การจำแนกชนิด และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในประเทศไทย โดยยีน *COX1*

Identification and Phylogenetic Analysis of Dacini Fruit Flies in Thailand by *COX1* Gene

ยุวรินทร์ บุญทบ* จารุวัตถ์ แต้กุล ชมัยพร บัวมาศ
เกศสุดา สนศิริ และ สุนัดดา เชาวลิต
Yuvarin Boontop*, Charuwat Taekul, Chamaiporn Buamas,
Kessuda Sonsiri and Sunadda Chaovalit

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900
Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 19000, Thailand
**Corresponding author: Email: Yuvarin9320@gmail.com*

(Received: 3 February 2022; Accepted: 9 May 2022)

Abstract: The fruit fly tribe Dacini is not only one of the most species-rich clades within the dipteran family Tephritidae, it is also one of most serious groups of horticultural pests and thus of particular biosecurity/quarantine concern. All Dacini members are notoriously difficult to identify by morphological characters. Molecular approaches, such as DNA 'barcoding' of the cytochrome c oxidase (*COX1*) gene, are commonly proposed to overcome this issue. Fresh materials of Dacini were collected from all regions of Thailand. Sequences were analyzed using a 'barcode' approach. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GenBank database. Twenty species of Dacini were confirmed and their sequences were deposited in the GenBank database: *Dacus* (1 species): *Dacus longicornis* Wiedemann; *Bactrocera* (10 species): *Bactrocera albistrigata* de Meijere, *B. carambolae* Drew & Hancock, *B. correcta* (Bezzi), *B. dorsalis* Hendel, *B. latifrons* (Hendel), *B. limbifera* (Bezzi), *B. nigrotibialis* (Perkins), *B. tuberculata* (Bezzi), *B. umbrosa* (Fabricius), *B. zonata* (Saunders); and *Zeugodaucs* (9 species): *Zeugodacus apicalis* (de Meijere), *Z. caudatus* (Fabricius), *Z. cilifer* (Hendel), *Z. cucurbitae* (Coquillett), *Z. diversa* (Coquillett), *Z. hochii* (Zia), *Z. incisus* (Walker), *Z. isolatus* (Hardy), *Z. platamus* (Hardy) and *Z. tau* (Walker). A molecular phylogeny of these 20 species of Dacini was generated using *COX1* gene. Maximum Likelihood and Bayesian analysis were used to investigate patterns of clustering of sequences with those of other pest species of fruit flies. Analyses of sequences gave consistent results. *COX1* gene was proved to be effective in resolving *Zeugodacus* and *Dacus* from *Bactrocera* fruit fly species. The phylogeny showed that *Zeugodacus* clade is more closely related to *Dacus* rather than *Bactrocera*. This result supported raising *Zeugodacus* to the genus level. This study provided basic information on the number of species of fruit flies of the tribe Dacini present in Thailand. *COX1* sequences were demonstrated as an effective tool in identifying

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

partial barcodes. Thus, we recommended that diagnostic and quarantine laboratories used the *COX1* gene for the accurate identification of Dacini species.

Keywords: Dacini fruit fly, identification, DNA barcoding, phylogenetics

บทคัดย่อ: แมลงวันผลไม้เผ่า (tribe) Dacini เป็นเผ่าที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดของแมลงวันผลไม้ในวงศ์ Tephritidae ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างสูงส่งผลต่อความกังวลใจด้านกักกันพืช และความปลอดภัยทางชีวภาพ แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini มีรูปร่างลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมากยากต่อการจำแนกชนิด การใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยการใช้ดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) จากยีน cytochrome c oxidase (*COX1*) นั้น สามารถช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย สกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *COX1* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบว่า สามารถยืนยันชนิดและบันทึกในฐานข้อมูล GenBank ได้ 20 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้สกุล *Dacus* (1 ชนิด): *Dacus longicornis* Wiedemann; แมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* (10 ชนิด)*: Bactrocera albistrigata* de Meijere*, B. carambolae* Drew & Hancock, *B. correcta* (Bezzi)*, B. dorsalis* Hendel, *B. latifrons* (Hendel), *B. limbifera* (Bezzi), *B. nigrotibialis,* (Perkins), *B. tuberculata* (Bezzi), *B. umbrosa* (Fabricius), *B. zonata* (Saunders); และแมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodaucs* (9 ชนิด): *Zeugodacus apicalis* (de Meijere)*, Z. caudatus* (Fabricius), *Z. cilifer* (Hendel), *Z. cucurbitae* (Coquillett), *Z. diversa* (Coquillett)*, Z. hochii* (Zia), *Z. incisus* (Walker)*, Z. isolatus* (Hardy), *Z. platamus* (Hardy) และ *Z. tau* (Walker) การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *COX1* จากแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 20 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วย maximum likelihood และ Bayesian analysis พบว่า แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน ยีน *COX1* แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการแก้ปัญหาของ *Zeugodacus* และ *Dacus* จาก *Bactrocera* โดยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่า *Zeugodacus* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Dacus* มากกว่า *Bactrocera* ซึ่งผลที่ได้นี้สามารถใช้สนับสนุนในการยกระดับของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Zeugodacus* การศึกษานี้ให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับจำนวนชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในประเทศไทย และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ได้รับการพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini แม้ใช้จากบาร์โคดบางส่วน ดังนั้นสามารถนำยีน *COX1* ไปใช้ในห้องปฏิบัติการวินิจฉัยศัตรูพืชและงานด้านกักกันศัตรูพืชเพื่อระบุชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้อย่างถูกต้อง

คำสำคัญ: แมลงวันผลไม้ Dacini การจำแนกชนิด ดีเอ็นเอบาร์โคด ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

คำนำ

การจำแนกชนิดของศัตรูพืชให้ถูกต้องเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์นั้นเป็นพื้นฐานสำคัญของงานวิจัยทางชีววิทยาขั้นพื้นฐานและการประยุกต์ต่าง ๆ เช่น งานด้านกักกันพืช และการเฝ้าระวังศัตรูพืชรุกราน ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าวิธีการทางสัณฐานวิทยาแบบดั้งเดิมไม่เพียงพอในการจำแนกศัตรูพืชที่มีลักษณะรูปร่างใกล้เคียงกันมาก ปัจจุบันจึงมีการศึกษาอนุกรมวิธานแบบผสมผสาน (integrative taxonomy) ซึ่งเป็นการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ เช่น การศึกษาด้านสัณฐานวิทยา (morphological character) และด้านพันธุกรรม (molecular character) มาร่วมในการศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ยากต่อการจำแนกชนิด เช่น แมลงวันผลไม้ (Boontop, 2016)

แมลงวันผลไม้ (true fruit flies) จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก เนื่องจากเข้าทำลายผัก ผลไม้ได้มากมายหลากหลายชนิด ทำให้ผักผลไม้เน่าเสียก่อนการเก็บเกี่ยว สร้างความเสียหายมากมายต่อการทำการเกษตร แต่แมลงวันผลไม้ในเผ่า (tribe) Dacini นั้นเป็นศัตรูพืชสำคัญในประเทศเขตร้อน และร้อนชื้น สามารถเข้าทำความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตทางการเกษตร จากการสำรวจพบว่า ทั่วโลกมีแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini มากกว่า 932 ชนิดที่เป็นศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ (Doorenweerd *et al*., 2018) และในทวีปเอเชียนั้นพบว่าแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในสกุล *Dacus* Fabricius สกุล *Bactrocera* Macquart และสกุล *Zeugodacus* Hendel เข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรสร้างความเสียหายในเชิงปริมาณและมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Krosch *et al*., 2012)

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้บางชนิด (Boontop *et al*., 2021) แต่พบว่า แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ตัวเต็มวัยนั้นมีความแปรผันของรูปร่างลักษณะภายนอก ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดให้มีความถูกต้องและแม่นยำ (Cameron *et al*., 2010; Schutze *et al*., 2012) การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ ที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลมาร่วมใช้จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้นั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเมื่อทราบชนิดที่ถูกต้องของแมลงวันผลไม้ ทำให้ทราบการแพร่กระจายและชนิดพืชอาหารที่ถูกต้อง สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์แนวทางในการป้องกัน และควบคุมกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ ด้วยลักษณะสัณฐาน ร่วมกับการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcoding) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่งหรือหลายบริเวณร่วมกันในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว และยีน Cytochrome c oxidase subunit 1 (*COX1* หรือ CO1) ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการระบุชนิดที่ไม่รู้จักบางส่วนของสิ่งมีชีวิต (Armstrong and Ball, 2005; Park *et al*., 2011) และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetics analysis) เพื่อนำข้อมูลด้านดีเอ็นเอบาร์โคดจากการศึกษาครั้งนี้มาจัดทำฐานข้อมูลชนิดของแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทยให้มีมาตรฐานทัดเทียมสากล สร้างความน่าเชื่อถือในการเจรจาการนำเข้าส่งออกสินค้าเกษตรของไทยได้หลากหลายชนิด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้) เลือกพื้นที่ที่มีการทำการเกษตร เช่น สวนผลไม้ แปลงผักต่าง ๆ รวมทั้งพื้นที่ป่าธรรมชาติ เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 5 จังหวัด (Figure 1) ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ซึ่งประกอบด้วยสำลีชุบสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 3 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจีนอล คิวลัวร์ และลาติลัวร์ ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอลเพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2563 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอ Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd., Switzerland) ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ของ Drew and Romig, (2013; 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ดองในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

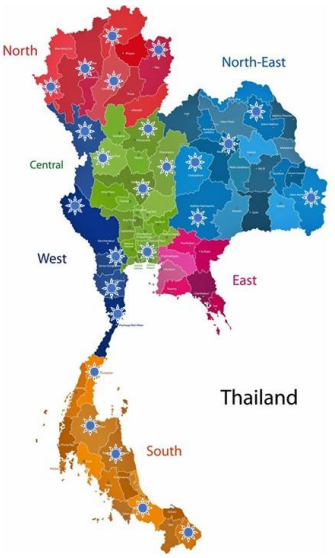

Figure 1. Locations of sampling sites in the six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) at which fruit flies were collected

2. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

2.1 สกัดดีเอ็นเอแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยามาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธี Boontop (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบกับผลิตภัณฑ์บริษัทโดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ข้าง ของแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม lysis buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารละลาย protinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 20 ชั่วโมง ทำการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม lysis buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ล้างตะกอน โดยการเติม wash buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ตามด้วย wash buffer GW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ทิ้งของเหลวที่เหลือตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตรละลายดีเอ็นเอโดยการเติม elution buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal primer จากยีนบางส่วน (partial) *COX1*: LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al*., 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์

HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย GoTaq® 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรโดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2 - 4 ทำซ้ำ จำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ผสม RedSafe dye ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730x1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *COX1* ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA

2.4 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยการ Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากยีน *COX1* ที่ศึกษาเปรียบเทียบความถูกต้อง กับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ขั้นตอน alignment ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al*., 2018) ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลใช้เกณฑ์มาตรฐาน 2 เกณฑ์ คือ maximum likelihood (ML) และ bayesian inference (BI) และเปรียบเทียบ topology ที่ได้จากทั้ง 2 เกณฑ์มาตรฐาน โดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียม dataset ของยีนตำแหน่ง *COX1* สำหรับ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .phy วิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และกำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง และวิเคราะห์โดย Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ .nexus ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) ใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ Mcmcstartingtree = user ngen = 10 000 000 temp = 0.25 nruns = 4 samplefreq = 1000 pintfreq = 1000 nchains = 4 savebrlens = yes stoprules = yes stopval = 0.01; ปรับค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin เพื่อให้ได้ consensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions โดย AWTY (Nylander *et al*., 2008)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักถังเปียกซึ่งบรรจุสารล่อเมทิลยูจีนอล คิวลัวร์ และลาติลัวร์จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

และภาคใต้ของไทยด้วยกับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยแนวทางวินิจฉัยของ Drew and Romig (2013; 2016) พบแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini สามารถจำแนกได้ 3 สกุล จำนวน 23 ชนิด ได้แก่

1) สกุล *Dacus* จำนวน 3 ชนิด (Figure 2) ได้แก่ *Dacus* (*Callantra*) *formosanus* (Tseng & Chu), *D.* (*Callantra*) *longicornis* Wiedemann และ *D.* (*Callantra*) *sphaeroidalis* (Bezzi)

2) สกุล *Bactrocera* จำนวน 10 ชนิด (Figure 3) ได้แก่ *Bactrocera* (*Bactrocera*) *albistrigata* de Meijere, *B.* (*Bactrocera*) *carambolae* Drew & Hancock, *B.* (*Bactrocera*) *correcta* (Bezzi), *B.* (*Bactrocera*) *dorsalis* Hendel, *B.* (*Bactrocera*) *latifrons* (Hendel), *B.* (*Bactrocera*) *limbifera* (Bezzi), *B.* (*Bactrocera*) *nigrotibialis* (Perkins), *B.* (*Bactrocera*) *tuberculata* (Bezzi), *B.* (*Bactrocera*) *umbrosa* (Fabricius) และ *B.* (*Bactrocera*) *zonata* (Saunders)

3) สกุล *Zeugodacus* จำนวน 10 ชนิด (Figure 4) ได้แก่ *Zeugodacus* (*Asiadacus*) *apicalis* (de Meijere) comb. nov, *Z.* (*Zeugodacus*) *caudatus* (Fabricius), stat. rev., *Z.* (*Parasinodacus*) *cilifer* (Hendel), comb. nov., *Z.* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett), stat. rev., *Z.* (*Hemigymnodacus*) *diversus* (Coquillett), *Z.* (*Sinodacus*) *hochii* (Zia), comb. nov., *Z.* (*Parasinodacus*) *incisus* (Walker), comb. nov., *Z.* (*Zeugodacus*) *isolatus* (Hardy), comb. nov., *Z.* (*Zeugodacus*) *platamus* (Hardy) และ *Z.* (*Zeugodacus*) *tau* (Walker), comb. nov.

2. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490/HCO2198 จากยีน *COX1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 23 ชนิด ได้แก่

1) สกุล *Dacus* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *D. formosanus*, *D. longicornis* และ *D. sphaeroidalis*

2) สกุล *Bactrocera* จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *B. albistrigata*, *B. carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. limbifera*, *B. nigrotibialis*, *B. tuberculata*, *B. umbrosa* และ *B. zonata*

3) สกุล *Zeugodacus* จำนวน 10 ชนิด *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae*, *Z. diversus*, *Z. hochii*, *Z. incisus*, *Z. isolatus*, *Z. platamus* และ *Z. tau*

Figure 2. Fruit flies in genus *Dacus*
(A) *Dacus formosanus*, (B) *D. longicornis*, (C) *D. sphaeroidalis*

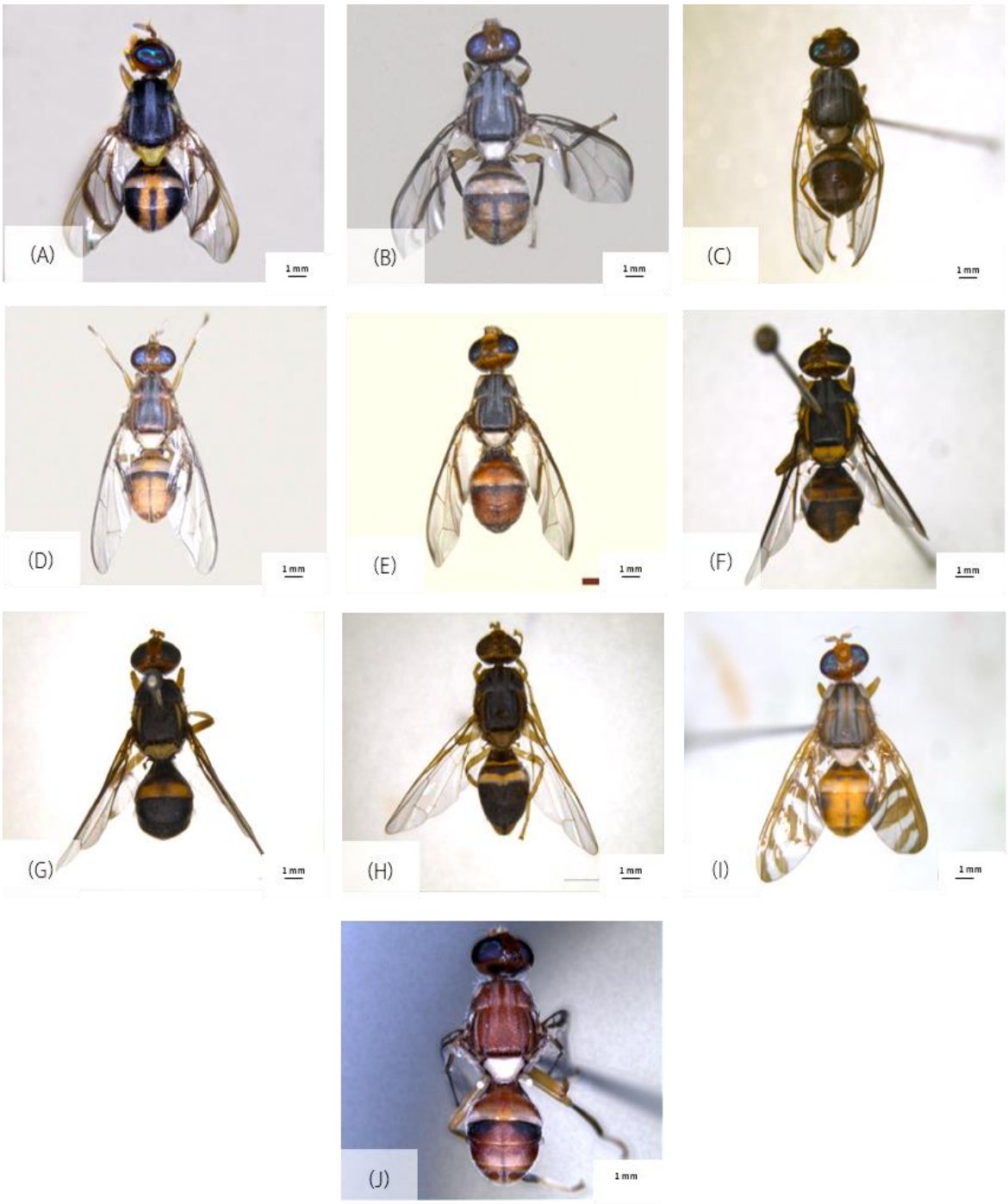

Figure 3. Fruit flies in genus *Bactrocera*

(A) *Bactrocera albistrigata*, (B) *B. carambolae*, (C) *B. correcta,* (D) *B. dorsalis*, (E) *B. latifrons*, (F) *B. limbifera*, (G) *B. nigrotibialis*, (H) *B. tuberculata*, (I) *B. umbrosa*, (J) *B. zonata*

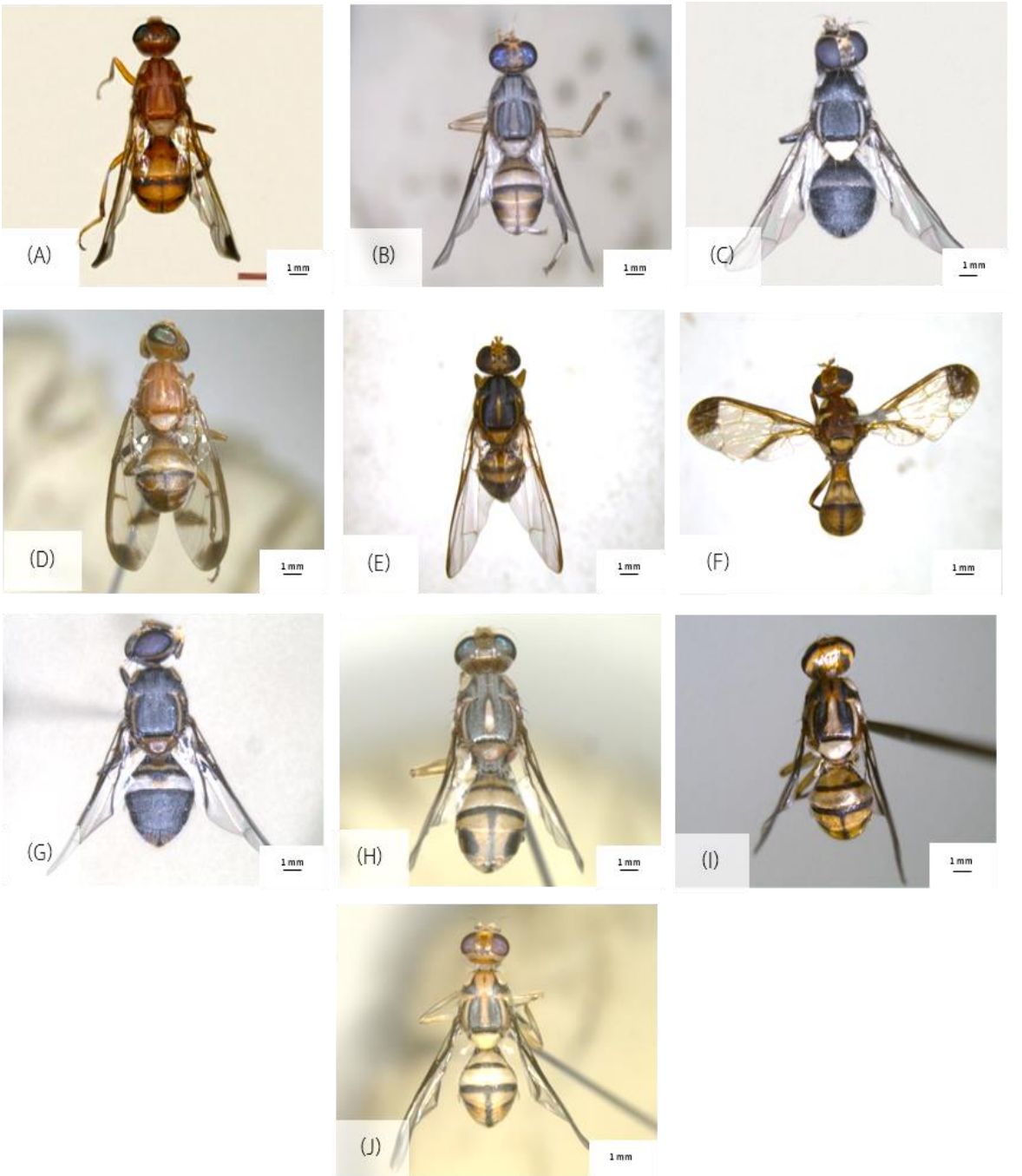

Figure 4. Fruit flies in genus *Zeugodacus*

(A) *Zeugodacus apicalis*, (B) *Z. caudatus*, (C) *Z. cilifer,* (D) *Z. cucurbitae*, (E) *Z. diversus*, (F) *Z. hochii*, (G) *Z. incises*, (H) *Z. isolatus*, (I) *Z. platamus*, (J) *Z. tau*

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ทั้ง 23 ชนิด ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 5) แต่เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้เพียง 20 ชนิด ดังนี้ *D. formosanus, B. albistrigata, B. carambolae*, *B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. limbifera*, *B. nigrotibialis*, *B. tuberculata, B. umbrosa*, *B. zonata*, *Z. apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae, Z. hochii, Z. incisus, Z. isolatus, Z. platamus* และ *Z. tau*

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการ Blast พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *COX1* นั้นมีความถูกต้อง และทำการบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ในรูปแบบ accession number (Table1) และจากข้อมูลที่ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้วิธีการสกัดดังกล่าวมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดได้ แต่สำหรับแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแต่ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้นั้น อาจเกิดจากความแปรผันของสารพันธุกรรมของตัวอย่างทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini และนำมาทำการ alignment ชนิดละ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยกเว้นแมลงวันผลไม้บางชนิดที่มีจำนวนตัวอย่างน้อย เช่น *D. longicornis*, *Z. apicalis* และ *Z. cilifer* ที่ใช้ 5, 5 และ 9 ตัวอย่าง ตามลำดับนั้น (Table 1) ไม่พบความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์เบสในชิ้นส่วนสายพันธุกรรมของ ยีน *COX1* ของแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดที่ศึกษา ดังนั้น ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี phylogenetic reconstruction สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ชนิดละจำนวน 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini แต่ละชนิด (จำนวน 20 ชนิด)

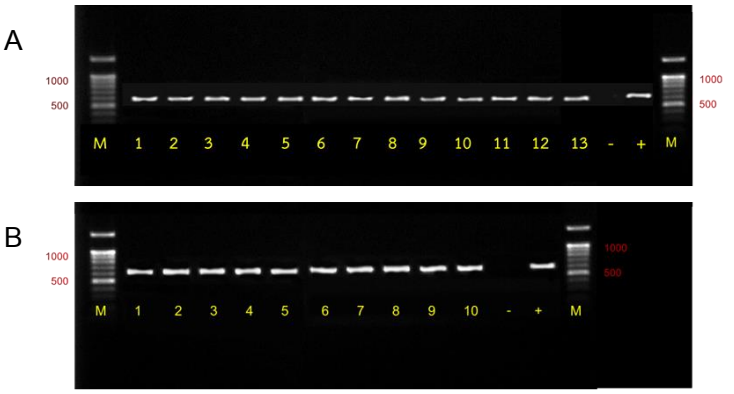

Figure 5. PCR results using the *COX1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair
A: Lane 1 = *Dacus formosanus,* 2 = *D. longicornis,* 3 = *D. sphaeroidalis,* 4 = *Bactrocera albistrigata,* 5 = *B. carambolae,* 6 = *B. correcta, 7* = *B. dorsalis,* 8 = *B. latifrons,* 9 = *B. limbifera,* 10 = *B. nigrotibialis,* 11 = *B. tuberculata,* 12 = *B. umbrosa,* 13 = *B. zonata,* (-) = negative control (double-distilled water: ddH2O), (+) = positive control (*Zeugodacus cucurbitae*) and M = Marker
B: Lane 1 = *Z. apicalis,* 2 = *Z. caudatus,* 3 = *Z. cilifer,* 4 = *Z. cucurbitae,* 5 = *Z. diversus,* 6 = *Z. hochii, 7* = *Z. incisus,* 8 = *Z. isolatus,* 9 = *Z. platamus,* 10 = *Z. tau,* (-) = negative control (ddH2O), (+) = positive control (*Z. cucurbitae*) and M = Marker

Table 1. Collection details (scientific name, specimen voucher, accession number and number of specimens) for fruit flies used in this study

No	Scientific name	Accession number	No. of specimens	Voucher specimen
1	*Bactrocera albistrigata*	MW600096 - 15	20	EMBT0401 - EMBT0420
2	*Bactrocera carambolae*	MW052780 - 84, MW093419 - 23	10	EMBT1301 - EMBT1310
3	*Bactrocera correcta*	MW067300 - 09	10	EMBT0601 - EMBT0610
4	*Bactrocera dorsalis*	MW052785 - 89, MW093424 - 28	10	EMBT0701 - EMBT0710
5	*Bactrocera latifrons*	MW136282 - 93	12	EMBT0901 - EMBT 0913
6	*Bactrocera limbifera*	MZ129218 - 19	10	EMBT0901 - EMBT0920
7	*Bactrocera nigrotibialis*	MZ914401 - 10	10	EMBT1001 - EMBT1020
8	*Bactrocera tuberculata*	MW600156 - 75	10	EMBT1101 - EMBT1120
9	*Bactrocera umbrosa*	MW376156 - 73	14	EMBT1201 - EMBT1215
10	*Bactrocera zonata*	MW600176 - 95	10	EMBT1301 - EMBT1320
11	*Dacus formosanus*	N/A		EMBT0101 - EMBT0120
12	*Dacus longicornis*	MW376179 - 83	5	EMBT0201 - EMBT0220
13	*Dacus sphaeroidalis*	N/A		EMBT0301 - EMBT0320
14	*Zeugodacus apicalis*	MW376174 - 77	5	EMBT1401 - EMBT1405
15	*Zeugodacus caudatus*	MW376156 - 73	15	EMBT1501 - EMBT1520
16	*Zeugodacus cilifer*	MW376133 - 41	9	EMBT1601 - EMBT1620
17	*Zeugodacus cucurbitae*	MW045505 - 14, MW052790 - 94	14	EMBT1601.L(SEM) - 1620
18	*Zeugodacus diversus*	N/A		EMBT1801 - EMBT1820
19	*Zeugodacus hochii*	MW600116 - 35	20	EMBT1901 - EMBT1920
20	*Zeugodacus incisus*	MW600136 - 55	10	EMBT2001 - EMBT2020
21	*Zeugodacus isolatus*	MW600196 -215	20	EMBT2101 - EMBT2120
22	*Zeugodacus platamus*	MW600216 - 235	20	EMBT2201 - EMBT2220
23	*Zeugodacus tau*	MW052795 - 99, MW093429 - 33	10	EMBT1901.L(SEM) - 1920

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ที่สำรวจพบในประเทศไทยจำนวน 20 ชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata* เป็น outgroup (Bartolini *et al*., 2020) พบว่า ข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ maximum likelihood และ Bayesian inference มีความสอดคล้องกัน (Figure 6) สามารถสนับสนุนการจำแนก และยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้ทั้ง 20 ชนิดได้ ทำให้สามารถยืนยันชนิดเพิ่มเติม จากเดิมที่ Boontop *et al*. (2021) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ไว้เพียง 6 ชนิด จากการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยยีน *COX1* ด้วยไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198 ผลการศึกษาครั้งนี้พบแมลงวันผลไม้ในสกุล *Dacus* นั้นมีความใกล้ชิดกับสกุล *Zeugodacus* และแยกออกจากสกุล *Bactrocera* อย่างชัดเจน โดยผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันผลไม้ใน 4 สกุลย่อย ได้แก่ *Asiaducus, Parasinodacus*, *Sinodacus* และ *Zeugodacus* นั้นแยกออกจากสกุลย่อย *Bactrocera* อย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับการศึกษาของ Krosch *et al*. (2012)

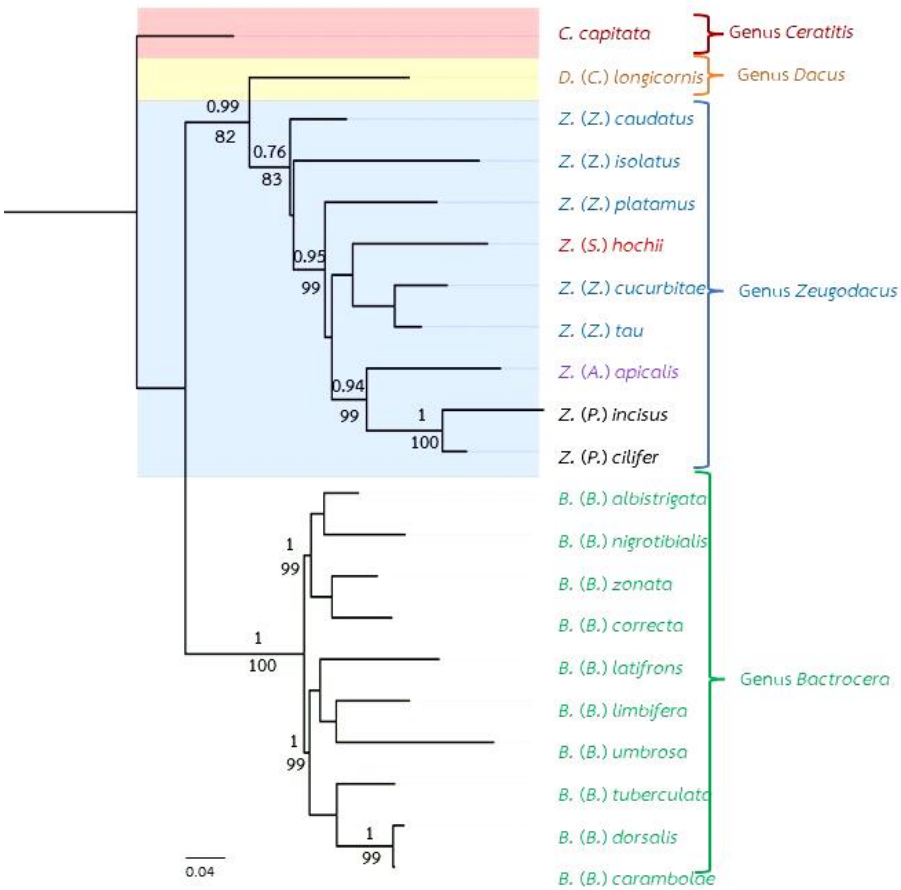

Figure 6. Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of *COX1* gene regions. Bootstrap support values (≥ 70 %) from 1000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥ 0.95) summarised from 1500 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes. Particulars genus is given as a particular colours

ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย Bayesian analysis จากยีน 4 ชนิด ได้แก่ 16S, COI, COII และ white eye genes ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini พบว่า สกุล *Bactrocera* นั้น แยกจากสกุล *Zeugodacus* อย่างชัดเจน และจากการศึกษาของ Virgilio *et al*. (2015) ซึ่งได้ใช้หลักฐานทางความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาด้วย Bayesian analysis จากยีน *COX1* และ 16S การมาสนับสนุนข้อมูลการจัดจำแนกแมลงวันผลไม้ขึ้นมาใหม่ โดยการย้ายแมลงวันผลไม้สกุลย่อย (subgenus) จำนวน 13 สกุลย่อย ในสกุล *Bactrocera* ซึ่งประกอบด้วย *Asiadacus, Austrodacus, Diplodacus, Hemigymnodacus,* comb. nov., *Heminotodacus, Hemiparatridacus, Nesodacus, Niuginidacus, Papuodacus, Paradacus, Parasinodacus,* comb. nov., *Sinodacus* และ *Zeugodacus* ขึ้นมาเป็นสกุลใหม่ ได้แก่ สกุล *Zeugodacus* Hendel (Table 2)

แมลงวันผลไม้ในสกุลย่อย *Parasinodacus* จำนวน 2 ชนิด คือ *Z. cilifer* และ *Z. incisus* นั้น มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และใกล้ชิดกับแมลงวันผลไม้ในสกุล *Asiadacus* ได้แก่ *Z. apicalis* นอกจากนี้ แมลงวันผลไม้ 2 ชนิด ในสกุลย่อย *Zeugodacus* คือ *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และใกล้ชิดกับสกุล *Sinodacus* ได้แก่ *Z. hochii* ซึ่งเมื่อพิจารณาพืชอาหารของแมลงวันผลไม้ทั้งสามชนิด พบว่า แมลงวันผลไม้ทั้งสามชนิดนั้นเข้าทำลายพืชในวงศ์ Cucurbitaceae เช่นเดียวกัน (Allwood *et al*., 1999)

จากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* สามารถสนับสนุนการศึกษาของ Drew and Romig (2013) ซึ่งรายงานชนิดแมลงวันผลไม้ยืนยันว่า *B. albistrigata* และ *B. frauenfeldi* เป็นคนละชนิดกัน เนื่องจากมีขนาดลำตัวที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นการแก้ไขการศึกษาของ Hardy and Adachi (1954) ที่ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของแมลงวันผลไม้และรายงานว่า *B. albistrigata* และ *B. frauenfeldi* นั้นเป็นชนิดเดียวกัน และเป็นชื่อพ้อง (synonym) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาสนับสนุนและยืนยันถึงความแตกต่างของแมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดได้สอดคล้องกับการกระจายที่พบว่า *B. albistrigata* กระจายตัวในประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ในขณะที่ *B. frauenfeldi* นั้น พบกระจายตัวอยู่เฉพาะในปาปัวนิวกินี หมู่เกาะโซโลมอน และรัฐควีนสแลนด์ของเครือรัฐออสเตรเลียเท่านั้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าการแยกความแตกต่างระหว่างชนิดที่มีลักษณะรูปร่างภายนอกใกล้เคียงกันนั้นมีความสำคัญมาก เพราะทำให้ทราบเขตการกระจายที่ถูกต้อง มีความสำคัญต่อการกำหนด area freedom (พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่ประกาศให้ปลอดศัตรูพืชที่ระบุ) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการประกอบการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (pest list) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (pest risk analysis) เพื่อใช้ในการเจรจาการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตรอีกด้วย

นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้ยังช่วยยืนยันข้อมูลแมลงวันผลไม้ใน 2 ชนิด ใน สกุล *Bactrocera* ซึ่งมักพบความผิดพลาดจากการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ *B. nigrotibialis* และ *Z. cilifer* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกันนั้น เมื่อใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสามารถยืนยันและสนับสนุนได้ว่า *Z. cilifer* นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันอย่างชัดเจนจาก *B. nigrotibialis* นอกจากนี้ ลำดับนิวคลิโอไทด์ที่แตกต่างและผลของการจัดกลุ่มจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นสามารถแยกแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex ที่มีความซับซ้อน ได้แก่ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* ได้อีกด้วย

จากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลลำดับพันธุกรรม หรือ ดีเอ็นเอบาร์โคดของยีน *COX1* นั้นมีความสอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ซึ่งพบว่า การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้ของ Boontop *et al*. (2021) พบว่า แมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทยทั้ง 3 สกุล ได้แก่ *Bactrocera, Zeugodaucs* และ *Dacus* นั้นมีลักษณะแตกต่างการอย่างเห็นได้ชัดจากการจัดความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

Table 2. Scientific name of Dacini fruit flies in Thailand

	Homotypic synonym	Current name
1	*Bactrocera (Asiaducus) apicalis* de Meijere	*Zeugodacus (Asiadacus) apicalis* (de Meijere), comb. nov.
2	*Bactrocera (Zeugodacus) caudata* (Fabricius)	*Zeugodacus (Zeugodacus) caudatus* (Fabricius), stat. rev.
3	*Bactrocera (Parasinodacus) cilifera* (Hendel)	*Zeugodacus (Parasinodacus) cilifer* (Hendel), comb. nov.
4	*Bactrocera (Zeugodacus) cucurbitae* (Coquillett)	*Zeugodacus (Zeugodacus) cucurbitae* (Coquillett), stat. rev.
5	*Bactrocera (Hemigymnodacus) diversa* (Coquillett)	*Zeugodacus (Hemigymnodacus) diversus* (Coquillett)
6	*Bactrocera (Sinodacus) hochii* (Zia)	*Zeugodacus (Sinodacus) hochii* (Zia), comb. nov.
7	*Bactrocera (Parasinodacus) incisa* (Walker)	*Zeugodacus (Parasinodacus) incisus* (Walker), comb. nov.
8	*Bactrocera (Zeugodacus) isolata* (Hardy)	*Zeugodacus (Zeugodacus) isolatus* (Hardy), comb. nov.
9	*Bactrocera (Zeugodacus) platamus* (Hardy)	*Zeugodacus (Zeugodacus) platamus* (Hardy)
10	*Bactrocera (Zeugodacus) tau* (Walker)	*Zeugodacus (Zeugodacus) tau* (Walker), comb. nov.

สรุป

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยใช้กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ร่วมกับสารล่อที่ใช้เมทิลยูจีนอล คิวลัวร์ และลาติลัวร์ และในการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบแมลงวันผลไม้จำนวน 3 สกุล ได้แก่ *Dacus, Bactrocera* และ *Zeugodacus* ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดโดยการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *COX1* ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โคดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 20 ชนิด

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โคดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ซึ่งในประเทศไทยมักใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก ทำได้ยากและต้องอาศัยความชำนาญของนักอนุกรมวิธานซึ่งเป็นสาขาที่ขาดแคลนยิ่งนัก ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ยืนยันว่า *COX1* เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากยีน *COX1* เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาดนิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500 - 800 คู่เบส เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ง่ายและรวดเร็ว ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วยสามารถจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้อย่างถูกต้องถึง 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลที่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันผลไม้ นอกจากนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ maximum likelihood และ Bayesian analysis นั้นเป็นวิธีการที่เหมาะสมสามารถยืนยันชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้ โดยพบว่าแมลงวันผลไม้ทั้ง 3 สกุลนั้น แยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องมีการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โคดของยีนอื่น ๆ มาใช้ในการศึกษาเพิ่มขึ้น

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรกที่ใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โคดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาสนับสนุนในการจำแนกและยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์ทันสมัยและเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากลมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ชนินทร ดวงสอาด คุณ ณฐมน แก้วนุ้ย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และ ดร.กตัญญุฑิตา ดำช่วย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ผู้ให้ความช่วยเหลือ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

Allwood, A.J., A Chinajariyawong, R.A.I. Drew, E.L. Hamacek, D.L. Hancock, C. Hengsawad, J.C. Jinapin, M. Jirasurat, C.K. Krong, S. Kritsaneepaiboon, C.S.T Leong and S. Vijaysegaran. 1999. Host plant records of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Southeast Asia. Raffles Bulletin of Zoology 47(7): 1-92.

Armstrong, K.F. and S.L. Ball. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 360(1462): 1813-1823.

Bartolini, I., J. Rivera, N. Nolazco and A. Olórtegui. 2020. Towards the implementation of a DNA barcode library for the identification of Peruvian species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). PLoS ONE 15(1): e0228136, doi: 10.1371/journal.pone. 0228136.

Boontop, Y. 2016. Natural variation and biogeography of the melon fruit fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), in Southeast-Asia and the West-Pacific. Ph.D. Thesis. Queensland University of Technology, Brisbane, Queensland. 347 p.

Boontop, Y., C. Buamas, K. Sonsiri, J. Duangthisan and S. Kaewsawat. 2021. Toward the identification of Dacini fruit flies (Diptera: Tephtidae) in Thailand using phylogenetic and wing morphometrics analyses. Thai Agricultural Research Journal 39(2): 118-130. (in Thai)

Cameron, E.C., J.A. Sved and A.S. Gilchrist. 2010. Pest fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northwestern Australia: one species or two? Bulletin of Entomological Research 100(2): 197-206.

Doorenweerd, C., L. Leblanc, A.L. Norrbom, M.S. Jose and D. Rubinoff. 2018. A global checklist of the 932 fruit fly species in the tribe Dacini (Diptera, Tephritidae). ZooKeys 730: 19-56.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to Worth-West Australasia. CABI, Indomalaya to Worth-West Australasia. Wallingford. 664 p.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2016. Keys to the Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia. CABI, Wallingford. 487 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 Miology and Biotechnology 3(5): 294-299.

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

Hardy, D.E. and M.S. Adachi. 1954. Studies in the fruit flies of the Philippine Islands, Indonesia, and Malaya Part 1. Dacini (Tephritidae-Diptera). Pacific Science 8(2): 147-204.

Krosch, M.N., M.K. Schutze, K.F. Armstrong, G.C. Graham, D.K. Yeates and A.R. Clarke. 2012. A molecular phylogeny for the tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. Molecular Phylogenetics and Evolution 64(3): 513-523.

Kumar, S., G. Stecher, M.K. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35(6): 1547-1549.

Nylander, J.A.A., J.C. Wilgenbusch, D.L. Warren and D.L. Swofford. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. Bioinformatics 24(4): 581-583.

Park, D.S., R. Foottit, E. Maw and P.D.N. Hebert. 2011. Barcoding bugs: DNA-based identification of the true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). PLoS ONE 6(4): e18749, doi: 10.1371/journal.pone. 0018749.

Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19(12): 1572-1574.

Schutze, M.K., A. Jessup and A.R. Clarke. 2012. Wing shape as potential discriminator of morphologically similar pest taxa within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae). Bulletin of Entomological Research 102: 103-111.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30(19): 1312-1313.

Virgilio, M., K. Jordaens, C. Verwimp, I. M. White and M. De Meyer. 2015. Higher phylogeny of frugivorous flies (Diptera, Tephritidae, Dacini): Localised partition conflicts and a novel generic classification. Molecular Phylogenetics and Evolution 85: 171-179.