บทคัดย่อ

T133915

รหัสโครงการ: RTA4280001

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

ชื่อนักวิจัย: วิสุทธิ์ ใบไม้[1], เฉลียว กุวังคะดิลก[1], ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์[1], สังวรณ์ กิจทวี[1], จอนห์ มิลน์[1], ปรีชา ประเทพา[2], ถาวร สุภาพรม[3]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

[3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ 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 ชนิดที่มีสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสอดคล้องกับข้อมูลด้านสัณฐานวิทยาและโครโมโซมซึ่งจำแนกออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *Diachasmimorpha, Fopius* และ *Psyttalia* การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 28S ribosomal RNA gene ได้ข้อมูลที่บ่งชี้ว่าแมลงเบียนชนิด *F. arisanus* เป็นสปีชีส์ซับซ้อนและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมตามสภาพภูมิศาสตร์ ข้อมูลพื้นฐานนี้มีประโยชน์สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงวันผลไม้หรือแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในจุลินทรีย์กลุ่ม *Wolbachia* กับแมลงวันผลไม้และแมลงเบียนโดยการหาลำดับเบสของยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มเปลือกนอกของจุลินทรีย์และยีนไซโตโครมออกซิเดส 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 ลำดับเบสของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (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

Project Code: RTA4280001

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

Investigators: Visut Baimai[1], Chaliow Kuvangkadilok[1], Pattamaporn Kittayapong[1], Sangvorn Kitthawee[1], John Milne[1], Preecha Prathepha[2], Thavorn Supaprom[3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, [2]Biotechnology Department, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Muang District, Mahasarakham, [3]Department 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 *Psyttalia*. 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.