

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับการระบุชนิดแมลง ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย DNA Barcodes for Identification of Medically-Important Insects of Thailand

เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร, ณรงค์ จัตูรัส, และนพวรรณ บุญชู^{a*}

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Katsarin Tiphphet, Narong Jaturas and Nophawan Bunchu^{a*}

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University,

Tha Pho, Muang, Phitsanulok 65000

บทคัดย่อ

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่มีการนำเครื่องหมายทางด้านอนุพันธุศาสตร์ของสายดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยการระบุชนิดของแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ นิยมใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI หรือ CoxI) โดยบทความนี้ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับหลักการและที่มาของวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด รายงานข้อมูลเกี่ยวกับการระบุชนิดด้วยวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมลงอันดับ Diptera ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย รวมถึงขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งข้อมูลการใช้วิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดแมลงที่รวบรวมนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ หรือศึกษาวิจัยดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสิ่งมีชีวิตอื่นต่อไป

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอบาร์โค้ด; แมลง; การระบุชนิด; ประเทศไทย

Abstract

DNA barcodes is a molecular taxonomic method that uses the short genetic marker on DNA of organism for distinguishing or identifying the species of an organisms. Identification of medically-important insects frequently targeted the cytochrome c oxidase subunit I (COI or coxI) gene. This article has compiled information on principles, origins and pipeline of DNA barcodes and the reports

^aสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

*ผู้รับผิดชอบบทความ : nophawanb@nu.ac.th

doi: 10.14456/tstj.2018.27

on classification of medically-important insects in order Diptera found in Thailand. This review may shed some light on medically-important insect's research or other organisms.

Keywords: DNA barcode; insect; identification; Thailand

1. บทนำ

แมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์เป็นสัตว์ที่ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุข เศรษฐกิจ และปศุสัตว์ ซึ่งแมลงบางชนิดเป็นพาหะการนำเชื้อโรคไปติดต่อกับสิ่งมีชีวิตได้ ทั้งทางตรงและทางอ้อม รวมถึงบางชนิดยังเป็นสาเหตุของโรคที่สำคัญ โดยเฉพาะแมลงที่จัดอยู่ในอันดับ Diptera ซึ่งมีความหลากหลายของชนิดและความสำคัญทางด้านการแพทย์อย่างมาก แมลงจัดว่าเป็นพาหะนำเชื้อโรคมาติดต่อกับคนที่สำคัญ [1] อาทิ แมลงวัน (fly) มีบทบาทเป็นพาหะเชิงกลของเชื้อก่อโรคหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว หนอนพยาธิ และสัตว์ขาข้อขนาดเล็ก และเป็นสาเหตุของโรคหนอนแมลงวันหรือ myiasis อีกทั้งยังเป็นตัวก่อความรำคาญให้แก่คนและสัตว์ [2] รินฝอยทราย (sand fly) เป็นพาหะนำโปรโตซัวในสกุล *Leishmania* ที่ทำให้เกิดโรค Leishmaniasis [3] โดยประเทศไทยถือว่าโรค Leishmaniasis เป็นโรคอุบัติใหม่ [4] รินดำ (black fly) เป็นพาหะกึ่งกลางของหนอนพยาธิ *Onchocerca volvulus* ที่ทำให้เกิดโรค Onchocerciasis ซึ่งมีการระบาดมากในแถบทวีปแอฟริกา สำหรับประเทศไทยการดูดเลือดของแมลงรินดำเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดผิวหนังอักเสบ [5] และยุง (mosquito) เป็นพาหะนำเชื้อโรคที่สำคัญหลายชนิด [1] อาทิ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) ที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่เกิดจากโปรโตซัวในสกุล *Plasmodium* ยุงลายที่เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก ไข้ไวรัสชิคุนกุนยา ไวรัสชิกา ยุงลาย (*Aedes* spp.) และยุงเสือ (*Mansonia* spp.) เป็นพาหะของหนอนพยาธิฟิลาเรีย (filarial worm) ที่ทำให้เกิดโรคเท้าช้าง และยุงรำคาญ

(*Culex* spp.) เป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis, JE) [6] ซึ่งจะเห็นได้ว่าแมลงต่าง ๆ เหล่านี้เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ใกล้กับตัวมนุษย์ และสามารถก่อปัญหาทางด้านสาธารณสุขอย่างมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวัง เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของแมลงพาหะเหล่านี้อยู่เสมอ ซึ่งการจำแนกชนิดแมลงที่ผ่านมาเป็นสิ่งที่จำเป็นและมีความสำคัญในการวางแผนการควบคุมการระบาด ที่อาศัยการแยกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน โดยพิจารณาจากทางด้านสัณฐานวิทยาเป็นหลัก [1] ซึ่งต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้ความชำนาญ และเชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานในการระบุชนิดของแมลงในแต่ละชนิด ในปัจจุบันผู้ที่มีความรู้ ความชำนาญ และเชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานมีจำนวนน้อย นอกจากนั้นการจำแนกชนิดของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถแยกความแตกต่างของแมลงบางชนิดได้อย่างชัดเจน อาทิ กลุ่มแมลงที่มีลักษณะทางสัณฐานแบบซับซ้อน (complex species) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถใช้วิธีการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาได้ ปัจจุบันมีความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านอณูชีววิทยา หรือชีววิทยาระดับโมเลกุล และได้มีการนำวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมาช่วยในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น isozyme analysis, DNA probe และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว และดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นอีกวิธีหนึ่งทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของสัตว์

ขาปล้อง (Phylum: Arthropoda) โดยวิธีการของ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้น อาศัยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลผสมผสานกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) [7] ซึ่งใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่สั้น สามารถนำไปใช้ในระบุนิตเพื่อแยกความแตกต่างของกลุ่มแมลงที่ลักษณะทางสัณฐานแบบซับซ้อน [8] และยังสามารถไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาหาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดต้องอาศัยฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความถูกต้องแม่นยำร่วมด้วย

ปัจจุบันมีรายงานอุบัติการณ์ของโรคที่มีแมลงเป็นพาหะนำโรคหรือเป็นสาเหตุของโรคอย่างต่อเนื่อง อาทิ โรค Leishmaniasis โรคมาลาเรีย โรคไข้เลือดออก โรคไข้ไวรัสชิคุนกุนยา โรคไข้สมองอักเสบ และโรคหอนแมลงวัน ส่วนใหญ่แล้วมีแมลงในอันดับ Diptera เป็นพาหะของโรค หรือสาเหตุของโรคที่สำคัญ ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งต้องอาศัยการจัดจำแนกชนิดแมลงพาหะที่ถูกต้องและรวดเร็วในการวางแผนป้องกันและควบคุมการระบาดของแมลงดังกล่าว วิธีการระบุนิตแมลงด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งนิยมใช้ในการระบุนิตแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีขาดผู้เชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธาน ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการจัดทำบทความนี้ขึ้น เพื่อรวบรวมข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวกับหลักการและที่มาของวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด รายงานที่เกี่ยวกับการระบุนิตแมลงในอันดับ Diptera ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศ ไทย โดยมีปัจจัยหน้าที่ที่มีส่วนสำคัญต้องเฝ้าระวังการระบาดของแมลงต่าง ๆ เหล่านั้นให้มีการจัดจำแนกชนิดแมลงที่ถูกต้องด้วยวิธีการดังกล่าว ประกอบด้วยแมลงวัน รันฟอยทราย รันดำ และยุง และขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัย

นักศึกษา และผู้ที่สนใจในการนำข้อมูลเป็นแนวทางไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแมลงดังกล่าว และการศึกษาในกลุ่มสิ่งมีชีวิตต่อไป

2. เนื้อหา

2.1 ที่มาและหลักการของวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)

ในปี ค.ศ. 2003 Hebert และคณะ ได้มีแนวคิดการติดฉลากบาร์โค้ดในสินค้ามาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิทยาศาสตร์ ซึ่งเสนอแนวคิดว่าสัตว์ทุกชนิดสามารถระบุชนิดได้ โดยอาศัยลักษณะเฉพาะของดีเอ็นเอที่เป็นสารพันธุกรรมของแต่ละสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดหรือแต่ละบุคคลมาใช้เป็นเครื่องหมายในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต เรียกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยได้มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI หรือ CoxI) ที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย มีความยาวประมาณ 500-600 คู่เบส มาใช้ในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตที่นำมาศึกษา ยีน COI จึงเป็นยีนแรกที่น่ามาใช้เป็นมาตรฐานเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสัตว์ [8] ซึ่งต่อมาได้มีการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดอย่างแพร่หลาย และได้มีการจัดตั้ง Consortium for the Barcode of Life ขึ้นในปี ค.ศ. 2004 ที่เกิดจากความร่วมมือกันระหว่างนักวิจัยของมหาวิทยาลัยต่าง ๆ รวมไปถึงนักวิจัยของพิพิธภัณฑ์สัตว์และพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติจากหลายประเทศเพื่อกำหนดมาตรฐานและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอบาร์โค้ด และจัดทำฐานข้อมูลส่วนกลางที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ให้มีความแปรผันที่แตกต่างกัน [9] สำหรับการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยทั่วไป เป็นการใช้อยู่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้น ๆ (short genetic loci) ประมาณ 150-800 คู่เบส ของยีนที่มีความจำเพาะสามารถบ่งชี้ถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิต

ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิด [10] แมลงในอันดับ Diptera มียีนที่นิยมใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ ยีนในกลุ่ม cytochrome c oxidase subunit I (*COI* หรือ *coxI*) และ subunit II (*COII*), cytochrome b (*cyt b*) และ 28S ribosomal RNA (28S *rRNA*)

ยีนในกลุ่ม *COI* และ *COII* เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียที่มีความสำคัญอยู่ในกระบวนการหายใจ (aerobic metabolism) โดยยีน *COI* นิยมนำมาใช้ในการระบุชนิดหรือการค้นคว้าวิจัยทางด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากยีน *COI* มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดสูง และมีการแทรกเข้ามาและการหลุดหายของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย [11] ส่วนยีน *COII* จัดอยู่ใน complex ของเอนไซม์ oligomeric ที่เป็นส่วนประกอบของระบบหายใจในส่วนที่เกี่ยวข้องในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนอื่น ๆ โดยที่ยีน *COII* จะถูกถ่ายทอดอิเล็กตรอนมาจาก cytochrome c ไปยัง subunit I ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาอยู่ 2 บริเวณ ที่ติดอยู่กับ transmembrane ในทิศทางด้านปลาย N และยังเป็นโปรตีนสำคัญที่มีการสัมผัสอยู่บริเวณพื้นผิวของ mitochondrial intermembrane [12] ยีน *cyt b* เป็นยีนอีกส่วนหนึ่งที่อยู่ใน cytochrome ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการหายใจในไมโทคอนเดรียที่มีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 1,140 คู่เบส [13] ซึ่งยีน *cyt b* สามารถค้นพบได้ทั่วไปในแมลงทุกชนิด นิยมนำยีน *cyt b* มาประยุกต์ใช้ในการเปรียบเทียบหาระดับความสัมพันธ์และการระบุชนิดของแมลงอีกด้วย นอกจากนี้ยีนที่อยู่ใน ribosomal RNA ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนหรือการแปลรหัส ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มยีน คือ (1) ยีนที่เกี่ยวข้องกับ large

rRNA ได้แก่ 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ 5.8S *rRNA* (2) ยีนทั้งหมดที่เก็บรหัส (coding sequence) ไว้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน และ small nuclear RNA (*snRNA*) บางชนิด และ (3) กลุ่มยีนขนาดเล็กที่มียีนส่วนใหญ่เรียงอยู่เป็นกลุ่ม (cluster) และมีหลายชุด (copy) เช่น *snRNA* บางชนิด *tRNA* และ 5S *rRNA* ซึ่งในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดนิยมนำยีน 28S *rRNA* มาใช้ ในระบุชนิดแมลงที่ต้องการศึกษาออกได้ โดยขนาดของ 28S *rRNA* ซึ่งมีความยาวประมาณ 4,718 คู่เบส ที่เป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซมขนาด 60S [14]

แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาการระบุชนิดของแมลงในอันดับ Diptera ด้วยวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด นิยมใช้ยีน *COI* มากที่สุด เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลจำนวนมาก และมีความแตกต่างมากเพียงพอที่สามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกันออกจากกันได้ และจากการรายงานที่ผ่านมาได้มีการใช้วิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดเข้ามาช่วยในการระบุชนิดแมลงในอันดับ Diptera ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย ดังนี้

2.1.1 แมลงวัน (fly)

แมลงวัน จัด อยู่ใน อันดับ ย่อย Brachycera มีลักษณะลำตัวเต็มวัยขนาดตัวเล็ก ประมาณ 0.5-1.5 เซนติเมตร มีปีกบางใส 1 คู่ มีหนวดแบบ aristate มีปากแบบดูดซับ (sponging mouth part) โดยแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทยนั้น ได้แก่ แมลงวันบ้าน แมลงวันหัวเขียว และแมลงวันหลังลาย ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Muscidae, Calliphoridae และ Sarcophagidae ตามลำดับ [15] ซึ่งแต่ละวงศ์จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างกันอย่างออกไป [2] ปัจจุบันประเทศไทยพบแมลงวันบ้าน 136 ชนิด [16] แมลงวันหัวเขียว 96 ชนิด [17] และแมลงวันหลังลายอีก 83 ชนิด [18] โดยอาศัยัญญา

อนุกรมวิธานในการระบุชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวัน [18-20] สำหรับการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันในประเทศไทยพบการศึกษาเพียงการศึกษาเดียว ซึ่งเป็นการศึกษาของ Barbara และคณะ (2016) ได้มีการศึกษายีน *COI* และ *28S rRNA* มาใช้ระบุชนิดแมลงวันได้ 13 ชนิด ประกอบด้วยแมลงวันหัวเขียว 9 ชนิด และแมลงวันหลังลาย 4 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้าง Phylogenetic tree ผลปรากฏว่าแมลงวันเหล่านั้นจะมีความความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน [22] ซึ่งจะเห็นได้ว่าการศึกษาระบุชนิดแมลงวันในประเทศไทยโดยใช้วิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังมีข้อมูลน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนชนิดของแมลงวันที่พบในประเทศไทย โดยคิดเป็นแมลงวันหัวเขียว 9.4 % และแมลงวันหลังลาย 3.61 % (ตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาการระบุชนิดแมลงวันด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดในต่างประเทศอยู่หลายพื้นที่ เช่น ในปี ค.ศ. 2013 Jordaens และคณะ ได้ศึกษาความแตกต่างของแมลงวันหัวเขียว ชนิด *Phormia regina* ระหว่างพื้นที่ในอเมริกาเหนือและยุโรปตะวันตก ด้วยวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ใช้ยีน *COI*, *COII*, *cty b* และ *28S rRNA* เข้ามาช่วยในการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าความแตกต่างพันธุกรรมสูงถึง 5.3 % และสามารถตรวจพบรูปแบบพันธุกรรมในพื้นที่อเมริกาเหนือ จำนวน 7 รูปแบบ และในพื้นที่ยุโรปตะวันตก จำนวน 2 รูปแบบ [23] ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 ได้มีการศึกษาการระบุชนิดของแมลงวันหลังลายสกุล *Oxysarcodexia* ในสหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล โดยใช้ยีน *COI* ที่สามารถระบุชนิดได้ 13 ชนิด จาก 151 ตัวอย่าง ที่ใช้ความยาวของยีน 590-648 คู่เบส [24] และสามารถระบุชนิดแมลงวันบ้านในสาธารณรัฐอิสลามปากีสถาน ได้ทั้งหมด 25 สกุลย่อย จาก 1,114 ตัวอย่าง [21] รวมถึง Marianna และคณะ ได้

การศึกษาตัวอ่อนของแมลงวันหลังลาย ชนิด *Wohlfahrtia magnifica* ที่ก่อให้เกิดโรค myiasis ในแกะ ประเทศอิตาลี โดยใช้ยีน *cyt b* พบว่า สามารถระบุชนิดตัวอ่อนได้ 17 จาก 19 ตัวอย่าง ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหล่านั้นมีรูปแบบทางพันธุกรรม (haplotype) 2 รูปแบบ ที่คล้ายคลึงกับรูปแบบทางพันธุกรรมที่เป็น *CB_magn01* และ *CB_magn02* และนอกจากนี้สามารถระบุชนิดตัวเต็มวัยจำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหล่านั้นมีรูปแบบทางพันธุกรรมเป็นแบบ *CB_magn01* โดยรูปแบบทางพันธุกรรมทั้ง 2 แบบ ที่พบนั้น เป็นตัวแทนทางสายสัมพันธ์วิวัฒนาการของ *W. magnifica* ที่มีถิ่นกำเนิดมาจากยุโรปกลาง ยุโรปตะวันออกเฉียงใต้ (East lineage) หรือที่มีถิ่นกำเนิดมาจากยุโรปตะวันตกเฉียงใต้ และตะวันตกเฉียงเหนือของแอฟริกา (West lineage) ซึ่งข้อมูลเหล่านั้นสามารถบ่งชี้ถึงถิ่นกำเนิดของแมลงวันหลังลาย ชนิด *W. magnifica* ในประเทศอิตาลี [25] และในปี ค.ศ. 2017 Bharti และ singh ได้ศึกษาการระบุชนิดแมลงวันหัวเขียวที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ในสาธารณรัฐอินเดีย โดยใช้ยีน *COI* ระบุชนิดได้ 7 จาก 9 ชนิด ที่อยู่ในวงศ์ย่อย 3 วงศ์ คือ Calliphorinae, Luciliinae และ Chrysomyinae โดยมีค่าความแตกต่างระหว่างชนิดสูงถึง 18.14 % [26] การศึกษาชนิดแมลงวันโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสรุปได้ดังตารางที่ 2

2.1.2 รินฝอยทราย (sand fly)

รินฝอยทรายจัดอยู่ในอันดับย่อย Nematocera วงศ์ Psychodidae มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรินฝอยทราย คือ ส่วนหัวจะมีตาขนาดใหญ่ 1 คู่ หนวดยาวที่มีลักษณะคล้ายสร้อยลูกปัด มี maxillary palp 1 คู่ที่ขีลงพื้น มีปากแบบแทงดูด (piercing-sucking) ส่วนนอกมีปีกบางใส 1 คู่

รูปร่างคล้ายใบหอก มีขนปกคลุมทั่วทั้งลำตัว ส่วนท้องจะยาว ปลายท้องตัวเมียจะมน ตัวผู้มี claspers ยื่นออก 1 คู่ [27] จากการศึกษาความหลากหลายของรณฝอยทรายในประเทศไทยโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก ซึ่งอาศัยกฎแจนนกรมวิทธาน Lewis's Keys (1978) ในการระบุชนิด [28] จากการศึกษาในประเทศไทยพบรณฝอยทราย อย่างน้อย 26 ชนิด [29] สำหรับการประยุกต์ใช้วิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาช่วยในการระบุชนิดของรณฝอยทรายในประเทศไทยที่มีการใช้ยีน COI พบว่า สามารถระบุชนิดรณฝอยทรายได้ 13 ชนิด จากตัวอย่างทั้งหมด 193 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดอุดรดิตถ์ โดยจัดจำแนกได้ทั้งหมด 4 สกุล คือ *Chinius*, *Idiophlebotomus*, *Phlebotomus* และ *Sergentomyia* [29] และในแถบพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยอีก 22 ชนิด [30] ซึ่งคิดเป็น 50 % (ตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานชนิดของรณฝอยทรายที่เป็นพาหะหลักของโรค Leishmaniasis แต่มีรายงานการพบชนิดของรณฝอยทรายที่อาจเป็นพาหะของลิซมาเนีย (potential vector) ได้แก่ รณฝอยทรายชนิด *Sergentomyia gemmea* และ *S. barraudi*

[31,32] นอกจากนี้มีการศึกษาการระบุชนิดรณฝอยทรายด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดในต่างประเทศอยู่หลายพื้นที่ เช่น การศึกษาวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของรณฝอยทรายในสาธารณรัฐอินเดีย โดยใช้ยีน COI ที่สามารถระบุชนิดที่แตกต่างกันได้ 8 ชนิด จาก 62 ตัวอย่าง และพบชนิดของรณฝอยทรายที่เป็นพาหะของโรค Leishmaniasis ได้ 2 ชนิด คือ *Phlebotomus argentipes* และ *P. papatasi* ในสาธารณรัฐอินเดียเป็นครั้งแรก [33] ต่อมาได้มีการระบุชนิดของรณฝอยทรายในประเทศเปรู ซึ่งสามารถจำแนกชนิดรณฝอยทรายได้ 19 ชนิด จาก 6 สกุลย่อย ใน 2 สกุล คือ *Lutzomyia* และ *Warileya* ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนั้น วิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถระบุชนิดของรณฝอยทรายได้ตรงกลับลักษณะทางสัณฐานวิทยา [3] ต่อมามีการศึกษาในพื้นที่ของแคริบเบียน ประเทศสาธารณรัฐโคลัมเบีย สามารถจัดจำแนกได้ 19 ชนิด ในสกุล *Lutzomyia* และ 1 ชนิด ในสกุล *Brumptomyia* [34] การศึกษาชนิดรณฝอยทรายโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การระบุชนิดแมลงในอันดับ Diptera ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทยด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด

กลุ่มแมลง	จำนวนชนิดที่สำรวจพบทั้งหมด	จำนวนชนิดที่ระบุชนิดด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด	คิดเป็นร้อยละ
แมลงวันหัวเขียว	96	9	9.40
แมลงวันหลังลาย	83	3	3.61
รณฝอยทราย	26	13	50.00
รณดำ	12	12	75.00
ยุงลาย	14	8	57.14
ยุงรำคาญ	82	3	3.65
ยุงเสือ	6	1	16.7

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการเปรียบเทียบบริเวณยีนที่ใช้ในการทำดีเอ็นบาร์โค้ดของแมลงในอันดับ Diptera

แมลง (วงศ์)	ชนิด	ประเทศ	ยีนที่ใช้ในการทำดีเอ็นบาร์โค้ด				เอกสาร อ้างอิง
			COI	COII	cyt b	28S rRNA	
แมลงวันหัวเขียว (Calliphoridae)	<i>Achoetandrus</i> spp. (2 ชนิด)	ราชอาณาจักรไทย	/				[22]
	<i>Chrysomya</i> spp. (4 ชนิด)		/				
	<i>Hypopygiopsis infumata</i>		/			/	
	<i>Lucilia</i> spp. (2 ชนิด)		/				
	<i>Chrysomya megacephala</i>	อเมริกาเหนือ และยุโรปตะวันตก		/	/	/	[23]
	<i>C. rufifacies</i>			/	/	/	
	<i>Phormia regina</i>			/	/	/	
ยุง (Culicidae)	<i>Aedes</i> spp. (8 ชนิด)	ราชอาณาจักรไทย	/				[41]
	<i>Culex</i> spp. (3 ชนิด)		/				
	<i>Mansonia bonnea</i>		/				
	<i>Aedes</i> spp. (6 ชนิด)	สาธารณรัฐอิสลาม ปากีสถาน	/				[43]
	<i>Anopheles</i> spp. (9 ชนิด)		/				
	<i>Armigeres subalbatus</i>		/				
	<i>Culex</i> spp. (7 ชนิด)		/				
	<i>Collessius pseudotaeniat</i>		/				
	<i>Lutzia fuscana</i>		/				
	<i>Phagomyia cogilli</i>		/				
	<i>Monsonia uniformis</i>		/				
	<i>Ochlerotatus</i> spp. (2 ชนิด)		/				
	<i>Culex</i> spp. (33 ชนิด)	สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล	/				[42]
แมลงวันบ้าน (Muscidae)	<i>Muscina</i> spp. (2 ชนิด)	แคนาดา	/				[21]
	<i>Spilogona</i> spp. (8 ชนิด)		/				
	<i>Phaonia</i> spp. (3 ชนิด)		/				
ริ้นฝอยทราย (Psychodidae)	<i>Lutzomyia</i> spp. (18 ชนิด)	สาธารณรัฐโคลอมเบีย	/				[34]
	<i>Brumptomyia mesai</i>		/				
	<i>Phlebotomus. argentipes</i>	สาธารณรัฐอินเดีย	/				[33]
	<i>P. papatasi</i>		/				
	<i>Chinius barbazani</i>	ราชอาณาจักรไทย	/				[29,30]
	<i>Phlebotomus</i> spp. (3 ชนิด)		/				
	<i>Sergentomvia</i> spp. (4 ชนิด)		/				
แมลงวันหลังลาย (Sarcophagidae)	<i>Boettcherisca nathani</i>	ราชอาณาจักรไทย	/			/	[22]
	<i>Lioproctia pattoni</i>		/			/	
	<i>Sarcosolomonina rohdendorfi</i>		/			/	
	<i>Oxysarcodexia</i> spp. (13 ชนิด)	สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล	/				[24]
ริ้นดำ (Simuliidae)	<i>Simulium feuerborni</i>	ราชอาณาจักรไทย	/				[5,35, 36]
	<i>S. angulistylum</i>		/				
	<i>S. siamense</i>		/				
	<i>S. bullatum</i>		/				
	<i>S. chaliowae</i>		/				
	<i>S. multistriatum</i>		/				
	<i>S. doipuienae</i>		/				
	<i>S. nigrogilvum</i>		/				
	<i>S. nodosum</i>		/				

2.1.3 รันดำหรือคูน (black fly)

รันดำจัดอยู่อันดับย่อย Nematocera ในกลุ่มเดียวกับแมลงร้นฝอยทราย แต่อยู่วงศ์ Simuliidae ที่มีรูปร่างลักษณะทั่วไป คือ มีตารวมขนาดใหญ่ 1 คู่ แต่ตัวเมียจะมีตาห่างกันตัวผู้ มีหนวด 1 คู่ โดยที่หนวดจะมีลักษณะที่อวบสั้น มีปากแบบแทงดูด (piercing-sucking) ส่วนอกด้าน dorsal มีขนเล็กสั้น ปกคลุมอยู่บริเวณรอบอก มีปีกสั้น ไม่มีเกล็ดและขนปกคลุมเส้นปีก และส่วนท้องมีขนาดสั้น ปลายสุดของท้องมีอวัยวะที่ช่วยในการผสมพันธุ์ [27] โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาในปี ค.ศ. 2014 Pramual และ Adler ศึกษาระบุชนิดรันดำที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนของประเทศไทยด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าสามารถระบุชนิดได้ 41 ชนิด ใน 6 สกุลย่อย จาก 351 ตัวอย่าง [5] ต่อมา Pramual และ Wongpakam ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระยะวงจรชีวิตของแมลงร้นดำในประเทศไทยที่มีการใช้วิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI และนำมาวิเคราะห์ตามหลักเกณฑ์ทางความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าตัวอ่อนของแมลงร้นดำที่ศึกษานั้นสามารถแยกออกตามสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการเป็น 2 ชนิด ได้แก่ *Simulium chaliowae* และ *S. bullatum* เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ชนิด ข้างต้นมาเปรียบเทียบกับ *S. multistriatum* พบว่าทั้ง 2 ชนิด นี้มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับชนิด *S. multistriatum* [35] และในปี ค.ศ. 2016 ได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ในการระบุชนิดของแมลงร้นดำที่ดูดเลือดคน ในวงศ์ Simuliidae ที่อยู่ในประเทศไทยได้ทั้งหมด 3 ชนิด คือ *S. nodosum*, *S. nigrogilvum* และ *S. doipuiense* ที่มีการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 131 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างชนิด *S. nodosum* และ *S. nigrogilvum* ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเป็นชนิดที่สามารถดูดเลือดคน

ส่วน *S. doipuiense* มีการค้นพบว่าเป็นแมลงร้นดำที่สามารถดูดเลือดคนในประเทศไทย [36] และการระบุชนิดรันดำด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดในประเทศไทยมีการศึกษาที่คิดเป็น 75 % ของจำนวนชนิดรันดำทั้งหมดในประเทศไทย (ตารางที่ 1) ซึ่งการศึกษาชนิดรันดำโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดทั้งหมดสรุปได้ดังตารางที่ 2

2.1.4 ยุง (mosquito)

ยุงเป็นแมลงที่ถูกจัดในอันดับย่อย Nematocera เช่นเดียวกับร้นฝอยทรายและรันดำ โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป คือ ส่วนหัวของยุงจะมีลักษณะกลม มีตารวม 1 คู่ ระหว่างตาทั้งสองมีหนวด (antenna) เรียวยาวยื่นออกไปทางส่วนหน้า มีปากแบบแทงดูด (piercing-sucking) ส่วนอกจะมีลักษณะโค้งมนเล็กน้อย มีเกล็ดปกคลุม มีปีกบางใส 1 คู่ มีเส้นปีกหลายเส้น มีเกล็ดปกคลุม ส่วนท้อง มีอยู่ 10 ปล้อง โดยที่ท้องจะถูกปกคลุมด้วยเกล็ด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีสีเกล็ดที่แตกต่างกัน [6] โดยยุงที่มีความสำคัญทางการแพทย์นั้นมียุงด้วยกัน 4 สกุล ได้แก่ *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* และ *Mansonia* ปัจจุบันประเทศไทยพบยุงรำคาญ (*Culex* spp.) 82 ชนิด ที่จัดอยู่ใน 5 สกุลย่อย [37] ยุงลาย (*Aedes* spp.) 14 ชนิด จัดอยู่ใน 5 สกุลย่อย [38] ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) 73 ชนิด จัดอยู่ใน 3 สกุลย่อย [39] และยุงเสือ (*Mansonia* spp.) 6 ชนิด จัดอยู่ในสกุลย่อย *Mansonioides* [40] โดยการศึกษาการจำแนกหรือระบุชนิดของยุงด้วยวิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI [41,45] และวิเคราะห์ genetic distance โดยอาศัยโมเดล Kimura-2-Parameter (K2P) [41] ซึ่งมีการรายงานการนำวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิด และจำแนก morphometrics ด้วยปีกของยุงชนิด *Aedes* ที่อยู่ในพื้นที่ของประเทศไทย พบว่า *Ae.*

albopictus และ *Ae. scutellaris* มีค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แตกต่างระหว่างชนิดเฉลี่ยถึง 0.123 % และเมื่อวิเคราะห์ morphometrics จากการดูลักษณะของเส้นปีกก็สามารถแยกเพศออกได้อย่างชัดเจน ถึงแม้ว่าลักษณะของเส้นปีกจะมีความใกล้เคียงกัน [41] อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาการระบุชนิดของยุงด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังมีการศึกษาอยู่น้อย โดยสามารถแบ่งเป็นยุงลาย 57.14 % ยุงรำคาญ 3.65 % และยุงเสือ 16.7 % (ตารางที่ 1) แต่ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้มีการศึกษาไปประยุกต์ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการระบุชนิดของยุงได้ นอกจากนี้ในต่างประเทศหลากหลายพื้นที่ยังได้นำวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาช่วยระบุชนิดของยุง เช่น ในปี ค.ศ. 2016 Carolina และคณะ [42] ได้รายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* เข้ามาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกชนิดยุงรำคาญใน subgenus *Melanoconion* ที่เป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคไวรัสเวสต์ไนต์ และไวรัสไข้สมองอักเสบที่กระจายอยู่ทั่วไปในแถบทางใต้ของอเมริกาเหนือ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างยุงรำคาญทั้งหมด 120 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจัดจำแนกชนิดของ *Melanoconion* ได้ 48 ชนิด โดยมีค่า genetic distance (K2P) ระหว่าง intraspecific เฉลี่ยถึง 3 % และ divergence values ที่ได้มีค่าแตกต่างกันที่สูงกว่าค่า divergence แบบ intraspecific ถึง 11 % ที่มีความสอดคล้องกับความแตกต่าง divergence แบบ intraspecific ในยุงชนิดอื่น ๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ในพื้นที่สาธารณรัฐอิสลามปากีสถาน [43] และ สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล [44] โดยการจัดจำแนกชนิดของยุงรำคาญ ใน subgenus *Melanoconion* จะมีโครงสร้างของอนุกรมวิธานที่ซับซ้อนและไม่สามารถแยกชนิดได้อย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ยีน *COI* ในการจัดจำแนกชนิด [45] และยังได้มีการศึกษาลำดับ

นิวคลีโอไทด์บริเวณ ยีน *COI* ในการระบุชนิดของยุง ที่พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวไม่สามารถแยกชนิดของ *Anopheles deaneorum* ออกจาก *A. marajoara* ได้ เมื่อศึกษาตัวอย่างในแถบพื้นที่อเมริกาใต้ [43] ซึ่งการศึกษาชนิดยุงโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2

2.2 ขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด

การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้น จำเป็นต้องอาศัยการทำงานในฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งปัจจุบันมีอยู่หลายฐานข้อมูล อาทิ NCBI แต่ฐานข้อมูลที่มีนิยมนำมาใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและมีข้อมูลเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงจำนวนมาก คือ ฐานข้อมูลที่เรียกว่า Barcode of Life Data Systems หรือ BOLD (<https://boldsystems.org>)

ขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยอ้างอิงวิธีการของ Wilson (2012) [46] โดยผู้วิจัยต้องลงทะเบียนในฐานข้อมูล BOLD (<http://www.boldsystems.org>) เพื่อสร้างโครงการศึกษาขึ้นมา ตั้งชื่อโครงการที่ต้องบันทึกข้อมูลลงไป แล้วกรอรายละเอียดของข้อมูลที่จะบันทึก แล้วบันทึกข้อมูล ซึ่งในระบบฐานข้อมูล BOLD สามารถที่จะบันทึกรายการได้ 999 รายการต่อ 1 โครงการที่บันทึกไว้ แต่ถ้าจะบันทึกรายการมากกว่านี้ควรที่จะสร้างฐานข้อมูลโครงการขึ้นมาใหม่ วิธีการใช้ฐานข้อมูลสามารถศึกษาได้จากเว็บไซต์ข้างต้น ซึ่งขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่ การเก็บตัวอย่างและจัดจำแนกชนิดตัวอย่างแมลง การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequences analysis) และการรวบรวมข้อมูลบันทึกลงในฐานข้อมูล สรุปได้ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนผังของกระบวนการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด สามารถใช้ทั้งตัวอย่างสด ตัวอย่างแห้งที่มีเก็บรักษาไว้ในฟิโพรลันท์ ตัวอย่างที่อยู่ในน้ำยาตรึงสภาพหรือตัวอย่างที่เก็บไว้ในตู้แช่ที่มีอุณหภูมิ -20°C ในกรณีใช้ตัวอย่างสด ผู้วิจัยต้องสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงที่ต้องการศึกษาด้วยวิธีที่เหมาะสม เช่น การวางกับดัก การใช้สวิงโอบ หรือกับดักแสงไฟ ตามชนิดของแมลงที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำตัวอย่างแมลงไปฆ่าทันทีด้วยความเย็น ศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เพื่อระบุชนิดของแมลงด้วยกุญแจอนุกรมวิธาน (กรณีมีผู้เชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธาน) จากนั้นนำตัวอย่างมาถ่ายภาพ และบันทึกข้อมูลทั่วไป เช่น พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่จับตัวอย่าง ผู้จัดจำแนกชนิดของตัวอย่าง วิธีการจับตัวอย่าง และข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้อง ลงไว้ในฐานข้อมูลด้านดีเอ็นเอบาร์โค้ด ส่วนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงนั้น ตัวอย่างแมลงที่มาสกัดดีเอ็นเอนั้นจะนิยมใช้ส่วนขาหรือปีก เนื่องจากเป็นส่วนพบเซลล์ที่มีเมแทบอลิซึมสูง

มีไมโทคอนเดรียจำนวนมาก เดิมใช้วิธี alkaline lysis [47] ต่อมา Jisming และคณะ (2016) [48] ได้มีการปรับปรุงวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาต่อยอด ดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้งานได้ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ก่อนหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) นั้น จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์มาตรฐานที่มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษา ส่วนใหญ่นิยมศึกษายีน *COI* ซึ่งตัวอย่างไพรเมอร์ที่นิยมใช้สำหรับยีน *COI* สำหรับตัวอย่างของแมลง แสดงได้ดังตารางที่ 3 และก่อนที่จะบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ลงในฐานข้อมูล จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้โปรแกรม CodonCode Aligner เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและแก้ไขเบสผิดพลาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ และใช้โปรแกรม Bioedit เพื่อ align sequences ให้ถูกต้อง แล้วจึงนำไปตรวจสอบความจำเพาะของตัวอย่างหรือการปนเปื้อนของตัวอย่างเปรียบเทียบกับข้อมูลใน

ฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) หรือ BOLD (<http://www.boldsystems.org>) ต่อไป

3. สรุป

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่มีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ประมาณ 150-800 คู่เบส มาช่วยบ่งชี้ถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิต สำหรับตัวอย่างแมลงนิยมนศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI หรือ *coxI*) ปัจจุบันวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน อาทิ การวินิจฉัยโรค หรือการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการระบุชนิดแมลงในอันดับ Diptera ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เพื่อเป็นแนวทางในการรักษา ควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรค และป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากแมลงอันดับ Diptera ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังมีข้อจำกัด ในเรื่องของ

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลต่าง ๆ เช่น NCBI EMBL หรือ DDBJ ซึ่งพบว่าข้อมูลยังมีน้อย และบางส่วนไม่ได้มีการยอมรับ จึงจำเป็นต้องมีการสร้างฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตให้ครอบคลุมตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในฐานข้อมูลที่มีมาตรฐานสูง รวมไปถึงข้อมูลการรายงานการระบุชนิดแมลงด้วยวิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในประเทศไทยยังมีการข้อมูลในการรายงานที่ไม่มาก เมื่อเปรียบเทียบกับกรรายงานการระบุชนิดของแมลงที่ผ่านมา จึงจำเป็นต้องมีการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการศึกษา หรือทางวิจัยต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ถึงแม้วิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถระบุชนิดได้ แต่ยังคงต้องอาศัยหลักการความรู้ด้านอนุกรมวิธานด้วย นอกจากนี้ควรมีการพัฒนากระบวนการฐานข้อมูล ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากตัวอย่างที่มีการระบุชนิดที่ถูกต้องอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ข้อมูลที่บันทึกไว้นั้นมีความถูกต้อง ครบคลุม และน่าเชื่อถือที่สามารถนำไปใช้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 3 ตัวอย่างไพรเมอร์ที่ใช้ทำเทคนิค PCR สำหรับยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI)

Primer	Sequence (5'→3')	Paired with	เอกสารอ้างอิง
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATGG	HCO2198	[49]
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	LCO1490	
LepF1	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	LepR1	[50]
LepR1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA	LepF1	
MLepF1	GCTTTCCACGAATAAATAATA	MLepF1	[51]
MLepR1	CCTGTTCCAGCTCCATTTTC	MLepR1	
M13F (-21)	TGTAACACGACGGCCAGT	M13F (-21)	[52]
M13R (-27)	CAGGAAACAGCTATGAC	M13R (-27)	
Forward	GGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTT	Reverse	
Reverse	AAAAATTTTAATTCCAGTTGGAACAGC	Forward	[53]

4. รายการอ้างอิง

- [1] อุขาวดี ถาวรระ และธีรภาพ เจริญวิริยะภาพ, 2556, การควบคุมแมลงทางการแพทย์: ยุง, กลุ่มกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ. 133 น.
- [2] คม สุคนธสรณ์ และกานแก้ว สุคนธสรณ์, 2544, แมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย. เชียงใหม่ดิจิทัลเวอร์คจกั. 131 น.
- [3] Nzelu, C.O., Caceres, A.G., Arrunátegui-Jimenez, M.J., Lanas-Rosas, M.F., Yanez-Trujillano H.H. and Luna-Caipos, D.V., 2015, DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru, *Acta. Trop.* 145: 45-51.
- [4] สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค, 2550, การสัมมนาระบาดวิทยาแห่งชาติครั้งที่ 19 : บันทึกเหตุการณ์สำคัญทางด้านระบาดวิทยา 2550, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, ห้างหุ้นส่วนจำกัด พรวิวัน, กรุงเทพฯ, 224 น.
- [5] Pramual, P. and Adler, H.P., 2014, DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand, *Mol. Ecol. Res.* 14: 262-271.
- [6] ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์, 2559, ยุงที่สำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย, การพิมพ์ดอกคอม, กรุงเทพฯ, 212 น.
- [7] Torbjorn, E., Endre, W. and Elisabeth, S., 2007, A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes} *Mol. Phylogenet. Evol.* 43: 530-542.
- [8] Carolina, T.G., Eduardo, S.B., Kevin, J.E., Tatiane, M.P., Susan, G. and Maria, A., 2016, Mitochondrial *COI* gene as a tool in the taxonomy of mosquitoes *Culex* subgenus *Melanoconion*, *Acta. Trop.* 164: 137-149.
- [9] วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2011, DNA barcodes ของพืช : หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด, *ว.พฤกษศาสตร์ไทย* 3(1): 1-30.
- [10] Lebonah, D.E., Dileep, A., Chandrasekhar, K., Sreevani, S., Sreedevi, B. and Pramoda K.J., 2014, DNA barcoding on bacteria: A review, *Adv. Biol.* 9 p.
- [11] พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีราช, 2554, ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตกรณีศึกษา : จีน Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์, *ว.มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม* 5(2): 205-210.
- [12] Amanda, D.R. and Felix, A.H., 2007, Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding, *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 325-345.
- [13] ศิวพร อินต๊ะหล่อ, เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์ และชานินทร์ ภูพัฒน์, 2555, การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย, *ว.นิติเวชศาสตร์* 4(3): 1-8.
- [14] Hwang, U.W., Kim, W., Tautz, D. and Friedrich, M., 1998, Molecular phylogenetics at the Felsenstein zone: approaching the Strepsiptera problem using 5.8S and 28S *rDNA* sequences, *Mol.*

- Phylogenet. Evol. 9: 470-480.
- [15] Bunchu, N., 2012, Blow fly (Diptera: Calliphoridae) in Thailand: Distribution, morphological identification and medical importance appraisals, Int. J. Parasitol. Res. 4: 57-64.
- [16] Tumrasvin, W. and Shinonaga, S., 1977, Studies on medically important flies in Thailand, III: Report of species belonging to the genus *Musca* Linne, including the taxonomic keys (Diptera: Muscidae), Bull. Tokyo. Med. Dent. Univ. 24: 209-218.
- [17] Bunchu, N., Moophayak, K., Sanit, S., Sukontason, K.L., Sukontason, K. and Kurahashi, H., 2014, Two new records of *Isomyia paurogonita* Fang and Fan, 1986 and *Sumatria latifrons* Malloch, 1926 (Diptera: Calliphoridae) from the northern Thailand, with revised key to the species of *Isomyia*, Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 56: 175-177.
- [18] Kurahshi, H. and Chaiwong, T., 2013, Keys to the flesh flies of Thailand, with description of a new species of *Robineauella* Enderlein (Diptera: Sarcophagidae), Med. Entomol. Zool. 64: 83-101.
- [19] Kurahashi, H. and Bunchu, N., 2011, The blow flies recorded from Thailand, with the description of a new species of *Isomyia* Walker (Diptera: Calliphoridae), Jpn. J. Syst. Entomol. 17: 237-278.
- [20] Tumrasvin, W. and Shinonaga, S., 1977, Studies on medically important flies in Thailand, III: Report of species belonging to the genus *Musca* Linne, including the taxonomic keys (Diptera: Muscidae), Bull. Tokyo. Med. Dent. Uni. 24: 209-18.
- [21] Renaud, K.A., Savage, J. and Adamowicz, J.S., 2012, DNA barcoding of Northern Nearctic Muscidae (Diptera) reveals high correspondence between morphological and molecular species limits, BMC Ecol. 12: 24.
- [22] Barbara, K.Z., Narin, S., Anchalee, W., Marcel, A.V., Kabkaew, S., Jens, A. and Richard, Z., 2016, Application of DNA barcoding for identifying forensically relevant Diptera from northern Thailand, Parasitol. Res. 115: 2307-2320.
- [23] Jordaens, K., Sonet, G., Braet, Y., De Meyer, M., Backeljau, T., Goovaerts, F., Bourguignon, L. and Desmyter, S., 2013, DNA barcoding and the differentiation between North American and west European *Phormia regina* (Diptera, Calliphoridae, Chrysomyinae), ZooKeys 365: 149-174.
- [24] Tais, M., Carina, M.S., Juliana, C. and Patricia, J.T., 2016, The use of DNA barcode for identifying species of *Oxysarcodexia* Townsend (Diptera: Sarcophagidae): A preliminary survey, Acta. Trop. 161: 73-78.
- [25] Marianna, M., Martin, J.R., Alex, A., Paul, D.R. and Annunziata, G., 2016, Origins of *Wohlfahrtia magnifica* in Italy based on

- the identification of mitochondrial cytochrome b gene haplotypes, *Parasitol. Res.* 115: 483-487.
- [26] Bharti, M. and Singh, B., 2017, DNA-based identification of forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) from India, *J. Med. Entomol.* 54: 1151-1156.
- [27] ต้องจิตร์ ถิ่นขมนาง, 2559, ภูมิวิทยาทางการแพทย์ (Medical Entomology), ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, คลังน่านาวิทยา, 314 น.
- [28] Lewis, 1978, Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Series, 37 p.
- [29] Polseela, R., Jaturas, N., Thanwisai, A., Sing, K.W. and Wilson, J.J., 2016, Towards monitoring the sandflies (Diptera: Psychodidae) of Thailand: DNA barcoding the sandflies of Wihan Cave, Uttaradit, Mitochondrial DNA Part A 27: 3795-3801.
- [30] Sukantamala, J., Sing, K.W., Jaturas, N., Polseela, R. and Wilson J.J., 2016, Unexpected diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) in tourist caves in Northern Thailand, Mitochondrial DNA Part A 1-6.
- [31] Kanjanopas, K., Siripattanapipong, S., Ninsaeng, U., Hitakarun, A., Jitkaew, S., Kaewtaphaya, P., Tan-ariya, P., Mungthin, M., Charoenwong, C. and Leelayoova, S., 2013, *Sergentomyia* (Neophlebotomus) *gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand, *BMC Infect. Dis.* 13: 1-4.
- [32] Chusri, S., Thammapalo, S., Chusri, S., Thammapalo, S., Silpapojakul, K. and Siriyasatien, P., 2014, Animal reservoirs and potential vectors of *Leishmania siamensis* in southern Thailand, *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 45: 13-9.
- [33] Kumar, N.P., Srinivasan, R. and Jambulingam, P., 2012, DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India, *Mol. Ecol. Resour.* 12: 414-420.
- [34] Romero-Ricardo, L., Lastre-Meza, N., Perez-Doria, A. and Bejarano, E.E., 2016, DNA barcoding to identify species of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) in the mixed leishmaniasis focus of the Colombian Caribbean, *Acta. Trop.* 159: 125-131.
- [35] Pramual, P. and Wongpakam, K., 2014, Association of black fly (Diptera: Simuliidae) life stages using DNA barcode, *Asia Pac. Entomol.* 17: 549-554.
- [36] Pramual, P., Thajjarern, J. and Wongpakamb, K., 2016, DNA barcoding of human-biting black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand, *Acta. Trop.* 164: 33-40.
- [37] Rattanarithikul, R., Harrison, B.A., Panthusiri, P., Peyton, E.L., Jones, J.W. and Coleman, R.E., 2005, Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand II: Genera *Culex* and *Lutzia*, *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 36: 1-97.

- [38] Rattanaarithikul, R., Harbach, H.E., Harrison, B.A., Panthusiri, P., Coleman, R.E. and Richardson, J.H., 2010, Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand VI. Tribe Aedini, Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health 41: 1-225.
- [39] Rattanaarithikul, R., Harrison, B.A., Harbach, H.E., Panthusiri, P. and Coleman, R.E., 2006, Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand IV. *Anopheles*, Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health 37: 1-128.
- [40] Rattanaarithikul, R., Harrison, B.A., Panthusiri, P., Peyton, E.L. and Coleman, R.E., 2006, Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand III: Genera *Aedeomyia*, *Ficalbia*, *Mimomyia*, *Hodgesia*, *Coquillettia*, *Mansonia* and *Uranotaenia*, Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health 37: 1-85.
- [41] Sumruayphol, S., Apiwathnasorn, C., Ruangsittichai, J., Sriwichai, P., Attrapadung, S., Samung, Y. and Dujardin J.P., 2016, DNA barcoding and wing morphometrics to distinguish three *Aedes* vectors in Thailand, Acta. Trop. 159: 1-10.
- [42] Torres-Gutierrez, C., Bergo, E.S., Emerson, K.J., de Oliveira, T.M., Greni, S. and Sallum, M.A., 2016, Mitochondrial *COI* gene as a tool in the taxonomy of mosquitoes *Culex* subgenus *Melanoconion*, Acta. Trop. 164: 33-40.
- [43] Ashfaq, M., Hebert, P.D.N., Mirza, J.H., Khan, A.M., Zafar, Y. and Mirza, M.S., 2014, Analyzing mosquito (Diptera: Culicidae) diversity in Pakistan by DNA barcoding, PLoS. ONE 9(5): 97-268.
- [44] Foster, P.G., Bergo, E.S., Bourke, B.P., Oliveira, T.M., Nagaki, S.S., SantAna, D.C. and Sallum, M.A., 2013, Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) PLoS. ONE 8 (2): 54-63.
- [45] Motoki, M.T., Wilkerson, R.C. and Sallum, M.A.M., 2009, The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae), Mem. Inst. 104: 823-850.
- [46] Wilson, J.J., 2012, DNA barcodes for the tree of life: A. animals insects, Meth. Mol. Biol. 858: 17-46.
- [47] Ivanova, N.V., Borisenko, A.V. and Hebert, P.D., 2009, Express barcodes: Racing from specimen to identification, Mol. Ecol. Resour. 9: 35-41
- [48] Jisming, S.W., Sing, K.W. and Wilson, J.J., 2016, DNA barcodes and citizen science provoke a diversity reappraisal for the “ring” butterflies of Peninsular Malaysia (*Ypthima*: *Satyrinae*: *Nymphalidae*: *Lepidotera*), Genome 10: 879-888.
- [49] Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R., 1994, DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from

- diverse metazoan invertebrates, Mol. Mar. Biol. Biotech. 3: 294-299.
- [50] Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J., Janzen, D.H. and Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly, *Astraptes fulgerator*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101: 14812-14817.
- [51] Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. and Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103: 968-971.
- [52] Messing, J., 1983, New M13 vectors for cloning, Meth. Enzymol. 101: 20-78.
- [53] Kumar, N.P., Rajavel, A.R., Natarajan, R. and Jambulingam, P., 2007, DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae), J. Med. Entomol. 44: 1-7.