การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันหนอนชอนใบในพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย

DNA barcoding of the leafminer (Diptera: Agromyzidae) for economic plants in Thailand

ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ

อาทิตย์ รักกสิกร สิริชัย สาธุวิจารณ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Agromyzid leafminers comprise a pest group that causes both considerable economic losses and serious quarantine problems. In this study, molecular approaches, such as DNA "barcoding" of the *cytochrome* c *oxidase* (*cox*1) gene, was performed to assist in the species identification of pest species of Agromyzidae leafminers in economic vegetable crops in Thailand. Fresh materials for leafminers were collected from all regions of Thailand. Sequences were analyzed using a "barcode" approach. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GENBANK. Five species of *Liriomyza* spp. were confirmed and their sequences deposited in Genbank: *Liriomyza brassicae* Riley, 1884; *L. chinensis* Kato, 1949; *L. huidobrensis* Blanchard, 1926; *L. sativae* Blanchard, 1938; and *L. trifolii* Burgess, 1880. Further phylogenetic analysis is needed to clarify the distinction among other species of Agromyzidae present in Thailand and nearby countries.

Keywords: DNA barcoding, Agromyzidae and Leaf miner flies

บทคัดย่อ

แมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae เป็นศัตรูพืชที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและปัญหาด้านการกักกันพืชเป็นอย่างยิ่ง การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากยีน *cytochrome* c *oxidase* (*cox*1) gene มาช่วยในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ที่เป็นศัตรูพืชผักที่สำคัญในประเทศไทย โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบจากภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย พบแมลงวันหนอนชอนใบ *Liriomyza* spp. และได้บันทึกข้อมูล ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในฐานข้อมูล Genbank จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard, 1926), *L. sativae* Blanchard, 1938 และ *L. trifolii* (Burgess

1880) ในอนาคตมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อยืนยันชี้แจงความแตกต่างระหว่างชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง

คำหลัก: ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและ แมลงวันหนอนชอนใบ

คำนำ

แมลงวันหนอนชอนใบเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญต่อพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อพืชผักที่ส่งออกไปขายยังต่างประเทศ โดยมักพบหนอนแมลงวันชอนใบติดไปกับพืชผักที่ต้องการส่งออก ส่งผลต่อการกีดกันทางการค้าตามมาภายหลัง และในปัจจุบันพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบเพิ่มจำนวนประชากรและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดความเสียหายให้กับพืชหลากหลายชนิด ทำโดยมักพบเข้าทำลายพืชวงศ์แตง (Family) Cucurbitaceae ซึ่งได้แก่ แตงชนิดต่างๆ พืชวงศ์ถั่ว (Family) Leguminosae ได้แก่ ถั่วชนิดต่างๆ และพืชในวงศ์มะเขือ (Family) Solanaceae ได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือเปราะ เป็นต้น และจากการแพร่กระจายตัวอย่างรวดเร็วของแมลงวันหนอนชอนใบรวมทั้งความหลากหลายของพืชอาหารนั้น ทำให้แมลงหนอนชอนใบเกิดความต้านทานยาฆ่าแมลงในการเพาะปลูกพืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด นอกจากนี้แมลงวันหนอนชอนใบหลายชนิดเกิดเป็นชนิดซับซ้อน (cryptic species) ยากต่อการจำแนกชนิดและควบคุม ก่อให้เกิดปัญหาต่อพืชผัก และพืชเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก

ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่น่าเชื่อถือและมีการยอมรับในระดับสากลมาร่วมใช้ในการจัดจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อใช้ในจำแนกชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบ นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเชิงลึกได้ รวมทั้งเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบที่มีในประเทศไทยให้มีมาตรฐานทัดเทียมสากล และใช้ข้อมูลเหล่านี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำเข้าส่งออกพืช ผักของไทยอีกด้วย และจะเป็นฐานข้อมูลในการวางยุทธศาสตร์ในการบริหารจัดการแมลงวันหนอนชอนใบอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) พร้อมกล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA)
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบ (ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก)
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit) (Bioline, Australia), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia),

Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mMTris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), สารละลาย GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)

- สารเคมี RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีการ

1. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันหนอนชอนใบ

1.1 นำตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop *et al*., 2017 ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวนสามข้างของแมลงวันหนอนชอนใบ (25 mg) มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (ตัวอย่างแมลงที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)) จากนั้นเติม Lysis BufferGL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Proteinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิทพร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง แล้วเติม Lysis BufferG3 ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน ISOLATE II Genomic DNA tube ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และเติม Elution Buffer G ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีจากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 เพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์universal primer จากยีน *cox1*:LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al*., 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย GoTaq® 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรโดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR

cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ

1.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส(gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ

1.4 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

1.5 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันหนอนชอนใบที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA

1.6 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ด้วยการ Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number

การบันทึกข้อมูล

1) บันทึกข้อมูล ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับชนิดแมลงวันหนอนชอนใบที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันหนอนชอนใบ พร้อมทั้งรายละเอียดของพืชอาหารที่พบแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลาย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม พ.ศ. 2564 - กันยายน พ.ศ. 2565

สถานที่: 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันหนอนชอนใบ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย (Figure 1) และพบแมลงวันหนอนชอนใบ 5 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard,1926), *L. sativae* Blanchard, 1938 และ *L. trifolii* (Burgess 1880) (Figure 2 - 6) จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490 / HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 7) เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 1) เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 2) และจากข้อมูลที่ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวแสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

ผลการทดลองครั้งนี้ทำให้ทราบชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง และได้ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันหนอนชอนใบซึ่งข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จำทำให้ได้ข้อมูลสนับสนุนการจัดจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบในประเทศไทยให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และเป็นที่ยอมรับของสากลโลก ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนสถานะของการจัดจำแนกแมลงวันหนอนชอนใบที่มีรายงานการพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาหรือประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบของไทยอีกด้วย

นอกจากนี้ยังได้ข้อมูลสถานภาพของแมลงวันหนอนชอนใบที่พบในประเทศไทย สามารถนำผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้ ไปใช้ประยุกต์ร่วมกับความสัมพันธ์ด้านสัณฐานวิทยาของพืชอาหารของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดในประเทศไทย โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบในพื้นที่การเกษตร รวมทั้งเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุม ป้องกันกำจัด และข้อมูลในการนำเข้าส่งออก สามารถเป็นประโยชน์ในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อสนับสนุนมาตรการการค้าระหว่างประเทศ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรและนำมาศึกษาผลดีเอ็นเอบาร์โค้ด การศึกษาครั้งนี้ได้ผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันหนอนชอนใบและบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae*, *L. chinensis*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii*

คำขอบคุณ

ข้าราชการ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมาบริการ ของกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงในการช่วยเหลือเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบ จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ และอัมพร วิโนทัย. 2544. *การแก้ไขปัญหาการระบาดของหนอนชอนใบบน พื้นที่สูงภาคเหนือ*. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 42 หน้า.

รัตนา นชะพงษ์ ศิริณี พูนไชยศรี สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี พรรณเพ็ญ ชโยภาส. 2551. *อนุกรมวิธานแมลงวันหนอนชอนใบสกุล Liriomyza และ Chromatomyia*. รายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2550. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพ.

International Plant Protection Convention (IPPC). 2016. ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 16: Genus *Liriomyza*. Available at: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2017/01/DP_16_2016_En_2017-01-30.pdf

OEPP/EPPO. 2005. Diagnostics Diagnostic PM 7/53. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35: 271–273.

Lim G.S, S.S. Sastroutomo and W.H. Loke. 1999. Workshop on leafminers of vegetables in Southeast Asia. CABI-SEARC.

Malipatil, M. B., P.M. Ridland, A. Rauf, J. Watung and D. Kandowangko. 2004. New records of *Liriomyza* Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia. *Formosan Entomo*l. 24: 287-292.

Minkenberg O.P. 1988. Dispersal of *Liriomyza trifolii*. *Bulletin of the. European and Mediterranean.* Plant Protection Organisation 18: 173-182.

Parrella, M.P., C.B. Keil and J.G. Morse. 1984. Insecticide resistance in *Liriomyza trifolii.* California Agriculture 38: 22-33.

Sasakawa, M. 2013. Thailand Agromyzidae (Diptera) -2. *Zootaxa*. 3746(4): 501-28.

Shiao, S.F. 2004. Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. *Applied Entomology and Zoology* 39(1): 27-39.

Spencer, K.A. 1973. *Agromyzidae (Diptera) of economic importance.* The Hague. Netherlands. 418 p.

Stegmaier, C.E. 1966. Host plants and parasites of *Liriomyza trifolii* in Florida (Diptera: Agromyzidae). *Florida Entomologist* 49: 75-80.

Figure 1 Samples of Agromyzid leafminer collected from host plants in Thailand.

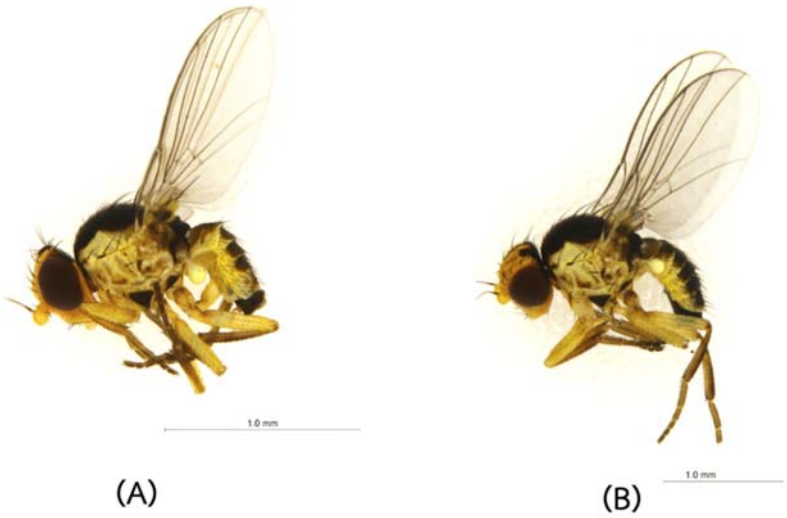

Figure 2 Adult of *Liriomyza brassicae* Riley, 1884

(A) Female of leafminer (B) Male of leafminer

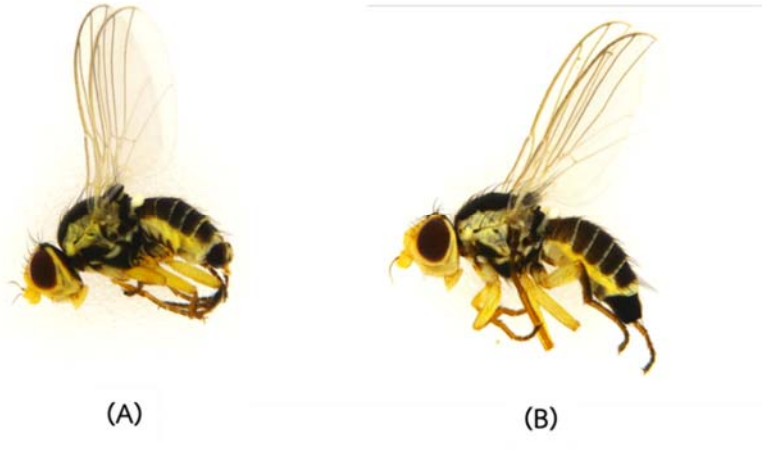

Figure 3 Adult of *Liriomyza chinensis* Kato, 1949
(B) Female of leafminer (B) Male of leafminer

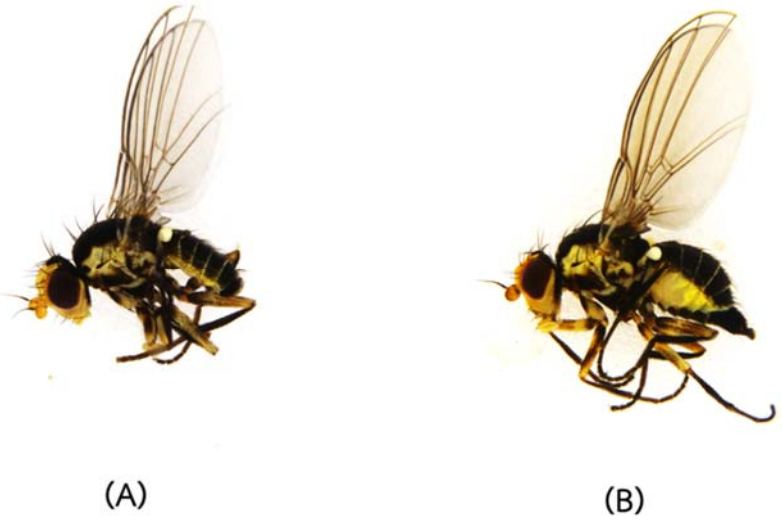

Figure 4 Adult of *Liriomyza huidrobrensis* Blanchard, 1926
(C) Female of leafminer (B) Male of leafminer

Figure 5 Adult of *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938

(A) Female of leafminer (B) Male of leafminer

Figure 6 Adult of *Liriomyza trifolii* Burgess, 1880

(B) Female of leafminer (B) Male of leafminer

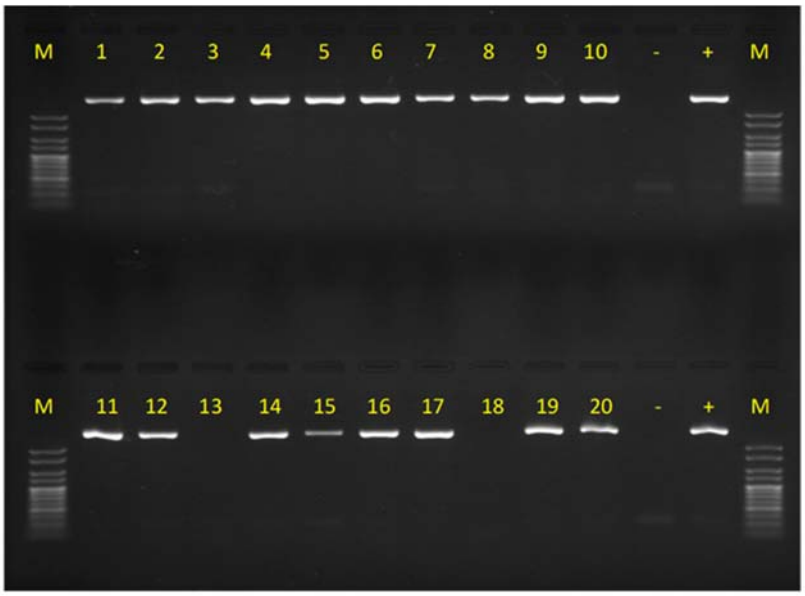

Figure 7 Some PCR results using the cox1 (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

Lane 1 - 4 = *Liriomyza brassicae* Lane 5- 8 = *Liriomyza chinensis*

Lane 9 - 12 = *Liriomyza huidobrensis* Lane 14 -16 = *Liriomyza sativae*

Lane 17, 19, 20 = *Liriomyza trifolii*

Table 1 Nucleotide sequence analysis of the 650 bp DNA fragments from leafminer samples amplified by *cox*1 gene (LCO1490 and HCO2198).

No.	Scientific name	Nucleotide sequence
1	*Liriomyza brassicae*	ATAGTAGGAACTTCTCTTAGAATTCTTATTCGAGCCGAATTAGGTCATCCAGGAGCTTTAA TTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACTGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTT ATAGTTATACCTATTATAATCGGAGGGTTTGGAAACTGACTAGTACCTTTAATATTAGGAG CTCCTGATATAGCCTTTCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGATTATTACCCCCTGCTCTT ACCTTATTATTAATAAGCAGTATAGTGGAAAACGGGGCCGGAACAGGATGAACAGTTTATC CTCCCCTCTCTTCTATTATTGCTCACGGTGGGGCATCTGTTGATCTAGCTATTTTTTCATTA CACCTTGCAGGAATTTCTAGAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAATTATTAATAT GCGATCCACAGGAATTAGATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCTGTTCTTATTACTG CTATCTTATTACTTTTATCTTTACCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACAATACTTCTAACAGAC CGAAATTTTAACACATCATTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGGAGACCCAATTTTATATCAAC ACCTATTCTGATTTT
2	*Liriomyza chiensis*	ATAGTGGGAACTTCCTTAAGAATTTTAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCTGGAGCTTTAA TTGGTGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACTGCACATGCTTTTATTATAATTTTCTTT ATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGGTTTGGAAACTGATTAGTACCATTAATATTAGGAG

		CACCCGATATAGCTTTTCCACGTATAAACAATATAAGTTTTTGATTATTACCTCCAGCACTT ACTTTACTTTTATTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGTTGAACGGTTTACC CTCCCCTTTCTTCTGTAATCGCCCATGGAGGGGCTTCTGTTGATCTTGCTATTTTCTCTTTA CATCTCGCAGGAATTTCATCAATTTTAGGGGCAGTAAATTTTATTACCACTATTATTAATAT ACGATCTATAGGAATTAGTTTCGATCGAATACCGTTATTTGTTTGATCTGTTTTAATTACAG CTATTTTATTATTATTATCATTGCCTGTATTAGCTGGAGCAATTACAATGCTATTAACAGAT CGAAATTTTAACACTTCTTTTTTTGACCCTGCTGGGGGAGGAGACCCAATTTTATATCAAC ATTTATTTTGATTTT
3	*Liriomyza huidrobrensis*	ATAGTGGGAACTTCTTTAAGAATTCTAATTCGTGCTGAATTAGGACACCCCGGTGCTTTAA TTGGTGACGATCAAATTTATAATGTCATTGTAACTGCCCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATGGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGATTAGTACCTTTAATATTAGGGG CTCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAACATAAGTTTTTGATTATTACCTCCAGCTCTT ACCCTTCTACTTATAAGAAGTATAGTTGAAAACGGAGCTGGGACAGGATGAACGGTTTACC CTCCTCTTTCTTCTATTATTGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTTCTCTA CATTTAGCTGGAATTTCATCTATTTTAGGGGCTGTAAATTTTATTACAACAATTATTAATAT ACGATCAACTGGTATTACTTTTGATCGAATACCATTATTTGTGTGATCTGTTCTAATTACTG CAGTTCTTTTACTGTTATCATTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAACAGAT CGAAATTTTAATACTTCTTTCTTTGACCCGGCTGGGGGAGGAGACCCAATTTTATATCAAC ATTTATTTTGATTTT
4	*Liriomyza sativae*	ATAGTAGGAACTTCTCTTAGAATTCTTATTCGAGCAGAATTAGGACATCCGGGTGCTTTAA TTGGTGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTAACTGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTT ATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGC TCCAGACATAGCATTTCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGATTATTACCCCCTGCTTTAA CTCTTTTATTAATAAGCAGTATAGTAGAAAATGGGGCTGGGACAGGATGAACGGTTTACCC TCCACTTTCTTCAATTATTGCACATGGTGGTGCTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTTCTCTCC ATTTAGCTGGAATTTCTTCTATTTTAGGGGCAGTAAATTTTATTACAACAATTATTAATATA CGATCAACAGGAATTAGTTTTGATCGAATACCTTTATTTGTGTGATCAGTTTTAATTACTGC TGTATTATTACTTTTATCATTGCCTGTGCTAGCTGGAGCAATTACTATATTATTAACAGATC GAAATTTTAATACATCATTTTTTGATCCAGCCGGTGGAGGAGACCCAATTTTATATCAACA TTTATTTTGATTTT
5	*Liriomyza trifolli*	ATAGTAGGAACTTCTCTTAGAATTCTTATTCGAGCAGAATTAGGGCACCCCGGTGCCCTAA TTGGTGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTAACTGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTT ATAGTTATGCCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTCCCTTTAATATTAGGAG CCCCAGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAACATAAGCTTTTGGTTATTACCCCCCGCTTT AACTCTTTTATTAATAAGCAGAATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACCGTTTAC CCTCCCCTTTCCTCAATTATTGCACATGGTGGAGCTTCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCCTT ACATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGGGCAGTAAATTTTATTACAACAATTATTAATA TACGATCAACGGGAATTAATTTTGACCGAATACCTTTATTTGTTTGATCTGTGTTAATTACT GCTGTATTATTACTTTTATCATTGCCCGTTTTAGCTGGAGCAATTACAATACTATTAACAGA CCGAAATTTTAATACATCATTTTTTGACCCAGCTGGGGGAGGAGATCCAATTTTATACCAA CATCTATTTTGATTTT

Table 2 GenBank accession number(s) for the DNA barcode of the leafminer (Diptera: Agromyzidae) for economic plants in Thailand.

	Scientific name	No. of nucleotide sequence(s)	GenBank accession number(s)
1	*Liriomyza brassicae*	20	OM327452 – 61, ON565771 - 80
2	*Liriomyza chiensis*	20	OM327462 – 71, ON565781 - 90
3	*Liriomyza huidrobrensis*	20	OM327472 – 81, ON565791 - 00
4	*Liriomyza sativae*	20	OM327482 – 99, ON565801 - 02
5	*Liriomyza trifolli*	20	OM327500 – 09, ON565803 - 10