ความหลากหลายทางพันธุกรรมและชีวชนิดของแมลงบั่วในประเทศไทย

Genetic Diversity and Biotypes of the Rice Gall Midge in Thailand

จิรพงศ์ ใจรินทร์[1)] กัลยา สานเสน[1)] สงวน เทียงดีฤทธิ์[1)] พิกุล ลีลากุด[1)] รุ่งนภา กาวิชัย[2)]
วันทนา ศรีรัตนศักดิ์[3)] นลินี เจียงวรรธนะ[4)]

Jirapong Jairin[1)] Kanlaya Sansen[1)] Sa-nguan Teangdeerith[1)] Phikul Leelakud[1)]
Rungnapa Kawichai[2)] Wantana Sriratanasak[3)] Nalinee Chiengwattana[4)]

Abstract

An amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biotype-specific markers were used for identification of genetic diversity and biotypes of rice gall midge, *Orseolia oryzae* in Thailand. Pupae and adults of the gall midges were collected from 19 field locations of 12 provinces during 2006 - 2007. Total of 242 polymorphic AFLP bands were generated from 12 selective primer pairs. Cluster analysis, performed by the UPGMA, separated the gall midge populations into four distinct groups. To identify the biotype, five specific biotype markers were used to characterize the collected gall midges. Two biotypes of the gall midges, biotype 2 and 5, were identified from all populations used in this research. The results showed that the genetic diversity was not associated with the biotypes of gall midges. This research may provide basic information to develop an effective strategy for controlling gall midge outbreak in Thailand.

Keywords: *Orseolia oryzae*, rice gall midge, biotype, genetic diversity, AFLP

บทคัดย่อ

การใช้โมเลกุลเครื่องหมาย amplified fragment length polymorphism (AFLP) และโมเลกุลเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับชีวชนิด (biotype-specific markers) สามารถจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมและชีวชนิดของแมลงบั่ว (*Orseolia oryzae*) ที่พบในประเทศไทย ดำเนินการโดยเก็บดักแด้และตัวเต็มวัยแมลงบั่วจากแหล่งปลูกข้าว 19 แห่ง ใน 12 จังหวัดในช่วงปี 2549-2550 วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างประชากร จำนวน 242 อัลลีล จาก 12 คู่ไพรเมอร์ และจัดกลุ่มโดย UPGMA สามารถจัดกลุ่มประชากรได้ 4 กลุ่ม และตรวจพบแมลงบั่ว 2 ชีวชนิด คือ ชีวชนิด 2 และ 5 จากประชากรที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับชีวชนิด พบว่า ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชีวชนิด ไม่มีความสอดคล้องกัน การศึกษาครั้งนี้เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการป้องกันกำจัดแมลงบั่วที่ระบาดในประเทศไทย

คำสำคัญ : *Orseolia oryzae* แมลงบั่วข้าว ชีวชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรม AFLP

1) ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตู้ ปณ. 65 อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000 โทรศัพท์ 0-4534-4103-4 ต่อ 122
Ubon Ratchathani Rice Research Center, P.O.Box 65, Mueang, Ubon Ratchathani 34000 Tel. 0-4534-4103-4 ext. 122
2) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ – แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ต.แม่ทราย อ.ร้องกวาง จ.แพร่ 54140
Maejo University, Phrae campus, Maesai, Rong Kwang, Phrae 54140
3) สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร กทม. 10900 โทรศัพท์ 0-2579-3693
Bureau of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2579-3693
4) ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท อ.เมือง จ.ชัยนาท 17000 โทรศัพท์ 0-6641-1733
Chai Nat Rice Research Center, Mueang, Chai Nat 17000 Tel. 0-6641-1733

Bureau of Rice Research and Development

คำนำ

แมลงบั่ว (rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood Mason)) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญในพื้นที่ปลูกข้าวภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางบางจังหวัด มีรายงานการระบาดทำลายข้าวตั้งแต่ ปี 2476 และมักพบระบาดเป็นประจำในเขตพื้นที่จังหวัดน่าน แพร่ ลำปาง เชียงราย ตาก กำแพงเพชร หนองคาย และเลย ในช่วงปี 2535-2541 พื้นที่ปลูกข้าวเสียหายจากการทำลายของแมลงบั่วใน 20 จังหวัด ไม่น้อยกว่า 46,000 ไร่ (Tayathum *et al*., 2004) การป้องกันกำจัดแมลงบั่วทำได้ค่อนข้างยาก การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการควบคุมและป้องกันกำจัดแมลงบั่วที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของการใช้พันธุ์ต้านทานคือ ความหลากหลายของชีวชนิดแมลงบั่วในแต่ละพื้นที่ปลูกข้าว ปัจจุบันยังไม่มีพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อแมลงบั่วทุกชีวชนิด จำเป็นต้องเลือกใช้พันธุ์ต้านทานที่เฉพาะเจาะจงกับชีวชนิดในแต่ละพื้นที่

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและชีวชนิด เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการตัดสินใจเลือกใช้พันธุ์ข้าวต้านทาน รวมถึงการคัดเลือกหาแหล่งพันธุกรรมต้านทานเพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ ปฏิกิริยาของพันธุ์ข้าวต้านทานต่อการเข้าทำลายของแมลงบั่วในประเทศไทย Tayathum และคณะ (2004) พบว่า มีความแตกต่างของชีวชนิดในบางพื้นที่ แต่ยังไม่สามารถระบุถึงชีวชนิดที่ชัดเจน เนื่องจากการศึกษาชีวชนิดแมลงบั่วใช้พันธุ์ข้าวทดสอบเปรียบเทียบที่ไม่ทราบยีนต้านทาน จึงไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลกับต่างประเทศที่มีการศึกษาด้านนี้อย่างจริงจัง ยกตัวอย่างเช่น ในประเทศอินเดีย มีการศึกษาและจำแนกชีวชนิดแมลงบั่วได้อย่างชัดเจน ทำให้ง่ายต่อการเลือกใช้พันธุ์ต้านทานในพื้นที่ที่มีความแตกต่างของชีวชนิด (Kalode and Bentur, 1989; Lingaraj *et al*., 2008)

อนึ่ง การศึกษาความหลากหลายของประชากรแมลงบั่วโดยใช้เทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ Ehtesham และคณะ (1995) พบความแตกต่างของจำนวนซ้ำของลำดับเบสบนโครโมโซม (repetitive DNA elements) ซึ่งสามารถนำมาศึกษาความหลากหลายของแมลงบั่วได้ ทว่าการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายที่จะตรวจนับจำนวนซ้ำดังกล่าวยังมีน้อยมาก ส่วนการศึกษาความหลากหลายของแมลงบั่วโดยใช้เทคนิค amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) สามารถจัดกลุ่มของแมลงบั่วที่พบในประเทศแถบเอเชียได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยแมลงบั่วจากประเทศจีน ลาว และบางพื้นที่ในอินเดีย กลุ่มที่สองประกอบด้วยแมลงบั่วที่พบส่วนใหญ่ในประเทศอินเดีย (Katiyar *et al*., 2000) ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการจัดกลุ่มแมลงบั่วด้วยเทคนิคดังกล่าว แต่มีการจัดกลุ่มความหลากหลายโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งสามารถจัดประชากรแมลงบั่วได้ 3 กลุ่ม จากประชากรแมลง 15 แห่งใน 14 จังหวัด และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายกับชีวชนิดที่ศึกษาปฏิกิริยาความต้านทานของพันธุ์ข้าว (Tayathum *et al*., 2004)

การศึกษาปฏิกิริยาการเข้าทำลายพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวต้านทานที่มียีนต้านทานแมลงบั่วแตกต่างกัน ในประเทศอินเดียสามารถจำแนกชีวชนิดของแมลงบั่วได้ 5 ชีวชนิด (Kalode and Bentur, 1989) ในขณะที่พบ 4 ชีวชนิดในประเทศจีน และ 2 ชีวชนิดในประเทศศรีลังกา เนื่องจากความแตกต่างของชีวชนิดของแมลงบั่วเกิดจากความแตกต่างในระดับพันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ จึงได้มีการศึกษาความแตกต่างดังกล่าวในระดับเอนไซม์และโปรตีน ต่อมาเมื่อเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้งานวิจัยในระดับดีเอ็นเอของแมลงบั่วเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันโมเลกุลเครื่องหมายมีบทบาทอย่างมากในการจำแนกชีวชนิดหรือความหลากหลายของแมลงบั่ว นักวิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อแยกความแตกต่างของแมลงบั่วชีวชนิด 1 2 3 4 และ 5 ที่พบในอินเดียได้ (Behura *et al*., 1999, 2000) โดยเริ่มจากการใช้เทคนิค RAPD และ AFLPs และพัฒนามาเป็นโมเลกุลเครื่องหมาย sequence tagged site (STS) เพื่อให้ง่ายและประหยัดในการนำไปใช้ (Behura *et al*., 1999) ซึ่งสามารถนำมาใช้จำแนกชีวชนิดแมลงบั่วในประเทศไทยเปรียบเทียบกับภูมิภาคอื่นได้

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความหลากหลาย และการจำแนกชีวชนิด ทำให้เข้าใจและสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงชีวชนิดของแมลงบั่วในพื้นที่ระบาดได้แม่นยำและรวดเร็วขึ้น และง่ายต่อการตัดสินใจเลือกใช้พันธุ์ต้านทานที่เหมาะสม นอกจากนี้ ยังเป็นข้อมูลพื้นฐาน

Bureau of Rice Research and Development

สำหรับการคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมต้านทาน เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์และการป้องกันกำจัดแมลงบั่ว งานวิจัยนี้ได้เก็บรวบรวมประชากรแมลงบั่ว และนำมาศึกษาความหลากหลาย โดยจำแนกชีวชนิดของแมลงบั่วที่พบในประเทศไทยในระดับดีเอ็นเอ เพื่อสนับสนุนการป้องกันกำจัดโดยการเลือกใช้พันธุ์ต้านทานที่เหมาะสมต่อไป

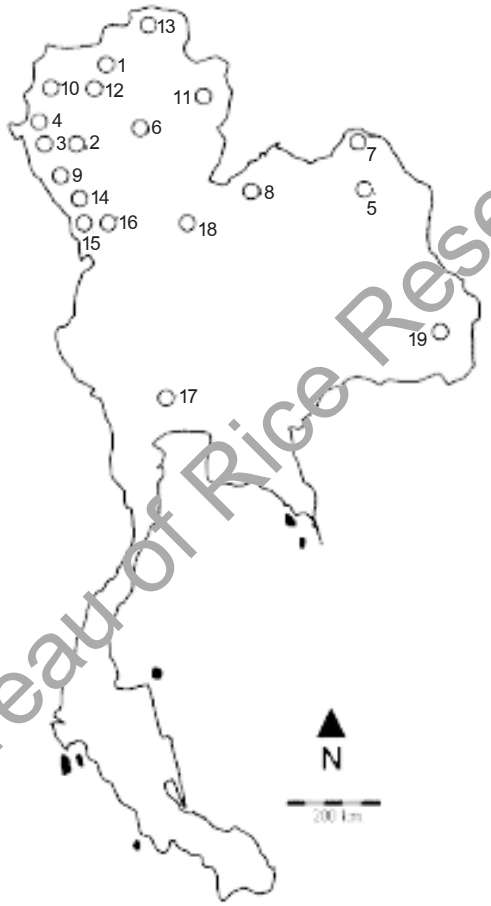
อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างแมลงบั่ว

เก็บตัวอย่างดักแด้และตัวเต็มวัยของแมลงบั่วจากแหล่งปลูกข้าวภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางในช่วงปี 2549-2550 ประกอบด้วยจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย ลำปาง น่าน ตาก สกลนคร หนองคาย นครพนม เลย พิษณุโลก อุบลราชธานี และนครปฐม (Fig. 1) ดักแด้แมลงบั่วเก็บจากต้นข้าวที่แสดงอาการหลอดบั่ว และเก็บตัวเต็มวัยที่พบในแปลงนาและจากกับดักแสงไฟ เก็บรักษาตัวอย่างแมลงในแอลกอฮอล์ 95%

การสกัดดีเอ็นเอจากแมลงบั่ว

แยกสกัดดีเอ็นเอจากแมลงบั่วแต่ละตัว โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก พยอมและคณะ (2550) บ่มตัวอย่างแมลงบั่วใน extraction buffer (200mM Tris-HCL pH 8.0, 200mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS, 0.008 mg/ml proteinase K) ในปริมาณ 400 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 12 ชม. จากนั้นบดตัวอย่างแมลงให้ละเอียดและเติมสารละลาย 2X CTAB (2% w/v CTAB, 100mM Tris-HCL pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 1.4M NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone) นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 °ซ. นาน 1 ชม. ทำให้เย็นลงที่ -20 °ซ. นาน



Pop. No	District	Province	Designation
1	Phrao	Chiang Mai	PHR-CMI
2	Mae Wang	Chiang Mai	MWG-CMI
3	Mae Sariang	Mae Hong Son	MSR-MHS
4	Khun Yuam	Mae Hong Son	KYM-MHS
5	Dong Mafai	Sakon Nakhon	DMF-SKN
6		Lampang	LPG
7	Phon Phisai	Nong Khai	PPS-NKI
8	Wang Saphung	Loei	WSP-LOE
9	Mae Chaem	Chiang Mai	MCM-CMI
10	Mueang	Mae Hong Son	MUA-MHS
11	Mueang	Nan	MUA-NAN
12	San Pa Tong	Chiang Mai	SPT-CMI
13	Chiang Khong	Chiang Rai	CKG-CRI
14		Tak	TAK1
15		Tak	TAK2
16		Tak	TAK3
17	Kamphaeng Saen	Nakhon Pathom	KPS-NPT
18		Phitsanulok	PSL
19	Mueang	Ubon Ratchathani	MUA-UBN

Fig. 1 Nineteen sites of the rice gall midge collection during 2006-2007 in 12 provinces of Thailand, population no. 1-18 used for diversity analysis

Bureau of Rice Research and Development

5 นาที แล้วจึงเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ที่แช่เย็น ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยการเขย่าเบาๆ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ 70% ปริมาณ 500 ไมโครลิตร เขย่าประมาณ 1 นาที และปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นเทแอลกอฮอล์ทิ้งและปล่อยให้ระเหยจนหมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ.

การวิเคราะห์ความแตกต่างของแมลงบั่วโดยเทคนิค AFLPs

วิเคราะห์ความแตกต่างของแมลงบั่วโดยเทคนิค AFLPs ซึ่งดัดแปลงจาก Vos และคณะ (1995) ตัดดีเอ็นเอของแมลงบั่วด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter ไปพร้อมกัน [100 ng/µl genomic DNA, 10X T4 ligate buffer, 0.5M NaCl, 1mg/ml BSA, 12u/µl *Eco*RI, 8u/ul *Mse*I, 3u/µl T4 ligate, 5pmol *Eco*RI adapter (forward: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' reward: 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'), 50pmol *Mse*I adapter (forward: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3',reward: 5'-TACTCAGGACTCAT-3')] บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 12 ชม. หลังจากนั้น ทำให้เจือจางโดยเติมน้ำกลั่น อัตรา 1:10 (ดีเอ็นเอต้นแบบ : น้ำกลั่น) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการเพิ่มปริมาณ ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง (*Eco*RI-primer+1: 5' AGACTGCGTACCAATTCN-3' และ *Mse*I-primer +1: 5' GATGAGTCCTGAGTAAN-3') สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) ครั้งแรก (PCR condition : 94 °ซ. นาน 1 นาที, 56 °ซ. นาน 1 นาที, 72 °ซ. นาน 1 นาที จำนวน 20 รอบ) และใช้ selective primers (Table 1) คัดเลือกและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 [PCR condition: 94 °ซ. นาน 2 นาที (94 °ซ. นาน 30 วินาที, 65 °ซ. นาน 30 วินาที 72 °ซ. นาน 1 นาที จำนวน 12 รอบ และแต่ละรอบลดอุณหภูมิรอบละ 0.7 °ซ.) 94 °ซ. นาน 30 วินาที, 56 °ซ. นาน 30

Table 1 Primers for selective amplification used in the AFLP fingerprinting of the 18 populations of the rice gall midge

Primer combination	*Eco*RI selective primers[1)] (5'--3')	*Mse*I selective primers[1)] (5'--3')
E-CGT / M-TAC	AGACTGCGTACCAATTC***CGT*** [1)]	GATGAGTCCTGAGTAA***TAC***[1)]
E-GTA / M-CAG	AGACTGCGTACCAATTC***GTA***	GATGAGTCCTGAGTAA***CAG***
E-GTA / M-CAA	AGACTGCGTACCAATTC***GTA***	GATGAGTCCTGAGTAA***CAA***
E-GTA / M-CAC	AGACTGCGTACCAATTC***GTA***	GATGAGTCCTGAGTAA***CAC***
E-GTA / M-CAT	AGACTGCGTACCAATTC***GTA***	GATGAGTCCTGAGTAA***CAT***
E-GCA / M-CAG	AGACTGCGTACCAATTC***GCA***	GATGAGTCCTGAGTAA***CAG***
E-GCA / M-CAC	AGACTGCGTACCAATTC***GCA***	GATGAGTCCTGAGTAA***CAC***
E-GCA / M-CAA	AGACTGCGTACCAATTC***GCA***	GATGAGTCCTGAGTAA***CAA***
E-ACC / M-GTC	AGACTGCGTACCAATTC***ACC***	GATGAGTCCTGAGTAA***GTC***
E-AC / M-GTC	AGACTGCGTACCAATTC***AC***	GATGAGTCCTGAGTAA***GTC***
E-ACC / M-GCC	AGACTGCGTACCAATTC***ACC***	GATGAGTCCTGAGTAA***GCC***
E-GT / M-CAC	AGACTGCGTACCAATTC***GT***	GATGAGTCCTGAGTAA***CAC***

[1)] Bold italic letters following the primer sequences indicated the selective nucleotides added to the core *Eco*RI (E) and *Mse*I (M) primer sequences

Bureau of Rice Research and Development

Table 2 Sequences of forward and reverse primers (Behura *et al*., 1999, 2000) used in multiplex PCR for identification of biotypes of the rice gall midge populations

Marker	Forward	Reverse	Size (bp)	Biotype distinguished
S09	ACATAACAATCACGTGCTAG	TGAACAATAGAAAAACAAATTGA	800	1,4
Y13-1	CGATGATCCCATGAACATTT	GAACACAAAAAATAGATCGA	450	1,4,5
Y13-2	TTAGCCCGATAAATCTTTCAC	AGAAATCGATTCCAGGACGT	600	5
Y13-3	ATTTTACCAGAATCGCGATG	ATGGTTTTACATTAAGATGAAAT	750	4
Y13-4	TCCCTGTGGATCATCTATTC	CAGGAATGAAGCTCTTGTTG	1,100	3, 5

วินาที, 72 °ซ. นาน 1 นาที จำนวน 23 รอบ] จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel 6%

การวิเคราะห์และการจัดกลุ่มประชากรแมลงบั่ว

บันทึกข้อมูลความผันแปรแถบดีเอ็นเอของแมลงบั่วที่แสดงความแตกต่างระหว่างประชากร (polymorphic band) โดยให้ค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป็น 0 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.10x (F.J. Rohlf, State university of New York, Stony Brook, USA) ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของ Dice (1945) และจัดกลุ่มประชากรแมลงโดยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) (Sokal and Michener, 1958)

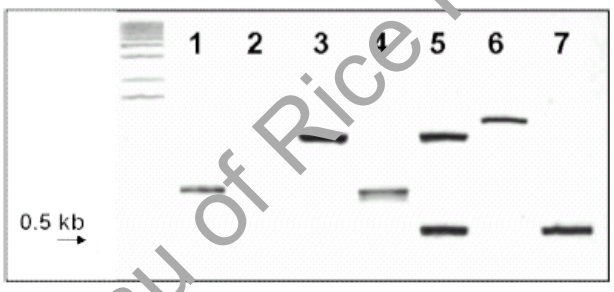


Fig. 2 Multiplex PCR amplification products of biotypes 1-5 (lanes 1-5, respectively), the African gall midge *O. oryzivora* (lane 6) and genomic DNA of gall midge collected during the Kerala gall midge outbreak of 1996-97 (lane 7) generated using Multiplex PCR from 5 pairs of biotype-specific primers (Table 2) (Behura *et al.*, 1999)

การจำแนกชีวชนิดโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายเฉพาะเจาะจงกับชีวชนิดของแมลงบั่ว

ตรวจจำแนกชีวชนิดของแมลงบั่วแต่ละแห่ง โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับชีวชนิด (Table 2) ที่สามารถแยกความแตกต่างแมลงบั่ว ชีวชนิดที่ 1 2 3 4 และ 5 (Fig. 2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR (PCR condition: 94 °ซ. นาน 1 นาที, 55 °ซ. นาน 1 นาที, 72 °ซ.นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ) และใช้ชุดไพรเมอร์ที่ประกอบด้วย 5 คู่ไพรเมอร์ในแต่ละปฏิกิริยา PCR (multiplex PCR) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel 1%

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงบั่ว

ดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงบั่ว จำนวน 18 ประชากรที่เก็บจากแหล่งปลูกข้าว 12 จังหวัด วิเคราะห์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย AFLPs (Fig. 3) ซึ่งแยกความแตกต่างที่เกิดจากผลของการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I คัดเลือกและขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากคู่ไพรเมอร์ เพื่อหาแถบดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างระหว่างประชากร ผลจากการวิเคราะห์ 12 คู่ไพรเมอร์ (Table 1) พบว่า จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 20-36 อัลลีลต่อคู่ไพรเมอร์ รวมแถบดีเอ็นเอที่พบทั้งหมดจำนวน 325 อัลลีล สามารถคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างประชากรและชัดเจนพอที่จะให้คะแนนได้ จำนวน 242 อัลลีล (Table 3) คิดเป็นร้อยละ 75.5 ของแถบดีเอ็นเอที่พบ จากการวิเคราะห์และจัดกลุ่มความ

Bureau of Rice Research and Development

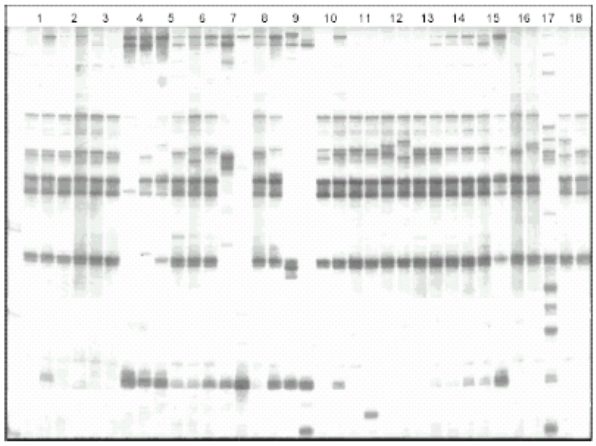


Fig. 3 AFLP analysis of DNA from 18 rice gall midge populations collected from 12 provinces in Thailand, DNA of an individual pupae or adult was digested with *Eco*RI and *Mse*I and pre-amplified using primer pair E-ACC/M-GTC

สัมพันธ์โดยวิธี UPGMA ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.79 (Fig. 3) สามารถจัดกลุ่มแมลงบั่วได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแมลงบั่วที่เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ (พร้าว แม่วาง สันป่าตอง) น่าน แม่ฮ่องสอน (เมือง แม่สะเรียง) เชียงราย (เชียงของ) นครปฐม ตาก หนองคาย สกลนคร เลย พิษณุโลก และสกลนคร กลุ่มที่ 2 3 และ 4 ประกอบด้วยแมลงบั่วเพียงประชากรเดียวที่เก็บจาก จังหวัดลำปาง แม่ฮ่องสอน (ขุนยวม) และ เชียงใหม่ (แม่แจ่ม) ตามลำดับ ประชากรในกลุ่มแรกซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่และค่อนข้างจะมีความใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.84 ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากดักแด้ของแมลงบั่วจะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยกว่าตัวเต็มวัยที่เก็บจากกับดักแสงไฟ

ชีวชนิดของแมลงบั่ว

ความแตกต่างของดีเอ็นเอแมลงบั่ว ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ของประชากร จากการทำ multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของแมลงบั่วในประเทศอินเดีย 5 ชีวชนิด (Fig. 2) พบว่า แมลงบั่วจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน (ขุนยวม) สกลนคร (ดงมะไฟ) ลำปาง เลย (วังสะพุง) เชียงใหม่ (แม่แจ่ม) ตาก และพิษณุโลก ไม่มีแถบดีเอ็นเอ (Fig. 5) คล้ายกับชีวชนิด 2 ที่พบในอินเดีย แสดงว่าประชากรแมลงบั่วดังกล่าว มีแนวโน้มจะเป็นชีวชนิด 2 ซึ่งพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน Gm1 และ Gm2 ยังสามารถต้านทานได้ดี (Mohan *et al*., 1994)

Table 3 Average number of bands, number of polymorphic bands and proportion of polymorphic fragments obtained from selective primer combinations

Primer combination	Total band	Polymorphic band	% polymorphic
E-GCA / M-CAA	36	33	91.7
E-GCA / M-CAG	29	15	51.7
E-GCA / M-CAC	22	12	54.5
E-GTA / M-CAT	26	19	73.1
E-GTA / M-CAG	34	28	82.4
E-GTA / M-CGT	21	10	47.6
E-GTA / M-CAC	26	24	92.3
E-GTA / M-CAA	28	25	89.3
E-ACC / M-GTC	31	27	87.1
E-AC / M-GTC	30	25	83.3
E-ACC / M-GCC	22	12	54.6
E-GT / CAC	20	10	50.0
Total	325	242	
Average	27.1	20.2	71.5

แมลงบั่วจากจังหวัดเชียงใหม่ (พร้าว แม่วาง สันป่าตอง) แม่ฮ่องสอน (แม่สะเรียง เมือง) เชียงราย (เชียงของ) หนองคาย (โพนพิสัย) น่าน (เมือง) ตาก นครปฐม (กำแพงแสน) และอุบลราชธานี (เมือง) มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp (Fig. 5) เหมือนกับประชากรแมลงบั่วที่ระบาดทำลายข้าวใน Kerala ประเทศอินเดีย ในช่วงปี ค.ศ. 1996-1997 ซึ่งได้รับการยืนยันว่าเป็นอีกกลุ่มหนึ่งของชีวชนิด 5 ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าชีวชนิดของแมลงบั่วในไทยบางประชากรเหมือนกับแมลงบั่วใน Kerala ประเทศอินเดีย ปกติแถบดีเอ็นเอของชีวชนิด 5 ที่ได้จากการทำ multiplex PCR จะมีอยู่ 2 แถบ (Fig. 2) แต่แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแมลงบั่วที่เก็บจาก Kerala และบางประชากรในประเทศไทยมีเพียงแถบเดียว พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน Gm1 Gm3 Gm5 และ Gm6 สามารถต้าน

Bureau of Rice Research and Development

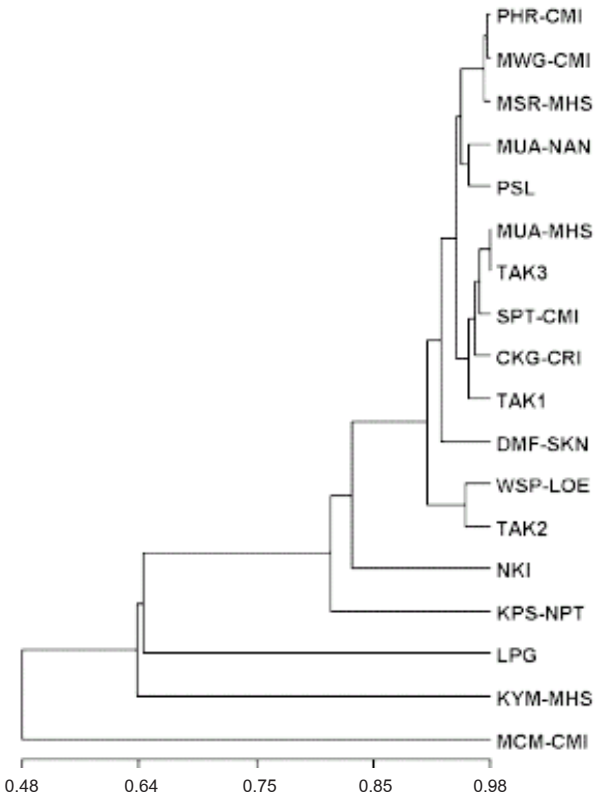


Fig. 4 Cluster analysis of rice gall midge based on data obtained from AFLPs of 18 populations, the dendrogram constructed by using UPGMA based on Dice's similarity coefficient

ทานได้ดีต่อชีวชนิดนี้ (Biradar *et al.* 2004) ผลการทดสอบปฏิกิริยาความต้านทานของพันธุ์ข้าว W1263 ที่มียีนต้านทาน Gm1 กับประชากรแมลงบั่วจากจังหวัดอุบลราชธานีซึ่งมีแนวโน้มเป็นชีวชนิด 5 พบว่า พันธุ์ข้าวดังกล่าวยังต้านทานได้ดีเช่นกัน

การทราบชีวชนิดของแมลงบั่วทำให้ง่ายต่อการจัดการและป้องกันกำจัด โดยเฉพาะการเลือกใช้พันธุ์ต้านทานให้เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ที่มีความแตกต่างของชีวชนิด การวิเคราะห์ชีวชนิดของแมลงบั่วโดยใช้เทคนิค PCR ช่วยให้สามารถจำแนกความแตกต่างของชีวชนิดแมลงบั่วได้รวดเร็วและแม่นยำ แม้ว่าจะวิเคราะห์จากแมลงเพียงตัวเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบปฏิกิริยาความต้านทานจากพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานแตกต่างกัน ซึ่งวิธีการดังกล่าวอาจเกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากสภาพแวดล้อมของการทดสอบ และใช้ระยะเวลานานในการขยายปริมาณและทดสอบแมลงแต่ละประชากร

เนื่องจากในอดีต ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอที่จะยืนยันชีวชนิดของแมลงบั่วในประเทศไทยและไม่มีการใช้พันธุ์/สายพันธุ์ข้าวต้านทานที่ทราบยีนต้านทานมาใช้ในการศึกษา ทำให้ไม่สามารถจำแนกและเปรียบเทียบชีวชนิดกับประเทศอื่นได้ แต่การใช้โมเลกุลเครื่องหมายสามารถนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับที่อื่นได้ อย่างไรก็ดี เพื่อยืนยันความถูกต้องของชีวชนิดโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย ควรมีการศึกษาความแตกต่างของปฏิกิริยาต้านทานของพันธุ์ข้าวต่อแมลงบั่วควบคู่กันไป โดยเลือกใช้พันธุ์ตรวจสอบที่ทราบยีนต้านทาน เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของแมลงบั่ว

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมและชีวชนิด

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลการจัดกลุ่มความหลากหลาย

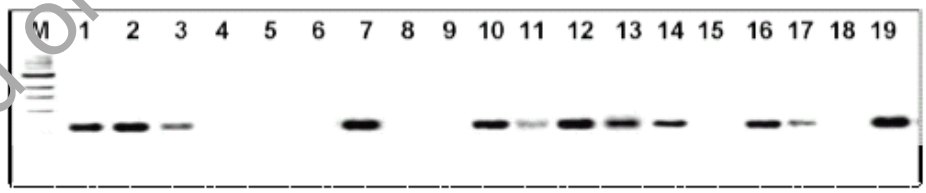


Fig. 5 Multiplex PCR amplification products of the biotype-specific fragment from genomic DNA of the rice gall midges collected from PHR-CMI (1), MWG-CMI (2), MSR-MHS (3), KYM-MHS (4), DMF-SKN (5), LPG (6), PPS-NKI (7), WSP-LOE (8), MCM-CMI (9), MUA-MHS (10), TTG-NAN (11), SPT-CMI (12), CKG-CRI (13), TAK1 (14), TAK2 (15), TAK3 (16), KPS-NPT (17), PSL (18) and MUA-UBN (19)

Bureau of Rice Research and Development

ทางพันธุกรรมโดยใช้ AFLPs และการจำแนกชีวชนิดโดยโมเลกุลเครื่องหมายที่เจาะจงกับชีวชนิดของแมลงบั่วในประเทศไทย พบว่า ข้อมูลทั้งสองไม่มีความสอดคล้องกัน กล่าวคือ ประชากรแมลงที่จัดอยู่ต่างกลุ่มกันมีชีวชนิดที่เหมือนกัน ถึงแม้ว่าประชากรแมลงบั่วที่เก็บจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน (ขุนยวม) ลำปาง และเชียงใหม่ (แม่แจ่ม) จะมีความแตกต่างของดีเอ็นเอเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจากที่อื่น เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย AFLPs (Fig. 4) แต่การตรวจสอบโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับชีวชนิด พบว่า แมลงบั่วทั้ง 3 ประชากรเป็นชีวชนิดที่เหมือนกับประชากรอื่น (Fig. 5) ประชากรแมลงในกลุ่มที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่า 95% เช่น แมลงบั่วที่เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ (พร้าว แม่วาง) แม่ฮ่องสอน (แม่สะเรียง) น่าน และพิษณุโลก แต่กลับพบว่าชีวชนิดของประชากรจากจังหวัดพิษณุโลกแตกต่างจากประชากรในกลุ่มดังกล่าว (Fig. 4) Tayathum และคณะ (2004) พบเช่นกันว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย RAPDs ไม่มีความสัมพันธ์กับชีวชนิดเมื่อดูจากปฏิกิริยาการเข้าทำลายพันธุ์ข้าว ดังนั้น ข้อมูลความหลากหลายทาง พันธุกรรมเพียงอย่างเดียวไม่สามารถอธิบาย หรือจำแนกชีวชนิดแมลงบั่วได้ อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิค AFLPs หรือ RAPDs สามารถหาความแตกต่างระหว่างชีวชนิด และพัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับชีวชนิดได้ (Behura *et al.*, 1999, 2000)

ปัจจุบัน การเก็บรวบรวมประชากรแมลงบั่ว และทดสอบปฏิกิริยาต้านทานของพันธุ์ข้าวต่อแมลงบั่วดำเนินการในศูนย์วิจัยข้าวหลายแห่งทั่วประเทศ ดังนั้น ข้อมูลจากการศึกษาเมื่อนำมาใช้ร่วมกับข้อมูลการวิเคราะห์ชีวชนิดโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย จะได้ข้อมูลเพียงพอเพื่อใช้ประโยชน์ในการพยากรณ์ชีวชนิดและคัดเลือกพันธุ์ต้านทานที่เหมาะสมในพื้นที่ระบาดแต่ละแห่ง นอกจากนี้ การเก็บตัวอย่างแมลงบั่วให้ครอบคลุมพื้นที่ปลูกข้าว และจำแนก ติดตามการเปลี่ยนแปลงชีวชนิดของแมลงบั่วแต่ละพื้นที่ในแต่ละฤดูปลูก จะทำให้เข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงของชีวชนิดในแต่ละปี ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการป้องกันกำจัด และสามารถเลือกใช้พันธุ์ต้านทานที่มีอยู่จำกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

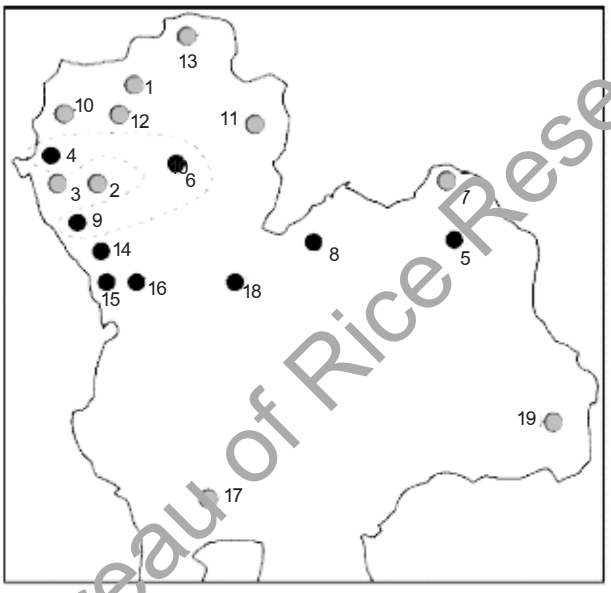


Fig. 5 Two biotypes of rice gall midges in Thailand, biotype 2 and biotype 5 indicated by black and gray spots, respectively. Biodiversity of the gall midge using AFLPs separated into four distinct groups, group 1 was outside the dotted line and group 2, 3 and 4 were inside the dotted line

สรุปผลการทดลอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงบั่ว ที่เก็บจาก 12 จังหวัดในประเทศไทย สามารถจัดกลุ่มแมลงบั่วได้ 4 กลุ่ม การตรวจสอบชีวชนิดของแมลงบั่วโดยใช้ชุดไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง พบ 2 ชีวชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอินเดีย พบว่า ชีวชนิดของแมลงบั่วที่พบในไทยคือชีวชนิดที่ 2 และ 5 แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของพันธุกรรมกับชีวชนิด ดังนั้น ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้จำแนกชีวชนิดของแมลงบั่วได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ อยู่ภายใต้โครงการความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญในประเทศไทย ซึ่งได้รับงบประมาณจากรัฐบาลไทย ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการเก็บรวบรวมประชากรแมลงบั่ว

Bureau of Rice Research and Development

เอกสารอ้างอิง

พยอม โคเบลลี่, วราพงษ์ ชมาฤกษ์ และพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2550. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย. วารสารวิชาการข้าว 1(1) : 44-51.

Behura, S.K., S. Nair, S.C. Sahu and M. Mohan. 2000. An AFLP marker that differentiates the biotypes of Asian rice gall midge is linked to sex and also linked to avirulence. Mol. Gen. Genet. 263 : 328-334.

Behura, S.K., S.C. Sahu, S. Rajamani, A. Devi, R. Mago, S. Nair and M. Mohan. 1999. Differentiation of Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason), biotype by sequence characterized amplified regions (SCARs). Insect Mol. Biol. 8 : 391-397.

Biradar, S.K., R.M. Sundaram, T. Thirumurugan, J.S. Bentur, S. Amudhan, V.V. Shenoy, B. Mishra, J. Bennett and N.P. Sarma. 2004. Identification of flanking SSR markers for a major rice gall midge resistance gene Gm1 and their validation. Theor. Appl. Genet. 109 : 1468-1473.

Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26 : 297-302.

Ehtesham, N.Z., J.S. Bentur and J. Bennett. 1995. Characterization of a DNA sequence that detects repetitive DNA elements in the Asian rice gall midge (*Orseolia oryzae*) genome: potential use in DNA fingerprinting of biotypes. Gene 153 : 179-183.

Kaloda, M.B. and J.S. Bentur. 1989. Characterization of Indian biotypes of rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-mason) (Diptera: Cecidomyiidae). Insect Sci. Applic. 10 : 219-224.

Katiyar SK, G. Chandel, Y. Tan, Y. Zhang, B. Huang, L. Nugaliyadde, K. Fernando, J.S. Bentur, S. Inthavong, S. Constantino and J. Bennett. 2000. Biodiversity of Asian rice gall midge (*Orseolia oryzae* Wood Mason) from five countries examined by AFLP analysis. Genome 43 : 322-332.

Lingaraj, V.K., A.K. Chakravarthy and T.N. Eregowda. 2008. Detection of Asian rice gall midge (*Orseolia oryzae*) biotype1 in the new locations of Karnataka, South India. Bull. Insectology 61 : 277-281.

Mohan, M., S. Nair, J.S. Bentur, U.P. Rao and J. Bennett. 1994. RFLP and RAPD mapping of the rice Gm2 gene that confers resistance to biotype 1 of gall midge (*Orseolia oryzae*). Theor. Appl. Genet. 87 : 782-788.

Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1958. A statistic method for evaluating systematic relationships. Univ. Kans. Sci. Bull. 28 : 1409-1438.

Tayathum, C., T. Attathom, D. Thongphak and K. Sripongpankul. 2004. Rice gall midge in Thailand: current status and biotype characterization. pp. 89-97. *In:* Bennett, J. *et al.* (eds), New Approaches to Gall Midge Resistance in Rice. International Rice Research Institute.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23 : 4407-4414.

Bureau of Rice Research and Development