การตรวจวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

Species Delimitation of Egg Parasitoids Subfamily Telenominae (Platygastridae) in Rice Paddies Using Molecular Technique

จารุวัตถ์ แต้กุล ยุวรินทร์ บุญทบ ชมัยพร บัวมาศ
อิทธิพล บรรณาการ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร สิทธิศิโรฒม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae นับเป็นวงศ์ที่มีความสำคัญมากที่สุดใน Superfamily Platygastroidea ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเข้าทำลายไข่ของแมลงศัตรูข้าวหลายชนิด ทั้งนี้แตนเบียนไข่วงศ์ย่อยนี้มีแนวโน้มที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในแปลงปลูกข้าวโดยชีววิธีอย่างมีประสิทธิภาพ แต่การวินิจฉัยความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้ ในส่วนใหญ่สามารถบ่งชี้ได้เพียงแค่ระดับสกุลเนื่องจากแมลงในวงศ์ย่อยนี้มีขนาดเล็กมาก ขนาดลำตัวยาวโดยประมาณ 2-3 มิลลิเมตร และลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกันมาก (cryptic species complex) การใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีภาพมาช่วยในการวินิจฉัยจำแนกชนิด ทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์ของการทดลองคือ เพื่อทราบชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้ ดี เอ็น เอ บาร์โค้ด ซึ่งขณะนี้ได้ดำเนินสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแตนเบียนไข่ในแปลงปลูกข้าวอินทรีย์และแปลงปลูกข้าวที่ไม่ใช้สารเคมี ณ จังหวัด กรุงเทพมหานครและปริมณฑล สุพรรณบุรี สิงห์บุรี อุทธยา อ่างทอง ชัยนาท บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีษะเกศ และ นครราชสีมา ได้ตัวอย่างเพื่อดำเนินการสกัด ดี เอ็น เอ จำนวน 40 ตัวอย่าง วินิจฉัยตัวอย่างในอันดับวงศ์ย่อยจนถึงชนิดได้ 5 ชนิด ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกชนิดได้ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ 10 ลักษณะประกอบด้วย 1) central keel structure on frons 2) frontal depression 3) head shape in dorsal view 4) hyperoccipital carina 5) brister plate beneth compound eyes 6) genal striae 7) number of calvomeres in female antenna 8) episternal foveae next to 1st coxa 9) orientation of malar sulcus 10) development of basal vein (Rs+M) in fore wing ดำเนินการสกัด ดี เอ็น เอ โดยวิธีการสกัดแบบเก็บรักษาตัวอย่าง ได้สารละลายดี เอ็น เอ เพื่อทำปฏิกิริยา PCR ทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยา PCR ขณะนี้ได้ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เพื่อทำการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นจำนวน 5 sequences จำนวน 5 ชนิด

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-06-60

คำนำ

แมลงในกลุ่ม ผึ้ง ต่อ แตนและมด (Hymenoptera) จัดว่าเป็นแมลงกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในแง่แมลงที่มีประโยชน์ ความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้มีมากกว่า 115,000 ชนิด (LaSalle and Gauld, 1993) จากการศึกษาถึงสายวิวัฒนาการ (phylogenetic position) พบว่า Hymenoptera มีความสัมพันธ์มากที่สุด (sister group) ต่อกลุ่มแมลงที่มีการเจริญเติบโตครบวงจร หรือ Holometabola (Sharkey, 2007; Savard *et al.*, 2006) โดยทั่วไปแล้วแมลงในกลุ่มผึ้ง ต่อ แตน แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มกินพืช paraphyletic Symphyta (sawflies, woodwasps) และแมลงผสมเกสร มด และ แตน monophyletic Apocrita ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย monophyletic Aculeata และ polyphyletic Parasitica กลุ่มย่อย Aculeata และ Parasitica เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในแง่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแตนเบียน (parasitoids wasps) พบว่าการนำเข้าแตนเบียนเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช (classical biological control) ประสบความสำเร็จสูงถึง 87% จากการนำเข้าแมลงศัตรูธรรมชาติทั้งหมด (Greathead, 1986; Lasalle and Gauld, 1993)

แมลงในกลุ่มแตนเบียนมีความน่าสนใจมากที่สุดในกลุ่มแมลงศัตรูธรรมชาติในแง่ของชีววิทยา แมลงในกลุ่มนี้สามารถอาศัยบริโภคอาหารทั้งในตัวเหยื่อ (endoparasitoids) และบนตัวเหยื่อ (ectoparasitoids) แตนเบียนแตกต่างจาก ตัวห้ำและตัวเบียนกล่าวคือ ตัวห้ำ (predator) เข้าทำลายและฆ่าเหยื่อโดยทางตรงและครั้งละหลายตัว ตัวเบียน (parasite) สร้างความรำคาญหรือบาดเจ็บให้กับเหยื่อแต่จะไม่ฆ่าเหยื่อ ในทางกลับกันแตนเบียน (parasitoids) เข้าทำลายเหยื่อครั้งละ 1 ตัว ตัวอ่อนกัดกินอวัยวะภายในเหยื่อและทำให้เหยื่อตายในที่สุด จำนวนของแตนเบียนภายในเหยื่ออาจแตกต่างกัน มีเพียงแค่ 1 ตัว (solitary) หรือหลายตัว (gregarious) ความสำคัญของแตนเบียนประกอบไปด้วย 1) ช่วยรักษาสมดุลของระบบนิเวศ แตนเบียนเข้าทำลายเหยื่อจัดเป็นการรักษาระดับการระบาดของแมลง 2) สามารถใช้ในการวัดระดับการแพร่กระจายของแมลง พบว่าหากมีแตนเบียนชนิดใดอยู่เป็นจำนวนมาก อาจมีผลมาจากความอุดมสมบูรณ์ของเหยื่อ 3) การใช้แตนเบียนควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี พบว่าเป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จทั้งแมลงศัตรูทางการเกษตร ป่าไม้ และทางการแพทย์ และยังช่วยลดระดับการใช้สารเคมีควบคุมแมลงศัตรูพืช 4) แมลงศัตรูพืชลดระดับความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง และ 5) ช่วยส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม

แตนแบนไข่ คือแตนเบียนที่เข้าทำลายไข่ของเหยื่อ พบว่ามีการใช้แตนเบียนไข่ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีถึง 7 วงศ์ และมี 1 ชนิด ผลิตเพื่อเป็นการค้าและประสบความสำเร็จในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ *Trichogramma* (Mills, 2010) ทั้งนี้จากแตนเบียนไข่ที่ถูกค้นพบ แต่ยังมีแตนเบียนไข่อีกหลายชนิดที่อยู่ในธรรมชาติที่ยังไม่มีการค้นพบและศึกษา แตนเบียนวงศ์ใหญ่ Platygastroidea จัดเป็นแตนเบียนไข่ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง มีการจัดจำแนกสายบรรพบุรุษในกลุ่มเดียวกันกับวงศ์ใหญ่ Prototrupoidea และ Cynipoidea สร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ชนิด

monophyly (Sharkey, 2007) ระดับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน มีการรวบรวมข้อมูลปัจจุบันใน Hymenoptera On-line database โดย Johnson (2014) มีเพียง 1 วงศ์ได้แก่ Platygastridae ประกอบด้วย 5 วงศ์ย่อยและมีความหลากชนิดดังต่อไปนี้ Platygastrinae (45 genera, 1,745 species), Sceliotrachelinae (28 genera, 142 species), Scelioninae (155 genera, 2,571 species), Teleasinae (13 genera, 509 species), และ Telenominae (20 genera, 907 species) มีเขตการแพร่กระจายครอบคลุมทั่วโลก การศึกษาแมลงในกลุ่มนี้ เขตร้อนชื้นเป็นเขตที่ได้มีการศึกษาน้อยที่สุด (Austin *et al.*, 2005)

แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae นับเป็นวงศ์ที่มีความสำคัญมากที่สุดใน Superfamily Platygastroidea ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี แมลงในวงศ์ย่อยนี้มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก ทั้ง โลกเก่า และโลกใหม่ ประกอบไปด้วย 20 สกุลและ 907 ชนิด ทั่วโลก ในประเทศไทยพบรายงานในแปลงปลูกข้าว 3 สกุลแต่ยังไม่มีการศึกษาโดยละเอียดในวงศ์ย่อยนี้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญที่แยก Telenomine ออกจากวงศ์ย่อยอื่นคือ ปล้องท้องส่วนบน (dorsal metasomatic tergites) จับกันแบบหลวมๆ กับปล้องท้องส่วนล่าง (ventral metasomatic tergites) ดังนั้นจึงไม่สามารถเห็นส่วนของรอยกดด้านข้างลำตัว (impressed submarginal ridge) เหมือนวงศ์ย่อยอื่น ปล้องท้องปล้องที่ 2 (T2) มีขนาดใหญ่และยาวกว่าปล้องท้องอื่นๆ เพศเมียมีปล้องหนวด (antennal segments) 10 – 11 ปล้องในขณะที่เพศผู้มี 12 ปล้อง มีน้อยมากที่เพศผู้มีปล้องหนวด 11 ปล้อง (Masner, 1976)

แตนเบียนวงศ์ย่อย Telenominae เข้าทำลายไข่ของแมลงศัตรูข้าวหลายชนิด อาทิ ไข่ของมวนเขียวข้าว ผีเสื้อหนอนกอข้าว บั่วข้าว เป็นต้น ทั้งนี้แตนเบียนไข่วงศ์ย่อยนี้มีแนวโน้มที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในแปลงปลูกข้าวโดยชีววิธีอย่างมีประสิทธิภาพ แต่ทั้งนี้การวินิจฉัยความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้ ในส่วนใหญ่สามารถบ่งชี้ได้เพียงแค่ระดับสกุลเนื่องจากแมลงในวงศ์ย่อยนี้มีขนาดเล็กมาก ขนาดลำตัวยาวโดยประมาณ 2-3 มิลลิเมตร และลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกันมาก ส่งผลให้เกิดปัญหาที่เรียกว่า Cryptic species complex นั้นคือกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมากจน ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยชนิดได้โดยง่าย ตัวอย่างเช่น แมลงในสกุล *Telenomus* (Haliday, 1833) การตรวจวินิจฉัยระดับชนิดจำเป็นต้องผ่าตัดท้องปล้องที่ 5–6 และวาดภาพอวัยวะสืบพันธุ์ (aedeagus) เพื่อเปรียบเทียบชนิด (Johnson, 1984) ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก มีความซับซ้อนและเสียเวลา และที่สำคัญต้องอาศัยนักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในแมลงกลุ่มนี้ การใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีภาพมาช่วยยืนยันลักษณะความคลุมเครือทางสัณฐานวิทยาเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อการวินิจฉัยจำแนกชนิดที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น ทั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับงานทางด้านควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีต่อไป

ดีเอ็นเอ บาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นแนวทางหนึ่งในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง เป็นการจัดเก็บชิ้นส่วนของจีโนมและสามารถนำมาเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการวินิจฉัยชนิด เหตุผลหลักของการใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลเพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิด คือ 1) มี

ความแม่นยำสูงในการบ่งบอกชนิดที่ถูกต้อง กล่าวคือในทางทฤษฎีแล้วหากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่ใช้ในการตัดสินใจ อย่างมากที่สุดวิเคราะห์ประเมินได้เพียง 100 ลักษณะโดยประมาณ แต่หากใช้ลักษณะความแตกต่างของลำดับเบสหรือ DNAอย่างต่ำประมาณ 500–600 ลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของจีนที่ใช้ในการเปรียบเทียบ 2) ได้ฐานข้อมูลที่สำคัญ เพื่องานวิจัยทางด้านความสัมพันธ์ด้านวิวัฒนาการ ของแตนเบียนไข่สกุล Telenominae และสกุลใกล้เคียงหรือสกุลที่ต้องการศึกษา 3) ช่วยแก้ปัญหา cryptic species complex ของแตนเบียนไข่สายพันธุ์ในประเทศไทย และ 4) เป็นฐานข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลของแตนเบียนไข่ในประเทศไทย ดีเอ็นเอ บาร์โค้ดเป็นวิธีการ ที่รวดเร็วและแม่นยำ ใช้เป็นประโยชน์ในหลายด้านเช่น การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ, บริษัทควบคุมแมลง, การระบาดของแมลงที่ไม่ไช่แมลงท้องถิ่น (Invasive speices), การนำเข้าส่งออกสินค้าทางการเกษตร, และ ความปลอดภัยทางอาหาร (Hepert & Gregory, 2005)

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือ เพื่อทราบชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้ ดีเอ็นเอ บาร์โค้ด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กับดักแมลงประกอบไปด้วย Yellow pan trap, Malaise trap รวมทั้งสวิงจับแมลง
2. ethanol ความเข้มข้น 95% เพื่อใช้ในการจัดเก็บตัวอย่างสดของแมลง
3. กระดาษคุณภาพสูง (acid free) เพื่อการเก็บรักษาตัวอย่างแห้งในระยะยาว
4. อุปกรณ์บันทึกเขตการแพร่กระจายในระดับละเอียด (GPS)
5. Forceps ขนาดเล็ก
6. ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับตัวอย่างสด
7. กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope กำลังขยายมากกว่า 50 เท่าขึ้นไป
8. สารเคมีในการทำแห้งตัวอย่างแมลง
9. พัดลมดูดอากาศ (Laminar Flow Clean Air Bench)
11. โรงเรือนทดลองกรณีเลี้ยงมวนเพื่อให้ได้ไข่ในการเลี้ยงแตนเบียน
12. กล้องจุลทรรศน์สเตริโอแบบกำลังขยายสูงสำหรับงานทางอนุกรมวิธานแมลง Leica M205 C พร้อม เลนซ์ Planapo Objective 1.0x สำหรับการถ่ายภาพเพื่อตีพิมพ์ในเอกสารวิชาการ
13. ชุดสกัด DNA (DNeasy etraction protocol for Hymenoptera) by C.D. Zhu and J.S. Noyes
14. Primer สำหรับ mitochondrial protein-coding gene cytochrome oxidase I (COI)

วิธีการ

<u>การเก็บและรักษาตัวอย่างแตนเบียนไข่ (Taxonomic sampling and specimen vouchering)</u>

แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าว จะถูกเก็บด้วย 2 กรรมวิธีประกอบไปด้วย 1) การเก็บตัวอย่างแห้ง ซึ่งจะเก็บในห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิต่ำ และ 2) การเก็บตัวอย่างสดเพื่องานวิจัยทางชีวโมเลกุล ทั้งนี้ใช้ 4 วิธีพื้นฐานทางกีฏวิทยาในการเก็บตัวอย่างได้แก่ สวิงโฉบแมลง Yellow Pan Trap (YPT), Malaise trap และ Slam trap. การใช้ YPT จะทำการเก็บแมลงทุกวันโดยทิ้งระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยวางกับดักเวลา 08:00 นาฬิกา และทำการเก็บแมลงในช่วงเช้าวันถัดไประหว่างเวลา 09:00 – 10:00 นาฬิกา และวางกับดัก Malaise trap และ Slam trap สามารถเว้นระยะเวลา 5-10 วัน นำแมลงออกจากกับดักโดยใช้ ตาข่ายความละเอียดพิเศษ (fine-mesh aquarium net) เก็บตัวอย่างใน ethanol ความเข้มข้น 95%หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอเพื่อเตรียมตัวอย่างแห้ง และรอไว้เพื่องานวิจัยทางด้านสกัดดีเอ็นเอ

<u>การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Specimens identification)</u>

แมลงที่เก็บได้จากแปลงปลูกข้าวทั้งในและนอกฤดูปลูก จะถูกจัดจำแนกในระดับอันดับ (order) โดยใช้การวินิจฉัยของ Goulet & Huber (1993) แมลงในกลุ่มเป้าหมาย Hymenoptera จะถูกแยกกลุ่มในระดับ Superfamily การจัดแบ่งในหมวด วงศ์และสกุล (Family และ genus) ดำเนินการเฉพาะในกลุ่มที่ต้องการศึกษา Platygastroidea (Platygastridae) เอกสารหลักที่ใช้ในการจัดจำแนกได้แก่ “Hymenoptera of the world: an identification guide to families” (Masner 1993) และความร่วมมือจากนักวิจัยจากประเทศแคนนาดา (CNCI:Canadian National Collection of Insects) การศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope ใช้โปรแกรมการถ่ายภาพ AutoMontage หรือ Cartograph extended-focus โดยใช้ JVC KY-F75U digital camera, Leica Z16 APOA โดยความร่วมมือกับพิพิธภัณฑ์แมลง สถาบันสมิธโซเนียน กรุงวอชิงตัน ดี ซี ประเทศสหรัฐอเมริกา

<u>การสกัด เพิ่มปริมาณและได้ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (DNA extractoin, amplification, and sequencing)</u>

ทำการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี การสกัดเพื่อการเก็บรักษาตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction protocol) ข้อดีของวิธีนี้คือหลังจากทำการสกัดดีเอ็นเอ ยังสามารถเก็บตัวอย่างเพื่อใช้อ้างอิงต่อไป (voucher specimens) วิธีการสกัดดีเอ็นเอชนิดนี้ ดำเนินการตามวิธีการ DNeasy extraction protocol (Qiagen Inc.) as modified for Hymenoptera by C.D. Zhu & J.S. Noyes at the British Museum of Natural (unpublished) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ Primer สำหรับ mitochondrial protein-coding gene cytochrome oxidase I (COI) ได้แก่ FR-COI primer GGA GGA TTT GGA AAT TGR YTW RTT CC (F), ACT GTA AAT ATR TGA TGW GCT CA (R) (Simon *et al.*, 1994) และ HCO/LCO primer TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA (F), GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G (R) (Folmer *et al.*, 1994) อุณหภุมิและสภาพในการเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ (DNA amplification profile) ดำเนินการตาม Taekul *et al.* (2013) การทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์โดยการใช้

QIAquick PCR purification kit (Qiagen) protocol ก่อนส่ง sequencing ผลผลิตจากการ sequence นำมาปรับความสม่ำเสมอของลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (both direction) โดยใช้ Sequencher v4.0.

<u>การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนไข่ในประเทศไทย (Biodiversity Informatics)</u>

การค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่จะดำเนินการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek *et al.*, 2005) รวมถึงสถานที่ ที่ค้นพบ รูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al.* (2008) และ Johnson *et al.* (2008) ตัวอย่างแมลงทั้งหมดรวมถึงตัวอย่างหลังจากการสกัด DNA (voucher specimen) จะถูกเก็บรวบรวม พร้อมทั้ง ลงบันทึกเขตการแพร่กระจาย แหล่งที่เก็บ แมลงอาศัย บันทึกในระบบฐานข้อมูลท้องถิ่น โดยการใส่บาร์โค้ด Number ของแต่ละตัวอย่าง เก็บรวมรวมตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร ส่งเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล GenBank ในประเทศสหรัฐอเมริกา หรือฐานข้อมูลอื่นอาทิ DNA Data Bank ของประเทศญี่ปุ่น (ฐานข้อมูล เอเซีย) ฐานข้อมูล GBIF (Global Biodiversity Information Facility) ส่งเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล EoL(Encyclopedia of Life) ส่งเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล HOL (Hymenoptera online Database)

เวลาและสถานที่

ดำเนินการเก็บตัวอย่างแตนเบียนไข่จากแหล่งปลูกข้าวอินทรีย์หรือแปลงปลูกข้าวที่ใช้สารเคมีน้อยที่สุดเพื่อให้ได้ตัวอย่างของแตนเบียนไข่ ในงบประมาณ 2560 ดำเนินการเก็บตัวอย่าง ณ จังหวัดกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ในจังหวัดสุพรรณบุรี สิงห์บุรี อุทธยา อ่างทอง ชัยนาท บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีษะเกศ และนครราชสีมา

การบันทึกข้อมูล

หลังจากเก็บตัวอย่างทำการบันทึกข้อมูลรายละเอียดแต่ละตัวอย่างที่เก็บตาม ISPM No.6 (FAO, 2006b) ได้แก่ แหล่งที่เก็บ พิกัดทางภูมิศาสตร์ พืชอาศัย วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง เป็นต้น การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนในประเทศไทย หากมีการค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่ ดำเนินการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek *et al.* 2005) รวมถึงสถานที่ ที่ค้นพบ รูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al.* (2008) และ Johnson *et al.* (2008) เก็บรักษาตัวอย่างแมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ณ พิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูลในระบบ BOLD (Barcode of Life Data System) ดำเนินการส่งข้อมูล (upload) ในฐานข้อมูล BOLDsystem (<u>www.boldsystems.org</u>) โดยตัวอย่างแต่ละชนิดมีรายละเอียดประกอบด้วย ภาพถ่ายตัวอย่าง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แหล่งที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บตัวอย่าง พิกัดภูมศาสตร์ เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป็นต้น

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ดำเนินสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแตนเบียนไข่ในแปลงปลูกข้าวอินทรีย์ ในสวนเฉลิมพระเกียรติฯ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร และจังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศ เขตภาคกลางได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง อยุธยา และชัยนาท แหล่งปลูกข้าวอินทรีย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีษะเกศ และ นครราชสีมา ใช้กับดักแตนเบียน 2 ชนิดได้แก่ กับดักถ้วยสีเหลือง (Yelllow Pan Trap กับดักผ้ามุ้ง (Malaise Trap) หลังจากนั้นนำมาศึกษาทางอนุกรมวิธานพบว่า ได้ตัวอย่างเพื่อดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 40 ตัวอย่าง วินิจฉัยตัวอย่างในอันดับวงศ์ย่อยจนถึงชนิดได้ 5 ชนิด ได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกชนิด 10 ลักษณะประกอบด้วย

1) central keel structure on frons
2) frontal depression
3) head shape in dorsal view
4) hyperoccipital carina
5) brister plate beneth compound eyes
6) genal striae
7) number of calvomeres in female antenna
8) episternal foveae next to 1st coxa
9) orientation of malar sulcus
10) development of basal vein (Rs+M) in fore wing

ดำเนินการสกัด ดี เอ็น เอ โดยวิธีการสกัดแบบเก็บรักษาตัวอย่าง ได้สารละลายดีเอ็นเอ เพื่อทำปฏิกิริยา PCR ทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ขณะนี้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อทำการวิเคราะห์ 5 sequences นำตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้งเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลง

<u>ตัวอย่างลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่ได้จากการทดลอง</u>

Telenomus sp.

ATAGCTTTCCCTCGGCTAAATAATATAAGATTCTGATTACTAATTCCATCTTTAACATTACTGATTTACAGAAAT
GTATTTGGATCTGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCACCACTATCAACTCAATTAAACCCATCAATTGA
TTTAACAATTTTCTCTCTTCATATTGCCGGAATTTCTTCAATTTTAAGATCAATTAATTTCTTATGTACAATTATT
AACATAAGAAATTCTTCAATTAACAACTGAACTTTATTTACTTGATCTGTTTTAATTACTACAGTTCTTCTTTTA
TTATCTCTACCCGTATTAGCAGGTGCAATTACAATAATTTTATCTGACCGAAATTTAAACACATCTTTCTTCAAC
CCAGCGGGTGGGGGAGATCCAGTTCTTTACCAACATTTATTTTGATTCTTTGGACACCCAGAAGTTTATATTCT
AATTCTTCCAGGCTTTGGATTAATTTCTCATATAATTTGTTTAGAAAGAGGGAAAAAGGAAACATTTGGTATACT
AGGAATAGTATATGCAATAGTCTCAATTGGATTTCTTGGATTCAT

Trissolcus sp.

ATGGCATTTCCACGATTAAATAATATAAGATTTTGATTATTAATTCCCGCATTCTTTTTATTAATTATAAGAAAC
ATTGTTGGACAAGGATCAGGAACTGGATGAACACTTTATCCAACACTTTCTACCCAACTTAATCCTTCAGTTGA
TTATACAATTTTCTCTTTACATATTGCTGGGGTATCATCAATTTTAAGATCAATTAACTTTTTATGTACAATTTTT
ATTCTAAGAAACTACCCTATAAAAAAATTGAACACTATTTACATGAGCAATTTTAATTACAACAGTTTTATTATTA
TTATCCTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATAGTTTTTTCAGATCGAAACTTAAATACATCATTTTTTGAC
CCAGCAGGAGGAGGGGATCCAATTTTATATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTATATATTTTA
ATTATTCCAGGATTTGGAATAATTTCTCACATAATTTGTTTAGAAAGAGGGAAAAAGGAAACATTTGGAACACT
TGGAATAATCTATGCTATAATTTCAATTGGATTTTTAGGATTTAT

Telenomus podisi group

AGGATTTGGAAATTGGTTTGTTCCACTTATACTTAATGCTCCTGATATAGCCTTTCCCCGCCTAAATAATATAAG
ATTTTGATTACTAATCCCTTCCTTAATTCTATTAATCTATAGAAATGTATTTGGATCAGGAACAGGAACAGGATG
AACAGTGTATCCCCCCCTTTCAACTCAACTCAATCCTTCAATTGATTTAACAATTTTTTCCCTTCATATTGCAGG
GATTTCTTCAATTCTTAGATCAATTAATTTCCTCTGCACTATTATTAACATAAAAAATCATTCTATAAATAATTG
AACATTATTTACATGATCAATCCTAATTACAACAATTTTACTACTTCTTTCCCTTCCAGTTCTAGCAGGAGCTAT
TACCATAATTTTATCAGATCGAAATCTAAATACCTCATTTTTTAATCCTGCTGGAGGGGGGGATCCTGTTCTTTA
CCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTTTATATTTTAATTCTCCCTGGGTTTGGTTTAATCTCACA
TATGATTTGTTTAGAAAGTGGGAAAAAAGAAACATTTGGAATATTAGGAATAATTTATGCCATAGTTTCAATTG
GATTCCTAGGATTTATTGTTTGAGCACATCACATATTTTACAGTA

Telenomus flavepes

AAATTGGTTAGTTCCATTAATACTTAATGCCCCAGATATAGCTTTTCCACGATTAAATAATATAAGATTTTGATT
ATTAATTCCATCAATTACACTATTAATTTACAGAAATATTTTTGGATCAGGAACAGGAACAGGATGAACTGTTTA
TCCACCATTATCAACACAAATAAACCCATCTATTGACTTAACAATTTTCTCTTTACATATTGCAGGAATTTCTTC
TATTCTCAGATCTATTAACTTTATATGTACAATTATTAATATAAAAAATAATTCAATAAATAACTGATCTTTATTT
ACATGATCAGTATTAATTACAACAATTTTATTATTACTATCATTACCCGTATTAGCAGGAGCAATTACAATAATT
TTATCAGACCGAAATTTAAATACTACTTTTTTTAACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTA
TTCTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTTTATATTCTAATTCTTCCAGGATTTGGATTAATTTCACATATAATTTGT
TTAGAGAGAGGGAAAAAAGAAACTTTTGGAATATTAGGAATAATTTATGCAATAATATCAATTGGATTTTTAGG
ATTTATTGTATGAGCACATC

Telenomus crassiclava group

TAAAGATATTGGAACACTATACTTCTACTTTGGAATATGAGCTGGAATACTAGGATCCTCAATAAGATCAATAA
TTCGAATAGAATTAAGAATCCCCGGCATATTAATTGGAAATGACCAAATTTATAACTCTATTGTAACTTCCCATG
CCTTCATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTATATTAGGAGGGTTTGGAAATTGAATTATCCCTTTAATAA
TTAATGCACCTGACATAGCTTTCCCTCGATTAAATAATATAAGATTTTGACTTCTAATTCCATCATTAACACTAC
TAATTTATAGAAATATTTTTGGAATAGGTACAGGAACCGGCTGAACAGTTTATCCCCCCCTTTCATCCCAAATA

AACCCTTCTATTGATTTAACTATCTTTTCTCTCCATCTAGCAGGAATCTCCTCGATTCTTAGATCAATTAACTTT
ATTTGTACAATTATAAATATAAGAAATTCCGTTGAAAATTGAACCTTATTCTCCTGATCAATTTTTATTACTACT
ATCCTTTTACTATTATCTCTTCCAGTCTTAGCTGGAGGAATCACTATAATTTTAACTGACCGAAATCTTAATACA
TCCTTCTTTAACCCTTCTGGTGGAGGGGATCCCGTTCTTTACCAACACTTATTCTGATTTTTT

ขณะนี้อยู่ระหว่างดำเนินการ นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ บางส่วนประมวลผลในโปรแกรมสำเร็จรูป เพื่อสร้าง แผ่นภาพโครงสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree reconstruction)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ดำเนินสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแตนเบียนไข่ในแปลงปลูกข้าวอินทรีย์และแปลงปลูกข้าวที่ไม่ใช้สารเคมี ในกรุงเทพมหานคร และจังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศเขตภาคกลางได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง อยุธยา และชัยนาท แหล่งปลูกข้าวอินทรีย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกศ และ นครราชสีมา ได้ตัวอย่างเพื่อดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 40 ตัวอย่าง วินิจฉัยตัวอย่างในอันดับวงศ์ย่อยจนถึงชนิดได้ 5 ชนิด ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกชนิดได้ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ 10 ลักษณะประกอบด้วย 1) central keel structure on frons 2) frontal depression 3) head shape in dorsal view 4) hyperoccipital carina 5) brister plate beneth compound eyes 6) genal striae 7) number of calvomeres in female antenna 8) episternal foveae next to 1st coxa 9) orientation of malar sulcus 10) development of basal vein (Rs+M) in fore wing ดำเนินการสกัด ดี เอ็น เอ โดยวิธีการสกัดแบบเก็บรักษาตัวอย่าง ได้สารละลายดีเอ็นเอ เพื่อทำปฏิกิริยา PCR ทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ขณะนี้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อทำการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นจำนวน 5 sequences จำนวน 5 ชนิด

เอกสารอ้างอิง

Austin, A. D., N. F. Johnson, and M. Dowton. 2005. Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastrid wasp (Hymenoptera). *Annual Review of Entomology*. 50: 553–582.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294–9.

Goulet, H. and J.T. Huber. 1993. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Ottawa, Agric. Canada. 667 pp.

Greathead, D.J. 1986. Parasitoids in classical biological control. pp. 289–318. *In*: Waage, J. and Greathead, D.J., eds. *Insect Parasitoids.* Academic Press, London.

Haliday. 1833. An essay on the classification of the parasitic Hymenoptera of Britain, which correspond with the Ichneumones minuti of Linnaeus. Entomological Magazine, 1: 259-276.

Hepert, P.D.N. and T.R. Gregory. 2005. The promise of DNA Barcording for taxonomy. *Systematic Biology*. 54(5): 852–859

Johnson N.F. 2011. A collaborative, integrated and electronic future for taxonomy. *Invertebrate Systematics*, 25: 471–475

Johnson, N. F. 2014. *Hymenoptera* (Online). Available. http://hol.osu.edu/ (2 Juen 2014).

Johnson, N.F., L. Masner, L. Musetti, L., S. Van Noort, K. Rajmohana, D.C. Darling, A.E. Guidotti and A. Polaszek. 2008. Revision of world species of the genus *Heptascelio* Kieffer (Hymenoptera: Platygastroidea, Platygastridae). *Zootaxa*. 1776: 1–51.

LaSalle, J. and I.D. Gauld 1993. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. pp. 1–26. *In*: LaSalle J., Gauld I.D., eds. *Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, Wallingford, UK.

Masner, L. 1976. Revisionary notes and keys to world genera of Scelionidae (Hymenoptera: Proctotrupoidea). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 97: 1–87.

Masner, L. 1980. Key to genera of Scelionidae of the Holarctic region, with descriptions of new genera and species (Hymenoptera: Proctotrupoidea). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 1(13): 1–54.

Mikó, I., L. Vilhelmsen, N.F. Johnson, L. Masner and Z. Pénzes 2007. Skeletomusculature of Scelionidae (Hymenoptera: Platygastroidea): head and mesosoma. *Zootaxa.* 1571: 1–78.

Mills, N. 2010. Egg parasitoids in biological control and integrated pest management. pp. 389–409. *In*: Consoli, F.L. et al., eds. *Egg parasitoids in*

Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma. Springer Science & Business Media B.V. US.

Orr, D. B. 1988. Scelionid wasps as biological control agents: a review. *The Florida Entomologist.* 71(4): 506-528.

Polaszek, A.D., D. Agosti, M. Alonso-Zarazaga, G. Beccaloni, P.P. BjØrn, *et al*. 2005. A universal register for animal names. *Nature*. 437: 477

Pyle, R.L., J.L. Earle and B.D. Greene. 2008. Five new species of the damselfish genus *Chromis* (Perciform es: Labroidei: Pomacentridae) from deep coral reefs in the tropical western Pacific. *Zootaxa.* 1671: 3–31.

Savard, J., T. Diethard, S. Richards, G.M. Weinstock, R.A. Gibbs, J.H. Werren, H. Tettelin and M.J. Lercher. 2006. Phylogenetic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of holometabolous insects. *Genome Research*. 16: 1334–1338.

Sharkey, M.J. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*. 1668: 521–548.

Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651–701.

Taekul, C., A. A. Valerio, A. D. Austin, H. Klompen and N.F. Johnson. 2013. Molecular phylogeny of telenomine egg parasitoids (Hymenoptera: Platygastridae s.l.: Telenominae): evolution of host shifts and implications for classification. *Systematic Entomology*. DOI: 10.1111/syen.12032

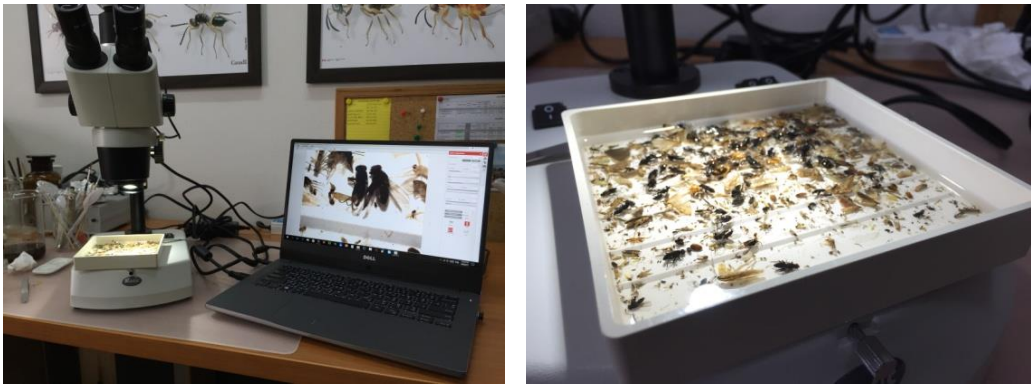

Figure 1 Taxonomic sampling and specimen vouchering: bulk specimens collected from Malaise trap were classified to superfamily level, Plantygastroidea

Figure 2 Taxonomic sampling and specimen vouchering: Platygastroidea contains single family Platygastridae, 4 subfamilies: Scelioninae Platygastrinae Teleasinae, Telenominae

Figure 3 Taxonomic sampling and specimen vouchering: voucher specimens the subfamily Telenominae contains in 95% ethanol for DNA extraction, amplification and sequencing