



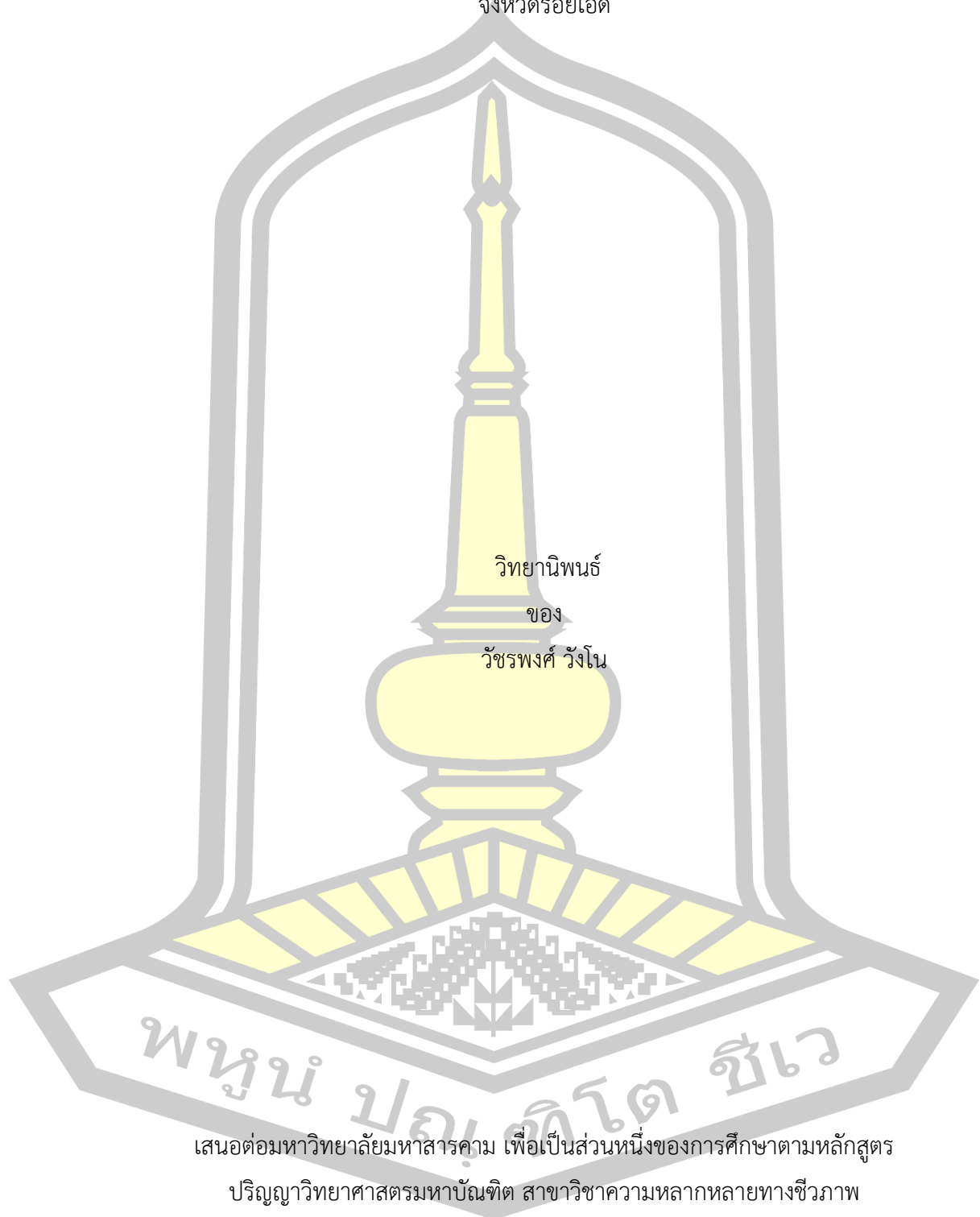
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอน *Gryllotalpa orientalis* Burmeister, 1838 ใน
จังหวัดร้อยเอ็ด

วิทยานิพนธ์
ของ
วัชรพงศ์ วังโน

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาความหลากหลายทางชีวภาพ
มกราคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

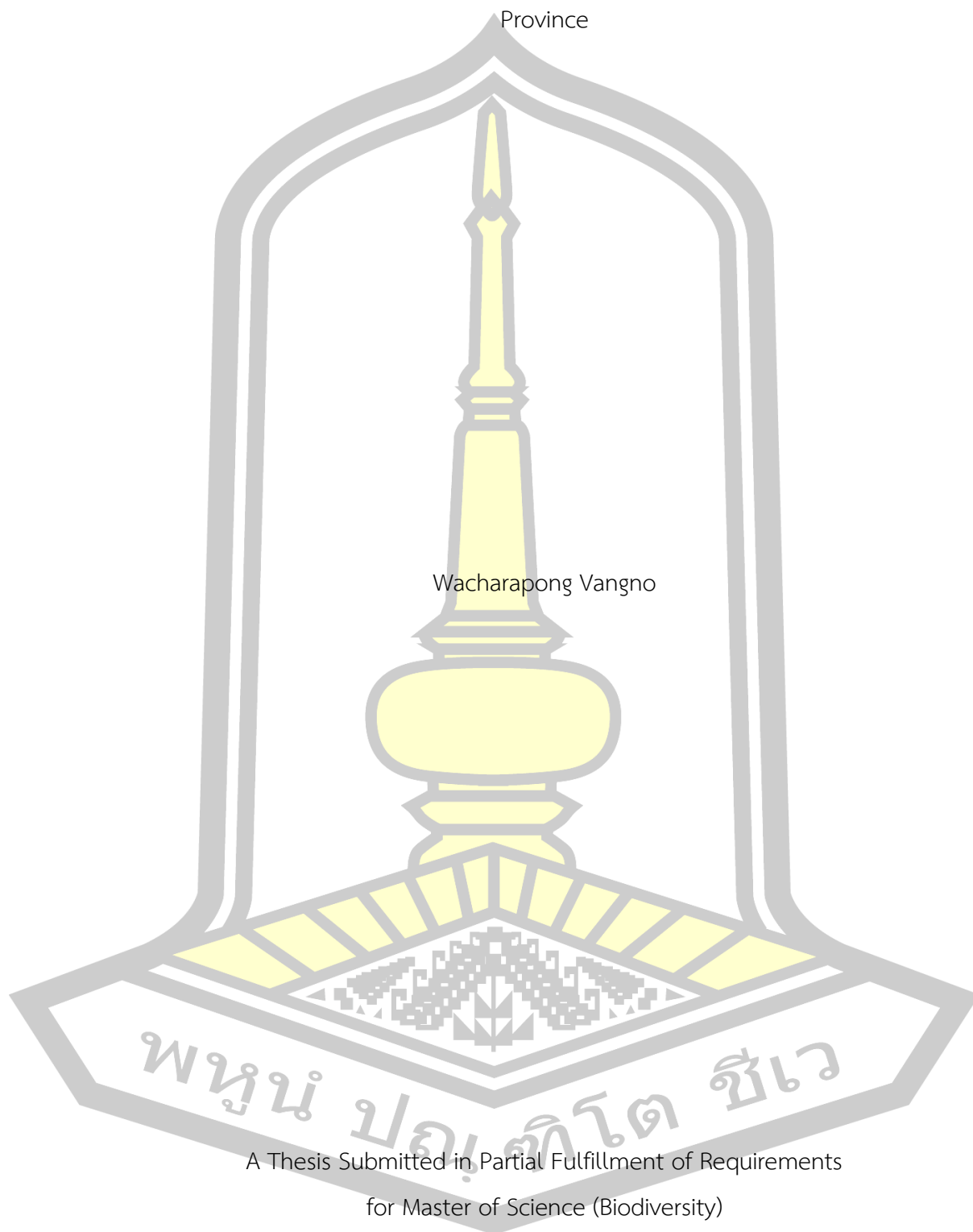
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอน *Gryllotalpa orientalis* Burmeister, 1838 ใน
จังหวัดร้อยเอ็ด



มกราคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Genetic diversity of mole cricket *Gryllotalpa orientalis* Burmeister, 1838 in Roi Et
Province



Wacharapong Vangno

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biodiversity)

January 2024

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายวัชรพงศ์ วังโน แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
ความหลากหลายทางชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รศ. ดร. วีระชัย สายจันทา)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร. สุดาร์ตน์ ถนอมแก้ว)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(รศ. ดร. ชัยรัตน์ ตัณฑราวัฒน์พันธ์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาความหลากหลายทางชีวภาพ ของมหาวิทยาลัย
มหาสารคาม

.....
(ผศ. ดร. สุดาร์ตน์ ถนอมแก้ว)

คณบดีสถาบันวิจัยวลัยรุกเขช

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอน <i>Gryllotalpa orientalis</i> Burmeister, 1838 ในจังหวัดร้อยเอ็ด		
ผู้วิจัย	วัชรพงศ์ วังโน		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วีระชัย สายจันทา		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	ความหลากหลายทางชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2567

บทคัดย่อ

แมลงกระซอนเป็นแมลงที่มีความสำคัญทั้งทางด้านอาหาร การเกษตร และการแพทย์ สามารถพบได้ทั่วโลก แมลงกระซอนในประเทศไทยถูกจัดจำแนกเป็นชนิดเดียว ได้แก่ *Gryllotalpa orientalis* แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเชิงลึกทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอนในประเทศไทยมาก่อน ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอนที่กระจายอยู่ในพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด โดยทำการเก็บตัวอย่างแมลงกระซอนจำนวน 271 ตัวอย่าง จากแหล่งธรรมชาติใน 14 พื้นที่แต่ละอำเภอของจังหวัดร้อยเอ็ด มาทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) ความยาว 430 คู่เบส และ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) ความยาว 465 คู่เบส เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ผลการศึกษาพบว่า ประชากรแมลงกระซอนจากแหล่งธรรมชาติในจังหวัดร้อยเอ็ดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง พบการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 และ 16S rDNA จำนวน 97 (22.6%) และ 80 (17.2%) ตำแหน่ง สามารถจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมออกได้เป็น 37 (Go1 – Go37) และ 15 (Gr1 – Gr15) แฮปโลไทป์ (haplotypes) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมโดยการสร้างเครือข่ายแฮปโลไทป์ (haplotype network) ให้ผลสอดคล้องกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน CO1 และ 16S rDNA โดยสามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมของแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดออกเป็น 6 กลุ่ม (I – VI) และเมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีนมาวิเคราะห์เป็นแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่า ประชากรแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดแบ่งสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการออกเป็น 6 กลุ่ม เช่นเดียวกัน และพบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม p -distance เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรอยู่ในช่วงระหว่าง 0.0002 ถึง 0.1138 นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์สัดส่วนของสัญญาณบางประการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุกรรม พบลักษณะสัญญาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่น ความกว้างช่องอก ความกว้างและความยาวของปีกคู่หลัง และความยาวของปีกคู่หน้า เป็นต้น จากผลการศึกษาครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า ประชากรแมลงกระซอนในแหล่งธรรมชาติของจังหวัดร้อยเอ็ดเป็นชนิดซับซ้อน (species complex) ซึ่งอาจ

จำแนกเป็นหลายชนิดและจำเป็นต้องศึกษาทางชีววิทยาด้านอื่นๆ รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานทั้งภายนอกและภายในของแมลงกระซอนในกลุ่มพันธุ์กรรมต่างๆ อย่างละเอียดต่อไปในอนาคต เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกชนิดของแมลงกระซอนที่พบในจังหวัดร้อยเอ็ดรวมทั้งแหล่งอื่นๆ ในประเทศไทยให้ถูกต้องและชัดเจนมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : แมลงกระซอน, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, จังหวัดร้อยเอ็ด



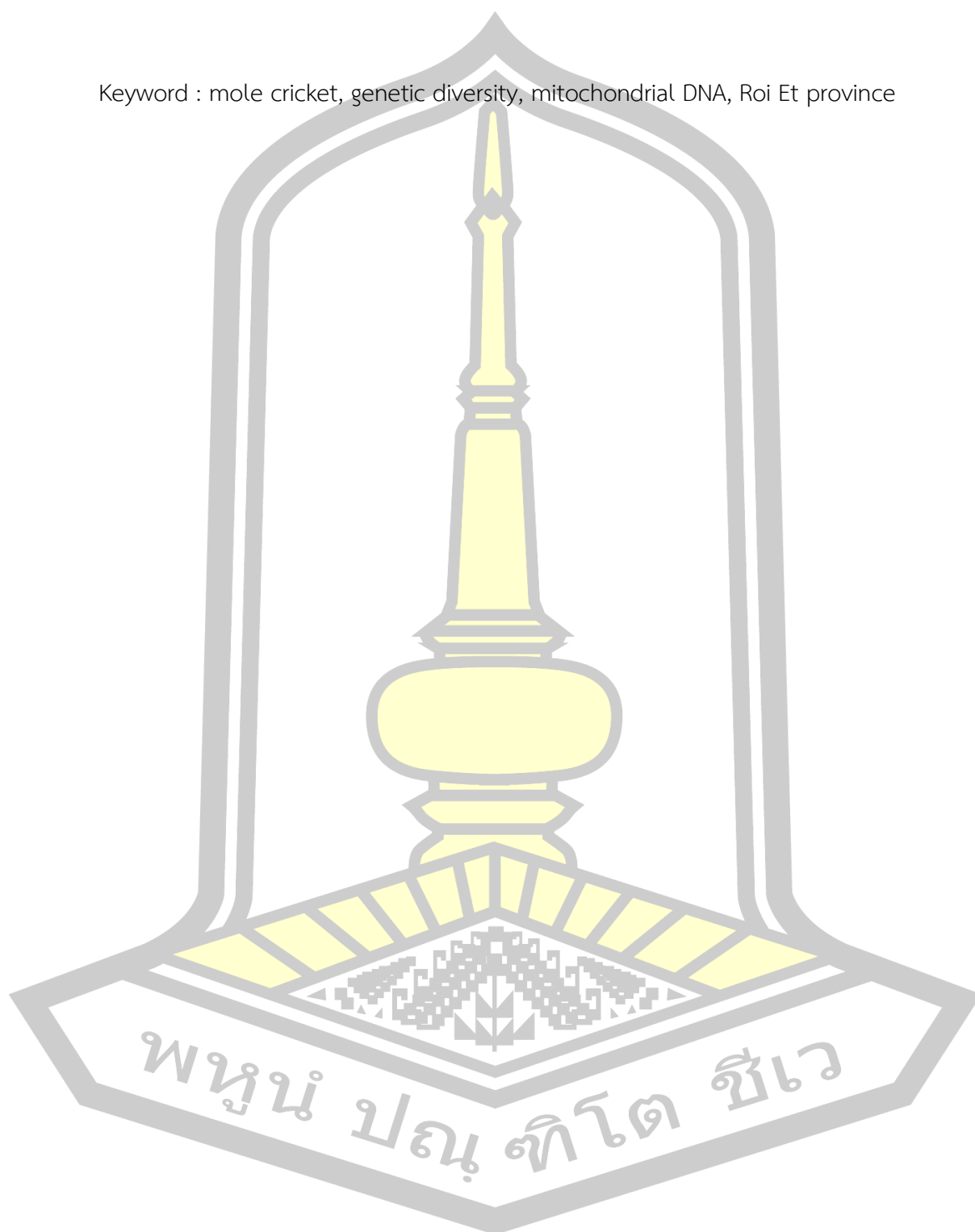
TITLE	Genetic diversity of mole cricket <i>Gryllotalpa orientalis</i> Burmeister, 1838 in Roi Et Province		
AUTHOR	Wacharapong Vangho		
ADVISORS	Associate Professor Weerachai Saijuntha , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biodiversity
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2024

ABSTRACT

The mole cricket is an edible, medicinal, and agriculturally significant insect that can be found worldwide. In Thailand, only *Gryllotalpa orientalis* has been recognized. However, a comprehensive investigation on the genetic variation of mole cricket in Thailand is still lacking. Thus, this study aims to examine the genetic variation of mole cricket from different localities in Roi Et Province. The 271 mole crickets were collected from natural habitats in 14 different districts of Roi Et Province for genetic variation investigation using two mitochondrial genes, namely 430 bp of cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) and 465 bp of 16S ribosomal DNA (16S rDNA) as genetic markers. A high level of genetic variation was found in mole cricket populations in this study. The 97 (22.6%) and 80 (17.2%) variation sites were found in CO1 and 16S rDNA sequences, respectively. According to these variations, 37 (Go1 – Go37) and 15 (Gr1 – Gr15) haplotypes were classified based on CO1 and 16S rDNA sequences, respectively. Haplotype network analysis revealed that six genetic groups have been classified, namely genetic groups I – VI. Phylogenetic tree analysis also demonstrates the six genetic groups, similar to haplotype network analysis. The *p*-distance value compared between 14 populations ranged from 0.0002 to 0.1138. In addition, morphometric analysis also supports the classification of genetic groups, as demonstrated that some characters showed significant differences between genetic groups, such as thorax width, tegmen length, wing length, and wing width. Thus, mole cricket populations in Roi Et Province contained a species complex. Further comprehensive investigations on biology, ecology, morphology, and genetics need to

be examined for a better understanding of their systematic and taxonomic status.

Keyword : mole cricket, genetic diversity, mitochondrial DNA, Roi Et province



กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รศ.ดร.วีระชัย สายจันทา และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ศ.ดร.ไพโรจน์ ประมวล รศ.ดร.ชัยรัตน์ ตัณฑราวัฒน์พันธ์ และ ผศ.ดร.สุดาร์ตน์ ถนอมแก้ว รวมทั้ง อ.ดร.นคร ประดิษฐ์ และ ดร.วรายุธ พิลาก ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ายิ่ง ในการให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา อันเป็นประโยชน์ในการจัดทำวิทยานิพนธ์นี้ตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนกระทั่งดำเนินการเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ย่าทวด คุณปู่ คุณย่า คุณตาเคน พ่อแม่พี่น้องทุกคนและครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ได้ให้กำลังใจและส่งเสริมสนับสนุนในการศึกษาเล่าเรียนครั้งนี้จนสำเร็จการศึกษา ขอขอบคุณอาจารย์ประจำหลักสูตรความหลากหลายทางชีวภาพทุกท่าน เจ้าหน้าที่และเพื่อนร่วมชั้นเรียนทุกคนของสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช ที่ช่วยสนับสนุนทั้งในด้านการเรียนการสอนและการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้จนเสร็จสมบูรณ์ คุณค่าและประโยชน์ของการศึกษาครั้งนี้ ผู้ศึกษาขอมอบเป็นเครื่องบูชาบุญการี บูรพาจารย์ และผู้มีอุปการะคุณทุกท่าน

วัชรพงศ์ วังโน

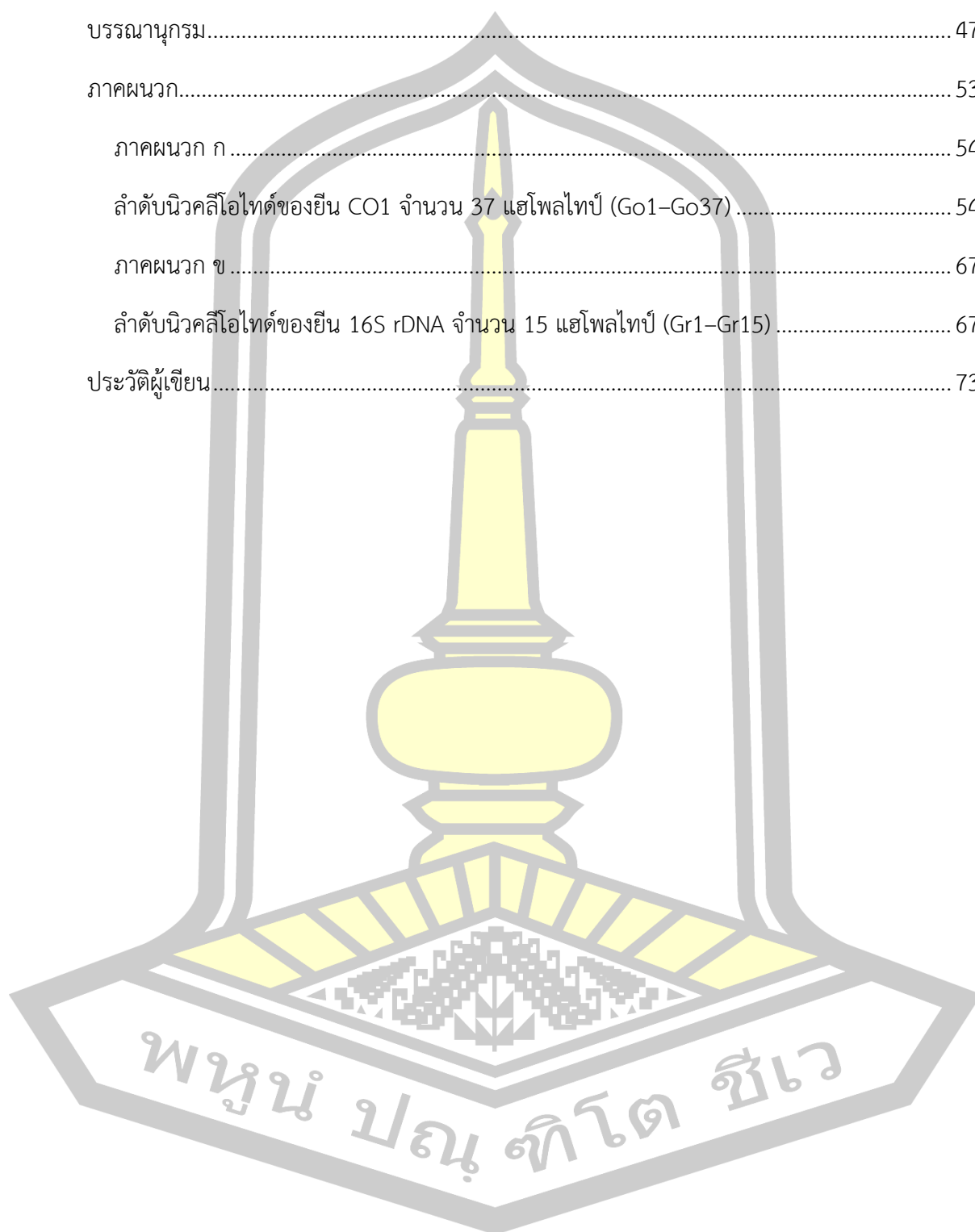


สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 สถานที่ทำการวิจัย	3
บทที่ 2	4
การทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 การจัดจำแนกและการเรียกชื่อ.....	4
2.2 ลักษณะทางชีววิทยา.....	6
2.2.1 สัตว์ฐานวิทยา.....	6
2.2.2 วงจรชีวิตและพฤติกรรมเฉพาะ	8
2.3 การกระจายตัวและแหล่งอาศัย	9
2.4 ภูมิปัญญาและการใช้ประโยชน์แมลงกระซอน	11

2.5 ประโยชน์และโทษของแมลงกระซอน.....	12
2.5.1 ประโยชน์ของแมลงกระซอน.....	12
2.5.2 ผลเสียที่เกิดจากแมลงกระซอน.....	13
2.6 ข้อมูลทางพันธุกรรม.....	15
2.6.1 ซิสเทมาติกส์.....	15
2.6.2 จีโนมในไมโทคอนเดรีย.....	17
2.6.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	19
บทที่ 3.....	21
วิธีการทดลอง.....	21
3.1 วิธีเก็บตัวอย่าง.....	21
3.2 การจำแนกชนิดและสัณฐานวิทยา.....	22
3.3 การวิเคราะห์พันธุกรรม.....	23
3.3.1 วิธีการสกัด DNA.....	23
3.3.2 วิธีการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	24
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	24
3.4.1 ข้อมูลสัณฐานวิทยา.....	24
3.4.2 ข้อมูลทางพันธุกรรม.....	25
บทที่ 4.....	26
ผลการทดลอง.....	26
4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	26
4.2 เครือข่ายแฮพลไทป์ (haplotype network).....	32
4.4 ความแตกต่างทางพันธุกรรม.....	37
4.5 สัณฐานวิทยาบางประการ.....	38
บทที่ 5.....	43

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	43
บรรณานุกรม.....	47
ภาคผนวก.....	53
ภาคผนวก ก	54
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 จำนวน 37 แฮพโลไทป์ (Go1-Go37)	54
ภาคผนวก ข	67
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จำนวน 15 แฮพโลไทป์ (Gr1-Gr15)	67
ประวัติผู้เขียน.....	73



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลความหลากหลายชนิดของแมลงกระซอนสกุล <i>Gryllotalpa</i> จำนวน 26 ชนิด ที่พบในเขตภูมิภาคตะวันออก.....	5
ตารางที่ 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ด.....	21
ตารางที่ 3 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอน 14 กลุ่ม ประชากรจากจังหวัด ร้อยเอ็ด วิเคราะห์โดยใช้ส่วนของยีน CO1 ขนาดความยาว 430 คู่เบส และ 16S rDNA ขนาดความ ยาว 465 คู่เบส.....	28
ตารางที่ 4 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม p-distance เปรียบเทียบระหว่าง 14 กลุ่มประชากรของ แมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ด โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 ในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบ	39
ตารางที่ 5 แสดงการวัดสัดส่วนแมลงกระซอนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุกรรม I-VI	40

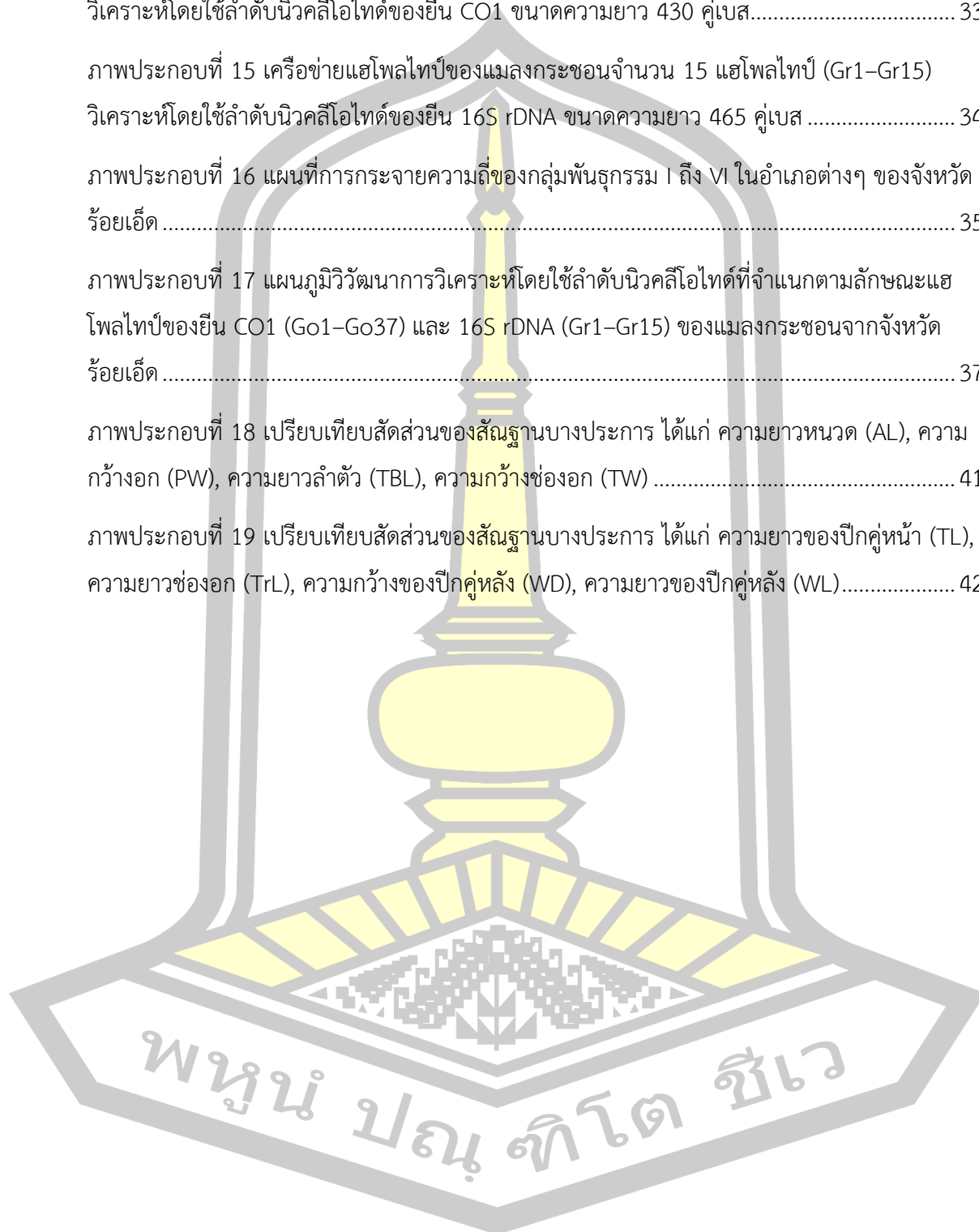
พูน ปณ จิโต ชีเว

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพประกอบที่ 1 แสดงลักษณะรูปร่างภายนอกทั่วไปของแมลงกระซอนสกุล <i>Gryllotalpa</i>	6
ภาพประกอบที่ 2 ลักษณะ forewing ของแมลงกระซอนชนิด <i>G. gryllotalpa</i> ที่พบในประเทศอิหร่าน, A = forewing ของเพศผู้, และ B = forewing ของเพศเมีย ลูกศรสีขาวแสดงให้เห็นถึงลักษณะของ harp-shaped cell ในปีกของเพศผู้ (Kazemi et al., 2013).....	7
ภาพประกอบที่ 3 ลักษณะปีกสั้น (SW) และปีกยาว (LW).....	8
ภาพประกอบที่ 4 วงจรชีวิตของแมลงกระซอน	9
ภาพประกอบที่ 5 พฤติกรรมที่พบในแมลงกระซอนชนิด <i>G. orientalis</i>	9
ภาพประกอบที่ 6 แสดงพื้นที่การกระจายของแมลงกระซอน 3 สกุล ได้แก่ สกุล <i>Gryllotalpa</i> สกุล <i>Scapteriscus</i> และสกุล <i>Neocurtilla</i>	11
ภาพประกอบที่ 7 เมนูอาหารที่ปรุงโดยใช้แมลงกระซอน	12
ภาพประกอบที่ 8 Consensus tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงกระซอน <i>Gryllotalpa orientalis</i> และชนิดอื่นๆ ในวงศ์ย่อย Gryllotalpidae และ Scapteriscinae.....	16
ภาพประกอบที่ 9 แสดงการจัดกลุ่มโดยมีลักษณะเฉพาะ (จุดสีดำ) และลักษณะที่พบร่วม (จุดสีขาว) เปรียบเทียบระหว่าง phyletic group, clade และ taxon ของแมลงกระซอน <i>Gryllotalpa orientalis</i> และชนิดอื่นๆ รวมทั้งสิ้น 26 ชนิด.....	17
ภาพประกอบที่ 10 แสดงการจัดเรียงของยีนและ tRNAs ในจีโนมของไมโทคอนเดรียของแมลงกระซอน <i>G. orientalis</i> จากประเทศเกาหลีใต้	18
ภาพประกอบที่ 11 แสดงตำแหน่งของลักษณะภายนอกจำนวน 8 ลักษณะของแมลงกระซอน ที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุกรรมของแมลงกระซอน	23
ภาพประกอบที่ 12 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่พบการแปรผันในยีน CO1 จำนวน 97 ตำแหน่ง เปรียบเทียบกันระหว่าง 37 แฮปโลไทป์ (Go1–Go37)	29
ภาพประกอบที่ 13 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่พบการแปรผันในยีน 16S rDNA จำนวน 80 ตำแหน่ง เปรียบเทียบกันระหว่าง 15 แฮปโลไทป์ (Gr1–Gr15)	31

ภาพประกอบที่ 14 เครือข่ายแฮพโลไทป์ของแมลงกระซอนจำนวน 37 แฮพโลไทป์ (Go1–Go37)	
วิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 ขนาดความยาว 430 คู่เบส.....	33
ภาพประกอบที่ 15 เครือข่ายแฮพโลไทป์ของแมลงกระซอนจำนวน 15 แฮพโลไทป์ (Gr1–Gr15)	
วิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาดความยาว 465 คู่เบส	34
ภาพประกอบที่ 16 แผนที่การกระจายความถี่ของกลุ่มพันธุกรรม I ถึง VI ในอำเภอต่างๆ ของจังหวัด ร้อยเอ็ด.....	35
ภาพประกอบที่ 17 แผนภูมิวิวัฒนาการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำแนกตามลักษณะแฮ พโลไทป์ของยีน CO1 (Go1–Go37) และ 16S rDNA (Gr1–Gr15) ของแมลงกระซอนจากจังหวัด ร้อยเอ็ด.....	37
ภาพประกอบที่ 18 เปรียบเทียบสัดส่วนของสัณฐานบางประการ ได้แก่ ความยาวหนวด (AL), ความ กว้างอก (PW), ความยาวลำตัว (TBL), ความกว้างช่องอก (TW)	41
ภาพประกอบที่ 19 เปรียบเทียบสัดส่วนของสัณฐานบางประการ ได้แก่ ความยาวของปีกคู่หน้า (TL), ความยาวช่องอก (TrL), ความกว้างของปีกคู่หลัง (WD), ความยาวของปีกคู่หลัง (WL).....	42



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันพบว่าการเพิ่มจำนวนของประชากรมนุษย์บนโลกมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้แหล่งอาหารโปรตีนจากเนื้อสัตว์อาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการในการบริโภคของมนุษย์ในอนาคต องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization: FAO) คาดการณ์ว่าภายในปี 2593 ประชากรโลกจะเพิ่มขึ้นเป็น 9,000 ล้านคน จาก 7,400 ล้านคน ที่มีอยู่ในปัจจุบัน ดังนั้น แหล่งอาหารโปรตีนทางเลือกอื่นจึงมีความจำเป็นมากขึ้น แมลงกินได้ (edible insects) ถือเป็นอาหารทางเลือกอีกอย่างหนึ่งที่จะส่งผลดีต่อทั้งระบบเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อมของโลกได้เป็นอย่างดีในอนาคต (Van Huis, 2013) ดังนั้น FAO จึงสนับสนุนให้แมลงเป็นอาหารสำหรับประชากรในอนาคต แมลงให้คุณค่าทางโภชนาการไม่ด้อยไปกว่าเนื้อสัตว์ ประกอบไปด้วย โปรตีน ไขมัน และวิตามินที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ มีการบันทึกไว้ว่า มนุษย์เริ่มรู้จักการบริโภคแมลงเมื่อ 7,000 ปีมาแล้ว (Ramos-Elorduy, 2009) ปัจจุบัน มีแมลงกินได้มากกว่า 2,300 ชนิด กระจายอยู่ทั่วโลก มีทั้งแมลงที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมบนบก (terrestrial environments) และแหล่งน้ำ (aquatic environments) และแมลงกินได้สามารถพบได้ในทุกฤดู แมลงที่สามารถนำมารับประทานได้ โดยทั่วไป จะ จัด อยู่ใน กลุ่ม Lepidopterans, Orthopterans, Isopterans และ Hymenopterans แมลงบางชนิดยังต้องอาศัยการจับจากแหล่งธรรมชาติมาเป็นอาหารเนื่องจากมีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยง แต่บางชนิดก็สามารถนำมาขยายพันธุ์และเพาะเลี้ยงเป็นฟาร์มขนาดใหญ่ได้ ซึ่งการเลี้ยงแมลงไม่ต้องใช้พื้นที่ น้ำ และพลังงานอื่นๆ ในปริมาณมาก ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง ลงทุนต่ำ ไม่สร้างมลพิษ สามารถเลี้ยงในเขตชนบทได้

ในประเทศไทยมีแมลงที่สามารถนำมารับประทานหลากหลายชนิด และแมลงกระชอนถือเป็นแมลงอีกชนิดที่นิยมนำมาปรุงเป็นอาหาร มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ให้พลังงาน 125.1 กิโลแคลอรี โปรตีน 15.4 กรัม ไขมัน 15.4 กรัม ต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม นอกจากนี้ยังมีไคตินที่มีประโยชน์ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลและไขมันในเลือด (Ravi Kumar, 2000) รวมทั้งสามารถต้านการติดเชื้อจากยีสต์ในระบบทางเดินอาหาร (Koide, 1998) ปัจจุบัน แมลงกระชอนเป็นที่ต้องการของตลาดค่อนข้างสูง แต่ยังไม่มีการเลี้ยงในฟาร์ม ยังต้องจับตามแหล่งธรรมชาติเป็นหลัก หากมีการจับเพื่อนำมาบริโภคในปริมาณมาก รวมทั้งการใช้สารเคมีในพื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยหลัก

ของแมลงกระซอน ในอนาคตอาจส่งผลกระทบต่อจำนวนลงของประชากรแมลงกระซอนในธรรมชาติ ดังนั้น การศึกษาข้อมูลพื้นฐานต่างๆ เกี่ยวกับแมลงกระซอนในประเทศไทย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง สำหรับการวางแผนเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์แมลงกระซอนได้อย่างยั่งยืนในอนาคต จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าข้อมูลพื้นฐานต่างๆ ของแมลงกระซอนในประเทศไทยนั้น ยังมีอยู่อย่างจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลทางด้านชีววิทยา สัณฐานวิทยา และความหลากหลายทางพันธุกรรม ข้อมูลเหล่านี้จะนำไปสู่การจัดจำแนกแมลงกระซอนที่พบในประเทศไทยที่ถูกต้องและชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่งที่ผ่านมา มีรายงานการพบแมลงกระซอนเพียงชนิดเดียวในประเทศไทย คือ *Gryllotalpa orientalis* เป็นข้อมูลที่ศึกษาด้วยการจำแนกชนิดของแมลงกระซอนโดยใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก หากมีการศึกษาข้อมูลด้านอื่นๆ ทั้งด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจจะมีการค้นพบชนิดที่ซ่อนเร้นอยู่ (cryptic species) รวมทั้งอาจมีความซับซ้อนของสปีชีส์ในประชากรของแมลงกระซอนในแหล่งธรรมชาติของประเทศไทย ดังที่มีรายงานการพบสปีชีส์ซับซ้อน (species complex) ในแมลงกินได้ชนิดอื่นๆ มาแล้วในประเทศไทย เช่น จิ้งโกร่ง (Pradit et al., 2022; Tantrawatpan et al., 2011) และแมลงทับ (Thaen-asa et al., unpublished) ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่จะนำไปสู่การใช้ประโยชน์ ทั้งในด้านการจัดการและอนุรักษ์พันธุกรรมตามแหล่งธรรมชาติให้คงอยู่อย่างยั่งยืน รวมทั้งการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟาร์มได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ด โดยใช้ส่วนของ cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) และ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ร่วมกับการวิเคราะห์เปรียบเทียบสัณฐานภายนอกบางประการ (morphometric measurement) ระหว่างกลุ่มพันธุกรรมที่แตกต่างกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแมลงกระซอนจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆ ในจังหวัดร้อยเอ็ด โดยใช้ยีน CO1 และ 16S rDNA เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรจากพื้นที่ต่างๆ เพื่อการจัดจำแนกกลุ่มและโครงสร้างทางพันธุกรรม รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแมลงกระซอนชนิดต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งทำการศึกษาสัณฐานบางประการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุกรรมที่แตกต่างกัน

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอนจากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดร้อยเอ็ด สามารถจำแนกโครงสร้างทางพันธุกรรมร่วมกับลักษณะสัณฐานบางประการ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรของแมลงกระซอนจากพื้นที่ต่างๆ ในจังหวัดร้อยเอ็ด

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างแมลงกระซอนจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆ ในจังหวัดร้อยเอ็ด โดยทำการเก็บตัวอย่างแหล่งละ 10 ถึง 20 ตัวอย่าง เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) ก่อน และจำแนกกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมออกโดยใช้ข้อมูลของยีน CO1 เมื่อจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของแมลงกระซอนได้แล้ว จะทำสุ่มเลือกกลุ่มประชากรที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มพันธุกรรมนั้น มาทำการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน 16S ribosomal DNA (16S rDNA) ร่วมกับการวิเคราะห์สัณฐานบางประการ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบยืนยันและสนับสนุนการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมด้วยยีน CO1

1.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 การจัดจำแนกและการเรียกชื่อ

แมลงกระซอน (mole cricket) จัดเป็นแมลงที่อยู่ในวงศ์ Gryllotalpidae ระดับ Orthoptera แมลงในกลุ่มนี้มีมากกว่า 70 ชนิด (Tan, 2016) โดยแมลงกระซอนในวงศ์ย่อย (subfamily) Gryllotalpinae ประกอบไปด้วยแมลงกระซอนจำนวน 4 สกุล ได้แก่ สกุล *Triamescaptor* สกุล *Neocurtilla* สกุล *Leptocurtilla* และสกุล *Gryllotalpa* โดยพบความหลากหลายชนิดของแมลงกระซอนในสกุล *Gryllotalpa* ที่กระจายตัวอยู่ในเขตภูมิภาคตะวันออก (Oriental region) จำนวน 26 ชนิด (ตารางที่ 1) ในประเทศไทยมีรายงานการพบแมลงกระซอนเพียงชนิดเดียว คือ *Gryllotalpa orientalis* โดยสามารถแสดงการจัดจำแนกตามหลักเกณฑ์ IBP Taxonomy Hierarchy ได้ดังนี้

Animalia

Arthropoda

Insecta

Orthoptera

Gryllotalpoidea

Gryllotalpidae

Gryllotalpinae

Gryllotalpa

Gryllotalpa orientalis Burmeister, 1838

แมลงกระซอน *G. orientalis* ถูกค้นพบและบรรยายชนิดไว้ครั้งแรกโดย Burmeister เมื่อปี 1838 ดังนั้นการเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงกระซอนชนิดนี้ จะเขียนดังนี้ “*Gryllotalpa orientalis* Burmeister, 1838” และพบการตั้งชื่อใหม่ที่ถูกต้องให้เป็นชื่อพ้อง (synonym) ในภายหลัง คือ “*Gryllotalpa fossor* Scudder, 1869” แต่ *G. orientalis* จะเป็นที่ยอมรับและถูกนำไปใช้มากกว่า โดยชื่อทั่วไป (common name) ภาษาอังกฤษจะเรียกว่า Oriental mole cricket ส่วนชื่อเรียกภาษาไทยจะเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น โดยภาคกลางจะเรียก “แมงกระซอน”

ภาคเหนือเรียก “แมงจอน” และภาคอีสานจะมีคำเรียกที่หลากหลายมากที่สุด เช่น แมงกะซอน แมงซอน แมงจิซอน แมงกิซอน แมงอิซอน เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลความหลากหลายชนิดของแมลงกระซอนสกุล *Gryllotalpa* จำนวน 26 ชนิด ที่พบในเขตภูมิภาคตะวันออก

สกุล/ชนิด	ผู้บรรยาย, ปี	ชื่อพ้อง	พื้นที่พบการกระจาย
<i>G. breviabdominis</i>	Ma & Zhang, 2011	ไม่มี	จีน (Henan)
<i>G. chinensis</i>	Westwood, 1838	ไม่มี	จีน
<i>G. choui</i>	Ma & Zhang, 2010	ไม่มี	จีน (Yunan)
<i>G. cycloptera</i>	Ma & Zhang, 2011	ไม่มี	จีน (Jiangxi, Zhejiang)
<i>G. dentista</i>	Yang, 1995	ไม่มี	ไต้หวัน (Taichung, Taipei)
<i>G. formosana</i>	Shiraki, 1930	ไม่มี	ไต้หวัน (Taipei)
<i>G. fraser</i>	Tan & Kamaruddin, 2013	ไม่มี	มาเลเซีย (Pahang)
<i>G. fulvipes</i>	Saussure, 1877	<i>G. nigripennis</i> Chopard, 1929	มาเลเซีย (Pahang, Perak), Sarawak, Sumatra สิงคโปร์
<i>G. fusca</i>	Chopard, 1950	ไม่มี	ประเทศมาเลเซีย (Pahang, Perak), Sarawak, Sumatra
<i>G. gorkhana</i>	Ingrisch, 2006	<i>G. minuta</i> Ingrisch, 1990	ประเทศเนปาล (Bagmati, Janakpur)
<i>G. gracilis</i>	Chopard, 1930	ไม่มี	เกาะบอร์เนียว (Sarawak)
<i>G. henana</i>	Cai & Niu, 1998	ไม่มี	จีน (Henan)
<i>G. hirsuta</i>	Burmeister, 1838	<i>G. grandis</i> Walker, 1869; <i>G. longipennis</i> (Haan, 1844); <i>G. siamensis</i> Giebel, 1870	เกาะบอร์เนียว ขวา มาเลเซีย สิงคโปร์ สุมาตรา
<i>G. insulana</i>	Chopard, 1954	ไม่มี	Flores
<i>G. jinxiuensis</i>	You & Li, 1990	ไม่มี	จีน (Guangxi)
<i>G. krishnani</i>	Arun Prasanna et al., 2012	ไม่มี	อินเดีย (Tamil Nadu)
<i>G. mabiana</i>	Ma et al., 2008	ไม่มี	จีน (Sichuan)
<i>G. nitens</i>	Ingrisch, 2006	ไม่มี	เนปาล (Bagmati, Karnali, Manang)
<i>G. nymphicus</i>	Tan, 2012	ไม่มี	สิงคโปร์
<i>G. obscura</i>	Chopard, 1966	ไม่มี	เนปาล (Dhankuta)
<i>G. orientalis</i>	Burmeister, 1838	<i>G. africana</i> , <i>G. fossor</i> (Chopard, 1968)	ติมอร์ตะวันออก Flores อินเดีย เมียนมาร์ เนปาล ปากีสถาน มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ สิงคโปร์ ศรีลังกา ไต้หวัน ไทย
<i>G. ornata</i>	Walker, 1869	ไม่มี	อินเดีย (Sikkim, Uttar Pradesh, West Bengal) เนปาล
<i>G. permai</i>	Tan & Kamaruddin, 2016	ไม่มี	มาเลเซีย (Perak)
<i>G. pygmaea</i>	Ingrisch, 1990	ไม่มี	เนปาล (Janakpur)
<i>G. wallance</i>	Tan, 2012	ไม่มี	สิงคโปร์
<i>G. wudangensis</i>	Li, Ma & Xy, 2007	ไม่มี	จีน (Hubei)

(Tan, 2016)

2.2 ลักษณะทางชีววิทยา

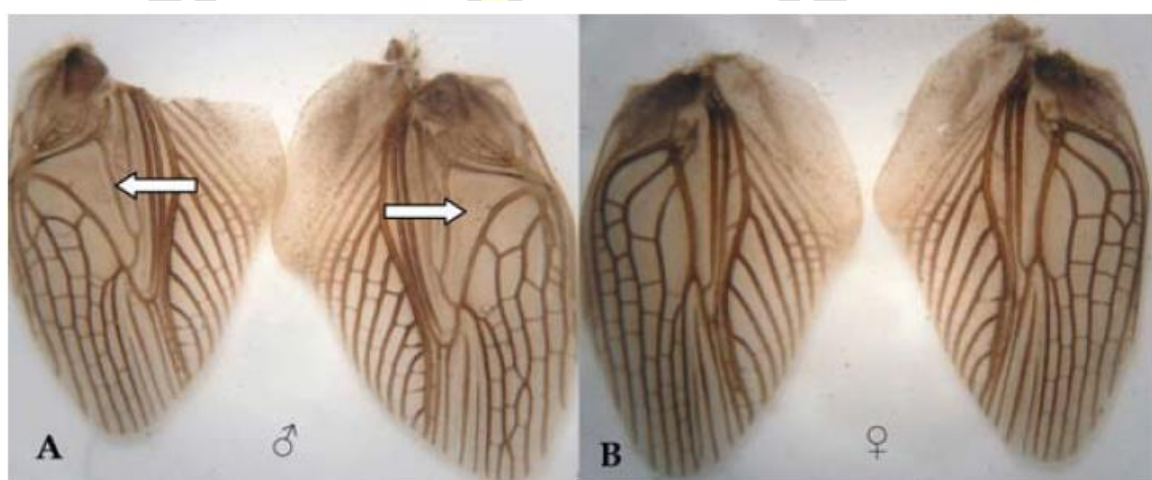
2.2.1 สัณฐานวิทยา

แมลงกระซอนเป็นแมลงขนาดกลาง ตัวเต็มวัยจะมีลักษณะทั่วไปคล้ายกับจิ้งหรีด ลำตัวมีสีน้ำตาล แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว ส่วนอก และ ส่วนท้อง โดยที่ส่วนหัวจะประกอบไปด้วย ตา ปาก และหนวด หนวดจะมีขนาดสั้นเป็นลักษณะแบบเส้นด้าย ปากมีลักษณะเป็นปากกัด ส่วนอกจะประกอบไปด้วยแผ่นหลังเป็นแผ่นกลมแข็ง และขาหน้าขนาดใหญ่แบนคล้ายอุ้งมือและมีหนามแข็งใช้ในการขุดดิน ส่วนลำตัวมีขนปกคลุม ยาวประมาณ 3 ถึง 4 เซนติเมตร ออกกว้างประมาณ 0.8 เซนติเมตร ประกอบไปด้วยปีก มีลักษณะบางใสสองคู่ (ภาพประกอบที่ 1) ตัวเต็มวัยสามารถบินได้ในระยะใกล้ๆ ประมาณ 1 ถึง 2 เมตร ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียมีรูปร่างลักษณะเหมือนกันมาก ในบางชนิดตัวเมียจะมีลักษณะท้องป่องและลำตัวสั้นกว่าตัวผู้เล็กน้อย แต่จะมีบางลักษณะของอวัยวะภายในและภายนอกที่แตกต่างกัน โดย อวัยวะภายในที่แตกต่างกันชัดเจนได้แก่ อวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive organs) อวัยวะภายนอกที่แตกต่างกัน ได้แก่ ตัวเมียจะมีท่อนำไข่ (oviduct) ที่ปลายท้อง แต่ตัวผู้ไม่มี ตัวผู้ท้องยาวเรียว แต่ที่แตกต่างคือเพศผู้สามารถทำเสียงได้เช่นเดียวกับจิ้งหรีดและตั๊กแตน แต่เสียงค่อยกว่ามาก โดยเพศผู้มีอวัยวะในการทำเสียง อยู่ที่ปีกคู่หน้า เป็นตุ่มทำเสียงที่เรียกว่าไฟล์ (file) และสแครปเปอร์ (scraper) และมีพื้นที่เล็กๆ บนแผ่นปีกที่ใช้ในการทำเสียงซึ่งเพศเมียไม่มี



ภาพประกอบที่ 1 แสดงลักษณะรูปร่างภายนอกทั่วไปของแมลงกระซอนสกุล *Gryllotalpa*
(ภาพโดยนายวัชรพงศ์ วังโน)

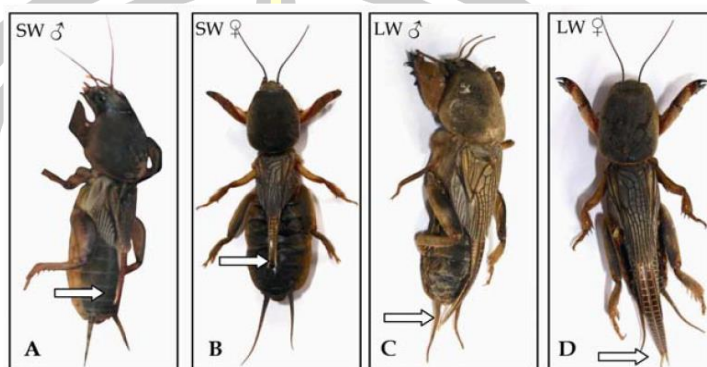
มีรายงานการพบลักษณะลายของปีกคู่หน้าที่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมียในแมลงกระซอนชนิด *G. gryllotalpa* ในแถบภาคตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอิหร่าน และพบความแตกต่างของลักษณะปีกในแต่ละช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกันด้วย (ภาพประกอบที่ 2) และจะพบลักษณะปีกสั้น ในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง กรกฎาคม และจะพบขาชุดมีลักษณะที่สั้นกว่าปกติเพื่อความสะดวกในการขุดรู ส่วนในช่วงหลังจากเดือนกรกฎาคม จะพบมีลักษณะปีกยาว และขาชุดจะยาวขึ้น (รูปที่ 3) เพื่อความสะดวกในการบินหาอาหารและจับคู่ (Kazemi et al., 2013)



ภาพประกอบที่ 2 ลักษณะ forewing ของแมลงกระซอนชนิด *G. gryllotalpa* ที่พบในประเทศอิหร่าน, A = forewing ของเพศผู้, และ B = forewing ของเพศเมีย ลูกศรสีขาวแสดงให้เห็นถึงลักษณะของ harp-shaped cell ในปีกของเพศผู้ (Kazemi et al., 2013)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบประชากรของแมลงกระซอน *G. orientalis* ใน 2 พื้นที่ของประเทศญี่ปุ่น ได้แก่ เกาะ Okinawa และ จังหวัด Hyogo ที่อยู่บนเกาะ Honshu ผลการศึกษาพบว่า ประชากรแมลงกระซอนจาก Okinawa และ Hyogo มีความแตกต่างกันในช่วงเวลาของการพัฒนาปีกเพื่อบินที่แตกต่างกันโดยไม่พบความแตกต่างในลักษณะปีกของเพศผู้และเพศเมียของประชากรแมลงกระซอน *G. orientalis* ที่อยู่ในเกาะ Okinawa ประเทศญี่ปุ่น จะไม่พบลักษณะปีกสั้น (ภาพประกอบที่ 3) พบพฤติกรรมการบินออกจากแหล่งอาศัยของแมลงกระซอนในช่วงเดือน เมษายน ถึง ตุลาคม ในทางกลับกัน พบว่า ประชากรของแมลงกระซอน *G. orientalis* ที่อยู่ในจังหวัด Hyogo ประเทศญี่ปุ่น มีลักษณะปีกของเพศผู้และเพศเมียแตกต่างกันตามช่วงฤดู ปีก

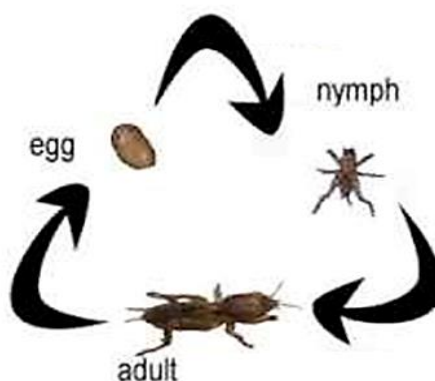
จะเริ่มยาวและสามารถบินได้ในช่วงเดือน มิถุนายน ถึง กันยายน โดยในช่วงเดือน กันยายน ถึง มิถุนายน ปีกจะยังมีลักษณะสั้นและยังบินไม่ได้ (Endo et al., 2011)



ภาพประกอบที่ 3 ลักษณะปีกสั้น (SW) และปีกยาว (LW) A=เพศผู้ปีกสั้น, B=เพศเมียปีกสั้น, C=เพศผู้ปีกยาว, D=เพศเมียปีกยาว (Kazemi et al., 2013)

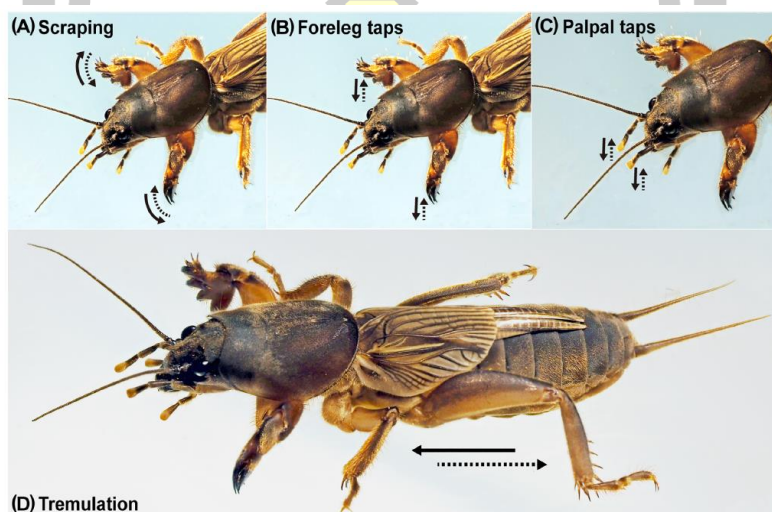
2.2.2 วงจรชีวิตและพฤติกรรมเฉพาะ

แมลงกระซอนมีวงจรชีวิตอยู่ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (nymphs) และระยะตัวเต็มวัย (adult) (ภาพประกอบที่ 4) แมลงกระซอนหนึ่งตัว จะวางไข่ 30 ถึง 50 ฟอง โดยจะวางไว้ในโพรงจนฟักเป็นตัว ไข่แต่ละฟองจะใช้เวลา 25 ถึง 30 วัน ในการฟักเป็นตัวอ่อน (nymph) ตัวอ่อนจะเจริญเติบโตค่อนข้างช้า แมลงกระซอนตัวอ่อนจะใช้เวลานาน 3 ถึง 4 เดือนในการพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัย บางชนิดใช้เวลาถึง 1 ปี โดยช่วงชีวิตเกือบทั้งหมดของแมลงกระซอนจะอาศัยอยู่ใต้ดิน โดยจะออกมาหากินและเล่นไผตอนกลางคืนโดยเฉพาะช่วงเวลาที่พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยที่มีปีกสมบูรณ์ และฤดูผสมพันธุ์ แมลงกระซอนจะออกมาหากินในเวลากลางคืน โดยจะจับกินสัตว์ขนาดเล็กชนิดต่างๆ ที่อยู่ในดินหรือบริเวณผิวดินเป็นอาหาร ระยะตัวอ่อนของแมลงกระซอนจะกัดกินรากและต้นอ่อนของต้นไม้ ทำให้แมลงกระซอนจัดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของเกษตรกร



ภาพประกอบที่ 4 วงจรชีวิตของแมลงกระซอน (<https://opening.download/spring-2021.html>)

Hayashi และคณะ (2018) ได้ศึกษาพฤติกรรมเกี่ยวกับการสั่น (vibration behaviors) ในแมลงกระซอน *G. orientalis* สังเกตพบว่ามีพฤติกรรม 4 แบบ (ภาพประกอบที่ 5) ได้แก่ (A) พฤติกรรมการใช้ขาหน้า (forelegs) ขูดกับพื้น (scraping) ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นพฤติกรรมที่ใช้สำหรับการขุดรู (B) พฤติกรรมการใช้ขาหน้าเคาะกับพื้น (taps) เชื่อว่าเป็นพฤติกรรมในการส่งสัญญาณเตือนผู้บุกรุกไม่ให้เข้าใกล้ (C) พฤติกรรมการใช้ส่วน palpal เคาะกับพื้น ซึ่งยังไม่ทราบเหตุผลที่ชัดเจนของพฤติกรรมนี้ (D) และพฤติกรรมการใช้ส่วนท้องของลำตัวถูกลงไปมาบนพื้น (tremulation) สันนิษฐานว่าเป็นพฤติกรรมที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตัว



ภาพประกอบที่ 5 พฤติกรรมที่พบในแมลงกระซอนชนิด *G. orientalis* (Hayashi et al., 2018)

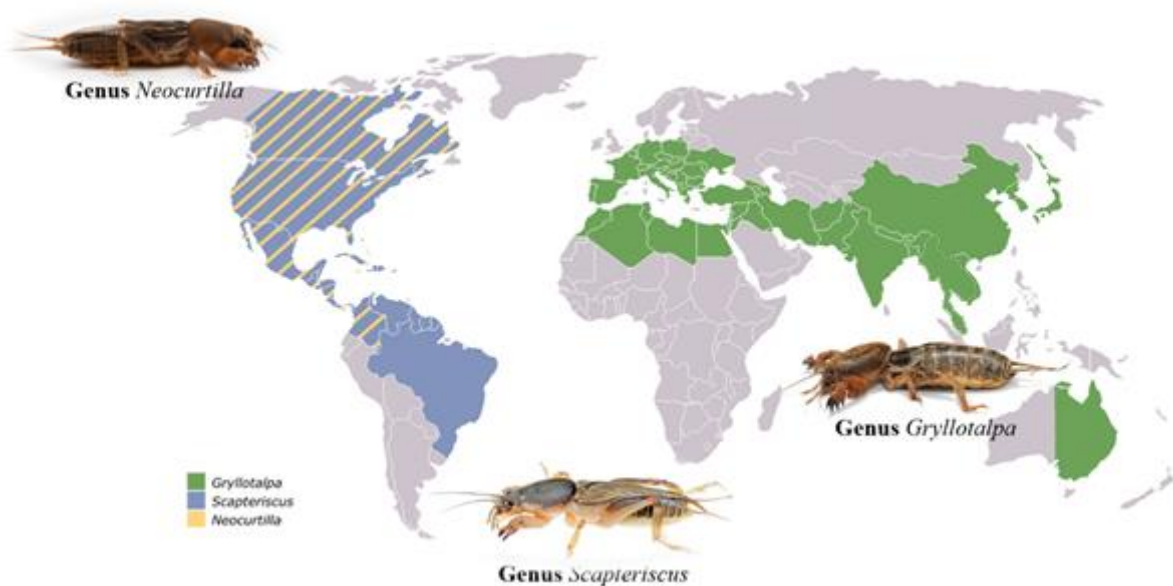
2.3 การกระจายตัวและแหล่งอาศัย

พบการกระจายของแมลงกระซอนอยู่ทั่วโลก ทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน (ภาพประกอบที่ 6) แมลงกระซอนชนิด *G. orientalis* พบกระจายอยู่ในประเทศเกาหลี จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ รวมทั้ง ฮาวาย ในฮาวาย พบเป็นการนำเข้าแมลงกระซอนตั้งแต่ปี ค.ศ. 1896 จากทวีปเอเชีย แต่จำแนกผิดเป็น *G. africana* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มาจากทวีปแอฟริกา ยิ่งไปกว่านั้น แมลงกระซอนในทวีปเอเชีย เช่น ประเทศเกาหลี ยังมีการจำแนกผิดเป็นชนิด *G. africana* ซึ่งแท้ที่จริงแล้วแมลงกระซอนที่กระจายในทวีปเอเชียเป็นชนิด *G. orientalis*

ส่วนใหญ่แมลงกระซอนจะอาศัยอยู่ในโพรงใต้ดิน โดยขุดรูจากรังนอนไปในหลายทิศทาง แมลงกระซอนจะชอบขุดโพรงใต้ดินบริเวณรอบๆ แหล่งน้ำ ริมหนองน้ำ ริมห้วย ริมบึง รังเป็นโพรงเท่าๆ ไล่ลึกลงไป 5 ถึง 10 เซนติเมตร มีรายงานการศึกษาพฤติกรรมการขุดและสร้างโพรงของแมลงกระซอน

ชนิด *G. orientalis* ที่อยู่ใต้ดิน ในสภาวะสิ่งแวดล้อมและฤดูกาลที่แตกต่าง พบว่าลักษณะการสร้างโพรงแบบธรรมดา (simple tunnel) ไปจนถึงแบบซับซ้อน ที่มีการแตกแขนงของโพรงที่หลากหลาย ชนิดของโพรงแบ่งคร่าวๆ ได้ 2 แบบ ได้แก่ โพรงต้นขนานกับพื้นไปในแนวนอน (horizontal) และโพรงลึกลงไปแนวตั้ง (vertical) โพรงทั้งสองชนิด จะถูกใช้ในการหาอาหาร โดยโพรงชนิด vertical จะใช้หาอาหารที่เป็นลำต้นหรือรากใต้ดิน ส่วนโพรงชนิด horizontal จะใช้ในการหาอาหารที่เป็นพืชเลื้อยตามผิวดิน นอกจากนี้โพรงชนิด vertical ยังถูกใช้ในการซ่อนตัวจากผู้ล่า พักผ่อน และจำศีล ในช่วงฤดูหนาว ส่วนโพรงชนิด horizontal จะถูกใช้เป็นช่องทางในการหลบหนีผู้ล่า และผสมพันธุ์ รางไข่จะถูกสร้างขึ้นข้างๆ โพรงชนิด horizontal และจะรวมเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างโพรงชนิด horizontal และเมื่อมีตัวอ่อนเกิดขึ้น ก็สร้างโพรงต่อเนื่องกันออกไปเป็นโครงข่าย (Endo, 2007, 2008)



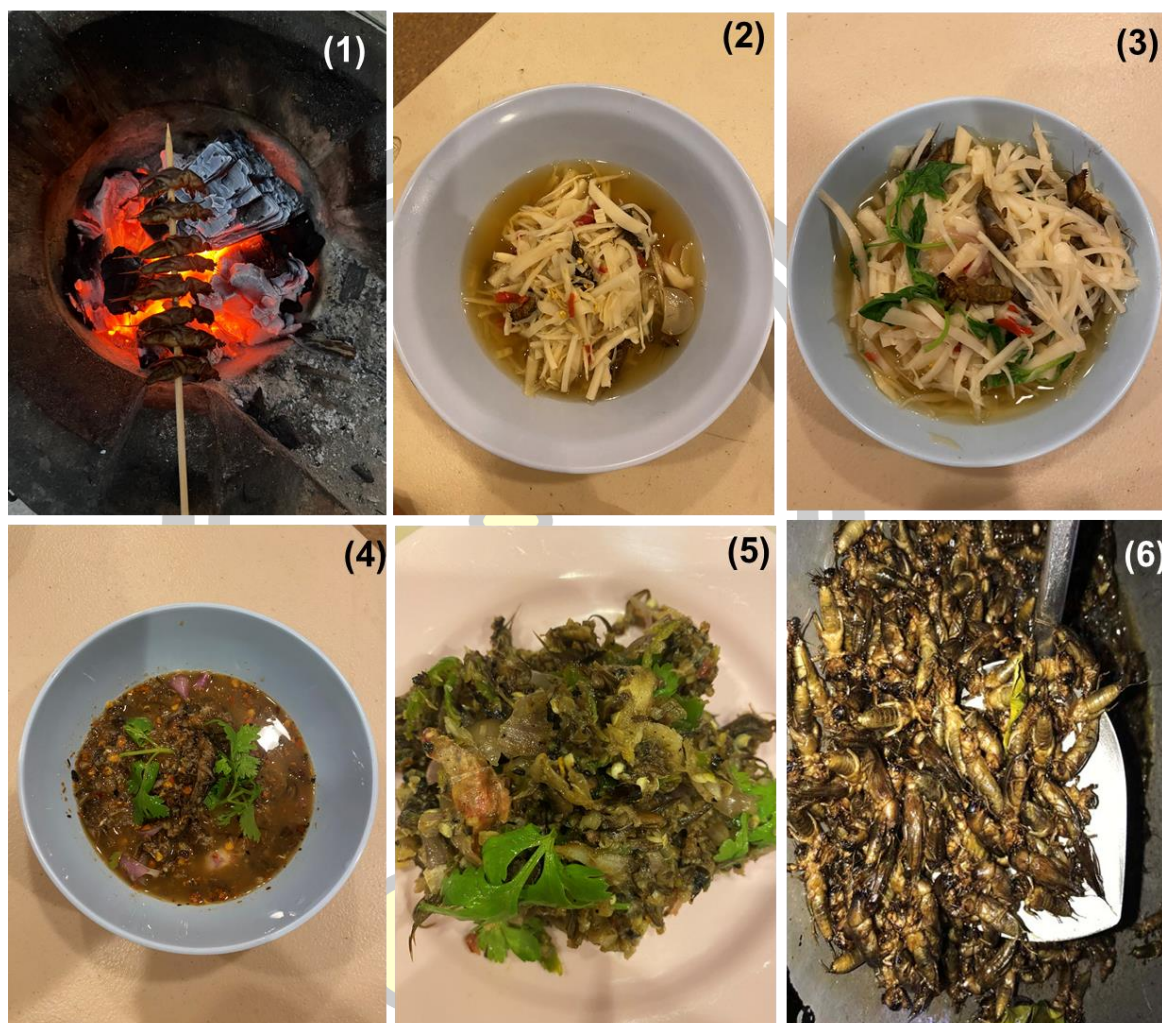


ภาพประกอบที่ 6 แสดงพื้นที่การกระจายของแมลงกระซอน 3 สกุล ได้แก่ สกุล *Gryllotalpa* สกุล *Scapteriscus* และสกุล *Neocurtilla* (File:Gryllotalpidae-Verbreitung.Png - Wikimedia Commons, n.d.)

2.4 ภูมิปัญญาและการใช้ประโยชน์แมลงกระซอน

แมลงกระซอนสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลากหลายเมนู โดยใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่นในการปรุง เมื่อจับแมลงกระซอนได้แล้ว ชาวบ้านนิยมนำมาเตรียมล้างทำความสะอาดและขังน้ำไว้ข้ามคืน เพื่อให้แมลงกระซอนขับถ่ายของเสียออกจากลำไส้ให้หมดเสียก่อน แล้วค่อยนำไปปรุงเป็นอาหาร ตัวอย่างเมนูอาหารที่นิยมนำแมลงกระซอนมาใช้ในการปรุง ได้แก่ จี่ คั่ว ปน ก้อย แกงใส่หน่อไม้สด แกงใส่หน่อไม้ดอง รวมทั้งสามารถตำเป็นน้ำพริกแมลงกระซอน (ภาพประกอบที่ 7) ส่วนใหญ่เป็นเมนูอาหารของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

พูน ปณ ฑิต ชีเว



ภาพประกอบที่ 7 เมนูอาหารที่ปรุงโดยใช้แมลงกระซอน (1) จี่แมลงกระซอน (2) แกงแมลงกระซอน ใส่หน่อไม้สด (3) แกงแมลงกระซอนใส่หน่อไม้ดอง (4) ปั่นแมลงกระซอน (5) น้ำพริกแมลงกระซอน (6) แมลงกระซอนคั่วหรือทอด (ภาพโดย นายวัชรพงศ์ วังโน)

2.5 ประโยชน์และโทษของแมลงกระซอน

2.5.1 ประโยชน์ของแมลงกระซอน

เนื่องจาก Food and Agricultural Organization (FAO) มีการรณรงค์ให้ประชากรทั่วโลกหันมาบริโภคแมลงเป็นอาหารและแหล่งโปรตีน แมลงกระซอนจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่จะถูกผลักดันให้เป็นอาหารของคนทั่วโลก เนื่องจากมีการกระจายและสามารถพบได้ทั่วโลก อย่างไรก็ตาม ในบางพื้นที่ ได้ใช้ประโยชน์จากแมลงกระซอนตั้งแต่อดีตต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน โดยในประเทศไทย

โดยเฉพาะภาคอีสาน ได้นำแมลงกระซอนมาประกอบเป็นอาหารได้หลากหลายเมนู รวมทั้งนำมาเป็นเหยื่อตกปลาได้ด้วย หรือนำไปเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ปีกเช่น นก เป็ด ไก่ ก็ได้เช่นกัน เนื่องจากแมลงกระซอนเป็นที่นิยมนำมาบริโภคในหลายพื้นที่ของประเทศไทย จึงถือว่าแมลงกระซอนเป็นแมลงเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่สร้างรายได้ให้กับชุมชน จะเห็นได้ว่า มีการจับแมลงกระซอนด้วยหลากหลายวิธีเพื่อนำไปขาย ปัจจุบัน แมลงกระซอนตัวสดอาจมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 100 ถึง 200 บาท และในบางพื้นที่ของประเทศไทย มีการค้าขายแมลงกระซอนเพื่อเป็นอาหารของนกสวยงามที่เลี้ยงขังกรง ซึ่งนกเหล่านี้ถือเป็นสัตว์คุ้มครอง หากรัฐบาลประกาศห้ามเลี้ยงนกชนิดนี้ จะส่งผลกระทบต่อรายได้หลักของชนเผ่าที่จับแมลงกระซอนขายเพื่อเป็นอาหารนกเหล่านี้อย่างมีนัยสำคัญ (Dai & Ding, 2022) ยิ่งไปกว่านั้น นอกจากนี้ยังมีการนำแมลงกระซอนไปแปรรูปเพื่อส่งเป็นผลิตภัณฑ์ส่งออก โดยองค์การสหประชาชาติ (UN) ประกาศให้แมลงเป็น superfood หรืออาหารที่มีประโยชน์และมีสารอาหารสูง จึงทำให้แมลงได้รับความสนใจในต่างประเทศ ทำให้มีการแปรรูปแมลงเพื่อเป็นส่วนผสมในหลายอย่าง เช่น ทำเป็นผงผสมใน ยา แบ่งขนมปัง ขนมขบเคี้ยว ใช้เป็นโปรตีนในการปรุงอาหาร ไอศกรีม เป็นต้น

นอกจากแมลงกระซอนสามารถนำมารับประทานเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาสูงได้แล้ว แมลงกระซอนถือเป็นสัตว์หน้าดินที่ช่วยในการพรวนดินให้ร่วนซุย ปรับสภาพดินให้มีคุณภาพดีขึ้น ซึ่งมีรายงานการวิจัยการนำแมลงกระซอนไปช่วยย่อยสลายเศษตะกอนน้ำทิ้งให้มีคุณภาพในการนำไปใช้มากขึ้น โดยไม่ต้องใช้สารเคมีในการบำบัด (Ozdemir et al., 2019) นอกจากนี้แมลงกระซอนยังเป็นอาหารของสัตว์หลายๆ ชนิด ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย ชาวบ้านจึงนิยมนำแมลงกระซอนไปเป็นเหยื่อตกปลา นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบประโยชน์อย่างอื่นของแมลงกระซอน โดยสารสกัดจากแมลงกระซอน *G. orientalis* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (cox2) ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (anti-oxidant) และยับยั้งการเกิดการอักเสบ (anti-inflammation) ในมนุษย์ได้ (Heo et al., 2008) นอกจากนี้แมลงกระซอนยังมีส่วนของไคตินที่เป็นเปลือกปกคลุมร่างกายที่มีประโยชน์ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลและไขมันได้ (Ravi Kumar, 2000) รวมทั้งด้านการติดเชื้อจากยีสต์ในระบบทางเดินอาหารอีกด้วย (Koide, 1998)

2.5.2 ผลเสียที่เกิดจากแมลงกระซอน

นอกจากประโยชน์แล้ว แมลงกระซอนยังถูกจัดเป็นแมลงศัตรูที่อันตรายสำหรับเกษตรกรในหลายประเทศ ปัจจุบันในประเทศไทย แมลงกระซอน *G. orientalis* เป็นชนิดหลักที่ทำลายพืชผักของเกษตรกร (Jeong, 1994) นอกจากนี้ แมลงกระซอนชนิด *G. orientalis* ยังเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของมะเขือเทศในประเทศอินโดนีเซีย โดยแมลงกระซอนจะกัดกินลำต้นหรือรากของ

ต้นมะเขือเทศ และทำให้ต้นมะเขือเทศตายในที่สุด จึงทำให้บางพื้นที่มีวิธีการกำจัดแมลงกระซอน เพื่อป้องกันผลผลิตทางการเกษตรของเกษตรกร ดังเช่น ในสหรัฐอเมริกา แมลงกระซอนถือเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชที่ปลูกในบ้านเรือนและทำลายสนามหญ้า จึงมีการควบคุมโดยใช้ทั้งสารเคมีและใช้การควบคุมโดยธรรมชาติ แต่การใช้สารเคมีจะส่งผลกระทบต่อสัตว์หน้าดินอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร เช่น ไส้เดือน ดังนั้นจึงมีการศึกษาการควบคุมแมลงกระซอนโดยใช้ตัวต่อ *Larra wasp* ในการเข้าโจมตีและวางไข่เพื่อฟักตัวอ่อนในตัวของแมลงกระซอน ทำให้แมลงกระซอนตายและลดจำนวนลง (Arévalo & Frank, 2005; Portman et al., 2009) หรือการใช้เชื้อแบคทีเรียในการควบคุมและกำจัดแมลงกระซอนในทวีปอเมริกา (Sezen et al., 2013) นอกจากนี้ในบางพื้นที่ของประเทศไทยยังเชื่อว่า เมื่อแมลงกระซอนบินเข้าไปในบ้านนั้นจะเข้าไปกัดทำลายเสื้อผ้าที่แขวนไว้ในตู้ รวมทั้งเป็นศัตรูพืชบางชนิด โดยแมลงกระซอนเป็นศัตรูสำคัญของต้นอ่อนดาวเรืองและต้นอ่อนของพืชหลายชนิด เช่น มะละกอ พริก แตงกวา

ยิ่งไปกว่านั้น การกินแมลงกระซอนในปริมาณมากเกินไป อาจส่งผลทำให้ร่างกายได้สารอาหารพลังงาน ไขมันและคอเลสเตอรอลเกินกว่าที่ร่างกายต้องการ และทำให้เกิดภาวะอ้วนติดตามมาได้ นอกจากนี้ การกินแมลงในปริมาณมากและบ่อยครั้งไม่ละเลียด จะทำให้เกิดการระคายเคืองบริเวณโคนลิ้นเนื่องจากสารโคตินจากเปลือกแมลงอีกด้วย พ่อค้าบางรายทำการทอดแมลงในน้ำมันที่ใช้ซ้ำๆ กัน น้ำมันที่ผ่านการใช้มาแล้วหลายๆ ครั้งจะเป็นอันตรายต่อร่างกายเพราะมีสารก่อมะเร็งปะปนอยู่ ซึ่งในส่วนนี้ผู้ซื้ออาจจะตรวจสอบหรือสังเกตได้ยาก จึงควรหลีกเลี่ยงการกินแมลงปริมาณมากๆ กรณีที่ติดใจรสชาติจริง อาจจะต้องปรุงเองในครอบครัวเพื่อลดความเสี่ยงที่จะได้รับสารก่อมะเร็งดังกล่าว

แม้ว่าสารโคตินจากเปลือกแมลงมีประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด แต่ในทางตรงกันข้าม โคตินและโคโทซานอาจจะก่อให้เกิดผลลบต่อร่างกายได้ เพราะกระบวนการจับตัวของไขมัน โคโทซานจะสร้างสารที่มีลักษณะเป็นวุ้น ซึ่งวุ้นดังกล่าวจะไปรบกวนการดูดซึมของวิตามินที่ละลายในไขมัน โดยเฉพาะวิตามินเอ วิตามินดี และวิตามินอี และเกลือแร่ ซึ่งในระยะยาวจะก่อให้เกิดความบกพร่องของการดูดซึมแคลเซียมได้ และถ้ามีความบกพร่องของการดูดซึมวิตามินดีควบคู่ไปด้วย ก็จะส่งผลต่อความแข็งแรงของกระดูกด้วย กรณีเช่นนี้จะเป็นอันตรายอย่างยิ่งถ้าเกิดขึ้นกับสตรีที่ตั้งครรภ์ (Ravi Kumar, 2000) นอกจากนี้ การกินแมลงอาจจะมีอันตรายจากการปนเปื้อนสารพิษฆ่าแมลงหรือสารเคมีที่เกษตรกรใช้ในการกำจัดศัตรูพืช (Kanthawongwan et al., 2019; Labu et al., 2022) รวมทั้งการติดเชื้อโรคโดยบังเอิญทั้ง

แบคทีเรียและพยาธิที่อยู่ในแมลง หรือเกิดอาการแพ้สารบางอย่างในแมลงที่รับประทานเข้าไปได้เช่นกัน (Belluco et al., 2015)

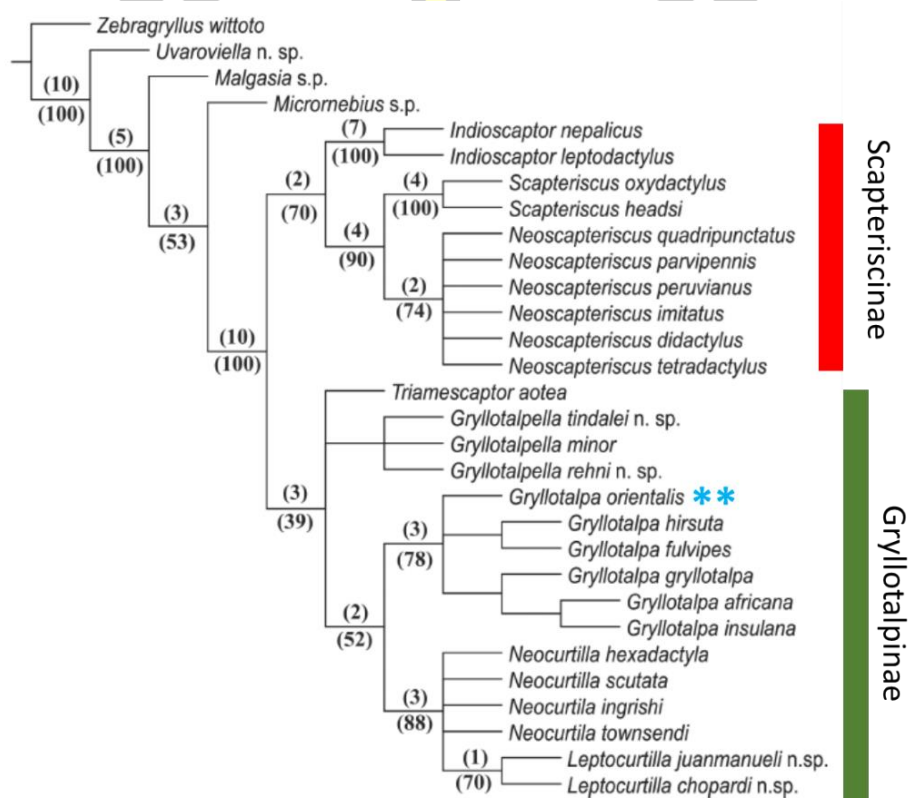
2.6 ข้อมูลทางพันธุกรรม

2.6.1 ซิสเทมาติกส์

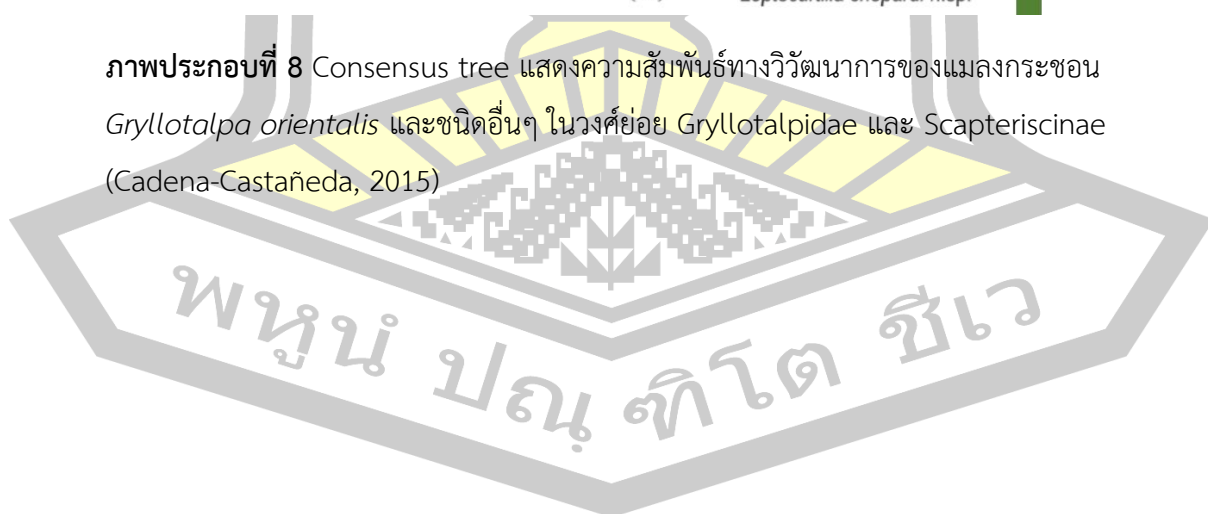
จากการค้นข้อมูลรายงานการศึกษาวិวัฒนาการของแมลงกระซอนชนิด *G. orientalis* นั้นพบว่ามีข้อมูลรายงานการศึกษาย่อยอย่างจำกัด โดยมีรายงานการศึกษความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงกระซอนทั้งหมดที่พบทั่วโลก เปรียบเทียบโดยใช้ลักษณะสัณฐานภายนอกบางประการ จำนวน 89 ลักษณะ เพื่อการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยจะดูลักษณะที่มีร่วมกันหรือแตกต่างกัน มาใช้กำหนดความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของแมลงกระซอนในวงศ์ Gryllotalpidae ทั้งหมด 26 ชนิด 6 สกุล ใน 2 subfamilies ได้แก่ Scapteriscinae และ Gryllotalpinae (Cadena-Castañeda, 2015) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า มีการจำแนกแมลงกระซอนออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ โดยแยกตาม subfamily (ภาพประกอบที่ 8) กลุ่มแรก จัดเป็น monophyletic group ของ subfamily Scapteriscinae เป็นกลุ่มที่มีลักษณะสัณฐานร่วมกันอยู่ 8 ลักษณะ โดยกลุ่ม monophyletic นี้ประกอบด้วย 3 กลุ่มสัมพันธ์ย่อย (clade) แบ่งแยกตาม genus ได้แก่ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบไปด้วย *Indioscaptor neplalicus* และ *I. leptodactylus* กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย *Scapteriscus oxydactylus* และ *S. headsii* และกลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วย *Neoscapteriscus quadripunctatus*, *N. parvipennis*, *N. peruvianus*, *N. imitates*, *N. didactylus* และ *N. tetradactylus* โดยกลุ่มย่อยที่ 2 และ 3 จะมีความใกล้ชิดกันมากกว่ากลุ่มย่อยที่ 1 (ภาพประกอบที่ 8)

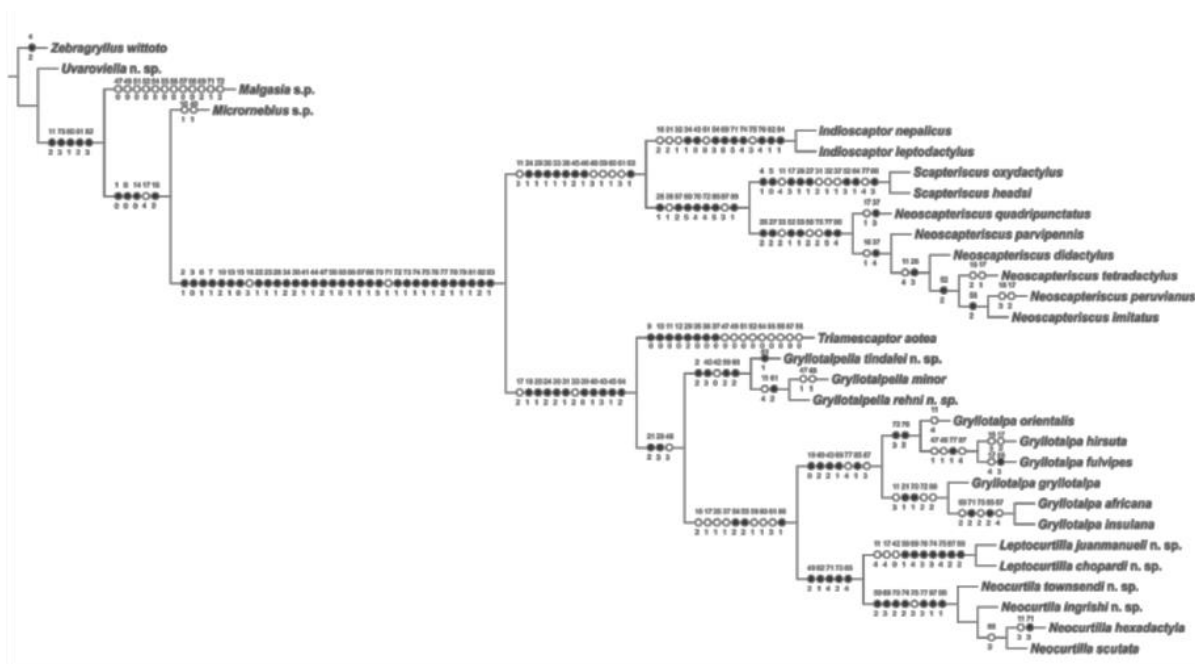
กลุ่มที่สอง จัดเป็น monophyletic group ของ subfamily Gryllotalpinae เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายมากที่สุดของวงศ์ Gryllotalpidae กลุ่มนี้มีลักษณะสัณฐานร่วมกันอยู่ 10 ลักษณะ และแยกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย (clades) ได้แก่ กลุ่มย่อยแรก คือ Triamescaptorini n. trib. มีลักษณะจำเพาะอยู่ 8 ลักษณะ และลักษณะร่วมกันกลุ่มอื่นอีก 9 ลักษณะ ซึ่งลักษณะจำเพาะที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจนคือ non-movable dactyls และพบกระจายอยู่เฉพาะในประเทศนิวซีแลนด์เท่านั้น ส่วนกลุ่มย่อย ที่ 2 ได้แก่ Gryllotalpellini n. trib. จำแนกออกจากกลุ่มอื่นด้วย 4 ลักษณะ ได้แก่ (1) cylindrical and very elongated body, (2) femoral process triangular shaped, (3) wing venation in a single homoplasy, และ (4) dorsal margin of the hind

tibia with not spines และ กลุ่มย่อยที่ 3 ได้แก่ (*Neocurtilla* + *Leptocurtilla* n. gen.) (*Gryllotalpa*) เป็นเป็นกลุ่มที่มีลักษณะร่วมกัน 3 ลักษณะ และแมลงกระซอนชนิด *G. orientalis* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ (ภาพประกอบที่ 9)



ภาพประกอบที่ 8 Consensus tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงกระซอน *Gryllotalpa orientalis* และชนิดอื่นๆ ในวงศ์ย่อย Gryllotalpidae และ Scapteriscinae (Cadena-Castañeda, 2015)





ภาพประกอบที่ 9 แสดงการจัดกลุ่มโดยมีลักษณะเฉพาะ (จุดสีดำ) และลักษณะที่พบร่วม (จุดสีขาว) เปรียบเทียบระหว่าง phyletic group, clade และ taxon ของแมลงกระซอน *Gryllotalpa orientalis* และชนิดอื่นๆ รวมทั้งสิ้น 26 ชนิด (Cadena-Castañeda, 2015)

2.6.2 จีโนมในไมโทคอนเดรีย

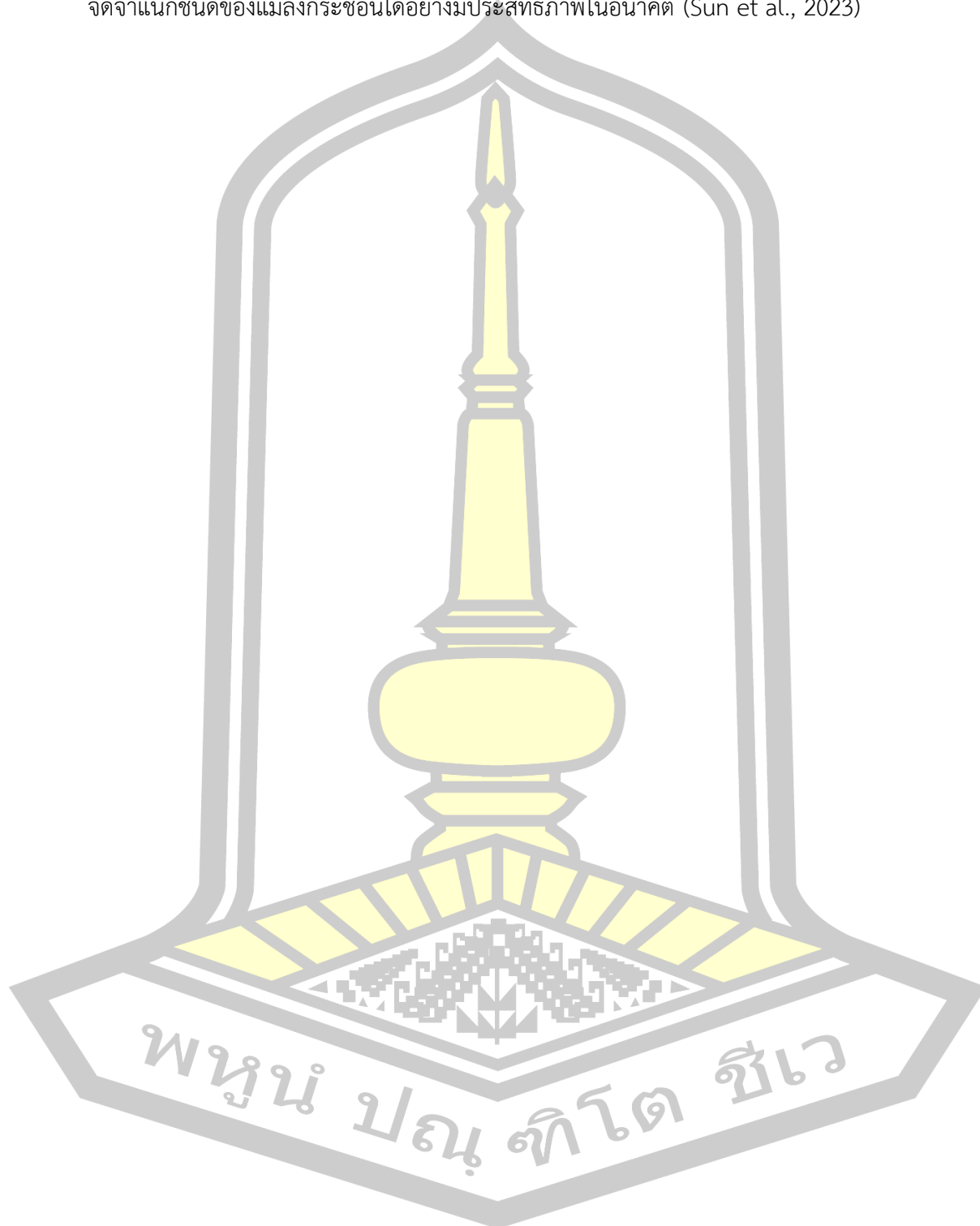
พบรายงานการศึกษาจีโนมในไมโทคอนเดรีย (mitogenome) ของแมลงกระซอน *G. orientalis* จากประเทศเกาหลีใต้ พบมีขนาด 15,521 คู่เบส (ภาพประกอบที่ 10) อัตราส่วนของเบส A และ T ต่ำที่สุด (70.5%) เมื่อเปรียบเทียบกับแมลงชนิดอื่นๆ จูตรหัสเริ่มต้น (start codon) ของยีน CO1 และ NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) คือ ATG และ GTG ตามลำดับ ซึ่งจะพบลักษณะของ start codon แบบนี้ในแมลงชนิดอื่นค่อนข้างน้อย โดยมีการเรียงลำดับของยีนสลับกับ tRNAs เหมือนกับแมลงหวี่ *Drosophila yakuba* และ *Locusta migratoria* ดังแสดงในภาพประกอบที่ 10 เมื่อนำข้อมูล mitogenome ของแมลงกระซอน *G. orientalis* ไปสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับข้อมูล mitogenome ของแมลงชนิดอื่นๆ พบการจัดกลุ่มออกเป็นไปตามการจำแนกกลุ่ม Diptera กลุ่ม Lepidoptera กลุ่ม Coleoptera กลุ่ม Mecopterida (Diptera + Lepidoptera) และกลุ่ม Endopterygota (Diptera + Lepidoptera + Coleoptera) แสดงให้เห็นว่า ข้อมูลของ mitogenome สามารถใช้ในการจัดกลุ่มของแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kim et al., 2005)

ก่อน จำเป็นต้องทำการวิจัยเชิงลึกทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา นิเวศวิทยา และพันธุกรรม ต่อไปในอนาคต ดังนั้น ยีนไมโทคอนเดรีย ทั้ง CO1 และ 16S rDNA จึงเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมในการนำไปใช้วิเคราะห์ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงในกลุ่ม Orthoptera รวมทั้งแมลงกระซอน *G. orientalis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

2.6.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการทบทวนวรรณกรรม พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอนทั่วโลกอยู่น้อยมาก โดยมีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอนในสกุล *Gryllotalpa* ได้แก่ *G. gryllotalpa*, *G. africana*, *G. tali* และ *G. marismortui* โดยใช้ allozyme จำนวน 21 loci เป็นเครื่องหมายโมเลกุล พบว่าแมลงกระซอนกลุ่มนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่พบการเกิดพันธุกรรมแบบผสม (heterozygosity) ในอัตราที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งให้เห็นว่า ประชากรของแมลงกระซอนเหล่านี้ไม่เป็นไปตามสมดุลของ Hardy-Weinberg (Nevo et al., 2000) และมีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอนชนิด *G. orientalis* จากประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ยีน CO1 เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ ผลการศึกษาพบการแปรผันทางพันธุกรรมต่ำ สามารถแบ่งลักษณะพันธุกรรมออกได้เป็นสอง haplotypes คือ GC01 และ GC02 โดยทั้งสอง haplotypes มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 11% ซึ่ง haplotype ชนิด GC01 ประกอบไปด้วย ประชากรแมลงกระซอน *G. orientalis* จาก Busan, Okchon, Wonju, Gangneung และ Suwon ส่วน haplotype ชนิด GC02 จะพบเฉพาะประชากรแมลงกระซอน *G. orientalis* จาก Suwon จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ประชากรแมลงกระซอน *G. orientalis* ในประเทศเกาหลีใต้ แบ่งออกเป็นสองกลุ่มพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยประชากรจากแหล่ง Suwon แบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มพันธุกรรม ซึ่งสัมพันธ์กับพื้นที่ของ Suwon ที่มีระบบนิเวศที่แตกต่างกัน 2 แบบ (Kim et al., 2007a.) หลังจากนั้น (Kim et al., 2007b) ได้ใช้ข้อมูลจีโนมของไมโทคอนเดรียเปรียบเทียบระหว่าง *G. orientalis* ทั้งสอง haplotypes ก็สามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมออกเป็นสองกลุ่มที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน สนับสนุนรายงานการศึกษาของ Kim et al. (2007a) ปัจจุบันเทคโนโลยีการศึกษาระดับจีโนมได้ถูกพัฒนาและนำมาใช้ในการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด รวมทั้งแมลงกระซอน *G. orientalis* พบรายงานการศึกษาลักษณะและขนาดของจีโนมโดยใช้เทคนิค flow cytometry และ k-mer พบว่า haploid จีโนมมีขนาดประมาณ 3.14 Gb และ 3.17–3.77 Gb โดยเทคนิค flow cytometry และ k-mer ตามลำดับ และพบว่าในจีโนมของ *G. orientalis* มี repetitive elements เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง

56% ซึ่งเทคนิคเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดจำแนกชนิดของแมลงกระซอนได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต (Sun et al., 2023)



บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วิธีเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างแมลงกระซอนจากพื้นที่ต่างๆ จำนวน 14 แหล่ง ในจังหวัดร้อยเอ็ด (ตารางที่ 2) ทำการล่อจับแมลงกระซอนในเวลากลางคืนด้วยวิธีการเปิดไฟสำหรับล่อแมลง (black light) และเปิดเสียงแมลงกระซอนจากอินเทอร์เน็ต โดยใช้ลำโพงขยายเสียง หรือในเวลากลางวันจะใช้วิธีการค้นหาแมลงกระซอนที่ทำรังอยู่บริเวณดินโคลนที่อยู่ข้างๆ แหล่งน้ำ โดยใช้จอบหรือเสียมขุดหาเพื่อให้แมลงกระซอนไต่ขึ้นมา ซึ่งจะสามารถใช้มือเปล่าจับแมลงกระซอนได้เลย เมื่อได้ตัวอย่างแมลงกระซอนแล้ว จะทำการล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ถึง 3 รอบ ทำให้สลบด้วยความความเย็น (0 ถึง 4 องศาเซลเซียส) แล้วเก็บใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง เติม 80% alcohol เพื่อรักษาสภาพลักษณะสัณฐานภายนอกและดีเอ็นเอให้คงสภาพอยู่อย่างสมบูรณ์มากที่สุด นำกลับมาหยั่งห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อทำการศึกษาวិเคราะห์เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานและพันธุกรรมต่อไป

ตารางที่ 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ด

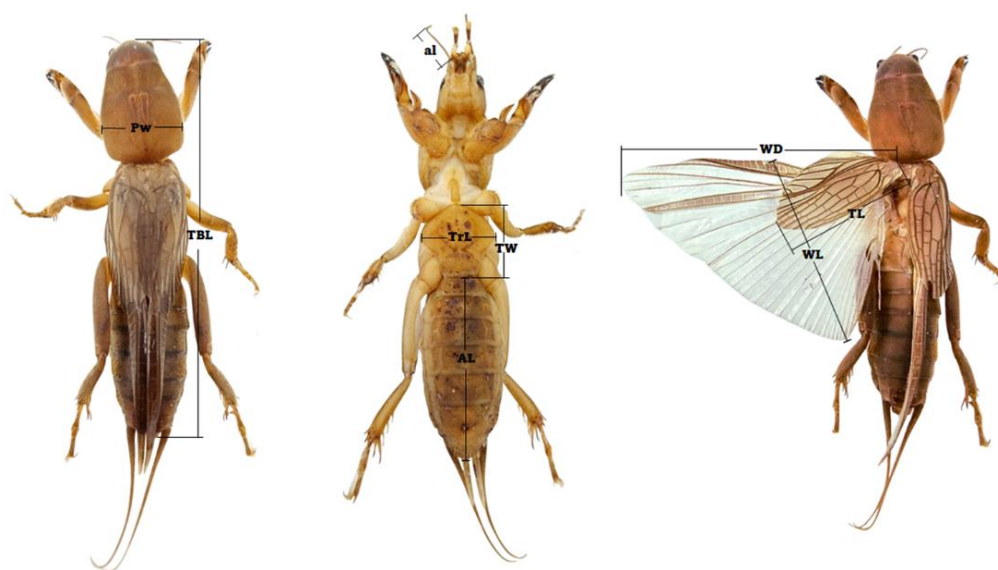
ลำดับที่	สัญลักษณ์	อำเภอ	พิกัด latitude, longitude	จำนวนตัวอย่าง
1	AS	อาจสามารถ	15.863654, 103.865170	16
2	JH	จังหาร	16.156793, 103.611769	20
3	JP	จตุรพักตรพิมาน	15.847237, 103.575358	19
4	KS	เกษตรวิสัย	15.740103, 103.565370	19
5	NP	หนองพอก	16.325670, 104.241017	20
6	MU	เมืองร้อยเอ็ด	15.985869, 103.590076	19
7	MD	เมยวดี	16.386208, 104.095767	20
8	PP	พนมไพร	15.651536, 104.125871	20
9	PT	โพนทอง	16.332934, 103.990648	20
10	PR	ปทุมรัตน์	15.655221, 103.356952	20
11	PS	โพนทราย	15.484762, 104.000455	20
12	SP	เสลภูมิ	16.135077, 104.017354	19
13	SD	ศรีสมเด็จ	16.132178, 103.495159	19
14	SW	สุวรรณภูมิ	15.648837, 103.852286	20
รวม				271

3.2 การจำแนกชนิดและสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างแมลงกระซอนที่เก็บมาได้ จะทำการจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานบางประการ ตามคำอธิบายของ Tan (2016) ซึ่งจะมี key ในการจำแนกชนิดของ *G. orientalis* ดังนี้

1. Body length greater than 30 mm. Transverse sclerite generally L-shaped (one apical branch distinctly longer) (Fig. 3). 2
- Body length less than 30 mm. Transverse sclerite T- (Fig. 4) (apical branches are of about same length) or L-shaped 6
2. Body length less than 35 mm. Male hindwings rudimentary or surpass tegmina 3
- Body length more than 35 mm. Body brown or red brown. Male hindwings rudimentary (Fig. 2). 4
3. Discoidal cell (or harp) of tegmen more slender (Fig. 5). Hindwings fully developed, surpassing tegmina and reaching abdominal apex *G. orientalis*
- Discoidal cell (or harp) of tegmen more stout (Fig. 6). Hindwings abbreviated, not surpassing tegmina *G. wallace*
4. Median prolongation of genitalia narrow or constricted basally (Fig. 7). *G. hirsuta*
- Median prolongation of genitalia medium to broad (Fig. 8 or 9) 4
5. Anterior trochanter with process wider. TL = 12.2 mm. Right stridulatory file 3.5 mm long, with about 37 teeth. Internal prolongation (Ip) pointing antero-dorsally, with apex subacute (Fig. 8). *G. nymphicus*
- Anterior trochanter with process narrower. TL = 17.1 mm. Right stridulatory file 5.1 mm long, with about 32 teeth. Internal prolongation (Ip) barely visible, with apex broadly rounded (Fig. 9). *G. fraser*
6. Limbs orange, abdomen black. 7
- Limbs brown, similar to abdomen. 8
7. Head and pronotum orange. Right stridulatory file with about 45 teeth. Transverse sclerite L-shaped (Fig. 3). Internal prolongation (Ip) pointing with apex acute (Fig. 3) *G. permai*
- Head and pronotum black. Right stridulatory file with about 30 teeth. Transverse sclerite almost T-shaped (Fig. 10). Internal prolongation (Ip) pointing with apex blunt (Fig. 10) *G. fulvipes*

หลังจากทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมโดยใช้ส่วนของยีน CO1 และ 16S rDNA เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ทำให้ทราบข้อมูลการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของแมลงกระซอนที่ศึกษาในครั้งนี้ หลังจากนั้น จะทำการสุ่มเลือกตัวอย่างจากแต่ละประชากรให้ครอบคลุมทุกกลุ่มพันธุกรรมที่ถูกจัดจำแนก เพื่อทำการวัดขนาดและสัดส่วนของลักษณะภายนอกบางประการของแมลงกระซอน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยใช้ vernier caliper ในการวัดสัดส่วนต่างๆ ทั้งหมด 8 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวหนวด (AL = antenna length), ความยาวลำตัว (TBL = total body length), ความกว้างอก (PW = pronotum width), ความยาวช่องอก (TrL = Thorax length), ความกว้างช่องอก (TW = Thorax width), ความยาวของปีกคู่หน้า (TL = tegmen length), ความยาวของปีกคู่หลัง (WL = wing length), ความกว้างของปีกคู่หลัง (WD = wing width) (ภาพประกอบที่ 11)



ภาพประกอบที่ 11 แสดงตำแหน่งของลักษณะภายนอกจำนวน 8 ลักษณะของแมลงกระซอน ที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุ์กรรมของแมลงกระซอน ได้แก่ ความยาวหนวด (AL = antenna length), ความยาวลำตัว (TBL = total body length), ความกว้างอก (PW = pronotum width), ความยาวช่องอก (TrL = Thorax length), ความกว้างช่องอก (TW = Thorax width), ความยาวของปีกคู่หน้า (TL = tegmen length), ความยาวของปีกคู่หลัง (WL = wing length), ความกว้างของปีกคู่หลัง (WD = wing width)

3.3 การวิเคราะห์พันธุกรรม

3.3.1 วิธีการสกัด DNA

นำส่วนขาชุดด้านขวาของแมลงกระซอนมาทำการแกะชิ้นเนื้อขนาดประมาณ 2 มิลลิกรัม เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด E.Z.N.A.[®] Tissue DNA kit (Omega bio-tek, GA, USA) โดยมีขั้นตอนคร่าวๆ ดังนี้ นำเนื้อเยื่อขาชุดใส่ในหลอด 1.5 ml นำไปประเหย alcohol ให้แห้งที่ 50 ถึง 70°C แล้วเติม buffer TL ปริมาตร 250 μ l บดตัวอย่างให้ละเอียดโดยใช้แท่งบดพลาสติก เติม proteinase K ความเข้มข้น 20 ng/ μ l ปริมาตร 10 μ l จากนั้นนำเอาไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ถึง 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะถูกละลายจนหมด แล้วทำการเติม RNase A (ความเข้มข้น 100 mg/ml) ปริมาตร 2 μ l ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม TB buffer ปริมาตร 2 เท่า ของตัวอย่าง หรือประมาณ 600 μ l แล้วนำไปบ่มที่ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ลงในคอลัมน์ที่เมา

กับชุดสกัดในปริมาตรครั้งละ 650 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm นาน 1 นาที ทำการล้างด้วยการเติม wash buffer ปริมาตร 650 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm นาน 1 นาที ทำการล้าง 2 รอบ แล้วปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าที่ 11,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อกำจัดสารต่างๆ ที่ตกค้างในคอลัมน์ออกให้หมด แล้วย้ายคอลัมน์ใส่ หลอด 1.5 ml ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่ 65°C นาน 2 นาที โดยเปิดฝาลอดด้วย เพื่อให้ alcohol ในหลอดระเหยหมด แล้วเติม elution buffer ปริมาตร 100 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm นาน 1 นาที ก็จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอด 1.5 ml นำเอาดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้วิเคราะห์ต่อไป

3.3.2 วิธีการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ DNA ที่สกัดไว้แล้วมาใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนของยีน CO1 โดยใช้ primer CI-J-1715 (5'-GGA TCA CCT GAT ATA GCA TTC CC-3') และ CI-N-2191 (5'-CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC-3') (Kim *et al.*, 2007a) และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน 16S rDNA โดยใช้ primer 16S22 (5'-CCG GTC TGAA CTC AGA TCA-3') และ 16SR21 (5'-GCC TGT TTA TCA AAA ACA T-3') (Yeh and Yang, 1997) ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้เครื่อง MyCycler™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, London, UK) ใช้สภาวะการทำ PCR เหมือนกันทั้งสองยีน ดังนี้ ทำส่วนผสมของ PCR (PCR mixture) ในปริมาตร reaction ละ 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 18.375 μ l, 10X Ex buffer ปริมาตร 2.5 μ l, 10 μ M dNTPs ปริมาตร 0.5 μ l, forward และ reverse primer ที่มีความเข้มข้น 10 pM ปริมาตรอย่างละ 1 μ l และเติม Ex Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan) ความเข้มข้น 5 U/ μ l ปริมาตร 0.125 μ l และใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 10 ถึง 50 ng/ μ l ปริมาตร 1 μ l หลังจากนั้นทำการ purify PCR product ด้วยชุด E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega bio-tek, GA, USA) แล้วส่งตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) กับบริษัทเอกชน

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

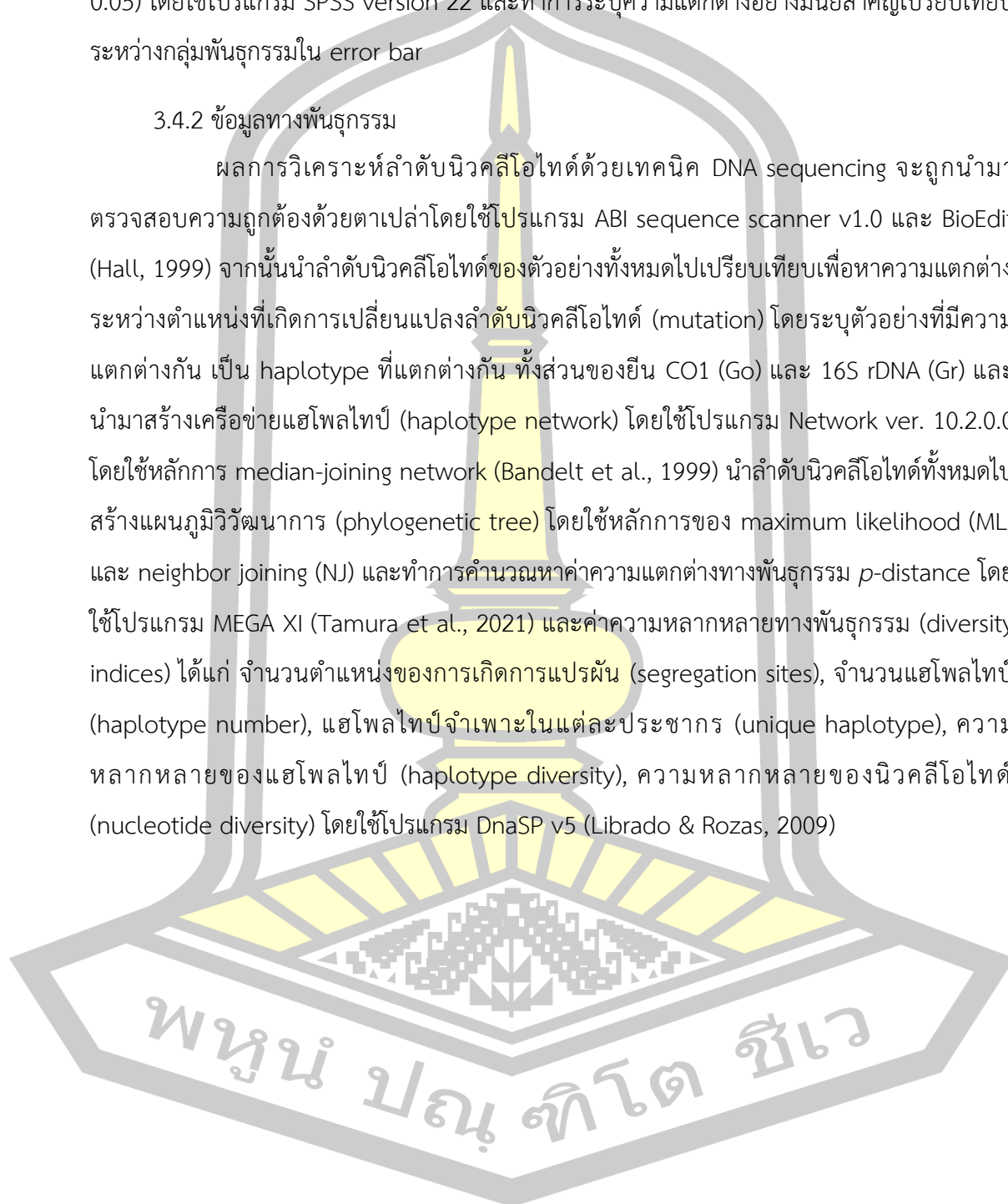
3.4.1 ข้อมูลพื้นฐานวิทยา

ศึกษาสัดส่วนสัมพันธ์ของลักษณะภายนอกและนำข้อมูลสัดส่วนที่วัดได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูล หาค่าเฉลี่ย (average) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ค่าน้อยที่สุด (min) และค่ามากที่สุด (max) ในแต่ละลักษณะพื้นฐานที่ทำการวัด

และสร้าง error bar เพื่อแสดงถึงค่าเฉลี่ย $\pm$ SD โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel และทดสอบหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์กรรม I – VI โดยใช้สถิติ One-Way ANOVA ที่ช่วงเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 22 และทำการระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุ์กรรมใน error bar

3.4.2 ข้อมูลทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing จะถูกนำมาตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาเปล่าโดยใช้โปรแกรม ABI sequence scanner v1.0 และ BioEdit (Hall, 1999) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดไปเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างระหว่างตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ (mutation) โดยระบุตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน เป็น haplotype ที่แตกต่างกัน ทั้งส่วนของยีน CO1 (Go) และ 16S rDNA (Gr) และนำมาสร้างเครือข่ายแฮพลไทป์ (haplotype network) โดยใช้โปรแกรม Network ver. 10.2.0.0 โดยใช้หลักการ median-joining network (Bandelt et al., 1999) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดไปสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้หลักการของ maximum likelihood (ML) และ neighbor joining (NJ) และทำการคำนวณหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม p -distance โดยใช้โปรแกรม MEGA XI (Tamura et al., 2021) และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (diversity indices) ได้แก่ จำนวนตำแหน่งของการเกิดการแปรผัน (segregation sites), จำนวนแฮพลไทป์ (haplotype number), แฮพลไทป์จำเพาะในแต่ละประชากร (unique haplotype), ความหลากหลายของแฮพลไทป์ (haplotype diversity), ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) โดยใช้โปรแกรม DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009)



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงกระซอนจำนวน 271 ตัวอย่าง จาก 14 พื้นที่ ในจังหวัดร้อยเอ็ด โดยใช้ส่วนของยีน CO1 เป็นเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อจำแนกความแตกต่างและกลุ่มพันธุกรรมก่อน หลังจากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 78 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวแทนของกลุ่มพันธุกรรมที่จำแนกด้วยยีน CO1 แล้ว มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA ผลจากการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 จำนวน 430 คู่เบส และส่วนของ 16S rDNA จำนวน 465 คู่เบส เปรียบกันระหว่างตัวอย่างแมลงกระซอนจากพื้นที่ต่างๆ ในจังหวัดร้อยเอ็ด พบการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (segregation site) ของยีน CO1 จำนวน 97 (22.6%) ตำแหน่ง จำแนกเป็นแบบ singleton variable จำนวน 15 ตำแหน่ง และการแปรผันแบบ parsimony informative จำนวน 82 ตำแหน่ง โดยไม่พบการเกิด insertion/deletion (indel) (ภาพประกอบที่ 12) พบตำแหน่งเกิดการแปรผันสูงสุดในประชากรแมลงกระซอนในอำเภออาจสามารถ (70 ตำแหน่ง) และอำเภอเกษตรวิสัย (72 ตำแหน่ง) และประชากรที่พบตำแหน่งการแปรผันของนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดอยู่ในอำเภอเมยวดี อำเภอโพนทราย และอำเภอเสลภูมิ ที่พบการแปรผันของนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่ง (ตารางที่ 3) ในส่วนของ 16S rDNA พบการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 80 (17.2%) ตำแหน่ง จำแนกเป็นแบบ singleton variable จำนวน 27 ตำแหน่ง และการแปรผันแบบ parsimony informative จำนวน 53 ตำแหน่ง และพบการเกิด indel จำนวน 4 ตำแหน่ง (ภาพประกอบที่ 13) พบตำแหน่งเกิดการแปรผันสูงสุดในประชากรแมลงกระซอนในอำเภอเกษตรวิสัย (56 ตำแหน่ง) และประชากรที่พบตำแหน่งการแปรผันของนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดอยู่ในอำเภอหนองพอก ที่พบการแปรผันของนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่ง (ตารางที่ 3)

เมื่อวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแมลงกระซอนจาก 14 พื้นที่ ในจังหวัดร้อยเอ็ดโดยใช้ส่วนของยีน CO1 พบค่าความหลากหลายทางของแฮพลไทป์ (haplotype diversity, Hd) อยู่ในช่วงระหว่าง 0.100 ± 0.088 และ 0.742 ± 0.071 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.579 ± 0.036 และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity; Nd) อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0002 ± 0.0006 และ 0.0574 ± 0.0048 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.0385 ± 0.0037 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน 16S rDNA พบค่าความหลากหลายทางของแฮพลไทป์ อยู่ในช่วงระหว่าง 0.000 ± 0.000 และ

1.000±0.500 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.859±0.019 และค่าค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0000±0.0000 และ 0.0777±0.0129 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.0556±0.0039 ในส่วนของ 16S rDNA ส่วนพื้นที่ที่มีตัวอย่างเพียง 1 ตัวอย่างจะไม่นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ (ตารางที่ 3)

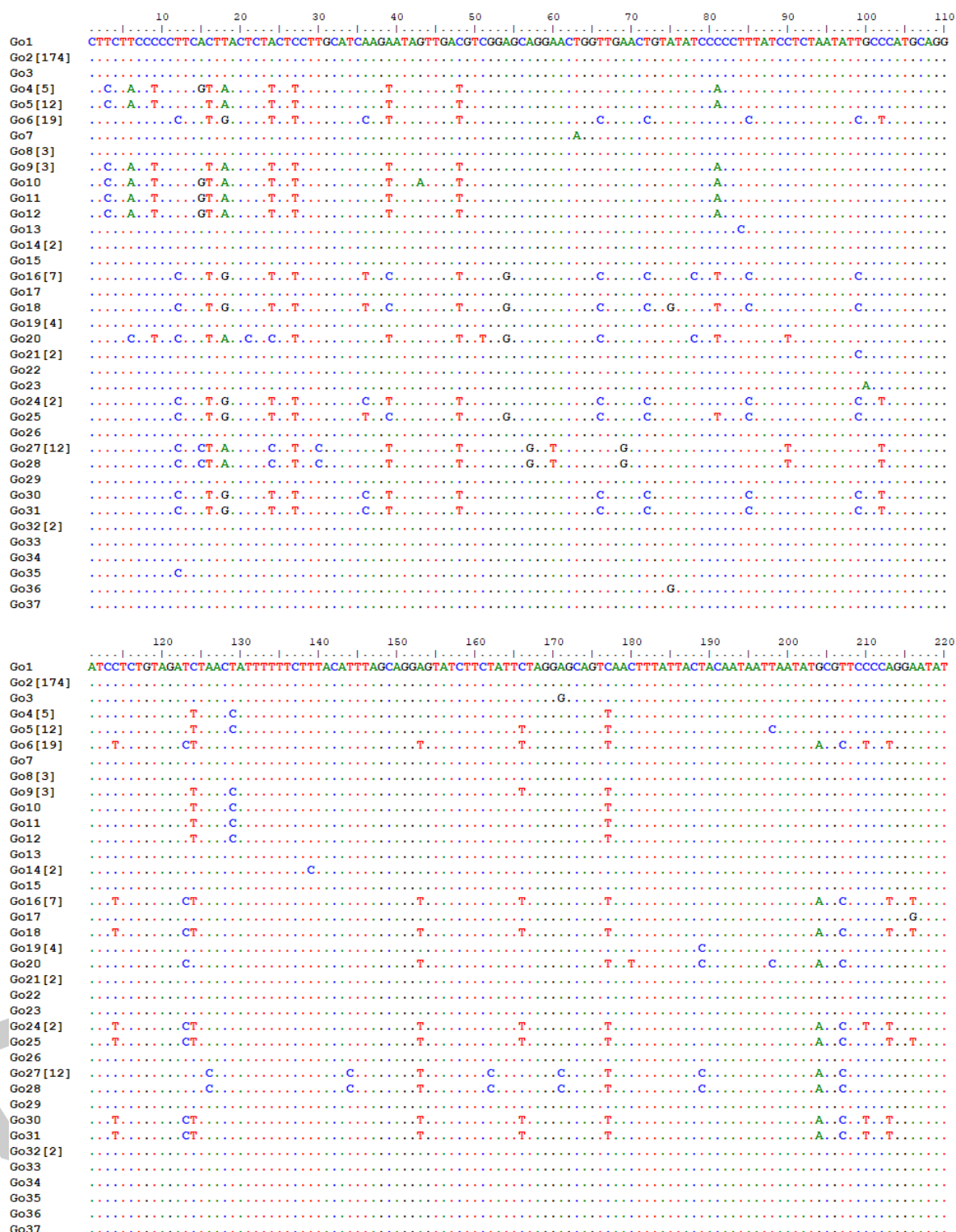
เมื่อนำตำแหน่งที่เกิดการแปรผันเหล่านี้ไปทำการวิเคราะห์จำแนกออกเป็นลักษณะทางพันธุกรรม (haplotype) ที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน CO1 พบว่า ตัวอย่างแมลงกระซอนจำนวน 271 ตัวอย่าง สามารถจำแนกออกได้เป็น 37 แฮพโลไทป์ ได้แก่ Go1-Go37 ในจำนวนนี้พบว่า มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ Go2 ที่พบได้กระจายทั่วไปในพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด แต่ก็มีลักษณะทางพันธุกรรมถึง 26 แฮพโลไทป์ ที่พบจำเพาะในแต่ละพื้นที่ (unique haplotypes; Uh) เช่น Go27-Go28 จะพบในพื้นที่ของอำเภอบ้านไผ่ (AS) Go3-Go12 พบเฉพาะในอำเภอมือทอง และ Go29-Go31 พบเฉพาะในอำเภอนมโหรีเท่านั้น เป็นต้น (ภาพประกอบที่ 14) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน 16S rDNA พบว่า ตัวอย่างแมลงกระซอนจำนวน 80 ตัวอย่าง สามารถจำแนกออกได้เป็น 15 แฮพโลไทป์ ได้แก่ Gr1 ถึง Gr15 ในจำนวนนี้พบว่า มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ Gr1 และ Gr12 พบได้กระจายทั่วไปในพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด แต่ก็มีลักษณะทางพันธุกรรม 9 แฮพโลไทป์ ที่พบจำเพาะในแต่ละพื้นที่ เช่น Gr10 จะพบในพื้นที่ของอำเภอบ้านไผ่ (AS) และ Gr9 จะพบในอำเภอมือทองเท่านั้น เป็นต้น (ภาพประกอบที่ 15)



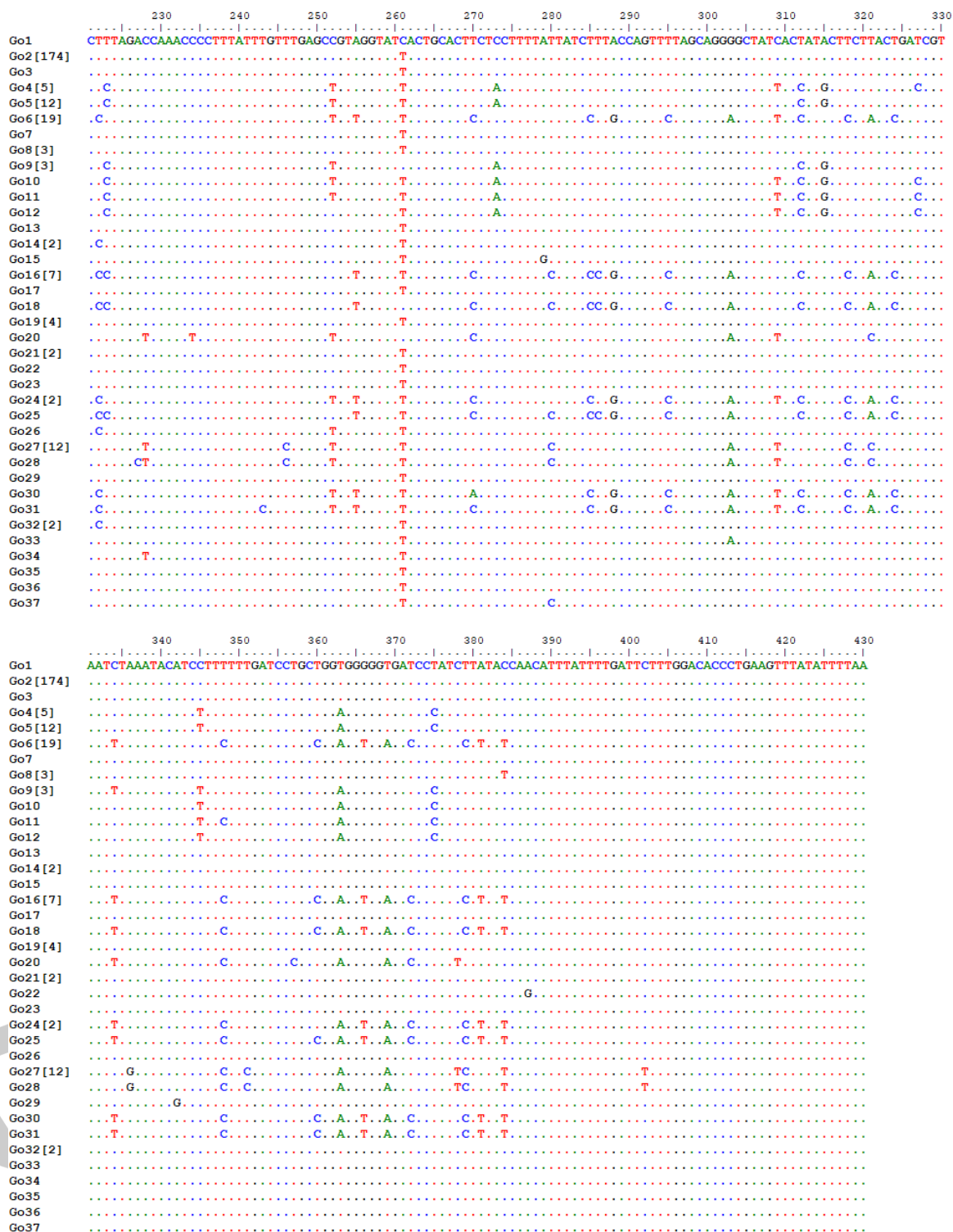
ตารางที่ 3 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอน 14 กลุ่ม ประชากรจากจังหวัดร้อยเอ็ด วิเคราะห์โดยใช้ส่วนของยีน CO1 ขนาดความยาว 430 คู่เบส และ 16S rDNA ขนาดความยาว 465 คู่เบส

ประชากร	CO1						16S rDNA					
	n	S	H	Uh	Hd±SD	Nd±SD	n	S	H	Uh	Hd±SD	Nd±SD
AS	16	70	4	2	0.442±0.145	0.0389±0.0058	16	29	2	0	0.143±0.119	0.0089±0.0036
JH	20	47	4	1	0.284±0.128	0.0111±0.0045	2	36	2	0	1.000±0.500	0.0777±0.0129
JP	19	28	5	2	0.532±0.130	0.0199±0.0035	7	13	3	0	0.762±0.115	0.0158±0.0032
KS	19	72	6	2	0.596±0.122	0.0428±0.0056	7	56	4	1	0.810±0.130	0.0578±0.0066
NP	20	5	5	3	0.368±0.135	0.0011±0.0015	3	1	2	1	0.667±0.314	0.0014±0.0014
MU	19	30	7	4	0.713±0.103	0.0123±0.0036	10	3	4	2	0.733±0.120	0.0019±0.0013
MD	20	1	2	0	0.100±0.088	0.0002±0.0006	2	2	2	1	1.000±0.500	0.0043±0.0030
PP	20	49	7	3	0.732±0.077	0.0565±0.0046	10	37	3	1	0.378±0.181	0.0281±0.0046
PT	20	5	5	2	0.368±0.135	0.0011±0.0015	1	0	1	n/a	n/a	n/a
PR	20	53	7	3	0.742±0.071	0.0574±0.0048	7	45	4	1	0.810±0.130	0.0432±0.0059
PS	20	1	2	0	0.189±0.108	0.0004±0.0006	2	0	1	0	0.000±0.000	0.0000±0.0000
SP	19	1	2	0	0.105±0.092	0.0002±0.0006	1	0	1	n/a	n/a	n/a
SD	19	47	5	2	0.386±0.139	0.0119±0.0045	4	36	3	1	0.833±0.222	0.0392±0.0071
SW	20	56	6	2	0.658±0.096	0.0558±0.0049	6	14	3	0	0.524±0.209	0.0094±0.0032
รวม	271	97	37	26	0.579±0.036	0.0385±0.0037	78	80	15	9	0.859±0.019	0.0556±0.0039

n, จำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์; S, จำนวนตำแหน่งที่เกิดการแปรผัน (segregation sites); H, จำนวนแฮโลไทป์; Uh, จำนวนแฮโลไทป์ที่พบเฉพาะในแต่ละประชากร; Hd, ความหลากหลายแฮโลไทป์ (haplotype diversity); Nd, ความหลากหลายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity); n/a, ไม่นำมาวิเคราะห์



ภาพประกอบที่ 12 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่พบการแปรผันในยีน CO1 จำนวน 97 ตำแหน่ง เปรียบเทียบกันระหว่าง 37 แฮพลไทป์ (Go1–Go37) หมายเลขในวงเล็บหลังชื่อแฮพลไทป์คือ จำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละแฮพลไทป์ ยกเว้นถ้าพบเพียงหนึ่งตัวอย่างจะไม่แสดงหมายเลข



ภาพประกอบที่ 12 (ต่อ) แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่พบการแปรผันในยีน CO1 จำนวน 97

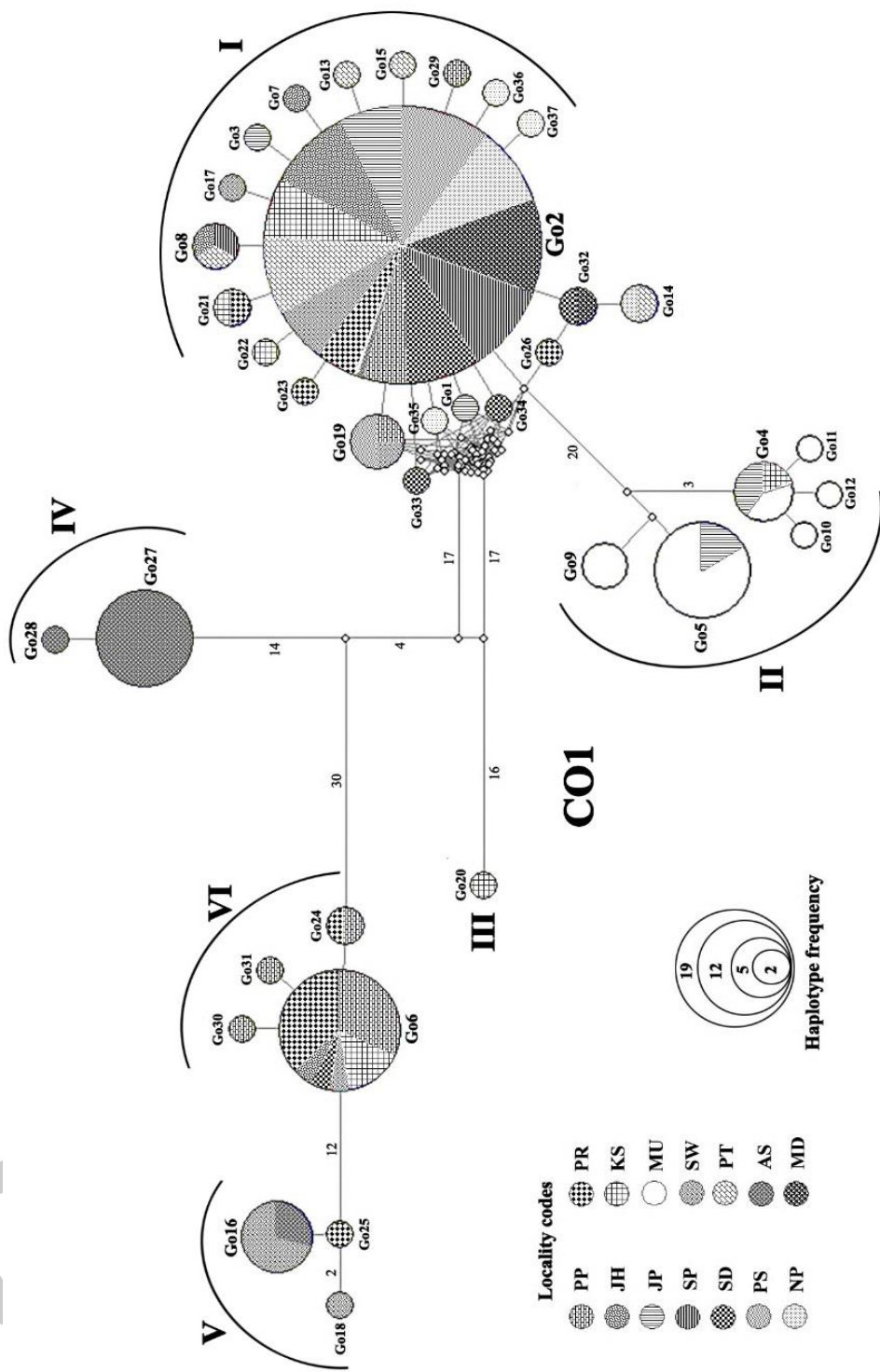
ตำแหน่ง เปรียบเทียบกันระหว่าง 37 แอพอไทป์ (Go1–Go37), หมายเลขในวงเล็บหลังชื่อแอพอไทป์คือจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละแอพอไทป์ ยกเว้นถ้าพบเพียงหนึ่งตัวอย่างจะไม่แสดงหมายเลข

ภาพประกอบที่ 13 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่พบการแปรผันในยีน 16S rDNA จำนวน 80 ตำแหน่ง เปรียบเทียบกันระหว่าง 15 แอสเพคต์ (Gr1-Gr15)

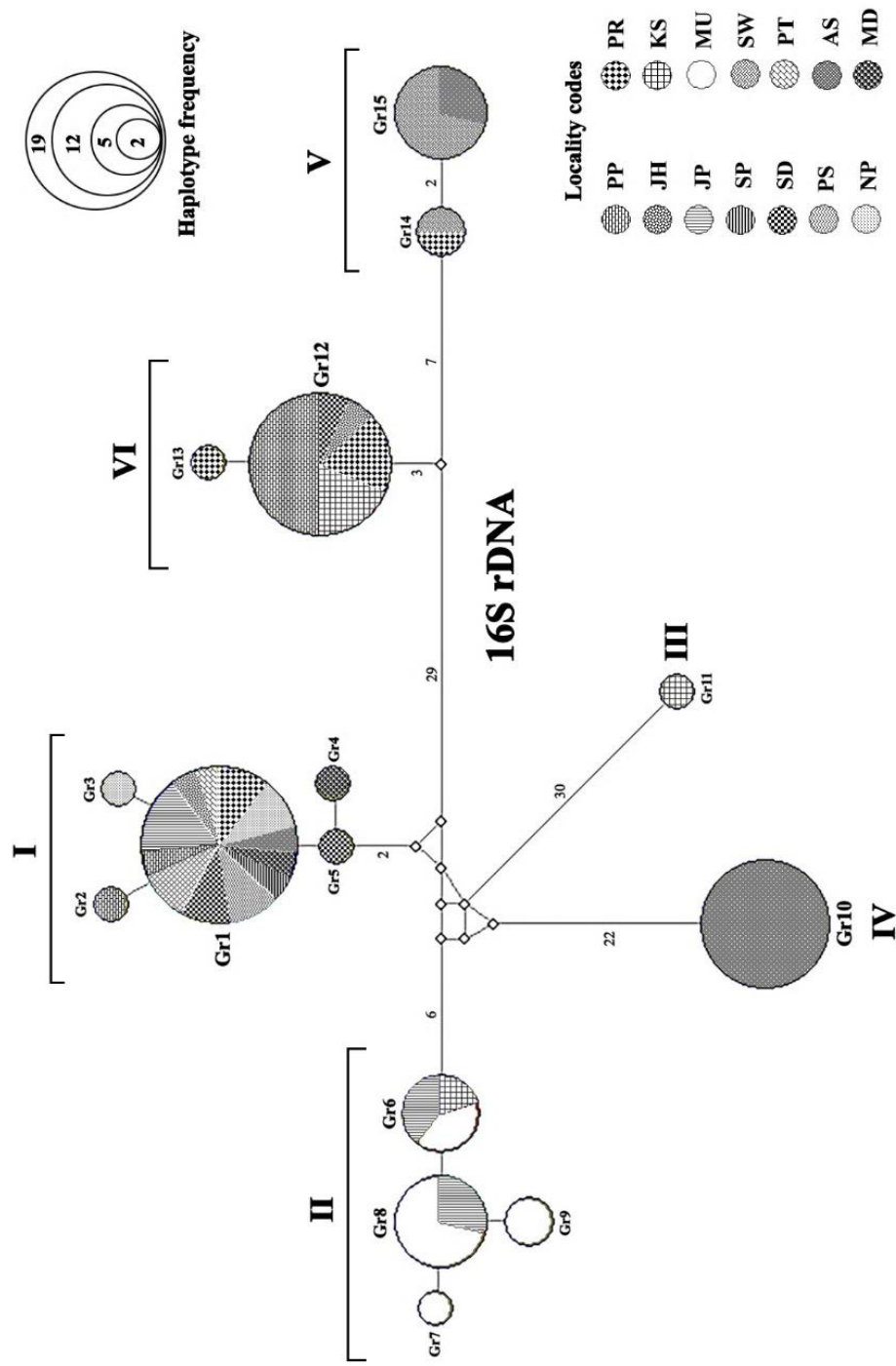
4.2 เครือข่ายแฮพลไทป์ (haplotype network)

เมื่อวิเคราะห์การจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรมด้วยวิธีการสร้าง haplotype network โดยใช้จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 271 ตัวอย่าง จำแนกตามลักษณะแฮพลไทป์ที่ตรวจพบของยีน CO1 (Go1–Go37) สามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมของแมลงกระซอนจากแหล่งธรรมชาติในจังหวัดร้อยเอ็ดออกได้เป็น 6 กลุ่มพันธุกรรม ได้แก่ กลุ่มพันธุกรรม I ประกอบด้วย 21 แฮพลไทป์ ได้แก่ Go1–Go3, Go7, Go8, Go13–Go15, Go17, Go19, Go21–Go23, Go26, Go29, Go32–Go37) กลุ่มพันธุกรรม II ประกอบด้วย 6 แฮพลไทป์ ได้แก่ Go4, Go5, Go9–Go11 จากอำเภอมือง อำเภोजตุรพักรพิมาน และอำเภอกษตรวิสัย กลุ่มพันธุกรรม III มีเพียงแฮพลไทป์ Go20 จากอำเภอกษตรวิสัย กลุ่มพันธุกรรม IV ประกอบด้วยแฮพลไทป์ Go27 และ Go28 จากอำเภออาจสามารถ กลุ่มพันธุกรรม V ประกอบด้วย แฮพลไทป์ Go16, Go18 และ Go25 จากอำเภोजตุรพักรพิมาน อำเภอสรีสมเด็จ และอำเภออาจสามารถ กลุ่มพันธุกรรม VI ประกอบด้วย 4 แฮพลไทป์ ได้แก่ Go6, Go24, Go30 และ Go31 (ภาพประกอบที่ 14)

หลังจากนั้นได้ทำการสุ่มตัวอย่างจาก 6 กลุ่มพันธุกรรม จำนวน 80 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ด้วยยีน 16S rDNA (Gr1–Gr15) ก็ยังสามารถจำแนกกลุ่มพันธุกรรมออกได้ 6 กลุ่มพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมด้วยยีน CO1 อย่างชัดเจน ได้แก่ กลุ่มพันธุกรรม I ประกอบด้วย 5 แฮพลไทป์ ได้แก่ Gr1–Gr5 กลุ่มพันธุกรรม II ประกอบด้วย 4 แฮพลไทป์ ได้แก่ Gr6–Gr9 จากอำเภอมือง อำเภोजตุรพักรพิมาน และอำเภอกษตรวิสัย กลุ่มพันธุกรรม III มีเพียงแฮพลไทป์ Gr11 จากอำเภอกษตรวิสัย กลุ่มพันธุกรรม IV มีเพียงแฮพลไทป์ G10 จากอำเภออาจสามารถ กลุ่มพันธุกรรม V ประกอบด้วย แฮพลไทป์ Gr14 และ Gr15 จากอำเภोजตุรพักรพิมาน อำเภอสรีสมเด็จ และอำเภออาจสามารถ กลุ่มพันธุกรรม VI ประกอบด้วยแฮพลไทป์ ได้แก่ Gr12 และ Gr13 (ภาพประกอบที่ 15) ซึ่งการจัดกลุ่มพันธุกรรมโดยใช้ยีน CO1 และ 16S rDNA มีความสัมพันธ์สอดคล้องกันอย่างชัดเจน เช่น ตัวอย่างที่ให้ลักษณะจำเพาะในการจัดกลุ่มพันธุกรรม III ได้แก่ Go20 และ Gr11 นั้น เป็นตัวอย่างแมลงกระซอนตัวเดียวกัน รวมทั้งกลุ่มพันธุกรรม IV ที่พบจำเพาะในอำเภออาจสามารถ ก็สามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มพันธุกรรมจำเพาะเหมือนกันทั้งยีน CO1 และ 16S rDNA ดังนั้นการวิเคราะห์และจำแนกกลุ่มพันธุกรรมในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความถูกต้องสูงและนำไปใช้อ้างอิงในอนาคตได้อย่างเหมาะสมและน่าเชื่อถือ

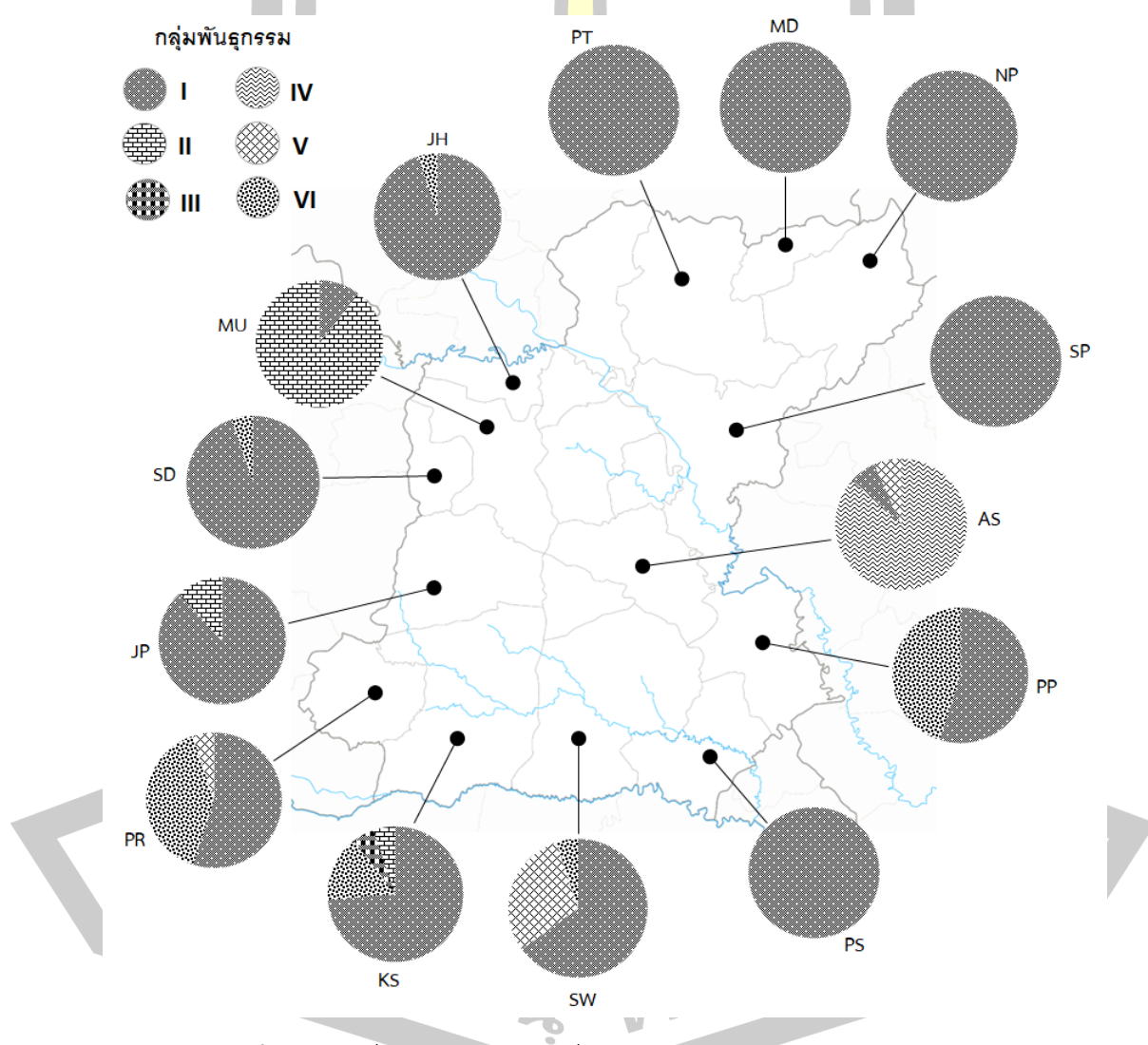


ภาพประกอบที่ 14 เครือข่ายแฮปไทป์ของแมลงกระซอนจำนวน 37 แฮปไทป์ (Go1–Go37) วิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 ขนาดความยาว 430 คู่เบส สามารถจำแนกกลุ่มพันธุกรรมออกได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ I ถึง VI ที่ค่าความแตกต่างมากกว่า 10 mutational steps ดังแสดงบนเส้นแขนง



ภาพประกอบที่ 15 เครือข่ายแฮปโลไทป์ของแมลงกระชอนจำนวน 15 แฮปโลไทป์ (Gr1-Gr15) วิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาดความยาว 465 คู่เบส สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์กรรมออกได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ I ถึง VI ที่ค่าความแตกต่างมากกว่า 5 mutational steps ดังแสดงบนเส้นแขนง

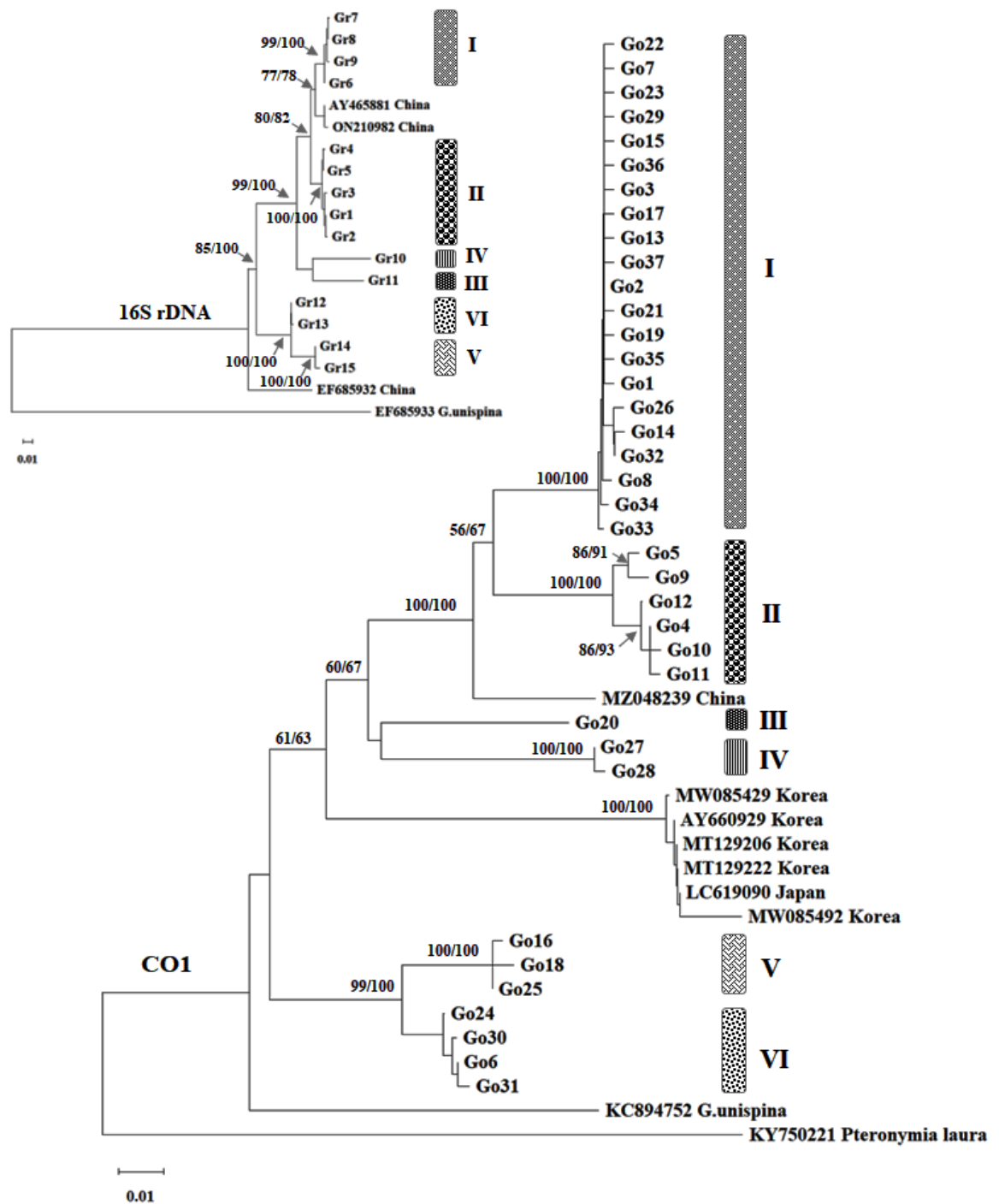
เมื่อนำข้อมูลมาทำแผนที่การกระจายตัวของกลุ่มพันธุ์กรรมในพื้นที่แต่ละอำเภอในจังหวัดร้อยเอ็ด พบว่า กลุ่มพันธุ์กรรมแบบ I กระจายตัวอยู่ทุกพื้นที่เก็บตัวอย่างในจังหวัดร้อยเอ็ด กลุ่มพันธุ์กรรมแบบ II พบกระจายตัวอยู่ในอำเภอเมือง จตุรพักตพิมาน และเกษตรวิสัย กลุ่มพันธุ์กรรมแบบ III พบจำเพาะในอำเภอเกษตรวิสัย กลุ่มพันธุ์กรรมแบบ IV พบจำเพาะในอำเภออาจสามารถ กลุ่มพันธุ์กรรมแบบ V พบกระจายตัวอยู่ในอำเภอสวรรณภูมิ โพนทราย และอาจสามารถ กลุ่มพันธุ์กรรมแบบ VI พบกระจายตัวอยู่ในอำเภอจังหาร สุวรรณภูมิ เกษตรวิสัย ปทุมรัตน์ โพนทราย พนมไพร และศรีสมเด็จ (ภาพประกอบที่ 16)



ภาพประกอบที่ 16 แผนที่การกระจายความถี่ของกลุ่มพันธุ์กรรม I ถึง VI ในอำเภอต่างๆ ของจังหวัดร้อยเอ็ด ได้แก่ MU, เมือง; SD, ศรีสมเด็จ; JP, จตุรพักตพิมาน; PR, ปทุมรัตน์; KS, เกษตรวิสัย; SW, สุวรรณภูมิ; PS, โพนทราย; PP, พนมไพร; AS, อาจสามารถ; SP, เสลภูมิ; NP, หนองพอก; MD, เมยวดี; PT, โพนทอง; JH, จังหาน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 และ 16S rDNA มาวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ พบว่า ประชากรแมลงกระซอนจาก 14 พื้นที่ในจังหวัดร้อยเอ็ด สามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมออกได้เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม I ถึง VI (ภาพประกอบที่ 17) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์เครือข่ายแฮพโลไทป์ แต่การวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ ได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงกระซอน *G. orientalis* จากประเทศเกาหลีจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างหมายเลข (accession number) MW085429 MW085492 AY660929 MT129206 และ MT129222 ตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่น หมายเลข LC619090 และตัวอย่างจากประเทศจีน หมายเลข MZ048239 ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank มาร่วมวิเคราะห์ด้วย เมื่อนำมาใช้วิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการร่วมกับตัวอย่างแมลงกระซอนจากจังหวัดร้อยเอ็ดโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 ขนาด 430 คู่เบส และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน CO1 ของแมลง *Pteronymia laura* เป็น out-group พบว่า ประชากรแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดแยกออกเป็น 6 กลุ่มพันธุกรรม ได้แก่ กลุ่มพันธุกรรม I ถึง VI โดยกลุ่มพันธุกรรม I และกลุ่มพันธุกรรม II และตัวอย่างจากจีนหมายเลข MZ048239 จัดกลุ่มสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน กลุ่มพันธุกรรม III จัดกลุ่มสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มพันธุกรรม IV ส่วนกลุ่มพันธุกรรม V จัดกลุ่มสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มพันธุกรรม VI ในส่วนของ 6 ตัวอย่างจากประเทศเกาหลีและญี่ปุ่นจะจัดกลุ่มอยู่ร่วมกันและจัดกลุ่มอยู่ระหว่างกลุ่มพันธุกรรม I-IV และกลุ่มพันธุกรรม V-VI (ภาพประกอบที่ 17)

มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแมลงกระซอนชนิด *G. orientalis* จากประเทศจีนอยู่เพียง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างหมายเลข AY465881 ON210982 และ EF685932 ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล GenBank เมื่อนำมาวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการร่วมกับตัวอย่างแมลงกระซอนจากจังหวัดร้อยเอ็ด โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rDNA ขนาด 465 คู่เบส ของแมลงกระซอน *Gryllotalpa unispina* เป็น out-group พบว่า การจัดกลุ่มพันธุกรรมของแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มพันธุกรรม ได้แก่ กลุ่มพันธุกรรม I ถึง กลุ่มพันธุกรรม VI สอดคล้องกับการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลของยีน CO1 และพบว่าตัวอย่างจากประเทศจีน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างหมายเลข AY465881 และ ON210982 ถูกจัดกลุ่มอยู่ร่วมกันอยู่ระหว่างกลุ่มพันธุกรรม I และ II และอีกหนึ่งตัวอย่างจากประเทศจีนหมายเลข EF685932 จะสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มพันธุกรรม V และ VI (ภาพประกอบที่ 17)



ภาพประกอบที่ 17 แผนภูมิวิวัฒนาการวิเคราะหโดยใชลําดับนิวคลีโอไทด์ที่จําแนกตามลักษณะแฮ
โพลไทป์ของยีน CO1 (Go1–Go37) และ 16S rDNA (Gr1–Gr15) ของแมลงกระซอนจากจังหวัด
ร้อยเอ็ด แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มพันธุกรรม (I–VI) และข้อมูลของแมลงกระซอน *G. orientalis* จาก
ประเทศเกาหลี ญี่ปุ่น และจีน ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ค่า bootstrap (NJ/MP) แสดงบน
แกนแต่ละกิ่งของแผนภูมิ

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม p -distance โดยใช้ข้อมูลของยีน CO1 ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่าง 14 กลุ่มประชากร แยกตามพื้นที่การเก็บตัวอย่างของแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ด พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม p -distance อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0002 ถึง 0.1138 (ตารางที่ 4) โดยพบว่าแมลงกระซอนจากพื้นที่อำเภออาจสามารถมีค่าความแตกต่างจากพื้นที่อื่นๆ สูงที่สุด โดยพบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม p -distance อยู่ในช่วง 0.0995 ถึง 0.1138

4.5 ลักษณะวิทยาบางประการ

เมื่อทำการวัดสัดส่วนของลักษณะบางประการของแมลงกระซอนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุกรรม (I–VI) ที่ถูกจำแนกโดยการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล CO1 และ 16S rDNA พบว่า กลุ่มพันธุกรรม II มีขนาดความยาวลำตัวทั้งหมด (total body length; TBL) เฉลี่ยที่ 25.71 ± 2.44 มิลลิเมตร (มม.) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มพันธุกรรมอื่นที่พบค่า TBL อยู่ในช่วง 30.59 ± 1.06 ถึง 34.25 ± 1.96 มม. อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ TBL ของกลุ่มพันธุกรรม I เฉลี่ยที่ 30.65 ± 2.43 มม. มีขนาดเล็กกว่ากลุ่มพันธุกรรม IV (32.84 ± 1.89 มม.) และกลุ่มพันธุกรรม VI (34.25 ± 1.96 มม.) อย่างมีนัยสำคัญ เช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่ากลุ่มพันธุกรรม II มีขนาดของลักษณะอย่างอื่นที่เล็กหรือสั้นกว่ากลุ่มพันธุกรรมอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ความกว้างช่องอก (thorax width; TW) ความยาวช่องอก (TrL=Thorax length) และความยาวของปีกคู่หลัง (wing length; WL) (ตารางที่ 5 และภาพประกอบที่ 18-19)

ตารางที่ 4 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม p-distance เปรียบเทียบระหว่าง 14 กลุ่มประชากรของแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ด โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ

Code	AS	JH	JP	KS	NP	MU	MD	PP	PT	PR	PS	SP	SD	SW
AS	-													
JH	0.0981	-												
JP	0.1012	0.0178	-											
KS	0.0995	0.0307	0.0356	-										
NP	0.0978	0.0066	0.0129	0.0275	-									
MU	0.1138	0.0575	0.0450	0.0646	0.0547	-								
MD	0.0978	0.0062	0.0124	0.0271	0.0007	0.0542	-							
PP	0.1009	0.0537	0.0600	0.0594	0.0534	0.0831	0.0530	-						
PT	0.0981	0.0066	0.0128	0.0275	0.0011	0.0547	0.0007	0.0534	-					
PR	0.1017	0.0541	0.0604	0.0598	0.0537	0.0833	0.0534	0.0593	0.0537	-				
PS	0.0975	0.0063	0.0125	0.0272	0.0008	0.0543	0.0003	0.0532	0.0008	0.0536	-			
SP	0.0976	0.0062	0.0124	0.0271	0.0007	0.0542	0.0002	0.0530	0.0007	0.0534	0.0003	-		
SD	0.0980	0.0119	0.0182	0.0310	0.0071	0.0578	0.0066	0.0538	0.0071	0.0541	0.0067	0.0066	-	
SW	0.1050	0.0462	0.0523	0.0560	0.0443	0.0797	0.0439	0.0632	0.0444	0.0629	0.0442	0.0439	0.0463	-

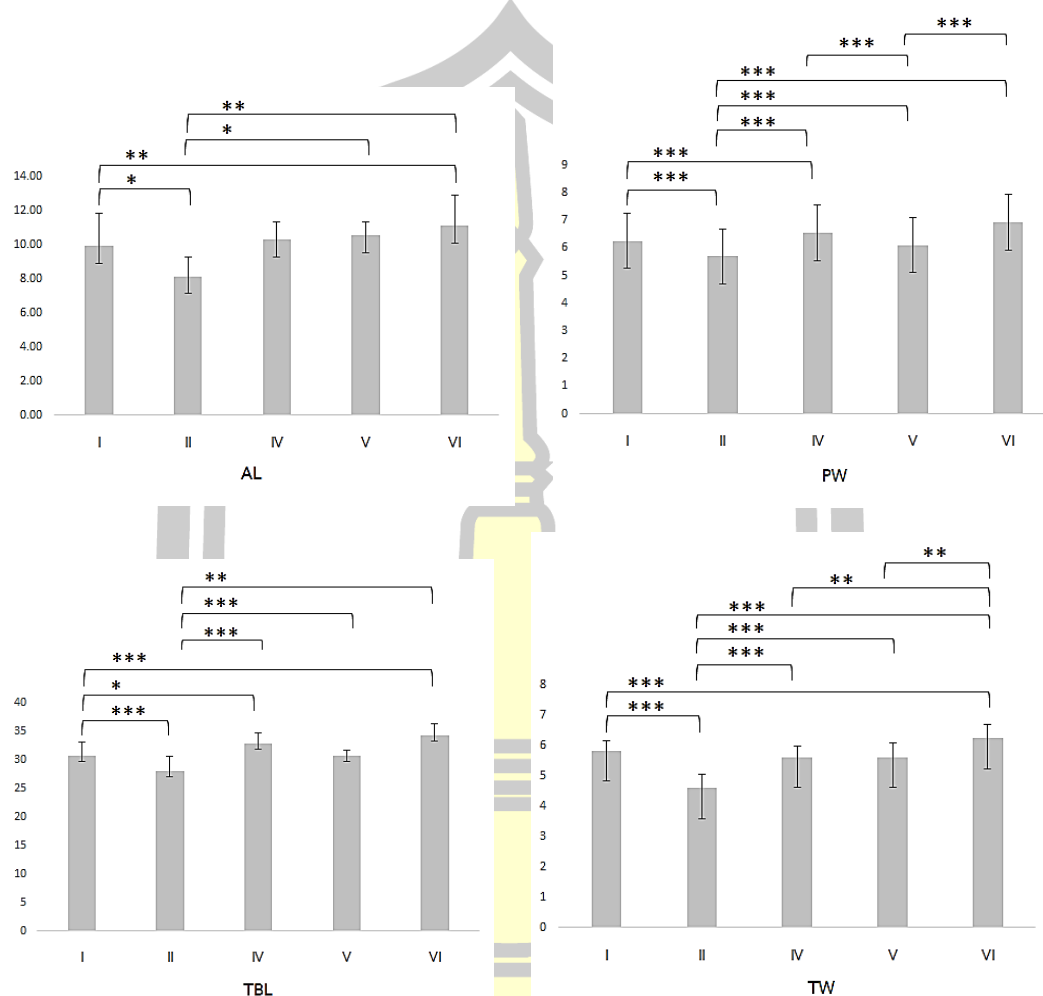
ตารางที่ 5 แสดงการวัดสัดส่วนแมลงกระซอนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพันธุ์กรรม I-VI (ยกเว้นกลุ่ม III) ตามการจำแนกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

Genetic group	Antenna length (AL)				Total body length (TBL)			
	n	mean±SD	min	max	n	mean±SD	min	max
I	149	9.9±1.92	2.77	13.22	149	30.65±2.43	25.07	39.76
II	5	8.11±1.12	6.62	9.94	5	25.71±2.44	23.26	29.37
IV	4	10.26±1.09	9.23	12.03	4	32.84±1.89	30.8	35.85
V	5	10.51±0.82	9.09	11.46	5	30.59±1.06	28.94	31.76
VI	22	11.08±1.81	4.49	13.2	22	34.25±1.96	30.06	39.76

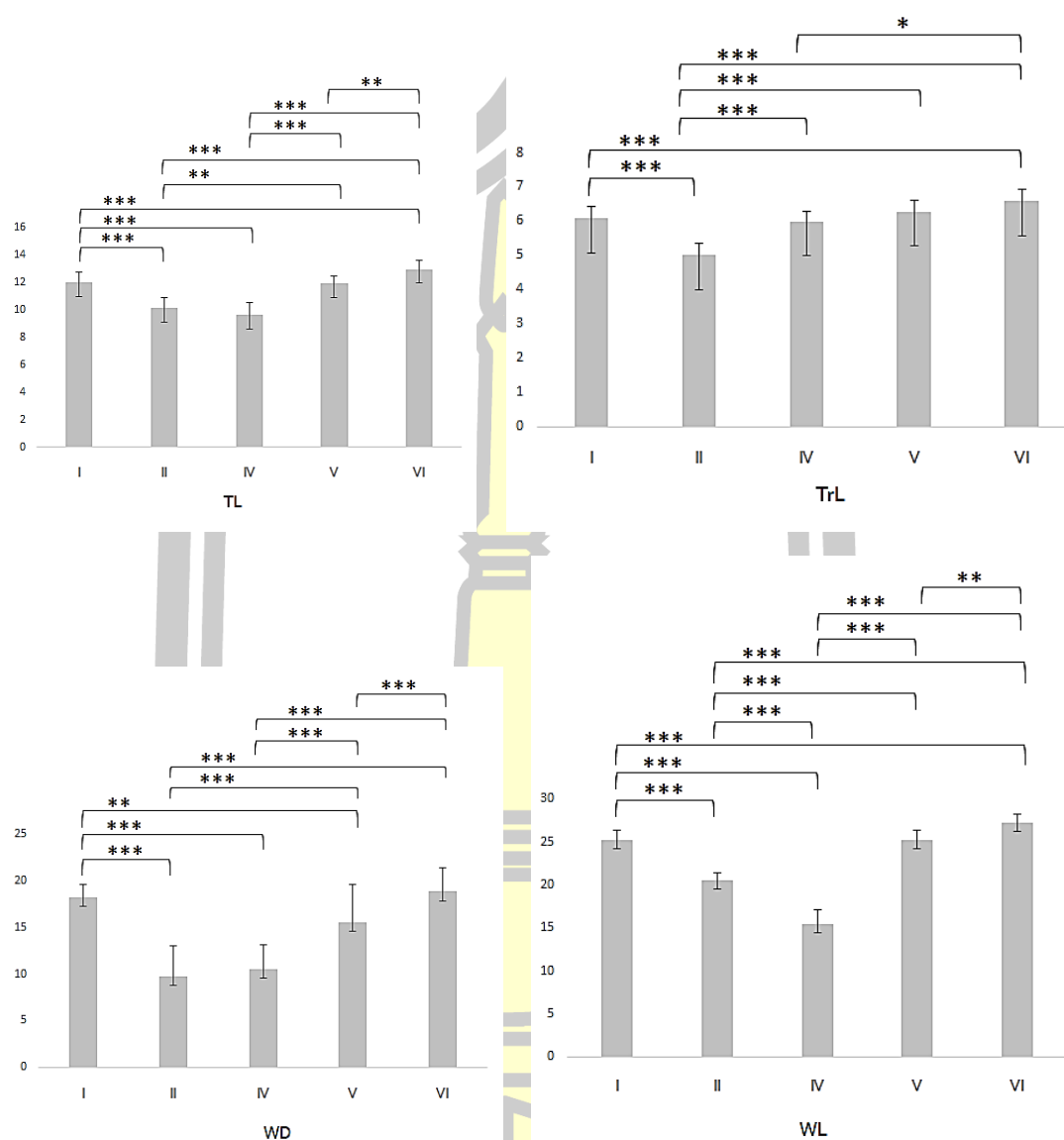
Genetic group	Pronotum width (PW)				Thorax length (TrL)			
	n	mean±SD	min	max	n	mean±SD	min	max
I	149	6.26±0.40	5.26	7.92	149	6.08±0.36	5.12	7.14
II	5	5.15±0.56	4.27	6.03	5	5.00±0.37	4.46	5.35
IV	4	6.54±0.43	6.14	7.26	4	5.99±0.30	5.53	6.38
V	5	6.10±0.14	5.92	6.36	5	6.29±0.32	5.77	6.74
VI	22	6.93±0.42	6.08	7.92	22	6.57±0.37	5.6	7.14

Genetic group	Thorax width (TW)				Tegmen length (TL)			
	n	mean±SD	min	max	n	mean±SD	min	max
I	149	5.83±0.35	4.88	6.65	149	11.99±0.81	9.79	13.8
II	5	4.61±0.45	3.85	5.17	5	10.15±0.79	8.77	11.06
IV	4	5.62±0.38	5.13	6.17	4	9.65±0.89	8.6	11.05
V	5	5.63±0.44	4.82	6.02	5	11.92±0.56	11.4	12.68
VI	22	6.25±0.46	4.46	6.65	22	12.97±0.63	11.92	14.33

Genetic group	Wing length (WL)				Wing width (WD)			
	n	mean±SD	min	max	n	mean±SD	min	max
I	149	25.15±1.26	22.16	27.78	149	18.23±1.34	15.08	21.89
II	5	20.49±0.93	19.34	21.69	5	9.78±3.22	7.29	16.14
IV	4	15.50±1.65	14.25	18.34	4	10.53±2.61	8.22	14.89
V	5	25.15±1.26	23.79	27.42	5	15.58±3.98	10.06	19.71
VI	22	27.16±1.04	25.13	30.2	22	18.87±2.50	12.13	22.4



ภาพประกอบที่ 18 เปรียบเทียบสัดส่วนของสี่ฐานบางประการ ได้แก่ ความยาวหนด (AL), ความกว้างอก (PW), ความยาวลำตัว (TBL), ความกว้างช่องอก (TW) ทดสอบโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เส้นโยงระหว่างแท่งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value $* < 0.05$, $** < 0.01$ และ $*** < 0.001$ แกน X แสดงถึงกลุ่มพันธุ์กรรม แกน Y แสดงถึงขนาดของสี่ฐานที่วัด (มม.)



ภาพประกอบที่ 19 เปรียบเทียบสัดส่วนของสัญญาณบางประการ ได้แก่ ความยาวของปีกคู่หน้า (TL), ความยาวช่องอก (TrL), ความกว้างของปีกคู่หลัง (WD), ความยาวของปีกคู่หลัง (WL) ทดสอบโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เส้นโยงระหว่างแท่งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value $* < 0.05$, $** < 0.01$ และ $*** < 0.001$ แกน X แสดงถึงกลุ่มพันธุ์กรรม แกน Y แสดงถึงขนาดของสัญญาณที่วัด (มม.)

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าประชากรแมลงกระซอนในพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล CO1 จำนวน 271 ตัวอย่าง สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมออกได้ถึง 37 แฮพโลไทป์ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 16S rDNA จำนวน 78 ตัวอย่าง สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมออกได้ 15 แฮพโลไทป์ ซึ่งในจำนวนพบลักษณะของแฮพโลไทป์จำเพาะกับบางพื้นที่ โดยเฉพาะตัวอย่างจากอำเภออาจสามารถ ในจำนวน 16 ตัวอย่าง มีถึง 14 ตัวอย่างที่พบว่าเป็นลักษณะแฮพโลไทป์ที่จำเพาะ ซึ่งอาจเกิดจากการที่มีสภาพพื้นที่ที่จำเพาะกับแมลงกระซอนที่มีลักษณะพันธุกรรมจำเพาะนี้ ยกตัวอย่างเช่น มีรายงานการพบลักษณะแฮพโลไทป์ที่จำเพาะกับพื้นที่ของจิ้งโกร่ง *Tarbinskiellus portentosus* ในประเทศไทย โดยพบลักษณะพันธุกรรมที่จำเพาะในพื้นที่อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา และจัดกลุ่มอยู่ใกล้เคียงกับข้อมูลตัวอย่างของจิ้งโกร่ง *Tarbinskiellus* sp. จากประเทศอินเดียมากกว่าตัวอย่างในประเทศไทย ซึ่งเป็นไปได้ว่า จิ้งโกร่งที่มีลักษณะพันธุกรรมจำเพาะนี้ สามารถอาศัยและกระจายพันธุ์ในพื้นที่ที่มีลักษณะภูมิประเทศหรือสิ่งแวดล้อมจำเพาะ (Pradit et al., 2022) เพื่อความเข้าใจในการปรับตัวและวิวัฒนาการของแมลงกระซอนให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ในอนาคตจำเป็นต้องทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของดินและระบบนิเวศที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแมลงกระซอนที่พบลักษณะพันธุกรรมที่จำเพาะเหล่านี้อย่างละเอียด

นอกจากนี้ แนวกันตามธรรมชาติ (natural barrier) เช่น เทือกเขาหรือแม่น้ำขนาดใหญ่ ถือเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการกีดขวางการเคลื่อนย้าย (migration) ของประชากร ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ รวมทั้งแมลงบางชนิดที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ในระยะไกล ยกตัวอย่างเช่น พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของจิ้งโกร่ง *T. portentosus* ระหว่างประชากรที่อยู่ริมฝั่งโขงของประเทศไทยและประเทศลาว วิเคราะห์โดยใช้ allozyme จำนวน 23 loci เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่า แม่น้ำโขงเป็นแนวกันการเคลื่อนที่ตามธรรมชาติอย่างหนึ่งของจิ้งโกร่ง *T. portentosus* (Tantrawatpan et al., 2011) จังหวัดร้อยเอ็ดมีแม่น้ำชีไหลและแม่น้ำเสียวใหญ่ผ่านหลายพื้นที่ ซึ่งอาจจะมีผลต่อการเป็นแนวกันตามธรรมชาติในเคลื่อนที่ของแมลงกระซอนได้เช่นกัน ซึ่งอาจอีกหนึ่งเหตุผลที่ทำให้พบแฮพโลไทป์และกลุ่มพันธุกรรมที่จำเพาะกับบางพื้นที่ในการศึกษาครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ตาม พื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ดนั้นพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นแนวระนาบเดียวกันของทุ่งกุลาร้องไห้และอยู่ในเขตลุ่ม

แม่น้ำซีทั้งหมด การพบลักษณะแฮปโลไทป์ที่จำเพาะและแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ แสดงให้เห็นว่าแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดน่าจะมีการเคลื่อนที่อย่างจำกัดทำให้เจอลักษณะกลุ่มพันธุกรรมเดียวกันในพื้นที่ใกล้เคียงกัน หลายพื้นที่ในการศึกษาครั้งนี้มีการทำนาปีและนาปรัง (double cropping paddy field) ซึ่งอาจส่งผลต่อความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในพื้นที่ที่ทำนาสองครั้งปีนี้ได้เช่นกัน เนื่องจากช่วงเวลาและชนิดของข้าวรวมทั้งพืชในพื้นที่นาในแต่ละช่วงของเวลาทำนาปีและนาปรังจะแตกต่างกัน (Litsinger et al., 2009) ดังนั้น สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เหล่านี้จึงมีความหลากหลายและแตกต่างกันไปในแต่ละช่วงเวลาในการทำนาด้วย ดังนั้น แมลงกระซอนที่อาศัยในพื้นที่เหล่านี้ อาจจะมีหลากหลายทางพันธุกรรมและหลากหลายชนิดได้มากกว่าพื้นที่ที่ทำนาครั้งเดียว อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาพบว่าเสียงของแมลงกระซอนต่างชนิดกันจะให้คลื่นความถี่ของเสียงที่ต่างกัน (Tan & Kamaruddin, 2013) เพราะฉะนั้น การใช้เสียงล่อที่แตกต่างกัน อาจจะได้ดึงดูดเฉพาะแมลงกระซอนบางกลุ่มพันธุกรรมหรือบางชนิดเท่านั้น และอาจทำให้ได้แมลงกระซอนชนิดที่ต่างกันได้เช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาต่อไป หากต้องการตัวอย่างแมลงกระซอนที่ครอบคลุมและเป็นตัวแทนประชากรที่แท้จริง อาจจะต้องทำการเก็บจากแหล่งอาศัยหรือโพรงของแมลงกระซอนโดยการขุดโดยตรงมากกว่าการล่อด้วยไฟหรือเสียง

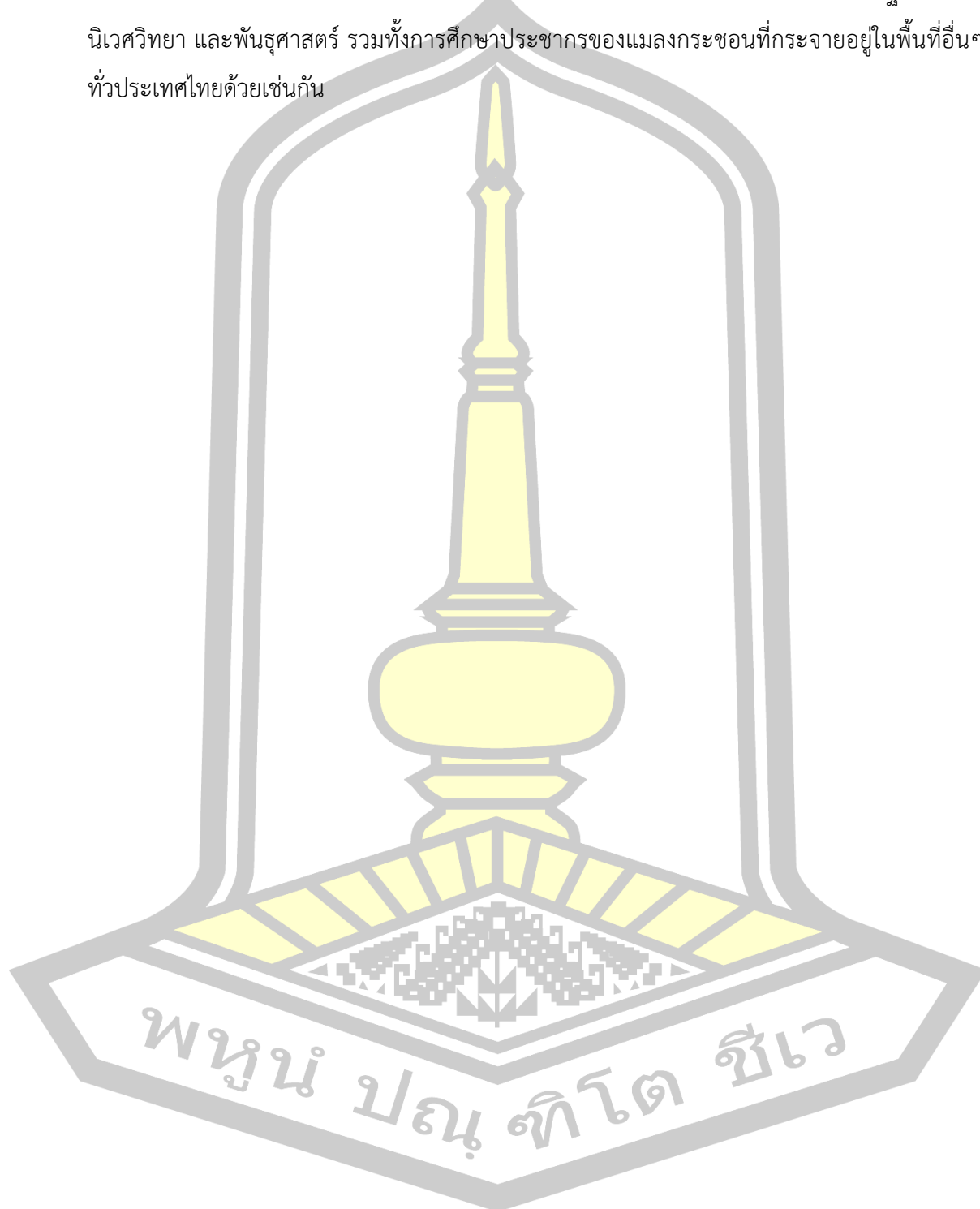
ชนิดของเครื่องหมายพันธุกรรมที่เลือกใช้ให้เหมาะสมในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มีความสำคัญมากเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้ยีน CO1 และ 16S rDNA เนื่องจากต้องการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดกับตัวอย่างจากประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่น ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ผลการศึกษาครั้งนี้ ถือได้ว่าเป็นการพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงกระซอน *G. orientalis* สูงที่สุดโดยพบถึง 37 แฮปโลไทป์จากการวิเคราะห์ 271 ตัวอย่างจากจังหวัดร้อยเอ็ด เมื่อเทียบกับการศึกษาในแมลงกระซอน *G. orientalis* 48 ตัวอย่างจากเกาหลีใต้ ที่พบเพียง 2 แฮปโลไทป์ เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ยีน CO1 (Kim et al., 2007a) นอกจากนี้ เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการโดยใช้ยีน CO1 พบว่า แมลงกระซอนจากเกาหลีและญี่ปุ่นจะจัดกลุ่มแยกออกไปและแตกต่างจากกลุ่มพันธุกรรมในจังหวัดร้อยเอ็ด และหนึ่งตัวอย่างของแมลงกระซอนจากประเทศจีนก็แยกออกจากกลุ่มพันธุกรรมอื่นๆ เช่นเดียวกัน ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA ก็พบว่าตัวอย่างจากประเทศจีนแยกกลุ่มพันธุกรรมแตกต่างจากแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดเช่นเดียวกัน ผลการวิเคราะห์นี้แสดงให้เห็นว่า แมลงกระซอน *G. orientalis* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และน่าจะมีความซับซ้อนของชนิดซ่อนอยู่ (cryptic species) จำเป็นจะต้องทำการศึกษาแมลงกระซอนชนิดนี้

เปรียบเทียบให้ครอบคลุมพื้นที่การกระจายในภูมิภาคตะวันออกให้มากที่สุด เพื่อที่จะให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกแมลงกระซอนชนิดนี้อย่างเป็นระบบมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตาม พบรายงานแมลงกระซอนชนิดใหม่ของสกุล *Gryllotalpa* ที่พบในเขตภูมิภาคตะวันออก (Oriental region) อยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น *G. krishnani* sp.n. ในประเทศอินเดีย (Prasanna *et al.*, 2012) และ *G. fraser* sp. n. ในคาบสมุทรของประเทศมาเลเซีย (Tan & Kamaruddin, 2013) แต่จะเป็นการบรรยายลักษณะพื้นฐานวิทยาเป็นหลัก ดังนั้น แมลงกระซอนในกลุ่มพันธุกรรมที่พบในจังหวัดร้อยเอ็ดในการศึกษานี้ อาจประกอบด้วยชนิดใหม่หรือชนิดที่ยังไม่เคยค้นพบและบรรยายในประเทศไทยมาก่อน จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาโดยละเอียดเทียบกับ key จำแนกของแมลงกระซอนสกุล *Gryllotalpa* ทั่วโลก อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์สัดส่วนของลักษณะบางประการเบื้องต้นจำนวน 8 ลักษณะ โดยเฉพาะขนาดความยาวของลำตัวเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดของแมลงกระซอนสกุล *Gryllotalpa* โดย *G. orientalis* จะมีความยาวลำตัวอยู่ในช่วง 30 – 35 มม. (Tan, 2016) ซึ่งในการศึกษานี้พบค่าเฉลี่ยความยาวลำตัวอยู่ในช่วงดังกล่าว ยกเว้นกลุ่มพันธุกรรม II ที่พบขนาดลำตัวสั้นกว่า 30 มม. แต่อาจจะเนื่องมาจากช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างที่แมลงกระซอนอาจจะยังไม่โตเต็มที่ทำให้ลำตัวและสัดส่วนอื่นๆ สั้นหรือเล็กกว่าปกติ แต่อย่างไรก็ตาม ขนาดลำตัวของแมลงกระซอนสามารถแปรผันได้ตามลักษณะสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ได้เช่นกัน ยกตัวอย่าง ขนาดโพรงและจำนวนความหนาแน่นของประชากรแมลงกระซอนที่อาศัยอยู่ในโพรงเดียวกัน จะมีผลต่อขนาดของลำตัวของแมลงกระซอนอย่างมีนัยสำคัญ (Allen *et al.*, 2020) และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของลักษณะบางประการระหว่างกลุ่มพันธุกรรม I ถึง VI แสดงให้เห็นว่า แต่ละกลุ่มพันธุกรรม ก็จะมีบางลักษณะพื้นฐานที่แตกต่างกัน ดังนั้นหากทำการศึกษาโดยละเอียด อาจนำไปสู่การจำแนกแมลงกระซอนสกุล *Gryllotalpa* ชนิดใหม่ในจังหวัดร้อยเอ็ดได้เช่นกัน

จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่า แมลงกระซอนที่พบในจังหวัดร้อยเอ็ด เป็นแมลงกระซอนสกุล *Gryllotalpa* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพันธุกรรมเดียวกับ *G. orientalis* จากประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่น ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank แต่พบว่าแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับสูง สามารถจำแนกกลุ่มพันธุกรรมออกได้ถึง 6 กลุ่มพันธุกรรม โดยพบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม p -distance ระหว่างบางกลุ่มประชากรของแมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ดค่อนข้างสูง นอกจากนี้ ยังพบว่าสัดส่วนของลักษณะบางประการมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า แมลงกระซอนในจังหวัดร้อยเอ็ด

จัดเป็นชนิดซับซ้อน ซึ่งอาจจะมีชนิดใหม่หรือชนิดที่ยังไม่เคยถูกบรรยายพบในประเทศไทยมาก่อน
ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาอย่างละเอียดในอนาคต ทั้งทางด้านชีววิทยา สัณฐานวิทยา
นิเวศวิทยา และพันธุศาสตร์ รวมทั้งการศึกษาประชากรของแมลงกระซอนที่กระจายอยู่ในพื้นที่อื่นๆ
ทั่วประเทศไทยด้วยเช่นกัน



บรรณานุกรม



- Allen, P. E., Laforest, L., Diyaljee, S. I., Smith, H. M., Tran, D. X., Winsor, A. M., & Dale, A. G. (2020). Long-term changes in mole cricket body size associated with enemy-free space and a novel range. *Biological Invasions*, 22(2), 773–782.
- Arévalo HA., & Frank JH. (2005). Nectar sources for *Larra bicolor* (Hymenoptera: Sphecidae), a parasitoid of *Scapteriscus* mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae), in northern Florida. *Florida Entomologist* 88, 146-15.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Belluco S, Losasso C, Maggioletti M, Alonzi C, Ricci A., & Paoletti MG. (2015). Edible insects: a food security solution or a food safety concern? *Animal Frontiers*, 5(2), 25-30.
- Cadena-Castañeda, O. J. (2015). The phylogeny of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpoidea: Gryllotalpidae). *Zootaxa*, 3985(4), 451–490. ,
- Dai, C., & Ding, Y. (2022). Importance of the Oriental mole cricket (*Gryllotalpa orientalis*) to gatherers' livelihoods in Guiyang city, China. *Journal of Insects and Food and Feed*, 8, 701-710.
- Endo, C. (2007). The underground life of the oriental mole cricket: an analysis of burrow morphology. *Journal of Zoology*, 273(4), 414–420.
- Endo, C. (2008). An analysis of the horizontal burrow morphology of the oriental mole cricket (*Gryllotalpa orientalis*) and the distribution pattern of surface vegetation. *Canadian Journal of Zoology*, 86, 1299-1306.
- Endo, C., Ikeda, Y., & Satoh, A. (2011). Variation in wing dimorphism of oriental mole cricket *Gryllotalpa orientalis*: Comparative study in Okinawa and Hyogo populations. *Entomological Science*, 14(1), 103–105.

File:Gryllotalpidae-verbretung.png - Wikimedia Commons. (n.d.). Retrieved January 12, 2024, from <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gryllotalpidae-verbretung.png>.

Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.

Hayashi, Y., Yoshimura, J., Roff, D. A., Kumita, T., & Shimizuid, A. (2018). *Four types of vibration behaviors in a mole cricket. PLoS One*, 13(10), e0204628.

Heo J., Lee D., Son M., Yun C., Hwang J., Kang S., Kim T., & Lee S. (2008). Effects of mole crickets (*Gryllotalpa orientalis*) extracts on anti-oxidant and anti-inflammatory activities. *Journal of Life Science*, 18(4), 509-514.

Jeong, HK. (1994). Check list of insects from Korea, *KonKuk Univ. Press*, Seoul.

Kanthawongwan T., Wattanachaiyingchareon W., & Hinhumpatch P. (2019). Acetylcholineesterase-inhibiting insecticide residues in commonly consumed fried edible insects. *EnvironmentAsia*, 12, 68-73.

Kazemi, M. H., Jafari, S., Lotfalizadeh, H., & Jafarloo, M. (2013). Wing dimorphism of European mole cricket *Gryllotalpa gryllotalpa* (L.) (Orthoptera: Gryllotalpidae) in the north-west of Iran. *JOURNAL OF ZOOLOGY*, 9(1), 45-50.

Kim, I., Cha, S. Y., Kim, M. A., Lee, Y. S., Lee, K. S., Choi, Y. S., Hwang, J. S., Jin, B. R., & Han, Y. S. (2007b). Mitochondrial DNA sequence variation of the Oriental mole cricket, *Gryllotalpa orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae) in Korea. *International Journal of Industrial Entomology*, 14, 107-112.

Kim, I., Cha, S. Y., Kim, M. A., Lee, Y. S., Lee, K. S., Choi, Y. S., Hwang, J. S., Jin, B. R., & Han, Y. S. (2007b). Polymorphism and genomic structure of the A+T-rich region of mitochondrial DNA in the oriental mole cricket, *Gryllotalpa Orientalis*

(Orthoptera: Gryllotalpidae). *Biochemical Genetics*, 45(7–8), 589–610.

<https://doi.org/10.1007/S10528-007-9099-5/TABLES/3>

Kim, I., So, Y. C., Myung, H. Y., Jae, S. H., Sang, M. L., Hung, D. S., & Jin, B. R. (2005).

The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the oriental mole cricket, *Gryllotalpa orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Gene*, 353(2), 155–168.

Koide, S. S. (1998). Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks. *Nutrition Research*, 18(6), 1091–1101.

Labu, S., Subramanian, S., Cheseto, X., Akite, P., Kasangaki, P., Chemurot, M., Tanga, C. M., Salifu, D., & Egonyu, J. P. (2022). Agrochemical contaminants in six species of edible insects from Uganda and Kenya. *Current Research in Insect Science*, 2, 100049.

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.

Litsinger, J. A., Canapi, B. L., Bandong, J. P., Lumaban, M. D., Raymundo, F. D., & Barrion, A. T. (2009). Insect pests of rainfed wetland rice in the Philippines: population densities, yield loss, and insecticide management. *International Journal of Pest Management*, 55(3), 221–242.

Nevo, E., Beiles, A., Korol, A. B., Ronin, Y. I., Pavlicek, T., & Hamilton, W. (2000). Extraordinary multilocus genetic organization in mole crickets, gryllotalpidae. *Evolution*, 54(2), 586–605.

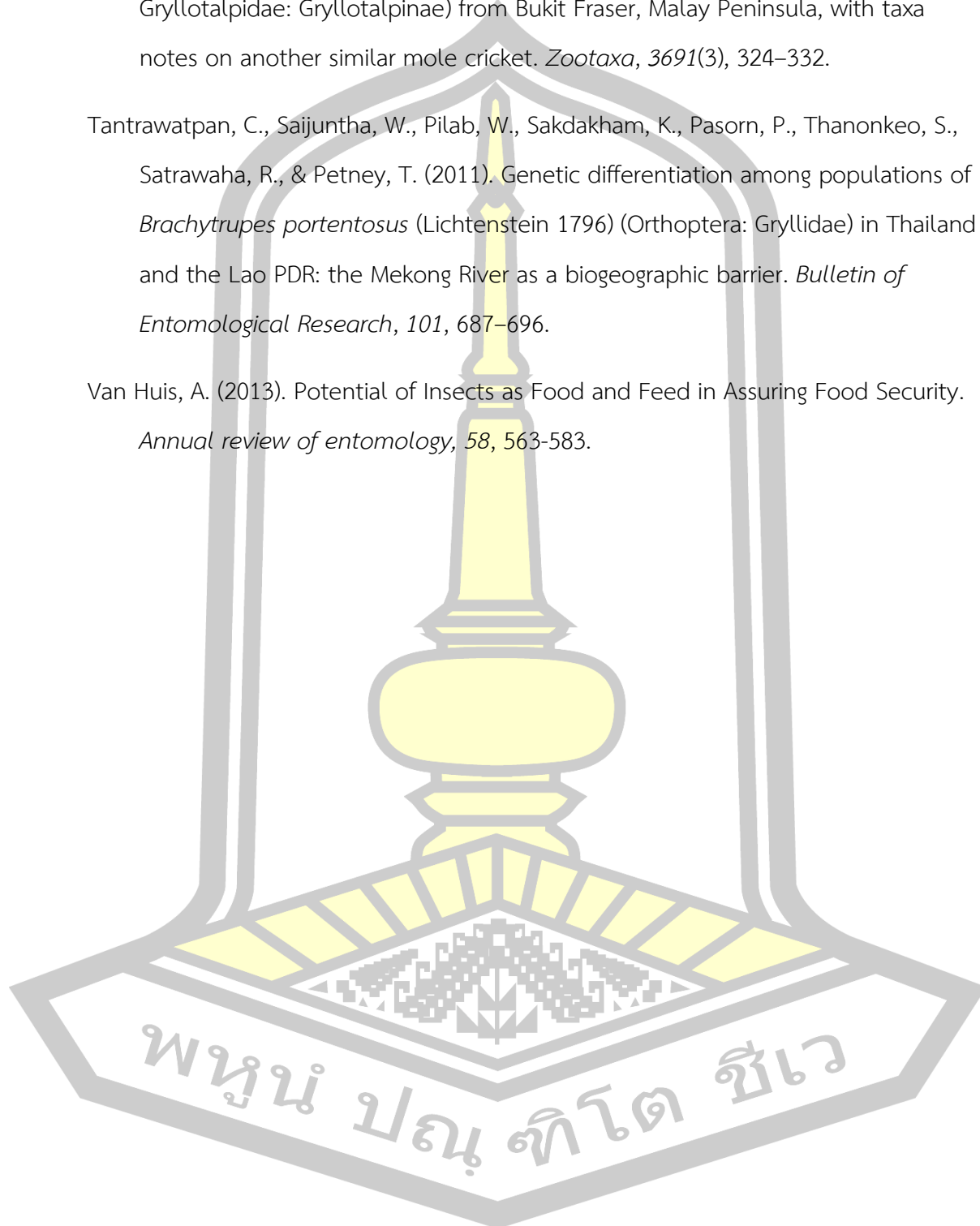
Ozdemir, S., Dede, G., Dede, O. H., & Turp, S. M. (2019). Composting of sewage sludge with mole cricket: stability, maturity and sanitation aspects. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(10), 5827–5834.

- Prasanna VA, Anbalagan S, Pandiarajan J, Dinakaran S, Krishnan M. 2012. A new species of the mole cricket genus *Gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae) from India. *Zootaxa*, 3597, 41-46.
- Portman, S. L., Frank, J. H., Mcsorley, R., & Leppla, N. C. (2009). Fecundity of *Larra bicolor* (Hymenoptera: Crabronidae) and Its Implications in Parasitoid: Host Interaction with Mole Crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae: Scapteriscus). *Florida Entomologist*, 92, 58-63.
- Pradit, N., Saijuntha, W., Pilap, W., Suksavate, W., Agatsuma, T., Jongsomchai, K., Kongbuntad, W., & Tantrawatpan, C. (2022). Genetic variation of *Tarbinskiellus portentosus* (Lichtenstein 1796) (Orthoptera: Gryllidae) in mainland Southeast Asia examined by mitochondrial DNA sequences. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(1), 955–964.
- Ramos-Elorduy, J. (2009). Anthro-entomophagy: Cultures, evolution and sustainability. *Entomological Research*, 39(5), 271–288.
- Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1–27.
- Sezen K, Isci S, Muratoglu H, Inan K, Demirbag Z. 2013. Identification and pathogenicity of bacteria from *Gryllotalpa gryllotalpa* L. (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Türk. Biyo. Müc. Derg.* 4: 89-108.
- Sun, K., Guan, D. L., Huang, H. T., & Xu, S. Q. (2023). Genome Survey Sequencing of the Mole Cricket *Gryllotalpa orientalis*. *Genes*, 14(2), 255.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Tan, M. K. (2016). Annotated checklist and key to species of *Gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae) from the Oriental region. *Zootaxa*, 4132(1), 77–86.

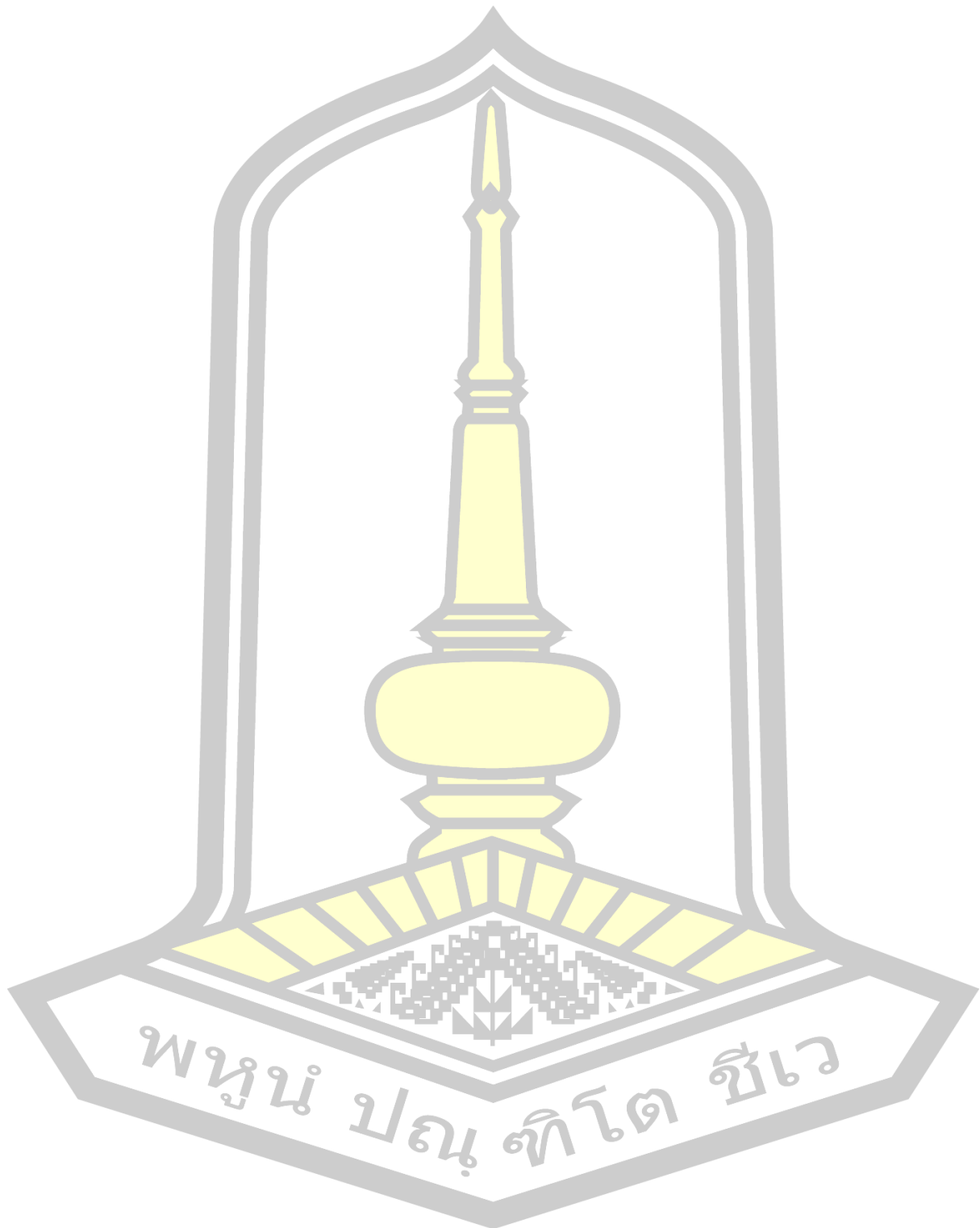
Tan, M. K., & Kamaruddin, K. N. (2013). A new species of mole cricket (Orthoptera: Gryllotalpidae: Gryllotalpinae) from Bukit Fraser, Malay Peninsula, with taxa notes on another similar mole cricket. *Zootaxa*, 3691(3), 324–332.

Tantrawatpan, C., Saijuntha, W., Pilab, W., Sakdakhom, K., Pasorn, P., Thanonkeo, S., Satrawaha, R., & Petney, T. (2011). Genetic differentiation among populations of *Brachytrupes portentosus* (Lichtenstein 1796) (Orthoptera: Gryllidae) in Thailand and the Lao PDR: the Mekong River as a biogeographic barrier. *Bulletin of Entomological Research*, 101, 687–696.

Van Huis, A. (2013). Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annual review of entomology*, 58, 563–583.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CO1 จำนวน 37 แฮปโลไทป์ (Go1-Go37)

>Go1

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
 GTTGAAGTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
 ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
 AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
 TCACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
 GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
 TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go2

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
 GTTGAAGTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
 ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
 AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
 TCACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
 GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
 TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go3

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
 GTTGAAGTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
 ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGGGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
 AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
 TCACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
 GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
 TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go4

CTCCTACCTCCTTCGTTAACTCTTCTTCTTGCATCAAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCACCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATTTAACC
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTAGGTA
TTACTGCACTTCTACTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACCATGCTTCTTACT
GACCGTAATCTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGGGGTGATCCCATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go5

CTCCTACCTCCTTCATTAACCTCTTCTTCTTGCATCAAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACTGG
TTGAACTGTATATCCACCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATTTAACCA
TTTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAATA
ATCAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTAGGTAT
TACTGCACTTCTACTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACCATGCTTCTTACTG
ATCGTAATCTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGGGGTGATCCCATCTTATACCAACAT
TTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go6

CTTCTTCCCCCTCATTGACTCTTCTTCTTGCATCCAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACTG
GCTGAACCGTATATCCCCCTCTATCCTCTAATATCGCTCATGCAGGATCTTCTGTAGACTTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATACGCTCTCCTGGAATATCCTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTTGGTA
TTACTGCACTCCTCTTTTATTATCCTTGCCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACCATACTCCTAACC
GATCGTAATTTAAATACATCCTTCTTTGATCCTGCCGAGGTGGAGACCCTATCCTTTATCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go7

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACAG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go8

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACAG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATATCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go9

CTCCTACCTCCTTCATTAACCTCTTCTTCTTGCATCAAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACAGG
TTGAACTGTATATCCACCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATTAAACCA
TTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAATA
ATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTAGGTAT
CACTGCACTTCTACTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACCATGCTTCTTACTG
ATCGTAATTTAAATACATCTTTTTTGATCCTGCTGGAGGGGGTGATCCCATCTTATACCAACAT
TTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go10

CTCCTACCTCCTTCGTTAACTCTTCTTCTTGCATCAAGTATAATTGATGTCGGAGCAGGAACTGG
TTGAACTGTATATCCACCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATTTAACCA
TTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAATA
ATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTAGGTAT
TACTGCACTTCTACTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACCATGCTTCTTACTG
ACCGTAATCTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGGGGTGATCCCATCTTATACCAACAT
TTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go11

CTCCTACCTCCTTCGTTAACTCTTCTTCTTGCATCAAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCACCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATTTAACC
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTAGGTA
TTACTGCACTTCTACTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACCATGCTTCTTACT
GACCGTAATCTAAATACATCTTTCTTTGATCCTGCTGGAGGGGGTGATCCCATCTTATACCAAC
ATTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go12

CTCCTACCTCCTTCGTTAACTCTTCTTCTTGCATCAAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCACCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATTTAACC
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TTACTGCACTTCTACTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACCATGCTTCTTACT
GACCGTAATCTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGGGGTGATCCCATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go13

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go14

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTCTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCCTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go15

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTGTTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go16

CTTCTTCCCCCTCATTGACTCTTCTTCTTGCATCTAGCATAGTTGATGTCGGGGCAGGAACTG
GCTGAACCGTATACCCTCCTCTATCCTCTAATATCGCCCATGCAGGATCTTCTGTAGACTTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATACGCTCCCCTGGTATATCCCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTTGGTA
TTACTGCACTCCTCCTTTTACTATCCCTGCCAGTTCTAGCAGGAGCTATCACCATACTCCTAACC
GATCGTAATTTAAATACATCCTTCTTTGATCCTGCCGGAGGTGGAGACCCTATCCTTTATCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go17

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCAGGGATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTCAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go18

CTTCTTCCCCCTCATTGACTCTTCTTCTTGCATCTAGCATAGTTGATGTCGGGGCAGGAACTG
GCTGAACCGTGTATCCTCCTCTATCCTCTAATATCGCCCATGCAGGATCTTCTGTAGACTTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATACGCTCCCCTGGTATATCCCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTTGGTA
TCACTGCACTCCTCCTTTTACTATCCCTGCCAGTTCTAGCAGGAGCTATCACCATACTCCTAACC
GATCGTAATTTAAATACATCCTTCTTTGATCCTGCCGGAGGTGGAGACCCTATCCTTTATCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go19

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACCACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go20

CTTCTCCCTCCCTCATTAACCCCTCCTTCTTGCATCAAGTATAGTTGATGTTGGGGCAGGAACTG
GCTGAACTGTATACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGACCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTTAATTTTATTACCACAAT
AATCAATATACGCTCCCCAGGAATATCTTTAGATCAAACCTCCTTTATTTGTTTGAGCTGTAGGTA
TCACTGCACTCCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACTTCTCACT
GATCGTAATTTAAATACATCCTTCTTTGATCCCGCTGGAGGGGGAGACCCTATTTTATACCAAC
ATTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go21

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATCGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go22

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAGCA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go23

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTACCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go24

CTTCTTCCCCCTCATTGACTCTTCTTCTTGCATCCAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACTG
GCTGAACCGTATATCCCCCTCTATCCTCTAATATCGCTCATGCAGGATCTTCTGTAGACTTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATACGCTCTCCTGGAATATCCTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTTGGTA
TACTGCACTCCTCCTTTTATTATCCTTGCCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACCATACTCCTAACC
GATCGTAATTTAAATACATCCTTCTTGATCCTGCTGGAGGTGGAGACCCTATCCTTTATCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go25

CTTCTTCCCCCTCATTGACTCTTCTTCTTGCATCTAGCATAGTTGATGTCGGGGCAGGAACTG
GCTGAACCGTATATCCTCCTCTATCCTCTAATATCGCCCATGCAGGATCTTCTGTAGACTTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATACGCTCCCCTGGTATATCCCTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTTGGTA
TTACTGCACTCCTCCTTTTACTATCCCTGCCAGTTCTAGCAGGAGCTATCACCATACTCCTAACC
GATCGTAATTTAAATACATCCTTCTTTGATCCTGCCGGAGGTGGAGACCCTATCCTTTATCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go26

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCCTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go27

CTTCTTCCCCCTCCTTAACTCTCCTTCTCGCATCAAGTATAGTTGATGTCGGAGCGGGTACTG
GTTGGACTGTATATCCCCCTTTATCTTCTAATATTGCTCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTCACT
ATTTTTCTTTACACTTAGCAGGTGTATCTTCCATTCTAGGCGCAGTTAACTTTATTACCACAAT
AATTAATATACGCTCCCCAGGAATATCTTTAGATCAAACCCCTTTATTTGTCTGAGCTGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTACTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACTCCTCACT
GATCGTAATCTGAATACATCCTTCTTCGATCCTGCTGGAGGGGGAGATCCTATTCTATATCAAC
ATTTATTTTGATTTTTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go28

CTTCTTCCCCCTCCTTAAGTCTCCTTCTCGCATCAAGTATAGTTGATGTCGGAGCGGGTACTG
GTTGGACTGTATATCCCCCTTATCTTCTAATATTGCTCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTCACT
ATTTTTCTTTACACTTAGCAGGTGTATCTTCCATTCTAGGCGCAGTTAACTTTATTACCACAAT
AATTAATATACGCTCCCCAGGAATATCTTTAGCTCAAACCCCTTTATTTGTCTGAGCTGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTACTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACTCCTCACT
GATCGTAATCTGAATACATCCTTCTTCGATCCTGCTGGAGGGGGAGATCCTATTCTATATCAAC
ATTTATTTTGATTTTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go29

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTATCCTCTAATATTGCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACGTCCTTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go30

CTTCTTCCCCCTCATTGACTCTTCTTCTTGCATCCAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACTG
GCTGAACCGTATATCCCCCTCTATCCTCTAATATCGCTCATGCAGGATCTTCTGTAGACTTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATACGCTCTCCTGGAATATCCTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCTGTTGGTA
TACTGCACTACTCCTTTTATTATCCTTGCCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACCATACTCCTAACC
GATCGTAATTTAAATACATCCTTCTTTGATCCTGCCGAGGTGGAGACCCTATCCTTTATCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go31

CTTCTTCCCCCTCATTGACTCTTCTTCTTGCATCCAGTATAGTTGATGTCGGAGCAGGAACTG
GCTGAACCGTATATCCCCCTCTATCCTCTAATATCGCTCATGCAGGATCTTCTGTAGACTTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGTATCTTCTATTTTAGGAGCAGTTAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATACGCTCTCCTGGAATATCCTTAGACCAAACCCCTTTATTCGTTTGAGCTGTTGGTA
TTACTGCACTCCTCCTTTTATTATCCTTGCCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACCATACTCCTAACC
GATCGTAATTTAAATACATCCTTCTTTGATCCTGCCGGAGGTGGAGACCCTATCCTTTATCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go32

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCCTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go33

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go34

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGATCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go35

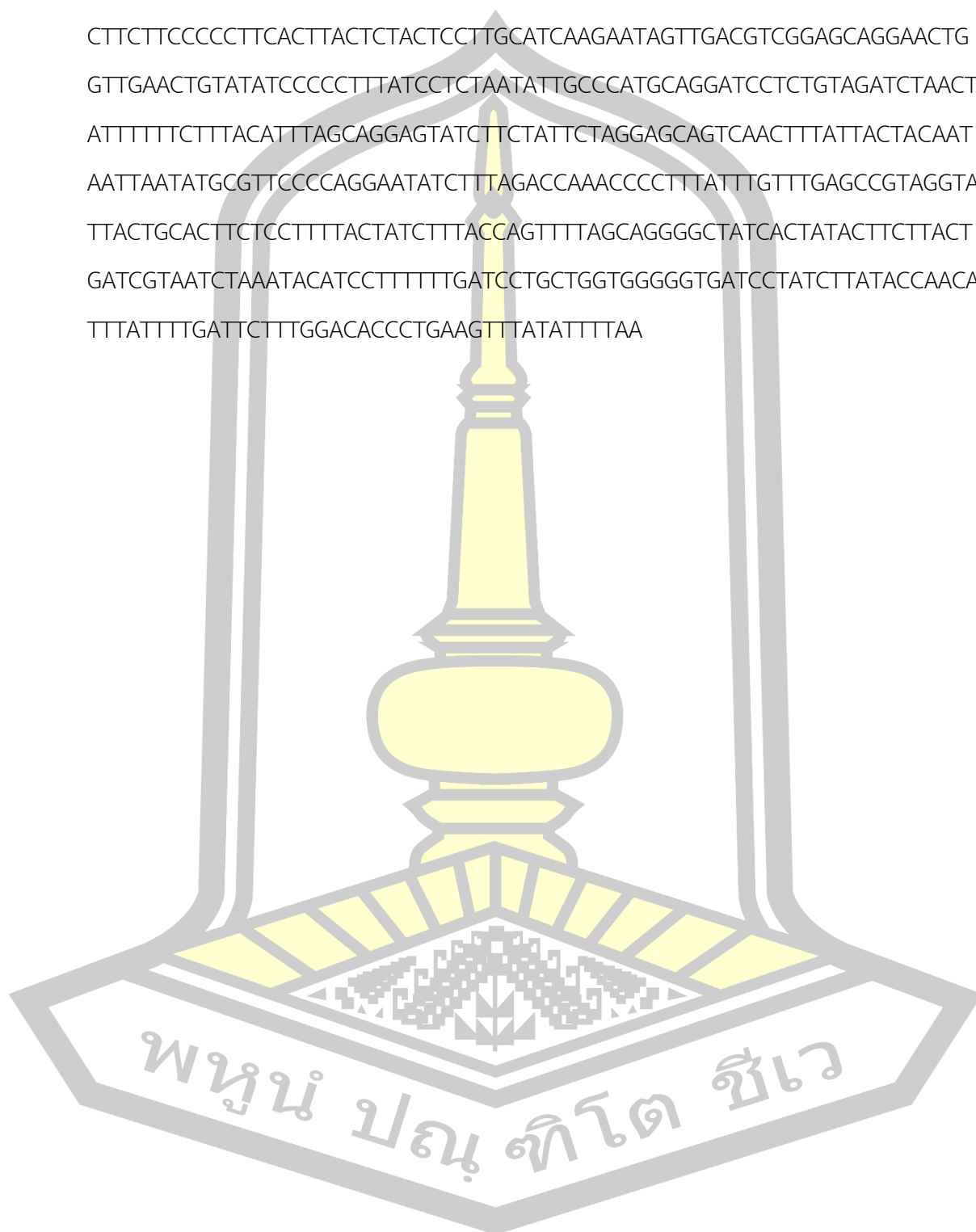
CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go36

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTGTATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TACTGCACTTCTCCTTTTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA

>Go37

CTTCTTCCCCCTTCACTTACTCTACTCCTTGCATCAAGAATAGTTGACGTCGGAGCAGGAACTG
GTTGAACTGTATATCCCCCTTTATCCTCTAATATTGCCCATGCAGGATCCTCTGTAGATCTAACT
ATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTATCTTCTATTCTAGGAGCAGTCAACTTTATTACTACAAT
AATTAATATGCGTTCCCCAGGAATATCTTTAGACCAAACCCCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGGTA
TTACTGCACTTCTCCTTTTACTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATCACTATACTTCTTACT
GATCGTAATCTAAATACATCCTTTTTTGATCCTGCTGGTGGGGGTGATCCTATCTTATACCAACA
TTTATTTTGATTCTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAA



ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จำนวน 15 แอสโตรไฟท์ (Gr1-Gr15)

>Gr1

GACTTACTAATAAACTACTGCGCCCTATAGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTCTTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAAGTTATTATTACATCCCTAATAAAAGATCATTATACCACATATAATGTAAATTAAGAAAAGTTTTATCCTTTCTAACCCTCCAGTAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTTATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTCCCTTATTATAATTTAAGCTTTCTTACTTAAAAATGAAATTAATCCTAATATATAAGACAGTTATTATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACAGTCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACTCAACATAATAAGCATTGAGACATGTTT

>Gr2

GACTTACTAATAAACTACTGCGCCCTATAGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTCTTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAAGTTATTATTACATCCTTAATAAAAGATCATTATACCACATATAATGTAAATTAAGAAAAGTTTTATCCTTTCTAACCCTCCAGTAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTTATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTCCCTTATTATAATTTAAGCTTTCTTACTTAAAAATGAAATTAATCCTAATATATAAGACAGTTATTATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACAGTCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACTCAACATAATAAGCATTGAGACATGTTT

>Gr3

GACTTACTAATAAACTACTGCGCCCTATAGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTCTTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAAGTTATTATTACATCCCTAATAAAAGATCATTATACCACATATAATGTAAATTAAGAAAAGTTTCCATCTTTCTAACCCTCCAGTAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTTATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTCCCTTATTATAATTTAAGCTTTCTTACTTAAAAATGAAATTAATCCTAATATATAAGACAGTTATTATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACAG

TCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACTCAACATAATAAGCATT
GAGACATGTTT

>Gr4

GACTTACTAATAAACTACTGCGCCCTATTGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTT
TTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTATTACATCCC
TAATAAAAGATCATTATACCACATATAATGTAAATTAAGAAAAGTTTTATCTTTTCTAACC
CCAGTAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTCC
CTTATTATAATTTAAGCTTTCTTACTTAAAAATGAAATTAATCCTAATATATAAGACAGTTATT
ATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACAG
TCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACTCAACATAATAAGCATT
GAGACATGTTT

>Gr5

GACTTACTAATAAACTACTGCGCCCTATAGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTT
TTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTATTACATCCC
TAATAAAAGATCATTATACCACATATAATGTAAATTAAGAAAAGTTTTATCTTTTCTAACC
CCAGTAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTCC
CTTATTATAATTTAAGCTTTCTTACTTAAAAATGAAATTAATCCTAATATATAAGACAGTTATT
ATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACAG
TCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACTCAACATAATAAGCATT
GAGACATGTTT

>Gr6

GACTTACTAATAAACTACTGCGCCCTATAGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTTAATATTTT
TTGTCGATTAGAACTCTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTATCTTATCCC
TAATAAAAGATCATTATACCATTATAATGTAAAAATTAAGAAAAGTTTTATCTTTTCTAACC
CCAGTAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTC
CTTATTATAATTTAAGCTTTCTTACTCAAAAATGAAATTAATCCTAATATATAAGACAGTTAT
TATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACA

GTCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACCCAACATAATAAGCAT
TGAGACATGTTT

>Gr7

GACTTACTAATAATACTACTGCGGCCCTATAGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTTAATATTTTC
TTGTCGATTAGAACTCTTAAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTATCTTATCCC
TAATAAAAGATCATTATACCATTTATAATGTAAAAATTAAGAAAAGTTTTTCATCTTTCCTAACCG
CCCCAATAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTC
CCTTATTATAATTTAAGCTTTCTTACTCAAAAATGAAATTAAATCCTAATATATAAGACAGTTAT
TATCTCGTCAAACCCCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACA
GTCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACCCAACATAATAAGCAT
TGAGACATGTTT

>Gr8

GACTTACTAATAAACTACTGCGGCCCTATAGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTTAATATTTTC
TTGTCGATTAGAACTCTTAAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTATCTTATCCC
TAATAAAAGATCATTATACCATTTATAATGTAAAAATTAAGAAAAGTTTTTCATCTTTCCTAACCG
CCCCAATAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTC
CCTTATTATAATTTAAGCTTTCTTACTCAAAAATGAAATTAAATCCTAATATATAAGACAGTTAT
TATCTCGTCAAACCCCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACA
GTCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACCCAACATAATAAGCAT
TGAGACATGTTT

>Gr9

GACTTACTAATAAACTACTGCGGCCCTATAGTCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTTAATATTTTC
TTGTCGATTAGAACTCTTAAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTATCTTATCCC
TAATAAAAGATCATTATACCATTTATAATGTAAAAATTAAGAAAAGTTTTTCATCTTTCCTAACCG
CCCCAATAAAATATTTATTATTTTTATTAAATAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTC
CCTTATTACAATTTAAGCTTTCTTACTCAAAAATGAAATTAAATCCTAATATATAAGACAGTTAT
TATCTCGTCAAACCCCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACA

GTCAATATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGCCAGACCCAACATAATAAGCAT
TGAGACATGTTT

>Gr10

GACTTACTAATAAACTACTGCGCCCTACAGTATTCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTT
TTGTCGATTAGAGCTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTATCTAATCCC
TAATAAAGGATCATTATACCATCTAAATGTTAATAAAAGAAAAGTTTAAATCTTTCCTAACCAC
CCCAGTAAATATTTATTATTTATACTAAATAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTCC
CTTATCATAATTTAAGCTTTTTTACTTAAAAATGAAATTAATCTTAATATATAAGACAGTCATT
ATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACAG
TCAATATACTGCGGCCCTCCATTTATAATCGGTAGGCAGGTTAGACTCAACATTATAAACATT
GAGACATGTTT

>Gr11

GACTTACTTATAAACTACTGCGCCCTATAGTTATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTT
TTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTTGCTATCCAATCCC
TACTAGAAGATCATTAAATCATACAAAATGTTGAAATAAAGAAAAGCTTGCATCTTTCCTAACCA
CCCCAGTAAATATTTATTATTTATATTAATAACTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTC
CCTTATTATTATTTAAGCTTTTTTACCCAAAATGAAATTAATCTAATATATAAGACAGTTAT
TATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCCCTAATTAAAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACA
GTCAGTATACTGCGGCCCTCAATATATAATCGGTAGGCAGGTCAGACCCAACATAATAGACAT
CGAGACATGTTT

>Gr12

GACTTACTTATAAACTACTGCGCCCTATAGTTATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTT
TTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTCTCTCATCCC
TAATAAAAGATCATTAAACCAAATAAAATGTAAAAAATTAAGAAAAGTTTTATCTTTCCTAACC
ACCCAGTAAATATTTATTATTTATACTAAACAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGT
CCCTTATCATCATTTAAGCCTTCTTACTCAAATATGAAATCAATTATAATACATGAGACAGTTG
TTATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCTTCAATTAAAAGACTAATGATTATGCTACCTTTGCAC

AGTCAATATACTGCGGCCCCTCAATAAAATCGGTAGGCAGGCCAGACTTAACATAAAAGACATC
AAGACATGTTT

>Gr13

GACTTACTTATAAACTACTGCGCCCCTATAGTTATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTT
TTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTATTCTCTCATCCC
TAATAAAAGATCATTAAACCAAATAAAATGTAAAAATTAAGAAAAGTTTTATCTTTCTAACC
ACCCCAGTAAAATATTTATTATTATACTAAACAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGT
CCCTTATCATCATTTAAGCCTTCTTACTCAAATATGAAATTCAATTATAATACATGAGACAGTTG
TTATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCTTCAATTAAGAACTAATGATTATGCTACCTTTGCAC
AGTCAATATACTGCGGCCCCTCAATAAAATCGGTAGGCAGGCCATACTTAACATAAAAGACATC
AAGACATGTTT

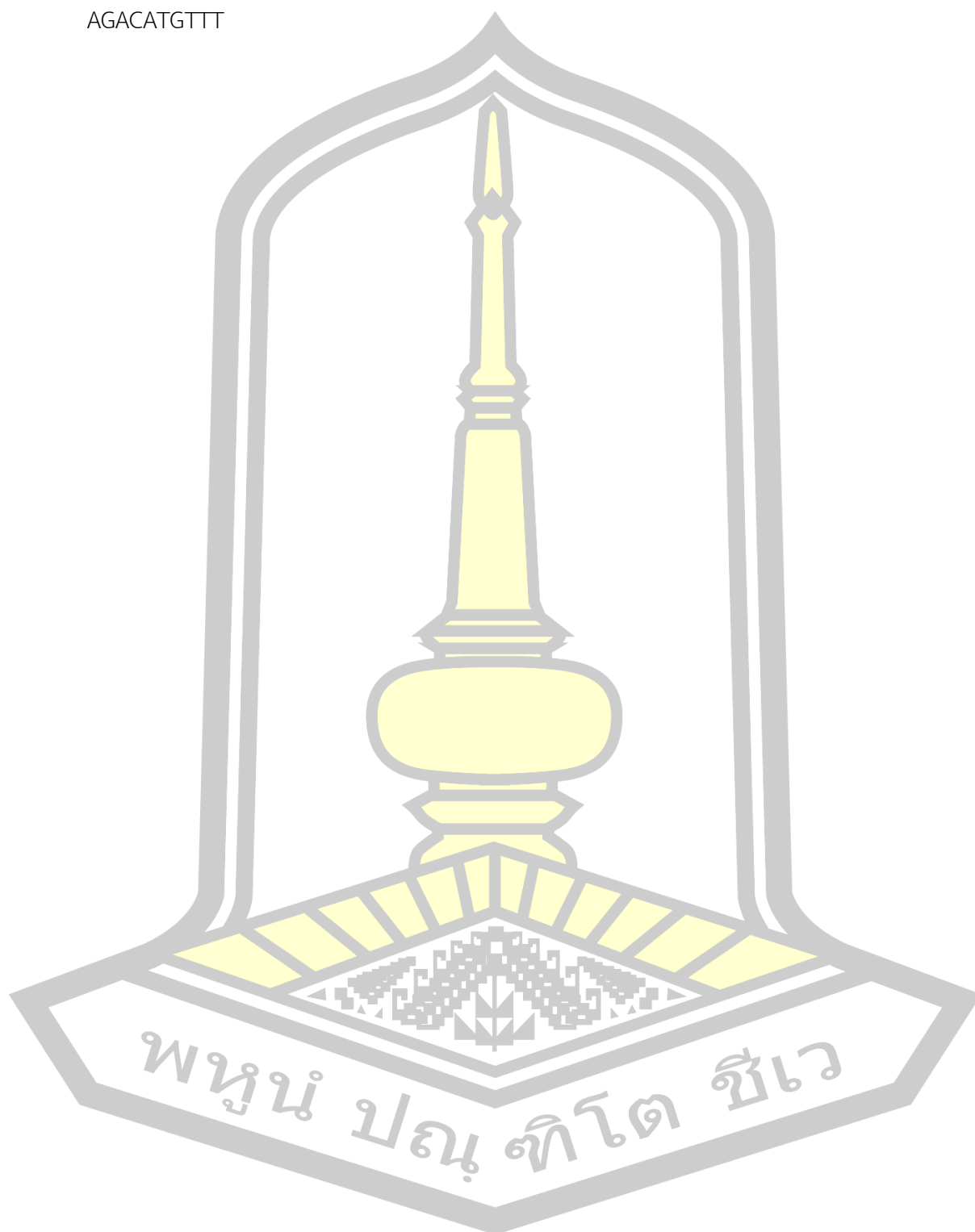
>Gr14

GACTTACTTATAAACTACTGCGCCCCATAGCCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTT
TTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTACTCTCTCATCCC
TAATAAAAGATCATTAAACCAAATAAAATGTAAAAATTAAGAAAAGTTTTATCTTTCTAACCA
CCCCAGCAAAATATTTATTATTATACTAAACAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTC
CCTTACTACCATTTAAGCCTTCTTACTCAAATATGAATTTCAATTATAATACATAAGACAGTTGT
TATCTCGTCAAACCTTCATTCCAGCCTTCAATTAAGAACTAATGATTATGCTACCTTTGCACA
GTCAATATACTGCGGCCCCTTAATAAAATCGGTAGGCAGGCCAGACTTAACATAAAAGACATCA
AGACATGTTT

>Gr15

GACTTACTTATAAACTACTGCGCCCCATAGCCATCCTAATCCAACATCGAGGTCTCAATATTTT
TTGTCGATTAGAACTCTTTAAGAAAATTAAGCTGTTATCCCTAAGGTAACCTACTCTCTCATCCC
TAATAAAAGATCATTAAACCAAATAAAATGTAAAAATTAAGAAAAGTTTTATCTTTCTAACCA
CCCCAGCAAAATATTTATTATTATACTAAACAATTCATATAAAGTTCTATAGGGTCTTATCGTC
CCTTACTACCATTTAAGCCTTCTTACTCAAATATGAATTTCAATTATAATACATAAGACAGTTGT
TATCTCGTCAAGCCCTTCATTCCAGCCTTCAATTAAGAACTAATGATTATGCTACCTTTGCACA

GTCAATATACTGCGGCCCTTAATAAAATCGGTAGGCAGGCCAGACTTGACATAAAAGACATCA
AGACATGTTT



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นาย วัชรพงศ์ วังโน
วันเกิด	1 กันยายน 2522
สถานที่เกิด	อำเภอสตึก จังหวัดบุรีรัมย์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 355/83 หมู่บ้านเดอะวิคตอเรีย ม.1 ต.ท่าสองคอน อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	พนักงานบริษัทสินเชื่อการตลาดรถยนต์มือสอง
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท ซี ไอ เอ็ม บี ไทย ออโต้ จังหวัดร้อยเอ็ด เลขที่ 268 ถนนหายโศก ม.11 ต.เหนือเมือง อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด 45000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2566 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาความหลากหลายทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูน ปณ ภัโต ชีเว