

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการจำแนกและตรวจสอบ
ความผันแปรทางพันธุกรรมของแตนเบียนแมลงวันผลไม้ชนิด
Psytalia fletcheri และ *P. incisi* (Hymenoptera: Braconidae)
Application of ISSR Markers for Identification and
Detection of Genetic Variation in Fruit Fly Parasitoids,
Psytalia fletcheri and *P. incisi* (Hymenoptera: Braconidae)

สมจิตต์ หอมจันทร์* และพิชญธิดา มีอุตร

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Somjit Homchan* and Pitchayathida Mee-udorn

Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Thapo, Maung, Phitsanulok 65000

บทคัดย่อ

แตนเบียนในสกุล *Psytalia* เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงวันผลไม้หลายชนิด ในประเทศไทยพบแตนเบียนสกุล *Psytalia* ที่มีการจัดจำแนกไว้ 3 ชนิด และที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด เนื่องจากมีลักษณะภายนอกที่คล้ายกันมาก แตนเบียนกลุ่มนี้มีแนวโน้มที่จะมีศักยภาพในการควบคุมแมลงวันผลไม้ได้ แต่ยังมีข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของแตนเบียนในสกุลนี้ในประเทศไทยค่อนข้างน้อย ดังนั้นการนำเครื่องหมายทางดีเอ็นเอที่เหมาะสม ใช้ได้ง่าย จึงมีความสำคัญในการจัดจำแนกชนิดและศึกษารูปแบบความผันแปรทางพันธุกรรม ดังนั้นจึงได้นำเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์มาทดลองใช้ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* และ *P. incisi* ที่เก็บตัวอย่างได้จากพื้นที่ต่าง ๆ โดยการใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ (AG)₈T, (AC)₈RG, (CTC)₆, (CA)₈A, (TC)₈C และ (CT)₈G ที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เมื่อนำไปวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของแตนเบียนทั้งสองชนิดนี้ พบว่าแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรอยู่ในช่วง 0.00 ถึง 0.14 และระหว่างประชากรมีค่าตั้งแต่ 0.02 ถึง 0.13 ในขณะที่แตนเบียนชนิด *P. incisi* มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงในประชากรเดียวกัน โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.18 ถึง 0.56 เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ สามารถจำแนกแตนเบียนทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ : แตนเบียนแมลงวันผลไม้; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; ความผันแปรทางพันธุกรรม; ไอเอสเอสอาร์

*ผู้รับผิดชอบบทความ : somjitt@nu.ac.th

Abstract

The parasitoids in the genus *Psytalia* are natural enemies of various species of fruit flies. In Thailand, only 3 species of *Psytalia* were identified and others were not clearly identified due to ambiguous morphologies. Some species of this genus tend to be used as effective biological control agents. However, the genetic information of these species, especially in Thailand is very limited. Thus, the appropriate genetic markers are needed for identification and evaluation of genetic variation in this genus. Therefore, ISSR markers have been used to detect genetic variation in 4 populations of *P. fletcheri* and 1 population of *P. incisi*, from different localities. Twenty ISSR primers were screened and only six, i.e. (AG)₈T, (AC)₈RG, (CTC)₆, (CA)₈A, (TC)₈C and (CT)₈G could generated polymorphic bands. The results showed low genetic variation within and among populations in *P. fletcheri* with genetic distance values ranging from 0.00 to 0.14 and 0.02 to 0.13, respectively. On the other hand, high genetic variation was found among individuals of *P. incisi* population with genetic distance values ranging from 0.18 to 0.56. In addition, phylogenetic tree showed that 2 species can be clearly separated by ISSR markers.

Keywords: fruit fly parasitoid; DNA marker; genetic variation; ISSR

1. บทนำ

แตนเบียน (parasitic wasp) เป็นแมลงในอันดับ Hymenoptera เช่นเดียวกับผึ้ง ต่อ แตน ทั่วโลกพบประมาณ 50,000 ชนิดและยังมีอีกจำนวนมากที่รอการค้นพบและจัดจำแนก [1] แตนเบียนในสกุล *Psytalia* เป็น endoparasitoids จัดอยู่ในวงศ์ Braconidae วงศ์ย่อย Opiinae เดิมแตนเบียนสกุลนี้ส่วนใหญ่ถูกจัดเป็นสกุลย่อย อยู่ในสกุล *Opius* และได้ยกระดับมาเป็นสกุล *Psytalia* ในปี ค.ศ. 1987 [2] แตนเบียนสกุลนี้มีประมาณ 80 ชนิด [3] แต่ที่พบในประเทศไทยมีเพียง 3 ชนิด ที่จำแนกได้ คือ *P. fletcheri*, *P. incisi*, และ *P. makii* สำหรับอีกประมาณ 4 ชนิด ที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ เช่น *Psytalia* sp. 1, *Psytalia* sp. nr (near) *fletcheri*, *Psytalia* sp. nr *incisi* และ *Psytalia* sp. nr *makii* [4] แมลงอาศัยของแตนเบียนกลุ่มนี้คือแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* หลายชนิด ได้แก่ *B. cucurbitae*, *B.*

dorsalis, *B. correcta*, *B. latifrons* เป็นต้น แตนเบียนชนิด *P. fletcheri* มักจะเบียนแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* หรือที่เรียกว่าแมลงวันแตง ส่วน *P. incisi* และ *P. makii* มักจะเบียนแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* อื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น *B. dorsalis*, *B. correcta*, *B. latifrons*, *B. papayae* [5] ซึ่งแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้เป็นแมลงศัตรูพืชผักผลไม้หลายชนิด ได้แก่ ผักรั้ว ขมิ้น พุทรา มะม่วง รวมถึงพืชตระกูลแตงชนิดต่าง ๆ ซึ่งแมลงวันผลไม้เพศเมียตัวเต็มวัย จะวางไข่ในพืชผักผลไม้เมื่อเข้าสู่ระยะตัวอ่อน (larva stage) ก็จะกินเนื้อของผลเป็นอาหารและเจริญอยู่ในผลทำให้เกิดการเน่าเสียและไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ในแต่ละปีพืชผักผลไม้รวมทั้งพืชพื้นเมืองและพืชเศรษฐกิจเสียหายเป็นจำนวนมากทั้งในประเทศไทยและหลาย ๆ ประเทศในแถบเอเชียใต้ อินโด-แปซิฟิก และบางประเทศในแอฟริกา เกษตรกรมักจะกำจัดแมลงวันผลไม้โดยการฉีดพ่นสารเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ผลรวดเร็ว

และสามารถกำจัดได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังมีวิธีการป้องกันโดยการห่อผลไม้ทำให้แมลงวันผลไม้ไม่สามารถเข้าทำลายได้ ซึ่งสิ้นเปลืองเวลาและแรงงานค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตาม ศัตรูธรรมชาติอย่างหนึ่งของแมลงวันผลไม้คือแตนเบียน โดยแตนเบียนเพศเมียตัวเต็มวัยจะวางไข่ลงในตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้และพัฒนาเติบโตโดยกินของเหลวในตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ซึ่งเป็นแมลงอาศัย (host) และทำให้แมลงอาศัยตายในที่สุด แตนเบียนจะเข้าสู่ระยะดักแด้ อยู่ภายในคราบดักแด้ของแมลงอาศัยจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย [6] ดังนั้นแตนเบียนกลุ่มนี้จึงถูกจัดให้เป็นแมลงที่มีความสำคัญในการควบคุมประชากรของแมลงวันผลไม้ และได้มีการนำไปเพาะเลี้ยงและปล่อยสู่ธรรมชาติเพื่อควบคุมประชากรแมลงวันผลไม้ เช่น *P. fletcheri* [7-9] ซึ่งเป็นแตนเบียนที่สำคัญของแมลงวันแตง (*B. cucurbitae*) ที่มักจะเข้าทำลายพืชผักหลากหลายชนิด แต่จะพบมากที่สุดคือพืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา ตำลึง บวบ มะระ เป็นต้น เมื่อมีการระบาดของแมลงวันผลไม้รวมทั้งแมลงวันแตงในหมู่เกาะฮาวาย จึงได้มีการนำเข้า แตนเบียนหลายชนิดเข้าไปยังหมู่เกาะฮาวาย เพื่อใช้ในการควบคุมประชากรแมลงวันผลไม้โดยวิธีนี้เป็นระยะเวลายาวนานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1916 [7] ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการนำแตนเบียนในสกุล *Psytalia* มาใช้ในการควบคุมประชากรแมลงวันผลไม้ และยังมีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับแตนเบียนสกุลนี้ค่อนข้างน้อย ในการจัดจำแนกแตนเบียนสกุลนี้ยังมีความสับสน ต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้ความชำนาญสูง เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะคล้ายกันมาก ดังนั้นเครื่องหมายพันธุกรรมจึงมีบทบาทสำคัญที่จะนำมาใช้แก้ปัญหาด้านการจำแนกชนิดของแตนเบียนได้ แตนเบียนในสกุลนี้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการควบคุมประชากรของแมลงวันผลไม้เพื่อลดการใช้สารเคมีซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ของแมลงในสกุลนี้ยังมีอยู่ค่อนข้างน้อย ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญมากในการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาให้แตนเบียนในสกุลนี้เป็นแมลงควบคุมศัตรูพืชโดยวิธีที่มีประสิทธิภาพ

มีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรแตนเบียน รวมถึงแมลงอื่น ๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางบริเวณของยีน *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรียเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงในอันดับ Hymenoptera [10,11] และ ITS (internal transcribe spacer) ของยีน *28S rRNA* เพื่อใช้ในการจำแนกสปีชีส์คอมเพล็กซ์ในแตนเบียน *Diachasmimorpha longicaudata* ซึ่งเป็นแตนเบียนของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* [12] โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งส่วนใหญ่สามารถใช้แยกความแตกต่างได้ในระดับชนิดขึ้นไป การจำแนกชนิดแตนเบียนในสกุล *Psytalia* 3 ชนิด คือ *P. concolor*, *P. coserae* และ *P. perproximus* ซึ่งเป็นแตนเบียนของ olive fly ในพื้นที่ต่าง ๆ ที่มีการปลูกกาแฟในเคนยา พบว่าเครื่องหมาย AFLP (amplified fragment length polymorphism) สามารถใช้ในการจำแนกแตนเบียนกลุ่มนี้ออกจากกันได้ [13]

นอกจากนี้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความผันแปรในแต่ละโลคัสสูงกว่าบริเวณอื่น ๆ คือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite marker หรือ simple sequence repeat หรือ short tandem repeat) อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงในแต่ละโลคัส ซึ่งมีการนำมาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของแมลงหลายชนิด เช่น ผึ้ง ชันโรง แตนเบียน [14-17] ข้อจำกัดของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ คือ การพัฒนาเครื่องหมายดังกล่าวต้องใช้เวลาและต้นทุนค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องหาลำดับเบสของบริเวณที่มี

simple sequence repeat (SSR) แล้วจึงจะออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งหรือโลคัสนั้น ๆ ดังนั้นข้อมูลทางด้าน microsatellite marker ของแตนเบียนจึงมีค่อนข้างจำกัด ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค inter-SSR (ISSR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างลำดับเบสที่มีเบสซ้ำแบบเอสเอสอาร์ จำนวนเบสในแต่ละซ้ำมีตั้งแต่ 2-4 เบส ตัวอย่างไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ ที่ถูกออกแบบเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของแมลงในกลุ่ม necro-phagous fly ซึ่งเป็นแมลงกินซากที่มีความสำคัญในด้านนิติวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ (AG)₈C, (CA)₆AC, (TG)₈GT, (GACA)₄ เป็นต้น [18] นอกจากนี้ยังมีการนำไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ เช่น (AG)₈T, (AC)₈T, (GA)₈T, (AC)₈YT, (GA)₈A มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในผึ้งชนิด *Apis mellifera* L. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไอเอสเอสอาร์นี้ พบว่าให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมมากถึง 53.66 % ซึ่งสามารถใช้ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของผึ้งในพื้นที่ต่าง ๆ ได้ [19] มีรายงานการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไอเอสเอสอาร์ในแตนเบียนของแมลง white fly ชนิด *Eretmocerus mundus* Mercet [20] พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของแตนเบียนชนิดนี้ในประชากร 3 กลุ่ม ออกมาได้

จะเห็นได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ เป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีความสำคัญที่สามารถนำมาใช้แก้ปัญหาในการจำแนกชนิดของแตนเบียนให้ถูกต้อง ในกรณีที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาได้ โดยสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาไม่แพง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรได้อีกด้วย ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาความ

ผันแปรทางพันธุกรรมของแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* และ *P. incisi* โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ ขนาด 16-18 นิวคลีโอไทด์ ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตนเบียนจากพื้นที่ต่าง ๆ โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ศึกษาองค์ความรู้ดังกล่าวสามารถนำไปเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 แตนเบียน

เก็บตัวอย่างผลไม้ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย ได้แก่ ชมพู ฝรั่ง ตำลึง บวบ มะระ ขี้กาแดง เป็นต้น จากพื้นที่ต่าง ๆ 5 จังหวัด คือ กาญจนบุรี นครราชสีมา นนทบุรี พิษณุโลก และลำปาง นำเข้ามายังห้องปฏิบัติการ ปล่อยให้แมลงวันผลไม้เจริญจนกระทั่งเข้าสู่ระยะดักแด้ แล้วเก็บดักแด้ใส่ในกล่องเลี้ยงแมลง เพื่อรอเวลาการออกมาเป็นตัวเต็มวัยของแตนเบียน ดักแด้ของแมลงวันผลไม้ที่มีแตนเบียนอยู่ภายในจะฟักออกมาเป็นแตนเบียน สำหรับดักแด้ที่ไม่ถูกเบียนจะฟักออกมาเป็นแมลงวันผลไม้ จากนั้นจัดจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ [21] และจำแนกชนิดแตนเบียนที่พบ [5] จากการเก็บตัวอย่างพืชที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในพื้นที่ต่าง ๆ ส่วนมากจะไม่พบแตนเบียน ในการเก็บตัวอย่างพบแตนเบียนในสกุล *Psytalia* เพียง 2 ชนิด คือ *P. fletcheri* และ *P. incisi* ในการเก็บตำลึงและชมพู ตามลำดับ และไม่พบแตนเบียนชนิด *P. makii* เลย ส่วนใหญ่ที่พบ คือ ชนิด *P. fletcheri* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชและแมลงอย่างกว้างขวาง จึงทำให้ประชากรแตนเบียนซึ่งมีความอ่อนแอต่อสารเคมีลดน้อยลง ตัวอย่างแตนเบียนจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20

องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างแตนเบียนแต่ละตัวมาตัดปีกออก แล้วทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ตามด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นซับให้แห้ง แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจาก Lifton protocol [22] บดตัวอย่างแตนเบียนใน homogenization buffer (0.2 M sucrose, 0.05 M EDTA, 0.1 M Tris, pH 9.0, and 0.5 % SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม potassium acetate ความเข้มข้น 8 โมลาร์ที่เย็น ปริมาตร 75 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที ตูดสารละลายใสใส่หลอดใหม่โดยระวังไม่ให้มีเศษตะกอนติดมา จากนั้นเติม RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาจึงเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1 v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วค่อย ๆ ตูดสารละลายใสด้านบนใส่หลอดใหม่ และเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1 v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 2 นาที นำสารละลายใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่า ของสารละลาย และ isopropyl alcohol ที่เย็น ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลาย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย แอลกอฮอล์ 70 % โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่าเดิม เป็นเวลา 15 นาที และเทแอลกอฮอล์ทิ้ง แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 20-25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบคุณภาพ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรส 0.8 % ใน 0.5X TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) และใช้เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ในการย้อมดีเอ็นเอ แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

2.3 การตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์และสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ การศึกษาครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ [20] โดยตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิขั้นตอน annealing และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ตั้งแต่ 2.0-4.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน 0.5X TBE buffer และย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

2.3.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ในตัวอย่างแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* จำนวน 4 ประชากร ซึ่งเก็บได้จากพืชอาศัยคือ ตำลึงที่ถูกแมลงวันแดงเข้าทำลาย จากจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา นนทบุรี และพิษณุโลก และแตนเบียนชนิด *P. incisi* จากจังหวัดลำปาง โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแตนเบียนด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์ เตรียมสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซี-

อาร์ ปริมาตรรวมใน 1 หลอดปฏิกิริยา เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 20-30 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา, PCR buffer 1 เท่า (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl และ 0.08 % (v/v) Nonidet P40), dNTP ชนิดละ 100 ไมโครโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.0-4.0 มิลลิโมลาร์ (ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์) ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ 10 พิโคโมลาร์, BSA 20 นาโนโมลาร์, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Thermo Scientific) 1 ยูนิต และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรครบ 20 ไมโครลิตร ตั้งค่าสภาวะอุณหภูมิในขั้นตอนต่าง ๆ ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้เหมาะสมสำหรับแต่ละไพรเมอร์ โดยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้ (1) ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ (2) ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิให้ต่ำลงที่ 47-59 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) นาน 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในข้อ (2) จำนวน 40 รอบ (3) เมื่อครบ 40 รอบแล้ว บ่มต่อที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน 0.5X TBE buffer และย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างแตนเบียนที่ศึกษา จากนั้นแปลงข้อมูลที่ได้จากแถบดีเอ็นเอเป็นข้อมูลแบบเลขฐานสอง โดยกำหนดให้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 และการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ข้อมูลและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

POPGENE 32 version 1.32 [23] และหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ภายในประชากรด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc version 2.2 [24] และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมกับระยะทาง (geographic distance) ด้วยวิธี Mantel test โดยใช้โปรแกรม IBDWS version 3.23 [25]

3. ผลและวิจารณ์ผล

3.1 ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแตนเบียน 2 ชนิด ด้วยไพรเมอร์ ไอเอสเอสอาร์ 20 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 6 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอของแตนเบียนและให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) คือ $(AG)_8T$, $(AC)_8RG$, $(CTC)_6$, $(CA)_8A$, $(TC)_8C$ และ $(CT)_8G$ โดยที่แต่ละไพรเมอร์ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 7-13 แถบ (ตารางที่ 1) รวมทั้งสิ้น 60 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 200-1,500 คู่เบส แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphic band) ในแต่ละตัวอย่างที่นำมาศึกษามีจำนวน 53 แถบ (88.33 %) แต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายค่อนข้างสูง คือ มีค่าประมาณ 71-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอนั้นพบมากในแตนเบียนชนิด *P. incisus* สำหรับประชากรแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* ที่มาจากแหล่งต่าง ๆ นั้นพบว่าให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่มีความคล้ายคลึงกันมาก อย่างไรก็ตาม พบว่ามีแถบดีเอ็นเอบางแถบที่ปรากฏเฉพาะในแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* แต่ไม่ปรากฏในแตนเบียนชนิด *P. incisus* ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 620 คู่เบส ที่ได้จากไพรเมอร์ $(AG)_8T$ (รูปที่ 1) ซึ่งแถบดีเอ็นเอนี้สามารถใช้เป็น

เครื่องหมายในการจัดจำแนกหรือระบุชนิดของแตนเบียนทั้งสองชนิดนี้ได้

3.2 ความผันแปรทางพันธุกรรมของแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* และ *P. incisi*

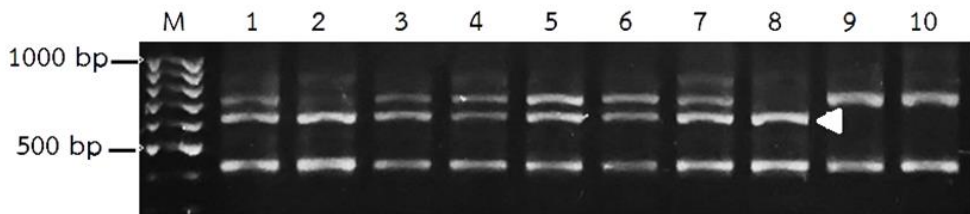
การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตนเบียนทั้ง 2 ชนิด ด้วยไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์ พบว่าแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* จากพื้นที่ ต่าง ๆ คือ กาญจนบุรี นนทบุรี นครราชสีมา และพิษณุโลก มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกัน ซึ่งมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ภายในประชากรตั้งแต่ 0 ถึง 0.14 และระหว่างประชากร ตั้งแต่ 0.02 ถึง 0.13 แสดงให้เห็นว่าแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรแตนเบียนของแมลงวันแดงในประเทศไทย [17] ความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรของแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* เมื่อเปรียบเทียบกับแตนเบียนชนิด *P. incisi* ซึ่งมีจำนวนประชากรที่ศึกษาค่อนข้าง

น้อย พบว่าประชากรแตนเบียนกลุ่มนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าค่อนข้างสูง โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.18 ถึง 0.56 ซึ่งสังเกตจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างแตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ ดังตัวอย่าง ไพรเมอร์ (CA)₈A (รูปที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบกับประชากร *P. fletcheri* จากจังหวัดต่าง ๆ พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอยู่ในช่วง 0.25 ถึง 0.34 (ตารางที่ 2) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* จากทั้ง 4 ประชากร มีแมลงอาศัยและพืชอาศัยค่อนข้างจำเพาะ และตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นได้มาจากแมลงและพืชอาศัยชนิดเดียวกัน คือ *B. cucurbitae* และตำลึง (*Coccinia grandis* L.) ในขณะที่แตนเบียนชนิด *P. incisi* แม้จะได้ตัวอย่างมาจากพืชอาศัยชนิดเดียว คือ ชมพู (*Eugenia javanica* lamk) แต่แตนเบียนชนิดนี้มีแมลงอาศัยหลากหลายกว่าชนิด *P. fletcheri* [4] จึงอาจส่งผลให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูงภายในประชากรเดียวกัน และเมื่อนำข้อมูล

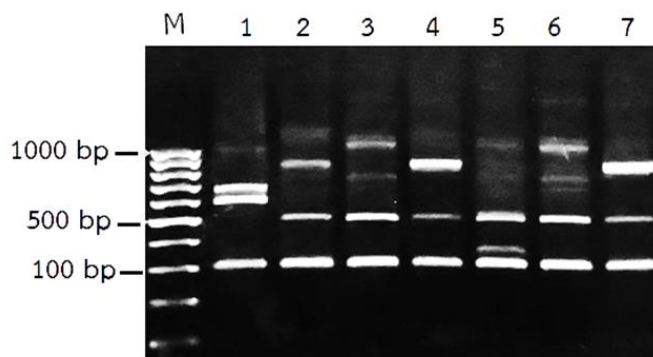
ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* และ *P. incisi* ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์ และจำนวนแถบที่เกิดขึ้นจากแต่ละไพรเมอร์

ISSR Primers	Melting temperature (°C)	Annealing temperature (°C)	Concentration of MgCl ₂ (mM)	Number of DNA bands	Number of polymorphic bands	Polymorphism (%)
(AG) ₈ T	50.0	48	2.0	8	6	75
(AC) ₈ R*G	53.9	48	4.0	11	11	100
(CTC) ₆	61.7	59	3.5	11	10	90.91
(CA) ₈ A	50.0	47	2.0	13	11	84.62
(TC) ₈ C	52.4	49	2.0	7	5	71.43
(CT) ₈ G	12.4	49	3.0	10	10	100

R* คือ นิวคลีโอไทด์ที่มีเบส G หรือ T



รูปที่ 1 ผลผลิตจากไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์ของแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* (1-8) และ *P. incisi* (9-10) จากไพรเมอร์ (AG)₈T ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* ดังลูกศรชี้ (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder)



รูปที่ 2 ผลผลิตไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์ของแตนเบียน *P. incisi* (ลำปาง 1-7) จากไพรเมอร์ (CA)₈A (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder)

ตารางที่ 2 ระยะห่างระหว่างประชากร (กิโลเมตร) (ด้านบน) และความแตกต่างทางพันธุกรรม (ด้านล่าง) ตามวิธีการของ Nei 1978 [26]

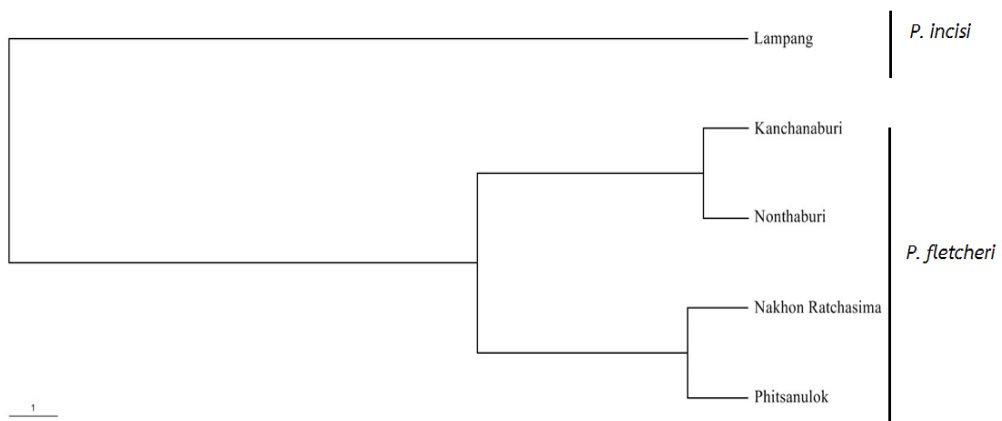
Populations (Provinces)	Kanchaburi (KRI) N=20	Nonthaburi (NBI) N=20	Nakhon Ratchasima (NMA) N=20	Phitsanulok (PLK) N=20	Lampang (LPG) N=7
KRI	****	196	432	452	647
NBI	0.0183	****	284	366	603
NMA	0.0939	0.0990	****	460	618
PLK	0.1212	0.1316	0.0248	****	243
LPG	0.3371	0.3441	0.2467	0.2881	****

ที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถแยกแตนเบียนทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้ชัดเจน (รูปที่ 3) ซึ่งแตนเบียนชนิด

P. fletcheri ทั้ง 4 ประชากร ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยที่ตัวอย่างประชากรจากกาญจนบุรีมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับประชานนทบุรี คือมีความ

แตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งสองน้อยที่สุด คือ 0.0183 ซึ่งประชากรจากสองพื้นที่อยู่ใกล้กันมากกว่าประชากรอื่น คือ ประมาณ 196 กิโลเมตร ในขณะที่ประชากรพิษณุโลกมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับประชากรจากนครราชสีมา คือ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมเพียง 0.0248 ซึ่งถือว่าประชากรทั้งสองมีความใกล้ชิดกันค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะห่างระหว่างพื้นที่อาศัยซึ่งมีระยะทางประมาณ 460 กิโลเมตร แสดงให้เห็นถึงว่าการไหลของยีน (gene flow) ระหว่างประชากรในพื้นที่

ต่าง ๆ ที่นำมาศึกษา เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมและระยะทางพบว่าไม่สัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R=0.3195$, $P=0.182$) ทั้งนี้เนื่องจากว่าประชากรที่นำมาศึกษานั้นอยู่ไม่ห่างจากกันมากและมีสภาพทางภูมิศาสตร์คล้ายคลึงกัน ถ้าประชากรอยู่ห่างกันมากโอกาสที่จะเกิด gene flow ก็จะน้อยด้วย ประชากรที่มี gene flow ถึงกันน้อยก็มีแนวโน้มที่จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากขึ้น [27,28]



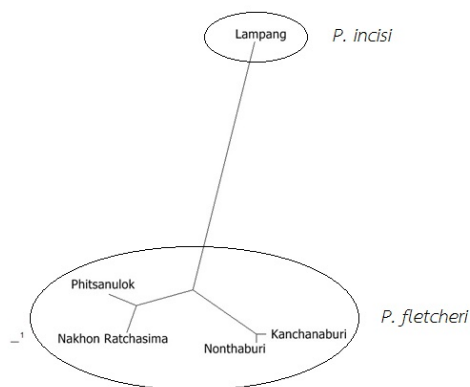
รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* ทั้ง 4 ประชากร และ *P. incisi* ที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์พีซีอาร์

การศึกษาครั้งนี้พบว่าไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์เพียง 2 ไพรเมอร์ ก็สามารถใช้ในการวิเคราะห์และแยกความแตกต่างของแตนเบียนทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 4) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพการนำดีเอ็นเอเครื่องหมายดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแตนเบียนในสกุล *Psytalia* และเป็นแนวทางนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแตนเบียนชนิดอื่น ๆ รวมถึงการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับประชากรและระหว่างประชากรได้อีกด้วย

4. สรุป

การจำแนกและตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* และ *P. incisi* ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอจากประชากรแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* จำนวน 5 ประชากร พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบความผันแปรในระดับประชากรได้โดยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในแตนเบียนแมลงวันแดง คือ 0.018 ถึง 0.131 และความแตกต่างภายในชนิด *P. incisi* มีค่าระหว่าง 0.18 ถึง 0.56 ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ชัดเจน อีกทั้งยังพบ

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับชนิดของแตนเบียนอีกด้วย ดังนั้นเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์จึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตนเบียน ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรค่อนข้างต่ำกว่าแมลงในกลุ่มอื่น ๆ



รูปที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแตนเบียนชนิด *P. fletcheri* และ *P. incisi* จาก 5 ประชากร โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ (AG)₈T และ (AC)₈RG

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร รหัสทุน R2558C04

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Pennacchio, F. and Strand, M., 2006, Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera, Ann. Rev. Entomol. 51: 233-258.
- [2] Wharton, R. A., 1987, Changes in nomenclature and classification of some Opiine Braconidae (Hymenoptera), Proc. Entomol. Soc. Washington 89: 61-73.
- [3] Wharton, R.A., 2009, Two new species of *Psytalia* Walker (Hymenoptera, Braconidae, Opiinae) reared from fruit-infesting tephritid (Diptera) hosts in Kenya, ZooKeys 20: 349-377.
- [4] Chinajariyawong, A., Clarke, A.R., Jirasurat, M., Kritsaneepiboon, S., Lahey, H. A., Vijayasegaran, S., Walter, G.H., 2000, Survey of opiine parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand and Malaysia, Raffles Bull. Zool. 48: 71-101.
- [5] Wharton, R.A. and Gilstrap, F.E., 1983, Key to and status of opiine braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus*. (Diptera: Tephritidae), Ann. Entomol. Soc. Amer. 76: 721-742.
- [6] Godfray, H. C. J., 1994, Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology, Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 488 pp.
- [7] Clausen, C.P., Clancy, D.W. and Chock, Q. C., 1965, biological control of the oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii, Tech. Bull. 1322.
- [8] Vargas, R.I., Long, J., Miller, N.W., Delate, K., Jackson, C.G., Uchida, G.K., Bautista R.C. and Harris, E.J., 2004, Releases of *Psytalia fletcheri* (Hymenoptera: Braconidae) and sterile flies to suppress melon fly (Diptera:

- Tephritidae) in Hawaii, J. Econ. Entomol. 97: 1531-1539.
- [9] Wharton, R.A., 1989, Classical Biological Control of Fruit Infesting Tephritidae, pp. 303-313, In Robinson, A. and Harper, G. (Eds.), World Crop Pests, Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies, and Control, Vol. 3b, Elsevier, Amsterdam.
- [10] Whitfield, J.B. and Cameron, S.A., 1998, Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial *16S rRNA* gene among hymenoptera, Mol. Biol. Evol. 15: 1728-1743.
- [11] Baer, C.F., Tripp, D.W., Bjorksten, T.A. and Antolin, M.F., 2004, Phylogeography of a parasitoid wasp (*Diaeretiella rapae*): No evidence of host-associated lineages, Mol. Ecol. 13: 1859-1869.
- [12] Kitthawee, S., 2013, ITS2 sequence variations among members of *Diachasmimorpha longicaudata* complex (Hymenoptera: Braconidae) in Thailand, J. Asia-Pacific Entomol. 16: 173-179.
- [13] Billah, M.K., Kimani-Njogu, S.W., Wharton, R.A., Woolley, J.B. and Masiga, D., 2008, Comparison of five allopatric fruit fly parasitoid populations (*Psytalia* species) (Hymenoptera: Braconidae) from coffee fields using morphometric and molecular methods, Bull. Entomol. Res. 98: 63-75.
- [14] Frank, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M. and Cornuet, J.M., 2001, Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and mitochondrial data, Heredity 86: 420-430.
- [15] Francisco, F.O., Santiago, L.R. and Arias, M.C., 2013, Molecular genetic diversity in populations of the stingless bee *Plebeia remota*: A case study, Genet. Mol. Biol. 36: 118-123.
- [16] Bon, M.C., Jones, W., Hurard, C., Loiseau, A., Ris, N., Pickett, C., Estoup, A. and Fauvergue, X., 2008, Identification of 21 polymorphic microsatellites in the African parasitoid wasp, *Psytalia lounsburyi* (Silvestri) (Hymenoptera: Braconidae), Mol. Ecol. Res. 8: 930-932.
- [17] Homchan, S, Haymer, D.S. and Kitthawee, S., 2014, Microsatellite marker variation in populations of the melon fly parasitoid, *Psytalia fletcheri*. ScienceAsia 40: 348-354.
- [18] Chong, Y.V., Chua, T.H. and Song, B.K., 2014, Genetic variations of *Chrysomya megacephala* populations in Malaysia (Diptera: Calliphoridae), Adv. Entomol. 2: 49-56.
- [19] Shouhani, H., Dousti, A., Radjabi, R. and Zarei, M., 2014, Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in areas of Iran, J. BioSci. Biotech. 3: 127-131.
- [20] Ardeh, M. J., 2013, The utility of ISSR-primers to make difference among populations of parasitoid, *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelin-

- dae), J. Crop Protec. 2: 263-269.
- [21] White, I.M. and Elson-Harris, M.M., 1992, Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics, Centre for Agriculture and Biosciences International, Wallingford, Londo, 601 pp.
- [22] Anleitner, I.E. and Haymer, D.S., 1992, Y enriched and Y specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, Chromosoma 101: 271-278.
- [23] Yeh, F.D., Yang, R. and Boyle, T., 1997, Population Genetic Analysis Software, POPGENE version 1. 32, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- [24] Rohlf, F. , 2006, NTSYS- Pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.02e, Exeter Software, New York.
- [25] Jensen, J.L., Bohonak, A.J., and Kelley, S.T. , 2005, Isolation by distance, web service, BMC Genet. 6: 13.
- [26] Nei, M. , 1978, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, Genetics 89: 583-590.
- [27] Rousset, F. , 1997, Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance, Genetics 145: 1219-1228.
- [28] Slatkin, M. , 1987, Gene flow and the geographic structure of natural populations, Science 236: 787-792.