 2002, Kolymbari, Crete, Greece.
- Ruang-areerate, T., P. Kittayapong, E.A. McGraw, V. Baimai and S.L. O'Neill. Evidence of host-parasite coevolution: *Wolbachia* replication follows host development. The^{2nd} International Conference on *Wolbachia*, June 2002, Kolymbari, Crete, Greece.
- Kittayapong, P., P. Mongkalagoon, V. Baimai and S.L. O'Neill. Expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of *Wolbachia* superinfected *Aedes albopictus* in relation to host age and crowding effect. The^{2nd} International Conference on *Wolbachia*, June 2002, Kolymbari, Crete, Greece.