

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงสกุล *Hemerodromia* (Diptera: Empididae) ในจังหวัดเลย

สัน นามตะคุ*

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสุขภาพ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์
จังหวัดกาฬสินธุ์ 46230

บทคัดย่อ

แมลงสกุล *Hemerodromia* เป็นดัชนีบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของสภาพแวดล้อม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงสกุล *Hemerodromia* (Diptera: Empididae) ในจังหวัดเลย และประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับระบุสปีชีส์ของ *Hemerodromia* ตัวเต็มวัยของ *Hemerodromia* จำนวน 90 ตัวอย่าง ถูกเก็บจาก 7 พื้นที่ในจังหวัดเลย โดยการใช้สวิงจับแมลงแกว่งขึ้นลงใกล้กับพุ่มไม้ในบริเวณรอบๆ น้ำตกหรือลำน้ำที่สะอาดปราศจากการรบกวนของมนุษย์ นำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้บริสุทธิ์ ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ผลการวิจัยพบว่า แมลงสกุล *Hemerodromia* ในจังหวัดเลย มีทั้งหมด 7 สปีชีส์ ความถูกต้องในการระบุสปีชีส์โดยเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีประสิทธิภาพสูงมาก (ร้อยละ 100) ทั้ง 7 สปีชีส์ของ *Hemerodromia* มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมกันและแยกเป็นกลุ่มเดี่ยวตามแต่ละสปีชีส์ และสามารถนำเอาข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อยอดในการระบุสปีชีส์ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในอนาคตได้

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม, DNA Barcode, Empididae, *Hemerodromia* และ จังหวัดเลย

* ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: san.na@ksu.ac.th

Genetic Diversity of *Hemerodromia* (Diptera: Empididae) in Loei Province

San Namtaku *

*Program of Science and Mathematics, Faculty of Science and Health Technology,
Kalasin University, Kalasin Province, 46230, Thailand*

Abstract

Genus *Hemerodromia* is an index indicating the abundance of environments. This study aimed to study the genetic diversity of the *Hemerodromia* (Diptera: Empididae) in Loei province and assess the effectiveness of the DNA barcode genetic markers for identifying the species of *Hemerodromia*. Ninety adults of specimens were sampled from seven areas in Loei province by sweep net swung plane, up and down near bush areas around the waterfall or stream bank which have a clean environment and without human disturbance. Specimens were used for steps of DNA extraction, polymerase chain reaction, purification sent for sequencing and analyzing the genetic variation. The results showed that *Hemerodromia* in Loei province has seven species. DNA barcoding identification analysis based on the best close match method revealed good performance, with 100% of specimens correctly identified. A phylogenetic tree based on the mitochondrial barcode sequences revealed that all of *Hemerodromia* species were monophyletic form clades. This basic research data will be useful for applying in further study in other organisms.

Keywords: Genetic diversity, DNA Barcode, Empididae, *Hemerodromia* and Loei Province

* Corresponding author: E-mail: san.na@ksu.ac.th

บทนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและสัตว์สูง แมลงเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนและความหลากหลายมากที่สุดในอาณาจักรสัตว์ แมลงสกุล *Hemerodromia* เป็นสกุลที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดในวงศ์ย่อย *Hemerodromiinae* ของวงศ์ *Empididae* ทั่วโลกมีรายงานการพบ 150 สปีชีส์ (Plant, 2015) ระยะตัวอ่อนและระยะดักแด้พบในแหล่งน้ำไหลเป็นส่วนใหญ่และเป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบนิเวศน้ำจืด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งต้นน้ำที่มีความอุดมสมบูรณ์ของสภาพนิเวศวิทยา แมลงสกุล *Hemerodromia* ระยะตัวอ่อนและระยะดักแด้มักจะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนสูง (Plant, 2011) บางสปีชีส์ของ *Hemerodromia* เป็นผู้ล่าตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงหลายๆ ชนิด ตัวอ่อนของ *Hemerodromia* บางสปีชีส์กินตัวอ่อนของแมลงรึ้นดำที่เป็นพาหะของโรค *Onchocerciasis* ในมนุษย์และปลาคาร์พ (Knutson and Steyskal, 1981) ดังนั้นแมลงสกุล *Hemerodromia* จึงมีความสำคัญในหลากหลายด้าน ได้แก่ การช่วยหมุนเวียนสารอาหารในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหล การเป็นศัตรูตามธรรมชาติของแมลงพาหะนำโรค เช่น แมลงรึ้นดำ เป็นต้น นอกจากนี้แมลงสกุล *Hemerodromia* ยังเป็นดัชนีบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของสภาพแวดล้อมเนื่องจากหลายสปีชีส์มีความจำเพาะกับสภาพนิเวศวิทยา (Plant, 2015)

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของแมลงสกุล *Hemerodromia* พบทั้งหมด 25 สปีชีส์ หลายสปีชีส์มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่จำเพาะกับสภาพนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย

ขณะที่บางสปีชีส์มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางพบได้ทั่วประเทศ จากความแตกต่างของสภาพนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยรวมถึงการกระจายทางภูมิศาสตร์ จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแมลงสกุล *Hemerodromia* โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcode) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อระบุสปีชีส์ รวมถึงการตรวจสอบความหลากหลายซ่อนเร้น (cryptic diversity) ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคด้านสัณฐานวิทยา (Pramual *et al.*, 2011; Pramual and Adler, 2014) เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ศึกษาในสัตว์ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ในไมโทคอนเดรีย ความยาวประมาณ 500-600 bp การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอบาร์โค้ด ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) สำหรับการระบุสปีชีส์ของแมลงสกุล *Hemerodromia* ในประเทศไทย ข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับการระบุสปีชีส์ของแมลงสกุล *Hemerodromia* ซึ่งยังมีการศึกษาในด้านนี้น้อยมาก นอกจากนี้ผลการศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมในแมลงสกุล *Hemerodromia* ในประเทศไทยจะทำให้ทราบถึงแบบแผนของความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตที่พบในแหล่งอาศัยที่มีระบบนิเวศสมบูรณ์ เช่น ป่าต้นน้ำ เป็นต้น ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการวางแผนบริหารจัดการทรัพยากรชีวภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างและการระบุปีชีส์

เก็บตัวอย่าง *Hemerodromia* ตัวเต็มวัยโดยใช้สวิงจับแมลงบริเวณน้ำตกหรือลำน้ำที่สะอาดปราศจากการรบกวนของมนุษย์ ตัวอย่างที่เก็บได้จะดองใน 80% เอทานอล และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C ระบุปีชีส์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามคำอธิบายลักษณะของแต่ละปีชีส์และเกณฑ์ที่สำคัญสำหรับระบุปีชีส์ของ *Hemerodromia* ในประเทศไทย (Plant, 2015)

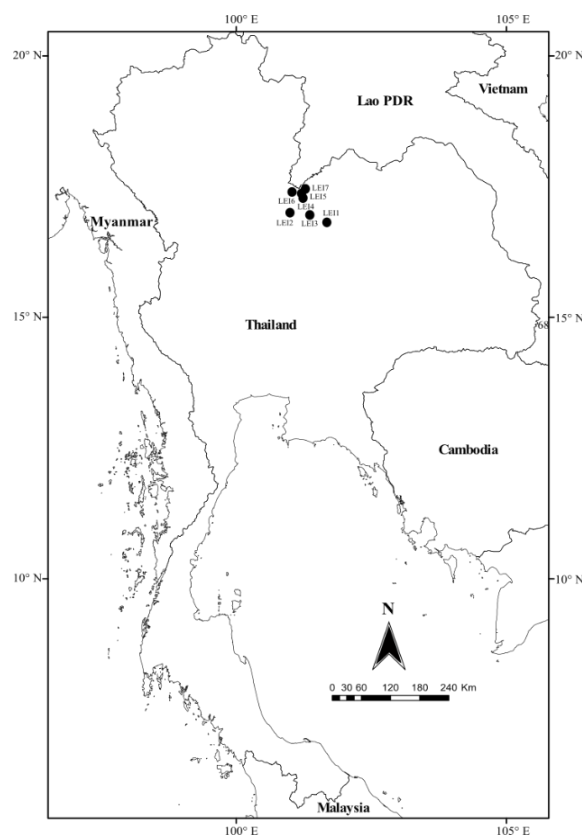
การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา ลูกโซ่และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดดีเอ็นเอจากตัวเต็มวัยโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490 (5'-GGTCAACAAAT CAT AAAGATATTGG-3') และ HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGG GTGACCAAAAAATCA-3') (Hebert et al., 2003) ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดย PCR แล้วนำมาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ทำผลผลิตจาก PCR ให้บริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ HiYield Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการ DNA sequencing service ของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

การวิเคราะห์ข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรม

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำดัดแปลงให้เป็นเส้นตรงโดยใช้ CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) วิเคราะห์หาแฮโลไทป์ (h) โดยการใช้โปรแกรม

Arlequin version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) หาค่าความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างสายลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) ด้วยวิธี Kimura-2 parameter ของโปรแกรม MEGA X (Tamura et al., 2016) ใช้โมเดล Kimura's 2-parameter (K2P) คำนวณหาค่า neighbor-joining (NJ) tree



ภาพที่ 1 แสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่างของ *Hemerodromia* 7 สปีชีส์ในจังหวัดเลย รายละเอียดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างแสดงใน Table 1 (คำย่อ LEI = จังหวัดเลย)

Table 1 แสดงรายละเอียดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง *Hemerodromia* ในจังหวัดเลย

สปีชีส์	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	รหัส	ละติจูด / ลองจิจูด	ระดับความสูง (เมตร)	วันเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง
<i>H. anomala</i> Plant, 2015	น้ำตกสวนห้อม อำเภอหนองหิน	LEI1	17°02'49"N 101°45'42"E	579	16/09/2016, 23/03/2017
<i>H. conspecta</i> Plant, 2015	น้ำตกสวนห้อม อำเภอหนองหิน	LEI1	17°02'49"N 101°45'42"E	579	23/03/2017
<i>H. furcata</i> Grootaert, Yang & Saigusa, 2000	น้ำตกสองคอน อำเภอภูเรือ	LEI2	17°21'31"N 101°24'23"E	733	22/03/2017
<i>H. fusca</i> Yang & Yang, 1986	น้ำตกสวนห้อม อำเภอหนองหิน	LEI1	17°02'49"N 101°45'42"E	579	29/11/2013
	น้ำตกสวนสวรรค์ อำเภอหนองหิน	LEI3	17°03'58"N 101°44'53"E	627	26/11/2013
	ลำห้วยข้างสวนยางพาราบ้านน้ำตกทางขึ้นไปน้ำตกสองคอน	LEI4	17°22'03"N 101°23'07"E	667	17/09/2016, 22/03/2017
	น้ำตกสองคอน อำเภอภูเรือ	LEI2	17°21'31"N 101°24'23"E	733	22/03/2017
<i>H. namtokhinpoon</i> Plant, 2015	น้ำตกสวนห้อม อำเภอหนองหิน	LEI1	17°02'49"N 101°45'42"E	579	23/03/2017, 27/05/2017
<i>H. yunnanensis</i> Yang & Yang, 1988	น้ำตกปลาบ่อ อำเภอภูเรือ	LEI5	17°23'51"N 101°22'02"E	279	20/09/2015, 18/09/2016
	ห้วยทับกอสอด อุทยานแห่งชาติภูสวนทราย อำเภอนาแห้ว	LEI6	17°30'55"N 100°56'19"E	915	19/09/2015
	ลำห้วยข้างสวนยางพาราบ้านน้ำตกทางขึ้นไปน้ำตกสองคอน	LEI4	17°22'03"N 101°23'07"E	667	22/03/2017
	น้ำตกเลิซบ อำเภอภูเรือ	LEI7	17°29'53"N 101°20'07"E	1,122	12/01/2018
	น้ำตกสวนห้อม อำเภอหนองหิน	LEI1	17°02'49"N 101°45'42"E	579	23/03/2017
<i>H. anisoserata</i> Plant, 2015	น้ำตกสองคอน อำเภอภูเรือ	LEI2	17°21'31"N 101°24'23"E	733	22/03/2017

ผลการวิจัย

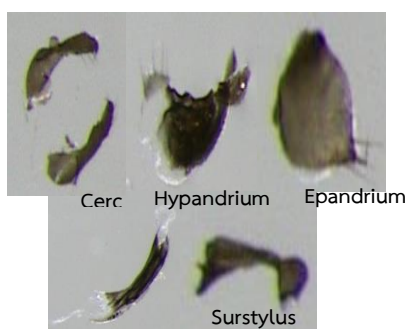
1. การระบุสปีชีส์ของ *Hemerodromia* ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 *Hemerodromia anisoserata* Plant, 2015

ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. anisoserata* จะสังเกตจากลักษณะของ terminalia โดยจะมี cerci ยาว มองดูรูปร่างของ epandrium จะเห็นเป็นลักษณะเกือบเป็นสี่เหลี่ยม hypandrium มีลักษณะคล้ายท้องเรือ surstylus มีลักษณะเรียวยาวแคบส่วนปลายเกือบจะกลม และมีติดยหรือเส้นขนเล็กๆ กระจุกรวมอยู่อย่างหนาแน่นต่อจากส่วนปลายของ epandrium แสดงดัง Fig. 2



(ก)



(ข)

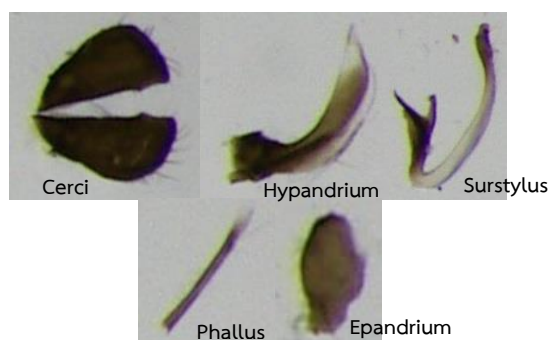
Fig. 2 (ก) ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. anisoserata* Plant, 2015
(ข) ส่วนประกอบต่างๆ ของ Terminalia

1.2 *Hemerodromia anomala* Plant, 2015

ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. anomala* จะสังเกตจากลักษณะของ terminalia โดยจะมี cerci ยาวและกว้าง epandrium จะมีสีดำและมีติดยลักษณะคล้ายขนเล็กๆ สีเข้ม hypandrium มีสีขาว ลักษณะแคบและยาว surstylus ยาว ชิดและโค้งขึ้น สปีชีส์นี้มีลักษณะที่เห็นเด่นชัด คือ ที่ปีกจะมีลักษณะสีดำเข้มมองเห็นเป็นก้อนอยู่ตรงตำแหน่ง R 4 แสดงดัง Fig. 3



(ก)



(ข)

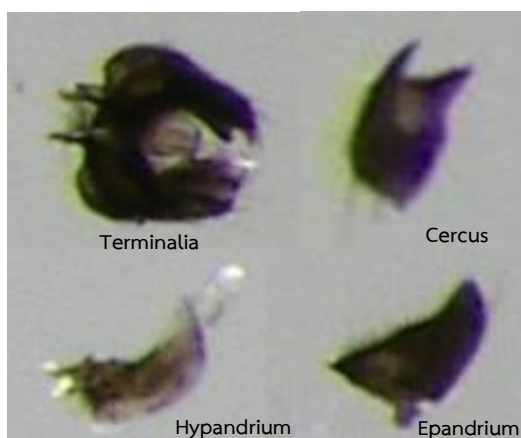
Fig. 3 (ก) ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. anomala* Plant, 2015
(ข) ส่วนประกอบต่างๆ ของ Terminalia

1.3 *Hemerodromia conspecta* Plant, 2015

ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. conspecta* จะสังเกตจากลักษณะของ terminalia โดยจะมี cerci ลักษณะอ้วนแน่น ขนาดเล็ก สั้นและกว้าง epandrium กว้างและมองจากด้านบนจะมีรูปร่างคล้ายสามเหลี่ยม แสดงดัง Fig. 4



(ก)



(ข)

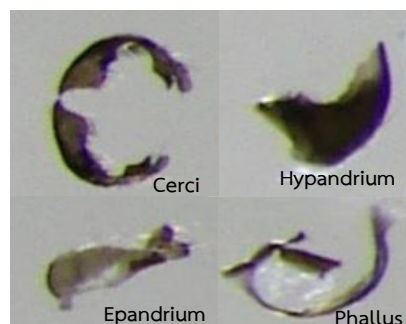
Fig 4 (ก) ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. conspecta* Plant, 2015
(ข) ส่วนประกอบต่างๆ ของ Terminalia

1.4 *Hemerodromia namtokhinpoon* Plant, 2015

ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. namtokhinpoon* จะสังเกตจากลักษณะของ terminalia โดยจะมี cerci สีดำ และขนาดเล็กมองดูซับซ้อน epandrium มีลักษณะยาวและแคบมาก hypandrium มีลักษณะมองดูคล้ายวงรี surstylus ยาว ชิดและโค้งขึ้น สปีชีส์นี้มีลักษณะที่เห็นเด่นชัด คือ ที่ปีกจะมีลักษณะสีดำเข้มมองเห็นเป็นก้อนอยู่ตรงตำแหน่ง R4 แสดงดัง Fig. 5



(ก)



(ข)

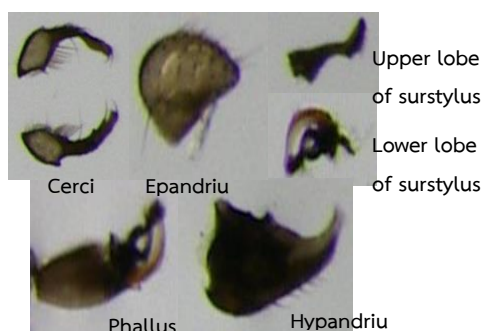
Fig 5 (ก) ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. namtokhinpoon* Plant, 2015
(ข) ส่วนประกอบต่างๆ ของ Terminalia

1.5 *Hemerodromia furcata* Grootaert, Yang & Saigusa, 2000

ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. furcata* จะสังเกตจากลักษณะของ terminalia โดยจะมี cerci สีดำและยาว ส่วนปลายจะแยกเป็นสองแฉก (bifurcate) epandrium ยาวและรูปร่างเกือบเป็นวงรี จะมีสีดำและมีเดือยลักษณะคล้ายขนเล็กๆ สีเข้ม hypandrium ลักษณะคล้ายท่อเรียว surstylus ประกอบด้วยส่วนพู่ด้านบนและด้านล่าง พู่ด้านบนมองดูเกือบจะเป็นรูปปลอกเท้า แสดงดัง Fig. 6



(ก)



(ข)

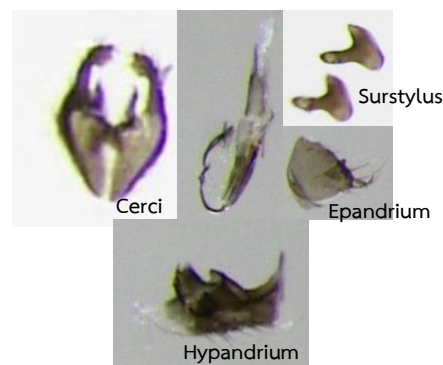
Fig. 6 (ก) ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. furcata* Grootaert, Yang & Saigusa, 2000 (ข) ส่วนประกอบต่างๆ ของ Terminalia

1.6 *Hemerodromia fusca* Yang & Yang, 1986

ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. fusca* จะสังเกตจากลักษณะของ terminalia โดยจะมี cerci สีดำและยาว ที่ประกอบด้วยเดือยหรือขนเล็กๆ epandrium มีปลายแหลมตรงรูปร่างเป็นแบบวงรี hypandrium ลักษณะคล้ายท่อเรียว surstylus สังเกตได้ง่ายโดยมีรูปร่างแบบตัว T (T-shape) ส่วนปลายแบนและกว้าง แสดงดัง Fig. 7



(ก)



(ข)

Fig. 7 (ก) ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. fusca* Yang & Yang, 1986 (ข) ส่วนประกอบต่างๆ ของ Terminalia

1.7 *Hemerodromia yunnanensis* Yang & Yang, 1988

ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. yunnanensis* จะสังเกตจากลักษณะของ terminalia โดยจะมี cerci สีดำและยาว ที่ประกอบด้วยเดือยหรือขนเล็กๆ epandrium มีปลายแหลม ตรงรูปร่างเป็นแบบวงรี hypandrium ลักษณะคล้ายท่อหรือ surstylus สังเกตได้ง่ายโดยมีรูปร่างแบบตัวแอล (L-shape) ส่วนปลายแบนและกว้าง แสดงดัง Fig 8

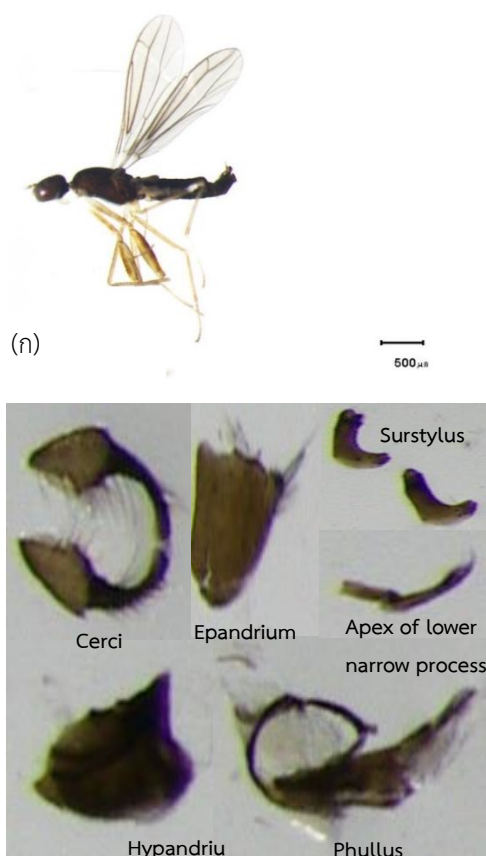


Fig 8. (ก) ตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *H. yunnanensis* Yang & Yang, 1988 (ข) ส่วนประกอบต่างๆ ของ Terminalia

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Hemerodromia* ทั้ง 7 สปีชีส์ ได้แก่ *H. anisoserata*, *H. anomala*, *H. conspecta*, *H. namtokhinpoon*, *H. fusca*, *H. furcata* และ *H. yunnanensis* โดยวิธี Neighbor-Joining (NJ) พบว่า สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Fig 9, Table 2) แยกออกเป็น clade ย่อยๆ 7 clade โดยมีค่า ร้อยละของค่า bootstrap สนับสนุนมากกว่า ร้อยละ 98 โดย สปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก ได้แก่ *H. fusca* และ *H. yunnanensis* ทั้งนี้เนื่องจากทั้งสองสปีชีส์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก และอาจเป็นกลุ่มสปีชีส์พี่น้องกัน (sister group species)

จากการศึกษานี้สามารถระบุสปีชีส์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาในอนาคตจะสามารถใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปัจจุบันได้ ทั้งนี้มีการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุสปีชีส์ของตัวอ่อนแมลงที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันในแต่ละช่วงของวงจรชีวิตสำเร็จโดย Thajjarern et al. (2017) จึงคาดว่าในอนาคตจะสามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการศึกษาระยะตัวอ่อนของ *Hemerodromia* ได้เช่นเดียวกัน

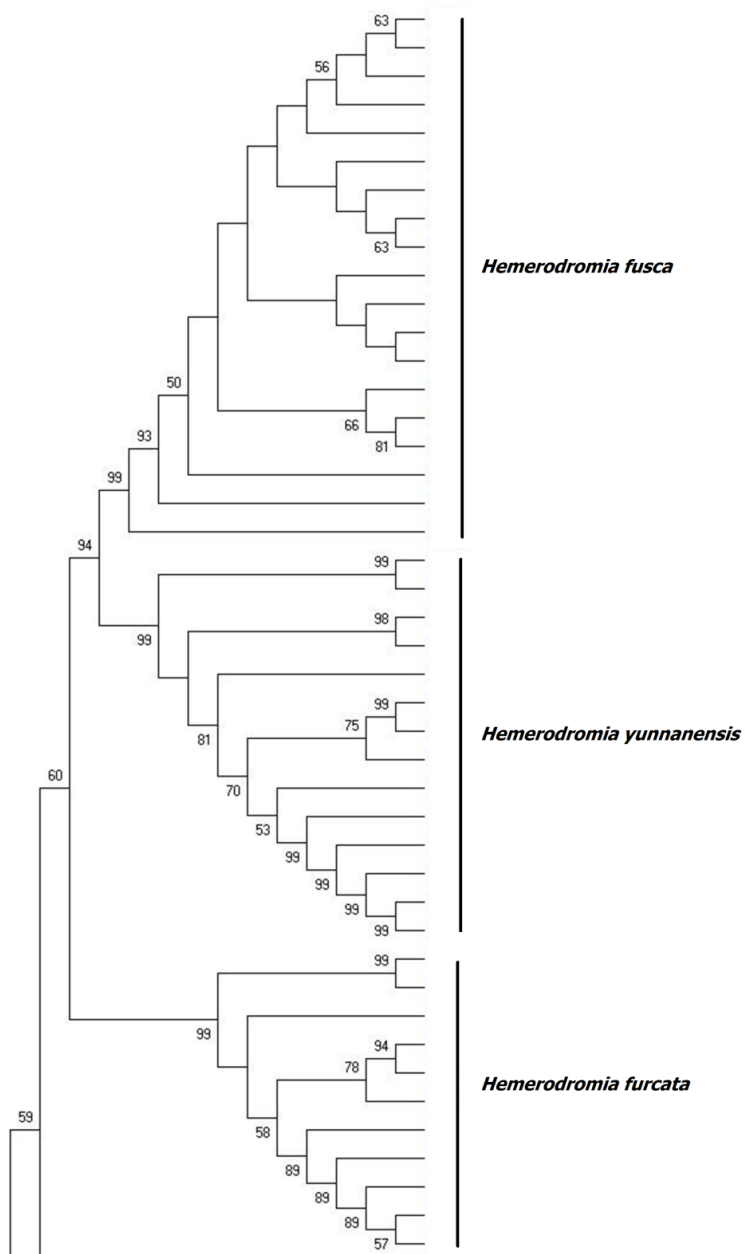


Fig. 9 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Neighbor-Joining สำหรับ 63 แสพโพลีไทป์ จากตัวอย่างทั้งหมด 90 ตัวอย่างของ *Hemerodromia* 7 สปีชีส์ ในจังหวัดเลย โดยมีค่าสถิติ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ แสดงเป็นค่าร้อยละ และสเกลบาร์ต่อต้านตำแหน่งนิวคลีโอไทด์มีค่าเท่ากับ 0.05

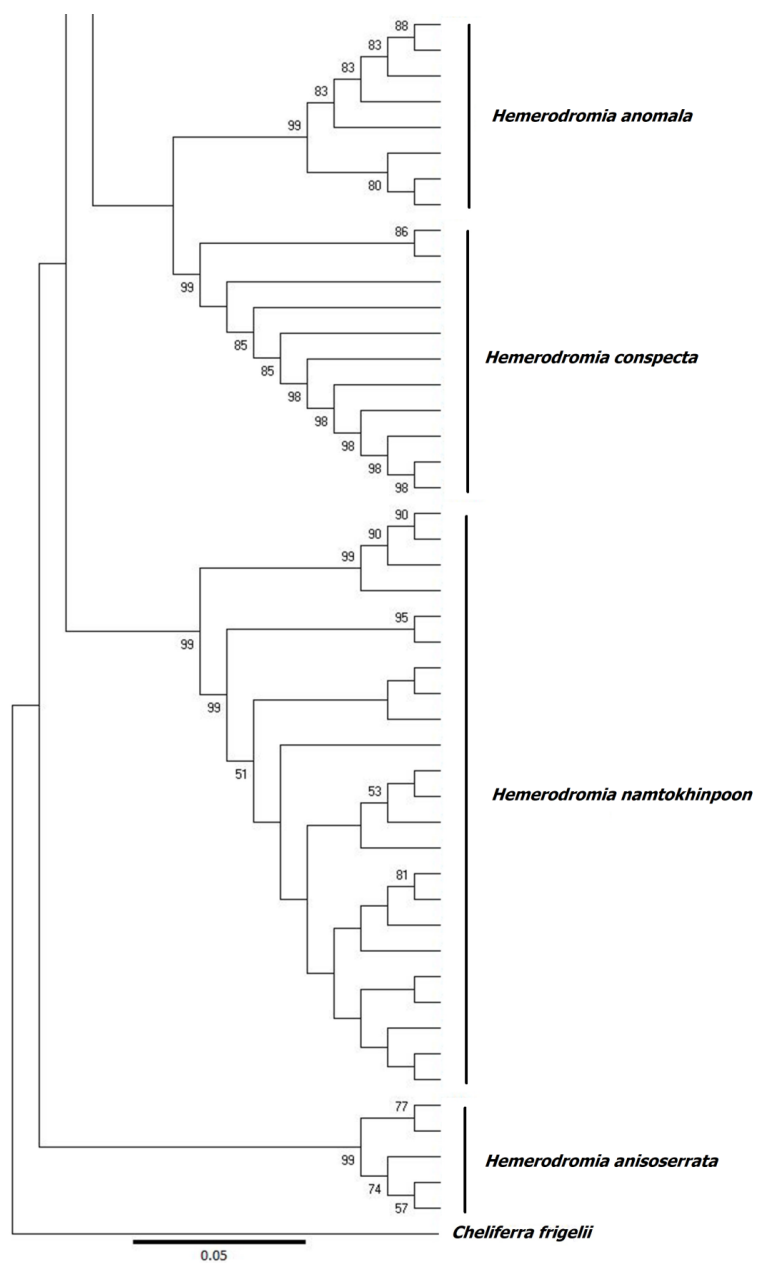


Fig. 9 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Neighbor-Joining สำหรับ 63 แสฟโพลีไทป์ จากตัวอย่างทั้งหมด 90 ตัวอย่างของ *Hemerodromia* 7 สปีชีส์ ในจังหวัดเลย โดยมีค่าสถิติ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ แสดงเป็นค่าร้อยละ และสเกลบาร์ต่อต้านตำแหน่งนิวคลีโอไทด์มีค่าเท่ากับ 0.05 (ต่อ)

Table 2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของการระบุสปีชีส์ของ *Hemerodromia* 7 สปีชีส์ในจังหวัดเลย โดยวิธี best close match ในโปรแกรม TaxonDNA (Meier *et al.*, 2006)

สปีชีส์	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน แฮพโลไทป์	เปอร์เซ็นต์ความ ถูกต้องของการระบุ สปีชีส์	เปอร์เซ็นต์ความ ผิดพลาดของการระบุ สปีชีส์
<i>H. anomala</i>	8	3	100	0
<i>H. conspecta</i>	11	3	100	0
<i>H. furcata</i>	11	8	100	0
<i>H. fusca</i>	18	17	100	0
<i>H. namtokhinpoon</i>	23	18	100	0
<i>H. yunnanensis</i>	13	9	100	0
<i>H. anisoseerrata</i>	5	5	100	0
Total	90	63		

สรุปผลการวิจัย

1. พบแมลงสกุล *Hemerodromia* ในจังหวัดเลยที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันทั้งหมด 7 สปีชีส์

2. ประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอบาร์โค้ด จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม TaxonDNA พบว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสายลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงสกุล *Hemerodromia* ทั้ง 7 สปีชีส์ มีความสามารถในการระบุ สปีชีส์ได้ร้อยละ 100

3. สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Hemerodromia* ในจังหวัดเลยจะมีลักษณะเป็น monophyletic clade โดยจะแยกออกเป็น clade ย่อยๆ 7 clade และสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก ก็จะแสดงลักษณะของกลุ่มสปีชีส์พี่น้องกัน

ข้อเสนอแนะ

เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถใช้ในการระบุสปีชีส์ของ *Hemerodromia* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สายลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่รายงานในผลการวิจัยในครั้งนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการระบุสปีชีส์สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่ยังไม่ทราบระยะตัวอ่อนได้ อีกทั้งยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปสู่การศึกษาเชื่อมโยงในอนาคตเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่อาศัยในระบบนิเวศของแต่ละสปีชีส์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สุขภาพ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและ อำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการชีววิทยาวิวัฒนาการและเซลล์ พันธุศาสตร์แมลง SC2 407/4 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เป็นสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ไพโรจน์ ประมวล และ Dr. Roderick R. Plant ที่ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษางานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

References

- Excoffier, L., and Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3): 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270(1512): 313-321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
- Knutson, L. V. and Steyskal, G. C. 1981. Empididae. In: McAlpine J.F., Peterson G.E., Shewell, G.E., Teskey H.J., Vockeroth J.R. and Wood D.M. (Coords.). *Manual of Nearctic Diptera*, Volume 1, Agriculture Canada Monograph, 27, Research Branch Agriculture Canada, Ottawa, 607-624.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., and Ng, P. K. L. 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Syst. Biol.* 55(5): 715–728. <https://doi.org/10.1080/10635150600969864>
- Plant, A. R. 2011. Hemerodromiinae (Diptera: Empididae), a tentative phylogeny and biogeographical discussion. *Syst. Entomol.* 36: 83-103.
- Plant, A. R. 2015. Diversity of Hemerodromia Meigen, 1822 (Diptera: Empididae) in Thailand, the tip of a tropical iceberg? *Zootaxa.* 4039 (1): 001-056.
- Pramual, P., Wongpakam, K. and Adler, P. H. 2011. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus Gomphostilbia (Diptera: Simuliidae). *NRC Research Press Genome.* 54: 1-9. doi:10.1139/G10-100.

- Pramual, P. and Adler, P. H. 2014. DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand. *Molecular Ecology Resources*. 14: 262-271 doi: 10.1111/1755-0998.12174.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Thaijarern, J., Pramual, P., and Adler, P. H. 2017. Life-stage association of black flies, using a fast-evolving nuclear gene sequence, and description of the larva of *Simulium lampangense* Takaoka & Choochote (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Zootaxa*, 4299(2): 263–270. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4299.2.6>
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24): 4876-4882.