การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI เพื่อการระบุชนิดของเพลี้ยอ่อนพืชตระกูลถั่วในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

USE OF A MITOCONTRIAL COI SEQUENCE FOR SPECIES INDENTIFICATION OF LEGUME APHIDS (HEMIPTERA: APHIDIDAE) IN LOWER NORTHERN THAILAND

พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ* และวิสูตร จันทร์อิฐ
PisitPool prasert* and Wisoot Chan-it
Faculty of Science and Technology, PibulsongkramRajabhat University
*corresponding author e-mail: poolprasert_p@psru.ac.th

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการศึกษาถึงชนิดของเพลี้ยอ่อนนี้ยังมีอยู่อย่างจำกัดในประเทศไทยทั้งนี้การจำแนกชนิดยังคงมีความยากเนื่องจากมีลักษณะที่เด่นชัดน้อย ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการระบุชนิดเพลี้ยอ่อนในพืชตระกูลถั่วที่สำรวจได้ในเขตพื้นที่ของจังหวัดสุโขทัย พิษณุโลก และเพชรบูรณ์ ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนในไมโทครอนเดีย 647 bp จากปลาย 5' ของยีน COI และสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ เมื่อวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับเพลี้ยอ่อนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Aphis craccivora, A. gossypii, A. nerrii และ A.glycine ด้วยวิธี Maximum likelihood, Neighbor Joining และ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Meanพบว่า เพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดสามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันอย่างเห็นได้ชัดในทุกๆ วิธีและมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มประชากรของเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดที่ต่ำซึ่งอยู่ระหว่าง 0.00-2.30 เปอร์เซ็นต์บ่งบอกได้ว่าการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถเป็นวิธีการที่ประสบผลสำเร็จได้เป็นอย่างดี ดังนั้น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพต่อการระบุชนิดได้อย่างรวดเร็ว

คำสำคัญ: ยีน COIดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพลี้ยอ่อนพืชตระกูลถั่วภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

Abstract

Nowadays, relatively few faunistic researches have been conducted on aphids in Thailand. Also, the identification of aphids is always difficult due to the shortage of easily

distinguishable morphological characters. Hence, aphid species obtained from Sukhothai, Phitsanulok and Petchabun provinces were molecular identified using DNA barcoding in this time. A 647-bp fragment of mitochondrial DNA from the 5′ region of the mitochondrial cytochrome c oxidase 1 (COI) gene was also reconstructed for phylogenic trees. Based upon phylogenetic relationship among four aphid species i.e. Aphis craccivora, A. gossypii, A. nerriiand A.glycineusing Maximum likelihood, Neighbor Joining andUnweighted Pair Group Method with Arithmetic Meananalyses,it was found that in eachaphid species was well differentiated and assembled a clade with high supportin all methodsand sequence variation within species was low, averaging just 0.00–2.30 percent. In addition, this result implied that DNA barcoding was successful in discrimination of aphid species. Therefore, DNA barcode can be applied as an effective tool for rapid species identification.

Keywords: COI gene, DNA barcode, Legume Aphids, Lower northern Thailand

บทนำ

เพลี้ยอ่อนเป็นแมลงปากดูดจัดอยู่ในวงศ์ Aphididae อันดับ Hemiptera ถือแมลงศัตรูทางการเกษตรที่มีพืชอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะพืชตระกูลถั่วในวงศ์ Fabaceae หรือ Leguminosae ซึ่งมีสมาชิกประมาณ 18,000 ชนิดใน 550 สกุลพบการกระจายได้ทั่วโลก (อุบลวรรณ, 2530; พิสุทธิ์, 2553) เพลี้ยอ่อนสามารถเข้าทำลายพืชทั้งในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยโดยใช้อวัยวะส่วนปากเจาะเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชเพื่อดูดกินน้ำเลี้ยงจนเกิดเป็นรอยแผลทำให้พืชเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสโรคพืช (Miller & Foottit, 2009) ทั้งนี้มีการรายงานของเพลี้ยอ่อนทั่วโลกแล้วประมาณ 5,000 ชนิดโดยพบที่เป็นแมลงศัตรูพืชทางการเกษตรประมาณ 250 ชนิด (Blackman & Eastop, 2000; Miller & Foottit, 2009) สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบเพลี้ยอ่อนทั้งหมดประมาณ 56 ชนิด (Sirikajornjaru, 2002)

ในปัจจุบันการระบุชนิดของเพลี้ยอ่อนมักใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลักซึ่งมีความยุ่งยากและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเท่านั้นเนื่องจากเพลี้ยอ่อนมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในชนิดเดียวกันตามสภาพแวดล้อม (Foottit et al., 2008; Miller & Foottit, 2009) เช่นชนิดของพืชอาศัยปัจจัยทางกายภาพต่าง ๆ หรือช่วงเวลาที่แตกต่างกันของปีเพื่อเป็นการลดปัญหาดังกล่าวข้างต้น ในปัจจุบันจึงได้มีการนำวิธีการทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตรวมถึงนำมาเป็นข้อมูลเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆเช่นการใช้ข้อมูลจากโปรตีน

และข้อมูลจากดีเอ็นเอ (Foottit et al., 2008; Chen et al., 2012) โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่นามาใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้แนวคิดจากการทำบาร์โค้ดสินค้าแล้วประยุกต์นำลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอมาใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำบนพื้นฐานที่ว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะและแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ (Hebert et al., 2003a, b; De Walt, 2011) วิธีการระบุชนิดด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถลดความผิดพลาดของการใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวมีความรวดเร็วในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตและที่สำคัญสามารถใช้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในทุกระยะของการเจริญ (Lee et al., 2011; Chen et al., 2012)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการระบุชนิดของเพลี้ยอ่อนพืชตระกูลถั่วที่ได้จากเขตพื้นที่จังหวัดสุโขทัย พิษณุโลก และเพชรบูรณ์ ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน COI ทั้งนี้สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการระบุชนิดของเพลี้ยอ่อนในพืชตระกูลถั่วที่สำคัญทางเศรษฐกิจอื่น ๆ ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อน

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่พบในพืชตระกูลถั่วพื้นที่ต่าง ๆ จากจังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย และเพชรบูรณ์ ด้วยวิธีการเก็บด้วยมือ (hand picking) ทำการเก็บรักษาตัวอย่างที่ได้ด้วย 95% เอทานอล นำตัวอย่างบางส่วนทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของ ลักขณา และคณะ (2555 ก, ข) และจัดจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยาตามคู่มือหลักของ Blackman & Eastop (2000) และ Sirikajornjaru (2002)

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่บางส่วนของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจได้แต่ละชนิด ๆ 3 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNA extraction kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN) ตามคู่มือที่แนบมาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ย้อม gel ด้วย red safe

การเพิ่มปริมาณดีเอ็น

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ตำแหน่ง Cytochrome c Oxidase I (COI) ขนาด 658 bpเพื่อเพิ่มจำนวนปริมาณของสายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์

สากล (Universal primer) จาก LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') และ HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994) โดยเตรียมสารละลายผสม (Master mixture) ที่มีปริมาตรรวม (Total volume)20 µl ต่อ 1 หลอดโดยที่ 1 หลอดที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Reaction) จะประกอบไปด้วยสาร 5X PCR Enhancer 4 µl, 10X HF Reaction Buffer 3 µl, 10 mMdNTP Mix 0.4 µl, ไพร์เมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.3 µl, เอ็นไซม(Taq DNA polymerase) 0.3 µl น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Nuclease free water) 9.7 µl และ gDNA (Template DNA) 2 µl จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler (BIO-RAD รุ่น C1000™) โดยมีสภาวะของการทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีของ Lee et al. (2011) เป็นดังนี้ initial activation (predenaturaton) 94 °C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย Denaturation 94 °C 1 นาที Annealing 48 °C 1 นาที Extension 72 °C 1 นาที โดยขั้นตอนของ Denaturation, Annealing และ Extentionจะใช้จำนวนรวมเท่ากับ 35 รอบ และรอบสุดท้าย Final Extension 72 °C 5 นาที 1 รอบ ตามลำดับ ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยกระบวนการ Gel electrophoresis เช่นเดียวกับการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและตรวจหาแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นโดยใช้ QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ให้กับบริษัทMacrogenประเทศเกาหลีเพื่อทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ต่อไป

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank จากนั้นทำการวิเคราะห์และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA version 6.0 (Tamura et al., 2013) ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) ของเพลี้ยอ่อนภายในชนิดเดียวกันทั้งภายในประชากรเดียวกันและระหว่างประชากรโดยจะคำนวณหา mtDNA haplotypes (h), haplotype diversity (hd) (Nei, 1987), nucleotide diversity (π) (Tajima, 1983), total number of mutations (m) และ mean number of pairwise nucleotide differences (k) โดยใช้โปรแกรมDnaSp version 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) จากนั้นวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของเพลี้ยอ่อนทั้งระดับชนิดและระดับประชากรด้วยวิธี Maximum likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ) และ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม MEGA version 6.0 (Tamura et al., 2013)

ผลการวิจัย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณปลายส่วยของยีน COI ด้วยด้วยเทคนิคพีซาร์กับชนิดของเพลี้ยอ่อนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Aphiscraccivora, A. gossypii, A. nerriiและ A.glycine สามารถให้ผลผลิตของพีซีอาร์ได้ประมาณ 647 bp เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า นิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกับยีน COI ในฐานข้อมูล GenBank (>97%) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ส่วนนิวคลีโอไทด์(Nucleotide composition) ในเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิด ซึ่งมีสัดส่วนของ Thymine (T = 40.8-41.3%) และ Adenine (A = 34.5-35.1%) สูงในขณะที่ Cytosine (C = 13.8-14.1%) และ Guanine (G = 10.2-10.5%) ต่ำ

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI โดยคำนวณหาmtDNA haplotypes (h), haplotype diversity (hd), nucleotide diversity (π), total number of mutations (m) และ mean number of pairwise nucleotide differences (k) ของเพลี้ยอ่อนในกลุ่มประชากรแต่ละชนิดโดยใช้โปรแกรม DnaSp version 5.10.01 โดยให้ผลของดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม (molecular diversity indices) ของเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดเป็นดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าดัชนีความความหลากหลายทางพันธุกรรมของเพลี้ยอ่อนสกุลใน Aphis จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI

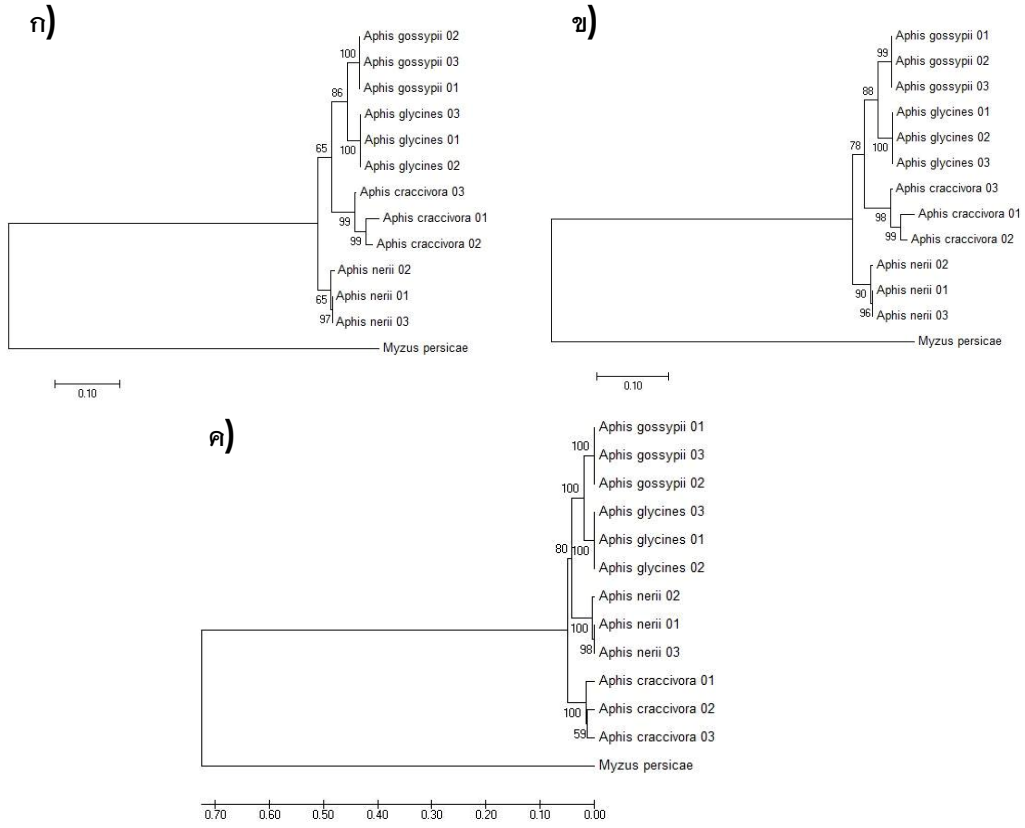
ดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม (molecular diversity indices)						
ชนิด (Species)	**n**	**No.**	**S**	**k**	**h (±SD)**	**π(±SD)**
Aphis gossypii	3	1	0	0.000	0.000 (±0.000)	0.00000 (±0.00000)
A.nerii	3	2	2	1.333	0.667 (±0.314)	0.00206 (±0.00097)
A. glycine	3	1	0	0.000	0.000 (±0.000)	0.00000 (±0.00000)
A.craccivora	3	3	18	15.000	1.000 (±0.272)	0.02318 (±0.00635)

หมายเหตุ: n =sample size, No. = number of haplotypes (No.), S = number of polymorphic (segregating) sites, k = average number of nucleotide differences, h = haplotype diversity with standard deviation (SD) และπ = nucleotide diversity.

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเพลี้ยอ่อนกลุ่มประชากรระหว่างชนิด (n เท่ากับ 12 ชนิดละ 3 ตัวอย่าง) พบจำนวน haplotype(No.) เท่ากับ 7 รูปแบบ, number of polymorphic (segregating) sites(S) เท่ากับ 95 ตำแหน่ง, mtDNA haplotypes (h) เท่ากับ 7 รูปแบบ, haplotype diversity (hd) (±SD) เท่ากับ 0.894 (±0.063), nucleotide diversity (π) (±SD) เท่ากับ 0.06367 (±0.00638), total number of mutations (m) เท่ากับ 110 ตัว และ mean number of pairwise nucleotide differences (k) เท่ากับ 41.197 ตามลำดับและเมื่อ

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ) และ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) โดยมีเพลี้ยอ่อน Myzuspersicae เป็น outgroupสำหรับแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มชนิดของเพลี้ยอ่อนทั้ง 4 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจนดังภาพที่ 1

นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากเพลี้ยอ่อนในสกุล Aphis ทั้ง 4 ชนิด มาทำการวิเคราะห์หาระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) พบว่า โดยภาพรวมมีระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ย (d) (± S.E.) เท่ากับ 0.047 (±0.007) ทั้งนี้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COIจากเพลี้ยอ่อนทั้ง 4 ชนิดมีค่าอยู่ในช่วง 2.8 ถึง 5.6 เปอร์เซ็นต์ซึ่งพบว่าค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แปรผันจาก 2.8% (A.glycineกับA. gossypii) ถึง 5.6% (A. glycineกับ A. nerii)



ภาพที่ 1แผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพลี้ยอ่อนในสกุล Aphis จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนCOI ด้วยวิธี ก) Maximum likelihood (ML), ข) Neighbor Joining (NJ) และ ค) Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ตามลำดับ

อภิปรายผล

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาทางด้านชีววิทยาโมเลกุลกับเพลี้ยอ่อนพืชตระกูลถั่วในสกุลAphis 4 ชนิด ในวงศ์ Aphididae ได้แก่ Aphis craccivora,A.glycines, A. gossypii และ A. nerii ที่สำรวจในเขตพื้นที่จากจังหวัดสุโขทัย พิษณุโลก และเพชรบูรณ์โดยเลือกใช้วิธีการศึกษาแบบดีเอ็นเอบาร์โค้ด จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ผลการศึกษาไพรเมอร์สากลสามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ประมาณ 647 bp ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ยขององค์ประกอบของไนโตรจีนัสเบสระหว่าง Adenine และ Thymine(A-T) ในเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดเท่ากับ 75.3-76.4% ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะที่พบในยีน COI ของสัตว์ (Hebert et al. 2003a) ทั้งนี้ตำแหน่งการพบมิวเทชันหรือการกลายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดของเพลี้ยอ่อน A.gossipiiและ A. glycine ในขณะที่เพลี้ยอ่อน A. nerii และ A. craccivora มีลำดับการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ ตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphic sites) ในยีน COI ทั้งหมด 2 ตำแหน่ง และ 18 ตำแหน่ง ตามลำดับ โดยรูปแบบการเกิดเป็นแบบทั้ง transversion mutation (A<->T, A<->C, G<->T หรือ G<->C) และ และแบบ transition mutation (A<->G หรือ T<->C) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึมที่น้อยหรือไม่เกิดเลยนี้ เป็นไปได้ว่าจำนวนตัวอย่างที่ใช้น้อยเกินไป ซึ่งในความเป็นจริงในยีน COI (mtDNA) มักจะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ที่สูงกว่ายีนในนิวเครียสถึง10 เท่า (nucDNA) (Tuppen, 2010) แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึมที่พบระหว่างชนิดของเพลี้ยอ่อนทั้ง 4 ชนิด นั้น สามารถพบได้ถึง 95 ตำแหน่ง จึงสามารถเลือกยีน COI ในการศึกษาถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดได้ ในส่วนของความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) ภายในชนิดของเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดนั้นมีค่าต่ำ (0.00-2.30%) เป็นไปได้ว่าการไหลของยีน (gene flow) ยังคงเกิดขึ้นในกลุ่มประชากรของเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิด ทั้งนี้ตัวอย่างที่ได้ยังอยู่ในภูมิภาคหรือมีความเป็นภูมิศาสตร์เดียวกันอยู่ ทั้งนี้การศึกษาของ Wongsa et al. (2016) กับประชากรเพลี้ยอ่อน A.craccivora ตามเขตภูมิศาสตร์ของประเทศไทยด้วยยีน COIพบว่ามีค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดมีค่าค่อนข้างต่ำ (0.10-0.87 เปอร์เซ็นต์) เช่นกัน แต่สำหรับความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยอ่อนประชากรในภาคใต้ที่มีค่าสูงที่สุดโดยเฉพาะมีความแตกต่างจากประชากรในเขตภาคเหนือนั้น อธิบายได้ว่า ประชากรของเพลี้ยอ่อนมีความเป็นไปได้ว่ามีการอพยพเคลื่อนย้าย (migration) มาจากที่เขตภูมิภาคอื่นที่ใกล้เคียง ซึ่งการศึกษาของ Obopile&Ositile (2010) ได้ให้เหตุผลเพิ่มอีกว่า เป็นไปได้ว่าเพลี้ยอ่อนมักจะไม่สามารถอยู่รอดได้ในพื้นที่มีความชุ่มชื้นโดยเฉพาะในฤดูฝนเหมือนดังในเขตของภาคใต้ของประเทศไทย นอกจากนี้การที่เพลี้ยอ่อนเองมีความสามารถในการสืบพันธุ์แบบที่สามารถออกลูก

เป็นตัวโดยไม่ต้องได้รับการผสมพันธุ์ (parthenogenesis) อาจส่งผลไปยังภายในกลุ่มประชากรให้มีความแตกต่างของยีนที่ต่ำได้

เมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์จากเพลี้ยอ่อนทั้ง 4 ชนิดมาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ) และ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) พบว่า เพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดมีวิวัฒนาการแบบเดี่ยว (monophyletic group) อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องการศึกษาของ Lee et al. (2011) ที่ศึกษา COI ในกลุ่มของเพลี้ยอ่อนในคาบสมุทรเกาหลี จาก 154 ชนิด ใน 72 สกุล 11 วงศ์ย่อยของวงศ์ Aphididae ด้วยวิธี NJ และพบว่าค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก 2.8% (A. glycineกับ A. gossypii) ถึง 5.6% (A. glycineกับ A. nerii)

ทั้งนี้เพื่อให้งานวิจัยมีชนิดของเพลี้ยอ่อนที่หลากหลายและมีโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรของเพลี้ยอ่อนในประเทศไทยมีความสมบูรณ์มากขึ้น มีข้อเสนอแนะว่า ควรเพิ่มการเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อนในแต่ละชนิดให้มากขึ้น ศึกษาชนิดที่สัมพันธ์กับพืชอาหารอื่นและศึกษาในเขตพื้นที่อื่น รวมทั้งการศึกษาในยีนอื่น ๆ อาทิ 16S rDNA, ITS (Internal transcribed spacer) เพิ่มเติมร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพต่อการระบุชนิดได้อย่างรวดเร็วโดยเฉพาะแมลงที่มีความสำคัญทางการเกษตรชนิดอื่น ๆ ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดเพลี้ยอ่อนพืชตระกูลถั่ววงศ์ Aphididae จำนวน 4 ชนิดสามารถแยกความแตกต่างของเพลี้ยอ่อนทั้งหมดออกจากกันได้อย่างชัดเจนและใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้เป็นอย่างดีซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะถูกรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเพลี้ยอ่อนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณแหล่งทุนจากการสนับสนุนการวิจัย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา (HERP 2559) และมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

พิสุทธิ์ เอกอำนวย. (2553). **โรคและแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ.** พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่: สวนสัตว์แมลงสยามแม่ริมเชียงใหม่. หน้า 591.

ลักขณา บำรุงศรี, ศิริณี พูนไชยศรี, ชลิดา อุณหวุฒิ, ยุวรินทร์ บุญทบ, ณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม และสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. (2555ก). **อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนวงศ์ย่อย Hormaphidinae**. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 2076–2086.

ลักขณา บำรุงศรี, สุนัดดา เชาวลิต, ชมัยพร บัวมาศ, อิทธิพล บรรณาการ และชฎาภรณ์ เฉลิมวิเชียรพร. (2555ข). **อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนเผ่า Macrosiphini**. รายงานผลงานวิจัยประจาปี 2555. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 2087–2098.

อุบลวรรณ อุโพธิ์. (2530). **พรรณไม้ในวงศ์ถั่ว**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (2000). **Aphids on the World's Crops: An identification and information guide**. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Chen, R., Jiang, L.Y., & Qiao, G.X. (2012). The effectiveness of three regions in mitochondrial genome for aphid dna barcoding: a case in Lachininae. **Plos One**, 7(10), e46190

De Walt, R.E. (2011). DNA barcoding: a taxonomic point of view. **Journal of the North American Benthological Society**, 30(1),174–181.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., &Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 3, 294–299.

Foottit, R.G., Maw, H.E.L., von Dohlen, C.D. & Hebert, P.D.N. (2008). Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. **Molecular Ecology Resources**, 8, 1189–1201.

Hebert, P.D.N, Cywinska, A., Ball, S.L., & de Waard, J.R. (2003a).Biological identifications through DNA barcodes.**Proceedings of the Royal Society B**, 270, 313–321.

Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. &deWaard,J.R. (2003b). Barcoding animal life: cytochromecoxidase subunit 1 divergences among closelyrelated species. **Proceedings of the Royal Society B**, 270, S96–S99.

Lee, W., Kim, H., Lim, J., Choi, H.R., Kim, Y., Kim, Y. S., Ji, J.Y., Foottit, R.G. &Lee, S. (2011). Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: updating the global data set. **Molecular Ecology Resources**, 11, 32–37.

Miller, G.L. &Foottit, R.G. (2009). **The Taxonomy of Crop Pests: The Aphids**, in Insect Biodiversity: Science and Society (eds R. G. Foottit and P. H. Adler), Wiley–Blackwell, Oxford, UK.

Nei, M. (1987). **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia Univ. Press, New York.

Obopile, M., & Ositile, B., (2010). Life table and population parameters of cowpea aphid, Aphis craccivoraKoch(Homoptera: Aphididae) on five cowpea Vignaunguiculata(L. Walp.) varieties. **Journal of Pest Science**, 83, p.9–14.

Librado, P.&Rozas, J. (2009).DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25, 1451–1452.

Sirikajornjaru, W. (2002).**Taxonomic study of aphids (Homoptera: Aphididae) in Northern Thailand**. Doctor of Philosophy Dissertation (Biology), Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.

Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, 105, 437–460.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. &Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30, 2725–2729.

Tuppen, H.A.L., Blakely, E.L., Turnbull, D. M. &Taylor.R.W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. **BiochimicaetBiophysicaActa**, 1797, 113–128.

Wongsa, K., Jeratthitikul, E., Sangthongpraow, B., Poolprasert, P. & Rattanawannee, A. (2016). Genetic variation among the geographic populations of cowpea aphid, Aphis craccivora Koch (Hemiptera: Aphididae), in Thailand inferred from COI gene sequences. **The 5th Burapha University International Conference 2016**. Bangsaen, Chonburi, Thailand, 132-141.