

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

สายพันธุ์หลังขาวกับสายพันธุ์จาก ต.ตรอกนอง อ.ขลุง จ.จันทบุรี

*กนกพร บุญศิริชัย¹ สุชาดา เสกสรรค์วิริยะ¹ วณิช ลิมโสภาสมณี¹

จิตติมา คงรัตนอารมณ์¹ ทศพล แทนรินทร์¹ และขวัญพิสุทธิ สัจจศิลป์เลิศ¹

¹กลุ่มวิจัยและพัฒนาชีวเคมี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)

9/9 หมู่ 7 ต.ทรายมูล อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120 โทรศัพท์ 0 3739 2901 โทรสาร 0 3739 2913

E-mail: kboonsir@yahoo.com

บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) สายพันธุ์หลังขาวได้รับการพัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในการควบคุมประชากรแมลงวันผลไม้ด้วยเทคนิคการใช้แมลงที่เป็นหมันจากรังสี งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการถ่ายทอดลักษณะหลังขาวของแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาว และเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ระหว่างแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาวกับสายพันธุ์จาก ต.ตรอกนอง อ.ขลุง จ.จันทบุรี ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าลักษณะหลังขาวเป็นลักษณะด้อย และพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 12 ชุดที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาว แต่พบในแมลงวันผลไม้จากตรอกนองที่มีความถี่อัลลีล 0.4 – 0.9 จำนวน 4 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้จากตรอกนอง แต่พบในแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาวที่มีความถี่อัลลีล 0.3 – 0.5 จำนวน 4 แถบ ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการถ่ายทอดพันธุกรรมจากแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาวสู่แมลงธรรมชาติ ในการควบคุมประชากรแมลงวันผลไม้ด้วยเทคนิคการใช้แมลงที่เป็นหมันจากรังสีต่อไป

คำสำคัญ : *Bactrocera dorsalis* (Hendel) เทคนิคการใช้แมลงที่เป็นหมัน ความผันแปรเชิงพันธุกรรม

Genetic Variation among the White-striped *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Comparison with a Trok Nong-derived Population

*Kanokporn Boonsirichai¹, Suchada Segsarnviriy¹, Wanitch Limohpasmanee¹,

Titima Kongratarnon¹, Thodsapol Thannarin¹ and Kwanpisut Sungsinleart¹

¹Research and Development Division, Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization)

9/9 Mu 7, Sai Mun, Ongkharak, Nakhon Nayok 26120

Phone: 0 3739 2901, Fax: 0 3739 2913, E-mail: kboonsir@yahoo.com

Abstract

A white-striped strain of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) had been developed for the fruit fly population control using the radiation-induced sterile insect technique (SIT). This report aimed at elucidating the inheritance

of the white-striped phenotype and the genetic differences between the white-striped strain and the strain derived from Trok Nong subdistrict, Khlung district, Chantaburi. The white-striped phenotype appeared recessive to the wild type. Meanwhile, twelve ISSR primers yielded DNA bands with significantly different frequencies between the two populations. The analysis indicated four DNA bands which were absent from the white-striped population but apparent at frequencies 0.4 – 0.9 among the Trok Nong-derived population. Another four DNA bands were found absent from the Trok Nong-derived population but existed at frequencies 0.3 – 0.5 among the white-striped population. These data may benefit the monitoring of gene flow from the white-striped fruit flies to the natural population when released in a SIT program.

Keywords: *Bactrocera dorsalis* (Hendel), SIT, genetic variation

1. บทนำ

แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) เป็นศัตรูสำคัญของไม้ผลในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้^{1,2} วณิช และคณะ³ ได้พัฒนา *B. dorsalis* สายพันธุ์หลังขาวซึ่งมีแถบด้านข้างและด้านบนของส่วนอก (lateral vittae และ scutellum) เป็นสีขาว (สายพันธุ์ปกติเป็นสีเหลือง) และศึกษาวิจัยการใช้แมลงสายพันธุ์นี้ในการควบคุมประชากร *B. dorsalis* ในพื้นที่ ต.ตรอกนอง อ.ขลุง จ.จันทบุรี ด้วยเทคนิคการใช้แมลงที่เป็นหมันด้วยรังสีหรือเอสไอที (sterile insect technique; SIT) โดยใช้ลักษณะหลังขาวเป็นเครื่องหมายสำหรับติดตามการกระจายประชากรของแมลงวันผลไม้ที่ผ่านการฉายรังสีในพื้นที่ศึกษา

รายงานนี้ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะหลังขาว และเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาวกับสายพันธุ์แมลงวันผลไม้จากตำบลตรอกนองซึ่งผ่านการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อประโยชน์ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรแมลงวันผลไม้ในพื้นที่ศึกษา⁴ การเฝ้าระวังเพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมจากสายพันธุ์หลังขาวสู่สายพันธุ์ธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ และการควบคุมคุณภาพของแมลงที่เพาะเลี้ยงในกิจกรรมเอสไอที⁵ โดยการศึกษานี้มีสมมติฐานว่าแมลงวันผลไม้ทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สามารถตรวจพบได้ด้วยการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สายพันธุ์แมลงวันผลไม้และการเพาะเลี้ยง

แมลงวันผลไม้สายพันธุ์ตรอกนองเป็นสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแมลงวันผลไม้จาก ต.ตรอกนอง อ.ขลุง จ.จันทบุรี เป็นจำนวน 3 - 5 ชั่วโมง แมลงวันผลไม้สายพันธุ์

หลังจากได้จากการกลายพันธุ์ของแมลงวันผลไม้จาก อ.องครักษ์ จ.นครนายก¹ และผ่านการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นจำนวน 40 - 42 ชั่วโมง การทดลองผสมพันธุ์ทำโดยการเพาะเลี้ยงแมลงวันผลไม้เพศผู้และเพศเมียต่างสายพันธุ์ 50 คู่ต่อกรง เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการของมานนท์⁶ คำนวณความถี่อัลลีลตามหลักพันธุศาสตร์ประชากร⁷

2. การสกัดดีเอ็นเอและการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

บดตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ในสารละลายประกอบด้วย NaCl 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 20 mM EDTA pH 8.0 25 mM SDS 1 % ย่อยโปรตีนด้วย proteinase K 10 U ที่ 55 °C ตกตะกอนโปรตีนด้วย NaCl 1 M ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 60 % ทำละลายดีเอ็นเอด้วย Tris-HCl pH 8.0 10 mM EDTA pH 8.0 0.1 mM

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากดีเอ็นเอแมลงวันผลไม้ 150 ng ด้วยไพรเมอร์สำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด inter simple sequence repeats หรือ ISSR (NAPS Unit Standard Primers: UBC Primer Set #9) 15 pmol ปฏิกิริยาประกอบด้วย Tris-HCl pH 8.8 75 mM (NH₄)₂SO₄ 20 mM MgCl₂ 3 mM dNTPs 0.4 mM Taq DNA polymerase 0.5 U ที่อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที 45 °C 1 นาที และ 72 °C 2 นาที จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระบวนการอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 2 %

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การถ่ายทอดลักษณะหลังขาว

จากการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะแถบสีขาวที่ด้านข้างและด้านบนของส่วนนอก หรือลักษณะ “หลังขาว” โดยการผสมพันธุ์ *B. dorsalis* (Hendel) สายพันธุ์หลังขาวกับสายพันธุ์ตรอกนอง พบลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 (F₁) มากกว่าร้อยละ 96 มีแถบที่ด้านข้างและด้านบนของส่วนนอกเป็นสีเหลืองเหมือนสายพันธุ์ตรอกนอง และน้อยกว่าร้อยละ 4 มีแถบเป็นสีขาว (Table 1) เนื่องจากสัดส่วนของลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ที่มีแถบส่วนนอกเป็นสีขาวมีเพียงส่วนน้อย จึงสันนิษฐานว่าลักษณะแถบสีขาวบนส่วนนอกเป็นลักษณะด้อย และลักษณะแถบสีเหลืองเป็นลักษณะเด่น ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับรายงานของ Saul และ McCombs⁸ ใน *B. cucurbitae* (Coquillett) การพบลูกผสมส่วนหนึ่งมีแถบสีขาวที่ส่วนนอกแสดงว่า ในประชากรแมลงวันผลไม้สายพันธุ์ตรอกนองที่ใช้ทดลองนั้นมีพันธุกรรมหลังขาวแฝงอยู่ จากการผสมพันธุ์แบบ reciprocal cross สามารถประเมินความถี่อัลลีลหลังขาวในประชากรตรอกนองเพศผู้ได้เป็น 0.027 ± 0.007 และเพศเมียเป็น 0.038 ± 0.038 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่อัลลีลในแต่ละเพศ (p จาก student's t-test > 0.05) และมีความถี่อัลลีลหลังขาวเฉลี่ยของประชากรเป็น 0.032 ± 0.016

เมื่ออัลลีลหลังขาวจากแมลงวันผลไม้สายพันธุ์ตรอกนอง พบกับอัลลีลหลังขาวจากประชากรแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาวในการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ จึงแสดงลักษณะหลังขาวให้เห็นได้ในลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ดังที่ได้กล่าวแล้ว สำหรับประชากรสายพันธุ์ตรอกนองนั้น โอกาสที่อัลลีลหลังขาวจะพบกันและแสดงลักษณะหลังขาวให้เห็นได้เป็น 0.003 ± 0.000 ซึ่งจำนวนแมลงในการทดลองนี้ (300 – 400 ตัวต่อซ้ำ) ไม่มากพอที่จะทำให้ตรวจพบแมลงหลังขาวในประชากรสายพันธุ์ตรอกนอง (ค่า p จาก chi-square statistics > 0.05)

Table 1 Occurrence of yellow-striped and white-striped fruit flies among the F_1 progeny

Parents		F_1 generation	
Female	Male	Yellow-striped	White-striped
Trok Nong	Trok Nong	$100 \pm 0 \%$	$0 \pm 0 \%$
White-striped	White-striped	$0 \pm 0 \%$	$100 \pm 0 \%$
White-striped	Trok Nong	$97.3 \pm 0.5 \%$	$2.7 \pm 0.5 \%$
Trok Nong	White-striped	$96.2 \pm 3.8 \%$	$3.8 \pm 3.8\%$

3.2 ความแตกต่างทางพันธุกรรม

เมื่อตรวจพบว่าแมลงวันผลไม้สายพันธุ์ตรอกนองมีอัลลีลหลังขาวแฝงอยู่ในประชากร จึงจำเป็นต้องตรวจเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ตรอกนองกับแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาว เพื่อประโยชน์ในการระบุสายพันธุ์ และเฝ้าระวังการปนเปื้อนในธรรมชาติ โดยพันธุกรรมแมลงสายพันธุ์หลังขาวที่เกิดจากกิจกรรมเอสไอที จึงใช้เทคนิค ISSR ในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างสองสายพันธุ์ จากไพรเมอร์ ISSR 100 ชุด พบเพียง 77 ชุดที่ให้แถบดีเอ็นเอ โดยมีจำนวนตำแหน่งพันธุกรรมที่ถูกสุ่มตรวจประมาณ 500 ตำแหน่ง จากจำนวนนี้พบไพรเมอร์เพียง 12 ชุดเท่านั้นที่แสดงความแตกต่างในชุดลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างแมลงสองสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา โดยมีอัลลีลของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความถี่อัลลีลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จำนวน 28 อัลลีล (Fig. 1 และ Table 2) แถบดีเอ็นเอที่พบเสมอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาว (ความถี่อัลลีล = 1.00) มีจำนวน 4 อัลลีล จากไพรเมอร์ 836 850 878 และ 884 แถบดีเอ็นเอที่พบได้ในสายพันธุ์ตรอกนองแต่ไม่พบในสายพันธุ์หลังขาวมีจำนวน 4 อัลลีล จากไพรเมอร์ 850 876 884 และ 899 ซึ่งแถบดีเอ็นเอทั้งสองชุดนี้จะสามารถใช้ประกอบการระบุสายพันธุ์แมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาวได้ เนื่องจากเป็นอัลลีลที่มีความสม่ำเสมอภายในสายพันธุ์

การประเมินการเคลื่อนที่ (gene flow) หรือการปนเปื้อนของยีนจากแมลงสายพันธุ์หลังขาวสู่แมลงธรรมชาติในตำบลตรอกนอง ต้องอาศัยแถบดีเอ็นเอที่โดยปกติแล้วจะไม่พบในสายพันธุ์ตรอก

นอง (ความถี่อัลลีล = 0.00) แต่อาจพบได้ในสายพันธุ์หลังขาว การศึกษาครั้งนี้พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 อัลลีล ที่แสดงลักษณะดังกล่าว จากไพรเมอร์ 878 880 และ 887 (Table 2) โดยมีความถี่อัลลีลในสายพันธุ์หลังขาวเป็น 0.30 - 0.50 เนื่องจากประชากรแมลงวันผลไม้สายพันธุ์ตรอกนองที่ใช้ในการศึกษาเป็นประชากรที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ประชากรเช่นนี้ย่อมสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมจากสาเหตุ population bottleneck และ genetic drift ร่วมกับ selection pressure ของการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ^{9,10,11} โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรนี้ย่อมแตกต่างจากโครงสร้างของประชากรธรรมชาติ ในอนาคตจึงจำเป็นต้องศึกษาการกระจายของแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ในประชากรปัจจุบันของ ต.ตรอกนอง เพื่อใช้ประกอบการประเมินการเคลื่อนที่ของยีนจากแมลงวันสายพันธุ์หลังขาวสู่ประชากรแมลงวันผลไม้ในธรรมชาติต่อไป

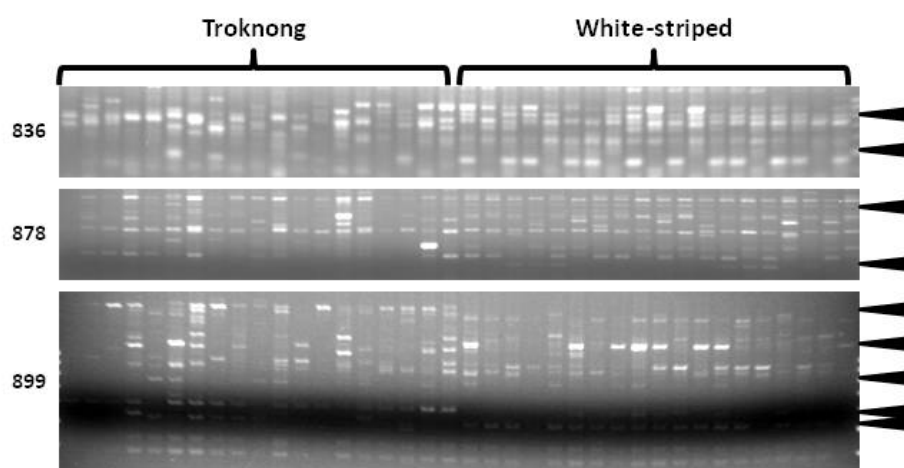


Fig. 1 ISSR fingerprints of Trok Nong and white-striped strain, 19 individuals each. Primer names are indicated on the left. Arrows designate polymorphic DNA bands.

5. สรุป

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะหลังขาวของแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาว พบว่าเป็นลักษณะด้อย และสามารถตรวจพบพันธุกรรมหลังขาวในประชากรแมลงวันผลไม้สายพันธุ์ตรอกนองที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีความถี่อัลลีล 0.032 ± 0.016 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดีเอ็นเอพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาวกับสายพันธุ์ตรอกนอง โดยพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่พบในแมลงสายพันธุ์หลังขาวแต่พบได้ในแมลงสายพันธุ์ตรอกนองจำนวน 4 แถบ แถบดีเอ็นเอที่พบเสมอในแมลงสายพันธุ์หลังขาวแต่พบได้บ้างในแมลงสายพันธุ์ตรอกนองจำนวน 4 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่พบในแมลงสายพันธุ์ตรอกนองแต่พบได้บ้างในแมลงสายพันธุ์หลังขาวจำนวน 4 แถบ ความแตกต่างเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการระบุสายพันธุ์และการเฝ้าระวังการถ่ายทอดพันธุกรรมจากแมลงวันผลไม้สายพันธุ์หลังขาวสู่ประชากรธรรมชาติต่อไป

Table 2 ISSR polymorphic alleles among Trok Nong and white-striped strains of *B. dorsalis*

Primer	DNA Sequence ^s	Size of polymorphic alleles (bp)	Frequency of occurrence ^{&}	
			Troknong	White-striped
816	5'-CACACACACACACACAT-3'	550	0.07	0.72
820	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTC-3'	700	0.20	0.62
836	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3'	600	0.53	1.00
		450	0.16	0.63
850	5'-GTGTGTGTGTGTGTGYC-3'	1300	0.44	0.12
		1250	0.67	1.00
		700	0.67	0.95
		450	0.44	0.00
876	5'-GATAGATAGACAGACA-3'	1450	0.22	0.63
		1275	0.39	0.79
		1250	0.28	0.84
		1100	0.44	0.00
878	5'-GGATGGATGGATGGAT-3'	1100	0.33	1.00
		680	0.00	0.32
880	5'-GGAGAGGAGAGGAGA-3'	600	0.00	0.37
884	5'-HBHAGAGAGAGAGAGAG-3'	1,000	0.53	0.00
		900	0.47	1.00
885	5'BHBGAGAGAGAGAGAGA-3'	520	0.47	0.95
887	5'-DVTCTCTCTCTCTC-3'	1850	0.00	0.39
		1800	0.00	0.50
		1450	0.82	0.56
		1225	0.35	0.94
		1000	0.94	0.72
899	5'-CATGGTGTGGTCATTGTTCCA-3'	1500	0.89	0.00
		1200	0.17	0.53
		950	0.33	0.89
		600	0.72	0.21
		500	0.28	0.74
900	5'-ACTTCCCCACAGGTTAACACA-3'	1,000	0.20	0.56

^sR = A, G; Y = C, T; B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; V = A, C, G.

[&]All polymorphic bands shown here are statistically significant at $p < 0.05$ by the chi-square test.

7. เอกสารอ้างอิง

1. มนตรี จิรสุรัตน์, 2544. แมลงวันผลไม้ที่สำคัญของประเทศไทยและการแพร่กระจาย. แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา, หน้า 13-18.
2. Waterhouse, D.F., 1993. The major arthropod pests and weeds of agriculture in Southeast Asia. ACIAR, Canberra, Australia.
3. วณิช ลิมโสภาสมณี, จิตติมา คงรัตน์อาภรณ์, ทศพล แทนรินทร์, สุชาดา เสกสรรค์วิริยะ, สาธิต วงษ์ศิริ, กนกพร บุญศิริชัย, 2553. การควบคุมแมลงวันผลไม้แบบพื้นที่กว้างโดยเทคนิคการใช้แมลงที่เป็นหมันผสมผสานร่วมกับวิธีการอื่น ณ ตำบลตรอกนอง อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี. รายงานผลงานวิจัย 2552 สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน), หน้า 47-50.
4. Aketarawong, N., Chinvinijkul, S., Orankanok, W., Guglielmino, C.R., Franz, G., Malacrida, 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 dorsalis* (Hendel), control programs in Thailand. *Genetica* 139(1), 129-40.
5. Krafur, E., 2005. Role of population genetics in the sterile insect technique. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. International Atomic Energy Agency and Springer, the Netherlands. pp.389-406.
6. มานนท์ สุตันทวงษ์, 2531. การเลี้ยงแมลงวันผลไม้ในสกุลดากัสตามชนิดให้ได้จำนวนมาก. เอกสารประกอบการบรรยายเรื่องการฝึกอบรมการควบคุมและกำจัดแมลงวันผลไม้โดยเทคนิคการใช้แมลงที่เป็นหมัน. สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ, หน้า 1-8.
7. Dorak, M.T., 2010. Basic population genetics. <http://www.dorak.info/genetics/popgen.html>.
8. Saul, S. H., McCombs, S.D., 1992. Light eye color mutants as genetic markers for released populations of Hawaiian fruit flies (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 85, 1240-1245
9. Landergott, U., Holderegger, R., Kozłowski, G., Schneller, J.J., 2001. Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata*. *Heredity* 87, 344-355.
10. Li, Q., Park, C., Endo, T., Kijima, A., 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture* 235(1-4), 207-222.
11. Gasnier, N., Cabaret, J., Moulia, C., 1992. Allozyme variation between laboratory reared and wild populations of *Teladorsagia circumcincta*. *Int. J. Parasitol.*, 22, 581-587.