

สัณฐานวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ กลุ่ม *Bactrocera tau* ซับซ้อน ในภาคใต้ของประเทศไทย

ปัทมา สมศิลป์¹ ดวงดา จุลศิริกุล² ภควดี รักษ์ทอง¹ และ สังวรณ กิจทวี^{3*}

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

²คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ³คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

*corresponding author e-mail: sangvorn.kit@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera tau* ซับซ้อน จากการเก็บตัวอย่างไม้ผลที่มีร่องรอยการถูกทำลายโดยแมลงวันผลไม้ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนกระทั่งแมลงวันผลไม้มีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย นำแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ทั้งหมด 242 ตัว (เพศผู้ 116 ตัว และเพศเมีย 126 ตัว) จากไม้ผล 5 ชนิด คือ ฟักทอง (*Cucurbita moschata*, CM) มะระขี้นก (*Momordica charantia*, MCh) แตงโม (*Citrullus lanatus*, CL) ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis*, MC) และแตงร้าน (*Cucumis sativus*, CS) ทำการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาเชิงการวัดของรูปร่างปีกด้วยเทคนิคจีโอเมตริก มอร์โฟเมตริกส์ (geometric morphometrics) โดยออกแบบตำแหน่งจุดตัดหลักของเส้นลายปีก 13 จุด บนตัวอย่างปีกแมลงวันผลไม้ ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มอ้างอิง *B. tau* A และ *B. tau* C ด้วยการวัดระยะทางมาฮาลานอบิส (mahalanobis distance) และโพรครัสเตส (procrustes distance) แล้วยืนยันการจัดจำแนกอีกครั้งด้วยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่ม (discriminant analysis) พบว่าแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ของภาคใต้ มีการแยกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *B. tau* A, *B. tau* C และ *B. tau* ชนิดใหม่ นอกจากนี้ยังพบว่าผลการวิเคราะห์ทั้งเพศผู้และเพศเมียสามารถจัดจำแนกได้ในทิศทางเดียวกัน เพื่อเป็นการยืนยันผลข้างต้นจึงทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนบริเวณไซโตโครมอีออกซิเดสวัน (Cytochrome Oxidase I: COI) ด้วยเทคนิค SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) พบว่ามีรูปแบบของพันธุกรรมที่แตกต่างกัน 23 รูปแบบ นำรูปแบบต่างๆ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ซึ่งยืนยันว่าแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม และให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิคจีโอเมตริก มอร์โฟเมตริกส์ การพบ *B. tau* ชนิดใหม่อยู่ร่วมกับ *B. tau* C ในประชากรเดียวกันนั้น บ่งบอกว่าการแบ่งแยกสายพันธุ์ของ *B. tau* ซับซ้อนอยู่ในรูปแบบการแบ่งแยกสปีชีส์แบบซิมแพตริก (sympatric speciation)

คำสำคัญ: *Bactrocera tau* ซับซ้อน พันธุกรรมระดับโมเลกุล สัณฐานวิทยาเชิงการวัด

MORPHOLOGY AND GENETIC DIVERSITY OF THE *BACTROCERA* *TAU* COMPLEX IN SOUTHERN THAILAND

Pattama Somsill¹, Duangta Julsirikul², Pakavadee Rakthong¹ and Sangvorn Kitthawee^{3*}

¹ Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University,

² Faculty of Science, Burapha University, ³ Faculty of Science, Mahidol University

*corresponding author e-mail: sangvorn.kit@mahidol.ac.th

Abstract

The aim of this research was to study geometric morphometrics and genetic diversities of the *Bactrocera tau* complex. Fruit infested with larval fruit flies were collected and brought to the laboratory until the adults emerged. A total of 242 adult specimens (116 males and 126 females) were obtained from five host plants: pumpkin (*Cucurbita moschata*, CM), bitter melon (*Momordica charantia*, MCh), watermelon (*Citrullus lanatus*, CL), gac fruit (*Momordica cochinchinensis*, MC) and cucumber (*Cucumis sativus*, CS). Thirteen landmarks on the wing specimens were designed and used in the geometric morphometric analysis. The specimens were distinguished and classified based on the referenced data (*B. tau* A and *B. tau* C). They were investigated using Mahalanobis and Procrustes distances following with discriminant analysis. The classification gave three separated groups: *B. tau* A, *B. tau* C and *B. tau* undescribed species in both males and females. When the specimens were tested in Cytochrome Oxidase I (COI) using Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique, twenty three haplotypes were found for this species complex. Furthermore, these haplotypes were sequenced and aligned for phylogenetic tree analysis. The phylogenetic tree provided the genetic diversity and discrimination among the *B. tau* species complex which were agreed with geometric morphometric analysis. These three species can be found in the same fruit species, such as gac fruit, in southern Thailand. Our findings seem to suggest that the undescribed species within the *B. tau* complex has arisen through sympatric speciation.

Keywords: *Bactrocera tau* complex, molecular genetics, geometric morphometrics

บทนำ

แมลงวันผลไม้ (fruit flies) สกุล *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) ทำความเสียหายรุนแรงในไม้ผล และพบระบาดอยู่ทั่วไป (White & Elson-Harris, 1992; Aluja et al., 1996; Armstrong & Jang, 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชียและออสเตรเลีย แมลงวันผลไม้หลายสปีชีส์ในสกุล *Bactrocera* ทำความเสียหายทางการเกษตรอย่างรุนแรง (Fletcher, 1987; Han

et al., 1994; White, 1996; Kinnear et al., 1998; Kim et al., 1999) สำหรับในประเทศไทยมีการสำรวจพบหลายชนิด เช่น *Bactrocera dorsalis* (Handel) (Somta et al., 2010; Aketarawong et al., 2011) *Bactrocera correcta* (Bezzi), *Bactrocera carambolae* (Kittayapong et al., 2000), *Bactrocera cucurbitae* และ *Bactrocera latifrons* (Hendel) (Somta, et al., 2010), *Bactrocera tau* (Dujardin & Kitthawee, 2013) และแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ จากรายงานการสำรวจแมลงวันผลไม้และแมลงเบียนโดย Chinajariyawong et al. (2000) พบว่าแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* ซ้ำซ้อน ทำลายไม้ผล เช่น มะม่วง ชมพู่ พุทรา ฝรั่ง สะตอ มะค่าโมง เป็นต้น นอกจากนี้ *B. carambolae* (ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *B. dorsalis* ซ้ำซ้อน) (Drew & Hancock, 1994) ทำลายไม้ผล เช่น มะเฟือง มะม่วง ฝรั่ง ชมพู่มะเหมี่ยว เป็นต้น (Sauers-Muller, 2005)

B. tau เป็นแมลงวันผลไม้ที่พบได้ในประเทศไทย และอีกหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถทำลายไม้ผลและพืชผักชนิดผลมากกว่า 50 ชนิด เช่น บวบ ฟักทอง มะระจีน มะระจีน มะเขือเทศ และกลุ่มพืชตระกูลแตง (Huque, 2006; Wang et al., 2006) เป็นต้น ปัจจุบันพบความแตกต่างในกลุ่ม *B. tau* ซ้ำซ้อนอย่างน้อย 7 ชนิด ได้แก่ *B. tau* A, C, D, E, F, G และ I (Baimai et al., 2000) การจำแนกแมลงกลุ่มนี้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาทางสัณฐานวิทยาโดยพิจารณาจากลักษณะภายนอก เช่น แถบสีส่วนหัว ส่วนลำตัว ส่วนปีก (White & Elson-Harris, 1992) และการจำแนกลักษณะอวัยวะวางไข่ (ovipositor) (Sumrandee et al., 2011) เป็นต้น นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Kitthawee & Dujardin (2010) ใช้เทคนิคจีโนมเมทริกมอร์โฟเมทริกส์ จำแนกรูปร่างเรขาคณิตของเส้นลายปีกพบว่าสามารถแยกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซ้ำซ้อนออกจากกันได้ ทั้งนี้ยังสามารถใช้วิธีพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ (cytogenetics) เช่น การวิเคราะห์ไมโทติกโครโมโซม (mitotic chromosome) (Baimai et al., 2000) เป็นต้น การตรวจวิเคราะห์ระดับโมเลกุล เช่น การวิเคราะห์แอลโลไซม์ (allozyme) (Saelee et al., 2006; Shi et al., 2014) การจำแนกชนิดโดยใช้ยีน 16S rRNA ร่วมกับยีน 12S rRNA (Smith et al., 2003) และการศึกษาความผันแปรของยีนบริเวณไซโตโครมออกไซด์เตสวิน (Cytochrome Oxidase I: COI) ของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA) (Jamnongluk et al., 2003; Prabhakar et al., 2013) เป็นต้น

การพบแมลงวันผลไม้ที่แตกต่างกันนั้นล้วนมีผลจากความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากวิวัฒนาการเพื่อการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาทั้งความผันแปรทางสัณฐานวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมทั้งสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซ้ำซ้อน ในภาคใต้ของประเทศไทย ผลการวิจัยนี้จะช่วยให้ทราบถึงความหลากหลายของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. tau* ซ้ำซ้อน รวมทั้งการเข้าทำลายพืชผลต่าง ๆ ซึ่งจะนำไปสู่การวางแผนควบคุมแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอื่น ๆ

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและจำแนกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อน

เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากไม้ผลวงศ์ Cucurbitaceae ที่มีร่องรอยการทำลายของแมลงวันผลไม้ ทั้งผลที่อยู่บนต้นและที่หล่นตามพื้นดินจากท้องที่ต่าง ๆ ในพื้นที่จังหวัด ระนอง (RN) สุราษฎร์ธานี (SI) และสตูล (SL) บันทึกชื่อไม้ผล และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของสถานที่เก็บตัวอย่างไม้ผล (ตารางที่ 1) นำไม้ผลที่มีหนอนแมลงวันผลไม้ใส่ในภาชนะพลาสติกขนาด 17x24x8 เซนติเมตร ที่มีซี่เลื่อยรองรับตัวหนอนที่ออกมาเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ จนกระทั่งแมลงวันผลไม้มีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย เลี้ยงตัวเต็มวัยด้วยน้ำและน้ำผึ้ง (ความเข้มข้น 10%) ในกรงพลาสติกขนาด 22x32x18 เซนติเมตร ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้น $75 \pm 5\%$ ประมาณ 10-14 วันหรือจนกระทั่งมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ จำแนกสปีชีส์และสปีชีส์ใกล้เคียงโดยวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก ตามคำอธิบายของ White & Elson-Harris (1992) และ Sumrandee et al. (2011) นำแมลงวันผลไม้ *B. tau* ตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% เพื่อการจัดจำแนกด้วยเทคนิคจีโอเมทริก มอร์โฟเมทริกส์ และเทคนิค SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

ตารางที่ 1 ชื่อพืชอาศัย จังหวัด ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์และจำนวนตัวอย่างแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อน

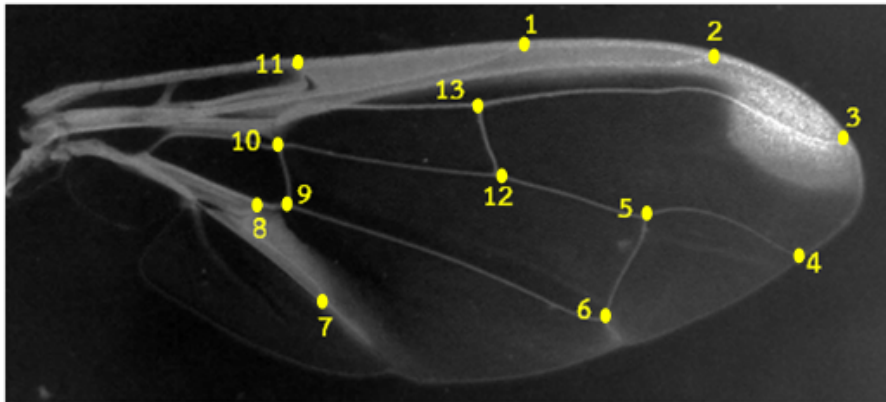
พืชอาศัย	จังหวัด	รหัส	ละติจูด	ลองจิจูด	จำนวนตัวเต็มวัย	
					เพศผู้	เพศเมีย
ฟักทอง (<i>Cucurbita moschata</i>)	ระนอง	RN(CM)-0049	N9°36'20"	E98°36'47"	4	7
มะระขี้นก (<i>Momordica charantia</i>)	ระนอง	RN(MCh)-0065	N9°22'17"	E98°27'32"	4	6
แตงโม (<i>Citrullus lanatus</i>)	สุราษฎร์ธานี	SI(CL)-0038	N9°45'59"	E99°22'1"	2	6
ฟักข้าว (<i>Momordica cochinchinensis</i>)	สุราษฎร์ธานี	SI(MC)-0061	N9°8'18"	E99°22'10"	25	26
ฟักข้าว (<i>Momordica cochinchinensis</i>)	สุราษฎร์ธานี	SI(MC)-0066	N9°5'20"	E99°21'47"	27	27
ฟักข้าว (<i>Momordica cochinchinensis</i>)	สุราษฎร์ธานี	SI(MC)-0068	N9°5'54"	E99°21'47"	27	27
แตงร้าน (<i>Cucumis sativus</i> L.)	สตูล	SL(CS)-0003	N6°55'29"	E99°49'52"	27	27
รวม					116	126
ข้อมูลอ้างอิง*						
<i>Bactrocera tau</i> A		KN(CG)26			12	14
<i>Bactrocera tau</i> C		NA(MC)16			21	21

* Kitthawee & Dujardin, (2010)

2. การวิเคราะห์รูปร่างทางสัณฐานวิทยาโดยใช้เทคนิคจีโอเมทริก มอร์โฟเมทริกส์

เตรียมปีกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* โดยตรึงปีกบนสไลด์ด้วยสารละลาย Hoyer ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วนำไปบันทึกภาพปีกด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (stereo

microscope) ภาพที่ได้นำไปออกแบบตำแหน่งหลักบนเส้นลายปีก (landmarks) ตามวิธีการของ Bookstein แบบที่ 1 คือแบบจุดตัดที่ชัดเจน (Bookstein, 1991) ได้ตำแหน่งหลักทั้งหมด 13 จุด (ภาพที่ 1) เก็บข้อมูลของจุดตัดในรูปพิกัด (X, Y) โดยซอฟต์แวร์โมดูล (software module) COO ของชุดโปรแกรม CLIC (Collecting Landmarks for Identification and Characterization) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่พัฒนาโดยศาสตราจารย์ Jean-Pierre Dujardin (<http://www.mpl.fr/morphometrics>) ข้อมูลจากแต่ละจุดของตำแหน่งหลักจะอยู่ตรงกันในทุกตัวอย่าง ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตำแหน่งหลัก 13 จุด บนเส้นปีกของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau*

ข้อมูลจุดพิกัดทั้งหมดจะเข้าสู่กระบวนการแปลงค่าให้อยู่ในรูปแบบพร้อมใช้โดยอาศัยซอฟต์แวร์โมดูล TET ข้อมูลที่อยู่ในรูปแบบ (format) แล้วจะนำมาวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์โมดูล MOG โดยวิธีการซ้อนทับของจุดตำแหน่งหลักที่ตรงกัน (superimposition) เพื่อให้จุดตำแหน่งหลักของแต่ละปีกทับกันสนิทที่สุด (homologous landmarks) หลังจากนั้นจึงทำการกำจัดอิทธิพลจากความแปรปรวนต่าง ๆ เช่น กำลังขยายของการถ่ายภาพ ขนาดของปีก และอื่น ๆ อาศัยวิธีการปรับเลื่อน ปรับขนาดให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน และการหมุน ให้เกิดความแตกต่างของระยะห่างของจุดตำแหน่งหลักน้อยที่สุด ซึ่งไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ด้วยซอฟต์แวร์โมดูล MOG ของชุดโปรแกรม CLIC ร่วมกับการวิเคราะห์แบบหลายตัวแปร (multivariate analysis) เช่น การวิเคราะห์การจำแนกกลุ่ม (discriminant analysis)

3. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลด้วยเทคนิค SSCP

ทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด (total genomic DNA) จากส่วนอกของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* (ท้องและขาเก็บไว้เพื่อเป็นหลักฐานประกอบหรือการยืนยันข้อมูล) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Cockbern & Fritz (1996) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ COI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ COI-F: 5'TGGAGACGACCAAATCTA3' และ COI-R : 5'GAGGAAATACCAGCTAAATG3' ตามขั้นตอนดังนี้ pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย ปฏิกิริยาลูกโซ่ 30 รอบ (denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที) และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่

ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSCP โดยดัดแปลงจาก Julsirikul & Kitthawee (2015) บนอะครีลาไมด์เจล แล้วย้อมสีด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท แผลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI จะแสดงรูปแบบแฮปโลไทป์ (SSCP haplotype) ที่แตกต่างกัน เก็บข้อมูลรูปแบบแฮปโลไทป์ของแผลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ทุกตัว เพื่อนำมาวิเคราะห์หาความถี่ของแฮปโลไทป์ และความหลากหลายของแฮปโลไทป์ โดยใช้โปรแกรม Arlequine ver. 3.1 (Excoffier et al., 2005)

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ทำโดยการนำดีเอ็นเอของแผลงวันผลไม้ *B. tau* จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งแสดงรูปแบบ SSCP แฮปโลไทป์ของยีน COI ที่แตกต่างกันทุกรูปแบบ มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์อีกครั้ง เพื่อนำผลผลิตไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสองทาง (bi-directional) ที่หน่วยวิจัยโรงพยาบาลรามธิบดี ตรวจสอบและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน COI ของแผลงวันผลไม้ *B. tau* ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura et al., 2011) โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Neighbor-Joining และหาความเชื่อมั่นของแผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการ bootstrap 1000 รอบ

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการจำแนกแผลงวันผลไม้ตามอนุกรมวิธาน

การศึกษานี้เก็บตัวอย่างจากแผลงวันผลไม้ กลุ่ม *B. tau* จำนวน 242 ตัว (เพศผู้ 116 ตัว และเพศเมีย 126 ตัว) จากไม้ผลตัวอย่าง 5 ชนิด คือ ฟักทอง (*Cucurbita moschata*, CM) มะระขี้นก (*Momordica charantia*, MCh) แตงโม (*Citrullus lanatus*, CL) ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis*, MC) และแตงร้าน (*Cucumis sativus*, CS) ที่มีร่องรอยจากการทำลายของแผลงวันผลไม้ในพื้นที่จังหวัดระนอง (RN) สุราษฎร์ธานี (SI) และสตูล (SL) (ตารางที่ 1) เมื่อจัดจำแนกชนิดแผลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* เบื้องต้นโดยวิธีศึกษาสัณฐานวิทยาตามอนุกรมวิธานของ White & Elson-Harris (1992) และ Sumrandee et al. (2011) พบว่าเป็นกลุ่ม *B. tau* ซับซ้อนประกอบด้วย *B. tau* A และ *B. tau* C ซึ่งในกลุ่ม *B. tau* C มีรูปร่างลักษณะของปลายอวัยวะวางไข่เป็นสามแฉก (trilobe) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของ *B. tau* C และ I (Sumrandee et al., 2011) เมื่อพิจารณารายละเอียดอื่นๆ แล้วพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปเหมือนกับ *B. tau* C แต่มีความแปรผันของรายละเอียดปลีกย่อย เพื่อให้เกิดความชัดเจนในการจำแนกแผลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อนในการศึกษานี้จึงใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาเชิงการวัดด้วยเทคนิคจีโอเมตริก มอร์โฟเมตริกส์ และอนุชีววิทยา ด้วยวิธี SSCP ในการจัดจำแนก

2. การศึกษารูปร่างทางสัณฐานวิทยาของแผลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อน โดยใช้เทคนิคจีโอเมตริก มอร์โฟเมตริกส์

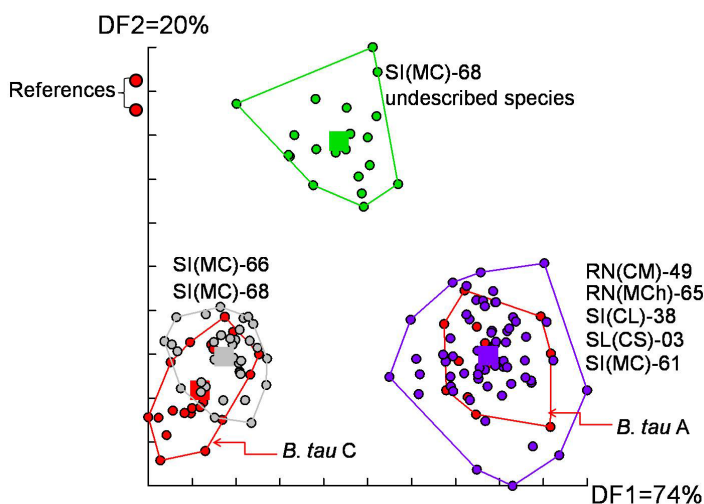
การแบ่งกลุ่มอาศัยการเปรียบเทียบรูปร่างทางเรขาคณิตของเส้นปีกแผลงวันผลไม้ *B. tau* ซับซ้อนทั้งหมดเทียบกับข้อมูลอ้างอิง *B. tau* A และ *B. tau* C ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้รับการยืนยันทางพันธุกรรมมาก่อน (Kitthawee & Dujardin, 2010) โดยวิธีตัดสินจากระยะห่างที่สั้นที่สุดของทั้งมาฮาลานอบิส (mahalanobis distance) และโพรครัสเตส (procrustes distance) (Dujardin et al., 2010) พบว่าแผลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มประกอบด้วย *B. tau* A, *B. tau* C และ *B. tau* ชนิดใหม่ (ตารางที่ 2) จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์

การจำแนกกลุ่ม (discriminant analysis) เพิ่มเติม ผลของการจำแนกกลุ่มได้จากผลรวมของปัจจัยการจำแนก (discriminant factors, DF) DF 94% (ประกอบด้วย DF1=74%, DF2=20%) ซึ่งยืนยันการแยกแต่ละกลุ่มออกจากกัน ทำให้ทราบว่าแมลงวันผลไม้ *B. tau* ซับซ้อนประกอบด้วย *B. tau* A, *B. tau* C และ *B. tau* ชนิดใหม่ (ภาพที่ 2) การวิเคราะห์ในเพสเมียสามารถจำแนกได้ผลเช่นเดียวกับในเพสผู้ นอกจากนี้ยังพบว่า *B. tau* A ได้จากประชากรของผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ส่วน *B. tau* C และ *B. tau* ชนิดใหม่ พบเฉพาะในฟักข้าว (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การจำแนกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อน โดยวิธีการวัดระยะห่างมาฮาลานอบิส (mahalanobis distance) และโปรครัสเทส (procrustes distance) เทียบกับข้อมูลอ้างอิง *B. tau* A และ *B. tau* C

รหัส	N*	จำนวนเพสผู้			N*	จำนวนเพสเมีย		
		<i>B. tau</i> A	<i>B. tau</i> C	<i>B. tau</i> ใหม่		<i>B. tau</i> A	<i>B. tau</i> C	<i>B. tau</i> ใหม่
RN(CM)-0049	4	4	-	-	7	7	-	-
RN(MCh)-0065	4	4	-	-	6	6	-	-
SI(CL)-0038	2	2	-	-	6	6	-	-
SI(MC)-0061	25	25	-	-	26	26	-	-
SI(MC)-0066	27	-	27	-	27	-	27	-
SI(MC)-0068	27	-	7	20	27	-	19	8
SL(CS)-0003	27	27	-	-	27	27	-	-
รวม	116	62	34	20	126	72	46	8

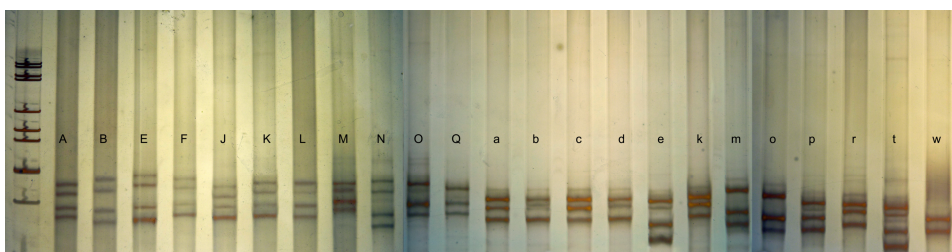
หมายเหตุ N* = จำนวนตัวเต็มวัย



ภาพที่ 2 การจำแนกกลุ่ม *B. tau* ซับซ้อนโดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่ม (discriminant analysis) เทียบกับข้อมูลอ้างอิง *B. tau* A และ *B. tau* C ค่า DF1 และ DF2 คือปัจจัยการจำแนกกลุ่ม (discriminant factors)

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อนโดยใช้เทคนิค SSCP

พบรูปแบบของแอสไพโลไทป์ที่แตกต่างกัน 23 รูปแบบ (ภาพที่ 3) โดยแอสไพโลไทป์ A เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดในเกือบทุกประชากร แอสไพโลไทป์ A, E, F, J, K, L, M, N, O และ Q พบในประชากรที่ได้จากพืชทั้ง 5 ชนิด คือ พักทอง มะระขึ้นก แตงโม พักข้าว และแตงร้าน ซึ่งมีความหลากหลายของแอสไพโลไทป์ในแต่ละประชากรแตกต่างกันตั้งแต่ 0-0.81 ส่วนแอสไพโลไทป์ a, b, c, d, e, k, m, o, p, r, t และ w พบเฉพาะในประชากรที่ได้จากผลพักข้าว (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาค่าความหลากหลายของแอสไพโลไทป์ พบว่าประชากร SI(MC)-0068 มีค่าความหลากหลายของแอสไพโลไทป์สูงที่สุด (0.85) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่พบว่าในประชากรนี้จำแนกได้ถึง 2 สายพันธุ์ในตารางที่ 2



ภาพที่ 3 รูปแบบทางพันธุกรรมของยีนบริเวณ Cytochrome Oxidase I (COI) ของแมลงวันผลไม้ กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อน โดยใช้เทคนิค SSCP ตัวอักษรแต่ละช่องแสดงชื่อรูปแบบแอสไพโลไทป์

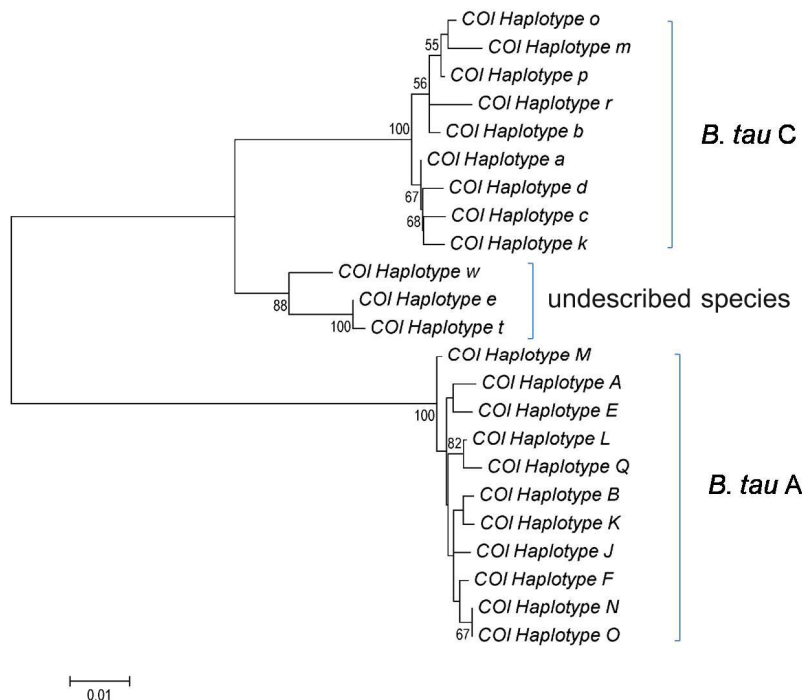
ตารางที่ 3 ค่าความถี่และความหลากหลายของแฮปโลไทป์ของรูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างกัน 23 รูปแบบ

รูปแบบ แฮปโลไทป์	ความถี่ของแฮปโลไทป์						
	RN(CM)-49	RN(MCh)-65	SI(CL)-38	SI(MC)-61	SI(MC)-66	SI(MC)-68	SL(CS)-03
A	0.55	0.40	1.00	1.00	-	-	0.33
B	0.27	0.60	-	-	-	-	0.24
E	-	-	-	-	-	-	0.02
F	-	-	-	-	-	-	0.04
J	-	-	-	-	-	-	0.04
K	-	-	-	-	-	-	0.04
L	0.09	-	-	-	-	-	-
M	0.09	-	-	-	-	-	0.02
N	-	-	-	-	-	-	0.11
O	-	-	-	-	-	-	0.06
Q	-	-	-	-	-	-	0.11
a	-	-	-	-	0.22	-	-
b	-	-	-	-	0.74	-	-
c	-	-	-	-	0.02	-	-
d	-	-	-	-	-	0.04	-
e	-	-	-	-	-	0.15	-
k	-	-	-	-	0.02	-	-
m	-	-	-	-	-	0.04	-
o	-	-	-	-	-	0.22	-
p	-	-	-	-	-	0.15	-
r	-	-	-	-	-	0.04	-
t	-	-	-	-	-	0.20	-
w	-	-	-	-	-	0.17	-
N*	11	10	8	51	54	54	54
H**	0.67	0.53	0.00	0.00	0.41	0.85	0.81

หมายเหตุ N* = จำนวนตัวเต็มวัย

H** = ความหลากหลายของแฮปโลไทป์

จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ Neighbor-Joining ของแฮปโลไทป์ ทั้ง 23 รูปแบบพบว่า *B. tau* ซับซ้อนแบ่งออกเป็นสามกลุ่มย่อย แฮปโลไทป์ A, B, E, F, J, K, L, M, N, O และ Q จับกลุ่มเป็นกลุ่มย่อยที่หนึ่งด้วยค่าความเชื่อมั่น 100% เช่นเดียวกับแฮปโลไทป์ a, b, c, d, k, m, o, p และ r จับกลุ่มเป็นกลุ่มย่อยที่สองด้วยค่าความเชื่อมั่น 100% ในขณะที่ แฮปโลไทป์ e, t และ w จับกลุ่มด้วยกันเป็นอีกหนึ่งกลุ่มย่อยด้วยค่าความเชื่อมั่น 88% (ภาพที่ 4) ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลที่ศึกษาด้วยเทคนิค SSCP และการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสอดคล้องกับการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาเชิงการวัดของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ด้วยเทคนิคจีโอเมตริก มอร์โฟเมตริกส์ พบแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ทั้งหมด 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็น *B. tau* A กลุ่มที่ 2 เป็น *B. tau* C และกลุ่มที่ 3 เป็น *B. tau* ชนิดใหม่



ภาพที่ 4 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แบบ Neighbor-Joining จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ COI ที่แสดง SSCP แอปโพลไทป์ต่าง ๆ ของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ชับซ้อน ค่าความเชื่อมั่นของแผนภูมิที่แสดงในแต่ละกิ่ง แถบมาตราส่วนแสดง 0.01 การเปลี่ยนแปลงแทนที่นิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง รวมทั้งแมลงวันผลไม้ที่เข้าทำลายพืชท้องถิ่น (วิสุทธิ์, 2555) โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* มีความผันแปรของลักษณะภายนอกสูง และเป็นกลุ่มสายพันธุ์ซับซ้อนกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่ง ซึ่งได้มีการจำแนกโดยวิธีการต่างๆ เช่น การวิเคราะห์ไมโทติคโครโมโซม การวิเคราะห์แอลโลไซม์ และวิธีอื่น ๆ ในระดับโมเลกุล ได้ข้อสรุปว่าเป็นสปีชีส์ซับซ้อนอย่างน้อย 7 ชนิด ที่มีชื่ออย่างไม่เป็นทางการคือ *B. tau* A, C, D, E, F, G และ I (Baimai et al, 2000; Jamnongluk et al., 2003; Thanaphum & Thaenkhram, 2003; Saelee et al., 2006) จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีจีโอเมตริก มอร์โฟเมตริกส์ และ SSCP พบว่าแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ *B. tau* A, *B. tau* C และ *B. tau* ชนิดใหม่ แมลงวันผลไม้ตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดนี้มีรูปร่างสัณฐานคล้ายคลึงกันแต่พบว่ามีความแตกต่างกันในรายละเอียด คือ *B. tau* A มีลักษณะปลายอวัยวะวางไข่เรียวไม่ปรากฏแฉก เป็นแมลงวันผลไม้กลุ่มที่พบในไม้ผลหลายชนิด ในการวิจัยครั้งนี้พบใน พักทอง มะระขึ้นก แดงโม พักข้าว และแตงร้าน ซึ่ง *B. tau* A จากไม้ผลเหล่านี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมโดยมีรูปแบบแอปโพลไทป์แตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Kitthawee & Dujardin (2010) ซึ่งพบ *B. tau* A จากไม้ผลหลายชนิด และมีรูปแบบของรูปร่างเรขาคณิตบนเส้นปีกที่ผันแปรแตกต่างกันในไม้ผลแต่ละชนิดเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า *B. tau* A เป็นแมลงวันผลไม้ที่ปรับตัวได้ดี ปัจจุบันที่มีผลต่อการปรับตัว

ได้แก่ ชนิดของไม้ผล ภูมิอากาศ เป็นต้น สำหรับแมลงวันผลไม้ *B. tau* C และ *B. tau* ชนิดใหม่ มีลักษณะปลายอวัยวะวางไข่เป็นสามแฉกเหมือนกัน พบในผลฟักข้าว ซึ่งเคยมีรายงานว่า *B. tau* C มีความจำเพาะต่อฟักข้าว (Kitthawee & Dujardin, 2010) ส่วน *B. tau* ชนิดใหม่ พบในฟักข้าว เช่นกันซึ่งต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมว่าสามารถพบในไม้ผลชนิดอื่นอีกหรือไม่ การพบ *B. tau* ชนิดใหม่ในประชากรเดียวกันกับ *B. tau* C นั้นแสดงให้เห็นถึงกลไกการแบ่งแยกสปีชีส์แบบซิมแพทริก (sympatric speciation)

การจัดจำแนกและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. tau* ซับซ้อนมีความสำคัญ ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของแมลงวันผลไม้รวมทั้งพืชผลทางการเกษตรที่อาจเป็นเป้าหมายในการถูกทำลาย ซึ่งจะนำไปสู่การวางแผนป้องกันและควบคุมได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นอกจากนี้การศึกษานี้ยังใช้เป็นตัวอย่างทั้งในเชิงวิชาการและการประยุกต์ใช้ควบคุมแมลงศัตรูอื่น ๆ ในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สามารถดำเนินการสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติภายใต้สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ซึ่งเป็นแหล่งสนับสนุนทุนวิจัย อันเป็นจุดเริ่มต้นให้โครงการนี้เกิดขึ้นได้ ขอขอบคุณสาขาวิชาสาธารณสุขชุมชน มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานีและภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลในการดำเนินงานวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำทางวิชาการมาโดยตลอด ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.วิสุทธิ ไบไม้ ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และให้ข้อเสนอแนะงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้เกี่ยวข้อง และเป็นข้อมูลเบื้องต้นอันก่อให้เกิดประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- วิสุทธิ ไบไม้. (2555). การวิจัยและการศึกษาเพื่อพัฒนาท้องถิ่น. *Rajabhat Journal of Sciences, Humanities and Social Sciences*, 13(1), 1-8.
- Aketarawong, N., Chinvinikul, S., Orankanok, W., Guglielmino, C.R., Franz, G., Mlacrida, A.R., & Thanaphum, S. (2011). The utility of microsatellite DNA markers for the evaluation of area-wide integrated pest management using SIT for the fruit fly, *Bactrocera doszralis* (Hendel), control programs in Thailand. *Genetica*, 139, 129-140.
- Aluja, M., Hurtado, C., Liedo, P., Cabrera, M., Castillo, F., Guillen, J., & Rios, E. (1996). Seasonal population fluctuations and ecological implications for management of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) in commercial mango orchards in Southern Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 89(3), 654-667
- Armstrong, J.W., & Jang, E.B. (1997). An overview of present and future fruit fly research in Hawaii and U.S. mainland. In A.J. Allwood and R.A.I. Drew (Eds.). *Management of Fruit Flies in the Pacific*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research Proceedings, 76, 30-42.
- Baimai, V., Phinchongsakuldit, J., & Sumrandee, C. (2000). Cytological evidence for a complex of species within the taxon *B. tau* (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69, 399-409.

- Bookstein, F.L. (1991). **Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Chinajariyawong, A., Clarke, A.R., Jirasurat, M., Kritsaneepiboon, S., Lahey, H.A., Vijayasegaran, S., & Walter, G.H. (2000). Survey of opiine parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand and Malaysia. **Raffles Bulletin of Zoology**, 48, 71-101.
- Cockburn A.F., & Fritz G.A. (1996). Isolation and purification of insect DNA. In: Clapp J.P., ed. **Methods in Molecular Biology, vol. 50: Species Diagnostic Protocols: PCR and Other Nucleic Acid Methods**. Totowa NJ: Hamana Press
- Drew, R.A.I., & Hancock, D.L. (1994). The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. **Bulletin of Entomological Research, Supplement**, 2, 1-68.
- Dujardin, J.P., Kaba, D., & Henry, A.B. (2010). The exchangeability of shape. **BMC Research Notes**, 3, 266.
- Dujardin, J.P., & Kitthawee, S. (2013). Phenetic structure of two *Bactrocera tau* cryptic species (Diptera: Tephritidae) infesting *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitaceae) in Thailand and Laos. **Zoology**, 116(2), 129-138.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1, 47-50.
- Fletcher, B. (1987). the biology of dacine fruit flies. **Annual Review of Entomology**, 32, 115-144.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit : A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series (Oxford)**, 41, 95-98.
- Han, M.J., Lee, S.H., Ahn, S.B., Choi, J.Y., & Choi, C.M. (1994). Distribution, damage and host plant of pumpkin fruit fly, *Paradacus depressa* (Shiraki). **Rural Development Administration Journal Agricultural Science**, 36, 346-350.
- Huque, R. (2006). Comparative studies on the susceptibility of various vegetables to *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 9, 93-95.
- Jamnongluk, W., Baimai, V., & Kittayapong, P. (2003). Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial COI sequences. **Genome**, 46, 112-118.
- Kim, T.H., Kim, J.S., & Mun, J.H. (1999). Distribution and bionomics of *Bactrocera depressa* (Shriaki) in Chonbuck province. **Korean Journal of Soil Zoology**, 4, 26-32.
- Kinnear, M., Bariana, H., Sved, J., & Frommer, M. (1998). Polymorphic microsatellite marker for population analysis of a tephritid pest species, *Bactrocera tryoni*. **Molecular Ecology**, 7, 1489-1495.
- Kitthawee, S., & Dujardin, J.P. (2010). The geometric approach to explore the *Bactrocera tau* complex (Diptera: Tephritidae) in Thailand. **Zoology**, 113, 243-249.
- Kitthawee, S., & Rungsri, N. (2011). Differentiation in wing shape in the *Bactrocera tau* (Walker) complex on a single fruit species of Thailand. **ScienceAsia**, 37, 308-313.
- Kittayapong, K., Milne, J.R., Tigvattananont, S., & Baimai, V. (2000). Distribution of the reproduction-modifying bacteria, wolbachia, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. **ScienceAsia**, 26, 93-103.
- Prabhakar, C.S., Sood, P., Mehta, P.K., & Sharma, P.N. (2013). Population genetic structure of the pumpkin fruit fly, *Bactrocera tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae) in Himachal Pradesh, India. **Biochemical Systematics and Ecology**, 291-296.

- Saelee, A., Tigvattanant, S., & Baimai, V. (2006). Allozyme electrophoretic evidence for a complex of species within the *Bactrocera tau* group (Diptera Tephritidae) in Thailand. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 28, 249-257.
- Sauers-Muller, A.V. (2005). Host plants of the carambola fruit fly, *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae), in Suriname, South America. **Neotropical Entomology**, 34(2), 203-214.
- Shi, W., Kerdelhue, C., & Ye, H. (2014). Genetic structure and colonization history of the fruit fly *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae) in China and Southeast Asia. **Journal of Economic Entomology**, 107(3), 1256-1265.
- Smith, P.T., Kambhampiti, S., & Armstrong, K.A., (2003). Phylogenetic relationships among *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 26, 8-17.
- Somta, C., Winotai, A., & Ooi, P.A.C. (2010). Fruit flies reared from *Terminalia catappa* in Thailand. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 13(1), 27-30.
- Sumrandee, C., Milne, J.R., & Baimai, V. (2011). Ovipositor morphology and host relations of *bactrocera tau* complex (Diptera: Tephritidae) in Thailand. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 33, 247-254.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28, 2731-2739.
- Thanaphum, S., & Thaenkhom, U. (2003). Relationships of forms the *Bactrocera tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae) taxon based on heat shock protein 70 cognate sequences. **Annals of the Entomological Society of America**, 96, 44-53.
- Wang, Z.L., Liu, H., Wang, X.P., Lui, M., Pei M.Y., & Lui, M.S. (2006). The distribution and occurrence of *Bactrocera tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae) inspected with lure in chongqing. **Journal of Southwest Agricultural University**, 28, 309-325.
- White, I. (1996). Fruit fly taxonomy: recent advances and new approaches. In McPherson, B.A. and Steck, G.J. (Eds.), **Fruit Fly Pests. A World Assessment of Their Biology and Management**. Delray Beach, Florida: St Lucie Press.
- White, I. & Elson-Harris, M. (1992). **Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics**. Wallingford, UK: CAB International.