มอร์โฟเมทริกส์ปีกเพื่อการวินิจฉัยชนิดแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* ในประเทศไทย

Wing Morphometrics for Species Diagnosis of Leafminer Flies (Genus *Liriomyza*) in Thailand

ยุวรินทร์ บุญทบ[1/*] สุนัดดา เชาวลิต[1/] ชมัยพร บัวมาศ[1/] อาทิตย์ รักกสิกร[1/] สิริชัย สาธุวิจารณ์[1/]

Yuvarin Boontop[1/*] Sunadda Chaovalit[1/] Chamaiporn Buamas[1/]Artit Rukkasikorn[1/] Sirichai Sathuwijarn[1/]

Received 24 Sep. 2024/Revised 8 Nov. 2024/Accepted 9 Nov. 2024

ABSTRACT

Leafminer flies of the genus *Liriomyza* are serious pests that damage a wide range of vegetable crops. These flies are also significant quarantine pests that exported vegetables must be inspected to prevent the infestation of these pests in plant materials. Accurate species identification of the genus *Liriomyza* using conventional external characters is difficult due to morphological similarities among *Liriomyza* species. This study aimed to evaluate the wing morphometrics in distinguishing among five *Liriomyza* species: *L. brassicae*, *L. chinensis*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* and *L. trifolii*. Sixteen homologous landmarks were digitized on the wings for geometric morphometric analysis. The results revealed significant differences in centroid size among species ($P<0.05$) with *L. brassicae* exhibiting the smallest wing size (1.58 ± 0.03 mm) and *L. huidobrensis* the largest (2.34 ± 0.05 mm). Canonical variate analysis demonstrated that *L. chinensis* and *L. huidobrensis* could be clearly separated from the remaining three species based on wing shape, while *L. brassicae*, *L. sativae* and *L. trifolii* exhibited highly similar wing morphologies, making them more difficult to distinguish. In conclusion, wing morphometrics is an effective tool for identifying *L. chinensis* and *L. huidobrensis* from the remaining three species and can be applied for plant quarantine inspection for vegetable exports in Thailand. However, due to overlapping wing shapes among *L. brassicae*, *L. sativae* and *L. trifolii*, further identification using male genitalia or nucleotides is recommended to improve the accuracy of species discrimination.

Keywords: species diagnosis; wing morphometrics; leafminer; quarantine pest

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[1/] Plant Protection Research and Development Office, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

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

บทคัดย่อ

แมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* เป็นศัตรูพืชผักหลายชนิด และเป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญการส่งออกพืชผักของประเทศไทยจำเป็นต้องตรวจสอบให้ปราศจากแมลงศัตรูกลุ่มนี้ แต่การจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* ทำได้ยาก เนื่องจากแมลงสกุลนี้มีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกันสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้เทคนิคมอร์โฟเมทริกส์ของปีกในการจำแนกชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบใน 5 ชนิด ได้แก่ *L. brassicae L. chinensis L. huidobrensis L. sativae* และ *L. trifolii* ทำการศึกษาโดยใช้จุดสังเกต (landmarks) บนปีกจำนวน 16 จุด พบว่า ขนาดเซนทรอยด์ของปีกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดย *L. brassicae* มีขนาดเล็กที่สุด (1.58±0.03 มม.) และ *L. huidobrensis* มีขนาดใหญ่ที่สุด (2.34±0.05 มม.) การวิเคราะห์เชิงพหุ (CVA) แสดงให้เห็นว่า *L. huidobrensis* และ *L. chinensis* มีรูปร่างปีกแตกต่างจากชนิดอื่นอย่างชัดเจน ขณะที่ *L. brassicae L. sativae* และ *L. trifolii* มีรูปร่างปีกคล้ายคลึงกันมาก และแยกจากกันได้ยาก ดังนั้น เทคนิคมอร์โฟเมทริกส์ของปีกสามารถใช้แยกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ *L. huidobrensis* และ *L. chinensis* ออกจากชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแมลงศัตรูพืชกักกันในพืชผักส่งออกของประเทศไทยได้ อย่างไรก็ตาม สำหรับแมลงวันหนอนชอนใบชนิดที่มีรูปร่างปีกใกล้เคียงกัน ได้แก่ *L. brassicae L. sativae* และ *L. trifolii* จำเป็นต้องใช้ข้อมูลประกอบเพิ่มเติม เช่น ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้หรือข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการจำแนกชนิดอย่างสมบูรณ์

คำสำคัญ: วินิจฉัยชนิด; มอร์โฟเมทริกส์ปีก; แมลงวันหนอนชอนใบ; แมลงศัตรูกักกัน

บทนำ

แมลงวันหนอนชอนใบ (leafminer) ในสกุล *Liriomyza* จัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Agromyzidae เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ โดยทุกชนิดในสกุลนี้สามารถเข้าทำลายพืชผักได้หลากหลายชนิด ซึ่งหากปะปนไปกับผลผลิตที่ส่งออก จะก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรง เนื่องจาก *Liriomyza* เป็นแมลงศัตรูกักกัน (quarantine pest) ที่หลายประเทศประกาศห้ามนำเข้าพืชผักที่ตรวจพบการปะปนของแมลงกลุ่มนี้ หากมีการตรวจพบในประเทศปลายทางมักจะมีมาตรการกีดกันทางการค้าตามมา (International Plant Protection Convention, 2016) เนื่องจากแมลงกลุ่มนี้มีขนาดลำตัวเล็กและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกเพียงอย่างเดียวจึงมีข้อจำกัด ด้วยเหตุนี้แนวคิดเรื่อง "อนุกรมวิธานแบบผสมผสาน" (integrative taxonomy) จึงถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดแมลงกลุ่มนี้ โดยเป็นแนวทางที่ผสานเทคนิคหลากหลายที่มีความน่าเชื่อถือเข้าด้วยกันอย่างน้อย 2–3 วิธี (Clarke and Schutze, 2014)

ในประเทศไทย ยุวรินทร์และคณะ (2565) ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) เพื่อจำแนกแมลงวันหนอนชอนใบที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ พบว่ามีอยู่ 5 ชนิด ได้แก่ *L. brassicae L. chinensis L. huidobrensis L. sativae* และ *L. trifolii* แต่วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยความชำนาญสูงและต้องใช้ทักษะเฉพาะในการเตรียมสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เพื่อให้สามารถสังเกตลักษณะที่ใช้ในการจำแนกได้อย่างถูกต้อง นอกจากนั้น ยังมีการนำเทคนิคด้านโมเลกุล เช่น การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) มาประยุกต์ใช้ร่วมกันในการจำแนกชนิด

แมลงวันหนอนชอนใบ (ยุวรินทร์และคณะ, 2566) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีต้นทุนสูง เนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาสูงและมีข้อจำกัดด้านการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาเทคนิคอื่นที่มีประสิทธิภาพ สะดวก ประหยัด และสามารถใช้งานร่วมกับวิธีการอื่น ๆ เพื่อแยกชนิดแมลงสกุล *Liriomyza* ในแนวทางอนุกรมวิธานแบบผสมผสานได้

เทคนิคการวิเคราะห์เชิงมอร์โฟเมทริกส์ของปีก (wing morphometrics) เป็นหนึ่งในเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติ (Sauer et al., 2020) เทคนิคนี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Rohlf, 2002) โดยอาศัยหลักการทางเรขาคณิตผนวกกับการวิเคราะห์สถิติหลายตัวแปร เพื่อวิเคราะห์รูปร่างของสิ่งมีชีวิตอย่างมีระบบ เทคนิคนี้มีจุดเด่นคือ สะดวก มีความแม่นยำสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับแมลงหลากหลายกลุ่ม เช่น แมลงวันหัวเขียว และยุงในทางการแพทย์ (Sontigun et al., 2017; Sauer et al., 2020) ผึ้ง และชันโรงในกลุ่มแมลงผสมเกสร (กิตติยาภรณ์และคณะ, 2565; Rattanawannee et al., 2020; Ndungu et al., 2023) แมลงปอ (Tarris-Sammaniego et al., 2023) สำหรับแมลงศัตรูทางการเกษตร Schutze et al. (2015) ได้นำมอร์โฟเมทริกส์มาใช้จำแนกแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แปรผันสูง ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า *B. invadens* และ *B. dorsalis* เป็นแมลงชนิดเดียวกัน จากข้อดีดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้เทคนิคมอร์โฟเมทริกส์ของปีกในการจำแนก และแยกความแตกต่างของชนิดแมลงวันหนอนชอนใบในสกุล *Liriomyza* ได้แก่ *L. brassicae L. chinensis L. huidobrensis L. sativae* และ *L. trifolii* เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันหนอนชอนใบที่พบในพืชส่งออกอย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างปีกแมลงวันหนอนชอนใบ

นำตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบจากพืชที่มีการจำแนกชนิดจากสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ยืนยันชนิดโดยใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอของยุวรินทร์และคณะ (2565; 2566) มาทำสไลด์ถาวรของปีก โดยการตัดปีกด้านขวาวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ปีกแมลงวันหนอนชอนใบจำนวน 20 ตัวอย่าง/ชนิด (Table 1) นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 40-45℃. เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้น้ำยา canada balsam แห้ง และปีกคงรูปในสภาพสมบูรณ์ จากนั้นถ่ายภาพปีกแมลงวันหนอนชอนใบด้วยกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (compound light microscope) Olympus รุ่น CX41RF (Olympus Co., Tokyo, Japan) บันทึกภาพถ่ายปีกแมลงวันหนอนชอนใบในรูปแบบของ JPEG ไฟล์ จากนั้นกำหนดจุดสังเกต (landmark based data) บนปีกแมลงวันหนอนชอนใบซึ่งประยุกต์จาก Shiao (2004) ด้วยโปรแกรม TPSDIG2 Version 2.17 (Rohlf, 2013) บันทึกไฟล์ในรูปแบบของ TPS ไฟล์ เพื่อนำไปศึกษาข้อมูลมอร์โฟเมทริกส์

2. การศึกษารูปร่างปีกแมลงวันหนอนชอนใบด้วยเทคนิคมอร์โฟเมทริกส์

2.1 ศึกษาขนาดเซนทรอยด์ (centroid sizes) ของแมลงวันหนอนชอนใบตามวิธีการของ Schutze et al. (2012) โดยวิเคราะห์ขนาดเซนทรอยด์ด้วยโปรแกรม MorphoJ 1.06 (Klingenberg, 2011) ซึ่งเป็นการคำนวณจากการรวมระยะทางระหว่างจุดสังเกตแต่ละจุด กับจุดกึ่งกลางของจุดสังเกต (ตำแหน่งเฉลี่ย

ในพื้นที่สองมิติของพิกัดทั้งหมด) และนำผลรวมที่ได้มาถอดรากที่สอง (Boontop, 2016) ทำการเปรียบเทียบขนาดเซนทรอยด์ของปีกแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดโดยหาค่าเฉลี่ย และการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's post hoc test

Table 1 Leafminer flies, their host plants and collection locations for this study

Leafminer species	Host plant species	Collection location (subdistrict, district, province)	Number of collected samples
L. brassicae	*Brassica chinensis* L.	Nong Prue, Bang Lamung, Chonburi	5
	B. juncea (L.)	Lat Yao, Chatuchak, Bangkok	2
	B. oleracea L.	Yang Chum Noi, Yang Chum Noi, Si Sa Ket	5
	B. rapa L.	Mae Win, Mae Wang, Chiang Mai	5
	B. oleracea L.	Tha Yang, Tha Yang, Phetchaburi	3
L. chinensis	*Allium ascalonicum* L.	Tha Muang, Tha Muang, Kanchanaburi	5
	A. sativum L.	Ta Ket, Uthumphon Phisai, Si Sa Ket	5
	A. cepa L.	Long Khot, Phrao, Chiang Mai	5
	A. tuberosum Rottl.	Nong Ngu Lueam, Mueang, Nakhon Pathom	5
L. huidobrensis	*Solanum tuberosum* L.	Kong Khaek, Mae Chaem, Chiang Mai	5
	S. tuberosum L.	Mae Faek Mai, San Sai, Chiang Mai	2
	S. tuberosum L.	Long Khot, Phrao, Chiang Mai	8
	S. tuberosum L.	Kong Khaek, Mae Chaem, Chiang Mai	5
L. sativae	*Vigna unguiculata*	Don Cha-em, Tha Maka, Kanchanaburi	5
	Sucumis sativus L.	Thung Thong, Tha Muang, Kanchanaburi	5
	Cucurbita moschata Decne.	Chorakhe Sam Phan, U Thong, Suphan Buri	5
	Lycopersicon esculentum Mill.	Bo Luang, Hot, Chiang Mai	5
L. trifolii	*Ocimum basilicum* L.	Si Maha Pho, Nakhon Chai Si, Nakhon Pathom	10
	Aqium graveolens L.	Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Pathom	3
	L. esculentum Mill.	Pang Hin Fon, Mae Chaem, Chiang Mai	7

2.2 ศึกษา Procrustes superimposition เพื่อเปรียบเทียบรูปร่างของปีกแมลงวันหนอนชอนใบโดยการปรับตำแหน่ง การหมุน และการปรับขนาดให้สอดคล้องกัน เพื่อให้สามารถวิเคราะห์รูปร่างของปีกแมลงวันหนอนชอนใบได้อย่างแม่นยำ โดยลดอิทธิพลของความแตกต่างด้านขนาดและทิศทางของแต่ละตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์การกระจายของชุดข้อมูลทางรูปร่างทางสถิติ เพื่อตรวจหาค่าผิดปกติ (outliers) โดยใช้พิกัดร่วม (co-ordinate system) ที่ปรับใหม่จากการกำหนดจุดสังเกต 16 จุด บนปีกของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละตัวในระบบสองมิติ (2D landmark-based analysis) ข้อมูลที่ได้นำไปศึกษาความแปรผันของรูปร่างปีกโดยใช้โปรแกรม MorphoJ

2.3 วิเคราะห์ผลของขนาดลำตัวที่มีต่อรูปร่างปีก (allometric effect) เพื่อกำจัดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากตำแหน่งการวัด หรือการกำหนดทิศทางเมื่อมีการเลื่อน การปรับขนาด หรือการหมุนภาพออก ทำให้ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้องและไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง (Zelditch et al., 2012) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) ในโปรแกรม MorphoJ โดยกำหนด centroid size (CS) เป็นตัวแปรอิสระและ

procrustes coordinates เป็นตัวแปรตาม เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดและรูปร่างปีก และทำการวิเคราะห์ถดถอยเพื่อประเมินความแปรปรวนของรูปร่างพร้อมตรวจสอบค่าสหสัมพันธ์และระดับนัยสำคัญทางสถิติ (p-value) รวมทั้งแสดงผลการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างปีกผ่าน deformation grids เพื่อแสดงแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างปีกที่สัมพันธ์กับขนาดลำตัว

2.4 วิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างปีกโดยใช้ canonical variate analysis (CVA) (Zelditch et al., 2012) ในโปรแกรม MorphoJ เพื่อจำแนกกลุ่มตัวอย่างตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ procrustes coordinates เป็นตัวแปรตามและกำหนดกลุ่มตัวอย่างเป็นตัวแปรอิสระ ได้แก่ ชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ แล้วทำการวิเคราะห์ CVA คำนวณ canonical variates (CVs) แสดงผลผ่านแผนภาพการกระจาย เพื่อประเมินการแยกกลุ่มจากการใช้ค่า eigenvalues ร่วมกับ variance (%) และ cumulative percentage ในการเลือก CVs ที่สำคัญที่สุดสำหรับการอธิบายลักษณะหรือความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร

2.5 วิเคราะห์ค่า Mahalanobis distance และ Procrustes distance พร้อมการทดสอบค่าความแตกต่างเชิงสถิติด้วย permutation test (n = 10,000) เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของรูปร่างปีกระหว่างกลุ่ม พร้อมแสดง deformation grids เพื่อแปลผลการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างปีกที่สัมพันธ์กับแต่ละ CV

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. จุดสังเกตบนปีกแมลงหนอนชอนใบ

การใช้จุดสังเกตทั้ง 16 จุดบนปีกแมลงวันหนอนชอนใบนี้เพื่อแสดงตำแหน่งที่มีความสอดคล้องกันทางโครงสร้าง (homologous landmarks) ในแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae L. chinensis L. huidobrensis L. sativae* และ *L. trifolii* จุดดังกล่าวเป็นจุดที่มีความคงที่และสามารถเทียบเคียงตำแหน่งได้ทั้งในระดับประชากรภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific) และระหว่างชนิดต่าง ๆ (interspecific) ซึ่งการวิเคราะห์รูปร่าง (shape analysis) บนพื้นฐานของจุดสังเกตที่มีความสอดคล้องกันทางโครงสร้างมีความแม่นยำสูงในการตรวจจับความแปรผันทางรูปร่างที่ไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า โดยเฉพาะในกลุ่มแมลงที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกัน เช่น แมลงวันหนอนชอนใบ *Liriomyza s*pp. และการศึกษานี้ทำในปีกของแมลงวันหนอนชอนใบ ซึ่งปีกเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียร ไม่แปรผันตามสภาพแวดล้อมมากนักเมื่อเทียบกับโครงสร้างภายนอกอื่น ๆ เช่น สีหรือลวดลาย อีกทั้งยังประกอบด้วยเส้นปีกและจุดเชื่อมต่อที่สามารถกำหนดตำแหน่งได้อย่างแน่นอนและสม่ำเสมอ จุดสังเกตทั้ง 16 จุดที่กำหนดขึ้นจึงมีบทบาทสำคัญในการอธิบายความแตกต่างของรูปร่างปีกระหว่างชนิดแมลง (Figure 1A-E) โดยสามารถสะท้อนความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกับระดับความแตกต่างทางอนุกรมวิธาน

2. รูปร่างปีกแมลงวันหนอนชอนใบ

2.1 ขนาดเซนทรอยด์ของปีก

จากข้อมูลขนาดเซนทรอยด์ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F=1.678$; $df=4, 95$; $P<0.05$) โดยพบว่า แมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae* มีขนาดเซนทรอยด์เล็กที่สุด (1.58±0.03) และ *L. huidobrensis* มีขนาดเซนทรอยด์ใหญ่ที่สุด (2.34±0.05) (Table 2) ส่วนแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* และ *L. huidobrensis* นั้นมีขนาดเซนทรอยด์แตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบอีก 3 ชนิด คือ *L. brassciae L. sativae* และ *L. trifolili* ซึ่งทั้งสามชนิดนั้นไม่มีความแตกต่างของขนาดเซนทรอยด์

(Table 2) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ Tantowijoyo and Hoffmann (2011) ที่ใช้ขนาดเซนทรอยด์ของปีกในการศึกษาความแตกต่างของ *L. huidobrensis* และ *L. sativae* ตามระดับความสูง พบความแปรปรวนที่มีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะเดียวกับผลการศึกษาของ Schutze et al. (2012) ที่ใช้ขนาดเซนทรอยด์ในการเปรียบเทียบรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลขนาดเซนทรอยด์เป็นตัวชี้วัดที่เหมาะสมต่อความแตกต่างทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาในชนิด สามารถนำมาศึกษาความสัมพันธ์กับรูปร่างปีกได้

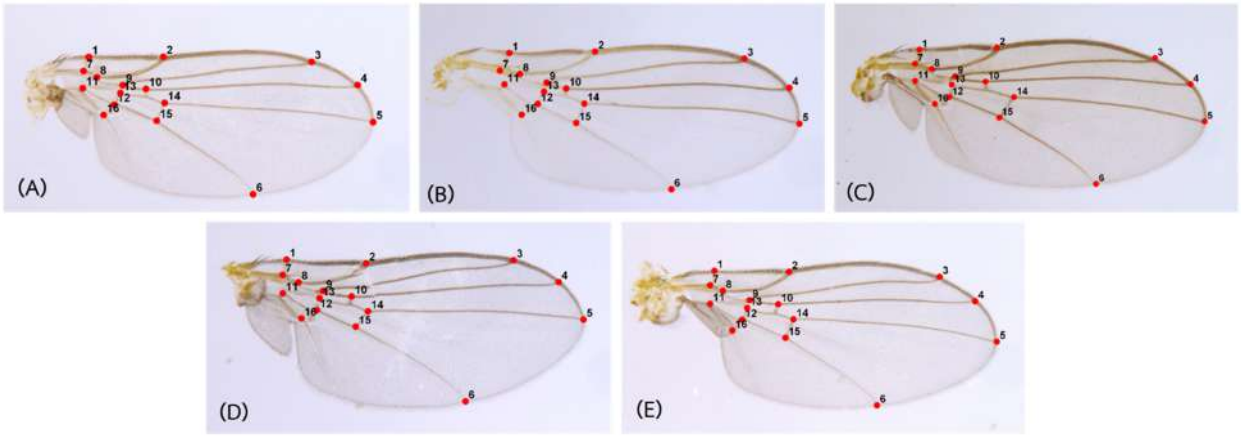


Figure 1 Right-hand wing of leafminers showing each of the 16 landmarks used in the morphometric analysis using TPSDIG2 program (A) *L. brassicae* (B) *L. chinensis* (C) *L. huidobrensis* (D) *L. sativae* (E) *L. trifolili*

Table 2 Mean of wing centroid size and standard error (mean±SE) of five *Liriomyza* species examined in this study

Leafminer species	Wing centroid size (mean±SE) [1/]	Significance[2/]
L. brassicae	1.575±0.032	A
L. chinensis	2.070±0.032	B
L. huidobrensis	2.341±0.047	C
L. sativae	1.618±0.012	A
L. trifolili	1.624±0.015	A

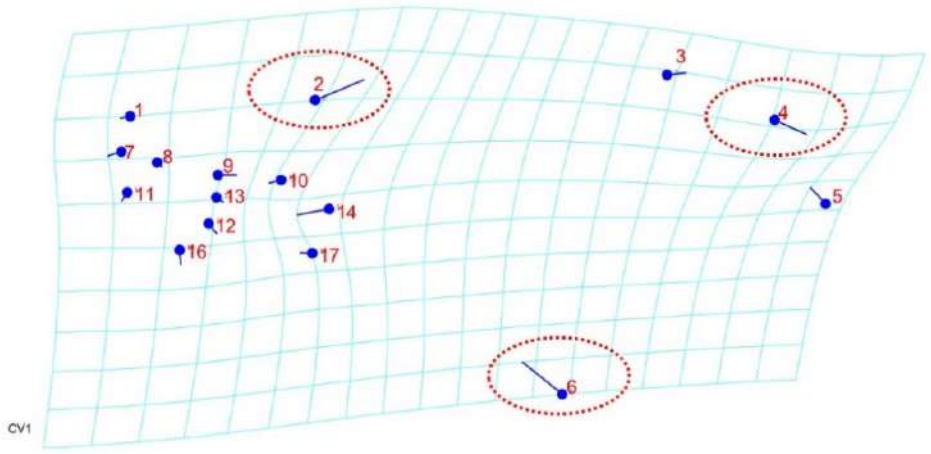
[1/] n=20

[2/] Different capital letters indicate significant differences (P<0.05; determined by Tukey's post hoc test after one way ANOVA) between leafminer species

2.2 Procrustes superimposition ของปีก

การศึกษารูปร่างปีกต้องอาศัยการวิเคราะห์ Procrustes superimposition ซึ่งให้ข้อมูลในรูปของพิกัดคาร์ทีเซียน (Cartesian coordinates) โดยเป็นพิกัดของจุดสังเกตบนปีกใน ระบบสองมิติ (แกน X และ Y) พบว่าค่าเฉลี่ยของพิกัดในแนวนอนและแนวตั้งมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้ในการระบุความแตกต่างของรูปร่างปีกในกลุ่มตัวอย่างแมลงวัน

หนอนชอนใบได้อย่างชัดเจน ช่วยให้สามารถเปรียบเทียบรูปร่างปีกได้โดยปราศจากอิทธิพลของขนาดหรือการหมุนที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่าง กระบวนการนี้ถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการศึกษามอร์โฟเมตริกส์ เนื่องจากช่วยให้สามารถวิเคราะห์ความแปรผันของรูปร่างได้อย่างแม่นยำและมีความน่าเชื่อถือ



Landmarks	Position on wing	X	Y	Landmarks	Position on wing	X	Y
1	Branching point of C and Sc	-0.218	0.075	9	Branching point of R2+3 and R4+5	-0.127	0.013
2	Intersection of R1 and C	-0.025	0.091	10	Junction of inner cross vein (r-m) and R4+5	-0.061	0.008
3	Termination of vein R2+3	0.343	0.118	11	Root (basal point) of M	-0.222	-0.005
4	Termination of vein R4+5	0.455	0.071	12	Branching point of M1+2 and M3+4	-0.136	-0.037
5	Termination of vein M1+2	0.509	-0.017	13	Junction of inner cross vein (r-m) and M1+2	-0.128	-0.010
6	Junction of M3+4 and wing margin	0.233	-0.216	14	Junction of outer cross vein (m-m) and M1+2	-0.010	-0.022
7	Junction of Sc and R	-0.228	0.038	15	Junction of outer cross vein (m-m) and M3+4	-0.028	-0.068
8	Branching point of R1 and Rs (R2+3, R4+5)	-0.190	0.026	16	Branching point of Cu+A	-0.167	-0.065

Figure 2 The Procrustes superposition illustrates the variation in sixteen landmarks on leafminer wings across five species. The figure presents the configurations of landmarks after removing differences in position, scale and orientation

จากการวิเคราะห์จุดสังเกตทั้ง 16 จุด พบว่าจุดสังเกตที่ตำแหน่ง 2 4 และ 6 ซึ่งอยู่บริเวณขอบปีกมีความแปรผันสูงที่สุด จากการมีก้านลอลลิพอพ (lollipop) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ระดับความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในจุดสังเกต โดยค่าความแปรผันของจุดเหล่านี้มีค่ามากกว่าจุดสังเกตในตำแหน่งอื่น (Figure 2) สอดคล้องกับงานของ Shiao (2004) ที่รายงานว่าจุดสังเกตในตำแหน่งดังกล่าวมีความแปรผันสูงที่สุด นอกจากนี้ ค่า Procrustes superimposition ที่วิเคราะห์ได้ของจุดสังเกตทั้ง 16 จุด ไม่มีค่าผิดปกติ (outliers) ข้อมูลที่ได้จึงสามารถนำไปใช้ศึกษาความแปรผันของรูปร่างปีกแมลงวันหนอนชอนใบต่อไปได้อย่างน่าเชื่อถือ

2.3 การเปลี่ยนแปลงขนาดของลำตัวที่มีผลต่อรูปร่างของปีก (allometric effect)

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยระหว่างขนาด centroid size และ Procrustes distance ของปีกแมลงวันหนอนชอนใบ โดยแต่ละจุดสีแทนตัวอย่างปีกของแมลงหนอนชอนใบในแต่ละชนิด และจุดเหล่านี้แสดงการกระจายและแนวโน้มความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างรูปร่างและขนาดอย่างชัดเจน ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างรูปร่างและขนาดปีก โดยขนาดปีกสามารถอธิบายความแปรปรวนของรูปร่างปีกได้ 22.18% ($P<0.0001$) (Figure 3) และค่าความแปรผันของรูปร่าง

ปีกที่เกิดจากผลกระทบของขนาด (allometric shape variation) มีสัดส่วนเพียง 1.51% เท่านั้น

ผลการศึกษานี้ยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงขนาดของลำตัวหรือขนาดปีกไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อรูปร่างของปีกแมลงวันหนอนชอนใบ ซึ่งทำให้สามารถใช้ข้อมูลรูปร่างของปีกเป็นตัวแปรอิสระสำคัญในการวิเคราะห์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของแมลงได้อย่างแม่นยำและเชื่อถือได้ ผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Krosch et al. (2013) รวมทั้งยุวรินทร์และคณะ (2564) ที่ได้รายงานผลการวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อประเมิน allometric effect ในแมลงวันผลไม้ และพบว่ารูปร่างของปีกไม่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดลำตัวอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน

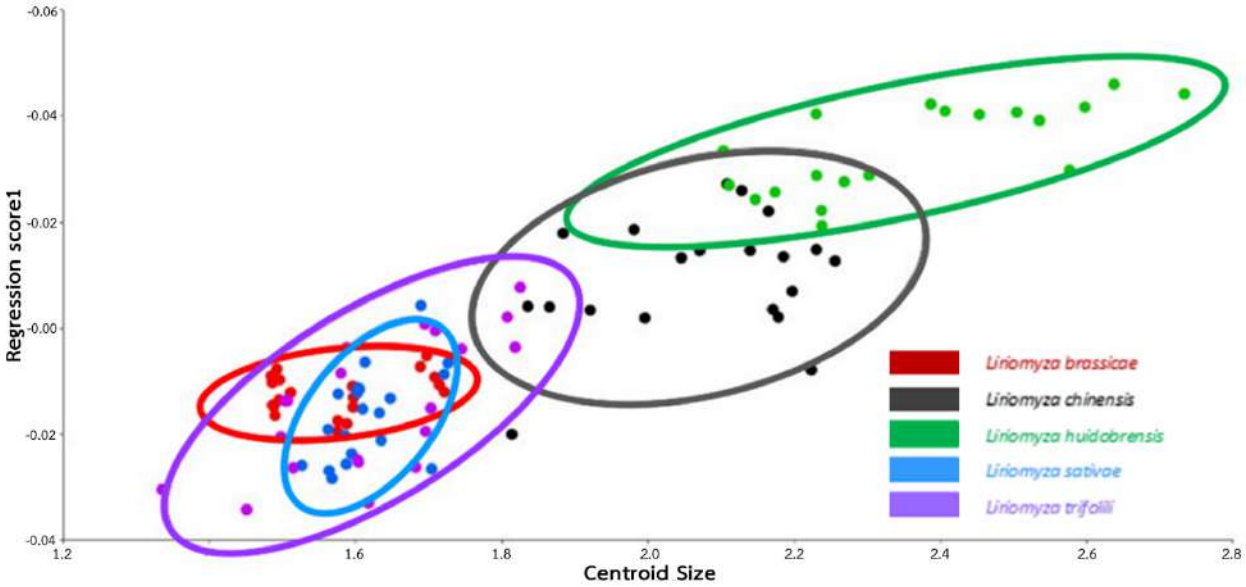


Figure 3 Regression of wing shape (represented by regression score one) on centroid size (a measure of wing size) in leafminers. Each colored dot represents the wing of a leafminer from one of the listed species

2.4 รูปร่างของปีกแมลงวันหนอนชอนใบ

การวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ตามองค์ประกอบ CVA หลังจากกำจัดปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนด้วย allometric effect แล้วพบว่า ข้อมูลเป็นแบบพหุมิติ (multidimensional shape data) ซึ่งอาจมีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งมิติ โดยพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร ซึ่งจัดกลุ่มแบ่งออกเป็น 4 รูปแบบ ตามผลของ CV และพบว่า CV1 (eigenvalue=13.40) มีความสำคัญสูงสุดสามารถอธิบายได้ถึง 46.05% ของความแปรผันทั้งหมด CV2 (eigenvalue=10.13) อธิบายความแปรผันได้ 34.82% CV3 (eigenvalue=2.96) อธิบาย 10.17% และ CV4 (eigenvalue=2.61) อธิบาย 8.95% (Table 3) CV1 และ CV2 แสดงสามารถแยก *L. chinensis* และ *L. huidobrensis* ออกจาก *L. brassicae L. sativae* และ *L. trifolii* ที่เกาะกลุ่มกันตามแนวแกน CVA ได้อย่างชัดเจน (Figure 4A) มีรูปร่างของปีกที่แตกต่างจากชนิดอื่น ๆ และเมื่อวิเคราะห์ถึง CV3 สามารถช่วยแยกแยะข้อมูลในมิติที่ต่างออกไป (Figure 4B) *L. huidobrensis* ไปรวมกลุ่มกับ *L. brassicae L. sativae* และ *L. trifolii* แต่ *L. chinensis* ยังคงแยกออกจากแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 4 ชนิดอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่า *L. chinensis* มีรูปร่างปีกที่แตกต่างจากชนิดอื่น ๆ อย่างชัดเจน

Table 3 Summary statistics for the canonical variate analysis (CVA) of *Liriomyza* spp. populations in this study, including eigenvalues, percentage of variance, and cumulative percentage explained by each canonical variate (CV)

Canonical variate (CV)	Eigenvalues	Variance (%)	Cumulative (%)
CV1	13.40	46.05	46.05
CV2	10.13	34.82	80.88
CV3	2.96	10.17	91.05
CV4	2.61	8.95	100.00

2.5 ค่า Mahalanobis distance และ Procrustes distance

ค่า Mahalanobis distance ของรูปร่างปีกแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.0001$) ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดความแตกต่างระหว่างกลุ่มชนิดในเชิงหลายมิติ (multivariate distance) โดย *L. chinensis* มีความแตกต่างจากชนิดอื่น ๆ มากที่สุด มีค่าสูงถึง 10.5446 เมื่อเทียบกับชนิดอื่น ขณะที่กลุ่มของ *L. brassicae L. sativae* และ *L. trifolii* มีค่าระยะห่างต่ำ แสดงถึงความใกล้เคียงกันของรูปร่างปีกในระดับที่อาจทำให้เกิดความสับสนในการจำแนกชนิดได้ (Table 4) สอดคล้องกับ Shiao (2004) ซึ่งได้ใช้วิธี minimum spanning tree เพื่อจัดกลุ่มรูปร่างของปีกแมลงวันหนอนชอนใบ และพบว่า *L. chinensis* มีรูปร่างปีกแตกต่างอย่างชัดเจนจากชนิดอื่น ได้แก่ *L. trifolii L. brassicae L. sativae L. huidobrensis* และ *L. bryoniae* ขณะเดียวกัน กลุ่มของ *L. trifolii L. brassicae* และ *L. sativae* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยมีความคล้ายคลึงกันทั้งในเชิงรูปร่างปีกและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก ลักษณะดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงข้อจำกัดของการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกในการจำแนกชนิดในกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ซึ่งอาจนำไปสู่ความผิดพลาดในการวินิจฉัยชนิด ดังที่ ยุวรินทร์และคณะ (2565) ชี้ให้เห็นว่า *L. brassicae L. sativae* และ *L. trifolii* มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันอย่างมาก การวิเคราะห์รูปร่างปีกโดยใช้วิธีมอร์โฟเมทริกส์ร่วมกับ Mahalanobis distance จึงมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความแม่นยำของการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบที่มีความคล้ายคลึงกันสูงในเชิงสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษายังพบว่า แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* มีรูปร่างปีกแตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Supartha and Susila (2018) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโมเลกุลของ *Liriomyza* ในต้นหอมในประเทศอินโดนีเซีย พบว่า *L. chinensis* มีความแตกต่างของรูปร่างปีกและแยกออกอย่างชัดเจนจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยพบว่า *L. chinensis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แยกออกอย่างชัดเจนจากแมลงวันหนอนชอนใบอีก 4 ชนิด ได้แก่ *L. brassicae L. huidobrensis L. sativae* และ *L. trifolii* ขณะที่แมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 4 ชนิดนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกัน สะท้อนถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน (Chen et al., 2018; Liang et al., 2023) ดังนั้น ขนาดเซนทรอยด์ ความแตกต่างของรูปร่างปีก และค่า Mahalanobis

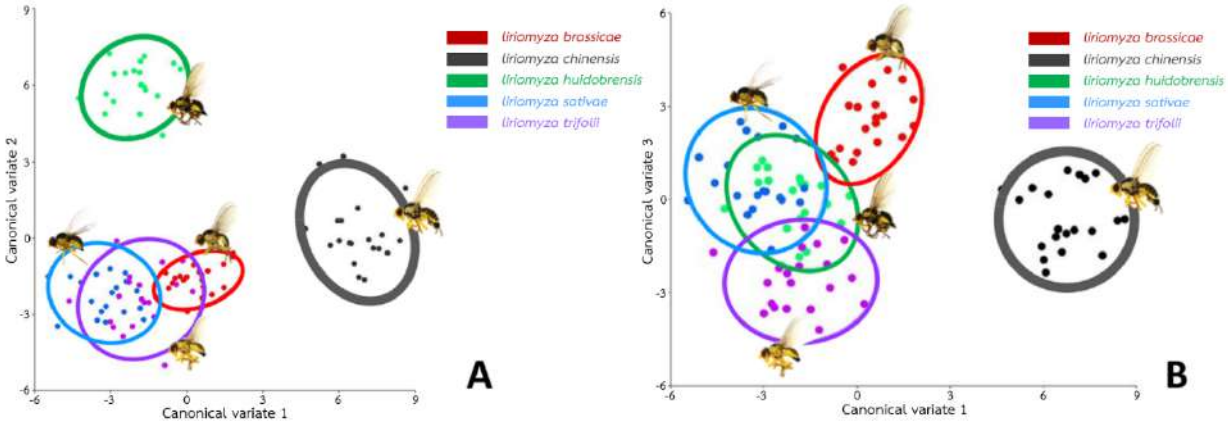


Figure 4 The first three variates from the canonical variate analysis of geometric morphometric wing shape data for leafminers. Twenty wings were analyzed per species, with 95% group confidence ellipses represented. Each colored dot indicates a wing from one of the listed species

Table 4 Pairwise Mahalanobis distances based on leafminer wing-shape analysis

Leafminer species	*L. brassicae*	*L. chinensis*	*L. huidobrensis*	*L. sativae*	*L. trifolii*
L. brassicae	-	-	-	-	-
L. chinensis	7.7638	-	-	-	-
L. huidobrensis	8.5248	**10.5446**	-	-	-
L. sativae	6.0366	10.4632	8.6375	-	-
L. trifolii	5.7039	9.4460	8.7715	5.2605	-

The diagonal shows Mahalanobis distances calculated from canonical variate analysis across all five species. Values in bold are significant after Bonferroni correction for multiple tests, with an initial P=0.05 and a corrected P<0.0001

distance สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบได้ เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏ (phenotype) ของสิ่งมีชีวิต เช่น รูปร่างของปีก เป็นลักษณะที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังรุ่นลูกหลานได้ และมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างรุ่นน้อยมาก ซึ่งแตกต่างจากลักษณะอื่น ๆ เช่น ขนาดปีก ขนาดลำตัวหรือสีสัน ที่มักมีความแปรผันสูงระหว่างรุ่นอันเนื่องมาจากปัจจัยภายนอก เช่น สภาพแวดล้อมและอาหารที่แมลงกินเข้าไป (Dujardin, 2008) ในทางกลับกัน รูปร่างของปีกไม่ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยแวดล้อม ความแตกต่างของรูปร่างปีกมีเพียงเล็กน้อย สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่แม่นยำในการจำแนกชนิดของแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Schutze et al., 2012) ทั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางอนุกรมวิธาน การตรวจสอบแมลงศัตรูพืชในกระบวนการกักกันพืช อันจะนำไปสู่การวินิจฉัยและจัดการแมลงศัตรูพืชอย่างเป็นระบบและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลอง

เทคนิคมอร์โฟเมทริกส์ของปีกสามารถใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบในสกุล *Liriomyza* ได้ โดยอาศัยข้อมูลเชิงปริมาณของขนาดเซนทรอยด์และ

รูปร่างปีก ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *L. brassicae* มีขนาดเซนทรอยด์เล็กที่สุด ในขณะที่ *L. huidobrensis* มีขนาดใหญ่ที่สุด และชนิด *L. chinensis* และ *L. huidobrensis* มีรูปร่างปีกที่แตกต่างอย่างชัดเจนจาก *L. brassicae*, *L. sativae* และ *L. trifolii* ที่มีลักษณะปีกคล้ายคลึงกัน ดังนั้น เทคนิคมอร์โฟเมทริกส์ของปีกจึงสามารถใช้แยกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ *L. huidobrensis* และ *L. chinensis* ออกจากชนิดอื่นอย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคนี้มีข้อจำกัดบางประการ เช่น ความคล้ายคลึงกันของรูปร่างปีกในบางชนิดที่อาจทำให้การจำแนกด้วยลักษณะภายนอกเกิดความคลาดเคลื่อนได้ รวมถึงการกำหนดจุดสังเกตที่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและความแม่นยำสูง

เอกสารอ้างอิง

กิตติยาภรณ์ นิ่มพร้อม ศิรประภา จันทร์สมัคร และทิพย์วรรณ สรรพสัตย์. 2565. การวัดสัณฐานแบบเรขาคณิตบนปีกหน้าของประชากรผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และผึ้งพันธุ์บัคฟาสต์ทางการค้าในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 27(2): 734-752.

ยุวรินทร์ บุญทบ ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร และสิทธิสิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2564. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และข้อมูลมอร์โฟเมทริกส์ของปีกแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร. 39(2): 118-130.

ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ และสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2565. อนุกรมวิธานแมลงวันหนอนชอนใบในวงศ์ Agromyzidae (Order: Diptera) ในพืชผัก. วารสารวิชาการเกษตร. 40(2): 126-139.

ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ และเฉลิมวุธ สมปาก. 2566. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อการจำแนกชนิดที่เชื่อถือได้ของแมลงวันหนอนชอนใบ (Diptera: Agromyzidae) ในประเทศไทย. วารสารเกษตร. 39(3): 365-376.

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, Australia.

Chen, J.Y., Y.W. Chang, S.Z. Zheng, M.X. Lu and Y.Z. Du. 2018. Comparative analysis of the *Liriomyza chinensis* mitochondrial genome with other Agromyzids reveals conserved genome features. Scientific Reports. 8(1): 8850.

Clarke, A. R. and M. K. Schutze, 2014. The complexities of knowing what it is you are trapping. pp. 611-632. In: Trapping and the Detection, Control, and Regulation of Tephritid Fruit Flies. T. Shelly, N. Epsky, E. B. Jang, J. Reyes-Flores & R. Vargas (Eds.). Springer Netherlands.

Dujardin, J.P. 2008. Morphometrics applied to medical entomology. Infection, Genetics and Evolution. 8(6): 875-890.

International Plant Protection Convention. 2016. Diagnostic protocols for regulated pests: DP 16: Genus *Liriomyza*. In: ISPM 27. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources. 11(2): 353-357.

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. Systematic Entomology. 38(1): 2-13.

Liang, Y.X., S.J. Du, Y.J. Zhong, Q.J. Wang, Q. Zhou, F.H. Wan, J.Y. Guo and W.X. Liu. 2023. Molecular phylogeny and identification of agromyzid leafminers in China, with a focus on the world wide genus *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae). Journal of Integrative Agriculture. 22(10): 3115-3134.

Ndungu, N., N.J. Vereecken, M. Gerard, S. Kariuki, L.K. Kati, A. Youbissi, S. Nassong, B. Hundt, J. Jaramillo and K. Nkoba. 2023. Can the shape of the wing help in the identification of African stingless bee species? (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Wing geometric morphometrics: A tool for African stingless bee taxonomy. International Journal of Tropical Insect Science. 43(2): 749-759.

Rattanawannee, A., O. Duangphakdee, C. Chanchao, C. Teerapakpinyo, N. Warrit, S. Wongsiri and B.P. Oldroyd. 2020. Genetic characterization of exotic commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in Thailand reveals high genetic diversity and low population substructure. Journal of Economic Entomology. 133(1): 34-42.

Rohlf, F.J. 2002. Geometric morphometrics and phylogeny. Systematics Association Special Volume. 64: 175-193.

Rohlf, F.J. 2013. tpsDig, Digitize Landmarks and Outlines. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, NY, USA.

Sauer, F.G., L. Jaworski L. Erdbeer, A. Heitmann, J. Schmidt-Chanasit, E. Kiel and R. Lühken. 2020. Geometric morphometric wing analysis represents a robust tool to identify female mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Germany. Scientific Reports. 10(1): 17613.

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(1): 103-111.

Schutze, M.K., K. Mahmood, A. Pavasovic, W. Bo, J. Newman, A.R. Clarke, M.N. Krosch 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*. Systematic Entomology. 40(2): 472-486.

Shiao, S.F. 2004. Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. Applied Entomology and Zoology. 39(1): 27-39.

Sontigun, N., K.L. Sukontason and B.K. Zajac, R. Zehner, K. Sukontason, A. Wannasan and J. Amendt. 2017. Wing morphometrics as a tool in species identification of forensically important blow flies of Thailand. Parasites & Vectors. 10(1): 229.

Supartha, I. W., and I. W. Susila. 2018. Morphological and molecular characteristics of *Liriomyza* sp. (Diptera: Agromyzidae) on onion plants (*Allium cepa* L.) in Bali. Asian Journal of Agriculture and Biology. 6(4): 524-529.

Tantowijoyo, W. and A. Hoffmann. 2011. Variation in morphological characters of two invasive leafminers, *Liriomyza huidobrensis* and *L. sativae*, across a tropical elevation gradient. Journal of Insect Science. 11: 69.

Tarris-sammaniego, S., J. Muzón and M. S. Iglesias. 2023. When size and shape matter: Morphometric characterization of two sympatric dragonflies of the genus *Perithemis* (Odonata: Libellulidae). Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 95(Suppl. 1): e20220583.

Zelditch, M.L., D.L. Swiderski and H.D. Sheets. 2012. Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. Academic Press. N.Y. 78 p