

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงชีปะขาว (อันดับ Ephemeroptera)
ในกลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทย

Genetic diversity of mayflies (Order Ephemeroptera)
in the Mekong River Basin of Thailand

นฤมล ประครองรักษ์¹ บุญเสฐียร บุญสูง² และ มณฑิรา มณฑาทอง^{1*}
Narumon Prakrongrak¹, Boonsatien Boonsoong² and Monthira Monthatong^{1*}

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น¹

Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University¹

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์²

Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University²

Email: monmon@kku.ac.th

Received : February 15, 2023

Revised : May 29, 2023

Accepted : June 2, 2023

บทคัดย่อ

แมลงชีปะขาว เป็นแมลงกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำในธรรมชาติ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงชีปะขาวในกลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทย โดยใช้ยีน cytochrome c oxidase (*COI*) ร่วมกับยีน 12S ribosomal RNA (*12S rRNA*) ตัวอย่างแมลงชีปะขาว จำนวน 38 ตัวอย่าง จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถระบุได้ถึงระดับสกุลจำนวน 10 สกุล ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากตัวอย่างของแมลงชีปะขาว ด้วยโปรแกรม MEGA พบว่าแมลงชีปะขาวทั้ง 10 สกุลมีค่า Intraspecific genetic divergence ของยีน *COI* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.00-1.42% โดยมีเฉลี่ยเท่ากับ 0.66% และค่า interspecific genetic divergence ของยีน *COI* มีค่าอยู่ระหว่าง 17.8-28.9% โดยมีเฉลี่ยเท่ากับ 24.0% ส่วนค่า Intraspecific genetic divergence ของยีน *12S rRNA* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.00-1.26% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.32% และค่า interspecific genetic divergence ของยีน *12S rRNA* มีค่าอยู่ระหว่าง 14.1-47.1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 34.1% จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum Likelihood (ML) analysis พบว่าทั้งยีน *COI* และ *12S rRNA* สามารถแยกแมลงชีปะขาวชีปะขาวจำนวน 38 ตัวอย่าง ออกเป็น 14 ชนิดได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *12S rRNA* ยังสามารถแบ่งกลุ่มแมลงชีปะขาวได้ 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่วงศ์ Heptageniidae วงศ์ Caenidae และวงศ์ Leptophlebiidae ออกได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ: แมลงชีปะขาว ความหลากหลายทางพันธุกรรม *COI 12S rRNA*

ABSTRACT

Mayflies are important aquatic insects that are used as bioindicators for water quality. This study investigated the genetic diversity of mayflies in the Mekong River Basin of Thailand using the cytochrome c oxidase (COI) gene and the 12s ribosomal RNA (12S rRNA) gene. Thirty-eight specimens of mayfly larvae were collected and morphologically classified to the lowest taxa. They belonged to ten genera. Genetic diversity and phylogenetic relationships were analyzed using the Maximum Likelihood (ML) method in MEGA. The intraspecific genetic divergence in COI sequences within mayfly genera ranged from 0.00% to 1.12%, with a mean value of 0.66%. The interspecific genetic divergence in COI sequences within mayfly genera ranged from 17.8% to 28.9%, with a mean value of 24.0%. The intraspecific genetic divergence in 12S rRNA sequences ranged from 0.00% to 0.86%, with a mean value of 0.32%. The interspecific genetic divergence in 12S rRNA sequences ranged from 14.1% to 47.1%, with a mean value of 34.1%. The phylogenetic relationships of the COI and 12S rRNA genes revealed that both genes were able to distinguish the mayflies in this study into 10 genera, which were monophyletic. Furthermore, the 12S rRNA gene was clearly classified among the mayflies of the family Heptageniidae, Caenidae, and Leptophlebiidae.

Keywords: Mayflies, Genetic diversity, *CO*, *12S rRNA*

บทนำ

แมลงชีปะขาวเป็นแมลงน้ำที่อยู่ในอันดับ Ephemeroptera มีความสำคัญต่อระบบนิเวศเป็นอย่างมาก นอกจากจะเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำแล้ว แมลงเหล่านี้ยังสามารถเป็นตัวชี้วัดของคุณภาพน้ำที่ดีได้ จึงมีการนิยมใช้แมลงชีปะขาวเพื่อการประเมินคุณภาพน้ำทางชีวภาพร่วมกับสโตนฟลาย และตัวอ่อนของแมลงหนอนปลอกน้ำ (Filter and Manue, 1986) แมลงชีปะขาวมีการกระจายตัวอยู่ทั่วโลกยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา โดยมีมากกว่า 3000 สปีชีส์ (Sartori and Brittain, 2015) ในทวีปเอเชียรวมถึงประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับแมลงชีปะขาวน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนชนิดที่มีกระจายอยู่ทั่วโลก

และระดับอนุกรมวิธานในระดับสกุลยังไม่แน่นอน (Soldán, 2001) เนื่องจากมีระยะตัวเต็มวัยสั้น ทำให้การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงซีปะขาวมักศึกษาระยะตัวอ่อน โดยตัวอ่อนส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็ก โดยมีขนาดประมาณ 1-4 เซนติเมตร ดังนั้นจึงยากต่อการจำแนกและระบุชนิด (Malzacher, 2015) การจำแนกแมลงซีปะขาว โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวยังคงประสบปัญหา เนื่องจากการแปรผันของฟีโนไทป์ในลักษณะที่มีความสำคัญทางอนุกรมวิธาน ซึ่งทำให้เกิดความยากลำบากอย่างยิ่งในระหว่างการทำจำแนกชนิด และอาจนำไปสู่การระบุชนิดที่ผิดพลาดได้ (McCafferty and Pereira, 1984) ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอนุกรมวิธานโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการจำแนกชนิด (species identification) การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) (Ball and Hebert, 2005; Ogden and Whiting, 2005; Gattolliat et al., 2015; Selvakumar et al., 2016) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นิยมใช้ในการศึกษา ชีสเทมาติคส์ ชีวภูมิศาสตร์ และนิเวศวิทยามักจะเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ โดยเฉพาะในการประยุกต์ในการสืบค้นความสัมพันธ์ในแง่ของวิวัฒนาการการสืบสายพันธุ์ โดย mitochondria DNA นั้น มีวิวัฒนาการค่อนข้างเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับ nuclear gene มีจำนวน copy ในเซลล์มาก และ mitochondria DNA ไม่เกิด genetic recombination และการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นแบบ maternally-inherited ทำให้แปลผลได้โดยไม่ซับซ้อนเหมือน nuclear genome (Williams et al., 2006) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงซีปะขาวในแม่น้ำโขงของประเทศไทยด้วยยีน *cytochrome oxidase subunit I (COI gene)* และ *12s ribosomal RNA genes (12s rRNA gene)* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย

วิธีการดำเนินการวิจัย

เก็บรวบรวมตัวอย่างและการระบุชนิด

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงซีปะขาวจากบริเวณแม่น้ำโขงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการใช้สวิง D-frame net ความถี่ตาข่าย 500 ไมโครเมตร โดยเก็บจุดย่อยละประมาณ 5 นาที เพื่อให้ครอบคลุมทุกถิ่นที่อยู่ นำตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก และเติมด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยตัวอย่างที่รวบรวมได้จะนำมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเพื่อจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานต่ำสุดเท่าที่จะสามารถทำได้ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยเอกสารทางวิชาการ ดังต่อไปนี้ Kang and Yang, 1994; Tong and Dudgeon, 2002; Sangpradub and Boonsoong, 2006; Jia et al., 2010; Malzacher, 2015; Malzacher and Sangpradub, 2021; Srinivasan et al., 2021 และเก็บรักษาสภาพในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากแมลงซีปะขาว

สกัดดีเอ็นเอจากแมลงซีปะขาวทั้งตัว ตัวอย่างละ 1 ตัว โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ GF-1 Nucleic acid extraction kits จากบริษัท Vivantis (Malaysia) วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ด้วย Nanodrop spectrophotometer (Bio-Active)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ศึกษาขึ้น 2 ตำแหน่ง คือ *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* และ *12S ribosomal RNA* ดังนี้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490 (5'-GGTCAACAAAT CATAAGATATTGG-3') และ HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994) ใน 1 ปฏิกริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.0 mM MgCl₂, 1x Vi buffer A, 200 μM dNTP, 0.2 μM primer, 50 ng/μl genomic DNA และ 2.0 unit Pfu DNA polymerase ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยมีขั้นตอนของ ปฏิกริยา (PCR profile) คือ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนการ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอน final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *12S rRNA* โดยใช้ไพรเมอร์ 12Sai (5'-AAACTACGATTAGA TACCTATTAT-3') และ 12Sbi (5'- AAGAGCGACGGGCGATGTGT-3') (Simon et al., 1994) ใน 1 ปฏิกริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.0 mM MgCl₂, 1x Vi buffer A, 200 μM dNTP, 0.2 μM primer, 20 ng/μl genomic DNA และ 2.0 unit Pfu DNA polymerase ปรับปริมาตรด้วย น้ำ deionized ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยมีขั้นตอนของปฏิกริยา (PCR profile) คือ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนการ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอน final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกริยา PCR จากบริเวณยีน *COI* และ *12S rRNA* นำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ชนิดเดียวกับที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ที่บริษัท MacroGen Inc. ประเทศเกาหลี โดยผลผลิตของปฏิกริยา PCR มีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300-500 ng/μl และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และ *12S rRNA* โดยตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7 (Hall, 1999) ประเมินคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเรียงเทียบ (alignment) ด้วยวิธี ClustalW ในโปรแกรม MEGA version 10 (Kumar et al., 2018) และตัดบริเวณ Indel (insertion/deletion) ด้วยโปรแกรม SeqFIRE (Ajawatanawong et al., 2012). ก่อนนำมาคำนวณหาระยะทางทางพันธุกรรม (genetic distance) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) โดยใช้ Kimura 2-parameter model และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) analysis (Model T92+G+I) ด้วยโปรแกรม MEGA ทำการวิเคราะห์ bootstrap 1,000 ซ้ำ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Barcode of Life Data Systems (BOLD) และ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) เพื่อเทียบหาชนิดในฐานข้อมูล

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงชีปะขาวจากบริเวณแม่น้ำโขงในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างแมลงชีปะขาวจากแม่น้ำโขงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยตัวอย่างที่รวบรวมได้จะนำมาจัดจำแนกเบื้องต้นและเก็บรักษาสภาพในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างแมลงชีปะขาวจากบริเวณแม่น้ำโขงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

วงศ์	แทกซา (จำนวนตัว)	สถานที่เก็บ	ผู้เก็บ	วันที่เก็บ	พิกัดทางภูมิศาสตร์	
Heptageniidae	<i>Componeuriella braaschi</i> (1)	Kang Saphue, Ubon Ratchathani	B. Boonsoong	2-2-61	15°19.232' N	105°29.888' E
Heptageniidae	<i>Afronurus</i> sp.1 (1)	Khong Chaim, Ubon Ratchathani	B. Boonsoong	3-2-61	15°14.728' N	105°14.636' E
Heptageniidae	<i>Thalerosphyrus sinuosus</i> (3)	Soi Sawan Waterfall, Ubon Ratchathani	B. Boonsoong	3-2-61	15°27.596' N	105°34.701' E
Heptageniidae	<i>Afronurus</i> sp.2 (3)	Soi Sawan Waterfall, Ubon Ratchathani	B. Boonsoong	3-2-61	15°27.596' N	105°34.701' E
Leptophlebiidae	<i>Sangpradubina thailandica</i> (6)	Kang Saphue, Ubon Ratchathani	B. Boonsoong	2-2-61	15°14.728' N	105°14.636' E
Leptophlebiidae	<i>Isca janiceae</i> (1)	Soi Sawan Waterfall, Ubon Ratchathani	B. Boonsoong	3-2-17	15°27.596' N	105°34.701' E
Caenidae	<i>Caenis</i> spp. (16)	Mekong River, Khong Chiam	B. Boonsoong	3-2-61	15°19.232' N	105°29.888' E

ตารางที่ 2 (ต่อ)

วงศ์	แทกซา (จำนวนตัว)	สถานที่เก็บ	ผู้เก็บ	วันที่เก็บ	พิกัดทางภูมิศาสตร์	
Caenidae	<i>Caenis</i> spp. (8)	Kaeng Saphue, Phibun Mangsahan	B. Boonsoong	2-2-61	15°14.728' N	105°14.636' E
Caenidae	<i>Caenis</i> spp. (7)	Kang Tana, Sirindhorn	B. Boonsoong	2-2-61	15°17.993' N	105°28.550' E
Caenidae	<i>Caenis</i> spp. (6)	Khut Khu Rapid Chiang Khan, Loei	C. Phalaraksh	9-3-61	17°54'26.8"N	101°42'06.1"E
Caenidae	<i>Caenis</i> sp. (2)	Soi Sawan Waterfall, Khong Chiam	B. Boonsoong	3-2-61	15°27.596' N	105°34.701' E
Caenidae	<i>Caenis</i> sp. (1)	Kaeng Tana, Sirindboon Ubon Ratchathani	B.Boonsoong	2-3-61	15°17.995N	105°28.550E
Caenidae	<i>Caenis</i> sp. (5)	Kaeng Saphue, Phibun Mangsahan	B. Boonsoong	2-2-61	15°14.728' N	105°14.636' E
Caenidae	<i>Cercobrachys</i> sp. (3)	Mekong River, Mueang NakhonPanom	P. Getwongsa	11-2-61	17°48'2741' N	104°7'29156' E
Caenidae	<i>Clypeocaenis</i> sp. (4)	Mekong River, A.Sangkhor, NongKhai	P. Getwongsa	4-2-61	18°0'78543' N	102°2'59733' E
Caenidae	<i>Caenis</i> sp. (1)	Mekong River, Mueang Mukdahan	P. Getwongsa	12-2-61	16°5'590228' N	104°7'34335' E

ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ดีเอ็นเอของแมลงชีปะขาวจำนวน 38 ตัวอย่าง นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยบริเวณยีน *COI* เพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 1 แถบ มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส และยีน *12S rRNA* ใช้คู่ไพรเมอร์ 12Sai และ 12Sbi สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 1 แถบ มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส และโดยพบว่าทั้ง 2 ยีนไม่ปรากฏแถบคู่ของดีเอ็นเอ เป็นการตรวจสอบในเบื้องต้นว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไม่ใช่ pseudogenes (Jalali et al., 2015) ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR จากบริเวณยีน *COI* และยีน *12S rRNA* นำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse นำมาตัดลำดับเบสด้านหน้าและท้ายที่ไม่มีความน่าเชื่อถือออก โดยใช้โปรแกรม Bioedit (Hall, 1999) พบว่าขนาดของยีน *COI* และ *12S rRNA* ที่นำมาวิเคราะห์ต่อมีขนาด 653 และ 376 คู่เบส ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Bolddsystems และ GenBank

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* กับฐานข้อมูล Bolddsystems และ GenBank เพื่อเทียบกับชนิดที่มีในฐานข้อมูล พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Similarity) กับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานในฐานข้อมูล อยู่ระหว่าง 80-98 เปอร์เซ็นต์ จากการจำแนกและระบุชนิดของ

แมลงซีปะขาวเบื้องต้นพบว่ายังไม่มีชนิดใดตรงกับชนิดที่มีรายงานในฐานข้อมูลเป็นเพียงข้อมูลที่ตรงกับระดับสกุลเท่านั้น ทั้งนี้อาจเกิดจากแมลงซีปะขาวที่พบยังไม่มีการรายงานเข้าไปในฐานข้อมูล เพราะข้อมูลทางด้านโมเลกุลของแมลงซีปะขาวยังคงมีจำนวนน้อยมาก และนอกจากนี้ยังพบว่ามียางตัวอย่างที่ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากสองฐานข้อมูลขัดแย้งกันและขัดแย้งกับการจำแนกจากรูปร่างภายนอกซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าข้อมูลในฐานข้อมูลทั้งสองนี้อาจจะมีการระบุชนิดที่ไม่ตรงกัน

ผลการวิเคราะห์ค่า Genetic divergence ของแมลงซีปะขาว

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และ *12s rRNA* และนำมาคำนวณค่า genetic divergence ด้วยโมเดล Kimura2-parameter ด้วยโปรแกรม MEGA (Kumar et al., 2018) และ *Gomphiocephalus hodgsoni* (Collembola) Accession number AY191995 เป็น outgroup พบว่าค่า Intraspecific genetic divergence ของยีน *COI* มีค่าอยู่ระหว่าง 0-1.12% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.66% โดย *Clypeocaenis* sp. มีค่า Intraspecific ต่ำที่สุด ส่วน *Afronurus* sp.1 *Compsoeuriella braaschi*, *Choroterpes proba*, *Isca janiceae* และ *Thraululus* sp. ไม่สามารถคำนวณค่าได้เนื่องจากมีเพียงชนิดละหนึ่งตัวอย่าง ส่วนค่า interspecific genetic divergence ของยีน *COI* มีค่าอยู่ระหว่าง 17.8-28.9% โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.0% ดังแสดงในตารางที่ 2 ค่า Intraspecific genetic divergence ของยีน *12s rRNA* มีค่าอยู่ระหว่าง 0-0.86% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.32% โดย *Caenis* sp.3, *Caenis longiforcipata*, *Cercobrachys* sp. และ *Clypeocaenis* sp. มีค่า Intraspecific ต่ำที่สุด และค่า interspecific genetic divergence ของยีน *12s rRNA* มีค่าอยู่ระหว่าง 14.1-47.1% โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 34.1% ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาค่า Intraspecific genetic divergence ของยีน *COI* พบว่ามีค่าสูงถึง 1.12% โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ศึกษาในแมลงซีปะขาวได้รายงานว่าความแตกต่างของค่า intraspecific สูงสุดคือ 3.4% และความแตกต่างของค่า interspecific ขั้นต่ำคือ 3.3% (Ball et al., 2005; Kjaerstad et al., 2012; Webb et al., 2012; Zhou et al., 2010; Gattolliat, 2015). ถึงแม้ว่าในงานวิจัยจะมีค่า Intraspecific สูง แต่ก็ยังคงมีค่าน้อยกว่าที่เคยมีรายงาน ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าค่า interspecific genetic divergence ของยีน *12S rRNA* นั้นสูงกว่ายีน *COI* เกือบทุกสปีชีส์จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีน *12S rRNA* นั้นได้รับการอนุรักษ์อย่างสูงในแมลงและใช้สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับ phyla และยีน *16S rRNA* ยังนิยมใช้สำหรับการศึกษาในระดับต่ำและระดับกลาง เช่นในระดับวงศ์ หรือสกุล (Hickson et al., 1996; Gerber et al., 2001; Mandal et al., 2014)

ผลการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships)

จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า ทั้งยีน *COI* และ *12S rRNA* สามารถแยกแมลงซีปะขาวซีปะขาวจำนวน 38 ตัวอย่าง ออกเป็น 14 ชนิดได้เช่นเดียวกัน (ภาพประกอบ 1 และภาพประกอบ 2) สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *12S rRNA* สามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่วงศ์

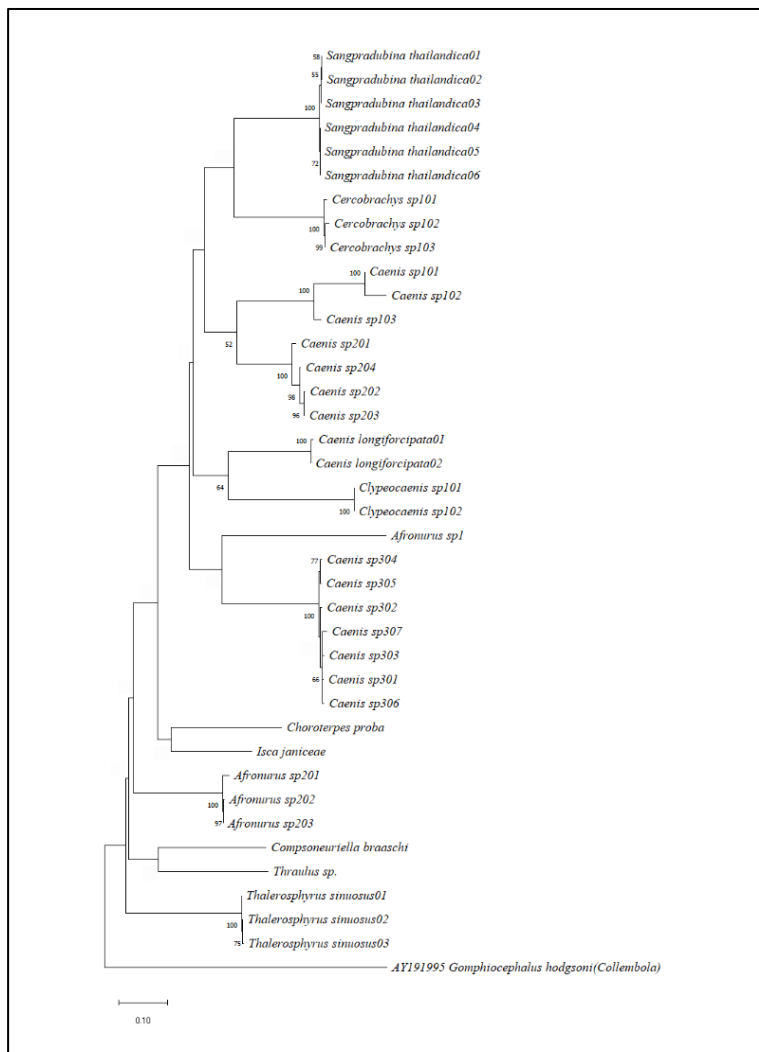
Heptageniidae วงศ์ Caenidae และวงศ์ Leptophlebiidae ในขณะที่สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *COI* ไม่ได้ถูกแบ่งในระดับของวงศ์ แต่ *COI* เป็นยีนที่นิยมใช้สำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุสายพันธุ์ของสัตว์รวมถึงนิยมใช้เพื่อระบุชนิดในกลุ่มแมลงอีกด้วย (Ball et al., 2005; Kjaerstad et al., 2012; Zhou et al., 2010; Gattolliat, 2015) และมีอัตราการทดแทนนิวคลีโอไทด์สูงซึ่งช่วยในการจำแนกสปีชีส์ที่เป็น cryptic species ได้ (Hebert et al., 2003) ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *COI* และ *12s rRNA* มีประสิทธิภาพสูงในการระบุชนิดและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงชีปะขาว โดยมีค่าเฉลี่ยของ interspecific distance เท่ากับ 24.0% และ 34.1% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสูงมากกว่า 10 เท่า ของค่าเฉลี่ย intraspecific distance 0.66% และ 0.32% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของยีน *COI* ยังไม่ชัดเจนเนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนน้อยเกินไป เช่น *Afronurus* sp.1, *Compsoneriella braaschi*, *Choroterpes proba*, *Isca janiceae* และ *Thraulius* sp. ซึ่งมีเพียงชนิดละหนึ่งตัวอย่างเท่านั้น และนอกจากนี้ยีนที่เข้ารหัสโปรตีน (protein-coding genes) เช่นยีน *COI* มักจะมีอัตราการแทนที่เบสสูง (base substitutions) และอัตราการวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (molecular evolution) สูงขึ้นประมาณสามเท่าเมื่อเทียบกับบริเวณที่ไม่ได้เข้ารหัส เช่น *12S* หรือ *16S rRNA* (Knowlton and Weigt, 1998)

ตารางที่ 2 แสดงค่า interspecific genetic divergence วิเคราะห์จากยีน *COI*

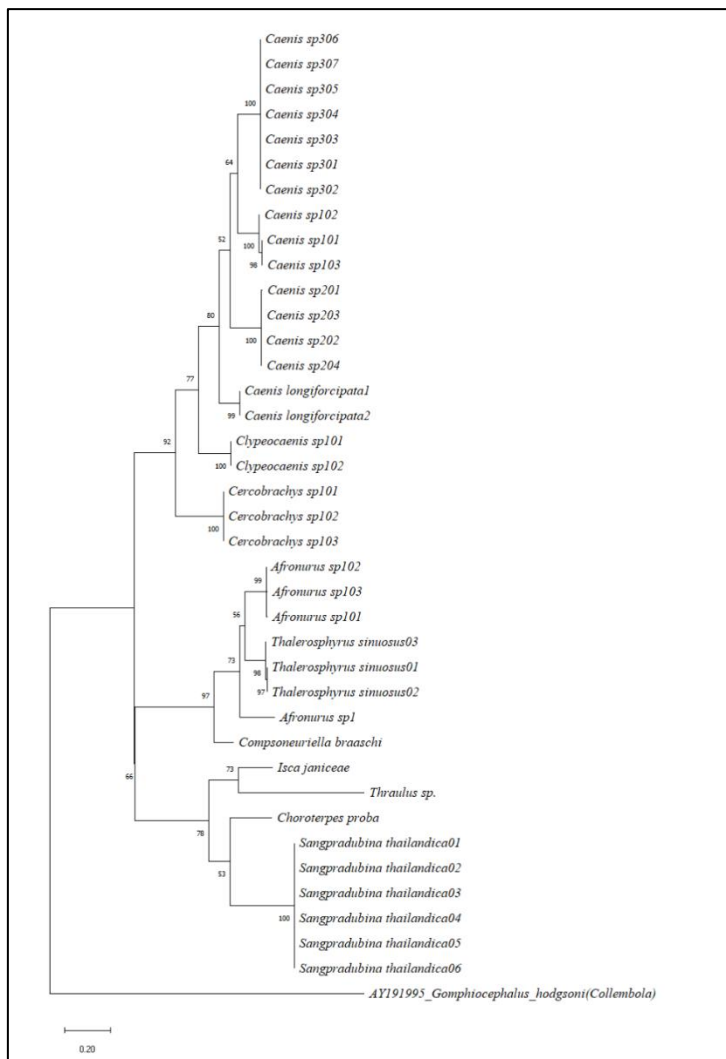
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	outgroup
1	<i>Afronurus</i> sp.1															
2	<i>Afronurus</i> sp.2	24.1														
3	<i>Caenis</i> sp.1	28.3	24.6													
4	<i>Caenis</i> sp.2	27.6	23.3	21.9												
5	<i>Caenis</i> sp.3	24.7	25.0	27.2	22.8											
6	<i>Caenis longiforcipata</i>	26.4	23.8	26.8	20.5	23.8										
7	<i>Compsoneriella braaschi</i>	23.1	21.8	27.9	24.2	26.3	24.6									
8	<i>Cercobrachys</i> sp.	27.7	25.3	23.6	18.7	24.2	20.3	21.0								
9	<i>Clypeocaenis</i> sp.	27.4	23.1	26.1	21.9	24.4	20.7	27.3	23.8							
10	<i>Choroterpes proba</i>	28.6	23.7	25.6	20.0	23.3	22.2	25.6	23.1	24.1						
11	<i>Isca janiceae</i>	25.6	20.9	23.9	22.8	22.4	22.9	22.3	22.2	24.1	20.6					
12	<i>Sangpradubina thailandica</i>	23.3	22.1	26.3	22.8	23.4	22.9	19.3	21.9	25.2	21.8	20.3				
13	<i>Thraulius</i> sp.	28.5	24.6	28.8	24.7	26.0	28.0	21.4	24.0	28.9	22.9	23.5	22.1			
14	<i>Thalerosphyrus sinuosus</i>	25.7	21.8	28.1	25.1	28.3	25.4	22.1	25.2	25.3	23.6	24.1	22.8	22.5		
outgroup	AY191995Gomphiocephalus hodgsoni (Collembola)	32.4	30.1	35.3	34.6	36.3	35.5	30.7	32.9	33.0	30.9	31.6	30.5	31.2	29.0	

ตารางที่ 3 แสดงค่า interspecific genetic divergence วิเคราะห์จากยีน 12s rRNA

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	outgroup
1	<i>Afronurus</i> sp.1															
2	<i>Afronurus</i> sp.2	19.1														
3	<i>Caenis</i> sp.1	43.7	46.8													
4	<i>Caenis</i> sp.2	42.3	46.1	16.8												
5	<i>Caenis</i> sp.3	41.9	44.0	14.1	15.4											
6	<i>Caenis longiforcipata</i>	40.3	44.1	16.9	15.6	17.0										
7	<i>Componeuriella braaschi</i>	21.2	22.1	38.6	36.6	37.3	36.7									
8	<i>Cercobrachys</i> sp.	42.3	42.9	25.4	24.9	23.4	24.2	33.0								
9	<i>Clypeocaenis</i> sp.	37.8	39.0	23.3	20.9	20.4	19.9	34.6	25.1							
10	<i>Choroterpes proba</i>	43.7	46.9	35.7	36.1	37.8	32.2	46.5	41.1	38.8						
11	<i>Isca janiceae</i>	39.9	35.6	43.6	38.8	42.4	39.1	36.8	40.5	39.1	24.9					
12	<i>Sangpradubina thailandica</i>	46.3	46.0	36.1	35.9	36.0	36.4	43.7	35.5	39.5	21.6	28.4				
13	<i>Thraulius</i> sp.	41.7	43.0	45.5	45.5	46.5	43.6	44.7	47.1	44.1	31.6	30.5	39.4			
14	<i>Thalerosphyrus sinuosus</i>	19.9	14.7	39.8	42.6	41.0	41.7	19.2	35.6	37.9	44.4	39.1	45.8	42.0		
outgroup	AY191995 <i>Gomphiocephalus hodgsoni</i> (Collembola)	59.6	60.5	57.4	56.1	56.1	59.0	58.2	56.1	56.3	55.6	54.5	55.6	58.8	59.0	



ภาพประกอบ 1 Molecular phylogeny of mayfly using Maximum likelihood (ML), using partial COI sequences. Tree was inferred from 653 base pair of 14 species of mayfly. Bootstrap values for maximum likelihood (ML) are shown above, under, or near the branches. Node support values are bootstrap values (percentage of 1000 replicate). Scale bar indicates 0.10 nucleotide substitutions.



ภาพประกอบ 2 Molecular phylogeny of mayfly using Maximum likelihood (ML), using partial 12S rDNA sequences. Tree was inferred from 376 base pair of 14 species of mayfly. Bootstrap values for maximum likelihood (ML) are shown above, under, or near the branches. Node support values are bootstrap values (percentage of 1000 replicate). Scale bar indicates 0.20 nucleotide substitutions.

เอกสารอ้างอิง

- Ajawatanawong, P., Atkinson, G.C., Watson-Haigh, N.S., MacKenzie, B. and Baldauf, S.L. 2012. SeqFIRE: a web application for automated extraction of indel regions and conserved blocks from protein multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 340-347.
- Ball, S.L. and Hebert, P.D.N. (2005). Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of North American Benthological Society*, 24(3), 508-524.
- Filter, R. and Manue, R. (1986). *The Freshwater Life of Britain and North West Europe*. Publisher: Collins.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Gattolliat J.L., Cavallo, E., Vuataz, L. and Sartori, M. (2015). DNA barcoding of Corsican mayflies (Ephemeroptera) with implications on biogeography, systematics and biodiversity. *Arthropod systematics and phylogeny* 73(1): 3-18.
- Gerber, A.S., Loggins, R., Kumar, S. and Dowling, T.E., (2001). Does non-neutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes?. *The Annual Review of Genetics*, 35(1), 539-566.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95-98.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., and deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hickson, R.E., Simon, C., Cooper, A., Spicer, G.S., Sullivan, J. and Penny, D., (1996). Conserved sequence motifs, alignment, and secondary structure for the third domain of animal 12S rRNA. *Molecular Biology and Evolution*, 13(1), 150-169.

- Jalali, S. K., Rakshit Ojha and Venkatesan T. (2015). DNA Barcoding for Identification of Agriculturally Important Insects. A. K. Chakravarthy (ed.), *New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management*, Springer India DOI 10.1007/978-81-322-2089-3, 13-23.
- Jia, Y. Y., Qin, J. Z., Ju, M., & Zhou, C. F. (2010). A new mayfly species of *Caenis* from headwater of Zijin Hill (Nanjing, Eastern China)(Ephemeroptera: Caenidae). *Zootaxa*, 2535(1), 61-68.
- Kang, S.C. and Yang, C.T. (1994). Caenidae of Taiwan (Ephemeroptera). *Chinese Journal of Entomology*, 14, 93-113.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol*, 16, 111-120.
- Kjaerstad, g., Webb, J.M. and Ekrem, T. (2012). A review of the Ephemeroptera of Finnmark DNA barcodes identify Holarctic relations. *Norwegian Journal of Entomology*, 59(2), 182-195.
- Malzacher, P. E. T. E. R. (2015). Revision of the Oriental species of the genus *Caenis* Stephens (Insecta: Ephemeroptera: Caenidae). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A, Neue Serie*, 8, 27-47.
- Malzacher, P., & Sangpradub, N. (2021). New mayfly species of *Caenis* and *Kalimaenis* from Thailand and descriptions of two new genera of the subfamily Caeninae (Ephemeroptera: Caenidae). *Integrative Systematics: Stuttgart Contributions to Natural History*, 3(1), 1-33.
- De Mandal, S., Chhakhuak, L., Gurusubramanian, G., & Kumar, N. S. (2014). Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects–A Review. *DNA Barcodes*, 2(1), 1-9.
- McCafferty, P.W. and Pereira, C. (1984). Effects of developmental thermal regimes on two mayfly species and their taxonomic interpretation. *Annals of the Entomological Society of America*, 77(1), 69-87.
- Ogden, T.H. and Whiting, M.F. (2005). Phylogeny of Ephemeroptera (mayflies) based on molecular evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(3): 625-643.

- Sangpradub, N., Boonsoong, B., & Mekong River Commission, Vientiane(Lao PDR). (2006). Identification of freshwater invertebrates of the Mekong River and its tributaries. MRC, Vientiane, Lao PDR. 274 p.
- Sartori, M. and Brittain, J. (2015). *Order Ephemeroptera. In: Ecology and General Biology*, Fourth Edition, 873-891.
- Selvakumar, C., Sivaramakrishnan, K.G. and Janarthanan, S. (2016). DNA barcoding of mayflies (Insecta: Ephemeroptera) from South India. *Mitochondrial DNA Part B*, 1(1): 651-655.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Soldán, T. (2001). Status of the systematic knowledge and priorities in Ephemeroptera studies: the Oriental region. *Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera*, 53-65.
- Srinivasan, P., Sivaruban, T., Barathy, S., Malzacher, P., & Isack, R. (2021). A new charismatic *Caenis* Stephens, 1835 (Ephemeroptera: Caenidae) from Southern India. *Zootaxa*, 4926(1), zootaxa-4926.
- Tong, X.L. and Dudgeon, D. (2002). Three new species of the genus *Caenis* from Hong Kong, China (Ephemeroptera: Caenidae). *Zoological Research*, 23(3), 232-238.
- Williams, H. C., Ormerod, S. J., & Bruford, M. W. (2006). Molecular systematics and phylogeography of the cryptic species complex *Baetis rhodani* (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(2), 370-382.
- Zhou, X., Jacobus, L. M., DeWalt, R. E., Adamowicz, S. J., & Hebert, P. D. (2010). Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera fauna of Churchill (Manitoba, Canada): insights into biodiversity patterns from DNA barcoding. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(3), 814-837.