การจำแนกชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

Identification of Economically Important Fruit Fly Larvae of Dacini (Diptera: Tephritidae) in Thailand using Scanning Electron Microscopy (SEM)

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

Received 14 April 2019/Revised 22 May 2020/Accepted 17 July 2020

ABSTRACT

Fruit flies are of prime economic and quarantine importance throughout the world. Their larvae infest fruits and cause serious problems in international and sometimes domestic trade. Morphological similarity among larvae of different species has made identification of larval stage based on morphological characteristic very difficult. The present paper reports on the use of scanning electron microscopy (SEM) to improve the precision and efficiency of species identification of fruit fly larvae. Larvae were collected during surveys of fruit orchards in all regions of Thailand during 2016-2018 *in* from which 120 specimens of 6 species were collected. Studies were focused on the six dacini fruit flies of greatest economic importance in Thailand including: *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, Zeugodacus cucurbitae* and *Z. tau.* A dichotomous key was prepared to enable initial identification of larvae by using a combination of morphological features. However, further phylogenetic analysis is needed to clarify the distinction among other species.

Keywords: larvae, fruit fly, SEM, DNA barcode

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ 10900

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

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

บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้เป็นศัตรูพืชของผัก ผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นศัตรูพืชกักกันพืชที่สำคัญของโลก ตัวอ่อนแมลงวันผลไม้สร้างความเสียหายต่อการนำเข้าและส่งออก ตัวอ่อนแมลงวันผลไม้มีลักษณะภายนอกที่มีความคล้ายคลึงกันมาก ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดด้วยจุลทรรศน์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) เพื่อจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางการเกษตรให้ถูกต้อง และเป็นที่ยอมรับระดับสากล โดยศึกษาจากตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จำนวน 6 ชนิด รวม 120 ตัวอย่าง บรรยายลักษณะสำคัญและจัดทำแนวทางตรวจวินิจฉัยตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ 6 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาด้านความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนข้อมูลในการจำแนกความแตกต่างในระดับชนิดของแมลงวันผลไม้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ตัวอ่อน, แมลงวันผลไม้, จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

บทนำ

แมลงวันผลไม้หรือแมลงวันทอง (true fruit flies) เป็นแมลงในอันดับ (Order) Diptera วงศ์ (Family) Tephritidae ซึ่งเป็นวงศ์ที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดของแมลงในอันดับ Diptera ทั่วโลก มีการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้แล้วมากกว่า 5,000 ชนิด (Aluja and Norrbom, 1999) ประมาณ 10% ของแมลงวันผลไม้เป็นศัตรูพืชผักและผลไม้ (Diamantidis *et al.,* 2008) มีการกระจายแพร่หลายไปทั่วทวีปแอฟริกา เอเชีย อเมริกา ยุโรปและออสเตรเลีย ยกเว้นแอนตาร์กติกา เป็นแมลงศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายกับผักและผลไม้ทั่วโลกเป็นอย่างมาก ดังนั้น จึงทำให้แมลงวันผลไม้เป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญระดับโลกอย่างแท้จริง (Hendrichs, 2000) สำหรับประเทศไทย พบว่าแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยเข้าทำลายผักผลไม้โดยการวางไข่บนผลที่มีเปลือกบางหรืออ่อนนุ่ม จากนั้นตัวอ่อนจะเจริญเติบโตกัดกินอยู่ภายในผล ทำให้ผักผลไม้เน่าเสียก่อนการเก็บเกี่ยว สร้างความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ การตรวจพบตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ที่ติดไปภายในผลพร้อมการส่งออกผักผลไม้ไปยังต่างประเทศ ก่อให้เกิดปัญหาการกีดกันทางการค้าตามมา ส่งผลกระทบต่อการส่งออกและเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก

การตรวจวินิจฉัยชนิดตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคชีวโมเลกุลควบคู่ไปด้วย เพื่อความถูกต้องและแม่นยำ เทคนิคชีวโมเลกุลที่ใช้ได้แก่ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) จาก mitochondrial cytochrome oxidase (cox1 หรือ mtCOI) ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีนที่ใช้เป็นมาตรฐานในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ทั่วโลกใช้ (Armstrong and Ball, 2005) ในการจัดจำแนกและวินิจฉัยชนิดของสัตว์หลากหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแมลง (Pauls *et al.,* 2010) แต่สำหรับประเทศไทย การตรวจชนิดแมลงวันผลไม้โดยทั่วไปจะตรวจลักษณะของตัวเต็มวัย และข้อมูลการตรวจจำแนกชนิดของตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้นั้นมีน้อยมาก

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาชนิดของแมลงวันผลไม้ในระยะตัวอ่อน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) โดยข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการอ้างอิงและเป็นข้อมูลสนับสนุน

การจัดจำแนกแมลงวันผลไม้ในระยะตัวอ่อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้สนับสนุน สร้างความน่าเชื่อถือในการส่งออกผักผลไม้ไปยังต่างประเทศต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างศึกษา

เก็บรวบรวมผักผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่มีร่องรอยการทำลายของแมลงวันผลไม้ จากพื้นที่การเกษตรทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้) ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 - เดือนกันยายน พ.ศ. 2561 จากนั้นนำส่วนของพืชที่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้มายังห้องปฏิบัติการ นำใส่กล่องพลาสติกที่มีตะแกรงรองก้น ซึ่งด้านล่างใส่ขี้เลื่อยเพื่อให้ตัวอ่อนเข้าดักแด้ และนำกล่องพลาสติกใส่ในกรงผ้า เพื่อให้ตัวเต็มวัยเจริญออกมาให้อาหาร คือ น้ำตาลผสม บรีเวอร์ยีสต์ในอัตรา 1:4 เพื่อให้สืบนลำตัวพัฒนาได้ดี ตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) ด้วยแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ของ Drew and Romig (2013, 2017) และเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่แมลงวันผลไม้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัย และทำการดองตัวอย่างบางส่วนด้วยแอลกอฮอล์ 95% เพื่อนำไปยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้ด้วยข้อมูลด้านพันธุกรรม

2. การศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว (ข้อ 1) ชนิดละ 10 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) ตามวิธีการของ Boontop *et al.,* (2017) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia)

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยยีน cox1 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al.,* 1994) โดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial-denaturing ที่อุณหภูมิ 94°ซ. จำนวน 1 รอบ เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94°ซ. นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50°ซ. นาน 30 วินาที และ extension 72°ซ. นาน 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) และตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) ด้วยอะกาโรสเจล (agarose gel) ที่ความเข้มข้น 1.5% และตรวจดูภายใต้แสง ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง transilluminator ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ของยีน cox1 ของแมลงวันผลไม้ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีที่ของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cox1 ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด มาทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999)

2.4 บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ จากนั้นเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานใน

ฐานข้อมูล GenBank โดยการนำนิวคลิโอไทด์ไป blastn เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่ศึกษาได้ในงานวิจัยนี้เก็บบันทึกไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank

3. การเตรียมตัวอย่างตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เพื่อใช้ศึกษาชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.1 การขยายพันธุ์และเตรียมตัวอ่อนแมลงวันผลไม้

นำตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมีย ที่ยืนยันชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรมแล้วนั้นมาจับคู่ผสมพันธุ์ จากนั้นคัดแยกเฉพาะแมลงวันผลไม้ระยะที่ 3 (3^{rd} instar) ซึ่งเป็นระยะที่ตัวอ่อนเจริญเติบโตเต็มที่ก่อนจะเข้าดักแด้ ตัวอ่อนมีความสมบูรณ์ และเหมาะสมที่สุดในการศึกษาชนิดตัวอ่อน วัดขนาดตัวอ่อนแมลงวันไม้ ชนิดละ 20 ตัวอย่าง

3.2 ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)

นำตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ชนิดละ 20 ตัวอย่าง มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อศึกษาลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดตามวิธีการของ (Steck and Ekesi, 2015) โดยนำตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ลวกในน้ำร้อนและเก็บรักษาไว้ในเอทานอล 70% แล้วดึงน้ำออก โดยการแทนที่น้ำในตัวอย่างด้วย acetone หรือ ethyl alcohol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้นของสารต่ำไปหาความเข้มข้นสูง เมื่อดึงน้ำออกจากตัวอย่างสมบูรณ์แล้วทำให้แห้ง (drying) จากนั้นนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปเชื่อมติดบนแท่นวางตัวอย่าง และนำไปเคลือบด้วยทองคำผสมแพลเลเดียม จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดรุ่น JEOL JSM-5510LV SEM ที่ห้องปฏิบัติการ FDACS / DPI, Gainesville, Florida, USA ทำการวัดขนาดของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ บันทึกชื่อวิทยาศาสตร์ วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง และจัดทำแนวทางวินิจฉัย (dichotomous key) ชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้พร้อมทั้งจัดเก็บตัวอย่างตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ที่ได้ไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล (ศิริณี, 2548)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจำแนกแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากผักผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่มีร่องรอยการทำลายของแมลงวันผลไม้ในพื้นที่การเกษตรทั่วทุกภาคของประเทศไทย สามารถจำแนกชนิดตัวเต็มวัยด้วยลักษณะทางสัณฐานของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้ 6 ชนิด จำนวน 2 สกุล คือ สกุล *Bactrocera* ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons,* และสกุล *Zeugodacus* ได้แก่ *Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* การศึกษาครั้งนี้ยังได้รวบรวมชนิดของพืชอาหาร (host plants) ที่แมลงวันผลไม้แต่ละชนิดเข้าทำลายด้วย (Table 1)

Table 1 Scientific name, host plants and locations from which larval of fruit flies specimens were collected

Scientific name	Host plants	Locations
Bactrocera carambolae	banana, custard apple, guava, jackfruit, jujube longan, lychee, mango, papaya, rambutan, rose apple and santon	Bangkok, Phetchaburi, Ratchaburi, Samut Sakhon Samut Songkhram, Kanchanaburi, Chiang Mai, Chiang Rai, Nan, Chanthaburi, Rayong, Buri Rum, Chaiyaphum, Mahasarakham, Nakhon Ratchasima, Nongkhai, Ubon Ratchathani, Udon Thani, Chumphon, Nakhon Si Thammarat, Phang Nga, Phuket, Ranong, Surat Thani and Trang
Bactrocera correcta	banana, custard apple, guava, jujube, mango, papaya, rose apple, santon and sapodilla	Bangkok, Phetchaburi, Ratchaburi, Samut Sakhon Samut Songkhram, Kanchanaburi, Chiang Mai, Nan, Rayong, Buri Rum, Chaiyaphum, Mahasarakham, Nakhon Ratchasima, Nongkhai, Udon Thani and Nakhon Si Thammarat
Bactrocera dorsalis	banana, custard apple, guava jackfruit, jujube longan, lychee, mango, papaya, rambutan, rose apple and santon	Bangkok, Phetchaburi, Ratchaburi, Samut Sakhon Samut Songkhram, Kanchanaburi, Chiang Mai, Chiang Rai, Chanthaburi, Rayong, Buri Rum, Chaiyaphum, Mahasarakham, Nakhon Ratchasima, Nongkhai, Ubon Ratchathani, Udon Thani Chumphon, Nakhon Si Thammarat, Phang Nga, Phuket, Ranong, Surat Thani and Trang
Bactrocera latifrons	eggplant	Phetchabun
Zeugodacus cucurbitae	bitter gourd, cantaloupe, cucumber, luffa, Ivy gourd, melon, snake luffa, water melon and winter melon	Bangkok, Nakhon Pathom, Pathumthani, Prachuap Khiri Khan, Kanchanaburi, Tak, Kamphaeng Phet, Lamphun, Nan, Chanthaburi, Rayong, Chaiyaphum, Khon Kaen, Loei, Saraburi, Mahasarakham, Nongkhai, Surin, Ubon Ratchathani and Phatthalung
Zeugodacus tau	bitter Gourd cucumber melon water melon winter melon	Nakhon Pathom, Pathumthani, Phetchabun Prachuap Khiri Khan, Ratchaburi, Kanchanaburi, Tak, Kamphaeng Phet, Lamphun, Nan, Chanthaburi, Rayong, Chaiyaphum, Khon Kaen, Loei, Mahasarakham, Nongkhai, and Ubon Ratchathani

2. การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยด้วยลักษณะทางพันธุกรรม

จากการนำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่จำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานภายนอกทั้ง 6 ชนิด มาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยยีน *cox1* ทำการ blastn เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกับนิวคลีโอไทด์กับแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าแมลงวันผลไม้ที่จำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานภายนอกทั้ง 6 ชนิดนั้นถูกต้อง มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน ที่ 99-100% และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในระบบฐานข้อมูล GenBank ได้ accession number ทั้งหมดจำนวน 60 หมายเลข (Table 2)

Table 2 Collection details (scientific name, accession number and voucher specimen) for fruit flies in Thailand used in this study

No.	Scientific name	Accession number[1/]	Voucher specimen[2/]
1	*Bactrocera carambolae*	MW052780 - 84	EMBT.L(SEM) 1301 - 1320
		MW093419 - 23	
2	*B. correcta*	MW067300 - 09	EMBT0601.L(SEM) - 0620
3	*B. dorsalis*	MW052785 - 89	EMBT0701.L(SEM) - 0720
		MW093424 - 28	
4	*B. latifrons*	MW136282 - 91	EMBT0901.L(SEM) - 0920
5	*Zeugodacus cucurbitae*	MW045505 - 14	EMBT1601.L(SEM) - 1620
6	*Z. tau*	MW052795 - 99	EMBT1901.L(SEM) - 1920
		MW093429 - 33	

[1/] The name and accession numbers refer to the fruit flies from this stored in Genbank

[2/] Voucher specimens kept at Insect museum , Department of Agriculture, Thailand

3. จำแนกชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ระยะที่ 3 (third larval instar) จากลักษณะภายนอกที่สำคัญ (Figure 1) ด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศ์แบบส่องกราด ทำให้สามารถเห็นลักษณะโครงสร้างสำคัญ ที่ใช้ในการจำแนกได้ละเอียด สามารถจำแนกชนิดของตัวอ่อนแมลงผลไม้ได้ 6 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* ซึ่งที่ผ่านมามีการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ด้วยสัณฐานวิทยาภายนอกไว้เพียง 2 ชนิด เท่านั้น คือ *B. correcta* และ *B. latifrons* (ชฎาภรณ์ และคณะ, 2555) แต่การศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกได้ 6 ชนิด โดยพบลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่

3.1 ส่วนหัว (head) คือ ส่วนของโครงสร้างแข็ง (cephalopharygeal) ซึ่งประกอบด้วย

ปาก (mouth hook) เป็นโครงสร้างแข็งประกอบด้วย ส่วนปลายสุดของฟัน (apical tooth) และส่วนหน้าของฟัน (pre - apical tooth) ที่พบก่อนส่วนปลายสุดของฟัน (Figure 2)

- แผ่นแข็งบริเวณรอบปาก (oral ridges) ซึ่งรูปร่างของแผ่นแข็งจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ลักษณะคล้ายฟันปลาหรือฟันหวี มีความสั้น

หรือยาวที่แตกต่างกัน บริเวณส่วนปลายแหลมหรือทื่อ มีลักษณะชิดติดกันหรือแยกออกจากกัน รวมทั้งจำนวนแถวของแผ่นแข็งนั้นมีแตกต่างกันในแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด (Figure 3)

3.2 ส่วนอก (thorax) บริเวณรูหายใจด้านหน้า (anterior spiracles) (Figure 4) เป็นรูหายใจที่พบบริเวณส่วนหน้า ด้านข้างของลำตัว มีลักษณะเป็นเนื้อยื่นออกมาคล้ายนิ้วมือ (tubules) มีจำนวนแตกต่างกันในแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด ตั้งแต่ 8 - 23 อัน

3.3 ส่วนท้ายของลำตัว (caudal segment) เป็นส่วนปลายสุดของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ (Figure 5) ได้แก่ รูหายใจบริเวณท้าย (posterior spiracle) ซึ่งประกอบด้วยรูหายใจท้าย (posterior spiracular slit) ที่มีลักษณะแนบติดกับส่วนท้องหรือแยกได้อย่างชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย (Figure 6) มีขนาด กว้างและยาวแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดแมลงวันผลไม้

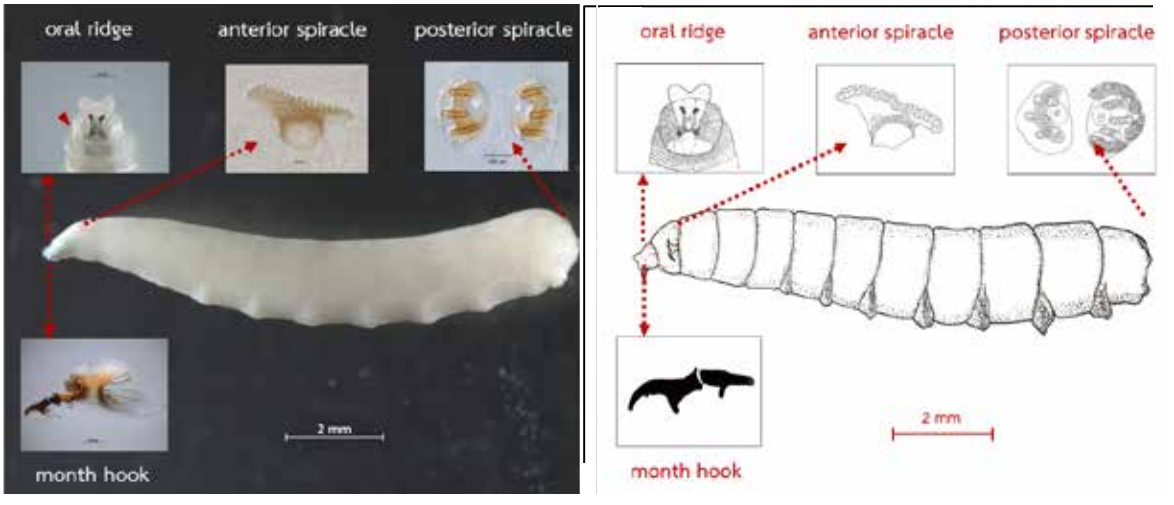

Figure 1 Morphological characters of third larval instar of fruit fly (lateral view). The important characteristics of larvae are the mouth hook, oral ridge, anterior spiracle and posterior spiracle

ลักษณะทางสัณฐาน (morphological description) ของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ 6 ชนิด

***Bactrocera (Bactrocera) carambolae* Drew & Hancook**

(Figures 2A, 3A, 4A, 5A และ 6A)

ชื่อสามัญ : แมลงวันทองมะเฟือง (carambola fruit fly)

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัว (tapering anteriorly) มีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อนจะมีเส้นแข็งสีดำ พาดขวางด้านใต้ของรูหายใจ

ความยาวของลำตัว : 10.5-12 มม.

ความกว้างของลำตัว : 1.7-1.8 มม.

ส่วนหัว : cephalic lobes พัฒนาได้ดี ปากบริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะแหลม ไม่มี pre-apical tooth (Figure 2A) แผ่นแข็งบริเวณรอบปากมีจำนวน 8-10 มีขนาดใหญ่ ลักษณะคล้ายฟันเลื่อย เป็นร่องลึกและยาว มองดูคล้ายแผงขน (Figure 3A)

ส่วนอก: รูหายใจด้านหน้ามีลักษณะโค้งนูนบริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 9-15 อัน (Figure 4A)

ส่วนท้อง : รูหายใจด้านหลังแนบติดกับส่วนท้องไม่สามารถแยกได้อย่างชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย (Figure 5A) รูหายใจที่ส่วนปลายท้อง

มีจำนวน 3 ท่อ ยาวเป็น 2.5-3 เท่าของความกว้าง (Figure 6A)

พืชอาหาร : ชมพู่ ลำไย กระท้อน น้อยหน่า ขนุน มะละกอ ลิ้นจี่ กล้วย เงาะ ฝรั่ง พุทรา และ มะม่วง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L(SEM)1301 - EMBT.L(SEM)1320 (20 ตัวอย่าง)

***Bactrocera (Bactrocera) correcta* (Bezzi)**

(Figures 2B, 3B, 4B, 5B และ 6B)

ชื่อสามัญ : แมลงวันทองฝรั่ง (guava fruit fly)

ตัวหนอนรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัว มีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อนจะมีเส้นแข็งสีดำพาดขวางด้านใต้ของรูหายใจ

ความยาวของลำตัว : 7.5-9 มม.

ความกว้างของลำตัว : 1.4-1.5 มม.

ส่วนหัว: cephalic lobes พัฒนาได้ดี ปากบริเวณส่วนปลายของฟัน มีลักษณะเรียว ยาวแหลม รูปร่างคล้ายเคียว ไม่มี pre-apical tooth (Figure 2B) แผ่นแข็งบริเวณรอบปากมีจำนวน 8-10 มีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย มีขนาดสั้น บริเวณขอบที่อ (Figure 3B)

ส่วนอก : รูหายใจด้านหน้ามีลักษณะโค้งนูน บริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 9-11 อัน (Figure 4B)

ส่วนท้อง : รูหายใจด้านหลังอยู่บริเวณส่วนท้ายสุดของหนอน แนบติดกับส่วนท้องไม่สามารถแยกได้อย่างชัด จากส่วนปล้องท้องสุดท้าย (Figure 5B) แต่ละข้างจะประกอบด้วยแท่งข้างละ 3 แท่ง รูหายใจที่ส่วนปลายท้อง มีจำนวน 3 ท่อ ยาวเรียวเป็น 2-3 เท่าของความกว้าง (Figure 6B)

พืชอาหาร : ชมพู่ ฝรั่ง กระท้อน มะละกอ กล้วย กระท้อน พุทรา ละมุด น้อยหน่า และ มะม่วง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.L(SEM)0601 - EMBT.L(SEM) 0620 (20 ตัวอย่าง)

***Bactrocera (Bactrocera) dorsalis* (Hendel)**

(Figures 2C, 3C, 4C, 5C และ 6C)

ชื่อสามัญ : แมลงวันผลไม้ (oriental fruit fly)

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัว มีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อนจะมีเส้นแข็งพาดขวางด้านใต้ของรูหายใจ

ความยาวของลำตัว : 8-11 มม.

ความกว้างของลำตัว : 1.7-1.8 มม.

ส่วนหัว : cephalic lobes พัฒนาได้ดี ปากบริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะ ผอมแหลม ไม่มี pre-apical tooth (Figure 2C) แผ่นแข็งบริเวณรอบปากมีจำนวน 11-14 อัน มีขนาดใหญ่ ฟันเลื่อยมีขนาด สั้น บริเวณขอบที่อ (Figure 3C)

ส่วนอก : รูหายใจด้านหน้ามีลักษณะโค้งนูน บริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 8-10 อัน (Figure 4C)

ส่วนท้อง : รูหายใจด้านหลังแนบติดกับส่วนท้องไม่สามารถแยกได้อย่างชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย (Figure 5C) รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 ท่อ ยาวเป็น 2.5 - 3 เท่าของความกว้าง (Figure 6C)

พืชอาหาร : ชมพู่ ลำไย กระท้อน น้อยหน่า ขนุน มะละกอ ลิ้นจี่ กล้วย เงาะ ฝรั่ง พุทรา และ มะม่วง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L(SEM)0701 - EMBT.L(SEM)0720 (20 ตัวอย่าง)

***Bactrocera (Bactrocera) latifrons* (Hendel)**

(Figures 2D, 3D, 4D, 5D, 6D และ 7D)

ชื่อสามัญ : แมลงวันทองมะเขือ หรือ แมลงวันทองพริก (solanum fruit fly)

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัวมีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อนจะมีเส้นแข็งพาดขวางด้านใต้ของรูหายใจ

ความยาวของลำตัว : 7.5-8.5 มม.

ความกว้างของลำตัว : 1.1-1.2 มม.

ส่วนหัว : cephalic lobes พัฒนาได้ดี ปาก บริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะแหลม ไม่มี pre-apicaltooth (Figure 2D) แผ่นแข็งบริเวณรอบปากมีจำนวน 5-6 มีขนาดใหญ่ ฟันปลาขนาดปานกลาง บริเวณขอบที่อ และมีระยะห่างไม่ชิดติดกัน (Figure 3D)

ส่วนอก : รูหายใจด้านหน้ามีลักษณะโค้งนูนบริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 13-18 อัน ในบางตัวอย่างที่นำมาศึกษาพบว่าตำแหน่งของ tubules นั้น ไม่ได้ตั้งอยู่ในทางเดียวกัน (Figure 4D)

ส่วนท้อง : รูหายใจด้านหลังแนบติดกับส่วนท้อง ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย (Figure 5D) รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 ท่อ ยาวเป็น 2-3 เท่าของความกว้าง (Figure 6D)

พืชอาหาร : พืชตระกูลพริก มะเขือเปราะ และมะเขือยาว

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L(SEM)0901 - EMBT. L(SEM)0920 (20 ตัวอย่าง)

***Zeugodacus (Zeugodacus) cucurbitae* (Coquillett)**

(Figures 2E, 3E, 4E, 5E, 6E และ 7E)

ชื่อสามัญ : แมลงวันแตง (melon fly)

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัวมีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อน จะมีเส้นแข็ง พาดขวางด้านใต้ของรูหายใจ

ความยาวของลำตัว : 9-11 มม.

ความกว้างของลำตัว : 1.2-1.3 มม.

ส่วนหัว: cephalic lobes พัฒนาได้ดี ปาก บริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะแหลม และมี pre-apical tooth ขนาดเล็กยื่นออกมา (Figure 2E) แผ่นแข็งบริเวณรอบปากมีจำนวน 17-23 อัน มีขนาดใหญ่ ฟันปลาลึกยาว บริเวณขอบที่อ ชิดติดกัน (Figure 3E)

ส่วนอก : รูหายใจด้านหน้ามีจำนวนตั้งแต่ 16 - 23 อัน (Figure 4E)

ส่วนท้อง : รูหายใจด้านหลังแนบติดกับส่วนท้องไม่สามารถแยกได้อย่างชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย(Figure 5E) รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 ท่อ ยาวเป็น 2.5-3.5 เท่าของความกว้าง (Figure 6E)

พืชอาหาร : พืชตระกูลแตง เช่น แตงโม ฟักเขียว แตงไทย แตงกวา มะระจีน มะระขี้นก บวบเหลี่ยม บวบงู เมล่อน และตำลึง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L(SEM)1601-EMBT.L(SEM)1620 (20 ตัวอย่าง)

***Zeugodacus (Zeugodacus) tau* (Walker)**

(Figures 2F, 3F, 4F, 5F และ 6F)

ชื่อสามัญ : แมลงวันฟักทอง (pumpkin fly)

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัว มีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อน จะมีเส้นแข็ง พาดขวางด้านใต้ของรูหายใจ

ความยาวของลำตัว : 7.5-9 มม.

ความกว้างของลำตัว : 1.1-1.2 มม.

ส่วนหัว: cephalic lobes พัฒนาได้ดี ปาก บริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะแหลม มี pre-apical tooth ขนาดเล็กยื่นออกมา (Figure 2F) แผ่นแข็งบริเวณรอบปากมีจำนวน 17-23 อัน มีขนาดใหญ่ ฟันปลายยาวปานกลาง บริเวณปลายที่อ ชิดติดกัน (Figure 3F)

ส่วนอก : รูหายใจด้านหน้ามีลักษณะโค้งนูน บริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 14 -16 ท่อ (Figure 4F)

ส่วนท้อง : รูหายใจด้านหลังแนบติดกับส่วนท้องไม่สามารถแยกได้อย่างชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย(Figure 5F) รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 ท่อ ยาวเป็น 3-3.5 เท่าของความกว้าง (Figure 6F)

พืชอาหาร : พืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงโม ฟัก มะระ และเมล่อน

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L(SEM)1901 - EMBT.L(SEM)1920 (20 ตัวอย่าง)

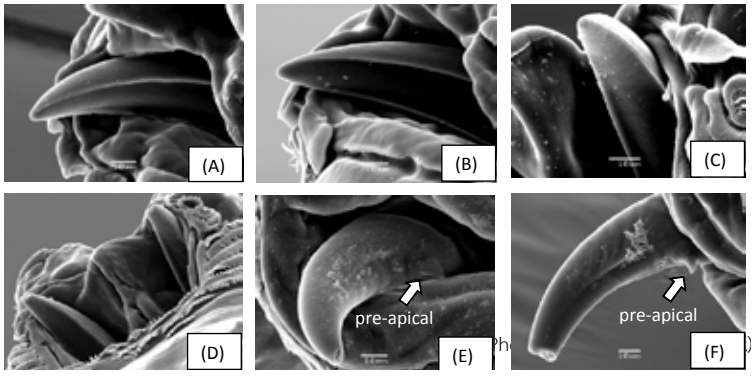

Figure 2 Mouth hook of third instar larva of different fruit fly species (A) *Bactrocera carambolae* (B) *Bactrocera correcta* (C) *Bactrocera dorsalis* (D) *Bactrocera latifrons* (E) *Zeugodacus cucurbitae* (F) *Zeugodacus tau* (Photographed by Gary J. Steck)

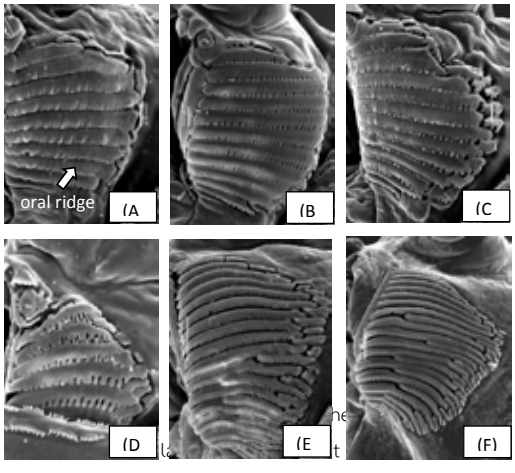

Figure 3 Oral ridges of third instar larva of different fruit fly species (A) *Bactrocera carambolae* (B) *Bactrocera correcta* (C) *Bactrocera dorsalis* (D) *Bactrocera latifrons* (E) *Zeugodacus cucurbitae* (F) *Zeugodacus tau* (Photographed by Gary J. Steck)

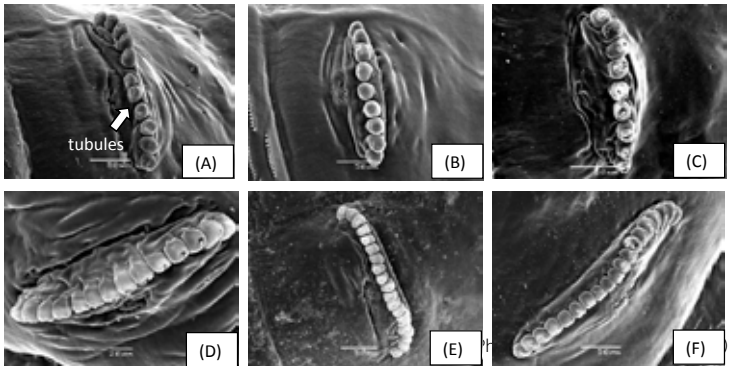

Figure 4 Anterior spiracle of third instar larva of different fruit fly species (A) *Bactrocera carambolae* (B) *Bactrocera correcta* (C) *Bactrocera dorsalis* (D) *Bactrocera latifrons* (E) *Zeugodacus cucurbitae* (F) *Zeugodacus tau* (Photographed by Gary J. Steck)

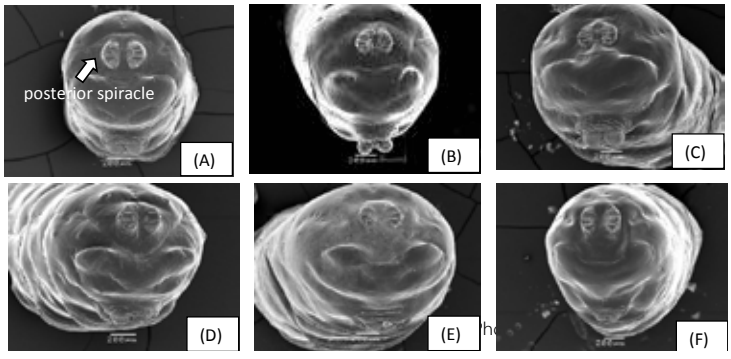

Figure 5 Caudal segment of third instar larva (lateral view) of different fruit fly species
(A) *Bactrocera carambolae* (B) *Bactrocera correcta* (C) *Bactrocera dorsalis*
(D) *Bactrocera latifrons* (E) *Zeugodacus cucurbitae* (F) *Zeugodacus tau*
(Photographed by Gary J. Steck)

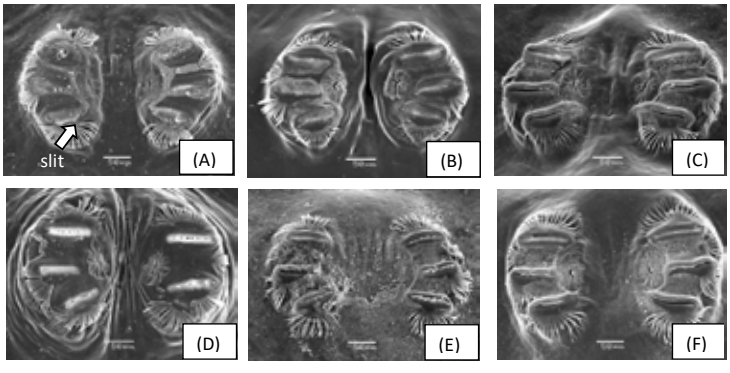

Figure 6 Posterior spiracle of third instar larva (lateral view) of different fruit fly species
(A) *Bactrocera carambolae* (B) *Bactrocera correcta* (C) *Bactrocera dorsalis*
(D) *Bactrocera latifrons* (E) *Zeugodacus cucurbitae* (F) *Zeugodacus tau*
(Photographed by Gary J. Steck)

ผลการศึกษาครั้งนี้ถือว่าเป็นครั้งแรกในทวีปเอเชียที่ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานภายนอกของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ ด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ทำให้สามารถเห็นลักษณะโครงสร้างสำคัญ ที่นำมาใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงได้ละเอียดมากยิ่งขึ้น และสามารถจัดทำแนวทางวินิจฉัยตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางการเกษตรได้ดังนี้

แนวทางวินิจฉัยตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

1. Preapical tooth present (Figures 2 E-F) ..... 2 *(Genus Zeugodacus)*
   Preapical tooth absent (Figures 2 A–D) ..... 3 *(Genus Bactrocera)*
2. Ridges of accessory plates relatively short, only partially interlocking with oral ridges (Figure 3 E) ..... *Z. cucurbitae*
   Ridges of accessory plates relatively long, deeply interlocking with oral ridges (Figure 3F) ..... *Z. tau*

3. Number of oral ridges 5 – 6 (Figures 3D) ..... *B. latifrons*
   Number of oral ridges more than 6 (Figures 3A-C) 4
4. Anterior spiracle with more than 10 tubules (Figure 4A). Number of oral ridges 8–10; margins scalloped (large, deeply serrated, blunt-edged teeth; long, narrow and fringelike… (Figure 3A) ..... *B. carambolae*
   Anterior spiracle with less than 10 tubules (Figure 4B-B). Oral ridges margins serrate, or scalloped (blunt edged, short teeth) (Figures 3B C) 5
5. Number of oral ridges 8-10; short teeth, margins scalloped, large, deeply serrated, blunt – edged teeth) (Figure 3B) ..... *B. correcta*
   Number of oral ridges 11-14; short teeth, margins serrate with blunt edged (Figure 3C) ..... *B. dorsalis*

การบรรยายลักษณะสัณฐานและการจัดทำแนวทางวินิจฉัยด้วย dichotomous key ของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ในงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดซึ่งมีประสิทธิภาพสูง ทำให้เห็นลักษณะโครงสร้างที่สำคัญต่าง ๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาที่ใช้เพียงการทำสไลด์ถาวรในการศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้ในระยะตัวอ่อน ทำให้พบว่า แมลงวันฟักทอง *Z. tau* นั้นมี pre - apical บริเวณส่วนของปาก และมี tubules ของรูหายใจด้านหน้าจำนวน 19 ท่อ ซึ่งแตกต่างจากที่เคยมีรายงานว่ามีจำนวน tubules 14-16 ท่อ (ยุวรินทร์และคณะ, 2562; Carroll *et al.,* 2004; Agarwal *et al.,* 2019) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของจำนวนแผ่นแข็งบริเวณรอบปากและสามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของแมลงวันผลไม้ที่มีความซับซ้อนในกลุ่ม *B. dorsalis* complex โดยสามารถแยก *B. dorsalis* ออกจาก *B. carambolae* ได้อีกด้วย

แต่เนื่องจากความหลากหลายและความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันผลไม้นั้นมีมาก (Mousseau and Dinglt, 1991) และเพื่อให้ครอบคลุมความแปรผันทางด้านสัณฐานที่เกิดขึ้นนั้น ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการเพิ่มตัวอย่างที่จะใช้ทำการศึกษาให้มีความครอบคลุมทุกพื้นที่ของการแพร่กระจายของแมลงวันผลไม้ชนิดนั้น ๆ และควรเก็บตัวอย่างจากพืชอาหารให้มีความหลากหลาย และจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาก็ต้องมีปริมาณมากขึ้นด้วย ดังเช่น การศึกษาของ Steck and Ekesi (2015) นั้นแสดงให้เห็นว่า ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดนั้นไม่ใช่ตัวแปรของความน่าเชื่อถือ แต่ความครอบคลุมของตัวแทนและจำนวนตัวอย่างเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญ

นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้แบบผสมผสาน (integrative taxonomy) ซึ่งเป็นการนำวิธีการที่มีความทันสมัยและน่าเชื่อถือต่าง ๆ มาศึกษาร่วมกัน ทำให้สามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงผลไม้และมีความน่าเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้น เช่นเดียวกับ Krosch *et al.* (2013) และ Schutze *et al.* (2012) ที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิคมอร์โฟเมตริกแบบจีโอเมตริก (geometric morphometrics) มาผสมผสานกับการศึกษาแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการตรวจจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ได้เป็นอย่างดี

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางการเกษตรของประเทศไทย โดยใช้ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมาศึกษาลักษณะโครงสร้างสำคัญต่าง ๆ ได้แก่ ปาก แผ่นแข็งบริเวณข้างปาก รูหายใจด้านข้าง และรูหายใจด้านท้าย และสร้างแนวทางวินิจฉัยชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ พบว่า สามารถจำแนกชนิดของแมลงผลไม้ได้ 2 สกุลคือ *Bactrocera* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons,* และสกุล *Zeugodacus* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย ให้มีความทันสมัยน่าเชื่อถือเทียบเท่าสากล และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List: PL) ของชนิดแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทย และใช้เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับสนับสนุนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis: PRA) ในการส่งออกพืชผักผลไม้ รวมทั้งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันกำจัด รวมทั้งการนำเข้าส่งออกผักผลไม้ไปยังต่างประเทศต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Dr. Gary J. Steck แห่ง Department of Agriculture and Consumer Services สหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์ถ่ายภาพตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ยุวรินทร์ บุญทบ ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนสิริ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร และ สิทธิสิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2562. การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphometrics ในตัวเต็มวัย. หน้า 402-417 *ใน: การประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 14* ระหว่างวันที่ 12-14 พฤศจิกายน 2562 โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี.

ชฎาภรณ์ เฉลิมวิเชียรพร สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ อิทธิพล บรรณาการ และ สิทธิศิ โรดม แก้วสวัสดิ์. 2555. การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้. หน้า 2166 - 2186. *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555.* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ พรรณเพ็ญ ชโยภาส รัตนา นชะพงษ์ ลักขณา บำรุงศรี สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ยุวรินทร์ บุญทบ และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2548. *แมลง การจำแนก และการเก็บตัวอย่าง.* กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, จำกัด. กรุงเทพฯ 100 หน้า.

Agarwal Vasudha, Md. Abbas Ahmad and ML Agarwal. 2019. Life history traits and immature stages of *Zeugodacus* (*Zeugodacus*) *tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *J. Entomol. Zool. Stud.* 7(2): 1149-1153.

Aluja, M. and A.L. Norrbom. 1999. *Fruit Flies* (*Tephritidae*): *Phylogeny and Evolution of behavior.* CRC Press. Florida, USA, 984 p.

Armstrong, K. F. and S. L. Ball. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences,* 360(1462), 1813-1823.

Boontop Y., M.K. Schutze, A.R. Clarke, S.L. Cameron, and M.N. Krosch. 2017. Signatures of invasion: using an

integrative approach to infer the spread of melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), across Southeast Asia and the West-Pacific. *Biol. Invasions*. 19(5): 1597-1619.

Carroll, L.E., A.L. Norrbom, M.J. Dallwitz, and F.C. Thompson. 2004 *Onwards. Pest fruit flies of the world – larvae*. Version: 9th April 2019. delta-intkey.com.

Diamantidis, A. D., Carey, J. R., and Papadopoulus, N. T. 2008. *Life-history of An Invasive Tephritid*. Department of Agriculture, Crop Production and Rural Environmental, University of Thessaly. Magnisias. Greece.

Drew, R. A. I. and M. C. Romig, 2013. *Tropical Fruit Flies of South-East Asia* (*Tephritidae: Dacinae*). CAB International. 664 pp.

Drew, R. A. I. and M. C. Romig, 2017. *Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia:* (*Tephritidae: Dacinae*). CAB International. 496 pp.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. biol. Biotechnol.* 3(5): 294-299.

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

Hendrichs, J. 2000. Use of the sterile insect technique against key insect pests. *Sustainable Development International.* 2: 75-79.

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

Mousseau, T.A. and H. Dingle. 1991. Maternal effects in insect life histories. *Annual Review of Entomology*. 36: 511-534.

Pauls, S. U., R. J Blahnik, X. Zhou, C.T. Wardwell, and R.W. Holzenthal. 2010. DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in *Chilean Smicridea* (Smicridea) (Trichoptera: Hydropsychidae). *J. N. AM. Benthol. Soc*. 29(3): 1058-1074.

Schutze, M.K., A. Jessup, and A.R. Clarke. 2012. Wing shape as potential discriminator of morphologically similar pest taxa within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae). *Bull. Entomol. Res.* 102: 103-111.

Steck, G. J., and S. Ekesi. 2015. Description of third instar larvae of *Ceratitis fasciventris, C. anonae, C. rosa* (FAR complex) and *C. capitata* (Diptera, Tephritidae). ZooKeys. 540: 443-466. https://doi.org/10.3897/zookeys.540.10061.