การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อการจำแนกชนิดที่เชื่อถือได้ของแมลงวันหนอนชอนใบ (Diptera: Agromyzidae) ในประเทศไทย

DNA Barcodes and Phylogenetic Study for Reliable Identification of Leafminers (Diptera: Agromyzidae) in Thailand

ยุวรินทร์ บุญทบ[1*] สุนัดดา เชาวลิต[1] ชมัยพร บัวมาศ[1]
เกศสุดา สนศิริ[1] และ เฉลิมวุธ สมปาก[2]
Yuvarin Boontop[1*], Sunadda Chaovalit[1], Chamaiporn Buamas[1]
Kessuda Sonsiri and Chalermwoot Somapark[2]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900
[1]Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 19000, Thailand
[2]กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900
[2]Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand
**Corresponding author: Email: Yuvarin9320@gmail.com*

Abstract: Agromyzid leafminers comprise a pest group that causes considerable economic losses to vegetable crops and poses serious quarantine challenges. In this study, the fragment of the cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene (*Cox1*) of the mitochondrial genome was sequenced to assist in the species identification of Agromyzidae which are pestiferous in Thailand. Sequences of leafminers collected in the country were analyzed using a "barcode" region and identified using standard nucleotide BLAST from GenBank database. Five species of *Liriomyza* sp. were identified and sequences of 20 samples for each species were deposited in GenBank: *Liriomyza brassicae* Riley, 1884; *Liriomyza chinensis* Kato, 1949; *Liriomyza huidobrensis* Blanchard, 1926; *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938; and *Liriomyza trifolii* Burgess, 1880. A molecular phylogeny of these five species of leafminer was generated using the sequences of *Cox1* gene. Bayesian and Maximum Likelihood analyses were used to investigate patterns of clustering. Analyses gave consistent results. The phylogeny showed that the *L. chinensis* clade is also separated from the other leafminers, and it is closely related to *L. chinensis* haplotype A from Japan. The phylogeny showed that the *L. sativae* clade is more closely related to *L. trifolii*. This study provided basic information on the number of species and DNA data of *Liriomyza* in Thailand. *Cox1* sequences were demonstrated as an effective tool for identifying leafminer species.

Keywords: Leaf miner flies, identification, DNA barcoding, phylogenetics

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

บทคัดย่อ: แมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae จัดได้ว่าเป็นกลุ่มศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อพืชผักและความท้าทายที่สำคัญยิ่งต่องานด้านการกักกันพืช การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากส่วนของยีน cytochrome *c* oxidase subunit 1 mitochondrial gene (*Cox1*) มาช่วยในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ซึ่งเป็นศัตรูพืชผักที่สำคัญในประเทศไทย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบได้ถูกรวบรวมภายในประเทศและนำไปวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank ผลการทดลองพบว่า แมลงวันหนอนชอนใบ *Liriomyza* sp. จำนวน 5 ชนิด จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 20 ตัวอย่าง ถูกระบุและบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ว่าเป็นชนิดพันธุ์ *Liriomyza brassicae* Riley, 1884; *Liriomyza chinensis* Kato, 1949; *Liriomyza huidobrensis* Blanchard, 1926; *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938 และ *Liriomyza trifolii* Burgess, 1880 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *Cox1* จากแมลงวันหนอนชอนใบจำนวน 5 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วย Maximum likelihood และ Bayesian analysis พบว่า แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกันยีน *Cox1* แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการใช้จำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ โดยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าแมลงวันหนอนชอนใบ *L.chinensis* นั้น มีความแตกต่างกับแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่นๆ และยังพบว่า แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* ที่พบในประเทศไทยนั้นมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับชนิดพันธุ์ haplotype A ที่พบในประเทศญี่ปุ่น และแผนภูมิวิวัฒนาการยังแสดงให้เห็นว่า แมลงวันหนอนชอนใบ *L. sativae* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแมลงวันหนอนชอนใบ *L. trifolii* มากกว่าแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ การศึกษานี้ให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับจำนวนชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* ในประเทศไทย และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cox1* ได้รับการพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบ

คำสำคัญ: แมลงวันหนอนชอนใบ การจำแนกชนิด ดีเอ็นเอบาร์โคด ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

คำนำ

จากการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศและสภาพแวดล้อมในปัจจุบันส่งผลต่อการอุบัติใหม่ (emerging species) และการรุกราน (invasive species) ของศัตรูพืชเพิ่มขึ้นหลากหลายชนิด และในหลาย ๆ ประเทศพบการเปลี่ยนแปลงจากศัตรูพืชรอง (minor pest) สามารถเข้าทำลายพืช ผัก และผลผลิตทางการเกษตรมากขึ้นจนกลายมาเป็นศัตรูพืชหลัก (major pest) แมลงวันหนอนชอนใบ (leafminers) เป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่ง โดยในระยะตัวอ่อนจะเข้าทำลายและกัดกินใบพืชบริเวณชั้นบนและล่างของเนื้อเยื่อเมโซฟิลล์ (mesophyll tissue) จึงถูกเรียกว่า “หนอนชอนใบ” (Spencer and Steyskal, 1986; Parrella, 1987;) แมลงวันหนอนชอนใบจึงนับได้ว่าเป็นหนึ่งในศัตรูพืชที่ในปัจจุบันสร้างความเสียหายให้ผลผลิตทางการเกษตรมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชผักเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อการค้าขายเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศ (Boontop *et al*., 2022a) ประเทศไทยในฐานะที่มีการส่งออกผักและผลไม้เป็นรายได้หลักที่สำคัญของประเทศ (Center for Information Technology and Communications, 2022) การตรวจพบแมลงวันหนอนชอนใบติดไปกับพืชผักที่ต้องการส่งออก ส่งผลให้เกิดการกีดกันทางการค้าตามมาภายหลัง

แมลงวันหนอนชอนใบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดเป็นชนิดซับซ้อน (cryptic species) จึงทำให้ยากต่อการจำแนกชนิด โดยในปี ค.ศ. 2021 ประเทศญี่ปุ่นพบแมลงวันหนอนชอนใบ *Liriomyza chinensis* แบ่งเป็น 2 haplotypes ได้แก่ haplotype A และ haplotype B ซึ่งมีพฤติกรรมการเข้าทำลายและการก่อให้เกิดความเสียหายที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่า แมลงวันหนอนชอนใบ haplotype B ซึ่งเป็นชนิดรุกรานที่ค้นพบใหม่นี้ มีการเข้าทำลายและสร้างความเสียหายในพืชสกุลหอมได้มากกว่า

haplotype A อีกทั้งยังพบว่า ลักษณะการเข้าทำลายจะเป็นลักษณะการเจาะทำลายแบบเป็นเส้นยาวแบบต่อเนื่อง (continuous mine) ซึ่งต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบ haplotype A ที่สำรวจพบมาก่อนหน้า มีการเข้าทำลายแบบเป็นเส้นยาวแบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous mine) (Tokumaru *et al*., 2021)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการแข่งขันการส่งออกและมาตรการทางด้านสุขอนามัยพืชที่เข้มงวดสำหรับการส่งออกผักผลไม้จากประเทศไทยไปสู่ตลาดโลกนั้น การจำแนกศัตรูพืชที่มีโอกาสติดไปกับการส่งออกสินค้าเกษตรที่โดยเฉพาะ “แมลงวันหนอนชอนใบ” ซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของพืชผักส่งออกให้มีความถูกต้อง มีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับสากลนั้นเป็นสิ่งสำคัญ เพราะสามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (pest list) เพื่อการส่งออกพืชผักผลไม้ของไทยสู่ตลาดโลกได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้การจำแนกชนิดของศัตรูพืชให้ถูกต้องเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์นั้นมีความสำคัญต่องานวิจัยทางชีววิทยาขั้นพื้นฐานและการประยุกต์ต่าง ๆ อีกทั้งในปัจจุบันงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับแมลงวันหนอนชอนใบนั้น มีการศึกษาการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบดั้งเดิม (traditional taxonomy) (Boontop *et al*., 2022a) และชนิดพืชอาหารนั้น (Boontop *et al*., 2022b) อาจไม่เพียงพอในการจำแนกศัตรูพืชที่มีลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่น่าเชื่อถือและมีการยอมรับในระดับสากลมาร่วมในการจัดจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ

การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบ และสามารถบอกถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของแมลงวันหนอนชอนใบ เพื่อยืนยันชนิดและความสัมพันธ์ของแมลงวันหนอนชอนใบที่พบในประเทศไทย ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้ก่อให้เกิดความน่าเชื่อถือด้านข้อมูลทางวิชาการ และเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ของแมลงวันหนอนชอนใบที่พบในประเทศไทย รวมทั้งสามารถจัดการและวางแนวทางในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีโอกาสรุกรานเข้ามาในประเทศไทยในอนาคตได้อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) ของแมลงวันหนอนชอนใบ

1.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบ

ตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบตัวเต็มวัยที่ใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดได้จากตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่การเกษตรทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) (Boontop *et al*., 2022a) โดยตัวอย่างแมลงหนอนชอนใบถูกเก็บรักษาไว้ในสารละลายแอลกอฮอล์ เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาตัวอย่างภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว โดยประยุกต์จากวิธีของ Boontop (2016) ร่วมกับคำแนะนำที่แนบมาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) โดยตัดขาทางด้านขวาของแมลงวันหนอนชอนใบ จำนวน 3 ข้าง ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม lysis buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย lysis buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ และเติมสารละลายแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ ปริมาตร 210 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 11,000 x g ระยะเวลา 1 นาที จากนั้นล้างตะกอน โดยการเติมสารละลาย

wash buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 11,000 x g ระยะเวลา 1 นาที และทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย wash buffer GW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000 x g ระยะเวลา 1 นาที ดูดสารละลายของเหลวใสด้านบนทิ้งและเก็บตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 11,000 x g ระยะเวลา 1 นาที ทำการย้ายตะกอนดีเอ็นเอจากหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร และละลายดีเอ็นเอโดยเติมสารละลาย elution buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้ายเพื่อเก็บสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 11,000 x g ระยะเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในวิธีการขั้นต่อไป

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Cox1* ซึ่งเป็นชิ้นส่วนยีนในตำแหน่งอนุรักษ์ของสิ่งมีชีวิตด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์สากล (universal primer) จากบางส่วนของยีน *Cox1* (partial *Cox1* gene) จำนวน 1 คู่ คือ LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al.*, 1994) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ LCO1490 และไพรเมอร์ HCO2198 เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ละ 1 ไมโครลิตร สารละลายสำเร็จรูป GoTaq® ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermocycle) โดยกำหนดขั้นตอนและระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้ 1) initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 นาที 2) denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 วินาที (โดยในขั้นตอน 2 - 4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมกับสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ที่ละลายในสารละลาย 1X TBE buffer จากนั้นทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) ผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ ระยะเวลา 30 นาที โดยเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ทำการบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน *Cox1* ขนาดประมาณ 700 คู่เบส (bp) ทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

1.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *Cox1* ของแมลงวันหนอนชอนใบ

ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cox1* ของแมลงวันหนอนชอนใบจากข้อ 1.3 เพื่อยืนยันความถูกต้อง ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วยการ BLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?

PAGE_TYPE= BlastSearch) และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบที่ได้ บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหนอนชอนใบ

2.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *Cox1* นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่บันทึกไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank จากข้อ 1.4 และร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank (Table 1) บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดในรูปแบบ FASTA และเปรียบเทียบด้วยการจัดให้ตรงตำแหน่ง (alignment) ทดสอบโมเดลที่เหมาะสมก่อนการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) โดยกำหนดให้ *Metopomyza flavonotata* และ *Metopomyza scutellata* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่พันธุกรรมใกล้เคียงกับวงศ์แมลงวันหนอนชอนใบ (Xuan *et al.,* 2023) เป็น outgroup สำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้ ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลใช้เกณฑ์มาตรฐาน 2 เกณฑ์ คือ Bayesian inference (BI) และ Maximum likelihood (ML) และเปรียบเทียบ topology ที่ได้จากทั้ง 2 เกณฑ์มาตรฐาน โดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียม dataset ของยีนตำแหน่ง *Cox1* สำหรับวิเคราะห์โดย 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) และการวิเคราะห์โดย 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

2.2 คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบด้วยโปรแกรมสำเร็จ MEGA รุ่น 11.0.13 โดยคำนวณจากโมเดล Tamura 3-parameter และใช้อัลกอริทึม (algorithm) โดยวิธี character-base ด้วยการจัดกลุ่มแบบ Maximum likelihood (ML) และทำการวิเคราะห์ bootstrap จำนวน 1,000 รอบ (Tamura *et al*., 2021)

Table 1. Obtained nucleotide details from GenBank (scientific name, type of haplotype, and accession number) for leafminers used in this study

	Scientific name	GenBank accession numbers	Haplotypes	References
1	*Liriomyza brassicae*	KY837720.1		Unpublished
2	*Liriomyza chinensis*	LC596957.1	A	Tokumaru *et al*., 2021
	Liriomyza chinensis	LC596958.1	B	Tokumaru *et al*., 2021
3	*Liriomyza huidrobrensis*	JQ862474.1		Wang *et al*., 2014
4	*Liriomyza sativae*	HQ333260.1		Yang *et al*., 2011
5	*Liriomyza trifolii*	JN570506.1		Carapelli *et al*., 2018
6	*Metopomyza flavonotata*	EF104707.1		Xuan *et al.,* 2023
7	*Metopomyza scutellata*	MG477113.1		Xuan *et al.,* 2023

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) ของแมลงวันหนอนชอนใบ

จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490/HCO2198 จากยีน *Cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบที่สำรวจและเก็บรวบรวมในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย (Boontop *et al.*, 2022b) และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขนาด 650 - 700 คู่เบส โดยเมื่อนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่า มีความใกล้เคียงกับแมลงวันหนอนชอนใบ 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard,1926), *L. sativae* Blanchard, 1938 และ *L. trifolii* (Burgess, 1880) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (percent homology identity) สูงถึง 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *Cox1* นั้น มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cox1* ของแมลงวันหนอนชอนใบชนิดเดียวกันในแหล่งอื่น ๆ ที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ และได้ทำการบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการศึกษานี้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ในรูปแบบ accession number (Table 2)

จากค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันหนอนชอนใบที่สำรวจพบในประเทศไทยเทียบกับแหล่งอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank ที่สูงถึง 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ากรรมวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมและสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงสามารถใช้วิธีการสกัดดังกล่าวมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดของแมลงวันหนอนชอนใบได้ นอกจากนี้ ยังเป็นการยืนยันว่ายีน *Cox1* ซึ่งเป็นยีนที่พบในไมโทคอนเดรียของเซลล์ มีความหลากหลายรูปของจีโนไทป์ (genotype) ต่ำ จึงถือเป็นยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ (conserve sequence) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีนนี้มีความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันสูง อีกทั้งยังมีการแทรกสอดเข้ามาและการหลุดหายของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย (Tipphet *et al*., 2018) ดังนั้น จึงทำให้ยีน *Cox1* เป็นยีนที่มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดและระบุชนิดและรวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหนอนชอนใบได้ สอดคล้องกับงานวิจัยหลาย ๆ งานก่อนหน้ามีการรายงานว่ายีน *Cox1* สามารถระบุชนิดและจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้หลากหลาย ได้แก่ หอยทาก แมลงไม่มีปีก ผีเสื้อ นก แมงมุม ปลา มด สัตว์ทะเล ไดอะตอม และเชื้อรา เป็นต้น (Siripiyasing and Chaveerach, 2011)

Table 2. Collection details (scientific name, number of specimens, voucher specimen, and accession number) of leafminers barcoded in Thailand

	Scientific names	No. of specimens	Voucher specimens	GenBank accession numbers
1	*Liriomyza brassicae*	20	LM0101 – LM0120	OM327452 – 61, ON565771 - 80
2	*Liriomyza chinensis*	20	LM0201 – LM0220	OM327462 – 71, ON565781 - 90
3	*Liriomyza huidrobrensis*	20	LM0301 – LM0320	OM327472 – 81, ON565791 - 00
4	*Liriomyza sativae*	20	LM0401 – LM0420	OM327482 – 99, ON565801 - 02
5	*Liriomyza trifolii*	20	LM0501 – LM0520	OM327500 – 09, ON565803 - 10

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหนอนชอนใบ

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบ โดยนำมาทำการเปรียบเทียบด้วยการจัดให้ตรงตำแหน่ง (alignment) ชนิดละ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามลำดับนั้น (Table 1) ไม่พบความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *Cox1* ของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดที่ศึกษา ดังนั้นในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี phylogenetic reconstruction สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบชนิดละ 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิด (จำนวน 5 ชนิด) ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank (Table 2) และลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันหนอนชอนใบ *Metopomyza scutellata* และ *M. flavonotata* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่พันธุกรรมใกล้เคียงกับวงศ์แมลงวันหนอนชอนใบ (Xuan *et al*., 2023) เพื่อใช้เป็น outgroup สำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้จากการวิเคราะห์ 2 วิธีการ ที่เป็นที่ยอมรับและน่าเชื่อถือในระดับสากล ได้แก่ แบบ Bayesian inference (BI) และ Maximum likelihood (ML) เพื่อเป็นการทดสอบว่า phylogenetic tree ที่ได้มีความน่าเชื่อถือ และแสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่ใช้ในการศึกษามีความน่าเชื่อถือและมีความแปรปรวนน้อย ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ให้ผลที่สอดคล้องกันทั้งสองวิธีการ ทำให้วิวัฒนาการที่ส่งผลต่อการจำแนกมีความสามารถสนับสนุนการจำแนกและยืนยันชนิดแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด ได้เป็นอย่างดี

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากสร้างแผนภูมิต้นไม้ที่สำรวจพบในประเทศไทยจำนวน 5 ชนิด (*L. brassicae*, *L. chinensis*, *L. huidrobrensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii*) พบว่า แมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิดมีความสัมพันธ์เชิงวัฒนาการแบบมีบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic group) และสามารถแยกออกเป็น 3 กลุ่มได้ชัดเจน ได้แก่ กลุ่มที่ 1 แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* (Clade A) กลุ่มที่ 2 แมลงวันหนอนชอนใบ *L. huidrobrensis* (Clade B) และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ แมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae*, *L. sativae* และ *L. trifolii* ซึ่งจัดอยู่ใน Clade C (Figure 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแมลงวันหนอนชอนใบ *L. huidrobrensis* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับแมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae*, *L. sativae* และ *L. trifolii* มากกว่า แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* ซึ่งจากผลการศึกษาที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Xuan *et al*. (2023) ที่พบว่า ข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความหลากหลายของแมลงหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* คือ *L. trifolii* และ *L. sativae* นั้นอยู่กลุ่มเดียวกัน แต่แมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae* แยกออกมาอีกกลุ่มหนึ่ง

เมื่อพิจารณาผลของการคำนวณค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) ของแมลงหนอนชอนใบที่พบในประเทศไทยกับแมลงหนอนชอนใบจากฐานข้อมูล GenBank (Table 3) พบว่า แมลงหนอนชอนใบที่พบในประเทศไทย (แมลงวันหนอนชอนใบ *L.brassicae, L.chinensis* 1, *L.chinensis* 2, *L.huidrobrensis, L.sativae* และ *L.trifolii*) มีค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมเมื่อเทียบกับแมลงหนอนชอนใบจากฐานข้อมูล Genbank มีค่าเท่ากับ 0.000 - 0.005 แสดงให้เห็นว่าแมลงหนอนชอนใบที่พบในประเทศไทยมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับแมลงหนอนชอนใบได้จากฐานข้อมูลเป็นอย่างมาก

ในส่วนของแมลงวันหนอนชอนใบที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก และเป็น Haplotype ที่แตกต่างกันนั้น พบว่า ค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมของแมลงหนอนชอนใบ *L. chinensis* 1 และ *L. chinensis* 2 ซึ่งสำรวจและรวบรวมได้จากประเทศไทย เมื่อเทียบกับ *L. chinensis* haplotype A* ซึ่งเป็นชนิดที่มีการระบาดที่ประเทศญี่ปุ่น มีค่าเท่ากับ 0.003 - 0.005 ส่วน *L. chinensis* haplotype B* มีค่าเท่ากับ 0.015 - 0.016 แสดงให้เห็นว่า แมลงหนอนชอนใบที่พบในประเทศไทยมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *L. chinensis* haplotype A* มากกว่า *L. chinensis* haplotype B*

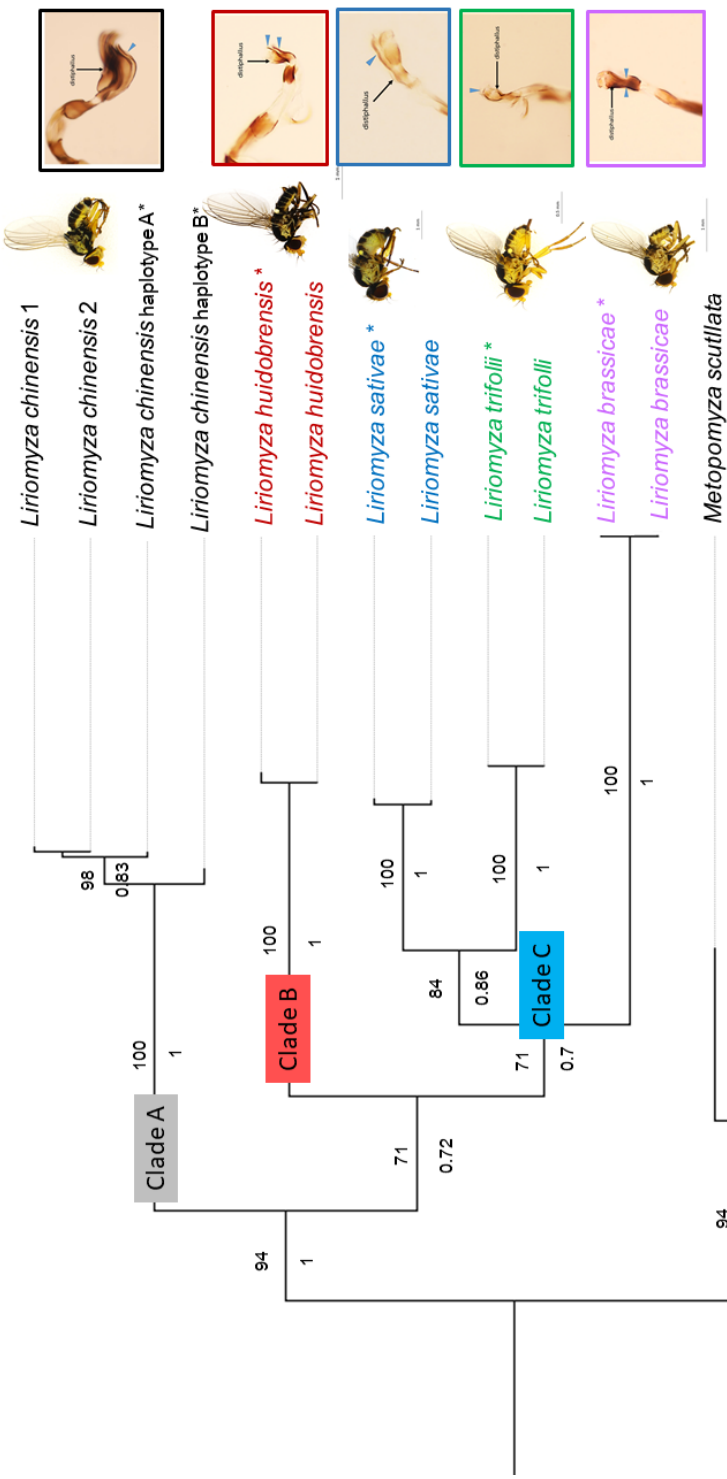

Figure 1. Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of *Cox1* gene regions. Bootstrap support values (≥ 70 %) from 1000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥ 0.95) summarised from 1500 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes. Particulars genus is given as a particular colours. * = nucleotides from GenBank

Table 5. Pairwise genetic distance matrix of *Cox1* gene sequences among of genus *Liriomyza* and *Metopomyza*. * nucleotides from GenBank

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. *Liriomyza brassicae* *														
2. *Liriomyza brassicae*	0.000													
3. *Liriomyza chinensis* haplotype A*	0.164	0.164												
4. *Liriomyza chinensis* haplotype B*	0.150	0.150	0.015											
5. *Liriomyza chinensis* 1	0.165	0.162	0.003	0.015										
6. *Liriomyza chinensis* 2	0.167	0.165	0.005	0.016	0.002									
7. *Liriomyza huidobrensis* *	0.172	0.170	0.150	0.148	0.144	0.146								
8. *Liriomyza huidrobrensis*	0.168	0.166	0.146	0.144	0.140	0.142	0.003							
9. *Liriomyza sativae* *	0.136	0.136	0.151	0.149	0.151	0.153	0.125	0.121						
10. *Liriomyza sativae*	0.134	0.132	0.149	0.147	0.147	0.149	0.121	0.117	0.003					
11. *Liriomyza trifolii* *	0.149	0.147	0.162	0.156	0.160	0.162	0.138	0.134	0.081	0.081				
12. *Liriomyza trifolii*	0.149	0.147	0.162	0.156	0.160	0.162	0.138	0.134	0.081	0.081	0.000			
13. *Metopomyza flavonotata* *	0.174	0.172	0.150	0.150	0.148	0.150	0.165	0.161	0.157	0.157	0.164	0.164		
14. *Metopomyza scutellate* *	0.174	0.174	0.142	0.142	0.138	0.140	0.143	0.139	0.132	0.134	0.142	0.142	0.103	

อย่างไรก็ตาม การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในครั้งนี้ยังช่วยสนับสนุนและยืนยันถึงความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา การกระจายตัวและพืชอาหารของแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด ที่พบเข้าทำลายพืชผักในประเทศไทย เช่น แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* ใน Clade A นั้น ส่วนอกด้านบน (scutellum) มีสีดำ แตกต่างจาก อีก 4 ชนิด ที่ส่วนอกด้านบนมีสีเหลืองอย่างเห็นได้ชัด (*L. huidobrensis*; Clade B) และ (*L. brassicae, L. sativae* และ *L. trifolii*; Clade C) (Boontop *et al*., 2022b) นอกจากนี้ ยังมีความสอดคล้องกับลักษณะรูปร่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ในส่วนของ distipallus ที่เป็นลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบอีกด้วย โดยแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* นั้นมีรูปร่างและขนาดใหญ่แตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด และแมลงวันหนอนชอนใบอีก 2 ชนิด คือ *L. trifolii* และ *L. sativae* ที่จัดกลุ่มอยู่ด้วยกันนั้นมีลักษณะภายนอกและมีลักษณะรูปร่างของ distipallus ที่คล้ายคลึงกันมากกว่าแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ (Boontop *et al*., 2022a)

นอกจากลักษณะสัณฐานภายนอกแล้วยังพบว่า ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นสอดคล้องกับชนิดพืชอาหารของแมลงวันหนอนชอนใบ แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* มีความเฉพาะเจาะจงกับพืชอาหาร (host specific) เนื่องจากพบแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* เข้าทำลายเฉพาะหอม-แดง และกระเทียมเท่านั้น ส่วนแมลงวันหนอนชอนใบอีก 4 ชนิด ได้แก่ *L. brassicae, L. huidobrensis, L. sativae* และ *L. trifolii* พบเข้าทำลายพืช ผัก ได้หลากหลายชนิด และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการยังแสดงให้เห็นว่าแมลงวันหนอนชอนใบ *L. huidobrensis* ที่สำรวจพบการกระจายตัวอยู่บริเวณที่สูงในจังหวัดเชียงใหม่ ของไทยนั้น พบว่า แยกออกจาก *L. sativae, L. trifolii* และ *L. brassicae* อย่างชัดเจน และจากการเกิดศัตรูพืชรุกรานพบว่า แมลงวันหนอนชอนใบที่สำรวจพบในประเทศญี่ปุ่นมีความหลายหลายทางพันธุกรรม (genetic variation) โดยพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบที่อุบัติใหม่นี้สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิดมากขึ้น (Tokumaru *et al*., 2021) การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานว่าแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* ที่สำรวจและรวบรวมได้จากประเทศไทย มีเพียงแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* haplotype A เพียงชนิดเดียว ซึ่งแตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* ที่มีรายงานในประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีรายงานว่า มีแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* จำนวน 2 haplotypes ได้แก่ haplotype A และ haplotype B (Tokumaru *et al*., 2021) นอกจากนี้ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการรุกรานและเข้าทำลายของแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* haplotype B ที่สามารถเข้าทำลายและการก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชในตระกูลหอมและกระเทียมได้มากกว่า haplotype A หลายเท่าตัว ดังนั้น ข้อมูลในครั้งนี้จึงเป็นพื้นฐานสำคัญที่สามารถนำไปประกอบการเตรียมการสำรวจศัตรูพืชอุบัติใหม่ และการเฝ้าระวังเส้นทางการรุกราน (invasive pathway) ของแมลงวันหนอนชอนใบชนิดต่าง ๆ ที่ไม่เคยสำรวจพบในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* haplotype B ในพื้นที่ทำการเกษตรของไทยในอนาคตอีกด้วย

สรุป

การศึกษาชนิดแมลงวันหนอนชอนใบในประเทศไทยมักใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกและอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิด แต่การศึกษาครั้งนี้ประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดของแมลงวันหนอนชอนใบที่พบเข้าทำลายพืชผักส่งออกของประเทศไทย ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของแมลงวันหนอนชอนใบจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ แมลงวันหนอนชอนใบ *Liriomyza brassicae, L. chinensis, L. huidobrensis, L. sativae* และ *L. trifolii* ได้อย่างถูกต้องถึง 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดในครั้งนี้ ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โคดของแมลงวันหนอนชอนใบ พร้อมทั้งบันทึกลงในฐานข้อมูล GenBank

นอกจากนี้ ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Bayesian analysis และ Maximum likelihood นั้น สามารถยืนยันชนิดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิดได้เป็นอย่างดี โดยพบว่าข้อมูลลำดับพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอบาร์โคดของยีน *Cox1* จากแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิดนั้น แยกออกเป็น 3 กลุ่ม ได้อย่างชัดเจนและให้ผลสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ การกระจายตัว และพืชอาหารของแมลงวันหนอนชอนใบ

การศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นครั้งแรกที่ใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โคดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาสนับสนุนในการจำแนกและยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันหนอนชอนใบในประเทศไทย สามารถนำมาใช้สนับสนุนการจำแนกชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบที่พบเข้าทำลายพืชผักเพื่อการส่งออก ทำให้ประเทศคู่ค้าของไทยให้ความเชื่อถือ มีความถูกต้องสมบูรณ์ ทันสมัยและเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากลมากขึ้น สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปปรับปรุงแก้ไขฐานข้อมูลแมลงวันหนอนชอนใบในประเทศไทยให้มีความถูกต้อง ก่อให้เกิดประโยชน์ทั้งด้านอนุกรมวิธานแมลง บริหารจัดการศัตรูพืช ใช้เป็นฐานข้อมูลในการสร้างระบบเตือนภัยทางการเกษตร สามารถตอบสนองและกำหนดแนวทางการป้องกันกำจัดอย่างทันท่วงที เพิ่มความมั่นคงของผลผลิตทางการเกษตร และเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับงานด้านกักกันพืชในเจรจาตอบโต้กับประเทศคู่ค้าและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตรของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

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., S. Choavalit, S., C. Buamas and S. Kaewsawat. 2022a. Taxonomy of leafminer flies in family Agromyzidae (Order: Diptera) in vegetable crops. Thai Agricultural Research Journal 40(2): 126-139. (in Thai)

Boontop, Y., S. Chaovalit, C. Buamas, S. Kaewsawat and S. Sathuwijarn. 2022b. Leafminer flies (Diptera: Agromyzidae), their host plants and distribution in Thailand. Entomology and Zoology Gazette 40(1): 2-16. (in Thai)

Carapelli, A., A. Soltani, C. Leo, M. Vitale, M. Amri, and J.M.-B. Jemâa. 2018. Cryptic Diversity Hidden within the Leafminer Genus *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae). Genes 9(11): 554, doi: 10.3390/genes9110554

Center for Information Technology and Communications. 2022. Principal Export. (Online). Available: https://tradereport.moc.go.th/Tradethai.aspx?chk=0 (December 17, 2022). (in Thai)

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(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.

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.

Parrella, M.P. 1987. Biology of *Liriomyza*. Annual Review of Entomology 32: 201-224.

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

Siripiyasing, P. and A. Chaveerach. 2011. DNA barcode for identification of living species: Case studies of *Cytochrome* c *Oxidase* I (COI) in animals. Rajabhat Maha Sarakham University Journal 5(2): 205-210. (in Thai)

Spencer, K.A. and G.C. Steyskal. 1986. Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the United States. Agriculture Handbook No. 638. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C. USA. 478 p.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30(9): 1312-1313.

Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution 38(7): 3022-3027.

Tipphet, K., N. Jaturas and N. Bunchu. 2018. DNA Barcodes for Identification of Medically-Important Insects of Thailand. Thai Science and Technology Journal 26(2): 313-328. (in Thai)

Tokumaru, S., R. Uesugi, C. Urairi, S. Toyoshima, Y. Aoki and A. Iwasaki. 2021. Detection of two biotypes of *Liriomyza chinensis* (Diptera: Agromyzidae) in Japan. Journal of Economic Entomology 114(3): 1406-1410.

Wang, S., Z. Lei, J. Wen, H. Wang, X. Li, B. Dong and B. Ren. 2014. The complete mitochondrial genome of *Liriomyza huidobrensis* and comparison with *L. trifolii* and *L. sativae* (Diptera: Agromyzidae). Mitochondrial DNA 25(2): 104-105.

Xuan, J.-L., S.J. Scheffer, O. Lonsdale, B.K. Cassel, M.L. Lewis, C.S. Eiseman, W.-X. Liu and B.M. Wiegmann, 2023. A genome-wide phylogeny and the diversification of genus *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae) inferred from anchored phylogenomics. Systematic Entomology 48(1): 178-197.

Yang, F., Y.Z. Du, L.P. Wang, J.M. Cao and W.W. Yu. 2011. The complete mitochondrial genome of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae): great difference in the A+T-rich region compared to *Liriomyza trifolii*. Gene 485(1): 7-15.