ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย

เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยา
กรกฎาคม 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย"

ของ นางสาวเกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ต้องจิตร ถันชมนาง)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพวรรณ บุญชู)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร.ณัฐนันท์ หงษ์ศรีจันทร์)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา ฮ้อเผ่าพันธ์)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ)

อนุมัติ

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

13 ก.ค. 2563

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย" ในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพวรรณ บุญชู ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณ ดร.ณัฐนันท์ หงษ์ศรีจันทร์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา อ้อเผ่าพันธ์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ให้กำลังใจ และให้การช่วยเหลือทางด้านงานวิจัยตลอดจน ตรวจและช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ต้องจิตร ถันชมนาง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ วิทย์ตะ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน ที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ต้องจิตร ถันชมนาง และดร. สงบ สนิท ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างแมลงวัน และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติคุณ หมู่พยัคฆ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจความถูกต้องเกี่ยวการจัดจำแนกชนิดของแมลงวัน ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย ครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานด้วยดีเสมอมา

นอกจากนี้ขอขอบคุณ นายอับดุลฮากัม ดูมีแด นางสาวปลื้มกมล ภูวนาถศรัณญา นางสาววรรณชา นครคำ และนางสาวชนกานต์ สืบกระแส ที่ช่วยเหลือด้านการเก็บตัวอย่างแมลงวัน และขั้นตอนอื่น ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ และความสนับสนุนตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย
ผู้วิจัย	เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพวรรณ บุญฐู
กรรมการที่ปรึกษา	ดร. ณัฐนันท์ หงษ์ศรีจันทร์
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา ฮ้อเผ่าพันธ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาปรสิตวิทยา, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2562
คำสำคัญ	ดีเอ็นเอบาร์โค้ด แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ประเทศไทย

บทคัดย่อ

แมลงวันจัดว่าเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่มีการแพร่กระจายตัวอยู่ทั่วโลก ดังนั้นจึงมีการศึกษาทางชีววิทยาของแมลงวันในด้านต่าง ๆ มาอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาการจำแนกชนิดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังมีจำกัด ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อจำแนกชนิดแมลงวันด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และความแตกต่างความผันแปรลักษณะทางพันธุกรรมของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย

การศึกษาในครั้งนี้เก็บแมลงวันทั้งหมด 3,199 ตัว จากบริเวณพื้นที่ต่าง ๆ ทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย จากการศึกษาการจำแนกชนิดด้วยการพิจารณาทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดจำแนกชนิดแมลงวันได้ 17 ชนิด ประกอบด้วย แมลงวันหัวเขียว 10 ชนิด ได้แก่ *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies*, *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes*, *Chrysomya chani*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia papuensis* แมลงวันบ้าน 5 ชนิด ได้แก่ *Atherigona orientalis*, *Hydrotaea chalcogaster*, *Hydrotaea spinigera*, *Musca domestica* และ *Synthesiomyia nudiseta* แมลงวันหลังลาย 2 ชนิด ได้แก่ *Sacrophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* และ *Sacrophaga* (*Parasarcophaga*) *dux*

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit 1 (*COI*) พบว่าแมลงวันทั้ง 17 ชนิด

มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 95.29-100% และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกันอยู่ระหว่าง 0.00-10.40% และต่างชนิดกันอยู่ระหว่าง 2.40-15.60% และได้มีการบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ตำแหน่งที่พบแมลง และรูปถ่ายแมลงวันของแมลงวันทั้ง 17 ชนิด จำนวน 77 ตัวอย่าง ลงในฐานข้อมูล Barcode of Life Data Systems (BOLD) (https://boldsystems.org) นอกจากนี้ยังพบแมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala* กระจายมากที่สุดในวงศ์ Calliphoridae พบในทุกพื้นที่ของการเก็บตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายชนิดของแมลงวัน พบว่าพื้นที่ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จังหวัดพิษณุโลก มีความหลากหลายชนิดของแมลงวันมากกว่าพื้นที่อื่นที่ศึกษาอยู่ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาทางด้านความหลากหลายชนิดของแมลงวัน และทางด้านงานนิติกีฏวิทยาในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

Title	DNA BARCODES OF MEDICALLY-IMPORTANT FLIES IN THAILAND
Author	Katsarin Tipphet
Advisor	Assistant Professor Nophawan Bunchu , Ph.D.
Co - Advisor	Nuttanan Hongsrichan, Ph.D.
	Assistant Professor Sukanya Horpaopan, Ph.D
Academic Paper	Thesis M.S. in Parasitology, Naresuan University, 2019
Keywords	DNA barcodes, Medically-important flies, Thailand

ABSTRACT

Flies have been recognized as medically-important insects worldwide. Therefore, many biological studies of flies have been continuously carried out. However, study on identification of medically-important flies in Thailand by using DNA barcode technique is still limited. The objectives of this study were to identify medically-important flies by using DNA barcode thechnique and to study their phylogenetic tree and genetic diversity.

In this study, a total of 3,199 flies were collected from study areas in 6 regions of Thailand and identified into 17 species including 10 species in Family Calliphoridae (*Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies*, *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes*, *Chrysomya chani*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Lucilia cuprina* and *Lucilia papuensis*), 5 species in Family Muscidae (*Atherigona orientalis*, *Hydrotaea chalcogaster*, *Hydrotaea spinigera*, *Musca domestica* and *Synthesiomyia nudiseta*) and 2 species in Family Sacrophagidae (*Sacrophaga* (*Boettcherisca*) *peregrine*, and *Sacrophaga* (*Parasarcophaga*) *dux*).

Based on sequences of cytochrome oxidase subunit 1 (*COI*) gene, phylogenetic tree and genetic diversity of all 17 fly species had evolutionary relationships in line with the morphological characteristics compared to the NCBI database. The similarity of nucleotide sequence was between 95.29-100%, and intraspecific and interspecific differences were

0.00-10.40%, and 2.40-15.60%, respectively. The nucleotide sequences, geographic locations where flies were collected, and photographs of all 77 samples of 17 species were already submitted into Barcode of Life Data Systems (BOLD) (https://boldsystems.org). In addition, *Chrysomya megacephala* was the most abundant fly species found in this study and Phao-Thai community forest in Phitsanulok province was found a highest diversity of species. The information of this study is useful for studying in biodiversity and applying in forensic investigation in the future.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษา	3
	ขอบเขตของงานวิจัย	3
	สมมุติฐานของการวิจัย	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	ลักษณะรูปร่างทั่วไปของแมลงวัน (Fly)	4
	การกระจายตัวของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่สำรวจพบในประเทศไทย	10
	วงจรชีวิตของแมลงวัน (Life cycle of fly)	12
	ความสำคัญทางการแพทย์	15
	หลักการและที่มาของวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcodes)	19
	การจำแนกแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด	21
3	วิธีดำเนินการวิจัย	38
	การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวัน	39
	การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์	43
	การวิเคราะห์ข้อมูล	45
	การบันทึกข้อมูลใน BOLD	53
4	**ผลการวิจัย**	58
	ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงวัน	58
	การศึกษาระบุชนิดแมลงวันด้วยเทคนิค DNA Barcoding	74

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์	82
	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala*	92
	การบันทึกตัวอย่างแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทยลงในฐานข้อมูล BOLD Systems	93
5	บทสรุป	95
	สรุปผลการวิจัย	95
	อภิปรายผล	97
บรรณานุกรม		104
ภาคผนวก		113
ประวัติผู้วิจัย		132

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตัวอย่างการกระจายตัวของแมลงวันที่มีความสำคัญทางแพทย์ที่สำรวจพบในประเทศไทย	10
2	ชนิดของแมลงวันที่มีการรายงานเกี่ยวกับทางการแพทย์ นิติกีฏวิทยา และการเกษตรกรรม ที่พบในประเทศไทย	17
3	ตัวอย่างการเปรียบเทียบบริเวณยีนที่ใช้ในการทำดีเอ็นบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์	29
4	ตัวอย่างวงศ์ของแมลงวันในประเทศไทยที่พบในฐานข้อมูล BOLD	36
5	ตัวอย่างชนิดแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทยที่พบในฐานข้อมูล BOLD	37
6	พื้นที่เก็บตัวอย่างแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ใน 6 ภูมิภาคของประเทศไทย	40
7	ตัวอย่างแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	42
8	รายละเอียดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	44
9	การเตรียม PCR reaction solution ที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ	44
10	ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR	44
11	แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	46
12	แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวิวัฒนาการ	47
13	แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya bezziana* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

14 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 47

15 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya chani* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 48

16 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya megacephala* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 48

17 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya pinguis* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 48

18 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Hemipyrellia ligurriens* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 49

19 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucilia cuprina* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 49

20 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucilia cuprina* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 49

21 แมลงวันบ้านชนิด *Atherigona orientalis* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

22 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Hydrotaea chalcogaster* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 50

23 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Hydrotaea spinigera* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ. 51

24 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Musca domestica* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 51

25 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Synthesiomyia nudiseta* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 52

26 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrine* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 52

27 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Sarcophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 53

28 การระบุชนิดตัวอย่างแมลงวันในพื้นจังหวัดของ 6 ภูมิภาคในประเทศไทย..... 64

29 แสดงผลการทำ BLAST ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ของตัวอย่างแมลงวันในพื้นจังหวัดของ 6 ภูมิภาคในประเทศไทย..... 76

30 ความแตกต่างทางพันธุกรรม Intraspecific – Interspecific ในยีน *COI* ของแมลงวันทั้ง 17 ชนิดในประเทศไทย..... 91

31 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลพิกัดลงในตารางข้อมูลจากฐานข้อมูล BOLD Systems..... 93

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 ลักษณะรูปร่างทั่วไปของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ 5
2 การจำแนกวงศ์ (Family) ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ 6
3 รูปร่างลักษณะทั่วไปของแมลงวันบ้าน 7
4 รูปร่างลักษณะทั่วไปของแมลงวันหัวเขียว 8
5 รูปร่างลักษณะทั่วไปของแมลงวันหลังลาย 9
6 วงจรชีวิตทั่วไปของแมลงวัน (Life cycle of fly) 13
7 ตัวอย่างลักษณะรูหายใจส่วนหลัง (posterior spiracle) ของตัวอ่อนทั้ง 3 วงศ์ 14
8 ขั้นตอนการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด 21
9 Phylogenetic tree ของแมลงวันหัวเขียว Calliphoridae โดยใช้ยีน *COI* 24
10 Phylogenetic tree ของแมลงวันหัวเขียว Calliphoridae โดยใช้ยีน *COII* 25
11 Phylogenetic tree ของแมลงวันหลังลาย Sarcophagidae โดยใช้ยีน *COI-COII* ด้วยวิธี Maximum likelihood 26
12 Phylogenetic tree ของแมลงวันหลังลาย Sarcophagidae โดยใช้ยีน *COI-COII* ด้วยวิธี Bayesian inference 27
13 Phylogenetic tree ของแมลงวันหลังลายสกุล *Oxysarcodexia* โดยใช้ยีน *COI* ด้วยวิธี Neighbor-Joining 28
14 แผนปฏิบัติงานวิจัย 38
15 แผนที่พื้นเก็บตัวอย่างแมลงวันทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย 41
16 วิธีการเก็บตัวอย่างแมลงวันที่ใช้เครื่องในหมูเน่าเป็นเหยื่อล่อ : (ก) เก็บตัวอย่างแมลงวันด้วยการใช้กับดัก และ (ข) เก็บตัวอย่างแมลงวันด้วยการใช้สวิงโฉบ 42
17 ตัวอย่างการลงทะเบียนในฐานข้อมูล Barcode of Life Data Systems (BOLD) ... 53
18 ตัวอย่างการสร้างโครงการศึกษาสำหรับงานวิจัยในฐานข้อมูล BOLD 54
19 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลวิจัยลงในโครงการการศึกษาที่อยู่ในฐานข้อมูล BOLD 55
20 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลตัวอย่างวิจัยลงในแบบฟอร์ม Template Version 3.0.xls. 55
21 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลรูปภาพลงในแบบฟอร์ม Image Version 3.0.xls..... 56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

22 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลลงโปรแกรม cmd..... 56
23 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence)..... 57
24 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya (Achoetandrus) rufifacies*.... 69
25 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya (Achoetandrus) villeneuvi*.... 69
26 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya bezziana*..... 69
27 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya (Ceylonomyia) nigripes*..... 70
28 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya chani*..... 70
29 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala*..... 70
30 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya pinguis*..... 71
31 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Hemipyrellia. ligurriens*..... 71
32 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Lucilia cuprina*..... 71
33 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Lucilia papuensis*..... 72
34 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Atherigona orientalis*..... 72
35 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Musca domestica*..... 72
36 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Hydrotaea chalcogaster*..... 73
37 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Hydrotaea spinigera*..... 73
38 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Synthesiomyia nudiseta*..... 73
39 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Sacophaga (Boettcherisca) peregrina*.... 74
40 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Sacophaga (Parasarcophaga) dux*..... 74
41 Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Calliphoridae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)..... 86
42 Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Calliphoridae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)..... 87

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
43	Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Calliphoridae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง).....	88
44	Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Muscidae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง).....	89
45	Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Sacrophagidae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง).....	90
46	วิเคราะห์ Haplotype network ของแมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala*.....	92
47	ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงในฐาน BOLD Systems คือ (ก) ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์และรูปภาพของตัวอย่างแมลงวัน (ข) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแมลงวัน.....	94

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

แมลงวันจัดเป็นสัตว์ขาข้อ ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม Arthropoda มีการแพร่กระจายตัวอยู่ทั่วโลก มีความสัมพันธ์อยู่ใกล้ชิดกับคน สัตว์ และสิ่งปฏิกูล โดยประเทศไทยได้มีการสำรวจพบแมลงวันอยู่หลากหลายชนิด ซึ่งแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์นั้น ประกอบด้วย 3 วงศ์หลัก คือ วงศ์ Muscidae หรือกลุ่มแมลงวันบ้าน มีการสำรวจพบถึง 136 ชนิด (Tumrasvin, & Shinonaga, 1977) วงศ์ Calliphoridae หรือกลุ่มแมลงวันหัวเขียว มีการสำรวจพบถึง 96 ชนิด (Bunchu et al., 2014) และวงศ์ Sarcophagidae หรือกลุ่มแมลงวันหลังลายมีการสำรวจพบถึง 83 ชนิด (Kurahshi, & Chaiwong, 2013) ซึ่งแมลงวันเหล่านี้มีบทบาทความสำคัญทั้งในด้านทางการแพทย์ และด้านนิติกีฏวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านทางการแพทย์แมลงวันถือว่ามีความสำคัญอย่างมากเป็นสาเหตุของโรคหนอนแมลงวัน (Myiasis) เป็นพาหะเชิงกลของเชื้อก่อโรคหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว หนอนพยาธิ และเป็นตัวก่อความรำคาญให้แก่คนและสัตว์ นอกจากนี้ แมลงวันยังมีประโยชน์ในหลายด้าน เช่น การนำตัวอ่อนของแมลงวันมาช่วยในการรักษาบาดแผลเรื้อรังของผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน หรือผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงในงานทางด้านนิติกีฏวิทยาที่ได้มีการศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาของแมลงวัน เพื่อใช้ในการสืบสวน และคลี่คลายคดีอาชญากรรมในการประมวลผลช่วงระยะเวลาหลังการเสียชีวิตของศพที่สำรวจพบ ซึ่งการป้องกันโทษ การใช้ประโยชน์ที่จากแมลงวันนั้นจำเป็นต้องมีการระบุชนิดของแมลงวันที่ถูกต้อง เพื่อที่จะได้มีการเฝ้าระวัง ป้องกันการระบาดของแมลงพาหะ และการควบคุมจำนวนประชากรของแมลงวัน รวมไปถึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้ ในการระบุชนิดแมลงวันนั้นสามารถจำแนกได้ตามหลักอนุกรมวิธาน โดยในกรณีพิจารณาจากทางด้านสัณฐานวิทยาเป็นหลัก ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อยที่สุดและไม่เกิดความเสียหายแก่ตัวอย่างแมลง แต่จำเป็นจะต้องอาศัยนักอนุกรมวิธานที่มีความรู้ความชำนาญ และเชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานในการระบุชนิดของแมลงวันในแต่ละชนิด ซึ่งในปัจจุบันผู้ที่มีความรู้ ความชำนาญ และเชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานจำนวนน้อย นอกจากนี้การจำแนกชนิดของแมลงวันโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถแยกความแตกต่างของแมลงวันบางชนิดออกได้อย่างชัดเจน อาทิ กลุ่มแมลงวันที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบซับซ้อน (complex species) ซึ่งเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากจนไม่

สามารถใช้วิธีการระบุชนิดทางสัณฐานวิทยาได้ (Ekrem et al., 2007) ปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านอณูชีววิทยา หรือชีววิทยาระดับโมเลกุลได้มีการพัฒนาและมีการยอมรับที่สามารถช่วยในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้หลากหลายวิธี เช่น isozyme analysis, DNA probes และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว รวมถึงวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcodes) ถือว่าเป็นอีกวิธีหนึ่งทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่นิยมนำมาประยุกต์ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด อาทิ สัตว์ขาข้อหรือพืช โดยวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นเป็นวิธีการที่ใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้นมาระบุชนิด เพื่อแยกความแตกต่างของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ลักษณะทางสัณฐานแบบซับซ้อนได้ โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตนั้นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่มีการศึกษามาก่อน และยังสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ แต่อย่างไรก็ตามความถูกต้องแม่นยำของการจำแนกชนิดด้วยวิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ดขึ้นอยู่กับจำนวนและความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลด้วย

ในปี ค.ศ. 2004 นักวิจัยจึงได้ทำการสร้างฐานข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต และมีข้อมูลเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงอยู่เป็นจำนวนมาก คือ ฐานข้อมูลที่มีชื่อว่า Barcode of Life Data Systems (BOLD) (https://boldsystems.org) แต่อย่างไรก็ตามฐานข้อมูลดังกล่าวยังมีข้อมูล DNA barcode ของแมลงวันจำนวนน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยคิดเป็นแมลงวันหัวเขียว 1.94% แมลงวันบ้าน 1.19% และแมลงวันหลังลาย 3.52% ซึ่งปัจจุบันการระบุชนิดของแมลงวันด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มีการศึกษาในประเทศไทยพบไม่มากนัก มีเพียงการศึกษาของ Barbara et al. (2016) ที่สามารถระบุชนิดแมลงวันได้ 13 ชนิด โดยแบ่งเป็นกลุ่มแมลงวัน Calliphoridae 9 ชนิด และกลุ่มแมลงวัน Sarcophagidae 4 ชนิด ต่อมาในปี ค.ศ. 2018 Sontigun et al. สามารถระบุชนิดแมลงวัน Calliphoridae 16 ชนิด และการศึกษาของ Samerjai et al. (2020) ที่สามารถระบุชนิดแมลงวัน Sarcophagidae 14 ชนิด โดยการศึกษาข้างต้นได้ศึกษาเพียงเฉพาะภายในพื้นที่ภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งยังไม่ได้มีการศึกษาครอบคลุมทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย และไม่ได้บันทึกข้อมูลไว้ที่ฐานข้อมูล BOLD

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเข้ามาช่วยในการศึกษาการระบุชนิดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย จำเป็นต้องเริ่มต้นในการจำแนกชนิดด้วยสัณฐานวิทยาให้ถูกต้อง และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในลักษณะดีเอ็นเอบาร์โค้ด บันทึกในฐานข้อมูล BOLD เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงวัน รวมถึงการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันที่มีความสำคัญ

ทางการแพทย์ในประเทศไทยต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและสำรวจความหลากหลายชนิดของแมลงวันในเขตพื้นที่อื่นได้อีกด้วย

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อจำแนกชนิดแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2. เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย

ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ทำการสำรวจแมลงวัน 17 ชนิด โดยแบ่งเป็นแมลงวันหัวเขียว 10 ชนิด ได้แก่ *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies*, *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes*, *Chrysomya chani*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia papuensis* แมลงวันบ้าน 5 ชนิด ได้แก่ *Atherigona orientalis*, *Hydrotaea chalcogaster*, *Hydrotaea spinigera*, *Musca domestica*, และ *Synthesiomyia nudiseta* แมลงวันหลังลาย 2 ชนิด ได้แก่ *Sacrophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* และ *Sacrophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* ในพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างด้วยกับดัก และสวิงโฉบที่ใช้เครื่องในหมูที่หมักจนเน่าเป็นเหยื่อล่อแมลงวัน นำตัวอย่างแมลงวันที่สำรวจพบมาจัดจำแนกชนิดโดยใช้ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาที่อาศัยกุญแจอนุกรมวิธาน และวิธีการดีเอ็นบาร์โค้ด และบันทึกข้อมูลลงฐานข้อมูล BOLD จากนั้นศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกันของแมลงวันที่ทำการศึกษา

สมมุติฐานของการวิจัย

1. สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดจำแนกชนิดของแมลงวันได้

2. ทราบถึงวิวัฒนาการ และความแตกต่างความผันแปรลักษณะทางพันธุกรรมของแมลงวันที่นำมาศึกษา

บทที่ 2

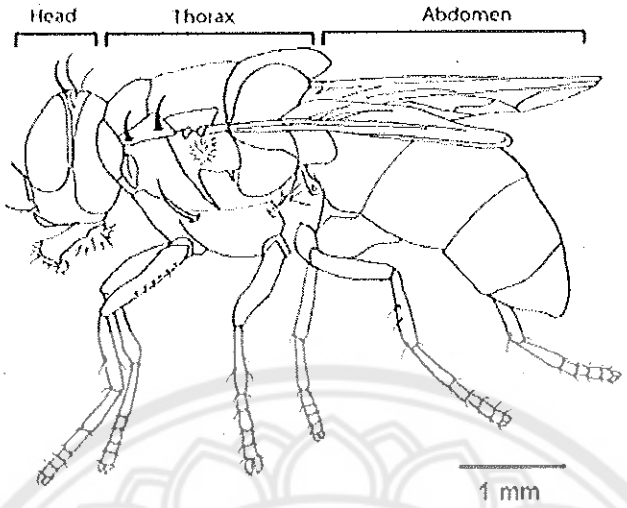
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะรูปร่างทั่วไปของแมลงวัน (Fly)

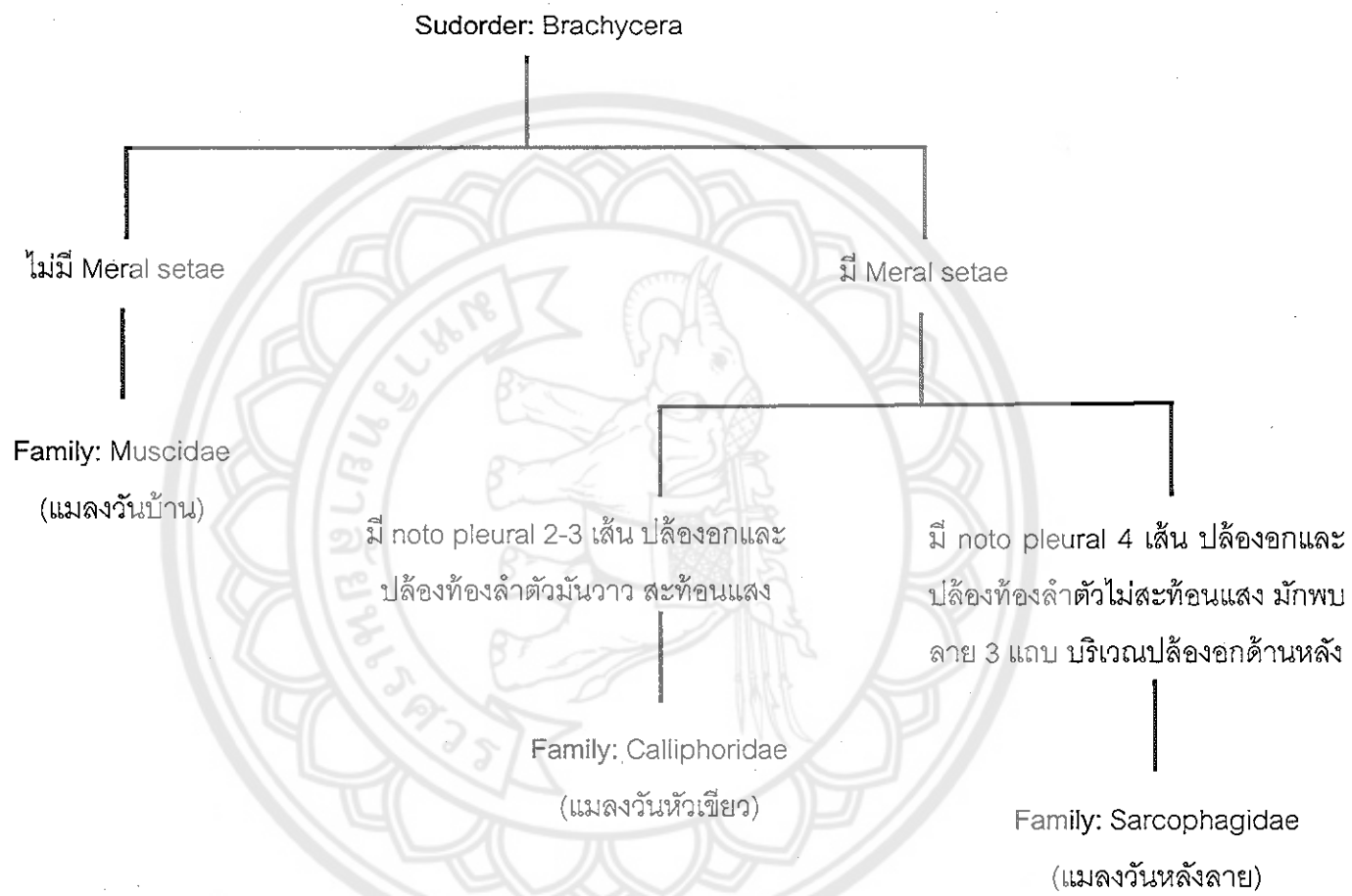
แมลงวันเป็นแมลงขนาดเล็กจัดอยู่ในไฟลัม (Phylum) Arthropoda ชั้น (Class) Insecta อันดับ (Order) Diptera อับดับย่อย (Suborder) Brachycera ซึ่งในอันดับย่อยนี้ สามารถจำแนกแมลงวันออกเป็น 3 วงศ์ (Family) คือ Muscidae (แมลงวันบ้าน) Calliphoridae (แมลงวันหัวเขียว) และ Sarcophagidae (แมลงหลังลาย) (คม สุคนธสรรพ์, และกาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548) ตามหลักอนุกรมวิธาน ได้ดังนี้

Kingdom: Animalia
Phylum: Arthropoda
Class: Insecta
Order: Diptera
Sudorder: Brachycera
Family: Muscidae
Calliphoridae
Sarcophagidae

โดยแมลงวันทั่วไปจะมีลักษณะที่แตกต่างจากสัตว์ขาข้อชนิดอื่น โดยแบ่งลักษณะรูปร่างเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (Head) ส่วนอก (Thorax) และส่วนท้อง (Abdomen) ที่สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจน โดยส่วนหัวจะประกอบด้วยตารวม 1 คู่ มีหนวด 1 คู่ มีปากแบบแทงดูด ส่วนอกจะแบ่งเป็นปล้องที่ประกอบด้วยกัน 3 ปล้อง แต่ละปล้องมีขา 1 คู่ มีปีก 1-2 คู่ และปีกบางใส รวมถึงส่วนท้องที่แบ่งออกเป็นปล้อง ไม่เกิน 11 ปล้อง (ต้องจิตร ถันชมนาง และคณะ, 2559) (ภาพ 1) และแมลงวันแต่ละวงศ์จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถจำแนกได้ตามรายละเอียดดัง ภาพ 2



ภาพ 1 ลักษณะรูปร่างทั่วไปของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์



ภาพ 2 การจำแนกวงศ์ (Family) ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์

1. แมลงวันบ้าน (Hose fly) จัดอยู่ในวงศ์ Muscidae ที่มีการกระจายตัวในประเทศไทย และสามารถจำแนกชนิดได้ทั้งหมด 136 ชนิด (Tumrasvin, & Shinonaga, 1977) ซึ่งแมลงวันกลุ่มนี้มีลักษณะทั่วไป คือ มีขนาดปานกลาง ส่วนอกมีสีเทาถึง เทาเข้ม พบแถบบนอกด้านหลังพาดตามยาว 4 แถบ แต่ละแถบมีความกว้างเท่ากัน ท้องเป็นส่วนท้ายสุดที่ถัดจากส่วนอกมีสีน้ำตาล-เทาดำ ทำให้มองเห็นได้เด่นชัด ตามีลักษณะเป็นตาประกอบขนาดใหญ่จำนวน 1 คู่ หนวดของแมลงวันบ้านมี 3 ปล้อง ปากของแมลงวันบ้านเรียกว่า proboscis มีลักษณะเป็นแบบดูดซับ มี maxillary pulp 1 คู่ อยู่ข้างปากทางด้านซ้ายและขวาข้างละ 1 อัน มีปีกที่เห็นชัด 1 คู่ คือ ปีกคู่หน้าที่มีลักษณะบางใส มีขาทั้งหมด 3 คู่ แต่ละปล้องปกคลุมด้วยขนแข็ง (คม สุคนธสรรพ์, และ กาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548) ลักษณะสำคัญที่สามารถแยกแมลงในกลุ่มอื่น ๆ คือ ส่วนอกของแมลงวันบ้าน ไม่มี Meral setae ปรากฏอยู่ ดังภาพ 3 แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในกลุ่มนี้ อาทิ *Hydrotaea spinigera* (Stein, 1910), *Musca ventrosa* (Wiedemann, 1830), *Atherigona orientalis* (Schiner, 1868) , *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) และ *Synthesiomyia nudiseta* (Van Der Wulp, 1883)

ภาพ 3 รูปร่างลักษณะทั่วไปของแมลงวันบ้าน

นิเวศวิทยาของแมลงวันบ้าน

พฤติกรรมการกินอาหาร (Feeding behavior) สามารถกินอาหารมนุษย์ได้ทุกชนิด ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเพศเมียจะต้องการอาหารประเภทจำพวกโปรตีนที่ช่วยใช้การพัฒนาของไข่ เข้าหาอาหารโดยการบินสุ่ม และสิ่งที่ช่วยกระตุ้น คือ การมองเห็น และการได้รับกลิ่น การรับรู้อาหารจะใช้ส่วนปากและส่วนขา จะดูดกินอาหารที่เป็นของเหลว แต่ถ้าเป็น

อาหารแข็งมันจะปล่อยน้ำลายออกมาทำให้อาหารเปียกเพื่อให้อาหารอ่อนตัวก่อนที่จะดูดกิน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2556)

แหล่งเกาะพัก (Resting places) การเกาะพักในตอนกลางวันจะเกาะพักอยู่ใกล้บริเวณแหล่งอาหาร เช่น บริเวณแหล่งกำจัดขยะมูลฝอยที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ส่วนการเกาะพักในตอนกลางคืนจะเกาะพักอยู่ใกล้บริเวณเพดาน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2556)

2. **แมลงวันหัวเขียว** (Blow Fly) จัดอยู่ในวงศ์ Calliphoridae มีการกระจายตัวในประเทศไทยและสามารถจำแนกชนิดได้ทั้งหมด 96 ชนิด (Bunchu et al., 2014) มีลักษณะเด่นทั่วไป คือ สีของลำตัวมีสีเขียวออกน้ำเงินมันวาว บริเวณส่วนอกมีเส้นขนแข็งยาวประปรายตามส่วนอก ด้าน dorsal ของอกมีริ้วสีดำพาดตามยาว ประมาณ 3 เส้น บน squama มีขนเล็ก สั้นขึ้นปกคลุม และส่วนหัวตามีสีแดงเข้ม ปากเป็นแบบซับดูดเช่นเดียวกับแมลงวันบ้าน มี maxillary palp รูปร่างยาว 1 คู่ มีปีก 1 คู่ลักษณะบางใส และมีขา 3 คู่ มี Meral setae และ noto pleural sate ประมาณ 2-3 เส้น ที่จะปรากฏอยู่บริเวณส่วนอกใต้ปีก (คม สุคนธสรรพ์, และกาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548) ดังภาพ 4 และแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในกลุ่มนี้ อาทิ *Achoetandrus rufifacies* (Macquart, 1843), *Achoetandrus villeneuvi* (Patton, 1922), *Ceylonomyia nigripes* (Aubertin, 1923), *Chrysomya chani* (Kurahashi, 1979), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *Hemipyrellia ligurriens* (Wiedemann, 1830) และ *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830)

ภาพ 4 รูปร่างลักษณะทั่วไปของแมลงวันหัวเขียว

นิเวศวิทยาของแมลงวันหัวเขียว

พฤติกรรมการกินอาหาร (Feeding behavior) แมลงวันหัวเขียวมีพฤติกรรมในการดูดกินอาหารเหลวรวมทั้งอาหารจากแหล่งเพาะพันธุ์ ซึ่งดูดกินของที่เป็นของเหลวที่เกิดจากการหมัก น้ำหวานจากเกสรดอกไม้ และโปรตีน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2556)

แหล่งเกาะพัก (Resting places) การเกาะพักในช่วงเวลากลางวันจะเกาะพักนอกบ้านตามต้นพืชใกล้โรงฆ่าสัตว์ ส่วนช่วงเวลากลางคืนจะอยู่บริเวณใกล้เคียงกับแหล่งที่หากินในเวลากลางวัน คือ เกาะพักตามต้นไม้ และใบหญ้า (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2556)

3. **แมลงวันหลังลาย** (Flesh fly) จัดอยู่ในวงศ์ Sarcophagidae มีการกระจายตัวในประเทศไทยและสามารถจำแนกชนิดได้ทั้งหมด 83 ชนิด (Kurahshi, & Chaiwong, 2013) มีลักษณะเด่นทั่วไป คือ ลำตัวมีสีเทาเข้มจนถึงดำ ส่วนอกพบแถบทึบสีเทาตามยาว 3 แถบ ทางด้านบนของส่วนท้องพบมีจุดเข้มหรือมีลายคล้ายตารางหมากรุก มี Meral setae มี noto pleural sate 4 เส้น ที่จะปรากฏอยู่บริเวณส่วนอกใต้ปีก ดังภาพ 5 แมลงวันหลังลายตัวเมียบางสภาวะจะไม่ออกลูกเป็นไข่ แต่จะออกลูกเป็นตัวอ่อน ซึ่งอาจวางตัวอ่อนในเนื้อสัตว์ที่กำลังเน่า หรือวางตัวอ่อนในสิ่งเน่าเปื่อยผุพัง (ต้องจิตร ถันชมนาง และคณะ, 2559) แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในกลุ่มนี้ อาทิ *Parasarcophaga dux* (Thomson, 1869), *Liopygia ruficornis* (Fabricius, 1794) และ *Boettcherisca peregrina* (Robineau-Desvoidy)

ภาพ 5 รูปร่างลักษณะทั่วไปของแมลงวันหลังลาย

นิเวศวิทยาของแมลงวันหลังลาย

พฤติกรรมการกินอาหาร (Feeding behavior) แมลงวันหลังลายแต่ละชนิดจะกินอาหารแตกต่างกันไป บางชนิดชอบกินอาหารตามมูลสัตว์ และซากสัตว์เน่าเปื่อย บางชนิดชอบกินเนื้อสัตว์ บางชนิดชอบอาหารที่มีรสหวาน และบางชนิดชอบอาหารทะเล หรือผลไม้ตากแห้ง สำหรับแมลงวันหลังลาย *P. ruficornis* พบว่าหากินตามมูลคนและมูลสัตว์ ซากสัตว์ รวมทั้งอาหารตากแห้ง และชอบดูดกินน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2556)

การกระจายตัวของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่สำรวจพบในประเทศไทย

จากการศึกษาการกระจายตัวของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์พบว่ามีการศึกษาเพียงบางจังหวัดของประเทศไทย โดยได้รวบรวมการกระจายของแมลงวันทั้งหมด 3 วงศ์ ได้แก่ แมลงวันบ้าน (Moophayak et al., 2011) แมลงวันหัวเขียว (Bunchu, 2012) และแมลงวันหลังลาย (Kurahashi, & Chaiwong, 2013) ดังตาราง 1

ตาราง 1 ตัวอย่างการกระจายตัวของแมลงวันที่มีความสำคัญทางแพทย์ที่สำรวจพบในประเทศไทย

วงศ์	ชนิด	จังหวัด
	Achoetandrus rufifacies (Macquart, 1843)	กาญจนบุรี กรุงเทพฯ ขอนแก่น เชียงใหม่ จันทบุรี ชลบุรี ตาก นครราชสีมา นครปฐม นครสวรรค์ นนทบุรี ปทุมธานี ปราจีนบุรี แพร่ พิษณุโลก ระยอง ลำปาง สมุทรปราการ สุพรรณบุรี ศรีสะเกษ อยุธยา อุบลราชธานี อุดรธานี อุตรดิตถ์
Calliphoridae		
	Achoetandrus villeneuvi (Patton, 1922)	กาญจนบุรี เชียงใหม่ นครราชสีมา พิษณุโลก
	Ceylonomyia nigripes (Aubertin, 1923)	กาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก นครราชสีมา พิษณุโลก

ตาราง 1 (ต่อ)

วงศ์	ชนิด	จังหวัด
	Chrysomya bezziana (Villeneuve, 1914)	เชียงใหม่ นครศรีธรรมราช ยะลา
	Chrysomya chani (Kurahashi, 1979)	กาญจนบุรี เชียงใหม่ นครราชสีมา ลำปาง พิษณุโลก สระแก้ว
	Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794)	กาญจนบุรี กรุงเทพฯ ขอนแก่น จันทบุรี ชลบุรี เชียงใหม่ ตาก นครราชสีมา นครปฐม นครสวรรค์ นนทบุรี ปทุมธานี ปราจีนบุรี แพร่ พิษณุโลก ระยอง ลำปาง สมุทรปราการ สระแก้ว สุพรรณบุรี ศรีสะเกษ อยุธยา อุบลราชธานี อุดรธานี อุตรดิตถ์
Calliphoridae	*Chrysomya pinguis* (Walker, 1858)	กาญจนบุรี เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก
	Hemipyrellia ligurriens (Wiedemann, 1830)	เชียงใหม่ ตาก พิษณุโลก ลำปาง นราธิวาส
	Lucilia cuprina (Wiedemann, 1830)	กรุงเทพฯ เชียงใหม่ ตาก พิษณุโลก

ตาราง 1 (ต่อ)

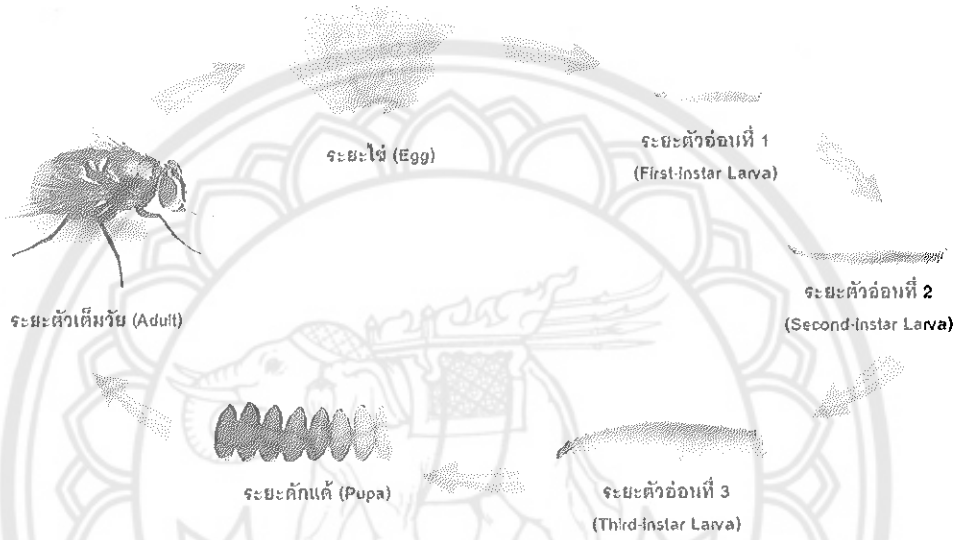
วงศ์	ชนิด	จังหวัด
Calliphoridae	*Lucilia papuensis (Macquart, 1843)*	กาญจนบุรี เชียงใหม่ นราธิวาส ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก เลย สระแก้ว สระบุรี
Muscidae	*Atherigona orientalis* (Schiner, 1868)	กาญจนบุรี กรุงเทพฯ ชลบุรี เชียงใหม่ นครราชสีมา
	Hydrotaea chalcogaster (Wiedemann, 1824)	เชียงใหม่
	Hydrotaea spinigera (Stein, 1910)	เชียงใหม่
	Musca domestica (Linnaeus, 1758)	กาญจนบุรี กรุงเทพฯ ชลบุรี เชียงใหม่ นครราชสีมา
	Synthesiomyia nudiseta (Van Der Wulp, 1883)	กรุงเทพฯ เชียงใหม่ พิษณุโลก
Sarcophagidae	*Boettcherisca peregrina* (Rohdendorf, 1937)	กรุงเทพฯ เชียงใหม่ พิษณุโลก อุบลราชธานี
	Parasarcophaga dux (Thomson, 1869)	กรุงเทพฯ เชียงใหม่ พิษณุโลก อุบลราชธานี

ที่มา: Moophayak et al., (2011); Bunchu, (2012); Kurahashi, & Chaiwong, (2013)

วงจรชีวิตของแมลงวัน (Life cycle of fly)

แมลงวันมีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) ที่ประกอบด้วยระยะการเจริญเติบโตทั้งหมด 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult) แต่ละระยะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากระยะหนึ่งสู่อีกระยะหนึ่งที่เกิดการ

ลอกคราบ (molting) เพื่อเป็นการเพิ่มขนาดของตัวอ่อนแมลงวันให้มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยการเจริญเติบโตของแมลงวันแต่ละระยะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน อาทิ ชนิดของแมลงวัน อุณหภูมิ ความชื้น และแหล่งอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านอุณหภูมิที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของแมลงวันในทุกระยะ และระยะต่าง ๆ ของแมลงวันในทางชีววิทยามีความแตกต่างกันออกไป (ภาพ 6) (คม สุคนธสรรพ์, และกาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

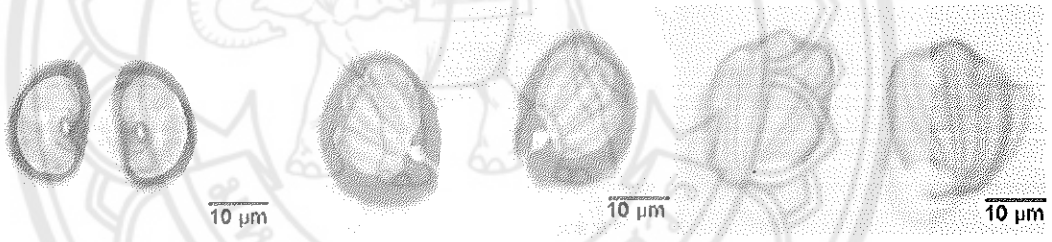


ภาพ 6 วงจรชีวิตทั่วไปของแมลงวัน (Life cycle of fly)

1. ระยะไข่ (Egg) มีลักษณะทั่วไป คือ รูปร่างยาวรี สีขาวครีม บริเวณหัวของไข่มีรูไมโครไพล์ (Micropyle) ที่มีลักษณะเป็นรูกลมขนาดเล็ก ทำหน้าที่เป็นทางเข้าของอสุจิ ด้านข้างตามความยาวของไข่จะพบร่องที่เรียกว่า plastron โดยแมลงวันบางชนิดสามารถวางไข่ได้หลายครั้ง ซึ่งวางไข่เป็นกลุ่ม กลุ่มละประมาณ 120-300 ฟอง แต่บางชนิดออกลูกเป็นตัว เนื่องจากระยะตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่มีความรวดเร็ว ได้แก่ แมลงวันหลังลาย ในการวางไข่ของแมลงวันมักจะวางในที่แสงแดดส่องไม่ถึง และมีความชื้นสูง ไข่ของแมลงวันมีระยะฟักตัวภายใน 6-12 ชั่วโมง (คม สุคนธสรรพ์, และกาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548)

2. ระยะตัวอ่อน (Larva) มีลักษณะทั่วไป คือ ลำตัวอ่อนนิ่ม สีขาว เหลือง หรือสีครีม มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก ส่วนหัวมีลักษณะเรียวกว่าส่วนท้าย และแตกต่างกันที่ขนาดใหญ่ขึ้นตามระยะตัวอ่อน ซึ่งตัวอ่อนแมลงวันสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 โดยตัวอ่อนในช่วงระยะที่ 1-2 เป็นระยะที่ต้องการกินอาหารมากกว่าตัวอ่อนในระยะที่ 3 เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองในช่วงเข้าสู่ระยะดักแด้ ในส่วนระบบหายใจของตัว

อ่อนแมลงวันเป็นแบบ amphipneustic คือ มีรูหายใจ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ที่อกปล้องแรก 1 คู่ เรียกว่า รูหายใจส่วนหน้า (anterior spiracle) และปลายปล้องสุดท้ายของลำตัว 1 คู่ เรียกว่า รูหายใจส่วนหลัง (posterior spiracle) ซึ่งแต่ละวงศ์จะมีรูปแบบของรูหายใจส่วนหลังที่แตกต่างกัน คือ รูหายใจของระยะตัวอ่อนแมลงวันบ้าน มีรูปร่างคล้ายตัวอักษร "D" มี slit จำนวน 3 อัน ลักษณะคดเคี้ยว และมีส่วนที่เรียกว่า button รูปร่างกลม อยู่เกือบตรงกลางระหว่าง slit (ภาพ 7ก) รูหายใจของระยะตัวอ่อนแมลงวันหัวเขียว มีรูปร่างคล้ายฟักข้าวโพด มี slit จำนวน 3 อัน ที่แยกออกจากกัน มี button อยู่ตรงกลางระหว่าง slit ที่ล้อมรอบด้วยวง peritreme สีเข้มชัด (ภาพ 7ข) และรูหายใจของระยะตัวอ่อนแมลงวันหลังลาย มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ มี slit จำนวน 3 อัน ที่แยกออกจากกัน มี button อยู่ตรงกลางระหว่าง slit ที่ล้อมรอบด้วยวง peritreme (ภาพ 7ค) นอกจากนี้ตัวอ่อนของแมลงวันมีการดำรงชีวิตในการกินซากพืช หรือซากสัตว์ที่เกิดการเน่าสลาย และชอบกินอยู่ในแหล่งอาหารที่มีความชื้น นอกจากนี้ช่วงท้ายของตัวอ่อนระยะที่ 3 นั้น จะมีการหยุดกินอาหาร และมีการเคลื่อนตัวไปอยู่ในบริเวณพื้นที่แห้ง เพื่อเตรียมเข้าสู่ระยะดักแด้ต่อไป



(ก) (ข) (ค)

ภาพ 7 ตัวอย่างลักษณะรูหายใจส่วนหลัง (posterior spiracle) **ของตัวอ่อนทั้ง 3 วงศ์ :** (ก) รูหายใจส่วนหลังแมลงวันบ้านชนิด *Musca domestica* (ข) รูหายใจส่วนหลังแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* และ (ค) รูหายใจส่วนหลังแมลงวันหลังลายชนิด *Boettcherisca peregrina*

ที่มา: ถ่ายภาพโดย นางสาวปลื้มกมล ภูวนาถศรัญญา วันที่ 11 พฤศจิกายน 2559

3. **ระยะดักแด้** (Pupa) มีลักษณะทั่วไปที่คล้ายกับถังเบียร์ มีปลอกหุ้ม (coarctate) ที่ถูกพัฒนามาจากผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่หดตัวลง โดยช่วงแรกจะเป็นสีขาวหรือสีเหลือง ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ เมื่อระยะดักแด้ที่มีอายุเพิ่มมากขึ้น ช่วงแมลงวันที่เข้าสู่ในระยะนี้มี

อายุนานประมาณ 3-7 วัน โดยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น จึงจะกลายเป็นตัวเต็มวัย

4. **ระยะตัวเต็มวัย** (Adult) เป็นระยะที่มีลักษณะสมบูรณ์ โดยช่วงแรกหลังออกจากดักแด้ใหม่ ๆ จะยังบินไม่ได้ จนกว่าโครงสร้างของลำตัว และปีกจะมีความแข็งแรง เพื่อที่จะสามารถบินได้ ซึ่งสามารถบินได้ไกลถึง 20-30 กิโลเมตร โดยในระยะตัวเต็มวัยมีการชอบหากินอาหารในช่วงเวลากลางวัน ซึ่งอาหารที่กินมีหลากหลายชนิด อาทิ อาหารเน่าเสีย เนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ หรือแม้กระทั่งอาหารที่ปรุงสุก และอาหารเหลวตามแหล่งสกปรกต่าง ๆ ที่สามารถวางไข่ และเป็นแหล่งอาหารของระยะตัวอ่อนต่อไป

ความสำคัญทางการแพทย์

ปัจจุบันแมลงวันได้มีบทบาทที่สำคัญทางการแพทย์ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดปัญหาของการเกิดโรค โดยเป็นพาหะเชิงกลที่นำเชื้อก่อโรคหลายชนิดที่เป็นโรคติดต่อสู่คนและสัตว์ อาทิ แบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว หนอนพยาธิ และยังเป็นสาเหตุของโรคหนอนแมลงวัน (Myiasis) รวมไปถึงเป็นตัวก่อความรำคาญให้แก่คนและสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามแมลงวันก็ยังถือว่าสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ในงานหลายหลายด้าน อาทิ ด้านงานนิติกีฏวิทยา ด้านทางการแพทย์ และด้านเกษตรกรรม (ตาราง 2) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ด้านโทษ

1. **เป็นพาหะเชิงกลที่นำเชื้อโรค** โดยแมลงวันเป็นพาหะนำเชื้อโรคต่าง ๆ มากมาย ที่เป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากแมลงวันมีแหล่งที่อยู่อาศัยตามชุมชน บ้านเรือน โดยมีพฤติกรรมการกินอาหารจากแหล่งที่สกปรกต่าง ๆ จนสามารถทำให้เชื้อโรคติดมากับลำตัว เมื่อแมลงวันบินมาตอมอาหารของคน จึงเกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรคในอาหารเกิดขึ้น ซึ่งการนำเชื้อโรคของแมลงวันมาสู่คนนั้นถือว่าเป็นการนำเชื้อเชิงกล โดยเชื้อส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย เช่น Non-fermentative gram negative bacilli, Coagulase-negative staphylococci, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneunoniae* เชื้อไวรัส เช่น Enteroviruses (Poliovirus type 2), porchine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ที่มีแมลงวันบ้านเป็นพาหะ (Schurrent et al., 2004) ปรสิต เช่น โปรโตซัว: *Entamoeba histolytica*, *Chilomestix mesnili*, *Giardia lamblia*, *Endolimax mana*, *Entamoeba coli*, *Lodamoeba butschlii* (คม สุคนธสรรพ์, และ กาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548) และหนอนพยาธิ *Ascaris lumbericoides*, *Trichuris trichiura*, hook worm, *Entrobious vermicularis*, *Taenis* sp., *Hymenolips nana*, *Toxocara canis*, ตัวอ่อนของ

พยาธิ hook worm และ Strongyloides ที่แมลงวันบ้านเป็นตัวพาหะนำเชื้อ (Getachew et al., 2007)

2. **ทำให้เกิดโรคหนอนแมลงวัน** (Myiasis) เป็นสภาวะเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ยังมีชีวิตอยู่ถูกบุกรุกด้วยตัวอ่อนของแมลงวัน ซึ่งอยู่ในช่วงเวลาหนึ่ง เพื่อกินอาหาร หรือเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว โดยผลจากการบุกรุกของตัวอ่อนในคนหรือสัตว์นี้มีตั้งแต่ไม่มีอาการจนถึงมีอาการที่รุนแรงถึงกับเสียชีวิตได้ ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคนี้มีอยู่หลายประการ อาทิ แมลงวันวางไข่บริเวณแผลหรือขอบแผล และการกินรับประทานอาหารที่มีไข่ของแมลงวัน (Zumpt, 1965; Kumarasinghe et al., 2000; Sukontason et al., 2005; Chaiwong et al., 2014) ซึ่งประเทศไทยได้มีการรายงาน พบตัวหนอนแมลงวันหัวเขียวที่ทำให้เกิดโรค โดยมีลักษณะแผลเน่านั้นที่เกิดจากตัวหนอนของแมลงวันในระยะที่ 3 มีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร อยู่ร่วมกับตัวหนอนระยะที่ 3 ของแมลงวัน ชนิด *Achoetandrus rufifacies* อีกทั้งยังได้มีการรายงานว่า พบหนอนแมลงวันทั้ง 3 ระยะ ในโพรงจมูกของผู้ป่วยเพศชายที่รับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จนตัวหนอนได้ทำลายเนื้อเยื่อในโพรงจมูกที่ทำให้เกิดแผลขึ้น (คม สุคนธสรรพ์, และ กาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548)

3. **ก่อให้เกิดความรำคาญ** ในบริเวณที่มีแมลงวันอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งตลาดสด ร้านขายเนื้อสัตว์หรืออาหารทะเล ที่ก่อความรำคาญต่อผู้คนที่อาศัยในบริเวณนั้น รวมถึงอาจจะทำให้บรรยากาศการท่องเที่ยวเสียไป เนื่องจากนักท่องเที่ยวไม่ไว้วางใจในความสะอาดของอาหาร และน้ำดื่มในสถานที่ท่องเที่ยวที่มีแมลงวันอยู่เป็นจำนวนมาก

ด้านประโยชน์

1. **ด้านนิติกีฏวิทยา** การนำข้อมูลความรู้เกี่ยวกับวงจรชีวิตของแมลงวันบางชนิดมาประยุกต์ใช้การสืบสวน เช่น การประมาณช่วงเวลาหลังการตาย เพื่อช่วยในการพิสูจน์หลักฐานและคลี่คลายคดีอาชญากรรม (Sukontason et al., 2005; Sukontason et al., 2010) โดยการนำตัวอย่างที่สำรวจพบในศพมาเปรียบเทียบกับข้อมูลการเจริญเติบโตของแมลงวันที่เคยมีการศึกษาไว้ เพื่อช่วยในการบ่งชี้การตายของศพที่ผิดธรรมชาติ การเคลื่อนย้ายศพมาจากสถานที่อื่น เนื่องจากแมลงวันในแต่ละชนิดจะอาศัยในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน จึงทำให้แมลงวันสามารถเป็นตัวช่วยอีกวิธีที่สามารถเป็นหลักฐานในการพิจารณาคดีได้ โดยที่ผ่านมาได้มีศึกษาเกี่ยวกับแมลงวันที่ใช้งานนิติกีฏวิทยาอยู่หลากหลาย อาทิ การศึกษาในประเทศไทยที่ได้เก็บตัวอย่างแมลงวันระยะต่าง ๆ มาจากร่างกายศพของมนุษย์ในสถานที่เกิดเหตุที่สภาพแวดล้อมต่างกัน พบแมลงวันทั้งหมด 6 วงศ์ คือ Calliphoridae, Musidae, piophilidae, Phoridae, Sarcophagidae และ

Stratiomyiidae ตามลำดับ (คม สุคนธสรรพ์, และกาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548) ที่สามารถประมวลผลระยะการเสียชีวิตของศพได้

2. **ด้านการแพทย์** การนำหนอนแมลงวันมารักษาบาดแผลของผู้ป่วยที่มีแผลเรื้อรัง ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า Maggot debridement therapy โดยการนำตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 ของแมลงวันที่เลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อมาปล่อยบนแผลเรื้อรังของผู้ป่วย และปิดทับด้วยผ้าโปร่ง (gauze) ปล่อยให้แมลงวันกินเนื้อเยื่อที่ตาย ผลที่ได้คือ แผลเรื้อรังหายได้เร็วกว่าการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะและการล้างแผล (คม สุคนธสรรพ์, และกาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548) อีกทั้งในปี ค.ศ. 2003 Sherman ได้ศึกษาการใช้หนอนแมลงวันรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดเรื้อรัง จำนวน 18 ราย พบว่าการใช้หนอนแมลงวันเข้ารักษาสามารถช่วยให้บาดแผลของผู้ป่วยมีความลดลงถึง 4 เซนติเมตร จนบาดแผลเกิดการแห้งที่เกิดจากเนื้อเยื่อที่ตายแล้วมากกว่า 33% หลังได้รับการรักษา ซึ่งชนิดแมลงวันที่สามารถนำไปใช้ในรักษาบาดแผลของผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ แมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucilia sericata* โดยปัจจุบันประเทศไทยได้มีการรายงานว่าตัวอ่อนของแมลงวันชนิด *Lucilia cuprina* สามารถใช้เป็นหนอนบำบัดในทางการแพทย์ได้ (Bunchu, 2012) นอกจากนี้ได้มีการรายงานนำสารคัดคลั่งของตัวอ่อนแมลงวันหลายชนิดมาใช้ต้านฤทธิ์จุลชีพได้ (Suriyakan et al., 2016)

3. **ด้านการเกษตรกรรม** สามารถนำตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียวมาช่วยในการผสมพันธุ์ของพืช อาทิ การผสมเกสรของต้นมะม่วงที่ทำให้เพิ่มผลผลิตที่มากให้กับเกษตรกร (Anderson et al., 1982) และการนำตัวอ่อนของแมลงวันบ้าน ชนิด *Musca domestica* มาเป็นอาหารสำหรับไก่งวงที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจ เนื่องจากสารอาหารที่อยู่ในตัวอ่อน *Musca domestica* มีค่าทางโภชนาการที่สูงกว่าอาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงไก่งวง (Zuidhof et al., 2003) และการใช้ตัวอ่อนของแมลงวันไปใช้ในขบวนการผลิตดีเซลชีวภาพ (Li et al., 2015; Niu et al., 2017)

ตาราง 2 ชนิดของแมลงวันที่มีการรายงานเกี่ยวกับทางการแพทย์ นิติกีฏวิทยา และการเกษตรกรรม ที่พบในประเทศไทย

วงศ์	ชนิด	การแพทย์	นิติกีฏวิทยา	การเกษตรกรรม
Calliphoridae	*Achoetandrus rufifacies* (Macquart, 1843)	/	/	-
	Achoetandrus villeneuvi (Patton, 1922)	/	/	-

ตาราง 2 (ต่อ)

วงศ์	ชนิด	การแพทย์	นิติกีฏวิทยา	การเกษตรกรรม
Calliphoridae	*Ceylonomyia nigripes* (Aubertin, 1923)	/	/	-
	Chrysomya bezziana (Villeneuve, 1914)	/	/	-
	Chrysomya chani (Kurahashi, 1979)	/	/	-
	Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794)	/	/	/
	Chrysomya pinguis (Walker, 1858)	/	/	-
	Hemipyrellia ligurriens (Wiedemann, 1830)	/	/	-
	Lucilia cuprina (Wiedemann, 1830)	/	/	-
	Lucilia papuensis (Macquart, 1843)	/	/	-
Muscidae	*Atherigona orientalis* (Schiner, 1868)	/	/	-
	Hydrotaea chalcogaster (Wiedemann, 1824)	/	/	-
	Hydrotaea spinigera (Stein, 1910)	/	/	-

ตาราง 2 (ต่อ)

วงศ์	ชนิด	การแพทย์	นิติกีฏวิทยา	การเกษตรกรรม
Muscidae	*Musca domestica* Linnaeus, 1758	/	-	/
	Synthesiomyia nudiseta Van Der Wulp, 1883	-	/	-
Sarcophagidae	*Boettcherisca peregrina* Rohdendorf, 1937	/	/	-
	Parasarcophaga dux (Thomson, 1869)	/	/	-

ที่มา: คม สุคนธสรรพ์, และกาบแก้ว สุคนธสรรพ์, (2548); Sukontason et al., (2005); Sukontason et al., (2010); Bunchu, (2012); Chaiwong et al., (2014); Li et al., (2015); Suriyakan et al., (2016); Niu et al., (2017)

หลักการและที่มาของวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcodes)

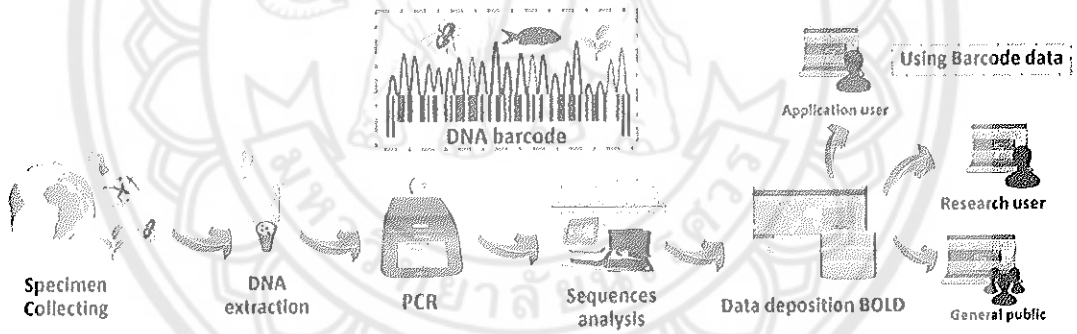
ในปี ค.ศ. 2003 Hebert et al. ได้มีแนวคิดการติดฉลากบาร์โค้ดในสินค้ามาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิทยาศาสตร์ โดยมีการเสนอแนวคิดที่ว่าสัตว์ทุกชนิดสามารถระบุชนิดได้ ซึ่งอาศัยลักษณะเฉพาะของดีเอ็นเอที่เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หรือแต่ละบุคคลมาใช้เป็นเครื่องหมายในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต หรือเรียกว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยได้มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome c oxidase subunit I (*COI* หรือ *CoxI*) ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียมีความยาวประมาณ 500-600 คู่เบส มาใช้ในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต โดยยีน *COI* เป็นยีนแรกที่นำมาใช้เป็นมาตรฐานเครื่องหมายดีเอ็นบาร์โค้ดในสัตว์ (Torres-Gutierrez et al., 2016) ต่อมาวิธีการของดีเอ็นบาร์โค้ดที่นำมาใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย และได้มีการจัดตั้ง Consortium for the Barcode of Life ขึ้นในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งเกิดจากความร่วมมือกันระหว่างนักวิจัยของมหาวิทยาลัยต่าง ๆ รวมไปถึงนักวิจัยของพิพิธภัณฑ์สัตว์และพืชระดับนานาชาติจาก

หลายประเทศ เพื่อกำหนดมาตรฐานและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอบาร์โค้ด และจัดทำฐานข้อมูลส่วนกลางที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เพื่อมีค่าความแปรผันที่แตกต่างกัน (วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2011) สำหรับการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดทั่วไปเป็นการศึกษาที่ใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้น ๆ (short genetic loci) ประมาณ 500-800 คู่เบส ของยีนที่มีความจำเพาะสามารถบ่งชี้ถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือต่างชนิด (Lebonah et al., 2014) ซึ่งยีนที่นิยมใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของการระบุชนิดแมลงวัน คือ ยีนในกลุ่ม Cytochrome c oxidase subunit I (*COI* หรือ *CoxI*) และ subunit II (*COII*), Cytochrome b (*cyt b*) และ 28s ribosomal RNA (28s *rRNA*)

โดยยีนในกลุ่ม *COI* และ *COII* เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียที่มีความสำคัญอยู่ในกระบวนการหายใจ (aerobic metabolism) ซึ่งยีน *COI* นิยมนำมาใช้ในการระบุชนิดหรือการค้นคว้าวิจัยทางด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากยีน *COI* มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดสูง และมีการแทรกเข้ามาและการหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย (พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์, และอรุณรัตน์ ฉวีราช, 2554) ส่วนยีน *COII* จัดอยู่ใน complex ของเอนไซม์ Oligomeric ที่เป็นส่วนประกอบของระบบหายใจในส่วนที่เกี่ยวข้องในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ให้เป็นออกซิเจน โดยที่ยีน *COII* จะถูกถ่ายทอดอิเล็กตรอนมาจาก cytochrome c ไปยัง subunit I ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาอยู่ 2 บริเวณ ที่ติดอยู่กับ transmembrane ในทิศทางด้านปลาย N และยังเป็นโปรตีนสำคัญที่มีการสัมผัสอยู่บริเวณพื้นผิวของ mitochondrial intermembrane (Roe, & Sperling, 2007) โดยการนำยีน *COII* มาประยุกต์ใช้เปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ และปริมาณสารจำพวกโปรตีน กรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตที่สามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ ยีน Cytochrome b (*cyt b*) เป็นยีนอีกส่วนหนึ่งที่อยู่ใน Cytochrome ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการหายใจในไมโทคอนเดรียที่มีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 1,140 คู่เบส (ศิวพร อินต๊ะหล่อ และคณะ, 2555) ซึ่งยีน *cyt b* สามารถค้นพบได้ทั่วไปในแมลงทุกชนิด นิยมนำยีน *cyt b* มาประยุกต์ใช้ในการเปรียบเทียบหาระดับความสัมพันธ์และการระบุชนิดของแมลงอีกด้วย นอกจากนี้ยีนที่อยู่ใน Ribosomal RNA ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการแปรรหัส ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มยีน คือ 1. ยีนที่เกี่ยวข้องกับ large rRNA ได้แก่ 18S rRNA, 28S rRNA และ 5.8S rRNA 2. ยีนทั้งหมดที่เก็บรหัส (coding sequence) ไว้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน และ small nuclear RNA (snRNA) บางชนิด และ 3. กลุ่มยีนขนาดเล็กที่มียีนส่วนใหญ่เรียงอยู่เป็นกลุ่ม (cluster) และมีหลายชุด (copy) เช่น snRNA บางชนิด tRNA และ 5S rRNA ซึ่งในการทำดีเอ็นเอ

บาร์โค้ดนิยมนำยีน 28s rRNA มาใช้ในการระบุชนิดแมลงที่ต้องการศึกษา โดยขนาดของ 28s rRNA ซึ่งมีความยาวประมาณ 4,718 คู่เบส ที่เป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซมขนาด 60S (Hwang et al., 1998)

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการระบุชนิดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ด้วยวิธีการของดีเอ็นบาร์โค้ด นิยมใช้ยีน *COI* มากที่สุด เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลจำนวนมาก และมีความแตกต่างมากเพียงพอที่สามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกันออกจากกันได้ (พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์, และอรุณรัตน์ ฉวีราช, 2554) ซึ่งขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่ การเก็บตัวอย่างและจัดจำแนกชนิดตัวอย่างแมลงวัน การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวัน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequences analysis) และการรวบรวมข้อมูลบันทึกลงในฐานข้อมูล สรุปได้ดังภาพ 8



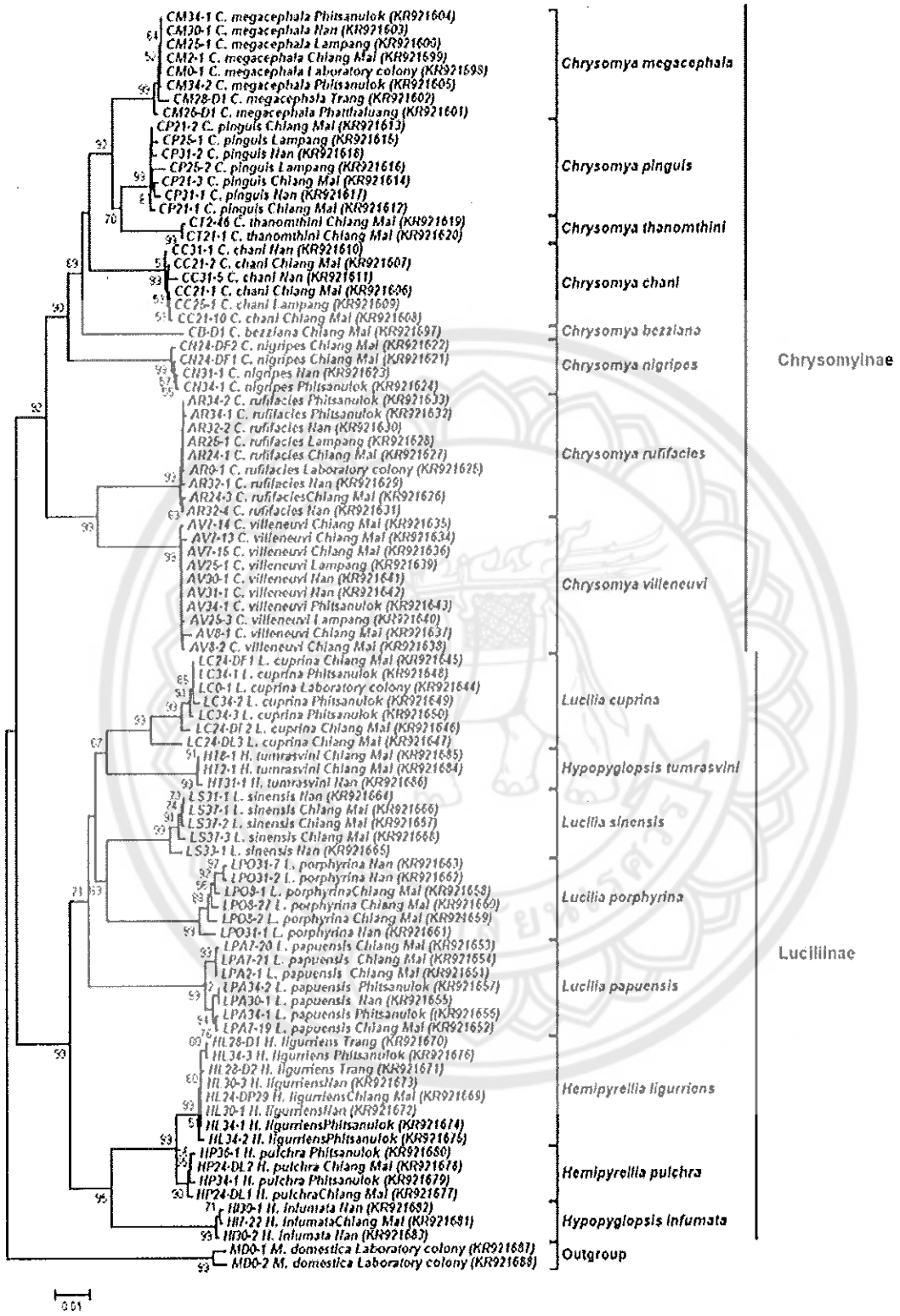
ภาพ 8 ขั้นตอนการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

การจำแนกแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ปัจจุบันการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันในประเทศไทยได้มีการศึกษาในหลายยีน เช่น ยีน *COI* (Renaud et al., 2012; Barbara et al., 2016) *COII* (Sontigun et al., 2018; Samerjai et al., 2020) และยีน 28S *rRNA* (Jordaens et al., 2016) จากการศึกษาที่ผ่านมา Barbara et al. (2016) ได้นำวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดเข้ามาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดแมลงวันที่มีความเกี่ยวข้องกับทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ของประเทศไทย โดยการใช้ยีน *COI* และ 28S *rRNA* เข้ามาช่วยจำแนกชนิดแมลงวัน พบว่าวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถระบุชนิดแมลงวันได้ 13 ชนิด จากตัวอย่างทั้งหมด 75 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยแมลงวันหัวเขียว 8 ชนิด

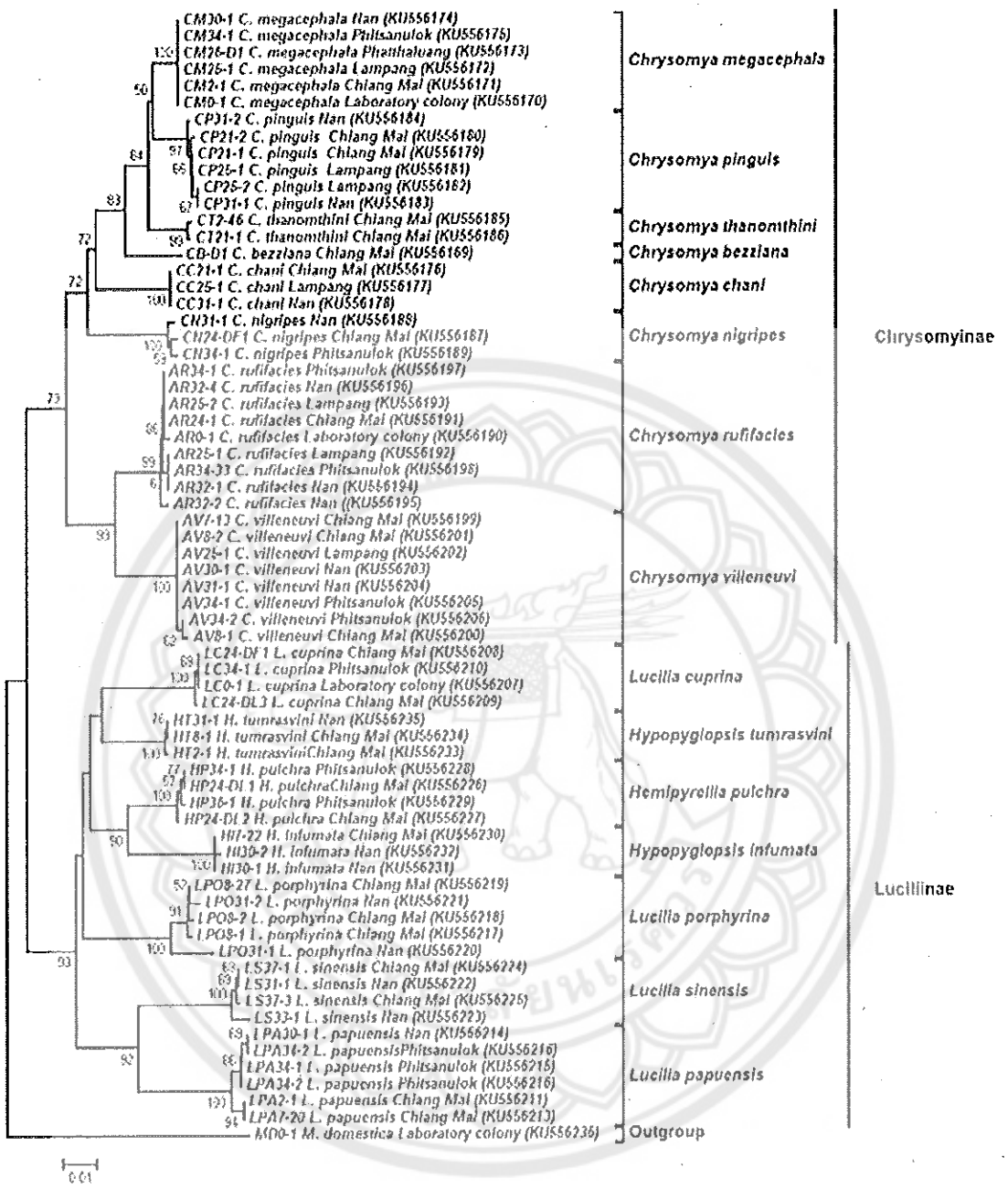
และแมลงวันหลังลาย 3 ชนิด เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการสร้าง phylogenetic tree ปรากฏว่าแมลงวันที่ใช้ในการสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์นั้นมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน (Barbara et al., 2016) ต่อมาในปี ค.ศ. 2018 Sontigun et al. ได้ใช้ยีน *COI* และ *COII* เข้ามาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหัวเขียวที่มีความสำคัญทางด้านนิติกีฏวิทยาในตอนภาคเหนือเหนือตอนบน และภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าสามารถจำแนกแมลงวันได้ 16 ชนิด จากตัวอย่างทั้งหมด 113 ตัวอย่าง เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหัวเขียว พบว่าแมลงวันหัวเขียวทั้ง 2 ภูมิภาค มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน (ภาพ 9-10) โดยที่มีค่าความแตกต่างระหว่างพันธุกรรม เท่ากับ 1.1-11.1% ของยีน *COI* และค่าความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมของยีน *COII* เท่ากับ 1.8-11.6% และในปี ค.ศ. 2020 Samerjai et al. ได้ศึกษาแมลงวันหลังลายที่มีความสำคัญทางด้านนิติกีฏวิทยา โดยใช้ยีน *COI* และ *COII* เข้ามาช่วยในการระบุชนิด พบว่าสามารถระบุชนิดของแมลงวันหลังลายได้ 14 ชนิด และเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ปรากฏว่าแมลงวันหลังลายในพื้นที่ภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทยมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน (ภาพ 11-12) ซึ่งมีค่าความแตกต่างระหว่างระหว่างพันธุกรรม เท่ากับ 0.00-0.96% และ 5.22-12.31% ในยีน *COI* และ *COII* ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการศึกษาระบุชนิดแมลงวันในประเทศไทยโดยใช้วิธีการดีเอ็นบาร์โค้ดยังมีการศึกษาอย่างจำกัด ในขณะที่การศึกษาการระบุชนิดแมลงวันด้วยวิธีการดีเอ็นบาร์โค้ดในต่างประเทศมีอยู่หลากหลายพื้นที่ เช่น ในปี ค.ศ. 2013 Jordaens et al. ได้ศึกษาความแตกต่างของแมลงวันหัวเขียว ชนิด *Phormia regina* ระหว่างพื้นที่ในอเมริกาเหนือและยุโรปตะวันตก ด้วยวิธีการของดีเอ็นบาร์โค้ดที่ใช้ยีน *COI*, *COII*, *cty b* และ 28s *rRNA* พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงถึง 5.3% และสามารถตรวจพบรูปแบบพันธุกรรมในพื้นที่อเมริกาเหนือจำนวน 7 รูปแบบ และในพื้นที่ยุโรปตะวันตกจำนวน 2 รูปแบบ (Jordaens et al., 2016) ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 ได้มีการศึกษาการระบุชนิดของแมลงวันหลังลาย สกุล *Oxysarcodexia* ในสหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล โดยใช้ยีน *COI* ที่มีความยาวของยีน 590-648 คู่เบส สามารถระบุชนิดได้ 13 ชนิดจาก 151 ตัวอย่าง และมีความแตกต่างทางพันธุกรรม เท่ากับ 1.8-2.3% (ภาพ 14) (Madeira et al., 2016) และสามารถระบุชนิดแมลงวันบ้านในสาธารณรัฐอิสลามปากีสถาน ได้ 25 สกุลย่อย จาก 1,114 ตัวอย่าง เมื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าแมลงวันบ้านในสาธารรัฐอิสลามมีวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันทั้งหมด 25 สกุลย่อย และมีความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมสูงถึง 11.33% (Renaud et al., 2012) รวมถึง Marangi et al. (2016) ได้รายงานการศึกษาตัวอ่อนของแมลงวันหลังลาย ชนิด *Wohlfahrtia magnifica* ที่ก่อให้เกิดโรค

myiasis ในแกะ ประเทศอิตาลี โดยใช้ยีน Cytochrome b พบว่าสามารถระบุชนิดตัวอ่อนได้ 17 ตัวอย่างจาก 19 ตัวอย่าง ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหล่านั้นมีรูปแบบทางพันธุกรรม (haplotypes) 2 รูปแบบที่คล้ายคลึงกับรูปแบบทางพันธุกรรมที่เป็น CB_magn01 และ CB_magn02 และนอกจากนี้สามารถระบุชนิดตัวเต็มวัยจำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหล่านั้นมีรูปแบบทางพันธุกรรมเป็นแบบ CB_magn01 โดยรูปแบบทางพันธุกรรมทั้ง 2 แบบที่พบเป็นตัวแทนทางสายสัมพันธ์วิวัฒนาการของ *W. magnifica* ที่มีถิ่นกำเนิดมาจากยุโรปกลาง ยุโรปตะวันออกเฉียงใต้ หรือที่มีถิ่นกำเนิดมาจากยุโรปตะวันตกเฉียงใต้ และตะวันตกเฉียงเหนือของแอฟริกา ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถบ่งชี้ถึงถิ่นกำเนิดของแมลงวันหลังลาย ชนิด *W. magnifica* ในประเทศอิตาลี (Marangi et al., 2016) ต่อมาในปี ค.ศ. 2017 Bharti, & Singh ได้ศึกษาการระบุชนิดแมลงวันหัวเขียวที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ในสาธารณรัฐอินเดีย ซึ่งใช้ยีน *COI* ระบุชนิดได้ 7 ชนิด จาก 9 ชนิด ที่อยู่ในวงศ์ย่อย 3 วงศ์ คือ Calliphorinae, Luciliinae และ Chrysomyinae โดยมีค่าความแตกต่างระหว่างชนิดสูงถึง 18.14% (Bharti, & Singh, 2017) และในปี ค.ศ. 2018 Buenaventura et al. ได้ศึกษาการระบุชนิดแมลงวันหลังลายในพื้นที่ประเทศโคลอมเบียด้วยยีน *COI* ที่มีความยาว 645 คู่เบส สามารถระบุชนิดได้ 4 สกุล คือ *Peckia, Oxysarcodexia, Ravinia* และ *Trichraea* และมีความแตกต่างระหว่างทางพันธุกรรมสูงถึง 13.00% (Buenaventura et al., 2018) ซึ่งในการศึกษาชนิดแมลงวันโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถสรุปได้ดังตาราง 3 และการสืบค้นข้อมูลของแมลงวันของประเทศไทยในฐานข้อมูล BOLD ยังมีการศึกษาที่น้อย โดยคิดเป็นแมลงวันหัวเขียว 1.09% แมลงวันบ้าน 0.75% และแมลงวันหลังลาย 0.49% เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ ซึ่งสรุปแหล่งข้อมูลการสืบค้นได้ดังตาราง 4 และตาราง 5



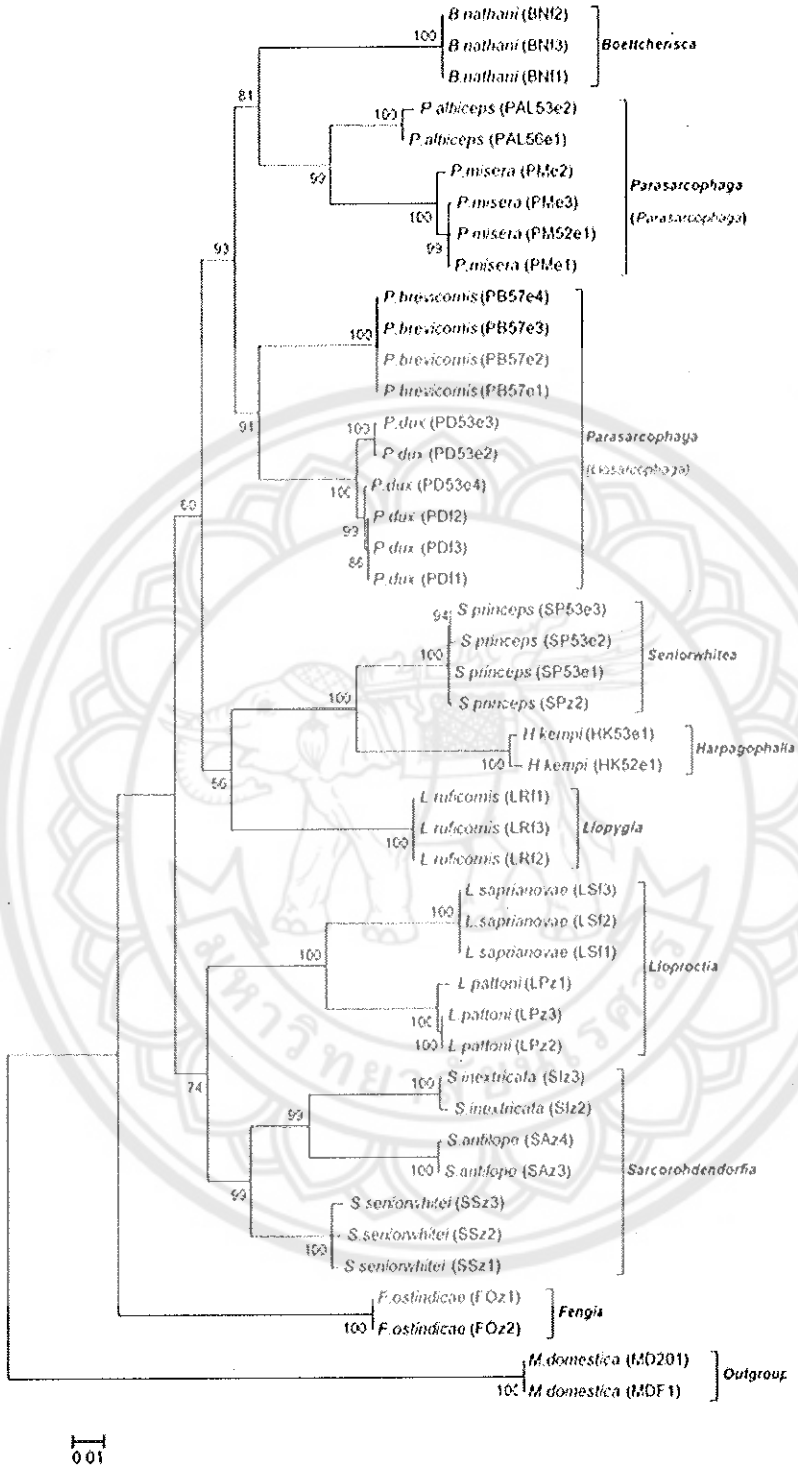
ภาพ 9 Phylogenetic tree ของแมลงวันหัวเขียว Calliphoridae โดยใช้ยีน *COI*

ที่มา: Sontigun et al., 2018



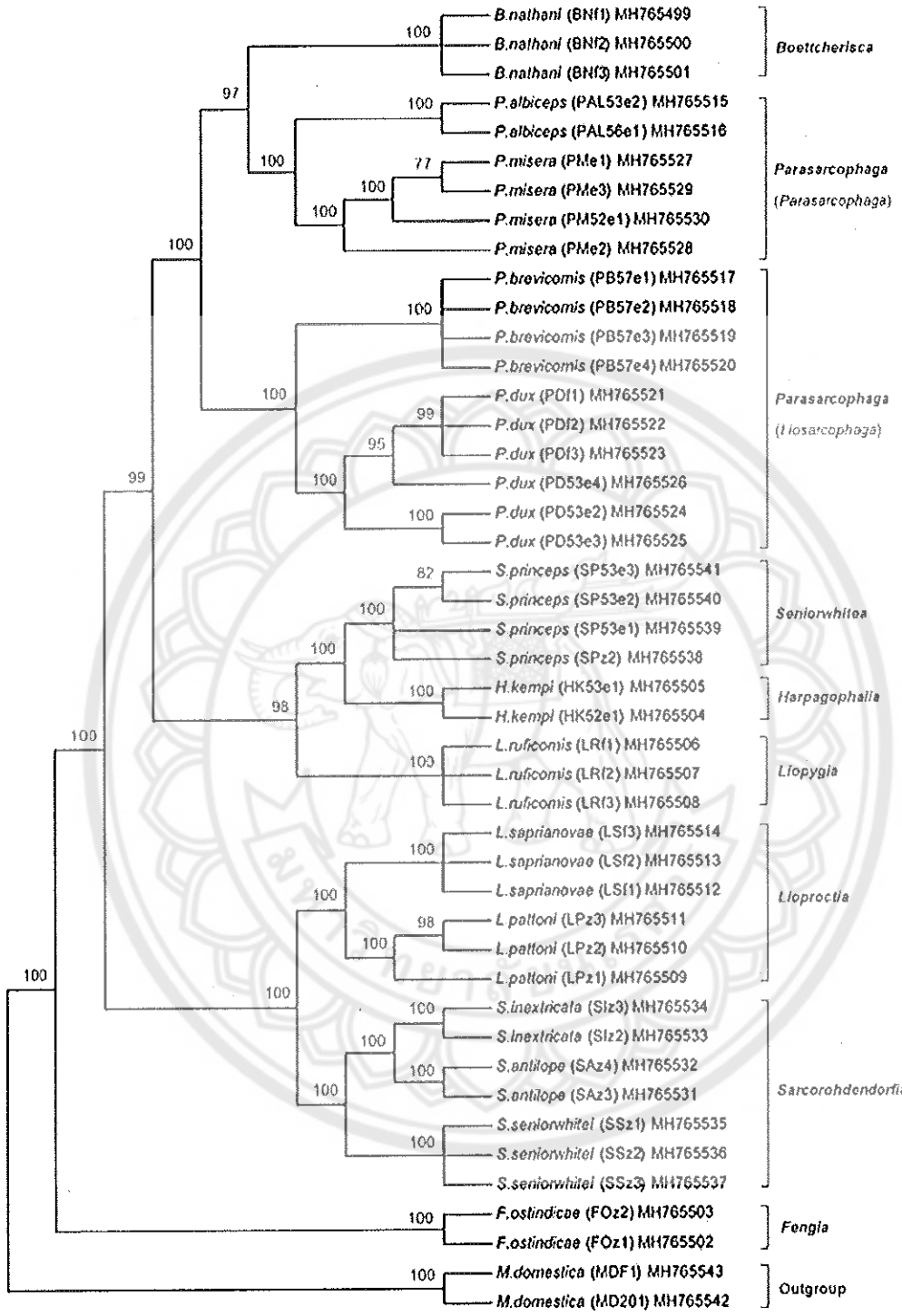
ภาพ 10 Phylogenetic tree ของแมลงวันหัวเขียว Calliphoridae โดยใช้ยีน *COII*

ที่มา: Sontigun et al., 2018



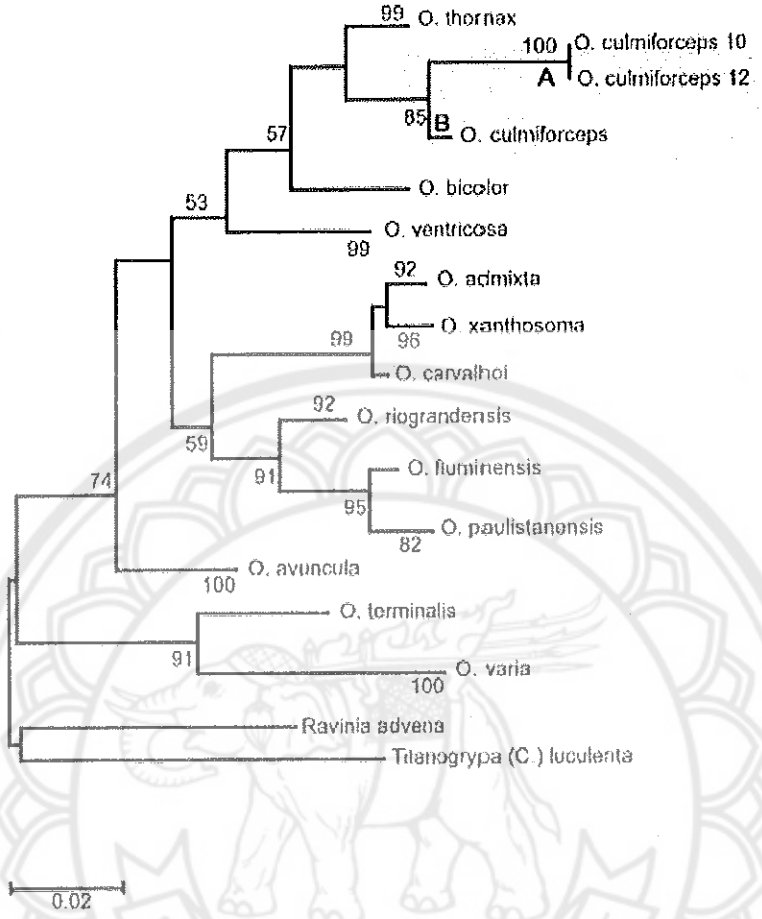
ภาพ 11 Phylogenetic tree **ของ**แมลงวันหัวเขียว Calliphoridae **โดยใช้ยีน** *COI-COII* **ด้วยวิธี** Maximum likelihood

ที่มา: Samerjai et al., 2020



ภาพ 12 Phylogenetic tree ของแมลงวันหัวเขียว Calliphoridae โดยใช้ยีน *COI-COII* ด้วยวิธี Bayesian inference

ที่มา: Samerjai et al., 2020



ภาพ 13 Phylogenetic tree ของแมลงวันหัวเขียว Calliphoridae โดยใช้ยีน *COI* **ด้วยวิธี** Neighbor-Joining

ที่มา: Madeira et al., 2016

ตาราง 3 ตัวอย่างการเปรียบเทียบบริเวณยีนที่ใช้ในการทำดีเอ็นบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์

แมลง (วงศ์)	ชนิด	ประเทศ	ยีนที่ใช้ในการศึกษา				เอกสารอ้างอิง
			COI	*COII*	*Cyt b*	28S *rRNA*	
แมลงวันหัวเขียว (Calliphoridae)	*Achoetandrus rufifacies**	ไทย	/			/	Barbara et al., 2016
	*A. villeneuvi**		/			/	
	*Chrysomya chani**		/			/	
	*C. megacephala**		/			/	
	*C. pinguis**		/			/	
	*C. thanomthini**		/			/	
	*Hypopygiopsis infumata**		/			/	
	*Lucilia papuensis**		/			/	
	*L. porphyrina**		/			/	
	*C. bezziana**	ไทย	/	/			Sontigun et al., 2018
	*C. chani**		/	/			
	*C. megacephala**		/	/			
	*C. nigripes**		/	/			
	*C. pinguis**		/	/			

ตาราง 3 (ต่อ)

แมลง (วงศ์)	ชนิด	ประเทศ	ยีนที่ใช้ในการศึกษา				เอกสารอ้างอิง
			COI	*COII*	*Cyt b*	28S *rRNA*	
แมลงวันหัวเขียว (Calliphoridae)	*C. rufifacies**	ไทย	/	/			Sontigun et al., 2018
	*C. thanomthini**		/	/			
	*C. villeneuvi**		/	/			
	*Lucilia cuprina**		/	/			
	*L. papuensis**		/	/			
	*L. porphyrina**		/	/			
	*L. sinensis**		/	/			
	*Hemipyrellia ligurriens**		/	/			
	*H. pulchra**		/	/			
	*Hypopygiopsis infumata**		/	/			
	*H. tumrasvini**		/	/			

ตาราง 3 (ต่อ)

แมลง (วงศ์)	ชนิด	ประเทศ	ยีนที่ใช้ในการศึกษา				เอกสารอ้างอิง
			COI	*COII*	*Cyt b*	28S *rRNA*	
แมลงวันหัวเขียว (Calliphoridae)	*Chrysomya megacephala*	อเมริกาเหนือ และ ยุโรปตะวันตก		/	/	/	Jordaens et al., 2013
	C. rufifacies			/	/	/	
	Phormia regina			/	/	/	
แมลงวันบ้าน (Muscidae)	*Coenosia demoralis*	สาธารณรัฐ อิสลามปากีสถาน	/				Renaud et al., 2012
	C. minor		/				
	Drymeia pribilofensis		/				
	D. segnis		/				
	Helina evecta		/				
	H. laxifrons		/				
	Hydrotaea pilitibia		/				
	Hy. scambus		/				
	Lispe cotidiana		/				
	Li. uliginosa		/				
	Lispocephala varians		/				

ตาราง 3 (ต่อ)

แมลง (วงศ์)	ชนิด	ประเทศ	ยีนที่ใช้ในการศึกษา				เอกสารอ้างอิง
			COI	*COII*	*Cyt b*	28S *rRNA*	
	Lispocephala. erythrocera	สาธารณรัฐ	/				Renaud et al.,
	Muscina flukei	อิสลามปากีสถาน	/				2012
	M. levida		/				
	Phaonia errans	สาธารณรัฐ	/				Renaud et al.,
	P. savonoskii	อิสลามปากีสถาน	/				2012
	P. serva		/				
แมลงวันบ้าน	*Spilogona arctica*		/				
(Muscidae)	*S. atrisquamula*		/				
	S. contractifrons		/				
	S. fatima		/				
	S. forticula		/				
	S. novemaculata		/				
	Thricops hirtulus		/				
	T. innocuus		/				

ตาราง 3 (ต่อ)

แมลง (วงศ์)	ชนิด	ประเทศ	ยีนที่ใช้ในการศึกษา				เอกสารอ้างอิง
			COI	*COII*	*Cyt b*	28S *rRNA*	
แมลงวันบ้าน (Muscidae)	*T. spiniger*	สาธารณรัฐอิสลามปากีสถาน	/				Renaud et al., 2012
	T. septentrionalis		/				
	T. villicrus		/				
แมลงวันหลังลาย (Sarcophagidae)	*Boettcherisca nathani**	ไทย	/				Barbara et al., 2016
	*Lioproctia pattoni**		/				
	*Sarcosolomonia rohdendorfi**		/				
	*Boettcherisca nathani**	ไทย	/	/			Samerjai et al., 2020
	*Fengia ostindicae**		/	/			
	*Harpagophalla kempi**		/	/			
	*Liopygia ruficornis**		/	/			
	*Lioproctia pattoni**		/	/			
	*Lioproctia saprianovae**		/	/			
	*Parasarcophaga albiceps**		/	/			
	*Parasarcophaga brevicornis**		/	/			

ตาราง 3 (ต่อ)

แมลง (วงศ์)	ชนิด	ประเทศ	ยีนที่ใช้ในการศึกษา				เอกสารอ้างอิง
			COI	*COII*	*Cyt b*	28S *rRNA*	
แมลงวันหลังลาย (Sarcophagidae)	*Parasarcophaga dux**	ไทย	/	/			Samerjai et al., 2016
	*Parasarcophaga misera**		/	/			
	*Sarcorohdendorfia antilope**		/	/			
	*Sarcorohdendorfia inextricata**		/	/			
	*Sarcorohdendorfia seniorwhitei**		/	/			
	*Seniorwhitea princeps**		/	/			
	Oxysarcodexia admixta	สหพันธ์	/				Madeira et al., 2016
	O. avuncular	สาธารณรัฐ	/				
	O. bicolor	บราซิล	/				
	O. carvalhoi		/				
	O. culmiforceps		/				
	O. fluminensis		/				
	O. paulistanensis		/				

ตาราง 3 (ต่อ)

แมลง (วงศ์)	ชนิด	ประเทศ	ยีนที่ใช้ในการศึกษา				เอกสารอ้างอิง
			COI	*COII*	*Cyt b*	28S *rRNA*	
แมลงวันหลังลาย (Sarcophagidae)	*O. riograndensis*	สหพันธ์	/				Madeira et al., 2016
	O. terminalis	สาธารณรัฐ	/				
	O. thornax	บราซิล	/				
	O. varia		/				
	O. ventricosa		/				
	O. xanthosoma		/				

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ * หมายถึง แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่มีการสำรวจพบในประเทศไทย

ตาราง 4 ตัวอย่างวงศ์ของแมลงวันในประเทศไทยที่พบในฐานข้อมูล BOLD

วงศ์	No. of Species	No. of Species in Thailand	No. of Barcodes (>500 bp)	คิดเป็นร้อยละ
Calliphoridae	273	3	20	1.09
Muscidae	933	7	7	0.75
Sarcophagidae	601	3	10	0.49

ที่มา: http://www.boldsystems.org/

ตาราง 5 ตัวอย่างชนิดแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทยที่พบในฐานข้อมูล BOLD

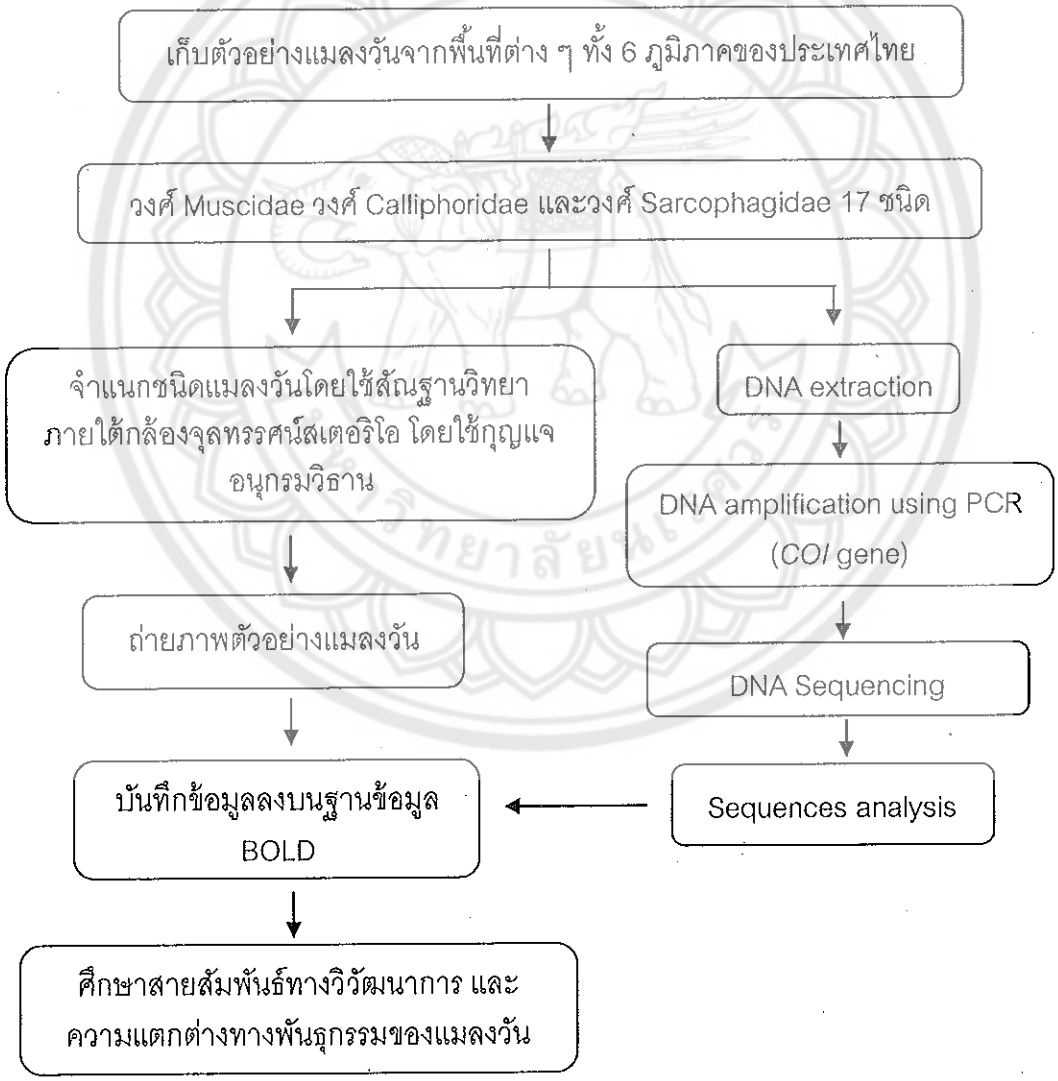
ชนิด	No. of Specimens	No. of Barcodes (>500 bp)	No. of Barcodes In Thailand	คิดเป็นร้อยละ
Chrysomya (*Achoetandrus*) *rufifacies* (Macquart, 1843)	34	34	-	-
Chrysomya bezziana (Villeneuve, 1914)	17	17	-	-
Chrysomya chani (Kurahashi, 1979)	1	1	-	-
Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794)	500	474	10	2.11
Chrysomya pinguis (Walker, 1858)	144	139	-	-
Hemipyrellia ligurriens (Wiedemann, 1830)	68	63	-	-
Lucilia cuprina (Wiedemann, 1830)	178	154	-	-
Lucilia papuensis (Macquart, 1843)	25	21	-	-
Hydrotaea spinigera (Stein, 1910)	15	15	-	-
Musca domestica Linnaeus, 1758	296	243	7	2.88
Atherigona orientalis (Schiner, 1868)	209	205	-	-
Hydrotaea chalcogaster (Wiedemann, 1824)	10	9	-	-
Synthesiomyia nudiseta Van Der Wulp, 1883	21	21	-	-

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยได้ทำการสำรวจจุดเก็บตัวอย่าง และทำการเก็บตัวอย่างแมลงวันจากทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย โดยตัวอย่างแมลงวันที่เก็บรวบรวมได้ 3 วงศ์ คือ วงศ์ Muscidae วงศ์ Calliphoridae และวงศ์ Sarcophagidae ซึ่งจำนวนของแมลงวันทั้งหมด 17 ชนิด จากนั้นก็ดำเนินงานวิจัยตามแผนปฏิบัติงานที่ได้วางไว้ (ภาพ 14) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้



ภาพ 14 แผนปฏิบัติงานวิจัย

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวัน

สำรวจสถานที่เก็บข้อมูล และสุ่มเก็บตัวอย่างแมลงวันในพื้นที่ทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย จำนวน 17 จังหวัด ประกอบด้วย พื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ เชียงใหม่ ชลบุรี นครสวรรค์ ปัตตานี พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ แพร่ มหาสารคาม ราชบุรี สกลนคร สงขลา อุตรดิตถ์ และอุบลราชธานี (ตาราง 6) (ภาพ 15) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างแมลงวันด้วยการใช้สวิงโฉบ และกับดัก ชนิดโคมดักแมลงวันพลาสติก โดยเหยื่อล่อที่ใช้ในการล่อแมลงวัน คือ เนื้อหมูและเครื่องในหมูที่ถูกทำให้เน่า 2-3 วัน (Boonchu et al., 2003) (ภาพ 16) ซึ่งการเก็บตัวอย่างแมลงวันแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างที่ใช้เหยื่อล่อในตอนเช้า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนำไปวางในจุดที่ต้องการจับแมลงวัน (ทำการบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์) และนำแมลงวันที่จับได้จากสวิงโฉบใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำแมลงที่จับได้ไปแช่ในน้ำแข็งเพื่อสลบแมลงวัน ส่วนแมลงวันที่ได้จากกับดัก ชนิดโคมดักแมลงวันพลาสติก ให้ใช้ถุงดำครอบไว้ทั้งกับดัก แล้วนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการด้านกีฏวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และทำการการุณยฆาตแมลงวัน โดยนำกับดักที่มีแมลงวันไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาทำการปักแมลงวัน โดยใช้เข็มปักแมลง ปักที่ปล้องอก ปล้องที่สองทางด้านขวาของแมลงวัน แล้วนำตัวอย่างแมลงวันที่ปักไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ความชื้นออกจากตัวแมลง เป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบกำหนดระยะเวลาก็นำตัวอย่างแมลงวันที่ได้มาทำการจำแนกชนิดภายใต้กล้องสเตอริโอ และใช้กุญแจอนุกรมวิธานในการระบุชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา แมลงวันวงศ์ต่าง ๆ ดังนี้

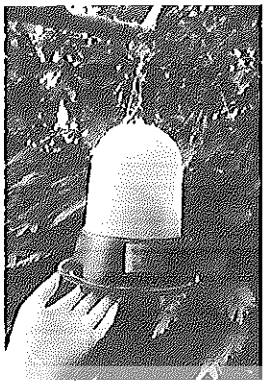
1. แมลงวันบ้าน ใช้กุญแจอนุกรมวิธานของ Tumrasvin, & Moophayak (2018)
2. แมลงวันหัวเขียว ใช้กุญแจอนุกรมวิธานของ Kurahshi, & Bunchu (2011)
3. แมลงวันหลังลาย ใช้กุญแจอนุกรมวิธานของ Kurahashi, & Samerjai (2018)

โดยคัดเลือกแมลงวันที่จะทำการศึกษาทั้งหมด 17 ชนิด ดังตาราง 7 ทำการบันทึกภาพแมลงวันที่จำแนกชนิดแล้วแต่ละตัวโดยใช้กล้องถ่ายภาพดิจิตอล เพื่อรอการบันทึกในฐานข้อมูล ทำการเก็บชิ้นส่วนขาหน้าข้างขวาแมลงวันแต่ละตัวโดยใช้ปากคีบ เก็บรักษาในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ปราศจาก DNAase และ RNAase ที่ใส่น้ำยารักษาสภาพ 95% Ethanol และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอการศึกษาในขั้นตอนต่อไป การศึกษานี้จะทำการศึกษาแมลงวันแต่ละชนิดที่ได้จากภูมิภาคต่าง ๆ อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง

ตาราง 6 พื้นที่เก็บตัวอย่างแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ใน 6 ภูมิภาคของประเทศไทย ดังนี้

ภาค	จังหวัด	อำเภอ
เหนือ	1. เชียงใหม่	เมือง
	2. พิษณุโลก	เนินมะปราง
	3. แพร่	เมือง
	4. อุตรดิตถ์	ลับแล
กลาง	5. นครสวรรค์	เมือง
	6. พิจิตร	สามง่าม
	7. เพชรบูรณ์	เขาค้อ
ตะวันตก	8. ราชบุรี	บ้านโป่ง
ตะวันออก	9. ชลบุรี	พนัสนิคม
ตะวันออกเฉียงเหนือ	10. กาฬสินธุ์	ยางตลาด
	11. ขอนแก่น	เมือง
	12. ชัยภูมิ	คอนสาร
	13 มหาสารคาม	กันทรวิชัย
	14 สกลนคร	ภูพาน
	15. อุบลราชธานี	วารินำราบ
ใต้	16. ปัตตานี	โคกโพธิ์
	17. สงขลา	เทพา

ภาพ 15 แผนที่พื้นเก็บตัวอย่างแมลงวันทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย



(ก)

(ข)

ภาพ 16 วิธีการเก็บตัวอย่างแมลงวันที่ใช้เครื่องในหมูเน่าเป็นเหยื่อล่อ : (ก) เก็บตัวอย่างแมลงวันด้วยการใช้กับดัก และ (ข) เก็บตัวอย่างแมลงวันด้วยการใช้สวิงโฉบ

ตาราง 7 ตัวอย่างแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

วงศ์	ชนิด
Calliphoridae	*Chrysomya (Achoetandrus) rufifacies* (Macquart, 1843)
	Chrysomya (Achoetandrus) villeneuvi (Patton, 1922)
	Chrysomya bezziana (Villeneuve, 1914)
	Chrysomya (*Ceylonomyia*) *nigripes* (Aubertin, 1923)
	Chrysomya chani (Kurahashi, 1979)
	Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794)
	Chrysomya pinguis (Walker, 1858)
	Hemipyrellia ligurriens (Wiedemann, 1830)
	Lucilia cuprina (Wiedemann, 1830)
	Lucilia papuensis (Macquart, 1843)
Muscidae	*Atherigona orientalis* (Schiner, 1868)
	Hydrotaea chalcogaster (Wiedemann, 1824)
	Hydrotaea spinigera (Stein, 1910)
	Musca domestica Linnaeus, 1758
	Synthesiomyia nudiseta Van Der Wulp, 1883

ตาราง 7 (ต่อ)

วงศ์	ชนิด
Sarcophagidae	*Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* Rohdendorf, 1937
	Sarcophaga (*Parasarcophaga*) *dux* (Thomson, 1869)

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1. **การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวัน** (DNA extraction)

นำส่วนขาของแมลงวันที่เก็บไว้ มาสกัด DNA โดยใช้เทคนิค alkaline lysis (Ivanova et al., 2009; Jisming-See et al., 2016) โดยแมลงวันบ้านจะมีการใช้ขาแมลงวัน จำนวน 2 ขา ต่อ 1 ตัวอย่าง ส่วนแมลงวันหัวเขียว และแมลงวันหลังลาย ใช้ 1 ขา ต่อ 1 ตัวอย่าง บรรจุในหลอดทดลอง (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติม alkaline buffer 17.5 ไมโครลิตร (0.1 N NaOH, 0.3 mM EDTA, pH 13) ลงในหลอดทดลอง แล้วนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ทำการเติม neutralization buffer 32.5 ไมโครลิตร (0.1 Tris-HCl, pH 7.0) ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันด้วย จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง เพื่อให้ตะกอนตกลงมา แล้วดูดดีเอ็นเอที่สกัดได้ใส่ในหลอดทดลองใหม่ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ใช้ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป

2. **การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง** (DNA amplification) **โดยเทคนิค** polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในการศึกษานี้เลือกใช้ไพร์เมอร์มาตรฐานที่จำเพาะกับยีน *COI* (Folmer et al., 1994) ดังตาราง 8 และใช้น้ำยาสำหรับทำ PCR ยี่ห้อ AccuStart™ II PCR SuperMix (Quanta BioScience) รัฐแมสซาชูเซตส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา (ตาราง 9) ซึ่งขั้นตอนการทำ PCR นั้นอ้างอิงตามวิธีของ Wilson (2012) (ตาราง 10) เมื่อได้ปริมาณผลผลิตพีซีอาร์แล้วจะทำการตรวจสอบคุณภาพและขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้น 2% ในสารละลาย 1x TBE buffer ที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ในการตรวจสอบมีปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำแผ่นเจลไปย้อมสาร ethidium bromide (10 ไมโครลิตร ต่อ 1 มิลลิลิตร) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 30 นาที แล้วนำไปตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV และทำการบันทึกภาพ จากนั้นผลผลิตพีซีอาร์จะถูกทำให้บริสุทธิ์ เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ตาราง 8 รายละเอียดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Primer	Strand	Sequence	Length
LCO1490	forward	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	25 bp
HCO2198	reverse	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	26 bp

ตาราง 9 การเตรียม PCR reaction solution ที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้

Ingredient	Volume (µl)	Final Concentration
PCR premix ยี่ห้อ AccuStart™ II PCR SuperMix (Quanta BioScience)	12.5	1X
10 µM Forward primer (LCO1490)	1	0.4 µM
10 µM Reverse primer (HCO2198)	1	0.4 µM
Distilled water	8.5	-
DNA Tamplate	2	2 µl
Total	25	

ตาราง 10 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

Step	Temperature	Time	Number of cycle
Initial denaturation	94 °C	1 min	1 cycle
Denaturation	94 °C	30 second	5 cycles
Annealing	45 °C	40 second	
Extension	72 °C	1 min	
Denaturation	94 °C	30 second	35 cycles
Annealing	51 °C	40 second	
Extension	72 °C	1 min	
Final extension	72 °C	10 min	1 cycle

3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วทำให้สายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (ยี่ห้อ Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) เริ่มจากการเติม Buffer NTI เข้าไปผสมกับผลผลิตพีซีอาร์ โดยปริมาณของ Buffer NTI มีการเพิ่มปริมาณขึ้นเป็น 2 เท่าของปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ แล้วทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการดูดสารละลายทั้งหมดลงในแท่งคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่ใสทิ้ง แล้วทำการเติม Buffer NT3 ปริมาณ 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ตะกอนแห้ง ทำการย้ายแท่งคอลัมน์ไปยังหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อละลาย DNA ออกจากแผ่นเมมเบรน จากทำการเติม Buffer NE ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จนได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ และทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้น 2% ในสารละลาย 1x TBE buffer ที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบมีปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำแผ่นเจลไปย้อมสาร ethidium bromide (10 ไมโครลิตร ต่อ 1 มิลลิลิตร) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 30 นาที แล้วนำไปตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen Inc Service ประเทศเกาหลี

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen Inc Service ประเทศเกาหลี โดยการวิเคราะห์ผลตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* ของแมลงวัน เพื่อสามารถยืนยันการระบุชนิดของแมลงวันที่สำรวจพบในเขตพื้นที่ประเทศไทย โดยตรวจสอบความถูกต้อง และแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งด้วยการใช้โปรแกรม SeqMan II (DNASTAR inc., Wisconsin, USA) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันด้วยวิธี multiple sequences alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W (Higgins et al.,1994) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระบุชนิดของแมลงวันที่แน่นอนแล้วในฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) และใช้โปรแกรม

MEGA version 7 (Kumar et al., 2016) เพื่อสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

2. การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและการแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงวัน

ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวัน สามารถใช้โปรแกรม SeqMan II (DNASTAR inc., Wisconsin, USA) โดยจะทำการเตรียมลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันมาจัดแต่งสายลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เรียบร้อย นำไปวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อดูค่าความแตกต่างระหว่างชนิดที่วิเคราะห์จาก Kimura 2-parameter model จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร่วมกับแมลงวันที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI (ตาราง 11-27) ด้วยโปรแกรม MEGA version 7 (Kumar et al., 2016) โดยใช้วิธีการ Maximum likehood tree ซึ่งมี *Drosophila desallei* (Accession No. HQ170762.1), *Drosophila melanocephala* (Accession No. HQ170778.1), *Drosophila percnosoma* (Accession No. HQ703708.1), *Drosophila porsimilis* (Accession No. AF451099.1) และ *Drosophila sordidapax* (Accession No. HQ170822.1) เป็น outgroup และสร้าง Haplotype network ด้วยโปรแกรม Network Version 5.0.11 software

ตาราง 11 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya (Achoetandrus) rufifacies* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Chrysomya rufifacies* voucher AR34-1	KR921632.1
2	*Chrysomya rufifacies* isolate Case_15	JN571565.1
3	*Chrysomya rufifacies* isolate Jammu	MK353338.1
4	*Chrysomya rufifacies* voucher CR12	KT894981.1
5	*Chrysomya rufifacies* isolate Case_8	JN571558.1
6	*Chrysomya rufifacies*	KF562105.1

ตาราง 12 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Chrysomya villeneuvi* voucher AV8-2	KR921638.1
2	*Chrysomya villeneuvi*	FJ195382.1

ตาราง 13 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya bezziana* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Chrysomya bezziana* isolate Jammu	MK167359.1
2	*Chrysomya bezziana* isolate C3	JQ246660.1

ตาราง 14 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Chrysomya nigripes* voucher PUMB2016-151-23	KX893348.1
2	*Chrysomya nigripes* voucher CN34-1	KR921624.1

ตาราง 15 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya chani* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Chrysomya chani* voucher CC07	KT894988.1
2	*Chrysomya chani*	FJ195377.1
3	*Chrysomya chani* voucher CC31-1	KR921610.1

ตาราง 16 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya megacephala* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Chrysomya megacephala* isolate 2	FJ614817.1
2	*Chrysomya megacephala* isolate CSU120801CB63	KY001902.1
3	*Chrysomya megacephala* voucher CM01	KT894991.1
4	*Chrysomya megacephala* haplotype X	KM434364.1
5	*Chrysomya megacephala* isolate Mg1	KM873618.1

ตาราง 17 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya pinguis* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Chrysomya pinguis* voucher WVU2009-017-12	FJ195381.1
2	*Chrysomya pinguis* voucher Cp-L6	KX096342.1
3	*Chrysomya pinguis* voucher CP21-3	KR921614.1

ตาราง 18 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Hemipyrellia ligurriens* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Hemipyrellia ligurriens* isolate CSU160601CB43	KY001908.1
2	*Hemipyrellia ligurriens* isolate Li1	EU880206.1
3	*Hemipyrellia ligurriens* isolate 6	KJ496774.1
4	*Hemipyrellia ligurriens* voucher -HL34-3	KR921676.1

ตาราง 19 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucilia cuprina* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Lucilia cuprina* isolate CSU160708CB36	KY001878.1
2	*Lucilia cuprina* isolate 3	KJ496771.1
3	*Lucilia cuprina* haplotype 2	DQ453495.1

ตาราง 20 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucilia cuprina* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Lucilia papuensis* voucher LuPa20	KT895004.1
2	*Lucilia papuensis* voucher LPA2-1	KR921651.1

ตาราง 21 แมลงวันบ้านชนิด *Atherigona orientalis* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Atherigona orientalis* isolate XGZ-5	MG708353.1
2	*Atherigona orientalis* isolate XGZ-4	MG708352.1
3	*Atherigona orientalis* isolate XGZ-2	MG708350.1
4	*Atherigona orientalis*	MH155275.1
5	*Atherigona orientalis* isolate 21	KJ496789.1

ตาราง 22 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Hydrotaea chalcogaster* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Hydrotaea chalcogaster* isolate CSU130701CB84	KY001846.1
2	*Hydrotaea chalcogaster* isolate 20	KJ496788.1
3	*Hydrotaea chalcogaster* strain 160C-2	KM497270.1
4	*Hydrotaea chalcogaster*	KF562114.1

ตาราง 23 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Hydrotaea spinigera* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Hydrotaea spinigera*	KP407084.1
2	*Hydrotaea spinigera* isolate 18	KJ496786.1
3	*Hydrotaea spinigera* isolate CSU160701CB79	KY001840.1
4	*Hydrotaea spinigera* isolate CSU170701CB20	MF511749.1

ตาราง 24 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Musca domestica* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Musca sp. FNK-2013*	KC855278.1
2	*Musca sp. 73 AV-2017*	MF059326.1
3	*Musca domestica isolate CSU140601CBJIA4*	KY001857.1
4	*Musca domestica isolate Do2*	JX861432.1
5	*Musca domestica isolate C51*	JQ246703.1
6	*Musca domestica*	KF562113.1
7	*Musca domestica*	KR262647.1
8	*Musca domestica*	MG557665.1

ตาราง 25 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Synthesiomyia nudiseta* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Synthesiomyia nudiseta* isolate CSU160701CB23	KY001859.1
2	*Synthesiomyia nudiseta*	KF562117.1

ตาราง 26 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

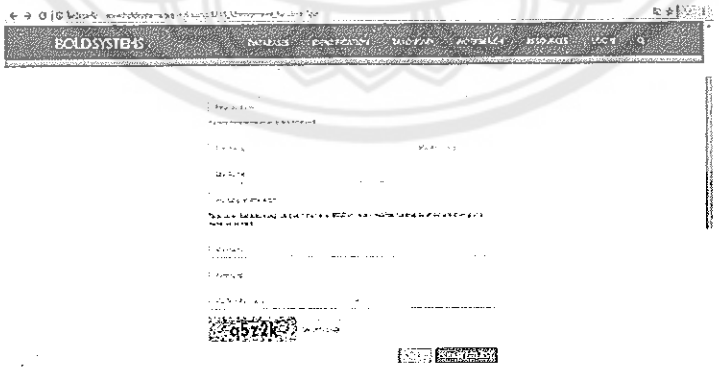
ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Sarcophaga peregrina* isolate 26	KJ496794.1
2	*Sarcophaga peregrina* isolate PBS15	KC855283.1
3	*Sarcophaga peregrina* voucher CSU130512CS18	KF037991.1
4	*Sarcophaga peregrina* strain 69M1	KJ129239.1
5	*Sarcophaga peregrina* strain 69H1	KJ129230.1
6	*Sarcophaga peregrina* voucher KM714	JN965026.1
7	*Sarcophaga peregrina* voucher S-CH9	EF405928.1
8	*Sarcophaga peregrina*	AF259509.1

ตาราง 27 แมลงวันหัวเขียวชนิด *Sarcophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากฐานข้อมูล NCBI ที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิงในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับที่	ชนิด (species)	Accession No.
1	*Sarcophaga dux* voucher PD53e4	MH765526.1
2	*Sarcophaga dux* isolate SCU1173SdC1	KC249713.1
3	*Sarcophaga dux* voucher PDf1	MH765521.1
4	*Sarcophaga dux* voucher PDf3	MH765523.1
5	*Sarcophaga dux* isolate S3	JX187399.1
6	*Sarcophaga dux* voucher S132	EF405938.1
7	*Sarcophaga dux*	KP407085.1
8	*Sarcophaga dux* isolate 28	KJ496796.1

การบันทึกข้อมูลใน BOLD

ขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้อ้างอิงวิธีการของ Wilson (2012) โดยผู้วิจัยต้องทำการลงทะเบียนในฐานข้อมูล Barcode of Life Data Systems (BOLD) (https://boldsystems.org) เพื่อทำการสร้างโครงการศึกษาขึ้นมา โดยทำการกรอกรายละเอียดของข้อมูลที่จะลงทะเบียนฐานข้อมูลให้ละเอียด แล้วทำการบันทึกข้อมูล ดังภาพ 17



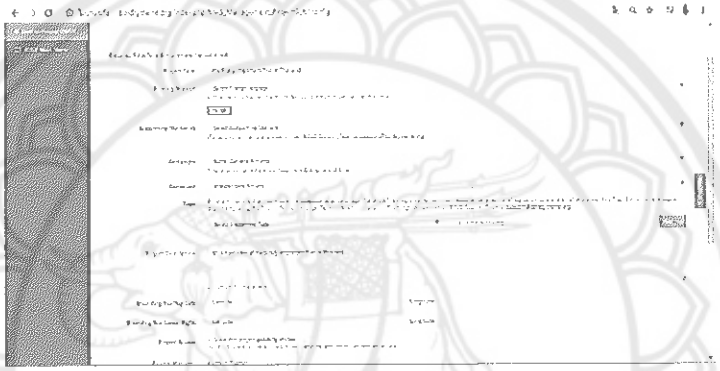
ภาพ 17 ตัวอย่างการลงทะเบียนในฐานข้อมูล Barcode of Life Data Systems (BOLD)

ที่มา: https://boldsystems.org

เมื่อลงทะเบียนในฐานข้อมูล BOLD เรียบร้อยแล้ว ทำการ Log In เข้าสู่ระบบฐานข้อมูล เพื่อทำการสร้างโครงการวิจัยที่ศึกษาลงในฐานข้อมูล ซึ่งมีขั้นตอนการสร้างโครงการวิจัย ดังนี้

1. การสร้างโครงการศึกษาสำหรับงานวิจัย

ตั้งชื่อโครงการที่ต้องบันทึกข้อมูล ทำการกรอกรายละเอียดของข้อมูลที่จะบันทึก (โดยเฉพาะข้อมูลที่มีหัวข้อตัวหนังสือสีแดง) แล้วทำการบันทึกข้อมูล ซึ่งในระบบฐานข้อมูล BOLD สามารถที่จะบันทึกรายการได้ 999 รายการต่อ 1 โครงการที่บันทึกไว้ แต่ถ้าจะทำการบันทึกรายการมากกว่านี้จะต้องทำการสร้างฐานข้อมูลโครงการขึ้นมาใหม่ ดังภาพ 18



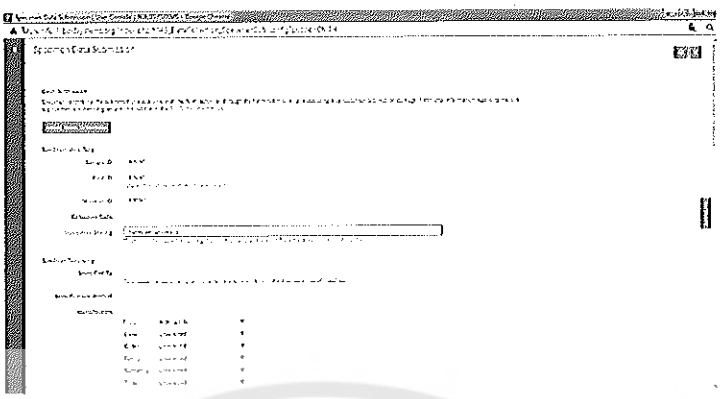
ภาพ 18 ตัวอย่างการสร้างโครงการศึกษาสำหรับงานวิจัยในฐานข้อมูล BOLD

2. การบันทึกข้อมูลวิจัยลงในโครงการการศึกษาที่บันทึกอยู่ในฐานข้อมูล BOLD

การบันทึกข้อมูลตัวอย่างงานวิจัยลงในโครงการการศึกษา สามารถบันทึกข้อมูลได้ 2 วิธีการ ดังนี้

2.1 การบันทึกข้อมูลตัวอย่างงานวิจัยแบบครั้งละ 1 ตัวอย่าง

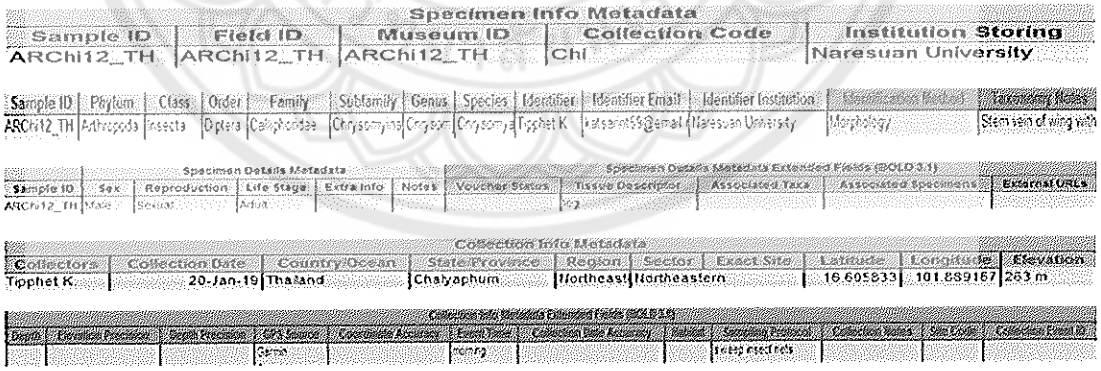
เปิดโครงการวิจัยสำหรับการบันทึกข้อมูลตัวอย่าง กดเลือก "Specimen Data" ในหัวข้อ Uploads จากนั้นกรอกข้อมูลที่ต้องการบันทึก โดยเฉพาะข้อมูลในหัวข้อที่มีตัวหนังสือสีแดงกำกับ ซึ่งหัวข้อ Sample ID, Field ID และ Museum ID ต้องตั้งชื่อตัวอย่างให้ตรงกัน เมื่อกรอกข้อมูลเรียบร้อยแล้วก็ทำการบันทึกข้อมูล ดังภาพ 19



ภาพ 19 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลวิจัยลงในโครงการการศึกษาที่อยู่ในฐานข้อมูล BOLD

2.2 การบันทึกข้อมูลตัวอย่างงานวิจัยแบบทั้งหมดทุกตัวอย่าง

เปิดโครงการวิจัยสำหรับการบันทึกข้อมูลตัวอย่าง แล้วกดเลือก "Specimen Data" ในหัวข้อ Uploads จากนั้นกด "BOLD documentation" เพื่อดาวน์โหลดแบบฟอร์ม "Template Version 3.0.xls" แล้วทำการกรอกข้อมูลที่ต้องการบันทึกให้ละเอียด (ภาพ 20) เมื่อกรอกข้อมูลเรียบร้อยแล้วทำการบันทึกข้อมูล จากนั้น Uploads ไฟล์ข้อมูลลงใน Initiate Batch Submission กดเลือกหัวข้อ New เมื่อเลือกแล้วทำการกด Next เลือกไฟล์ข้อมูลที่กรอกเรียบร้อยแล้ว และกด Submit เพื่อบันทึกข้อมูล

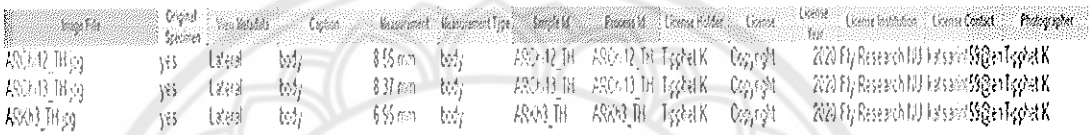


ภาพ 20 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลตัวอย่างวิจัยลงในแบบฟอร์ม Template Version 3.0.xls

3. การบันทึกรูปภาพตัวอย่างวิจัยลงในโครงการการศึกษาที่บันทึกอยู่ในฐานข้อมูล BOLD

3.1 การเตรียมแบบฟอร์มข้อมูลรูปภาพ

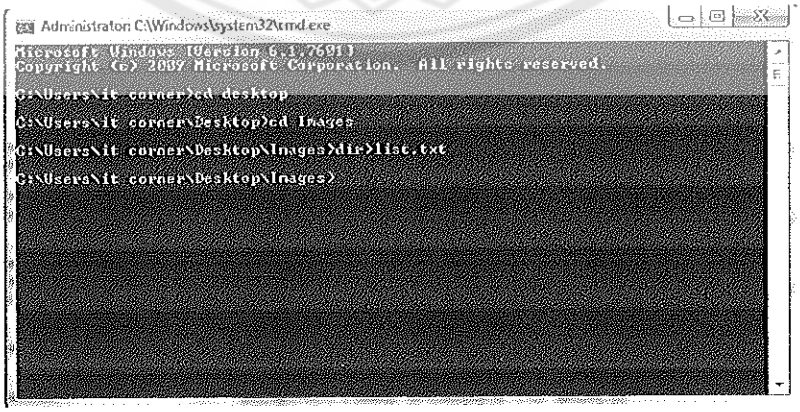
เปิดโครงการวิจัยสำหรับการบันทึกข้อมูลตัวอย่าง แล้วกดเลือก "Specimen Image" ในหัวข้อ Uploads จากนั้นกดดาวน์โหลดแบบฟอร์ม"Image Version 3.0.xls" แล้วทำการกรอกข้อมูลรูปภาพที่ต้องการบันทึกให้ละเอียด โดยข้อมูล Image File จะต้องตรงกับชื่อ Sample ID (ภาพ 21) และทำการบันทึกข้อมูลในโฟล์เดอร์ Image



ภาพ 21 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลรูปภาพลงในแบบฟอร์ม Image Version 3.0.xls

3.2 การเตรียมโฟลเดอร์รูปภาพ

บันทึกรูปภาพตัวอย่างวิจัยให้อยู่ในสกุลไฟล์ .jpg ตั้งชื่อรูปภาพให้ตรงกับชื่อ Image File ที่บันทึกไว้ในแบบฟอร์มข้อมูลรูปภาพ โดยขนาดโฟลเดอร์รูปภาพทั้งหมดต้องไม่เกิน 20 megapixed ซึ่งบันทึกชื่อโฟล์เดอร์ว่า "Image" ที่หน้า desktop จากนั้นทำโฟล์เดอร์ Image ให้อยู่ในสกุล .zip โดยเปิด windown กด Start, Run, cmd และกด OK แล้วทำการกรอกข้อมูล "cd desktop; กด enter, cd Images; กด enter, dir > list.txt; กด enter. ลงในหน้า Windows (ภาพ 22) แล้วคลิกขวาที่โฟล์เดอร์ Image เลือก Winzip และกด Add to Image.zip



ภาพ 22 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลลงโปรแกรม cmd

3.3 การบันทึกโฟลเดอร์รูปภาพลงในฐานข้อมูล BOLD

เปิดโครงการวิจัยสำหรับการบันทึกข้อมูลตัวอย่าง แล้วกดเลือก "Specimen Image" ในหัวข้อ Uploads เลือกโฟลเดอร์ Image.zip ลงในช่อง JPEG Image Files in Zip archive และกด Submit เพื่อบันทึกข้อมูล โดยการบันทึกรูปภาพตัวอย่างลงในฐานข้อมูล BOLD นั้น ต้องทำหลังจากการบันทึกข้อมูลตัวอย่างงานวิจัยในโครงการการศึกษาที่ถูกสร้างขึ้นเรียบร้อยแล้วเท่านั้น

4 การบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) ของตัวอย่างวิจัยลงในโครงการการศึกษาที่บันทึกอยู่ในฐานข้อมูล BOLD

เปิดโครงการวิจัยสำหรับการบันทึกข้อมูลตัวอย่าง แล้วกดเลือก "Sequences" ในหัวข้อ Uploads จากนั้นกดเลือก Select ID ให้ตรงกับตัวอย่างวิจัย กรอกข้อมูลลงในช่อง Run site และ กรอกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) ลงในช่อง Paste sequences in fasta format โดยรูปแบบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) จะต้องอยู่ในรูปแบบของไฟล์ Fasta เท่านั้น และชื่อของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) จะต้องให้ตรงกับชื่อ Sample ID (ภาพ 23) และกด Submit เพื่อบันทึกข้อมูล

ภาพ 23 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงวัน

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างแมลงวันในพื้นที่ทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย ประกอบด้วยพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ เชียงใหม่ ชลบุรี นครสวรรค์ ปัตตานี พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ แพร่ มหาสารคาม ราชบุรี สกลนคร สงขลา อุตรดิตถ์ และอุบลราชธานี (ตาราง 11) โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันด้วยการใช้สวิงโฉบ และกับดัก ชนิดโคมดักแมลงวันพลาสติก จำนวนทั้งสิ้น 3,199 ตัว แมลงวันที่เก็บได้ประกอบด้วย วงศ์ Calliphodae วงศ์ Muscidae และวงศ์ Sarcophagidae ซึ่งสามารถจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ดังนี้

1. วงศ์ Calliphodae

กลุ่มแมลงวันในวงศ์ Calliphodae โดยทั่วไปจะมีลักษณะลำตัวเป็นสีเขียวสะท้อนแสง มี Meral setae มี Notopleural setae อยู่ 2-3 เส้น ไม่มีแถบสีดำที่ส่วนอก ซึ่งแมลงวันแต่ละชนิดที่จัดอยู่ในวงศ์ Calliphodae นั้น จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

1.1 กลุ่มที่มี Stem vein และ มีขนที่ Prealar knob

1.1.1 มี Sternopleual bristle (*st*) 0+1 และเพศผู้ และเพศเมียที่ลักษณะตาที่ห่างกัน คือ แมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes* (ภาพ 27)

1.1.2 มี Sternopleual bristle (*st*) 1+1 และเพศผู้ที่ลักษณะตาที่ชิดกัน และเพศเมียที่ลักษณะตาที่ห่างกัน คือ

1.1.2.1 มี outter vertical bristle developed (*ov*) ในเพศผู้ และเพศเมียไม่มี frontal-orbital bristle developed (*ors*) ในเพศเมีย และช่วงท้องปล้องที่ 5 (Tergite 5) ของเพศเมียมีรอยแยกตรงกลางของปล้อง ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ

1) *Chrysomya (Achoetandrus) rufifacies* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ลำตัวเป็นสีเขียวสะท้อนแสง มีรูหายใจส่วนหน้า (Mesothoracic spiracle) สีขาว แก้ม (gena) มีลักษณะขนสีขาว ส่วนปล้องขามีลักษณะที่ไม่มีอวบอ้วนทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (ภาพ 24)

2) *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ลำตัวเป็นสีเขียวสะท้อนแสง มีรูหายใจส่วนหน้า (Mesothoracic

spiracle) สีดำ หรือสีน้ำตาลออกดำ แก้ม (gena) มีลักษณะขนสีดำเทา ส่วนปล้องขามีลักษณะที่อวบอ้วนทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แต่ส่วนมากปล้องขาจะมีลักษณะอวบอ้วนในเพศผู้มากกว่า (ภาพ 25)

1.1.2.2 ไม่มี outter vertical bristle developed (*ov*) ในเพศผู้ มี frontal-orbital bristle developed (*ors*) แบบ 2+1 ในเพศเมีย และช่วงท้องปล้องที่ 5 (Tergite 5) ของเพศเมียไม่มีรอยแยกตรงกลางของปล้อง ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 4 ชนิด คือ

1) *Chrysomya bezziana* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ เส้นขนที่ lower squama มีลักษณะสีขาว รูหายใจส่วนหน้า (Mesothoracic spiracle) มีขนาดเล็กกว่าหนวดปล้องที่ 3 (antenna sement; AS) โดยขนที่อยู่ในส่วนของ parafrontal และ gena มีลักษณะสีเหลือง หรือส้มอมเหลือง และเพศผู้มีลักษณะของตาส่วนบนที่ไม่ความแตกต่างกัน ซึ่งส่วนมากแมลงวันชนิดนี้สามารถพบได้ในป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ (ภาพ 26)

2) *Chrysomya megacephala* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ เส้นขนที่ lower squama มีลักษณะสีน้ำตาลดำ รูหายใจส่วนหน้า (Mesothoracic spiracle) มีขนาดใหญ่กว่าหนวดปล้องที่ 3 (antenna sement; AS) โดยขนที่อยู่ในส่วนของ parafrontal และ gena มีลักษณะสีเหลือง หรือส้มอมเหลือง และเพศผู้มีลักษณะของตาส่วนบนที่ความแตกต่างกัน (ภาพ 29)

3) *Chrysomya chani* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ เส้นขนครึ่งหนึ่ง (anterior half) ของ upper squama มีลักษณะสีขาว รูหายใจส่วนหน้า (Mesothoracic spiracle) มีขนาดใหญ่ และกว้างกว่าหนวดปล้องที่ 3 (antenna sement; AS) โดยขนที่อยู่ในส่วนของ parafrontal และ gena มีลักษณะสีดำ และเพศผู้มีลักษณะของตาที่นูนเป็นครึ่งวงกลม คล้ายลูกบอล (ภาพ 28)

4) *Chrysomya pinguis* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ลำตัวเป็นสีเขียวออกน้ำเงิน หรือสีเขียวเหลือบม่วง เส้นขนครึ่งหนึ่ง (anterior half) ของ upper squama มีลักษณะสีดำน้ำตาล มีเส้นขนตรงตำแหน่งของ posthumeral bristles (ph) โดยขนที่อยู่ในส่วนของ parafrontal และ gena มีลักษณะสีดำ และเพศผู้มีลักษณะของตาไม่นูนเป็นครึ่งวงกลม คล้ายลูกบอล (ภาพ 30)

1.2 กลุ่มที่ไม่มี Stem vein ไม่มีขนที่ anterior lappet ของ metathoracic spiracle และมี postscutellum มีลักษณะที่แบน ไม่นูน

1.2.1 Supraspiracular convexity ไม่มีขน หรือมีขนที่สั้น ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 3 ชนิด คือ

1.2.1.1 *Lucilia cuprina* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ สีของลำตัวเป็นสีเขียวเหลืองออกทองแดงสะท้อน ปล้องอกส่วนที่ 2 (postsutural) มีเส้นขนขึ้นทั้ง 3 คู่ ตรงตำแหน่ง acrostichal bristles (ac) (ภาพ 32)

1.2.1.2 *Lucilia papuensis* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ สีของลำตัวเป็นสีเขียวสะท้อนแสง ด้านหลังของ postocular ของส่วนหัว มีลักษณะเส้นขนขึ้นเรียงกันทั้งหมด 2 แถว ปล้องอกส่วนที่ 2 (postsutural) มีเส้นขนขึ้นทั้ง 2 คู่ ตรงตำแหน่ง acrostichal bristles (ac) และขอบด้านล่างของ upper squama มีเส้นขนสีน้ำตาลดำ (ภาพ 33)

1.2.2 Supraspiracular convexity มีขนที่ หรือมีขนที่สั้น ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 3 ชนิด คือ

1.2.2.1 *Hemipyrellia ligurriens* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ สีของลำตัวเป็นสีเขียวสะท้อน โดยปล้องท้องส่วนที่ 3 มีลักษณะสีเขียวออกโลหะ หนวดคู่ที่ 3 (antenna sement; AS) มีลักษณะสีน้ำตาลดำ และขาของเพศผู้และเพศเมียจะไม่มีขนที่ยาว (ภาพ 31)

2. วงศ์ Muscidae

กลุ่มแมลงวันในวงศ์ Muscidae โดยทั่วไปจะมีลักษณะลำตัวส่วนใหญ่เป็นสีน้ำตาลเทา บางชนิดจะมีลักษณะลำตัวสีดำหรือสีเขียวสะท้อน คล้ายแมลงวันในวงศ์ Calliphodae แต่มีขนาดที่เล็กกว่า ไม่มี Meral setae และมีแถบสีดำบริเวณส่วนอก 4 แถบ ซึ่งแมลงวันแต่ละชนิดที่จัดอยู่ในวงศ์ Muscidae นั้น จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

2.1 กลุ่มที่ pteropleuron ขน มีปากแบบดูดซับ และ palpus มีลักษณะปกติ ไม่พองตรงปลาย

2.1.1 ปลายเส้นปีกของตำแหน่ง M1+2 มีลักษณะหักโค้ง ตำแหน่ง lower squama มีลักษณะเรียบ โดย prosternum มีลักษณะปกติ ไม่มีขน ส่วนหัวของตำแหน่ง face มีลักษณะปกติ ไม่นูน ไม่มีขน และไม่โค้ง ส่วนขาคู่ที่ 2 (mid) ของตำแหน่ง tibia มีขน posterior (*p*) 2-5 เส้น ไม่มีขนตรง posteroventral (*pv*) มีขนที่ Stem vein และ มีขนที่ propleuron คือ แมลงวันชนิด *Musca domestica* (ภาพ 35)

2.2 กลุ่มที่ pteropleuron ไม่มีขน ขาคู่ที่ 3 (Hind) ของตำแหน่ง tibia มีขน posterodosal (*pd*) 1-2 เส้น โดยเส้นขน posterodosal (*pd*) จะมีลักษณะเส้นเล็ก 1 เส้น และเส้นยาว 2 เส้น และมี sternite (*st*) แบบ 1+1

2.2.1 ด้านในของตำแหน่ง lower squama มีลักษณะแคบ แต่มีขนาดกว้างตรงขอบของ lower squama โดยส่วนของ hypopleuron มีขน ซึ่งส่วน arista จะไม่มีขน เส้นปีกของตำแหน่ง R5 มีลักษณะที่กว้างกว่าเส้นปีกในตำแหน่ง r-m เพียงเล็กน้อย ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 1 ชนิด คือ

2.2.1.1 *Synthesomyia nudiseta* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ตามีลักษณะที่แยกออกจากกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย ส่วนของ antenna และ paipi เป็นสีส้มเข้ม ส่วนปล้องอกจะมีเส้นรอยดำทั้งหมด 4 เส้น ซึ่งส่วนขาจะมีลักษณะเป็นสีดำยกเว้นปลายขาด้านล่างจะมีลักษณะเป็นสีส้ม และตำแหน่ง femur จะพบเส้นขน posteroventral (*pv*) เรียงเป็นแถว รวมถึงขาคู่ที่ 3 ตำแหน่ง tibia พบขน posterodosel (*pd*) 2 เส้น และขน anterodosal (*ad*) 2 เส้น (ภาพ 38)

2.2.2 ด้านในของตำแหน่ง lower squama มีลักษณะกว้าง แต่มีลักษณะกลมมนตรงขอบของ lower squama โดยส่วน arista จะมีขนที่สั้น หรือเกือบไม่มีขน และตำแหน่งของ sternopleural bristles (*stpl*) เป็นแบบ 1+1 ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ

2.2.2.1 *Hydrotaea spinigera* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ลำตัวมีลักษณะสีดำไม่สะท้อน และขอบของ posterior ตรงส่วนตา มีลักษณะที่เว้านูน (ภาพ 37)

2.2.2.2 *Hydrotaea chalogaster* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ลำตัวมีลักษณะสีดำไม่สะท้อน และขอบของ posterior ตรงส่วนตา มีลักษณะตรง ที่ไม่เว้านูน โดยเพศผู้จะมีขาคู่ที่ 3 ส่วน tibia ที่ตรง ไม่โค้ง ซึ่งส่วนฐานหนวด (aristae) ของเพศเมีย ค่อนข้างจะแดง และมีขาคู่ที่ 3 ส่วน tibia พบ anteroventral จำนวน 1 เส้น รวมถึง tarsal จะมีลักษณะเป็นสีเหลือง (ภาพ 36)

2.3 กลุ่มที่ pteropleuron ไม่มีขน ขาคู่ที่ 3 (Hind) ของตำแหน่ง tibia มีขน posterodosal (*pd*) ที่ยาว 2 เส้น และ sternite 3 (*st*) มีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมด้านเท่า ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 1 ชนิด คือ

2.2.3.1 *Atherigona orientais* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ palpus มีลักษณะสั้น และปลายจะบานออก หรือขยาย และขา ตำแหน่ง fore tarsomere ไม่มีขน (ภาพ 34)

3. วงศ์ Sacophagidae

กลุ่มแมลงวันในวงศ์ Sacophagidae โดยทั่วไปจะมีลักษณะลำตัวเป็นสีเทาดำ มี Meral setae มี Notopleural setae อยู่ 4 เส้น และมีแถบสีดำบริเวณส่วนอก 3 แถบ ซึ่งแมลงวันแต่ละชนิดที่จัดอยู่ในวงศ์ Sacophagidae นั้น จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

3.1 กลุ่มมีขนที่ Hypopleural ซึ่งไม่มีขนที่ Postscutellum ตำแหน่ง notopleural มี 4 เส้น และลำตัวมีลักษณะเป็นสีเทา โดยมีจุดดำอยู่ตรงส่วนท้อง

3.1.1 หนวดส่วน arista จะมีขนยาว ทั้ง 2 ข้าง ส่วน abdominal sternites (*st*) เป็นแบบ 1+1+1 ลำตัวมีลักษณะเป็นสีเทาออกดำ ส่วนท้องมีลักษณะเป็นจุดสีดำคล้ายตารางหมากรุก ซึ่งส่วนหัว ตำแหน่ง frontal bristles (*ori*) มีลักษณะขนที่กระจายเต็มส่วน lunule แก้ม (gena) มีลักษณะขนสีดำ โดยส่วนอก ตำแหน่ง dorso-central distinct (*dc*) มีการพัฒนาขนทั้งหมด 5 คู่ และส่วนเส้นปีก first longitudinal (R_1) จะไม่มีขน ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 2 สกุล คือ

3.1.1.1 กลุ่ม propleuron มีขน ส่วนอก ตำแหน่ง discal scutella bistles (*dsc*) มีขน 1 คู่ โดยส่วนท้องของเพศผู้ในตำแหน่ง abdominal sternites (st_4) ที่ 4 มีขนที่ค่อนข้างยาว และส่วนขาคู่ที่ 3 ของเพศเมีย ในตำแหน่ง tibia จะไม่มีขน ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 1 ชนิด คือ

1) *Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ส่วนแก้ม (gena) มีลักษณะขนที่เป็นสีเหลือง ส่วนท้องมีลักษณะสีเทาจุดที่ตำแหน่ง tergite 3-5 aedeagus มีลักษณะปลายโค้งมน pregonite จะยืดตามยาว มีลักษณะที่เรียว และส่วนปลายของ cercus ไม่มีอวบ (ภาพ 39)

3.1.1.2 กลุ่ม propleuron ไม่มีขน ส่วนขาคู่ที่ 2 ตำแหน่ง tibia ไม่มีขน ในเพศผู้ ส่วนเพศเมีย ตำแหน่ง tergite ที่ 6 มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ และส่วนตำแหน่ง R_1 ของเส้นปีกจะไม่มีเส้นขนอยู่บนพื้นผิวด้านหลัง ซึ่งแมลงวันที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 1 ชนิด คือ

1) *Sarcophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* โดยแมลงวันชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ palpus มีลักษณะน้ำตาลอมดำ ส่วนขาคู่ที่ 2 ตำแหน่ง posteroventral (*pv*) มีลักษณะขนคล้ายหวี ซึ่งขาคู่ที่ 3 ตำแหน่ง tibia มีขนเป็นเส้นเล็ก ส่วนท้อง

ตำแหน่ง sternite มีเส้นขน 2-3 เส้น ตำแหน่ง ventralia จะไม่มี pedunculated และตำแหน่ง cerus มีลักษณะรูปร่างเรียว ไม่มีหนาม รวมถึงส่วนปลายของตำแหน่ง juxta มีลักษณะเป็นแฉก (ภาพ 40)

ตาราง 28 การระบุชนิดตัวอย่างแมลงวันในพื้นจังหวัดของ 6 ภูมิภาคในประเทศไทย

ภาค	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ตำแหน่งพื้นที่เก็บตัวอย่าง	กลุ่มแมลงวันที่เก็บตัวอย่าง (Family)	แมลงวันที่จัดจำแนกชนิด (Species)	จำนวนตัวอย่างแมลงวัน (ตัว)
ภาคเหนือ	อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่	18°45'56.0"N 98°55'40.0"E	- Calliphoridae	- *Chrysomya bezziana*	4
			- Muscidae	- *Hydrotaea chalcogaster*	5
			- Sarcophagidae	- *Hydrotaea spinigera*	5
				- *Musca domestica*	5
				- *Synthesiomyia nudiseta*	5
				- *Sarcophaga (Boettcherisca) peregrina*	6
				- *Sarcophaga (Parasarcophaga) dux*	6
	ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก	16°43'32.8"N 100°39'24.4"E	- Calliphoridae	- *Chrysomya (Achoetandrus) rufifacies*	20
			- Muscidae	- *Chrysomya (Achoetandrus) villeneuvi*	5
				- *Chrysomya (Ceylonomyia) nigripes*	4
				- *Chrysomya chani*	3
				- *Chrysomya megacephala*	500
				- *Chrysomya pinguis*	3
				- *Hypopygiosis ligurriens*	4

ตาราง 28 (ต่อ)

ภาค	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ตำแหน่งพื้นที่เก็บตัวอย่าง	กลุ่มแมลงวันที่เก็บตัวอย่าง (Family)	แมลงวันที่จัดจำแนกชนิด (Species)	จำนวนตัวอย่างแมลงวัน (ตัว)
เหนือ				- *Lucilia cuprina*	2
				- *Lucilia papuensis*	20
				- *Atherigona orientalis*	3
				- *Musca domestica*	5
	อำเภอเมือง จังหวัดแพร่	18°08'11.7"N 100°08'48.1"E	Calliphoridae	- *Chrysomya megacephala*	100
	อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	17°41'28.4"N 100°02'45.1"E	- Calliphoridae - Muscidae	- *Chrysomya megacephala* - *Musca domestica*	100 20
กลาง	อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์	15°44'58.6"N 100°05'41.2"E	Calliphoridae	- *Chrysomya megacephala*	300
	อำเภอสามง่าม จังหวัดพิจิตร	16°31'52.8"N 100°13'09.2"E	- Calliphoridae - Muscidae	- *Chrysomya (Achoetandrus) rufifacies* - *Chrysomya megacephala* - *Hydrotaea spinigera* - *Musca domestica*	6 44 3 4

ตาราง 28 (ต่อ)

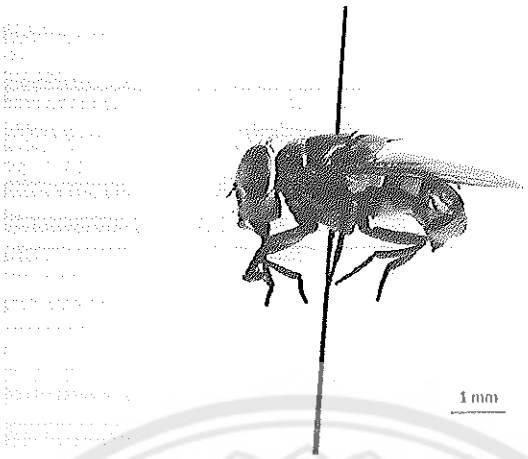
ภาค	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ตำแหน่งพื้นที่เก็บตัวอย่าง	กลุ่มแมลงวันที่เก็บตัวอย่าง (Family)	แมลงวันที่จัดจำแนกชนิด (Species)	จำนวนตัวอย่างแมลงวัน (ตัว)
กลาง	อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์	16°37'46.5"N 100°59'41.2"E	- Calliphoridae - Muscidae	- *Chrysomya (Achoetandrus) rufifacies* - *Chrysomya (Achoetandrus) villeneuvi* - *Hypopygiosis ligurriens* - *Musca domestica*	10 3 4 5
ตะวันตก	อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี	13°46'50.5"N 99°52'00.7"E	Calliphoridae	- *Chrysomya megacephala*	200
ตะวันออก	อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี	13°26'07.4"N 101°10'57.3"E	Calliphoridae	- *Chrysomya megacephala*	200
ตะวันออกเฉียงใต้	อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์	16°24'33.0"N 103°27'37.0"E 16°39'22.9"N 103°27'39.1"E	- Calliphoridae - Muscidae	- *Chrysomya megacephala* - *Musca domestica*	100 3
	อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น	16°24'03.0"N 102°47'17.0"E	- Calliphoridae - Muscidae	- *Chrysomya megacephala* - *Musca domestica*	50 3

ตาราง 28 (ต่อ)

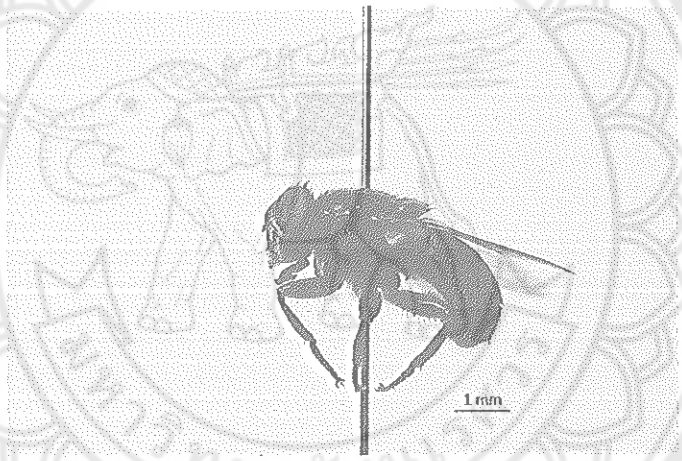
ภาค	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ตำแหน่งพื้นที่เก็บตัวอย่าง	กลุ่มแมลงวันที่เก็บตัวอย่าง (Family)	แมลงวันที่จัดจำแนกชนิด (Species)	จำนวนตัวอย่างแมลงวัน (ตัว)
	อำเภอคอนสาร	16°36'21.0"N	- Calliphoridae	- *Chrysomya (Achoetandrus)*	6
	จังหวัดชัยภูมิ	101°53'21.0"E	- Muscidae	*rufifacies*	40
				- *Chrysomya megacephala*	7
				- *Musca domestica*	
ตะวันออกเฉียงใต้	อำเภอกันทรวิชัย	16°14'54.3"N	Calliphoridae	*Chrysomya megacephala*	400
	จังหวัดมหาสารคาม	103°15'09.0"E			
	อำเภอภูพาน	17°03'30.5"N	- Calliphoridae	- *Chrysomya (Achoetandrus)*	10
	จังหวัดสกลนคร	103°58'18.9"E	- Muscidae	*rufifacies*	95
				- *Chrysomya megacephala*	4
				- *Musca domestica*	
	อำเภอวารินชำราบ	15°07'03.7"N	Calliphoridae	*Chrysomya megacephala*	200
	จังหวัดอุบลราชธานี	104°54'17.1"E			
ใต้	อำเภอโคกโพธิ์	6°40'16.6"N	Calliphoridae	*Chrysomya megacephala*	200
	จังหวัดปัตตานี	101°04'38.0"E			

ตาราง 28 (ต่อ)

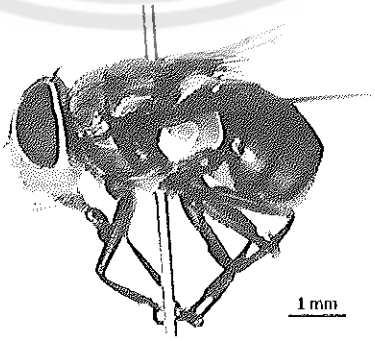
ภาค	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ตำแหน่งพื้นที่เก็บตัวอย่าง	กลุ่มแมลงวันที่เก็บตัวอย่าง (Family)	แมลงวันที่จัดจำแนกชนิด (Species)	จำนวนตัวอย่างแมลงวัน (ตัว)
	อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา	6°41'21.1"N 101°02'45.3"E	Calliphoridae	*Chrysomya megacephala*	250



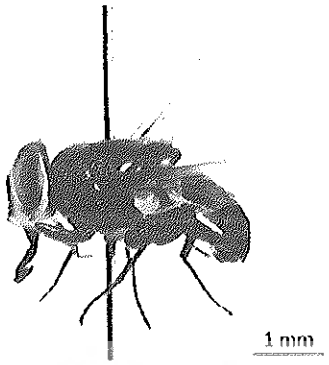
ภาพ 24 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya (Achoetandrus) rufifacies*



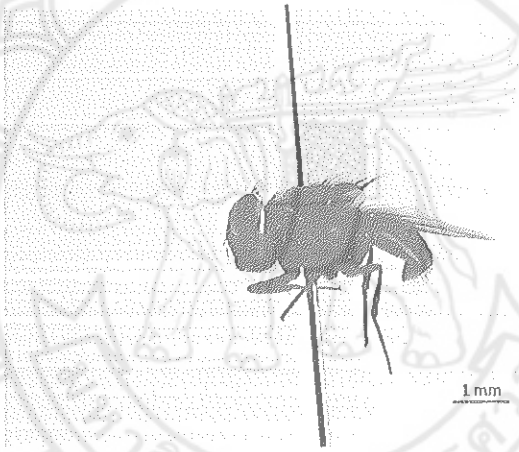
ภาพ 25 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya (Achoetandrus) villeneuvi*



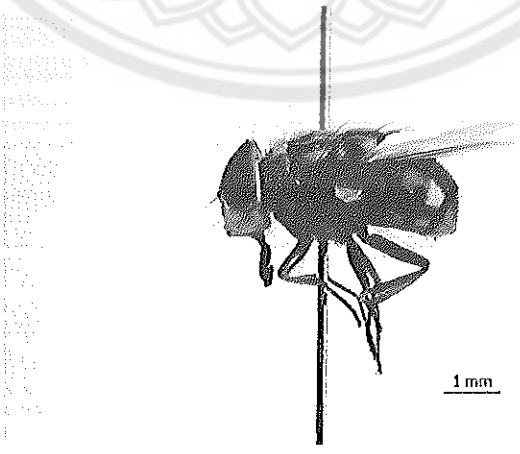
ภาพ 26 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya bezziana*



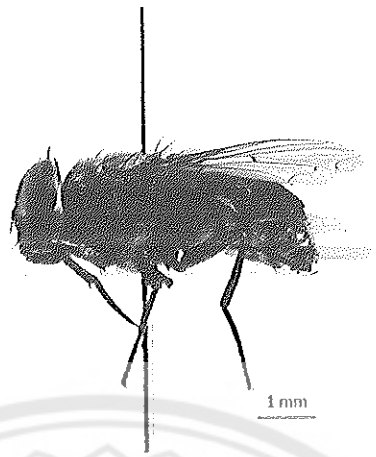
ภาพ 27 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) ***nigripes***



ภาพ 28 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya chani*

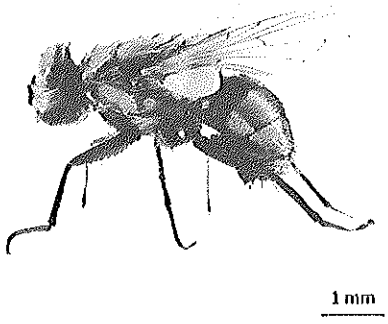


ภาพ 29 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala*

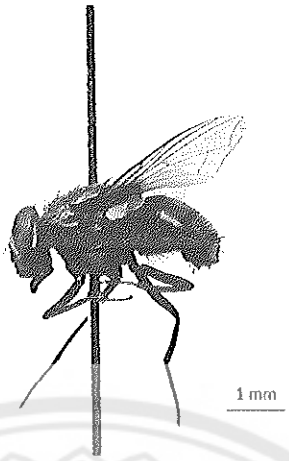


ภาพ 30 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Chrysomya pinguis*

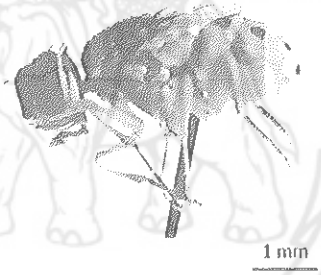
ภาพ 31 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Hemipyrellia ligurriens*



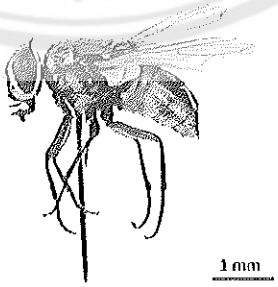
ภาพ 32 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Lucilia cuprina*



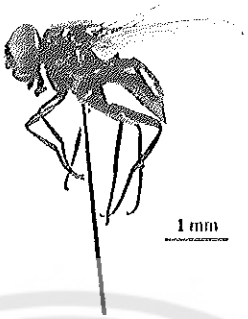
ภาพ 33 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Lucilia papuensis*



ภาพ 34 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Atherigona orientalis*

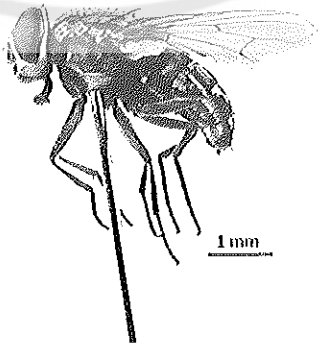


ภาพ 35 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Musca domestica*

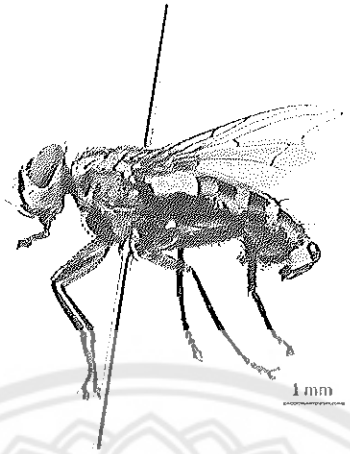


ภาพ 36 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Hydrotaea chalcogaster*

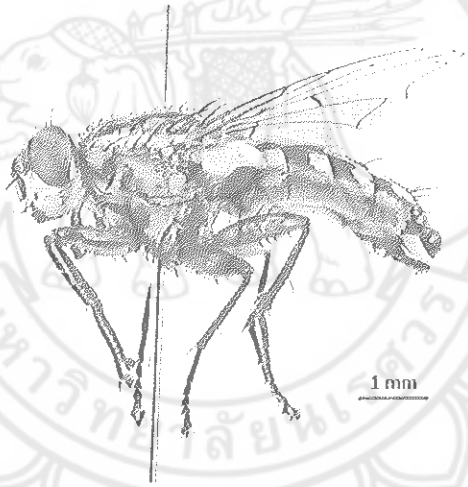
ภาพ 37 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Hydrotaea spinigera*



ภาพ 38 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Synthesiomyia nudiseta*



ภาพ 39 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Sacophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina*



ภาพ 40 ลักษณะสัณฐานวิทยาแมลงวันชนิด *Sacophaga* (*Parasarcophaga*) *dux*

การศึกษาการระบุชนิดแมลงวันด้วยเทคนิค DNA Barcoding

การศึกษาการระบุชนิดแมลงวันด้วยเทคนิค DNA Barcoding มีขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่ การสกัด DNA จากตัวอย่างแมลงวัน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์ข้อมูล

จากการเก็บตัวอย่างแมลงวัน จำนวน 3,199 ตัว ใน 6 ภูมิภาคของประเทศไทย โดยนำมาจัดจำแนกชนิด และวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งใช้ตัวอย่างขาแมลงวันแต่ละชนิดจำนวน 2-3 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ เชียงใหม่ ชลบุรี นครสวรรค์ ปัตตานี พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ แพร่ มหาสารคาม ราชบุรี สกลนคร สงขลา อุตรดิตถ์ และอุบลราชธานี ด้วยเทคนิค

DNA Barcoding โดยที่ใช้ยีน *COI* เข้ามาช่วยในการจำแนกชนิดของแมลงวัน พบว่าแมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies*, *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes*, *Chrysomya chani*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia papuensis* แมลงวันบ้านชนิด *Atherigona orientalis*, *Hydrotaea chalcogaster*, *Hydrotaea spinigera*, *Musca domestica* และ *Synthesiomyia nudiseta* แมลงวันหลังลายชนิด *Sacrophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* และ *Sacrophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* มีผลผลิตพีซีอาร์ (PCR produte) ขนาดประมาณ 710 คู่เบส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *COI* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันทั้ง 17 ชนิด มีจำนวน 644 คู่เบส เมื่อเทียบเคียงกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชนิดแล้วในฐานข้อมูล NCBI จะมีค่าความเหมือนสูงถึง 100% ในแมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies* จำนวน 13 ตัวอย่าง ชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi* จำนวน 1 ตัวอย่าง ชนิด *Chrysomya bezziana* จำนวน 2 ตัวอย่าง ชนิด *Chrysomya chani* จำนวน 2 ตัวอย่าง ชนิด *Chrysomya megacephala* จำนวน 30 ตัวอย่าง ชนิด *Hemipyrellia ligurriens* จำนวน 2 ตัวอย่าง และ ชนิด *Lucilia papuensis* จำนวน 1 ตัวอย่าง แมลงวันบ้านชนิด *Atherigona orientalis* จำนวน 1 ตัวอย่าง ชนิด *Hydrotaea chalcogaster* จำนวน 2 ตัวอย่าง ชนิด *Hydrotaea spinigera* จำนวน 1 ตัวอย่าง ชนิด *Musca domestica* จำนวน 10 ตัวอย่าง และ ชนิด *Synthesiomyia nudiseta* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันหลังลายชนิด *Sacrophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตาราง 12)

โดยแมลงวันที่มีค่าความเหมือนอยู่ระหว่าง 95.29-99.83% คือ แมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes* จำนวน 2 ตัวอย่าง ชนิด *Chrysomya chani* จำนวน 2 ตัวอย่าง ชนิด *Chrysomya megacephala* จำนวน 1 ตัวอย่าง ชนิด *Chrysomya pinguis* จำนวน 2 ตัวอย่าง ชนิด *Hemipyrellia ligurriens* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ ชนิด *Lucilia papuensis* จำนวน 5 ตัวอย่าง แมลงวันบ้านชนิด *Atherigona orientalis* จำนวน 1 ตัวอย่าง ชนิด *Hydrotaea spinigera* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ ชนิด *Musca domestica* จำนวน 2 ตัวอย่าง และ แมลงวันหลังลายชนิด *Sacrophaga* (*Boettcherisca*) *peregrine* จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตาราง 29)

ตาราง 29 แสดงผลการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ของตัวอย่างแมลงวันในพื้นจังหวัดของ 6 ภูมิภาคในประเทศไทย

Sample code	Maximum identity to	BLASTN in Genbank					BIN in BOLD System
		Accession number	Total score	Query coverage	E-value	Identity	
ARChi12_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARChi13_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARKh3_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARKh4_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARKS3_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARKS14_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARPb28_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARPhi2_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARPhi5_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARPL3_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARPL5_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARSak1_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
ARSak2_TH	*Chrysomya rufifacies*	MG816778.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAB3064
AVPb3_TH	*Chrysomya villeneuvi*	KY020754.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:ACD5557
CNPL53_TH	*Chrysomya nigripes*	KY020762.1	1112	100%	0	99.83%	BOLD:AAD0731
CNPL92_TH	*Chrysomya nigripes*	KY020762.1	1112	100%	0	99.83%	BOLD:AAD0731
CBCM1_TH	*Chrysomya bezziana*	MK167359.1	1108	96%	0	100.00%	BOLD:AAC4787
CBCM2_TH	*Chrysomya bezziana*	MK167359.1	1108	96%	0	100.00%	BOLD:AAC4787

ตาราง 29 (ต่อ)

Sample code	Maximun identity to	BLASTN in Genbank					BIN in BOLD System
		Accession number	Total score	Query coverage	E-value	Identity	
CCPT21_TH	*Chrysomya chani*	MG383395.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:ACD4569
CCPT112_TH	*Chrysomya chani*	MG383395.1	1154	100%	0	99.83%	BOLD:ACD4569
CCPT221_TH	*Chrysomya chani*	MG383395.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:ACD4569
CMBM6_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMBM9_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMChai1_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMChB1_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMChB2_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMCR2_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMKh2_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMKh5_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMKS2_TH	*Chrysomya megacephala*	MG816777.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMPN4_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMPb4_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMPb5_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667

ตาราง 29 (ต่อ)

Sample code	Maximum identity to	BLASTN in Genbank					BIN in BOLD System
		Accession number	Total score	Query coverage	E-value	Identity	
CMPL2_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMPL56_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMRB102_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMPhi1_TH	*Chrysomya megacephala*	MG816777.1	1074	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMPhi13_TH	*Chrysomya megacephala*	MG816777.1	1074	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMTM16_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMTM74_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMMS1_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMMS2_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMSak12_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMSak14_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMUR1_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMUR2_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CMUT1_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667

ตาราง 29 (ต่อ)

Sample code	Maximun identity to	BLASTN in Genbank					BIN in BOLD System
		Accession number	Total score	Query coverage	E-value	Identity	
CMUT2_TH	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA5667
CM PSe1_Lao	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	-
CMPSe2_Lao	*Chrysomya megacephala*	MG816777.1	1125	100%	0	99.83%	-
CMPSe3_Lao	*Chrysomya megacephala*	MF059330.1	1154	100%	0	100.00%	-
CpiPL15_TH	*Chrysomya pinguis*	KR921616.1	1148	100%	0	99.83%	BOLD:ACF0516
CpiPL31_TH	*Chrysomya pinguis*	KY020781.1	1148	100%	0	99.83%	BOLD:ACF0516
HeliPb78_TH	*Hemipyrellia ligurriens*	KY001908.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAE4423
HeliPL36_TH	*Hemipyrellia ligurriens*	KY001908.1	1148	100%	0	99.83%	BOLD:AAE4423
HeliPL127_TH	*Hemipyrellia ligurriens*	KY001908.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAE4423
LcuPL1_TH	*Lucilia cuprina*	MK547634.1	1154	100%	0	100.00%	-
LcuPL2_TH	*Lucilia cuprina*	MK547634.1	1154	100%	0	100.00%	-
LPaPb9_TH	*Lucilia papuensis*	KT895003.1	1154	100%	0	100.00%	-
LPaPL7_TH	*Lucilia papuensis*	KY031743.1	1044	100%	0	96.83%	-
LPaPL27_TH	*Lucilia papuensis*	KY031743.1	1044	100%	0	96.83%	-
LPaPL69_TH	*Lucilia papuensis*	KY031743.1	1044	100%	0	96.83%	-

ตาราง 29 (ต่อ)

Sample code	Maximum identity to	BLASTN in Genbank					BIN in BOLD System
		Accession number	Total score	Query coverage	E-value	Identity	
LPaPao104_TH	*Lucilia papuensis*	KY031743.1	1044	100%	0	96.83%	-
LPaPao105_TH	*Lucilia papuensis*	KY031743.1	1044	100%	0	96.83%	-
AoriPL1_TH	*Atherigona* sp.	KY837694.1	842	85%	0	95.29%	-
AoriPL2_TH	*Atherigona orientalis*	MK265329.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAF5305
HCCM1_TH	*Hydrotaea chalcogaster*	KY001846.1	1154	100%	0	100.00%	-
HCCM2_TH	*Hydrotaea chalcogaster*	KY001846.1	1154	100%	0	100.00%	-
HSPhi27_TH	*Hydrotaea spinigera*	KC855280.1	838	75%	0	98.89%	BOLD:AEC8419
HSPhi28_TH	*Hydrotaea spinigera*	KP713677.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAW9285
MDChai44_TH	*Musca domestica*	MK236181.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
MDCM1_TH	*Musca domestica*	MG557665.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
MDKh9_TH	*Musca domestica*	MK236181.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
MDKh15_TH	*Musca domestica*	MK236181.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
MDPb10_TH	*Musca domestica*	MK236181.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
MDPb11_TH	*Musca domestica*	MK236181.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
MDPhi52_TH	*Musca domestica*	KX230673.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020

ตาราง 29 (ต่อ)

Sample code	Maximum identity to	BLASTN in Genbank					BIN in BOLD System
		Accession number	Total score	Query coverage	E-value	Identity	
MDPuD1_TH	*Musca domestica*	MK236181.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
MDPuD2_TH	*Musca domestica*	MK236181.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
MDsak26_TH	*Musca* sp.	KY837673.1	1092	96%	0	99.14%	-
MDsak47_TH	*Musca* sp.	KY837673.1	1092	96%	0	99.14%	-
MDUT2_TH	*Musca domestica*	MK236181.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAA6020
SNCM1_TH	*Synthesiomyia nudiseta*	NC_042953.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAH9692
SNCM2_TH	*Synthesiomyia nudiseta*	NC_042953.1	1154	100%	0	100.00%	BOLD:AAH9692
BPCM1_TH	*Sarcophaga peregrina*	KJ129230.1	1085	99%	0	98.16%	-
BPCM2_TH	*Sarcophaga peregrina*	KJ129239.1	1075	98%	0	98.30%	-
PDCM1_TH	*Sarcophaga dux*	MH765523.1	1154	100%	0	100.00%	-
PDCM2_TH	*Sarcophaga dux*	MH765523.1	1154	100%	0	100.00%	-

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ – หมายถึง not applicable

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ทั้งหมด 17 ชนิด 3 วงศ์ ซึ่งศึกษาโดยใช้วิธี Maximum likelihood พบว่ามีรายละเอียดดังนี้

1. แมลงวันหัวเขียววงศ์ Calliphoridae ทั้งหมด 64 ตัวอย่าง จาก 17 จังหวัด 6 ภูมิภาคของประเทศไทย สามารถแบ่งแมลงวันวงศ์ Calliphoridae ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 กลุ่มแมลงวันวงศ์ย่อย Chrysomyinae แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya megacephala* จำนวน 31 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ เชียงราย ชลบุรี นครสวรรค์ ปัตตานี พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ สกลนคร สงขลา สระแก้ว อุตรดิตถ์ อุบลราชธานี และประเทศลาว ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya megacephala* จากประเทศไทย (accession no. KT894991.1) อียิปต์ (accession no. KM434364.1) เกาหลี (accession no. KM873618.1) และจีน (accession no. FJ614817.1 และ KY001902.1) (ภาพ 41) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.2% (ตาราง 30)

แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya pinguis* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya pinguis* จากประเทศไทย (accession no. KX096342.1 และ KR921614.1) และสหรัฐอเมริกา (accession no. FJ195381.1) (ภาพ 41) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.7% (ตาราง 30)

แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya bezziana* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya bezziana* จากประเทศไทย (accession no. MK167359.1) และบราซิล (accession no. JQ246660.1) (ภาพ 41) โดยไม่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (ตาราง 30)

แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya chani* จำนวนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya chani* จากประเทศไทย (accession no. KR921610.1 และ KT894988.1) และสหรัฐอเมริกา (accession no. FJ195377.1) (ภาพ 42) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.2% (ตาราง 30)

และแมลงวันวงศ์ย่อย Luciliinae แมลงวันหัวเขียวชนิด *Hemipyrellia ligurriens* จำนวนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Hemipyrellia ligurriens* จากประเทศไทย (accession no. KR921676.1) จีน (accession

no. KY001908.1) เกาหลี (accession no. EU880206.1) และมาเลเซีย (accession no. KJ496774.1) (ภาพ 42) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.1% (ตาราง 30)

แมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucilia cuprina* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Lucilia cuprina* จากประเทศจีน (accession no. KY001878.1) สหรัฐอเมริกา (accession no. DQ453495.1) และมาเลเซีย (accession no. KJ496771.1) (ภาพ 42) โดยไม่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (ตาราง 30)

แมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucilia papuensis* จำนวนทั้งหมด 1 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Lucilia papuensis* จากประเทศไทย (accession no. KR921651.1 และ KT895004.1) ส่วน 5 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก ไม่มีความใกล้ชิดกับแมลงวัน *Lucilia papuensis* (ภาพ 42) ซึ่งเป็นชนิดอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 1.4% (ตาราง 30)

1.2 กลุ่มแมลงวันวงศ์ย่อย Chrysomyinae ชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies* จำนวนทั้งหมด 13 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และสกลนคร มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya rufifacies* จากประเทศไทย (accession no. KR921632.1) มาเลเซีย (accession no. JN571565.1 และอินเดีย (accession no. MK353338.1) (ภาพ 43) โดยไม่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (ตาราง 30)

แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi* จำนวนทั้งหมด 1 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya* จากประเทศไทย (accession no. KR921638.1) และสหรัฐอเมริกา (accession no. FJ195382.1) (ภาพ 43) โดยไม่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (ตาราง 30)

แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัด พิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya nigripes* จากประเทศไทย (accession no. KR921624.1) และอินเดีย (accession no. KX893348.1) (ภาพ 43) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.3% (ตาราง 30)

2. แมลงวันบ้านวงศ์ Muscidae ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จาก 10 จังหวัด 3 ภูมิภาคของประเทศไทย สามารถแบ่งแมลงวันวงศ์ Muscidae ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1 กลุ่มแมลงวันวงศ์ย่อย Phaoniinae ชนิด *Synthesiomyia nudiseta* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Synthesiomyia nudiseta* จากประเทศจีน (accession no. KY001859.1) และมาเลเซีย (accession no. KF562117.1) (ภาพ 44) โดยไม่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (ตาราง 30)

แมลงวันบ้านชนิด *Hydrotaea spinigera* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิจิตร มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Hydrotaea spinigera* จากประเทศจีน (accession no. MF511749.1 และ KY001840.1) และมาเลเซีย (accession no. KP407084.1 และ KJ496786.1) (ภาพ 44) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 3.1% (ตาราง 30)

แมลงวันบ้านชนิด *Hydrotaea chalcogaster* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Hydrotaea chalcogaster* จากประชากรจีน (accession no. KM497270.1 และ KY001846.1) และมาเลเซีย (accession no. KJ496788.1 และ KF562114.1) (ภาพ 44) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.2% (ตาราง 30)

และแมลงวันวงศ์ย่อย Coenosiinae ชนิด *Atherigona orientalis* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มี 1 ตัวอย่าง ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Atherigona orientalis* จากสหพันธรัฐมาเลเซีย (accession no. KJ496789.1) ส่วนอีก 1 ตัวอย่าง มีความใกล้ชิดกับประเทศจีน (accession no. MG708353.1, MG708352.1 และ MG708353.1) และอินเดีย (accession no. MH155275.1) (ภาพ 44) ซึ่งเป็นชนิดอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกันอยู่ 10.4% (ตาราง 30)

2.2 กลุ่มแมลงวันวงศ์ย่อย Muscinae ชนิด *Musca domestica* จำนวนทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ พิจิตร เพชรบูรณ์ และอุตรดิตถ์ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Musca domestica* จากประเทศจีน (accession no. KY001857.1) เกาหลี (accession no. KR262647.1 และ JX861432.1) บราซิล (accession no. JQ246703.1) บังกลาเทศ (accession no. MG557665.1) และมาเลเซีย (accession no. KF562113.1) ส่วน 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดสกลนคร ไม่มีความใกล้ชิดกับแมลงวัน *Musca*

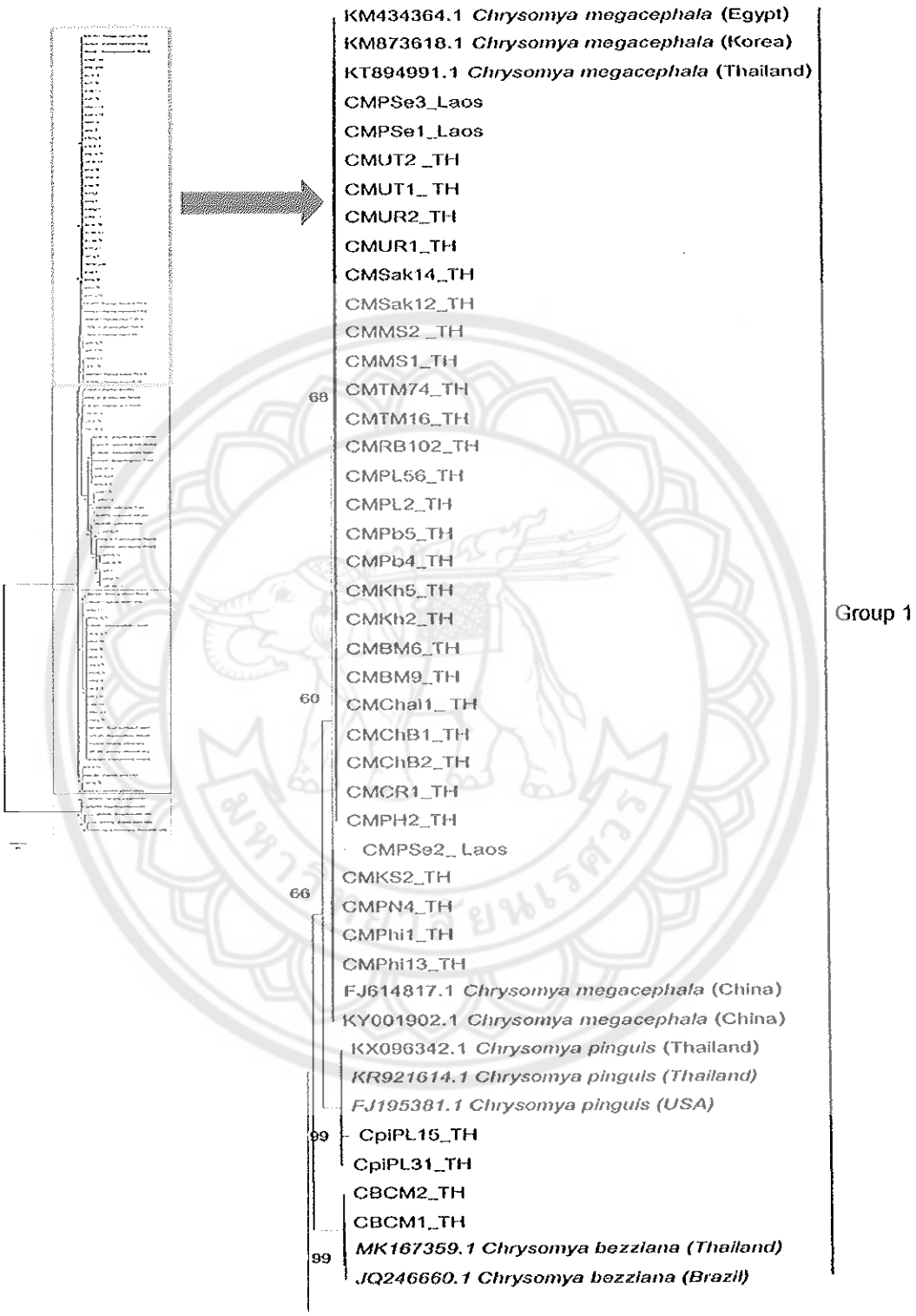
domestica (ภาพ 44) ซึ่งเป็นชนิดอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 2.00% (ตาราง 30)

3. แมลงวันบ้านวงศ์ Sarcophagidae ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ภาคเหนือของประเทศไทย สามารถแบ่งแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

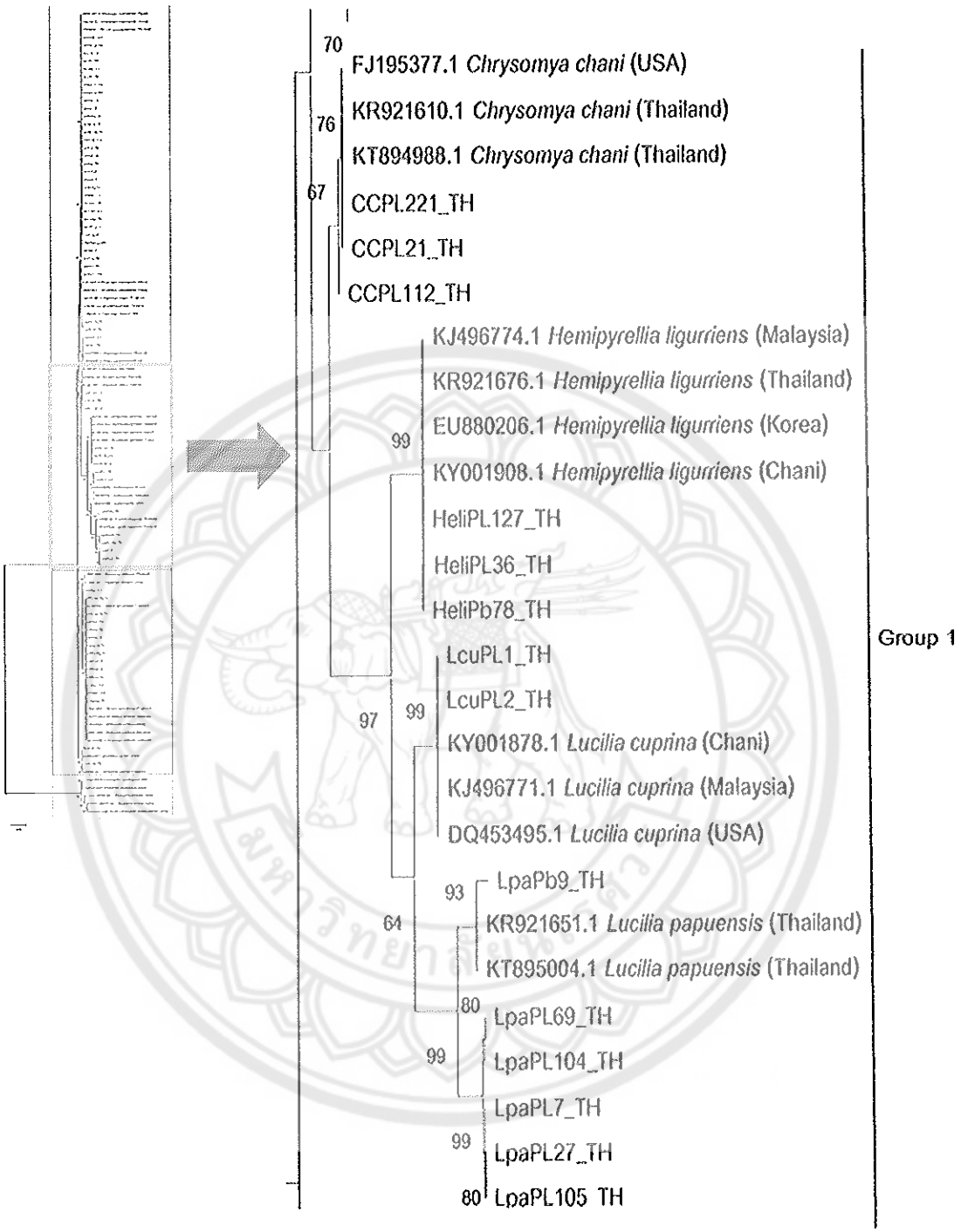
3.1 กลุ่มแมลงวันหลังลายชนิด *Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Sarcophaga peregrina* จากประเทศจีน (accession no. KF037991.1, KJ129230.1 และ KJ129239.1) สหรัฐอเมริกา (accession no. AF259509.1) ออสเตรเลีย (accession no JN965026.1) มาเลเซีย (accession no. KJ496794.1 และ KC855283.1) (ภาพ 45) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกันอยู่ 1.2% (ตาราง 30)

3.2 กลุ่มแมลงวันหลังลายชนิด *Sarcophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Sarcophaga dux* จากประเทศไทย (accession no. MH765521.1, MH765523.1 และ MH765526.1) อียิปต์ (accession no. KC249713.1) และมาเลเซีย (accession no. JX187399.1, EF405938.1, KP407085.1 และ KJ496796.1) (ภาพ 45) โดยไม่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (ตาราง 30)

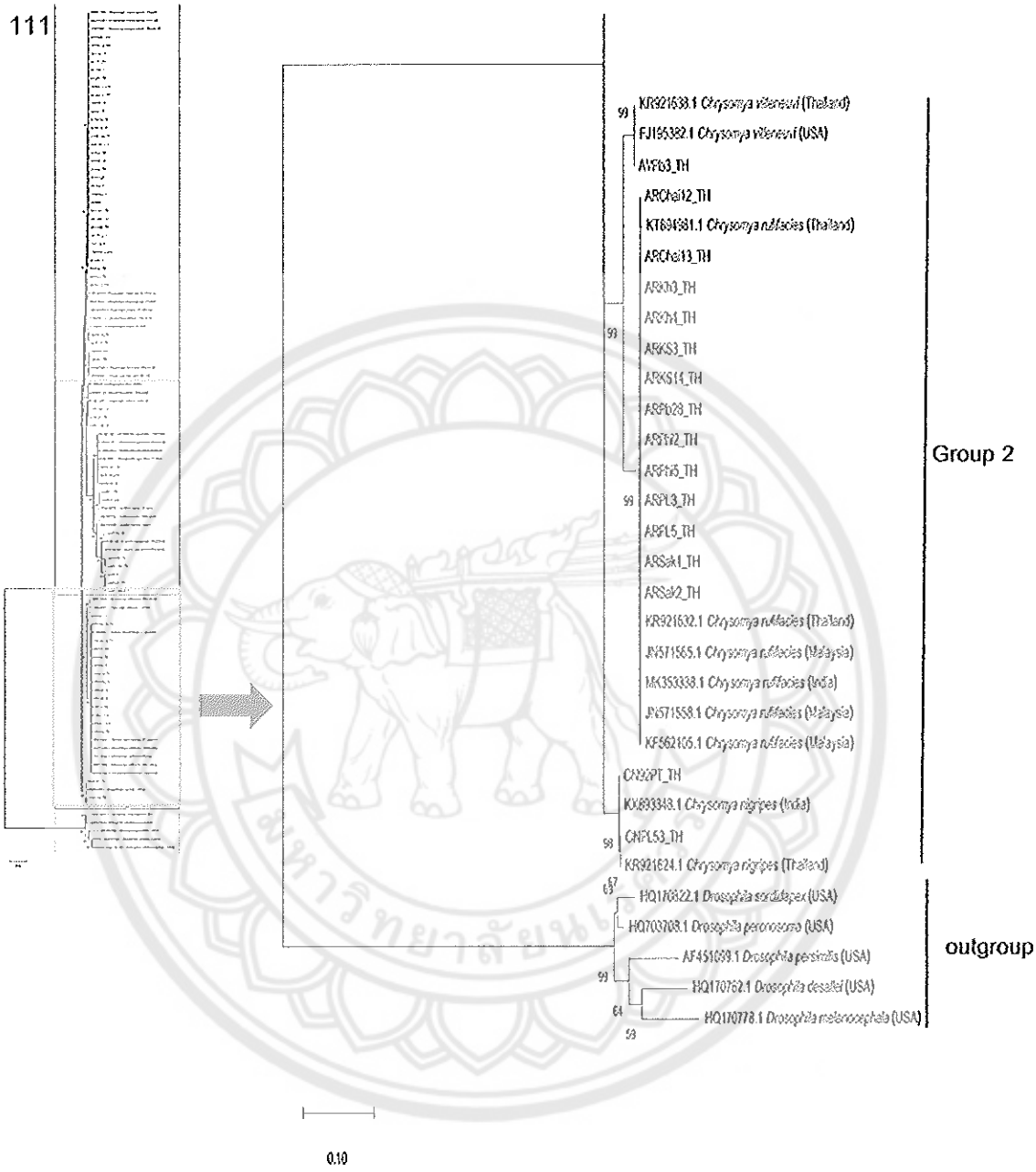
การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ทั้ง 17 ชนิด 3 วงศ์ นั้น จะมีกลุ่มแมลงหวี่ชนิด *Drosophila desallei* (accession no. HQ170762.1), *Drosophila melanogaster* (accession no. HQ170778.1), *Drosophila percnosoma* (accession no. HQ703708.1), *Drosophila porsimilis* (accession no. AF451099.1) และ *Drosophila sordidapax* (accession no. HQ170822.1) เป็น outgroup และมีค่าความแตกต่างระหว่างพันธุกรรม 2.40-15.60% (ตาราง 30)



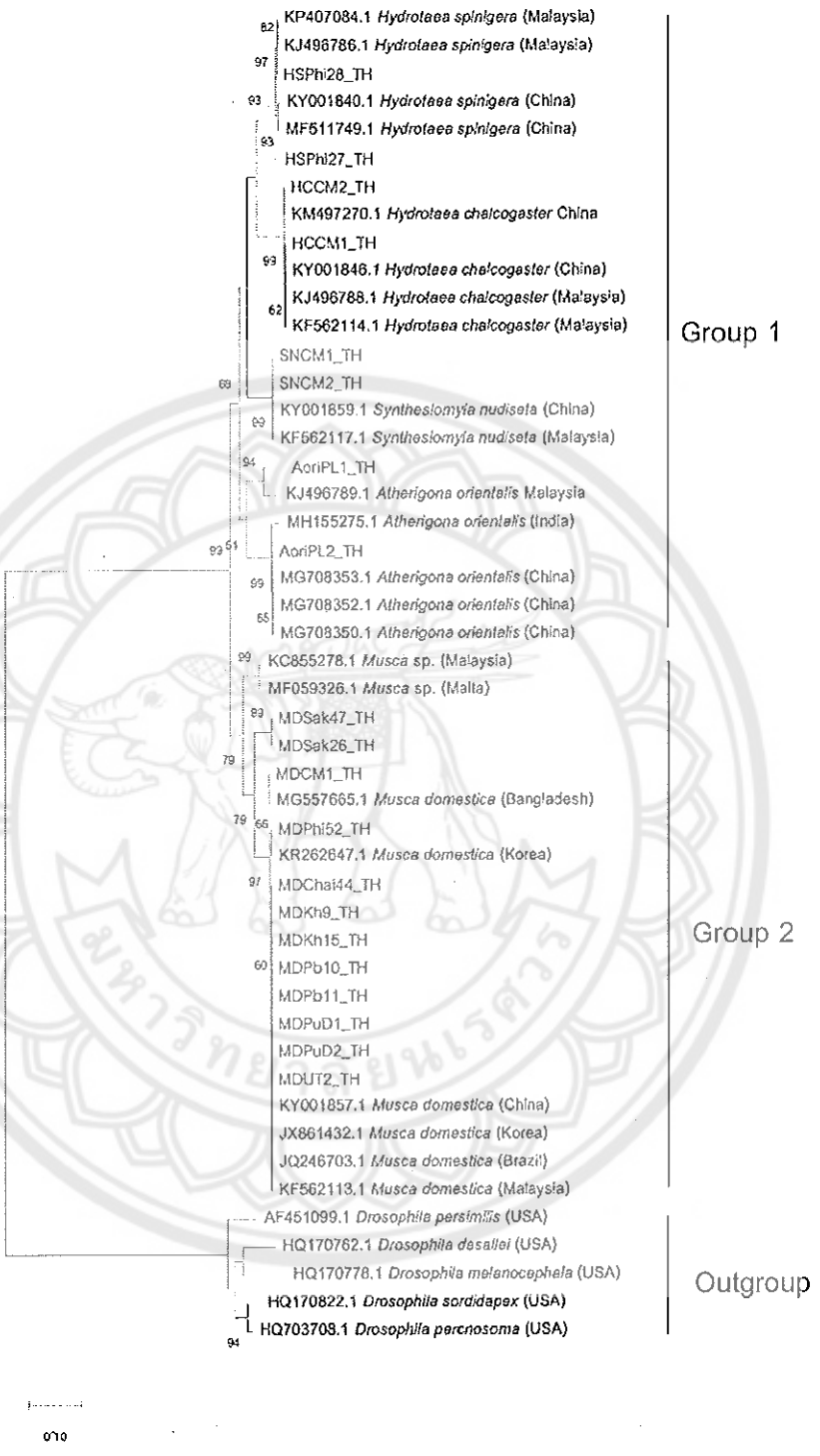
ภาพ 41 Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Calliphoridae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



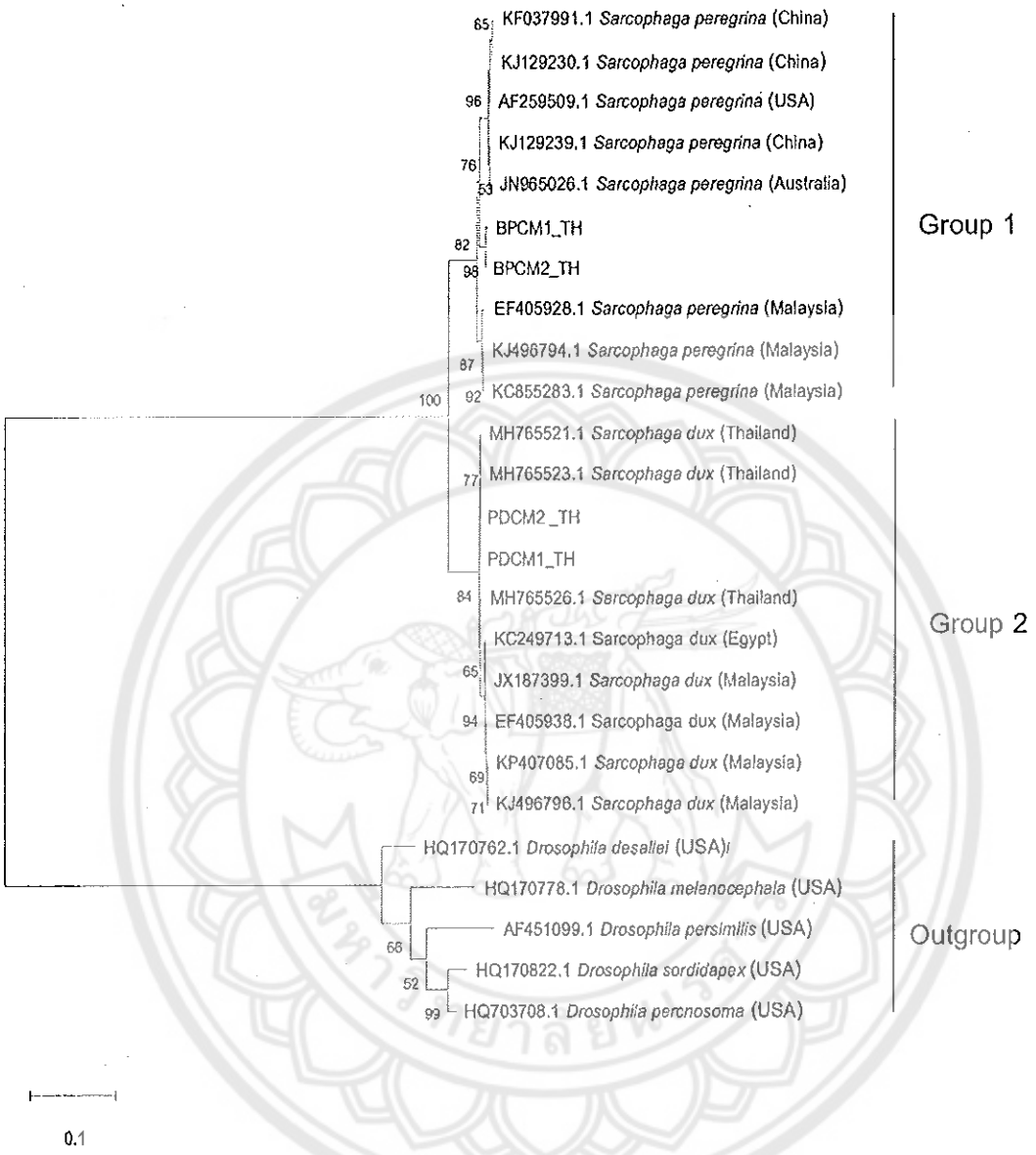
ภาพ 42 Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Calliphoridae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



ภาพ 43 Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Calliphoridae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



ภาพ 44 Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Muscidae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยโดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



ภาพ 45 Maximum Likelihood tree ของแมลงวันกลุ่ม Sacrophagidae ด้วยยีน *COI* (644 คู่เบส) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยรูปแบบ Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)

ตาราง 30 ความแตกต่างทางพันธุกรรม Intraspecific – Interspecific ในยีน *COI* ของแมลงวันทั้ง 17 ชนิดในประเทศไทย

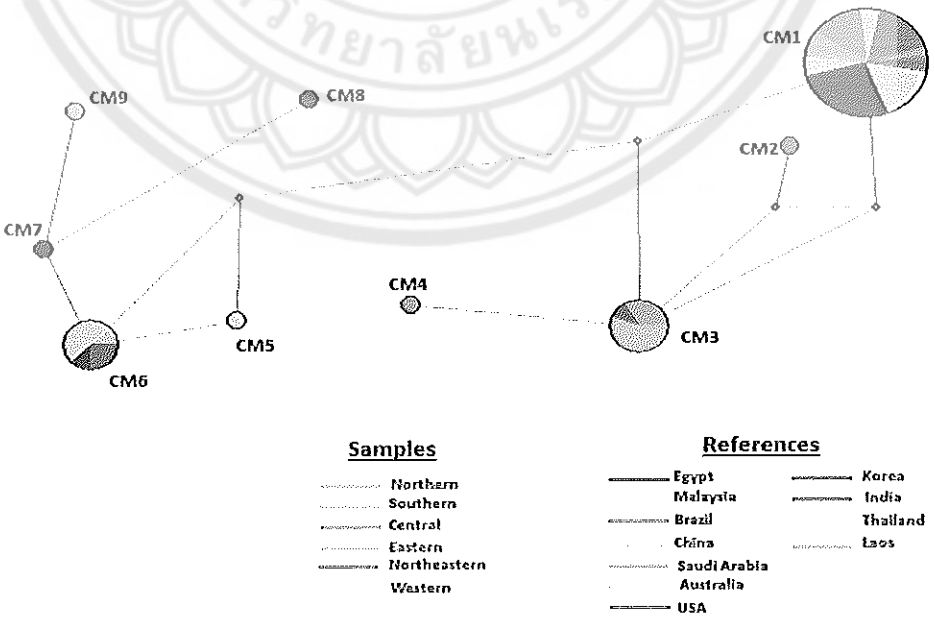
Species	Intraspecific p-distances (%)	Interspecific p-distances (%)																
		AR	AV	CB	CC	CN	CM	Cpi	Heli	Lcu	Lpa	Aori	HS	HC	MD	SN	BP	PD
AR	0																	
AV	N/A	3.8																
CB	0	7.8	6.9															
CC	0.2	6.5	5.9	4.0														
CN	0.3	6.5	5.9	5.6	4.9													
CM	0.2	6.6	5.6	3.5	3.4	4.2												
Cpi	0.7	8.0	6.7	4.0	4.2	5.2	2.4											
Heli	0.1	10.5	9.7	8.5	7.5	9.7	7.9	8.7										
Lcu	0	11.8	10.4	10.0	7.6	11.0	8.7	9.6	5.4									
Lpa	1.4	11.8	10.7	11.9	8.4	10.4	9.9	11.4	8.6	6.5								
Aori	10.4	12.8	11.7	12.1	10.8	12.2	12.5	12.8	12.5	12.2	13.2							
HS	3.1	11.1	10.7	11.5	9.1	10.7	10.8	11.5	11.3	10.0	11.7	11.9						
HC	0.2	13.1	11.9	12.4	12.1	11.5	11.5	12.9	10.6	10.1	12.5	12.7	8.4					
MD	2.0	12.2	11.6	11.0	10.1	11.1	10.5	11.2	11.8	11.8	12.8	14.1	11.5	13.2				
SN	0	11.8	12.0	11.2	9.7	11.4	10.3	12.0	10.3	10.6	11.8	11.5	9.9	10.1	12.3			
BP	1.2	13.7	12.7	14.5	12.7	14.7	14.1	14.4	13.9	12.4	15.3	14.6	14.3	13.2	15.6	14.4		
PD	0	11.0	11.0	11.2	9.7	11.4	11.2	12.3	12.1	11.0	12.5	12.0	12.8	12.7	13.6	13.6	8.4	

หมายเหตุ:

- N/A: not applicable
- AR: *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies*, AV: *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi*, CB: *Chrysomya bezziana*, CC: *Chrysomya chani*, CN: *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes*, CM: *Chrysomya megacephala*, Cpi: *Chrysomya pinguis*, Heli: *Hemipyrellia ligurriens*, Lcu: *Lucilia cuprina*, Lpa: *Lucilia papuensis*, Aori: *Atherigona orientalis*, HS: *Hydrotaea spinigera*, HC: *Hydrotaea chalcogaster*, MD: *Musca domestica*, SN: *Synthesiomyia nudiseta*, BP: *Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* , PD: *Sarcophaga* (*Parasarcophaga*) *dux*

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala*

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ด้วยการวิเคราะห์ Haplotype network จำนวน 31 ตัวอย่าง 6 ภูมิภาค ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จำนวน 644 คู่เบส พบว่าแมลงวัน *Chrysomya megacephala* มีรูปแบบพันธุกรรมจำนวน 3 รูปแบบ (CM1 CM2 และ CM3) ซึ่งเป็นตัวอย่างแมลงวันที่ใช้ในการศึกษา โดยรูปแบบพันธุกรรมที่พบร่วมในแต่ละพื้นที่ จำนวน 2 รูปแบบ (CM1 และ CM3) ซึ่งรูปแบบพันธุกรรม CM1 เป็นรูปแบบพันธุกรรมที่พบมากที่สุด พบในพื้นที่ 6 ภูมิภาค ประกอบด้วย ภาคเหนือ (จังหวัดแพร่ และอุตรดิตถ์) ภาคกลาง (จังหวัดพิจิตร เพชรบูรณ์ และนครสวรรค์) ภาคตะวันตก (จังหวัดราชบุรี) ภาคตะวันออก (จังหวัดชลบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดขอนแก่น ชัยภูมิ มหาสารคาม สกลนคร และอุบลราชธานี) ภาคใต้ (จังหวัดปัตานี และสงขลา) และประเทศลาว ที่มีรูปแบบพันธุกรรมคล้ายกับฐานข้อมูลในประเทศไทย อียิปต์ และมาเลเซีย ส่วนรูปแบบพันธุกรรม CM3 เป็นรูปแบบที่พบในพื้นที่ 2 ภูมิภาค ประกอบด้วย ภาคเหนือ (จังหวัดพิษณุโลก) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดกาฬสินธุ์) ที่มีรูปแบบพันธุกรรมคล้ายกับฐานข้อมูลในประเทศจีน และรูปแบบพันธุกรรมที่พบเฉพาะแต่ละพื้นที่ จำนวน 1 รูปแบบ (CM2) โดยรูปแบบพันธุกรรมจากตัวอย่างในพื้นที่ประเทศลาว ขณะที่รูปแบบพันธุกรรมอีก 6 รูปแบบ (CM4 CM5 CM6 CM7 CM8 และ CM9) เป็นรูปแบบพันธุกรรมที่มาจากฐานข้อมูล GenBank (ภาพ 46)



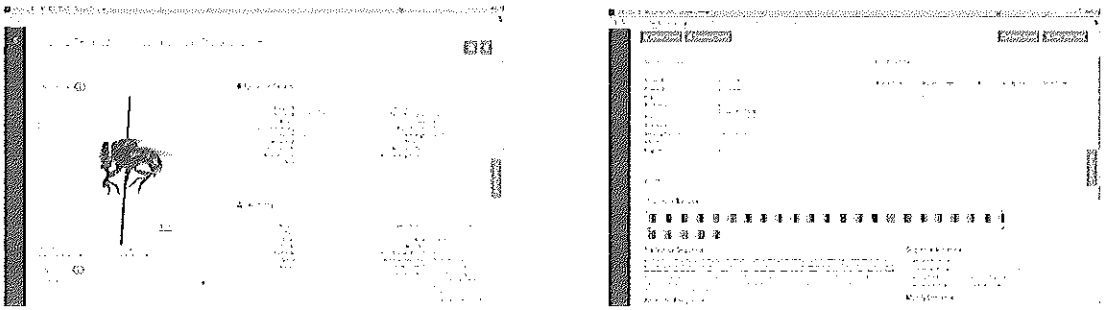
ภาพ 46 วิเคราะห์ Haplotype network **ของแมลงวันชนิด** *Chrysomya megacephala*

การบันทึกตัวอย่างแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ลงในฐานข้อมูล BOLD Systems

การบันทึกตัวอย่างแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ลงในฐานข้อมูล BOLD Systems โดยมีการบันทึกข้อมูลแมลงวันจำนวน 77 ตัวอย่าง จากแมลงวัน 17 ชนิด ในพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย คิดเป็นแมลงวันหัวเขียว 3.66% แมลงวันบ้าน 1.18% และแมลงวันหลังลาย 0.83% เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ถูกบันทึกไว้ก่อนหน้านี้ การบันทึกลงในฐานข้อมูล BOLD Systems ต้องมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ตำแหน่งที่พบแมลงวัน และรูปถ่ายแมลงวันของแมลงวันทุกชนิด ซึ่งสำหรับการบันทึกข้อมูลแสดงพิกัดภูมิศาสตร์ของแมลงวันในหัวข้อ Sample ID, Field ID และMuseam ID ต้องมีการตั้งชื่อที่เหมือนกัน (ตาราง 31) โดยสามารถดาวน์โหลดไฟล์ตารางข้อมูลจากฐานข้อมูล BOLD Systems เมื่อบันทึกข้อมูลทุกอย่างครบหมดแล้ว ทางระบบจะทำการประมวลผล เพื่อออกรหัส BIN ตัวอย่างแมลงวัน (ภาพ 47) โดย BIN ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ทั้ง 77 ตัวอย่าง ที่ถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูล BOLD Systems สรุปได้ดังตาราง 29

ตาราง 31 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลพิกัดลงในตารางข้อมูลากฐานข้อมูล BOLD Systems

Specimen Info Metadata				
Sample ID	Field ID	Museum ID	Collection Code	Institution Storing
ARChi12_TH	ARChi12_TH	ARChi12_TH	Chi	Naresuan University
ARChi13_TH	ARChi13_TH	ARChi13_TH	Chi	Naresuan University
ARKh3_TH	ARKh3_TH	ARKh3_TH	Kh	Naresuan University
ARKh4_TH	ARKh4_TH	ARKh4_TH	Kh	Naresuan University



(ก) (ข)

ภาพ 47 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงในฐาน BOLD Systems คือ
(ก) ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ และรูปภาพของตัวอย่างแมลงวัน
(ข) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแมลงวัน

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างแมลงวันในพื้นที่ทั้ง 6 ภูมิภาคของประเทศไทย ประกอบด้วยพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครสวรรค์ ปัตตานี พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ แพร่ มหาสารคาม ราชบุรี สกลนคร สงขลา สระแก้ว อุตรดิตถ์ และอุบลราชธานี โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันด้วยการใช้สวิงโฉบ และกับดัก ชนิดโคมดักแมลงวันพลาสติก จำนวนทั้งสิ้น 3,199 ตัว สามารถจัดจำแนกชนิดแมลงวันได้เป็น 3 วงศ์ คือ แมลงวันวงศ์ Calliphoridae ประกอบด้วยชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies*, *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes*, *Chrysomya chani*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia papuensis* แมลงวันวงศ์ Muscidae ประกอบด้วยชนิด *Atherigona orientalis*, *Hydrotaea chalcogaster*, *Hydrotaea spinigera*, *Musca domestica* และ *Synthesiomyia nudiseta* และแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ประกอบด้วยชนิด *Sacrophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* และ *Sacrophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* ซึ่งแมลงวันชนิด *Chrysomya megacephal* มีการพบปริมาณและกระจายมากที่สุดในวงศ์ Calliphoridae ที่พบในทุกพื้นที่ของการเก็บตัวอย่าง และในพื้นที่ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จังหวัดพิษณุโลกจะมีความหลากหลายชนิดของแมลงวันมากกว่าพื้นที่อื่นที่ทำการศึกษา

เมื่อนำตัวอย่างแมลงวันไปตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA Barcoding โดยที่ใช้ยีน *COI* เข้ามาช่วยในการจำแนกชนิดของแมลงวัน พบว่าแมลงวันทั้ง 17 ชนิด มีขนาด PCR product อยู่ที่ช่วงประมาณ 710 คู่เบส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีจำนวน 644 คู่เบส เมื่อเทียบเคียงกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชนิดแล้วในฐานข้อมูล NCBI จะมีค่าความเหมือนสูงถึง 100% และมีค่าต่ำสุด 95.29% ซึ่งการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ทั้งหมด 17 ชนิดนี้ ใช้วิธี Maximum likelihood เข้ามาวิเคราะห์ พบว่ากลุ่มแมลงวันหัวเขียววงศ์ Calliphoridae ทั้งหมด 64 ตัวอย่าง จาก 17 จังหวัด 6 ภูมิภาคของประเทศไทย สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย แมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala* จำนวน 31 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya pinguis* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya bezziana* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya*

chani จำนวน 3 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Hemipyrellia ligurriens* จำนวนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Lucilia cuprina* จำนวน 2 ตัวอย่าง และแมลงวันชนิด *Lucilia papuensis* จำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies* จำนวนทั้งหมด 13 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด*Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi* จำนวน 1 ตัวอย่าง และแมลงวันชนิด *Chrysomya (Ceylonomyia) nigripes* จำนวน 2 ตัวอย่าง

กลุ่มแมลงวันบ้านวงศ์ Muscidae ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จาก 10 จังหวัด 3 ภูมิภาคของประเทศไทย สามารถแบ่งแมลงวันวงศ์ Muscidae ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแมลงวันชนิด *Synthesiomyia nudiseta* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Hydrotaea spinigera* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Hydrotaea chalcogaster* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Atherigona orientalis* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย แมลงวันชนิด *Musca domestica* จำนวนทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

กลุ่มแมลงวันบ้านวงศ์ Sarcophagidae ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ภาคเหนือของประเทศไทย สามารถแบ่งแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแมลงวันหลังลายชนิด *Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 2 แมลงวันชนิด *Sarcophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง

โดยการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงวัน 17 ชนิด พบค่าความแตกต่างภายในชนิดเดียวกัน 0.00-10.40% และมีค่าความแตกต่างระหว่างชนิด 2.40-15.60% โดยชนิดที่มีค่าความแตกต่างภายในชนิดสูงที่สุดคือ *Atherigona orientalis* รวมถึงการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมีความสอดคล้องกับการระบุชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันทั้ง 17 ชนิด และการศึกษารูปแบบพันธุกรรมของแมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala* พบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรม 3 รูปแบบ ซึ่งเป็นรูปแบบทางพันธุกรรมที่พบร่วมในแต่ละพื้นที่ 2 รูปแบบ และรูปแบบทางพันธุกรรมเฉพาะแต่ละพื้นที่ 1 รูปแบบ

นอกจากนี้การบันทึกข้อมูลของแมลงวันที่มีความสัมพันธ์ทางการแพทย์ลงในฐานข้อมูล BOLD Systems จำนวน 77 ตัวอย่าง จากแมลงวัน 17 ชนิด โดยคิดเป็นแมลงวันหัวเขียว 3.66% แมลงวันบ้าน 1.18% และแมลงวันหลังลาย 0.83% เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของประเทศอื่น

อภิปรายผล

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ จากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย สามารถจัดจำแนกชนิดแมลงวันได้ 3 วงศ์ คือ วงศ์ Calliphoridae ประกอบด้วยชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies*, *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi*, *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes*, *Chrysomya chani*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia papuensis* วงศ์ Muscidae ประกอบด้วยชนิด *Atherigona orientalis*, *Hydrotaea chalcogaster*, *Hydrotaea spinigera*, *Musca domestica* และ *Synthesiomyia nudiseta* และวงศ์ Sarcophagidae ประกอบด้วยชนิด *Sacrophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* และ *Sacrophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* ซึ่งส่วนใหญ่ในแต่ละพื้นที่จะพบแมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala* มากที่สุด อาจเนื่องจากแมลงวันชนิดนี้เป็นแมลงวันที่ชอบอาศัยในแหล่งอาศัยของคน หรือตลาดสดที่มีแหล่งอาหารที่สมบูรณ์ ซึ่งจากการสำรวจของ Lertthamnongtham et al. (2003) ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ มีการพบแมลงชนิด *Chrysomya megacephala* ได้ตลอดทั้งปี โดยพบมากที่สุดในช่วงฤดูร้อนและพบน้อยที่สุดในช่วงฤดูหนาว และพื้นที่ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก มีการพบแมลงวันที่มีความหลากหลายชนิด อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่สมบูรณ์ ไม่มีสิ่งใดไปรบกวน และแหล่งอาหารที่สมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bunchu et al. (2012) ที่มีการศึกษาความหลากหลายชนิดแมลงวันในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก สามารถจัดจำแนกชนิดแมลงได้ 5 วงศ์ย่อย 14 สกุล และ 36 ชนิด และการศึกษาความหลากหลายชนิดของเกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์ และคณะ (2019) พบวงศ์ย่อย *Chrysomyinae* (51.19%) มากที่สุด และพบแมลงวันหัวเขียว ได้ 16 ชนิด โดยพบแมลงวันชนิด *Lucilia sinensis* มากที่สุด (35.42%) ซึ่งการระบุชนิดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ด้วยการดูลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงวันที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ พบว่าแมลงวันทั้งหมด 17 ชนิดที่ศึกษามีความแตกต่างกันทางด้านลักษณะสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกับการจำแนกชนิดตามทฤษฎีของ Kurahshi, & Bunchu (2011); Tumrasvin, & Moophayak (2018); Kurahashi, & Samerjai (2018) ทุกประการ เมื่อทำการเลือกตัวอย่างแมลงวัน 3 วงศ์ จำนวน 88 ตัวอย่าง เพื่อจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยแบ่งเป็นแมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies* จำนวน 13 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi* จำนวน 1 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya bezziana* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya chani* จำนวน 3 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya megacephalya* จำนวน 30 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Chrysomya pinguis* จำนวน

2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Hemipyrellia ligurriens* จำนวน 3 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Lucilia cuprina* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Lucilia papuensis* จำนวน 6 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Atherigona orientalis* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Hydrotaea chalcogaster* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Hydrotaea spinigera* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Musca domestica* จำนวน 10 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Synthesiomyia nudiseta* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Sacrophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* จำนวน 2 ตัวอย่าง และแมลงวันชนิด *Sacrophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งแมลงวันทั้งหมด 17 ชนิด ได้ใช้ยีน *COI* เข้ามาช่วยในวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาด PCR product อยู่ที่ช่วงประมาณ 710 คู่เบส พบว่าแมลงวันทั้ง 17 ชนิด มีค่าความเหมือนอยู่ในช่วง 98.16-100% แต่จะมีแมลงวันชนิด *Lucilia papuensis* จำนวน 5 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก ที่มีค่าความเหมือนอยู่ในช่วง 96.83% โดยที่ตัวอย่างจากเพชรบูรณ์มีค่าความเหมือนอยู่ที่ 100% อาจเนื่องจากเกิดการแลกเปลี่ยนยีน (gene flow) ระหว่างประชากรของ *Lucilia papuensis* ในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์และจังหวัดพิษณุโลก (Sontigun et al., 2018) และแมลงวันชนิด *Atherigona orientalis* จำนวน 1 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกที่มีค่าความเหมือนต่ำสุด 95.29% เมื่อนำเทียบเคียงกับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันที่ทราบชนิดแล้วในฐานข้อมูล NCBI อาจเนื่องจากแมลงวันชนิด *Atherigona orientalis* ในฐานข้อมูลมีจำนวนข้อมูลของแมลงวันชนิดนี้น้อย จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในศึกษามีน้อย และยีนที่ใช้ในการระบุชนิดแมลงวันยังไม่สามารถแยกชนิดของแมลงวันออกได้ จึงทำให้ควรมีการศึกษายีนอื่น ๆ เพิ่ม เพื่อช่วยระบุชนิดของแมลงวันออกได้อย่างชัดเจน (Kutty et al., 2008; Mashaly et al., 2017)

จากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood ที่มีขนาดความยาวของยีน *COI* จำนวน 644 คู่เบส พบว่าแมลงวันทั้ง 17 ชนิด มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน โดยกลุ่มแมลงวันหัวเขียวสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ที่ประกอบด้วยแมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala* จำนวน 31 ตัวอย่าง โดยมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya megacephala* ในประเทศไทย อียิปต์ เกาหลี และจีน แมลงวันชนิด *Chrysomya pinguis* จำนวน 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya pinguis* จากประเทศไทย และสหรัฐอเมริกา แมลงวันชนิด *Chrysomya bezziana* จำนวน 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya bezziana* จากประเทศไทย และบราซิล แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya chani* จำนวน 3 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกมี

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya chani* จากประเทศไทย และสหรัฐอเมริกา และแมลงวันวงศ์ย่อย Luciliinae แมลงวันชนิด *Hemipyrellia ligurriens* จำนวนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Hemipyrellia ligurriens* จากประเทศไทย จีน เกาหลี และมาเลเซีย แมลงวันชนิด *Lucilia cuprina* จำนวน 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Lucilia cuprina* จากประเทศไทย จีน สหรัฐอเมริกา และมาเลเซีย แมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucilia papuensis* จำนวน 6 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ และพิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Lucilia papuensis* จากประเทศไทย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *rufifacies* จำนวนทั้งหมด 13 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya rufifacies* จากประเทศไทย มาเลเซีย และอินเดีย โดยไม่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน แมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Achoetandrus*) *villeneuvi* จำนวน 1 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya* จากประเทศไทย และสหพันธรัฐอเมริกา แมลงวันชนิด *Chrysomya* (*Ceylonomyia*) *nigripes* จำนวน 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Chrysomya nigripes* จากประเทศไทย และอินเดีย โดยกลุ่มนี้ดั้งเดิมจะถูกจัดจำแนกรวมกับสกุล *Chrysomya* แต่เมื่อปี 2011 Kurahashi, & Bunchu ได้มีการศึกษาจัดจำแนกชนิดกลุ่มแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทยใหม่ พบว่าแมลงวันหัวเขียวสกุล *Achoetandrus* และ *Ceylonomyia* มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันกับสกุล *Chrysomya* ออกไป เช่น สีของ Mesothoracic spiracles, Outer vertical bristls (*ov*) และรอยแยกตรงปล้องท้องส่วนที่ 5 เป็นต้น ทำให้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันทั้ง 2 สกุล มีความแตกต่างกัน รวมถึงแมลงวันหัวเขียวทั้ง 10 ชนิด มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.00-1.40% นอกจากนี้แมลงวันชนิด *Chrysomya megacephala* มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับ *Chrysomya pinguis* โดยที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความแตกต่างกัน อาจเนื่องจากการใช้ยีนชนิดเดียวในการระบุชนิด จำนวนชนิดของแมลงวัน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nelson et al., 2007; Singh et al., 2011; Aly, 2014; GilArriorua et al, 2014; Barbara et al., 2016; Williams et al., 2016; Meng et al., 2017) จากการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทย Barbara et al. (2016) ได้ทำการศึกษาการศึกษาการระบุชนิดแมลงวันที่มีความเกี่ยวข้องกับทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ของประเทศไทย โดยการใช้ยีน *COI* และ *28S rRNA* ที่สามารถระบุชนิดแมลงวันได้ 13 ชนิด ประกอบด้วย แมลงวันหัวเขียว *Achoetandrus rufifacies*,

Achoetandrus villeneuvi, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya thanomthini*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya chani*, *Hypopygiopsis infumata*, *Lucilia papuensis*, *Lucilia porphyrina* และแมลงวันหลังลาย *Boettcherisca nathani*, *Lioproctia pattoni*, *Sarcorohdendorfia antelope*, *Sarcosolomonia rohdendorfi* ที่มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) อยู่ในช่วง 600-710 คู่เบส พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.80% และในปี 2018 Sontigun et al. ได้มีการศึกษาแมลงวันหัวเขียวที่มีความสำคัญในทางนิติกีฏวิทยาที่มาจากพื้นที่ภาคเหนือตอนบน และภาคใต้ โดยใช้ยีน *COI* และ *COII* ที่มีความยาว 1,247 คู่เบส สามารถจำแนกชนิดแมลงวันเขียวได้ 16 ชนิด พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 0.80% ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันหัวเขียวทั้ง 6 ภูมิภาค มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายชนิดเดียวกันที่สูงกว่าแมลงวันหัวเขียวในภาคเหนือ หมู่เกาะแคริเบียน (1.06%) และอินเดีย (0.03%) (Sohath et al., 2017; Meenakshi, & Baneshwar, 2017) รวมถึงการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ Haplotype network ซึ่งทำการวิเคราะห์แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya megacephala* มีรูปแบบทางพันธุกรรม 3 รูปแบบ โดยรูปแบบ CM1 เป็นรูปแบบที่พบในทุกภูมิภาค และรูปแบบ CM3 เป็นรูปแบบที่พบในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก ภาคเหนือและจังหวัดกาฬสินธุ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ขณะที่รูปแบบพันธุกรรม CM2 พบเฉพาะในประเทศลาว 1 ตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Qiu et al. (2017) ได้ศึกษาการระบุชนิดแมลงวัน *Chrysomya megacephala* ในประเทศจีน โดยใช้ยีน *COI* เข้ามาช่วยจำแนกชนิด พบรูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ จาก 7 ภูมิภาค ซึ่งเห็นได้ว่าแมลงวัน *Chrysomya megacephala* ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างต่ำ

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแมลงวันบ้านวงศ์ Muscidae ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จาก 10 จังหวัด 3 ภูมิภาคของประเทศไทย สามารถแบ่งแมลงวันวงศ์ Muscidae ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแมลงวันชนิด *Synthesiomyia nudiseta* จำนวน 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Hydrotaea spinigera* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง แมลงวันชนิด *Hydrotaea chalcogaster* จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งแมลงวันทั้ง 3 ชนิด เป็นตัวอย่างที่ได้จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวันจากประเทศจีน และมาเลเซีย รวมถึงแมลงวันชนิด *Atherigona orientalis* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Atherigona orientalis* จากประเทศมาเลเซีย จีน และอินเดีย (ซึ่งเป็นชนิดอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI) มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน 10.4% ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาในปี 2018 Lipin et al. ได้ศึกษาการระบุชนิดชนิดแมลงวันบ้าน (Muscidae) ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยใช้ยีน *COI* พบว่าสามารถจัดจำแนก

ชนิดได้ 12 ชนิด ที่มีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรม 0.00-12.50% การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันบ้านทั้ง 4 ชนิด ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดพิษณุโลก มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ต่ำกว่ากับการศึกษาแมลงวันบ้าน ในประเทศจีน (Lipin et al., 2018) เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้มีการเก็บตัวอย่างของแมลงวันบ้านทั้ง 4 ชนิด จำนวนตัวอย่าง และเขตพื้นที่การเก็บน้อยเกินไป ทำให้ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแมลงวันชนิด *Musca domestica* จำนวนทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ พิจิตร เพชรบูรณ์ และอุตรดิตถ์ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Musca domestica* จากประเทศจีน เกาหลี บราซิล บังกลาเทศ และมาเลเซีย ส่วน 2 ตัวอย่างจากพื้นที่จังหวัดสกลนคร ไม่มีความใกล้ชิดกับแมลงวัน *Musca domestica* ซึ่งเป็นชนิดอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI เนื่องจากตัวอย่างในพื้นที่จังหวัดสกลนครอาจมีค่าความแปรผันทางด้านพันธุกรรมที่สูงกว่าพื้นที่จังหวัดอื่นที่เกิดจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น สภาพแวดล้อมที่เป็นพื้นที่ป่า ภูเขา สภาพอากาศ ซึ่งเป็นตัวชี้วัดทำให้เกิดค่าความแปรผันทางด้านพันธุกรรม (Tabor et al., 2015) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kunprom, & Pramual (2019) ที่ศึกษาการระบุชนิดชนิดของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย พบว่าแมลงวันผลไม้จะมีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมที่สูงหรือต่ำนั้นขึ้นอยู่กับผลไม้ที่เป็นอาหารของแมลงวัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาแมลงวันชนิด *Musca domestica* ในพื้นที่จังหวัดสกลนครก็ยังไม่สามารถยืนยันการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมกว่าพื้นที่อื่นได้ เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจำนวนที่น้อย ควรที่จะมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มขึ้น และไพร์เมอร์มาตรฐาน (Folmer primer) ที่จำเพาะกับยีน *COI* มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดกลุ่มแมลงวัน *Musca* sp. น้อย ควรที่จะมีการใช้ยีนอื่นเข้ามาช่วยในการระบุชนิด (Mashaly et al., 2017) รวมถึงแมลงวันบ้าน *Musca domestica* มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน อยู่ในช่วง 2.0% ซึ่งแตกต่างกับการรายงาน Lipin et al. (2018) ที่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน รวมถึงการศึกษาที่ผ่านมาของ Mashaly et al. (2017) ได้มีการระบุชนิดของแมลงวันที่มีความสำคัญในงานด้านนิติกีฏวิทยาในประเทศซาอุดิอาระเบีย ซึ่งสามารถจัดจำแนกชนิดแมลงวันด้วยเทคนิค DNA Barcoding ได้ 7 ชนิด จากตัวอย่างแมลงวัน 3,697 ตัวอย่าง โดยมีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) อยู่ในช่วง 710 คู่เบส ที่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม 1.05% ซึ่งมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ต่ำกว่าการศึกษาในครั้งนี้ และแมลงวันบ้านทั้ง 5 ชนิด ถือว่าเป็นการรายงานการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และความหลากหลายทางพันธุกรรมในแมลงวันบ้านเป็นครั้งแรกในประเทศไทย

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันหลังลายวงศ์ Sarcophagidae ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ภาคเหนือของประเทศไทย โดยมีค่าความเหมือนอยู่ที่ 98.16-100% สามารถแบ่งแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแมลงวันหลังลายชนิด *Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Sarcophaga peregrina* จากประเทศจีน สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และมาเลเซีย โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกันอยู่ 1.2% และกลุ่มที่ 2 แมลงวันชนิด *Sarcophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* จำนวนทั้งหมด 2 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับแมลงวัน *Sarcophaga dux* จากประเทศไทย อียิปต์ และมาเลเซีย โดยไม่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Buenaventura et al. (2018) ที่ศึกษาแมลงวันหลังลายในประเทศโคลัมเบีย โดยใช้ยีน *COI* พบว่าสามารถจัดจำแนกแมลงวันหลังลายในกลุ่ม *Peckia*, *Oxysarcodexia*, *Ravinia* และ *Tricharaea* ซึ่งสามารถจัดจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยมีค่าความเหมือนถึง 100% และมีค่าความแตกต่างพันธุกรรมที่น้อยกว่า 3% รวมถึงการศึกษาของ Samerjai et al. (2020) ได้ศึกษาแมลงวันหลังลายที่มีความสำคัญทางด้านนิติกีฏวิทยาของประเทศไทย โดยใช้ยีน *COI* และ *COII* เข้ามาช่วยในการระบุชนิด พบว่าสามารถจัดจำแนกชนิดแมลงวันหลังลายได้ 14 ชนิด โดยแมลงวันหลังลายชนิด *Parasarcophaga dux* มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม 0.96% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการศึกษาในครั้งนี้มีค่าความแตกต่างพันธุกรรมที่ต่ำกว่าการศึกษาที่ผ่านมา เนื่องจากมีการเก็บตัวอย่างแมลงวันหลังลายชนิด *Sarcophaga* (*Boettcherisca*) *peregrina* และ *Sarcophaga* (*Parasarcophaga*) *dux* ที่น้อยเกินไป จึงทำให้ไม่พบความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของแมลงวันหลังลายทั้ง 2 ชนิด

จากการสืบค้นข้อมูลของแมลงวันของประเทศไทย ในฐานข้อมูล BOLD พบว่ามีการศึกษาแมลงวันที่อยู่ในฐานข้อมูลน้อย จำนวน 13 ชนิด ของแมลงวันทั้ง 3 วงศ์ โดยคิดเป็นแมลงวันหัวเขียว 1.09% แมลงวันบ้าน 0.75% และแมลงวันหลังลาย 0.49% เมื่อทำการบันทึกตัวอย่างแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย ลงในฐานข้อมูล BOLD จำนวน 17 ชนิด 77 ตัวอย่าง ทำให้ข้อมูลแมลงวันมีจำนวนที่เพิ่มขึ้นจากข้อมูลเดิม จำนวน 4 ชนิด ซึ่งคิดเป็นแมลงวันหัวเขียว 3.66% แมลงวันบ้าน 1.18% และแมลงวันหลังลาย 0.83% เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทยได้การระบุชนิดแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ด้วยเทคนิคดีเอ็นบาร์โค้ด ยังไม่มีรายงานการบันทึก ข้อมูลลงใน

ฐานข้อมูล BOLD พบแต่การบันทึกข้อมูลลงในฐานข้อมูล Genbank เท่านั้น (Barbara et al., 2016; Sontigun et al., 2018; Samerjai et al., 2020)

นอกจากนี้การศึกษาแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ยังข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณดีเอ็นเอในกลุ่มตัวอย่างแมลงวันที่ใช้ศึกษา เช่น จำนวนปริมาณดีเอ็นเอของขาแมลงวันบ้านที่มีน้อยกว่าแมลงวันหัวเขียว และแมลงวันหลังลาย อาจเนื่องจากลักษณะโครงสร้างของขาแมลงวันที่มีขนาดเล็กกว่าแมลงวันอีก 2 วงศ์ (คม สุคนธสรรพ์, และ กาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2548) จึงทำให้มีการเพิ่มปริมาณขาแมลงวันบ้านในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลต่าง ๆ เช่น NCBI, EMBL, หรือ DDBJ ซึ่งพบว่าข้อมูลยังมีน้อย และบางส่วนไม่ได้มีการยอมรับ จึงจำเป็นต้องมีการสร้างฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตให้ครอบคลุมตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในฐานข้อมูลที่มาตรฐานสูง รวมถึงไม่สามารถแยกสปีชีส์ใหม่ที่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ หรือสปีชีส์ใหม่ที่มีวิวัฒนาการแยกจากสปีชีส์เดิม (เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์ และคณะ, 2018)

แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้จำเป็นต้องอาศัยการระบุชนิดแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการระบุชนิดด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อาศัยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด เนื่องจากแมลงวันบางชนิดมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน (Hwang, & Turner, 2005; Al-Ghamdi et al., 2015; Mashaly et al.,2017) จึงไม่สามารถที่จะจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งได้ และการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความหลากหลายชนิดของแมลงวันแต่ละชนิดควรที่มีการศึกษาเพิ่มขึ้นต่อไป เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา และสำรวจความหลากหลายชนิดของแมลงวันในเขตพื้นที่อื่นได้ นอกจากนี้ข้อมูลดังกล่าวที่บันทึกลงในฐานข้อมูล BOLD เป็นข้อมูลอ้างอิงในการจำแนกชนิด สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเกี่ยวกับการเฝ้าระวังพาหะนำโรคที่เกิดจากแมลงวัน และการระบุชนิดแมลงวันที่นำไปใช้ในงานด้านนิติกีฏวิทยา และด้านการแพทย์ต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์, ณรงค์ จตุรัส, และนพวรรณ บุญชู. (2561). ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับการระบุชนิดแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 26*, 1-16.

เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์, ณรงค์ จัตุรัส, สุกัญญา ฮ้อเผ่าพันธ์, ณัฐนันท์ หงษ์ศรีจันทร์, สุภาพร ล้ำเลิศธน, และนพวรรณ บุญชู. (2562). ความหลากหลายของชนิดแมลงวันหัวเขียวในพื้นที่ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จังหวัดพิษณุโลก ราชอาณาจักรไทย. *ประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 3 และการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ครั้งที่ 1 หัวข้อ "การบริหารและการพัฒนาประเทศไทยในยุค 4.0"*, 268-276.

คม สุคนธสรรพ์, และกาบแก้ว สุคนธสรรพ์. (2548). *แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย*. เชียงใหม่: เชียงใหม่ดิจิตอลเวิร์คจำกัด.

ต้องจิตร ถันชมนาง, วิชิต พิพิธกุล, และวันชัย มาลีวงษ์. (2559). *กีฏวิทยาทางการแพทย์ (Medical Entomology)*. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

ธารินี ไชยวงศ์. (2555). ตัวอ่อนของแมลงวันหัวเขียว *Lucilia sericata*: ทางเลือกสำหรับบาดแผลติดเชื้อ. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด, 24*(1), 12-21.

นพวรรณ บุญชู. (2562). *บทบาทแมลงวันในงานนิติเวชกีฏวิทยา*. พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร.

พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์, และอรุณรัตน์ ฉวีราช. (2554). ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตกรณีศึกษา: จีน Cytochrome c Oxidase I (*COI*) ในสัตว์. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม, 5*(2), 205-210.

วุฒิพงศ์ มหาคำ. (2011). DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย, 3*(1), 1-30.

ศิวพร อินต๊ะหล่อ, เลิศลักขณา ภู่พัฒน์, และธานินทร์ ภู่พัฒน์. (2555). การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย. *วารสารนิติเวชศาสตร์, 4*(3), 1-8.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. (2556). *การควบคุมแมลงทางการแพทย์*. (น. 29-35). กรุงเทพฯ: บริษัทหนังสือดีวัน จำกัด.

Al-Ghamdi, K. M., Alikhan M., Mahyoub J. A., Alanazi N. A., AlNajada A. R., Nassar M. I., & Alfarhan B. Z. (2015). Characterization of forensically important necrophagus

flies (Diptera) of Jeddah, Saudi Arabia. *Advances in Environmental Biology, 9*, 58–71.

Aly, S.M. (2014). Reliability of long vs short COI markers in identification of forensically important flies. *Croatian Medical Journal, 55*, 19–26.

Anderson, D.L., Sedgley, M., Short, J.R.T. & Allwood, A.J. (1982). Insect pollination of mango in northern Australia Mangifera indica, includes Apis mellifera. *Australian Journal of Agricultural Research, 33*, 541-548.

Barbara, K. Z., Narin, S., Anchalee, W., Marcel, A. V., Kabkaew, S., Jens, A., & Richard, Z. (2016). Application of DNA barcoding for identifying forensically relevant Diptera from northern Thailand. *Parasitology Research, 115*, 2307-2320.

Bharti, M., & Singh, B. (2017). DNA-Based Identification of Forensically Important Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) From India. *Journal of Medical Entomology, 54*(5), 1151-1156.

Boonchu, N., Piangjai, S., Sukontason. K. L., & Sukontason, K. (2003). Comparison of the effectiveness of baits used in traps for adult fly collection. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 34*, 630-633.

Buenaventura, E., Valverde-Castro, C., Wolff, M., Triana-Chavez, O., & Gómez-Palacio, A. (2018). DNA barcoding for identifying synanthropic flesh flies (Diptera, Sarcophagidae) of Colombia. *Acta Tropica, 182*, 291-297.

Bunchu, N. (2012). Blow fly (Diptera: Calliphoridae) in Thailand: distribution, morphological identification and medical importance appraisals. *International Journal of Parasitology Research, 4*, 57-64.

Bunchu, N., Moophayak, K., Sanit, S., Sukontason, K. L., Sukontason, K., & Kurahashi, H. (2014). Two new records of Isomyia paurogonita Fang and Fan, 1986 and Sumatria latifrons Malloch, 1926 (Diptera: Calliphoridae) from the northern Thailand, with revised key to the species of Isomyia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56, 175-177.

Bunchu, N., Sukontason, K., Sanit, S., Chidburee, P., Kurahashi, H., & Sukontason, K. L. (2012). Occurrence of blow fly species (Diptera: calliphoridae) in Phitsanulok Province, Northern Thailand. *Tropical Biomedicine, 29*(4), 1–12.

Chaiwong, T., Tem-Eiam, N., Limpavithayakul, M., Boongunha, N., Poolphol, W., & Sukontason, K. L. (2014). Aural myiasis caused by *Parasarcophaga* (Liosarcophaga) *dux* (Thomson) in Thailand. *Tropical Biomedicine, 31*(3), 1-3.

Ekrem, T., Willassen, E., & Stur, E. (2007). A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 43*, 530–542.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (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.

Getachew, S., Gebre-Michael, T., Erko, B., Balkew, M., & Medhin, G. (2007). Non-biting cyclorrhaphan flies (Diptera) as carriers of intestinal human parasites in slum areas of Addis Ababa. Ethiopia. *Acta Tropica, 103*, 186-194.

GilArriortua, M., Saloña Bordas, M. I., Köhnemann, S., Pfeiffer, H., & de Pancorbo, M. M. (2014). Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera, Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers. Forensic Science International, 242, 274–282.

Herbert, P. D. N., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedines of the Royal Society B, 270*, 96-99.

Hwang, C., & Turner, B. D. (2005). Spatial and temporal variability of necrophagous Diptera from urban to rural areas. *Medical and Veterinary Entomology, 19*, 379–391.

Hwang, U. W., Kim, W., Tautz, D., & Friedrich, M. (1998). Molecular phylogenetics at the Felsenstein zone: approaching the Strepsiptera problem using 5.8S and 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 9*(3), 470–480.

Ivanova, N. V., Borisenko, A. V., & Hebert, P. D. (2009). Express barcodes: racing from specimen to identification. *Molecular Ecology Resources, 9*, 35-41.

Jisming-See, S. W., Sing, K. W. & Wilson, J. J. (2016). DNA barcodes and citizen science provoke a diversity reappraisal for the "ring" butterflies of Peninsular Malaysia (Ypthima: Satyrinae: Nymphalidae: Lepidotera). *Genome, 59*(10), 879-888.

Jordaens, K., Sonet, G., Braet, Y., De Meyer, M., Backeljau, T., Goovaerts, F., ... Desmyter, S. (2013). DNA barcoding and the differentiation between North American and west European Phormia regina (Diptera, Calliphoridae, Chrysomyinae). *ZooKeys, 365*,149-174.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution, 33*(7), 1870–1874.

Kunprom, C., & Pramual, P. (2019). DNA barcoding of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand: ambiguity, misidentification and cryptic diversity. *Mitochondrial DNA Part A, 30*(8), 861-873.

Kurahashi, H., & Bunchu, N. (2011). The blow flies recorded from Thailand, with the description of a new species of Isomyia Walker (Diptera, Calliphoridae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 17*, 237-278.

Kurahshi, H., & Chaiwong, T. (2013). Keys to the flesh flies of Thailand, with description of a new species of Robineauella Enderlein (Diptera: Sarcophagidae). *Medical Entomology and Zoology, 64*, 83–101.

Kurahashi, H., & Samerjai, C. (2018). Revised keys to the flesh flies of Thailand, with the establishment of a new genus (Diptera: Sarcophagidae). *Medical Entomology and Zoology, 69*, 67–93.

Kumarasinghe, S. P., Karunaweera N. D., & Ihalamulla R. L. (2000). A study of cutaneous myiasis in Sri Lanka. *International Journal of Dermatology, 39*, 689–694.

Kutty, S. N., Pape, T., Pont, A., Wiegmann, B. M., & Meier, R. (2008). The Muscoidea (Diptera: Calyptratae) are paraphyletic: Evidence from four mitochondrial and four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 49*(2), 639–652.

Lebonah, D. E., Dileep, A., Chandrasekhar, K., Sreevani, S., Sreedevi, B., & Kumari J. P. (2014). DNA Barcoding on Bacteria: A Review. *Advances in Biology*, 1-9.

Lertthamnongtham, S., Sukontason, K. L., Sukontason, K., Piangiai, S., Choochote, W., Vogtsberger, RC., & Olson, J. K. (2003). Seasonol fluctuations in populations of the two most forensically important fly species in northen Thailand. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 97*, 87-91.

Li, Y., Cagirici, H.B., Horpaopan, S., Ott, J., Imai, A., Majewski, J., & Lathrop, M. (2015). Leveling the playing field in homozygosity mapping using map distances. *Annals of Human Genetics, 79*, 366–372.

Madeira, T., Souza, C. M., Cordeiro, J., & Thyssen, P. J. (2016). The use of DNA barcode for identifying species of Oxysarcodexia Townsend (Diptera: Sarcophagidae): A preliminary survey. Acta Tropica, 161, 73-78.

Marangi, M., Hall, M. J. R., Aitken, A., Ready, P. D., & Giangaspero, A. (2016). Origins of *Wohlfahrtia magnifica* in Italy based on the identification of mitochondrial cytochrome b gene haplotypes. *Parasitology Research, 115*, 483–487.

Mashaly, A., Alajmi, R., Mustafa, A. E., Rady, A., & Alkhedir, H. (2017). Species Abundance and Identification of Forensically Important Flies of Saudi Arabia by DNA Barcoding. *Journal of Medical Entomology, 54*(4), 837–843.

Meng, F., Ren, L., Wang, Z., Deng, J., Guo, Y., Chen, C., … Cai, J. (2017). Identification of forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) in China based on COI. *Journal of Medical Entomology, 54*(5), 1193–1200.

Moophayak, K., Kurahashi, H., & Sukontason, K. L. (2011). Three new species of shoot fly, *Atherigona* spp., from northern Thailand. *Journal of Insect Science, 11*(139), 1-7.

Nelson, L. A., Wallman, J. F., & Dowton, M. (2007). Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology, 21*(1), 44–52.

Niu, Y., Zheng, D., Yao, B., Cai, Z., Zhao, Z., Wu, S., ... Yang, D. (2017). A novel bioconversion for value-added products from food waste using Musca domestica. *Waste Management, 61*, 455–460.

Qiu, D., Cook, C. E., Yue, Q., Hu, J., Wei, X., Chen, J., Liu, D., & Wu, K. (2017). Species-level identification of the blowfly *Chrysomya megacephala* and other Diptera in China by DNA barcoding. *Genome, 60*(2), 158-168.

Ren, L., Chen, W., Shang, Y., Meng, F., Zha, L., Wang, Y., & Guo, Y. (2018). The Application of COI Gene for Species Identification of Forensically Important Muscid Flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology, 55*(5), 1150-1159.

Renaud, A. K., Savage, J., & Adamowicz, S. J. (2012). DNA barcoding of Northern Nearctic Muscidae (Diptera) reveals high correspondence between morphological and molecular species limits. *BMC Ecology, 12*, 24.

Roe, A. D., & Sperling, F. A. H. (2007). Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics Evolution, 44*(1), 325–345.

Samerjai, C., Sukontason, K. L., Sontigun, N., Sukontason, K, Klong-Klaew, T., Chareonviriyaphap, T., ... Wannasan, A. (2020). Mitochondrial DNA-Based Identification of Forensically Important Flesh Flies (Diptera: Sarcophagidae) in Thailand. *Insects, 11*(1), 1-16.

Schurrer, J. A., Dee, S. A., Moon, R. D., Rossow, K. D., Mahlum, C., Mondaca, E., ... Pijoan, C. (2004). Spatial dispersal of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated flies after contact with experimentally infected pigs. *American Journal of Veterinary Research,, 65*(9), 1284-1292.

Sherman, R. A. (2003). Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care, 26*(2), 446-51.

Singh, B., Kurahashi, H., & Wells, J. D. (2011). Molecular phylogeny of the blowfly genus Chrysomya. *Medical and Veterinary Entomology, 25*, 126–134.

Sontigun N., Sukontason K. L., Amendt J., Zajac BK., Zehner R., Sukontason K., ... Wannasan, A. (2018). Molecular Analysis of Forensically Important Blow Flies in Thailand. *Insects, 9*(4), 1-15.

Sukontason, K. L., Narongchai, P., Sripakdee, D., Boonchu, N., Chaiwong, T., Ngern-Klun, R., ... Sukontason, K. (2005). First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology. *Journal of Medical Entomology, 42*, 702-704.

Sukontason, K., Sribanditmongkol, P., Ngoen-klan, R., Klongklaew, T., Moophayak, K., & Sukontason, K. L. (2010). Differentiation between Lucilia cuprina and *Hemipyrellia ligurriens* (Diptera: Calliphoridae) larvae for use in forensic entomology applications. *Parasitology research, 106* (3), 641-646.

Suriyakan, S., Kanthawong, S., Chaiwong, T., Lamlertthon, S., Thongwat, D., Panya, M., ... Bunchu, N. (2016). Antimicrobial activity of excretory and secretory products from *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) larvae. *Journal of the Medical Association of Thailand, 99* (9), 1-8.

Tabor, K. L., Fell, R. D., & Brewster, C.C. (2005). Insect fauna visiting carrion in southwest Virginia. *Forensic Science Insects, 150*, 73–80.

Torres-Gutierrez, C., Bergo, E. S., Emerson, K. J., de Oliveira, T. M. P., Greni, S., & Sallum, M. A. M. (2016). Mitochondrial COI gene as a tool in the taxonomy of mosquitoes Culex subgenus Melanoconion. *Acta Tropica, 164*, 137-149.

Tumrasvin, W., & Shinonaga, S. (1977). Studies on medically important flies in Thailand. III. Report of species belonging to the genus Musca Linne, including the taxonomic keys (Diptera: Muscidae). *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University, 24*, 209-218.

Williams, A. K., Lamb, J., & Villet, H. M. (2016). Phylogenetic radiation of the greenbottle flies (Diptera, Calliphoridae, Luciliinae). *Zookeys, 586*, 59–86.

Wilson, J. J. (2012). DNA barcodes for insects. *Methods in Molecular Biology, 858*, 17-46.

Zuidhof, M.J., Molnar, C.L., Morley, F.M., Wray, T.L., Robinson, F.E., Khan, B.A., Al-Ani, L., & Goonewardene, L.A. (2003). Nutritive value of house fly (*Musca domestica*) larvae as a feed supplement for turkey poults. *Animal Feed Science and Technology, 105* (1-4), 225-230.

Zumpt, F. (1965). *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. London, UK: Butterworths.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ประกาศแต่งตั้งคณะกรรมการที่ปรึกษาเพื่อควบคุมการทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท

ประกาศบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการที่ปรึกษาเพื่อควบคุมการทำวิทยานิพนธ์
ระดับปริญญาโท

.....

เพื่อให้การทำวิทยานิพนธ์ของนิสิตระดับปริญญาโท ดำเนินไปด้วยความเรียบร้อยมีคุณภาพและมาตรฐานสอดคล้องกับหลักเกณฑ์ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และเป็นไปตามข้อ ๒๗ (๒) (ก) แห่งข้อบังคับมหาวิทยาลัยนเรศวร ว่าด้วยการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา พ.ศ.๒๕๕๙

ฉะนั้น อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๒๓ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ.๒๕๓๓ บัณฑิตวิทยาลัย จึงแต่งตั้งอาจารย์ที่ปรึกษาเพื่อควบคุมการทำวิทยานิพนธ์ของ นางสาวเกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์ รหัสประจำตัว ๕๙๐๖๐๓๕๗ สาขาวิชาปรสิตวิทยา ดังต่อไปนี้

๑. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพวรรณ	บุญชู	ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
๒. ดร.ณัฐนันท์	หงษ์ศรีจันทร์	กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
๓. ดร.สุกัญญา	ย้อเผ่าหนัง	กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ให้อาจารย์ที่ปรึกษาดำเนินการควบคุมการทำวิทยานิพนธ์ ให้เป็นไปตามประกาศมหาวิทยาลัยนเรศวร เรื่อง แนวปฏิบัติในการทำวิทยานิพนธ์ พ.ศ. ๒๕๕๔ ประกาศ ณ วันที่ ๒๑ มิถุนายน พ.ศ.๒๕๕๕

ประกาศ ณ วันที่ ๒๐ เมษายน พ.ศ.๒๕๖๐

(ศาสตราจารย์ ดร.รัตนะ บัวสนธ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาคผนวก ข ประกาศอนุมัติให้นิสิตระดับปริญญาโทดำเนินการวิจัย

ประกาศบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เรื่อง อนุมัติให้นิสิตระดับปริญญาโทดำเนินการทำวิจัย
ครั้งที่ ๓๒๗/๒๕๖๐

.....

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้ นางสาวเกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์ รหัสประจำตัว ๕๙๐๖๐๓๕๗ นิสิตระดับปริญญาโท หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา ดำเนินการทำวิจัยตามโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่เสนอ

เรื่อง ภาษาไทย "ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย"
ภาษาอังกฤษ "DNA BARCODE OF MEDICALLY-IMPORTANT FLIES IN THAILAND"
โดยมี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพวรรณ บุญชู เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

จึงประกาศมาให้ทราบโดยทั่วกัน

ประกาศ ณ วันที่ ๓ พฤศจิกายน พ.ศ.๒๕๖๐

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาคผนวก ค ใบรับรองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ

ใบรับรองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย
ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ)	DNA barcodes of medically-important flies in Thailand
ชื่อผู้วิจัย	นางสาวเยตรินทร์ ทิพย์เกิร์
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุพรรณ บุญฐ
สังกัดหน่วยงาน/คณะ	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
เลขสำคัญโครงการ	NUIBC AV 61-01-03
เลขที่รับรองโครงการ	60-77
ประเภทการรับรอง	งานประเภทที่ 1
การรับรองครั้งที่ 1	ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 6/2561 วันที่ 19 มีนาคม 2561 เห็นว่ามีความสอดคล้องกับแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ จึงเห็นควรให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้
วันหมดอายุครั้งที่ 1	จนกว่าจะสิ้นสุดโครงการ

ลงนาม

(ดร. วิสาข์ ลุพรรณเศรษฐบุตร์)
ประธานคณะกรรมการเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ
มหาวิทยาลัยนเรศวร

หมายเหตุ ใบรับรองฉบับนี้ใช้ควบคู่กับหนังสือราชการ เลขที่ ศธ 0527.01.33(1)/ว 0606 ลงวันที่ 21 มีนาคม 2561

ภาคผนวก ง การเตรียมสารละลายสำหรับการขั้นตอน DNA Barcoding

1. Reagent for DNA extraction

1.1 Alkaline buffer 17.5 µL (100 ml)

0.1 N NaOH

0.3 mM EDTA

(เติมสารทั้งหมดใน Distilled water 200 ml และปรับปริมาตรค่า pH 13)

1.2 neutralization buffer 32.5 µL (100 ml)

0.1 Tris-HCl

(เติมสารทั้งหมดใน Distilled water 200 ml และปรับปริมาตรค่า pH 7)

1.3 TE buffer (pH 8.0) (200 ml)

1 M Tris-HCL	1.6 ml
0.5 M EDTA	0.4 ml

(เติม สารทั้งหมดใน Distilled water 200 ml และปรับปริมาตรค่า pH to 8.0)

2. Reagent for agarose gel electrophoresis

2.1 Electrophoresis buffer (10X TBE) (1000 ml)

Tris base	108 g
Boric acid	55 g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	7.5 ml
Distilled water	1000 ml

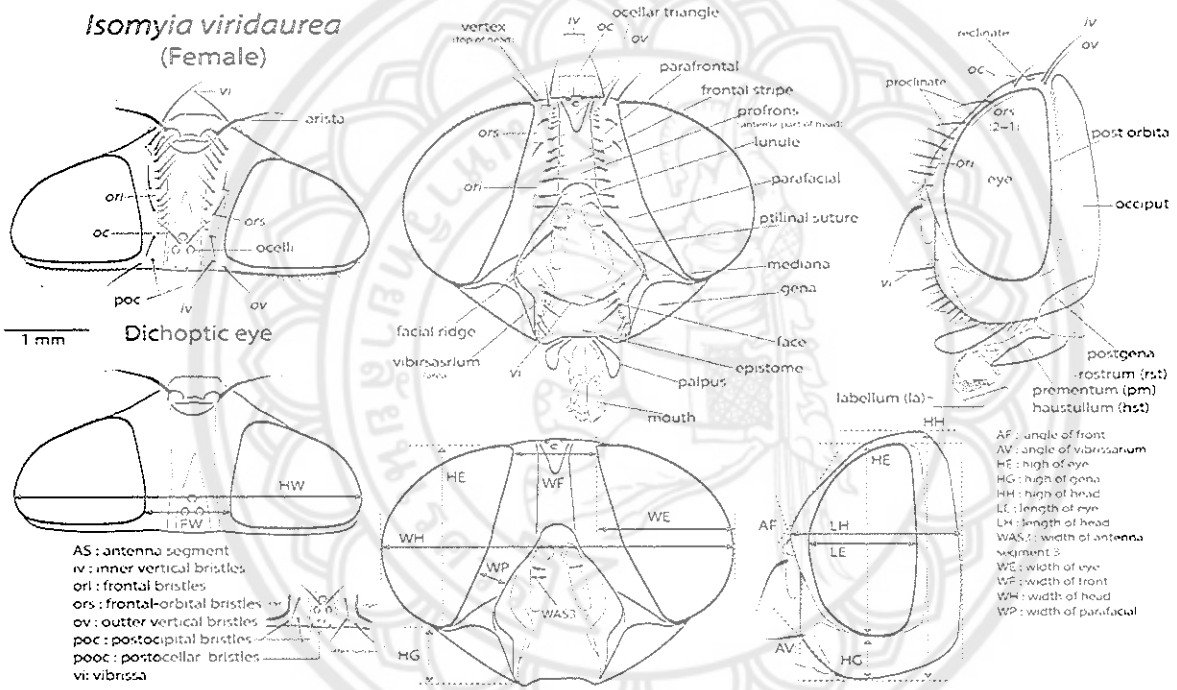
(เติม Tris base 108 g, Boric acid 55 g และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) 7.5 ml ลงใน Distilled water 1000 ml ละลายสารทั้งหมดให้ละลาย และก็ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส)

2.2. Agarose gel (2%) (100 ml)

Agarose	2 g
1XTBE	100 ml
NEO green	5 µl

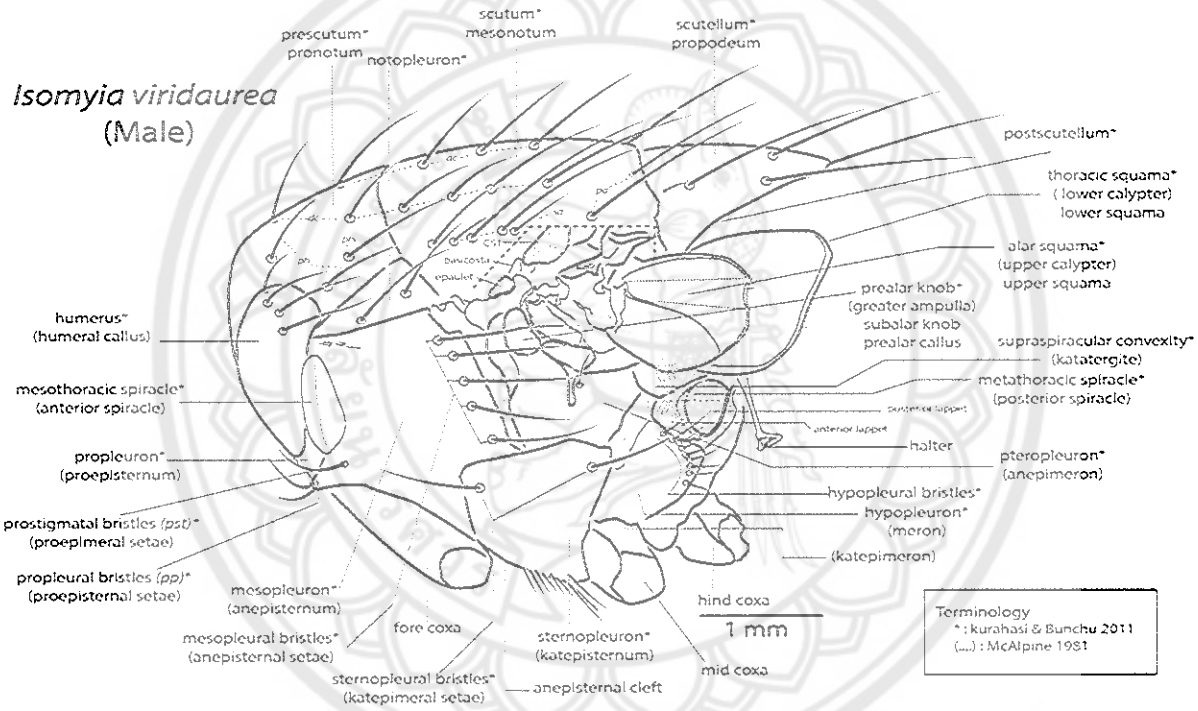
(ชั่ง agarose 2 g ผสมเข้ากับ 1XTBE 100 ml และละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยความร้อนของ microwave เป็นเวลา 1 นาที หรือจนกว่าสารละลายหมด จากนั้นเติม NEO gree 5 µl ลงไปในสารลาย และเทสารละลายจนไปที่ถาดใส่ gel เพื่อให้ gel แข็งตัว)

ภาคผนวก จ ภาพไดอะแกรมที่ใช้ในการระบุชนิดของแมลงวัน



ภาพ 48 ลักษณะโครงสร้างส่วนหัวของแมลงวัน *Isomyia viridaurea* เพศเมีย

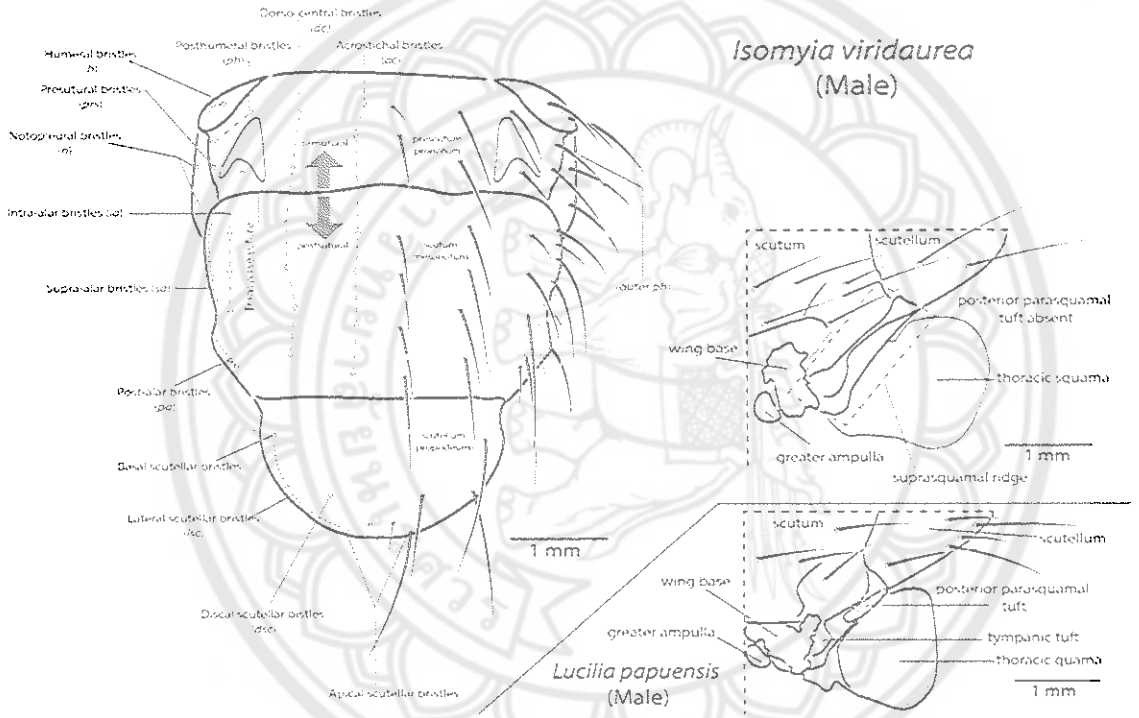
ที่มา: นพวรรณ บุญชู (2562)



ภาพ 49 ลักษณะโครงสร้างส่วนอกแมลงวันด้านข้างของแมลงวัน *Isomyia viridaurea* เพศผู้

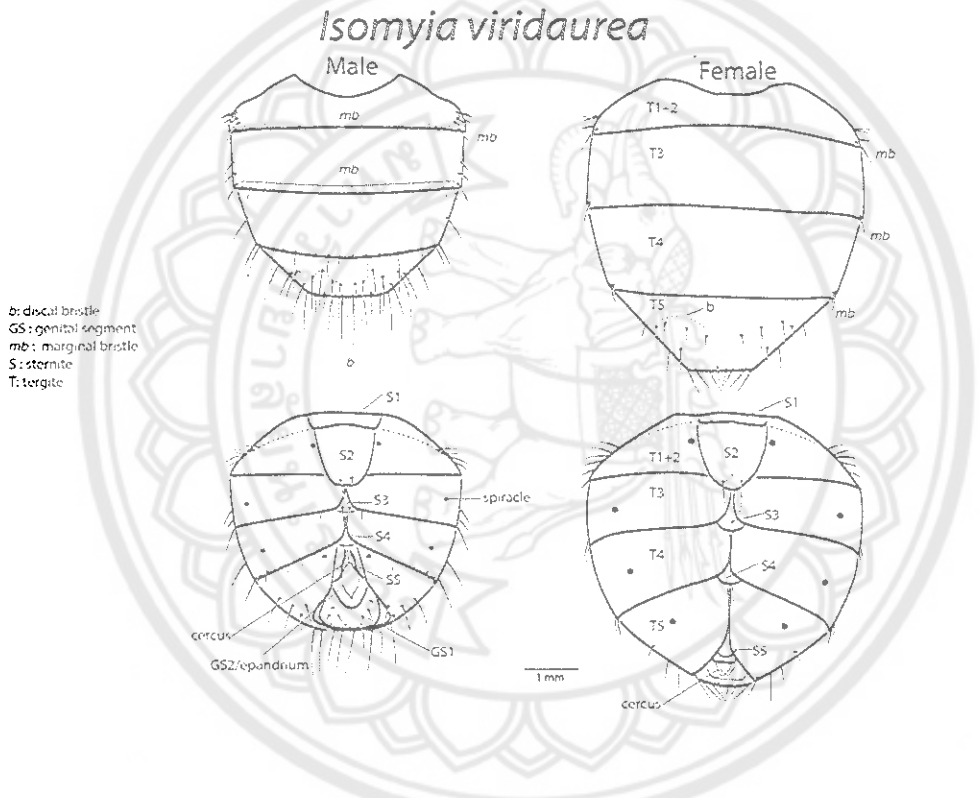
ที่มา: นพวรรณ บุญชู (2562)

ภาคผนวก จ (ต่อ)



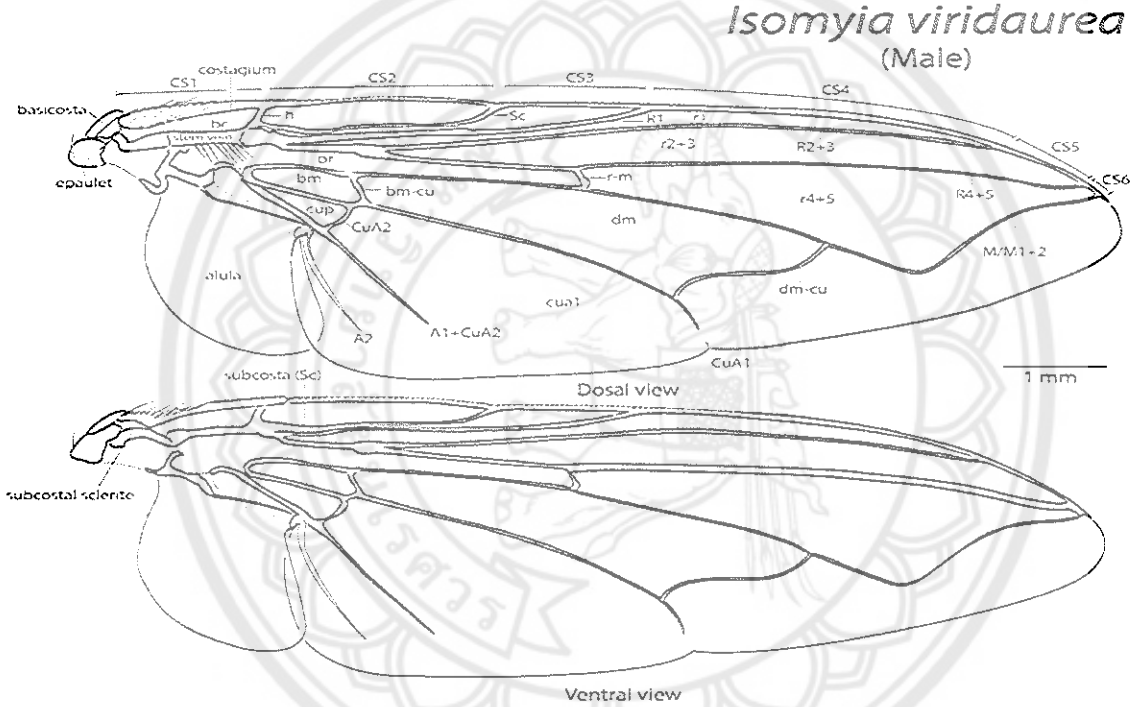
ภาพ 50 ลักษณะโครงสร้างส่วนอกของแมลงวัน *Isomyia viridaurea* เพศผู้ และแมลงวัน *Lucilia papuensis* เพศผู้

ที่มา : นพวรรณ บุญชู (2562)



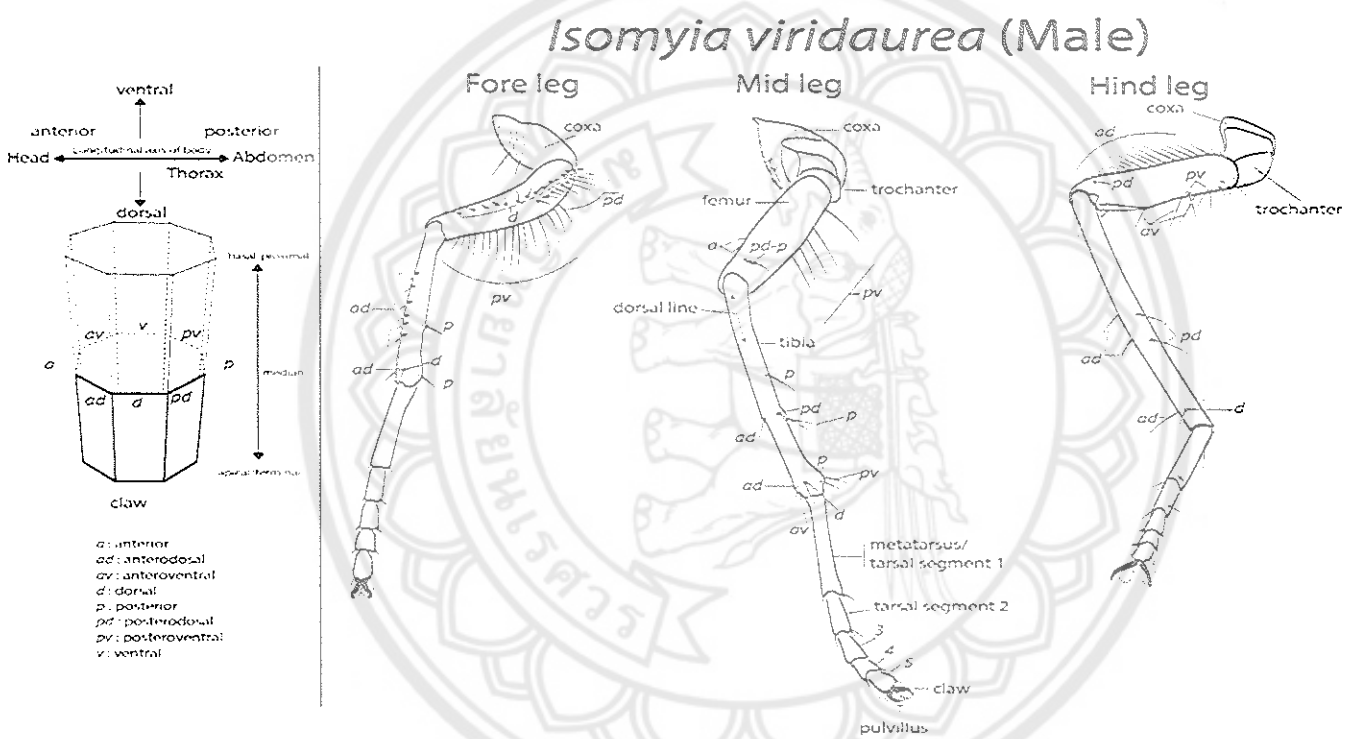
ภาพ 51 ลักษณะโครงสร้างส่วนท้องของแมลงวัน *Isomyia viridaurea* เพศผู้และเพศเมีย

ที่มา: นพวรรณ บุญชู (2562)



ภาพ 52 ลักษณะโครงสร้างส่วนปีกของแมลงวัน *Isomyia viridaurea* เพศผู้

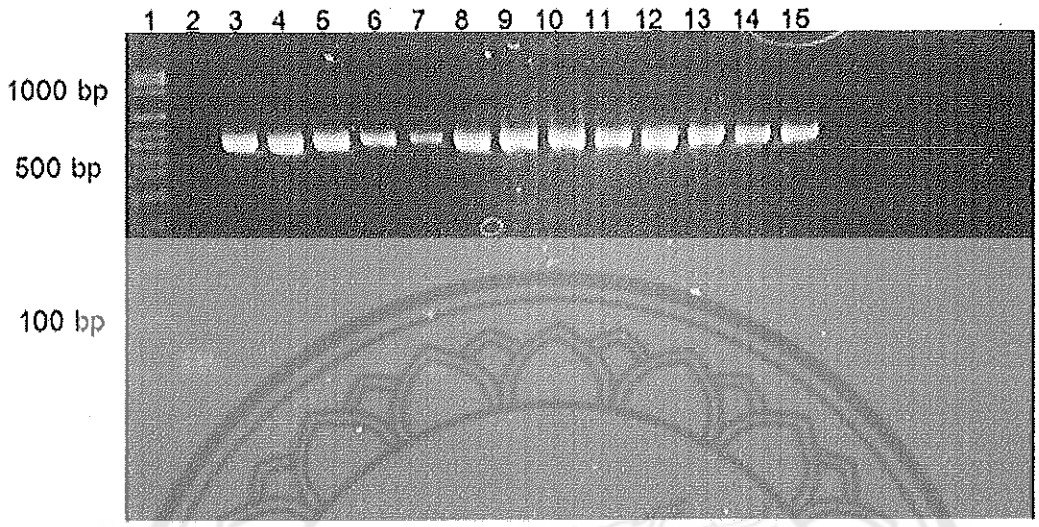
ที่มา: นพวรรณ บุญชู (2562)



ภาพ 53 ลักษณะโครงสร้างส่วนขาของแมลงวัน *Isomyia viridaurea* เพศผู้

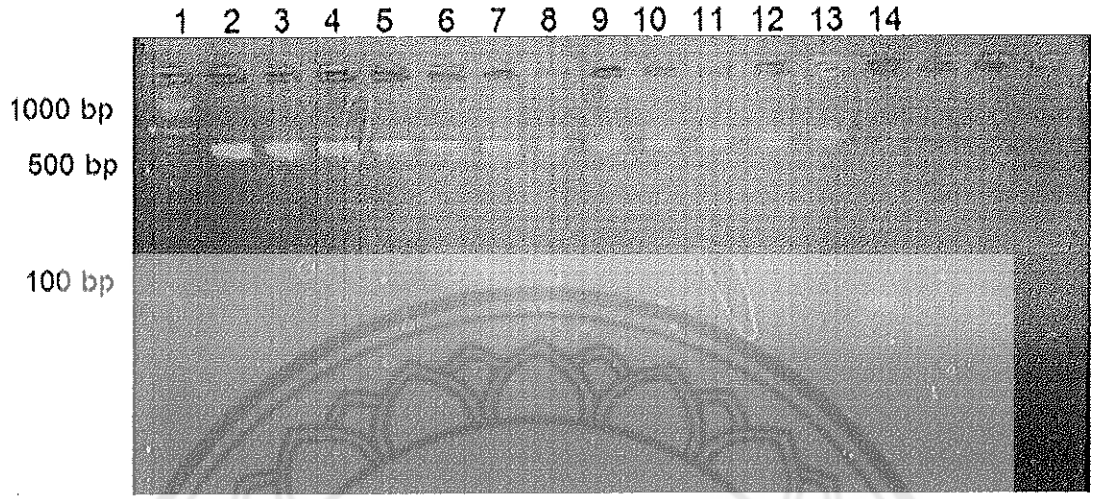
ที่มา: นพวรรณ บุญชู (2562)

ภาคผนวก ฉ ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



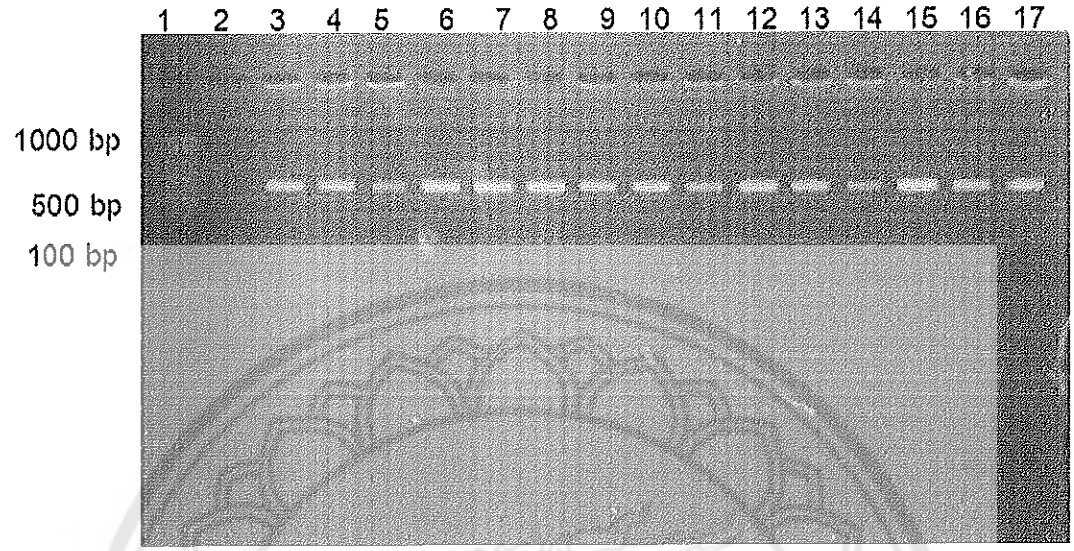
ภาพ 54 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Calliphodae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = Negative control, Lane3 = ARChi12_TH, Lane4 = ARChi13_TH, Lane5 = ARKh3_TH, Lane6 = ARKh4_TH, Lane7 = ARKS3_TH, Lane8 = ARKS14_TH, Lane9 = ARPb28_TH, Lane10 = ARPhi2_TH, Lane11 = ARPhi5_TH, Lane12 = ARPL3_TH, Lane13 = ARPL5_TH, Lane14 = ARSak1_TH และ Lane15 = ARSak2_TH

ภาคผนวก ฉ (ต่อ)



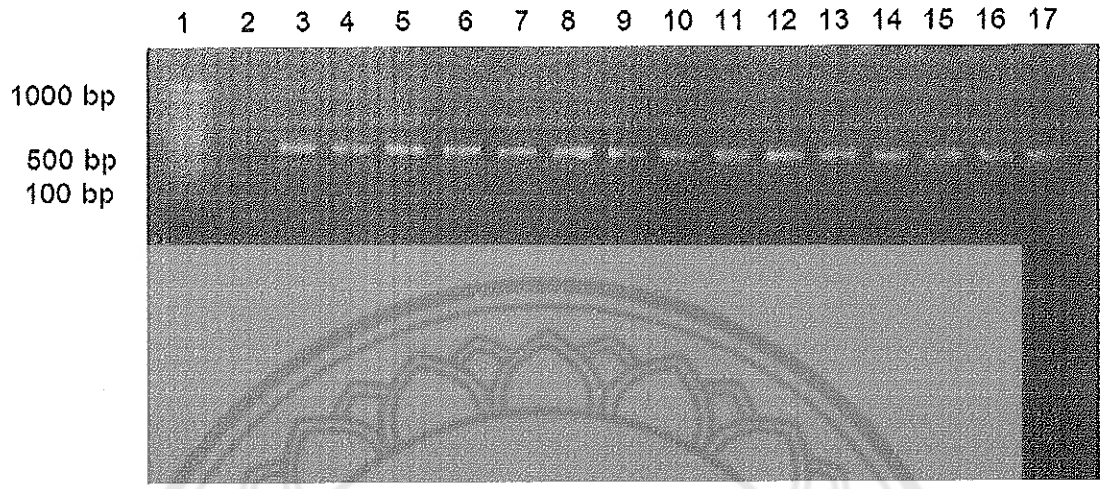
ภาพ 55 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Calliphodae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = AVPb3_TH, Lane3 = CNPL53_TH, Lane4 = CNPL92_TH, Lane5 = CBCM1_TH, Lane6 = CBCM2_TH, Lane7 = CCPT21_TH, Lane8 = CCPT112_TH, Lane9 = CCPT221_TH, Lane10 = CMBM6_TH, Lane11 = CMBM9_TH, Lane12 = CMChai1_TH, Lane13 = CMChB1_TH และ Lane14 = Negative control

ภาคผนวก ฉ (ต่อ)



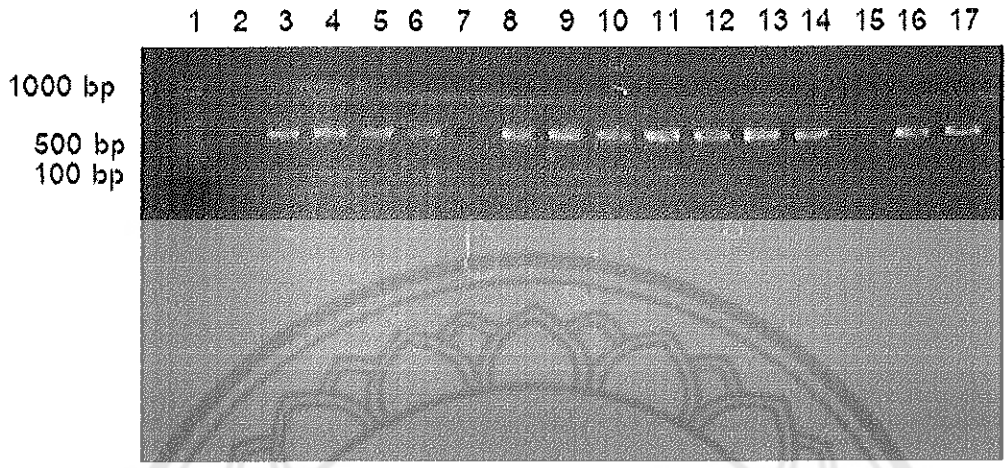
ภาพ 56 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Calliphodae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = Negative control, Lane3 = CMChB2_TH, Lane4 = CMCR2_TH, Lane5 = CMKh2_TH, Lane6 = CMKh5_TH, Lane7 = CMKS2_TH, Lane8 = CMPN4_TH, Lane9 = CMPb4_TH, Lane10 = CMPb5_TH, Lane11 = CMPL2_TH, Lane12 = CMPL56_TH, Lane13 = CMRB102_TH, Lane14 = CMPhi1_TH, Lane15 = CMPhi13_TH, Lane16 = CMTM16_TH และ Lane17 = CMTM74_TH

ภาคผนวก ฉ (ต่อ)



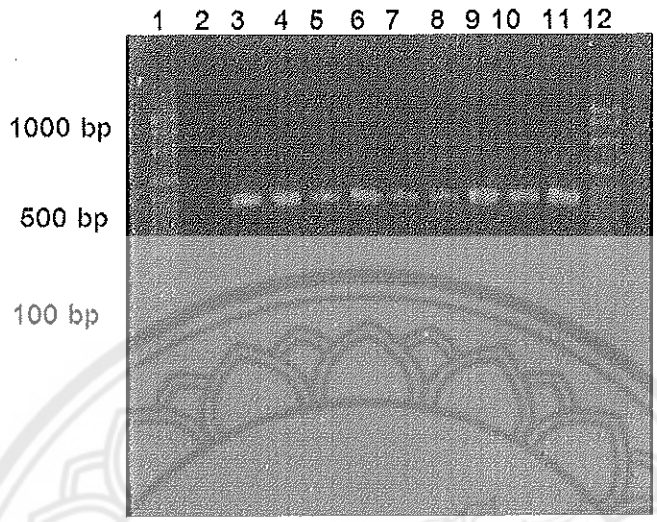
ภาพ 57 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Calliphodae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = Negative control, Lane3 = CMMS1_TH, Lane4 = CMMS2_TH, Lane5 = CMSak12_TH, Lane6 = CMKh5_TH, Lane7 = CMKS2_TH, Lane8 = CMPN4_TH, Lane9 = CMPb4_TH, Lane10 = CMSak14_TH, Lane11 = CMUR1_TH, Lane12 = CMUR2_TH, Lane13 = CMUT1_TH, Lane14 = CMUT2_TH, Lane15 = CM PSe1_Lao, Lane16 = CMPSe2_Lao และ Lane17 = CMPSe3_Lao

ภาคผนวก ฉ (ต่อ)



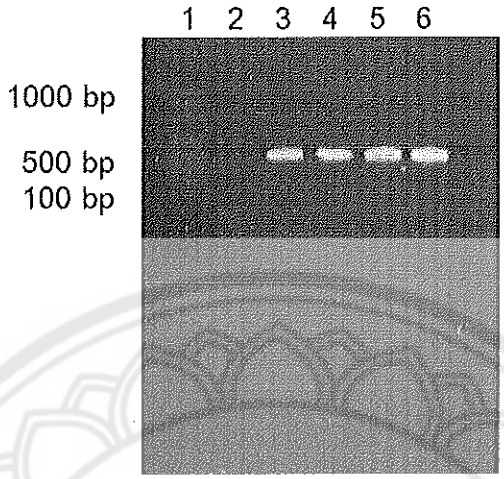
ภาพ 58 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Calliphodae และวงศ์ Muscidae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = Negative control, Lane3 = CpiPL15_TH, Lane4 = CpiPL31_TH, Lane5 = HeliPb78_TH, Lane6 = HeliPL36_TH, Lane7 = HeliPL127_TH, Lane8 = LcuPL1_TH, Lane9 = LcuPL2_TH, Lane10 = LPaPb9_TH, Lane11 = LPaPL7_TH, Lane12 = LPaPL27_TH, Lane13 = LPaPao104_TH, Lane14 = LPaPao105_TH, Lane15 = AoriPL1_TH, Lane16 = AoriPL2_TH และ Lane17 = HCCM1_TH

ภาคผนวก ฉ (ต่อ)

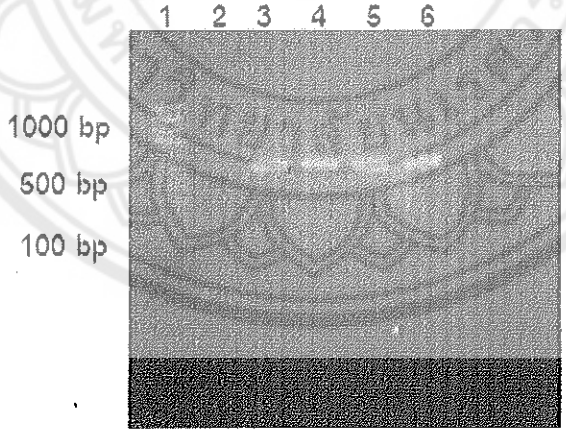


ภาพ 59 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Muscidae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = Negative control, Lane3 = HCCM2_TH, Lane4 = HSPhi27_TH, Lane5 = HSPhi28_TH, Lane6 = MDChai44_TH, Lane7 = MDCM1_TH, Lane8 = MDKh9_TH, Lane9 = MDKh15_TH, Lane10 = MDPb10_TH, Lane11 = MDPb11_TH และ Lane12 = DNA marker

ภาคผนวก ฉ (ต่อ)

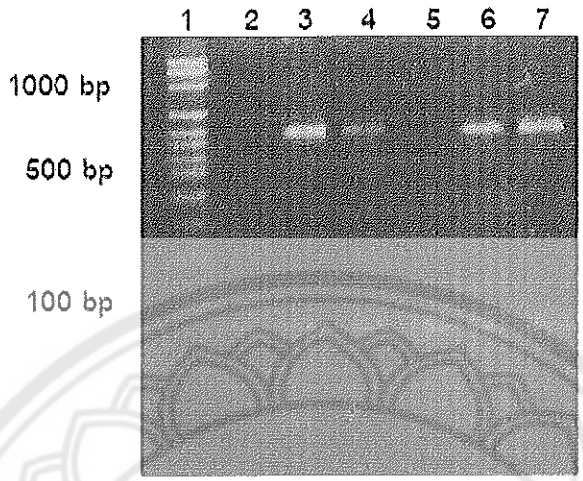


ภาพ 60 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Calliphodae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = Negative control, Lane3 = MDPhi52_TH, Lane4 = MDPuD1_TH, Lane5 = MDPuD2_TH และ Lane6 = MDsak26_TH



ภาพ 61 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Calliphodae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = Negative control, Lane3 = MDsak47_TH, Lane4 = MDUT2_TH, Lane5 = SNCM1_TH และ Lane6 = SNCM2_TH

ภาคผนวก ฉ (ต่อ)



ภาพ 62 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ประมาณ 710 คู่เบส ของแมลงวันในวงศ์ Calliphodae ซึ่งแยกบน 2% อะกาโรสเจล (agaros gel) Lane1 = DNA marker, Lane2 = Negative control, Lane3 = BPCM1_TH, Lane4 = BPCM2_TH, Lane5 = Negative control, Lane6 = PDCM1_TH และ Lane7 = PDCM2_TH