

การวิเคราะห์ไรโบโซมยีนบริเวณ Internal Transcribed Spacer ส่วนที่ 2
ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย

นายพายุ ภัคดีนวน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ANALYSIS OF INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 REGION OF THE RIBOSOMAL
GENE OF SOME MEDICALLY IMPORTANT FLIES IN THAILAND

Mr. Payu Bhakdeenuan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ไรโบโซมยีนบริเวณ Internal Transcribed Spacer ส่วนที่ 2 ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย

โดย

นายพายุ ภัคดีนวน

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผศ. ดร. สัจชัย พยุงกร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้ฉันวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รศ. นพ. ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. พญ. วิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. สัจชัย พยุงกร)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร. นสพ. สนธยา เดียวศิริทรัพย์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. อภิวัฒน์ วัชรสิน)

พายุ ภัคดีนวน: การวิเคราะห์ไรโบโซมยีนบริเวณ Internal Transcribed Spacer ส่วนที่ 2 ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย. (ANALYSIS OF INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 REGION OF THE RIBOSOMAL GENE OF SOME MEDICALLY IMPORTANT FLIES IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นพ. เพล้ง สิริยะเสถียร, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. สัญชัย พยุงบร, 119 หน้า.

การระบุสายพันธุ์แมลงวันด้วยสัณฐานวิทยา ไม่เพียงต้องอาศัยความเชี่ยวชาญอย่างสูงด้านอนุกรมวิธาน แต่ยังจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่สมบูรณ์อีกด้วย ปัจจุบันเทคนิคการระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกใช้อย่างแพร่หลาย งานวิจัยนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) ของ ribosomal DNA ในการจำแนกสายพันธุ์แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทย พบว่าแมลงวัน 113 ตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ถูกระบุสายพันธุ์ด้วยสัณฐานวิทยาแบ่งเป็น 22 สปีชีส์ ใน 3 วงศ์ คือ Sarcophagidae Calliphoridae และ Muscidae โดยที่แมลงวันทั้ง 22 สปีชีส์ มีขนาดนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 แตกต่างกัน ตั้งแต่ 297 bp ถึง 377 bp เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 กับฐานข้อมูลอ้างอิงใน NCBI พบว่า 89 ตัวอย่างตรงกับการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยา ส่วนอีก 24 ตัวอย่างไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล ผลการเปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ค่า intraspecific divergence สูงสุด (0.3-6.9%) พบใน *Musca domestica* ในขณะที่ค่า interspecific divergence ต่ำสุด (3.3%) พบในการเปรียบเทียบระหว่าง *Chrysomya megacephala* กับ *Chrysomya pinguis* ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้ Kimura 2-parameter model พบว่าสามารถแยกแมลงวันแต่ละสปีชีส์ออกจากกันได้อย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap support 77-95% แต่ไม่สามารถแยกสปีชีส์เดียวกันที่มาจากต่างพื้นที่ออกจากกันได้อย่างมีนัยสำคัญ การทดลองนี้เป็นการสะสมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันที่มาจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ไว้ในฐานข้อมูลออนไลน์ระดับโลก ซึ่งจะเป็ประโยชน์ในการใช้ระบุสายพันธุ์แมลงวันที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้ในอนาคต อันจะเป็นประโยชน์ในการประมาณเวลาเสียชีวิต (Postmortem interval: PMI) การรักษาโรคไม่เฉียบพลันและการบูรณาการวิธีป้องกันกำจัดแมลงวัน ดูดเลือดที่เป็นปัญหาต่อปศุสัตว์ต่อไป

สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์การแพทย์..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา..... 2554..... ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5374687030: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: FLIES / INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 / MOLECULAR IDENTIFICATION / THAILAND

PAYU BHAKDEENUAN: ANALYSIS OF INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 REGION OF THE RIBOSOMAL GENE OF SOME MEDICALLY IMPORTANT FLIES IN THAILAND. ADVISOR: ASSOC. PROF. PADET SIRIYASATIEN, M.D., Ph.D, CO-ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., 119 pp.

Morphology identification of fly especially in the same genus is difficult and not only required highly expert persons but also required completely of the fly samples. Recent studies suggested that species identification based on nucleotide sequence are more widely used. This study used the internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA as a tool to identify medical and veterinary importance flies species in Thailand. Among 113 fly samples collected from different regions of Thailand. Based on morphology identification; there were 22 species in three families including Sarcophagidae Calliphoridae and Muscidae. ITS2 fragment of the 22 species were vary in length rang from 297 bp to 377 bp. When compared ITS2 sequence with NCBI database, 89 samples were identified correctly with morphological based identification. In another 24 samples, were no reference in database. The results of intra- and interspecies sequence variation analysis showed the maximum of intraspecies variation (0.3-6.9%) was found in *Musca domestica*. While the minimum interspecies variation (3.3%) was found in the sister grouped couple of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya pinguis*. The bootstrapped Neighbor-Joining tree with Kimura 2-parameter model constructed in this study can identify flies species though species level with 77-95% bootstrap support but unable to differentiate between the same species from various regions. The nucleotide sequences from this study were accumulated to the worldwide online database and would be valuable for accurating the closely related flies species identification which usefulness for estimating of the Postmortem interval (PMI), treatment of myiasis and the integrated management of fly control.

Field of Study :.....Medical Science..... Student's Signature.....

Academic Year :.....2011..... Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือ แนะนำ และให้คำปรึกษาจากบุคคลหลายท่านที่ผู้เขียนต้องขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผศ. ดร. สัญชัย พยงกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ และให้คำแนะนำในการทำวิจัย รวมทั้งปรับปรุงแก้ไขจุดบกพร่องให้งานสมบูรณ์ขึ้นได้อย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. พญ. วิไล ชินชนเศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. นสพ. สนธยา เตียวศิริทรัพย์ และ ดร. อภิวิทย์ รัชชสิน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ ทั้งยังกรุณาถ่ายทอดความรู้ แนวคิด วิธีการคำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขจุดบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ศ. ดร. นพ. กม สุคนธสรรพ์ พร้อมด้วยบุคลากรภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดร. Hitoshi Sasaki ภาควิชา Dairy Science (Applied Entomology) Hokkaido College of Arts and Sciences ประเทศญี่ปุ่น สำหรับความกรุณาจำแนกสายพันธุ์และให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างแมลงวันในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และนครราชสีมา

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. อุษาวดี ถาวร และ ดร. อภิวิทย์ รัชชสิน สำหรับแรงบันดาลใจ คำปรึกษา และการสนับสนุนเรื่องการศึกษาที่มีให้ตลอดมา ขอขอบคุณบุคคลกรฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่าน ที่คอยเติมแรงใจและให้ความช่วยเหลือเกื้อกูลกันมาตลอด

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยอำนวยความสะดวกและจัดการอุปกรณ์วิจัยภายในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ น.ส. อภิญญา บุตรดี และเจ้าหน้าที่ฝ่ายบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยประสานงานและจัดการเอกสารต่างๆ ตั้งแต่เริ่มจนจบหลักสูตรได้อย่างดีเยี่ยม

ขอบคุณและขอบใจพี่ๆ น้องๆ ร่วมห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิจัย ให้คำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหาต่างๆ และเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ นิสิตร่วมสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและส่งเสริมกำลังใจตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้หมด จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

คุณค่าทั้งหลายที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูคุณเวทิตี แต่มารดาและคุณพ่ออนุภาพ รักคินวน ผู้ให้กำเนิด คุณอาเกษแก้ว คุณเสน ที่เคยเลี้ยงดู บ่มเพาะคุณธรรมและลักษณะนิสัยที่ดี รวมถึงบูรพาจารย์ที่เคยสั่งสอนและประสิทธิ์ประสาทวิชาตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามของการวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
กรอบแนวความคิดการวิจัย	4
คำสำคัญ.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย	5
รูปแบบการวิจัย.....	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
แมลงวันในประวัติศาสตร์.....	8
การจัดจำแนกหมวดหมู่แมลงวันตามหลักวิทยาศาสตร์	9
ชีววิทยาของแมลงวัน	10
สัณฐานวิทยาของแมลงวัน	13
แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทย.....	16
แมลงวันกับความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์.....	21
การจำแนกสายพันธุ์แมลงวัน โดยใช้ลักษณะสัณฐาน.....	31
การบูรณาการความรู้ด้านอนุพันธุศาสตร์เพื่อการจำแนกสายพันธุ์แมลงวัน.....	34
ชีวสารสนเทศศาสตร์	39
เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิควิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	40
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	43

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	45
ตัวอย่างทดลอง.....	45
เครื่องมือ	46
วัสดุอุปกรณ์.....	47
สารเคมี.....	47
โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล.....	48
การดำเนินการวิจัย.....	49
- การสกัดดีเอ็นเอ	49
- การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR.....	50
- การตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส	52
- การโคลนสายนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2	53
- การสกัดพลาสมิด.....	55
- การหาลำดับนิวคลีโอไทด์	56
- การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันที่มีความสำคัญ ทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทย.....	56
- การขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์	57
- การจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ด้วยเทคนิค PCR-RFLP	58
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	60
ผลการจำแนกสายพันธุ์ด้วยสัณฐานวิทยา	60
ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR.....	63
ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	65
ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของตัวอย่างกับฐานข้อมูล.....	66
ผลการระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และการแพร่กระจาย ของสายพันธุ์แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย.....	67
ผลการขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์.....	68
ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม.....	71
ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์และ ระหว่างสายพันธุ์.....	76
ผลการจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ด้วยเทคนิค PCR-RFLP	84

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	87
รายการอ้างอิง	95
ภาคผนวก	105
ภาคผนวก ก	106
ภาคผนวก ข	111
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	119

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์พร้อมรายละเอียดของไพรเมอร์	50
3.2 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR.....	52
3.3 Thermal cycler condition.....	52
3.4 ส่วนประกอบและสัดส่วนของสารที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อ.....	54
3.5 อัตราส่วนของสารที่ใช้ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ <i>DraI</i> และ <i>PsiI</i>	58
3.6 อัตราส่วนของสารใน 8% native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).....	59
4.1 ข้อมูลตัวอย่างแมลงวันที่ใช้ในการวิจัย	60
4.2 ขนาด ITS2 ค่า percentage identities เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง และเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง.....	69
4.3 เปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae.....	78
4.4 เปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ของแมลงวันวงศ์ Calliphoridae	79
4.5 เปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ของแมลงวันวงศ์ Muscidae.....	81
4.6 ขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>DraI</i> และ <i>PsiI</i>	84
5.1 ค่าความต่างระหว่างสายพันธุ์ (interspecific divergence) ของสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกัน	92

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	ภาพแมลงวันในลูกกิ้งจากขุยมะพร้าว..... 9
2.2	วงชีพของแมลงวัน <i>Chrysomya megacephala</i> 10
2.3	ภาพถ่ายไข่แมลงวันหัวเขียวขนาด 1 ต่อ 100 μm จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน..... 11
2.4	หนอนแมลงวันหลังลาย 12
2.5	ส่วนหัวแมลงวัน 14
2.6	ส่วนอกแมลงวัน 14
2.7	ปีกแมลงวัน 15
2.8	ส่วนขาแมลงวัน..... 15
2.9	แมลงวันบ้านระยะตัวเต็มวัยและลักษณะการเรียงตัวของเส้นปีก..... 16
2.10	แมลงวันคอกสัตว์ระยะตัวเต็มวัยและลักษณะการเรียงตัวของเส้นปีก..... 18
2.11	แมลงวันหัวเขียว (<i>Chrysomya megacephala</i>)..... 19
2.12	แมลงวันหลังลาย <i>Sarcophaga</i> spp. 21
2.13	ลักษณะการเกิด Obligatory myiasis ที่บริเวณช่องคลอดของแกะ 23
2.14	ผลการรักษาแผลเบาหวานที่เท้าในชายวัย 73 ปี ด้วยหนอนแมลงวัน 25
2.15	Fauna succession 28
2.16	Isomorphen-diagram..... 30
2.17	Isomegalen diagram..... 30
2.18	ลักษณะพื้นฐานของไข่ที่ใช้จำแนกสายพันธุ์แมลงวัน 32
2.19	ลักษณะพื้นฐานที่ใช้จำแนกหนอนแมลงวัน..... 33
2.20	ปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR (polymerase chain reaction) 36
2.21	Chain termination DNA sequencing..... 37
2.22	การอ่านผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี chain termination..... 38
2.23	Ribosomal RNA transcription unit 42
3.1	พื้นที่เก็บตัวอย่าง 45
3.2	โครงสร้างของ rDNA gene 51
4.1	ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของบริเวณ ITS2 บน 1 % agarose gel 64

4.2	แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae Calliphoridae และ Muscidae จากการใช้ Neighbor-Joining Method แบบ Kimura 2-Parameter โดยกำหนดค่า bootstrap test กับ 1,000.....	72
4.3	แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae จากการใช้ Neighbor-Joining Method แบบ Kimura 2-Parameter โดยกำหนดค่า bootstrap test กับ 1,000.....	73
4.4	แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันวงศ์ Calliphoridae จากการใช้ Neighbor-Joining Method แบบ Kimura 2-Parameter โดยกำหนดค่า bootstrap test กับ 1,000.....	74
4.5	แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันวงศ์ Muscidae จากการใช้ Neighbor-Joining Method แบบ Kimura 2-Parameter โดยกำหนดค่า bootstrap test กับ 1,000.....	76
4.6	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>DraI</i>	85
4.7	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>PsiI</i>	86
ก.1	แผนที่ยีนของพลาสมิดเวกเตอร์ Vector pTZ57R/T (Fermentas®).....	107
ข.1	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae.....	111
ข.2	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Calliphoridae.....	113
ข.3	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Muscidae.....	117

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์ หรือคำย่อ	ชื่อเรียกหรือคำเต็ม	คำอธิบายและ ความหมาย
%	percentage	เปอร์เซ็นต์
♀	female	เพศเมีย
♂	male	เพศผู้
cm	centimetre	เซนติเมตร
g	grams	กรัม
ng	nanogram	นาโนกรัม เท่ากับ 10^{-9} กรัม
mg	milligram	มิลลิกรัม เท่ากับ 10^{-3} กรัม
µg	microgram	ไมโครกรัม
L	liter	ลิตร
ml	milliliter	มิลลิลิตร เท่ากับ 10^{-3} ลิตร
µl	microliter	ไมโครลิตร
M	molar	โมลาร์
mM	millimolar	มิลลิโมลาร์
µM	micromolar	ไมโครโมลาร์
bp	base pair	คู่เบส
ddH ₂ O	deionized distilled water	น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates	นิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ประกอบด้วย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP
DNA	deoxyribonucleic acid	สารพันธุกรรม
mtDNA	mitochondrial DNA	สารพันธุกรรมของไมโทคอนเดรีย
rDNA	ribosomal DNA	ส่วนของ DNA ที่จะถูกถอดรหัสเป็น rRNA
RNA	ribonucleic acid	สารที่ใช้สังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิต
rRNA	ribosomal RNA	RNA ที่เป็นส่วนประกอบของไรโบโซม
mRNA	messenger RNA	เมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ
tRNA	transfer RNA	RNA ที่ทำหน้าที่ย้ายกรดอะมิโนไปที่ไรโบโซม
ITS2	Internal transcribed spacer 2	ส่วนของ DNA ที่กั้นระหว่างยีน ในที่นี้หมายถึง บริเวณที่กั้นระหว่าง 5.8S กับ 28S rRNA gene

สัญลักษณ์ หรือคำย่อ	ชื่อเรียกหรือคำเต็ม	คำอธิบายและความหมาย
A	adenine	เบสอะดีนีน, ส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก
G	guanine	เบสกวานีน, ส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก
C	cytosine	เบสไซโตซีน, ส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก
T	thymine	เบสไทมีน, ส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก
°C	degree celsius	องศาเซลเซียส
r.p.m	revolutions per minute	รอบต่อนาที
pH	pondus hydrogenii (Latin)	ค่าวัดความเป็นกรด-ด่าง
PCR	polymerase chain reaction	ปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR
PCR-RFLP	PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism	เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยขนาด DNA ที่ถูกตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>	แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ polymerase
UV	ultraviolet	แสงเหนือม่วง, รังสีอัลตราไวโอเล็ต
PMI	postmortem interval	การประมาณเวลาเสียชีวิต
Acc. no.	accession number	เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์
NCBI	National Center for Biotechnology Information	หน่วยงานในประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีหน้าที่ เก็บรวบรวมข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพ
NJ method	Neighbor-Joining method	วิธีที่ใช้สร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม
K2P	Kimura 2-parameter	พารามิเตอร์ที่ใช้สร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (Latin)	และคนอื่นๆ (and others)
p. / pp.	page / pages	จำนวนหน้ากระดาษ, หน้า
ed. / eds.	editor / editors	บรรณาธิการ
ดร.	ดอกเตอร์	ผู้ได้รับปริญญาคุณวุฒิปริญญาตรี
รศ.	รองศาสตราจารย์	รองศาสตราจารย์, ตำแหน่งทางวิชาการ
ผศ.	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ตำแหน่งทางวิชาการ
นพ.	นายแพทย์	ผู้ได้รับปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิตที่เป็นชาย
พญ.	แพทย์หญิง	ผู้ได้รับปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิตที่เป็นหญิง
นสพ.	นายสัตวแพทย์	ผู้ได้รับปริญญาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิตที่ เป็นชาย
อ.	อาจารย์	อาจารย์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แมลงวัน (flies) ถือเป็นแมลงที่มีความสำคัญและใกล้ชิดมนุษย์ (synanthropic) มากที่สุดชนิดหนึ่ง บางชนิดเป็นโทษต่อมนุษย์ เช่น เป็นพาหะนำโรคสู่มนุษย์โดยวิธีกล (mechanical transmission) เป็นสาเหตุของโรคไมเอียซิส (myiasis) อันเกิดจากหนอนแมลงวันไซเข้าผิวหนังแล้วเจริญเติบโตตามอวัยวะต่างๆของร่างกาย ซึ่งสร้างความเจ็บปวดให้กับผู้ป่วยและอาจเสียชีวิตหากหนอนลูก้าเข้าสู่อวัยวะสำคัญ ในประเทศไทยแมลงวันที่เป็นสาเหตุของไมเอียซิสที่สำคัญ เช่น แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya bezziana* [1], *Cochliomyia (Callitroga) macellaria* (F.) [2], *Chrysomya megacephala* และ *Chrysomya rufifacies* [3] รวมทั้งแมลงวันหลังลาย *Sarcophaga ruficornis* [4] เป็นต้น นอกจากนี้แมลงวันบางชนิดยังสร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมปศุสัตว์ได้ด้วย [5] เช่น แมลงวันคอกสัตว์ ซึ่งสามารถดูดเลือดทั้งสัตว์และคน ทำให้เกิดการสูญเสียเลือดเป็นผลให้ปศุสัตว์สุขภาพทรุดโทรม น้ำหนักลด จนเป็นโรคโลหิตจางได้ด้วย [6]

ในทางตรงกันข้าม แมลงวันหลายชนิดก็เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ อาทิเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น การใช้หนอนบำบัด (maggot therapy) ในการรักษาแผลเนื้อตาย (necrotic wound) ซึ่งหนอนแมลงวัน ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ *Lucilia sericata* [7] นอกเหนือจากการใช้ประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยแล้วความรู้ด้านชีววิทยาของแมลงวัน เช่น ลำดับการเข้าไปตอมศพ และระยะเวลาในการพัฒนาเป็นระยะต่างๆ ในวงชีพของแมลงวัน ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างอื่นได้อีก อาทิช่วยในการสืบสวนคดีอาชญากรรมในงานอาชญานิติภุวิทยา (medicocriminal forensic entomology) กล่าวคือ เมื่อมีการตายเกิดขึ้นโดยศพถูกทิ้งไว้โดยลำพัง เช่น การเสียชีวิตโดยไม่มีผู้ใดพบเห็น การเกิดฆาตกรรม หรือการลอบทำอัตวินิบาตกรรม เป็นต้น เมื่อเวลาผ่านไปมักพบว่า มีแมลงต่างๆ เข้ามากินศพ นักนิติภุวิทยาสามารถใช้แมลงเหล่านี้เป็นหลักฐานในทางนิติเวชได้ เช่น ใช้ประมาณเวลาเสียชีวิต (postmortem interval; PMI) เป็นต้น [8-10]

จากที่กล่าวข้างต้นจะเห็นว่า แมลงวันให้ทั้งคุณและโทษแตกต่างกันตามแต่สายพันธุ์ ซึ่งมีอยู่หลากหลายชนิด การจะหลีกเลี่ยงผลร้ายที่จะเกิด หรือต้องการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากแมลงวันนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบสายพันธุ์ที่ถูกต้องแม่นยำ เพราะการจำแนกสายพันธุ์แมลงวันได้แม่นยำ เป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยในการเฝ้าระวัง รวมทั้งการรักษาโรคไมเอียซิสซึ่งมีพยาธิสภาพที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแมลงวันทีก่อโรค ทั้งนี้ยังสามารถช่วยลดความเสียหาย และโอกาสเกิดโรคจากแมลงวันคอกสัตว์กับอุตสาหกรรมปศุสัตว์ได้ด้วยเนื่องจากแมลงวันดูดเลือดแต่ละสายพันธุ์

มีพฤติกรรมและชีววิทยาที่แตกต่างกัน การทราบสายพันธุ์ จะช่วยให้สามารถป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้อง แม้กระทั่งการใช้แมลงวันในการรักษาแผลเนื้อตายนั้นก็จำเป็นอย่างยิ่งเช่นกัน ที่ต้องอาศัยการจำแนกที่ถูกต้อง เพื่อป้องกันการนำสายพันธุ์ที่อาจเป็นอันตรายมาใช้ในการรักษา นอกจากนี้การจำแนกสายพันธุ์ยังจำเป็นอย่างยิ่งในงานอาชญานิติภูมิวิทยา โดยเฉพาะในการประมาณค่า PMI เนื่องจากหนอนแมลงวันแต่ละสายพันธุ์จะใช้เวลาในการพัฒนาเป็นระยะต่างๆ แตกต่างกัน ดังนั้นหากทำการเลี้ยงหนอนสายพันธุ์เดียวกันในสภาวะควบคุมที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วนำข้อมูลขนาดความยาวหรือน้ำหนักแห้งของหนอนตั้งแต่ฟักจากไข่กับเวลาที่ใช้ในการเจริญ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ก็จะทำให้สามารถประมาณเวลาเสียชีวิตได้จากขนาดของหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากที่เกิดเหตุกับข้อมูลของสายพันธุ์เดียวกันที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เหตุนี้ตัวอย่างหนอนแมลงวันที่เก็บจากศพจึงจำเป็นต้องทราบสายพันธุ์ที่ถูกต้องแน่ชัดจึงจะสามารถใช้ประมาณค่า PMI ได้แม่นยำ [11-14]

การจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับใช้ระบุชนิดแมลงวัน ทว่าวิธีการดังกล่าวไม่เพียงแต่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญอย่างสูงทางด้านอนุกรมวิธาน แต่ยังจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้ตัวอย่างที่มีความสมบูรณ์ การได้ตัวอย่างแมลงเพียงบางส่วน เช่น ในงานอาชญานิติภูมิวิทยา จะทำให้สามารถระบุสายพันธุ์ได้ยากขึ้น [5] ปัจจุบันความก้าวหน้าของวิทยาการด้านการวิเคราะห์ DNA เช่น เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เทคนิค sequencing และเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ถูกนำมาบูรณาการเพื่อแก้ปัญหาจากการระบุสายพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาดังกล่าว เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความน่าเชื่อถือ รวดเร็ว แม่นยำ และมีความไวสูง [15]

งานวิจัยนี้แสดงการบูรณาการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาผนวกกับการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูลทางชีวภาพ (bioinformatics) และอาศัยความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer 2 (ITS2) ของ ribosomal RNA (rRNA) gene ในการระบุสายพันธุ์ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทยที่อยู่ในวงศ์ (family) Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae ให้สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำขึ้น ทั้งนี้ผลที่ได้ยังเป็นการรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทยไว้ในฐานข้อมูลสากล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแมลงวันจากต่างภูมิประเทศ และสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลให้กับงานวิจัยอื่นเพื่อใช้จำแนกแมลงวันสายพันธุ์ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ในอนาคต อันจะเป็นประโยชน์ในงานอาชญานิติภูมิวิทยา งานปศุสัตว์ การวินิจฉัยโรคไม่เอื้อยีสต์ รวมถึงการใช้หนอนบำบัดและงานด้านอื่นๆต่อไป

1.2 คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของยีน rRNA ของแมลงวันแต่ละสายพันธุ์ในวงศ์ Muscidae Calliphoridae และ Sarcophagidae มีความแตกต่างกันอย่างไร

คำถามรอง สามารถใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของยีน rRNA ระบุสายพันธุ์ของแมลงวันในวงศ์ Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree) และเทคนิค PCR-RFLP ได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในยีน rRNA ของแมลงวันวงศ์ Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae ซึ่งอาจสามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันได้

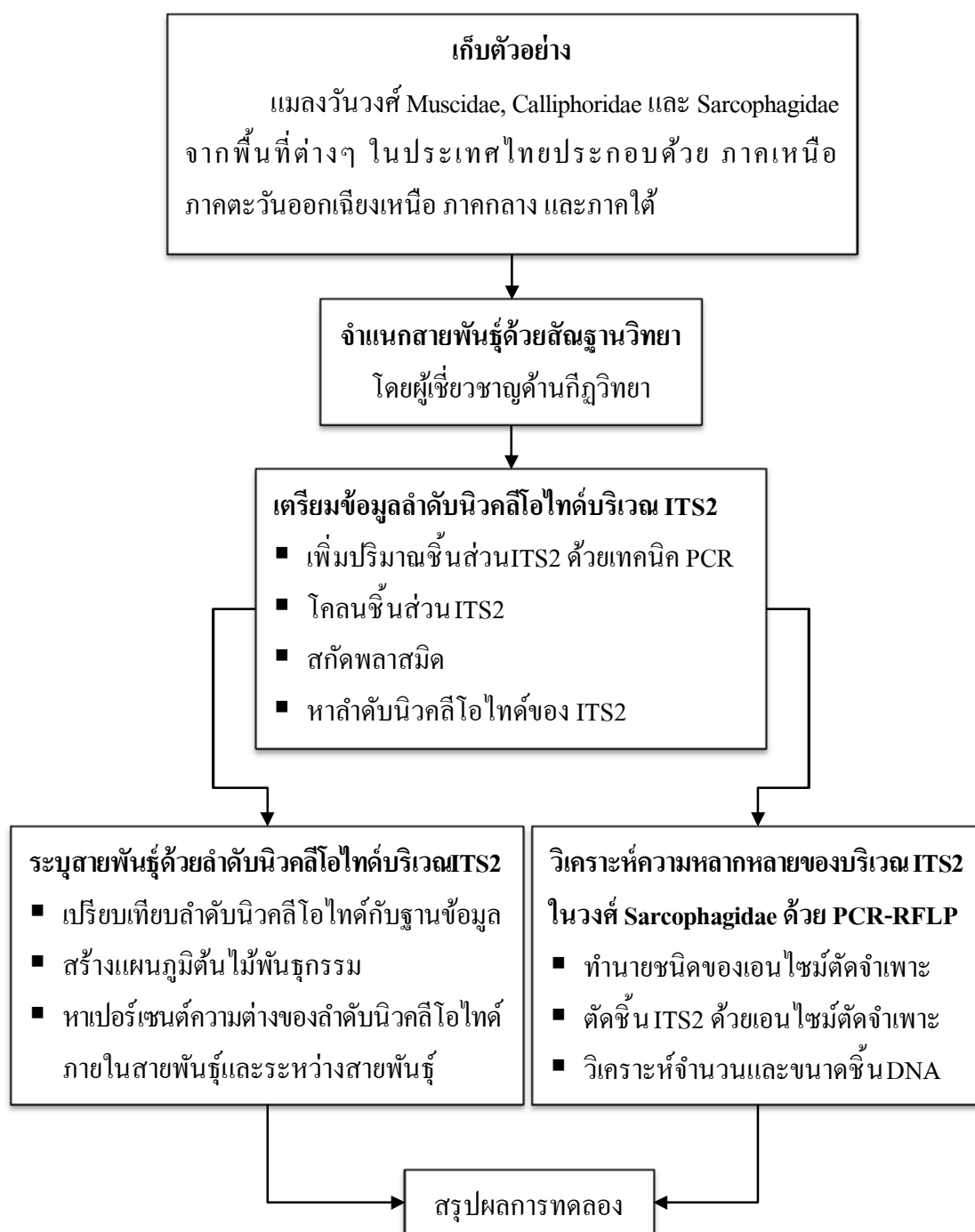
1.3.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในยีน rRNA ของแมลงวันวงศ์ Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae ในการใช้จำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันกลุ่มดังกล่าว โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม และการใช้เทคนิค PCR-RFLP

1.4 สมมุติฐานของการวิจัย

1.4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในยีน rRNA ของแมลงวันวงศ์ Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae มีเอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์ และมีความหลากหลายเพียงพอสำหรับใช้จำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันกลุ่มดังกล่าวได้

1.4.2 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมที่สร้างโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในยีน rRNA ของแมลงวันวงศ์ Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae และเทคนิค PCR-RFLP สามารถใช้ระบุสายพันธุ์ของแมลงวันกลุ่มดังกล่าวได้

1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย



1.6 คำสำคัญ

Flies / Internal Transcribed Spacer 2 / Molecular identification / Thailand

1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1.7.1 แมลงวันบ้าน ตรงกับภาษาอังกฤษว่า house flies คือ ชื่อสามัญของแมลงวัน *Musca domestica* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Muscidae วงศ์ย่อย Muscinae มีลำตัวยาว 6-9 มิลลิเมตร สีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ที่อกมีแถบสีดำพาดตามยาว 4 เส้น propleura มีขนปกคลุม ตาแยกออกจากกันทั้งในตัวผู้และตัวเมีย แต่ตัวเมียแยกห่างกว่าตัวผู้ ปากเป็นแบบ sponging mouth part ลักษณะ arista เป็นพู่ขนนก (plumose)

1.7.2 แมลงวันหัวเขียว ตรงกับภาษาอังกฤษว่า blowflies คือ ชื่อสามัญที่ใช้เรียกแมลงวัน ในวงศ์ Calliphoridae ที่บางชนิดลำตัวเป็นมันวาวสะท้อนแสงคล้ายโลหะสีเขียว น้ำเงิน ดำเงา บรอนซ์ หรือทองแดง บางชนิดไม่เป็นมันวาว ตารวมของแมลงวันกลุ่มนี้มีสีแดงขนาดใหญ่ เห็นได้ ชัดเจน ลักษณะ arista เป็นพู่ขนนก

1.7.3 แมลงวันหลังลาย ตรงกับภาษาอังกฤษว่า flesh flies คือ ชื่อสามัญที่ใช้เรียกแมลงวัน ในวงศ์ Sarcophagidae ซึ่งมีลำตัวสีเทาไม่มันวาวสะท้อนแสง ขนาดกลางถึงใหญ่ ยาว 8-15 มิลลิเมตร มีขนแข็งตามลำตัว ลักษณะ arista เป็นพู่ขนนก มี longitudinal black marking พาดตรง กลาง thorax 3 แถบ และมี ill-defined black squares คล้ายตาหมากรุกบน abdomen

1.7.4 แมลงวันคอกสัตว์ ตรงกับภาษาอังกฤษว่า stable flies คือ ชื่อสามัญของแมลงวัน ในวงศ์ Muscidae วงศ์ย่อย Stomoxysiinae ลำตัวสีเทา ยาว 7-8 มิลลิเมตร มี longitudinal dark stripes พาดกลาง thorax 4 แถบ โดยแถบ 2 แถบด้านนอกจะขาดตอนบริเวณ suture มีจุดดำ 3 จุดบน abdomen ปล้องที่ 2 และ 3 ขนาด abdomen สั้นและกว้างกว่าแมลงวันบ้าน ส่วนท้องมีสีเทาและ น้ำตาลเข้ม สลับกันคล้ายตาหมากรุก ขน arista บนหนวดปล้องที่ 3 เป็นแบบหวี และมีอยู่ด้านเดียว ปากเป็นแบบแทงดูด กินเลือดทั้งสองเพศ

1.7.5 Second internal transcribed spacer (ITS2) คือ หนึ่งในบริเวณ intergenic spacer ที่คั่นระหว่างยีนส์ 18S, 5.8S และ 28S บน ribosomal RNA transcription unit ในยูคาริโอต โดย spacer ดังกล่าวประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ ITS1 ซึ่งกั้นระหว่างยีนส์ 18S กับ 5.8S และ ITS2 กั้นระหว่างยีนส์ 5.8S กับ 28S

1.7.6 ไมเอียซิส (myiasis) คือ ภาวะที่มีหนอนแมลงอาศัยอยู่บนร่างกายของสิ่งมีชีวิตอื่น ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งหนอนอาจจะดูดกินเนื้อเยื่อของโฮสต์ ของเหลว หรืออาหารที่โฮสต์กินเข้าไป ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ แตกต่างกันตามชนิดของหนอนและอวัยวะที่หนอนอาศัยอยู่

1.7.7 Postmortem Interval (PMI) คือ ระยะเวลาหลังจากเสียชีวิตของศพ

1.7.8 อนุกรมวิธาน ตรงกับภาษาอังกฤษว่า taxonomy หมายถึงการจำแนกพันธุ์ ซึ่งมัก หมายถึงการจำแนกพันธุ์ทางชีววิทยาโดยอาศัยหลักการทางวิทยาศาสตร์

1.7.9 Bioinformatics หมายถึงการประยุกต์ใช้ความรู้ทางคอมพิวเตอร์ในการจัดเก็บ สืบค้น ถิ่นกรอง และวิเคราะห์ข้อมูลชนิดต่างๆ ทางชีววิทยา ซึ่งส่วนมากมักจะเป็นลำดับดีเอ็นเอ ลำดับ โปรตีน หรือข้อมูลทางชีววิทยาที่เกิดจากเทคโนโลยี high throughput เช่น microarray data ให้เกิด เป็น information

1.7.10 Monophyly หมายถึง การวิวัฒนาการจากกลุ่มบรรพบุรุษออกไปเป็นกลุ่มสกุล หลากหลายต่างๆ แบ่งออกเป็นกลุ่มๆ อย่างเป็นระเบียบ ไม่มีชนิดในสกุลหลากหลายปะปนสลับกันไปมา ในสายวิวัฒนาการ

1.7.11 Paraphyly คือลักษณะของการวิวัฒนาการที่เริ่มจากบรรพบุรุษกลุ่มหนึ่งวิวัฒน์เป็น กลุ่มหลากหลายกลุ่มหนึ่ง (สมมุติเป็น A) แต่ขณะที่การวิวัฒนาการในกลุ่ม A ยังไม่เสร็จสิ้น สมาชิกส่วนหนึ่ง ในกลุ่ม A ได้วิวัฒน์ไปเป็นอีกกลุ่มหนึ่ง (สมมุติเป็น B) เป็นเหตุให้สมาชิกในกลุ่ม A แยกออกเป็น สองสายวิวัฒนาการ โดยมีกลุ่ม B อยู่กั้นกลาง ลักษณะแบบนี้จะเรียกกลุ่ม A ว่าเป็น paraphyly ทั้งนี้ จะกำหนดว่าเป็น paraphyly หรือ monophyly ต้องมีจุดอ้างอิงเสมอ

1.7.12 Cladogram เกิดจากการสมมติระหว่างคำว่า clado หมายถึงกิ่งก้านสาขา กับคำว่า gram ที่หมายถึงแผนภูมิ ดังนั้น cladogram จึงเป็นชื่อรวมๆของแผนภูมิที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา

1.7.13 Sister group หมายถึงลักษณะความสัมพันธ์ในกลุ่มพี่น้อง กลุ่มทางสายสัมพันธ์ทาง วิวัฒนาการที่อยู่ชิดกัน

1.7.14 Node หมายถึงตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อย

1.7.15 Clade หมายถึงกลุ่มที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน

1.7.16 Phylogenetic tree หมายถึงแผนภูมิที่แสดงถึงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่ม สิ่งมีชีวิตที่ได้มาจากข้อมูลทางพันธุกรรม

1.7.17 Out group คือสิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบกับ โดยคาดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่วิวัฒน์แยกจาก กลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

1.7.18 Bootstrap test หมายถึง การคำนวณความเชื่อมั่นทางสถิติของการจัดกลุ่มของ สิ่งมีชีวิตในแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม โดยคำนวณร้อยละความเชื่อมั่นจากการสุ่มดึงชุดข้อมูลออก จากข้อมูลทั้งหมดแล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูลก่อนใส่ชุดข้อมูลที่ดึงออกมาเข้าไปใหม่ ซึ่งจะทำ การคำนวณเช่นนี้ซ้ำๆ 100 ถึง 1000 ครั้งขึ้นอยู่กับข้อกำหนดค่า

1.7.19 Indel คือ เกิดจากการดึงเอาคำหน้าของคำว่า insertion กับ deletion มาร่วมกัน เพื่อใช้อธิบายลักษณะของการที่มีการเพิ่ม (insertion) หรือขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์

1.8 รูปแบบการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study)

1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.9.1 สามารถลดปัญหาที่เกิดจากการใช้ฐานวิทยาในการจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันในวงศ์ Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae ซึ่งบางสายพันธุ์จำแนกจากกันได้ยากด้วยลักษณะสัณฐานและมีโอกาสผิดพลาดได้ง่ายหากตัวอย่างไม่สมบูรณ์ โดยอาศัยความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในยีน rRNA ของแมลงวันทั้ง 3 วงศ์ ผนวกกับวิธีทางอณูชีววิทยาในการจำแนกสายพันธุ์แมลงวันกลุ่มดังกล่าวให้สะดวกและแม่นยำขึ้น ทั้งนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้กับแมลงวันชนิดอื่นได้ในอนาคต

1.9.2 สามารถประยุกต์ใช้วิธีการจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวันด้วยวิธีทางอณูชีววิทยากับงานด้านนิติเวชศาสตร์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการประมาณเวลาเสียชีวิตได้แม่นยำขึ้น ทั้งนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคไมเอียซีส และสามารถนำไปบูรณาการร่วมกับการควบคุมแมลงวันคุดเลือดที่เป็นปัญหาต่ออุตสาหกรรมปศุสัตว์ได้ด้วย

1.9.3 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS2 ในยีน rRNA ของแมลงวันทั้ง 3 วงศ์ที่ได้ในการทดลองนี้จะถูกรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลสากล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลให้กับงานวิจัยอื่นๆ เพื่อใช้จำแนกแมลงวันสายพันธุ์ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ในอนาคต และยังเป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแมลงวันจากต่างภูมิภาคทั่วโลกอีกด้วย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แมลงถือเป็นสิ่งมีชีวิตที่ประสบความสำเร็จในการปรับตัวมากที่สุดชนิดหนึ่งในบรรดาสสิ่งมีชีวิตทั้งหมดบนโลก หลายชนิดพบเป็นฟอสซิลจากยุคครีตแต่บรรพ์แต่ลูกหลานยังคงสืบทอดเผ่าพันธุ์อยู่จนปัจจุบัน ด้วยเหตุที่สามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้อย่างดี อีกทั้งบางชนิดยังได้วิวัฒนาการจนมีปีกที่แข็งแรง ทำให้ขอบเขตการหาอาหารกว้างขึ้นและช่วยให้สามารถหลบหลีกศัตรูได้ดี กอปรกับการมีระยะเวลาของวงชีวิตที่สั้นแต่สามารถแพร่พันธุ์ได้จำนวนมากและรวดเร็ว เป็นเหตุให้จำนวนประชากรแมลงมีมากที่สุดและสามารถพบได้เกือบทุกที่บนโลก [5, 16] ด้วยเหตุนี้แมลงจึงเข้ามามีบทบาทเกี่ยวข้องกับมนุษย์อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้เช่นกัน

แมลง นอกจากจะมีความสัมพันธ์เชิงบวกโดยให้ประโยชน์ต่อมนุษย์ (beneficial insect) เช่น ช่วยผสมเกสรให้พืชพันธุ์ทางการเกษตร เป็นอาหารของปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง หรือแม้กระทั่งมนุษย์ ให้ผลผลิตที่เป็นประโยชน์ เช่น เส้นไหมที่ได้จากหนอนไหม (*Bombyx mori*) น้ำผึ้งและไขผึ้งจากผึ้งเลี้ยง (*Apis mellifera*) แต่ในด้านตรงข้าม แมลงหลายชนิดก็มีความสัมพันธ์เชิงลบ เช่น สร้างความรำคาญ รบกวนการดำเนินชีวิต นำเชื้อโรคจากการไต่ตอม หรือในฐานะเป็นพาหะนำโรคหลายชนิดสู่มนุษย์ (vector) เช่น ยุงเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus) ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออก เชื้อ Japanese encephalitis (JE) virus ทำให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบเจอี รวมทั้งเป็นพาหะนำโรคพยาธิอีกหลายชนิด เช่น รินนำเชื้อ *Leishmania* spp. ทำให้เกิดโรคไลชมาเนีย และหมัดนำเชื้อ *Yersinia pestis* ซึ่งก่อโรคกาฬโรค เป็นต้น [17] นอกจากนี้แมลงหลายชนิดยังได้วิวัฒนาการและปรับตัวจนเข้ามาใช้ชีวิตใกล้ชิดกับมนุษย์ จนทำให้เกิดอิทธิพลกับการดำรงชีพของมนุษย์ตามมาด้วย และหนึ่งในจำนวนหลายชนิดที่ใกล้ชิดกับมนุษย์ที่มักถูกนึกถึงมากที่สุดคือ แมลงวัน

2.1 แมลงวันในประวัติศาสตร์

แมลงวันได้ปรับลักษณะการดำรงชีวิตให้เข้ามาใกล้ชิดมนุษย์มาช้านาน อนุมานได้จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์ที่มีอายุยาวนานที่สุดจากยุคเมโสโปเตเมีย (2,000 ปีก่อนคริสตกาล) ซึ่งเป็นลูกกลิ้งประกอบด้วยรูปสัตว์ชนิดต่างๆและหนึ่งในนั้นมีรูปแมลงวันอยู่ด้วย (ภาพที่ 2.1) และจากข้อความที่บันทึกโดยใช้อักษรรูปสี่เหลี่ยม (cuneiform) ในตำราดินเหนียว Har-ra-Hubulla จากยุค 1,600 ปีก่อนคริสตกาล ซึ่งในข้อความดังกล่าวมีการกล่าวถึงแมลงวันหัวเขียวชนิดต่างๆ รวมกว่า 10 ชนิด ทั้งนี้หลักฐานจากยุคก่อนประวัติศาสตร์ไม่เพียงแต่บอกถึงความใกล้ชิดทางด้านการดำรงชีวิตระหว่างแมลงวันกับมนุษย์เท่านั้น แต่หลักฐานอีกหลายอย่างยังแสดงให้เห็นถึงความสำคัญและอิทธิพลของแมลงวันที่มีต่อมนุษย์ยุคนั้นอีกด้วย เช่น ลูกกลิ้งทรงกระบอกจากยุคบาบิโลนเก่า

(1,700-1,400 ปีก่อนคริสตกาล) ที่แสดงภาพแมลงวันศักดิ์ส่วนใหญ่เกินขนาดจริงอยู่เคียงข้างภาพของเทพเจ้า Nergal ซึ่งเป็นที่เคารพบูชาของคนในยุคนี้ เช่นเดียวกับมนุษย์ยุคอียิปต์โบราณที่บูชาแมลงวันเป็นคั้งเครื่องรางและเทอดทูนประหนึ่งเป็นตัวแทนแห่งเกียรติยศ โดยประติมากรรมสลักที่ร้อยจากรูปจำลองแมลงวันไว้สวมเพื่อขับไล่ภูตผีปีศาจ และมอบสร้อยคอดังกล่าวที่เป็นทองคำเป็นรางวัลแก่ผู้ที่ชนะสงครามอีกด้วย [18]



ภาพที่ 2.1 ภาพแมลงวันในลูกกลิ้งจากยุคเมโสโปเตเมีย[19]

ในยุคปัจจุบันความสัมพันธ์ระหว่างมนุษย์กับแมลงวันเปลี่ยนไปหลากหลายรูปแบบบ้างเปลี่ยนไปในทางลบ ด้วยเพราะลักษณะชีววิทยาและการหาอาหารของแมลงวันซึ่งมักไต่ตอมขยะและของเน่าเสีย ทำให้แมลงวันกลายเป็นตัวแทนของความสกปรก เป็นพาหะนำเชื้อโรค และเนื่องจากมีระยะตัวอ่อนเป็นหนอนจึงสร้างความน่าขยะแขยงให้แก่ผู้ที่เกลียดกลัวหนอนแมลงได้อีกด้วยในด้านบวกแมลงวันให้ประโยชน์ต่อมนุษย์หลายประการ เช่น ใช้ระยะตัวอ่อนให้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ เป็นต้น

2.2 การจัดจำแนกหมวดหมู่แมลงวันตามหลักวิทยาศาสตร์

แมลงวันจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (eukaryote) ถูกลำดับชั้นของหมวดหมู่สิ่งมีชีวิตตามหลักอนุกรมวิธานของแมลง (insect taxonomy) ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom)	Animalia
ไฟลัม (Phylum)	Arthropoda
ไฟลัมย่อย (Subphylum)	Atelocerata
ชั้น (Class)	Hexapoda (Insecta)
อันดับ (Order)	Diptera
อันดับย่อย (Suborder)	Brachycera
คิวิชั่น (Division)	Cyclorrhapha

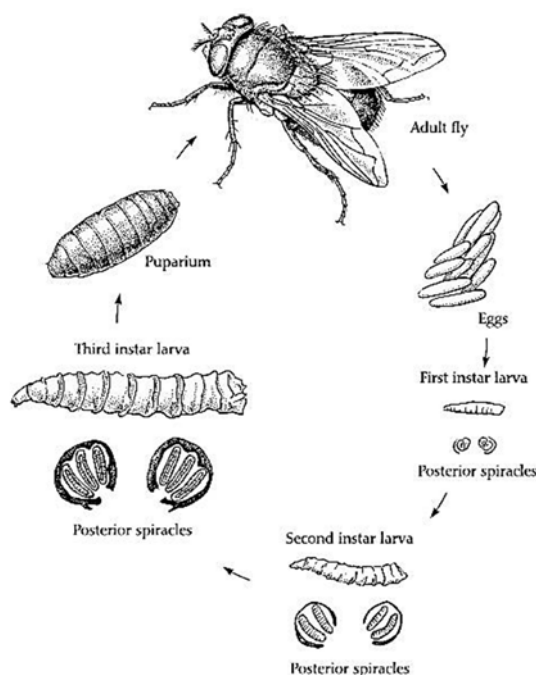
แมลงในดิวิชัน Cyclorrhapha เป็นดิวิชันที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าแมลงในอันดับเดียวกัน บางครั้งจึงเรียกแมลงดิวิชันนี้ว่า higher flies ดิวิชันนี้สามารถแบ่งตามการมีหรือไม่มี calypteres (squama) ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่ม Acalypterate เป็นกลุ่มของแมลงที่ไม่มี calypteres หรือมีแต่ขนาดเล็กมาก ไม่มี greater ampullae ที่ด้านข้างอก และหนดปล้องที่ 2 (pedicle) ไม่มีรอยเว้า (antennal seam) แมลงในกลุ่มนี้ได้แก่ แมลงหวี่ (Drosophilidae) และวันตา (Chloropidae)

2. กลุ่ม Calypterate คือแมลงที่มี calypteres เจริญดี และมี greater ampullae ที่ด้านข้างของอก หนดปล้องที่ 2 มีรอยเว้า กลุ่มนี้ประกอบด้วยแมลงหลายวงศ์ แต่ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ มีอยู่ 5 วงศ์ ได้แก่ Muscidae, Calliphoridae, Sarcophagidae, Oestridae และ Glossinidae

2.3 ชีววิทยาของแมลงวัน

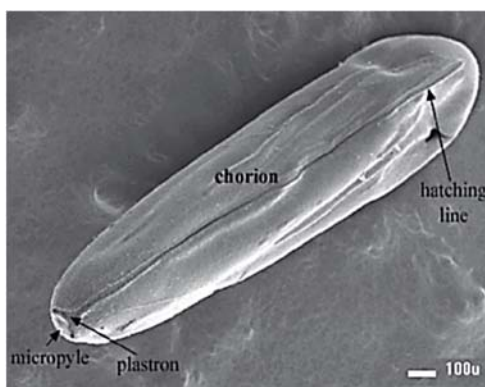
แมลงวันมีลักษณะนิสัยชอบออกหากินเวลากลางวันแต่ไม่ชอบแสงแดดจัด มีรศมีการหากินประมาณ 3 กิโลเมตร สามารถกินอาหารได้เกือบทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็นของเน่าเสีย ขยะมูลฝอย หรือแม้กระทั่งมูลสัตว์และซากสัตว์ แมลงวันเป็นแมลงที่มีวงชีพแบบ Holometabolous คือมีการถอดรูปร่างสมบูรณ์แบบ (complete metamorphosis) แบ่งเป็นระยะต่างๆ ประกอบด้วยระยะ ไข่ (eggs) ตัวอ่อน (larva) ดักแด้ (pupa) และตัวเต็มวัย (adult) ยกเว้นบางสายพันธุ์ในวงศ์ Sarcophagidae มีเพียง 3 ระยะเนื่องจากไข่ถูกฟักตั้งแต่อยู่ใน reproductive tract อนึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาเป็นระยะต่างๆ ในวงชีพจะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ โดยเฉลี่ยใช้เวลาในการพัฒนาครบวงชีพประมาณ 8-10 วัน ยกเว้นสกุล *Tabanus* อาจใช้เวลาเป็นปี [20] วงชีพของแมลงวันแสดงดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 วงชีพของแมลงวัน *Chrysomya megacephala* (ดัดแปลงจาก Goff, 2000 [21])

2.3.1 ระยะไข่

แมลงวันส่วนใหญ่ออกลูกเป็นไข่ (oviparous) ยกเว้นบางสายพันธุ์ในวงศ์ Sarcophagidae ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะแรกตั้งแต่ออยู่ใน reproductive tract ภายในตัวแม่ จึงออกลูกเป็นตัว (ovoviviparous) หลังจากพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้เพียง 18-30 ชั่วโมง แมลงวันก็สามารถผสมพันธุ์ได้และจะผสมพันธุ์เพียงแค่ครั้งเดียว หลังจากผ่านการผสมพันธุ์ไป 2-3 วัน ตัวเมียจะเริ่มหาแหล่งเพาะพันธุ์โดยจะเลือกวางไข่บนแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับ ตัวอ่อนตามแต่ชนิดของแมลงวัน ซึ่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับแมลงวัน วงศ์ Muscidae เป็นสิ่งหมักเน่า ซึ้นและแข็ง ส่วนแมลงวันวงศ์ Calliphoridae และ Sarcophagidae ได้แก่พวกเนื้อเน่าเสีย หรือซากสัตว์ เป็นต้น แมลงวันสามารถหาแหล่งวางไข่ที่เหมาะสมให้กับตัวอ่อนโดยอาศัยสิ่งดึงดูดต่างๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย และสารระเหยจากสิ่งเน่าเปื่อย เป็นต้น ส่วนวิธีการหาแหล่งอาหารของตัวเต็มวัยจะใช้วิธีการแตกต่างกันตามแต่สายพันธุ์ เช่น วงศ์ Sarcophagidae จะใช้ chemoreceptors ที่อยู่บนหนวดช่วยในการรับกลิ่น (olfactory cues) ในขณะที่วงศ์ Muscidae อาศัยการรับภาพ (visual cues) ช่วยในการหาแหล่งอาหาร แมลงวันมักเลือกวางไข่ในบริเวณที่มืด แสงแดดส่องไม่ถึง และมีความชื้นสูง ตลอดชีวิตตัวเมียบางตัวสามารถวางไข่ได้มากกว่า 10 ครั้ง โดยไข่จะถูกวางเป็นกลุ่มๆ ละประมาณ 150-200 ฟอง ไข่มีสีขาวครีม มันเงา รูปร่างคล้ายกล้วย ขนาด 0.3 - 0.4 x 0.9 - 1.5 มิลลิเมตร ผิวนอกของไข่ถูกเคลือบด้วยส่วนที่เรียกว่า chorion ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นตาข่ายหรือจุดขึ้นกับสายพันธุ์ สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้ [6, 8, 22-23] ตอนท้ายของไข่ มีบริเวณที่มีลักษณะคล้ายหลุมเรียกว่า micropyle เป็นที่ให้สเปิร์มเข้าไปผสมกับไข่ ด้านข้าง มีร่องพาดขนานตลอดความยาวร่องนี้เกิดจากการแยกตัวของ Chorion เผยให้เห็นเยื่อหุ้มไข่เรียกว่า plastron ในกรณีที่ไข่จมน้ำหรือถูกปกคลุมด้วยหยดน้ำเล็กๆ ร่องนี้จะช่วยดักอากาศไว้กับไข่ ทำให้ตัวอ่อนหายใจได้อย่างต่อเนื่อง ตัวอ่อนจะฟักจากไข่ผ่านเส้น Hatching line การออกจากไข่ของตัวอ่อนระยะแรกเรียกว่า eclosion ไข่จะฟักเป็นหนอนหลังถูกวางผ่านไป 6-12 ชั่วโมง ไข่แมลงวันแสดงดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ภาพถ่ายไข่แมลงวันหัวเขียวขนาด 1 ต่อ 100 μm จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน [2]

2.3.2 ระยะตัวอ่อน

หนอนแมลงวัน (maggot) มีรูปร่างเรียวยาว ลำตัวนิ่ม ไม่มีขา สีขาวขุ่น เห็นเส้นแบ่งปล้องชัดเจน ประกอบด้วยปล้องอกจำนวน 3 ปล้อง และปล้องท้องจำนวน 7-9 ปล้องแล้วแต่สายพันธุ์ ปลายด้านหน้าเรียวยาวแหลมซึ่งเป็นส่วนกะโหลกหัว (head capsule) สามารถพบได้ในหนอนของแมลงชนิดอื่นด้วย มีโครงสร้างสีดำที่ประกอบด้วยขากรรไกรเกี่ยวเนื่องกับ sclerite (cephalopharyngeal skeleton) ไปสิ้นสุดในปากที่เป็นตะขอ (cephalic hook) ปลายด้านท้ายของตัวหนอนมีลักษณะป้านมีท่อหายใจเรียกว่า posterior spiracle จำนวน 1 คู่ สามารถใช้จำแนกชนิดของแมลงวันได้ ระยะตัวอ่อนของแมลงวันแบ่งเป็น 3 ระยะ (instar) ตามหลักสากลแทน แต่ละระยะด้วยสัญลักษณ์ L1, L2 และ L3 ตามลำดับ แต่ละระยะสามารถระบุได้จากจำนวน slit ที่อยู่บน posterior spiracle โดยระยะ L1, L2 และ L3 จะมีจำนวน slit 1, 2 และ 3 อันตามลำดับ ขนาดของหนอนระยะต่างๆจะแตกต่างกันเช่น ในแมลงวันหัวเขียว ระยะ L1 มีขนาดเล็ก น้อยกว่า 2 มิลลิเมตร ระยะ L2 มีขนาดยาว 2-9 มิลลิเมตร และระยะ L3 จะยาวเฉลี่ย 9-22 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามขนาดของหนอนในระยะต่างๆ ไม่สามารถใช้บอกอายุที่แน่นอนของหนอนได้ เนื่องจากขนาดจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ รวมถึงปริมาณและคุณภาพของอาหารที่หนอนได้รับ หนอนระยะ L3 เมื่อเติบโตเต็มที่จะหยุดกินอาหารและย้ายออกจากแหล่งอาหารเพื่อหาแหล่งที่แห้งและมีแดดเพื่อเข้าดักแด้ (pupariation) ลักษณะของหนอนแมลงวันแสดงดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 หนอนแมลงวันหลังลาย [24] แสดง

aI-VII = ปล้องท้องทั้ง 7 ปล้อง,

pc = pseudocephalon,

sb = spinose band,

sf = บริเวณท่อหายใจ,

tI-III = ปล้องอกทั้ง 3 ปล้อง

2.3.3 ระยะดักแด้

หนอนระยะ L3 เมื่อเข้าดักแด้ลำตัวจะหดสั้นลงจนมีรูปร่างคล้ายไข่หรือซิการ์ สีน้ำตาลแดง สีมะฮอกกานีเข้ม หรือสีน้ำตาลดำ ตัวดักแด้ยังคงคุณสมบัติของหนอนระยะ L3 ไว้จึงสามารถใช้ระบุสายพันธุ์จากระยะดักแด้ได้โดยใช้ลักษณะของหนอนวัย L3 [24]

2.3.4 ระยะเวลาตัวเต็มวัย

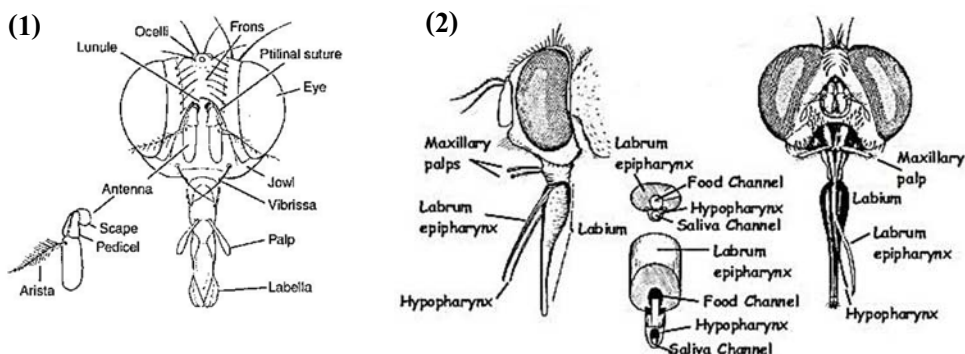
การเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยจากระยะดักแด้ ตัวเต็มวัยจะดันฝาปิดเปลือกดักแด้ (operculum) โดยใช้อวัยวะบนหัวเรียกว่า ptilinum ที่มีลักษณะโป่งพองคล้ายถุงลมนิรภัยที่เกิดจากแรงดันเลือด ซึ่งหลังจากนั้นจะจมกลับเข้าไปในใบหน้า โครงกระดูก cephalopharyngeal จากระยะหนอนจะถูกทิ้งติดไว้ที่เปลือกดักแด้ สามารถนำมาจำแนกชนิดได้ เมื่อตัวเต็มวัยโผล่พ้นพื้นดิน จะสำรองของเสียที่เป็นของเหลวสีเขียวดำเรียกว่า meconium คล้ายกับอุจจาระแรกของทารก หลังขั้นตอนนี้สีลำตัวจะเริ่มเปลี่ยนจากสีเทากลายเป็นสีต่างๆ ตามสายพันธุ์ แมลงวันตัวเต็มวัยจะรอให้ hemolymph กระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆ เพื่อให้ปีกแข็งและขยายจนสมบูรณ์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15-30 นาที จึงบินออกหากินต่อไป [17]

2.4 ลักษณะวิทยาของแมลงวัน

แมลงวันมีร่างกายที่ถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกแข็ง (exoskeleton) แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ หัว (head) ออก (thorax) และท้อง (abdomen) แต่ละส่วนมี 3 ด้านคือด้านบน (dorsum) ด้านใต้ (sternum) และด้านข้าง (pleuron)

หัวแมลงวันมีขนาดใหญ่ เป็นที่ตั้งของตาและหนวดหนึ่งคู่ ด้านหน้าของหัวที่บริเวณเหนือฐานของหนวด (antenna) ซึ่งอยู่ระหว่างตาทั้ง 2 ข้างมีลักษณะเป็นร่องคล้ายเกือกม้าเรียกว่า ptilinal fissure หนวดแมลงวันมีขนาดและลักษณะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ ซึ่งลักษณะโดยทั่วไปของหนวดประกอบด้วยปล้องไม่เกิน 3 ปล้อง เรียงจากโคนหนวดไปส่วนปลายสุดประกอบด้วย ปล้อง scape pedicel และ flagellum ตามลำดับ ปล้อง pedicel มีร่องเป็น แนวยาวเรียกว่า antennal seam ในขณะที่ปล้อง flagellum มีขนาดใหญ่ ปลายบนของปล้องนี้ มีขน arista ที่มีลักษณะแตกต่างกันตามสายพันธุ์สามารถจำแนกชนิดได้ ลักษณะตาของแมลงวันเป็นตาประกอบ (compound eyes) ขนาดใหญ่ หากตาอยู่ชิดกันเรียก holoptic พบในเพศผู้ หากแยกห่างกันเรียก dichoptic พบในเพศเมีย พื้นที่ที่แยกตาออกจากกันเรียกว่า frons บางสายพันธุ์ส่วนบนสุดของหัวมีตาเดี่ยว (simple eyes) 3 ดวงเรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยมเรียกว่า ocelli

ลักษณะปากแมลงวันเป็นแท่งยาวเรียก proboscis ซึ่งถูกวิวัฒนาการให้เอื้อต่อการดำรงชีวิตและการหาอาหาร โดยปากแบบซับดูด (sponging mouth) พบในแมลงวันที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย ส่วนปากแบบแทงดูด (piercing-sucking mouth) พบในแมลงวันที่ดูดกินเลือดเป็นอาหาร ส่วนประกอบของปากแมลงวันโดยทั่วไปประกอบด้วย maxilla หนึ่งคู่ mandible หนึ่งคู่ hypopharynx labrum และที่ด้านปลายสุดของ proboscis จะมีอวัยวะที่พัฒนาสำหรับใช้ดูดซับของเหลวหรือของแข็งขนาดเล็ก เช่น เกสรดอกไม้ เรียกว่า labella (ภาพที่ 2.5)

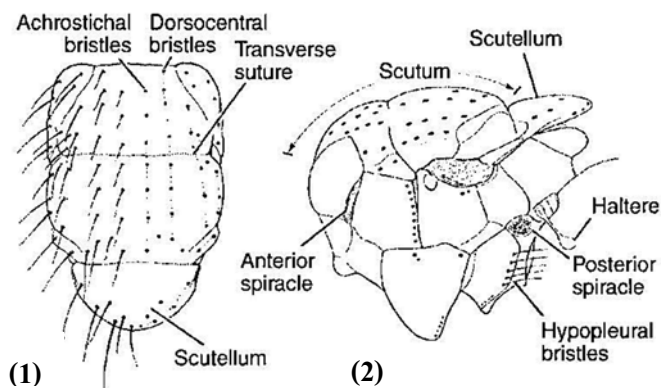


ภาพที่ 2.5 ส่วนหัวแมลงวัน

แสดงปากแบบจับดูด (1) และปากแบบแทงดูด (2)

(ดัดแปลงจาก Greenberg, 1971 [25] และ Wall and Shearer, 2001 [26])

ส่วนอกแมลงวันแบ่งเป็น 3 ส่วนเรียงจากหัวถึงท้าย ได้แก่ prothorax, mesothorax และ metathorax บริเวณด้านบนของอกเรียกว่า scutum ซึ่งส่วนใหญ่เป็นส่วนของ mesothorax พื้นที่ส่วนนี้ถูกแบ่งให้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนหน้า (anterior) และส่วนหลัง (posterior) ด้วยเส้น transverse suture ซึ่งเส้นนี้อาจยาวจนพาดผ่านส่วน scutum ทั้งหมดหรือเพียงแค่บางส่วนขึ้นกับสายพันธุ์แมลงวัน ที่ด้านหน้าของ mesothorax และด้านท้ายของ metathorax มีรูหายใจ (spiracle) ปล่อยละ 1 คู่ เรียกว่า anterior spiracles และ posterior spiracles ตามลำดับ (ภาพที่ 2.6)



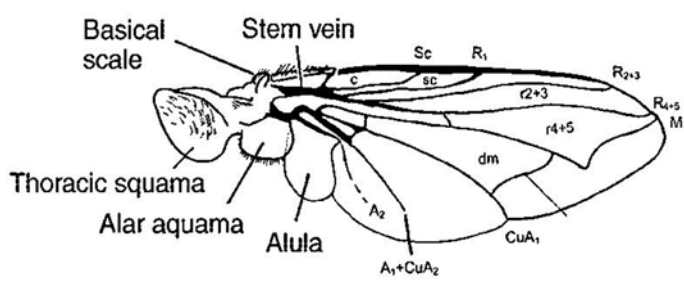
ภาพที่ 2.6 ส่วนอกแมลงวัน

แสดงอกด้านบน (1) และด้านข้าง (2)

(ดัดแปลงจาก Wall and Shearer, 2001 [26])

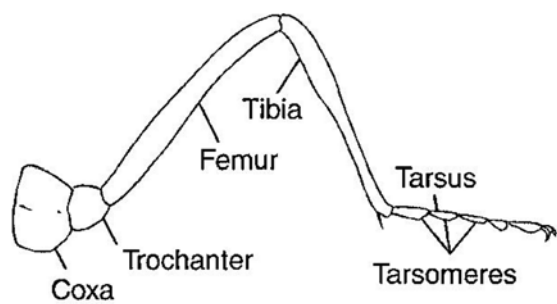
ด้านข้างของ mesothorax เป็นที่ตั้งของปีกคู่แรกใช้สำหรับบิน ปีกคู่นี้มีลักษณะเป็นเยื่อบางๆ มีเส้นปีกเรียงแผ่เป็น โครงช่วยพยุงปีกให้แข็งแรง ซึ่งลักษณะการเรียงนี้มีเอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์ ใช้จำแนกสายพันธุ์ได้ เส้นปีกแต่ละเส้นเรียกว่า Vein โดยทั่วไปมี 6 เส้น ได้แก่ costa (C) subcostal (Sc)

radius (R) media (M) cubitus (Cu) และ anal vien (A) (ภาพที่ 2.7) ซึ่งเส้นปีกเหล่านี้จะอยู่เป็นเส้นเดี่ยวๆ หรือแตกแขนงแล้วเชื่อมกับเส้นใกล้เคียง ก็ได้ พื้นที่ของแผ่นปีกระหว่างเส้นปีกเรียกว่า cell หากยาวไปจนถึงขอบปีกเรียกว่า cell แบบเปิด แต่หากถูกกั้นด้วยเส้นแขนงที่เชื่อมระหว่างเส้นปีกจะเรียกว่า cell แบบปิด ที่บริเวณโคนปีกมีเยื่อบางที่มีลักษณะเป็นพู 3 พู ช่วยในการพับปีกและบิน อันนอกสุด (เล็กที่สุด) เรียกว่า alula อันตรงกลางเรียกว่า alar aquama หรือ upper calypter และอันในสุดเรียกว่า thoracic squama หรือ lower calypter โกลีฐานของปีกคู่แรกมีปุ่มขนาดใหญ่เรียกว่า greater ampulla เป็นอวัยวะที่ช่วยให้แมลงวันสร้างเสียงหึ่งๆ ได้ในขณะที่บิน ปีกคู่ที่สองตั้งอยู่บน metathorax ถูกวิวัฒนาการจนลดรูปเหลือคล้ายปุ่มเรียก halteres ช่วยในการทรงตัวขณะบิน



ภาพที่ 2.7 ปีกแมลงวัน [27]

ออกแต่ละปล้องมีขาปล้องละ 1 คู่ แบ่งเป็น 5 ส่วน เรียงจากโคนขาถึงปลายขา ประกอบด้วย coxa (พหูพจน์คือ coxae) trochanter femur tibia และ tarsus (พหูพจน์คือ tarsi) ส่วน tarsi มี 5 ปล้อง ที่ปลายของปล้องสุดท้ายมีเล็บ (claw) 1 คู่ใช้สำหรับยึดเกาะ (ภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.8 ส่วนขาแมลงวัน [27]

ส่วนท้องประกอบด้วยปล้องท้องจำนวน 8 และ 9 ปล้องในเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ ที่เห็นชัดเพียง 4 ปล้อง ในเพศเมียปล้องต่างๆ ถูกเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นอวัยวะสำหรับสืบพันธุ์และวางไข่ [5, 28]

2.5 แผลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทย

ด้วยสภาพทางภูมิศาสตร์ของประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนที่มีลักษณะอากาศและอุณหภูมิที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของแมลงวันเป็นอย่างดี จึงมักประสบกับปัญหาที่เกิดจากแมลงวันที่มีอยู่มากมายหลากหลายชนิดอย่างเล็งไม่ได้เช่นกัน ซึ่งแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทยมากเป็นอันดับต้นอยู่ในวงศ์ Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae [5, 9-10, 25, 28-32]

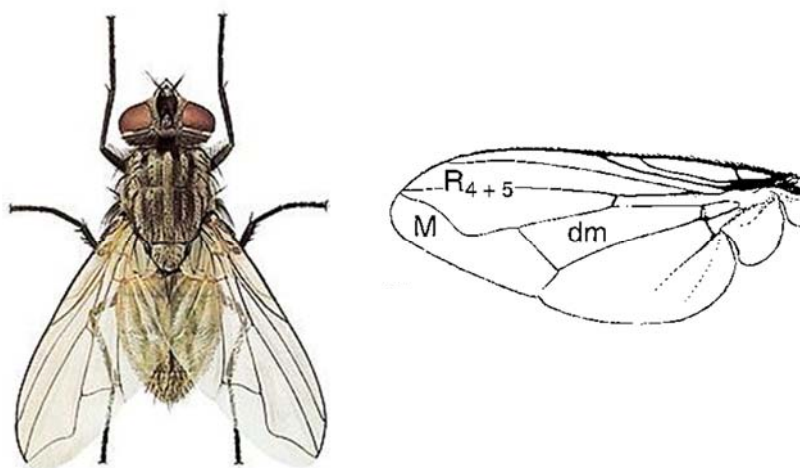
2.5.1 วงศ์ Muscidae

แมลงวันในวงศ์นี้เรียกรวมกันว่า muscid flies พบแพร่กระจายทั่วโลกกว่า 4,000 ชนิด ประกอบด้วยวงศ์ย่อย 7 วงศ์ย่อยแต่ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์มีเพียง 3 วงศ์ย่อยได้แก่ Muscinae, Stomoxinae และ Fanniinae

2.5.1.1 วงศ์ย่อย Muscinae

Musca domestica L. (แมลงวันบ้าน/ House flies)

เป็นแมลงวันที่มีความใกล้ชิดกับมนุษย์ พบแพร่กระจายทั่วโลก และเป็นแมลงวันที่พบมากที่สุด ในบรรดาแมลงวันทั้งหมดในประเทศไทย ขนาดลำตัวยาว 6-9 มิลลิเมตร ลำตัวสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม สันหลังอกบริเวณ scutum มีแถบสีดำพาดตามยาว 4 เส้น ปลายแถบทั้ง 4 เส้นสิ้นสุดภายในส่วน scutum ไม่เลยเข้าไปบริเวณ scutellum ปลายเส้นปีกเส้น M โค้งหักมุมจนปลายเส้นขึ้นไปใกล้เส้น R_{4+5} ตามีสีน้ำตาลปนแดงแยกออกจากกันทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แต่เพศเมียแยกห่างกว่า ปากเป็นแบบ sponging mouth part ลักษณะ arista เป็นพู่ขนนก (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 แมลงวันบ้านระยะตัวเต็มวัยและลักษณะการเรียงตัวของเส้นปีก

(ดัดแปลงจาก Greenberg, 1971 [25] และ Wall and Shearer, 2001 [26])

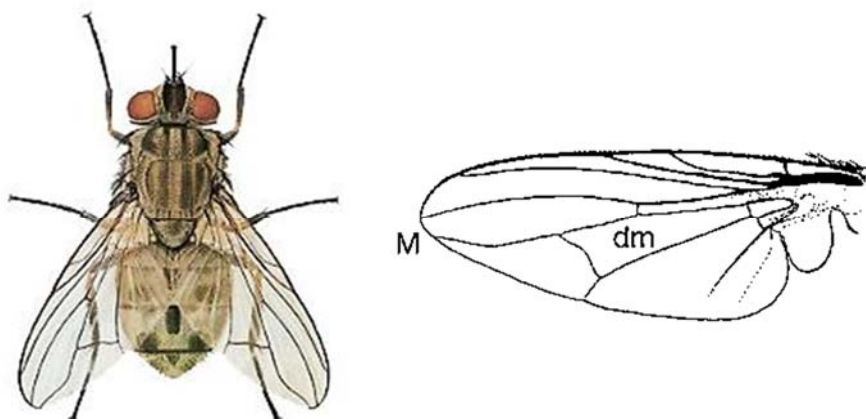
แมลงวันบ้านตัวเมียจะวางไข่ครั้งละประมาณ 120 ฟอง ตลอดชีวิตสามารถวางไข่ได้ 4-6 ครั้ง ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ภายใน 18-24 ชั่วโมง ตัวอ่อนมี 3 ระยะ เวลาที่ใช้ในการพัฒนาจากวัย 1 ถึงวัย 3 ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ปริมาณอาหารและอุณหภูมิ เป็นต้น ที่อุณหภูมิ 25°C ตัวอ่อนสามารถเจริญเป็นดักแด้ได้ภายใน 3-4 วัน แต่ที่อุณหภูมิ 15 °C ตัวอ่อนจะใช้เวลาในการเจริญเป็นดักแด้ถึง 40 วัน ระยะดักแด้ใช้เวลาประมาณ 5 วัน จึงฟักเป็นตัวเต็มวัยเมื่อออกจากดักแด้ ตัวเต็มวัยจะเกาะอยู่บริเวณที่ไม่มีแสงเพื่อรอให้ ผีวขึ้นนอกแจ้งตัวประมาณ 18-36 ชั่วโมง ตัวเต็มวัยมีอายุไขเฉลี่ย 2-4 สัปดาห์ ลักษณะนิสัยของแมลงวันบ้านเป็นแมลงวันที่ชอบดมอาหารและอาศัยอยู่ตามบ้าน มักวางไข่ตามกองขยะหรือสิ่งปฏิกูล จึงเป็นพาหะนำโรคโดยวิธีกลที่สำคัญหนอนแมลงวันบ้านอาจทำให้เกิดไมเอียซิสได้จากการที่แมลงวันไปวางไข่บนแผลของผู้ป่วยที่ไม่ได้สติหรือผู้ป่วยซึ่งมีความพิการทางสมอง หรือทำให้เกิดไมเอียซิสโดยบังเอิญ เช่น กินอาหารที่มีไข่หรือหนอนแมลงวันเข้าไปแล้วตัวอ่อนไปเจริญต่อในลำไส้ เป็นต้น [28]

2.5.1.2 วงศ์ย่อย Stomoxinae

แมลงวันในวงศ์ย่อยนี้ทั้งเพศผู้และเพศเมียกินเลือดสัตว์อื่นเป็นอาหาร มีขนาดใกล้เคียงกับแมลงวันบ้านมาก ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ที่อกมีแถบสีดำพาดตามยาว 4 เส้นเช่นกัน แต่แตกต่างกันชัดเจนตรงที่มีปากแบบแทงดูดขึ้นยาวออกมาชัดเจน ส่วนท้องมีขนาดกว้างกว่าแมลงวันบ้าน มีลายตารางหมากรุกสีดำบนท้องและมีจุดสีดำ บนปล้องที่ 2 และ 3 ปล้องละ 2 จุด [27] ชนิดที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทยอยู่ในสกุล *Stomoxys*

Stomoxys spp. (แมลงวันคอกสัตว์/ stable flies)

ลักษณะของแมลงวันในสกุลนี้มีลำตัวมีสีเทา ยาว 7-8 มิลลิเมตร มี longitudinal dark stripes พาดกลาง thorax 4 แถบ โดยแถบ 2 แถบด้านบนจะขาดตอนบริเวณ suture มีจุดดำ 3 จุดบน abdomen ปล้องที่ 2 และ 3 ปลายเส้นปีกเส้น M โคนเล็กน้อยปลายเส้นอยู่ห่างเส้น R_{4+5} (ภาพที่ 2.10) ขนาด abdomen ล้วนและกว้างกว่าแมลงวันบ้าน ส่วนท้องมีสีเทาและน้ำตาลเข้ม สลับกันคล้ายตาหมากรุก ขน arista บนหนวดปล้องที่ 3 เป็นแบบหวีและมีอยู่ด้านเดียว [27]



ภาพที่ 2.10 แมลงวันคอกสัตว์ระยะตัวเต็มวัยและลักษณะการเรียงตัวของเส้นปีก
(ดัดแปลงจาก Greenberg, 1971 [25] และ Wall and Shearer, 2001 [26])

เนื่องจากแมลงวันชนิดนี้ทั้งสองเพศดูดกินเลือดเป็นอาหาร ทำให้มักพบอยู่ใกล้สัตว์ที่เป็นแหล่งเลือดซึ่งรวมถึงคนด้วยในบางโอกาส สัตว์เลี้ยง และปศุสัตว์ เช่น วัว ควาย ซึ่งเป็นสัตว์ที่แมลงวันชนิดนี้ชอบอาศัยอยู่ใกล้ชิด (synbovines) มากที่สุด และด้วยลักษณะนิสัยที่ชอบดูดกินเลือดสัตว์ จึงก่อปัญหาทั้งด้านการแพทย์และสัตวแพทย์เป็นอย่างมาก โดยสามารถรบกวนทำให้สัตว์ให้นมผลิตน้ำนมลดลงถึง 25% ทั้งนี้ยังเป็นพาหะนำโรคหลายชนิด เช่น เป็นพาหะของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ซึ่งก่อโรค surra ในม้า อูฐ และสุนัข เป็นพาหะนำเชื้อ *Bacillus anthracis* ที่ก่อโรค anthrax มาสู่คนและสัตว์ เป็นพาหะตัวกลางของพยาธิตัวกลม *Habronema* spp. ในกระเพาะม้า เป็นต้น

วงชีวิตของแมลงวันชนิดนี้ประกอบด้วย 4 ระยะได้แก่ ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ตัวเมียมักวางไข่เป็นกลุ่มๆ บริเวณกองฟางที่เปื้อนอุจจาระของปศุสัตว์และบริเวณกองฟางที่อับชื้น ตัวอ่อนของแมลงวันคอกสัตว์จะฟักออกจากไข่หลังจาก 12-24 ชั่วโมงที่ไข่ถูกวาง หนอนวัยหนึ่งมีขนาดเล็กแต่จะเติบโตอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะ 2 และ 3 แล้วจึงเป็นดักแด้ ระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาจนถึงขั้นตอนนี้จะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์และอุณหภูมิ เช่น ที่ 27 °C ใน *Stomoxys calcitrans* จะใช้เวลาเฉลี่ย 12-13 วัน ภายหลังเข้าดักแด้เป็นเวลาประมาณ 7-14 วัน ก็จะฟักเป็นตัวเต็มวัยและออกหาแหล่งเลือดเป็นอาหารทันที ตัวเต็มวัยจะเริ่มผสมพันธุ์หลังจากมีอายุ 3-5 วัน และเพศเมียเริ่มวางไข่เมื่ออายุ 5-8 วัน ตัวเต็มวัยจำเป็นต้องกินเลือดเพื่อการผสมพันธุ์สมบูรณ์และนำไปใช้ในการสร้างไข่ พบว่า *Stomoxys calcitrans* สามารถวางไข่ได้ครั้งเดียวในรอบของการกินเลือดและสามารถวางไข่ได้ถึง 60-130 ฟองต่อครั้ง ซึ่งหมายถึงแมลงวันคอกสัตว์จะต้องกินเลือดใหม่อีกครั้งจึงจะวางไข่ได้อีกรอบ ตลอดชีวิตสามารถวางไข่ได้เฉลี่ย 60-800 ฟอง อายุขัยของแมลงวันชนิดนี้แตกต่างกันตามแต่ละชนิด เช่น *Stomoxys calcitrans* มีชีวิตอยู่ในห้องปฏิบัติการได้นานถึง 35 วัน แต่มีชีวิตแค่ไม่เกิน 2 สัปดาห์ในธรรมชาติ หนอนของแมลงวัน

ชนิดนี้สามารถพบเจริญได้ทั้งในปุ๋ยคอก อาหารสัตว์ที่ทำหกรั่วหรือแม้กระทั่งกองวัชพืชที่ทับถมกัน ซึ่งหนอนเหล่านี้อาจจะเข้าดักแด้ที่แหล่งอาหารเดิมนี้หรือใต้แหล่งอาหารเหล่านี้ก็ได้ [27]

แมลงวันสกุล *Stomoxys* สามารถพบได้ทั่วโลกแต่พบมากบริเวณเขตร้อน สำหรับประเทศไทยพบได้ทั่วประเทศ และมีจำนวนมากในฤดูร้อน สายพันธุ์ที่เคยสำรวจพบว่าแพร่กระจายในประเทศไทยมากเป็นอันดับต้น ได้แก่ *Stomoxys calcitrans* (L.), *Stomoxys sitchensis* Rondani และ *Stomoxys indica* Picard ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ อาจพบได้บ้างตามสัดส่วนที่น้อยลงมา ได้แก่ *Stomoxys bengalensis* Picard, *Stomoxys urema* และ *Stomoxys pulla* [28, 33-35]

2.5.2 วงศ์ Calliphoridae

เป็นวงศ์ของแมลงวันขนาดกลางที่เรียกรวมกันว่า blow flies หรือแมลงวันหัวเขียว ประกอบด้วยสมาชิกมากกว่า 1,000 ชนิด แพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ระยะตัวเต็มวัยมีขนาดใกล้เคียงกัน ทั้งสองเพศคือยาว 6-14 มิลลิเมตร ขึ้นกับสายพันธุ์และอาหารที่ได้รับในระยะหนอน ลักษณะเด่นของแมลงวันในวงศ์นี้คือมีลำตัวมันวาวสะท้อนแสงคล้ายโลหะ มีหลากหลายสีตั้งแต่สีเขียว น้ำเงิน ดำเงา บรอนซ์ หรือทองแดง ตาประกอบมีขนาดใหญ่ มีขนแข็ง (bristle) ตามลำตัวจำนวนมาก หนวดมี 3 ปล้องๆ สุดท้ายมี arista แบบพู่ขนนก (ภาพที่ 2.11)



ภาพที่ 2.11 แมลงวันหัวเขียว (*Chrysomya megacephala*) [25]

ในระยะหนอนเมื่อถึงวัยที่เจริญเต็มทีลำตัวมีขนาดประมาณ 8-23 มิลลิเมตร สีขาวครีม ที่ปล้องสุดท้ายมีลักษณะป้านมี cone-shaped tubercle 6-8 อันและมีท่อหายใจ (posterior spiracle) 1 คู่ ลักษณะ slits ในท่อหายใจแต่ละอันเอียงเข้าหาแกนกลางตัวของหนอน

แมลงวันหัวเขียวมีลักษณะนิสัยชอบหาอาหารตามแหล่งที่อยู่อาศัยของคน แหล่งขायปลา ขायเนื้อ แหล่งปฏิกูลที่มีซากพืช ซากสัตว์ที่เน่าเปื่อย กองขยะ และมูลสัตว์ ทั้งนี้มีรายงานการ

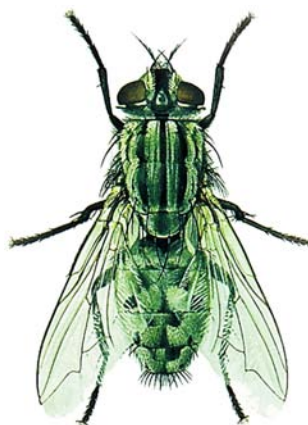
ทดลองพบว่าแมลงวันหัวเขียวเป็นแมลงวันกลุ่มแรกที่เข้าไปตอมซากศพทั้งคนและสัตว์ตั้งแต่หน้าที่แรกๆ โดยชอบเข้าไปวางไข่ตามรูจมูก ปาก และส่วนเปิดอื่นๆ ของศพ รวมถึงรอยแผลเปิดที่มีเลือด ซึ่งเป็นแหล่งที่ให้ความชื้น, น้ำตาลและ โปรตีน ซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะเป็นแหล่งวางไข่และเพาะพันธุ์ตัวอ่อน โดยแมลงวันชนิดนี้จะถูกดึงดูดด้วยสารที่หลั่งออกมาจากซากศพ ซึ่งการรับรู้จากระยะไกลนี้แมลงวันจะอาศัยอวัยวะรับกลิ่นบนหนวด (olfaction) ในการระบุตำแหน่งศพ จนกว่าจะเข้าไปใกล้ศพมากพอจนสามารถมองเห็นด้วยตาประกอบได้ ในบางสายพันธุ์จะถูกดึงดูดจากรอยแผลเปิดทำให้มักมีการเข้าไปวางไข่บริเวณรอยแผลเปิดและก่อโรคไมเอียซิสได้ด้วย [36]

วงศ์นี้ประกอบด้วยแมลงวันกว่า 150 genera ซึ่งส่วนใหญ่ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายซาก ช่วยให้เกิดการหมุนเวียนของอินทรีย์สารในระบบนิเวศ แต่มีประมาณ 80 สายพันธุ์ซึ่งอยู่ในอันดับ *Cochliomyia*, *Calliphora*, *Chrysomya*, *Cordylobia*, *Lucilia*, *Protophormia* และ *Phormia* ที่ระยะหนอนเป็นปรสิตบนสัตว์เลี้ยงหรือปศุสัตว์ ก่อให้เกิดโรคไมเอียซิสได้ [27]

ชนิดที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ได้แก่สกุล *Auchmeromyia*, *Cochliomyia*, *Cordylobia*, *Chrysomya*, *Lucilia* และ *Calliphora* [5] สำหรับในประเทศไทยจากการสำรวจในปี 1979 พบว่ามี 42 ชนิด [37] เฉพาะในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลพบ 5 ชนิดคือ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies*, *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina* และ *Hemipyrellia ligurriens* ส่วนชนิดที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ได้แก่ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies*, *Phaenicia sericata* และ *Phaenicia cuprina* [38]

2.5.3 วงศ์ Sarcophagidae

แมลงวันในวงศ์นี้เป็นแมลงวันขนาดใหญ่ที่ลักษณะนิสัยชอบกินอาหารและวางไข่บนทั้งเนื้อสดและเน่าเปื่อย จึงได้ชื่อสามัญ (common name) ว่าแมลงวันตอมเนื้อ (flesh flies) แมลงวันกลุ่มนี้ลักษณะลำตัวมีสีเทาไม่มันวาวสะท้อนแสง ตัวเต็มวัยยาว 8-15 มิลลิเมตร มีขนแข็งตามลำตัว ลักษณะ arista เป็นพู่ขนนก มี longitudinal dark stripes พาดบนอกส่วน scutum 3 แถบ ปลายแถบเส้นกลางยาวเลยไปจนสุดส่วน scutellum มี ill-defined black squares คล้ายตารางหมากรุกบน abdomen จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า แมลงวันหลังลาย ที่ปลายขา มี tarsal claw และ pluvisilli ขนาดใหญ่ ทำให้มองคล้ายกับมีเท้าโต (big-footed flies) เพศเมียบางสายพันธุ์ออกลูกเป็นหนอนวัย 1 (viviparous) เนื่องจากไข่ถูกฟักตั้งแต่อยู่ใน reproductive tract [36] ลักษณะพิเศษนี้ทำให้หนอนแมลงวันหลังลายได้เปรียบแมลงวันหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในแหล่งอาหารเดียวกัน เนื่องจากหนอนสามารถใช้อาหารได้ทันทีโดยไม่ต้องรอเวลาฟักหรือเลี้ยงต่อผู้ล่าและปรสิตเหมือนไข่จากแมลงวันชนิดอื่น



ภาพที่ 2.12 แมลงวันหลังตาย *Sarcophaga* spp. [25]

แมลงวันหลังตายมีมากกว่า 2600 ชนิดทั่วโลก บางชนิดเป็นปรสิตของแมลงด้วยกัน บางชนิดเป็นปรสิตของหอย และบางชนิดเป็นปรสิตของสัตว์มีกระดูกสันหลัง แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ ซึ่งอยู่ในวงศ์ย่อย Sarcophaginae ได้แก่ ชนิดที่ชอบตอมหรือวางไข่บนเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เช่น สกุล *Wohlfahrtia* และชนิดที่ชอบตอมหรือกินซากศพ เช่น สกุล *Sarcophaga* [5] โดยหนอนของแมลงวันทั้ง 2 สกุลเป็นสาเหตุของไมเอียซิส

ในประเทศไทยจากการสำรวจในปี 1976 พบแมลงวันวงศ์นี้ในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑลจำนวน 4 ชนิดคือ *Sarcophaga peregrine*, *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga orchidae*, *Sarcophaga albiceps* [38] และพบได้ถึง 48 ชนิดทั่วประเทศ [37]

2.6 แมลงวันกับความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์

2.6.1 เป็นพาหะนำโรคโดยวิธีกล

แมลงวันนับได้ว่าเป็นแมลงที่สำคัญและมีอิทธิพลต่อชีวิตของมนุษย์อย่างมาก เพราะไม่เพียงแต่สร้างความรำคาญจากการไต่ตอม อันเนื่องจากการปรับตัวเข้ามาใช้ชีวิตใกล้กับคนแล้ว ทว่ายังสามารถนำโรคสู่คน โดยการถ่ายทอดเชื้อโรคที่ติดมากับลำตัว ปาก หรือขา ในขณะที่ตอมอาหาร หรือสิ่งปฏิกูลต่างๆ ได้ด้วย คนได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยรับประทานอาหารที่ถูกแมลงวันตอม ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคมืด (shigellosis) ไข้รากสาด (typhoid fever) อหิวาตกโรค (cholera) เป็นต้น ทั้งนี้ยังพบว่าสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตับอักเสบ (Hepatitis) โปลิโอ และตาแดง (conjunctivitis) [28] รวมถึงแบคทีเรียก่อโรคกว่า 42 สายพันธุ์ เช่น coagulase-negative staphylococci แบคทีเรียกลุ่ม Streptococcus, D non-enterococci, Viridans streptococci ซึ่งเป็นสาเหตุของ infective endocarditis, *Enterobacter cloacae* เป็นสาเหตุของ endophthalmitis, *Klebsiella pneumonia* ทำให้เกิด spinal epidural abscesses หรือ impetigo-like

vegetating nasal lesions, *Morganella morganii* ก่อโรค ecthyma gangrenosum-like eruptions และทำให้เกิดการติดเชื้อจากโรคฉวยโอกาส *Viridans streptococci* ทำให้เกิด Empyema thoracis and lung abscesses, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *Proteus mirabilis* ทำให้เกิด chronic otitis media เป็นต้น [31] นอกจากนี้แมลงวันที่เป็นคางซิปเป็นผู้ย่อยสลายแล้ว แมลงวันคูดเลือดยังถูกรายงานว่าสามารถเป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคโดยวิธีกลสู่สัตว์กว่า 35 ชนิดได้ด้วย เช่น *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma evansi* และ *T. vivax*, เชื้อก่อโรคแอนแทรกซ์ที่ผิวหนัง, tularaemia, bovine viral leukosis, vesicular stomatitis และ hog cholera [39] และเนื่องจากแมลงกลุ่มนี้มีความใกล้ชิดกับสัตว์มาก จึงสามารถนำโรคจากสัตว์มาสู่คนโดยวิธีกลได้ เช่น โรคแอนแทรกซ์ (anthrax), tularaemia และ Lyme disease [20]

2.6.2 ปัญหาจากการเจาะดูดเลือด

เกิดจากแมลงวันคอกสัตว์และเหือด โดยพบว่าแมลงวันคอกสัตว์สามารถกัดดูดเลือดสร้างความรำคาญให้แก่ปศุสัตว์ทำให้ผลิตน้ำนมลดลงถึง 25% ทั้งนี้ยังทำให้สัตว์สูญเสียเลือดและเกิดภาวะโลหิตจางได้ด้วย โดยเฉพาะเหือดที่มีขนาดตัวใหญ่ทำให้สามารถดูดเลือดได้ถึง 0.5 มิลลิลิตรต่อครั้งต่อตัว และยังสามารถทำให้สัตว์สูญเสียเลือดเพิ่มขึ้นอีกจากแผลที่มีเลือดไหลซึมไม่หยุดอันเกิดจากสารที่ทำให้เลือดไม่แข็งตัวในน้ำลายของเหือด ทั้งนี้บาดแผลดังกล่าวยังอาจถูกดูดเลือดซ้ำจากเหือดตัวอื่นๆต่อไปหรืออาจถูกใช้เป็นแหล่งวางไข่ของแมลงวันที่ก่อโรคไมเอียซิสได้อีกด้วย มีรายงานว่าเหือด *Hybomitra sonomensis* และ *Tabanus punctife* จำนวน 25 ถึง 30 ตัวดูดเลือดโฮสต์เป็นเวลา 6 ชั่วโมงสามารถทำให้โฮสต์เสียเลือดได้มากกว่า 100 มิลลิลิตร และในบริเวณที่เป็นแหล่งชุกชุมสามารถทำให้ลูกวัวมีน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์ถึง 45 กิโลกรัม [39] ดังนั้นหากมีฟาร์มสัตว์ให้เนื้อหรือนมในบริเวณที่เป็นแหล่งชุกชุมของเหือด สัตว์อาจถูกกัดดูดเลือดจนส่งผลให้น้ำหนักหรือปริมาณน้ำนมลดลงได้ ทั้งนี้เคยมีรายงานว่า แม่วัวอายุหนึ่งปีที่ถูกเหือดกัด 66 ถึง 90 ตัวต่อวันผลิตน้ำนมลดลงถึง 0.1 กิโลกรัม และในปี 1965 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ความชุกชุมของเหือดทำให้เกิดการสูญเสียรายรับทั้งปีจากการเลี้ยงวัวเนื้อรวมทั้งสิ้น 40 ล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกา [40] ผลจากการเจาะดูดเลือดที่นอกจากจะทำให้เกิดความรำคาญและสูญเสียเลือดแล้วยังพบว่าแมลงวันคูดเลือดทั้ง 2 ชนิดยังเป็นพาหะนำโรคหลายชนิด เช่น แมลงวันคอกสัตว์เป็นพาหะของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ซึ่งก่อโรค surra ในม้า อูฐ และสุนัข เป็นพาหะนำเชื้อ *Bacillus anthracis* ที่ก่อโรค anthrax มาสู่คนกับสัตว์ และเป็นพาหะตัวกลางของพยาธิตัวกลม *Habronema* spp. ในกระเพาะม้า เป็นต้น ในทำนองเดียวกันเหือดที่มักจะทำปัญหาด้านสัตวแพทย์มากกว่าด้านการแพทย์เพราะถึงแม้จะมีเหือดหลายชนิดที่ดูดกินเลือดคนแต่มีไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่เป็นพาหะนำโรคมาสู่คน หนึ่งในชนิดที่สำคัญคือ *Chrysops* (*C. dimidiatus*) นำเชื้อพยาธิ *Loa loa* ซึ่งก่อให้เกิดโรค Loiasis ในทวีปแอฟริกากลางและแอฟริกาตะวันตก นอกจากนี้ผลจากการกัดอาจทำให้เกิด

อาการแพ้อย่างรุนแรงในรายที่แพ้ น้ำลายเหือบ ทั้งนี้ยังพบว่าตัวอ่อนของเหือบชนิดที่ดำรงชีพแบบผู้ล่ายังสามารถกัดและปล่อยสารพิษเข้าสู่แผลทำให้เกิดอาการเป็นผื่นแพ้ได้ โดยพบได้เป็นพิเศษ ในเกษตรกรที่ต้องแช่เท้าในน้ำหรือโคลนเวลาทำงาน [20]

2.6.3 ก่อโรคไมเอียซิส

หนอนแมลงวันบางชนิดสามารถไชเข้าผิวหนัง เจริญเติบโตบนหรือในอวัยวะ โดยดูดกินเนื้อเยื่อของโฮสต์ ของเหลว และอาหารที่โฮสต์กินเข้าไป ก่อให้เกิดการอักเสบของผิวหนังและเป็นแผลเน่าเกิด โรคไมเอียซิส สร้างความเจ็บปวดทั้งในคนและปศุสัตว์ ส่งผลให้เกิดความเสียหายกับอุตสาหกรรมปศุสัตว์ได้ด้วย อาการของโรคอาจอาจเกิดอย่างอ่อนหรือไม่ปรากฏอาการเลย แต่ในบางรายอาจพบอาการรุนแรงจนทำให้โฮสต์ถึงแก่ชีวิตได้ [41] ในทางปรสิตวิทยาสามารถแบ่งไมเอียซิส โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์กับหนอนแมลงวันได้เป็น 3 กลุ่ม [27] ได้แก่

Obligatory myiasis เกิดจากแมลงวันชนิดที่เป็น Obligatory ectoparasite คือ จำเป็นต้องอาศัยโฮสต์ที่เป็นสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อพัฒนาตลอดระยะหนอนโดยไม่สามารถขาดโฮสต์ได้ แมลงวันที่ทำให้เกิดไมเอียซิสชนิดนี้ ได้แก่ *Dermatobia hominis*, *Chrysomya bezzina* และ *Wohlfahrtia* spp. [5, 27]



ภาพที่ 2.13 ลักษณะการเกิด Obligatory myiasis ที่บริเวณช่องคลอดของแกะ สาเหตุจากหนอนแมลงวัน *Wohlfahrtia magnifica* (Sarcophagidae) และลูกศรแสดง myiasis ช้อนจากหนอนแมลงวัน *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) [42]

Facultative myiasis เป็นภาวะที่เกิดจากหนอนแมลงวันซึ่งปกติหากินตามธรรมชาติ แต่ในบางช่วงชีวิตสามารถปรับตัวเพื่ออาศัยกับสิ่งมีชีวิตอื่น จึงทำให้เกิดไม่เอื้อชีสได้ [27] ได้แก่ แมลงวัน *Lucilia*, *Calliphora* และ *Parasarcophaga* spp. [5]

Accidental myiasis เกิดจากหนอนแมลงวันซึ่งไม่ได้เป็นปรสิตของโฮสต์ แต่เข้าสู่อวัยวะภายในโดยบังเอิญ เช่น กินไข่ของแมลงวันเข้าไปพร้อมอาหารหรือน้ำ [27] ได้แก่ หนอนแมลงวัน *Musca domestica* เป็นต้น [5]

สำหรับในประเทศไทยการเกิดไม่เอื้อชีสในมนุษย์มีข้อมูลการรายงาน พบว่าแมลงวันที่เป็นสาเหตุได้แก่ แมลงวันหัวเขียวสายพันธุ์ *Chrysomya bezziana* Villeneuve [1, 43-46], *Cochliomyia* (*Callitroga*) *macellaria* (F.) [46], *Chrysomya megacephala* และ *Chrysomya rufifacies*. [3] แมลงวันหลังลายสายพันธุ์ *Parasarcophaga ruficornis* F. [4] และแมลงวันสายพันธุ์อื่นได้แก่ *Eristalis tenax* (L.) (drone fly) [47-49], *Oestrus ovis* L. (sheep blot fly) [50] และ *Megaselia scalaris* (Loew) [51] เป็นต้น

2.6.4 การรักษาแผลเนื้อตายด้วยหนอนแมลงวัน

ความสามารถในการรักษาแผลเนื้อตายของหนอนแมลงวัน ถูกค้นพบโดย William Baer ศัลยแพทย์ทหารชาวยุโรปในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 จากการสังเกตพบแผลของทหารในสนามรบที่มีหนอนแมลงวันเจริญอยู่จะสะอาดและติดเชื้อมากกว่าแผลที่ไม่มีหนอนแมลงวันซึ่งทำให้รักษาหายได้เร็วกว่า เหตุนี้ William Baer จึงทดลองรักษาแผลของคนไข้ของเขาในโรงพยาบาล Johns Hopkins และ โรงพยาบาลเด็กใน Baltimore โดยใช้หนอนแมลงวันหัวเขียว ผลการรักษาถูกเผยแพร่ในปี 1929 ต่อจากนั้นในปี 1935 โรงพยาบาลกว่า 1,000 แห่งก็เริ่มมีห้องเลี้ยงแมลงวันสำหรับการรักษาแผลโดยเฉพาะ และมีการก่อตั้งบริษัทที่ผลิตหนอนแมลงวันใช้ในการรักษาแผลเรื้อรังเพื่อการค้าตามมาอีกมากมาย [20]

หลักการรักษาแผลด้วยหนอนแมลงวันอาศัยความสามารถในการทำให้เกิดไม่เอื้อชีสของหนอนแมลงวันบนแผล และหลักการที่หนอนจะหลั่งเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยเนื้อตายให้เป็นของเหลวแล้วดูดกินเข้าสู่ร่างกายเพื่อเป็นอาหารในช่วงที่เจริญอยู่บนโฮสต์ ซึ่งวิธีการนี้เสมือนการจำลองการเกิดไม่เอื้อชีส แต่ควบคุมให้เกิดผลดีโดยการกำจัดเนื้อตายกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์เนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ (granulation tissue) [7] โดยหลีกเลี่ยงการเกิดผลเสียต่อเนื้อเยื่อดีโดยการใช้หนอนในปริมาณที่เหมาะสมคือ 5-10 ตัวต่อขนาดแผล 1 ตารางเซนติเมตร ทั้งนี้พบว่าระหว่างการย่อยเนื้อตายนั้น หนอนยังหลั่งสารประกอบที่มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียกลุ่ม *Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas aeruginosa* [52] รวมถึงแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ เช่น methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [53]

ข้อดีดังกล่าวจะช่วยลดการติดเชื้อในแผลได้โดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะอันเป็นผลดีต่อผู้ป่วยที่แพ้ยาปฏิชีวนะอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบวิธีการรักษาด้วยวิธีนี้กับการรักษาด้วยวิธีอื่นพบว่า เป็นวิธีการที่ง่ายแต่ปลอดภัยกว่าที่สามารถทำให้แผลสะอาด ช่วยลดกลิ่นไม่พึงประสงค์ของแผล ทำให้แผลสมานกันได้เร็วกว่า ช่วยลดโอกาสในการถูกตัดอวัยวะทิ้งได้มากกว่าวิธีอื่น และที่สำคัญคือมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่ามาก ลักษณะแผลที่เคยใช้วิธีการรักษาด้วยหนองแมลงวันแล้วได้ผลดี เช่น แผลกดทับ (pressure ulcers) แผลเลือดคั่ง (venous stasis ulcer) แผลเบาหวานที่เท้า (diabetic foot ulcers) (ภาพที่ 2.14) แผลไฟไหม้ (burns) แผลจากอุบัติเหตุ (traumatic wounds) และแผลหลังการผ่าตัด (postsurgical wounds) [20] เป็นต้น

หนองแมลงวันที่นิยมใช้ในการนี้คือ หนองแมลงวัน *Lucilia sericata* (Calliphoridae) เนื่องจากสามารถเลี้ยงได้ง่ายในภาวะจำลอง หนองแมลงวันชนิดนี้จะกินเนื้อตายเฉพาะผิวหนังบนเท่านั้นไม่ไช่เข้าภายในอวัยวะ ทั้งนี้ตัวเต็มวัยของ *L. sericata* ยังออกลูกเป็นไข่ทำให้ง่ายต่อการทำให้ปราศจากเชื้อในขั้นตอนการเลี้ยง อีกทั้งยังไม่จำเพาะต่อโฮสต์เหมือนแมลงวันที่ก่อให้เกิดไมเอียซิสต์ชนิดที่เป็น obligate parasite อีกด้วย [7]



ภาพที่ 2.14 ผลการรักษาแผลเบาหวานที่เท้าในชายวัย 73 ปี ด้วยหนองแมลงวัน;

(A) ก่อนรักษา (B) ระหว่างรักษา (C) 1 ปีหลังการรักษา [20]

2.6.5 การใช้ประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ (Forensic Entomology)

ประโยชน์อีกประการหนึ่งที่มนุษย์ได้รับจากแมลงวันคือ การนำความรู้ด้านชีววิทยาของแมลงวันมาใช้ในกระบวนการพิจารณาทางกฎหมาย ทำให้เกิดศาสตร์ใหม่ที่เรียกว่านิติวิทยาศาสตร์ เป็นศาสตร์ที่ผสมผสานระหว่างการศึกษาเกี่ยวกับแมลงรวมถึงสัตว์ขาข้อชนิดอื่นๆ กับนิติเวชศาสตร์ โดยเฉพาะการใช้แมลงในการสืบสวนคดีอาชญากรรมหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าอาชญากรรมนิติวิทยาศาสตร์ กล่าวคือเมื่อมีการตายเกิดขึ้นโดยศพถูกทิ้งไว้โดยลำพัง เช่น การเสียชีวิตโดยไม่มีผู้ใดพบเห็น การเกิดฆาตกรรม และการลอบทำอัตวินิบาตกรรม เมื่อเวลาผ่านไปมักพบว่ามีแมลง

ต่างๆ เข้ามามีบทบาท นักนิติวิทยาศาสตร์สามารถใช้แมลงเหล่านี้ เป็นหลักฐานในทางนิติเวชได้ เช่น ใช้บอกว่เสียชีวิตมานานเท่าไรหรือการประมาณระยะเวลาที่น้อยที่สุดหลังจากเสียชีวิต ใช้เป็นหลักฐานแสดงถึง การเคลื่อนย้ายศพ เชื่อมโยงระหว่างที่เกิดเหตุ เหยื่อ และผู้ต้องสงสัย ช่วยระบุตำแหน่งบาดแผลบนศพ ใช้ในการหาหลักฐานทางพิษวิทยา หรือแม้กระทั่งใช้เป็นหลักฐานในการยืนยันการทอดทิ้งและทารุณกรรม[8-10].

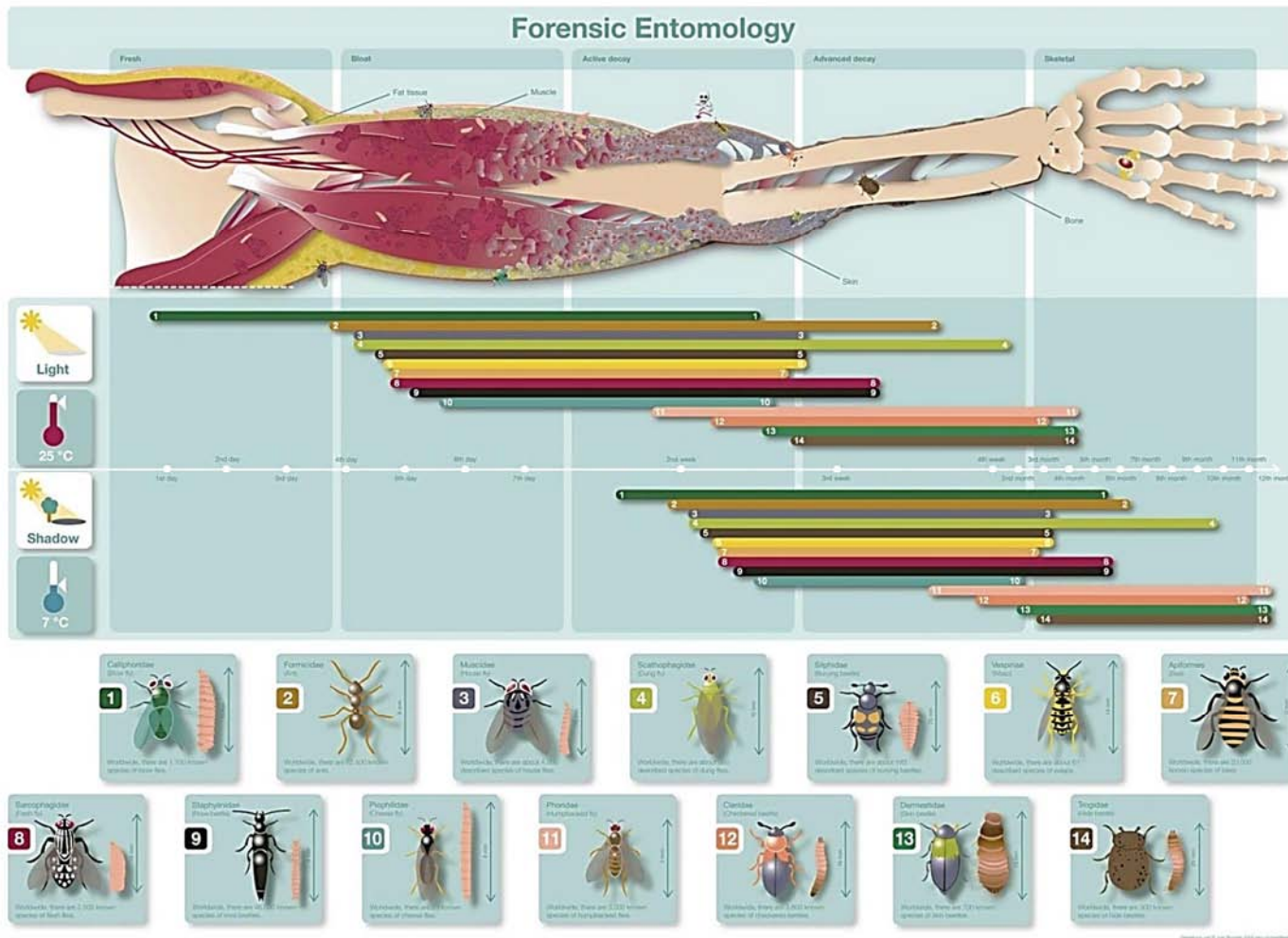
แมลงวันนับเป็นแมลงชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากไม่เพียงแต่พบได้จำนวนมากบนศพ ทว่ายังเป็นแมลงชนิดแรกๆ ที่เข้าไปกินศพอีกด้วย ซึ่งชนิดที่พบมากที่สุดอยู่ในวงศ์ Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae ตามลำดับ [15, 54-56] แต่ทั้งนี้ชนิดของแมลงวันดังกล่าวยังมีความหลากหลายแตกต่างกันตามพื้นที่ จึงทำให้แต่ละท้องถิ่นที่พบสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ด้วย เช่น มีการสำรวจหนอนแมลงวันบนศพในประเทศที่มีลักษณะภูมิประเทศใกล้เคียงประเทศไทยอย่างเช่นประเทศมาเลเซีย ระหว่างปี 1993 ถึง 1996 พบหนอนแมลงวัน *Chrysomya* species มากที่สุดถึง 73.7% โดยเฉพาะ *Chrysomya megacephala* (F.) และ *Chrysomya rufifacies* (Macquart) รองลงมาเป็นหนอนแมลงวันชนิดอื่นๆรวมกันได้แก่ *Sarcophaga* spp., *Lucilia* spp., *Hermetia* spp. และแมลงวันในวงศ์ Muscidae [57]

ในประเทศไทยมีรายงานการเก็บหนอนแมลงวันจากศพ 30 ศพในภาคเหนือ ในปี 2000 ถึง 2006 พบแมลงวันวงศ์ Calliphoridae มากที่สุด (28 ศพ) ได้แก่ *Chrysomya megacephala* (F.), *Chrysomya rufifacies* (Macquart), *Chrysomya villeneuvei* Patton, *Chrysomya nigripes* Aubertin, *Chrysomya bezziana* Villeneuve, *Chrysomya chain* Kurahashi, *Lucilia cuprina* (Wiedemann), *Hemipyrellia ligurriens* (Wiedemann) และไม่ทราบชนิด 2 สายพันธุ์ รองลงมา (10 ศพ) คือ แมลงวันในวงศ์ Muscidae (*Hydrotaea spinigera* Stein, *Synthesiomyia nudiseta* (Wulp)) และวงศ์ Sarcophagidae (8 ศพ) ได้แก่ *Sarcophaga ruficornis* (F.) และไม่ทราบชนิดจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่เหลือเป็นชนิดอื่นรวมๆ กัน [55]

การประมาณระยะเวลาที่น้อยที่สุดหลังจากเสียชีวิต โดยอาชุนิติวิทยาศาสตร์มักถูกใช้ในกรณีเสียชีวิตมากกว่า 24 ชั่วโมง เนื่องจากเมื่อระยะเวลาดังกล่าว การประมาณค่าจากลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของศพ เช่น การแข็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigidity) การตกลงสู่เบื้องต่ำของเม็ดเลือดแดง (lividity) และอุณหภูมิร่างกายที่ลดลง จะมีความแม่นยำน้อยลง เพราะศพเริ่มเข้าสู่กระบวนการเน่า ซึ่งหลังจากนี้ การคะแนนค่า PMI โดยใช้แมลงจะเข้ามามีบทบาทอย่างมาก และบางกรณีถือเป็นวิธีเดียวที่จะสามารถใช้แก้ปัญหาได้ ปัจจัยหลัก 2 อย่างที่ต้องคำนึงถึงในการใช้แมลงคะแนนค่า PMI คือ ลำดับการเข้าไปกินศพตามระยะการย่อยสลายของศพที่แตกต่างกันของแมลงแต่ละชนิด (fauna succession) และการเปลี่ยนแปลงในระยะต่างๆตามวงชีวิตที่แตกต่างกันของแมลงดังกล่าว (estimating the PMI from degree of development) [58-59]

2.6.6 การคะแนนค่า PMI จากลำดับการเข้าไปกินศพของแมลงแต่ละชนิด

ภายหลังจากเสียชีวิต ผลจากการถูกย่อยสลายจากทั้งเอนไซม์ในร่างกายและแบคทีเรีย จะทำให้ศพเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีต่างๆ ในร่างกายที่แตกต่างกันในระยะต่างๆ ของการเน่า ซึ่งเริ่มจาก fresh stage, bloated stage, active decay stage, post-decay stage ไปจนถึงระยะ skeletonization สารเคมีที่เกิดจากการย่อยสลายของศพที่แตกต่างกันในระยะต่างๆ นี้จะทำให้เกิดกลิ่นคั่งคุดแมลงสายพันธุ์ที่แตกต่างกันเข้ามากินศพ (ภาพที่ 2.15) สำหรับกลุ่มแมลงวันพบว่าเมื่อถูกดึงดูดด้วยสารอินทรีย์จากศพ [60-62] จะเข้ามาตอมศพตั้งแต่นาทีแรกๆ และวางไข่ภายในเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง [16, 19] โดยสายพันธุ์ที่เข้าไปตอมศพกลุ่มแรกคือ แมลงวันหัวเขียวต่อมาจึงเป็นแมลงวันบ้านและแมลงวันหลังลายตามลำดับ [63]



ภาพที่ 2.15 Fauna succession แสดงลำดับการเข้าไปกินศพของแมลงแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 7 °C และ 25 °C (1) Calliphoridae (2) Formicidae (3) Muscidae (4) Scathophagidae (5) Silphidae (6) Vespiniae (7) Apiformes (8) Sarcophagidae (9) Staphylinidae: Rove beetle (10) Piophilida (11) Phoridae (12) Cleridae (13) Dermestidae (14) Trogidae (ที่มา <http://www.flickr.com/photos/mstoll/4287107245/>)

จากข้อมูลข้างต้นหากมีการรวบรวมข้อมูลสายพันธุ์ของแมลงที่พบบริเวณศพในช่วงระยะการย่อยสลายต่างๆ ก็จะสามารถนำมาใช้อ้างอิงในการประมาณระยะเวลาการตายได้ ในอีกด้านหนึ่งการเก็บรวบรวมข้อมูลสายพันธุ์ของแมลงที่พบบริเวณศพก็กลายมาเป็นข้อจำกัดของวิธีการนี้ได้ด้วย เนื่องจากแมลงแต่ละชนิดที่พบบนศพมักจะแตกต่างกันตามแต่สภาพแวดล้อมสภาพภูมิภาค ฤดูกาล และภูมิอากาศ ทั้งนี้การคะแนนค่า PMI ด้วยวิธีนี้ยังเป็นการคะเนเวลาช่วงกว้างๆ ที่เหมาะสำหรับศพที่เสียชีวิตมากกว่าหนึ่งเดือนขึ้นไปถึงหนึ่งปีเท่านั้น เป็นผลให้วิธีนี้ไม่สะดวกในการใช้งานหากจะคะแนนค่า PMI ในกรณีที่เสียชีวิตมาไม่กี่วัน

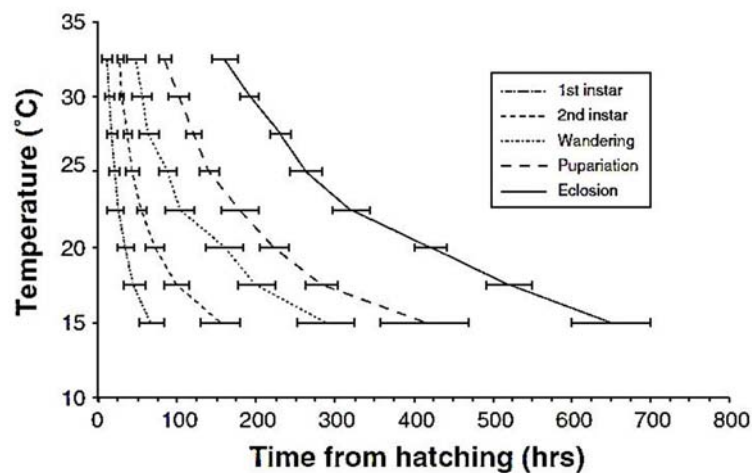
2.6.7 การคะแนนค่า PMI โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงในระยะต่างๆ ตามวงชีพที่แตกต่างกันของแมลงวัน

วิธีนี้เหมาะสำหรับการคะแนนค่า PMI หลังจากศพเสียชีวิตได้ไม่นานนัก อาจเป็นสัปดาห์หรือเท่ากับจำนวนวันที่ครบวงชีพของแมลงที่พบบนศพนั้นๆ โดยอาศัยหลักการที่ระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาในแต่ละระยะการเจริญของแมลงวันจะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์และอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม [16] โดยจากการศึกษาของ Grassberger et al. [64] ถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของแมลงวัน *C. albiceps* ตั้งแต่ระยะไข่ถึงตัวเต็มวัย โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30, และ 35 °C พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของ *C. albiceps* ทุกๆระยะ และที่อุณหภูมิ 15 °C จะหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะ L1 การประยุกต์ใช้ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้คือ การสร้างกราฟความสัมพันธ์ isomorphen-diagram และ isomegalen diagram

2.6.7.1 Isomorphen-diagram

เป็นกราฟที่ได้จากข้อมูลการเลี้ยงแมลงวันในสภาวะควบคุมที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการพัฒนาของแมลงวัน ตั้งแต่ฟักจากไข่จนเป็นระยะต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างกัน (ภาพที่ 2.16) สามารถนำมาใช้คะแนนค่า PMI ได้โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันระยะที่แก่ที่สุดที่พบบนศพมาเลี้ยงจนกระทั่งออกจากดักแต่แล้วบันทึกเวลาที่ใช้ไว้ จากนั้นนำข้อมูลอุณหภูมิของที่เกิดเหตุมาวิเคราะห์ด้วยกราฟโดยลากเส้นจากอุณหภูมิที่วัดได้ขณะพบศพไปจนถึงเส้นแทนระยะตัวเต็มวัย แล้วลากเส้นลงมาที่แกนเวลาที่ใช้ในการพัฒนาเป็นแต่ละระยะก็จะได้อายุของแมลงวันตั้งแต่ไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยที่อุณหภูมิดังกล่าว จากนั้นจึงนำมาลบด้วยจำนวนเวลาที่ใช้เลี้ยงแมลงข้างต้น ผลต่างที่ได้คือค่า PMI

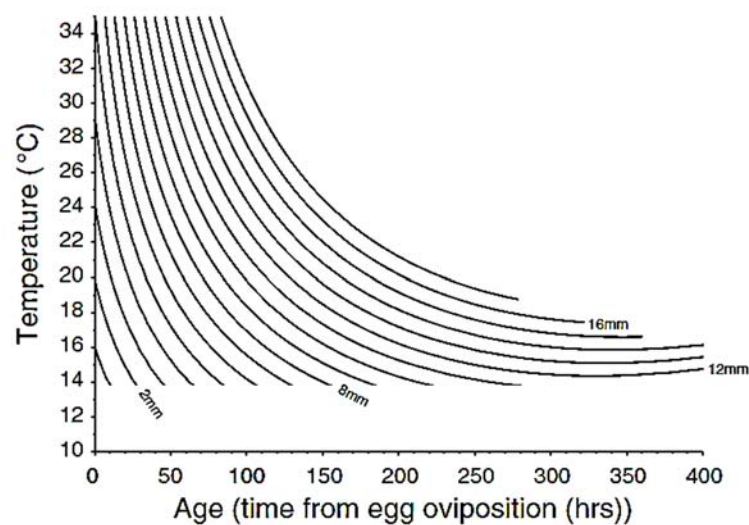
วิธีการนี้จำเป็นต้องได้ข้อมูลอุณหภูมิบริเวณสถานที่เกิดเหตุที่แน่นอน และตัวอย่างแมลงวันจากสถานที่เกิดเหตุควรเป็นตัวอย่างที่มีชีวิต เพราะหากตัวอย่างตายจะทำให้การประมาณค่า PMI ได้น้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจากการลอกคราบจากหนอนวัย 2 เป็นวัย 3 มีช่วงเวลา และตัวอย่างหนอนวัย 2 ตอนปลายมีลักษณะคล้ายตอนต้น ทำให้อาจเกิดความสับสนได้ว่าหนอนที่นำมาประมาณค่า PMI ลอกคราบไปถึงระยะใดแล้ว [65]



ภาพที่ 2.16 Isomorphen-diagram [65]

2.6.7.2 Isomegalen diagram

คือกราฟที่ได้จากการนำข้อมูลการเลี้ยงหนอนแมลงวันในห้องปฏิบัติการ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์แบบสามมิติ ระหว่างความยาวหรือน้ำหนักแห้งของหนอนตั้งแต่ฟักจากไข่จนเข้าดักแด้ (แกน Z) กับ อุณหภูมิ (แกน Y) และเวลาที่ใช้ในการเจริญ (แกน X) (ภาพที่ 2.17) ซึ่งสามารถนำมาคะเนค่า PMI ได้จากขนาดหรือน้ำหนักแห้งของหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากที่เกิดเหตุกับข้อมูลของสายพันธุ์เดียวกันที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยมีข้อมูลของอุณหภูมิเฉลี่ยในที่เกิดเหตุมาประกอบ [11-14, 58] ทว่าการคะเนค่า PMI โดยใช้กราฟดังกล่าวนี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเมื่อหนอนเริ่มเข้าสู่ระยะดักแด้ ความยาวของหนอนจะลดลง หากคำนวณค่า PMI จากขนาดของหนอนในช่วงระยะนี้ แล้วอาจได้ค่า PMI ที่คลาดเคลื่อนได้ [13] ทั้งนี้ยังพบว่าขนาดของหนอนยังขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารที่ได้รับและความหนาแน่นของประชากรอีกด้วย [66]

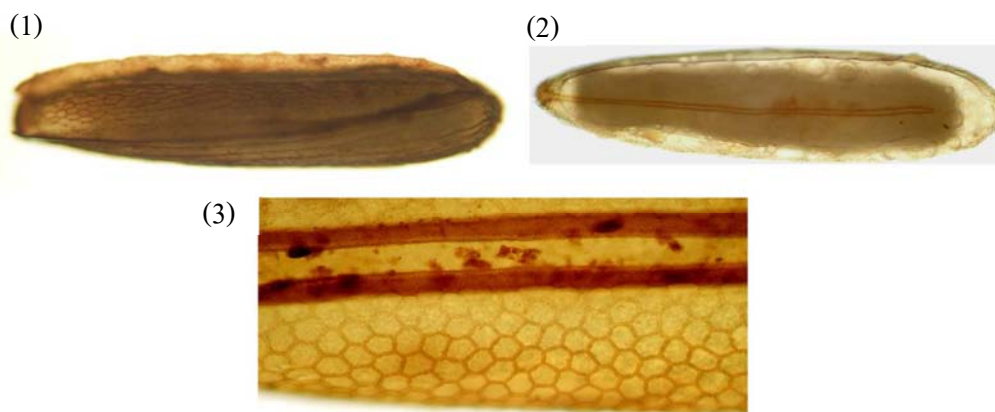


ภาพที่ 2.17 Isomegalen diagram [65]

ทั้งนี้ จะเห็นว่าการจะประมาณเวลาเสียชีวิตได้อย่างแม่นยำนั้น จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลของอุณหภูมิในสถานที่เกิดเหตุประกอบการพิจารณาด้วย เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่สัมพันธ์กับขนาดและระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาของหนอนในระยะต่างๆ โดยตรง แต่อีกประการหนึ่งที่สำคัญไม่แพ้กันคือ ความถูกต้องแม่นยำในการจำแนกสายพันธุ์ของแมลงวัน โดยเฉพาะในสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากแต่ละสายพันธุ์หรือแม้แต่สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน อาจมีวงชีพที่ความแตกต่างกันได้ [67-68] ทั้งนี้การจำแนกสายพันธุ์แมลงวันได้อย่างถูกต้องนั้น ไม่เพียงแต่ช่วยให้สามารถคะแนนค่า PMI ได้ใกล้เคียงที่สุดเท่านั้น ทว่ายังเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยในการรักษาโรคไม่เฉียบพลันซึ่งมีพยาธิสภาพที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแมลงวันที่ก่อโรค รวมถึงการใช้แมลงวันในการรักษาแผลเนื้อตายซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องอาศัยการจำแนกที่ถูกต้องเช่นกัน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการนำสายพันธุ์ที่เป็นอันตรายมาใช้ในการรักษา อนึ่งในงานปศุสัตว์ที่ประสบปัญหาแมลงวันดูดเลือดรบกวนและเป็นพาหะนำโรคสู่สัตว์เลี้ยง หนึ่งในแนวทางแก้ปัญหาคือการบูรณาการวิธีป้องกันกำจัดแมลงเหล่านี้ได้อย่างถูกวิธี ซึ่งผลลัพธ์ขึ้นกับการเข้าใจชีววิทยา วงชีพ และความจำเพาะต่อโฮสต์ของแมลงวันดูดเลือดที่มีความแตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นความแม่นยำในการจำแนกสายพันธุ์จึงเข้ามาเป็นส่วนสำคัญในการแก้ปัญหาจุดนี้ได้ด้วย [69]

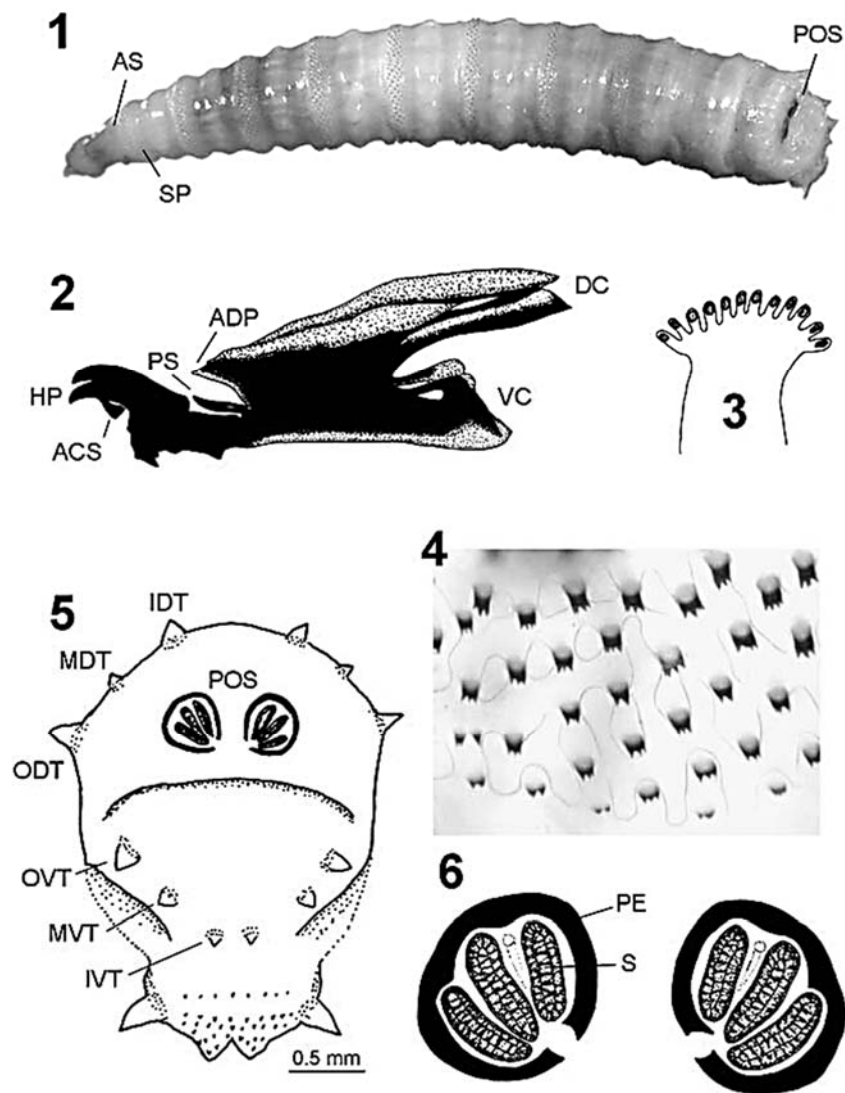
2.7 การจำแนกสายพันธุ์แมลงวันโดยใช้ลักษณะลักษณะ

ปัจจุบันการระบุสายพันธุ์แมลงวันภายใต้กล้อง light microscopy (LM) หรือแม้แต่ scanning electron microscopy (SEM) [9-10, 70-71] สามารถใช้ความรู้ทางอนุกรมวิธานจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทุกระยะ ตั้งแต่ระยะไข่ ซึ่งใช้ลักษณะและการเรียงตัวของ chorion ระยะห่างและความยาวของ plastron และ ลักษณะของ hatch line (ภาพที่ 2.3, 2.18)[6, 9-10] ในทำนองเดียวกันจะใช้ลักษณะของ cephalopharyngeal skeleton ลักษณะของ dorsal cuticular spines ระหว่าง prothorax กับ mesothorax ลักษณะของ posterior spiracle [72] จำนวน papilla บน anterior spiracle [71] ในการระบุสายพันธุ์ในระยะหนอน (ภาพที่ 2.19) ในขณะที่ระยะดักแด้จะใช้รูปร่างขนาด และลักษณะที่หลงเหลืออยู่จากหนอนวัย 3 เช่น anterior spiracle, posterior spiracle, internal cephalopharyngeal skeleton ตลอดจนหนามบนเปลือกดักแด้ ช่วยในการจำแนก [73] ส่วนตัวเต็มวัยจะระบุสายพันธุ์ตามลักษณะภายนอกเช่น หนวดและ arista ออก (thorax) ท้อง (abdomen) และเส้นปีก (wing veins) [19, 37] ซึ่งอาจใช้ตัวเต็มวัยที่เก็บจากศพหรือนำระยะไข่ หนอน หรือดักแด้มาเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยก็ได้



ภาพที่ 2.18 ลักษณะพื้นฐานของไข่ที่ใช้จำแนกสายพันธุ์แมลงวัน [6, 44]

- (1) ไข่แมลงวัน *Synthesiomyia nudiseta* แสดงเส้น plastron ที่นูนคล้ายครีบก และมีขนาดกว้างมากกว่าครึ่งของขนาดความกว้างของไข่
- (2) ไข่แมลงวัน *Chrysomya megacephala* แสดงเส้น plastron ที่แคบและยาวเกือบสุดฟองไข่
- (3) ลักษณะของ chorion ที่มีโครงร่างรูปหกเหลี่ยมต่อกันเป็นตาข่าย และมีลักษณะนูนบนไข่แมลงวัน *Chrysomya nigripes*



ภาพที่ 2.19 ลักษณะสัณฐานที่ใช้จำแนกหนอนแมลงวัน [72]

- (1) หนอนแมลงวัน *C. megacephala* ระยะ 3 แสดง Anterior spiracle (AS), Posterior spiracle (POS), Spines ระหว่าง pro- และ mesothorax (SP)
- (2) Cephalopharyngeal skeleton แสดง Hook part (HP), Dorsal cornua (DC), Ventral cornua (VC), Accessory sclerite (ACS), Parastomal sclerite (PS), Anterodorsal process (ADP)
- (3) Anterior spiracle
- (4) Dorsal cuticular spines ระหว่าง prothorax กับ mesothorax
- (5) ด้านท้าย (Posterior end) ของหนอน แสดง Inner dorsal tubercle (IDT), Middle dorsal tubercle (MDT), Outer dorsal tubercle (ODT), Inner ventral tubercle (IVT), Middle ventral tubercle (MVT), Outer ventral tubercle (OVT), Posterior spiracle (POS)
- (6) Posterior spiracle แสดง Peritreme (PE) และ slits (S)

ทั้งนี้การระบุสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงวันภายใต้กล้อง SEM ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง [74] ซึ่งถึงแม้ลดปัญหาดังกล่าวได้โดยใช้กล้อง LM แต่ก็ยังจำเป็นต้องได้ตัวอย่างที่มีความสมบูรณ์ การได้ตัวอย่างแมลงเพียงบางส่วน ซึ่งเกิดได้บ่อยกับตัวอย่างในงานนิติเวชศาสตร์ จะทำให้สามารถระบุสายพันธุ์ได้ยากขึ้นหรืออาจระบุไม่ได้เลย เนื่องจากอาจสูญเสียลักษณะเฉพาะที่ใช้ในการจำแนกชนิดไป [75] แต่ที่สำคัญยิ่งกว่าคือ ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญอย่างสูงทางด้านอนุกรมวิธาน ซึ่งข้อมูลที่มีโดยเฉพาะในระยะไข่ หนอนและคักแต่ก็ยังไม่ครอบคลุมทุกระยะของแมลงวันแต่ละสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในแต่ละพื้นที่อีกด้วย [67-68, 76] และถึงแม้จะมีการแก้ปัญหาโดยการเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยเพื่อให้ระบุสายพันธุ์ได้ง่ายและแม่นยำขึ้น แต่วิธีการดังกล่าวก็ต้องใช้เวลานานและต้องควบคุมสภาวะในการเลี้ยงให้มีความถูกต้องแม่นยำ อีกทั้งยังเสี่ยงต่อความล้มเหลวในการเลี้ยงอีกด้วย [8, 15, 63, 76]

ปัจจุบันเทคนิคด้านอณูพันธุศาสตร์ (Molecular genetics techniques) ถูกพัฒนาก้าวหน้าอย่างรวดเร็วและเข้ามามีบทบาทอย่างมากในงานที่เกี่ยวข้องกับการแพทย์โดยเฉพาะการพิสูจน์อัตลักษณ์และหลักฐานในงานนิติเวชศาสตร์ ซึ่งรวมถึงการระบุสายพันธุ์ของแมลงวันในงานอาชญากรรมนิติวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ รวดเร็ว แม่นยำ และมีความไวสูง กล่าวคือ สามารถระบุสายพันธุ์ได้จากชิ้นส่วนอวัยวะของแมลงวันที่ไม่สมบูรณ์หรือมีปริมาณเพียงเล็กน้อย [15] เป็นผลให้สามารถลดปัญหาจากการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยาดังกล่าวข้างต้นลงได้

2.8 การบูรณาการความรู้ด้านอณูพันธุศาสตร์เพื่อการจำแนกสายพันธุ์แมลงวัน

เทคนิคด้านอณูพันธุศาสตร์ที่ถูกนำมาบูรณาการเพื่อใช้จำแนกสายพันธุ์แมลงประกอบด้วยหลายเทคนิค ทั้งนี้ส่วนใหญ่จะเริ่มจากการได้มาซึ่ง DNA ของตัวอย่างที่ต้องการระบุสายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของบริเวณ DNA ที่ต้องการศึกษาด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนนี้จะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและมีประสิทธิภาพ เช่น เทคนิคการผสมผสานระหว่างการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ DNA (DNA sequencing techniques) กับวิชาชีวสารสนเทศ และเทคนิค PCR-RFLP [77-78]

2.8.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรีย พืช และสัตว์ อาจมีรายละเอียดแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ทั้งนี้ยังตั้งอยู่บนพื้นฐานหลัก คือ การทำให้เซลล์แตกด้วยเอนไซม์หรือด้วยวิธีการบดตัวอย่างที่แช่แข็ง จากนั้นจึงแยกองค์ประกอบอื่นๆออกจากดีเอ็นเอ แล้วจึงทำให้ดีเอ็นเอเข้มข้นขึ้น [79] ทั้งนี้คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำมาสกัด

ซึ่งวิธีการที่ให้ผลในการสกัดดีเอ็นเอจากแมลงวันที่ดีที่สุดคือการเก็บรักษาด้วย 70-100% ethanol หรือการทำให้ตัวอย่างแห้งสนิท ซึ่งวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างด้วยวิธีเหล่านี้สามารถเก็บรักษาตัวอย่างไว้นานถึงหนึ่งปีโดยที่ DNA ยังคงสภาพคืออยู่ แต่การใช้ ethylacetate หรือ formaldehyde นำตัวอย่างแมลงวันหรือใช้เก็บรักษาตัวอย่าง อาจเป็นการทำลายดีเอ็นเอได้ [65] ทั้งนี้การสกัด DNA มีอยู่หลายวิธี เช่น phenol/choloform extraction, CTAB extraction, Chelex extraction และการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากบริษัทผู้ผลิตต่างๆ [63]

2.8.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR

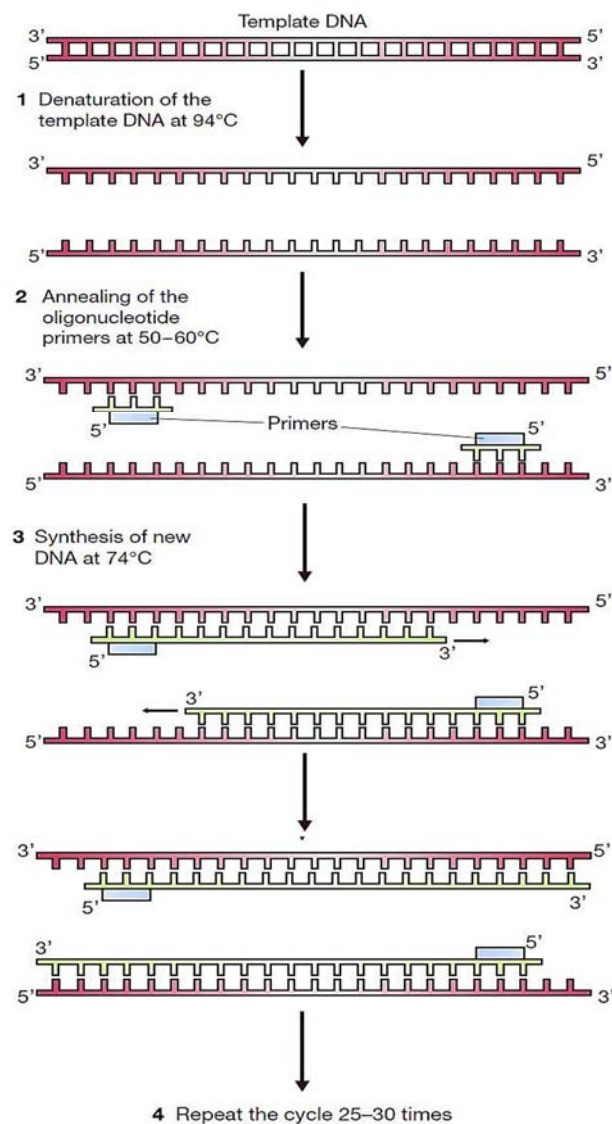
ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยอาศัยหลักการที่ว่า DNA สายคู่สามารถจับเข้าคู่กันได้เพราะชนิดของเบสคู่สม (complementary; A=T, G=C) และมีเอนไซม์ DNA polymerase ช่วยทำให้สาย DNA ขาวออกไปด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP) จึงเลียนแบบหลักการดังกล่าวเพื่อสังเคราะห์สาย DNA ขึ้นใหม่ในหลอดทดลองโดยอาศัยสาย DNA เป็นต้นแบบ (template) และใช้ DNA สายสั้นๆ (primer) ที่สามารถจับกับ DNA ต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสม ก็จะได้ DNA สายใหม่ขึ้น และหากทำปฏิกิริยาซ้ำหลายรอบก็จะได้ปริมาณของยีนที่เราสนใจเพิ่มมากขึ้นไปด้วย ซึ่งปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ [79]

- Denaturation: ทำลายพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds) ระหว่าง DNA สายคู่ด้วยอุณหภูมิ 94°C เพื่อให้กลายเป็น DNA สายเดี่ยวและพร้อมเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

- Annealing: ลดอุณหภูมิเหลือ 50–60 °C ซึ่งที่อุณหภูมินี้จะทำให้ DNA สายเดี่ยวทั้งสองเส้นกลับมาเข้าคู่กันอีกครั้ง แต่เนื่องจากในสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยามีไพรเมอร์ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นกว่าและเป็นคู่สมกับสาย DNA สายเดี่ยวทั้งคู่ โอกาสที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับ DNA สายเดี่ยวจึงมีมากกว่า

- Synthesis: เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 74°C ซึ่งอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งจะเข้าไปจับที่ปลายของไพรเมอร์แต่ละเส้นและเริ่มสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์สายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ดังกล่าว นิวคลีโอไทด์สายใหม่ที่ได้จะเป็นคู่สมกับสาย DNA ต้นแบบ

จากขั้นตอนดังกล่าว พบว่าหากเริ่มจากสาย DNA ต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่หนึ่ง จะได้ DNA สายคู่จำนวน 2 เส้น เมื่อทำปฏิกิริยารวนซ้ำ denaturation-annealing-synthesis ไปเรื่อยๆ DNA ที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบ โดยเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณตามสมการ 2^{n+1} เมื่อ n คือจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนั้นหากทำปฏิกิริยาครบ 30 รอบก็จะได้ DNA สายคู่จำนวนกว่า 1300 ล้านเส้นต่อ DNA สายคู่ต้นแบบเพียงเส้นเดียว ลักษณะการเกิดปฏิกิริยา PCR แสดงดังภาพที่

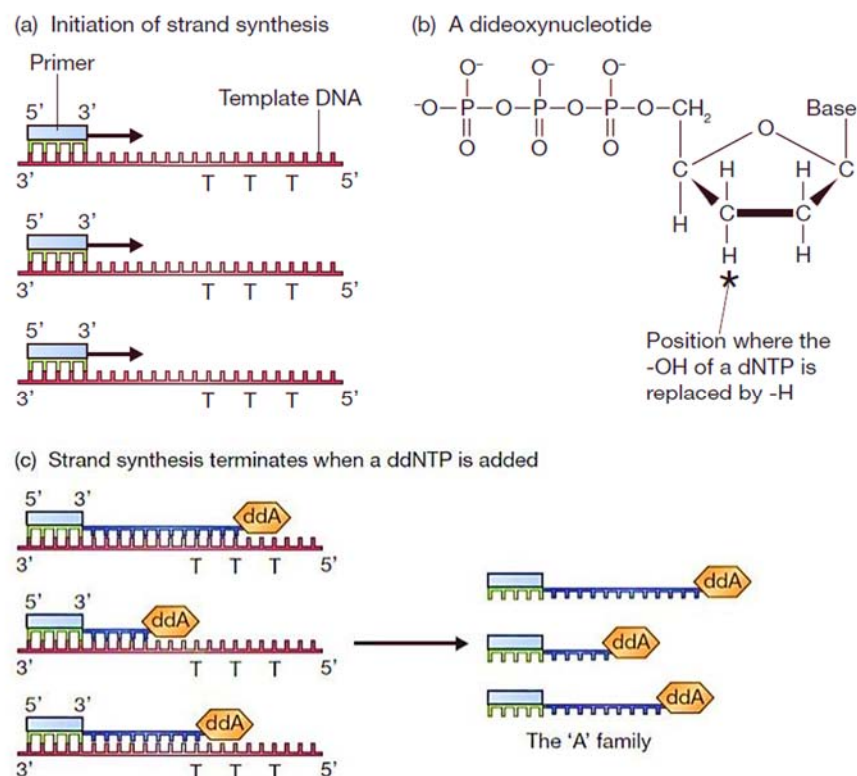


ภาพที่ 2.20 ปฏิกริยาลูกโซ่ PCR (polymerase chain reaction) [79]

2.8.3 เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

DNA sequence คือลำดับการเรียงตัวของไนโตรจีนัสเบส 4 ชนิดที่แตกต่างกันคือ Adenine (A), Guanine (G), Cytosine (C) และ Thymine (T) ประกอบขึ้นเป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) บนจีโนมของเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอต พบว่าลำดับการเรียงตัวของเบสดังกล่าวจะมีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์สามารถนำมาจำแนกสายพันธุ์ได้ ซึ่งเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีด้วยกันหลากหลายวิธี แต่ที่ได้รับความนิยมคือวิธี chain termination ที่ถูกคิดค้นโดย Fred Sanger และคณะในช่วงกลางปี 1970 โดยอาศัยพื้นฐานที่ว่าสายนิวคลีโอไทด์ขนาดต่างๆ ที่แตกต่างกันเพียงแค่เบสเดียวสามารถแยกจากกันได้ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis

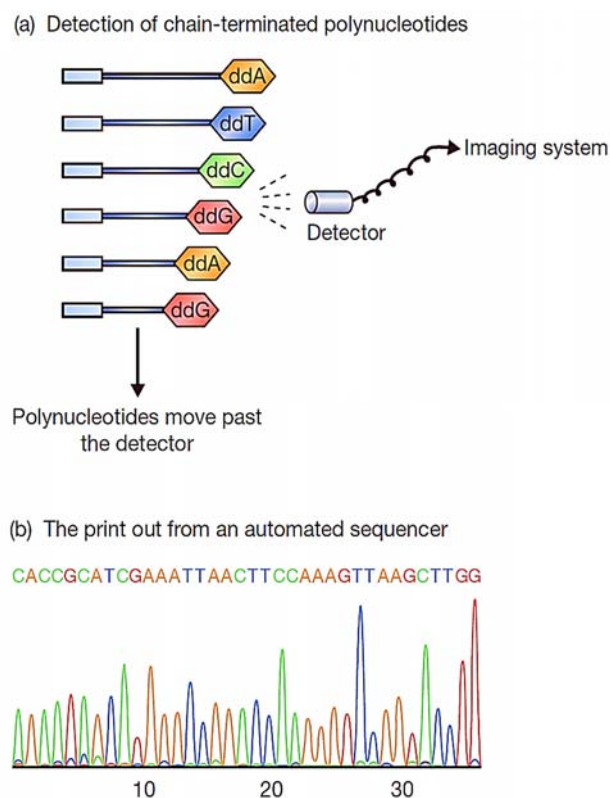
ปฏิกิริยาที่ใช้ในวิธีนี้อยู่บนพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR โดยจะทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทีละชนิด (A, G, C หรือ T) แล้วจึงนำผลมาประมวลรวมกัน เริ่มจากการเตรียมให้ดีเอ็นเอสายคู่กลายเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน (denature) แล้วจึงกระตุ้นให้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ถูกออกแบบมาให้จับแบบจำเพาะในบริเวณเดียวกันบนสาย DNA ต้นแบบโดยให้ปลาย 3' อยู่ใกล้กับ DNA ที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สุด จากนั้น DNA polymerase เริ่มสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ให้ยาวออกไปเรื่อยๆ โดยใช้สารตั้งต้นที่เป็น deoxyribonucleotide triphosphates 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ที่เติมลงไปในแต่ละหลอดในปริมาณที่เพียงพอ ซึ่งปฏิกิริยาควรจะดำเนินไปจนสายนิวคลีโอไทด์ยาวออกไปเรื่อยๆ เหมือนในปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR แต่วิธีนี้จะเติม dideoxynucleotide 4 ชนิด (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) ที่ถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ต่างๆ ลงไปให้เพียงพอในแต่ละหลอดๆ ละ 1 ชนิด เพื่อทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไทด์จบการสังเคราะห์ (chain terminator) เนื่องจากที่ปลาย 3' ของ dideoxynucleotide มี -H แทน -OH ดังนั้น หาก DNA polymerase ดึง dideoxynucleotide เข้ามาแทน deoxyribonucleotide การสังเคราะห์ก็จะหยุดเพราะขาดปลาย 3'-OH ที่จะเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์กับปลาย 5'-phosphate ของ deoxyribonucleotide ตัวต่อไป (ภาพที่ 2.21)



ภาพที่ 2.21 Chain termination DNA sequencing แสดงการเริ่มต้นสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ (a), dideoxynucleotide (b) และการหยุดการสังเคราะห์หลังจากถูกเติม ddNTP (c) [79]

หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดต่างๆกัน ขึ้นอยู่กับว่า DNA polymerase จะถูกหยุดการสังเคราะห์ที่นิวคลีโอไทด์ตัวใดในสายนั้น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำได้จากการตรวจสอบ dideoxynucleotide ที่ปลายของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยนำผลิตภัณฑ์ทั้งหมดจากทั้ง 4 หลอดไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในช่องเดียวกันบนอะกาโรสเจล ด้วยเหตุที่ dideoxynucleotide แต่ละตัวจะมีสีฟลูออเรสเซนต์ที่ต่างกันติดอยู่ และชิ้น DNA ที่ได้มีขนาดไม่เท่ากันจึงเคลื่อนที่ไปบนแผ่นเจลได้ไม่เท่ากัน สายที่สั้นที่สุดจะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุดและเคลื่อนลงมาจนถึงตำแหน่งที่เครื่องมืออ่านผลได้ก่อน เครื่องจะอ่านสีฟลูออเรสเซนต์จากแถบ DNA บนแผ่นเจล และแปลผลออกมาเป็นนิวคลีโอไทด์ตามลำดับที่ติดติดติดไว้ ผลรวมทั้งหมดที่ได้จะวิเคราะห์ออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (ภาพที่ 2.22)

วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สามารถศึกษาได้ทั้งใน genomic DNA และ cDNA รวมถึง mitochondrial DNA ทั้งในยีนส่วนที่ถอดรหัสได้ (coding region) และที่ไม่ถอดรหัส (non-coding region) อีกทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาอนุกรมวิธาน (taxonomy) และการศึกษาทางพันธุกรรมประชากรศาสตร์ (population genetics) ได้ด้วย [79]



ภาพที่ 2.22 การอ่านผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี chain termination

แสดงการตรวจวัดสีฟลูออเรสเซนต์ที่ปลายสายนิวคลีโอไทด์ (a), ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลผลได้จากเครื่อง automated sequencer (b) [79]

2.8.4 เทคนิค PCR-RFLP

เทคนิค RFLP ตั้งอยู่บนพื้นฐานที่ว่า ความผิดพลาดจากการจำลองตัวเองของโมเลกุล DNA อันอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมหรือความผิดพลาดในการทำงานของเซลล์เอง ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลง และถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลาน เป็นผลให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งหากนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านั้นมาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) ที่แต่ละชนิดมีคุณสมบัติพิเศษเฉพาะตัวที่สามารถตัด DNA เฉพาะบริเวณที่จำเพาะเท่านั้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะมีขนาดคงที่เสมอ ทำให้สามารถระบุสายพันธุ์ได้โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่ตัดได้กับขนาดของชิ้นส่วน DNA อ้างอิงที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และอ่านผลการเปรียบเทียบขนาดชิ้น DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ปัจจุบันพบว่าหากในขั้นตอนการเตรียม DNA เพื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี RFLP มีการนำ DNA มาเพิ่มปริมาณเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มากขึ้นภายใต้ปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ก่อน จะเรียกเทคนิค RFLP ลักษณะนี้ว่า PCR-RFLP [80]

2.9 ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics)

ชีวสารสนเทศศาสตร์ ตรงกับภาษาอังกฤษว่า Bioinformatics ซึ่งเป็นคำย่อของคำว่า molecular bioinformatics ที่เกิดจากการสนธิระหว่างคำว่า molecular biology (อณูชีววิทยา) กับ informatics (สารสนเทศศาสตร์) เป็นศาสตร์ที่บูรณาการความรู้จากหลายแขนง เช่น ชีววิทยา วิทยาการคอมพิวเตอร์ คณิตศาสตร์ประยุกต์ สถิติ และสารสนเทศศาสตร์ เพื่อจัดเก็บข้อมูลทางชีววิทยาของชีวโมเลกุลให้เป็นระบบ และสามารถเชื่อมโยงเป็นเครือข่ายสำหรับสืบค้นข้อมูล เทียบเคียงกับฐานข้อมูลออนไลน์ได้ ซึ่งข้อมูลส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับข้อมูลทางพันธุศาสตร์หรือรหัสพันธุกรรม เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA RNA และลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นโปรตีน เป็นต้น [81]

ลักษณะการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น การจัดจำแนกชื่อหรือสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา โดยการใช้โปรแกรม BLAST ซึ่งเข้าถึงได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST> เทียบเคียงความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ กับฐานข้อมูลบนเครือข่ายออนไลน์ที่เปิดให้ใช้งานทั่วโลก เช่น GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) ที่เป็นระบบฐานข้อมูลที่ใช้จัดเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใต้การจัดการของ NCBI ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

ทั้งนี้ชีวสารสนเทศศาสตร์ยังรวมถึงการพัฒนาโปรแกรมต่างๆ เพื่อใช้วิเคราะห์ทางชีววิทยาด้านต่างๆ เช่น โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) ที่ใช้เปรียบเทียบความเหมือนของสายดีเอ็นเอหรือโปรตีนหลายๆ เส้นพร้อมกัน โปรแกรมที่ใช้สำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้

พันธุกรรม เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและจัดจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น

2.10 เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิควิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรกคือ noncoding DNA เป็นบริเวณที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นฟีโนไทป์ ซึ่งบริเวณนี้พบกระจายอยู่บนสาย DNA หรือกัณอยู่ระหว่างยีนต่างๆ ได้แก่บริเวณที่เป็น centromere, telomere, transportable elements และ spacer DNA ส่วนบริเวณที่สองคือ coding DNA เป็นบริเวณที่จะถูกถอดรหัส (transcription) เป็น RNA (ribonucleic acid) และ/หรือแปลรหัส (translation) เป็น โปรตีน เรียกบริเวณดังกล่าวว่ายีน (gene) [82] บริเวณดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ในการระบุสายพันธุ์ได้ โดยบริเวณของยีนที่ใช้ในการระบุสายพันธุ์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีทั้งยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA; cpDNA), บนดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA; nrDNA) และไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA; mtDNA) [83]

2.10.1 ยีนบนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA gene; mtDNA gene)

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลขนาดเล็กพบอยู่ในไซโทพลาสต์ของเซลล์นั้น ออร์แกเนลนี้ช่วยสร้าง ATP ในกระบวนการ oxidative phosphorylation โดยใช้เอนไซม์เชิงซ้อนคือ cytochromes ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ cytochrome *c* oxidase ที่มี 3 subunits เอนไซม์นี้พบที่ผนังด้านในของไมโทคอนเดรียและเป็นเอนไซม์ลำดับที่ 3 และสุดท้ายที่รับและส่งต่ออิเล็กตรอนจากกระบวนการ mitochondrial oxidative phosphorylation

ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียของแมลงมีลักษณะเป็นวงสายคู่ (double-strand circular genome) ขนาดประมาณ 16,000 bp สามารถถอดรหัสให้ยีนทั้งหมด 37 ยีน โดยที่ 22 ยีนถอดรหัสเป็น rRNA อีก 2 ยีนถอดรหัสเป็น tRNA และที่เหลืออีก 13 ยีนถอดรหัสเป็นโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนที่ใช้ในกระบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมี 5 ชนิด คือ NADH-ubiquinone oxidoreductase, Succinate-ubiquinone oxidoreductase, Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase, Cytochrome oxidase และ ATP synthase ยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน NADH-ubiquinone oxidoreductase มีทั้งหมด 7 ยีน ได้แก่ ยีน ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 และ ND6 ยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase มียีนเดียวคือ ยีน *cytb* ยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน Cytochrome oxidase มีจำนวน 3 ยีน คือ ยีน COI, COII และ COIII และยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน ATP synthase ได้แก่ ยีน ATP6 และ ATP8 [84]

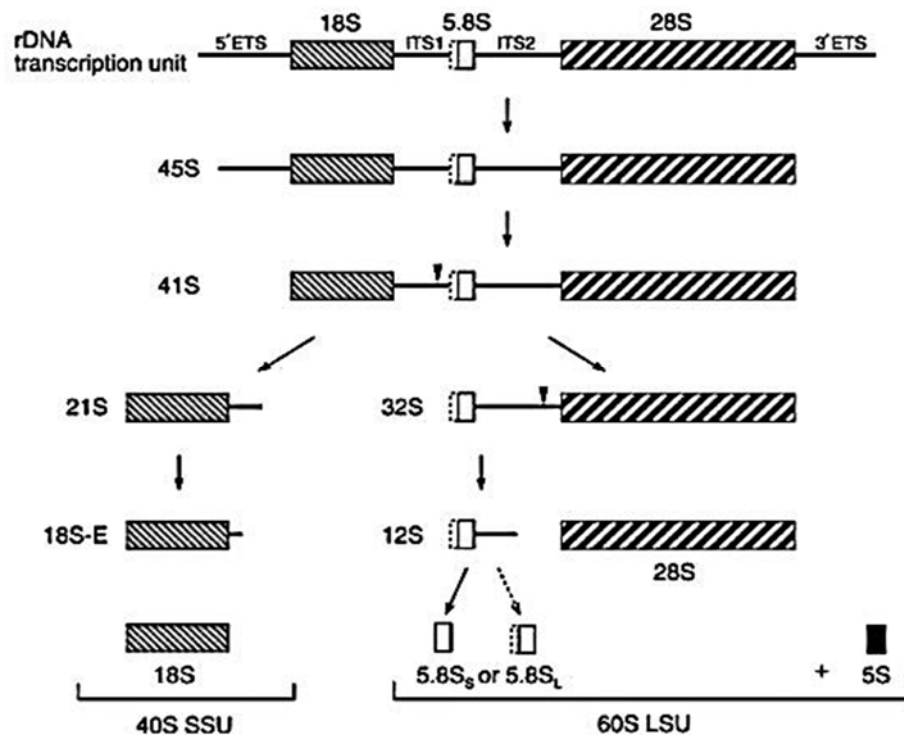
ในการจำแนกชนิดของแมลงพบว่าบริเวณของยีนบน mtDNA ที่นิยมนำมาใช้ระบุสายพันธุ์ เช่น ND5, cytb, COI, COII, 12S rDNA และ 16S rDNA [26, 63, 68, 75, 77, 83, 85-87] ซึ่งถึงแม้ mtDNA จะสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีชีวิตทุกๆ เซลล์ของร่างกาย และมีจำนวน copies ต่อเซลล์อยู่ในหลักพัน ขณะที่ดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีเพียง 2 copies ต่อหนึ่ง somatic cell และเนื่องจากไม่มี repairing system จึงมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าใน nrDNA ประมาณ 10-20 เท่า [88] เป็นเหตุให้สามารถสะสมการกลายพันธุ์ใหม่ๆ ได้มากกว่าประมาณ 10 เท่าตัวตามไปด้วย แต่การใช้ mtDNA เพื่อจำแนกสายพันธุ์และศึกษาวิวัฒนาการก็มีข้อจำกัดบางประการ เช่น จีโนมไมโทคอนเดรียมีขนาดเล็กเพียงร้อยละ 0.00006 ของจีโนมในนิวเคลียสเท่านั้น ซึ่งเป็นตัวแทนได้ไม่ดีสำหรับวิวัฒนาการ โดยภาพรวม [89] และด้วยเหตุที่ไม่มี repairing system จึงทำให้ลำดับ DNA เปลี่ยนแปลงได้ง่ายและมีโอกาสเกิดความแตกต่างภายในสายพันธุ์เพิ่มขึ้นทำให้การจำแนกสายพันธุ์อาจผิดพลาดได้ ทั้งนี้ขนาดของยีนบน mtDNA ยังมีขนาดใหญ่ทำให้การเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคอนุพันธุศาสตร์ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค sequencing เป็นไปได้ยากและมีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย [83] การทดลองนี้จึงเลือกใช้ยีนบน nrDNA เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการระบุสายพันธุ์ของแมลงวัน

2.10.2 ยีนบนดีเอ็นเอของนิวเคลียส (Nuclear DNA gene; nrDNA gene)

ในนิวเคลียสจีโนม กระบวนการถอดรหัส DNA เป็น RNA เพื่อสร้างโปรตีน จะได้โมเลกุล RNA ที่จำเป็น 3 ชนิดได้แก่ 1) messenger RNA (mRNA) ซึ่งจะถูกแปลรหัสได้โปรตีน 2) transfer RNA (tRNA) เป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการนำกรดอะมิโนมาส่งให้ mRNA เพื่อสร้างสายโพลีเปปไทด์หรือโปรตีน และ 3) ribosomal RNA (rRNA) เป็นองค์ประกอบสำคัญของไรโบโซมซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแปลรหัส DNA เป็นโปรตีน โดยโมเลกุลทั้ง 3 ชนิดถูกสร้างมาจากยีนบน DNA แม่แบบ (DNA template) คือ mRNA genes, tRNA genes และ rRNA genes ตามลำดับ

rRNA genes คือยีนที่จะถูกถอดรหัสเป็นโมเลกุล rRNA แล้วรวมกับโปรตีนกลายเป็นไรโบโซมขนาดต่างๆ ยีนดังกล่าวสามารถพบได้มากมายในจีโนมของยูคาริโอตทุกชนิด เนื่องจากเป็น multicopy gene family ที่มีอยู่ทุกที่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต [90] พบว่า rRNA genes จะมีความแปรปรวนสูงระหว่างสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน แต่มีความยาวและลำดับเบสเหมือนกันภายในสายพันธุ์เดียวกัน (closely related species) ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องมือทางพันธุกรรมที่ดี ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ โดยเฉพาะในชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก [91]

โดยปกติ rRNA genes จะอยู่เป็นกลุ่มเรียกว่า rRNA transcription unit เรียงต่อกันซ้ำๆ (tandem repeat) กระจายอยู่ทั่วไปใน nuclear genome ในยูคาริโอตจะมีตั้งแต่ 50-500 ชุด แต่ละหน่วยถูกแยกจากกันด้วย intergenic spacer (IGS) ซึ่ง rRNA transcription unit แต่ละหน่วยประกอบด้วยยีน 18S, 5.8S และ 28S rRNA เรียงต่อกันจากด้าน 5' end ไป 3' end นอกจากนี้ยังมียีน 5S rRNA อยู่เป็นยีนเดี่ยวๆ แยกไปอยู่ในตำแหน่งอื่นบนโครโมโซม ทั้งนี้การเรียงตัวของยีนทั้ง 3 ยีนแต่ละยีนจะถูกคั่นด้วย spacer ประกอบด้วย internal transcribed spacer (ITS) ได้แก่ ITS1 กับ ITS2 และ external transcribed spacer (ETS) อีก 2 บริเวณ ทำให้การเรียงตัวของ rRNA transcription unit เป็นดังนี้ ETS-18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S-ETS [92] พบว่าทั้งยีนและ spacer ทั้งหมดจะถูกถอดรหัส (transcription) ออกมาพร้อมกัน แต่ส่วนของ spacer จะถูกตัดออกจาก rRNA precursor molecule เมื่อเกิดการ splicing ให้เป็น rRNA ขนาดต่างๆ ดังนั้นบริเวณ ITS นี้จึงไม่ได้มีผลต่อการทำงานของเซลล์ ทำให้เกิดการอนุรักษ์ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงตามการวิวัฒนาการ และมีความผันแปร (diverse) ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดสูง [93] ด้วยเหตุนี้บริเวณ ITS ของ rRNA genes จึงเป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตมากกว่ายีนชนิดอื่นๆ บนจีโนมของนิวเคลียส เนื่องจากยีนที่เหลือนั้นเป็น single copy ยีนที่สามารถเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ได้ยาก [94] โครงสร้างอย่างละเอียดของ rRNA transcription unit แสดงดังภาพที่ 2.23



ภาพที่ 2.23 Ribosomal RNA transcription unit [95]

ในปัจจุบันถึงแม้จะมีการใช้บริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลสำหรับจำแนกสายพันธุ์และศึกษาวิวัฒนาการอย่างแพร่หลาย แต่พบว่าการใช้บริเวณ ITS ทั้งหมดมีความยากต่อการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดใหญ่ ทั้งยังทำให้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีโอกาสผิดพลาดเพิ่มขึ้น ด้วยการเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบางช่วงในบริเวณ ITS จึงถูกนำมาพิจารณา โดยพบว่าบริเวณ ITS1 มีความหลากหลายพอที่จะสามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ได้ แต่กลับเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ได้ยาก ส่วนบริเวณ 5.8S gene พบว่ามีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ค่อนข้างต่ำ บริเวณ ITS2 เป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์มากที่สุดเพราะนอกจากจะมีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์แล้ว ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังมีขนาดค่อนข้างสั้นเพียงประมาณ 300-500 bp ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR อันเป็นผลดีในงานอาชญานิติภูมิวิทยา ซึ่งมักจะพบตัวอย่างที่ไม่สมบูรณ์หรือมีดีเอ็นเอที่เริ่มเสื่อมสภาพ [96-98]

การทดลองนี้จึงเลือกใช้บริเวณ ITS2 ในการจำแนกสายพันธุ์แมลงวันบางสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย เพื่อลดปัญหาในการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในงานด้านอาชญานิติภูมิวิทยา งานปศุสัตว์ การวินิจฉัยโรคไมเอียซิส รวมถึงการใช้หนอนบำบัด และงานด้านอื่นๆ ต่อไป

2.11 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจำแนกสายพันธุ์แมลงวัน ได้ถูกต้องแม่นยำ เป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยในการเฝ้าระวังรวมทั้งการรักษาโรคไมเอียซิสซึ่งมีพยาธิสภาพที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแมลงวันที่ก่อโรค ทั้งนี้ยังช่วยลดความเสียหาย และโอกาสเกิดโรคจากแมลงวันคอกสัตว์กับอุตสาหกรรมปศุสัตว์ได้ด้วย เนื่องจากแมลงวันดูดเลือดแต่ละสายพันธุ์มีพฤติกรรมและชีววิทยาที่แตกต่างกัน การทราบสายพันธุ์จะช่วยให้สามารถป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้อง แม้กระทั่งการใช้แมลงวันรักษาแผลเนื้องอกก็จำเป็นต้องอาศัยการจำแนกที่ถูกต้อง เพื่อป้องกันการนำสายพันธุ์ที่เป็นอันตรายมาใช้ในการรักษา ทั้งนี้การประเมินหลักฐานทางนิติภูมิวิทยายบนพื้นฐานที่ต้องอาศัยข้อมูลการพัฒนาของวงชีพแมลงวัน ปัจจัยหลักที่จะทำให้สามารถประเมินค่าได้ใกล้เคียงที่สุดคือการระบุสายพันธุ์ได้ถูกต้องเช่นกัน

การอาศัยสัณฐานวิทยาจำเป็นต้องใช้ความเชี่ยวชาญสูงจึงจะสามารถแยกสายพันธุ์แมลงวัน ที่ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ โดยเฉพาะในระยะตัวอ่อน ซึ่งถึงแม้จะสามารถเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยเพื่อให้จำแนกได้ง่ายขึ้นแต่ก็ต้องใช้เวลานาน และเสี่ยงต่อการล้มเหลว เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยระบุสายพันธุ์ในปัจจุบัน เทคนิคหนึ่งที่ได้รับความนิยมคือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ซึ่งยีนที่ได้รับความนิยมคือ ยีน COI บน mtDNA ทว่ายีนดังกล่าวมี

ขนาดใหญ่ทำให้การเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคอนุพันธุศาสตร์ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค sequencing เป็นไปได้ยากและมีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย บริเวณ ITS2 บน mtDNA เป็นจึงอีกหนี่งทางเลือกในฐานะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้จำแนกสายพันธุ์ที่สำคัญในปัจจุบัน

การใช้บริเวณ ITS2 จำแนกสายพันธุ์แมลงวันพบว่ามีการศึกษาในแมลงวันหลายกลุ่มจากหลากหลายที่ในโลก เช่น ในประเทศจีน Song et al. [99] ใช้บริเวณ ITS2 จำแนกสายพันธุ์แมลงวันในวงศ์ Sarcophagidae, Calliphoridae และ Muscidae รวมทั้งสิ้น 55 สายพันธุ์พบว่า ITS2 สามารถแยกแมลงวันในแต่ละวงศ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้ยังสามารถแยกแมลงวันภายในวงศ์ Sarcophagidae ออกจากกันได้ดีอีกด้วย และถึงแม้จะเกิดการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในแมลงวัน *M. domestica* แต่ก็ยังจัดอยู่ใน clade เดียวกันและแยกอย่างชัดเจนจากสายพันธุ์ใกล้เคียง นอกจากนี้ Nelson et al. [100] ยังใช้ ITS2 ในการจำแนกสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียวในออสเตรเลียที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกันจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chrysomya flavifrons*, *Chrysomya latifrons*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya saffrana*, *Chrysomya semimetallica*, *Chrysomya varipes* และ *Chrysomya incisuralis* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ตั้งแต่ 0.23% ถึง 11.82% แต่ทั้งนี้ยังสามารถแยกสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันที่สุด (*Chrysomya latifrons* กับ *Chrysomya semimetallica*) ออกจากกันได้ชัดเจน ในแมลงวันกลุ่มอื่นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ยังสามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ black flies (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทยจำนวน 40 สายพันธุ์ ในจิ้นัส *Simulium* ออกจากกันได้สมบูรณ์อีกด้วย [101]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างทดลอง

3.1.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย

ตัวอย่างดีเอ็นเอแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ที่อยู่ในวงศ์ Sarcophagidae Calliphoridae และ Muscidae จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย คือ ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดหนองคาย และนครราชสีมา ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนนทบุรี และกรุงเทพมหานคร ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระนอง และภูเก็ต (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

3.1.2 การเก็บตัวอย่าง ขนาดของประชากร และการจำแนกสายพันธุ์ด้วยสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วยแมลงวันระยะตัวเต็มวัยและหนอนวัย 3 จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย โดยที่ตัวอย่างแมลงวันตัวเต็มวัย ถูกเก็บโดยใช้ดักบดเป็นเหยื่อล่อระยะหนอนได้รับตัวอย่างจาก ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ในขณะที่ตัวอย่างแมลงวันคอกสัตว์ (*Stomoxys* spp.) ถูกเก็บโดย ดร. Hitoshi Sasaki จากบริเวณฟาร์มปศุสัตว์โดยใช้กับดักล่อด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างทั้งหมดถูกกำหนดรหัสและถูกจำแนกสายพันธุ์ด้วยสัณฐานวิทยาโดยผู้เชี่ยวชาญทางด้านกีฏวิทยา และยืนยันผลโดยภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ตารางที่ 4.1)

ตัวอย่างถูกเก็บแยกใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละหนึ่งตัว และรักษาสภาพสัณฐานและดีเอ็นเอของตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 70% [65] ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำไปใช้ทดลองขั้นต่อไป

3.2 เครื่องมือ

- 3.2.1 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C (รุ่น LG ของบริษัท LG[®] ประเทศไทย), -20 °C (รุ่น Whirlpool ของบริษัท Sanyo[®] ประเทศไทย) และ -80 °C (รุ่น Thermo Scientific 995 ของบริษัท Becthai[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น Eppendorf Centrifuge 5417R ของบริษัท Eppendorf[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.3 Dry bath incubator (รุ่น MD-02N-220 ของบริษัท Cleaver Scientific[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.4 เครื่อง Spectrophotometer (รุ่น NanoDrop 1000 spectrophotometer ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.5 เครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (รุ่น GeneAmp PCR system 2400 ของบริษัท Applied Biosystems[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.6 เครื่อง electrophoresis (รุ่น Sub-Cell GT ของบริษัท Bio-Rad[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.7 เครื่องรันเจล PAGE (รุ่น MiniProtein 3 cell ของบริษัท Bio-Rad[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.8 เครื่องถ่ายภาพเจล (รุ่น Gel Doc[™] XR ของบริษัท Bio-Rad[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.9 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น Orbital Incushaker ของบริษัท Labec[®] ประเทศออสเตรเลีย)

- 3.2.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- 3.2.11 เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ชนิด 2 และ 4 ตำแหน่ง
- 3.2.12 ตู้ไมโครเวฟ (รุ่น Intellowave ของบริษัท LG[®] ประเทศไทย)
- 3.2.13 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (ของบริษัท Becthai[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.2.14 เครื่องผสมสาร (vortex)
- 3.2.15 กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope (รุ่น SZX9 ของบริษัท Olympus[®] ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.2.16 เครื่องคอมพิวเตอร์ พร้อมโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ผล
- 3.2.17 ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (Automatic adjustable micropipette ของบริษัท GIBTHAI) ขนาด 0.5-1.0, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร พร้อมปิเปตต์ทิว (pipette tip)

3.3 วัสดุอุปกรณ์

- 3.3.1 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- 3.3.2 ปากคีบ (forceps)
- 3.3.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.3.4 แท่งบดตัวอย่าง
- 3.3.5 เข็มเย็บเยื่อ (Needle) และ spreader
- 3.3.6 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 3.3.7 หลอด flacon tube ขนาด 15 ml และ 50 ml
- 3.3.8 นาฬิกาจับเวลา (Digital Timer)
- 3.3.9 ถุงมือยาง (Disposable gloves)

3.4 สารเคมี

- 3.4.1 ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับสกัด genomic DNA (ชุด Invisorb[®] Spin tissue mini Kit ของบริษัท Invitex ประเทศเยอรมันนี)
- 3.4.2 ชุดโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์เรสโดยใช้เวกเตอร์ pTZ57R/T (ชุด InsTAclone[™] PCR cloning kit ของบริษัท Fermentas[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.4.3 ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับสกัดพลาสมิด (ชุด FastPlasmid[™] Mini kit ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมันนี)
- 3.4.4 ชุดสารเคมีที่ใช้ในการย่อยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ *DraI* และเอนไซม์ *PsiI* (ของบริษัท Fermentas[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.4.5 Competent *E. coli* cells

- 3.4.6 สารเคมีสำหรับใช้ทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)
- 3.4.7 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน
- 3.4.8 สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis
- 3.4.9 สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยวิธี PAGE
- 3.4.10 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lueria-Bertani (LB) broth, LB agar, SOB และ SOC solution
- 3.4.11 Ethanol ความเข้มข้น 70%

หมายเหตุ : รายละเอียดพร้อมวิธีเตรียมแสดงไว้ในภาคผนวก ก

3.5 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

- 3.5.1 BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 บนระบบปฏิบัติการวินโดวส์ ใช้สำหรับอ่านกราฟ electropherograms ที่ได้จากการ sequencing รวมถึงเปรียบเทียบสายนิวคลีโอไทด์หลายสายในครั้งเดียวด้วยแอปพลิเคชัน Clustal W version 2.0 และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific divergence) และระหว่างสายพันธุ์ (interspecific divergence) ด้วย mode Sequence Identity Matrix
- 3.5.2 BLASTN 2.2.26+ (Basic Local Alignment Search Tools) โปรแกรมออนไลน์ใช้ตรวจสอบความเหมือนหรือซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank เข้าใช้งานได้ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd
- 3.5.3 BankIt โปรแกรมออนไลน์ใช้สำหรับเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าในฐานข้อมูล GenBank เข้าใช้งานได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>
- 3.5.4 MEGA 4.0.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software version 4.0.2) ใช้วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ สามารถดาวน์โหลดมาใช้งานโดยไม่เสียค่าใช้จ่ายได้ที่ <http://www.megasoftware.net/> [102]
- 3.5.5 โปรแกรม NEBcutter V2.0 ใช้หาคำแหน่งตัดและทำนายขนาดของนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โปรแกรมนี้สามารถเข้าใช้งานได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายที่ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

3.6 การดำเนินการวิจัย

3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

เป็นการสกัด genomic DNA จากตัวอย่างแมลงวัน และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดไปวัดหาปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.6.1.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ ชุดทดสอบสำเร็จรูป Invisorb® Spin tissue mini Kit ของบริษัท Invitex ประเทศเยอรมันนี

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันแยกเป็นตัวเดี่ยว โดยทำตามขั้นตอนและคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ ตัวอย่างแมลงวันระยะตัวเต็มวัย ใช้ใบมีดตัดอวัยวะส่วนอื่นทิ้งเหลือเฉพาะอก ระยะหนอนใช้หนอนทั้งตัว ใส่ตัวอย่างที่เตรียมได้ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม lysis buffer G 400 µl แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไม้บด จากนั้นจึงเติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 40 µl ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาปั่นแยกเอาตะกอนทิ้งที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เติม binding buffer T 200 µl แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นกรองเอาแต่ดีเอ็นเอด้วย NucleoSpin® Tissue Column ที่ประกอบกับ collection tube โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้งแล้วล้าง silica membrane เพื่อชะเอาองค์ประกอบอื่นที่อาจตกค้างอยู่ออก ด้วยสารละลาย Wash buffer 500 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งจะทำการล้าง 2 ครั้ง จากนั้นทำให้ silica membrane แห้งโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 2 นาที ในขั้นตอนสุดท้ายจะชะ DNA ออกจาก silica membrane โดยใส่ NucleoSpin® tissue column ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่เตรียมไว้ และเติมสารละลาย elution buffer D ที่อุณหภูมิ 60 °C (เพื่อให้ได้ผลผลิต DNA เพิ่มขึ้น) ปริมาตร 50 µl จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และนำไปวัดค่าความเข้มข้นของ DNA ต่อไป

3.6.1.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณและประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (NanoDrop 1000 spectrophotometer; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา) โดยเครื่องจะวัดค่าทั้งที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (ความยาวคลื่นที่ดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด) และ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรที่วัดได้จะถูกนำมาประมวลผลโดยเทียบกับค่าความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์สูงควรมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.8-1.9 [103] หากค่าต่ำกว่าช่วงดังกล่าวแสดงว่ามีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลาย และถ้ามากกว่าแสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนอยู่ในสารละลาย

รักษาคุณภาพของดีเอ็นเอโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.6.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่ PCR

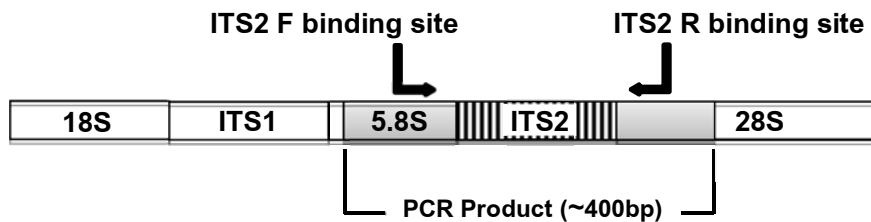
เป็นขั้นตอนการคัดลอกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ ITS2 ออกจาก genomic DNA ที่สกัดได้ และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน ITS2 ให้มีมากพอสำหรับใช้ในขั้นตอนต่างๆ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (DNA polymerase) ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อช่วงยีน ITS2 ภายใต้ปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสม

3.6.2.1 ไพรเมอร์ (primer)

การศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Song *et al.* [99] ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวถูกออกแบบให้ครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ second internal transcribed spacer (ITS2) ของ rDNA โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Drosophila melanogaster* (accession no. M21017) เป็นต้นแบบ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer (ITS2 F) จำเพาะกับส่วนปลาย 3' ของยีน 5.8S rDNA โดยจะจับที่ตำแหน่ง 2814-2835 ส่วน reverse primer (ITS2 R) จำเพาะกับส่วนปลาย 5' ของ 28S rDNA และจับที่ตำแหน่งที่ 3295-3317 รายละเอียดไพรเมอร์และลักษณะการทำงานแสดงดังตารางที่ 3.1 และ ภาพที่ 3.2 ตามลำดับ

Primer	Sequences (5'-3')	Tm (°C)
ITS2 F	TGCTTGGACTACATATGGTTGA	58
ITS2 R	GTAGTCCCATATGAGTTGAGGTT	61

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์พร้อมรายละเอียดของไพรเมอร์ [99]



ภาพที่ 3.2 โครงสร้างของ rDNA gene [99]

แสดงบริเวณ binding site ของไพรเมอร์และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

3.6.2.2 การทำปฏิกิริยาอุกโช PCR

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน ITS2 โดยใช้สารละลายที่มีองค์ประกอบกับ สัดส่วนที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.2) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.3) โดยใช้ Thermal cycler condition ที่ควบคุมโดยเครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (GeneAmp PCR system 2400; Applied Biosystems[®] สหรัฐอเมริกา) ซึ่งมีหลักการดังนี้ ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาอุกโช PCR เครื่องจะ เพิ่มอุณหภูมิตามที่กำหนดในขั้นตอนแรก คือ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอ ต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ (Initial PCR activation step) จากนั้นจึงเริ่ม ปฏิกิริยาอุกโช PCR จำนวน 30 รอบ ตามลำดับขั้นที่อุณหภูมิต่างๆ กัน โดยเริ่มจาก 94 °C นาน 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว (Denaturation) จากนั้นจึงลดอุณหภูมิลงเหลือ 47 °C นาน 1 นาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับจำเพาะกับไพรเมอร์ (Annealing) แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้น อีกครั้งที่ 72 °C เพื่อให้เกิดการเพิ่มความยาวให้สาย นิวคลีโอไทด์จากการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase (Extension) ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 45 วินาที เมื่อปฏิกิริยาอุกโช PCR ทำงานครบ 30 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 °C นาน 10 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่อย่างสมบูรณ์ (Final extension) สุดท้ายจึงเก็บผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้ไว้ที่ 2-8 °C จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

สารที่เป็นองค์ประกอบ	ปริมาตร (μl)
10X <i>Taq</i> buffer	2.0
2 mM dNTP	2.0
25mM MgCl ₂	2.0
10μM forward primer	0.8
10μM reverse primer	0.8
<i>Taq</i> DNA polymerase; Invitrogen® (5U/μl)	0.2
DNA template (200 ng/μl)	2.0
ddH ₂ O	10.2
รวม	20.0

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาหลอด PCR

ขั้นตอน	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°C)	จำนวนรอบ
1. Initial PCR activation step	5	94	1
2. ปฏิกิริยาหลอด PCR ของ 3 ขั้นตอนเกิดวนซ้ำกัน ประกอบด้วย			
- Denaturation	1	94	} 30
- Annealing	1	47	
- Extension	45 วินาที	72	
3. Final extension	10	72	1

ตารางที่ 3.3 Thermal cycler condition

3.6.3 การตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เทสารละลาย 1% agarose ใน 1X TAE buffer (ภาคผนวก ก) ที่ต้มจนละลายแล้วลงถาดรองเจล จากนั้นจึงใส่หัว (comb) เพื่อทำหลุมสำหรับหยอดตัวอย่าง ทิ้งให้เจลเกิด polymerization ประมาณ 1 ชั่วโมงแล้วจึงนำหัวออก นำแผ่นเจลใส่ลงในอ่างรันเจล จากนั้นเติม 1X TAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล แล้วจึงหยอดสารผสมระหว่างสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Fermentas®) 3 μl กับ 6X loading dye 1 μl ลงในหลุมที่จะใช้บอกขนาดดีเอ็นเอ ส่วนหลุมที่เป็น negative control ให้หยอด ddH₂O 3 μl ผสมกับ 6X loading dye 2 μl สุดท้ายจึงหยอดผลิตภัณฑ์

PCR ของแต่ละตัวอย่าง ละ 3 μ l ผสมกับ 6X loading dye 2 μ l ลงในหลุมแต่ละหลุมที่เหลือ สุดท้ายจึงปิดฝาครอบอ่างรันเจลแล้วต่อสายไฟจาก power supply เข้าขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง ตั้งค่า power supply โดยใช้กระแสไฟฟ้า 400 Amp. แรงดันไฟฟ้า 100 Volt. เวลา 50 นาที แล้วรันจนครบเวลา สังเกตว่าดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างโมเลกุลของอะกาโรสเจลไปสู่ด้านที่มีประจุบวกด้วยความเร็วแตกต่างกัน โดยขนาดเล็กจะวิ่งได้เร็วกว่าและชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันจะเคลื่อนที่บนอะกาโรสเจลได้ระยะทางใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อรันจนครบเวลาแล้วนำแผ่นเจลไปย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) จะเห็นดีเอ็นเอเรืองแสงเป็นแถบ และเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานก็จะสามารถบอกได้ว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดเท่าไร โดยคาดว่าชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 350-500 bp

3.6.4 การโคลนสายนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถึงแม้จะมีสายนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนของ ITS2 มากที่สุด แต่ก็มีสายนิวคลีโอไทด์ขนาดต่างๆ ที่เป็นผลจากปฏิกิริยาการเพิ่มความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ในช่วงแรกๆ ซึ่งสายเหล่านี้ก็ยังมีส่วนที่ไม่ใช่ ITS2 เกินอยู่ด้วย นอกจากนี้ยังมีสายนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบลอยปะปนอยู่ในสารละลายของผลิตภัณฑ์อีกด้วย ซึ่งหากนำผลิตภัณฑ์ในขั้นนี้ไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) อาจทำให้เกิดการรบกวนผลการลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงต้องมีการคัดเลือกเอาเฉพาะสายที่เป็นส่วนของบริเวณ ITS2 ที่ต้องการเท่านั้น โดยใช้วิธีเชื่อมต่อกับส่วนของยีน ITS2 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ โดยอาศัยหลักการที่ว่าที่ด้านปลายของผลิตภัณฑ์ PCR มีการเติมเบส A (adenine) จากการทำงานของ *Taq* polymerase ซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับปลาย T (thymine) ของพลาสมิดเวกเตอร์ได้ด้วยการทำงานของเอนไซม์ DNA ligase จากนั้นจึงนำไปเพิ่มจำนวนโดยเลียนแบบวิธีการตามธรรมชาติด้วยการนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อให้เพิ่มจำนวนไปตามการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นจึงสกัดเอาเฉพาะ พลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรีย ผลผลิตที่ได้จึงไม่มีการปะปนของสายนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ต้องการและพร้อมส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.6.4.1 การเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (ligation)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (ภาคผนวกที่ ก) ซึ่งรวมอยู่ในชุดทดสอบสำเร็จรูป InsTAclone™ PCR cloning kit ของบริษัท Fermentas ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยอาศัยเอนไซม์ T_4 DNA ligase เป็นตัวทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ

(ligation reaction) ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 20 μ l แสดงดังตารางที่ 3.4 ทำปฏิกิริยาโดยนำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

องค์ประกอบ	ปริมาตร/ปฏิกิริยา (μ l)
Vector (pTZ57R/T) (55 ng/ μ l)	3.0
5X Ligation buffer	6.0
T ₄ DNA Ligase (5U/ μ l)	1.0
ddH ₂ O	8.0
DNA จากผลิตภัณฑ์ PCR (50 ng/ μ l)	2.0
รวม	20.0

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบและสัดส่วนของสารที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อ

3.6.4.2 การถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้า competent cell ด้วยวิธี heat shock [104]

นำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ เริ่มจากละลาย competent cell โดยตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที เมื่อเซลล์ละลายแล้วจึงเปิดแบ่งใส่หลอดสารละลายที่มีพลาสมิดเวกเตอร์สายผสมที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.4.1 หลอดละ 10 μ l แช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) โดยบ่มใน Dry bath incubator ที่อุณหภูมิ 42 °C 45 วินาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็งอีก 2 นาที เติม SOC medium ให้ครบปริมาตร 250 μ l แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 200 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำสารละลายมา spread บน LB agar ที่ผสมยาแอมพิซิลิน 100 μ g/ml และ spread ด้วย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 80 μ g/ml ไว้ก่อนแล้ว สุดท้ายจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.6.4.3 การคัดเลือกโคโลนี *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม

ด้วยคุณสมบัติของพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas[®]) ที่มีอินที่ให้ลักษณะต้านต่อยาแอมพิซิลิน ดังนั้นเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดนี้จะสามารถเจริญบนอาหาร LB agar ที่มียาแอมพิซิลินได้ จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อาจปนเปื้อนในขั้นตอนการถ่ายเชื้อได้ และจากคุณสมบัติของ พลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas[®]) ที่ได้รับการออกแบบให้มีบริเวณ *lacZ* gene ซึ่งทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ที่ย่อยสาร X-gal แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้า คุณสมบัติข้อนี้สามารถนำมาคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มี ITS2 ออกจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มี ITS2 ได้ โดยเซลล์ที่

ได้รับพลาสมิดที่ไม่มี ITS2 แทรก ยีน *lacZ* จะยังคงทำงานและย่อย X-gal ได้ ทำให้เซลล์เหล่านี้เจริญเป็นโคโลนีสีฟ้า ตรงข้ามกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่มี ITS2 แทรกที่บริเวณ *lacZ* gene ออกจากกัน ทำให้ยีน *lacZ* ไม่สามารถทำงานได้ เซลล์เหล่านี้จะเจริญเป็นโคโลนีสีขาวครีม

3.6.4.4 การยืนยันผลการโคลนด้วยเทคนิค colony PCR

ยืนยันผลการโคลนว่าโคโลนีที่เลือกเป็นกลุ่มของเซลล์ที่มีพลาสมิดที่มีชิ้นยีน ITS2 ถูกแทรกอยู่กับสายนิวคลีโอไทด์หรือไม่ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่มีส่วนประกอบของสารละลาย สภาวะและไพรเมอร์ที่ใช้ตามวิธีการในข้อ 3.6.2 แต่จะลดสัดส่วนของสารประกอบที่ใช้ให้เหลือเท่ากับปริมาตรรวม 10 μ l ต่อ 1 ตัวอย่าง และใช้โคโลนีสีขาวที่ต้องการยืนยันเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ทั้งนี้จะทำการ subculture โคโลนีดังกล่าวไว้บนอาหาร LB agar สำหรับเป็นเพลตต้นแบบ (master plate) ผลลัพธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสในขั้นนี้จะถูกตรวจสอบบน 1% agarose gel ตามวิธีในข้อ 3.6.3 หากตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการปรากฏบนแผ่นเจล จึงเขี่ยโคโลนีจากเพลตต้นแบบมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ผสม ยาแอมพิซิลิน 100 μ g/ml ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สำหรับนำไปสกัดเอาเฉพาะพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียต่อไป

3.6.5 การสกัดพลาสมิด

ตกตะกอนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนไว้ในข้อ 3.7.4.4 โดยปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดแยกเอาพลาสมิดออกจากเซลล์ โดยทำตามขั้นตอนและคำแนะนำในคู่มือของชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับสกัดพลาสมิด FastPlasmid™ Mini kit ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมันนี้

ทำให้เซลล์แตกโดยเติมสารละลาย lysis ปริมาตร 400 μ l แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex เป็นเวลา 30 วินาที และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 3 นาที จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างเซลล์โดยการเติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 400 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ spin column แห้งและกำจัดสารละลายที่อาจตกค้าง ต่อมาจึงย้าย spin column ไปใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติมสารละลาย elute ปริมาตร 50 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อชะเอาพลาสมิดออกจาก spin column

สารละลายที่มีพลาสมิดที่สกัดได้ถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (NanoDrop 1000 spectrophotometer; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร เพื่อวัดปริมาณและประเมินคุณภาพของผลผลิตที่ได้ ก่อนส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.6.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS2 ในการทดลองนี้ใช้วิธีรับบริการตรวจวิเคราะห์จากบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ M13F (-20) (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') และยืนยันความแม่นยำของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างด้วยการส่งไปวิเคราะห์อย่างน้อย 2 โคลนต่อหนึ่งตัวอย่าง [92]

3.6.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทย

3.6.7.1 การปรับปรุงลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงค่าในรูปกราฟ sequence electropherogram จากทั้ง 2 โคลน ถูกพิจารณาความถูกต้องโดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 โดยบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ประกอบด้วยส่วนของยีน ITS2 และไพรเมอร์ทั้งสองข้างจะถูกแยกออกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ แต่เนื่องจากบริเวณที่เป็นไพรเมอร์ ITS2 F และ ITS2 R คือลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนปลาย 3' ของยีน 5.8S และส่วนปลาย 5' ของ 28S rDNA ตามลำดับ จึงต้องตัดทั้ง 2 บริเวณดังกล่าวออกจากส่วนที่เป็นยีน ITS2 ด้วย ซึ่งรูปแบบการตัดยึดตามวิธีของ Tautz et al. [105] และ Song et al. [99] บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนของยีน ITS2 ในรูปแบบ Fasta format ไว้ในโปรแกรม Notepad สำหรับใช้วิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.6.7.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรมออนไลน์ BLASTN 2.2.26+ ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ เทียบกับฐานข้อมูลทั้งหมด ผลการเปรียบเทียบความเหมือนจะถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และตัดสินจากค่า percentage identities

3.6.7.3 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างซ้ำภายในสายพันธุ์ และระหว่างสายพันธุ์

นำตัวแทนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 2 โคลนจากทุกตัวอย่างของแมลงวันวงศ์เดียวกันมา align เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์เดียวกันจากต่างประเทศจากฐานข้อมูลใน NCBI โดยใช้แอฟริเคชั่น Clustal W version 2.0 [106] ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.0.5.3 แล้วนำไฟล์ที่ align ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในระหว่างซ้ำ (inter-copy sequence variation) รวมทั้งเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific divergence) และระหว่างสายพันธุ์ (interspecific divergence) ด้วยโหมด sequence identity matrix ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.0.5.3 [85] อนึ่งผลการจากการคำนวณด้วยโหมด sequence identity matrix คือเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ค่าความต่างจึงหาได้จาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความต่าง} = 100 - \text{เปอร์เซ็นต์ความเหมือนจากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์}$$

3.6.7.4 การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

ใช้โปรแกรม MEGA version 4.0.2 [102] สร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันด้วยวิธี distance matrix โดยใช้ algorithm แบบ Neighbor-Joining method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ตามโมเดลแบบ Kimura-2-parameter พร้อมทั้งทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ และใช้ *Drosophila melanogaster* เป็น out group [92]

3.6.8 การขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกโคลนจากทุกตัวอย่างของประชากรแมลงวันที่ได้จากการศึกษา มาขึ้นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) แบบออนไลน์ เพื่อเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าไปในฐานข้อมูลออนไลน์ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BankIt สำหรับจัดเตรียมข้อมูลที่จำเป็นสำหรับขึ้นขอเลขทะเบียน ทั้งนี้การระบุตำแหน่งของยีนต่างๆบนสายนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในแมลงวันแต่ละสายพันธุ์ยึดตามรูปแบบของ Tautz et al. [105] และ Song et al. [99]

3.6.9 การจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

3.6.9.1 การทำนายเอนไซม์ตัดจำเพาะและรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้

เป็นวิธีการเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสมสำหรับใช้จำแนกชนิดของแมลงวันหลังลายในการทดลองนี้ ซึ่งพิจารณาจากขนาด และจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากถูกตัดที่บริเวณจำเพาะของเอนไซม์นั้นๆ โดยที่ขนาดและจำนวนที่ได้ในแต่ละสายพันธุ์ควรมีแตกต่างกันพอที่จะแยกแต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน การทำนายทำได้โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในขั้นตอนข้อ 3.6.6 มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NEBcutter version 2.0

3.6.9.2 การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เป็นการขั้นตอนการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ที่ได้จากปฏิกิริยา ลูกโซ่ PCR ของตัวอย่างแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ในการทดลองนี้ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำนายได้จากโปรแกรม NEBcutter V2.0 ซึ่งผลการทำนายพบว่า เอนไซม์ที่ให้รูปแบบการตัดที่เหมาะสมที่สุดคือเอนไซม์ *DraI* และ *PsiI* โดยปฏิกิริยาที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้ง 2 เอนไซม์ ในสารละลายที่มีปริมาตรรวม 10 μ l ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ PCR buffer เอนไซม์ตัดจำเพาะ (*DraI*, *PsiI*) และน้ำกลั่น (ตารางที่ 3.5) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงสำหรับเอนไซม์ *DraI* และ 37 °C เป็นเวลา 5 นาทีสำหรับเอนไซม์ *PsiI* ก่อนนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วย 8 % PAGE

สารที่เป็นองค์ประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์		ปริมาตร (μ l)
<i>DraI</i>	<i>PsiI</i>	
10X buffer Tango	10X FastDigest [®] buffer Tango	1.0
<i>DraI</i> enzyme (10 U/ μ l)	FastDigest [®] <i>PsiI</i> enzyme (10 U/ μ l)	0.3
PCR product (400 ng/ μ l)	PCR product (400 ng/ μ l)	6.0
ddH ₂ O	nuclease-free H ₂ O	2.7
Total		10.0

ตารางที่ 3.5 อัตราส่วนของสารที่ใช้ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ *DraI* และ *PsiI*

3.6.9.3 การตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย 8% PAGE

เตรียม 8 % native polyacrylamide gel โดยใช้ส่วนผสมดังตารางที่ 3.6 ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันแล้วเทลงในแผ่นกระจก จากนั้นจึงใส่หวี (comb) เพื่อทำหลุมสำหรับหยอดตัวอย่าง ทิ้งให้เจลเกิด polymerization ประมาณ 1 ชั่วโมงแล้วจึงนำหวีออก นำแผ่นเจลประกอบกับ electrophoresis chamber แล้วใส่ลงในอ่างรันเจล จากนั้นเติม 0.5X TBE buffer ให้ท่วม electrophoresis chamber และสั่นออกมาจนท่วมประมาณครึ่งหนึ่งของความสูงอ่าง จากนั้นจึงปิดฝาครอบอุปกรณ์แล้วต่อสายไฟจาก power supply เข้าขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง ตั้งค่า power supply โดยใช้กระแสไฟฟ้า 400 Amp. แรงดันไฟฟ้า 100 Volt. เวลา 30 นาที เพื่อรันไล่เอาเศษตะกอนออกจากแผ่นเจลก่อนรันจริง ภายหลังไล่เศษตะกอนจนครบเวลาจึงหยุดเครื่อง แล้วหยอดสารผสมระหว่างสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 หรือ 100 bp (Fermentas[®]) 3 μ l กับ 6X loading dye 1 μ l ลงในหลุมที่จะใช้บอกขนาดดีเอ็นเอ ส่วนหลุม ที่เป็น negative control ให้หยอดผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละตัวอย่างที่ไม่ได้ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ ตัวอย่างละ 4 μ l ผสมกับ 6X loading dye 2 μ l สุดท้ายจึงหยอดดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัวอย่างละ 6 μ l ผสมกับ 6X loading dye 2 μ l ลงในหลุมแต่ละหลุมที่เหลือ แล้วตั้งเวลาเพิ่มเป็น 75 นาทีและรันจนครบเวลา สุดท้ายจึงนำเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

สารที่เป็นองค์ประกอบ	ปริมาตร (ml)
ddH ₂ O	2.635
30% acrylamide	1.33
5X TBE buffer	1.0
10% ammonium persulfate	0.035
TEMED	0.175
Total	5.0

ตารางที่ 3.6 อัตราส่วนของสารใน 8% native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการจำแนกสายพันธุ์ด้วยสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างแมลงวันจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จ. เชียงใหม่ 51 ตัวอย่าง หนอนคาย 10 ตัวอย่าง นครราชสีมา 9 ตัวอย่าง นนทบุรี 3 ตัวอย่าง กรุงเทพมหานคร 5 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ 4 ตัวอย่าง ระนอง 11 ตัวอย่าง และภูเก็ต 20 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 113 ตัวอย่าง ถูกจำแนกสายพันธุ์ด้วยสัณฐานวิทยาโดยผู้เชี่ยวชาญทางด้านกีฏวิทยา และยืนยันผลโดยภาควิชา ปรสิตรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จัดเป็น 22 สปีชีส์ภายใน 3 วงศ์ คือ Sarcophagidae, Calliphoridae และ Muscidae (ตารางที่ 4.1)

วงศ์	สปีชีส์ที่ถูกจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยา และสถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (เพศ)	รหัสตัวอย่าง
Sarcophagidae	<i>Sarcophaga dux</i>		
	อ.เมือง จ.เชียงใหม่	3 (♀)	SdCM1, 2, 3
	ห้องเลี้ยงแมลง ภาควิชาปรสิตรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	1 (L ₃)	SdCM4
	ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย	1 (♀) / 1 (♂)	SdNK1, 2
	สถานีรถไฟบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร	1 (♀)	SdBK1
	บ.เขาตะเกียบ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	2 (♀)	SdPC1, 2
	เกาะพยาม จ.ระนอง	1 (♀)	SdRN1
	หาดในหาน จ.ภูเก็ต	4 (♀)	SdPK1, 2, 3, 4
	<i>Sarcophaga ruficornis</i>		
	อ.เมือง จ.เชียงใหม่	2 (♀)	SrCM1, 2
	ห้องเลี้ยงแมลง ภาควิชาปรสิตรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	1 (L ₃)	SrCM3
	ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย	1 (♂)	SrNK1
	อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี	3 (♀)	SrNT1, 2, 3
	สถานีรถไฟบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร	2 (♀)	SrBK1, 2
หาดในหาน จ.ภูเก็ต	2 (♀)	SrPK1, 2	

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลตัวอย่างแมลงวันที่ใช้ในการวิจัย

หมายเหตุ: L₃ หมายถึง 3rd instar larva (หนอนระยะ 3)

วงศ์	สปีชีส์ที่ถูกจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยา และสถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (เพศ)	รหัสตัวอย่าง
Sarcophagidae	<i>Sarcophaga peregrina</i>		
	อ.เมือง จ.เชียงใหม่	1 (♀)	SpCM1
	ห้องเลี้ยงแมลง ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2 (L ₃)	SpCM2, 3
	เกาะพยาม จ.ระนอง	1 (♀)	SpRN1
	<i>Sarcophaga scopariiformis</i>		
	เกาะพยาม จ.ระนอง	1 (♀)	SscRN 1
Calliphoridae	<i>Chrysomya megacephala</i>		
	ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย	3 (♀)	CmNK1, 2, 3
	สถานีรถไฟบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร	1 (♀)	CmBK1
	บ.เขาตะเกียบ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	2 (♀)	CmPC1, 2
	เกาะพยาม จ.ระนอง	2 (♀) / 4 (♂)	CmRN1, 2 / 3, 4, 5, 6
	หาดในหาน จ.ภูเก็ต	1 (♀)	CmPK1
	<i>Chrysomya chani</i>		
	ตราดหมอก ต.แม่ริม อ.เมือง จ.เชียงใหม่	1 (♀) / 2 (♂)	CcCM1 / 2, 3
	หาดในหาน จ.ภูเก็ต	2 (♀)	CcPK1, 2
	<i>Chrysomya nigripes</i>		
	คอกคำ ต.แม่เหิยะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่	1 (♀) / 2 (♂)	CnCm1 / 2, 3
	<i>Chrysomya pinguis</i>		
	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ จ.เชียงใหม่	2 (♀) / 2 (♂)	CpCM1, 2 / 3, 4
	<i>Chrysomya rufifacies</i>		
	ต.หนองควาย อ.หางดง จ.เชียงใหม่	1 (♀) / 2 (♂)	CrCM1 / 2, 3
	ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย	1 (♀)	CrNK1
	<i>Chrysomya villeneuvei</i>		
	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่	2 (♀) / 1 (♂)	CvCM1, 2 / 3
<i>Hypopygiopsis tumrasvini</i>			
อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่	3 (♀)	HiCM1, 2, 3	

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

หมายเหตุ: L₃ หมายถึง 3rd instar larva (หนอนระยะ 3)

วงศ์	สปีชีส์ที่ถูกจำแนกโดยใช้ฐานฐานวิทยา และสถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (เพศ)	รหัสตัวอย่าง
Calliphoridae	<i>Hypopygiopsis tumrasvini</i>		
	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่	3 (♀)	HtCM1, 2, 3
	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>		
	วัดอุโมงค์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่	1 (♀) / 2 (♂)	HlCM1 / 2, 3
	หาดในหาน จ.ภูเก็ต	1 (♀)	HlPK1
	<i>Hemipyrellia pulchra</i>		
	ต.สะถวง อ.แมริม จ.เชียงใหม่	1 (♀) / 2 (♂)	HpCM1 / 2, 3
	หาดในหาน จ.ภูเก็ต	1 (♀)	HpPK1
	<i>Lucilia cuprina</i>		
	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่	3 (♀)	LcCM1, 2, 3
หาดในหาน จ.ภูเก็ต	3 (♀) / 1 (♂)	LcPK1, 2, 3 / 4	
<i>Lucilia papuensis</i>			
วัดอุโมงค์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่	1 (♀) / 2 (♂)	LpaCM1 / 2, 3	
<i>Lucilia porphyrina</i>			
อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่	1 (♀) / 2 (♂)	LpoCM1 / 2, 3	
Muscidae	<i>Musca domestica</i>		
	บ้านหนองแก้ว อ.หางดง จ.เชียงใหม่	2 (♀) / 1 (♂)	MdCM1, 2 / 3
	ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย	1 (♀)	MdNK1
	เกาะพยาม จ.ระนอง	2 (♀)	MdRN1, 2
	หาดในหาน จ.ภูเก็ต	1 (♀)	MdPK1
	<i>Musca sorbens</i>		
	บ้านหนองแก้ว อ.หางดง จ.เชียงใหม่	1 (♀)	MsCM1
	ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย	2 (♀)	MsNK1, 2
	สถานีรถไฟบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร	1 (♀)	MsBK1
	หาดในหาน จ.ภูเก็ต	4 (♀)	MsPK1, 2, 3, 4
<i>Hydrotaea spinigera</i>			
บ้านหนองแก้ว อ.หางดง จ.เชียงใหม่	2 (♀) / 1 (♂)	HsCM1, 2 / 3	

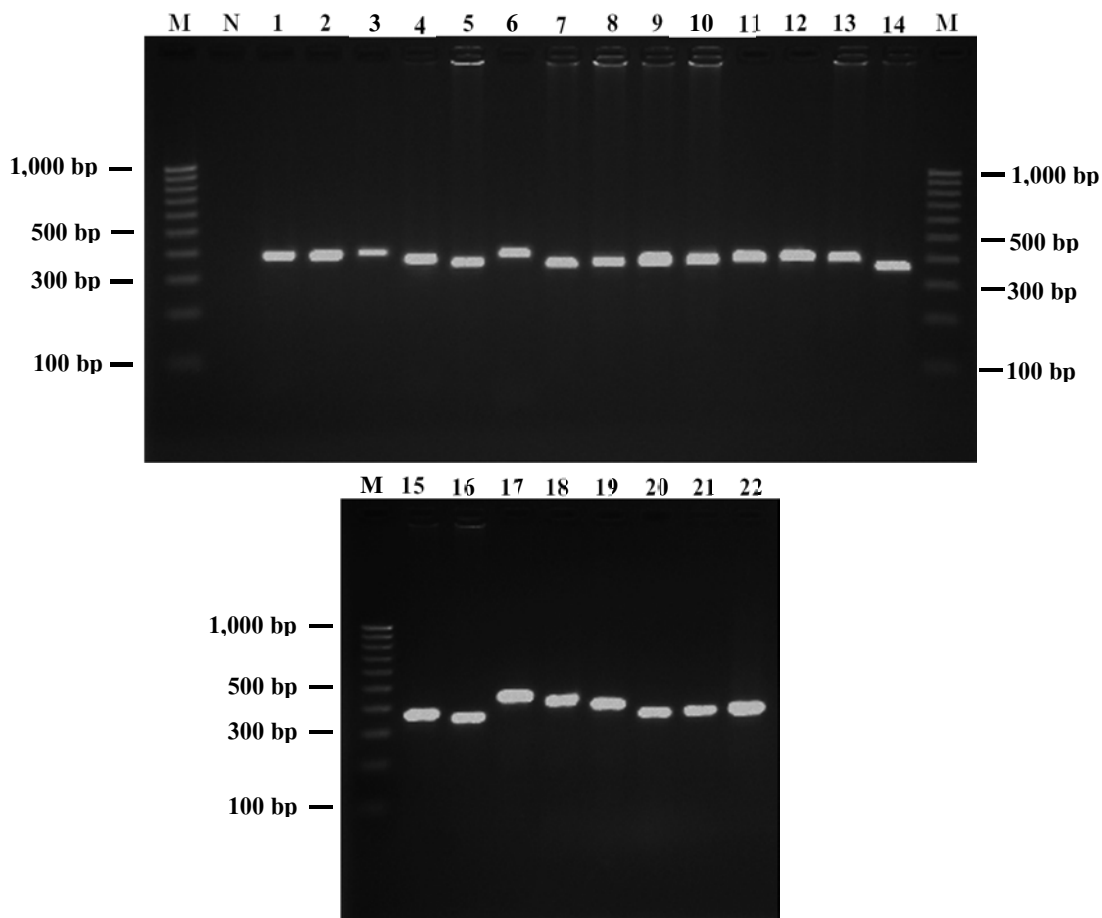
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

วงศ์	สปีชีส์ที่ถูกจำแนกโดยใช้ฐานวิทยา และสถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (เพศ)	รหัสตัวอย่าง
Muscidae	<i>Stomoxys calcitrans</i>		
	อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา	3 (♀)	ScKR1, 2, 3
	<i>Stomoxys indica</i>		
	อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา	1 (♀) / 2 (♂)	SiKR1 / 2, 3
	<i>Stomoxys sitiens</i>		
	อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา	3 (♂)	SsKR1, 2, 3

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

4.2 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR

หลังจากคัดลอกและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA เฉพาะบริเวณ ITS2 ออกจาก rDNA ที่สกัดได้โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับไพรเมอร์ ITS2F (5' TGCTTGACTACATATGGTTGA 3') และ ITS2R (5' GTAGTCCCATATGAGTTGAGGTT 3') ภายใต้ปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้ DNA ที่สนใจเคลื่อนที่คู่ไปกับ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Invitrogen[®]) ในแผ่นเจล (1% Agarose gel) ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 60 นาที แล้วย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 350 - 500 bp (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของบริเวณ ITS2 บน 1 % agarose gel

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas[®])

Lane N คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ

Lane 1-22 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS2 ของแมลงวัน

Sarcophaga dux (1) *Sarcophaga ruficornis* (2)

Sarcophaga peregrina (3) *Sarcophaga scopariiformis* (4)

Chrysomya megacephala (5) *Lucilia papuensis* (6)

Hypopygiopsis tumrasvini (7) *Chrysomya pinguis* (8)

Chrysomya villeneuvei (9) *Chrysomya rufifacies* (10)

Chrysomya nigripes (11) *Lucilia cuprina* (12)

Chrysomya chani (13) *Lucilia porphyrina* (14)

Hemipyrellia ligurriens (15) *Hemipyrellia pulchra* (16)

Hydrotaea spinigera (17) *Musca domestica* (18)

Musca sorbens (19) *Stomoxys indica* (20)

Stomoxys sitiens (21) และ *Stomoxys calcitrans* (22)

4.3 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกใส่ PCR ของแต่ละตัวอย่าง หลังจากถูกเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T โดยอาศัยหลักการที่ว่าที่ปลายของผลิตภัณฑ์ PCR มีการเติมเบส A ซ้ำๆ จากการทำงานของ *Taq* polymerase ซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับปลาย T ของพลาสมิดเวกเตอร์ได้ด้วยการทำงานของเอนไซม์ DNA ligase จากนั้นจึงนำพลาสมิดสายผสมไปเพิ่มจำนวนโดยเลียนแบบวิธีการตามธรรมชาติด้วยการนำเข้าสู่ competent cell *E. coli* DH5 α เพื่อให้เพิ่มจำนวนไปตามการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากคุณสมบัติของพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas[®]) ที่ได้รับการออกแบบให้มีบริเวณ *lacZ* gene ซึ่งทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ที่ย่อยสาร X-gal แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้า คุณสมบัติข้อนี้สามารถนำมาคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้น ITS2 ออกจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้น ITS2 ได้ โดยเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้น ITS2 แทรก ยีน *lacZ* จะยังคงทำงานและย่อย X-gal ได้ ทำให้เซลล์เหล่านี้เจริญเป็นโคโลนีสีฟ้าตรงข้ามกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้น ITS2 แทรก ยีนบริเวณ *lacZ* gene ออกจากกัน ทำให้ยีน *lacZ* ไม่สามารถทำงานได้ เซลล์เหล่านี้จะเจริญเป็นโคโลนีสีขาวครีม จากนั้นจึงสกัดเอาเฉพาะพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับสกัดพลาสมิด FastPlasmid™ Mini kit ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมันนี ก่อนส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS2 ที่บริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ M13F(-20) (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') และยืนยันความแม่นยำของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างด้วยการส่งไปวิเคราะห์อย่างน้อย 2 โคลนต่อหนึ่งตัวอย่าง

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ sequencing จะแสดงค่าในรูปแบบกราฟ sequence electropherogram ความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 2 โคลน ถูกพิจารณาโดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 โดยบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ ITS2 และไพรเมอร์ทั้งสองข้าง จะถูกแยกออกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ แต่เนื่องจากบริเวณที่เป็นไพรเมอร์ ITS2 F และ ITS2 R คือลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนปลาย 3' ของยีน 5.8S และส่วนปลาย 5' ของ 28S rDNA ตามลำดับ จึงต้องตัดบริเวณดังกล่าวออกจากส่วนที่เป็น ITS2 ด้วย ซึ่งรูปแบบการตัดยึดตามวิธีของ Tautz et al. [105] และ Song et al. [99]

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างซ้ำ (inter-copy sequence variation) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากแต่ละซ้ำในแมลงวันตัวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน (ไม่ได้แสดงผล)

พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดแต่งแล้วของตัวอย่างแมลงวันที่ถูกจำแนกด้วยสถานวิทยาให้อยู่ในวงศ์ Sarcophagidae มีขนาด 313 bp (*SscRN1*) ถึง 343 bp (*SpCM1-3*, *SpRN1*) เฉลี่ย 335.18 bp โดยที่มีค่า A+T content เฉลี่ย 80.5% (T=40.1%, C=8.0%, A=40.4%, และ

G=11.6%) ในขณะที่วงศ์ Calliphoridae มีขนาด 297 bp (*HsCM1-3*) ถึง 323 bp (*CcCM1-3*, *CcPK1-2*) เฉลี่ย 312.08 bp และมีค่า A+T content เฉลี่ย 80.8% (T= 39.6%, C= 8.1%, A= 41.2%, และ G= 11.2%) ในทำนองเดียวกันความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Muscidae มีขนาด 312 bp (*SrKR3*) ถึง 377 bp (*HsCM1-3*) เฉลี่ย 341.45 bp และมีค่า A+T content เฉลี่ย 76.6% (T= 37.9%, C= 10.3%, A= 38.7%, และ G= 13.1%) ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดแต่งแล้วของแมลงวันที่ใช้ศึกษาในการทดลองนี้แสดงในตารางที่ 4.2

4.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของตัวอย่างกับฐานข้อมูล

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกปรับปรุงแล้ว มาเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI ซึ่งรวบรวมไว้ในระบบอินเทอร์เน็ตด้วยโปรแกรมออนไลน์ BLAST 2.2.26+ ซึ่งเป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับฐานข้อมูลทั้งหมดที่เก็บไว้ในระบบอินเทอร์เน็ต ผลการเปรียบเทียบความเหมือนจะถูกวิเคราะห์ด้วยค่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และตัดสินจากค่า percentage identity พบว่า ตัวอย่างแมลงวันที่ถูกจำแนกด้วยฐานวิทยาให้อยู่ในวงศ์ Sarcophagidae มีค่า percentage identity 99-100% (เฉลี่ย 99.82%) โดยที่ตัวอย่างรหัส *SdCM1-4*, *SdNK1-2*, *SdBK1*, *SdPC1*, *SdRN1* และ *SdPK1-4* เหมือนกับ *Sarcophaga dux* (Acc no. EF061818) ด้วยค่า identity 99-100% ตัวอย่างรหัส *SrBK1-2*, *SrCM1-3*, *SrNK1*, *SrNT1-3* และ *SrPK1-3* เหมือนกับ *Sarcophaga ruficornis* (Acc no. GQ424202) ด้วยค่า identity 100% ในขณะที่ ตัวอย่างรหัส *SpCM1-3* และ *SpRN1* เหมือนกับ *Sarcophaga peregrina* (Acc no. GQ424201) ด้วยค่า identity 100% และตัวอย่างรหัส *SscRN1* เหมือนกับ *Sarcophaga scopariformis* (Acc no. EF061834) ด้วยค่า identity 99%

ส่วนตัวอย่างแมลงวันที่ถูกจำแนกด้วยฐานวิทยาให้อยู่ในวงศ์ Calliphoridae มีค่า percentage identity 97-100% (เฉลี่ย 99.86%) โดยที่ตัวอย่างรหัส *CmNK1-3*, *CmBK1*, *CmPK1*, *CmPC1-2* และ *CmRN1-6* เหมือนกับ *Chrysomya megacephala* (Acc no. FJ830688) ด้วยค่า identity 100% ตัวอย่างรหัส *CnCM1-3* ตรงกับ *Chrysomya nigripes* (Acc no. DQ310489) ด้วยค่า identity 100% และรหัส *CpCM* ตรงกับ *Chrysomya pinguis* (Acc no. FJ614854) ด้วยค่า identity 100% โดยที่ตัวอย่างรหัส *CrCM1-3* และ *CrNK1* ตรงกับ *Chrysomya rufifacies* (Acc no. EF560177) ด้วยค่า identity 100% ในทำนองเดียวกัน *HICM1-3* และ *HIPK1* เหมือนกับ *Hemipyrellia ligurriens* (Acc no. FJ614857) ด้วยค่า identity 100% ทั้งนี้ยังพบว่า *LcCM1-3* และ *LcPK1-4* เหมือนกับ *Lucilia cuprina* (Acc no. EF560185) ด้วยค่า identity 100% และตัวอย่างรหัส *LpoCM1-3* เหมือนกับ *Lucilia porphyrina* (Acc no. FJ614864) ด้วยค่า identity 97-99% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงรหัส *CcCM1-3* และ *CcPK1-2* เหมือนกับ *Chrysomya megacephala* (Acc no. FJ830687)

ด้วยค่า identity 91% ตัวอย่างรหัส CvCM1-3 เหมือนกับ *Chrysomya albiceps* (Acc no. EF560173) ด้วยค่า identity 98% และตัวอย่างรหัส HpCM1-3 และ HpPK1 ตรงกับ *Hemipyrellia ligurriens* (Acc no. FJ614857) ด้วยค่า identity 93% ในขณะที่ HtCM1-3 เหมือนกับ *Lucilia porphyrina* (Acc no. FJ614864) ด้วยค่า identity 88% และ LpaCM1-3 เหมือนกับ *Lucilia bazini* (Acc no. EF061785) ด้วยค่า identity 95%

ในขณะที่ตัวอย่างแมลงวันที่ถูกจำแนกด้วยฐานวิทยาให้อยู่ในวงศ์ Muscidae มีค่า percentage identity 82-100% (เฉลี่ย 97.72%) โดยพบว่ารหัส MdCM1-3 MdNK1 MdPK1 และ MdRN1-2 เหมือนกับ *Musca domestica* (Acc no. EU555399 EU555401 และ EF061807) ด้วยค่า identity 99% ในทำนองเดียวกันตัวอย่างแมลงวันรหัส MsBK1 MsCM1 MsNK1-2 และ MsPK1-4 เหมือนกับ *Musca sorbens* (Acc no. EF061810) ด้วยค่า identity 100% นอกจากนี้ยังพบว่า รหัส ScKR1-3 ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Stomoxys calcitrans* (Acc no. EF560191) ด้วยค่า identity 97-98% ในขณะที่รหัส SiKR1-3 เหมือนกับ *Stomoxys indicus* (Acc no. EU851209) ด้วยค่า identity 93-95% และรหัส SsKR1-3 ตรงกับ *Stomoxys indicus* (Acc no. EU851257) และ *Stomoxys sitiens* (Acc no. EU851213) ด้วยค่า identity 90% และ 82% ตามลำดับ โดยที่ HsCM1-3 เหมือนกับ *Stomoxys calcitrans* (Acc no. EU851201) ด้วยค่า identity 72%

4.5 ผลการระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และการแพร่กระจายของสายพันธุ์แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย

จากผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของตัวอย่างแมลงวันในการทดลองนี้กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI ด้วยโปรแกรมออนไลน์ BLAST 2.2.26+ พบว่าผลการระบุสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันทั้งหมด 113 ตัวอย่าง 89 ตัวอย่างถูกจำแนกตรงกับการจำแนกโดยใช้ฐานวิทยา ด้วยค่า identity 93-100% โดยถูกแบ่งเป็น 3 วงศ์ 15 สปีชีส์ ได้แก่ *Sarcophaga dux* (14 ตัวอย่างจากเชียงใหม่ หนองคาย กรุงเทพมหานคร ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง และภูเก็ต) *Sarcophaga ruficornis* (11 ตัวอย่างจากเชียงใหม่ หนองคาย นนทบุรี กรุงเทพมหานคร และภูเก็ต) *Sarcophaga peregrine* (4 ตัวอย่างจากเชียงใหม่และระนอง) *Sarcophaga scopariiformis* (1 ตัวอย่างจากระนอง) *Chrysomya megacephala* (13 ตัวอย่างจากหนองคาย กรุงเทพมหานคร ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง และภูเก็ต) *Chrysomya nigripes* (3 ตัวอย่างจากเชียงใหม่) *Chrysomya pinguis* (4 ตัวอย่างจากเชียงใหม่) *Chrysomya rufifacies* (4 ตัวอย่างจากเชียงใหม่และหนองคาย) *Hemipyrellia ligurriens* (4 ตัวอย่างจากเชียงใหม่และภูเก็ต) *Lucilia cuprina* (7 ตัวอย่างจากเชียงใหม่และภูเก็ต) *Lucilia porphyrina* (3 ตัวอย่างจากเชียงใหม่) *Musca domestica* (7 ตัวอย่างจากเชียงใหม่ หนองคาย

ระนอง และภูเก็ต) *Musca sorbens* (8 ตัวอย่างจากเชียงใหม่ หนองคาย กรุงเทพมหานคร และภูเก็ต) *Stomoxys calcitrans* (3 ตัวอย่างจากนครราชสีมา) *Stomoxys indica* (3 ตัวอย่างจากนครราชสีมา)

พบว่าตัวอย่าง 3 ตัวอย่างในสปีชีส์ *Stomoxys sitiens* (3 ตัวอย่างจากนครราชสีมา) ระบุสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ไม่ตรงกับการจำแนกโดยใช้ฐานฐานวิทยา โดยได้ผลตรงกับ *Stomoxys indicus* ด้วยค่า identity 90% ในขณะที่ผลคล้ายกับ *Stomoxys sitiens* ด้วยค่า identity เพียง 82%

ตัวอย่างจำนวน 21 ตัวอย่างไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในฐานข้อมูลแบ่งเป็น 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Chrysomya villeneuvei* (3 ตัวอย่างจากเชียงใหม่) *Hemipyrellia pulchra* (4 ตัวอย่างจากเชียงใหม่และภูเก็ต) *Hypopygiopsis tumrasvini* (3 ตัวอย่างจากเชียงใหม่) *Chrysomya chani* (5 ตัวอย่างจากเชียงใหม่และภูเก็ต) *Lucilia papuensis* (3 ตัวอย่างจากเชียงใหม่) และ *Hydrotaea spinigera* (3 ตัวอย่างจากเชียงใหม่)

4.6 ผลการขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลแล้ว จึงจัดเตรียมข้อมูลสำหรับใช้ยื่นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) แบบออนไลน์ เพื่อเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าไปในฐานข้อมูลออนไลน์ของ NCBI โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ BankIt ซึ่งเข้าใช้ได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank> โดยระบุตำแหน่งของยีนต่างๆ บนสายนิวคลีโอไทด์ในแมลงวันแต่ละสายพันธุ์ยึดตามรูปแบบของ Tautz et al. [105] และ Song et al. [99] ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์จากทุกโคลนของทุกตัวอย่างประชากรแมลงวันที่ใช้ศึกษาคือ JQ811222 - JQ811486 แสดงดังตารางที่ 4.2

สายพันธุ์จากการจำแนก ด้วยหลักฐานวิทยา และ รหัสตัวอย่าง	Acc no. ในแต่ละโคลน	ITS2 (bp)	Percentage identity	ผลการระบุสายพันธุ์ โดยใช้บริเวณ ITS2	ฐานข้อมูล อ้างอิง
<i>Sarcophaga dux</i>					
<i>Sd</i> CM 1 / 2 / 3 / 4	JQ811457-65	333/ 334/ 333/ 334	99/ 100/ 99/ 100	<i>Sarcophaga dux</i>	EF061818
<i>Sd</i> NK 1 / 2	JQ811466-69	334	100	<i>Sarcophaga dux</i>	EF061818
<i>Sd</i> BK 1	JQ811470-71	334	100	<i>Sarcophaga dux</i>	EF061818
<i>Sd</i> PC 1 / 2	JQ811472-75	334	100	<i>Sarcophaga dux</i>	EF061818
<i>Sd</i> RN 1	JQ811476-77	334	100	<i>Sarcophaga dux</i>	EF061818
<i>Sd</i> PK 1 / 2 / 3 / 4	JQ811478-86	334/ 333/ 333/ 334	100/ 99/ 99/ 100	<i>Sarcophaga dux</i>	EF061818
<i>Sarcophaga ruficornis</i>					
<i>Sr</i> BK 1 / 2	JQ811431-34	336	100	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	GQ424202
<i>Sr</i> CM 1 / 2 / 3	JQ811436-41	336	100	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	GQ424202
<i>Sr</i> NK 1	JQ811442-43	336	100	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	GQ424202
<i>Sr</i> NT 1 / 2 / 3	JQ811444-51	336	100	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	GQ424202
<i>Sr</i> PK 1 / 2	JQ811453-56	336	100	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	GQ424202
<i>Sarcophaga peregrina</i>					
<i>Sp</i> CM 1 / 2 / 3	JQ811421-27	343	100	<i>Sarcophaga peregrina</i>	GQ424201
<i>Sp</i> RN 1	JQ811429-30	343	100	<i>Sarcophaga peregrina</i>	GQ424201
<i>Sarcophaga scopariiformis</i>					
<i>Ssc</i> RN 1	JQ811419-20	313	99	<i>Sarcophaga scopariiformis</i>	EF061834
<i>Chrysomya megacephala</i>					
<i>Cm</i> NK 1 / 2 / 3	JQ811391-96	303	100	<i>Chrysomya megacephala</i>	FJ830688
<i>Cm</i> BK 1	JQ811397-98	303	100	<i>Chrysomya megacephala</i>	FJ830688
<i>Cm</i> PK 1	JQ811399-401	303	100	<i>Chrysomya megacephala</i>	FJ830688
<i>Cm</i> PC 1 / 2	JQ811402-06	303	100	<i>Chrysomya megacephala</i>	FJ830688
<i>Cm</i> RN 1 / 2 / 3 / 4 / 5 / 6	JQ811407-18	303	100	<i>Chrysomya megacephala</i>	FJ830688
<i>Chrysomya chani</i>					
<i>Cc</i> CM 1 / 2 / 3	JQ811380-86	323	91	<i>Chrysomya megacephala</i>	FJ830687
<i>Cc</i> PK 1 / 2	JQ811387-90	323	91	<i>Chrysomya megacephala</i>	FJ830687
<i>Chrysomya nigripes</i>					
<i>Cn</i> CM 1 / 2 / 3	JQ811374-79	322	100	<i>Chrysomya nigripes</i>	DQ310489
<i>Chrysomya pinguis</i>					
<i>Cp</i> CM 1 / 2 / 3 / 4	JQ811365-73	305	100	<i>Chrysomya pinguis</i>	FJ614854

ตารางที่ 4.2 ขนาด ITS2 ค่า percentage identities เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์
ของตัวอย่างและเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง

สายพันธุ์จากการจำแนก ด้วยหลักฐานวิทยา และ รหัสตัวอย่าง	Acc no. ในแต่ละโคลน	ITS2 (bp)	Percentage identity	ผลการระบุสายพันธุ์ โดยใช้บริเวณ ITS2	ฐานข้อมูล อ้างอิง
<i>Chrysomya rufifacies</i>					
CrCM 1 / 2 / 3	JQ811355-62	317	100	<i>Chrysomya rufifacies</i>	EF560177
CrNK 1	JQ811363-64	317	100	<i>Chrysomya rufifacies</i>	EF560177
<i>Chrysomya villeneuvei</i>					
CvCM 1 / 2 / 3	JQ811348-54	313	98	<i>Chrysomya albiceps</i>	EF560173
<i>Hemipyrellia ligurriens</i>					
HlCM 1 / 2 / 3	JQ811337-45	312	100	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	FJ614857
HlPK 1	JQ811346-47	312	100	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	FJ614857
<i>Hemipyrellia pulchra</i>					
HpCM 1 / 2 / 3	JQ811328-34	297	93	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	FJ614857
HpPK 1	JQ811335-36	297	93	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	FJ614857
<i>Hypopygiopsis tumrasvini</i>					
HtCM 1 / 2 / 3	JQ811320-27	297	88	<i>Lucilia porphyrina</i>	FJ614864
<i>Lucilia cuprina</i>					
LcCM 1 / 2 / 3	JQ811303-11	333	100	<i>Lucilia cuprina</i>	EF560185
LcPK 1 / 2 / 3 / 4	JQ811312-19	333	100	<i>Lucilia cuprina</i>	EF560185
<i>Lucilia papuensis</i>					
LpaCM 1 / 2 / 3	JQ811296-302	322	95	<i>Lucilia bazini</i>	EF061785
<i>Lucilia porphyrina</i>					
LpoCM 1 / 2 / 3	JQ811286-93	303 / 303 / 300	99 / 99 / 97	<i>Lucilia porphyrina</i>	FJ614864
<i>Musca domestica</i>					
MdCM 1 / 2 / 3	JQ811271-77	348 / 348 / 351	99 / 99 / 99	<i>Musca domestica</i>	EU555401
MdNK 1	JQ811278-79	359	99	<i>Musca domestica</i>	EU555399
MdPK 1	JQ811280-81	359	99	<i>Musca domestica</i>	EU555399
MdRN 1 / 2	JQ811282-85	348 / 360	99	<i>Musca domestica</i>	EU555401/ EF061807
<i>Musca sorbens</i>					
MsBK 1	JQ811252-53	347	100	<i>Musca sorbens</i>	EF061810
MsCM 1	JQ811254-55	347	100	<i>Musca sorbens</i>	EF061810
MsNK 1 / 2	JQ811258-61	347	100	<i>Musca sorbens</i>	EF061810
MsPK 1 / 2 / 3 / 4	JQ811263-70	347	100	<i>Musca sorbens</i>	EF061810
<i>Hydrotaea spinigera</i>					
HsCM 1 / 2 / 3	JQ811245-51	377	72	<i>Stomoxys calcitrans</i>	EU851201

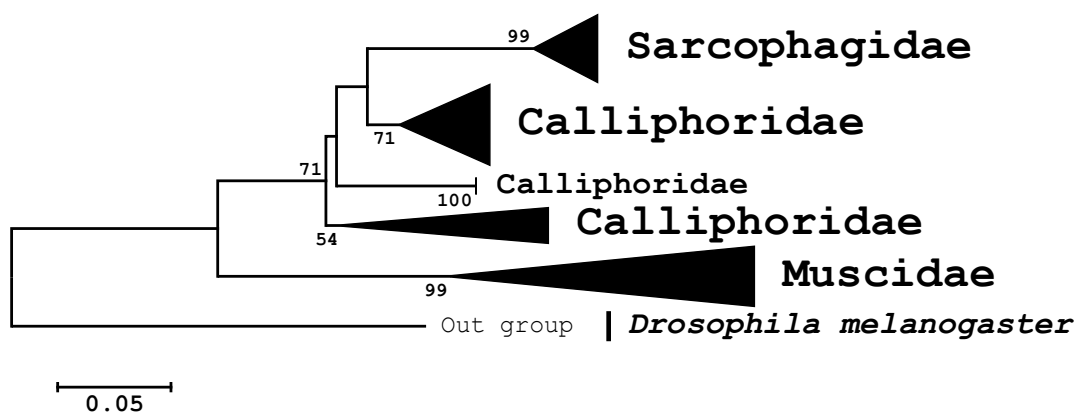
สายพันธุ์จากการจำแนก ด้วยหลักฐานวิทยา และ รหัสตัวอย่าง	Acc no. ในแต่ละโคลน	ITS2 (bp)	Percentage identity	ผลการระบุสายพันธุ์ โดยใช้บริเวณ ITS2	ฐานข้อมูล อ้างอิง
<i>Stomoxys calcitrans</i>					
ScKR 1 / 2 / 3	JQ811238-44	321 / 322 / 321	97 / 98 / 97	<i>Stomoxys calcitrans</i>	EF560191
<i>Stomoxys indicus</i>					
SiKR 1 / 2 / 3	JQ811229-37	318 / 313 / 312	93 / 95 / 95	<i>Stomoxys indicus</i>	EU851209
<i>Stomoxys sitiens</i>					
SsKR 1 / 2 / 3	JQ811222-28	316	90	<i>Stomoxys indicus</i>	EU851257
			82	<i>Stomoxys sitiens</i>	EU851213

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

4.7 ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

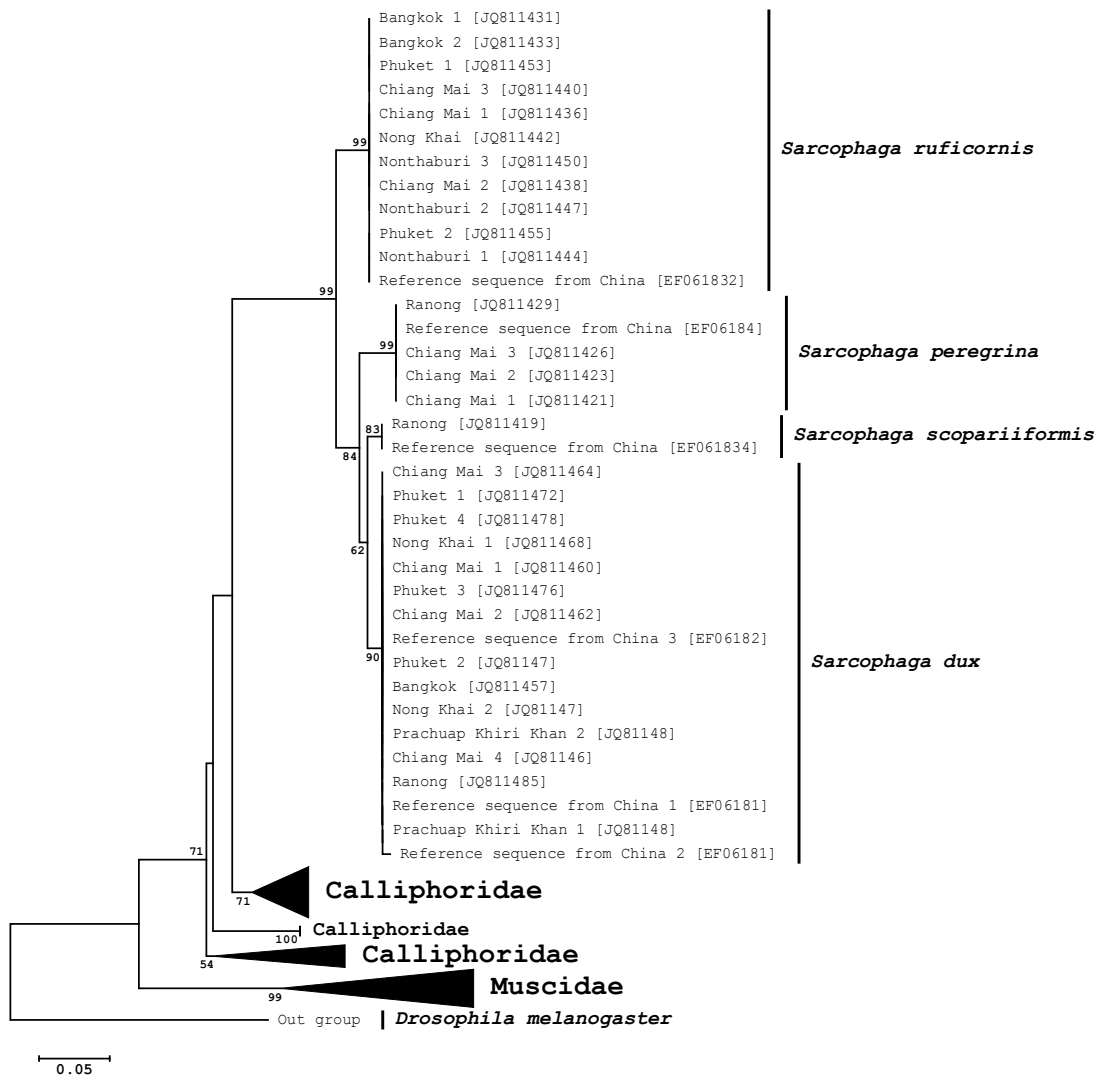
แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมที่ได้เป็นผลจากการสร้างบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ rDNA ของตัวอย่างแมลงวันทั้งสามสายพันธุ์ในการทดลองนี้เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์จากต่างประเทศที่มีในฐานข้อมูลของ NCBI โดยแสดงผลการเปรียบเทียบทั้งสามวงศ์โดยรวมดังภาพที่ 4.2 และแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ภายในวงศ์ที่ละวงศ์ คือ Sarcophagidae Calliphoridae และ Muscidae ดังภาพที่ 4.3 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมถูกสร้างโดยใช้โปรแกรม MEGA version 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) โดยใช้วิธี distance matrix ด้วย algorithm แบบ Neighbor-Joining (NJ) method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ตามโมเดลแบบ Kimura 2-parameter (K2P) พร้อมทั้งทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรมด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ โดยกำหนดให้แสดง bootstrap value ที่มากกว่า 50% ในแผนภูมิวิวัฒนาการ และใช้ *Drosophila melanogaster* เป็น out group [92]

จากการวิเคราะห์ cladogram เพื่อดูความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับวงศ์ (ภาพที่ 4.2) พบว่าทั้งวงศ์ Sarcophagidae และ Muscidae แยกเป็น monophyly อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 99% ในขณะที่วงศ์ Calliphoridae มีลักษณะเป็น paraphyly นอกจากนี้ยังพบว่าวงศ์ Sarcophagidae และ Calliphoridae ถูกจัดเป็น monophyly อยู่ใน node เดียวกันด้วยค่า bootstrap test 71% โดยมีวงศ์ Muscidae เป็นวงศ์ที่อยู่ใกล้ชิด

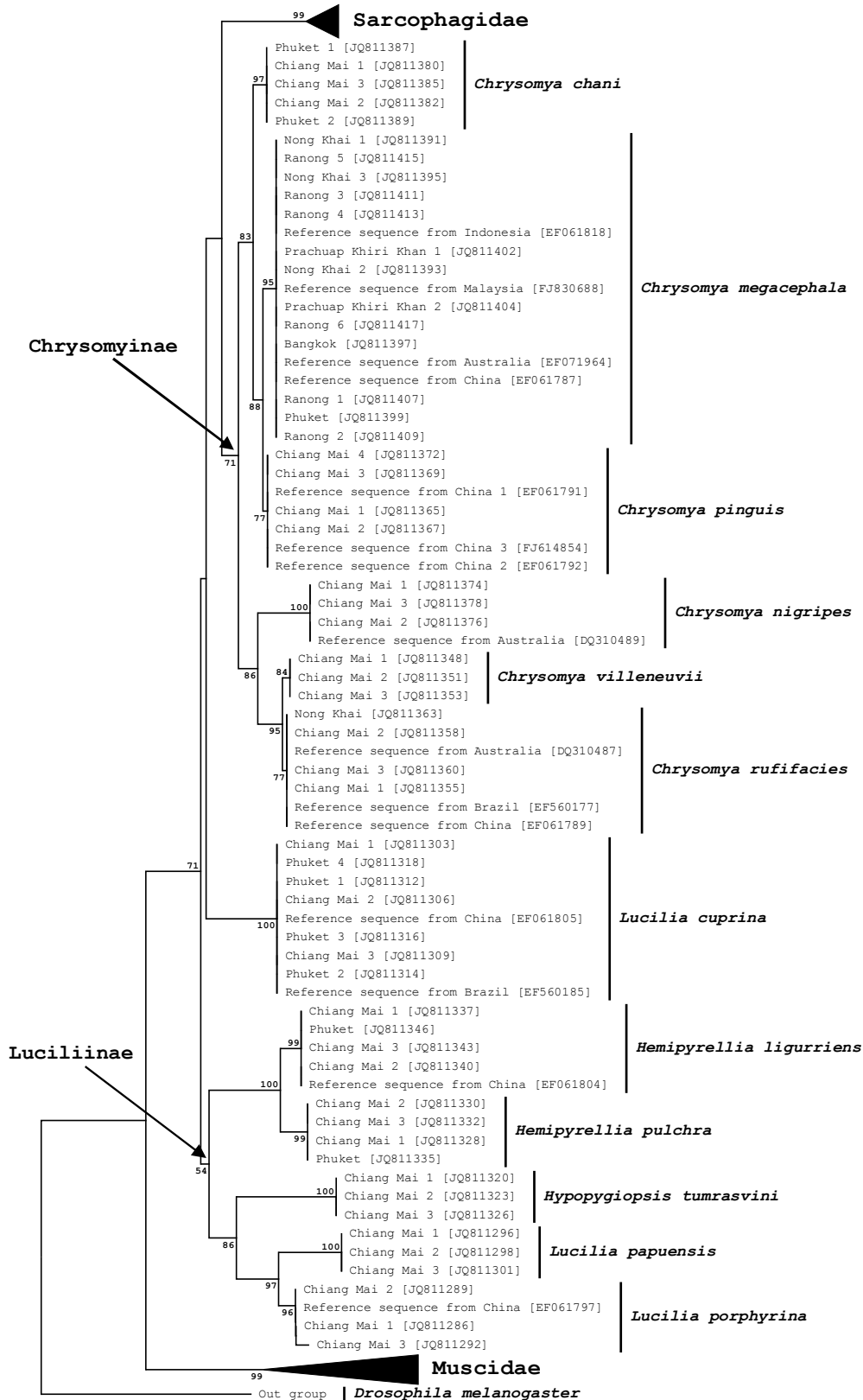


ภาพที่ 4.2 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae Calliphoridae และ Muscidae จากการใช้ Neighbor-Joining method แบบ Kimura 2-Parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test เท่ากับ 1000

ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae พบว่าแมลงวันหลังลายทั้ง 4 สายพันธุ์คือ *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga scopariiformis* ถึงแม้จะอยู่ใน genus เดียวกันแต่ก็แยกเป็นกลุ่มเดี่ยวจากกันอย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 83-99% นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างในสายพันธุ์เดียวกันทั้งที่มาจากพื้นที่ต่างกันในประเทศไทยและต่างประเทศถูกรวมเป็น clade เดียวกันอย่างสมบูรณ์ และทั้งหมดถูกรวมเป็น monophyletic node ด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 99% โดยอยู่ใน clade เดียวกับวงศ์ Calliphoridae (ภาพที่ 4.3)



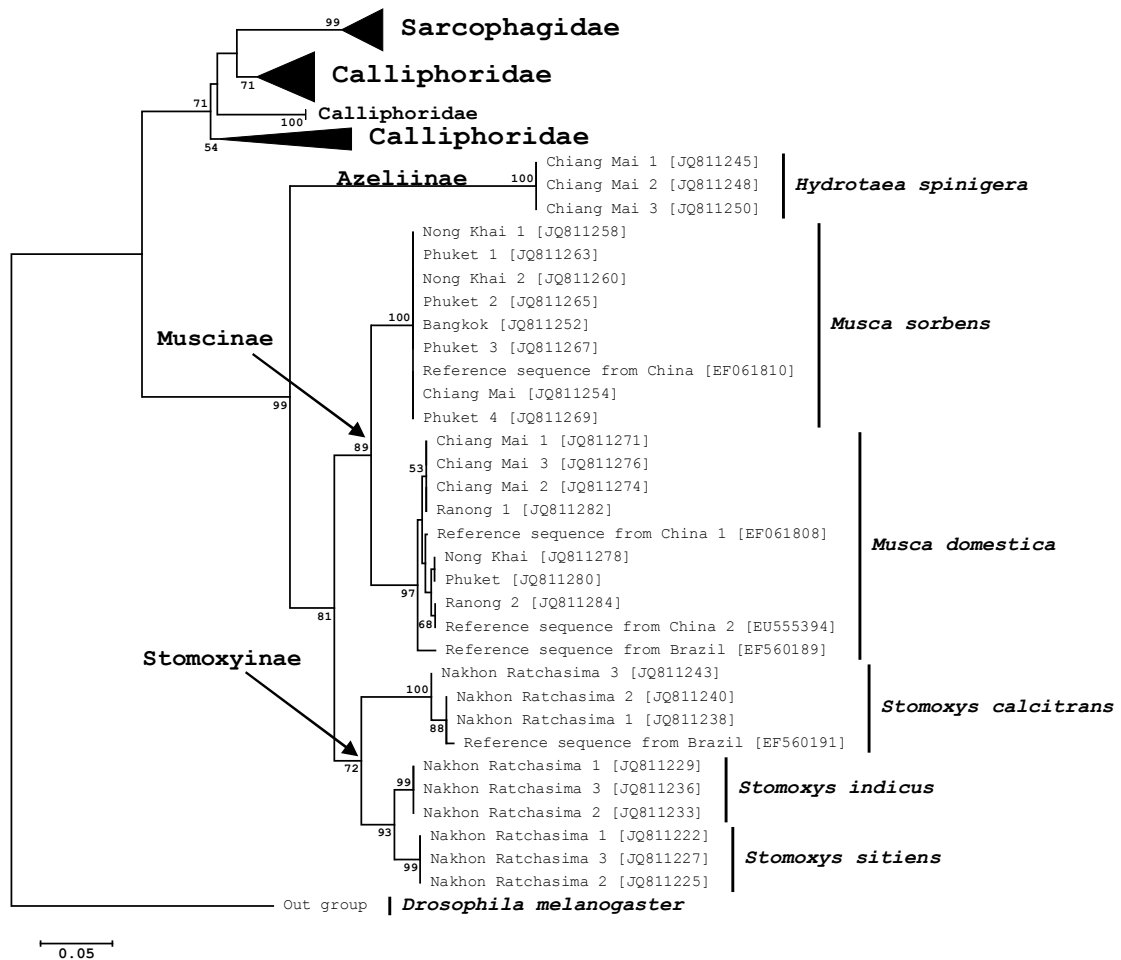
ภาพที่ 4.3 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae จากการใช้ Neighbor-Joining method แบบ Kimura 2-Parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test เท่ากับ 1000



ภาพที่ 4.4 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Calliphoridae จากการใช้ Neighbor-Joining method แบบ Kimura 2-Parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test เท่ากับ 1000

จาก cladogramme ดังภาพที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันในวงศ์ Calliphoridae ถูกแยกเป็น polyphyly โดยทั้งหมดถูกแบ่งเป็น clade อย่างชัดเจนระหว่างวงศ์ย่อย Chrysomyinae ได้แก่ *Chrysomya chani*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya villeneuvei*, *Chrysomya rufifacies* และวงศ์ย่อย Luciliinae ได้แก่ *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* ยกเว้น *Lucilia cuprina* ที่ควรจะอยู่ใน clade เดียวกันกับวงศ์ย่อย Luciliinae แต่แยกออกมาเป็น clade เดี่ยวด้วยค่า bootstrap test 100% โดยที่แต่ละสปีชีส์ทั้งที่มาจากต่างพื้นที่ในประเทศไทยและต่างประเทศต่างถูกแยกเป็น clade เดี่ยวอย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 77-100% ทั้งนี้ทุก clade ของแมลงวันวงศ์นี้ยังรวมกันเป็น monophyly อยู่ใน node เดียวกันแยกจากวงศ์ Muscidae อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 71% โดยมีวงศ์ Sarcophagidae รวมอยู่ใน node นี้ด้วย

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันในวงศ์ Muscidae ดัง cladogramme ในภาพที่ 4.5 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 สามารถแยกแมลงวันวงศ์ Muscidae ออกเป็น 3 clade ของวงศ์ย่อยอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วย clade ของวงศ์ย่อย Azeliinae (bootstrap test 100%) ได้แก่ *Hydrotaea spinigera* clade วงศ์ย่อย Muscinae (bootstrap test 89%) ได้แก่ *Musca domestica* กับ *Musca sorbens* และ clade ของวงศ์ย่อย Stomoxyinae (bootstrap test 72%) ได้แก่ *Stomoxys calcitrans*, *Stomoxys indicus* และ *Stomoxys sitiens* นอกจากนี้ยังพบว่าแต่ละสปีชีส์ทั้งที่มาจากต่างพื้นที่ในประเทศไทยและต่างประเทศต่างถูกรวมแยกเป็น clade อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 97-100% ถึงแม้ clade ของ *Musca domestica* และ *Stomoxys calcitrans* จะถูกจัดเป็น paraphyly แต่ทั้งหมดก็อยู่ใน clade เดียวกันด้วยค่า bootstrap test 97% และ 100% ตามลำดับ ทั้งนี้ทุกตัวอย่างของแมลงวันวงศ์นี้ยังรวมกันเป็น monophyly อยู่ใน node เดียวกันด้วยค่า bootstrap test 99% อีกด้วย



ภาพที่ 4.5 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมบนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Muscidae จากการใช้ Neighbor-Joining method แบบ Kimura 2-Parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test เท่ากับ 1000

4.8 ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 โคลนจากแต่ละตัวอย่างแมลงวันมา align เทียบกัน โดยใช้แอฟริเคชั่น Clustal W version 2.0 [106] ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.0.5.3 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากแต่ละซ้ำในแมลงวันตัวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน (ไม่ได้แสดงผล) และตัวอย่างแมลงวันบางสายพันธุ์ที่มาจากจังหวัดเดียวกันมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน ได้แก่ *Sarcophaga dux* จากเชียงใหม่และภูเก็ต *Musca domestica* จากเชียงใหม่และระนอง *Lucilia porphyrina* จากเชียงใหม่ *Stomoxys calcitrans* และ *Stomoxys indicus* จากนครราชสีมา (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นจึงเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างละหนึ่งซ้ำจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความต่างกันจากแต่ละจังหวัดในแต่ละสายพันธุ์มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์ (intraspecific divergence) ทั้งที่มาจากพื้นที่เดียวกันในประเทศไทยและจากต่างประเทศ รวมทั้งความต่างระหว่างสายพันธุ์ (interspecific divergence) ที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน

โดยใช้โหมด sequence identity matrix ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.0.5.3 ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 4.3, 4.4 และ 4.5 แยกตามแต่ละวงศ์ คือ Sarcophagidae Calliphoridae และ Muscidae ตามลำดับ พบว่าในวงศ์ Sarcophagidae เปอร์เซ็นต์ intraspecific divergence ในประเทศไทยของ *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga scopariiformis* เท่ากับ 0-0.3%, 0% และ 0% ใน *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga ruficornis* และ *Sarcophaga peregrine* ตามลำดับ ส่วน *Sarcophaga scopariiformis* สรุปไม่ได้เนื่องจากไม่มีตัวอย่างเปรียบเทียบ เมื่อเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายพันธุ์ในต่างประเทศพบว่าเท่ากับ 0-1.5%, 0.3%, 2.1% และ 0.4% ใน *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga scopariiformis* ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ในขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific divergence ในวงศ์ Calliphoridae พบว่าไม่มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์ (intraspecific divergence เท่ากับ 0%) ในแมลงวัน *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya chani*, *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya villeneuvii*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini* และ *Lucilia papuensis* ยกเว้น *Lucilia cuprina* และ *Lucilia porphyrina* มีค่า intraspecific divergence เท่ากับ 0-0.4% และ 3.4% ตามลำดับ เมื่อเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายพันธุ์ในต่างประเทศพบว่ามีค่า 0-1.4%, 0-1%, 0-0.4%, 0.4% และ 1.4-3.4% ใน *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya rufifacies*, *Lucilia cuprina* และ *Lucilia porphyrina* ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างในแมลงวันสปีชีส์ *Chrysomya nigripes* และ *Hemipyrellia ligurriens* ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific divergence ในแมลงวันสปีชีส์ที่เหลือคือ *Chrysomya chani*, *Chrysomya villeneuvii*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini* และ *Lucilia papuensis* สรุปผลไม่ได้เนื่องจากไม่มีข้อมูลเปรียบเทียบ (ตารางที่ 4.4)

แมลงวันในวงศ์ Muscidae พบว่าไม่มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์ (intraspecific divergence เท่ากับ 0%) ในแมลงวัน *Hydrotaea spinigera*, *Musca sorbens* และ *Stomoxys sitiens* ในขณะที่ *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans* และ *Stomoxys indicus* มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์เท่ากับ 0.3-6.9%, 0.7-2.2% และ 1-3.5% ตามลำดับ ในขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์ intraspecific divergence เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ในต่างประเทศพบว่า *Musca domestica* และ *Stomoxys calcitrans* มีเปอร์เซ็นต์ intraspecific divergence เท่ากับ 0.6-6.4% และ 2.8-3.7% ตามลำดับ โดยที่ไม่พบความต่างภายในสายพันธุ์ระหว่างประเทศใน *Musca sorbens* ทั้งนี้ *Hydrotaea spinigera*, *Stomoxys indicus* และ *Stomoxys sitiens* ไม่มีข้อมูลเปรียบเทียบจาก NCBI (ตารางที่ 4.5)

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	
[1]	-																						
[2]	0.3	-																					
[3]	0	0.3	-																				
[4]	0.3	0	0.3	-																			
[5]	0.3	0	0.3	0	-																		
[6]	0	0.3	0	0.3	0.3	-																	
[7]	0.3	0	0.3	0	0	0.3	-																
[8]	0.3	0	0.3	0	0	0.3	0	-															
[9]	0.3	0	0.3	0	0	0.3	0	0	-														
[10]	1.5	1.2	1.5	1.2	1.2	1.5	1.2	1.2	1.2	-													
[11]	0.7	0.9	0.7	0.9	0.9	0.7	0.9	0.9	0.9	2.1	-												
[12]	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	12.9	12.4	-											
[13]	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	12.9	12.4	0	-										
[14]	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	12.9	12.4	0	0	-									
[15]	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	12.9	12.4	0	0	0	-								
[16]	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	12.9	12.4	0	0	0	0	-							
[17]	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	13.1	12.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	-						
[18]	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8	20	-					
[19]	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8	20	0	-				
[20]	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.6	2.1	2.1	-			
[21]	11.6	11.9	11.6	11.9	11.9	11.6	11.9	11.9	11.9	13.0	11.6	19.2	19.2	19.2	19.2	19.2	19.4	16.8	16.8	15.7	-		
[22]	11.9	12.2	11.9	12.2	12.2	11.9	12.2	12.2	12.2	13.3	11.9	19.2	19.2	19.2	19.2	19.2	19.4	16.8	16.8	15.7	0.4	-	

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae

- [1-11] *Sarcophaga dux* จากกรุงเทพฯ (SdBK1), เชียงใหม่ 1 (SdCM1,3), เชียงใหม่ 2 (SdCM2,4), หอนอกชาย (SdNK1,2), ประจวบคีรีขันธ์ (SdPC1,2), ภูเก็ต 1 (SdPK1,4), ภูเก็ต 2 (SdPK3,4), ระนอง (SdRN1), จีน 1 (EF061818), จีน 2 (EF061819), จีน 3 (EF061820)
- [12-17] *Sarcophaga ruficornis* จากกรุงเทพฯ (SrBK1,2), เชียงใหม่ (SrCM1-3), หอนอกชาย (SrNK1), นนทบุรี (SrNT1-3), ภูเก็ต (SrPK1,2), จีน (EF061832)
- [18-20] *Sarcophaga peregrina* จากเชียงใหม่ (SpCM1-3), ระนอง (SdRN1), จีน (EF061846)
- [21-22] *Sarcophaga scopariiformis* จากระนอง (SscRN1), จีน (EF061834)

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]	[29]	[30]	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]	[36]	[37]	[38]	
[1]	-																																						
[2]	0	-																																					
[3]	0	0	-																																				
[4]	0	0	0	-																																			
[5]	0	0	0	0	-																																		
[6]	0	0	0	0	0	-																																	
[7]	0	0	0	0	0	0	-																																
[8]	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	-																															
[9]	0	0	0	0	0	0	0	1.4	-																														
[10]	12.4	12.4	12.4	12.4	12.4	12.4	12.4	13.5	12.4	-																													
[11]	12.4	12.4	12.4	12.4	12.4	12.4	12.4	13.5	12.4	0	-																												
[12]	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	18.8	17.8	17.4	17.4	-																											
[13]	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	18.8	17.8	17.4	17.4	0	-																										
[14]	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	4.6	3.3	10.9	10.9	16.9	16.9	-																									
[15]	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	4.9	3.6	11.8	11.8	17.1	17.1	1.0	-																								
[16]	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	4.6	3.3	11.5	11.5	16.9	16.9	0.7	0.4	-																							
[17]	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	4.6	3.3	10.9	10.9	16.9	16.9	0	1.0	0.7	-																						

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ของแมลงวันวงศ์ Calliphoridae

- [1-9] *Chrysomya megacephala* จากหนองคาย (CmNK1-3), กรุงเทพฯ (CmBK1), ภูเก็ต (CmPK1), ประจวบคีรีขันธ์ (CmPC1,2), ระนอง (CmRN1-6), มาเลเซีย (FJ830688), ออสเตรเลีย (EF071964), อินโดนีเซีย (EF061818), จีน (EF061787)
- [10-11] *Chrysomya chani* จากเชียงใหม่ (CcCMI-3), ภูเก็ต (CcPK1,2)
- [12-13] *Chrysomya nigripes* จากเชียงใหม่ (CnCMI-3), ออสเตรเลีย (DQ310489)
- [14-17] *Chrysomya pinguis* เชียงใหม่ (CpCMI-4), จีน 1 (EF061791), จีน 2 (EF061792), จีน 3 (FJ614854)
- [18-22] *Chrysomya rufifacies* จากเชียงใหม่ (CrCMI-3), หนองคาย (CrNK1), จีน (EF061789), บราซิล (EF560177), ออสเตรเลีย (DQ310487)

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]	[29]	[30]	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]	[36]	[37]	[38]	
[18]	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	18.8	17.7	17.0	17.0	13.9	13.9	15.8	15.5	15.8	15.8	-																					
[19]	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	18.8	17.7	17.0	17.0	13.9	13.9	15.8	15.5	15.8	15.8	0	-																				
[20]	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	18.8	17.7	17.0	17.0	13.9	13.9	15.8	15.5	15.8	15.8	0	0	-																			
[21]	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	18.8	17.7	17.0	17.0	13.9	13.9	15.8	15.5	15.8	15.8	0	0	0	-																		
[22]	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	17.2	17.2	14.1	14.1	16.1	15.8	16.1	16.1	0.4	0.4	0.4	0.4	-																	
[23]	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	18.0	16.9	16.8	16.8	14.0	14.0	15.0	15.6	15.4	15.0	3.8	3.8	3.8	3.8	4.1	-																
[24]	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.4	36.1	35.6	35.6	35.3	35.3	36.2	36.4	36.2	36.2	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	34.4	-															
[25]	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.4	36.1	35.6	35.6	35.3	35.3	36.2	36.4	36.2	36.2	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	34.4	0	-														
[26]	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.1	36.4	36.1	35.6	35.6	35.3	35.3	36.2	36.4	36.2	36.2	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	34.4	0	0	-													
[27]	36.5	36.5	36.5	36.5	36.5	36.5	36.5	36.8	36.5	35.9	35.9	36.5	36.5	36.7	36.8	36.7	36.7	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.7	11.6	11.6	11.6	-												
[28]	36.5	36.5	36.5	36.5	36.5	36.5	36.5	36.8	36.5	35.9	35.9	36.5	36.5	36.7	36.8	36.7	36.7	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.7	11.6	11.6	11.6	0	-											
[29]	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.0	39.6	41.4	41.4	42.6	42.6	40.2	40.2	40.0	40.2	40.7	40.7	40.7	40.7	40.7	40.6	34.0	34.0	34.0	33.3	33.3	-										
[30]	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	35.2	35.2	36.1	36.1	33.4	33.1	33.4	33.4	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.9	25.9	25.9	25.9	26.8	26.8	37.3	-									
[31]	34.1	34.1	34.1	34.1	34.1	34.1	34.1	34.1	34.1	35.5	35.5	36.1	36.1	33.7	33.4	33.7	33.7	34.3	34.3	34.3	34.3	34.3	35.2	25.9	25.9	25.9	26.8	26.8	37.5	0.4	-								
[32]	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	35.2	35.2	36.1	36.1	33.4	33.1	33.4	33.4	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.9	25.9	25.9	25.9	26.8	26.8	37.3	0	0.4	-							
[33]	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	35.2	35.2	36.1	36.1	33.4	33.1	33.4	33.4	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.9	25.9	25.9	25.9	26.8	26.8	37.3	0	0.4	0	-						
[34]	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	33.9	35.2	35.2	36.1	36.1	33.4	33.1	33.4	33.4	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.9	25.9	25.9	25.9	26.8	26.8	37.3	0	0.4	0	0	-					
[35]	39.9	39.9	39.9	39.9	39.9	39.9	39.9	39.3	39.9	39.3	39.3	40.4	40.4	39.3	39.5	39.3	39.3	38.9	38.9	38.9	38.9	38.9	39.0	32.5	32.5	32.5	32.4	32.4	28.0	36.8	37.1	36.8	36.8	36.8	-				
[36]	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	37.9	38.5	39.1	39.1	41.5	41.5	39.1	39.1	38.9	39.1	39.1	39.1	39.1	39.1	39.1	38.7	30.9	30.9	30.9	31.2	31.2	22.1	34.7	35.0	34.7	34.7	34.7	17.3	-			
[37]	39.8	39.8	39.8	39.8	39.8	39.8	39.8	39.2	39.8	40.3	40.3	43.1	43.1	39.9	39.9	39.7	39.9	40.2	40.2	40.2	40.2	40.2	40.0	30.7	30.7	30.7	31.9	31.9	24.0	34.3	34.6	34.3	34.3	34.3	19.7	3.4	-		
[38]	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3	38.0	38.3	38.6	38.6	41.1	41.1	38.9	38.9	38.7	38.9	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7	38.5	30.4	30.4	30.4	31.3	31.3	23.0	34.8	35.1	34.8	34.8	34.8	18.5	1.4	3.4	-	

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

- | | | | |
|---------|---|---------|--|
| [23] | <i>Chrysomya villeneuvei</i> จากเชียงใหม่ (CvCM1-3) | [30-34] | <i>Lucilia cuprina</i> จากเชียงใหม่ (LcCM1-3), ภูเก็ต 1 (LcPK1), ภูเก็ต 2 (LcPK2-4), |
| [24-26] | <i>Hemipyrellia ligurriens</i> จากเชียงใหม่ (HICM1-3), ภูเก็ต (HIPK1), จีน (EF061804) | | จีน (EF061805), บราซิล (EF560185) |
| [27-28] | <i>Hemipyrellia pulchra</i> จากเชียงใหม่ (HpCM1-3), ภูเก็ต (HpPK1) | [35] | <i>Lucilia papuensis</i> จากเชียงใหม่ (LpaCM1-3) |
| [29] | <i>Hypopygiopsis tumrasvini</i> จากเชียงใหม่ (HICM1-3) | [36-38] | <i>Lucilia porphyrina</i> จากเชียงใหม่ 1 (LpoCM1,2), เชียงใหม่ 2 (LpoCM3), จีน (EF06179) |

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	
[1]	-																								
[2]	1.8	-																							
[3]	0.9	0.9	-																						
[4]	4.5	6.1	5.3	-																					
[5]	4.2	5.9	5.0	0.3	-																				
[6]	0.3	2.0	1.2	4.8	4.5	-																			
[7]	5.3	6.9	6.1	1.4	1.2	5.6	-																		
[8]	4.8	6.4	5.6	0.9	0.6	5.1	1.7	-																	
[9]	1.8	3.5	2.6	5.6	5.3	2.1	4.8	5.9	-																
[10]	5.3	5.3	4.5	2.5	2.3	5.6	3.3	2.8	6.4	-															
[11]	20.0	19.8	19.2	20.5	20.8	20.3	21.2	20.8	20.0	20.2	-														
[12]	20.0	19.8	19.2	20.5	20.8	20.3	21.2	20.8	20.0	20.2	0	-													
[13]	20.0	19.8	19.2	20.5	20.8	20.3	21.2	20.8	20.0	20.2	0	0	-												
[14]	20.0	19.8	19.2	20.5	20.8	20.3	21.2	20.8	20.0	20.2	0	0	0	-											
[15]	20.0	19.8	19.2	20.5	20.8	20.3	21.2	20.8	20.0	20.2	0	0	0	0	-										
[16]	43.8	43.1	43.5	45.3	45.0	44.0	45.3	45.0	43.8	44.8	46.4	46.4	46.4	46.4	46.4	-									
[17]	32.2	31.3	31.9	34.2	33.9	32.2	34.1	33.9	32.2	33.7	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	41.9	-								
[18]	32.5	31.6	32.2	34.5	34.2	32.5	34.4	34.2	32.5	33.9	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	41.9	0.7	-							
[19]	32.3	31.4	32.0	34.3	34.0	32.3	34.2	34.0	32.3	33.7	32.5	32.5	32.5	32.5	32.5	42.2	2.2	2.2	-						
[20]	33.1	32.5	33.1	35.1	34.8	33.1	35.0	34.8	33.1	34.8	33.7	33.7	33.7	33.7	33.7	41.1	3.4	2.8	3.7	-					
[21]	31.2	30.7	31.2	33.3	33.0	31.2	33.0	33.0	31.0	33.0	31.9	31.9	31.9	31.9	31.9	43.1	23.7	23.9	23.2	24.1	-				
[22]	30.6	30.0	30.6	32.7	32.4	30.6	32.2	32.4	30.1	32.4	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	42.6	23.5	23.8	23.3	24.2	2.6	-			
[23]	30.6	30.0	30.6	32.7	32.4	30.9	32.2	32.4	30.1	32.4	31.2	31.2	31.2	31.2	31.2	42.8	24.1	24.4	23.9	24.8	3.5	1.0	-		
[24]	33.5	32.9	33.5	35.4	35.2	33.5	34.9	35.2	33.2	35.2	34.7	34.7	34.7	34.7	34.7	44.1	25.6	25.8	25.3	26.2	10.9	12.1	12.7	-	

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ของแมลงวันวงศ์ Muscidae

- [1-10] *Musca domestica* จากเชียงใหม่ 1 (*Md*CM1), เชียงใหม่ 2 (*Md*CM2), เชียงใหม่ 3 (*Md*CM3) หนองคาย (*Md*NK1), ภูเก็ต (*Md*PK1), ระนอง 1 (*Md*RN1), ระนอง 2 (*Md*RN2), จิน 1 (EF061808), จิน 2 (EU555394), บราซิล (EF560189)
- [11-15] *Musca sorbens* จากกรุงเทพฯ (*Ms*BK1), เชียงใหม่ (*Ms*CM1), หนองคาย (*Ms*NK1,2), ภูเก็ต (*Ms*PK1-4), จิน (EF061810)
- [16] *Hydrotaea spinigera* จากเชียงใหม่ (*Hs*CM)
- [17-20] *Stomoxys calcitrans* จากนครราชสีมา 1 (*Sc*KR1), นครราชสีมา 2 (*Sc*KR2), นครราชสีมา 3 (*Sc*KR3), บราซิล (EF560191)
- [21-23] *Stomoxys indicus* จากนครราชสีมา 1 (*Si*KR1), นครราชสีมา 2 (*Si*KR2), นครราชสีมา 3 (*Si*KR3)
- [24] *Stomoxys sitiens* นครราชสีมา (*Ss*KR1-3)

จากการวิเคราะห์ความต่างระหว่างสายพันธุ์ (interspecific divergence) ของแมลงวันภายในแต่ละวงศ์พบว่า วงศ์ Sarcophagidae เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Sarcophaga dux* เทียบกับ *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga scopariiformis* เท่ากับ 11.8%, 12.1%, และ 11.6% ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Sarcophaga ruficornis* กับ *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga scopariiformis* เท่ากับ 19.8% และ 19.2% ตามลำดับ และระหว่าง *Sarcophaga peregrine* กับ *Sarcophaga scopariiformis* เท่ากับ 16.8% (ตารางที่ 4.3)

ในวงศ์ Calliphoridae ผลการวิเคราะห์ความต่างระหว่างสายพันธุ์ (interspecific divergence) พบว่าเปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Chrysomya megacephala* กับ *Chrysomya chani*, *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya villeneuvei*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 12.4%, 17.8%, 3.3%, 17.7%, 16.9%, 36.1%, 36.5%, 39.6%, 33.9-34.1% (เฉลี่ย 33.96%), 39.9% และ 38.5-39.8% (เฉลี่ย 39.15%) ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Chrysomya chani* กับ *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya villeneuvei*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis*, *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 17.4%, 10.9%, 17%, 16.8%, 35.6%, 35.9%, 41%, 35.2-35.5% (เฉลี่ย 35.3%), 39.3% และ 39.1-40.3% (เฉลี่ย 39.7%) ตามลำดับ โดยที่เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Chrysomya nigripes* กับ *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya villeneuvei*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 16.9%, 13.9%, 14%, 35.3%, 36.5%, 42.6%, 36.1%, 40.4% และ 41.5-43.1% (เฉลี่ย 42.3%) ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Chrysomya pinguis* กับ *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya villeneuvei*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 15.8%, 15%, 36.2%, 36.7%, 40.2%, 33.4-33.7% (เฉลี่ย 33.5%), 39.3% และ 39.1-39.9% (เฉลี่ย 39.5%) ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่า เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya villeneuvei*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 3.8%, 33.1%, 34.9%, 40.7%, 34.2-34.3% (เฉลี่ย 34.1%), 38.9% และ 39.1-40.2% (เฉลี่ย 39.65%) ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Chrysomya villeneuvei* กับ *Hemipyrellia ligurriens*,

Hemipyrellia pulchra, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 34.4%, 34.7%, 40.6%, 34.9-35.2% (เฉลี่ย 35%), 39% และ 38.7-40 (เฉลี่ย 39.35%) ตามลำดับ โดยที่เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Hemipyrellia ligurriens* กับ *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 11.6%, 34%, 25.9%, 32.5% และ 30.7-30.9% (เฉลี่ย 30.8%) ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันเปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Hemipyrellia pulchra* กับ *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 33.3%, 26.8%, 32.4% และ 31.2-31.9% (เฉลี่ย 31.55%) ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Hypopygiopsis tumrasvini* กับ *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 37.3-37.5% (เฉลี่ย 37.4%), 28% และ 22.1-24% (เฉลี่ย 23.05%) ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Lucilia cuprina* กับ *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 36.8-37.1% (เฉลี่ย 36.9%) และ 34.3-35 (เฉลี่ย 34.6%) ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Lucilia papuensis* กับ *Lucilia porphyrina* เท่ากับ 17.3-19.7% (เฉลี่ย 18.5%) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

จากตารางที่ 4.5 พบว่า ผลการวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่างสายพันธุ์แมลงวัน (interspecific divergence) ในวงศ์ Muscidae เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Musca domestica* กับ *Musca sorbens*, *Hydrotaea spinigera*, *Stomoxys calcitrans*, *Stomoxys indicus* และ *Stomoxys sitiens* เท่ากับ 19.2-21.2% (เฉลี่ย 20.25%), 43.1-45.3% (เฉลี่ย 44.28%), 31.3-34.5% (เฉลี่ย 32.96%), 30.0-33.3% (เฉลี่ย 31.51%) และ 32.9-35.4% (เฉลี่ย 34.12) ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Musca sorbens* กับ *Hydrotaea spinigera*, *Stomoxys calcitrans*, *Stomoxys indicus* และ *Stomoxys sitiens* เท่ากับ 46.4%, 32.5-33.0% (เฉลี่ย 32.7%), 30.9-31.9% (เฉลี่ย 31.33%) และ 34.7% ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Hydrotaea spinigera* กับ *Stomoxys calcitrans*, *Stomoxys indicus* และ *Stomoxys sitiens* เท่ากับ 41.9-42.2% (เฉลี่ย 42%), 42.6-43.1% (เฉลี่ย 42.8%) และ 44.1% ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Stomoxys calcitrans* กับ *Stomoxys indicus* และ *Stomoxys sitiens* เท่ากับ 23.2-24.4% (เฉลี่ย 23.75%) และ 25.3-25.8 (เฉลี่ย 25.56%) ตามลำดับ โดยที่เปอร์เซ็นต์ interspecific divergence ระหว่าง *Stomoxys indicus* กับ *Stomoxys sitiens* เท่ากับ 10.9-12.7% (เฉลี่ย 11.9%) ตามลำดับ

4.9 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

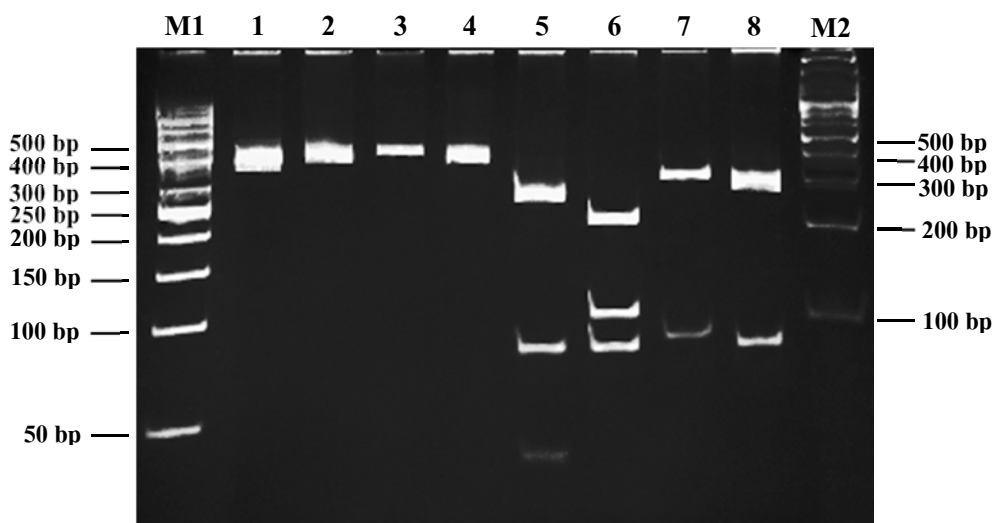
จากการทำนายเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ความหลากหลายในสายพันธุ์แมลงวันวงศ์ Sarcophagidae พร้อมทั้งขนาดและจำนวนของชิ้น DNA ที่จะถูกตัดได้โดยใช้โปรแกรม NEBcutter version 2.0 พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมคือเอนไซม์ *DraI* และ *PsiI*

โดยที่ผลิตภัณฑ์จากการย่อยของเอนไซม์ *DraI* ให้จำนวนชิ้น DNA จำนวน 2 ชิ้นใน *Sarcophaga peregrina* (85 และ 316 bp) และ *Sarcophaga scopariiformis* (79 และ 292 bp) และให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้นใน *Sarcophaga dux* (49, 79 และ 273 bp) และ *Sarcophaga ruficornis* (79, 100 และ 215 bp) ในขณะที่ผลิตภัณฑ์จากการย่อยของเอนไซม์ *PsiI* ให้จำนวนชิ้น DNA จำนวน 2 ชิ้นใน *Sarcophaga dux* (94 และ 298 bp) และ *Sarcophaga peregrina* (98 และ 303 bp) และให้จำนวนชิ้น DNA 3 ชิ้นใน *Sarcophaga ruficornis* (67, 111 และ 216 bp) และ *Sarcophaga scopariiformis* (95, 95 และ 181 bp) (ตารางที่ 4.6)

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ถูกตัดแล้วมาตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วย 8 % native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 volt เป็นเวลา 75 นาที แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่ามีรูปแบบและจำนวนชิ้น DNA ตรงกับการทำนายด้วยโปรแกรม NEBcutter version 2.0 (ภาพที่ 4.6 และ 4.7) ยกเว้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Sarcophaga scopariiformis* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PsiI* ปรากฏจำนวนชิ้น DNA บนเจลเพียง 2 แถบเนื่องจากขนาดชิ้นส่วน DNA ที่ขนาดเท่ากันจะไม่สามารถแยกได้ด้วย 8% PAGE

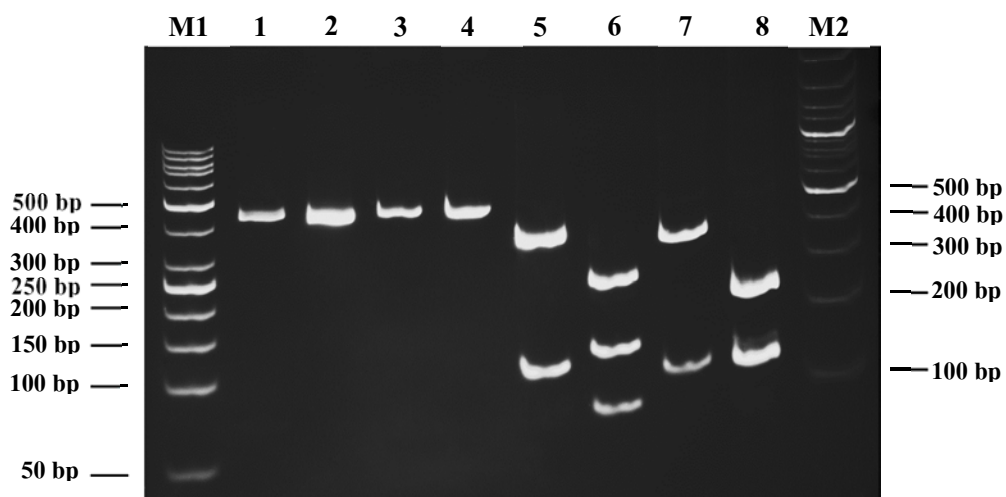
สายพันธุ์แมลงวัน	ขนาด (bp) และจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์	
	<i>DraI</i>	<i>PsiI</i>
<i>Sarcophaga dux</i>	49, 79, 273	94, 298
<i>Sarcophaga ruficornis</i>	79, 100, 215	67, 111, 216
<i>Sarcophaga peregrina</i>	85, 316	98, 303
<i>Sarcophaga scopariiformis</i>	79, 292	95, 95, 181

ตารางที่ 4.6 ขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* และ *PsiI*



รูปที่ 4.6 ผลิตรหัสดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI*

- Lane M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder, Fermentas[®])
- Lane 1-4 คือ ผลิตรหัสดีเอ็นเอ PCR ที่ไม่ถูกย่อยของ *Sarcophaga dux*,
Sarcophaga ruficornis, *Sarcophaga peregrina* และ
Sarcophaga scopariiformis ตามลำดับ
- Lane 5-8 คือ ผลิตรหัสดีเอ็นเอ PCR ที่ถูกย่อยด้วย *DraI* ของ *Sarcophaga dux*,
Sarcophaga ruficornis, *Sarcophaga peregrina* และ
Sarcophaga scopariiformis ตามลำดับ
- Lane M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas[®])



รูปที่ 4.7 ผลิตรหัสพันธุกรรมที่ซีอาร์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PsiI*

- Lane M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50 bp DNA Ladder, Fermentas[®])
- Lane 1-4 คือ ผลิตรหัสพันธุกรรม PCR ที่ไม่ถูกย่อยของ *Sarcophaga dux*,
Sarcophaga ruficornis, *Sarcophaga peregrina* และ
Sarcophaga scopariiformis ตามลำดับ
- Lane 5-8 คือ ผลิตรหัสพันธุกรรม PCR ที่ถูกย่อยด้วย *PsiI* ของ *Sarcophaga dux*,
Sarcophaga ruficornis, *Sarcophaga peregrina* และ
Sarcophaga scopariiformis ตามลำดับ
- Lane M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas[®])

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

แมลงวันที่มีอยู่หลากหลายชนิด มีทั้งให้คุณและโทษต่อมนุษย์แตกต่างกันตามแต่สายพันธุ์ การจำแนกสายพันธุ์แมลงวันได้อย่างถูกต้องนั้น ไม่เพียงแต่เป็นประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ โดยช่วยให้สามารถกะเนค่า PMI ได้ใกล้เคียงที่สุดเท่านั้น ทว่ายังเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยในการรักษา โรคไม่เอชไอวีซึ่งมีพยาธิสภาพที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแมลงวันที่ก่อโรค รวมถึงการใช้แมลงวันในการรักษาแผลเนื้อตายซึ่งจำเป็นระบุสายพันธุ์ได้ถูกต้องเพื่อป้องกันการนำสายพันธุ์ที่เป็นอันตรายมาใช้ในการรักษา อนึ่งในงานปศุสัตว์ที่ประสบปัญหาแมลงวันดูดเลือดรบกวนและเป็นพาหะนำโรคสู่สัตว์เลี้ยง หนึ่งในหนทางแก้ปัญหาคือการบูรณาการวิธีป้องกันกำจัดแมลงเหล่านั้นอย่างถูกวิธี ซึ่งผลลัพธ์ขึ้นกับการเข้าใจชีววิทยา วงชีวิต และความจำเพาะต่อโฮสต์ของแมลงวันดูดเลือดที่มีความแตกต่างกันตามแต่สายพันธุ์ ดังนั้นความแม่นยำในการจำแนกสายพันธุ์จึงเข้ามาเป็นส่วนสำคัญในการแก้ปัญหาจุดนี้ได้ด้วย [69] การระบุสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับใช้จำแนกชนิดแมลงวัน ทว่าวิธีการดังกล่าว ไม่เพียงแต่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญอย่างสูงทางด้านอนุกรมวิธาน แต่ยังจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้ตัวอย่างที่มีความสมบูรณ์ด้วยงานวิจัยนี้แสดงอีกหนึ่งทางเลือกในการระบุสายพันธุ์แมลงวัน บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene บริเวณ ITS2 ในกรณีที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถระบุได้ชัดเจน

5.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

ตัวอย่างแมลงวันจำนวน 113 ตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ถูกจำแนกสายพันธุ์ด้วยสัณฐานวิทยาโดยผู้เชี่ยวชาญทางด้านกีฏวิทยา แบ่งเป็น 3 วงศ์ 22 สปีชีส์ คือ

วงศ์ Sarcophagidae จำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga scopariiformis*

วงศ์ Calliphoridae จำนวน 12 สปีชีส์ ได้แก่ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya villeneuvei*, *Chrysomya chani*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina*

วงศ์ Muscidae จำนวน 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Musca domestica*, *Musca sorbens*, *Hydrotaea spinigera*, *Stomoxys calcitrans*, *Stomoxys indica* และ *Stomoxys sitiens*

แมลงวันทั้งหมดถูกสกัดเอา genomic DNA แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA เฉพาะบริเวณ ITS2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS2 F (5' TGCTTGGACTACATATGGTTGA 3') และ ITS2 R (5' GTAGTCCCATATGAGTTGAGGTT 3') [99] พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 350-500 bp และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 2 โคลนที่มาจากแมลงวันตัวเดียวกัน เพื่อตรวจสอบโอกาสที่อาจพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ซึ่งอยู่ในยีนที่มีลักษณะเป็นกลุ่มซ้ำๆ บนสาย DNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากแต่ละซ้ำในแมลงวันตัวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ประกอบด้วยส่วนของยีน ITS2 และไพรเมอร์ทั้งสองข้าง โดยไพรเมอร์ ITS2 F และ ITS2 R คือลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนปลาย 3' ของยีน 5.8S และส่วนปลาย 5' ของ 28S rDNA ตามลำดับ จึงตัดบริเวณไพรเมอร์ทั้งสองออกจากส่วนที่เป็น ITS2 โดยยึดรูปแบบการตัดตามวิธีของ Tautz et al. [105] และ Song et al. [99] พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่ถูกตัดแต่งแล้วมีขนาดความยาวแตกต่างกันเล็กน้อยแม้กระทั่งในแมลงวันวงศ์เดียวกัน โดยที่วงศ์ Sarcophagidae มีขนาด 313-343 bp เฉลี่ย 335.18 bp ในขณะที่วงศ์ Calliphoridae มีขนาด 297-323 bp เฉลี่ย 312.08 bp วงศ์ Muscidae มีขนาด 312-377 bp เฉลี่ย 341.45 bp ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Song et al. [92] ซึ่งรายงานว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Sarcophagidae Calliphoridae และ Muscidae มีขนาดเฉลี่ย 337.6, 313.5 และ 353.7 bp ตามลำดับ

ทั้งนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันทั้ง 3 วงศ์มีจำนวนเบส A+T สูงอีกด้วย (80.5%, 80.8% และ 76.6% ในวงศ์ Sarcophagidae, Calliphoridae และ Muscidae ตามลำดับ) ซึ่งคล้ายกับแมลงวงศ์ Simuliidae (71-83.8%) [101], แมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* (80%) [105] แต่แตกต่างจากแมลงในกลุ่มอื่นที่มีจำนวนเบส G และ C สูง เช่น ยุง *Anopheles crucians* (56.12%) [107] และ *Culex quinquefasciatus* (58%) [108] โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ในการทดลองนี้ บริเวณที่มีจำนวนเบส A และ T สูงมีลักษณะเป็นเบส A/T เรียงซ้ำๆ กัน (repetition) ซึ่งลำดับการเรียงซ้ำๆ แบบนี้ไม่พบในเบส G และ C

เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าจากแมลงวันทั้งหมด 113 ตัวอย่าง ให้ผลในการระบุสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ตรงกับการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยา 89 ตัวอย่าง ด้วยค่า identity สูงถึง 93-100% โดยถูกแบ่งเป็น 3 วงศ์ 15 สปีชีส์ คือ

1) วงศ์ Sarcophagidae ได้แก่ *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga peregrina* และ *Sarcophaga scopariformis* มีค่า identity เหมือนกับฐานข้อมูลสูงถึง 99-100% และสามารถระบุสายพันธุ์ของแมลงวันได้อย่างชัดเจน

2) วงศ์ Calliphoridae ได้แก่ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya rufifacies*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Lucilia cuprina* เหมือนกับฐานข้อมูล 100% และ *Lucilia porphyrina* มีค่า identity สูงถึง 97-99% ซึ่งสามารถระบุสายพันธุ์ของแมลงวันได้อย่างชัดเจน

3) วงศ์ Muscidae ได้แก่ *Musca domestica* (identity 99%), *Musca sorbens* (identity 100%), *Stomoxys calcitrans* (identity 97-98%) และ *Stomoxys indicus* (identity 93-95%)

พบว่าสปีชีส์ *Stomoxys sitiens* ระบุสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ไม่ตรงกับการจำแนกโดยใช้ฐานข้อมูล โดยได้ผลตรงกับ *Stomoxys indicus* ด้วยค่า identity สูงถึง 90% แต่ผลการจำแนกตรงกับ *Stomoxys sitiens* ด้วยค่า identity เพียง 82% ทั้งนี้เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของ *Stomoxys sitiens* ในฐานข้อมูล (Accession no. EU851213) เป็นเพียงบางส่วนของบริเวณ ITS2 เท่านั้น (Query coverage เท่ากับ 88%) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกันจึงทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างคล้ายกับ *Stomoxys indicus* มากกว่าเพราะ *Stomoxys indicus* ที่มีฐานข้อมูลเป็นบริเวณ ITS2 ทั้งหมดและเป็นสายพันธุ์ใกล้ชิดเมื่อพิจารณาด้วยแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

ทั้งนี้แมลงวัน 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Chrysomya villeneuvei*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Chrysomya chani* *Lucilia papuensis* และ *Hydrotaea spinigera* ยังไม่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายจึงทำให้ไม่มีฐานข้อมูลใน NCBI ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันกลุ่มนี้ จึงเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันที่ใกล้เคียงที่สุดในฐานข้อมูล โดยที่ *Chrysomya chani* เหมือนกับ *Chrysomya megacephala* (identity 91%), *Chrysomya villeneuvei* เหมือนกับ *Chrysomya albiceps* (identity 98%) *Hemipyrellia pulchra* เหมือนกับ *Hemipyrellia ligurriens* (identity 93%) ในขณะที่ *Hypopygiopsis tumrasvini* เหมือนกับ *Lucilia porphyrina* (identity 88%) *Lucilia papuensis* เหมือนกับ *Lucilia bazini* (identity 95%) และ *Hydrotaea spinigera* เหมือนกับ *Stomoxys calcitrans* (identity 72%) พบว่าการจับคู่ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 5 สปีชีส์นี้ยังสนับสนุนผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมอีกด้วย โดยที่ *Chrysomya chani* เป็น sister group ของ *Chrysomya megacephala*, *Hemipyrellia pulchra* เป็น sister group ของ *Hemipyrellia ligurriens* และ *Hypopygiopsis tumrasvini* เป็น sister group ของ *Lucilia porphyrina*

จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมเพื่อแสดงถึงประสิทธิภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในการใช้แยกสายพันธุ์แมลงวัน พบว่าในระดับวงศ์ทั้ง Sarcophagidae และ Muscidae ถูกแยกเป็น monophyly อย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 99% ในขณะที่วงศ์ Calliphoridae มีลักษณะเป็น paraphyly นอกจากนี้ยังพบว่าวงศ์ Sarcophagidae และ Calliphoridae ถูกจัดเป็น

monophyly อยู่ใน node เดียวกันด้วยค่า bootstrap test 71% โดยมีวงศ์ Muscidae เป็น sister group ซึ่งผลการทดลองตรงกับรายงานของ Song et al. [92] ที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และรายงานของ Rognes [109] กับ Wells and Stevens [110] ที่ใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการจัดหมวดหมู่

ในระดับวงศ์ย่อย บริเวณ ITS2 สามารถแยกแยะลงวันออกเป็น 6 วงศ์ย่อยอย่างชัดเจน คือ

1) Sarcophaginae (วงศ์ Sarcophagidae) ประกอบด้วย *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga scopariiformis*

2) Chrysomyinae (วงศ์ Calliphoridae) ประกอบด้วย *Chrysomya chani*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya pinguis*, *Chrysomya nigripes*, *Chrysomya villeneuvei* และ *Chrysomya rufifacies*

3) Luciliinae (วงศ์ Calliphoridae) ประกอบด้วย *Hemipyrellia ligurriens*, *Hemipyrellia pulchra*, *Hypopygiopsis tumrasvini*, *Lucilia papuensis* และ *Lucilia porphyrina*, *Lucilia cuprina*

4) Azeliinae (วงศ์ Muscidae) ได้แก่ *Hydrotaea spinigera*

5) Muscinae (วงศ์ Muscidae) ประกอบด้วย *Musca domestica* และ *Musca sorbens*

6) วงศ์ย่อย Stomoxyinae (วงศ์ Muscidae) ประกอบด้วย *Stomoxys calcitrans*, *Stomoxys indicus* และ *Stomoxys sitiens*

พบว่าวงศ์ย่อย Sarcophaginae, Chrysomyinae, Azeliinae, Muscinae และ Stomoxyinae มีลักษณะเป็น monophyly ด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 71-100% ตรงข้ามกับวงศ์ย่อย Luciliinae ที่มีลักษณะเป็น paraphyly เนื่องจาก *Lucilia cuprina* ที่ควรจะอยู่ใน clade เดียวกันกับวงศ์ย่อย Luciliinae แต่แยกออกมาเป็น clade เดี่ยวด้วยค่า bootstrap test 100%

ในระดับสปีชีส์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของสายพันธุ์เดียวกันทั้งที่มาจากต่างพื้นที่ในประเทศไทยและต่างประเทศต่างถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกัน ถึงแม้จะพบความแตกต่างใน *Lucilia prophyrina*, *Musca domestica* และ *Stomoxys calcitrans* แต่ก็ไม่เป็นรูปแบบที่มีนัยสำคัญเนื่องจากพบที่เกิดความแตกต่างแม้กระทั่งภายในสายพันธุ์เดียวกันจากพื้นที่เดียวกัน และถึงแม้จะแตกต่างกันแต่ก็ยังถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกันด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 96-100% แต่กระนั้นกลับพบว่าแมลงวันทุกสปีชีส์ถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap test ตั้งแต่ 77% ถึง 100% ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของ ITS2 ในการจำแนกสายพันธุ์แมลงวันในระดับสปีชีส์ได้ แต่ไม่สามารถใช้แยกสปีชีส์เดียวกันที่มาจากต่างพื้นที่ได้

การวิเคราะห์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสปีชีส์ (intraspecific divergence) พบว่าส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์ทั้งที่มาจากต่างพื้นที่กัน มีเพียงแมลงวัน 5 สปีชีส์

ที่มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์ ได้แก่ *Sarcophaga dux*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia porphyrina*, *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans* และ *Stomoxys indicus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความต่างภายในสายพันธุ์เท่ากับ 0-0.3%, 0-0.4%, 3.4%, 0.3-6.9%, 0.7-2.2% และ 1-3.5% ตามลำดับ พบว่า *Musca domestica* มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์สูงที่สุดถึง 6.9% ซึ่งเกิดจากการ indel ของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้นๆ (ATATTC, ATAATA, ACT) โดยพบลักษณะเช่นเดียวกันนี้ในลำดับนิวคลีโอไทด์จากจีน (Accession no. EF061808) และบราซิล (Accession no. EF560189) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Song et al. [99] ที่พบว่า *Musca domestica* มีความแตกต่างภายในสายพันธุ์สูงถึง 5.34% และเกิดจากการ indel ของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้นๆ เช่นกัน ทั้งนี้ถึงแม้จะมีความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสปีชีส์ แต่จากการวิเคราะห์ทั้ง 6 สปีชีส์ในผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมพบว่า *Sarcophaga dux*, *Lucilia cuprina* และ *Stomoxys indicus* ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกันอย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap test 90% 100% และ 99% ตามลำดับ ถึงแม้จะพบลักษณะ paraphyly ในสปีชีส์ *Lucilia prophyrina*, *Musca domestica* และ *Stomoxys calcitrans* ทว่าแต่ละสปีชีส์ก็ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกันด้วยค่า bootstrap test สูงถึง 96-100% และแยกจาก sister group อย่างชัดเจน

เมื่อเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายพันธุ์ในต่างประเทศพบว่า มีค่า intraspecific divergence ตั้งแต่ 0-6.4% ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมพบว่าส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกับสายพันธุ์ภายในประเทศอย่างสมบูรณ์ ยกเว้น *Musca domestica* ที่มีเปอร์เซ็นต์ intraspecific divergence สูงที่สุด (6.4%) เกิดจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากบราซิล (accession no. EF560189) ซึ่งทำให้ clade ของ *Musca domestica* มีลักษณะเป็น paraphyly แยกสายพันธุ์จากบราซิลออกจากสายพันธุ์เอเชียอย่างชัดเจน

จากเหตุผลที่ว่า การจำแนกสายพันธุ์มีโอกาสผิดพลาดได้ง่ายหากแมลงวันทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกันมากหรือเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน [92] ซึ่งจากผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมและค่าความต่างระหว่างสายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันแสดงดังตารางที่ 5.1

วงศ์	คู่ของสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกัน		ค่าเฉลี่ยความต่างระหว่างสายพันธุ์ (%)
Sarcophagidae	<i>Sarcophaga. dux</i>	<i>Sarcophaga. scopariiformis</i>	11.6
	<i>Sarcophaga. dux</i>	<i>Sarcophaga. ruficornis</i>	11.8
	<i>Sarcophaga. dux</i>	<i>Sarcophaga. peregrine</i>	12.1
Calliphoridae	<i>Chrysomya megacephala</i>	<i>Chrysomya pinguis</i>	3.3
	<i>Chrysomya chani</i>	<i>Chrysomya pinguis</i>	10.9
	<i>Chrysomya nigripes</i>	<i>Chrysomya rufifacies</i>	13.9
	<i>Chrysomya villeneuveii</i>	<i>Chrysomya rufifacies</i>	3.8
	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	<i>Hemipyrellia pulchra</i>	11.6
	<i>Hypopygiopsis tumrasvini</i>	<i>Lucilia porphyrina</i>	23.0
	<i>Lucilia cuprina</i>	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	25.9
Muscidae	<i>Musca domestica</i>	<i>Musca sorbens</i>	20.2
	<i>Hydrotaea spinigera</i>	<i>Stomoxys calcitrans</i>	42.0
	<i>Stomoxys calcitrans</i>	<i>Stomoxys indicus</i>	23.7
	<i>Stomoxys indicus</i>	<i>Stomoxys sitiens</i>	11.9

ตารางที่ 5.1 ค่าความต่างระหว่างสายพันธุ์ (interspecific divergence) ของสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกัน

จากตารางที่ 5.1 พบว่าเปอร์เซ็นต์ความต่างระหว่างสายพันธุ์ต่ำที่สุด (3.3%) พบในคู่ของ *Chrysomya megacephala* กับ *Chrysomya pinguis* ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Song et al. [99] ที่รายงานว่า *Chrysomya megacephala* กับ *Chrysomya pinguis* เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันและมีความต่างระหว่างสายพันธุ์ 2.93% จากการวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Chrysomya megacephala* และ *Chrysomya pinguis* พบว่าความต่างเกิดจากการ indel ของเบส T 1 นิวคลีโอไทด์ (T) และ 4 นิวคลีโอไทด์ (TTTT) เกิดการ transition G↔ A 2 ตำแหน่งและ C↔ T 1 ตำแหน่ง ซึ่งถึงแม้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งคู่จะใกล้กันมากแต่ผลการเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเหมือนกับฐานข้อมูล 100% และผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมก็สามารถแยกทั้งสองสปีชีส์ออกจากกันได้อย่างชัดเจนด้วย bootstrap test 77-95% ทั้งนี้พบว่า *Chrysomya rufifacies* กับ *Chrysomya villeneuveii* มีผลที่ใกล้เคียงคู่ของ *Chrysomya megacephala* กับ *Chrysomya pinguis* มากโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 3.8% และผลการเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Chrysomya villeneuveii* กับฐานข้อมูลพบว่าเหมือนกับ *Chrysomya albiceps* มากกว่า *Chrysomya rufifacies* ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองนี้ไม่มีตัวอย่างของ *Chrysomya albiceps* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้กับ *Chrysomya villeneuveii* มากกว่า

Chrysomya rufifacies แสดงให้เห็นว่าการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ร่วมกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลนี้จำเป็นต้องมีการสะสมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกันให้มากที่สุดเพื่อให้การระบุสายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงสุด

Wells and Stevens [110] กล่าวว่า การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ค่าความต่างระหว่าง intra และ interspecific divergence เป็นตัวแปรความสำคัญในการจำแนกสายพันธุ์ใกล้เคียงกันออกจากกันเพราะหากค่า interspecific divergence น้อยกว่าค่า intraspecific divergence จะทำให้สายพันธุ์ใกล้เคียงกันถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกันได้ และผลการเปรียบเทียบระหว่างค่า intra และ interspecific divergence ในการทดลองนี้พบว่าสายพันธุ์ใกล้เคียงกันทุกคู่มีค่า interspecific divergence สูงกว่า intraspecific divergence

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการบอกความแตกต่างของสายพันธุ์แมลงวันหลังกลายในการทดลองนี้ ซึ่งแมลงวันดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่จำแนกด้วยลักษณะพื้นฐานออกจากกันได้ยาก พบว่าเอนไซม์ *DraI* ไม่เพียงแต่จะสามารถแยก *Sarcophaga dux* กับ *Sarcophaga ruficornis* ออกจาก *Sarcophaga peregrina* กับ *Sarcophaga scopariiformis* ได้ แต่ยังสามารถแยกทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยซันดิเอ็นที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจนอีกด้วย (49, 79, 273 bp ใน *Sarcophaga dux* และ 79, 100, 215 bp ใน *Sarcophaga ruficornis*) ในขณะที่การตัดจำเพาะของเอนไซม์ *PsiI* สามารถแยก *Sarcophaga ruficornis* กับ *Sarcophaga scopariiformis* ออกจาก *Sarcophaga dux* และ *Sarcophaga peregrina* และสามารถแยกทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยซันดิเอ็นที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจนด้วยเช่นเดียวกัน (67, 111, 216 bp ใน *Sarcophaga ruficornis* และ 95, 95, 181 bp ใน *Sarcophaga scopariiformis*) จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 มีความหลากหลายพอที่จะใช้จำแนกสายพันธุ์แมลงวันหลังกลายทั้งสี่ชนิดในการทดลองนี้ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ตาม จำเป็นจะต้องประยุกต์ใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิด (*DraI* and *PsiI*) ร่วมกัน เช่น อาจแยกแมลงออกเป็น 2 กลุ่ม โดยใช้เอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งก่อน แล้วจึงจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ผลของการตัดด้วยเอนไซม์ที่เหลือ

กล่าวโดยสรุป ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในการทดลองนี้ออกจากกันได้อย่างชัดเจนถึงระดับสปีชีส์ และผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา [67-68, 99] คือ ไม่สามารถใช้แยกสปีชีส์เดียวกันที่มาจากต่างพื้นที่ได้ชัดเจน อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมในการทดลองนี้ยังใช้บอกประสิทธิภาพของบริเวณ ITS2 ในการใช้แยกสายพันธุ์

แมลงวันได้ไม่ชัดเจน เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีจำนวนน้อย กอปรกับเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันไม่มาก จึงอาจทำให้ผลที่ได้เหมือนแมลงวันแต่ละสปีชีส์แยกจากกันได้ชัดเจน ดังนั้นการใช้แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมจำแนกสายพันธุ์จึงจำเป็นต้องมีการสะสมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกันให้มากที่สุดเพื่อให้การระบุสายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงสุด

ผลจากการใช้เทคนิค PCR-RFLP จำแนกสายพันธุ์แมลงวันหลังลายพบว่า สามารถแสดงถึงความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS2 ที่สามารถนำมาจำแนกสายพันธุ์แมลงวัน *Sarcophaga dux*, *Sarcophaga ruficornis*, *Sarcophaga peregrine* และ *Sarcophaga scopariiformis* ออกจากกันได้ ซึ่งถึงแม้เทคนิค PCR-RFLP นี้จะไม่มีฐานข้อมูลสากลที่ใช้เปรียบเทียบผลที่ได้กับตัวอย่างและยังไม่มีเครื่องมือวัดทางสถิติที่เหมาะสมที่สามารถนำมารองรับการวิเคราะห์ผลได้ [63] ทว่าวิธีการดังกล่าวนี้ก็สามารถให้ผลได้รวดเร็ว และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถคัดแยกสายพันธุ์แมลงวันได้ในขั้นต้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 มีความสามารถในการจำแนกแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทยออกจากกันได้ ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้จำแนกแมลงวันสายพันธุ์อื่นที่อาจจำแนกได้ไม่ชัดเจนด้วยการใช้ฐานวิทยาศาสตร์ ซึ่งเป็นประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ในการคะเนค่า PMI การรักษาโรคไม่เอชไอวี ซึ่งมีพยาธิสภาพที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแมลงวันที่ก่อโรค ในงานปศุสัตว์ที่ต้องการการบูรณาการวิธีป้องกันกำจัดแมลงดูดเลือดหรือแมลงรบกวนปศุสัตว์ที่มีชีวิตวิทยา วงชีพ และความจำเพาะต่อโฮสต์แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามวิธีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ผสมผสานกับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลในการจำแนกแมลงวันในการทดลองนี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณน้อย จำเป็นต้องมีการสะสมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกันให้มากที่สุด เพื่อให้การระบุสายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงสุด

รายการอ้างอิง

- [1] Papasarathorn, T., P. Chularerk, C. Limcharoen, and J. Rojanapremsook. 1976. Human myiasis caused by *Chrysomya bezziana Villeneuve*. Journal of The Medical Association of Thailand 50: 761-6.
- [2] Thyssen, P. J. 2010. Keys for Identification of Immature Insects. In J. Amendt, M.L. Goff, C.P. Campobasso, and M. Grassberger (eds.), Current Concepts in Forensic Entomology, pp. 25-42. Netherlands: Springer.
- [3] Sukontason, K. L., et al. 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(4): 702-4.
- [4] Sucharit, S., V. Kerdpibule, W. Tumrasvin, T. Deesin, and C. N. Nakorn. 1981. Myiasis of the vagina of a comatose women caused by *Parasarcophaga ruficornis* Fabricius. Journal of The Medical Association of Thailand 64(11): 580-3.
- [5] ฦัฐ มาลัยนวล. 2545. Introduction to Medical Entomology: บทนำ. ใน ฦัฐ มาลัยนวล และ สุภัทรา เตียวเจริญ (บรรณาธิการ), แมลงและสัตว์ขาข้อทางการแพทย์, หน้า 1-10. กรุงเทพมหานคร: เรือนแก้วการพิมพ์.
- [6] Sukontason, K. L., N. Bunchu, T. Chaiwong, B. Kuntalue, and K. Sukontason. 2007. Fine structure of the eggshell of the blow fly, *Lucilia cuprina*. Journal of Insect Science 7: 9.
- [7] Sherman, R. A., M. J. Hall, and S. Thomas. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. The Annual Review of Entomology 45: 55-81.
- [8] Sukontason, K. L., R. Ngern-Klun, D. Sripakdee, and K. Sukontason. 2007. Identifying fly puparia by clearing technique: application to forensic entomology. Parasitology Research 101(5): 1407-16.
- [9] Sukontason, K. L., P. Sribanditmongkol, T. Chaiwong, R. C. Vogtsberger, S. Piangjai, and K. Sukontason. 2008. Morphology of immature stages of *Hemipyrellia ligurriens* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) for use in forensic entomology applications. Parasitology Research 103(4): 877-87.

- [10] Sukontason, K. L., T. Chaiwong, S. Piangjai, S. Upakut, K. Moophayak, and K. Sukontason. 2008. Ommatidia of blow fly, house fly, and flesh fly: implication of their vision efficiency. Parasitology Research 103(1): 123-31.
- [11] Kamal, A. S. 1958. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) I. Bionomics. Annals of the Entomological Society of America 51(3): 261-71.
- [12] Grassberger, M. and C. Reiter. 2002. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). Forensic Science International 128(3): 177-82.
- [13] Grassberger, M. and C. Reiter. 2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. Forensic Science International 120(1-2): 32-6.
- [14] Smith, K. G. V. 1986. A manual of forensic entomology. London: British Museum (Natural History).
- [15] Chen, W. Y., T. H. Hung, and S. F. Shiao. 2004. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. Journal of Medical Entomology 41(1): 47-57.
- [16] Byrd, J. H. and J. L. Castner. 2001. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. Florida, USA: CRC Press LLC.
- [17] Gillott, C. 2005. Entomology. 3rd ed. Dordrecht, Netherland: Springer.
- [18] Greenberg, B. 1991. Flies as forensic indicators. Journal of Medical Entomology 28(5): 565-77.
- [19] Greenberg, B. and J. C. Kunich. 2002. Entomology and the law: Flies as forensic indicators. England: Cambridge University Press.
- [20] Resh, V. H. and R. T. Carde. 2009. Encyclopedia of insects. 2nd ed. MA, USA: Elsevier.
- [21] Goff, M. L. 2000. A fly for the prosecution : how insect evidence helps solve crimes. London, England: Harvard University Press.
- [22] Greenberg, B. and D. Singh. 1995. Species identification of calliphorid (Diptera) eggs. Journal of Medical Entomology 32: 21-6.
- [23] Sukontason, K., et al. 2004. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. Micron 35: 391-5.

- [24] Szpila, K. 2010. Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance. In J. Amendt, M.L. Goff, C.P. Campobasso, and M. Grassberger (eds.), Current Concepts in Forensic Entomology, pp. 43-53. Netherlands: Springer.
- [25] Greenberg, B. 1971. Flies and disease: Ecology, classification and biotic associations. vol. 1. New Jersey, USA: Press New.
- [26] Wallman, J. F. and S. C. Donnellan. 2001. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. Forensic Science International 120(1-2): 60-7.
- [27] Wall, R. and D. Shearer. 2008. Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control. 2nd ed. Chippingham, England: Blackwell Science.
- [28] บุญเสริม อ่วมอ่อง. 2543. แมลงวัน: กิจวัทยาและการควบคุม. นนทบุรี: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์ การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- [29] Bidawid, S. P., J. F. Edeson, J. Ibrahim, and R. M. Matossian. 1978. The role of non-biting flies in the transmission of enteric pathogens (Salmonella species and Shigella species) in Beirut, Lebanon. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 72(2): 117-21.
- [30] Tan, S. W., K. L. Yap, and H. L. Lee. 1997. Mechanical transport of rotavirus by the legs and wings of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Journal of Medical Entomology 34(5): 527-31.
- [31] Sukontason, K. L., M. Bunchoo, B. Khantawa, S. Piangjai, Y. Rongsriyam, and K. Sukontason. 2007. Comparison between *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* as carriers of bacteria in northern Thailand. the Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 38(1): 38-44.
- [32] Greenberg, B. 1973. Flies and disease: Biological and disease transmission. vol. 2. New Jersey, USA: Press New.
- [33] Muenworn, V., G. Duvallet, K. Thainchum, S. Tuntakom, P. Akratanakul, and T. Chareonviriyaphap. 2010. Stable Fly (Diptera: Muscidae) Distribution in Thailand. Kasetsart Journal (Natural Science) 44: 44-52.

- [34] Masmeatathip, R., C. Ketavan, and G. Duvallet. 2006. Morphological Studies of *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae) in Central Thailand. Kasetsart Journal (Natural Science) 40: 872-81.
- [35] Muenworn, V., et al. 2010. Geographic Distribution of Stomoxiine Flies (Diptera: Muscidae) and Diurnal Activity of *Stomoxys calcitrans* in Thailand. Journal of Medical Entomology 47(5): 791-7.
- [36] Gunn, A. 2006. Essential forensic biology. West Sussex, England: John Wiley & Sons.
- [37] Tumrasvin, W., H. Kurahashi, and R. Kano. 1979. Studies on medically important flies in Thailand VII. Report on 42 species of calliphorid flies, including the taxonomic keys (Diptera: Calliphoridae). Bulletin of Tokyo Medical and Dental University 26(4): 243-72.
- [38] Sucharit, S., W. Tumrasvin, and S. Vutikes. 1976. A survey of houseflies in bangkok and neighboring provinces. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 1: 85-90.
- [39] Foil, L. D. and J. A. Hogsette. 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 113(4): 1125-58.
- [40] Anon. 1979. Proceedings of a workshop on livestock pest management. Manhattan, Kansas: Kansas State University Press.
- [41] อาคม สังข์วรรณนท์. 2538. กีฏวิทยาทางสัตวแพทย์. กรุงเทพมหานคร: สหมิตร ปริ้นติ้ง
- [42] Amendt, J., C. S. Richards, C. P. Campobasso, R. Zehner, and M. J. R. Hall. 2011. Forensic entomology: applications and limitations. Forensic Science and Medical Pathology 7: 379-92.
- [43] Lee, H. L., M. Krishnasamy, and J. Jeffery. 2005. A case of human nasopharyngeal myiasis caused by *Chrysomya bezziana* Villeneuve, 1914 (Diptera: Calliphoridae) in Malaysia. Tropical Biomedicine 22(1); 87-8.
- [44] Vitavasiri, A., P. Charoenchasri, S. Kaewmanee, and M. Bhaibulaya. 1995. Subdermal myiasis caused by maggots of *Chrysomya bezziana*. Siriraj Hospital Gazette 47: 419-22.
- [45] Nacapunchai, D. and K. Laohavichit. 1999. Human myiasis caused by *Chrysomya bezziana* larvae in gangrenous wound following snake bite. Mahidol. Med. J. 6: 81-3.

- [46] Wanachiwanawin, D., K. Ungkanont, and S. Kaewmanee. 1996. Myiasis of the maxillary sinus caused by *Cochliomyia macellaria* larvae and review of literature. Siriraj Hospital Gazette 48: 118-22.
- [47] Kruatrachu, M. and N. Chinachoti. 1957. A case of myiasis due to *Eristalis tenax* larvae. Journal of The Medical Association of Thailand 40: 31-4.
- [48] Bhaibulaya, M. 1982. Intestinal myiasis caused by *Eristalis tenax* larva: a case report. Journal. Parasitol. Trop. Med. Assoc. Thai. 5: 97-9.
- [49] Siripoonya, P., S. Tesjaroen, and C. Viravan. 1993. Intestinal myiasis: a case report. Journal of The Medical Association of Thailand 76: 229-31.
- [50] Nacapunchai, D., C. Lamon, and N. Sukprasert. 1998. A first record from Thailand of human external ophthalmomyiasis due to *Oestrus ovis*. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 29(1): 133-6.
- [51] Priyanond, P., P. Sangsook, and S. Panpairoj. 1973. A case report of acute urethral obstruction caused by Phoridae larvae. Navy Med. J. 13: 115-21.
- [52] Vilcinskas, A. 2004. From Traditional Maggot Therapy to Modern Biosurgery. In A. Vilcinskas (ed.), Insect biotechnology, pp. 71-3. New York: Springer.
- [53] Bexfield, A., Y. Nigam, S. Thomas, and N. A. Ratcliffe. 2004. Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbes and Infection 6(14): 1297-304.
- [54] Saigusa, K., M. Takamiya, and Y. Aoki. 2005. Species identification of the forensically important flies in Iwata prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrom oxidase gene subunit I (COI) sequences. Legal Medicine (Tokyo) 7(3): 175-8.
- [55] Sukontason, K., et al. 2007. Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006. Parasitology Research 101(5): 1417-23.
- [56] Leccese, A. 2004. Insects as forensic indicators: methodological aspects. Journal of Forensic Medicine and Toxicology 5(1): 26-32.
- [57] Lee, H. L. 1996. Recovery of forensically important insect larvae from human cadavers in Malaysia (1993-1996). Malaysian Journal of Pathology 18(2): 125-7.

- [58] Catts, E. P. 1990. Analyzing entomological data. In E.P. Catts and N.H. Haskell (eds.), Entomology and Death: A Procedural Guide, pp. 124-37. Clemon, SC: Joyce's Print shop.
- [59] Siriyasatien, P. and N. Sirisup. 2005. Estimation of post-mortem interval (PMI) using data from lifecycle of flies on corpses. Chulalongkorn Medical Journal 49(4): 195-200.
- [60] Cragg, J. B. 1956. The olfactory behavior of *Lucilia* species (Diptera) under natural conditions. Annals of Applied Biology 44(3): 467-77.
- [61] Ashworth, J. R. and R. Wall. 1994. Responses of the sheep blowflies *Lucilia sericata* and *L. cuprina* to odour and the development of semiochemical baits. Medical and Veterinary Entomology 8(4): 303-9.
- [62] Wall, R. and M. L. Warnes. 1994. Responses of the sheep blowfly *Lucilia sericata* to carrion odour and carbon-dioxide. Entomologia Experimentalis Et Applicata 73: 239-46.
- [63] Amendt, J., R. Krettek, and R. Zehner. 2004. Forensic entomology. Naturwissenschaften 91(2): 51-65.
- [64] Grassberger, M., E. Friedrich, and C. Reiter. 2003. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central Europe. International Journal of Legal Medicine 117(2): 75-81.
- [65] Amendt, J., C. S. Richards, C. P. Campobasso, R. Zehner, and M. J. Hall. 2011. Forensic entomology: applications and limitations. Forensic Science Medicine and Pathology 7(4): 379-92.
- [66] Campobasso, C. P., G. Di Vella, and F. Introna. 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. Forensic Science International 120(1-2): 18-27.
- [67] Wells, J. D., T. Pape, and F. A. Sperling. 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). Journal of Forensic Sciences 46(5): 1098-102.
- [68] Wells, J. D. and F. A. Sperling. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). Forensic Science International 120(1-2): 110-5.

- [69] Foil, L. D. and J. A. Hogsette. 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 13(4): 1125-58.
- [70] Sukontason, K. L., et al. 2006. Observations of the third instar larva and puparium of *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). Parasitology Research 99(6): 669-74.
- [71] de Filippis, T. and A. C. Leite. 1997. Scanning electron microscopy studies on the first-instar larva of *Dermatobia hominis*. Medical and Veterinary Entomology 11(2): 165-71.
- [72] Sukontason, K., S. Piangjai, S. Siriwattanarungsee, and K. L. Sukontason. 2008. Morphology and developmental rate of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. Parasitology Research 102(6): 1207-16.
- [73] Siriwattanarungsee, S., K. L. Sukontason, B. Kuntalue, S. Piangjai, J. K. Olson, and K. Sukontason. 2005. Morphology of the puparia of the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) and blowfly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). Parasitology Research 96(3): 166-70.
- [74] Sukontason, K., et al. 2003. Larval ultrastructure of *Parasarcophaga dux* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae). Micron 34(8): 359-64.
- [75] Harvey, M. L., I. R. Dadour, and S. Gaudieri. 2003. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. Forensic Science International 131(2-3): 134-9.
- [76] Amendt, J., R. Krettek, C. Niess, R. Zehner, and H. Bratzke. 2000. Forensic entomology in Germany. Forensic Science International 113(1-3): 309-14.
- [77] Stevens, J. and R. Wall. 2001. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. Forensic Science International 120(1-2): 116-23.
- [78] Kress, W. J. and D. L. Erickson. 2008. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. PNAS 105(8): 2761-2.
- [79] Brown, T. A. 2010. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. 6th ed. West Sussex, England: Blackwell Publishing.

- [80] สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2002. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [81] สุตกุล ปาลกะวงษ์ ณ อยุธยา. 2006. ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics): ศาสตร์ใหม่แห่งวงการชีววิทยา. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21(3): 27-9.
- [82] Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Wralter. 2008. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science.
- [83] Hajibabaei, M., G. A. Singer, P. D. Hebert, and D. A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends in Genetics 23(4): 167-72.
- [84] Anderson, S., et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290(5806): 457-65.
- [85] Preativatanyou, K., et al. 2010. Mitochondrial DNA-based identification of some forensically important blowflies in Thailand. Forensic Science International 202(3): 97-101.
- [86] Saigusa, K., M. Takamiya, and Y. Aoki. 2005. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. Legal Medicine (Tokyo) 7(3): 175-8.
- [87] Zehner, R., J. Amendt, S. Schutt, J. Sauer, R. Krettek, and D. Povolny. 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). International Journal of Legal Medicine 118(4): 245-7.
- [88] Pesole, G., C. Gissi, A. De Chirico, and C. Saccone. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. Journal of Molecular Evolution 48(4): 427-34.
- [89] พัชรีย์ เลิศฤทธิ. 2552. ตำราพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: มิสเตอร์ก๊อปปี (ประเทศไทย).
- [90] Singer, M. and P. Berg. 1991. Gene & Genomes. Australia: Black well Scientific.
- [91] Ratcliffe, S. T., D. W. Webb, R. A. Weinzievr, and H. M. Robertson. 2003. PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae)- a generally applicable method. Journal of Forensic Science 48(4): 783-5.
- [92] Song, Z. K., X. Z. Wang, and G. Q. Liang. 2008. Molecular evolution and phylogenetic utility of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) in Calyptratae (Diptera: Brachycera). Journal of Molecular Evolution 68(5): 448-64.

- [93] Ritland, C. E., K. Ritland, and N. A. Straus. 1993. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex. Molecular Biology and Evolution 10(6): 1273-88.
- [94] White, P. C., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press.
- [95] Heindl, K. and J. Martinez. 2010. Nol9 is a novel polynucleotide 5'-kinase involved in ribosomal RNA processing. EMBO Journal 29: 4161-71.
- [96] Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, and D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS 102(23): 8369-74.
- [97] Chase, M. W., et al. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360(1462): 1889-95.
- [98] กนก พฤฒิวาทีญญ, นนทชัย เอกชัยวรวุฒิ, ภาณุวัฒน์ ชุตินวงศ์, นันทนา ศิริทรัพย์ และ เพล้ง สิริยะเสถียร. 2553. การจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่เกิดจากศพโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 54(6): 637-47.
- [99] Song, Z., X. Wang, and G. Liang. 2008. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). Forensic Science International 175(1): 17-22.
- [100] Nelson, L. A., J. F. Wallman, and M. Dowton. 2008. Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). Forensic Science International 177(2-3): 238-47.
- [101] Thanwisai, A., C. Kuvangkadilok, and V. Baimai. 2006. Molecular phylogeny of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. Genetica 128(1-3): 177-204.
- [102] Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24(8): 1596-9.
- [103] Kalp, G. C. 2002. Cell and Molecular Biology Concept and Experiments. New York: John. wiley & sons.

- [104] Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Press.
- [105] Tautz, D., J. M. Hancock, D. A. Webb, C. Tautz, and G. A. Dover. 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. Molecular Biology and Evolution 5(4): 366-76.
- [106] Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22(22): 4673-80.
- [107] Wilkerson, R. C., J. F. Reinert, and C. Li. 2004. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 41(3): 392-401.
- [108] Severini, C., F. Silvestrini, P. Mancini, G. La Rosa, and M. Marinucci. 1996. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Insect Molecular Biology 5(3): 181-6.
- [109] Rognes, K. 1997. The Calliphoridae (blowflies) (Diptera: Oestroidea) are not a monophyletic group. Cladistics 13: 27-66.
- [110] Wells, J. D. and J. R. Stevens. 2008. Application of DNA-based methods in forensic entomology. Annual Review of Entomology 53: 103-20.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองและวิธีเตรียม

- ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับสกัด **genomic DNA** (Invisorb[®] Spin tissue mini Kit; Invitex, เยอรมันนี) ประกอบด้วย

Lysis buffer G

Proteinase K

Binding buffer T

Wash buffer

Elute buffer (AE)

- สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดีเอ็นเอ **PCR** ของบริษัท **Invitrogen[®]** ประกอบด้วย

10x PCR buffer Buffer (Tris-HCl 200 mM, (pH 8.4), KCl 500 mM)

2mM dNTP

25M MgCl₂

U/ μl ของ *Taq* DNA Polymerase

- สารละลาย **10X TAE** ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris-HCl	48.0	กรัม
----------	------	------

CH ₃ COONa ₃ H ₂ O	16.4	กรัม
---	------	------

Na ₂ EDTA	7.44	กรัม
----------------------	------	------

วิธีเตรียม ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่นแล้วปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.7 ด้วย glacial acetic acid จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

หมายเหตุ: เมื่อใช้งานให้เจือจางจากความเข้มข้น **10X TAE** เป็น **1X TAE** ด้วยน้ำกลั่น

- สารละลาย **6X loading buffer** ประกอบด้วย

Bromophenol blue	0.01	กรัม
------------------	------	------

Tris-HCl (pH 6.8)	1.25	มิลลิลิตร
-------------------	------	-----------

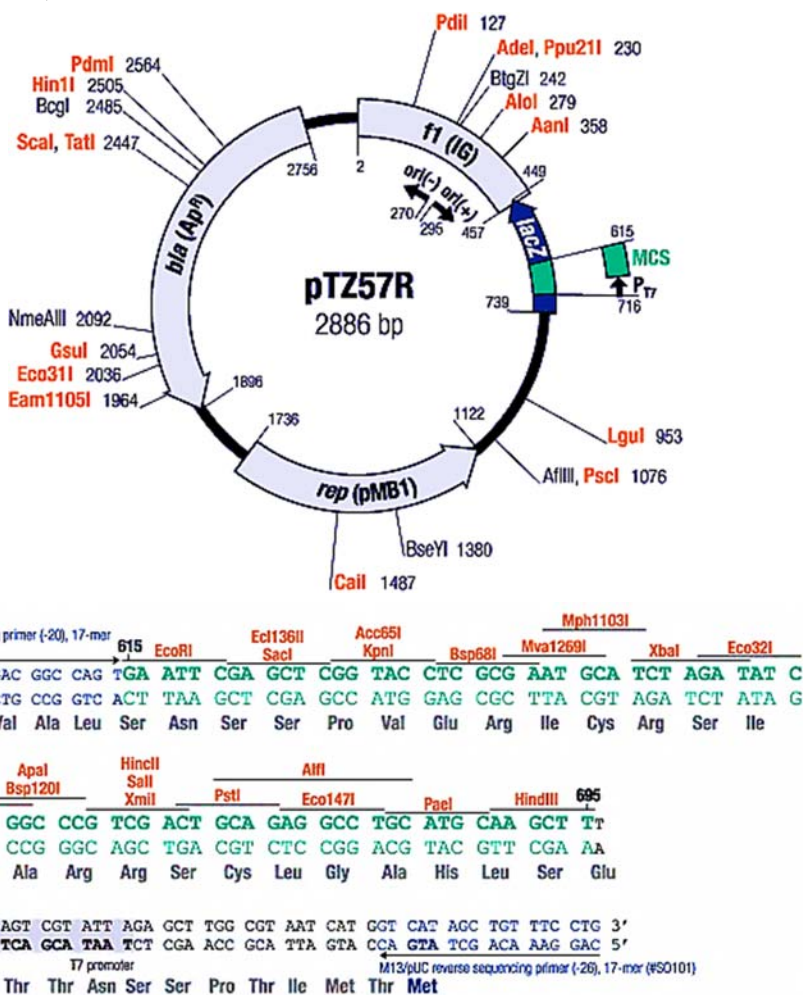
Glycero	15.0	มิลลิลิตร
---------	------	-----------

วิธีเตรียม ผสม bromophenol blue และ Tris-HCl ให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม glycerol 15 มิลลิลิตร ก่อนเก็บไว้ที่ 4 °C

5. สารละลายเอชไอเอ็มโบริไม่ค้ความเข้มข้น 0.5 µg/ml
วิธีเตรียม ละลายเอชไอเอ็มโบริไม่ค้จำนวน 0.5 มิลลิกรัมด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บในขวด
 สีชาไว้ในที่พ้นจากแสง
 หมายเหตุ: เอชไอเอ็ม โบริไม่ค้เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมืออย่างเวลาเตรียมสารละลาย

6. ชุดโคลนผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสโดยใช้เวกเตอร์ pTZ57R/T (InstAclone™
 PCR cloning kit; Fermentas, สหรัฐอเมริกา) ประกอบด้วย
 ddH₂O
 5X Ligation buffer
 Vector pTZ57R/T, (0.17 pmol. Ends)
 T₄ DNA ligase

7. Vector pTZ57R/T, Fermentas®



ภาพที่ ก.1 แผนที่ขึ้นของพลาสมิดเวกเตอร์ Vector pTZ57R/T (Fermentas®)

ที่มา www.fermentas.com/en/products/all/molecular-cloning/kits/ K121-instaclone-pcr-cloning

8. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani) broth ปริมาตรรวม 1 ลิตร ประกอบด้วย

2% Bacto-tryptone	10.0	กรัม
0.5% Yeast-extract	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม

วิธีเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดกับน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตรแล้วปรับค่า pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปเก็บที่ -4 °C

หมายเหตุ: อาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่ผสมแอมพิซิลิน เตรียมได้ด้วยวิธีเดียวกัน หากแต่หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ทิ้งไว้ให้อุ่น จึงเติมแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

9. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani) agar ปริมาตรรวม 1 ลิตร ประกอบด้วย

2% Bacto-tryptone	10.0	กรัม
0.5% Yeast-extract	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

วิธีเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดกับน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตรแล้วปรับค่า pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากทิ้งไว้จนอุ่นจึงทลงในจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนก่อนนำไปใช้

หมายเหตุ: อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมแอมพิซิลิน เตรียมได้ด้วยวิธีเดียวกัน หากแต่หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จ ให้ทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ให้อุ่น แล้วจึงเติมยาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ก่อนเทแบ่งลงบนจานเพาะเชื้อ

10. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB และ SOC solution ปริมาตรรวม 1 ลิตร ประกอบด้วย

0.5% Yeast-extract	5.0	กรัม
2% Bacto-tryptone	200.0	กรัม
0.5% Yeast-extract	5.0	กรัม
10 mM NaCl	100.0	มิลลิลิตร
1 mM MgCl ₂	100.0	มิลลิลิตร
1 mM MgSO ₄	100.0	มิลลิลิตร
1 mM KCl	25.0	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม ละลายส่วนผสมในน้ำปริมาตร 1 ลิตร แล้วปรับค่า pH เท่ากับ 7.0 ก่อนนำไป
 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: SOC solution เตรียมจากการเติมสารละลาย Glucose, MgSO₄ และ MgCl₂ ลงใน
 SOB ในอัตราส่วน 97:1:1:1 ตามลำดับ

11. ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

วิธีเตรียม เตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 µg/ml โดยใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
 เป็นตัวทำละลาย จากนั้นกรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ ก่อนนำไปเก็บที่ -20 °C

12. สารเคมี 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal)

วิธีเตรียม ละลาย X-gal 20 มิลลิกรัมใน Dimethylformamide 400 ไมโครลิตรใส่ในหลอด
 1.5 ml microtube เก็บให้พ้นจากแสงที่อุณหภูมิ -20 °C

13. ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับสกัดพลาสมิด (FastPlasmid™ Mini kit; Eppendorf, เยอรมันนี)

สารละลาย Lysis buffer

สารละลาย Wash buffer

สารละลาย AE (Elution buffer)

14. สารเคมีสำหรับ native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

14.1 10% ammonium persulfate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม ละลาย ammonium persulfate 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร

14.2 Stock solution ของ 5X TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

0.5 M EDTA (pH 8.0) 20.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม stock solution ของ 0.5 M EDTA (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

ละลาย EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) disodium salt 18.612 กรัมใน
 ddH₂O 70 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วย ddH₂O
 ให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์
 ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: EDTA จะไม่ละลายสมบูรณ์จนกว่าจะถึง pH 8.0

Tris base 54.0 กรัม

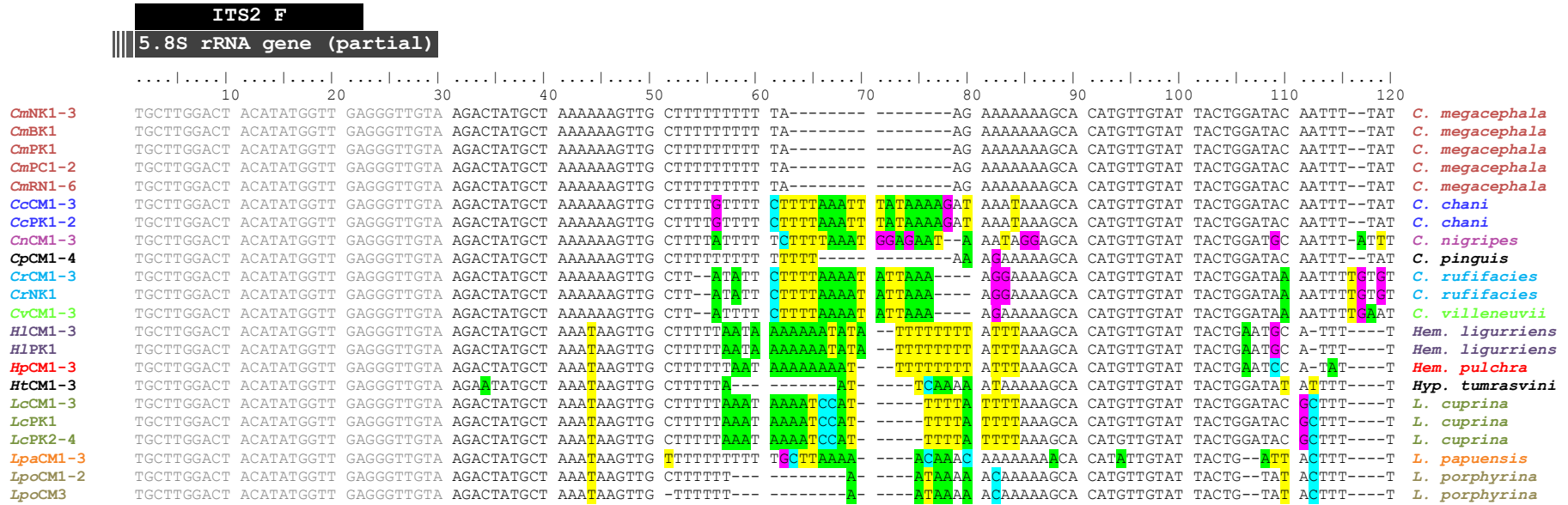
Boric acid 27.5 กรัม

ddH₂O 900.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม 5X TBE ละลาย Tris base และ Boric acid ใน ddH₂O ตามสัดส่วน แล้วเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วย ddH₂O ให้เท่ากับ 1 ลิตร
 หมายเหตุ: สารละลาย 5X TBE สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ แต่อาจเกิดตะกอนของสารหากทิ้งไว้เป็นเวลานาน ให้ทิ้งตะกอนและถ่ายสารละลายใส่ขวดแก้วใบใหม่
 อนึ่งการนำไปใช้ในขั้นตอน PAGE ต้องเจือจางสารละลาย TBE จาก 5X เป็น 0.5X ด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปใช้

14.3 30% Acrylamide

วิธีเตรียม ละลาย Bis acrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 25 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม acrylamide 40% ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปเก็บที่ 4 °C
 หมายเหตุ: acrylamide เป็นพิษต่อระบบประสาทและมีแนวโน้มที่จะเป็นสารก่อมะเร็ง จึงควรใส่ถุงมืออย่างเวลาเตรียมสารละลาย



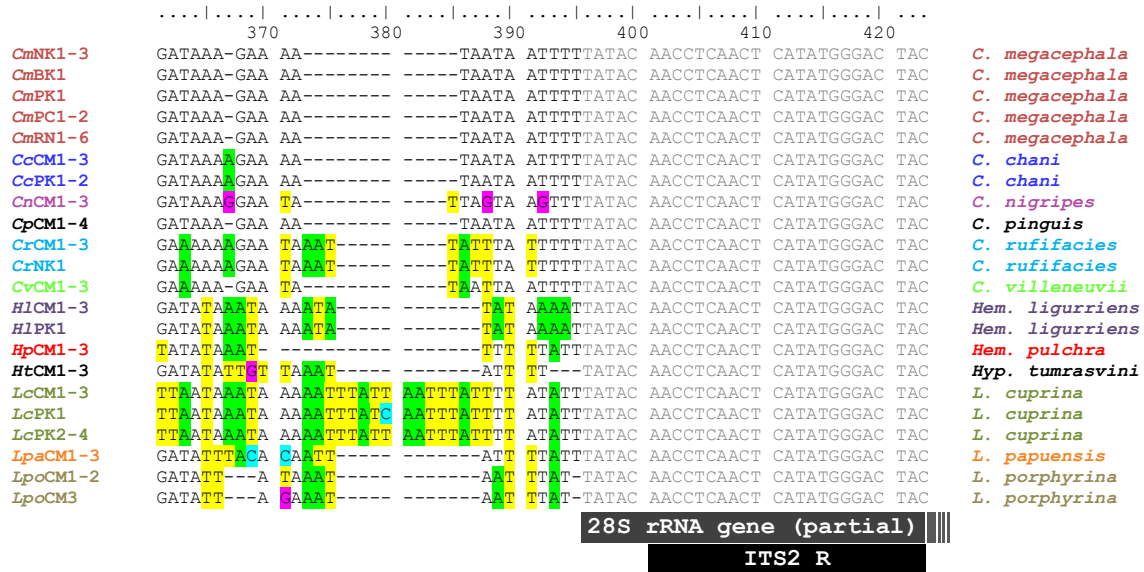
ภาพที่ ข.2 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Calliphoridae (รหัสตัวอย่างอ้างอิงตารางที่ 4.1)

	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	
<i>CmNK1-3</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATG--AAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AAT	ATTATAAGAT	GTT-GAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. megacephala</i>
<i>CmBK1</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATG--AAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AAT	ATTATAAGAT	GTT-GAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. megacephala</i>
<i>CmPK1</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATG--AAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AAT	ATTATAAGAT	GTT-GAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. megacephala</i>
<i>CmPC1-2</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATG--AAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AAT	ATTATAAGAT	GTT-GAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. megacephala</i>
<i>CmRN1-6</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATG--AAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AAT	ATTATAAGAT	GTT-GAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. megacephala</i>
<i>CcCM1-3</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATGTTGAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AAT	ATTATAAGAT	GTTGAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. chani</i>
<i>CcPK1-2</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATGTTGAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AAT	ATTATAAGAT	GTTGAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. chani</i>
<i>CnCM1-3</i>	TGTATTCATA	AGCTAAATGG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	GTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. nigripes</i>
<i>CpCM1-4</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATG--AAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AAT	ATTATAAGAT	GTT-GAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. pinguis</i>
<i>CrCM1-3</i>	TTTATTCATA	ATGCTAAATAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. rufifacies</i>
<i>CrNK1</i>	TTTATTCATA	ATGCTAAATAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. rufifacies</i>
<i>CvCM1-3</i>	TTTATTCATA	ATGCTAAATAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>C. villeneuveii</i>
<i>H1CM1-3</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>Hem. ligurriens</i>
<i>H1PK1</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>Hem. ligurriens</i>
<i>HpCM1-3</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>Hem. pulchra</i>
<i>HtCM1-3</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>Hyp. tumrasvini</i>
<i>LcCM1-3</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-TAAA	ATTATATATT	TTAT-TATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>L. cuprina</i>
<i>LcPK1</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-TAAA	ATTATATATT	TTAT-TATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>L. cuprina</i>
<i>LcPK2-4</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	CATT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-TAAA	ATTATATATT	TTAT-TATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>L. cuprina</i>
<i>LpaCM1-3</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>L. papuensis</i>
<i>LpoCM1-2</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>L. porphyrina</i>
<i>LpoCM3</i>	TGTATTCATA	ATGCTAAAAG	CTAAAGATA-	CAAAACCTCT	AAAT--GAAT	AAAATCAGAG	TATTTT-AA	----TAAAT	TTTAAATAT	TCTTTTTTTTA	TTGAGGAAGG	TCTAGCATAA	<i>L. porphyrina</i>

ภาพที่ ข.2 (ต่อ) รหัสตัวอย่างอ้างอิงตารางที่ 4.1

	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
<i>CmNK1-3</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. megagephala</i>
<i>CmBK1</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. megagephala</i>
<i>CmPK1</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. megagephala</i>
<i>CmPC1-2</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. megagephala</i>
<i>CmRN1-6</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. megagephala</i>
<i>CcCM1-3</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. chani</i>
<i>CcPK1-2</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. chani</i>
<i>CnCM1-3</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. nigripes</i>
<i>CpCM1-4</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. pinguis</i>
<i>CrCM1-3</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. rufifacies</i>
<i>CrNK1</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. rufifacies</i>
<i>CvCM1-3</i>	AAA---TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>C. villeneuveii</i>
<i>H1CM1-3</i>	AATAT-TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTTTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>Hem. ligurriens</i>
<i>H1PK1</i>	AATAT-TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTTTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>Hem. ligurriens</i>
<i>HpCM1-3</i>	AATAT-TTTA	TGAAACTAGA	ATTGCCTTTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>Hem. pulchra</i>
<i>HtCM1-3</i>	AATAT-TT-A	TGAAACTAGA	ATTGCTCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>Hyp. tumrasvini</i>
<i>LcCM1-3</i>	AATAT-TT-A	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>L. cuprina</i>
<i>LcPK1</i>	AATAT-TT-A	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>L. cuprina</i>
<i>LcPK2-4</i>	AATAT-TT-A	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>L. cuprina</i>
<i>LpaCM1-3</i>	AATAT-TT-A	TGAAACTAGA	ATTGCTCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>L. papuensis</i>
<i>LpoCM1-2</i>	AATAT-TT-A	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>L. porphyrina</i>
<i>LpoCM3</i>	AATAT-TT-A	TGAAACTAGA	ATTGCCTCTC	TAATA-----	-AAAAGAATT	TTTT-----	--ATATGTGA	AAAATAAAGA	AATGA-----	TTTATATTCA	TGGTTTT-GA	TATT--TTAT	<i>L. porphyrina</i>

ภาพที่ ข.2 (ต่อ) รหัสตัวอย่างอ้างอิงตารางที่ 4.1



28S rRNA gene (partial)
ITS2 R

ภาพที่ ข.2 (ต่อ) รหัสตัวอย่างอ้างอิงตารางที่ 4.1

ITS2 F
5.8S rRNA gene (partial)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
<i>MdCM1</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. domestica</i>
<i>MdCM2</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. domestica</i>
<i>MdCM3</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. domestica</i>
<i>MdNK1</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. domestica</i>
<i>MdPK1</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. domestica</i>
<i>MdRN1</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. domestica</i>
<i>MdRN2</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. domestica</i>
<i>MsBK1</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. sorbens</i>
<i>MsCM1</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. sorbens</i>
<i>MsNK1-2</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. sorbens</i>
<i>MsPK1-4</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAAATC	A-TCAAATGA	TTTGTGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>M. sorbens</i>
<i>ScKR1</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	--ATCAATCT	CGTTAAGAGA	TTTGTGTTT-	--TAAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>St. calcitrans</i>
<i>ScKR2</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	--ATCAATCT	CGTTAAGAGA	TTTGTGTTT-	--TAAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>St. calcitrans</i>
<i>ScKR3</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	--ATCAATCT	CGTTAAGAGA	TTTGTGTTT-	--TAAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>St. calcitrans</i>
<i>SiKR1</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAATC-	--TTAATTTGA	-TTGTGTTT-	--TAAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>St. indicus</i>
<i>SiKR2</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAATC-	--TTAATTTGA	-TTGTGTTT-	--TAAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>St. indicus</i>
<i>SiKR3</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TAATCAATC-	--TTAATTTGA	-TTGTGTTT-	--TAAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>St. indicus</i>
<i>SsKR1-3</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CT----TAAA	TGATCAGTC-	--TTAGTTGA	-TTGAGTTT-	--TGAGCACA	TGTTATATTA	CTGGATTCTG	<i>St. sitiens</i>
<i>HsCM1-3</i>	TGCTTGGACT	ACATATGGTT	GAGGGTTGTA	AGACTATGCT	AAATAAGTTG	CTCACTTACA	CTGTTATTTTG	CTCTAATCAA	GCCTAATCCG	TGTTAGCACA	TATTTTATTTC	ATGGTTTATTG	<i>Hyd. spinigera</i>

	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	
<i>MdCM1</i>	T-----TCAT	CATTTGATGA	-----TGAA	TAAAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTCTCA---	-AATACTTAT	ATAT-----	<i>M. domestica</i>
<i>MdCM2</i>	T-----TCAT	CATTTGATGA	-----TGAA	TAAAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTCTCA---	-AATACTTAT	ATAT-----	<i>M. domestica</i>
<i>MdCM3</i>	T-----TCAT	CATTTGATGA	-----TGAA	TAAAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTCTCA---	-AATACTTAT	ATAT-----	<i>M. domestica</i>
<i>MdNK1</i>	TGTTTTCAT	CATTTGATGA	ATAAATTC	TAAAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTCTCA---	-AATACTTAT	ATAT-----	<i>M. domestica</i>
<i>MdPK1</i>	TGTTTTCAT	CATTTGATGA	ATAAATTC	TAAAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTCTCA---	-AATACTTAT	ATAT-----	<i>M. domestica</i>
<i>MdRN1</i>	T-----TCAT	CATTTGATGA	-----TGAA	TAAAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTCTCA---	-AATACTTAT	ATAT-----	<i>M. domestica</i>
<i>MdRN2</i>	TGTTTTCAT	CATTTGATGA	ATAAATTC	TAAAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTCTCA---	-AATACTTAT	ATAT-----	<i>M. domestica</i>
<i>MsBK1</i>	G-TTTTTTGT	CACCAAAAGA	-----CCGC	TATAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTTTTATTA	AAATACTTTC	ATTT-----	<i>M. sorbens</i>
<i>MsCM1</i>	G-TTTTTTGT	CACCAAAAGA	-----CCGC	TATAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTTTTATTA	AAATACTTTC	ATTT-----	<i>M. sorbens</i>
<i>MsNK1-2</i>	G-TTTTTTGT	CACCAAAAGA	-----CCGC	TATAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTTTTATTA	AAATACTTTC	ATTT-----	<i>M. sorbens</i>
<i>MsPK1-4</i>	G-TTTTTTGT	CACCAAAAGA	-----CCGC	TATAGAATTC	ATAATATTA	TAGTCAAGAT	AGAATACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCTAGTAT	TTTTTTATTA	AAATACTTTC	ATTT-----	<i>M. sorbens</i>
<i>ScKR1</i>	-----AAGTCC	ATAATATGAA	-----ACCTC	ATAATATGAA	TAGTCAAGAT	AGAA-ACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCAGTAT	TTCTTGT--	GAATACTT--	-TGT-----		<i>St. calcitrans</i>
<i>ScKR2</i>	-----AAGTCC	ATAATATGAA	-----ACCTC	ATAATATGAA	TAGTCAAGAT	AGAA-ACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCAGTAT	TTCTTGT--	GAATACTT--	-TGT-----		<i>St. calcitrans</i>
<i>ScKR3</i>	-----AAGTCC	ATAATATGAA	-----ACCTC	ATAATATGAA	TAGTCAAGAT	AGAA-ACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCAGTAT	TTCTTGT--	GAATACTT--	-TGT-----		<i>St. calcitrans</i>
<i>SiKR1</i>	-----AATATC	ATAATATGAA	-----ACCTC	ATAATATGAA	TAGTCAAGAT	AGAA-ACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCAGTAT	TTCTTGT--	GAATACTT--	-TGT-----		<i>St. indicus</i>
<i>SiKR2</i>	-----AATATC	ATAATATGAA	-----ACCTC	ATAATATGAA	TAGTCAAGAT	AGAA-ACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCAGTAT	TTCTTGT--	GAATACTT--	-TGT-----		<i>St. indicus</i>
<i>SiKR3</i>	-----AATATC	ATAATATGAA	-----ACCTC	ATAATATGAA	TAGTCAAGAT	AGAA-ACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCAGTAT	TTCTTGT--	GAATACTT--	-TGT-----		<i>St. indicus</i>
<i>SsKR1-3</i>	-----AATATC	ATAATATGAA	-----ACCTC	ATAATATGAA	TAGTCAAGAT	AGAA-ACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCAGTAT	TTCTTGT--	GAATACTT--	-TGT-----		<i>St. sitiens</i>
<i>HsCM1-3</i>	T-----TATCC	ATAATATGAA	-----ACCTC	ATAATATGAA	TAGTCAAGAT	AGAA-ACCTC	ATT-GAAAAA	ATCCAGTAT	TTCTTGT--	GAATACTT--	-TGT-----		<i>Hyd. spinigera</i>

ภาพที่ ข.3 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันวงศ์ Muscidae (รหัสตัวอย่างอ้างอิงตารางที่ 4.1)

	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
<i>MdCM1</i>	-TTTTTCATT	CGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAATG--	ATTTTTTTAT	GAAACTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTGAATTGA	AAAACA---A	AAAATT-TCA	TATACCGAAA	AGAAAGGATT	<i>M. domestica</i>
<i>MdCM2</i>	-TTTTTCATT	CGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAATG--	ATTTTTTTAT	GAAACTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTGAATTGA	AAAACA---A	AAAATT-TCA	TATACCGAAA	AGAAAGGATT	<i>M. domestica</i>
<i>MdCM3</i>	-TTTTTCATT	CGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAATG--	ATTTTTTTAT	GAAACTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTGAATTGA	AAAACA---A	AAAATT-TCA	TATACCGAAA	AGAAAGGATT	<i>M. domestica</i>
<i>MdNK1</i>	-TTTTTCATT	CGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAATG--	ATTTTTTTAT	GAAACTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTGAATTGA	AAAACA---A	AAAATT-TCA	TATACCGAAA	AGAAAGGATT	<i>M. domestica</i>
<i>MdPK1</i>	-TTTTTCATT	CGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAATG--	ATTTTTTTAT	GAAACTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTGAATTGA	AAAACA---A	AAAATT-TCA	TATACCGAAA	AGAAAGGATT	<i>M. domestica</i>
<i>MdRN1</i>	-TTTTTCATT	CGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAATG--	ATTTTTTTAT	GAAACTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTGAATTGA	AAAACA---A	AAAATT-TCA	TATACCGAAA	AGAAAGGATT	<i>M. domestica</i>
<i>MdRN2</i>	TTTTTTCATT	CGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAATG--	ATTTTTTTAT	GAAACTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTGAATTGA	AAAACA---A	AAAATT-TCA	TATACCGAAA	AGAAAGGATT	<i>M. domestica</i>
<i>MsBK1</i>	--TTTTCAAT	TAATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTATATTGA	AGAAAA---A	ATA--T-GAA	CATACAAAAA	AGAAAAGATT	<i>M. sorbens</i>
<i>MsCM1</i>	--TTTTCAAT	TAATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTATATTGA	AGAAAA---A	ATA--T-GAA	CATACAAAAA	AGAAAAGATT	<i>M. sorbens</i>
<i>MsNK1-2</i>	--TTTTCAAT	TAATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTATATTGA	AGAAAA---A	ATA--T-GAA	CATACAAAAA	AGAAAAGATT	<i>M. sorbens</i>
<i>MsPK1-4</i>	--TTTTCAAT	TAATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTCT--	TTTATATTGA	AGAAAA---A	ATA--T-GAA	CATACAAAAA	AGAAAAGATT	<i>M. sorbens</i>
<i>ScKR1</i>	--TTTTCAAT	TGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTTGA	TTGAAAAACA	TATACA---T	ATAAAT-TATA	CATTGAAAGC	AGAAAAGATT	<i>St. calcitrans</i>
<i>ScKR2</i>	--TTTTCAAT	TGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTTGA	TTGAAAAACA	TATACA---T	ATAAAT-TATA	CATTGAAAGC	AGAAAAGATT	<i>St. calcitrans</i>
<i>ScKR3</i>	--TTTTCAAT	TGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAA-----	ATTTTTT-AT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTTGA	TTGAAAAACA	TATACA---T	ATAAAT-TATA	CATTGAAAGC	AGAAAAGATT	<i>St. calcitrans</i>
<i>SiKR1</i>	TTTTTTCATT	TGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTCTT	TCTAAATTGA	AAAATA---T	ATG---TAAA	TACATTGAAA	AGAAAAGATT	<i>St. indicus</i>
<i>SiKR2</i>	TTTTTTCATT	TGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTCTT	TCTAAATTGA	AAAATA---T	ATG---TAAA	TACATTGAAA	AGAAAAGATT	<i>St. indicus</i>
<i>SiKR3</i>	TTTTTTCATT	TGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTCTT	TCTAAATTGA	AAAATA---T	ATG---TAAA	TACATTGAAA	AGAAAAGATT	<i>St. indicus</i>
<i>SsKR1-3</i>	TTTTTTCATT	TGATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAA-----	ATTTTTTTAT	GAA-CTAGAA	TTGCTCTCTT	TCTAAATTGA	AAAATA---T	ATATAT---A	TACATTGAAA	AGAAAAGATT	<i>St. sitiens</i>
<i>HsCM1-3</i>	GTTTTTCAAT	TAATTGAGGA	AGGTCTAGCA	TAAAATTTTC	AAATTTTATT	GAAACTAGAA	TGGCTCTCT--	TTTATCTTGA	GAAATTCACA	ATAAAGTTTA	TATGTTTAAA	AGAAAAGATT	<i>Hyd. spinigera</i>

	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470		
<i>MdCM1</i>	TTTTTCATT	GAAAATGATG	GTGTTT---	CTATTTAATG	TATAACT---	GAATAGTATC	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. domestica</i>
<i>MdCM2</i>	TTTTTCATT	GAAAATGATG	GTGTTT---	CTATTTAATG	TATAACTCT	GAATAGTATC	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. domestica</i>
<i>MdCM3</i>	TTTTTCATT	GAAAATGATG	GTGTTT---	CTATTTAATG	TATAACTCT	GAATAGTATC	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. domestica</i>
<i>MdNK1</i>	TTTTTCATT	GAAAATGATG	GTGTTT---	CTATTTAATG	TATAACT---	GAATAGTATC	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. domestica</i>
<i>MdPK1</i>	TTTTTCATT	GAAAATGATG	GTGTTT---	CTATTTAATG	TATAACT---	GAATAGTATC	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. domestica</i>
<i>MdRN1</i>	TTTTTCATT	GAAAATGATG	GTGTTT---	CTATTTAATG	TATAACT---	GAATAGTATC	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. domestica</i>
<i>MdRN2</i>	TTTTTCATT	GAAAATGATG	GTGTTT---	CTATTTAATG	TATAACT---	GAATAGTATC	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. domestica</i>
<i>MsBK1</i>	TTTT-CATT-	-AAAATGAT-	-TTTATT---	CTATAAATG	TA-AACTATA	AATTAGTATT	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. sorbens</i>
<i>MsCM1</i>	TTTT-CATT-	-AAAATGAT-	-TTTATT---	CTATAAATG	TA-AACTATA	AATTAGTATT	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. sorbens</i>
<i>MsNK1-2</i>	TTTT-CATT-	-AAAATGAT-	-TTTATT---	CTATAAATG	TA-AACTATA	AATTAGTATT	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. sorbens</i>
<i>MsPK1-4</i>	TTTT-CATT-	-AAAATGAT-	-TTTATT---	CTATAAATG	TA-AACTATA	AATTAGTATT	T-----	-----	-----GTT	TTATACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>M. sorbens</i>

28S rRNA gene (partial)

<i>ScKR1</i>	TTTT-CATT-	-AAAATGATG	GAAATTT---	CTATTGAGAG	TACAAAAA-A	GAAAATTAATA	-----	-----	-----GTT	T-AAACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>St. calcitrans</i>	
<i>ScKR2</i>	TTTT-CATT-	-AAAATGATG	GAAATTT---	CTATTGAGAG	TACAAAAA-A	GAAAATTAATA	-----	-----	-----GTT	T-AAACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>St. calcitrans</i>	
<i>ScKR3</i>	TTTT-CATT-	-AAAATGATG	GAAATTT---	CTATTGAGAG	TACAAAAA-A	GAAAATTAATA	-----	-----	-----GTT	T-AAACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>St. calcitrans</i>	
<i>SiKR1</i>	TTTT-CAAA-	-AAAATGA-G	AAATTT---	CTATTGAGAG	AAAAAANT---	-GTCAAAAC	T-----	-----	-----GTT	T-AAACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>St. indicus</i>	
<i>SiKR2</i>	TTTT-CAAA-	-AAAATGA-G	AAATTT---	CTATTGAGAG	AAAAAANT---	-GTCAAAAC	T-----	-----	-----GTT	T-AAACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>St. indicus</i>	
<i>SiKR3</i>	TTTT-CAAA-	-AAAATGA-G	AAATTT---	CTATTGAGAG	AAAAA-T---	-GTCAAAAC	T-----	-----	-----GTT	T-AAACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>St. indicus</i>	
<i>SsKR1-3</i>	TTTT-CAACA-	-AAAATGA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GTT	T-AAACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>St. sitiens</i>	
<i>HsCM1-3</i>	TTTTTTCATT	TAAGATGATG	GTCTCTTTT	CTTAATAGTA	TAAAAAAAAG	GAAAATTAAT	TTTTCTACTTT	TTTTATTTTA	AACATAAG	GTT	TTACACAACC	TCAACTCATA	TGGGACTAC	<i>Hyd. spinigera</i>

28S rRNA gene (partial)

ITS2 R

ภาพที่ ข.3 (ต่อ) (รหัสตัวอย่างอ้างอิงถึงตารางที่ 4.1)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นามสกุล นายพายุ ภัคดีนวน
 วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 22 เดือนเมษายน พ.ศ. 2523
 ที่อยู่ บ้านเลขที่ 18/2 หมู่ 2 ต.หิน โงม อ.เมือง จ.หนองคาย 43000
 ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2546
 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีวะวิทยา)
 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
 ประวัติการทำงาน พ.ศ. 2548 ถึง ปัจจุบัน
 นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับปฏิบัติการ
 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
 กระทรวงสาธารณสุข จ.นนทบุรี

ผลงานวิจัย

- พ.ศ. 2546 Biosorption of synthetic textile dyes by autoclaved *Lentinus polychrous* Le'v LP-SW-3 mycelia (ปริญญาานิพนธ์ระดับปริญญาบัณฑิต)
- พ.ศ. 2550 Field evaluation of novaluron, a chitin synthesis inhibitor larvicide, against mosquito larvae in polluted water in urban areas of Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38(3):434-41.
- พ.ศ. 2550 Larvicidal efficacy of new formulations of temephos in non-woven sachets against larvae of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in water-storage containers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38(4):641-5.
- พ.ศ. 2550 Repellent activity of essential oils against cockroaches (Dictyoptera: Blattidae, Blattellidae, and Blaberidae) in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38(4):663-73.
- พ.ศ. 2552 Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 40(5):951-62.
- พ.ศ. 2554 Insecticide resistance in bedbugs in Thailand and laboratory evaluation of insecticides for the control of *Cimex hemipterus* and *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.* 48(5): 1023-30.