การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และข้อมูลมอร์โฟเมทริกส์ของปีกแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทย
Toward the Identification of Dacini Fruit Flies (Diptera : Tephridae) in Thailand Using Phylogenetic and Wing Morphometrics Analyses

ยุวรินทร์ บุญทบ[1/*] ชมัยพร บัวมาศ[1/] เกศสุดา สนศิริ[1/]
จอมสุรางค์ ดวงธิสาร[1/] สิทธิสิโรดม แก้วสวัสดิ์[1/]
Yuvarin Boontop[1/] Chamaiporn Buamas[1/] Kessuda Sonsiri[1/]
Jomsurang Duangthisan[1/] Sitisarodom Kaewsawat[1/]

Received 2 Nov 2020/Revised 2 Feb 2021/Accepted 22 Feb 2021

ABSTRACT

Tropical fruit flies (Tephritidae: Dacinae: Dacini) are among the world's worst horticultural pests and are of particular biosecurity quarantine concern. Species of Dacini are notoriously difficult to identify using morphology, which, in view of their economic and international trade importance, creates ongoing difficulties for plant protection. The goal of this research was to perform phylogenetic and geometric morphometric analyses to support definition of six species of importance to Thailand i.e *Bactrocera correcta*, *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *Zeugodacus cucurbitae* and *Z. tau*. Materials were collected from various kinds of fruit orchards and by lure trapping in all regions in Thailand during 2017 - 2018. Phylogenetic analyses of Cytochrome c oxidase subunit I (*cox1*) DNA sequences of the six species were performed, Maximum Likelihood and Bayesian inference of sequences gave consistent results. *Zeugodacus* formed a reciprocally monophyletic sister group to a larger clade comprising the four species of *Bactrocera*. Wing morphometrics was based on 15 venation landmarks. Centroid sizes computed from landmark data differed significantly among sampled species ($P < 0.05$). Centroid size was smallest for *B. latifrons* (5.53 ± 0.08 mm) and largest for *Z. tau* (6.40 0.09 mm). Canonical Variate Analysis (CVA) revealed a clear pattern in which species of *Zeugodacus* clustered together and were clearly separated from the cluster comprising species of *Bactrocera*. Individuals of each species clustered together with limited overlapping with congeneric species. The present study provides a basis for accurate identification of the most economically important Dacini in Thailand, using international standards and best practice. However, further study is needed, including incorporation of data from additional genes to identify the numerous members of Dacini present in Thailand and neighbouring countries and to characterzie these species so that they can be included in a comprehensive diagnostic system.

Keywords: fruit fly, morphometrics, phylogenetics

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ 10900

[1/] Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok, 10900

***Corresponding author: yuvarin9320@gmail.com**

บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้ (Tephritidae: Dacinae: Dacini) มีความแปรผันของรูปร่างลักษณะภายนอกเป็นอย่างมาก ก่อให้เกิดปัญหาในการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ ส่งผลต่อการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ รวมทั้งยากต่อการตัดสินใจในการหาแนวทางการป้องกันกำจัด การศึกษาครั้งนี้ เป็นการนำความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกับเทคนิคมอร์โฟเมทริกส์มาสนับสนุนการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย โดยทำการศึกษาในแมลงวันผลไม้ 6 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera correcta*, *B. carambolae*, *B. dorslis*, *B. latifrons*, *Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากสวนผลไม้หลายชนิด และใช้กับดักฟีโรโมนติด ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างปี 2560 – 2561 นำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้ ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน Cytochrome c oxidase subunit I (*cox1*) ด้วย Maximum Likelihood และ Bayesian Inference ผลการวิเคราะห์ พบว่า ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยแมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodacus* ซึ่งประกอบด้วย *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* นั้น แยกออกจากสกุล *Bactrocera* อย่างชัดเจน และจากการศึกษามอร์โฟเมทริกส์ปีกแมลงวันผลไม้ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยขนาดเซนทรอยด์จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. latifrons* มีขนาดเล็กสุด (5.53 ± 0.08 มม.) และ *Z. tau* มีขนาดใหญ่สุด (6.40 ± 0.09 มม.) การศึกษารูปร่างของปีกด้วยวิธี Canonical Variate Analysis (CVA) สามารถแยกความแตกต่างของรูปร่างปีกแมลงผลไม้สกุล *Zeugodacus* ออกจากสกุล *Bactrocera* ได้อย่างชัดเจน อีกทั้งรูปร่างปีกของแมลงวันผลไม้ในสกุลเดียวกันมีความคล้ายคลึงกันมากกว่าแมลงวันผลไม้ต่างสกุล การศึกษาครั้งนี้ เป็นการนำเสนอข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทยอย่างถูกต้อง ด้วยวิธีการที่มีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาทางชีวโมเลกุลโดยการศึกษายีนเพิ่มเติมในการจำแนกแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ที่มีอยู่ในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: แมลงวันผลไม้ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มอร์โฟเมทริกส์

บทนำ

ผักและผลไม้จัดเป็นสินค้าเกษตรที่มีความสำคัญต่อการส่งออกและสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก แต่การส่งออกผักผลไม้ไปจำหน่ายยังต่างประเทศนั้น จะต้องมีการเปิดตลาดการค้า ดังนั้น ประเทศผู้ส่งออกมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีข้อมูลศัตรูพืชที่มีโอกาสเข้าทำลายผลิตผลรองรับ เพื่อใช้ในการเจรจาต่อรองทางการค้า ซึ่งปัจจุบัน พบว่า ข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการส่งออกสินค้าเกษตร คือ ข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวต้องได้มาจากแหล่งข้อมูลที่น่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับระดับสากล ดังนั้น จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการจัดจำแนกศัตรูพืชที่มีโอกาสติดไปกับผักและผลไม้ในการส่งออกให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

ด้วยเหตุนี้ แมลงวันผลไม้หรือแมลงวันทอง (Tephritid fruit fly) จึงเป็นแมลงศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายกับผักผลไม้เป็นอย่างมาก เพราะตัวเต็มวัยวางไข่และตัวหนอนกัดกินภายในทำให้ผักผลไม้เน่าเสียก่อนการเก็บเกี่ยว และมักพบตัวหนอนแมลงวันผลไม้ติดไปภายในผลที่ส่งออกไปยังต่างประเทศ ก่อให้เกิดปัญหาการกีดกันทางการค้าตามมา มีรายงานว่า แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini สร้างความเสียหายจนเกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* และ *Zeugodacus* (Aluja and Norrbom, 2001; White and Elson-Harris, 1992) เป็นสาเหตุให้มีการศึกษาชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini รวมถึงการแพร่กระจาย และชนิดของพืชอาหารกันอย่างกว้างขวาง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมกำจัด แต่แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini นั้นมีลักษณะทางสัณฐานภายนอกใกล้เคียงกันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงวันผลไม้ในกลุ่มที่มีความ

ซับซ้อน (complex) ซึ่งยากในการจัดจำแนกเป็นอย่างยิ่ง หากใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกในการตรวจวินิจฉัยชนิด (Krosch *et al*., 2012) โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Zeugodacus tau* และ *Bactrocera dorsalis* complex ทำให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานเป็นอย่างมาก และยังมีแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini อีกหลายชนิดที่แม้จะเป็นชนิดเดียวกัน แต่มีความแปรผันทางรูปร่างลักษณะภายนอก ซึ่งยากต่อการตัดสินใจว่าเป็นความแปรผันทางสัณฐานภายในชนิดเดียวกันหรือเป็นความแตกต่างระหว่างชนิด (Schutze *et al*., 2012) ปัจจุบัน ประเทศไทยมีการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้โดยใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกเท่านั้น ซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญของนักอนุกรมวิธาน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการประยุกต์ใช้หลักอนุกรมวิธานแบบผสผสาน (integrative taxonomy) ซึ่งเป็นการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ ที่มีความทันสมัยน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล มาใช้ในการศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้

งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในประเทศไทย ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และการศึกษามอร์โฟเมทริกส์ของปีกแมลงผลไม้ เพื่อใช้สนับสนุนการจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางการเกษตร และเพื่อใช้ในการเจรจาต่อรองทางการค้าด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini และการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตรในประเทศไทย 6 ภูมิภาค (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด (Figure 1) การเก็บตัวอย่างแมลงจะใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd, Australia ซึ่งประกอบด้วยสำลีชุบสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 3 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจินอล (methyl eugenol) คิวลัวร์ (Cue lure) และลาติลัวร์ (Lati lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ ทำการติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ (จังหวัด) พร้อมทั้งบันทึกพืชอาหารของแมลงวันผลไม้ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 - กันยายน พ.ศ. 2561 ทำการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้เบื้องต้นจากลักษณะภายนอก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ของ Drew and Romig (2013, 2016) เก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บไว้ในตู้ที่อุณหภูมิ -20 ซ.

2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetics analysis) ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ตัวอย่างแมลงวันผลไม้จำนวน 10 ตัวอย่าง



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

ต่อแมลงวันผลไม้หนึ่งชนิด ใช้วิธีการสกัดของ Boontop *et al*. (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ISOLATE II Genomic DNA kit (Bioline, Australia)

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LCO 1490(GGTCAACAAAT-CATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al*., 1994) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 M ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 M ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย 2x Green master mix 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (Deionized water) เป็นปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ กำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 ซ. นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ 2) denaturing ที่ 94 ซ. 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 ซ. 30 วินาที 4) extension ที่ 72 ซ. 30 วินาที โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำ 35 รอบ และ 5) final extension ที่ 72 ซ. 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ที่อะกาโรสเจลความความเข้มข้น 1.5% ผสม RedSafe dye ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง ultraviolet (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยการ blastn เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number

2.4 ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากยีน *cox1* ที่ศึกษาเปรียบเทียบความถูกต้อง กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากการศึกษาของ Jiang *et al*. (2013) ซึ่งประกอบ GenBank accession numbers JX297532.1, JX099733.1, JX099753.1, JX266421, JX266424 และ Krosch *et al*. (2018) ประกอบด้วย GenBank accession number+s MH125354.1 โดยใช้แมลงวันผลไม้สกุล *Dacus* คือ *Dacus longicornis* เป็น outgroup (GenBank accession number MH937563) จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ขั้นตอน alignment ด้วยโปรแกรม MEGAX (Kumar *et al*., 2018) ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลใช้เกณฑ์มาตรฐาน 2 เกณฑ์ คือ Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian Inference (BI) และเปรียบเทียบ topology ที่ได้จากทั้ง 2 เกณฑ์มาตรฐาน โดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ ดังนี้ 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 fa) 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) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนี้ Mcmc startingtree = 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)

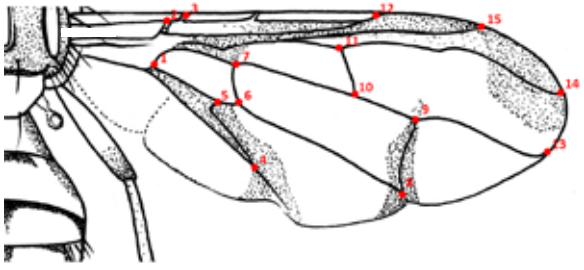


Figure 2 Right-hand wing of a Dacini fruit fly showing each of the 15 landmarks used in the geometric morphometric analysis using TPS Program

3. ศึกษารูปร่างปีกแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ด้วยเทคนิคมอร์โฟเมทริกส์

3.1 การเตรียมตัวอย่างปีก

เพื่อศึกษารูปร่างของปีกโดยการทำสไลด์ถาวร ใช้ปีกแมลงวันผลไม้ จำนวน 20 ตัวอย่าง/ชนิด ตัดปีกด้านขวามาวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 - 45 °ซ. ให้แห้ง ถ่ายภาพปีกแมลงวันผลไม้ด้วยกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (compound light microscope) Olympus รุ่น CX41RF (Olympus Co., Tokyo, Japan) และกำหนดจุดสังเกต (landmark) บนปีกแมลงวันผลไม้ (Figure 2 และ Table 1) (Boontop *et al*., 2016) ด้วยโปรแกรม TPSDIG2 Version 2.17 (Rohlf, 2013) สร้างไฟล์ในรูปแบบของ TPS ไฟล์ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลพิกัดคาร์ทีเซียน (cartesian coordinate) ซึ่งเป็นข้อมูลที่อยู่ในระนาบสองมิติ (x, y) หรือสามมิติ (x, y, z) เป็นจุดที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงหน้าที่

Table 1 Fifteen landmarks located at the junctions and terminations of wing veins chosen for this study

Landmarks	Position on wing
1	Basal junction of veins of cell bm
2	Anterior-most point of the suture located towards the base of vein sc
3	Inner antero-distal corner of cell bc
4	Junction of veins A1 and CuA2
5	Junction of CuA1 and CuA2
6	Junction of vein CuA1 and dm-bm cross vein
7	Junction of vein M and dm-bm cross-vein
8	Junction of vein CuA1 and dm-cu
9	Junction of vein M and dm-cu
10	Junction of vein M and r-m cross-vein
11	Junction of vein R4+5 and r-m cross-vein
12	Junction of vein R1 and costal vein
13	Termination of vein M
14	Termination of vein R4+5
15	Termination of vein R2+3

ของโครงสร้างหรืออวัยวะที่เรียกว่า “โฮโมโลจี” (homology) มีลักษณะเป็นจุดคู่เหมือน (homologous point) ซึ่งเป็นจุดที่มีตำแหน่งตรงกันทั้งในระดับภายในประชากร (intraspecies) และระหว่างประชากร (interspecies) จึงใช้จุดสังเกตดังกล่าวเป็นตัววิเคราะห์ความแตกต่างและความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างปีกแมลงวันผลไม้

3.2 ศึกษาขนาดเซนทรอยด์ (centroid sizes)

การศึกษาขนาดเซนทรอยด์ของแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini ด้วยโปรแกรม Morpho J version 1.06 (Klingenberg, 2011) ขนาดของเซนทรอยด์นั้น มีความสัมพันธ์กับรูปร่างปีก สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบรูปร่างของปีกได้อย่างแม่นยำ (Schutze; *et al*., 2012) โดยขนาดเซนทรอยด์คำนวณจากการรวมระยะทางระหว่างจุดสังเกตแต่ละจุด กับจุดกึ่งกลางของจุดสังเกต (ตำแหน่งเฉลี่ยในพื้นที่สองมิติของพิกัดทั้งหมด) และถอดรากที่สองของผลรวมนี้ (Boontop *et al*., 2016) (Figure 3) และเปรียบเทียบขนาดเซนทรอยด์ ของปีกแมลงวันผลไม้โดยหาค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนด้วยการวิเคราะห์แบบ one-way ANOVA โดย Tukey post hoc test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 22 (IBM SPSS Statistics, IBM Corporations, New York, USA)

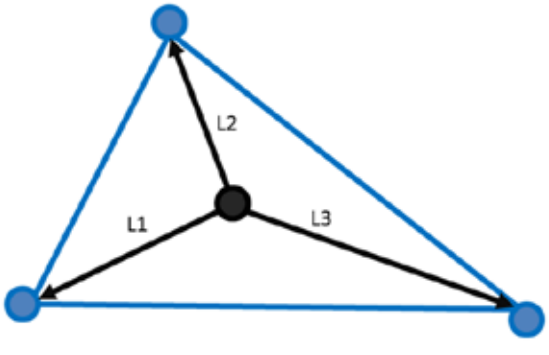


Figure 3 A geometric depiction of the calculation of centroid size, which equals the square root of the summed squared lengths of lines segments L1, L2, L3 (Boontop *et al*., 2016)

3.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของลำตัว (allometric effect)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของลำตัวที่มีผลต่อรูปร่างของปีก โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์สมการแบบถดถอย (regression analysis) จากรูปร่างปีก และขนาดเซนทรอยด์ ด้วยโปรแกรม Morpho J

3.4 วิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างของปีก (wing shape)

การวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ ทำการวิเคราะห์ตามหลัก Canonical Variate Analysis (CVA) (Zelditch *et al*., 2012) ด้วยโปรแกรม Morpho J

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตัวอย่างแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini และการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากแปลงเพาะปลูก โดยใช้กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียกพร้อมสารล่อ สามารถจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้ 2 สกุล คือ สกุล *Bactrocera* และ *Zeugodacus* จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, และสกุล *Zeugodacus* ได้แก่ *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* การศึกษาครั้งนี้ยังได้บันทึกชนิดของพืชอาหาร (host plants) ที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลาย และประเภทของสารล่อที่มีประสิทธิภาพในการดึงดูดแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด (Table 2) พบว่า แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*, *B. carambolae* และ *B. correcta* เข้าทำลายพืชอาหารได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น มะม่วง ฝรั่ง และชมพู่ และจากความสามารถในการเข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด ทำให้มีโอกาสในการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณจากพืชอาหารชนิดต่าง ๆ ได้ตลอดทั้งปี ทำให้การป้องกันกำจัดทำได้ยาก แต่แมลงวันผลไม้บางชนิดนั้นมีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชอาหาร (host plant specificity) เช่น แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* นั้น ลงทำลายเฉพาะพืชวงศ์แตง (Cucurbitaceae) เช่น มะระ แตงกวา ฟัก บวบ ตำลึง เมล่อน แตงโม และ แตงไทย ส่วนแมลงวันพริก *B. latifrons* นั้น พบเข้าทำลายเฉพาะ

พืชในวงศ์มะเขือ (Solanaceae) ได้แก่ พริก และมะเขือ เท่านั้น และพบว่า สารล่อที่ใช้ในการศึกษานั้น มีความสามารถในการดึงดูด (attractiveness of lure) แมลงวันผลไม้แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น สารล่อเมธิลยูจีนอล ดึงดูดแมลงวันผลไม้ *B. carambolae, B. correcta* และ *B. dorsalis* และสารล่อคิวลัวร์ดึงดูดเฉพาะแมลงวันสกุล *Zeugodacus* ได้แก่ *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* เท่านั้น และสารล่อลาติลัวร์มีความเฉพาะเจาะจงกับแมลงวันพริก *B. latifrons* ซึ่งผลการศึกษาความสามารถในการดึงดูดของสารล่อแมลงวันผลไม้ครั้งนี้ จะช่วยสนับสนุนและเป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการนำไปใช้ในการควบคุมและป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ให้ถูกต้องในแปลงเพาะปลูกพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับการศึกษาของ Royer and David (2018) ที่รายงานว่า สารล่อ Methyl eugenol และ Cue lure นั้น มีความสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini

2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

ผลการศึกษา พบว่า ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ทั้ง 6 ชนิด มีความยาว 650 คู่เบส และความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ผ่านขั้นตอน alignment แล้ว มีความยาว 588 คู่เบส จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยการ blastn เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) พบว่า แมลงวันผลไม้ที่จำแนกจากลักษณะสัณฐานภายนอก มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99-100% กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้บันทึกไว้ในระบบฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ GenBank accession number ทั้งหมดจำนวน 60 หมายเลข (Table 3)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จำนวน 6 ชนิด และนำมาทำการ alignment ชนิดละ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Table 3) ไม่พบความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด ดังนั้น ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี phylogenetic reconstruction สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด (จำนวน 6 ตัวอย่าง) ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จาก Jiang *et al.* (2013) และ Krosch *et al.* (2018)

Table 2 Scientific name of fruit fly, host plants and attractants from which fruit flies specimens were collected

	Scientific name	Host plants	Attractants
1	*Bactrocera carambolae*	banana, custard apple, guava, jackfruit, jujube, longan, lychee, mango, papaya, rambutan, rose apple and santon	Methyl Eugenol
2	*Bactrocera correcta*	banana, custard apple, guava, jujube, mango, papaya, rose apple, santon and sapodilla	Methyl Eugenol
3	*Bactrocera dorsalis*	banana, custard apple, guava, jackfruit, jujube, longan, lychee, mango, papaya, rambutan, rose apple and santon	Methyl Eugenol
4	*Bactrocera latifrons*	eggplant and chili	Lati lure
5	*Zeugodacus cucurbitae*	bitter gourd, cantaloupe, cucumber, luffa, Ivy gourd, melon, snake luffa, water melon and winter melon	Cue lure
6	*Zeugodacus tau*	bitter gourd, cucumber, melon and water melon	Cue lure

Table 3 Collection details (scientific name, specimen voucher, accession number and number of specimens) for fruit flies used in this study

	Scientic name	Specimen voucher	Accession number	No. of specimens
1	*Bactrocera carambolae*	EMBT.L(SEM) 1301 - 1310	MW052780-84	10
			MW093419-23	
2	*Bactrocera correcta*	EMBT0601.L(SEM) - 0610	MW067300-09	10
3	*Bactrocera dorsalis*	EMBT0701.L(SEM) - 0710	MW052785-89	10
			MW093424-28	
4	*Bactrocera latifrons*	EMBT0901.L(SEM) - 0910	MW136282-91	10
5	*Zeugodacus cucurbitae*	EMBT1601.L(SEM) - 1610	MW045505-14	10
6	*Zeugodacus tau*	EMBT1901.L(SEM) - 1910	MW052795-99	10
			MW093429-33	

พบว่า ข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ maximum likelihood และ Bayesian Inference มีความสอดคล้องกัน (Figure 4) สามารถจำแนกแมลงวันผลไม้ได้ 6 ชนิด คือ *B. correcta, B. carambolae*, *B. dorsalis*, *B. latifrons, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และพบว่า แมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodacus* (*Z. cucurbitae* และ *Z. tau*) นั้น แยกออกจากแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* อย่างชัดเจน สอดคล้องกับการศึกษาของ De Meyer *et al.* (2015) และ Virgilio *et al.* (2015) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ทั่วโลก และมีการเปลี่ยนแปลงแมลงวันผลไม้ที่เคยจัดด้วยลักษณะสัณฐานภายนอกให้อยู่ในสกุลย่อย (subgenus) *Zeugodacus* มาเป็นสกุลใหม่ ได้แก่ สกุล *Zeugodacus* ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นครั้งแรกที่ใช้ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาสนับสนุนในการจำแนก และยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์ ทันสมัยและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลมากขึ้น

สำหรับแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ซึ่งเป็นกลุ่มแมลงวันผลไม้ที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกใกล้เคียงกันมากนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ยีนตำแหน่ง *cox1* นั้น สามารถแยก *B. dorsalis* complex จากแมลงวันผลไม้อื่น ๆ ในสกุล *Bactrocera* และพบว่า สามารถแยกแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ออกจาก *B. carambolae* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันผลไม้สองชนิดนี้ ที่สามารถแยกออกจากกันโดยลักษณะของเส้นปีก แถบสีบริเวณส่วนท้อง และจุดสีดำบริเวณขาคู่หน้า แต่ถ้าต้องการยืนยันชนิดหรือจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *B. dorsalis* complex ให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ยีนตำแหน่งอื่น ๆ ในการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้น (Krosch *et al.*, 2012) เช่นเดียวกับ Boykin *et al.* (2013) ที่ใช้ยีนถึง 6 ตำแหน่ง *(cox1, nad4-3', CAD, period, ITS1 และ ITS2)*

3. การศึกษารูปร่างปีกแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ด้วยเทคนิคมอร์โฟเมทริกส์

3.1 ตัวอย่างปีกเพื่อศึกษารูปร่าง

การกำหนดจุดสังเกต (landmark based data) ด้วยเทคนิคมอร์โฟเมทริกส์ ลงบนปีกแมลงวันผลไม้ที่สำคัญทางการเกษตร 6 ชนิด คือ *Bactrocera correcta, B. carambolae, B. dorsalis, B.latifrons, Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* แสดงใน Figure 5

3.2 ศึกษาขนาดเซนทรอยด์ (centroids sizes) ของแมลงวันผลไม้ เผ่า Dacini

ผลการศึกษาขนาดเซนทรอยด์ด้วยวิธีการทางมอร์โฟเมทริกส์จากปีกของแมลงวันผลไม้เผ่า

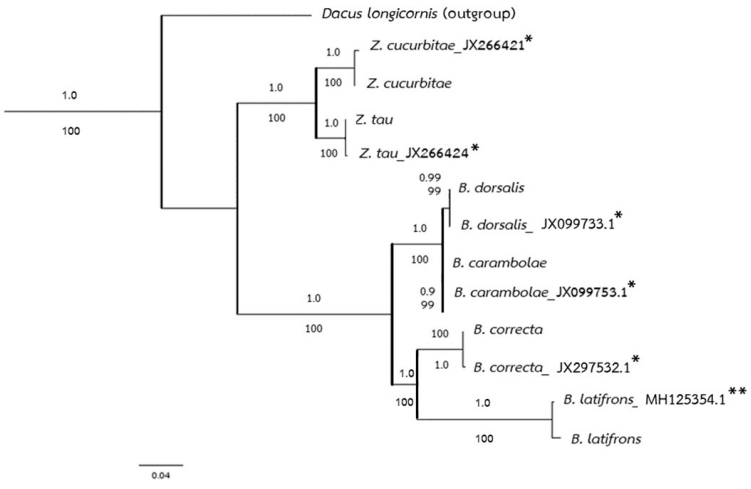


Figure 4 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of *cox1* gene regions. Bootstrap support values (≥70 %) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarised from 1,500 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes. * nucleotides from Jiang *et al.* (2013) and ** nucleotides from Krosch *et al.* (2018)

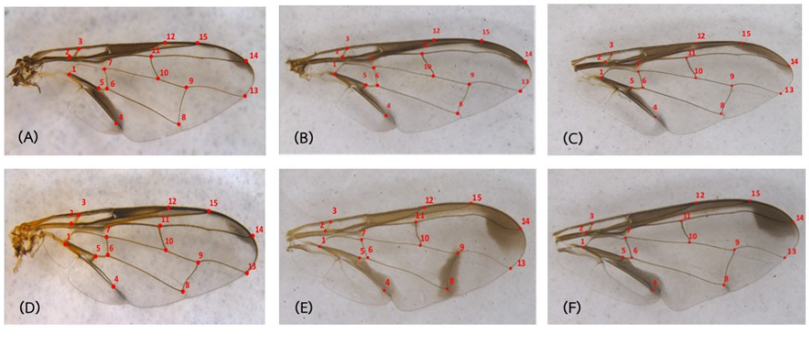


Figure 5 Right-hand wing of Dacini fruit flies showing each of the 15 landmarks used in the geometric morphometric analysis using TPS Program

(A) *Bactrocera correcta* (B) *Bactrocera carambolae* (C) *Bactrocera dorsalis*
(D) *Bactrocera latifrons* (E) *Zeugodacus cucurbitae* (F) *Zeugodacus tau*

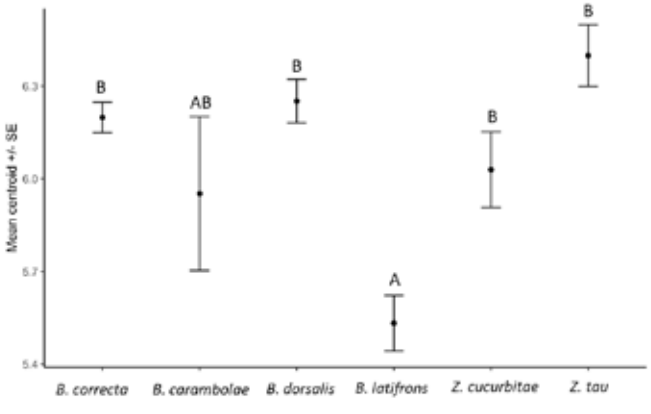


Figure 6 Mean (±SE) wing centroid size of Dacini fruit flies. Samples sharing the same letter are not statistically different from each other based on one-way ANOVA with a Tukey post hoc test ($F_{5, 114}$ = 7.211; P < 0.05)

Dacini จำนวน 6 ชนิด (*Bactrocera correcta, B. carambolae, B. dorsalis, B. latifrons, Z. cucurbitae* และ *Z. tau*) พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยขนาดเซนทรอยด์ จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. latifrons* มีขนาดเล็กสุด (5.53±0.08) และ *Z. tau* มีขนาดใหญ่สุด (6.40±0.09) (Figure 6) ซึ่งขนาดของเซนทรอยด์จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. latifrons* ที่มีขนาดเล็กสุด อาจส่งผลมาจากคุณภาพของอาหารที่ตัวหนอนกินเข้าไปไม่เพียงพอต่อการพัฒนาขนาดตัว (Kithawee and Rungsri, 2011) เนื่องจาก *B. latifrons* มีความเจาะจงต่อพืชอาศัยได้แก่ พริก และมะเขือ (Table 2) ซึ่งจากข้อจำกัดด้านปริมาณและคุณภาพของอาหารอาจส่งผลต่อขนาดของเซนทรอยด์ได้ (Boontop *et al*., 2016)

3.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของร่างกายที่มีผลต่อรูปร่างของปีก

การวิเคราะห์สมการแบบถดถอยจากรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ต่อขนาดของเซนทรอยด์ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) (Figure 7) ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของรูปร่างปีกที่มีผลต่อรูปร่างของปีกในแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex (Kroch *et al*., 2013) และ *Z. cucurbitae* (Boontop *et al*., 2016) ที่ยืนยันให้เห็นว่า ขนาดของเซนทรอยด์ ไม่ได้มีผลต่อรูปร่างของปีก ดังนั้น สามารถใช้ข้อมูลรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ในการแยกความแตกต่างระหว่างชนิดแมลงวันผลไม้

3.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างปีกแมลงวันผลไม้ตามหลัก Canonical Variate Analysis (CVA)

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างรูปร่างปีกแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *B. correcta, B. carambolae, B. dorsalis, B. latifrons, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* ตามหลักการ CVA พบว่า บริเวณแกนหลักของผลการวิเคราะห์พบวงกลมแต่ละสี ซึ่งเป็นตัวแทนของแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดในสกุล *Zeugodacus* นั้นแยกออกจากวงกลมซึ่งเป็นตัวแทนแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ที่มีการเกาะกลุ่มกันอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า แมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodacus* นั้น มีรูปร่างปีกที่มีความแตกต่างจากแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* อย่างเห็นได้ชัด และพบว่าแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Bactrocera* นั้น เกาะกลุ่มกันตามแนวแกน CVA แสดงให้เห็นว่า แมลงวันผลไม้ทั้งหมดในสกุล *Bactrocera* มีรูปร่างของปีกคล้ายคลึงกันมาก โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ได้แก่ *B. carambolae* และ *B. dorsalis* วงกลมที่เป็นตัวแทนชนิดแมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดจะซ้อนทับกัน แสดงว่า รูปร่างปีกแมลงวันผลไม้สองชนิดมีลักษณะรูปร่างปีกคล้ายคลึงกันที่สุด (Schutze *et al*., 2012) และแตกต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ในสกุลเดียวกัน (Figure 8) สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานภายนอกที่พบว่า แมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดนั้นคล้ายคลึงกันมาก ก่อให้เกิดความสับสนต่อการจำแนกชนิดเป็นอย่างยิ่ง (ยุวรินทร์ และคณะ, 2554) นอกจากนี้ การแบ่งกลุ่มแมลงวันผลไม้จากรูปร่างของปีกมีความสอดคล้องกับข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอีกด้วย

รูปร่างของปีกมีผลต่อการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันผลไม้ เพราะแมลงวันผลไม้เพศผู้จะจดจำรูปร่างปีกของเพศเมียในการเลือกจับคู่ผสมพันธุ์ (Sivinski and Pereira, 2005) ดังนั้น ความแปรปรวนของรูปร่างปีกจึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยในการจับคู่ผสมพันธุ์ และส่งผลกระทบต่อการขยายพันธุ์ รวมทั้งส่งผลต่อการเกิดแมลงวันผลไม้ชนิดใหม่ขึ้นอีกด้วย (De Quieroz, 2007) การศึกษารูปร่างของปีกในครั้งนี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากมีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการใช้รูปร่างปีกในการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้เพื่อยืนยันว่า *Bactrocera invadens* นั้นจริง ๆ เป็นชนิดเดียวกับ *B. dorsalis* (Schultze *et al*., 2015) แต่ในประเทศไทยที่ผ่านมา การศึกษามอร์โฟเมทริกส์มีเพียงการศึกษาในแมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodacus* เพียง 2 ชนิด เท่านั้น คือ *Z. tau* (Kithawee and Rungsri, 2011) และ *Z. cucurbitae* (Boontop *et al*., 2017) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นครั้งแรก ที่มีการใช้เทคนิคมอร์โฟเมทริกส์จากปีก

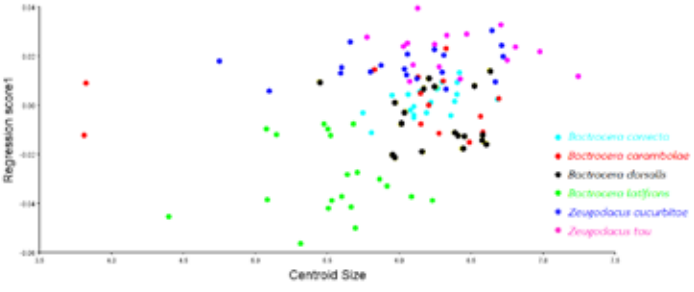


Figure 7 Multiple regression of wing shape (regression score one) on centroid size (a measure of wing size) from Dacini fruit flies. Each colored dot represents the wing of a fly from one of the listed species

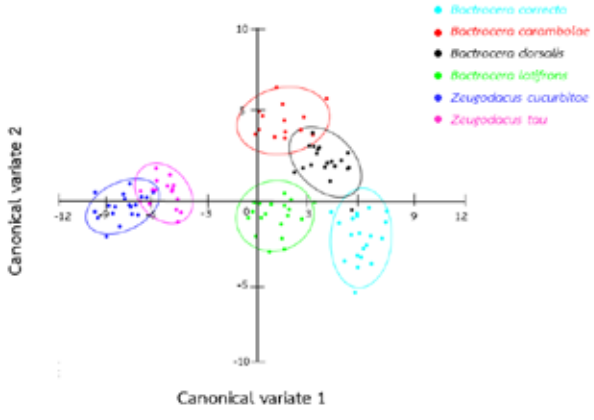


Figure 8 Plot of the first two variates following canonical variate analysis of geometric morphometric wing shape data for Dacini fruit flies sampled. Twenty wings were analysed per site; 95% group confidence ellipses are represented. Each coloured dot represents the wing of a fly from one of the listed species

ร่วมกับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เพื่อยืนยันความถูกต้องในการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในเผ่า Dacini ของประเทศไทย

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้ด้วยหลักการอนุกรมวิธานแบบผสมผสานในครั้งนี้ เป็นการศึกษาทางชีวโมเลกุลจากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิคมอร์โฟเมทริกส์ ซึ่งช่วยสนับสนุนและยืนยันการตรวจจำแนกแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางการเกษตรในเผ่า Dacini จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera correcta, B. carambolae, B. dorsalis, B. latifrons, Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* และผลจากการศึกษารูปร่างของปีกด้วยวิธีการมอร์โฟเมทริกส์ ให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้ทั้งสองสกุลด้วย นอกจากนี้ ผลจากการศึกษามอร์โฟเมทริกส์จากปีกของแมลงวันผลไม้ ยังใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนข้อมูลรูปร่างปีกของแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทย ถือเป็นการพัฒนางานวิจัยด้านการอารักขาพืชและเพิ่มเติมองค์ความรู้ รวมทั้งสร้างความน่าเชื่อถือในการพัฒนางานวิจัยของประเทศไทยให้เทียบเท่าระดับสากลมากขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. ชนินทร ดวงสอาด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ผู้ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

ยุวรินทร์ บุญทบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี และ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. ปี 2555 อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* จากสารล่อแมลงในเขตภาคใต้ของประเทศไทย. หน้า 1742-1758. *ใน: รายงานการประชุมประจำปี 2554.* กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพ. 1899 หน้า

ยุวรินทร์ บุญทบ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ชมัยพร บัวมาศ และ จารุวัตถ์ แต้กุล. 2562. การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทยด้วยลักษณะทางพันธุกรรม. หน้า 16-29 *ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 14* ระหว่างวันที่ 12-14 พฤศจิกายน 2562 โรงแรมดุสิตธานี หัวหิน จังหวัดเพชรบุรี.

Aluja, M. and A.L. Norrbom, 2001. *Fruit Flies* (*Tephritidae*): *Phylogeny and Evolution of behavior*. CRC Press, Florida, USA. 984 pp.

Boontop, Y., M.K. Schutze, A.R. Clarke, S.L. Cameron and M.N. Krosch. 2017. Signatures of invasion: using an integrative approach to infer the spread of melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), across Southeast Asia and the West-Pacific. *Biol. Invasions.* 19(5): 1597-1619.

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, Australia.

Boykin, L.M, M.K Schutze and M.N. Krosch. 2013. Multi-gene phylogenetic analysis of south-east Asian pest members of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) does not support current taxonomy. *J. Appl. Entomol.* 138(4): 235-253.

De Meyer, M., H. Delatte, M. Mwatawala, S. Quilici, J.F. Vayssieres and M. Virgilio. 2015. A review of the current knowledge on *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera, Tephritidae) in Africa, with a list of species included in *Zeugodacus*. *ZooKeys.* 540: 539-557.

De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56(6): 879-886.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. *Tropical Fruit Flies* (*Tephritidae: Dacinae*) *of South-East Asia*. CABI. London, UK. 664 p.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2016. *Keys to the tropical fruit flies of South-East Asia*. CABI, London, UK. 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. *Mol. Mar. Bio Biotechnol.* 3(5): 294-299.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *In* Nucleic acids symposium series. 41, 95-98.

Jiang, F., Z.H. Li, Y.L. Deng, J.J. Wu, R.S. Liu and N. Buahom. 2013. Rapid diagnosis of the economically important fruit fly, *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker. *Bull. Entomol. Res.* 103(3): 363-371.

Kitthawee, S. and N. Rungsri. 2011. Differentiation in wing shape in the *Bactrocera tau* (Walker) complex on a single fruit species in Thailand. *Sci. Asia.* 37: 308-313.

Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 353-357.

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 Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 64(3): 513-23.

Krosch, M.N., M.K. Schutze, K.F. Armstrong, Y. Boontop, L.M. Boykin, T.A. Chapman, A. Englezou, S.L. Cameron and A.R. Clarke. 2013. Piecing together an integrative taxonomic puzzle: microsatellite, wing shape and aedeagus length analyses of *Bactrocera dorsalis* s.l. (Diptera: Tephritidae) find no evidence of multiple lineages in a proposed contact zone along the Thai/ Malay Peninsula. *Syst. Entomol.* 38(1): 2-13.

Krosch, M.N., F. Strutt, S. Cameron, A. Clarke, M. Bottrill, S. Broughton, B. Lessard, J. McMahon, J. Royer, B. Woods, N, Woods, D. Yeates and M. Schutze. 2018. Validation of novel molecular diagnostic loci and multilocus phylogenetics for Australasian dacine fruit flies (Diptera: Tephritidae). Submitted (27-MAR-2018) School of Earth, Environmental and Biological Sciences, QUT, 2 George Street, Brisbane, QLD 4001, Australia.

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547-1549.

Nylander, J.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: 581-583.

Rohlf, F.J. 2013. tpsDig, digitize landmarks and outlines. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, NY, USA. Available at: http://life.bio.sunysb.edu/morph/. (Accessed : 12 March 2013).

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

Royer J.E. and G.M. David. 2018. Combining Cue-Lure and Methyl Eugenol in traps significantly decreases catches of most *Bactrocera, Zeugodacus* and *Dacus* Species (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Australia and Papua New Guinea. *Econ. Entomol.* 111(1): 298-303.

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). *Bull. Entomol. Res.* 102: 103-111.

Schutze, M.K., N. Aketarawong, W. Amornsak, K.F. Armstrong, A.A. Augustinos, N. Barr and A.R. Clarke. 2015. Synonymization of key pest species within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae): taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoecological data. *Syst. Entomol.* 40(2): 456-471.

Schutze, M.K., K. Mahmood, A. Pavasovic, W. Bo, J. Newman, A.R. Clarke and S.L. Cameron. 2015. One and the same: integrative taxonomic evidence that *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) is the same species as the Oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis. Syst. Entomol.* 40(2): 472-486.

Sivinski, J. and R. Pereira. 2005. Do wing markings in fruit flies (Diptera: Tephritidae) have sexual significance? *Fla. Entomol.* 88(3): 321-324.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics:* 30: 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. *Mol. Phylogenet. Evol.* 85:171-179.

White, I.M. and M.M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. *CAB International.* 19: 2496-2497.

Zelditch, M. L., D. L. Swiderski and H.D. Sheets. 2012. *Geometric Morphometrics for Biologists:* A Primer. Academic Press, MA, USA, 477 p.