

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงเบียน
DIACHASMIMORPHA LONGICAUDATA (ASHMEAD) ในแมลงวัน
ฟักทอง และแมลงวันพริกด้วยเทคนิค SSCP ของยีน COI
ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF *DIACHASMIMORPHA*
LONGICAUDATA (ASHMEAD) IN PUMPKIN FLY
AND SOLANUM FLY USING SSCP OF THE COI GENE

ดวงตา จุลศิริกุล^{1*} และสังวรณ กิจทวี²

Duangta Julsirikul^{1*} and Sangvorn Kitthawee²

บทคัดย่อ

Diachasmimorpha longicaudata (Ashmead) เป็นแมลงเบียนที่สำคัญของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย โดยมีรายงานว่า เป็นชนิดพันธุ์ซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยอย่างน้อย 3 ชนิดพี่น้อง ได้แก่ DLA, DLB และ DLBB ที่มีความจำเพาะต่อชนิดแมลงอาศัย ซึ่งอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรม งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟักทอง และแมลงวันพริกโดยใช้เทคนิค single strand conformation polymorphism (SSCP) ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ขนาด 265 คู่เบส ผลการวิเคราะห์พบว่า *D. longicaudata* จากแมลงวันพริกมีรูปแบบ COI SSCP haplotype แบบ COI-1, COI-2 และ COI-3 ซึ่งจัดอยู่ในชนิด DLA ในขณะที่ *D. longicaudata* จากแมลงวันฟักทองมีรูปแบบ haplotype 4 แบบ ได้แก่ COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11 ซึ่งเป็นรูปแบบใหม่ที่แตกต่างไปจากทั้ง 3 ชนิดพี่น้อง ที่เคยมีการรายงานมาก่อน นอกจากนี้ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบ Maximum Likelihood แสดงให้เห็นว่า *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนในประเทศไทย

¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

¹Faculty of Science, Burapha University, Muang District, Chonburi Province 20131

²คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

²Faculty of Science, Mahidol University, Ratchathewi District, Bangkok 10400

*corresponding author e-mail: duangta@buu.ac.th

Received: 1 August 2025; Revised: 29 September 2025; Accepted: 3 October 2025

DOI: <https://doi.org/10.14456/lsej.2025.22>

มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแบบมีบรรพบุรุษร่วมกันด้วยค่าความเชื่อมั่นบูตสแตรป์เท่ากับ 100% โดยรูปแบบ COI SSCP haplotype แบบ COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11 รวมกลุ่มเป็นเคลดย่อยที่แยกชัดเจนออกจากชนิดอื่นภายในเคลดของ *D. longicaudata* ผลการวิจัยในครั้งนี้สะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพของการประยุกต์ใช้เทคนิค SSCP ร่วมกับยีน COI ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงเบียน *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนในประเทศไทย และข้อมูลที่ได้จะช่วยสนับสนุนงานทางอนุกรมวิธาน การอนุรักษ์พันธุกรรม ตลอดจนการใช้ประโยชน์ของแมลงเบียนชนิดนี้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างถูกต้องเหมาะสม และยั่งยืน

คำสำคัญ: *Diachasmimorpha longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อน ยีน COI เทคนิค SSCP

Abstract

Diachasmimorpha longicaudata (Ashmead) is an important parasitoid of tephritid fruit flies in Thailand and has been recognized as the species complex comprising at least three sibling species, named as DLA, DLB, and DLBB. These species exhibit distinct host specificity, which may play an important role in driving their genetic differentiation. This research aimed to investigate the genetic diversity of *D. longicaudata* collected from pumpkin fruit flies and solanum fruit flies using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of a 265 base pair fragment of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. The results revealed that *D. longicaudata* from solanum fruit flies exhibited COI-1, COI-2, and COI-3 haplotypes, corresponding to the DLA lineage. Whereas *D. longicaudata* from pumpkin fruit flies showed four novel haplotypes (COI-8, COI-9, COI-10, and COI-11) which are distinct from the previously reported lineage. Furthermore, nucleotide sequence analysis and a Maximum Likelihood phylogenetic tree demonstrated that the *D. longicaudata* species complex in Thailand is a monophyletic group with a bootstrap value of 100%. The haplotypes COI-8, COI-9, COI-10, and COI-11 formed a distinct subclade within the *D. longicaudata* clade and are clearly differentiated from their sibling species. This study demonstrates the effectiveness of integrating SSCP analysis with the COI gene to investigate genetic variation within the *D. longicaudata* species complex in Thailand. The genetic data obtained provide valuable insights for taxonomic studies, genetic conservation, and the appropriate and sustainable application of this parasitoid species in biological pest control.

Keywords: *Diachasmimorpha longicaudata*, complex species, COI gene, SSCP technique

บทนำ

Diachasmimorpha longicaudata (Ashmead) เป็นแมลงเบียน (parasitoid) ที่จัดอยู่ในอันดับ Hymenoptera วงศ์ Braconidae ซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของแมลงวันผลไม้หลายสกุล เช่น *Bactrocera Anastrepha* และ *Ceratitis* ที่เป็นแมลงศัตรูพืชในหลายภูมิภาคทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย (Chinajariyawong et al., 2000) โดยแมลงศัตรูพืชเหล่านี้บางชนิด เช่น *Bactrocera dorsalis*, *Ceratitis capitata*, หรือ *Zeugodacus tau* ยังมีความต้านทานต่อการกำจัดแมลงศัตรูพืช (Vontas et al., 2011; Ye et al., 2023) จึงทำให้ยากต่อการควบคุมกำจัด ดังนั้น *D. longicaudata* จึงเป็นแมลงที่มีประโยชน์ สามารถนำไปใช้ควบคุม หรือลดการระบาดของประชากรแมลงวันผลไม้โดยชีววิธีได้อย่างปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม แมลงเบียน *D. longicaudata* เป็นแมลงเบียนเดี่ยวในระยะตัวหนอนแบบเบียนภายใน (solitary larval endoparasitoid) พบกระจายแถบภูมิภาคอินโด-ออสเตรเลีย แต่ในปัจจุบันได้ถูกนำไปใช้ในการควบคุมแมลงวันผลไม้ในหลายพื้นที่ทั่วโลก (Ovruski et al., 2000) สำหรับประเทศไทย มีการสำรวจการกระจายของประชากรตามธรรมชาติของแมลงเบียน *D. longicaudata* (Chinajariyawong et al., 2000; Kitthawee, 2000) และศึกษาพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงแมลงเบียนชนิดนี้เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโดยชีววิธี (Sirimachan et al., 2017; Winotai et al., 2007) นอกจากนี้มีรายงานว่า แมลงเบียน *D. longicaudata* ในประเทศไทยเป็นชนิดพันธุ์ซับซ้อน (complex species) ประกอบด้วยอย่างน้อย 3 ชนิดพี่น้อง (sibling species) คือ DLA, DLB และ DLBB โดยทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาล้ำคลึงกันมาก แต่มีความแตกต่างกันในเชิงพันธุกรรม และในเชิงการสืบพันธุ์ และบางชนิดมีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงอาศัย (Kitthawee, 2008; Kitthawee, 2013; Julsirikul et al., 2014; Kitthawee & Dujardin, 2016)

การวิเคราะห์ single strand conformation polymorphism (SSCP) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำ นิยมใช้ในการศึกษาชีววิทยาเชิงประชากร (Gasser et al., 2006; Kakavas, 2021) รวมถึงการนำมาใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของในแมลง (Hiss et al., 1994) โดยนิยมใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ในไมโทคอนเดรีย เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ เนื่องจากยีน COI เป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในการนำมาเป็นเครื่องหมายระบุชนิดสิ่งมีชีวิต หรือ DNA barcode (Antil et al., 2023) โดยเมื่อนำมาใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ SSCP พบว่าสามารถตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่แยกยากหรือมีความซับซ้อน เช่น การประยุกต์ใช้ในแมลง (Thakaew, 2011; Julsirikul et al., 2017; Kitthawee & Julsirikul, 2019; Thoroughgood et al., 2021) Julsirikul et al. (2017) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI และ 16S rDNA ด้วยเทคนิค SSCP พบว่า ทั้ง 3 ชนิดพี่น้องของ *D. longicaudata* (DLA, DLB และ DLBB) แสดงรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ (haplotype) ของยีน COI ที่แตกต่างกัน 7 รูปแบบ

โดยมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างแปรผัน (polymorphic site) 32 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามตัวอย่างของ *D. longicaudata* เหล่านั้นได้จากแมลงอาศัยในกลุ่มแมลงวันทอง (*Bactrocera dorsalis*) และแมลงวันฝรั่ง (*Bactrocera correcta*) ซึ่งแมลงเบียน *D. longicaudata* ในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจว่าพบในแมลงวันผลไม้อื่น ๆ อีกหลายชนิด รวมถึงพบในแมลงวันพริก (*Bactrocera latifrons*) และแมลงวันฟักทอง (*Zeugodacus tau*) (Chinajariyawong et al., 2000) และยังไม่มีการรายงานข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงเบียน *D. longicaudata* ในแมลงอาศัยเหล่านี้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงเบียน *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันพริก และแมลงวันฟักทองในประเทศไทย โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ด้วยเทคนิค SSCP ที่อาจทำให้พบความแปรผันทางพันธุกรรมของ *D. longicaudata* ในประเทศไทยที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างแมลงเบียน

แมลงเบียน *Diachasmimorpha longicaudata* เก็บจากส่วนผลที่ถูกทำลายโดยแมลงวันผลไม้จาก 6 พื้นที่ในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2559-2563 รายละเอียดดังตารางที่ 1 (Table 1) การจัดจำแนกเบื้องต้น โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยของแมลงเบียน และแมลงวันผลไม้ ถูกจัดจำแนกตาม Wharton & Gilstrap (1983) และ White & Elson-Harris (1992) ตามลำดับ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

Table 1 Location and number of field-collected *Diachasmimorpha longicaudata* used in single strand conformation polymorphism analysis.

Location	Code	Fruit fly	Host plant	Parasitoid (N)		
				Total	M	F
Saraburi	SRSX	<i>Bactrocera latifrons</i>	<i>Solanum xanthocarpum</i>	58	28	30
	SRCF	<i>Bactrocera latifrons</i>	<i>Capsicum frutescens</i>	21	10	11
Petchabun	PECF	<i>Bactrocera latifrons</i>	<i>Capsicum frutescens</i>	26	6	20
Rayong	RYCF	<i>Bactrocera latifrons</i>	<i>Capsicum frutescens</i>	25	16	9
Chiang Mai	CMTT	<i>Zeugodacus tau</i>	<i>Trichosanthes tricuspidata</i>	11	10	1
Ranong	RNSSp	<i>Zeugodacus tau</i>	<i>Strychnos</i> sp.	85	61	24

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณบริเวณยีน COI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase

chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 5'GGTAACTGCTCATGCTT3' และ 5'TAAATCCACTGAACACCC3' (Julsirikul et al., 2017) ตามขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation ที่ 94°C 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR จำนวน 25 รอบ (Denaturation ที่ 94°C 1 นาที Annealing ที่ 50°C 1 นาที และ Extension ที่ 72°C 45 วินาที) และ Final extension ที่ 72°C 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา PCR ด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ViSafe Red Gel Stain (Vivantis, Malaysia) ใน 0.5% TBE buffer ใช้ความต่างศักย์คงที่ 100 V เป็นเวลา 30 นาที และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator

3. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

นำผลผลิตปฏิกิริยา PCR ของยีน COI ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ SSCP loading buffer (98% formamide, 0.5 M EDTA, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol) 1.5 ไมโครลิตร นำไปทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 96°C 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อป้องกันดีเอ็นเอกลับคืนสภาพเป็นสายคู่ นำมาแยกด้วย 7% Polyacrylamide gel electrophoresis ใน 0.5% TBE buffer ที่อุณหภูมิ 4°C ตามวิธีการของ Julsirikul et al. (2017) จากนั้นตรวจสอบรูปแบบของ SSCP haplotype ด้วยเทคนิค Silver staining

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

การระบุรูปแบบของ COI SSCP haplotype ของแมลงเบียน *D. longicaudata* แต่ละตัวในการศึกษานี้ ทำโดยใช้รูปแบบของ Julsirikul et al. (2017) เป็นรูปแบบอ้างอิง รูปแบบที่เหมือนกันจะถูกระบุเป็น haplotype COI-1 ถึง COI-7 รูปแบบที่แตกต่างจะถูกจัดเป็นรูปแบบใหม่ นับจำนวนตัวอย่างแต่ละ haplotype วิเคราะห์หาค่าความถี่ของ haplotype จำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แปรผัน (polymorphic site) ความหลากหลายของ haplotype (h) และความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) ด้วยโปรแกรม Arlequine 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ของ COI SSCP haplotype ทุกรูปแบบที่แตกต่างกันซ้ำ เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสองทิศทาง (bi-directional) โดยบริษัท เอ ที ซี จี จำกัด ประเทศไทย นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้อง และแก้ไขลำดับบริเวณหวั่นท้ายให้ได้ขนาด 265 คู่เบส ด้วยโปรแกรม BioEdit 7.2 (Hall, 1999) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA12 (Kumar et al., 2024) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI จากการวิเคราะห์ด้วย Nucleotide BLAST ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์หมายเลข KX767865, KX767871, KX767872, KX767876, KX767878, KX767879 และ KX767880 ซึ่งคือ COI SSCP haplotype COI-1 ถึง COI-7 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *D. longicaudata* (AY935349 และ JX240377) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และใช้ *Psytallia* spp. (EU761016, EU761026, EU761032 และ EU761037) เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup)

การสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบ Maximum Likelihood (ML) ใช้แบบจำลองที่มีค่า Bayesian Information Criterion (BIC) ต่ำที่สุด ได้แก่ แบบจำลอง Hasegawa-Kishino-Yano with Gamma distribution (HKY+G) ด้วยค่าพารามิเตอร์ดังนี้ Maximum Likelihood value ($\ln L$) = -1007.077 Gamma distribution = 0.17 และ Transition/Transversion bias (R) = 2.43 ด้วยการทดสอบความเชื่อมั่นทางสถิติบูตสแตรป์ (bootstrap support) 1000 รอบ

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ Single Strand Conformation Polymorphism ของยีน COI

การวิเคราะห์ SSCP ของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ขนาด 265 bp ของแมลงเบียน *D. longicaudata* จำนวน 226 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงรูปแบบของ COI SSCP haplotype ที่แตกต่างกัน 7 รูปแบบ โดยค่าความถี่ COI SSCP haplotype แสดงดังตารางที่ 2 (Table 2) จากการศึกษาพบว่า *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟริก (*B. latifrons*) แสดงรูปแบบของ COI SSCP haplotype เหมือนกับรูปแบบอ้างอิง ได้แก่ COI-1, COI-2 และ COI-3 โดยทั้ง 4 ประชากรพบการกระจายของ COI SSCP haplotype ทุกรูปแบบ ในขณะที่ *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟักทอง (*Z. tau*) แสดงรูปแบบของ COI SSCP haplotype รูปแบบใหม่ 4 รูปแบบ ตั้งชื่อเป็น COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11 จากค่าความถี่พบว่า COI-8 เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด นอกจากนี้ การวิเคราะห์ค่าความหลากหลายของ haplotype และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่า แมลงเบียน *D. longicaudata* ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าความหลากหลายของ haplotype รวมเท่ากับ 0.740 ± 0.014 โดยแต่ละประชากรมีค่าอยู่ในช่วง 0.193 ถึง 0.480 และมีค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์รวมเท่ากับ 0.058 ± 0.028 โดยแต่ละประชากรมีค่าอยู่ในช่วง 0.002 ถึง 0.006

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการจัดเรียงลำดับ (sequence alignment) แสดงให้เห็นว่า COI SSCP haplotype ทั้ง 11 รูปแบบที่ต่างกันมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แปรผัน (polymorphic site) จำนวน 45 ตำแหน่ง คิดเป็น 17.58% แสดงดังตารางที่ 3 (Table 3) องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ของทุกรูปแบบมีปริมาณ AT สูงอยู่ในช่วง 67.55% ถึง 69.43% การวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์รายคู่โดยใช้แบบจำลอง Kimura 2-parameter แสดงดังตารางที่ 4 (Table 4) ยืนยันผลการวิเคราะห์ SSCP โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงเบียน *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟริก ที่แสดงรูปแบบ COI SSCP haplotype แบบ COI-1, COI-2 และ COI-3 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเทียบกับรูปแบบอ้างอิงเท่ากับ 0 ในขณะที่ *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟักทอง ที่แสดงรูปแบบ COI SSCP haplotype แบบ COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11 ที่แตกต่างไปจากรูปแบบอ้างอิงมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 9.26 % ถึง 13.32% และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *D. longicaudata* AY935349 และ JX240377 จากฐานข้อมูล NCBI มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ COI SSCP haplotype แบบ COI-4 และ COI-7 ตามลำดับ

Code (N)	Haplotype frequency							S	h (SD)	π (SD)
	COI-1	COI-2	COI-3	COI-8	COI-9	COI-10	COI-11			
SRSX (58)	0.069 (4)	0.034 (2)	0.897 (52)					5	0.193 (0.067)	0.003 (0.002)
SRCF (21)	0.857 (18)	0.095 (2)	0.048 (1)					5	0.267 (0.119)	0.004 (0.002)
PECF (26)	0.077 (2)	0.231 (6)	0.692 (18)					5	0.480 (0.094)	0.005 (0.003)
RYCF (25)	0.760 (19)	0.080 (2)	0.080 (4)					5	0.407 (0.108)	0.006 (0.004)
CMTT (11)				0.727 (8)	0.091 (1)		0.182 (2)	2	0.473 (0.161)	0.002 (0.002)
RNSsp (85)				0.788 (67)	0.141 (12)	0.071 (6)		3	0.358 (0.059)	0.003 (0.002)
Total (226)	0.190 (43)	0.053 (12)	0.332 (75)	0.332 (75)	0.057 (13)	0.027 (6)	0.009 (2)	32	0.740 (0.014)	0.058 (0.028)

[illegible]

299

Table 4 Percent nucleotide difference (below diagonal) and number of base difference (above diagonal) based on 265 bp of COI sequence between SSCP haplotypes using the Kimura 2-parameter model.

Haplotype	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.
1. COI-1 (KX767865)	-	3	5	21	22	20	16	26	28	27	27	21	16	0	5	3
2. COI-2 (KX767876)	1.15	-	2	20	21	21	17	29	29	28	30	20	17	3	2	0
3. COI-3 (KX767878)	1.91	0.76	-	22	23	23	19	31	31	30	32	22	19	5	0	2
4. COI-4 (KX767879)	8.44	8.01	8.84	-	9	3	18	27	25	24	26	0	18	21	22	20
5. COI-5 (KX767871)	8.88	8.44	9.28	3.52	-	8	16	26	24	23	25	9	16	22	23	21
6. COI-6 (KX767872)	8.01	8.44	9.28	1.15	3.11	-	17	26	24	23	25	3	17	20	23	21
7. COI-7 (KX767880)	6.37	6.79	7.61	7.17	6.32	6.74	-	24	24	23	25	18	0	16	19	17
8. COI-8	10.61	11.98	12.85	11.09	10.64	10.64	9.70	-	2	3	1	27	24	26	31	19
9. COI-9	11.52	11.98	12.85	10.18	9.74	9.74	9.70	0.76	-	1	1	25	24	28	31	19
10. COI-10	11.06	11.52	12.39	9.74	9.30	9.30	9.26	1.15	0.38	-	2	24	23	27	30	28
11. COI-11	11.06	12.45	13.32	10.64	10.18	10.18	10.14	0.38	0.38	0.76	-	26	25	27	32	30
12. <i>D. longicaudata</i> (AY935349)	8.44	8.01	8.84	0.00	3.52	1.15	7.17	11.09	10.18	9.74	10.64	-	18	21	22	20
13. <i>D. longicaudata</i> (JX240377)	6.37	6.79	7.61	7.17	6.32	6.74	0.00	9.70	9.70	9.26	10.14	7.17	-	16	19	17
14. SRCF (COI-1)	0.00	1.15	1.91	8.44	8.88	8.01	6.37	10.61	11.52	11.06	11.06	8.44	6.37	-	5	3
15. PECF (COI-3)	1.91	0.76	0.00	8.84	9.28	9.28	7.61	12.85	12.85	12.35	13.32	8.44	7.61	1.91	-	2
16. RYCF (COI-2)	1.15	0.00	0.76	8.01	8.44	8.44	6.79	11.98	11.98	11.52	12.45	8.01	6.79	1.15	0.76	-

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

แผนภูมิต้นไม้แบบ Maximum Likelihood แสดงดังภาพที่ 1 (Figure 1) สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ของแมลงเบียน *D. longicaudata* จากการศึกษาจำนวน 7 ลำดับ และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์อีก 9 ลำดับ ของ *D. longicaudata* จากฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการอ้างอิง และเปรียบเทียบ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Psytallia* spp. จำนวน 4 ลำดับ เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม การจัดจำแนกของแผนภูมิต้นไม้แสดงให้เห็นว่า *D. longicaudata* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแบบมีบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic group) แยกจากสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มด้วยค่าความเชื่อมั่นบูตสแตรป์เท่ากับ 100% โดยแยกเป็น 2 เคลดหลัก (major clade) คือ เคลดหลักที่ 1 ประกอบด้วยเคลดย่อย (subclade) ของ *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟริก อยู่ร่วมกับ *D. longicaudata* จากฐานข้อมูล NCBI แบบ COI-1, COI-2 และ COI-3 และเคลดย่อยของ *D. longicaudata* JX240377 ที่อยู่ร่วมกับ *D. longicaudata* จากฐานข้อมูล NCBI แบบ COI-7 ส่วนเคลดหลักที่ 2 ประกอบด้วย เคลดย่อยของ *Diachasmimorpha* sp. AY935349 อยู่ร่วมกับ *D. longicaudata* จากฐานข้อมูล NCBI แบบ COI-4, COI-5 และ COI-6 และเคลดย่อยของ *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟักทอง (COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11) ที่รวมกันเป็นกลุ่มแยกจากรูปแบบอื่น ๆ แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *D. longicaudata* ในกลุ่มนี้ ซึ่งเป็นกลุ่มใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน

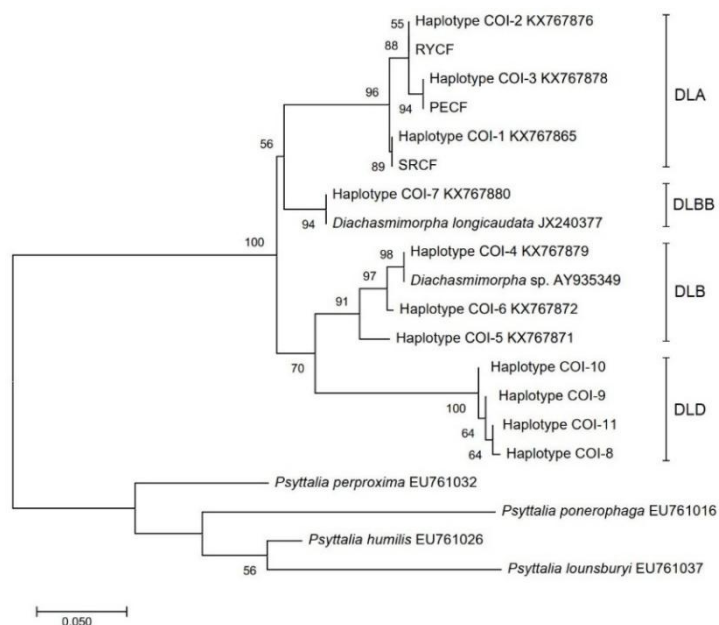


Figure 1 Maximum Likelihood trees of COI SSCP haplotype sequences. Bootstrap support (>50%) using the Hasegawa-Kishino-Yano distance is shown at each branch. Scale bar represents 0.05 substitutions per site.

อภิปรายผล

1. การวิเคราะห์ Single Strand Conformation Polymorphism ของยีน COI

เทคนิค SSCP เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพ ในการศึกษานี้ ใช้เทคนิค SSCP ตรวจสอบความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ขนาด 265 คู่เบส จากผลการวิเคราะห์พบว่าสามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ในระดับ 1 คู่เบส ดังตารางที่ 3 (Table 3) สอดคล้องกับ Hiss et al. (1994) และ Kakavas (2021) ที่รายงานว่า เทคนิค SSCP สามารถตรวจสอบความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ในระดับ 1 คู่เบส โดยมีความแม่นยำถึง 99% เมื่อขนาดของดีเอ็นเอที่นำมาใช้มีความยาวไม่เกิน 300 คู่เบส Julsirikul et al. (2017) รายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อน พบว่าเทคนิค SSCP สามารถตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ได้ในระดับ 2 คู่เบส และความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ได้ในระดับ 1 คู่เบส แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเทคนิคนี้ที่สามารถนำไปใช้งานได้จริงในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด

การเปรียบเทียบความแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ของ *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อน พบว่ามีองค์ประกอบแบบมีปริมาณ AT สูง ซึ่งเป็นลักษณะปกติของยีนในไมโทคอนเดรียของแมลง (Habeeb et al., 2011; Song et al., 2016) โดยมีค่าความหลากหลายของ haplotype (h) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) ใกล้เคียงกับ Julsirikul et al. (2017) ที่มีค่าเฉลี่ย h เท่ากับ 0.724 และ ค่าเฉลี่ย π เท่ากับ 0.0441 ในประเทศไทย *D. longicaudata* ถูกระบุว่าเป็นชนิดพันธุ์ซับซ้อน แยกเป็นชนิดพันธุ์ DLA, DLB และ DLBB ด้วยข้อมูลทางโมเลกุล ทางสัณฐานวิทยา และการผสมข้ามชนิด (Kitthawee, 2008; Kitthawee, 2013; Julsirikul et al., 2014; Kitthawee & Dujardin, 2016) โดยการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลทางโมเลกุลพบว่าทั้ง 3 ชนิดพันธุ์แสดงรูปแบบ COI SSCP haplotype 7 รูปแบบ และมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์อยู่ในช่วง 6.78% ถึง 8.54% และค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์อยู่ในช่วง 0.45% ถึง 0.78% (Julsirikul et al., 2017) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ พบรูปแบบ COI SSCP haplotype 4 รูปแบบใหม่ใน *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟักทอง (*Z. tau*) ได้แก่รูปแบบ COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11 โดยทั้ง 4 รูปแบบมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเองอยู่ในช่วง 0.38% ถึง 1.15% และมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากชนิดพันธุ์ DLA DLB และ DLBB อยู่ในช่วง 9.26% ถึง 13.32% ซึ่งโดยทั่วไปแมลงในอันดับ Hymenoptera ค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ระหว่างชนิดจะมากกว่า 4% ซึ่งถือเป็นเกณฑ์ขั้นต่ำในการแยกชนิด (Cognato, 2006) โดยมีค่าเฉลี่ยความแตกต่างระหว่างชนิดอยู่ที่ 11.5% (Hebert et al., 2003) แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในอันดับนี้ ดังนั้นเมื่อพิจารณา ร่วมกับการศึกษานี้ *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนในประเทศไทย จะมีรูปแบบของ COI

SSCP haplotype ทั้งหมดรวมเป็น 11 รูปแบบ และมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI ที่แปรผันจำนวน 45 ตำแหน่ง แสดงถึงการพบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มากขึ้น ซึ่ง Stireman et al. (2006) อธิบายว่า แมลงเบียนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับแมลงอาศัยที่มันลงเบียน และจะพัฒนาความแตกต่างทางพันธุกรรมจนอาจเกิดเป็นชนิดใหม่ได้ตามชนิดของแมลงอาศัยที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยที่แตกต่างกัน (cascading host-associated differentiation) แมลงเบียน *D. longicaudata* มีแมลงวันผลไม้หลายชนิดเป็นแมลงอาศัย (Chinajariyawong et al., 2000) โดยพบว่า *D. longicaudata* สายพันธุ์ DLA มีความจำเพาะต่อแมลงวันฝรั่ง (Kitthawee 2008; Kitthawee & Dujardin 2009; Julsirakue et al., 2014) และแมลงวันพริก (Kitthawee, 2010) ซึ่งสอดคล้องการวิจัยครั้งนี้ที่พบ *D. longicaudata* สายพันธุ์ DLA ในแมลงวันพริก ในขณะที่ *D. longicaudata* ที่มีรูปแบบ COI SSCP haplotype COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11 เป็นความแปรผันรูปแบบใหม่ พบได้เฉพาะในแมลงวันฟักทอง ดังนั้นความจำเพาะต่อชนิดของแมลงอาศัย จึงอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยอื่น เช่น ระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (Julsirikul et al., 2017) และนำไปสู่การแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ภายในกลุ่มของ *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อน

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

โครงสร้างของแผนภูมิต้นไม้แบบ Maximum Likelihood (ML) แสดงให้เห็นว่าแมลงเบียน *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนในประเทศไทยมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแบบมีบรรพบุรุษร่วมกัน โดยการจัดกลุ่ม และการแสดงความสัมพันธ์ของ COI SSCP haplotype จากโครงสร้างแผนภูมิต้นไม้ ML และการวิเคราะห์ COI SSCP haplotype ในการศึกษาอื่น สอดคล้องกับ Julsirakul et al. (2014, 2017) คือ *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนในประเทศไทย 3 ชนิด คือ DLA, DLB และ DLBB มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ คือ DLA (COI-1, COI-2 และ COI-3) ใกล้ชิดกับ DLBB (COI-7) มากกว่า DLB (COI-4, COI-5 และ COI-6) โดยการจัดกลุ่มบนแผนภูมิต้นไม้ และค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกันแสดงว่า *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันพริกทุกประชากรจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ DLA ในขณะที่ *D. longicaudata* ที่ได้จากแมลงวันฟักทองแสดงรูปแบบ COI SSCP haplotype แบบใหม่ที่ยังไม่เคยพบมาก่อน ได้แก่รูปแบบ COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11 ทั้ง 4 รูปแบบถูกจัดรวมกันเป็น 1 เคลดย่อย ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ DLB โดยพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในเคลดของ COI-8, COI-9, COI-10 และ COI-11 มีค่าต่ำ แต่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างแปรผันไปจากชนิดที่น้อง DLA, DLB และ DLBB ในระดับที่เป็นค่าที่ใช้ในการแยกชนิดของแมลงในอันดับ Hymenoptera (>4%) ดังนั้นจึงยืนยันการแยก *D. longicaudata* ที่แสดง COI SSCP haplotype 4 รูปแบบใหม่ที่พบในแมลงวันฟักทองเป็นอีก 1 ชนิดภายในกลุ่ม *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อน โดยตั้งชื่อเป็น DLD

ตามรายงานการสำรวจของ Kitthawee (2002) ที่พบแมลงเบียน *D. longicaudata* ชนิด DLD เฉพาะในแมลงวันฟักทองเช่นกัน

สรุปผลการวิจัย

เทคนิค SSCP เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษาชีววิทยาเชิงประชากร เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ไม่ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์มาก่อน และยังมีข้อได้เปรียบที่สามารถใช้ในการคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากเพื่อตรวจหาความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อนำมาใช้ร่วมกับยีน COI ในการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงเบียน *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนในประเทศไทย จึงสามารถตรวจสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทำให้พบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของ *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนได้เพิ่มมากขึ้น การวิจัยนี้เป็นการรายงานข้อมูลความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงเบียน *D. longicaudata* ชนิด DLD เป็นครั้งแรก โดยพบว่า DLD มีลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COI ที่แตกต่างจากชนิดพี่น้องอื่นในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นผลการวิเคราะห์จึงแสดงให้เห็นว่า *D. longicaudata* ชนิดพันธุ์ซับซ้อนในประเทศไทยประกอบด้วยอย่างน้อย 4 ชนิดพี่น้อง ได้แก่ DLA, DLB, DLBB และ DLD ที่จำแนกได้ยากจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว โดยบางสายพันธุ์มีแนวโน้มที่จะพัฒนาความความแปรผันทางพันธุกรรมจากปัจจัยด้านความจำเพาะต่อชนิดของแมลงอาศัย เช่น DLA มีความจำเพาะต่อแมลงวันฝรั่ง (*B. correcta*) และแมลงวันฟริก (*B. latifrons*) ในขณะที่ DLD มีความจำเพาะต่อแมลงวันฟักทอง (*Z. tau*) ซึ่งชนิดของแมลงอาศัยที่แตกต่างกันอาจเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการกีดกันการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรของ *D. longicaudata* ในแต่ละสายพันธุ์ และนำไปสู่การแยกตัวทางพันธุกรรมในระยะยาวได้ ดังนั้น ข้อมูลเกี่ยวกับความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงเบียน *D. longicaudata* จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำแมลงเบียนชนิดนี้ไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี เนื่องจากการเลือกใช้สายพันธุ์ของ *D. longicaudata* ที่เหมาะสมกับศัตรูพืชเป้าหมาย จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ มีความแม่นยำในการควบคุม และลดความเสี่ยงที่อาจเกิดผลกระทบต่อแมลงอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย ผลการวิจัยในครั้งนี้สะท้อนให้เห็นว่า การประยุกต์เทคนิค SSCP ร่วมกับยีน COI เป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพสำหรับการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมในกลุ่มแมลงเบียน โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แยกยาก ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน การอนุรักษ์พันธุกรรม การผลิตและขยายพันธุ์ และการประยุกต์ใช้แมลงเบียนได้อย่างถูกต้องเหมาะสมกับศัตรูพืชเป้าหมายในการควบคุมโดยชีววิธีอย่างยิ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้สนับสนุนการวิจัย ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Antil S, Abraham JS, Sripoorna S, Maurya S, Dagar J, Makhija S, et al. DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. *Molecular Biology Reports* 2023;50(1):761-775.
- Chinajariyawong A, Clarke AR, Jirasurat M, Krisaneepiboon S, Lahey HA, Vijayasegaran S, et al. Survey of opiine parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand and Malaysia. *The Raffles Bulletin of Zoology* 2000;48(1):71-101.
- Cognato A. Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries. *Journal of Economic Entomology* 2006;99:1037-1045.
- Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 2010;10(3):564-567.
- Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, et al. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols* 2006;1:3121e3128.
- Habeeb SKM, Kumar S, Sanjayan KP, Anuradha V, Praveena A. Comparative evolutionary analysis of insects using mitochondrial genes. *International Journal of Current Research* 2011;3:66e73.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999;41:95-98.
- Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2003;270(1):S96-S99.
- Hiss RH, Norris DE, Dietrich CH, Whitcomb RF, West DF, Bosio CF, et al. Molecular taxonomy using single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of mitochondrial ribosomal DNA genes. *Insect Molecular Biology* 1994;3(3):171-182.
- Julsirikul D, Haymer D, Kitthawee S. Genetic structure and diversity of the *Diachasmimorpha longicaudata* species complex in Thailand: SSCP analysis of mitochondrial 16S rDNA and COI DNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* 2017;71:59-68.
- Julsirikul D, Worapong J, Kitthawee S. Analysis of mitochondrial COI sequences of the *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) species complex in Thailand. *Entomological Science* 2014;17:231-239.
- Kakavas KV. Sensitivity and applications of the PCR single-strand conformation polymorphism method. *Molecular Biology Reports* 2021;48(4):3629-3635.

- Kitthawee S. Seasonal occurrence of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae) in a guava orchard in central Thailand. *ScienceAsia* 2000;26(2):87-92.
- Kitthawee S. Studies on systematics and distribution of fruit fly parasitoids, *Diachasmimorpha longicaudata* and related species, in Thailand. (Research Report). Mahidol University; 2002.
- Kitthawee S. Forced-contact mating: a technique for crossing experiments with the fruit fly parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 2008;44:73-78.
- Kitthawee S. Ecological genetics and reproductive isolation of fruit fly parasitoids, *Diachasmimorpha longicaudata* complex, in Thailand. (Research Report). Mahidol University; 2010.
- Kitthawee S. ITS2 sequence variations among members of *Diachasmimorpha longicaudata* complex (Hymenoptera: Braconidae) in Thailand. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 2013;16(2):173-179.
- Kitthawee S, Dujardin JP. The *Diachasmimorpha longicaudata* complex: reproductive isolation and geometric patterns of the wing. *Biological Control* 2009;51:191-197.
- Kitthawee S, Dujardin J-P. The *Diachasmimorpha longicaudata* complex in Thailand discriminated by its wing venation. *Zoomorphology* 2016;135(3):323-332.
- Kitthawee S, Julsirikul D. Population genetic structure of *Zeugodacus tau* species complex in Thailand. *Agricultural and Forest Entomology* 2019;21:265-275.
- Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S, Tamura K. MEGA12: molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution* 2024;41(12):msae263.
- Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Management Reviews* 2000;5:81-107.
- Sirimachan N, Chongchitmate P, Waijaroen R, Damrak K, Srikacha S. Development of mass production method of parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) for control fruit fly. In: Plant protection research and development office annual report. Plant protection research and development office, Department of Agriculture 2017:1030-1036.
- Song SN, Tang P, Wei SJ, Chen XX. Comparative and phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes in basal hymenopterans. *Scientific Reports* 2016;6:20972.
- Stireman JO, Nason JD, Heard SB, Seehawer JM. Cascading host-associated genetic differentiation in parasitoids of phytophagous insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2006;273(1586):523-530.
- Thakaew U, Engkhaninun J, Volkaert H, Attathom T. Molecular diversity of tomato thrips, *Ceratothripoides claratris* (Shumshur) (Thysanoptera: Thripidae) populations found in Thailand using PCR-SSCP. *International Journal of Agricultural Technology* 2011;7(2):307-320.

- Thoroughgood JT, Armstrong JS, White B, Anstead CA, Galloway TD, Lindsay LR, et al. Molecular differentiation of four species of *Oropsylla* (Siphonaptera: Ceratophyllidae) using PCR-based single strand conformation polymorphism analyses and DNA sequencing. *Journal of Medical Entomology* 2021;58(1):241-245.
- Vontas J, Hernández-Crespo P, Margaritopoulos JT, Ortego F, Feng H-T, Mathiopoulos KD, Hsu J-C. Insecticide resistance in tephritid flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2011;100(3):199-205.
- Wharton RA, Gilstrap FE. Key to and status of opiine braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus s.l.* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 1983;76:721-742.
- White IM, Elson-Harris MM. *Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics*. Oxon: CAB International; 1992.
- Winotai A, Waijaroen R, Choeikhamheng P, Morakote R. Research and development of mass production and utilization of parasitoid, for biological control of fruit fly. In: *Plant protection research and development office annual report*. Plant protection research and development office, Department of Agriculture 2007:747-757.
- Ye S, Tian Z, Ma W, Gao X, Chen H, Yang J, et al. Rapid response of midgut bacteria in *Bactrocera tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae) to lambda-cyhalothrin- and spinosad-induced stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2023;265:115502.