

การจำแนกหนอนแดงโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Molecular Identification of Chironomidae Larvae

ภรณ์ อุทัยภาส*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Poranee Utayopas*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

หนอนแดงพบแพร่กระจายอยู่ในแหล่งน้ำทั่วไป และนิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีววิทยาของแหล่งน้ำ แต่การศึกษาหนอนแดงที่สุ่มตัวอย่างจากแหล่งน้ำมีอุปสรรค เนื่องจากหนอนแดงบางสปีชีส์มีรูปร่างภายนอกคล้ายกันมาก และการจัดจำแนกแบบดั้งเดิมคือการดูจากรูปร่างภายนอกบางครั้งทำได้ยาก ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้การจัดจำแนกโดยเทคนิคชีวโมเลกุล ได้แก่ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cytochrome c oxidase (COI)* ควบคู่กับการดูจากลักษณะภายนอก ตัวอย่างหนอนแดงที่ศึกษาซึ่งมาจากตลาดจตุจักร กรุงเทพมหานคร พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์จากตัวอย่างการศึกษานี้มีประสิทธิภาพต่ำ มีค่าเพียง 8.49% และดีเอ็นเอมีคุณภาพดีเพียงพอที่จะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มีเพียง 11 ตัวอย่าง การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มี 3 สปีชีส์ ที่ได้ผลสอดคล้องกันทั้งสองฐานข้อมูล โดยมีสองสปีชีส์ที่แต่ละสปีชีส์ได้มาจาก 3 ตัวอย่าง และอีก 1 สปีชีส์ มาจาก 1 ตัวอย่าง ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมและดัชนีความเหมือนของแต่ละตัวอย่างภายในสปีชีส์เดียวกันยังได้ผลสอดคล้องกันทั้ง 2 สปีชีส์ สำหรับตัวอย่างอื่นไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากสองฐานข้อมูลขัดแย้งกัน และขัดแย้งกับการจำแนกจากรูปร่างภายนอก

คำสำคัญ : หนอนแดง, ยีน *cytochrome c oxidase*, การจัดจำแนก, เทคนิคชีวโมเลกุล

Abstract

Chironomidae larvae are the widely distributed and frequently found invertebrate in inland water bodies. They are extensively used as bioindicators of freshwater ecosystem health. However, the uses of chironomids are limited due to their morphological similarity and difficulties in manual identifications. To overcome these problems, this study, therefore, used the sequence of mitochondrial *COI* gene, together with morphological

traits, to identify DNA profiles of chironomid samples bought from Jatujak Market, Bangkok. Overall, only 8.49% amplification efficiency was received. Comparison of *COI* sequences with the two DNA databases resulted in the same closest species of the samples to three species, in which the two species was received from 3 samples whilst the third one was received from only one sample. In addition, congruence of genetic distances and similarity indexes were also observed among samples within the same species of these two species. Other chironomid larvae samples could not be identified because neither sequence comparisons resulted from the two DNA databases nor morphological identifications was concordant.

Keywords: Chironomidae, mitochondrial *COI* gene, molecular-based identification

1. บทนำ

หนอนแดง (Chironomidae larvae) พบแพร่กระจายอยู่ในทุกแหล่งน้ำเกือบทุกชนิด และเป็นกลุ่มสัตว์ที่พบบ่อยที่สุดในการสำรวจสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ในแหล่งน้ำต่างๆ [1] Hynes รายงานว่าหนอนแดงและ Oligochaete เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่พบจำนวนมากที่สุดในดินตะกอนท้องน้ำ (benthos) จึงนิยมใช้เป็นตัวประเมินคุณภาพของดินตะกอนท้องน้ำ [2] หนอนแดงจัดเป็นดัชนีทางชีวภาพที่น่าเชื่อถือสำหรับการตรวจคุณภาพน้ำและดินตะกอน แต่การศึกษาความหลากหลายของหนอนแดงยังมีน้อยเนื่องจากความยากลำบากในการจำแนกถึงระดับสปีชีส์ [3] การจำแนกโดยใช้รูปร่างภายนอกเป็นกุญแจการจัดจำแนกนั้นมีข้อจำกัด ได้แก่ ผลของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างภายนอกไปตามสิ่งแวดล้อม (phenotypic plasticity) และความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variability) ของลักษณะที่ใช้ในกุญแจการจัดจำแนก ซึ่งอาจนำไปสู่การจัดจำแนกผิดพลาด นอกจากนี้หลายสปีชีส์ที่มีรูปร่างภายนอกคล้ายคลึงกัน (cryptic species) มักถูกจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ยิ่งไปกว่านั้นกุญแจการจัดจำแนกโดยรูปร่างภายนอกใช้ได้สำหรับระยะการเติบโตบางระยะหรือ

บางเพศเท่านั้น ทำให้สิ่งมีชีวิตหลายตัวไม่สามารถถูกจำแนกได้ ประการสำคัญคือการจัดจำแนกโดยใช้รูปร่างภายนอกต้องการผู้ชำนาญและมีประสบการณ์ทางด้านนี้มาเป็นเวลานาน [4] และถึงแม้ว่าจะใช้ผู้ชำนาญในการจัดจำแนกสปีชีส์ อัตราการจัดจำแนกผิดยังคงค่อนข้างสูง อยู่ระหว่าง 7.5-9% [5,6] และการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเป็นตัวแยกสปีชีส์ มักทำให้อัตราการจัดจำแนกผิดพลาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ [7]

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการจัดจำแนกเริ่มต้นเมื่อ 30 ปี ก่อน เมื่อ ribosomal RNA probe ได้พัฒนาขึ้นเพื่อจำแนกและสร้างสายวิวัฒนาการของ Eubacteria และ Archaeobacteria [8] การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลได้ถูกนำมาแยกสปีชีส์และใช้ในการจำแนกอย่างแพร่หลายในช่วง 2 ปี ที่ผ่านมา [9] วัตถุประสงค์ที่น่าเสนอเร็ว ๆ นี้ คือการสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมดในโลกได้ [10] แม้ว่าการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกได้นำมาสู่การปฏิบัติในการจัดจำแนกอย่างชัดเจน แต่ความแม่นยำและหลักการหรือวิธีที่ใช้ในการจัดจำแนกยังคงเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ [11]

ยีนที่ใช้เป็นเครื่องหมายในการสร้างสายวิวัฒนาการของหนอนแดง ได้แก่ *cytochrome b* และ *cytochrome c oxidase I (COI)* ซึ่ง Boore and Brown รายงานว่ายีน *COI* เหมาะสมสำหรับการสร้างสายวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิตในวงศ์หรือสกุลที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และระหว่างสปีชีส์และสปีชีส์ย่อยของแมลงกลุ่มที่แตกต่างกัน ยีนนี้ได้ถูกศึกษาในรึ้นน้ำจืด โดยศึกษาใน *Chironomus* 38 สปีชีส์ *Polypedium* 2 สปีชีส์ และ *Camptochironomus*, *Einfeldia*, *Cryptochironomus*, *Baeotendipes* สกุลละ 1 สปีชีส์ [12] ขณะที่หนอนแดงในกลุ่ม *pulmosus* มีการศึกษายีน *COI* จาก 5 สปีชีส์ได้แก่ *C. balatonucus*, *C. entis*, *C. plumosus*, *C. muratensis* และ *C. agilis* 2 [13]

ในการวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* จำแนกสปีชีส์ของหนอนแดงและประเมินว่าสามารถนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้แยกสปีชีส์ของหนอนแดงได้แม่นยำหรือไม่เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาหนอนแดงในแหล่งน้ำต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างหนอนแดงซึ่มาจากตลาดนัดจตุจักรในวันที่ 10 ธันวาคม 2552 และวันที่ 15 มกราคม 2553 ตัวอย่างหนอนแดงที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอมาจากหนอนแดงจำนวนอย่างน้อย 20 ตัว (ในกรณีที่ตัวอย่างนั้นมีมากกว่า 20 ตัว) ซึ่งจะนำมาตัดหัวและทำสไลด์เพื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นสปีชีส์เดียวกันทั้งหมดหรือไม่ ส่วนตัวที่เหลือจะดองไว้ใน 95% แอลกอฮอล์ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Taylor และคณะ [14] เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยบ่มดีเอ็นเอที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตามด้วย 94 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวนรอบ 30 รอบ และจบโดยให้อยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที โดยใช้ไพรเมอร์ 911 (5'-TTT CTA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') และ 912 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน *COI* จากการศึกษาของ Markus และคณะ [15] ดีเอ็นเอที่ได้จะนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบต่อไป ดังนี้

2.1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Boldsystems (<http://www.boldsystems.org>) และ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

2.2 หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic distance) เพื่อสร้าง dendrogram โดยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) [15] โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 (<http://www.megasoftware.net>)

2.3 เปรียบเทียบค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) โดยใช้โปรแกรม Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu.bioedit>)

3. ผลและวิจารณ์

สกัดดีเอ็นเอจากหนอนแดงทั้งหมดจำนวน 165 ตัวอย่าง แต่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคพีซีอาร์ได้เพียง 12 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.48% เมื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีเพียงพอที่สามารถนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มีเพียง 11 ตัวอย่าง ปัจจัย

หนึ่งอาจเกิดเนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดอาจมีปริมาณน้อยเกินไป ทำให้เพิ่มปริมาณได้ยาก เนื่องจากผู้วิจัยยังไม่เชี่ยวชาญในการดูแลรักษาภายนอกของหนอนแดง แม้มีรูปร่างแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย หรือไม่แน่ใจว่าเป็นพวกเดียวกัน หรือไม่ ก็จัดแยกออกมาเป็นอีก 1 ตัวอย่าง ทำให้ตัวอย่างที่มีหนอนแดงเพียงตัวอย่างละ 1 ตัว มีจำนวนถึง 142 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จำนวน 11 ตัวอย่างนั้น ประกอบด้วยตัวอย่างที่มีหนอนแดงเพียง 1 ตัว จำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เหลือแต่ละตัวอย่างมีหนอนแดงจำนวนมากกว่า 20 ตัว ซึ่ง Hajibabaei *et al* ทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดและรายงานว่า 80% ของข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้มาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเออย่างน้อย 5-10 ตัวต่อสปีชีส์ [17] Hunter และคณะ ยังรายงานว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแมลง มีขนาดเล็ก ทำให้ต้องใช้ทุกตัวเพื่อสกัดดีเอ็นเอ เพื่อให้เพียงพอสำหรับการทำพีซีอาร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะตัวอ่อน [18]

นอกจากนี้ตัวอย่างทั้งหมดยังไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ง่าย อาจเนื่องจากมีตัวยับยั้ง เช่น มีกากอาหารในทางเดินอาหารของแมลง หรือดีเอ็นเออาจขาดออกจากกันเนื่องจากขั้นตอนการสกัด เช่น ในกรณีของ blackfly (*S. posticum*: Simuliidae) ที่สกัดดีเอ็นเอโดยใช้คลื่นความถี่ (sonicate) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยพีซีอาร์ได้ ในขณะที่วิธีการสกัดตามมาตรฐานที่ไม่ใช้คลื่นความถี่ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ อย่างไรก็ตามการสกัดโดยวิธีนี้ประสบความสำเร็จเพียง 66% เท่านั้น [18] นอกจากนี้ดีเอ็นเออาจเสื่อมสลาย เนื่องจากเก็บเอาไว้ระยะหนึ่งก่อนจะนำมาทำเทคนิคพีซีอาร์ สาเหตุดังกล่าวเป็นผล

ให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหนอนแดงทำได้ยากและประสบความสำเร็จต่ำ

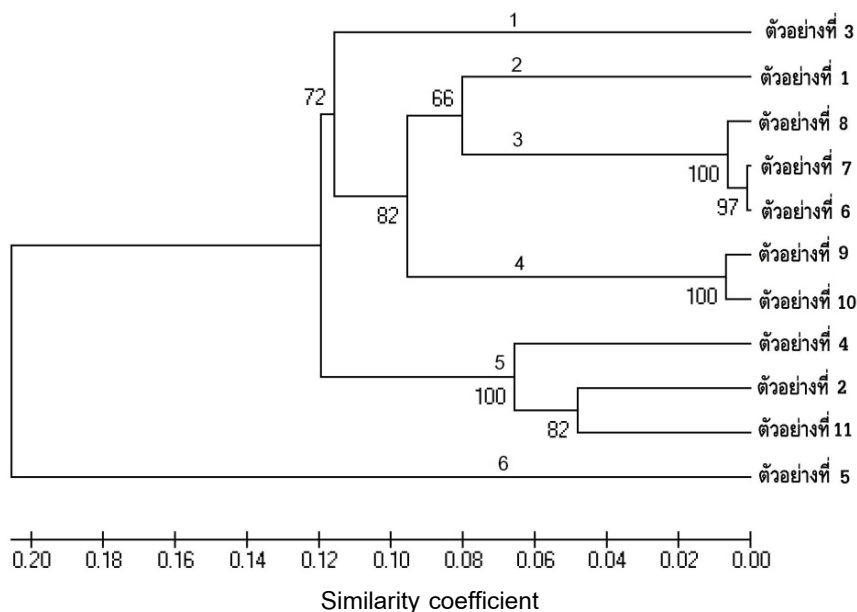
ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Boldsystems พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีโอกาเป็น 6 สปีชีส์ (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) (รูปที่ 1) ซึ่งได้ความสัมพันธ์ 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 (ตัวอย่างที่ 3) มีลักษณะคล้ายคลึงกับหนอนแดงใน subfamily Tanyponidae มากที่สุด กลุ่มที่ 2 (ตัวอย่างที่ 1) น่าจะเป็น *Kiefferulus tainanus* กลุ่มที่ 3 (ตัวอย่างที่ 6, 7 และ 8) น่าจะเป็น *Benthalia dissidens* กลุ่มที่ 4 (ตัวอย่างที่ 9 และ 10) มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Tanytarsus* มากที่สุด กลุ่มที่ 5 (ตัวอย่างที่ 2, 4 และ 11) น่าจะเป็น *Chironomus circumdatus* และกลุ่มที่ 6 (ตัวอย่างที่ 5) ลักษณะคล้ายคลึงกับหนอนแดงใน tribe Tanytarsini มากที่สุด นอกจากนี้ดัชนีความเหมือน (similarity index) (ตารางที่ 2) ยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยดัชนีความเหมือนในกลุ่มที่ 3 มีค่าระหว่าง 0.91-0.94 กลุ่มที่ 4 มีค่าเท่ากับ 0.90 ขณะที่ดัชนีความเหมือนในกลุ่มที่ 5 มีค่าระหว่าง 0.71-0.80 (รูปที่ 2)

สำหรับตัวอย่างที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Boldsystems มีความคล้ายคลึงกับ *Labrundinia* sp. ซึ่งอยู่ใน subfamily Tanyponidae มากที่สุด แต่ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ได้เป็น *Anopheles rangeli* (ยุงก้นปล่อง) การจำแนกจากรูปร่างภายนอกได้เป็น *Tanypus* sp. ซึ่งอยู่ใน subfamily Tanyponidae เช่นกัน แต่ลักษณะเด่นของหนอนแดงสกุล *Labrundinia* คือ ฟันกลางของ ligula มีขนาดสูงสุด ฟันซี่ถัดมาสองข้างมีขนาดสั้นกว่าฟันด้านนอกสุด ขณะที่ *Tanypus* sp มี

พื้นบน ligula เท่ากันทุกซี่ (รูปที่ 3) และพบ anal tubules 6 อันที่หาง [19] ดังนั้นตัวอย่างที่ 3 น่าจะอยู่ใน subfamily Tanyponidae แต่ยังไม่สามารถระบุสกุลที่ชัดเจนได้

ตารางที่ 1 ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI กับฐานข้อมูล Bolddsystems และ GenBank

ตัวอย่างที่	Bolddsystems		GenBank		
	Closest species	Similarity (%)	Closest species	Closest species	Similarity (%)
1	<i>Kiefferulus tainanus</i>	96.00	<i>Kiefferulus tainanus</i>	0.0	97
2	<i>Chironomus circumdatus</i>	98.00	<i>Chironomus circumdatus</i>	0.0	98
3	<i>Labrundinia</i> sp.	88.21	<i>Anopheles rangeli</i> (ยุงก้นปล่อง)	0.0	88
4	<i>Chironomus circumdatus</i>	97.63	<i>Chironomus circumdatus</i>	0.0	98
5	<i>Tanytarsus guerlus</i>	89.02	Chironomidae sp.	5e-120	87
6	<i>Benthalia dissidens</i>	96.94	<i>Benthalia dissidens</i>	0.0	97
7	<i>Benthalia dissidens</i>	96.79	<i>Benthalia dissidens</i>	0.0	97
8	<i>Benthalia dissidens</i>	96.80	<i>Benthalia dissidens</i>	0.0	96
9	<i>Micropsectra</i> sp.3	89.20	<i>Tanytarsus bispinosus</i>	0.0	88
10	<i>Micropsectra</i> sp.3	89.04	<i>Tanytarsus bispinosus</i>	0.0	89
11	<i>Chironomus circumdatus</i>	94.00	<i>Chironomus circumdatus</i>	0.0	95



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ของหนอนแดงที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน COI

ตัวอย่างที่ 1	1.00										
ตัวอย่างที่ 2	0.68	1.00									
ตัวอย่างที่ 3	0.63	0.63	1.00								
ตัวอย่างที่ 4	0.59	0.72	0.69	1.00							
ตัวอย่างที่ 5	0.54	0.54	0.63	0.63	1.00						
ตัวอย่างที่ 6	0.67	0.68	0.75	0.73	0.63	1.00					
ตัวอย่างที่ 7	0.67	0.68	0.75	0.73	0.63	0.94	1.00				
ตัวอย่างที่ 8	0.67	0.67	0.76	0.73	0.66	0.92	0.92	1.00			
ตัวอย่างที่ 9	0.63	0.64	0.77	0.71	0.74	0.78	0.78	0.79	1.00		
ตัวอย่างที่ 10	0.65	0.64	0.78	0.68	0.73	0.81	0.81	0.80	0.92	1.00	
ตัวอย่างที่ 11	0.62	0.71	0.70	0.81	0.61	0.74	0.74	0.74	0.71	0.70	1.00
ตัวอย่างที่ 1		ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6	ตัวอย่างที่ 7	ตัวอย่างที่ 8	ตัวอย่างที่ 9	ตัวอย่างที่ 10	ตัวอย่างที่ 11

รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของหนอนแดงที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน COI

ตัวอย่างที่ 9 และ 10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Boldsystems มีความคล้ายคลึงกับ *Micropectra* มากที่สุด แต่ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank มีความคล้ายคลึงกับ *Tanytarsus bispinosus* มากที่สุด การจำแนกจากรูปร่างภายนอกได้เป็น *Tanytarsus* เนื่องจากหนอนแดงสกุล *Micropectra* และ *Tanytarsus* มีพินลักษณะคล้ายคลึงกันมาก แต่ *Tanytarsus* มีหนามแหลม (spur) ที่หนวด ขณะที่ *Micropectra* ไม่มี [19] ดังนั้นเมื่อจากรูปร่างภายนอกแล้ว ตัวอย่างที่ 9 และ 10 น่าจะเป็น *Tanytarsus* มากกว่า แต่เนื่องจากค่าความเหมือน (% similarity) มีค่าน้อยกว่า 90% จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นสปีชีส์ใด

ตัวอย่างที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Boldsystems มีความคล้ายคลึง

กับ *Tanytarsus guerlus* ซึ่งอยู่ใน subfamily Chironominae tribe Tanytarsini มากที่สุด แต่ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank มีความคล้ายคลึงกับ *Chironomidae* sp. ซึ่งอยู่ใน subfamily Chironominae tribe Chironomini มากที่สุด ขณะที่การจำแนกจากรูปร่างภายนอกโดยดูจากลักษณะของพินและ paralaial plate หนอนแดงใน tribe Tanytarsini จะมี paralaial plate ขาวมาชิดกัน ขณะที่หนอนแดงใน tribe Chironomini มี paralaial plate คล้ายพัดและอยู่ห่างกัน [20] ดังนั้นตัวอย่างที่ 5 น่าจะอยู่ใน subfamily Chironominae tribe Tanytarsini มากกว่า แต่ยังไม่สามารถระบุสกุลที่ชัดเจนได้

นอกจากนี้เมื่อจากรูปร่างภายนอกได้แก่ พินและ paralaial plate หนอนแดงทุกตัวอย่างอยู่ใน subfamily Chironominae (มี paralaial plate) ยกเว้น

ตัวอย่างที่ 3 เท่านั้นที่อยู่ใน subfamily Tanyponidae (ไม่มี paralabial plate) แต่เมื่อพิจารณาจากสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ตัวอย่างที่ 3 กลับมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกับตัวอย่างที่เหลือทั้งหมดมากกว่าตัวอย่างที่ 5 ซึ่งอยู่ใน subfamily เดียวกัน ผลดังกล่าวอาจเกิดเนื่องจากข้อจำกัดของการหาลำดับเบส ซึ่งอ่านได้ประมาณ 350-450 คู่เบสเท่านั้น ส่วนที่ยาวเกินกว่านี้ไม่สามารถอ่านได้สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลได้อย่างสมบูรณ์ คูได้จากค่าความเหมือน ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 90% Ekram และคณะวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน *COI* จากหนอนแดง 97 ตัวอย่าง จำนวน 47 สปีชีส์ใน 7 สกุล และรายงานว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* มีเพียงพอที่จะแยกความผันแปร (variation) ระหว่างสปีชีส์ของตัวอย่างหนอนแดงที่ศึกษาได้ และไม่มีสปีชีส์ใดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้จำแนกได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อมีความเหมือนกันได้อย่างสมบูรณ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล หากไม่มีความเหมือนกันอย่างสมบูรณ์ โอกาสที่จะจำแนกสปีชีส์ที่ไม่รู้จักหรือจำแนกให้อยู่ในสกุลที่ถูกต้อง โดยเฉพาะสกุล subtribe Tanytar-sina ยังทำได้ไม่ดี [21] ดังนั้นหากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนน้อย จึงยังไม่ควรสรุปว่าเป็นสปีชีส์ใด อาจต้องเปรียบเทียบกับลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ที่ยาวขึ้นหรือเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่น เช่น *ND4* หรือ ยีนในนิวเคลียส เช่น *internal transcribed spacer (ITS)* ร่วมด้วย

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันประสิทธิภาพของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการ

จำแนกหนอนแดงสปีชีส์ที่ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์และมีข้อมูลของสปีชีส์นั้นอยู่ในฐานข้อมูลแล้ว สอดคล้องกับการศึกษาของ Carew และคณะ ที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จำแนกหนอนแดงสกุล *Cladopelma* และ *Microchironomus* ในประเทศออสเตรเลีย หนอนแดงทั้งสองสกุลมีรูปร่างภายนอกคล้ายคลึงกันมาก แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* สามารถใช้แยกหนอนแดงทั้งสองสกุลออกจากกันได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังสามารถใช้แยกสปีชีส์ของ *Cladopelma* ที่มีรูปร่างคล้ายคลึงกันออกจากกันได้ 4 สปีชีส์ [22] ขณะที่ Sharkley และคณะ ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จำแนกสปีชีส์ของหนอนแดงสกุล *Chironomus* ในประเทศออสเตรเลีย และได้ผลสอดคล้องกับการจำแนกโดยรูปร่างภายนอกในระดับสกุล โดยสามารถจำแนกหนอนแดง *Chironomus* แยกออกจากหนอนแดงสกุลอื่นได้อย่างแม่นยำ 100% [23] Sharkley และคณะ เสนอว่าประโยชน์ของการจำแนกสปีชีส์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* เห็นว่าการจำแนกโดยวิธีอื่นคือสามารถจำแนกได้ทุกระยะการเติบโต สำหรับผลจากการทดลองนี้ ตัวอย่างที่ 6, 7 และ 8 เมื่อดูจากรูปร่างภายนอกแล้ว มีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะตัวอย่างที่ 7 มีรูปร่างแตกต่างจากตัวอย่างที่ 6 และ 8 อย่างชัดเจน แต่เมื่อพิจารณาจากสไลด์ส่วนประกอบของปากและส่วนหัวของหนอนแดงทั้ง 3 ตัวอย่างแล้ว พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *COI* ช่วยยืนยันว่าทั้ง 3 ตัวอย่างน่าจะเป็นสปีชีส์เดียวกันคือ *Benthalia dissidens* ในลักษณะคล้ายคลึงกัน ตัวอย่างที่ 2 และ 4 ลำตัวมีลักษณะแตกต่างกัน โดยเฉพาะตัวอย่างที่ 4 ซึ่งมีส่วนอกป่องออกแตกต่างจากตัวอย่างที่ 2 อย่างชัดเจน ขณะที่ลักษณะ

ของฟีนของทั้ง 2 ตัวอย่าง มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *COI* พบว่าเป็นสปีชีส์เดียวกันคือ *Chironomus circumdatus* โดยมีค่าความเหมือนสูงสุด 97-98% ดังนั้นรูปร่างภายนอกของตัวอย่างหนอนแดงในแต่ละกลุ่มอาจแตกต่างกันได้ เนื่องจากเป็นตัวอ่อนระยะแตกต่างกัน และฟีนก็สามารถแตกต่างกันได้เล็กน้อยเนื่องจากการผันแปรภายในสปีชีส์เดียวกัน หากไม่ใช่ผู้ชำนาญอาจไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถจำแนกออกจากกันได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการจัดจำแนก

โดยสรุปการจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* มีประสิทธิภาพสูง เมื่อสามารถเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงต้องระวังในการจำแนกหนอนแดง หากลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีความสมบูรณ์ไม่เพียงพอ หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล อาจทำให้แปลผลผิดพลาดควรนำลำดับดีเอ็นเอจากยีนอื่น เช่น ยีนในนิวเคลียสเข้ามาเปรียบเทียบร่วมกัน การได้ผลที่สอดคล้องกันทั้งจากยีนในไมโทคอนเดรียและนิวเคลียส จะทำให้สามารถยืนยันสายความสัมพันธ์ที่แยกออกจากกันเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ [21]

4. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2551 ขอขอบคุณ คุณวชิร สายสุข ที่ช่วยเหลือให้รายงานนี้สำเร็จ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีระชัย ชนานันต์ สำหรับคำปรึกษาและการตรวจแก้ไขบทความวิจัยนี้

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] King, R.S. and Richardson, C.J., 2002, Evaluating subsampling approaches and microinvertebrate taxonomic resolution for wetland bioassessment, J. North Amer. Benthol. Soc. 2: 150-171.
- [2] Hynes, H.B.N., 1960, The Biology of Polluted Waters, Liverpool University Press, Liverpool.
- [3] Nyman, M., Korhola, A. and Brooks, S.J., 2005, The distribution and diversity of Chironomidae (Insecta: Diptera) in Western Finnish Lapland, with special emphasis on Shallow Lakes, Global Ecol. Biogeogr. 14: 137-153.
- [4] Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Dewaard, J.R., 2003, Biological identification through DNA barcodes, Proceedings of the Royal Society of London-Ser. B: Biol. Sci. 270: 313-321.
- [5] Hewlett, R., 2000, Implications of taxonomic resolution and sample habitat for stream classification at a broad geographical scale, J. North Amer. Benthol. Soc. 19: 352-361.
- [6] Metzeling, L., Robinson, D., Perriss, S. and Marchant, R., 2002, Temporal persistence of benthic invertebrate communities in South-Eastern Australian Streams: Taxonomic resolution and implications for the use of predictive models, Mar. Freshw. Res. 53: 1223-1234.
- [7] Sharma, M., 2007, Molecular Identification of Chironomid Species Based on Its-1 and Its-2

- Regions of rDNA, M.Sc. Thesis, Wright State University.
- [8] Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. and Woese, C.R., 1980, The phylogeny of prokaryotes, *Science* 209: 457-463.
- [9] DeSalle, R. and Birstein, V.J., 1996, PCR identification of black caviar, *Nature* 381: 197-198.
- [10] Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H. and Vogler, A.P., 2003, A plea for DNA taxonomy, *Trends Ecol. Evol.* 18: 70-74.
- [11] Wheeler, Q.D., 2005, Losing the plot: DNA barcodes and taxonomy, *Cladistics* 21: 405-407.
- [12] Boore, I.L. and Brown, W.M., 2000, Mitochondrial genomes of *Galathea*, *Helobdella* and *Platynereis*: Sequence and gene arrangement comparisons indicate that *Pogonophora* is not a phylum and annelida and arthropoda are not sister taxa, *Mol. Biol. Evol.* 300: 1703-1706.
- [13] Guryev, V., Mararevitch, I., Blinov, A. and Martin, J., 2001, Phylogeny of the genus *Chironomus* (Diptera) inferred from DNA sequences of mitochondria *cytochrome b* and *cytochrome oxidase I*, *Mol. Phylo. Evol.* 19: 9-21.
- [14] Taylor, D.B., Szalanski, A.L., Peterson, R.D., 1996, PCR-RFLP identification of screwworm, *Med. Vet. Entomol.* 10: 63-70.
- [15] Rohlf, F.J., 2002, *NTSYS* Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- [16] Markus, P.N., Carsten, N., Christoph, K., Dirk, S.K. and Bruno, S., 2007, Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species, *Mol. Ecol.* 16: 1957-1968.
- [17] Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. and Hickey, D.A., 2007, DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics, *Trends Genet.* 23: 167-172.
- [18] Hunter, S.J., Goodall, T.I., Walsh, K.A., Owen, R. and Day J.C., 2007, Nondestructive DNA extraction from blackflies (Diptera: Simuliidae): Retaining voucher specimens for DNA barcoding projects, *Mol. Ecol. Res.* 8: 56-61.
- [19] Epler, J.H., 2001, Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina, North Carolina Department of Environment and Natural Resources, Division of Water Quality, Environmental Sciences Section, Available Source: <http://www.esb.enr.state.nc.us/BAUwww/Chironomid.htm>.
- [20] Simpson, K.W. and Bode, R.W., 1980, *Common Larvae of Chironomidae* (Diptera)

- from New York State Stream and Rivers Bulletin No 439, The State Education Department Albany, New York.
- [21] Ekram, T., Willassen, E. and Stur, E.A., 2007, Comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes, *Mol. Phylo. Evol.* 43: 530-542.
- [22] Carew, M.E., Pettigrove, V. and Hoffmann, A.A., 2005, The utility of DNA markers in classical taxonomy: Using cytochrome oxidase I markers to differentiate Australian *Cladopelma* (Diptera) midges, *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 587-594.
- [23] Sharley, D.J., Pettigrove, V. and Parsons, Y.M., 2004, Molecular identification of *Chironomus* spp. (Diptera) for biomonitoring of aquatic ecosystems, *Aust. J. Entomol.* 43: 359-365.