

รายงานฉบับสมบูรณ์ (ปีที่ 2)

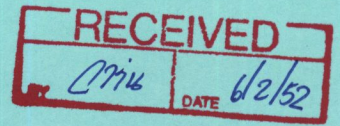
นิเวศวิทยาพันธุศาสตร์และกลไกการแยกสปีชีส์ ของ
แมลงเบียน (ศัตรูแมลงวันผลไม้) *Diachasmimorpha*
longicaudata complex ในประเทศไทย

โดย

รศ.ดร. สังวรรณ กิจทวี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล



รายงานฉบับสมบูรณ์ (ปีที่ 2)

นิเวศวิทยาพันธุศาสตร์และกลไกการแยกสปีชีส์ ของ
แมลงเบียน (ศัตรูแมลงวันผลไม้) *Diachasmimorpha*
longicaudata complex ในประเทศไทย

โดย

รศ.ดร. สักรินทร์ กิจทวี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานฉบับสมบูรณ์

นิเวศวิทยาพันธุศาสตร์และกลไกการแยกสปีชีส์ ของ
แมลงเบียน (ศัตรูแมลงวันผลไม้) *Diachasmimorpha*
longicaudata complex ในประเทศไทย

โดย

รศ.ดร. สังวรรณ กิจทวี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบาย
การจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT)

(งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย รหัสโครงการ BRT R_251010 โดยดำเนินการระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2551 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2551

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นายชาติรี เอี่ยมพรสิน และนางสาวผกามาศ ทับรอด ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาตรี โท-เอก นายอรุณา ประสพธรรม, นางสาวอริศรา พงษ์ศิริ, นางสาวนิราณี บินนิมะ, นางสาวดวงดา จุลศิริกุล และนางสาวสมจิตต์ ทินกระโทก ที่มีส่วนช่วยสร้างบรรยากาศในห้องปฏิบัติการ นางสาววิรดา พลพินิจ, นางสาวสุภาณี หิรัญกนกพันธ์ และนางสาวจุฬลักษณ์ โมกระหงษ์ ช่วยงานสำรวจและเก็บตัวอย่างของงานวิจัยในกลุ่มแมลงเบียน ทำให้งานวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดีและขอขอบคุณ นางโฉมฉาย สัมเมฆ ที่จัดทำบัญชีและพิมพ์ต้นฉบับนี้ให้ลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: ศึกษาในเวศวิทยาพันธุศาสตร์และกลไกการแยกสปีชีส์ ของแมลงเบียน (ศัตรูแมลงวันผลไม้) *Diachasmimorpha longicaudata* complex ในประเทศไทย โครงการมีวัตถุประสงค์และวิธีการดังนี้: 1) ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงเบียน *D. longicaudata* โดยเทคนิค SSCP 2) หาลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบส ก่อนนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) 3) ตรวจสอบกลไกการแบ่งแยกสปีชีส์ ในแมลงเบียนกลุ่ม *D. longicaudata* complex โดยการพัฒนาเทคนิคการผสมข้ามสายพันธุ์ 4) ศึกษาประสิทธิภาพของแมลงเบียน โดยการเปรียบเทียบพฤติกรรมการค้นหาเหยื่อและการโจมตีเหยื่อเพื่อวางไข่ 5) ทำการศึกษาวิวัฒนาการร่วมกัน (co-evolution)

ผลการวิจัย: การสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงเบียนจากผลไม้ที่ถูกทำลายด้วยแมลงวันผลไม้ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย พบแมลงเบียน *D. longicaudata* และจัดจำแนกได้ 3 กลุ่มเป็น DLA, DLB และ DLBB ได้เลี้ยงขยายพันธุ์แมลงเบียนทั้ง 3 กลุ่มไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบยืนยันการจัดจำแนกการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-SSCP ผลการศึกษาพบ *D. longicaudata* ทั้ง 3 กลุ่ม (DLA, DLB และ DLBB) แตกต่างกัน ข้อมูลแสดงยีนบริเวณ 28s ของแมลงเบียนทั้ง 3 กลุ่มในรูปของแถบ SSCP ออกมาต่างกัน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในแต่ละรูปแบบ SSCP พบความแตกต่าง สำหรับการศึกษา PCR product บริเวณ ITS2 จาก nuclear DNA และบริเวณ COI จาก mitochondrial DNA พบความแตกต่างของยีน เมื่อนำข้อมูลที่ sequence มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลจาก GenBank ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า *D. longicaudata* เป็นสปีชีส์ซับซ้อน แยกเป็น 3 กลุ่ม โดย กลุ่ม DLA พบในภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือ กลุ่ม DLB พบทั่วไปและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับข้อมูล GenBank ส่วนกลุ่ม DLBB พบทางใต้ของประเทศไทย อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ในเวศวิทยาพันธุศาสตร์ยังต้องการการยืนยันจากตัวอย่างของท้องถิ่นต่างๆ เพิ่ม

การศึกษากการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ ทางโครงการใช้เทคนิคการผสมพันธุ์ ที่พัฒนาได้แล้ว ทำให้ยืนยันได้ว่าแมลงเบียนทั้ง 3 กลุ่มเป็นสายพันธุ์ใกล้ชิด ส่วนการศึกษาประสิทธิภาพของแมลงเบียน พบว่า DLA สามารถควบคุมเฉพาะ *B. correcta* ขณะที่ DLB และ DLBB สามารถควบคุมได้ทั้ง *B. correcta* และ *B. dorsalis* การศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงผลไม้โดยชีววิธี

Abstract

Objectives: The research objective is to study ecological genetics and reproductive isolation of fruit fly parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* complex, in Thailand. The scopes and methods of this project are: 1) to evaluate levels of genetic variation in natural populations of *D. longicaudata* complex by using single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique, 2) to compare DNA sequences and to construct phylogenetic tree from the sequenced genes, 3) to determine the mode of reproductive isolation in the *D. longicaudata* complex, 4) to determine host choice by comparison of foraging and ovipositional behavior among the members of *D. longicaudata* complex and 5) to study co-evolution of host and parasitoid of this interesting group.

Results: Parasitoids were collected from fruit fly infested fruits from several locations in Thailand. Parasitoids, *D. longicaudata* were identified, reared and kept for further studies on ecological genetics. The *D. longicaudata* was primarily grouped into three forms (DLA, DLB and DLBB) based on their host species. PCR-linked single-strand conformation (PCR-SSCP) technique in nuclear DNA (28s and ITS2 regions) and mitochondrial DNA (COI) was used for investigating the genetic differentiation of molecular systematics of these *D. longicaudata* forms. Based on the 28s region, three different SSCP banding patterns were detected thus indicating that these three forms could be distinguished. The internal transcribed spacer (ITS2) region and cytochrome oxidase (COI) were amplified and PCR products were investigated. Three different products were detected from these *D. longicaudata* forms. DNA sequences of 28s, ITS2 and COI genes from investigated *D. longicaudata* forms were compared and used to construct phylogeny. The phylogeny showed that three distinctive groups were clearly separated. Group DLA was found in Central and North-East. Group DLB was commonly found in Thailand and closely related with *D. longicaudata* from GenBank. Group DLBB was found only in Southern part of Thailand. However, these genetic variations and population structure of *D. longicaudata* need to be confirmed by further investigated in various geographical samples. To determine the mode of reproductive isolation of these forms, cross-mating experiments among three different groups of *D. longicaudata* provided evidence that these groups were reproductively isolated. This suggests that these three forms of *D. longicaudata* in Thailand are species complex. In addition, these species complex were studied on host selection. The results showed that DLA group selected to parasitize *Bactrocera correcta* while DLB and DLBB groups parasitized both *B. correcta* and *B. dorsalis*. They can be an effective biological control of their fruit fly species.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

แมลงเบียน (parasitoids) เป็นแมลงที่เป็นประโยชน์สำหรับการควบคุมโดยชีววิธี แมลงเบียนกลุ่ม *Diachasmimorpha longicaudata* สามารถใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ ศัตรูสำคัญ ที่ทำความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร แมลงเบียนชนิดนี้ใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ในหลายประเทศ ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาแมลงเบียนชนิด *D. longicaudata* เป็นอย่างดี แต่นักวิจัยหลายท่านได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่า *D. longicaudata* อาจเป็นกลุ่มแมลงเบียนชนิดซับซ้อน (species complex) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแมลงเบียนจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ด้วยวิธีการศึกษาทางพันธุศาสตร์และเพื่อความชัดเจนในเรื่องชนิด (species) ทางโครงการวิจัยนี้จึงทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง *D. longicaudata* จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ทำการแยกกลุ่ม *D. longicaudata* ได้ 3 กลุ่ม คือ DLA, DLB และ DLBB โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์กับแมลงและพืชอาศัย นำ *D. longicaudata* ทั้ง 3 กลุ่มมาศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์ด้วยเทคนิค PCR-SSCP จาก nuclear DNA (บริเวณ 28s และ ITS2) จาก mitochondrial DNA บริเวณ COI พบความแตกต่างของแถบ SSCP เมื่อศึกษายีนบริเวณ 28s และพบความแตกต่างของ PCR products จากการศึกษายีนบริเวณ ITS2 (ทั้งๆ ที่ยังไม่ได้นำไปดำเนินการต่อยังเทคนิค SSCP) ไม่พบความแตกต่างของ PCR – products จากการศึกษายีนบริเวณ COI ยีน เมื่อนำ PCR ของ แถบ SSCP จากการศึกษายีน 28s และ PCR products จากการศึกษายีนบริเวณ ITS2 กับ COI ไป sequences นำข้อมูลที่ sequence มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลจาก GenBank ผลการวิเคราะห์สายพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า *D. longicaudata* เป็นสปีชีส์ซับซ้อน แยกเป็น 3 กลุ่ม DLA, DLB และ DLBB) โดยกลุ่ม DLA กระจายอยู่ในภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือ กลุ่ม DLB พบกระจายอยู่ทั่วไปและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับข้อมูล GenBank ส่วนกลุ่ม DLBB พบทางใต้ของประเทศไทย อย่างไรก็ตามการศึกษานิเวศวิทยาพันธุศาสตร์ยังต้องการการยืนยันและการศึกษาในรายละเอียด จากตัวอย่างของท้องถิ่นต่างๆ เพิ่ม

ถึงแม้ว่าข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์จะบอกการแบ่งแยกทางสปีชีส์ การยืนยันด้วยการศึกษาการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ก็มีความจำเป็น การศึกษาผสมข้ามสายพันธ์จะสามารถใช้ตรวจสอบการแยกสปีชีส์ในกลุ่มชนิดซับซ้อนนี้ได้ ด้วยเหตุผลที่ว่าต่างสปีชีส์กันก็อาจผสมกันได้แต่จะได้ลูกหลานที่ผิดปกติหรือเป็นหมัน ในการศึกษาพบว่าการเลี้ยงขยายพันธ์แมลงเบียนในห้องปฏิบัติการตามปกติยังมีปัญหาด้านการผสมพันธ์ ดังนั้นทางโครงการจึงพัฒนาเทคนิคการผสมพันธ์แมลงเบียนด้วยวิธีใหม่ได้สำเร็จ (ดังเอกสารตีพิมพ์) และได้ดัดแปลงเทคนิคมาใช้ผสมแมลงเบียนต่างสายพันธ์ โดยเฉพาะในกลุ่มสายพันธ์ซับซ้อนของ *D. longicaudata* complex ผลของการผสมข้ามสายพันธ์ระหว่าง DLBB x DLA หรือ DLBB x DLB ไม่พบอสุจิเพศผู้ ในถุงเก็บอสุจิในเพศเมีย และไม่ให้ลูกเพศเมียเลย (เพศเมียเท่านั้นเกิดจากไข่ที่ได้รับการ

ผสมกับอสุจิของเพศผู้) ข้อมูลนี้บ่งชี้ถึงการแบ่งแยกกันอย่างสมบูรณ์ ส่วนการผสม DLA x DLB พบอสุจิของ DLA เพศผู้ในถุงเก็บอสุจิใน DLB เพศเมีย และให้ลูกผสมเพศเมียที่ไม่สมบูรณ์เพียง 1-2 ตัว ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่า *D. longicaudata* เป็นกลุ่มสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ

การศึกษาประสิทธิภาพของแมลงเบียน จึงใช้แมลงเบียนกลุ่มต่างๆ ดังกล่าว ศึกษาโจมตีแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ เช่น *Bactrocera correcta* และ *B. dorsalis* พบว่า DLA สามารถควบคุมได้เฉพาะ *B. correcta* ขณะที่ DLB และ DLBB สามารถควบคุมได้ทั้ง *B. correcta* และ *B. dorsalis* ผลการศึกษาสามารถนำไปวางแผนและประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงผลไม้ศัตรูที่สำคัญทางการเกษตรโดยชีววิธีให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

Executive Summary

Parasitoids are beneficial wasps that are useful in biological control. The parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* parasitizes fruit fly larvae which infest many commercially grown fruits. This parasitoid has been used for biological control in many countries. Although *D. longicaudata* has been well studied, several researchers have documented and suggested that *D. longicaudata* was probably a species complex. Thus it is necessary to undertake genetic investigation of *D. longicaudata* populations in the field to understand its genetic diversity and to elucidate its taxonomic status. In this study, *D. longicaudata* samples were collected from several localities in Thailand. They were identified and reared in the laboratory. Based on morphological characters and host relationships, *D. longicaudata* has been grouped into three forms (DLA, DLB and DLBB). PCR-linked single-strand conformation (PCR-SSCP) technique in nuclear DNA (28s and ITS2 regions) and mitochondrial DNA (COI) can be used in genetic differentiation of these *D. longicaudata* forms. Based on 28s region three different SSCP banding patterns were detected and indicated that these three forms were distinguished. Internal transcribed spacer (ITS2) region was amplified and PCR products were investigated. Three different products were presented. Cytochrome oxidase (COI) region was also used in investigating *D. longicaudata* complex from different locations. Both PCR-SSCP patterns of the 28s and PCR products of the ITS2 and COI regions were sequenced for comparisons of related taxa. The results revealed that there were sequence divergences or genetic differences among DLA, DLB and DLBB. The phylogenetic construction exhibited that three distinctive groups were clearly separated. Group DLA was found in Central and North-East (Bangkok, Suphanburi, Loei). Group DLB was found in general (i.e. Nan and Surat-thani) and closely related with *D. longicaudata* from GenBank. Group DLBB was found only in the South (Surat-thani). However, these genetic variations and population structure of *D. longicaudata* need to be confirmed by further investigation in various geographical samples.

Although genetic differences can ensure species isolation among species in a complex, it is still important to verify reproductive isolation. Cross-mating experiments can investigate reproductive isolation among species complex. If the populations of different species interbreed, the resulting offspring are either abnormal in number, inviable or infertile. In laboratory, mating system in *D. longicaudata* is generally not simple. Therefore, a new technique was developed for successfully manipulating the mating system. This technique was modified and used in cross-mating experiments among members of the *D. longicaudata* to clarify reproductive isolation question within the species complex. Results in cross-mating experiments among three different forms

of *D. longicaudata* provided evidence that these forms were reproductively isolated due to reproductive incompatibility. Crosses between groups DLBB x DLA or DLBB x DLB showed that there was no sperm transfer to female spermathecae resulting in complete reproductive isolation. Crosses between groups DLA and DLB produced a few female progeny indicating that there was partial reproductive isolation with low degree of genetic compatibility. These suggest that these three forms of *D. longicaudata* in Thailand are closely related species complex.

The relationships between fruit fly hosts and parasitoids, *D. longicaudata* complex were tested in order to use for biological control program. Parasitoids were allowed to attack different host species. The results showed that DLA group selected to parasitized *Bactrocera correcta* hosts while DLB and DLBB groups parasitized both *B. correcta* and *B. dorsalis*. These results indicated that *D. longicaudata*, DLA group, is more useful for biological control against *B. correcta*. In addition, DLB and DLBB groups can be effective biological control of *B. correcta* and *B. dorsalis* which is the most economically important agricultural pest in Asia.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อไทย	ข
บทคัดย่ออังกฤษ	ค
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (ไทย)	ง
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (อังกฤษ)	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
วิธีการดำเนินงาน	2
ผลการวิจัย	4
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	17
เอกสารอ้างอิง	18
เอกสารแนบหมายเลข 1	19

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการสำรวจแมลงเบียน <i>D. longicaudata</i> ที่ทำลายแมลงวันผลไม้ จากไม้ผลหลากหลายชนิดตามแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย ระหว่างวันที่ 1 มกราคม – 31 ธันวาคม 2551	4
2	แสดงความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของยีน 28s ใน <i>D. longicaudata</i> complex	12
3	ผลการตรวจสอบการผสมพันธุ์ของแมลงเบียนจากถิ่นต่างๆ กับ <i>D. longicaudata</i> (DLA, DLB และ DLBB)	16
4	ผลการตรวจสอบการควบคุมควบคุมแมลงวันผลไม้ <i>B. correcta</i> และ/หรือ <i>B. dorsalis</i>	17

สารบัญภาพ

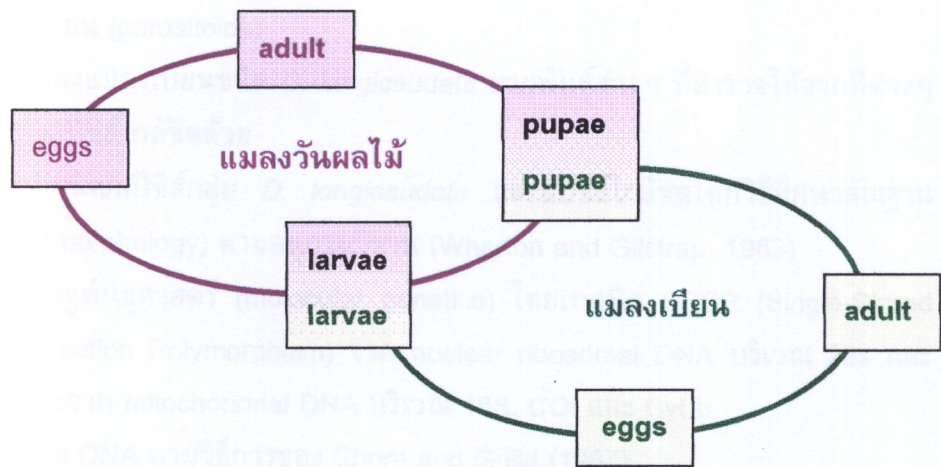
ภาพที่		หน้า
1	วงชีวิตของแมลงเบียน (สีเขียวก) ที่เจริญในด้วหนอนของแมลงวันผลไม้ (สีม่วง)	2
2	เปรียบเทียบแถบ SSCP ของยีนบริเวณ 28s ระหว่าง DLA, DLB และ DLBB (<i>D. longicaudata</i> complex)	10
3	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 28s ใน <i>D. longicaudata</i> complex	11
4	แสดง cladogram ของ <i>D. longicaudata</i> complex ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28s	12
5	แสดงขนาดของ PCR product ของยีน ITS2 (Lane 1 = 1000 + 1.5 bp DNA Ladder, Lanes 2-3 = DLA, Lanes 4-5 = DLB, Lanes 6-7 = DLBB, Lanes 8-9 = DLB, Lanes 10-12 = ฯลฯ)	13
6	แสดงสายสัมพันธ์ของ <i>D. longicaudata</i> (DLA, DLB, DLBB) จากห้องปฏิบัติการที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2	13
7	แสดงขนาดของ PCR product ของยีน COI (Lane 1 = 100bp + 2Kb +3Kb DNA Ladder, Lane 6 = BK-F, Lane 113 = NA-M, Lane 121 = NA-F, Lane 122 = NA-F, Lane 123 = SI-F, Lane 129 = SI-M, Lane 148 = LO-F, Lane 149 = LO-F)	14
8	แสดงสายสัมพันธ์ของ <i>D. longicaudata</i> (DLA, DLB, DLBB) จากห้องปฏิบัติการและ ที่เก็บได้จากห้องที่ต่างๆ(บางส่วน) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI	15

บทนำ

แมลงวันผลไม้เป็นศัตรูไม้ผลหลายชนิด ทำความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรและกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย การใช้สารเคมีในการควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้ก่อให้เกิดปัญหาตามมาโดยเฉพาะแมลงวันผลไม้สร้างความต้านทานและกลับมาระบาดใหม่ นอกจากนี้สารเคมียังไปทำลายศัตรูธรรมชาติ เช่น แมลงเบียน (parasitoids)

แมลงเบียน (parasitoids) เป็นศัตรูธรรมชาติที่เป็นประโยชน์ สามารถใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ (fruit flies) แมลงเบียนกลุ่ม *Diachasmimorpha longicaudata* จัดอยู่ใน family Braconidae, order Hymenoptera จะเบียนเบียนแมลงวันผลไม้โดยเข้าทำลายวัยต่างๆ ของตัวหนอนแมลงวันผลไม้ โดยใช้แมลงวันผลไม้เป็นอาหารและที่อยู่อาศัย ที่สุดพัฒนาออกเป็นตัวเต็มวัย (ภาพที่ 1) แมลงเบียน *D. longicaudata* เป็นแมลงที่มีอยู่ในธรรมชาติ สามารถใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ได้ดี การจัดจำแนกแมลงเบียนพบว่า *D. longicaudata* มีสปีชีส์แปรตามสภาพภูมิศาสตร์ จึงสันนิษฐานว่าเป็นกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน (complex species) คำถามที่ตามมาก็คือหากปล่อยให้สปีชีส์ต่างๆ อยู่ด้วยกันโดยไม่ทราบสปีชีส์ชัดเจน จะส่งผลดี/ผลเสียต่อการควบคุมในทางชีววิธี (biological control) หรือไม่? การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยการศึกษาในเวทียาพันธุศาสตร์ รวมทั้งความเข้าใจในปัญหาสปีชีส์ซับซ้อนในธรรมชาติ จึงเข้ามามีบทบาทในการตอบคำถาม ทั้งนี้เนื่องจากการจัดจำแนกชนิดอย่างถูกต้องเป็นขั้นตอนจำเป็นอันดับแรกสุด ของวิธีการควบคุมโดยชีววิธี กล่าวคือ การศึกษาและความเข้าใจในความหลากหลายทางพันธุกรรม จะช่วยไขปัญหาสปีชีส์ซับซ้อน การยืนยันการแยกสปีชีส์โดยวิธีการผสมข้ามสายพันธุ์ เป็นการตรวจสอบความสามารถในการสืบพันธุ์และการถ่ายทอดทางพันธุกรรม สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบจะนำไปทดสอบความสามารถของแมลงเบียน เพื่อค้นหาแมลงเบียนที่มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ควบคุมทางชีววิธี

การศึกษาวิจัยนี้จะช่วยพัฒนาองค์ความรู้การอนุรักษ์และจัดการด้านความหลากหลายของแมลงเบียน ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยยังเป็นประโยชน์ในการประยุกต์บริหารจัดการใช้แมลงเบียนเพื่อการควบคุมแมลงวันผลไม้โดยชีววิธีได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป



ภาพที่ 1. วงชีวิตของแมลงเบียน (สีเขียว) ที่เจริญในตัวหนอนของแมลงวันผลไม้ (สีม่วง)

วัตถุประสงค์ของโครงการและวิธีการ

1. ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงเบียน *D. longicaudata* โดยเทคนิค SSCP ของ nuclear DNA และ mitochondrial DNA
2. หาลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสก่อนนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)
3. ตรวจสอบกลไกการแบ่งแยกสปีชีส์ในแมลงเบียนกลุ่ม *D. longicaudata* complex โดยการพัฒนาเทคนิคการผสมข้ามสายพันธุ์ตลอดจนการตรวจสอบความสมบูรณ์ในสายพันธุ์
4. ศึกษาประสิทธิภาพของแมลงเบียนโดยการเปรียบเทียบพฤติกรรมการค้นหาเหยื่อและการโจมตีเหยื่อเพื่อวางไข่
5. ทำการศึกษาวิวัฒนาการร่วมกัน (co-evolution) จากการประมวลข้อมูลทุกด้าน

วิธีการดำเนินงาน

วิธีวิจัยในภาคสนาม

เก็บตัวอย่างแมลงเบียนจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย โครงการนี้จะต้องเก็บข้อมูลทั้งชนิดของไม้ผล แมลงวันผลไม้และแมลงเบียน

วิธีวิจัยในห้องปฏิบัติการ

1. แมลงวันผลไม้ (fruit flies)
เลี้ยงแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ สำหรับเป็นอาหารและที่อยู่อาศัยของแมลงเบียนที่ต้องเพาะเลี้ยง

2. แมลงเบียน (parasitoids)
เพาะเลี้ยงแมลงเบียนชนิด *D. longicaudata* สายพันธุ์ต่างๆ ที่สำรวจได้จากที่ต่างๆ รวมทั้งสปิชีส์ใกล้เคียงด้วย
3. จำแนกชนิด/สปิชีส์กลุ่ม *D. longicaudata* และสปิชีส์ใกล้เคียงโดยวิธีศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ตามอนุกรมวิธาน (Wharton and Gilstrap, 1983)
4. ศึกษาอนุพันธุศาสตร์ (molecular genetics) โดยเทคนิค SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) จาก nuclear ribosomal DNA บริเวณ 28s และ ITS และจาก mitochondrial DNA บริเวณ 16S, COI และ Cyt b
 - a) สกัด DNA ตามวิธีการของ Shore and Guild (1987)
 - b) เพิ่มจำนวนยีนบริเวณที่ต้องการศึกษาจาก nuclear DNA และ mitochondrial DNA
 - c) เตรียม gel สำหรับ SSCP และ PCR product สำหรับ SSCP
 - d) ย้อมสีด้วย DNA silver staining
 - e) ตรวจวิเคราะห์ SSCP haplotypes
5. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในแต่ละ haplotype จาก (e) โดยนำ PCR product แต่ละ haplotype ไป sequence
6. วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ phylogenetic tree โดยทำ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนศึกษาใน (5.) โดยใช้ Clustal W นำ alignment ที่ได้ไปสร้าง phylogenetic tree
7. ศึกษากลไกการแยกสปิชีส์โดย
 - a) การผสมข้ามสายพันธุ์ (cross breeding experiments)
 - b) การยีนย่น การผสมข้ามสายพันธุ์ โดยตรวจสอบลูกผสม (hybrid)
8. ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้โดยการตรวจสอบการควบคุมชนิดของแมลงวันผลไม้
9. ศึกษาชีววิทยา และพฤติกรรม ของแมลงเบียนที่มีศักยภาพ ในการควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้

ผลการวิจัย

การวิจัยในภาคสนาม

การดำเนินการวิจัย: โดยการสำรวจและค้นหาแมลงเบียนชนิด *D. longicaudata* ในธรรมชาติจากไม้ผลที่ถูกแมลงวันผลไม้ทำลายในเขตจังหวัด กรุงเทพฯ, กาญจนบุรี, เลย, น่าน, นครศรีธรรมราช, แพร่, พิษณุโลก, ราชบุรี, ระยอง, สุราษฎร์ธานี, สิงห์บุรี, สุพรรณบุรี, ตราด, อุบลราชธานี และอุดรดิตถ์

จำแนกชนิด/สปีชีส์ของกลุ่ม *D. longicaudata* และสปีชีส์ใกล้เคียงโดยวิธีศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ตามอนุกรมวิธาน (Wharton and Gilstrap, 1983)

ผลการดำเนินงาน: พบแมลงเบียนชนิด *D. longicaudata* และแมลงเบียนชนิดอื่นๆ ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1. แสดงผลการสำรวจแมลงเบียน *D. longicaudata* ที่ทำลายแมลงวันผลไม้จากไม้ผลหลากหลายชนิดตามแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย ระหว่างวันที่ 1 มกราคม– 31 ธันวาคม 2551

Code	Date	Province	Parasitoids	Host flies	Host plants (ชื่อท้องถิ่น)
BK(CG)AJ	14/1/08	กรุงเทพฯ	—	—	<i>Coccinia grandis</i> (ตำลึง)
BK(SS)	14/1/08	กรุงเทพฯ	—	<i>B. correcta</i> <i>B. dorsalis</i>	<i>Syzygium samarangense</i> (ชมพู่)
BK(SS)	21/4/08	กรุงเทพฯ	<i>Fopius</i> sp. <i>D. longicaudata</i>	<i>B. dorsalis</i> <i>B. correcta</i>	<i>Syzygium samarangense</i> (ชมพู่)
BK(SS)	12/5/08	กรุงเทพฯ	<i>Fopius</i> sp. <i>D. longicaudata</i>	<i>B. dorsalis</i> <i>B. correcta</i>	<i>Syzygium samarangense</i> (ชมพู่)
BK(ST)AJ	14/1/08	กรุงเทพฯ	—	—	<i>Solanum torvum</i> (มะเขือพวง)
BK(ST)AJ	14/1/08	กรุงเทพฯ	—	—	<i>Solanum melongena</i> (มะเขือยาว)
BK(TC)AJ-11	12/5/08	กรุงเทพฯ	<i>D. longicaudata</i> <i>Fopius</i> sp.	<i>B. dorsalis</i> <i>B. correcta</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกราบ)
KN(CG)AJ26	8/8/08	กาญจนบุรี (campus)	<i>P.syttalia</i> sp.	<i>B. cucurbitae</i> <i>B. tau</i> (2sp)	<i>Coccinia grandis</i> (ตำลึง)
KN(CG)AJ29	22/9/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	<i>Psytalia</i> sp. <i>Fopius</i> sp.(??)	<i>B. cucurbitae</i> <i>B. tau</i> (few)	<i>Coccinia grandis</i> (ตำลึง)
KN(CG)AJ39	28/11/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	—	<i>B. cucurbitae</i>	<i>Coccinia grandis</i> (ตำลึง)

KN(CMo)AJ30	22/9/08	กาญจนบุรี	<i>Psytalia sp.</i>	<i>B. tau</i>	<i>Cucurbita moschata</i> ฟักทอง
KN(CP)AJ42	28/11/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	—	<i>B. latifron</i>	<i>Chionanthus parkinsonii</i> (มะเขือเปราะ)
KN(LA)AJ-40	28/11/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	—	—	<i>Luffa acutangula</i> (บวบเหลี่ยม)
KN(MC)AJ27	23/8/08	กาญจนบุรี (ไทรโยค)	—	<i>B. tau</i>	<i>Momordica cochinchinensis</i> ฟักข้าว
KN(MC)AJ31	22/9/08	กาญจนบุรี (ท่ามะขาม)	—	<i>B. tau</i>	<i>Momordica cochinchinensis</i> ฟักข้าว
KN(MC)AJ32	11/11/08	กาญจนบุรี (บ่อพลอย)	—	<i>B. tua</i>	<i>Momordica cochinchinensis</i> ฟักข้าว
KN(MCh)AJ28	22/9/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	—	<i>B. cucurbitae</i>	<i>Momordica charantia</i> มะระหวาน
KN(MCh)AJ41	28/11/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	—	<i>B. cucurbitae</i>	<i>Momordica charantia</i> (มะระขี้นก)
KN(SM)AJ44	28/11/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	—	<i>B. tau C-2 like?</i>	<i>Suregada multiflorum</i> มะตุ๊ก
KN(TCo)AJ43	28/11/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	—	<i>B. tau??</i>	<i>Trichosanthes cordata</i> ขี้กาขาว
KN(TT)AJ45	12/12/08	กาญจนบุรี (ท่าเสา)	—	—	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> ขี้กาแดง
LO(ZM)AJ2	5/2/08	เลย	<i>Fopius sp.</i>	<i>B. correcta</i> <i>B. dorsalis</i> moth	<i>Ziziphus mauritiana</i> (พุทรา)
LO(ZM)AJ3	5/2/08	เลย	<i>Fopius. sp.</i> <i>Psytalia sp.</i>	<i>B. correcta</i> <i>B. dorsalis</i>	<i>Ziziphus mauritiana</i> (พุทรา)
LO(ZM)AJ4	30/8/08	เลย(ภูกระดึง)	<i>D. longicaudata</i>	<i>B. correcta</i>	<i>Zinnia muritiana</i> (พุทรา)
NA(CS)AJ32	20/7/08	น่าน	—	<i>B. tau</i> <i>B. cucurbitae</i>	<i>Cucumis sativus</i> แตงกวา
NA(MC)AJ33	20/7/08	น่าน	—	<i>B. tau</i>	<i>Momordica cochinchinensis</i> ฟักข้าว
NA(SM)AJ28	28/2/08	น่าน	<i>F. vandenboschi</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>Syzygium malaccense</i> (ชมพูมะเหมี่ยว)
NA(TC)AJ21	28/2/08	น่าน	<i>D. longicaudata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa L.</i> (ทุกวาง)
NA(TC)AJ29	20/7/08	น่าน (ปตท.)	—	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa L.</i> (ทุกวาง)
NA(TC)AJ30	20/7/08	น่าน (นาน้อย)	<i>D. longicaudata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa L.</i> (ทุกวาง)
NA(TC)AJ31	20/7/08	น่าน (นาหวาบ)	<i>D. longicaudata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa L.</i> (ทุกวาง)
NA(TC)AJ34	10/9/08	น่าน (นาหวาบ)	<i>Fopius sp.</i> <i>D. longicaudata</i>	<i>B. dorsalis</i> <i>B. carambolae</i>	<i>Terminalia catappa L.</i> (ทุกวาง)

NA(TC)AJ35	10/9/08	น่าน (น่าน้อย)	<i>Fopius</i> sp.	<i>B. dorsalis</i> <i>B. carambolae</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
NA(TC)AJ36	10/9/08	น่าน (อ.สา)	-	<i>B. dorsalis</i> <i>B. carambolae</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
NA(TC)AJ39	14/10/08	น่าน (นาราบ)	<i>Fopius</i> sp.	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
NA(TT)AJ37	15/9/08	น่าน	—	<i>B. tua</i>	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> ขี้กาแดง
NA(TT)AJ38	6/10/08	น่าน ต.ม่วงตีด อ.ภูเวียง	<i>Psytalia</i> spp.	<i>B. tau</i> <i>B. cucurbitae</i>	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> ขี้กาแดง
NA(ZM)AJ26	28/2/08	น่าน	<i>F. vandenboschi</i> <i>F. arisanus</i> <i>Psytalia</i> sp.	<i>B. dorsalis</i> moth beetle	<i>Ziziphus mauritiana</i> (พุทรา)
NT(TC)AJ-3	2/1/08	นครศรีธรรมราช		<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
NT(TC)AJ-4	2/1/08	นครศรีธรรมราช		<i>B. correcta</i> <i>B. dorsalis</i> <i>B. albistrigata</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
NT(TC)AJ-5	18/5/08	นครศรีธรรมราช	<i>Fopius</i> sp. <i>P. incisi</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
PR(MC)AJ4	7/11/08	แพร่	—	<i>B. tua</i>	<i>Mormordica cochinchinensis</i> ผักข่า
PR(MC)AJ5	7/11/08	แพร่	—	<i>B. tua</i> C.1-like C.2-like	<i>Mormordica cochinchinensis</i> ผักข่า
PR(TC)AJ1	10/9/08	แพร่ (อ.เด่นชัย)	-	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
PR(TC)AJ2	10/9/08	แพร่ (อ.สูงเม่น)	<i>Fopius</i> sp.	<i>B. dorsalis</i> <i>B. carambolae</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
PR(TC)AJ3	10/9/08	แพร่ (อ.ร้องกวาง)	<i>Fopius</i> sp.	<i>B. dorsalis</i> <i>B. carambolae</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
PS(AL)JIT-1	28/3/08	พิษณุโลก	—	<i>B. dorsalis</i> (like)	<i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb. (มะหาด)
PS(GA)JIT-2	28/3/08	พิษณุโลก	<i>D. longicaudata</i> (like)	—	<i>Gmelina arborea</i> ช้อ
RB(MC)AJ7	4/8/08	ราชบุรี	—	<i>B. tau</i> (to John)	<i>Mormordica cochinchinensis</i> ผักข่า
RB(MC)AJ9	9/12/08	ราชบุรี	—	<i>B. tua</i> C1-like C2-like	<i>Mormordica cochinchinensis</i> ผักข่า
RB(PG)AJ8	4/8/08	ราชบุรี	—	<i>B. dorsalis</i>	<i>Psidium guajava</i> (ฝรั่ง)
RY(MC)AJ-1	27/11/08	ระยอง	—	—	<i>Mormordica cochinchinensis</i> ผักข่า

SI(TC)AJ2	28/1/08	สุราษฎร์ธานี	<i>D. longicaudata</i> (DLBB like)	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
SI(TC)AJ3	24/4/08	สุราษฎร์ธานี	<i>D. longicaudata</i> (1ind.)	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
SI(TC)AJ4	13/10/08	สุราษฎร์ธานี (ราช ภัฏ)	<i>D. longicaudata</i>	<i>B. dorsalis</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
SN(ZM)AJ-1	14/1/08	สิงห์บุรี	<i>D. longicaudata</i> <i>Chelonus</i> sp.	<i>B. correcta</i> <i>B. dorsalis</i> <i>B. umbrosa</i> moth	<i>Ziziphus mauritiana</i> (พุทรา)
SP(TC)AJ1	1/6/08	สุพรรณบุรี	<i>D. longicaudata</i>	<i>B. dorsalis</i> <i>B. correcta</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
SP(TC)AJ-1	6/5/08	สุพรรณบุรี	<i>D. longicaudata</i>	<i>B. correcta</i>	<i>Terminalia catappa</i> L. (ทุกวาง)
TR(CI)AJ-1	10/4/08	ตราด	—	<i>Bactrocera</i> spp. (3 sp.)	<i>Colophyllon inophyllum</i> L. (กระทิง)
UB(AC)AJ-2	2/12/08	อุบลราชธานี (วาริน-)	—	<i>B. dorsalis</i>	<i>Averrhoa carambola</i> L. (มะเฟือง)
UB(MC)AJ-1	2/12/08	อุบลราชธานี (วาริน-)	—	<i>B. tau</i> A <i>B. tau</i> C.2-like	<i>Momordica cochinchinensis</i> ฟักข้าว
UB(PL)AJ-3	2/12/08	อุบลราชธานี (วาริน-)	—	—	<i>Passiflora laurifolia</i> (Passion fruit)
UD(BM)AJ-1	17/4/08	อุดรดิตถ์	—	<i>B. dorsalis</i> (like)	<i>Bouea macrophylla</i> มะปราง

แมลงเบียนที่เก็บได้จากท้องที่ต่างๆ จะเก็บรักษาไว้ที่ -80°C เพื่อพร้อมสำหรับศึกษานิเวศวิทยา
พันธุศาสตร์ ต่อไป

การวิจัยในห้องปฏิบัติการ

แมลงวันผลไม้ (Fruit flies)

การดำเนินการวิจัย: เพาะเลี้ยงแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ

ผลการดำเนินงาน: สามารถเพาะเลี้ยงแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera dorsalis* complex (*D. carambolae*, *B. dorsalis* และ *B. papayae*), *B. correcta*, *B. latifrons*, *B. cucurbitae* และ *B. tau*

แมลงเบียน (Parasitoids)

การดำเนินการวิจัย: เพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์แมลงเบียนชนิดต่างๆ

ผลการดำเนินงาน: สามารถทำการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์แมลงเบียน *D. longicaudata* complex (DLA, DLB และ DLBB), *Fopius arisanus*, *F. vandenboschi*, *Psytalia fletcheri* และ *P. incisi*

การศึกษาศึกษาอนุพันธุศาสตร์ (molecular genetics)

การดำเนินการวิจัย: ศึกษาอนุพันธุศาสตร์ (molecular genetics) จากแมลงเบียน *D. longicaudata* ทั้ง 3 สายพันธุ์ (DLA, DLB และ DLBB) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และ ที่เก็บได้จากท้องที่ต่างๆ(บางส่วน) โดยเทคนิค SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) จาก nuclear ribosomal DNA บริเวณ 28s และ ITS2 จาก mitochondrial DNA บริเวณ COI ตามขั้นตอนต่อไปนี้

a) สกัด DNA แมลงเบียน *D. longicaudata* ทั้ง 3 สายพันธุ์ (DLA, DLB และ DLBB) และที่เก็บได้จากท้องที่ต่างๆ ตามวิธีการของ Shore และ Guild (1987)

b) เพิ่มปริมาณ DNA จาก nuclear ribosomal DNA บริเวณ 28s และ ITS2 จาก mitochondrial DNA บริเวณ COI ด้วยเทคนิค PCR ที่ออกแบบ PCR-primer โดย Gimeno และคณะ (Gimeno et al., 1997)

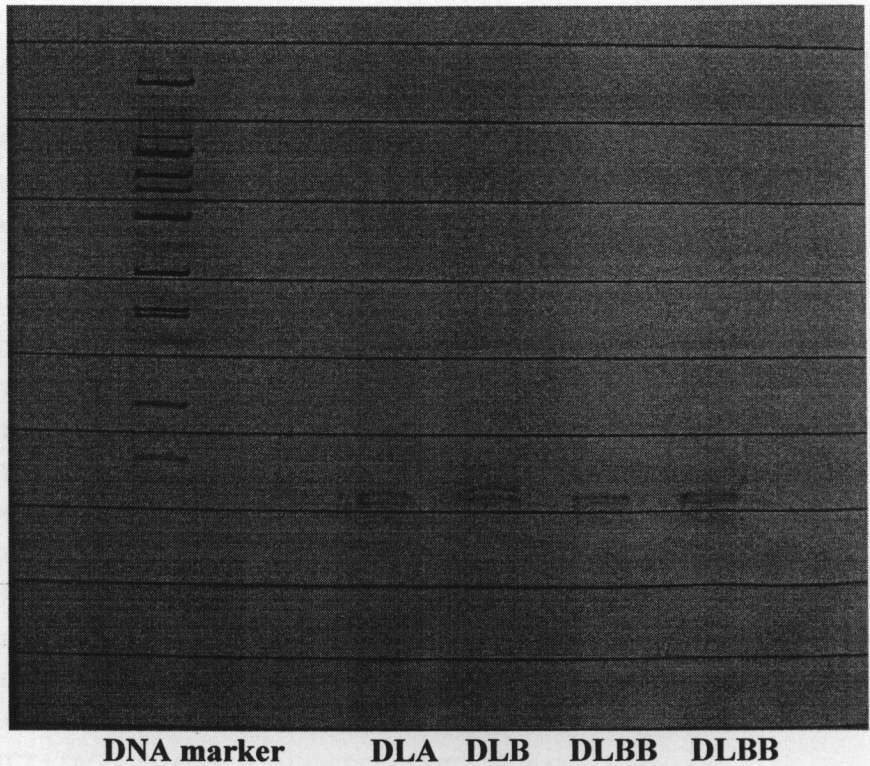
c) ตรวจ PCR product ของตัวอย่างแมลงเบียนที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis

d) ทำการตรวจสอบ haplotype ของตัวอย่างด้วยวิธี PCR-SSCP ซึ่งดัดแปลงมาจากเทคนิคของ Kong และคณะ (Kong et al., 2003)

- e) เตรียม gel สำหรับ SSCP และ PCR product สำหรับ SSCP
- f) ย้อมสีด้วย DNA silver staining
- g) ตรวจวิเคราะห์ SSCP haplotypes
- h) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในแต่ละ haplotype จาก (g) โดยนำ PCR product แต่ละ haplotype ไป sequence
- i) วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยทำ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนศึกษาใน (h) โดยใช้ Clustal W นำ alignment ที่ได้ไปสร้าง phylogenetic tree

ผลการดำเนินงาน : ยีนบริเวณ 28s

พบว่า PCR product ของยีนบริเวณ 28s มีขนาดประมาณ 400 base pairs และด้วยเทคนิค PCR-SSCP สามารถแยกกลุ่ม *D. longicaudata* (DLA, DLB, และ DLBB) ได้ 3 haplotypes (ดังภาพที่ 2)เมื่อนำ PCR product แต่ละ haplotype ไป sequence ได้ผล (ดังภาพที่ 3)การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในแต่ละ haplotype ร่วมกับข้อมูลจาก GenBank พบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์(ดังตารางที่ 2) ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า DLB แยกออกมาและโดยสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *D. longicaudata* จาก GenBank ขณะที่ DLA แยกออกจาก DLBB ซึ่งทั้งคู่ก็แยกออกมาจาก DLB (ดังภาพที่ 4) ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนการแบ่งแยกสปีชีส์ใน *D. longicaudata* complex และสอดคล้องกับผลผลการทดลองการผสมข้ามสายพันธุ์ (Kitthawee 2008)



DNA marker

DLA

DLB

DLBB

DLBB

ภาพที่ 2. เปรียบเทียบแถบ SSCP ของยีนบริเวณ 28s ระหว่าง DLA, DLB และ DLBB (*D. longicaudata* complex)

(CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment)

Haplotype	Nucleotide position	(bp)
DLZ93645	GGGGAGATTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATAAGTTATGATATAG	
B_28S	GGGGAGATTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATAAGTTATGATATAG	
A_28S	GGGGAGATTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATAAGTTATGATATAG	
BB_28S	GGGGAGATTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATAAGTTATGATATAG	

DLZ93645	GTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTACATTCTTATATATTTTATTGCAAGA	
B_28S	GTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTACATTCTTATATATTTTATTGCAAGA	
A_28S	GTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTACATTCTTATATATTTTATTGCAAGA	
BB_28S	GTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTACATTCTTATATATTTTATTGCAAGA	

DLZ93645	TGTTGTCGGCGTGCACCTCTTCCCTAGTAGAACGTCGCGACCCGTTGAGT	
B_28S	TGTTGTCGGCGTGCACCTCTTCCCTAGTAGAACGTCGCGACCCGTTGAGT	
A_28S	TGTTGTCGGCGTGCACCTCTTCCCTAGTAGAACGTCGCGACCCGTTGAGT	
BB_28S	TGTTGTCGGCGTGCACCTCTTCCCTAGTAGAACGTCGCGACCCGTTGAGT	

DLZ93645	GTCGGTCTATAGCCCGAGAGGTAGCCTTTAATTTTCAATTAAAGACCC	
B_28S	GTCGGTCTATAGCCCGAGAGGTAGCCTTTAATTTTCAATTAAAGACCC	
A_28S	GTCGGTCTATAGCCCGAGAGGTAGCCTTTAATTTTCAATTAAAGACCC	
BB_28S	GTCGGTCTATAGCCCGAGAGGTAGCCTTTAATTTTCAATTAAAGACCC	

DLZ93645	TTGGTGTTTTTCTGACTGGCTGCTCGATGGTATTCATAAGGTATTAAGCC	
B_28S	TTGGTGTTTTTCTGACTGGCTGCTCGATGGTATTCATAAGGTATTAAGCC	
A_28S	TTGGTGTTTTTCTGACTGGCTGCTCGATGGTATTCATAAGGTATTAAGCC	
BB_28S	TTGGTGTTTTTCTGACTGGCTGCTCGATGGTATTCATAAGGTATTAAGCC	

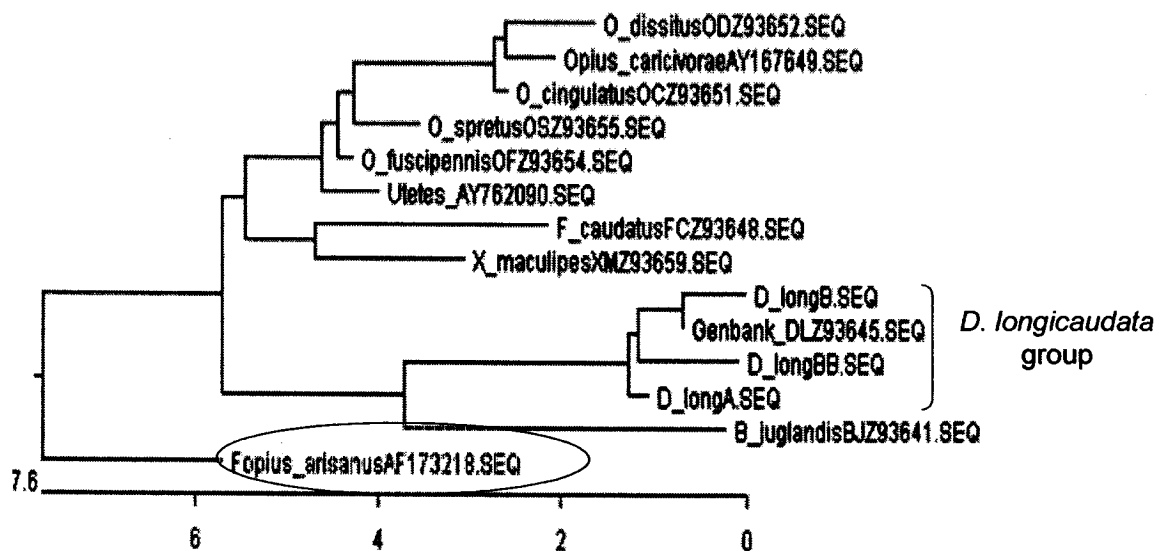
DLZ93645	GCATATTATGCGTTTATATCCGTCGCAAGCGGGTCAATTTTATAGTAG	
B_28S	GCATATTATGCGTTTATATCCGTCGCAAGCGGGTCAATTTTATAGTAG	
A_28S	GCATATTATGCGTTTATATCCGTCGCAAGCGGGTCAATTTTATAGTAG	
BB_28S	GCATATTATGCGTTTATATCCGTCGCAAGCGGGTCAATTTTATAGTAG	

DLZ93645	TACGACCTAGTGCCGTCGC	
B_28S	TACGACCTAGTGCCGTCGC	
A_28S	TACGACCTAGTGCCGTCGC	
BB_28S	TACGACCTAGTGCCGTCGC	

ภาพที่ 3. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 28s ใน *D. longicaudata* complex

ตารางที่ 2. แสดงความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของยีน 28s ใน *D. longicaudata* complex

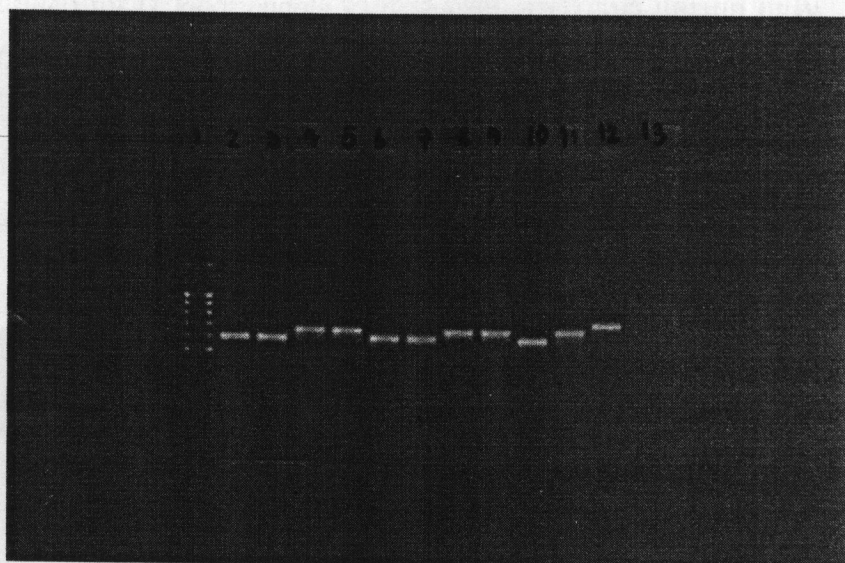
Nucleotide position (bp)				Haplotype
187	258	284	304	
T----	A----	A----	C	Bank
T----	A----	A----	A	DLB
A----	T	C----	G	DLA
A----	T	C----	G	DLBB



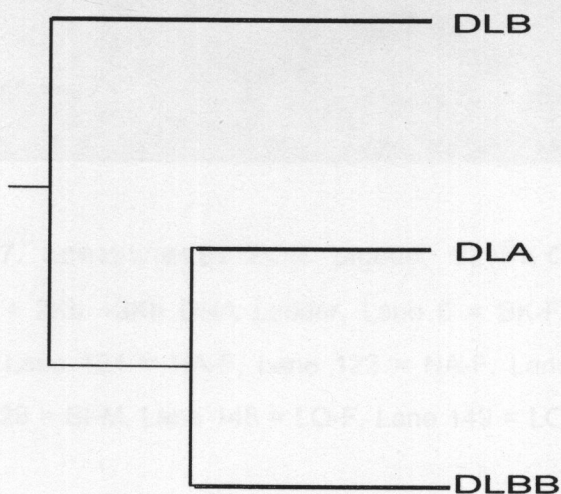
ภาพที่ 4. แสดง cladogram ของ *D. longicaudata* complex ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28s

ผลการดำเนินงาน : ยีนบริเวณ ITS2

PCR-product ของยีนบริเวณ ITS2 พบว่ามีความแตกต่างในกลุ่ม *D. longicaudata* (DLA, DLB และ DLBB) แล้ว (ดังภาพที่ 5) เมื่อนำ PCR product ไป sequence และทำการวิเคราะห์ พบว่า DLA, DLB และ DLBB แยกออกจากกัน (ดังภาพที่ 6) ข้อมูลนี้สอดคล้องกับผลการดำเนินงาน ในยีนบริเวณ 28s และ สนับสนุนการแบ่งแยก สปีชีส์ใน *D. longicaudata* complex



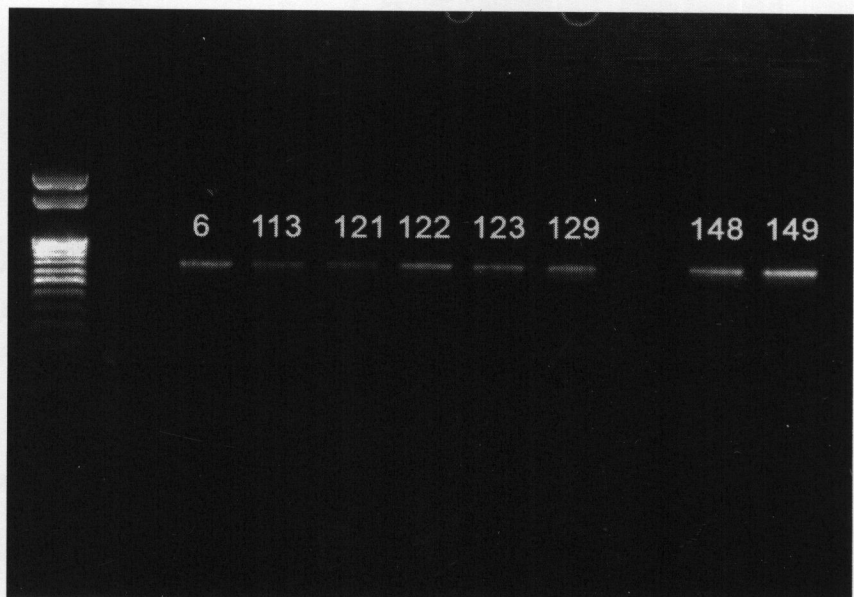
ภาพที่ 5. แสดงขนาดของ PCR product ของยีน ITS2 (Lane 1 = 1000 + 1.5 bp DNA Ladder, Lanes 2-3 = DLA, Lanes 4-5 = DLB, Lanes 6-7 = DLBB, Lanes 8-9 = DLB, Lanes 10-12 = ฯลฯ)



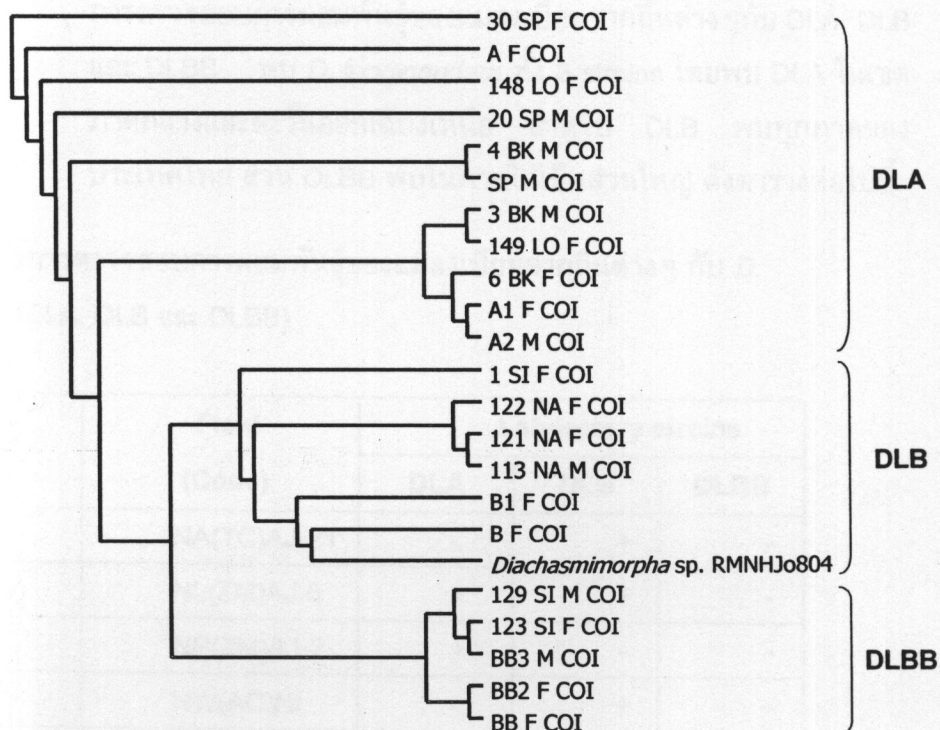
ภาพที่ 6. แสดงสายสัมพันธ์ของ *D. longicaudata* (DLA, DLB, DLBB) จากห้องปฏิบัติการที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2

ผลการดำเนินงาน : ยีนบริเวณ COI

PCR-product ของ mitochondrial DNA บริเวณ COI ไม่พบว่ามี ความแตกต่างในกลุ่ม *D. longicaudata* (DLA, DLB และ DLBB) และที่เก็บได้ จากท้องที่ต่างๆ(บางส่วน) (ดังภาพที่ 7) แต่เมื่อนำ PCR products ไป sequence และทำการวิเคราะห์ พบว่ากลุ่ม DLB แยกออกมาโดย สัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *D. longicaudata* จาก GenBank ขณะที่กลุ่ม DLA แยกออกจากกลุ่ม DLBB ขณะที่ทั้งสองกลุ่มก็แยกออกจาก DLB การ ตรวจสอบแมลงเบียนที่เก็บจากท้องที่(บางส่วน) ในประเทศไทย พบว่า แมลงเบียน *D. longicaudata* จากกรุงเทพฯ, สุพรรณบุรี และเลย อยู่ใน กลุ่ม DLA จากจังหวัดน่านและสุราษฎร์ธานีตกอยู่ในกลุ่ม DLB ส่วน ใหญ่ของตัวอย่างจากสุราษฎร์ธานีจะอยู่ในกลุ่ม DLBB (ดังภาพที่ 8) ข้อมูลนี้สอดคล้องกับผลการดำเนินงาน ในยีนบริเวณ 28s และ ITS2 และ สนับสนุนการแบ่งแยก สปีชีส์ใน *D. longicaudata* complex



ภาพที่ 7. แสดงขนาดของ PCR product ของยีน COI (Lane 1 = 100bp + 2Kb +3Kb DNA Ladder, Lane 6 = BK-F, Lane 113 = NA-M, Lane 121 = NA-F, Lane 122 = NA-F, Lane 123 = SI-F, Lane 129 = SI-M, Lane 148 = LO-F, Lane 149 = LO-F)



ภาพที่ 8. แสดงสายสัมพันธ์ของ *D. longicaudata* (DLA, DLB, DLBB) จากห้องปฏิบัติการและ ที่เก็บได้จากท้องที่ต่างๆ(บางส่วน) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI

การศึกษาการผสมข้ามสายพันธุ์

การดำเนินการวิจัย: หลังพัฒนาเทคนิคการผสมพันธุ์แมลงเบียนได้เป็นผลสำเร็จ และได้ศึกษาการผสมข้ามสายพันธุ์ของ *D. longicaudata* complex (DLA, DLB DLBB) จึงนำแมลงเบียน กลุ่ม *D. longicaudata* ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ มาผสมกับ DLA, DLB และ DLBB ที่เพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (stock) โดยให้ F_1 offspring เจริญภายใน *B. dorsalis* และ/หรือ *B. correcta*

ผลการดำเนินงาน: การผสมข้ามสายพันธุ์ในกลุ่ม *D. longicaudata* พบว่า DLA และ DLB มีการแบ่งแยกทางพันธุกรรม ผลงานได้รับการตีพิมพ์ ในวารสาร Biological Control (Kitthawee, 2008) นอกจากนี้การผสมข้ามสายพันธุ์

DLBB เพิ่มเข้ามาในกลุ่ม *D. longicaudata* complex พบได้ผลยืนยันการแบ่งแยกทางพันธุกรรมของกลุ่ม DLA, DLB และ DLBB

การตรวจสอบการผสมพันธุ์ของแมลงเบียนจากถิ่นต่างๆ กับ DLA, DLB และ DLBB พบ *D. longicaudata* ทั้ง 3 strains โดยพบ DLA ในเขตภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือ สำหรับ DLB พบทุกภาคของประเทศไทย ส่วน DLBB พบในภาคใต้เป็นส่วนใหญ่ ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3. ผลการตรวจสอบการผสมพันธุ์ของแมลงเบียนจากถิ่นต่างๆ กับ *D. longicaudata* (DLA, DLB และ DLBB)

Provinces	Field (Code)	Laboratory strains		
		DLA	DLB	DLBB
น่าน	NA(TC)AJ-21	-	+	-
หนองบัวลำภู	NL(ZM)AJ-5	+	+	-
นครปฐม	NP(ZM)AJ-2	+	-	-
นราธิวาส	NW(AC)NI	-	+	-
ปทุมธานี	PT(ZM)AP-1	+	-	-
สุราษฎร์ธานี	SI(TC)AJ-1	-	-	+
สุราษฎร์ธานี	SI(TC)AJ-2	-	-	+

+ = successful crosses

- = unsuccessful crosses

ศึกษาประสิทธิภาพของแมลงเบียนในการควบคุมควบคุมแมลงวันผลไม้

การดำเนินการวิจัย: ศึกษาชนิดของ hosts ที่เหมาะสมกับแมลงเบียนโดยให้แมลงเบียนโจมตีแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ/หรือ *B. correcta*

ผลการดำเนินงาน: พบว่าแมลงเบียนที่ผสมได้ (ตามตารางที่ 3) กับ DLA สามารถโจมตีแมลงวันผลไม้ *B. correcta* ส่วนที่ผสมได้กับ DLB และ DLBB สามารถโจมตี *B. dorsalis* ได้ดี ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4. ผลการตรวจสอบการควบคุมควบคุมแมลงวันผลไม้ *B. correcta* และ/หรือ *B. dorsalis*

Parasitoids (Code)	Hosts	
	<i>B. correcta</i>	<i>B. dorsalis</i>
DLA	+	-
DLB	+	+
DLBB	+	+
NA(TC)AJ-21	-	+
NL(ZM)AJ-5	+	+
NP(ZM)AJ-2	+	-
NW(AC)NI	-	+
NW(TC)NI	-	+
PT(ZM)AP-1	+	-
SI(TC)AJ-1	-	+
SI(TC)AJ-2	-	+
SN(ZM)AJ-1	+	-

+ = specific host

- = non-host

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

แมลงเบียน *D. longicaudata* ที่สำรวจและพบในหลายท้องถิ่นที่ได้เก็บรักษาไว้ กำลังดำเนินการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-SSCP แมลงเบียนกลุ่ม *D. longicaudata* complex ที่กำลังเล็งขยายพันธุ์ไว้ในห้องปฏิบัติการพบว่ามีความแตกต่างทางสายพันธุ์อย่างน้อย 3 สายพันธุ์ (DLA, DLB และ DLBB) ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่สามารถจัดจำแนกโดยวิธีทางสัณฐานวิทยาทั่วไป แต่การตรวจสอบทางอนุพันธุศาสตร์ด้วยเทคนิค PCR-SSCP จาก nuclear DNA บริเวณ 28s และ ITS2 จาก mitochondrial DNA บริเวณ COI พบว่าสามารถบอกความแตกต่างของกลุ่ม DLA, DLB และ DLBB ได้ชัดเจน ข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงถึง DLB แยกออกมาโดยสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *D. longicaudata* จาก GenBank ขณะที่กลุ่ม DLA แยกออกจากกลุ่ม DLBB ซึ่งสองกลุ่มนี้ได้แยกออกจาก DLB ด้วยการตรวจสอบแมลงเบียนจากท้องถิ่น (บางส่วน) พอจะกล่าวได้ว่า *D. longicaudata* กลุ่ม DLA พบทางภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กลุ่ม DLB พบทั่วไป ส่วน DLBB พบทางภาคใต้ของประเทศไทย ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้รับการยืนยันด้วยการผสมข้ามสายพันธุ์ (cross breeding experiments) พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์ DLA และ

DLB อาจมีการแบ่งแยกโดยขบวนการ sympatric speciation ขณะที่ DLBB น่าจะแบ่งแยกจากสายพันธุ์อื่นๆ โดยขบวนการ allopatric speciation ข้อสรุปที่กล่าวมานี้สมควรที่จะได้รับการยืนยันเพิ่มเติมจากการศึกษานิเวศวิทยาพันธุศาสตร์ของโครงการต่อไป

ปัญหาและอุปสรรค

1. การสำรวจและค้นหาแมลงเบียนยังทำได้น้อยกว่าแผน
2. การเลี้ยงแมลงเบียนให้ได้ผลดียังต้องการการดูแลเอาใจใส่อย่างมาก
3. การเลี้ยงแมลงเบียนหลายสายพันธุ์ยังคงเป็นภาระ
4. แถบ SSCP แมลงเบียนกลุ่ม *D. longicaudata* จากท้องที่ต่างๆ ยังอ่านยากอยู่บ้าง

แนวทางการแก้ไข

1. พยายามออกสำรวจและค้นหาแมลงเบียนชนิดเชื้อให้มากขึ้น
2. ได้พยายามจัดความสำคัญและรักษาสายพันธุ์ที่ต้องการตอบคำถามเป็นหลักก่อน
3. ต้องพัฒนาเทคนิค SSCP ให้ง่ายต่อการอ่านและง่ายต่อการนับ haplotypes ต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Gimeno, C., R. Belshaw, and D. L. Quicke. 1997. Phylogenetic relationships of the Alysinae/Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) and the utility of cytochrome b, 16S and 28S D2 rRNA. *Insect Mol. Biol.* 6: 273-84.
2. Kitthawee, S. 2008. Forced-contact mating: a technique for crossing experiments with the fruit fly parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biol. Control.* 44: 73-78
3. Kong, P., C. Hong, P. A. Richardson, and M. E. Gallegly. 2003. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal Genet. Biol.* 39: 238-49.
4. Shore, E. M., and G. M. Guild. 1987. Closely linked DNA elements control the expression of the Sgs-5 glue protein gene in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1: 829-39.
5. Wharton, R. A., and F. E. Gilstrap. 1983. Key to a status of opiine braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* s.l. (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 721-742.

สรุป OUTPUTS ที่ได้รับจากการดำเนินงาน
นิเวศวิทยาพันธุศาสตร์และกลไกการแยกสปีชีส์ ของแมลงเบียน (ศัตรูแมลงวันผลไม้)
***Diachasmimorpha longicaudata* complex ในประเทศไทย (BRT R_251010)**
ตั้งแต่เดือนมกราคม 2551 ถึง ธันวาคม 2551

1. การตีพิมพ์บทความในวารสารวิชาการ

1.1 ตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว (published) จำนวน ...1...เรื่อง ดังนี้

Author: Kitthawee S.

Title: Forced-contact mating: a technique for crossing experiments with the fruit fly parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae)

Journal Biological Control

Volume 44 pages 73-78

1.2 อยู่ระหว่างการจัดทำต้นฉบับ (in manuscript) จำนวน...1... เรื่อง ดังนี้

Author: Kitthawee S. and Julsirikul D.

Title: Molecular systematics of *Diachasmimorpha longicaudata* complex inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) sequences.

Journal in preparation

2. การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ จำนวน ...1... เรื่อง ดังนี้

Author: Prasopthum A., Tiensing T. and Kitthawee S.

Title: Identification of three strains of the *Diachasmimorpha longicaudata* complex (Hymenoptera: Braconidae) in Thailand using cuticular hydrocarbons

3. จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาตรี โท เอก ในโครงการ จำนวน 3 คน ดังนี้

3.1 ชื่อนักศึกษา: นางสาวดวงดา จุลศิริกุล

ชื่อวิทยานิพนธ์: Genetic diversity of fruit fly parasitoids in Thailand based on PCR-SSCP of 28S, ITS, COI and 16S regions

ระดับการศึกษา: ปริญญาเอก

- 3.2 ชื่อนักศึกษา: นางสาวอริศรา พงษ์ศิริ
ชื่อวิทยานิพนธ์: Systematics of the fruit fly parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: raconidae) complex species in Thailand.
ระดับการศึกษา: ปริญญาโท
- 3.3 ชื่อนักศึกษา: นายอรุณา ประสพธรรม
ชื่อโครงการวิจัย: Cuticular hydrocarbons of the fruit fly parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* complex.
ระดับการศึกษา: ปริญญาตรี

ลงนาม.....*อริศรา พงษ์ศิริ*
ผู้รับทุน
วันที่.....*5 กพ. 52*