

การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI*

Analysis of Genetic Variation of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) Inferred from mtDNA *COI* Sequences

สุกัญญา ภูสิงห์¹, กิรติ ตันเรื่อน², วิโรจน์ ลิขิตตระกูลวงศ์³, ณัฐดนัย ลิขิตตระการ⁴, ศิลปชัย เสนารัตน์⁵,
และ พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ^{1*}

Sukanya Poosing¹, Keerati Tanruean², Wirot Likittrakulwong³, Natdanai Likhitrakarn⁴, Sinlapachai Senarat⁵, and Pisit Poolprasert^{1*}

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ในเขตพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก-สุโขทัย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *COI* ในไมโทคอนเดรียของตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทั้งสองพื้นที่รวมทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ที่มีขนาด 642 คู่เบส ในการตรวจสอบ พบว่า ประชากรแมลงวันผลไม้ในพื้นที่ที่ศึกษามี haplotype 10 รูปแบบ มีค่า Haplotype diversity เท่ากับ 0.942 และมีค่า Nucleotide diversity ค่อนข้างต่ำอยู่ระหว่าง 0.00775–0.00964 เมื่อทำการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood พบว่า กลุ่มประชากรแมลงวันผลไม้มีความสัมพันธ์เป็นกลุ่มวงศาวงวิวัฒนาการเดี่ยว อย่างไรก็ตามผลการวิจัยในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จึงมีข้อเสนอแนะให้ทำการเก็บสำรวจตัวอย่างในพื้นที่ครอบคลุมทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย นอกจากนี้การนำตัวอย่างของแมลงวันผลไม้ชนิดซับซ้อนในสกุล *Bactrocera* รวมทั้งการใช้ยีนจากบริเวณไมโทคอนเดรียและนิวเคลียส มาทำการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ร่วมด้วยเพื่อความชัดเจนทางสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการตามภูมิศาสตร์ต่อไป

คำสำคัญ: แมลงวันผลไม้, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ความผันแปรทางพันธุกรรม, ยีน *COI*

Abstract

Population genetic diversity of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in Phitsanulok- Sukhothai areas was assessed using DNA sequences of the mitochondrial

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

¹Biology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000

²สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

²Biotechnology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000

³สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

³Animal Science Program, Faculty of Food and Agricultural technology, Pibulsongkram Rajabhat University

⁴สาขาวิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

⁴Division of Plant Protection, Faculty of Agriculture Production, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

⁵ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

⁵Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathum Wan, Bangkok, 10330

*Corresponding author : poolprasert_p@psru.ac.th

cytochrome c oxidase subunit I gene (*COI*). In total, 16 flies representing two sampled sites were sequenced for a 642-bp fragment of the gene. It was revealed that 10 haplotypes were exhibited with haplotype diversity value about 0.942. The nucleotide diversity for *COI* sequences of *B. dorsalis* populations was relatively low ranging from 0.00775–0.00964. The phylogenetic tree from the mt*COI* sequences inferred using the Maximum Likelihood method indicated monophyly with strong support of *B. dorsalis*. Nevertheless, it was suggested that various collection sites in each region throughout Thailand should be initially conducted. Additionally, the further study should be accompanied by using the other sibling species of *B. dorsalis* complex and analyzing DNA sequences from both mitochondrial and nuclear genes in order to obtain distinctly information in terms of phylogeography.

Keywords: *Bactrocera dorsalis*, DNA barcoding, Genetic variation, Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I

บทนำ

แมลงวันผลไม้ (oriental fruit fly) จัดอยู่ในวงศ์ Tephritidae อันดับ Diptera เป็นศัตรูที่สำคัญของผักและผลไม้หลายชนิด ซึ่งมี 4 สกุลหลัก ได้แก่ *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* และ *Rhagoletis* โดยมีจำนวนชนิดมากถึง 4,000 ชนิดทั่วโลก (Carroll *et al.*, 2004; Houdt *et al.*, 2010; Lengkong *et al.*, 2017) โดยเฉพาะสกุล *Bactrocera* ซึ่งมีสมาชิกประมาณ 500 ชนิดใน 28 สกุลย่อย (subgenus) (Drew, 1989; Drew and Hancock, 1994) สำหรับประเทศไทย แมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera dorsalis* ซึ่งเป็นชนิดที่ซับซ้อน (complex species) ประกอบด้วย 5 ชนิด คือ A, B, C, D และ E (Baimai *et al.*, 1995) ซึ่งทำลายไม้ผลต่าง ๆ เช่น มะม่วง ชมพู พุทรา ฝรั่ง สะตอ และ มะค่าโมง เป็นต้น (ปัทมา สมศิลป์ และคณะ 2558; ทวีศักดิ์ ขวัญไทรรงค์, 2561; Chinajariyawong *et al.*, 2000)

การระบุชนิดแมลงวันผลไม้ที่ถูกต้องและรวดเร็ว นั้นเป็นหลักการที่สำคัญต่อการควบคุมแมลงวันผลไม้ที่สร้างความเสียหายแก่พืชผลทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้จากการจัดจำแนกแมลงวันผลไม้ในอดีตที่ผ่านมา มักใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น แขนงสีส่วนหัว ส่วนลำตัว ส่วนปีก เป็นหลักเพียงอย่างเดียว อาจเป็นผลทำให้เกิดความผิดพลาดต่อการระบุชนิดแมลงผลไม้ได้ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีความซับซ้อนทางชนิด ชนิดพี่น้อง (sibling species) หรือชนิดซ่อนเร้น (cryptic species) (Drew and Hancock, 1994; White and Elson-Harris, 1992; Armstrong *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีการระบุชนิดและความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ด้วยวิธีการที่หลากหลาย อาทิ การศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาเชิงการวัดของรูปร่างปีกด้วยเทคนิคจีโอเมทริก มอร์โฟเมทริกส์ (Geometric morphometrics) (Adsavakulchai *et al.*, 1999; Schutze *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2017) การวิเคราะห์สารกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ (Tan *et al.*, 2010) การศึกษาด้วยวิธีพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ (Cytogenetics) (Augustinos *et al.*, 2014) การศึกษาทางอนุชีววิทยาด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) (Nakahara *et al.*, 2001; Onah *et al.*, 2017) อาร์เอฟพีดี (RAPD) (Rashmi *et al.*, 2016) และไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) (Shi *et al.*, 2012) เป็นต้น ทั้งนี้ในปัจจุบัน ได้มีการนำแนวความคิดเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) มาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถช่วยระบุตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชนิดได้จึงทำให้พบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีความซับซ้อนยากต่อการระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเพื่อลดความผิดพลาดในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จากการใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว โดยพบว่า การใช้ยีนบริเวณ cytochrome c oxidase I (*COI*) ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตมีประสิทธิภาพที่ดี (Hebert *et*

al., 2003; Wilson, 2012) ทั้งนี้มีรายงานถึงการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดกับ เพื่อการระบุชนิด และการวิเคราะห์โครงสร้างและความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรแมลงวันผลไม้ *Bactocera dorsa* อยู่อย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา (Jose et al., 2013; Barr et al., 2017) อินเดีย (Choudhary et al., 2018; Manger et al., 2018) จีน (Shi and Ye, 2007; Shi et al., 2010, 2012; Schutze et al., 2012) ไต้หวัน (Schutze et al., 2012; Wan et al., 2012) อินโดนีเซีย (Lengkong et al., 2017) มาเลเซีย (Schutze et al., 2012; Jose et al., 2013) กัมพูชา ลาว (Jose et al., 2013) และฟิลิปปินส์ (Schutze et al., 2012) เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาอยู่อย่างจำกัด มีการศึกษาเพียงไม่กี่พื้นที่ เช่น เชียงใหม่ (สันป่าตอง) กรุงเทพมหานคร และนครศรีธรรมราช (Schutze et al., 2012; Jose et al., 2013) ทั้งนี้แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีการทำลายพืชผลทางการเกษตรอย่างกว้างขวางและพบได้ทั่วภูมิภาคของประเทศไทย ซึ่งมีรายงานว่าแมลงวันผลไม้มีความแปรผันของพันธุกรรมตามภูมิประเทศและพืชอาศัยที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลาย ดังนั้นการศึกษาทางพันธุศาสตร์เชิงประชากรยังมีความจำเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เพราะข้อมูลจากการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมมีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมกำจัดแมลงวันผลไม้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด (ปัทมา สมศิลป์ และคณะ, 2558; ทวีศักดิ์ ขวัญไตรรงค์, 2561; Shi and Ye, 2007; Shi et al., 2010, 2012)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดและประเมินความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จากเขตพื้นที่ของจังหวัดสุโขทัยและพิษณุโลกด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไมโทคอนเดรียบริเวณ cytochrome oxidase subunit I (COI) ซึ่งผลการวิจัยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้ ไม่เพียงจะทำให้ทราบถึงชนิดและความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ที่นำไปสู่การวางแผนในการบริหารจัดการศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

ทำการสำรวจเพื่อเก็บตัวอย่างแมลงวันทองผลไม้ *B. dorsalis* จากไร่พืชวงศ์แตงและสวนผลไม้ในเขตพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกและสุโขทัย ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 ถึงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2561 ด้วยวิธีการเก็บที่หลากหลายรูปแบบ ได้แก่ การวางกับดักกาวเหนียว การใช้ขวดพลาสติก และการใช้สวิง และเก็บรักษาตัวอย่างที่ได้ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% และนำมาระบุชนิดทางสัณฐานวิทยาภายนอกภายใต้กล้องสเตอริโอโดยใช้คู่มือการจัดจำแนกชนิดตามวิธีการของ Drew and Hancock (1994) และ Prabhakar et al. (2012) เป็นหลัก ก่อนทำการศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุลต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR

นำตัวอย่างแมลงวันทองผลไม้ที่เก็บรักษาในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNA extraction kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN) จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที ย้อม gel ด้วย RedSafe™ จากนั้น นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทไมโทคอนเดรีย ตำแหน่ง Cytochrome C oxidase I (COI) ขนาด 642 คู่เบส เพื่อเพิ่มจำนวนของปริมาณสายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์สากล (Universal primer) จาก LCO1490: (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') และ HCO2198: (5'-TAAACTTCAGGGTGACC AAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994) โดยเตรียมสารละลาย

ผสม (master mix) ที่มีปริมาตรรวม (total volume) 20 μ l ต่อ 1 หลอด (reaction) โดย 1 หลอดที่ใช้เพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบไปด้วยสาร 5x PCR Enhancer 4 μ l , 10X HF Reaction Buffer 2 μ l, 10 mM dNTP Mix 0.4 μ l, Forward Primer และ Reverse Primer อย่างละ 0.4 μ l, เอนไซม์ (Taq DNA polymerase) 0.3 μ l น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (nuclease free water) 10.5 μ l และ gDNA (DNA template) 2 μ l จากนั้นเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler (BIO-RAD C1000TM) โดยมีสภาวะของการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยการ ประยุกต์ตามวิธีของ Manger *et al.* (2018) เป็นดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และรอบสุดท้าย Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ ตามลำดับ ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ได้จาก ปฏิกิริยา PCR ด้วยกระบวนการเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) เช่นเดียวกับการตรวจสอบคุณภาพ ดีเอ็นเอ และตรวจหาดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ไปทำการอ่านข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดี เอ็นเอ (DNA sequencing) ณ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทาง พันธุกรรมที่มีบันทึกใน GenBank ด้วยการ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) หลังจากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปศึกษาารูปแบบของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) แบบวิธี Maximum likelihood (ML) โดยใช้โมเดล Kimura-2 parameter (K2P) ผ่าน โปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) ทำการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) ของประชากรแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่สำรวจได้โดยคำนวณหาค่า mtDNA haplotypes (h) haplotype diversity (hd) (Nei, 1987) nucleotide diversity (π) (Tajima, 1983) total number of mutations (m) mean และ number of pairwise nucleotide differences (k) โดยใช้โปรแกรม DnaSp version 5.10.01 (Librodo and Rozas, 2009)

ผลการวิจัย

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนปลายของยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) กับแมลงวัน ผลไม้ *B. dorsalis* ทั้ง 16 ตัวอย่าง ตัวอย่างจาก จ.สุโขทัย (9 ตัวอย่าง; พิกัด, 17°0'22"N/99°34'29"E) และ จ. พิษณุโลก (6 ตัวอย่าง; พิกัด, 16°34'6"N/ 100°38'8"E) สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ประมาณ 642 คู่เบส เมื่อ ตรวจความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และได้ฝากข้อมูลลำดับนิวคลีโอ ไทด์ไว้ในฐานข้อมูล (Accession number MH187230- MH187238) และเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความใกล้เคียง (% identify) ถึง $\geq 99\%$ ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวโดย ใช้โปรแกรม ClustalW พบว่า มีเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide composition) ใน *B. dorsalis* ซึ่งมีสัดส่วนของ Thymine (T=35.7) และ Adenine (A=29.3) สูงในขณะที่ Cytosine (C=18.5) และ Guanine (G=16.5) ต่ำ

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI โดยคำนวณหาค่า mtDNA haplotypes (h) haplotype diversity (hd), nucleotide diversity (π), total number of mutations (m) mean และ number of pairwise nucleotide differences (k) โดยใช้โปรแกรม DnaSp version 5.10.01 ให้ผลของดัชนี ความหลากหลายทางพันธุกรรม (molecular diversity indices) ของประชากร *B. dorsalis* (Table 1)

Table 1 Genetic diversity indices of *B. dorsalis* based on mtDNA-COI gene /

Gene area	Provinces	N	No.	S	K	hd ($\pm$ SD)	π ($\pm$ SD)
COI	Phitsanulok	9	5	11	4.944	0.889 ($\pm$ 0.071)	0.00775 ($\pm$ 0.00191)
	Sukhothai	7	6	15	6.190	0.952 ($\pm$ 0.092)	0.00964 ($\pm$ 0.00246)
Total		16	10	18	6.017	0.942 ($\pm$ 0.036)	0.00943 ($\pm$ 0.00200)

Note: n = sample size, No. = number of haplotypes (No.), S = number of polymorphic (segregating) sites, K = average number of nucleotide differences, hd = haplotype diversity with standard (SD) และ π = nucleotide diversity

ผลการศึกษาจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) ของประชากร *B. dorsalis* (n เท่ากับ 16 ตัวอย่าง) พบจำนวน haplotype (No.) เท่ากับ 10 รูปแบบ, number of polymorphic (segregating) sites (S) เท่ากับ 18 ตำแหน่ง, mtDNA haplotypes (h) เท่ากับ 10 รูปแบบ, haplotype diversity (hd) ($\pm$ SD) เท่ากับ 0.942 ($\pm$ 0.036), nucleotide diversity (π) เท่ากับ 0.00943 ($\pm$ 0.00200), total number of mutations (m) เท่ากับ 18 ตัว และ number of pairwise nucleotide differences (k) เท่ากับ 6.017 ตามลำดับ

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic relationship) ของประชากร *B. dorsalis* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ด้วยวิธี ML โดยโมเดล K2P และทดสอบความเชื่อมั่นด้วย Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยมีแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera caranbolae* ซึ่งเป็นชนิดช้ซ้อนของ *B. dorsalis* complex จากภูมิภาคต่างๆ ของทวีปเอเชียเข้ามาร่วม และใช้แมลงวันผลไม้ *B. papaya* และ *B. invadens* เพื่อใช้เป็น outgroup สำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ในครั้งนี้ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของแมลงวันผลไม้ออกจากกันได้อย่างชัดเจน เป็น 2 กลุ่มหลัก (Clade) โดยกลุ่มที่ 1 (Clade1) ประกอบไปด้วย *B. dorsalis* + *B. caranbolae* และกลุ่มที่ 2 (Clade2) เป็นชนิดที่ใช้เพื่อเป็น outgroup ประกอบไปด้วย *B. papaya* + *B. invadens* (Figure 1)

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาของกลุ่มประชากรแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ทำการสำรวจในเขตพื้นที่จากจังหวัดสุโขทัย และพิษณุโลก ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ด้วยโปรแกรมที่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ประมาณ 642 คู่เบส ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ยของไนโตรจีนัสเบสระหว่าง Adenine และ Thymine (A-T) เท่ากับ 29.3-35.7% ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะที่พบในยีน COI ของกลุ่มสัตว์ (Hebert *et al.*, 2003) ทั้งนี้ตำแหน่งการพบมิวเทชันหรือการกลายพันธุ์ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ ตำแหน่งพอลิเมอร์พิซิม (polymorphic sites) ในยีน COI ในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งหมด 18 ตำแหน่ง โดยรูปแบบของการเกิดเป็นทั้งแบบ transversion mutation (A $\leftrightarrow$ T, A $\leftrightarrow$ C, G $\leftrightarrow$ T หรือ G $\leftrightarrow$ C) และแบบ transition mutation (A $\leftrightarrow$ G หรือ T $\leftrightarrow$ C) ทั้งนี้ในความเป็นจริงในยีน COI (mtDNA) มักจะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดที่สูงกว่ายีนในนิวเคลียส

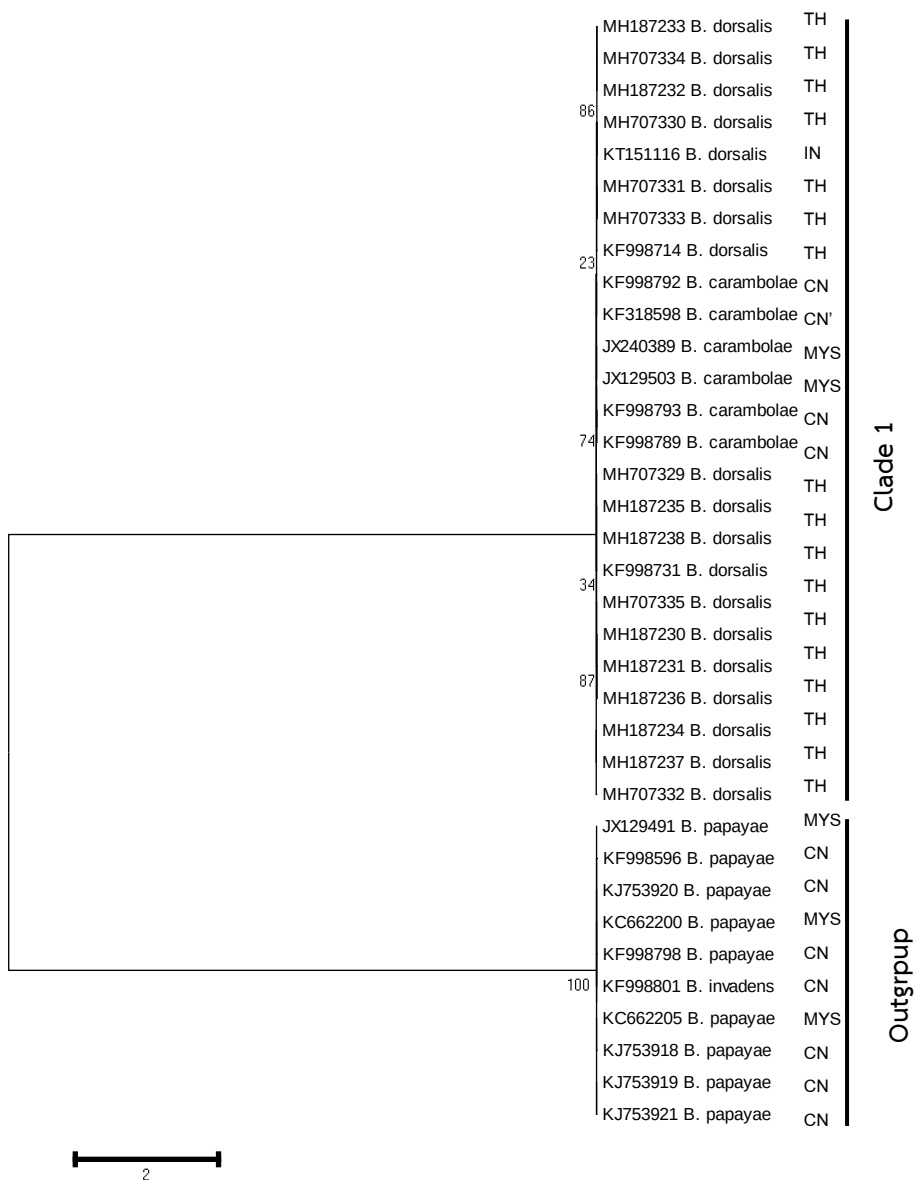


Figure 1 Phylogenetic tree based on mtDNA-COI gene of the 16 oriental fruit flies (*B. dorsalis*) using Maximum Likelihood (ML) method and confidence level was calculated with the bootstrap test (1,000 replicates). Species names are followed by collection locality (CN: China, IN: India, MYS: Malaysia and TH: Thailand).

ถึง 10 เท่า (nucDNA) (Taylor and Turnbull, 2005) แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึมที่พบที่ในชนิดของแมลงวันผลไม้ระหว่างกลุ่มประชากรนั้น สามารถพบได้ถึง 18 ตำแหน่ง จึงสามารถเลือกยีน COI ในการศึกษาถึงความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรได้ ในส่วนของความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) ภายในชนิดของแมลงวันผลไม้ของกลุ่มประชากรนั้นมีค่าค่อนข้างต่ำ ($0.00943 \pm 0.00200\%$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษากับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Shi *et al.* (2012) ที่รายงานถึง

ความแปรผันทางพันธุกรรมของ *B. dorsalis* ในประเทศจีน และพบว่าส่วนใหญ่การแปรผันจะอยู่ในช่วง 0.007-0.020% อาจเป็นไปได้ว่ามีการถ่ายเทหรือการไหลของยีน (gene flow) ยังคงเกิดขึ้นในกลุ่มประชากรของ *B. dorsalis* เพราะตัวอย่างของ *B. dorsalis* ที่ได้ยังคงอยู่ในเขตภูมิภาคเดียวกันอยู่ นอกจากนี้ Choudhary *et al.* (2016) ได้รายงานถึงความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ตามเขตภูมิศาสตร์ของประเทศอินเดียและในประเทศต่าง ๆ แถบภูมิภาคเอเชีย ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *COI* อีกด้วย พบว่า มีค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดของกลุ่มประชากรนั้นมีค่าค่อนข้างต่ำเช่นกัน โดยมีค่าโดยรวมประมาณ $0.008458 \pm 0.005122\%$ เช่นเดียวกับการวิจัยของ Barr *et al.* (2014) ที่ศึกษาในกลุ่มประชากรจากฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ก็ให้ผลความแปรผันที่ต่ำ ($0.00128 \pm 0.00321\%$) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการประเมินความแปรผันทางพันธุกรรมกับแมลงวันผลไม้ชนิดซับซ้อนอื่น ๆ เช่น *B. zonata* ในประเทศอินเดียเองก็ให้ค่าที่ต่ำ ประมาณ $0.014 \pm 0.0005\%$ เช่นกัน โดยมีการให้เหตุผลไว้ว่า ประชากรของแมลงวันผลไม้ อาจมีการอพยพเคลื่อนย้าย (migration) มาจากเขตภูมิภาคที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากแมลงวันผลไม้มีปีกสามารถบินไปมาหาสู่กันได้ มีพืชอาศัยที่หลากหลายและ/หรืออาจเป็นเพราะตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ที่ฝังอยู่ในผลไม้ เมื่อมีการขนส่งผลไม้เพื่อการค้า เป็นผลทำให้แมลงวันผลไม้เหล่านั้นติดไปยังพื้นที่ปลายทางหรือตามตามภูมิภาคต่าง ๆ ได้

ทั้งนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) สามารถแบ่งแยกกลุ่มของแมลงวันผลไม้ออกจากกันได้เป็นสองกลุ่ม (Clade) หลักอย่างชัดเจน คือ กลุ่มที่ 1 (Clade1) ประกอบไปด้วย *B. dorsalis* + *B. caranbolae* ส่วนกลุ่มที่ 2 (Clade2) คือ outgroup ประกอบไปด้วย *B. papaya* + *B. invadens* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kunprom and Pramual (2016) ที่ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* ของประเทศไทย จำนวน 12 ชนิด โดยพบว่า แมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ มีการปะปนอยู่ในกลุ่มของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* ทำให้เกิดเป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาการมาจากหลายบรรพบุรุษ (paraphyletic group) เหมือนกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งอาจเกิดจากความแปรผันที่เหลื่อมล้ำกันทั้งภายในชนิดและระหว่างชนิด (intra- and interspecific overlap) ทั้งนี้ Sauers-Muller (2005) และ Juma *et al.* (2014) ได้ให้ข้อคิดเห็นว่า แมลงวันผลไม้ *B. carambolae* และ *B. dorsalis* ต่างก็เป็นแมลงวันผลไม้ภายใต้ชนิดซับซ้อนเดียวกัน คือ *B. dorsalis* complex ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว จะทำให้เห็นว่ามี ความแตกต่างกัน แต่ในเชิงชนิดหรือสปีชีส์ชีววิทยา (biological species concept) พบว่า กลุ่มประชากรของแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 ชนิดสามารถสืบพันธุ์กันและให้ลูกหลานที่ไม่เป็นหมัน นอกจากนี้ การศึกษาของ ทวีศักดิ์ ขวัญไตรรงค์ (2561) ได้มีการรายงานเพิ่มว่า โดยปกติแล้วแมลงวันผลไม้ชนิดซับซ้อนจะมีความแปรผันค่อนข้างสูง โดยเฉพาะใน *B. dorsalis* complex ที่มีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis* A, B, C, D และ E มีผลมาจากระยะห่างทางภูมิศาสตร์ การปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และชนิดของพืชอาศัยที่แตกต่างกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ มี haplotype 10 รูปแบบ ทั้งนี้ในรายงานก่อนหน้านี้ของ Shi *et al.* (2005) ที่ศึกษาถึงพันธุศาสตร์ประชากรของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในมณฑลยูนนาน ประเทศจีน โดยรวบรวมมาทั้งหมด 6 พื้นที่ โดยวิเคราะห์ความแปรผันจากยีน *COI* (505 คู่เบส) และพบ มีจำนวน haplotype ถึง 28 รูปแบบ (37 ตัวอย่าง) ต่อมา Liu *et al.* (2007) ได้สำรวจได้ประชากร *B. dorsalis* เพิ่มเติมรวมเป็น 6 พื้นที่ และวิเคราะห์ความแปรผันจากยีน *COI* (501 คู่เบส) พบว่ามี จำนวน haplotype ได้ถึง 43 รูปแบบ (48 ตัวอย่าง) จึงเป็นข้อสังเกตว่า หากมีการขยายพื้นที่ในการสำรวจให้ครอบคลุมทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย อาจเป็นไปได้ว่า จะสามารถพบการผันแปรของยีนหรือพบรูปแบบของ haplotype ได้มากขึ้นตามไปด้วย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น แม้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้สามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพต่อการระบุชนิดได้อย่างรวดเร็ว ยังสามารถใช้กับแมลงชนิดอื่น

โดยเฉพาะกลุ่มแมลงที่มีความสำคัญทางการเกษตร มีข้อเสนอแนะว่าการศึกษาต่อไปจึงควรมีการใช้เทคนิคอื่น ๆ ที่เคยใช้ได้ผลในการแยกชนิดซับซ้อน เช่น การศึกษาสัณฐานวิทยาของปีกและการศึกษาทางพันธุศาสตร์แบบอื่นๆ (Adsavakulchai *et al.*, 1999; Kitthawee and Dujardin, 2009; Kitthawee and Dujardin, 2010) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ลึกซึ้งและชัดเจนมากขึ้นในความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ จึงควรมีการศึกษาทางด้านฤดูกาล การผสมพันธุ์ พืชอาหาร แมลงเบียนแมลงวันผลไม้ชนิดซับซ้อน รวมทั้งอาจศึกษาในยีนอื่นๆ ร่วมด้วย อาทิ 16SrDNA, ITS (Internal transcribed spacer) เพิ่มเติมด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ในวางแผนทางการบริหารการจัดการควบคุมแมลงวันผลไม้ให้มีประสิทธิภาพต่อไป

สรุป

การระบุชนิดของแมลงวันผลไม้ โดยการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน COI สามารถระบุได้เป็นชนิด *Bactrocera dorsalis* ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งผลการวิจัยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้ ไม่เพียงจะทำให้ทราบถึงชนิดและความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้กลุ่มซับซ้อน แต่เพื่อให้ทราบถึงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (evolutionary tree) ที่ชัดเจนขึ้น จึงควรใช้จำนวนตัวอย่างจากหลายๆ พื้นที่ ทั้งจำนวนชนิดที่แตกต่างกันและรวมถึงบริเวณยีนที่หลากหลายทั้งในนิวเคลียส (nDNA) และไมโทคอนเดรีย (mtDNA) ร่วมด้วย ทั้งนี้ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ที่นำไปสู่การวางแผนในการบริการจัดการศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรสุพรรณบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือ และห้องอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- ทวีศักดิ์ ขวัญไตรรงค์. (2561). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera latifrons* ในภาคกลางของประเทศไทย. *แก่นเกษตร*, 46(1) : 733-738.
- ปัทมา สมศิลป์, ดวงตา จุลศิริกุล, ภควดี รักษ์ทอง, และ สังวรณ กิจทวี. (2558). สัณฐานวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ กลุ่ม *Bactrocera tau* ซับซ้อน ในภาคใต้ของประเทศไทย. *Rajabhat Journal of Sciences Humanities and Social Sciences*, 16(2), 334-346.
- Adsavakulchai, A., V. Baimai, W. Prachyabrued, P. J. Grote, and S. Lertlum. (1999). Morphometric study for identification of the *Bactrocera dorsalis* Complex (Diptera: Tephritidae) using wing image analysis. *Biotropica*, 13, 37-48.
- Armstrong, K. F., C. M. Cameron, E. R. Frampton. (1997). Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: A rapid molecular diagnostic technique for quarantine application. *Bulletin of Entomological Research*, 87, 111-118.
- Augustinos, A. A., E. Drosopoulou, A. GariouPapale-xiou, K. Bourtzis, P. Mavragani-Tsipidou, and A. Zacharopoulou. (2014). The *Bactrocera dorsalis* species complex: comparative cytogenetic analysis in support of sterile insect technique applications. *BMC Genetics*, 15(2), S16

- Baimai, V., W. Trinachachartvanit, S. Tigvattananont, P. J. Grote, R. Poramarcom, and U. Kijchalao. (1995). Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. I. Five sibling species of *Bactrocera dorsalis* complex. *Genome*, 38, 1015-1022.
- Barr, N. B., L. A. Ledezma, L. Leblanc, M. S. Jose, D. Rubinoff, S. M. Geib, B. Fujita, D. W. Bartels, D. Garza, P. Kerr, M. Hauser, and Gaimari, S. (2014). Genetic diversity of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) on the Hawaiian Islands: Implications for an introduction pathway into California. *Journal of Economic Entomology*, 107(5), 1946–1958.
- Carroll, L. E., A. L. Norrbom, M. J. Dallwitz, and F. C. Thompson. (2004). *Anastrepha leptozona* Hendel: 1-1. In *Pest fruit flies of the world larvae*. Retrieved from <http://delta-intkey.com>.
- Chinajariyawong, A., A. R. Clarke, M. Jirasurat, S. Kritsaneepiboon, H. A. Lahey, S. Vijayse -garan, and G. H. Walter. (2000). Survey of opiine parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand and Malaysia. *Raffles Bulletin of Zoology*, 48, 71-101.
- Choudhary, J. S., N. Naaz, M. Lemtur, B. Das, A. K. Singh, B. P. Bhatt, and C. S. Prabhakar. (2018). Genetic analysis of *Bactrocera zonata* (Diptera: Tephritidae) populations from India based on *cox1* and *nad* gene sequences. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(5), 727-736.
- Choudhary, S. J., N. Naaz, S. C. Prabhakar, and M. Lemtur. (2016). Genetic analysis of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) populations based on mitochondrial COX1 and *nad1* gene sequences from India and other Asian countries. *Genetica*, 144, 611-623.
- Drew, R. A. I. (1989). The Tropical Fruit Flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australasian and Oceanian regions. *Memoirs of the Queensland Museum*, 26, 15-21.
- Drew, R. A. I., and D. L. Hancoc. (1994). *The Bactrocera dorsalis complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacidae) in Asia. Bulletin of Entomological Research Supplement Series*. CAB International. Information Press. Eynsham. Oxford. UK 68 p.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham, and J. R. deWaard. (2003). Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*, 270, S96–S99.
- Houdt, J. K. J., F. C. Breman, M. Virgilio, and M. D. Meyer. (2010). Recovering full DNA barcodes from natural history collections of tephritid fruitflies (Tephritidae, Diptera) using mini barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 10, 459–465.
- Jose, M. S., L. Leblanc, S. M. Geib, and D. Rubinoff. (2013). An evaluation of the species status of *Bactrocera invadens* and the systematics of the *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) complex. *Annals of the Entomological Society of America*, 106(6), 684–694.

- Juma, S., R. Muhamad, A. N. Adam, K-W. A. Hee, and M. Gnanasegaram. (2014). Occurrence of tephritid fruit flies with intermediate morphologies of *Bactrocera carambolae* and *B. papayae* (Diptera: Tephritidae) in Selangor, Peninsular Malaysia. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(7), 609–616.
- Kitthawee, S., and J. P. Dujardin. (2009). The *Diachasmimorpha longicaudata* complex: isolation and geometric patterns of the wing. *Biological Control*, 51, 191–197.
- Kitthawee, S., and J. P. Dujardin. (2010). The geometric approach to explore the *Bactrocera tau* complex (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Zoology*, 113, 243–249.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1873.
- Kunprom, C., and P. Pramual. (2016). DNA barcode variability and host plant usage of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Genome*, 59, 792–804.
- Lengkong, M., J. Pelealu, M. Tulung, V. Mantiri, and E. F. Lengkong. (2017). Identification of genetic diversity in *Bactrocera* spp. from Minahasa Regency based on COI barcode. *International Journal of ChemTech Research*, 10(9), 974–982.
- Librado, P., and J. Rozas. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Liu, J., Shi, W. and Ye, H. (2007). Population genetics analysis of the origin of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae), in northern Yunnan Province, China. *Entomological Science*, 10, 11-19.
- Manger, A., Behere, G.T., Firake, D.M., Sharma, B., Deshmukh, N.A., Firake, P.D., Thakur, N.S.A. and Ngachan, S.V. (2018). Genetic characterization of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) from Northeastern India based on DNA barcodes, *Mitochondrial DNA Part A*, 29(5), 792–799.
- Nakahara, S., H. Kato, M. Kaneda, T. Sugimoto, M. Muraji. (2001). Identification of *Bactrocera dorsalis* complex species (Diptera: Tephritidae) by PCR-RFLP analysis. II. A study of genetic variation in *B. dorsalis* complex (Philippines population) and *B. dorsalis* (Taiwan population). *Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan*, 37, 69–73.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Onah, I. E., J. E. Eyo, and D. Taylor. (2017). Application of PCR-RFLP of COI gene for identification of life stages of *Bactrocera dorsalis* and *Ceratitis anonae* infesting citrus in Southeastern Nigeria. *African Entomology*, 25(2), 485–493.
- Pietersea, W., H. A. Benitez, and P. Addison. (2017). The use of geometric morphometric analysis to illustrate the shape change induced by different fruit hosts on the wing shape of *Bactrocera dorsalis* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Zoologischer Anzeiger*, 269, 110–116.

- Prabhakar, C.S., P. Sood, and P. K. Mehta. (2012). Pictorial keys for predominant *Bactrocera* and *Dacus* fruit flies (Diptera: Tephritidae) of north western Himalaya. *Arthropods*, 1(3), 101–111.
- Rashmi, M.A., A. Verghese, P. D. K. Jayanthail, A. K. Chakravarthy, A. Kirubha, and S. B. Kandakoor. (2016). Molecular diversity of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae) in Karnataka. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 22(1), 12-19.
- Sauers-Müller, A.V. (2005). Host plants of the carambola fruit fly, *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock (Diptera: Tephritidae), in Suriname. South America. *Neotropical Entomology*, 34, 203–214.
- Schutze, M. K., M. N. Krosch, K. F. Armstrong, T. A. Chapman, A. Englezou, A. Chomič, S. L. Cameron, D. Hailstones, and A. R. Clarke. (2012). Population structure of *Bactrocera dorsalis* s.s., *B. papaya* and *B. philippinensis* (Diptera: Tephritidae) in southeast Asia: evidence for a single species hypothesis using mitochondrial DNA and wing-shape data. *BMC Evolution Biology*, 30, 12-130.
- Shi, W., and H. Ye. (2007). Genetic structure in four geographic populations of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) located in the seasonal occurrence zone in Yunnan Province. *Acta Ecologica Sinica*, 6, 2477–2482.
- Shi, W., C. Kerdelhué, and H. Ye. (2005). Population genetics of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), in Yunnan (China) based on mitochondrial Dna Sequences. *Environmental Entomology*, 34(4), 977–983.
- Shi, W., C. Kerdelhué, and H. Ye. (2010). Population genetic structure of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) from Yunnan province (China) and nearby sites across the border. *Genetica*, 138, 377–385.
- Shi, W., C. Kerdelhué, and H. Ye. (2012). Genetic structure and inferences on potential source areas for *Bactrocera dorsalis* (Hendel) based on mitochondrial and microsatellite markers. *PLOS ONE*, 7(5), e37083.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437–460.
- Tan, K. H., I. Tokushima, H. Ono, and R. Nishida. (2010). Comparison of phenylpropanoid volatiles in male rectal pheromone gland after methyl eugenol consumption, and molecular phylogenetic relationship of four global pest fruit fly species: *Bactrocera invadens*, *B. dorsalis*, *B. correcta* and *B. zonata*. *Chemoecology*, 21(1), 25-33.
- Taylor, R. W., and D. M. Turnbull. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 389–402.
- Wan, X., Y. Liu, and B. Zhang. (2012). Invasion History of the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*, in the Pacific-Asia Region: Two Main Invasion Routes. *PLOS ONE*, 7(5), e36176.
- White, I., and M. Elson-Harris. (1992). *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. Wallingford, UK: CAB International.

Wilson, J.J. (2012). DNA Barcodes for Insects. In W. Kress, and D. Erickson (eds). *DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 858. Humana Press, Totowa, NJ.