



ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำ (Trichoptera) ในประเทศไทย

วิทยานิพนธ์
ของ
ชวนัฐ เจริญชัยวัฒนโชติ

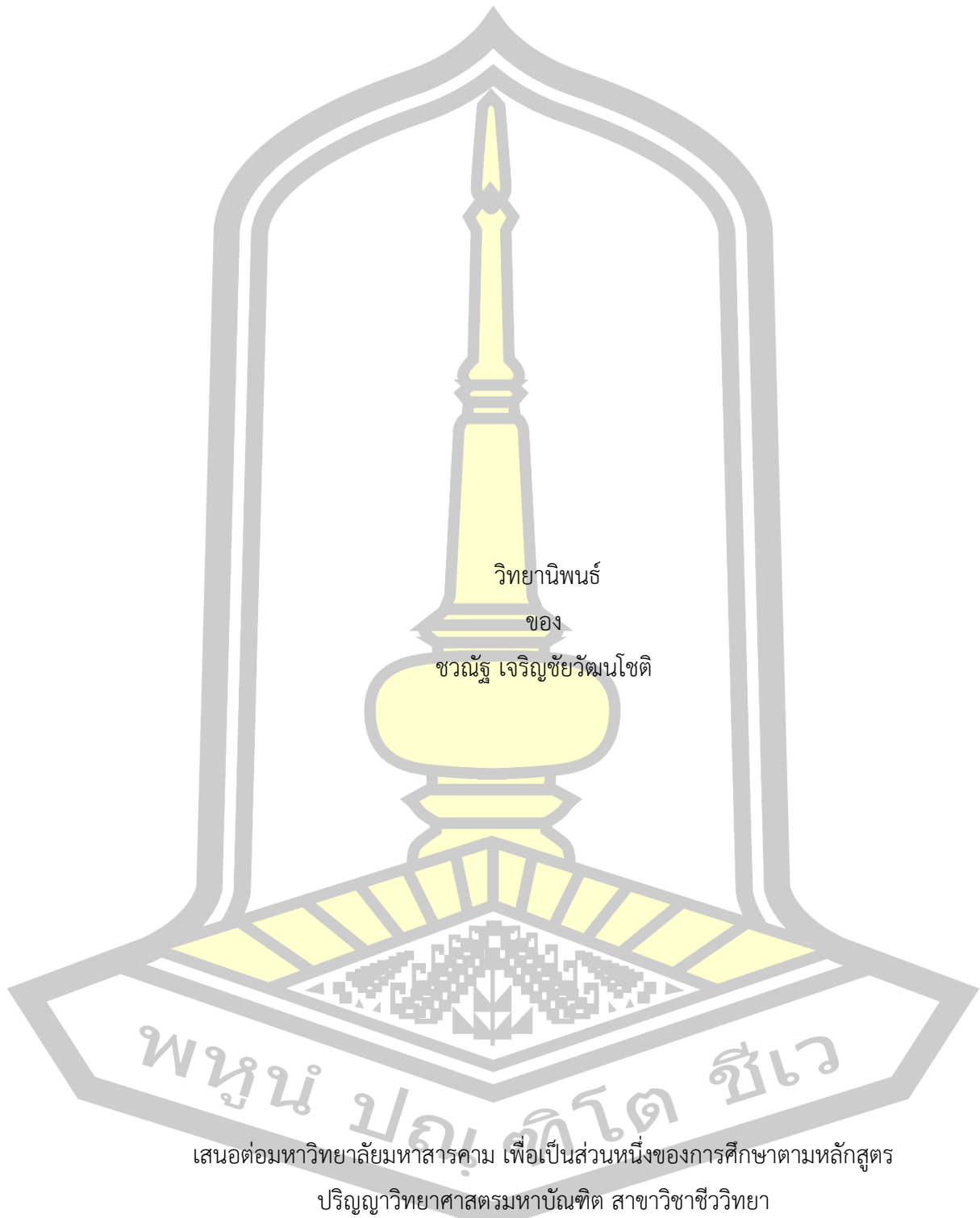
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำ (Trichoptera) ในประเทศไทย



เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

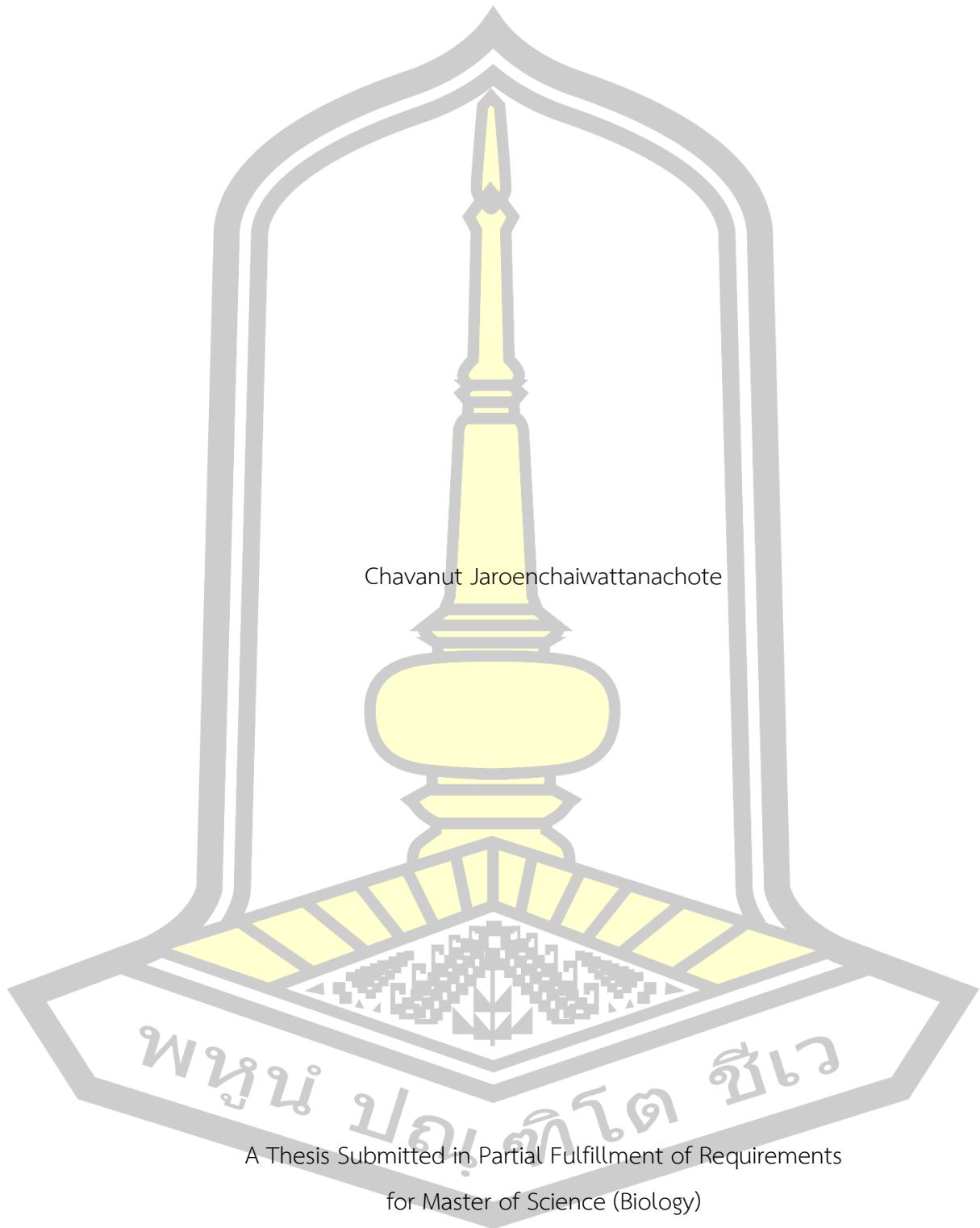
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

DNA barcoding of Caddisflies (Trichoptera) in Thailand

Chavanut Jaroenchaiwattanachote



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biology)

May 2024

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายชวณัฐ เจริญชัยวัฒน
โชติ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. อุบล ตั้งควานิช)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. อิสระ ธานี)

กรรมการ

(รศ. ดร. สุคนธ์ทิพย์ เสวตนลินทล)

กรรมการ

(รศ. ดร. ปิยมาศ นานอก โสภาดาวัลย์)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำ (Trichoptera) ในประเทศไทย		
ผู้วิจัย	ชวณัฐ เจริญชัยวัฒน์โชติ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร. ไพโรจน์ ประมวล		
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อิศระ ธาณี		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2567

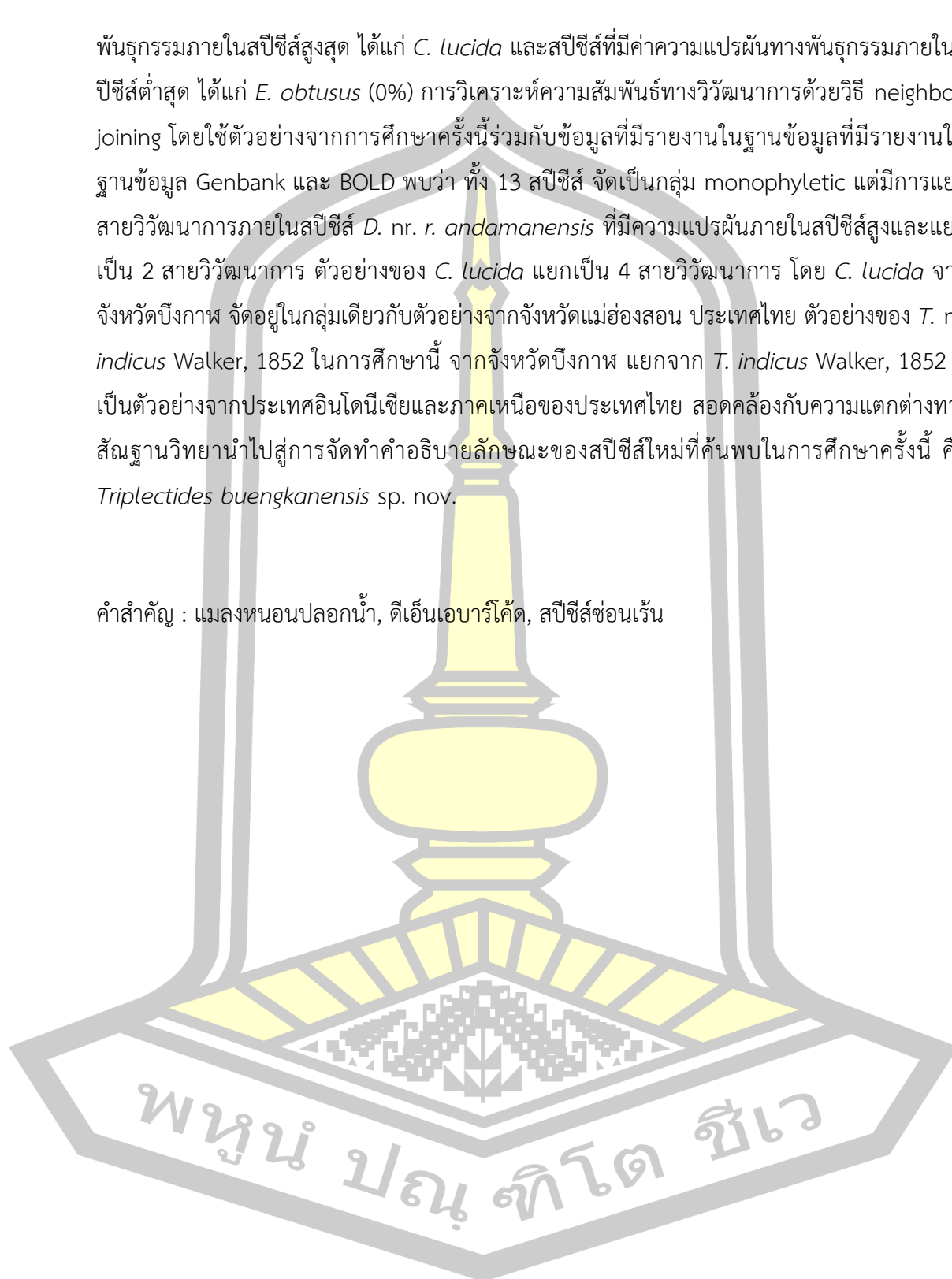
บทคัดย่อ

อันดับแมลงหนอนปลอกน้ำ (Trichoptera) เป็นหนึ่งในอันดับที่มีความหลากหลายมากที่สุด ระยะตัวอ่อน อาศัยในระบบนิเวศแหล่งน้ำ หลายสปีชีส์มีความจำเพาะต่อแหล่งที่อยู่อาศัย และมีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางกายภาพและเคมี จึงนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพแหล่งน้ำ อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ดังกล่าวมีอุปสรรคสำคัญ เนื่องจากต้องการข้อมูลในระดับสปีชีส์ซึ่งมีข้อจำกัดในการจัดจำแนกในระยะตัวอ่อน ซึ่งส่วนใหญ่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ ในปัจจุบันมีการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำเพื่อระบุสปีชีส์อย่างแพร่หลาย ซึ่งสามารถนำมาใช้เชื่อมโยงระยะตัวเต็มวัยที่ระบุสปีชีส์ได้ด้วยฐานวิธยากับระยะตัวอ่อน รวมถึงระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย ซึ่งหลายสปีชีส์ไม่สามารถจำแนกด้วยฐานวิธยาได้ อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำน้อยมาก การศึกษาครั้งนี้ เก็บตัวอย่างแมลงหนอนปลอกน้ำ ทั้งหมด 6 แห่ง จาก 5 จังหวัดในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 1487 ตัวอย่าง จำแนกด้วยฐานวิธยาได้ 4 วงศ์ 8 สกุล 13 สปีชีส์ ได้แก่ *Dipseudopsis* nr. *robustior* *andamanensis*, *Cheumatopsyche* *lucida* Ulmer, 1907, *Cheumatopsyche* *schwendingeri* M&C, 1997, *Macrostemum* *dione* M&C, 1998, *Aethaloptera* *sexpunctata* Kolenati, 1859, *Ecnomus* *argonautos* Laudee & Malicky, 1999, *Ecnomus* *mammus* M&C, 1993, *Ecnomus* *obtus* Ulmer, 1910, *Leptocerus* *posticus* Banks, 1911, *Oecetis* *bengalica* Martynov, 1836, *Oecetis* *biramosa* Martynov, 1936, *Oecetis* sp. และ *Triplectides* *buengkanensis* sp. nov. พื้นที่ที่พบแมลงหนอนปลอกน้ำมากที่สุด ได้แก่ บึงโขงหลง จังหวัดบึงกาฬ จำนวน 1186 ตัวอย่าง 11 สปีชีส์ รองลงมา ได้แก่ หนองเชียงสา จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 246 ตัวอย่าง 2 สปีชีส์

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน Cytochrome c oxidase I (COI) พบว่า ค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ มีค่าระหว่าง 0 – 14.41% โดยสปีชีส์ที่มีค่าความแปรผันทาง

พันธุกรรมภายในสปีชีส์สูงสุด ได้แก่ *C. lucida* และสปีชีส์ที่มีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ต่ำสุด ได้แก่ *E. obtusus* (0%) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining โดยใช้ตัวอย่างจากการศึกษาครั้งนี้ร่วมกับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank และ BOLD พบว่า ทั้ง 13 สปีชีส์ จัดเป็นกลุ่ม monophyletic แต่มีการแยกสายวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ *D. nr. r. andamanensis* ที่มีความแปรผันภายในสปีชีส์สูงและแยกเป็น 2 สายวิวัฒนาการ ตัวอย่างของ *C. lucida* แยกเป็น 4 สายวิวัฒนาการ โดย *C. lucida* จากจังหวัดบึงกาฬ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับตัวอย่างจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน ประเทศไทย ตัวอย่างของ *T. nr. indicus* Walker, 1852 ในการศึกษาครั้งนี้ จากจังหวัดบึงกาฬ แยกจาก *T. indicus* Walker, 1852 ที่เป็นตัวอย่างจากประเทศอินโดนีเซียและภาคเหนือของประเทศไทย สอดคล้องกับความแตกต่างทางสัณฐานวิทยานำไปสู่การจัดทำคำอธิบายลักษณะของสปีชีส์ใหม่ที่ค้นพบในการศึกษาครั้งนี้ คือ *Triplectides buengkanensis* sp. nov.

คำสำคัญ : แมลงหอนปลอกน้ำ, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, สปีชีส์ซ่อนเร้น



TITLE DNA barcoding of Caddisflies (Trichoptera) in Thailand
AUTHOR Chavanut Jaroenchaiwattanachote
ADVISORS Professor Pairoi Pramual , Ph.D.
 Assistant Professor Issara Thanee , Ph.D.
DEGREE Master of Science **MAJOR** Biology
UNIVERSITY Mahasarakham **YEAR** 2024
 University

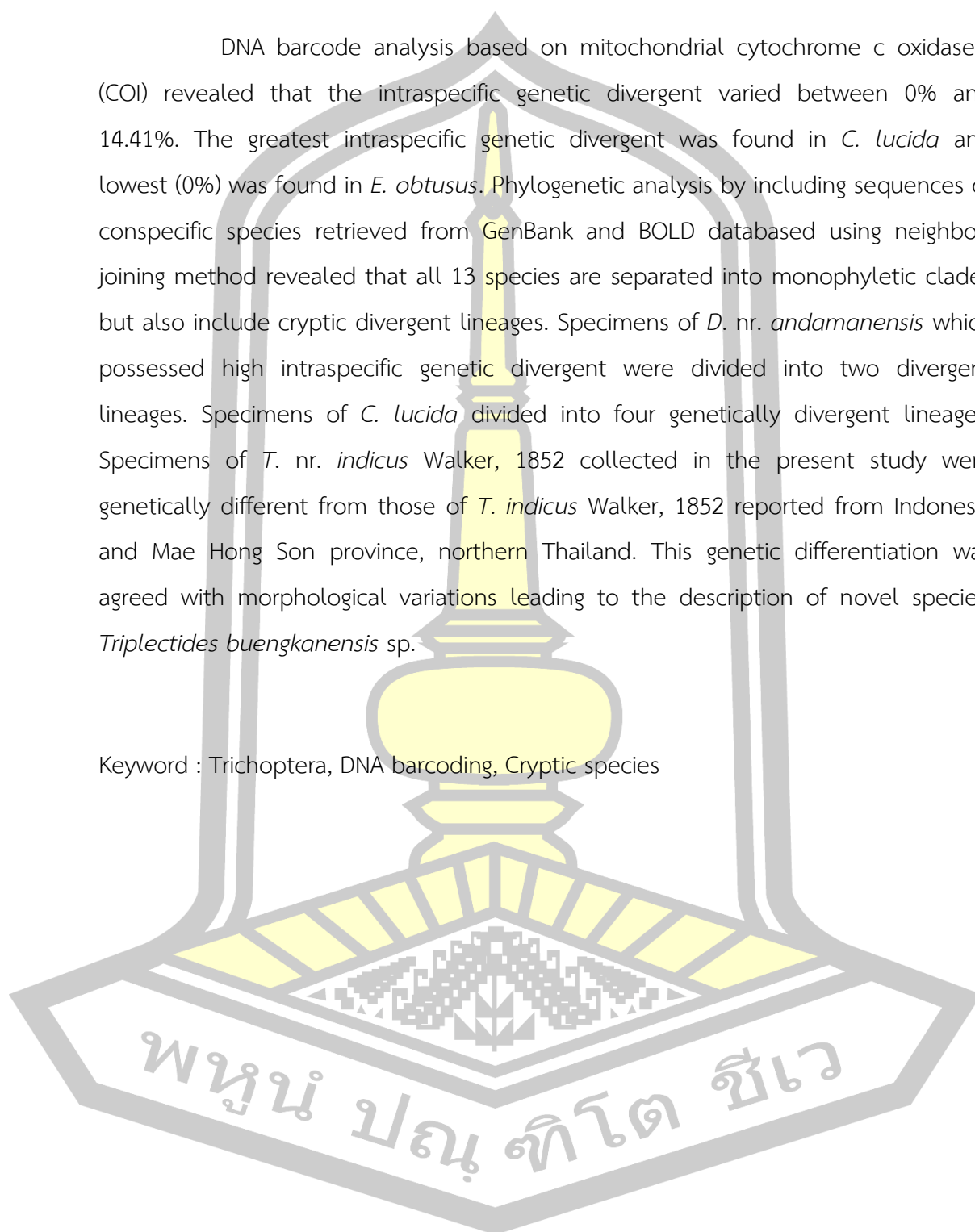
ABSTRACT

Trichoptera, or caddisflies, are one of the most diverse order of freshwater insects. The immature stages occupy aquatic ecology. Many species are specific to particular environmental conditions and high sensitivity to the physical and chemical change. Therefore, species of the order Trichoptera are used as bioindicators. However, application of Trichoptera as bioindicator has important obstacle because difficulty for identification of the immature stages as many are unable to identify into species level. Recently, DNA barcoding has been applying for species identification of Trichoptera. This molecular identification approach can be used to associate unknown immature and female to the known adult male. However, in Thailand, information on DNA barcoding of Trichoptera is limited. In this study Trichopteran specimens were collected from 6 sampling sites from 5 provinces in northeastern Thailand. A total of 1487 specimens from 4 families, 8 genera and 13 species were collected, namely, *Dipseudopsis* nr. *robustior andamanensis*, *Cheumatopsyche lucida* Ulmer, 1907, *Cheumatopsyche schwendingeri* M&C, 1997, *Macrostemum dione* M&C, 1998, *Aethaloptera sexpunctata* Kolenati, 1859, *Ecnomus argonautos* Laudee & Malicky, 1999, *Ecnomus mammus* M&C, 1993, *Ecnomus obtusus* Ulmer, 1910, *Leptocerus posticus* Banks, 1911, *Oecetis bengalica* Martynov, 1836, *Oecetis biramosa* Martynov, 1936, *Oecetis* sp. and *Triplectides buengkanensis* sp. nov. The most diverse sampling site is Bueng Khong Long, Buengkan province where 1186 specimens (11 species) were collected. The second most abundance sampling site is Nong Chiang Cha, Chiyaphum province with 246 specimens (2

species) were collected.

DNA barcode analysis based on mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) revealed that the intraspecific genetic divergent varied between 0% and 14.41%. The greatest intraspecific genetic divergent was found in *C. lucida* and lowest (0%) was found in *E. obtusus*. Phylogenetic analysis by including sequences of conspecific species retrieved from GenBank and BOLD databased using neighbor-joining method revealed that all 13 species are separated into monophyletic clades but also include cryptic divergent lineages. Specimens of *D. nr. andamanensis* which possessed high intraspecific genetic divergent were divided into two divergent lineages. Specimens of *C. lucida* divided into four genetically divergent lineages. Specimens of *T. nr. indicus* Walker, 1852 collected in the present study were genetically different from those of *T. indicus* Walker, 1852 reported from Indonesia and Mae Hong Son province, northern Thailand. This genetic differentiation was agreed with morphological variations leading to the description of novel species, *Triplectides buengkanensis* sp.

Keyword : Trichoptera, DNA barcoding, Cryptic species



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร. ไพโรจน์ ประมวล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อิศระ ธาณี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำตลอดการทำวิจัยครั้งนี้ รองศาสตราจารย์ ดร. อุบล ตั้งควาณิช ประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. สุคนธ์ทิพย์ เสวตณลินทล และรองศาสตราจารย์ ดร. ปิยมาศ นานอก โสภาดาวัลย์ คณะกรรมการ ที่ช่วยให้คำแนะนำ ปรับปรุงและแก้ไข ในการสอบเค้าโครงและป้องกันวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณเงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บิดาและมารดา นายพัน ตรัณวัน และนางสาวปรีศรา เจริญชัยวัฒนโชติ ผู้ให้กำเนิด และผู้ที่มีความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล โกมณเทียร นายธีระศักดิ์ ธงยันต์ และนิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม นางสาววรารักษ์ จำปาโท ดร. วรณชัย วรณสิงห์ และนายรณฤทธิ์ มินทะระ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยในห้องปฏิบัติการ

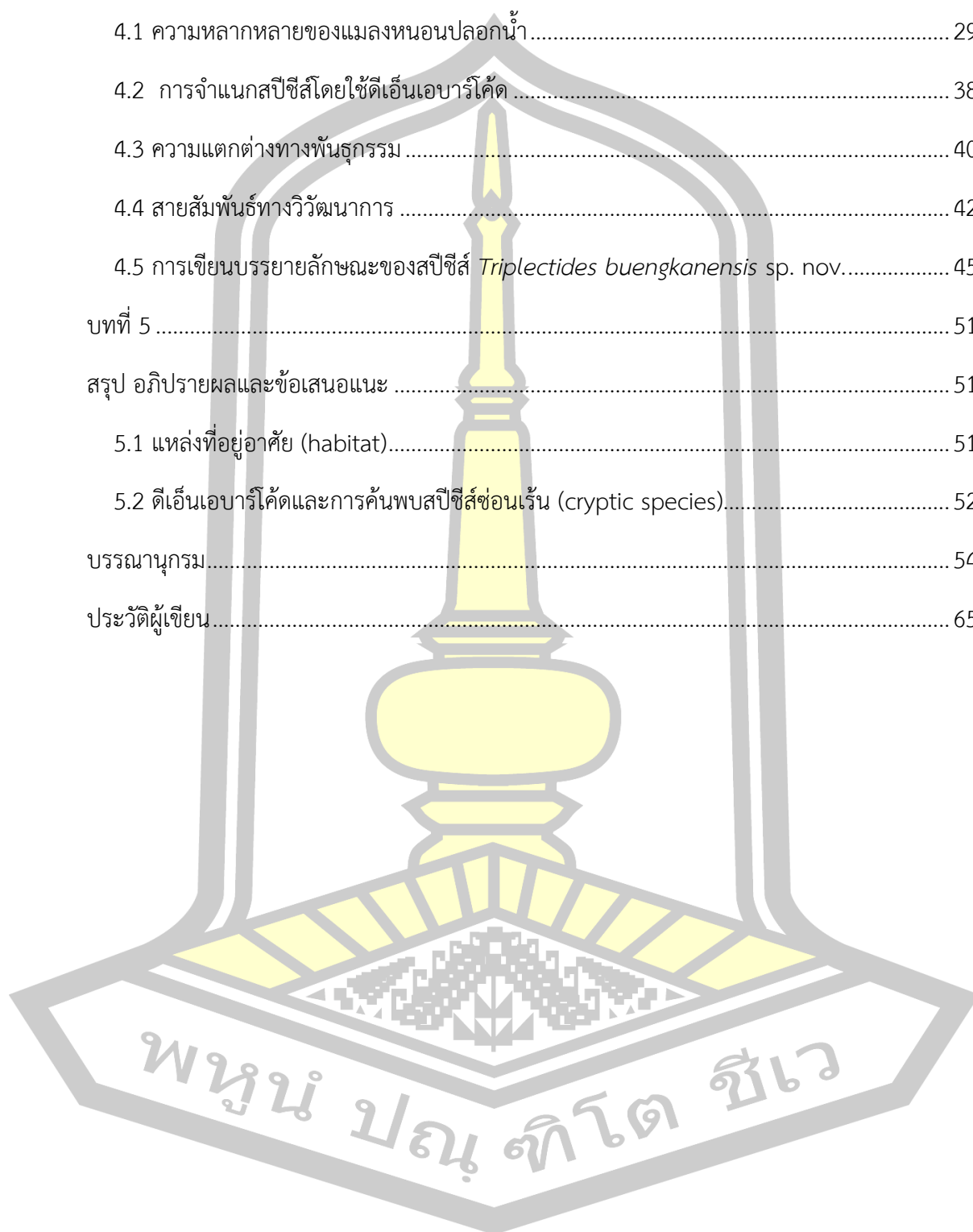
ชวณัฐ เจริญชัยวัฒนโชติ

พูน ปณ จิตโต ชีเว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ความสำคัญของการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
บทที่ 2 ปรัชญาเอกสารข้อมูล	3
2.1 ชีวิตวิทยาของแมลงหนองปลอกน้ำ.....	3
2.2 วงชีวิตของแมลงหนองปลอกน้ำ	5
2.3 ความสำคัญของแมลงหนองปลอกน้ำในระบบนิเวศ.....	13
2.4 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding).....	16
2.5 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนองปลอกน้ำ	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
3.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกสปีชีส์แมลงหนองปลอกน้ำ	24
3.2 การศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุล	27
บทที่ 4	29

ผลการทดลอง	29
4.1 ความหลากหลายของแมลงหนอนปลอกน้ำ	29
4.2 การจำแนกสปีชีส์โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด	38
4.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรม	40
4.4 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	42
4.5 การเขียนบรรยายลักษณะของสปีชีส์ <i>Triplectides buengkanensis</i> sp. nov.....	45
บทที่ 5	51
สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	51
5.1 แหล่งที่อยู่อาศัย (habitat).....	51
5.2 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและการค้นพบสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species).....	52
บรรณานุกรม.....	54
ประวัติผู้เขียน.....	65



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 รายชื่อวงศ์ที่ยังไม่สูญพันธุ์และสูญพันธุ์ไปแล้ว จำนวนสกุลและสปีชีส์ และกลไกการได้อาหารของแต่ละวงศ์ ในแต่ละเขตชีวภูมิศาสตร์ (Biogeographical region) (ที่มา: ดัดแปลงจาก Morse, 2019)	1
ตารางที่ 2 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำสปีชีส์ <i>Chuematopsyche thomasseti</i> Ulmer ที่บริเวณตัวอ่อนรินดำ (<i>Simulium</i>) ระบุระยะของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำสปีชีส์นี้ โดยการวัดขนาด จากกรามถึง postgena	16
ตารางที่ 3 พื้นที่เก็บตัวอย่างแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัยในประเทศไทย	24
ตารางที่ 4 พื้นที่ศึกษา ความหลากหลายและจำนวนของตัวอย่างแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัย	30
ตารางที่ 5 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุสปีชีส์ จากฐานข้อมูล BOLD systems	39
ตารางที่ 6 ค่า Minimum และ Maximum intraspecific genetic divergent และการระบุสปีชีส์ โดยใช้ฐานข้อมูล BOLD systems	41

พญ. ปณ. จิตโต ชีวะ

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงหนอนปลอกน้ำวงศ์ย่อย Annulipalpia “Spicipalpia” และ Integripalpia (Kjer et al., 2001).....	4
ภาพที่ 2 วงชีวิตของแมลงหนอนปลอกน้ำ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) อาศัยในแหล่งน้ำ (aquatic ecosystem) ระยะตัวเต็มวัย (adult) อาศัยบนบก (terrestrial ecosystem).....	5
ภาพที่ 3 ตัวอย่างแผ่นรุ้นและไข่ของแมลงหนอนปลอกน้ำวงศ์ Hydropsychidae (a) แผ่นรุ้นแบบ ..	6
ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำ (literal view).....	7
ภาพที่ 5 การจำแนกตามลักษณะของตัวอ่อนทั้ง 5 รูปแบบ.....	8
ภาพที่ 6 การจำแนกตามลักษณะหัวของแมลง ..	9
ภาพที่ 7 ลักษณะของดักแด้ในวงศ์ Limnephilidae (a) ลักษณะของกระดูกขาบริเวณ antenna และขนแข็งบริเวณริมฝีปากบน ส่วนปลายงอคล้ายตะขอ (labrum hooked) (b) กระดูกขาเป็นพู บริเวณ mesotarsus แผงขนบนปล้องท้องที่ 1 (median spined ridge) และ hook plates, habitus, (dorsal view) (c) ลักษณะของ anal processes และ lateral fringe (ventral view). 10	
ภาพที่ 8 ปล้องท้องของ Banksiola sp. (Phryganeidae) ระยะดักแด้ แสดงลักษณะของ hook plates และ anal processes (dorsal view).....	10
ภาพที่ 9 ดักแด้ในวงศ์ Rhyacophilidae, Hydrobiosidae และ Glossosomatidae.....	11
ภาพที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัย ..	12
ภาพที่ 11 (a) ลักษณะทั่วไปของหัวและอกของตัวเต็มวัยแมลงหนอนปลอกน้ำ (s.w. = setal wart) (dorsal view) (b) ตัวอย่างปีกคู่หน้าและหลังของแมลงหนอนปลอกน้ำสปีชีส์ <i>Dolophilodes novusamericana</i> (Phllopotamidae).....	12
ภาพที่ 12 ลักษณะของ maxillary palp ตัวเต็มวัยสกุล Austrotinodes (Ecnomidae)	13
ภาพที่ 13 The River Continuum Concept	15
ภาพที่ 14 ตำแหน่งในการเข้าจับของไพรเมอร์	18

ภาพที่ 15 ขั้นตอนการการจดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (1) นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ (2) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการ (3) กระบวนการ Gel Electrophoresis เพื่อดูปริมาณและความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (4) อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปเทียบกับฐานข้อมูล (BOLD)18	
ภาพที่ 16 พื้นที่ศึกษา.....	25
ภาพที่ 17 กักตักแสงไฟ (UV black light trap).....	26
ภาพที่ 18 การเตรียมตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของแมลงหนอนปลอกน้ำในโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์.....	26
ภาพที่ 19 <i>Dipsuedopsis</i> nr. <i>robustior</i> andamanensis; (a) ตัวเต็มวัยเพศผู้ (lateral view), (b) hind tibial spur (ventral view), อวัยวะเพศผู้ (c) มุมมองด้านข้าง (lateral view), (d) มุมมองด้านท้อง (ventral view), (e) มุมมองด้านหลัง (dorsal view), (f) ปีกคู่หน้า	31
ภาพที่ 20 <i>Dipsuedopsis robustior</i> andamanensis Weaver & Malicky, 1994 (a, b & c) และ <i>Dipsuedopsis knappi</i> Schmid & Denning, 1979 (d); (a) tergite ปล้องที่ 10, (b) inferior appendage ของอวัยวะเพศผู้ (มุมมองด้านท้อง), (c) hind tibial spur, (d) ปีกคู่หน้า.....	32
ภาพที่ 21 ภาพถ่ายอวัยวะเพศผู้ของ <i>Triplectides buengkanensis</i> sp. nov.; (a) dorsal view, (b) ventral view, (c) lateral view, (d) phallic apparatus (dorsal view), (e) phallic apparatus (lateral view); scale bars= 0.1 mm; abbreviation: ap. lo. = apicodorsal lobe, IX= segment IX, X= segment X, bv. lo. = basoventral lobe, me. lo. = mesal lobe, ph. sc. = phallotremal sclerite, pr. ap. = preanal appendages, 2nd art. = second article.33	
ภาพที่ 22 อวัยวะเพศผู้ของ <i>Triplectides indicus</i> Walker, 1852 (a-c), <i>Triplectides misakianus</i> Matsumura, 1931 (d-f) และ <i>Triplectides nessimiani</i> Desdério & Pes (g-i); (a, d, g) dorsal view, (b, e, h) ventral view, (c, f, i) lateral view; abbreviation: ap. lo. = apicodorsal lobe, IX= segment IX, X= segment X, bv. lo. = basoventral lobe, me. lo. = mesal lobe, ph. sc. = phallotremal sclerite, pr. ap. = preanal appendages, 2nd art. = second article	34
ภาพที่ 23 อวัยวะเพศเมียของ <i>Triplectides buengkanensis</i> sp. nov. (a-c) และ <i>Triplectides misakianus</i> Matsumura, 1931 (d-f); (a) ventral view, (b) lateral view, (c) dorsal view; abbreviation: IX = segment IX, pr. ap. = preanal appendage, sp. sc. = spermathecal sclerite, se. be. = sensilla-bearing process, lam. = lamella, go. pl. = gonopod plate .35	

ภาพที่ 24 ตัวเต็มวัยเพศเมีย; (a) <i>Ecnomus argonautos</i> Laudee & Malicky, 1999 จากพื้นที่ศึกษา อ.บึงโขงหลง จ.บึงกาฬ (BK), (b) <i>Ecnomus mammus</i> M&C, 1993 และ (c) <i>Ecnomus obtusus</i> Ulmer, 1910 จาก อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ (CP2).....	36
ภาพที่ 25 ปีกนอกของตัวเต็มวัยเพศเมีย (a) <i>Ecnomus argonautos</i> Laudee & Malicky, 1999 จากพื้นที่ศึกษา อ.บึงโขงหลง จ.บึงกาฬ (BK), (b) <i>Ecnomus mammus</i> M&C, 1993 และ (c) <i>Ecnomus obtusus</i> Ulmer, 1910 จาก อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ (CP2).....	37
ภาพที่ 26 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Neighbor-joining) จาก 115 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก 13 สปีชีส์ ในการศึกษาครั้งนี้ (สีดำและแดง) ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล Genbank (สีเทา) (Bootstrapping 1000 ซ้ำ).....	44
ภาพที่ 27 ตัวเต็มวัยของ <i>Triplectides buengkanensis</i> sp. nov.; (a) เพศผู้, (b) เพศเมีย; scale bars = 2 mm.....	45
ภาพที่ 28 ปีกนอกและปีกในของสปีชีส์ <i>Triplectides buengkanensis</i> sp. nov.; (a) ปีกนอกตัวเต็มวัยเพศผู้, (b) ปีกในตัวเต็มวัยเพศผู้, (c) ปีกนอกตัวเต็มวัยเพศเมีย, (d) ปีกในตัวเต็มวัยเพศเมีย; scale bars = 1 mm; abbreviation: DC = discoidal cell, C = costal vein, Sc = subcostal vein, R = radial vein, M = median vein, Cu = cubital vein, A = anal vein, s = sectoral crossvein, r-m = radial-median crossvein, m-cu = median-cubital crossvein, nygma = opaque thickened spot in membrane.....	46
ภาพที่ 29 ภาพวาดอวัยวะเพศผู้ของ <i>Triplectides buengkanensis</i> sp. nov.; (a) dorsal view, (b) ventral view, (c) lateral view, (d) phallic apparatus (dorsal view), (e) phallic apparatus (lateral view); scale bars = 0.1 mm; abbreviation: ap. lo. = apicodorsal lobe, IX= segment IX, X= segment X, bv. lo. = basoventral lobe, me. lo. = mesal lobe, ph. sc. = phallotremal sclerite, pr. ap. = preanal appendages, 2nd art. = second article.....	49
ภาพที่ 30 อวัยวะเพศเมียของ <i>Triplectides buengkanensis</i> sp. nov.; (a) ventral view, (b) lateral view, (c) dorsal view; scale bars= 0.1 mm; abbreviation: IX = segment IX, pr. ap. = preanal appendage, sp. sc. = spermathecal sclerite, se. be. = sensilla-bearing process, lam. = lamella, go. pl. = gonopod plate.....	50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

แมลงหนอนปลอกน้ำ (อันดับ Trichoptera) ในระยะตัวอ่อน มีแหล่งอาศัยที่หลากหลายและแต่ละ สปีชีส์มีความจำเพาะต่อแหล่งอาศัย ทำให้สามารถกระจายตัวได้กว้างในแหล่งน้ำจืด และมีความสำคัญมากในระบบนิเวศแหล่งน้ำ สามารถเชื่อมโยงระบบนิเวศในน้ำและบนบก เป็นอาหารของปลาและแมลงน้ำสปีชีส์อื่น (กิตติยา ถาวโรฤทธิ์ และนฤมล แสงประดับ, 2559) ปัจจุบัน มีการค้นพบและระบุสปีชีส์แล้ว 16,266 ตัวโลก แมลงหนอนปลอกน้ำจัดให้เป็นหนึ่งในอันดับที่มีจำนวนสปีชีส์ของแมลงน้ำมากที่สุดในโลก (Morse, 2019) เนื่องจากมีความไวต่อการได้รับมลพิษในแหล่งน้ำที่แตกต่างกัน จึงมีการศึกษาแมลงหนอนปลอกน้ำเพื่อใช้เป็นดัชนีชีวภาพ (bioindicator) ในการประเมินคุณภาพแหล่งน้ำ ร่วมกับแมลงชีปะขาว (อันดับ Ephemeroptera) และแมลงสโตนฟลาย (อันดับ Plecoptera) (Ab Hamid & Md Rawi, 2017; Bonada et al., 2006; Boonsoong et al., 2009; Mustow, 2002; Pirvu & Pacioglu, 2012; Schmidt-Kloiber & Hering, 2015; Sripanya et al., 2022; Zhou et al., 2007) เนื่องจากมีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำสูง (Armitage et al., 1983; Dolédec & Statzner, 2008; Moya et al., 2011) ส่งผลให้แมลงเหล่านี้ได้รับผลกระทบอย่างรุนแรงจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและเกิดการเปลี่ยนแปลงทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย (Sandin et al., 2014)

แมลงหนอนปลอกน้ำในเขตร้อนชื้นมีความหลากหลายสูงมาก โดยเฉพาะระยะตัวอ่อนที่สามารถพบได้ในที่อยู่อาศัยหลากหลายรูปแบบ เช่น แหล่งน้ำไหล แม่น้ำ ทะเลสาบและบ่อน้ำ (Johanson, 2007) การประยุกต์ใช้ตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพของแหล่งน้ำ หรือการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในแหล่งน้ำต้องการข้อมูลด้านอนุกรมวิธาน โดยเฉพาะการระบุสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม จากจำนวน 998 สปีชีส์ ที่พบในประเทศไทย (Malicky, 2010) มีแมลงหนอนปลอกน้ำในระยะตัวอ่อนเพียงร้อยละ 3 เท่านั้นที่มีคำอธิบายลักษณะในระดับสปีชีส์ (Laudee, 2008; Malicky et al., 2005; Permkam & Malicky, 2006; Prommi et al., 2006; Prommi & Permkam, 2015) เนื่องจากแมลงหนอนปลอกน้ำเพศผู้ในระยะตัวเต็มวัยแต่ละสปีชีส์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันค่อนข้างชัดเจน จึงถูกนำมาใช้ในการระบุสปีชีส์เป็นหลัก โดยใช้ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

ปัจจุบัน ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการทางพันธุศาสตร์โมเลกุล โดยใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการระบุสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต สำหรับสัตว์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase I (COI) เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ยีน COI นิยมนำมาใช้ในการระบุสปี

ชีสหรือการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์สูง (เกศรินทร์ ทิพย์เพชร และคณะ, 2021) ช่วยให้สามารถระบุสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มที่ยังขาดข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาที่แน่ชัดได้ (Borisenko et al., 2009; Hebert et al., 2003b) และสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species) ได้ (Borisenko et al., 2009; Hüllen et al., 2021; Pauls et al., 2010; Tyagi et al., 2019; Wickson et al., 2014) และเนื่องจากเป็นยีนพื้นฐานที่นิยมใช้ จึงทำให้มีข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสัตว์สปีชีส์ต่างๆ มากมาย ในฐานข้อมูล BARCODE OF LIFE DATA SYSTEM (BOLD) (Hebert et al., 2003a) และมีการนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดไปใช้ในการระบุสปีชีส์ของแมลงหนองปลอกน้ำอย่างกว้างขวาง (Barcelos-Silva et al., 2018; Erasmus et al., 2018; Genco et al., 2020; Harvey et al., 2012; Kućinić et al., 2020; Orfinger et al., 2022; Pauls et al., 2010; Peng et al., 2023)

ในประเทศไทยยังไม่มีผลการรายงานการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของระยะตัวเต็มวัยของแมลงหนองปลอกน้ำ เพื่อประโยชน์ด้านอนุกรมวิธานและการระบุสปีชีส์ของแมลงหนองปลอกน้ำ สร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนองปลอกน้ำในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการหาความสัมพันธ์กับแมลงหนองปลอกน้ำระยะตัวอ่อนที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการระบุสปีชีส์ของแมลงหนองปลอกน้ำ
2. เพื่อสร้างฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนองปลอกน้ำในประเทศไทย

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

ได้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและการนำไปใช้ระบุสปีชีส์ของแมลงหนองปลอกน้ำ ในประเทศไทย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างตัวเต็มวัยของแมลงหนองปลอกน้ำในประเทศไทย โดยใช้สวิงและกับดักแสงไฟ (Light trap)
2. ระบุสปีชีส์ของแมลงหนองปลอกน้ำด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนขาและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพหิเช่ (polymerase chain reaction) ตามวิธีของ (Folmer et al., 1994) โดยใช้ยีน Cytochrome c oxidase I (COI) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI GenBank และ BOLD จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

บทที่ 2

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 ชีวิตวิทยาของแมลงหนอนปลอกน้ำ

แมลงหนอนปลอกน้ำ (Caddisfly) จัดอยู่ในไฟลัม (phylum) Arthropoda ชั้น (class) Insecta อันดับใหญ่ (superorder) Amphiesmenoptera ร่วมกับวงศ์ Lepidoptera มีการค้นพบและระบุสปีชีส์แล้ว 16,266 สปีชีส์ (Morse et al., 2019) มากกว่าครึ่งหนึ่งของสปีชีส์ที่พบและสามารถระบุสปีชีส์ได้ ถูกพบในเขตนีโอทรอปิคอล (Neotropical region) และเขตโอเรียนทัล (Oriental) โดยพบว่ามีความหลากหลายมากที่สุดเขตโอเรียนทัล ที่พบแมลงหนอนปลอกน้ำมากกว่า 3,700 สปีชีส์ มากกว่าเขตชีวภูมิศาสตร์อื่น (ยกเว้นเขตนีโอทรอปิคอล) ถึง 2 เท่า (De Moor & Ivanov, 2008) ในประเทศไทย พบแมลงหนอนปลอกน้ำ 28 วงศ์ 109 สกุล 998 สปีชีส์ (Malicky, 2010) โดยอันดับ Trichoptera สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 อันดับย่อย ได้แก่ Annullipalpia “Spicipalpia” และ Integripalpia ดังภาพที่ 1 ข้อมูลความหลากหลาย การกระจาย และกลไกการได้รับอาหารของแมลงหนอนปลอกน้ำ แสดงในตารางที่ 1

จำแนกตามอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

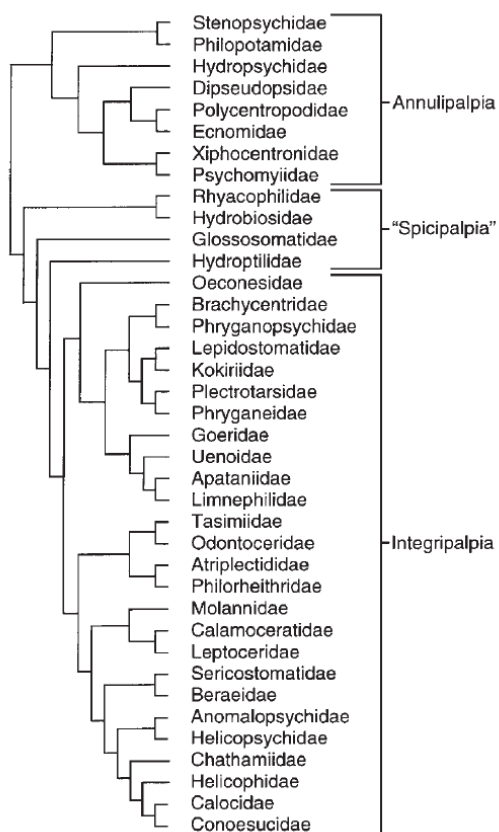
Class: Insecta

Superorder: Amphiesmenoptera

Order: Trichoptera

(Kirby, 1813)

พหุณ ปณ จิตโต ชีเว



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงหนอนปลอกน้ำวงศ์ย่อย Annulipalpia
"Spicipalpia" และ Integripalpia (Kjer et al., 2001)



ตารางที่ 1 รายชื่อวงศ์ที่ยังไม่สูญเสียพันธุ์และสูญพันธุ์ไปแล้ว จำนวนสกุลและสปีชีส์ และกลไกการได้อาหารของแต่ละวงศ์ ในแต่ละเขตชีวภูมิศาสตร์ (Biogeographical region) (ที่มา: ดัดแปลงจาก Morse, 2019)

Families	Feeding	จำนวน สกุลที่ยัง สูญพันธุ์	จำนวน สกุลที่พบ	จำนวน สปีชีส์ที่ยังไม่สูญพันธุ์	จำนวน สปีชีส์ที่พบ	จำนวน สปีชีส์ที่พอสซิล	AT (จำนวน สปีชีส์)	AU (จำนวน สปีชีส์)	EP (จำนวน สปีชีส์)	NA (จำนวน สปีชีส์)	NT (จำนวน สปีชีส์)	OL (จำนวน สปีชีส์)	WP (จำนวน สปีชีส์)
Psychomyiidae	gra,xyl,gat,pff	10	3	600	18	43	12	44	18	0	378	116	116
Xiphocentronidae	gat	7	0	183	1	2	0	3	8	58	116	1	1
Ecnomidae	pre,pff	12	1	518	22	98	183	4	3	57	169	11	11
Polycentropodidae	pre,pff	18	11	861	117	21	86	53	9	282	295	72	72
*Vitimotaulidae	N/A	0	7	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0
Dipseudopsidae	pff	5	1	112	10	51	4	3	6	0	53	2	2
*Electralbertidae	N/A	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Kambaitipsychidae	N/A	1	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Pseudoneureclipsidae	gat?	2	0	121	4	5	1	3	0	4	99	9	9
Philopotamidae	pff	26	10	1508	35	150	215	52	76	354	625	65	65
Stenopsychidae	pff	3	0	107	1	1	9	26	0	3	83	0	0
Hydropsychidae	pff, pre,gra,gat	41	2	1982	12	221	181	89	173	457	757	171	171
yNecrotaulidae	N/A	0	9	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0
Hydroptilidae	pie, gra, gat, pre, shh, par	74	1	2570	22	161	337	89	352	921	614	183	183
Ptilocolepidae	shh	2	0	16	2	0	0	7	2	0	2	5	5
Glossosomatidae	gra	20	1	785	10	6	40	73	100	318	181	91	91
Hydrobiosidae	pre	51	5	427	6	0	199	4	7	184	38	1	1
Rhyacophilidae	pre, shd, gra	5	3	833	14	0	0	122	130	0	469	133	133

หมายเหตุ : N/A = ไม่ทราบ, ตัวอย่าง : gat = gatherers/scrapers; gra = grazers/scrapers; par = parasites; pff = passive filter feeders; pie = piercers; pre = predators; sca = scavengers; shd = shredding; shh = shredding; shh = shredding; เจตชีวภูมิศาสตร์: AT = Afrotropical, AU = Australasian, EP = East Palearctic, NA = Nearctic, NT = Neotropical, OL = Oriental, WP = West Palearctic

ตารางที่ 1 (ต่อ) รายชื่อวงศ์ที่ยังไม่สูญพันธุ์และสูญพันธุ์ไปแล้ว จำนวนสกุลและสปีชีส์ และกลไกการได้อาหารของแต่ละวงศ์ในแต่ละเขตชีวภูมิศาสตร์ (Biogeographical region) (ที่มา: ดัดแปลงจาก Morse, 2019)

Families	Feeding	จำนวน สกุลที่ยังไม่ สูญพันธุ์	จำนวน สกุลที่สูญพันธุ์	จำนวน สปีชีส์ที่ยังไม่สูญพันธุ์	จำนวน สปีชีส์ที่สูญพันธุ์	AT (จำนวน สปีชีส์)	AU (จำนวน สปีชีส์)	EP (จำนวน สปีชีส์)	NA (จำนวน สปีชีส์)	NT (จำนวน สปีชีส์)	OL (จำนวน สปีชีส์)	WP (จำนวน สปีชีส์)
Uenoidae	gra, gat	4	1	32	0	0	0	1	20	0	11	0
Apataniidae	gra, gat, shd, shh	21	3	212	1	0	0	83	32	0	70	41
Limnephilidae	shd, gra, pre, gat, pff, shh	97	0	1037	12	0	2	198	251	43	142	557
Atriplectridae	sca	4	1	6	0	2	3	0	0	1	0	0
†Ogmomyiidae	N/A	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Limnocentropodidae	pre	1	0	18	0	0	0	2	0	0	17	0
Tasimiidae	gra, gat	4	4	9	0	0	7	0	0	2	0	0
Calamoceratidae	shd, gra, pre	8	0	190	7	6	34	8	5	76	67	2
Molannidae	pre, gat, gra	2	9	42	6	0	0	10	7	0	26	6
Leptoceridae	shh, pre, gra, gat	49	4	2235	30	353	324	123	130	286	987	125
Odontoceridae	gra, gat, pre	15	0	172	8	4	5	14	15	47	89	3
Philorheithridae	pre	9	0	30	0	3	21	0	0	6	0	0
Ceylanopsychidae	N/A	1	0	7	0	0	0	0	0	0	7	0
Antipodoeiidae	gra	3	0	34	0	0	1	0	0	33	0	0
Beraeidae	gat, shd, gra	7	0	59	3	2	0	1	3	0	0	53

หมายเหตุ : N/A = ไม่ทราบ, ตัวย่อ : gat = gatherers/scrapers; gra = grazers/scrapers; par = parasites; pff =passive filter feeders; pie = piercers; pre = predators; sca = scavengers; shd = shredding; shh = shredding; เขตชีวภูมิศาสตร์: AT = Afrotropical, AU = Australasian, EP = East Palearctic, NA = Nearctic, NT = Neotropical, OL = Oriental, WP = West Palearctic

ตารางที่ 1 (ต่อ) รายชื่อวงศ์ที่ยังไม่สูญเสียพันธุ์และสูญพันธุ์ไปแล้ว จำนวนสกุลและสปีชีส์และกลไกการได้อาหารของแต่ละวงศ์ ในแต่ละเขตชีวภูมิศาสตร์ (Biogeographical region) (ที่มา: ดัดแปลงจาก Morse, 2019)

Families	Feeding	จำนวน สกุลที่ ยังไม่ สูญ	จำนวน สกุลที่ สูญ ไปแล้ว	จำนวน สปีชีส์ ที่ยังไม่สูญ	จำนวน สปีชีส์ ที่สูญ	AT (จำนวน สปีชีส์)	AU (จำนวน สปีชีส์)	EP (จำนวน สปีชีส์)	NA (จำนวน สปีชีส์)	NT (จำนวน สปีชีส์)	OL (จำนวน สปีชีส์)	WP (จำนวน สปีชีส์)
Phryganopsychidae	shd	1	0	4	0	0	0	2	0	0	3	0
Plectrotarsidae	shd	3	1	5	1	0	5	0	0	0	0	0
+Baissoferidae	N/A	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0
+Dysoneuridae	N/A	0	75	0	14	0	0	0	0	0	0	0
Kokiriidae	pre	6	0	15	0	0	13	0	0	2	0	0
Pisuliidae	shd	2	0	19	0	19	0	0	0	0	0	0
Oeconesidae	shd	6	0	18	0	0	18	0	0	0	0	0
Phryganeidae	pre, shh, gra, gat	15	7	81	39	0	0	39	28	0	22	18
+Ningxiapsychidae	N/A	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Brachycentridae	gra, pff, shh, pre, gat	7	1	112	2	0	0	30	39	0	31	28
Lepidostomatidae	xyl, shd, gra, pre	7	4	519	14	49	3	74	77	22	287	31
Rossianidae	gat, gra, shh	2	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0
+Taymyrelectronidae	N/A	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
+Yantarocentridae	N/A	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Goeridae	gra, gat	11	0	189	4	2	5	30	12	0	125	18
Thremmatidae	gra, gat	3	0	53	0	0	0	9	36	0	5	5

หมายเหตุ : N/A = ไม่ทราบ, ตัวย่อ : gat = gatherers/scrapers; gra = grazers/scrapers; par = parasites; pff = passive filter feeders; pie = piercers; pre = predators; sca = scavengers; shd = shredding; shh = shredding; เขตชีวภูมิศาสตร์: AT = Afrotropical, AU = Australasian, EP = East Palearctic, NA = Nearctic, NT = Neotropical, OL = Oriental, WP = West Palearctic

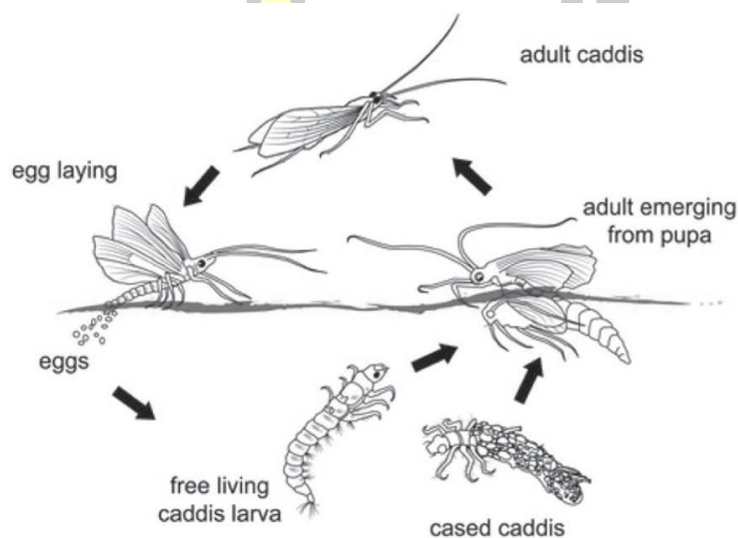
ตารางที่ 1 รายชื่อวงศ์ที่ยังไม่สูญเสียพันธุ์และสูญพันธุ์ไปแล้ว จำนวนนกสกุลและสปีชีส์ และกลไกการได้อาหารของแต่ละวงศ์ ในแต่ละเขตชีวภูมิศาสตร์ (Biogeographical region) (ที่มา: ดัดแปลงจาก Morse, 2019)

Families	Feeding	จำนวน สกุลที่ยังไม่ สูญพันธุ์	จำนวน สกุลที่ สูญพันธุ์	จำนวน สปีชีส์ที่ ยังไม่สูญพันธุ์	จำนวน สปีชีส์ที่ สูญพันธุ์	จำนวน สปีชีส์ที่ พบบ่อย	AT (จำนวน สปีชีส์)	AU (จำนวน สปีชีส์)	EP (จำนวน สปีชีส์)	NA (จำนวน สปีชีส์)	NT (จำนวน สปีชีส์)	OL (จำนวน สปีชีส์)	WP (จำนวน สปีชีส์)
Chathamidae	shh	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Hydroalpingidae	gat, gra	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Parasericostomatidae	N/A	2	5	13	0	0	0	0	0	0	13	0	0
Helicopsychidae	gra	2	4	281	15	17	53	2	14	80	5	58	5
Sericostomatidae	shd, gat, shh, pre	16	0	103	6	19	0	2	16	7	4	58	58
Petrothrincidae	gra	1	0	14	0	14	0	0	0	0	0	0	0
Helocubucidae	N/A	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Calocidae	gat	7	0	33	0	0	33	0	0	0	0	0	0
Helicophidae	gat, shh	9	0	47	0	0	31	0	0	16	0	0	0
Barbarochthonidae	shd	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Conoesucidae	gra, shd, shh	11	0	42	0	0	42	0	0	0	0	0	0
ichnotaxa	N/A	0	11	0	265	0	0	226	10	1	0	31	31
Total		648	121	16,266	765	1251	1873	1426	1581	3309	5854	1841	1841

หมายเหตุ : N/A = ไม่ทราบ, ตัวอย่าง : gat = gatherers/scrapers; gra = grazers/scrapers; par = parasites; pff = passive filter feeders; pie = piercers; pre = predators; sca = scavengers; shd = shredding; shh = shredding; เขตชีวภูมิศาสตร์: AT = Afrotropical, AU = Australasian, EP = East Palearctic, NA = Nearctic, NT = Neotropical, OL = Oriental, WP = West Palearctic

2.2 วงชีวิตของแมลงหนอนปลอกน้ำ

แมลงหนอนปลอกน้ำ เป็นแมลงจำพวกที่มีวงจรชีวิตสมบูรณ์ (Holometabolous neopteran) กล่าวคือการเจริญเติบโตจะพัฒนาจากระยะไข่ไปเป็นตัวอ่อน ระยะดักแด้และเป็นตัวเต็มวัยตามลำดับ (ภาพที่ 2) อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด ตัวอ่อนและดักแด้มีการสร้างรังเพื่ออาศัยอยู่ในน้ำเป็นส่วนใหญ่ มีแมลงหนอนปลอกน้ำเพียงไม่กี่สปีชีส์ที่ทราบวงจรชีวิต แต่ส่วนใหญ่มีวงจรชีวิต 1 ปี (univoltine) บางสปีชีส์มีมากกว่าหนึ่งรุ่นต่อปี บางสปีชีส์มีการพักไข่ 2 ถึง 3 ปีต่อครั้ง โดยทั่วไปวงจรชีวิตของแมลงหนอนปลอกน้ำที่มีแหล่งที่อยู่อาศัยอยู่สูงจากระดับน้ำทะเลมาก จะมีวงจรชีวิตยาว และมีวงจรชีวิตสั้นลงเมื่อแหล่งที่อยู่อาศัยเข้าใกล้เส้นศูนย์สูตร (Morse, 2009)



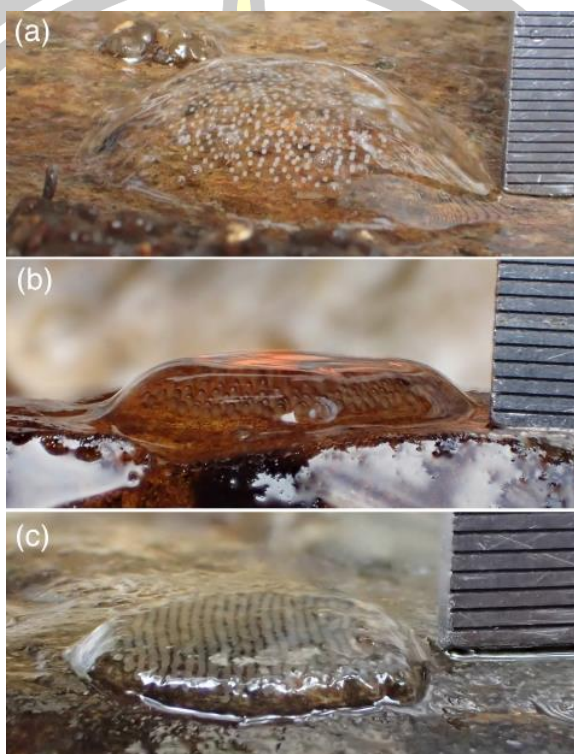
ภาพที่ 2 วงชีวิตของแมลงหนอนปลอกน้ำ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) อาศัยในแหล่งน้ำ (aquatic ecosystem) ระยะตัวเต็มวัย (adult) อาศัยบนบก (terrestrial ecosystem)

(ที่มา: Prommi, 2018)

2.2.1 ไข่ (Eggs)

ไข่ของแมลงหนอนปลอกน้ำ ถูกห่อหุ้มด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) มีลักษณะเป็นวุ้น เรียกว่า spumalin โดยมีไข่จำนวน 12 ถึง 636 ฟอง กระจายอยู่ตามแผ่นวุ้น 1 แผ่น และตัวเมียหนึ่งตัวอาจสร้างแผ่นวุ้นได้หลายแผ่น โดยไข่มีลักษณะกลม (circular eggs) หรือรี (elliptical eggs) วุ้นมีลักษณะได้หลายรูปแบบ เช่น กลม รี หรือรูปผีเสื้อ เป็นต้น โดยที่วุ้นอาจกางเป็นแผ่นแบนๆ พับเป็นเกลียว หรือลักษณะเหมือนสร้อยลูกปัด เนื่องจากการมีวุ้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ห่อหุ้มไข่เอาไว้ ทำให้ยากต่อการศึกษาลักษณะพื้นผิวของไข่ ไข่ของแมลงหนอนปลอกน้ำสามารถฟักตัวได้

หลายเดือน โดยเฉพาะในช่วงฤดูหนาว จนเข้าสู่ช่วงที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสม ตัวอ่อนสามารถฟักออกจากไข่ได้โดยใช้เวลาเพียงไม่กี่วัน หากวันที่เต็มไปด้วยไข่ขาดน้ำตัวอ่อนระยะแรกจะยังคงอาศัยอยู่ในไข่ รอจนเกิดน้ำท่วมขึ้นอีกครั้งใหม่ บางสปีชีส์ที่มีการวางไข่ไว้บนพืชหรือหินที่ยื่นไปหาแหล่งน้ำ ตัวอ่อนระยะแรกจะเคลื่อนที่ออกจากแผ่นไข่ ลงไปในแหล่งน้ำ (Morse, 2009)



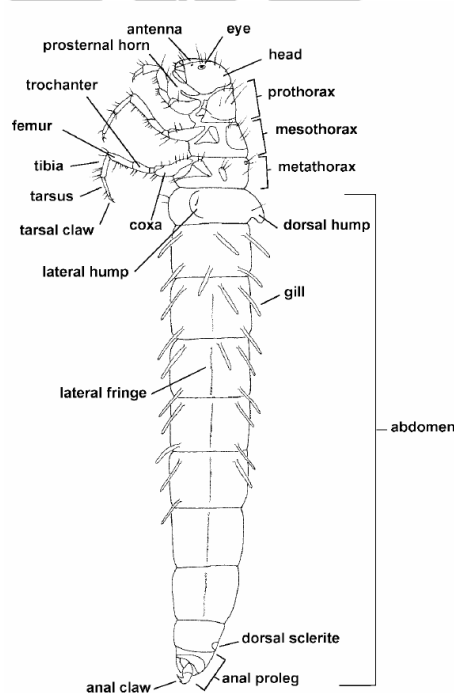
ภาพที่ 3 ตัวอย่างแผ่นไข่และไข่ของแมลงหนอนปลอกน้ำวงศ์ Hydropsychidae (a) แผ่นไข่แบบ A-type (b) แผ่นไข่แบบ U-type (c) แผ่นไข่แบบ E-type (ไม้บรรทัดเหล็ก ช่องละ 0.5 มิลลิเมตร) (ที่มา: Lancaster & Glaister, 2019)

ในปี 2019 Lancaster และ Glaister ได้ทำการจัดจำแนกลักษณะของแผ่นไข่ที่ห่อหุ้มไข่ของแมลงหนอนปลอกน้ำ ในวงศ์ Hydropsychidae พบว่าสามารถจัดจำแนกได้เป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ (1) A-type แผ่นไข่มีลักษณะเป็นรูปโดม ความหนาประมาณ 5-8 มิลลิเมตร ชั้นของ spumalin มีความนุ่ม (2) U-type มีความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร แผ่นไข่เป็นแผ่นแบน ตรงกลางบุลงเล็กน้อย แผ่นไข่แข็ง (3) E-type มีลักษณะเป็นแผ่นไข่บาง มีความหนาน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3)

2.2.2 ตัวอ่อน (Larvae)

ตัวอ่อนของแมลงหนอนปลอกน้ำส่วนใหญ่ มี 5 ระยะ ก่อนจะกลายเป็นดักแด้ แต่บางสปีชีส์อาจมีมากกว่า 5 ระยะ เช่น แมลงหนอนปลอกน้ำในสกุล *Sericostoma* ในประเทศยุโรป มีการเจริญของระยะตัวอ่อน 6 ระยะ และสกุล *Agapetus* ในประเทศยุโรป มีการเจริญของระยะตัวอ่อน 7

ระยะ (Wiggins, 1996) โดยส่วนใหญ่ระยะตัวอ่อนจะใช้เวลาช้านานกว่าระยะอื่นๆ ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจนถึงระยะสุดท้าย 2 เดือน ถึง 2 ปี รูปร่างของตัวอ่อนแตกต่างกับไปตามวงศ์หรือสกุล และขึ้นอยู่กับที่อยู่อาศัยและอาหารที่จำเพาะต่อสปีชีส์



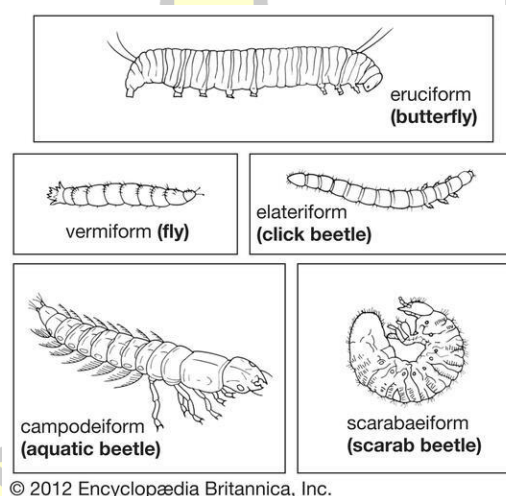
ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำ (lateral view)
(ที่มา: Merritt et al., 2019)

อันดับย่อย Integripalpia ส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบ eruciform (ภาพที่ 5) ตัวมีรูปร่างแบบทรงกระบอก หัวมีรูปแบบ hypognathous (ภาพที่ 6) โดยมีปากที่ตั้งฉากกับลำตัว ปล้องที่ 9 มี anal proleg สั้นๆ แล้วมี anal claw ที่เล็ก มีปลอก ทรงกระบอกและกลวง ที่ไม่ได้ยึดเกาะกับวัตถุอื่นๆ ทำให้สามารถเคลื่อนที่ไปพร้อมกับปลอกเพื่อหาแหล่งอาหารใหม่ได้ มีกลไกการได้อาหาร (Functional feeding group) 3 รูปแบบ กลุ่มกัดกิน (shredders) กลุ่มขูดกิน (scrapers) หรือการเก็บสะสม (collector gatherers) (Morse, 2009) เมื่อตัวอ่อนเจริญจนถึงระยะสุดท้าย จะนำวัสดุมาปิดปลอกเพื่อป้องกันผู้ล่า และเจริญต่อไปเป็นระยะดักแด้ภายในปลอก โดยมีรูให้น้ำไหลผ่านได้เพื่อการหายใจในระยะดักแด้ (Wiggins, 1996)

อันดับย่อย Annulipalpia มีรูปร่างแบบ campodeiform (ภาพที่ 5) หัวมีลักษณะแบบ prognathous (ภาพที่ 6) ปากขนานกับลำตัว มี anal proleg ยาว เห็น anal claw ได้อย่างชัดเจน ส่วนใหญ่หาอาหารอยู่กับที่ โดยการกรองกินหรือแทะเล็มซากอินทรีย์ขนาดเล็ก และบางสปีชีส์ขูดกิน

diatoms เป็นอาหาร สร้างเปลือกติดกับวัสดุทางธรรมชาติ ตั้งแต่เป็นตัวอ่อนระยะแรก บางวงศ์มีการสร้างตาข่ายจากเส้นไหมเพิ่มเติม ก่อนจะกลายเป็นดักแด้ ตัวอ่อนระยะสุดท้ายจะคลุมเปลือกโดยใช้หินเป็นวัสดุ น้ำสามารถซึมผ่านรังไหมได้ โดยส่วนใหญ่ น้ำจะสามารถไหลผ่านรังไหมผ่านรูเปิดเล็กๆ จากปลายทั้งสองด้าน (Wiggins, 1996)

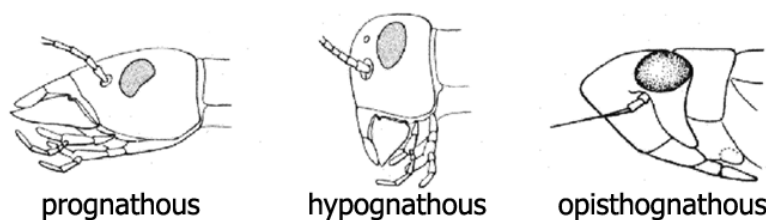
อันดับย่อย Spicpalpia มีกลไกการหาอาหารแตกต่างกัน วงศ์ Rhyacophilidae และ Hydrobiosidae เป็นผู้ล่า (predators) โดยที่ไม่มีการสร้างเปลือก ตัวอ่อนในวงศ์ Glossosomatidae เริ่มสร้างรังไหมไว้ก่อน ตั้งแต่ยังเป็นตัวอ่อนระยะแรก และใช้ประโยชน์การป้องกันตัวขณะที่ขุดกินอาหาร ตัวอ่อนในวงศ์ Hydroptilidae เป็นพวกที่อาศัยอยู่อย่างอิสระ (free-living) ตั้งแต่เป็นตัวอ่อนระยะแรก จนกระทั่งเจริญเป็นตัวอ่อนระยะสุดท้ายจึงเริ่มสร้างรังไหมและหากินต่อไปในระยะนั้น ตัวอ่อนระยะสุดท้ายในอันดับย่อยนี้จะสร้างรังไหมแบบปิด น้ำสามารถซึมผ่านได้เล็กน้อย จึงอาศัยออกซิเจนที่แพร่ผ่านผนังของรังไหมเพื่อการหายใจระหว่างที่อยู่ในระยะดักแด้ (Wiggins, 1996)



ภาพที่ 5 การจำแนกตามลักษณะของตัวอ่อนทั้ง 5 รูปแบบ

(ที่มา: <https://www.britannica.com/animal/insect/Natural-history>)

พจนานุกรม จีโต ชีว

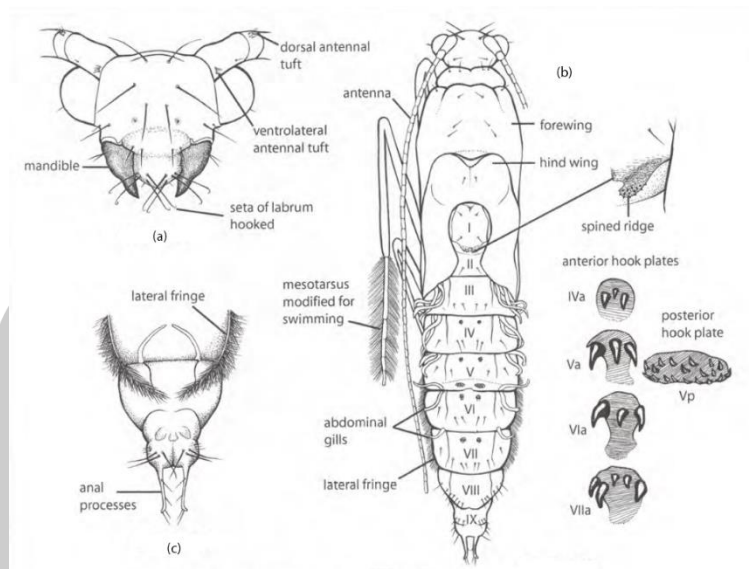


ภาพที่ 6 การจำแนกตามลักษณะหัวของแมลง

(ที่มา: <http://jscienceclass.blogspot.com/2011/06/orientation-of-insect-head-prognathous.html>)

2.2.3 ดักแด้ (Pupae)

ดักแด้ของแมลงหนอนปลอกน้ำ มีรูปร่างแบบ exarate รยางค์ที่พัฒนาลายตัวเต็มวัยแล้ว อยู่แนบชิดลำตัว (Yong et al., 2004) กราม (mandibles) มีการพัฒนาให้ยาวและแข็งแรงขึ้น มี sclerotin เป็นส่วนประกอบ เพื่อใช้ในการตัดรังไหม ไยไหมที่ใช้สร้างปลอกและแม่ตัวสดูที่สร้าง ปลอกบางสปีชีส์ เพื่อที่จะว่ายขึ้นไปบริเวณผิวน้ำ หลังจากสิ้นสุดระยะดักแด้ (Merritt et al., 2019) มีขนเส้นเดี่ยวๆ ขึ้นกระจายที่ส่วนหัว บางสปีชีส์มีขนแข็ง (seta) บริเวณริมฝีปากบน (labrum) มี กระจุกขนเล็กๆ บริเวณโคนของ antennae (dorsal and ventrolateral) (ภาพที่ 7a) ปีกแนบชิดไป กับลำตัว ขาพับเข้าหาลำตัวเอียงไปทางด้านท้อง โดยส่วนใหญ่ mesotarsus มีแผงขนที่ช่วยในการ ว่ายขึ้นไปบนผิวน้ำ เมื่อสิ้นสุดระยะดักแด้ (ภาพที่ 7b) ปล้องท้องหลายปล้อง มี hook plates ปล้อง ละ 1 คู่ ทางด้านหลัง ลักษณะเฉพาะของ hook plates คือการที่บางปล้องมี 2 คู่ คู่บนและล่าง โดย ที่ส่วนใหญ่จะพบบนปล้องที่ 5 ตะขอคู่บนจะงอลงด้านล่าง และตะขอคู่ล่างจะงอขึ้นด้านบน มี ประโยชน์ในการยึดเกาะกับรังไหมภายในปลอก และมีส่วนสำคัญในการช่วยเคลื่อนที่ออกจากปลอก เมื่อถึงเวลาเจริญที่จะเป็นระยะตัวเต็มวัย เหนืออกของดักแด้โดยส่วนใหญ่ยังคงลักษณะจากระยะตัว อ่อนไว้ ส่วนประกอบของปล้องที่ 1 ในดักแด้แมลงหนอนปลอกน้ำหลายวงศ์ จะมีแผงขนแข็งอยู่ (spined ridge) มีแผงขนบางๆ (lateral fringe) ด้านข้างลำตัว กระจายตัวแตกต่างกันไปในแต่ละวงศ์ และจะพัดลงไปทางด้านท้อง บนปล้องที่ 8 (ภาพที่ 7c) มักพบเห็น anal process เป็นคู่ยาวขนาน กัน บนปล้องสุดท้าย แต่มีบางสปีชีส์ที่มีลักษณะเป็นพู่สั้นๆ (ภาพที่ 8)



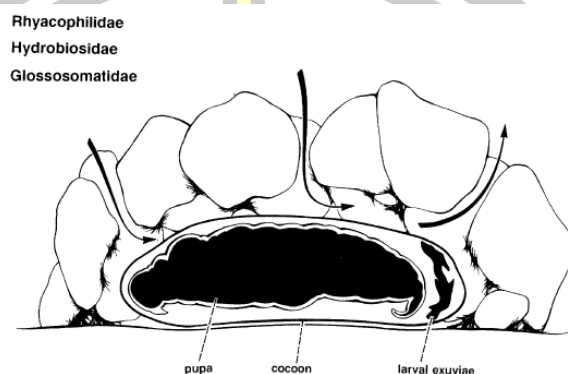
ภาพที่ 7 ลักษณะของดักแด้ในวงศ์ Limnephilidae (a) ลักษณะของกระจุกขนบริเวณ antenna และขนแข็งบริเวณริมฝีปากบน ส่วนปลายอคล้ายตะขอ (labrum hooked) (b) กระจุกขนเป็นพู่ บริเวณ mesotarsus แผงขนบนปล้องท้องที่ 1 (median spined ridge) และ hook plates, habitus, (dorsal view) (c) ลักษณะของ anal processes และ lateral fringe (ventral view) (ที่มา: Merritt et al., 2019)



ภาพที่ 8 ปล้องท้องของ *Banksiola* sp. (Phryganeidae) ระยะดักแด้ แสดงลักษณะของ hook plates และ anal processes (dorsal view) (ที่มา: Merritt et al., 2019)

ตัวอ่อนระยะสุดท้ายจะสร้างส่วนที่ปิดปกคลุม จากวัสดุทางธรรมชาติโดยใช้เส้นไหม เพื่อเตรียมลอกคราบเข้าสู่ระยะดักแด้ โดยปกคลุมจะมีรูให้น้ำไหลผ่านได้ ต่างจากดักแด้วงศ์ Glossosomatidae, Hydrobiosidae และ Rhyacophilidae จะสร้างรังไหมห่อหุ้มตัวอีกชั้นภายใน

ปลอก โดยที่รังไหมมีความหนาและมีคุณสมบัติทำให้น้ำไหลผ่านได้น้อย และไม่ได้แนบชิดตัวดักแด้ ทำให้เกิดโพรงระหว่างดักแด้และรังไหม ช่วยสร้างแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ภายในรังไหม ร่วมกับการขยับของดักแด้ภายใน เพื่อควบคุมการไหลของน้ำที่มีออกซิเจนอยู่ ผ่านเข้าและออกภายใน ปลอก (Wiggins & Wichard, 1989) (ภาพที่ 9)



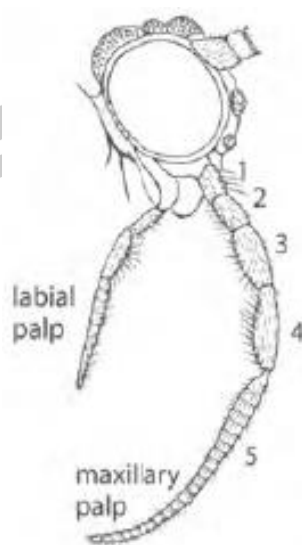
ภาพที่ 9 ดักแด้ในวงศ์ Rhyacophilidae, Hydrobiosidae และ Glossosomatidae
(ที่มา : Wiggins & Wichard, 1989)

ในบางกรณี หลังจากที่ทำกรสร้างวัสดุเพื่อปิดปลอกแล้ว ตัวอ่อนระยะสุดท้ายสามารถพักตัว (diapause) ได้ 2 ถึง 3 เดือน ภายในปลอก แต่ส่วนใหญ่จะเกิดกระบวนการลอกคราบเป็นระยะ ดักแด้ทันทีและจะทิ้งคราบไว้ในปลอก มีขนบริเวณปล้องท้อง ที่ช่วยในการกรองวัตถุที่อาจเข้าไปอุดตันรูระบายน้ำออก โดยส่วนใหญ่ระยะดักแด้จะใช้เวลา 2 ถึง 3 สัปดาห์ ก่อนจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย (Morse, 2009)

2.2.4 ตัวเต็มวัย (Adult)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัย (ภาพที่ 10 และ 11) setal wart มักเป็นจุดที่ใช้ในการจำแนกในระดับวงศ์ แยกโดยสีและลักษณะพื้นผิว มีลักษณะคล้ายโดมและมีขนแข็งปกคลุม ในแมลงหนอนปลอกน้ำในบางวงศ์ setal wart บริเวณหัวมีขนาดลดลง แตกต่างกันไปตามแต่ละวงศ์ บางวงศ์มีตาเดี่ยว (ocelli) 3 จุด อยู่บนหัว ลักษณะคล้ายลูกปัด กลมและมีสีขาวหรือเงิน จำนวนปล้องของ maxillary palp ก็เป็นจุดสำคัญที่ใช้จำแนกได้เช่นกัน ตัวอย่าง ปล้อง 1 ถึง 5 (ภาพที่ 10) ในวงศ์ Ecnomidae สกุล *Austrotinodes* ปล้องที่ 5 ของ maxillary palp มี sclerotin ก่อตัวขึ้นเป็นรูปวงแหวน (ภาพที่ 12)

(ที่มา: Merritt et al., 2019)



ภาพที่ 12 ลักษณะของ maxillary palp ตัวเต็มวัยสกุล *Austrotinodes* (Ecnomidae)

(ที่มา: Merritt et al., 2019)

ในบางกลุ่มอาจไม่สามารถจำแนกสปีชีส์โดยใช้จำนวนปล้องของ maxillary palp ได้ เนื่องจากในเพศผู้และเพศเมียสปีชีส์เดียวกัน อาจมีจำนวนปล้องไม่เท่ากัน เช่น เพศเมียมี 5 ปล้อง แต่เพศผู้ลดจำนวนลง ในวงศ์ Phryganeidae มี 4 ปล้อง วงศ์ Limnephilidae, Brachycentridae และ Helicopsychidae มี 3 ปล้อง หรืออาจจะน้อยกว่านั้น ในวงศ์ Lepidostomatidae และ Sericostomatidae ฐานของ maxillary palp และ antennae มีขนาดใหญ่ และ antenna งอไปด้านหลัง รวมถึงจำนวน tibial spurs บริเวณขาคู่ หน้า กลางและหลัง ที่เป็นอีกหนึ่งลักษณะ ที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัย (Malicky, 2010)

2.3 ความสำคัญของแมลงหนอนปลอกน้ำในระบบนิเวศ

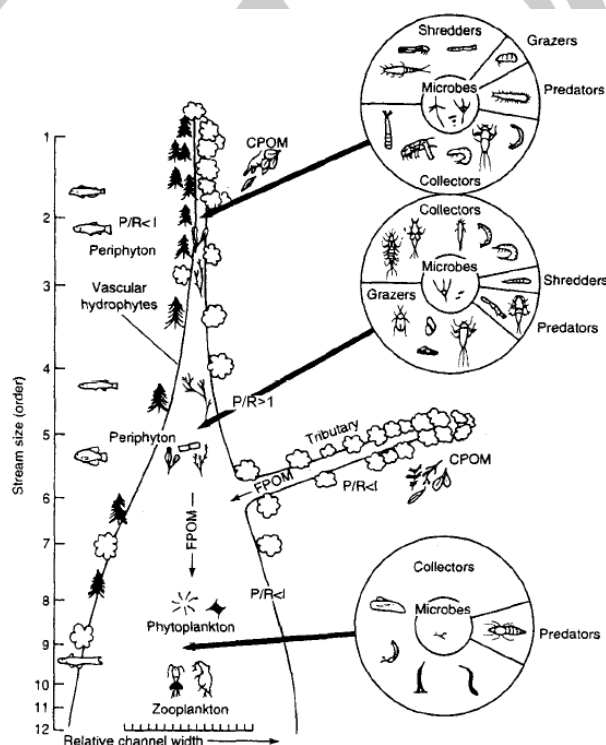
2.3.1 การหมุนเวียนสารอาหารในระบบนิเวศ

แมลงหนอนปลอกน้ำมีความหลากหลายของแหล่งที่อยู่อาศัย กระจายไปตามระบบนิเวศน้ำจืดที่มีลักษณะเฉพาะและมีคุณภาพน้ำแตกต่างกัน จึงสามารถพบแมลงหนอนปลอกน้ำในระยะตัวอ่อนได้ในทุกทวีป ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา (Antarctica) แมลงกลุ่มนี้มีบทบาทต่อระบบนิเวศ โดยเป็นอาหารของสัตว์น้ำ ทำให้เกิดการถ่ายทอดพลังงานในสายใยอาหาร นอกจากนี้ยังมีการใช้ตัวอ่อนของแมลงหนอนปลอกน้ำเป็นดัชนีชีวภาพในการประเมินผลกระทบคุณภาพสิ่งแวดล้อมของแหล่งน้ำ ตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำ เป็นกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหน้าดินที่มีความหลากหลายและความหนาแน่น ในระบบนิเวศน้ำจืด โดยเฉพาะแหล่งน้ำสะอาด ช่วยในการหมุนเวียนสารอาหารในระบบ

นิเวศ จากการเก็บสะสมอาหาร การกรองกินและการขูดกินอินทรีย์วัตถุขนาดเล็ก สะสมอยู่ภายในรูปของมวลชีวภาพภายในแมลงหนอนปลอกน้ำ และถ่ายทอดไปยังสัตว์นักล่าในห่วงโซ่อาหาร ส่วนแมลงหนอนปลอกน้ำกลุ่มที่กัดกินพืชและซากพืชและสัตว์ มีบทบาทในการสลายอินทรีย์วัตถุขนาดใหญ่ รวมถึงมูลสัตว์ให้มีขนาดเล็กลง ส่งผลดีต่อสัตว์ขนาดเล็กที่สามารถกินได้แค่เศษอินทรีย์วัตถุขนาดเล็กเท่านั้น (Morse, 2009) ตัวเต็มวัยยังเป็นอาหารของสัตว์ในระบบนิเวศบก เช่น นกน้ำ กบและสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมบางสปีชีส์ โดยเฉพาะบริเวณที่มีประชากรของแมลงหนอนปลอกน้ำหนาแน่น (Prommi, 2018)

แมลงหนอนปลอกน้ำมีส่วนสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สำคัญต่อการศึกษาและพัฒนาทฤษฎี The River Continuum Concept (RCC) ซึ่งกล่าวถึง ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่เกิดขึ้นตามขนาด และอันดับของลำธารที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ลำธารต้นน้ำมาถึงแม่น้ำในพื้นที่ลุ่ม โดยแต่ละส่วนของแม่น้ำจะมีกลุ่มของสัตว์แบ่งตามกลไกการได้อาหาร แตกต่างกันไป ซึ่งแมลงหนอนปลอกน้ำมีความสำคัญอย่างมาก ในทฤษฎี The River Continuum Concept (RCC) เนื่องจากแหล่งพลังงานในลำธารต้นน้ำพบว่าส่วนใหญ่มีอิทธิพลมาจาก ต้นไม้ริมลำธาร ต้นไม้ที่ปกคลุมมากทำให้แสงส่องผ่านลำธารน้อย และการสร้างผลผลิตของกลุ่มที่สามารถสร้างอาหารเองได้ในลำธารมีน้อย ทำให้อัตราส่วนของการสังเคราะห์แสงต่อการหายใจต่ำ ($P/R \text{ ratio} < 1$) ซึ่งแหล่งคาร์บอนและพลังงานส่วนใหญ่มาจากใบไม้ที่ร่วงหล่นลงในลำธาร (allochthonous) และสัตว์ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสัตว์ที่กินอนุภาคสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ (shredder) และสัตว์ที่เก็บกินอนุภาคสารอินทรีย์ (collector) เนื่องจากมีอนุภาคสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ (course particulate organic matter, CPOM) มาก ส่วนในลำธารขนาดกลางนั้นแสงสามารถส่องถึงลำธารได้มากขึ้น ทำให้ผู้ผลิตกลุ่มที่สร้างอาหารเองได้มีบทบาทในการสร้างพลังงานขึ้นต้น ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของเพอร์ไฟตอน และพืชน้ำ ทำให้อัตราส่วนของการสังเคราะห์แสงต่อการหายใจค่อนข้างสูง ($P/R \text{ ratio} > 1$) แหล่งพลังงานนี้เรียกว่า autochthonous ส่วนสัตว์ที่พบส่วนใหญ่นั้นเป็นกลุ่มสัตว์ที่ขูดกินสาหร่ายและเพอร์ไฟตอน (grazer) และ สัตว์ที่เก็บกินอนุภาคสารอินทรีย์ และในแม่น้ำ พบว่าความขุ่นของน้ำเพิ่มขึ้น และมีปริมาณอนุภาคสารอินทรีย์ขนาดเล็ก (fine particulate organic matter, FPOM) มาก ถึงแม้มีปริมาณแพลงก์ตอนพืช และพืชน้ำปริมาณพอเหมาะแต่ไม่เพียงพอที่จะเกิดการสังเคราะห์แสงมาก ทำให้อัตราส่วนของการสังเคราะห์แสงต่อการหายใจต่ำ ($P/R \text{ ratio} < 1$) ในบริเวณนี้สัตว์ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสัตว์ที่เก็บกินอนุภาคสารอินทรีย์ เนื่องจากมี FPOM สูง ส่วนประชากรของปลาพบว่าในลำธารต้นน้ำส่วนใหญ่พบปลาที่กิน

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและเป็นปลาที่ชอบอาศัยในอุณหภูมิต่ำส่วนในลำธารขนาดกลางและแม่น้ำจะพบปลาที่ชอบอาศัยในอุณหภูมิต่ำที่สูงขึ้น และเป็นกลุ่มปลาที่กินแพลงก์ตอนเป็นอาหาร (Vannote et al., 1980) (ภาพที่ 13) จากทฤษฎีดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าแมลงหนอนปลอกน้ำมีบทบาทในทุกบริเวณของแหล่งน้ำไหล เนื่องจากแมลงหนอนปลอกน้ำแต่ละกลุ่มมีความหลากหลายของกลไกการได้รับอาหาร (Wiggins, 1996) (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 13 The River Continuum Concept
(ที่มา : Vannote et al., 1980)

อีกทั้งยังมีรายงานการควบคุมประชากรของริ้นดำปี่สี *Simulium chutteri* Lewis เป็นแมลงดูดเลือด ที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตสัตว์ โดยตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำ เช่น *Cheumatopsyche thomasseti* Ulmer โดยการตรวจสอบอาหารภายในกระเพาะของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำ (De Moor, 1992) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำสปิชีส์ *Chuematopsyche thomasseti* Ulmer ที่บริเวณตัวอ่อนรินดำ (*Simulium*) ระบุระยะของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำสปิชีส์นี้ โดยการวัดขนาด จากGRAM ถึง postgena

ค่าเฉลี่ยของขนาดหัวตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำ	ระยะของตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนที่ศึกษา	จำนวนตัวอ่อนรินดำที่พบในกระเพาะ	อัตราส่วนของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำที่บริเวณตัวอ่อนรินดำ (%)
120	3	11	1	9
185	4	10	4	40
245	5	9	7	78

(ที่มา : ดัดแปลงจาก De Moor, 1992)

2.3.2 ศักยภาพของแมลงหนอนปลอกน้ำในการเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำ

แมลงหนอนปลอกน้ำสามารถเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำได้ เนื่องจากในวงศ์ Trichoptera เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ใหญ่และมีความหลากหลาย (Wiggins, 1996) โดยส่วนใหญ่แล้วจะอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำไหลที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำ แต่ก็สามารถพบได้ในแหล่งน้ำนิ่งที่น้ำมีอุณหภูมิค่อนข้างสูงได้เช่นกัน ด้วยความจำเพาะของแต่ละกลุ่ม ที่มีการปรับตัวไปตามแหล่งที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกันนี้ ทำให้สามารถใช้ทรัพยากรได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำ มีความสามารถในการสร้างและปลอก เพื่อป้องกันตัวจากผู้ล่า ในขณะที่หาอาหาร และสามารถเคลื่อนย้ายไปพร้อมกับปลอก เพื่อหาแหล่งอาหารใหม่ บางสปิชีส์สามารถสร้างตาข่ายเพื่อดักจับอาหารที่ไหลมาตามแหล่งน้ำไหล (Wiggins, 1996) ด้วยเหตุนี้จึงสามารถพบได้ในแหล่งที่อยู่อาศัยหลากหลายรูปแบบ และประชากรของแต่ละสปิชีส์มีความหนาแน่นสูง ส่งผลให้แมลงหนอนปลอกน้ำกลายเป็นตัวชี้วัดคุณภาพน้ำที่มีประสิทธิภาพ (Dohet, 2002)

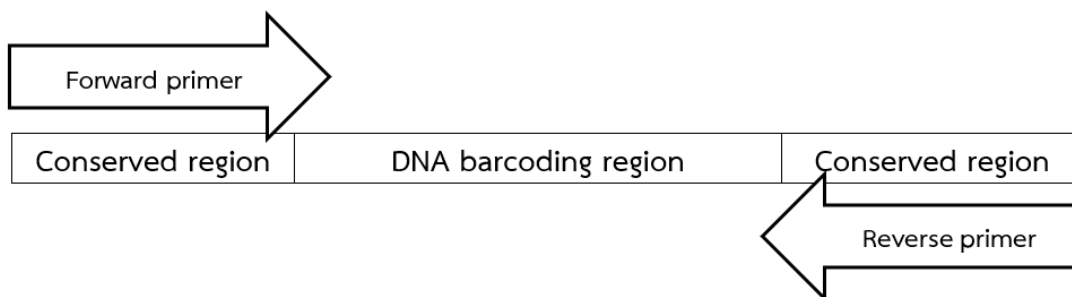
มีการใช้แมลงหนอนปลอกน้ำในการเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำอย่างแพร่หลาย โดยใช้กลุ่มตัวอย่างของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำที่ระบุสปิชีส์ในระดับวงศ์ (Hannaford & Resh, 1995; Hewlett, 2000; de Moor, 2002; Sripanya et al., 2022) และมีการใช้ตัวเต็มวัยแมลงหนอนปลอกน้ำในระดับสปิชีส์ ในการเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำ (Prommi et al., 2012, 2014; Prommi & Thani, 2014)

2.4 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการที่ใช้ความรู้ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลเพื่อประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ จากแนวคิดนี้ทำให้มีการพัฒนารหัสบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องและรวดเร็วขึ้น โดยไม่

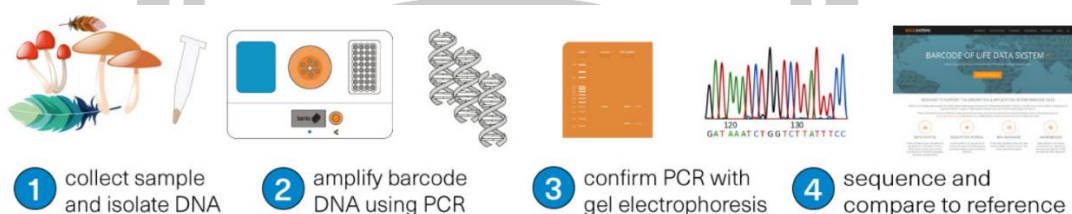
จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ครบสมบูรณ์ วิธีการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้ได้ถูกริเริ่มศึกษาและพัฒนาโดย พอล เฮเบิร์ต นักวิจัยด้านวิวัฒนาการ มหาวิทยาลัยกัลฟ์ ประเทศแคนาดา ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003 (Hebert et al., 2003b) และในปัจจุบันได้มีนักวิจัยทั่วโลกได้ร่วมกันจัดตั้งโครงการ Consortium for the Barcode of Life หรือ CBOL โดยมีสถาบันสมิธโซเนียน ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นหน่วยงานหลักที่สนับสนุนโครงการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต หลักการของดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีแนวคิดจากรูปแบบการเรียงตัวที่แตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์ 4 สปีชีส์ คือ อะดีนีน (adenine, A) ไทมิน (thymine, T) ไซโทซีน (cytosine, C) และกัวนีน (guanine, G) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่งจะมีการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกันออกไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์ ซึ่งจัดเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนั้นอาจเกิดมาจากการแทนที่ของเบส (substitution) การขาดหายของเบส (deletion) และการเพิ่มของเบส (insertion) ซึ่งเป็นผลให้เกิดความแปรผัน ทางพันธุกรรม (genetic variation) ขึ้น ในการเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ จึงจำเป็นต้องเลือกดีเอ็นเอมาตรฐาน หรือ ยีนมาตรฐาน ที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตขนาดสั้น ๆ ที่มีความผันแปรสูง และมีความแตกต่างกันมากพอที่จะใช้ในการจำแนกสปีชีส์ได้ ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อทำหน้าที่ในการระบุสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว โดยคุณสมบัติของส่วนดีเอ็นเอที่จะถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ควรมีลักษณะดังนี้

- 1.) บริเวณดีเอ็นเอที่เลือกนั้นต้องมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variability) ที่มากพอจนสามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ (species) ได้ และต้องมีความแตกต่างภายในสปีชีส์เดียวกันน้อยมากหรือไม่มีเลย
- 2.) ต้องเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ ขนาดประมาณ 500-800 คู่เบส เพื่อให้่ายต่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอร์เชน (Polymerase chain reaction)
- 3.) ช่วงหัวและท้ายของดีเอ็นเอนั้นต้องเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไปเพื่อใช้เป็นตำแหน่งในการเข้าจับของไพรเมอร์มาตรฐาน (universal primer) ดังภาพที่



ภาพที่ 14 ตำแหน่งในการเข้าจับของไพรเมอร์

ขั้นตอนในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดแสดงดังภาพที่ 15 โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างถ่ายภาพและบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ให้สมบูรณ์ จากนั้นจึงนำเอาตัวอย่างมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้พร้อมทั้งตรวจสอบความถูกต้อง แล้วจึงจัดเก็บดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้ในฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการระบุสปีชีส์สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยหากต้องการพิสูจน์ตัวอย่างชิ้นส่วนของสิ่งมีชีวิตไม่ทราบสปีชีส์ก็สามารถทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างนั้น ๆ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการ อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำไปเทียบกับฐานข้อมูลก็จะสามารถระบุสปีชีส์และข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างนั้นได้อย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 15 ขั้นตอนการการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (1) นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ (2) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการ (3) กระบวนการ Gel Electrophoresis เพื่อดูปริมาณและความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (4) อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปเทียบกับฐานข้อมูล (BOLD) (ที่มา: <https://bento.bio/protocol/dna-barcoding/>)

นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้ทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสัตว์และพบว่ายีน cytochrome c oxidase subunit I (Cox1 หรือ COI) ที่พบในไมโทคอนเดรียของสัตว์ทุกสปีชีส์ โดยที่ในสัตว์สปีชีส์เดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่ในสัตว์ต่างสปีชีส์กันจะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงทำให้มีการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ดังกล่าวมาใช้ในการระบุสปีชีส์ของสัตว์หลายกลุ่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การระบุสปีชีส์นก ผีเสื้อ (Hebert et al., 2004) แมงมุม (Barrett & Hebert, 2005) และสัตว์เลื้อยคลาน (Nagy et al., 2012) เป็นต้น

ส่วนในพีชการค้นหาวินิจฉัยที่เอ็นเอที่เหมาะสมเพียงตำแหน่งเดียวเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการระบุทุกสปีชีส์ของพืชนั้น ยังไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากยีนในตำแหน่ง COI จากไมโทคอนเดรียของพืชมีวิวัฒนาการช้ากว่าในสัตว์ ทำให้มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย

2.5 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำ

แมลงหนอนปลอกน้ำ ถูกจัดให้เป็นแมลงน้ำที่มีจำนวนสปีชีส์มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง (Morse et al., 2019) ทั้งนี้ตัวอ่อนแต่ละสปีชีส์มีถิ่นที่อยู่อาศัยย่อย (microhabitat) และมีความทนทานต่อปัจจัยสิ่งแวดล้อม (Environmental stressors) ที่แตกต่างกัน เช่น สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ (pesticides) สารอาหาร (nutrients) และตะกอน (sediments) ที่แตกต่างกัน (Wallace et al., 1996) ทำให้มักมีการนำไปเป็นดัชนีชีวภาพ เพื่อตรวจวัดคุณภาพน้ำ (Ab Hamid & Md Rawi, 2017; Prommi & Thani, 2014) การระบุสปีชีส์ของตัวอ่อนและแหล่งที่อยู่อาศัยที่ถูกต้องจึงเป็นประโยชน์ในการพัฒนาศักยภาพในการเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำ แต่เนื่องจากลักษณะของตัวเต็มวัยเพศผู้ที่มีการนำไปใช้ในการระบุสปีชีส์เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ตัวอ่อนของแมลงหนอนปลอกน้ำหลายสปีชีส์ยังไม่ได้มีคำอธิบายลักษณะเพื่อใช้ในการระบุสปีชีส์ (Zhou et al., 2007) มีการคาดการณ์ว่ายังเหลือการระบุสปีชีส์ของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำอีกประมาณ 13,000 สปีชีส์ ที่ยังไม่ได้มีการระบุสปีชีส์ (Zhou et al., 2016)

มีการใช้ตำแหน่งยีน COI ในไมโทคอนเดรีย ในการระบุสปีชีส์ของแมลงหนอนปลอกน้ำอย่างกว้างขวาง (Geraci et al., 2011; Hogg et al., 2009; Pauls et al., 2010; Zhou et al., 2007) เนื่องจากมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์สูง จึงมีศักยภาพในการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย เนื่องจากระยะตัวเต็มวัยของแมลงหนอนปลอกน้ำเพศผู้นั้นมีลักษณะเฉพาะที่ทำให้สามารถระบุสปีชีส์ได้ ข้อมูลเหล่านี้ยังช่วยในการจำแนกสปีชีส์ของตัวเต็มวัยได้ กรณีศึกษาในประเทศจีน ในสกุล *Mexipsyche* (Hydropsychidae) ระยะตัวอ่อนของแต่ละสปีชีส์มีลักษณะของหัวที่ต่างกัน ในขณะที่อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้แต่ละสปีชีส์นั้นมีความซับซ้อน (Zhou et al., 2007) และทวีปอเมริกาเหนือสามารถจำแนกสปีชีส์ซ่อนเร้นของ *Diplectrona modesta* Banks, 1908 ได้ (Zhou et al., 2011)

Erasmus et al. (2018) ได้ทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำ โดยใช้ยีน COI บริเวณแม่น้ำ Crooked River ในรัฐบริติชโคลัมเบีย เก็บตัวอย่างโดยใช้ kick-net methods พบตัวอ่อนของแมลงหนอนปลอกน้ำสปีชีส์ที่ไม่เคยพบในแม่น้ำแห่งนี้มาก่อนถึง 3 สปีชีส์

Lepidostoma togatum (Lepidostomatidae), *Ceraclea annulicornis* (Leptoceridae) และ *Cheumatopsyche harwoodi* (Hydropsychidae) ซึ่งตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำสปีชีส์ *Cheumatopsyche harwoodi* (Hydropsychidae) ไม่สามารถจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลงไปถึงระดับสปีชีส์ได้ ต้องอาศัยข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ไฟโลจีเนติกทรี เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากสปีชีส์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล BOLD (BARCODE OF LIFE DATA SYSTEM)

Kučinić et al. (2016) ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดแมลงหนอนปลอกน้ำสกุล *Tinodes* ในประเทศโครเอเชีย พบว่า ค่า p-distances ระหว่างสปีชีส์ภายในสกุล *Tinodes* มีค่าระหว่าง 10% ถึง 27% และมีค่า 0–3% ภายในสปีชีส์เดียวกัน โดยที่ค่า minimum interspecific divergence ระหว่างสปีชีส์ *T. antonioi* และ *T. n. sp. nr. turanicus* มีระยะห่างทางพันธุกรรม 10% ส่วน Maximum interspecific divergence คือ 24% ระหว่างสปีชีส์ *T. antonioi* และ *T. higashiyamanus* (24%) ค่า maximum intraspecific divergence 3% ภายในสปีชีส์ *T. dives* จากประเทศโครเอเชีย และสปีชีส์ย่อย *T. dives consiglioi* จากประเทศอิตาลี แสดงให้เห็นวิวัฒนาการเบนออก ของสปีชีส์ย่อย เนื่องจากค่า maximum intraspecific divergence นั้นมีค่ามากเกินไป จากการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดข้างต้นไม่พบความแตกต่างกันทางพันธุกรรม จากตัวอย่างที่มีลักษณะที่แตกต่างภายในสปีชีส์ *T. antonioi* แสดงให้เห็นว่าลักษณะที่แตกต่างภายในสปีชีส์ อาจไม่สามารถจัดจำแนกให้เป็นสปีชีส์ใหม่ได้เสมอไป อาจต้องวิเคราะห์โดยใช้ยีนตำแหน่งอื่นร่วมด้วย

Kučinić et al. (2020a) ทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำ โดยใช้ยีน COI บริเวณต้นน้ำ 36 แห่ง ในประเทศโครเอเชีย เก็บตัวอย่างโดยใช้สวิง และกับดักแสงไฟ จากตัวอย่าง 110 ตัวอย่าง ที่ทำการหาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ทำให้สามารถจำแนกตัวเต็มวัยของแมลงหนอนปลอกน้ำ ได้ทั้งหมด 70 สปีชีส์ 32 สกุล จาก 15 วงศ์ และพบสปีชีส์ที่น่าสนใจ เช่น *Rhyacophila cabrankensis*, *R. balcanica*, *Crunoecia kemponyi* และ *Allogmaus auricollis* ที่ยังไม่ได้มีการศึกษาบทบาทในแหล่งที่อยู่อาศัย แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในด้านความหลากหลาย อนุกรมวิธานและการศึกษาชีววิทยาเชิงอนุรักษ์ (conservation biology) ไม่เพียงแค่นั้นที่ศึกษา แต่ต้องใช้ข้อมูลจากทั่วโลก เพื่อที่จะเข้าใจการกระจายและความหลากหลายของสปีชีส์นั้นๆ และชี้ให้เห็นความสำคัญของตาน้ำทั่วโลก เนื่องจากเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่ค่อนข้างจำเพาะต่อสัตว์บางสปีชีส์ เช่น แมลงหนอนปลอกน้ำสปีชีส์ *Rhyacophila cabrankensis*

Kučinić et al. (2020b) ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำสกุล *Triaenodes* ในประเทศโครเอเชีย จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดจาก 60 ตัวอย่าง สกุล *Triaenodes* พบว่า ภายในสปีชีส์ *T. unanimitis* มีค่า intraspecific genetic distance น้อยที่สุด (0.2%) ระหว่างสปีชีส์ *T. unanimitis* และ *T. rufescens* จากประเทศรัสเซีย มีความแตกต่างกันเพียง 0.2% เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก BOLD database พบว่าเป็นคนละสปีชีส์กัน แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า ทั้งสองอยู่ในสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเดียวกัน โดยมีค่า bootstrap support 100% จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและ ABGD พบว่าภายในสปีชีส์ *Triaenodes unanimitis* ถูกแบ่งออกเป็น 5 สายวิวัฒนาการ โดยที่ตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากตัวอย่างในพื้นที่อื่นๆ 8% และไม่ได้อยู่ร่วมสายวิวัฒนาการจากพื้นที่ศึกษาอื่น ค่า intraspecific genetic distance มากที่สุดภายในสปีชีส์ *T. ochreellus* (10%) หลังจากวิเคราะห์ ABGD และสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า *T. ochreellus* แบ่งออกเป็น 2 สาย ได้แก่ สปีชีส์ย่อย *T. o. lefkas* และ *T. o. ochreellus* ซึ่งทั้งสองมีการกระจายในพื้นที่ที่แตกต่างกัน *T. o. ochreellus* กระจายอยู่ทางตะวันตกและ *T. o. lefkas* กระจายอยู่ทางตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปยุโรป ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนการแยกออกของสปีชีส์ย่อย *T. o. lefkas*

Orfinger et al. (2022) ศึกษาความสัมพันธ์ของแมลงหนอนปลอกน้ำในแต่ละระยะ เนื่องจากการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่ใช้จำแนกได้เพียงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ จึงได้ทำการหาความสัมพันธ์ของแมลงหนอนปลอกน้ำในระยะต่างๆ รวมถึงระยะตัวเต็มวัยเพศเมียกับ เพศผู้ที่สามารถระบุสปีชีส์ได้ โดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการวิเคราะห์ P-distance และการสร้างสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่ง COI ของแมลงหนอนปลอกน้ำสกุล *Polycentropus* ในเขตนีอาร์คติก (Nearctic region) พบว่า สามารถระบุสปีชีส์ของระยะตัวอ่อนได้ถึง 14 สปีชีส์ ได้แก่ *P. alabamensis* Hamilton, Harris & Lago, 1990, *P. blicklei* Ross & Yamamoto 1965, *P. carlsoni* Morse 1971, *P. carolinensis* Banks 1905, *P. colei* Ross 1941, *P. confusus* Hagen 1861, *P. denningi* Smith 1962, *P. elarus* Ross 1944, *P. gertschi* Denning 1950, *Polycentropus halidus* Milne 1936, *P. maculatus* Banks 1908, *P. pentus* Ross 1941, *P. rickeri* Yamamoto 1966 และ *P. variegatus* Banks 1900 ระบุสปีชีส์ของตัวเต็มวัยเพศเมียได้ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *P. carolinensis* และ *P. chelatus* Ross & Yamamoto 1965

Molina et al. (2017) ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้ยีน COI ในการระบุสปีชีส์ของแมลงชีปะขาว (Ephemeroptera) สโตนฟลาย (Plecoptera) และแมลงหนอนปลอกน้ำ (Trichoptera) บริเวณแม่น้ำจากธารน้ำแข็ง ในเทือกเขา Andes ประเทศโบลิเวีย ที่มีความจำเพาะของที่อยู่อาศัยและอาจเกิดปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตลดลง จากการศึกษพบว่า จากการวิเคราะห์ค่า p-distance ระหว่างสกุลและวงศ์ที่แตกต่างกัน นั้นมีค่า p-distance สูง (สูงสุด 20%) ความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ต่ำ (ช่วง 0.1-2%) และสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอ่อน ดักแด้และตัวเต็มวัย ของแมลงชีปะขาวได้ 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Meridialaris tintinnabula* Pescador & Peters, 1987 สโตนฟลาย (Plecoptera) 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Anacroneuria vagante* Stark & Baumann, 2011, *Claudioperla tigrina* Klapálek, 1904 และ *C. ruhieri* Gibon & Molina, 2013 และแมลงหนอนปลอกน้ำ 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Anomalocos moecus* cf. *illiesi* Marlier, 1962 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของยีน COI ในการจำแนกสปีชีส์และหาความสัมพันธ์ของระยะตัวอ่อน ดักแด้และตัวเต็มวัย และช่วยย่นระยะเวลาในการสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพได้

Peng et al. (2023) ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัยสกุล *Eoneureclipsis* Kimmins, 1955 ในวงศ์ Psychomyiidae ในประเทศจีน โดยใช้ยีน COI และวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) พบ 4 สปีชีส์ใหม่ ได้แก่ *Eoneureclipsis jianfenglingensis* sp. nov. จากมณฑลไหหลำ, *E. foraminulatus* sp. nov. จากเขตปกครองตนเองกว่างซีจ้วง, *E. spinosus* sp. nov. จากเขตปกครองตนเองกว่างซีจ้วงและมณฑลกว่างตุง, และ *E. gei* sp. nov. จากมณฑลฝูเจี้ยน และได้เขียนคำอธิบายลักษณะภาพประกอบและ dichotomous key

Genco et al. (2020) ศึกษาแมลงหนอนปลอกน้ำระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยสกุล *Drepanocentron* และ *Hydromanicus* ในอุทยานแห่งชาติแบค มา (Bach Mã National Park) ในประเทศเวียดนามตอนกลาง เก็บตัวอย่างตัวอ่อนด้วยวิธีการ Kick method เก็บตัวอย่างตัวเต็มวัยด้วยกับดักแสงไฟ โดยใช้ black-light trap นำตัวอย่างมาทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยใช้ยีน COI วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยวิธี Parsimony, Maximum likelihood และ Bayesian analysis พบสปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Hydromanicus calyx* n. sp. (Hydropsychidae) และ *Drepanocentron dentatum* n. sp. (Xiphocentronidae) และได้ทำการเขียนคำอธิบายลักษณะและภาพประกอบทั้งระยะตัวเต็มวัยและตัวอ่อน ระยะตัวเต็มวัยของ *D. dentatum* n. sp ถูกจัด

จำแนกสปีชีส์ออกจาก *D. vercaius* ที่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด มีลักษณะสัณฐานวิทยาของอวัยวะเพศผู้ที่แตกต่างกัน บริเวณ inferior appendages โดย *D. dentatum* n. sp. มีลักษณะคล้ายแผงฟันทางด้าน dorsal แต่ *D. vercaius* มีแผงฟันอยู่ทางด้าน ventral ระยะตัวอ่อนของ *D. dentatum* n. sp. แตกต่างจากสปีชีส์ใกล้เคียง *Xiphocentron messapus* และ *Cnodocentron yavapai* จากลักษณะของ mandible

สปีชีส์ *Hydromanicus calyx* n. sp. ระยะตัวเต็มวัย จากลักษณะเฉพาะของ harpago บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ มีความแตกต่างจากสปีชีส์ใกล้เคียง *H. nieuwenhuisi*, *H. abiud* และ *H. serubabel* จากลักษณะของ harpago ระยะตัวอ่อน มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกับสปีชีส์ *H. inferior* แต่มีความแตกต่างกันบริเวณ stridulatory areas ที่ส่วนหัวทางด้าน ventral โดยสปีชีส์ *Hydromanicus calyx* n. sp. มีลักษณะเด่นคือ มีรอยกล้ำเนื้อเป็นแนวยาว



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

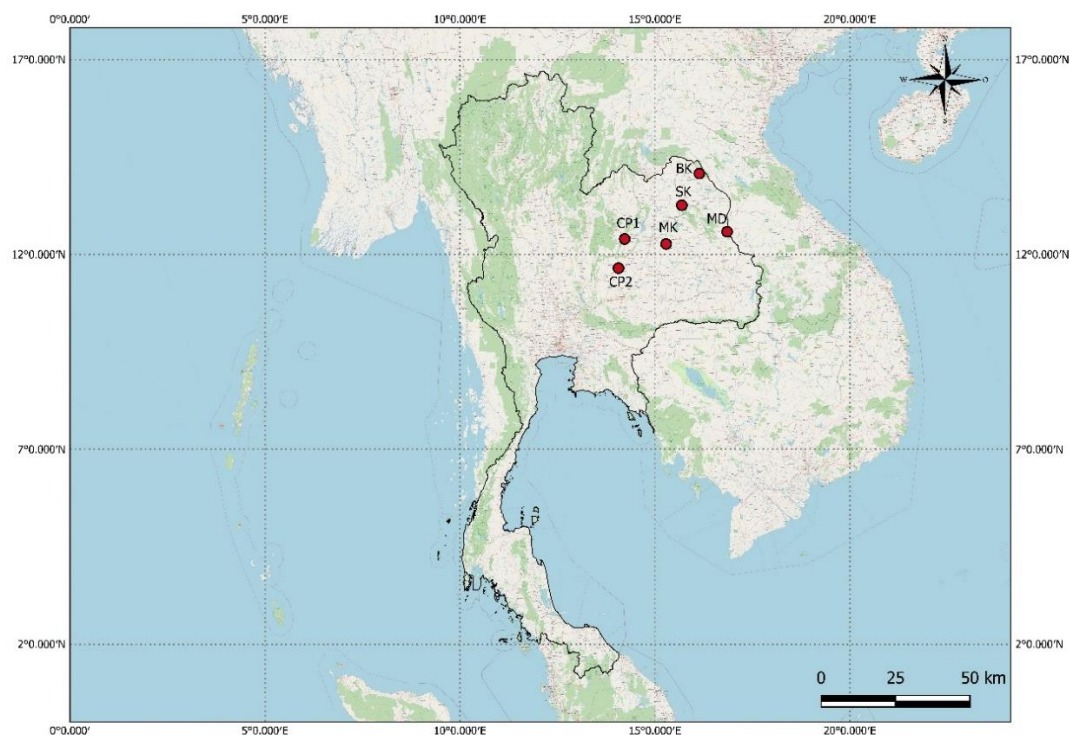
3.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกสปีชีส์แมลงหอนปลอกน้ำ

สำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงหอนปลอกน้ำระยะตัวเต็มวัยจากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย ทั้งหมด 6 แห่ง ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2565 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2566 (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 16) เก็บตัวอย่างตัวเต็มวัยด้วยการใช้กับดักแสงไฟ โดยใช้หลอด UV black light 6 วัตต์ และแบตเตอรี่ 12 โวลต์ วางหลอดไฟลงบนภาดพลาสติก ที่ใส่น้ำสูงประมาณ 5 เซนติเมตร ใส่สารลดแรงตึงผิว (detergent) 2 ถึง 3 หยด เพื่อลดแรงตึงผิวบริเวณผิวน้ำ ทำให้แมลงไม่สามารถคลานกลับขึ้นมาได้ (Malicky, 2010) (ภาพที่ 17) วางกับดักแสงไฟไว้ข้างแหล่งน้ำ พื้นที่ละ 2 ชุด ตั้งไว้เป็นระยะเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 พื้นที่เก็บตัวอย่างแมลงหอนปลอกน้ำตัวเต็มวัยในประเทศไทย

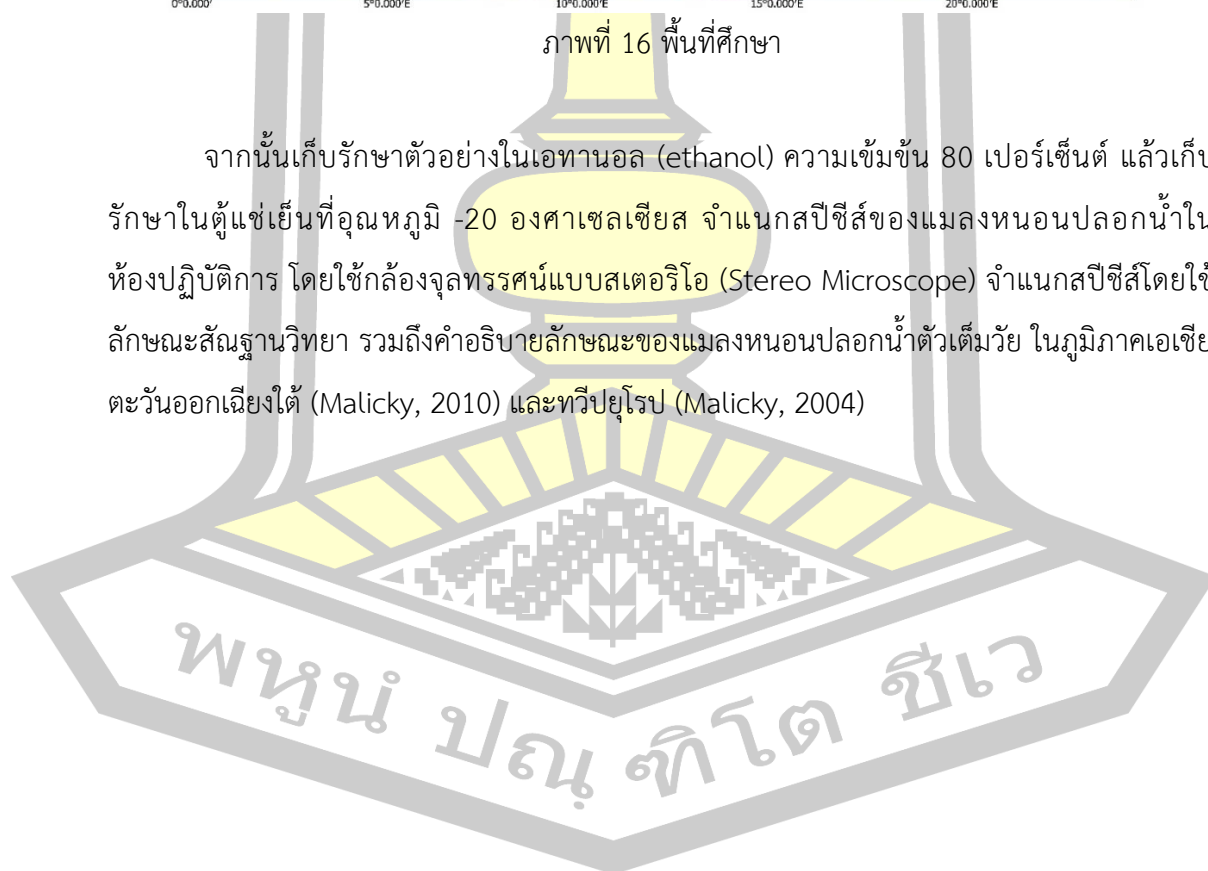
Location: Code	Type	Date	Latitude/Longitude
Bueng Khong Long, Bueng Kan: BK	Marsh	13 October 2022 & 4 February 2023	18.02334 N/104.01569 E
Ban Yang, Kantharawichai, Maha Sarakham: MK	Pond	7 December 2022	16.29047 N/103.18336 E
Waritchaphum, Sakhon Nakhon: SK	Pond	11 December 2022	17.24151 N/103.57452 E
Bang Sai Yai, Mukdahan: MD	River	1 January 2023	16.59807 N/104.73190 E
Chatturat, Chaiyaphum: CP1	Marsh	4 March 2023	15.68335 N/101.98085 E
Phu Khiao, Chaiyaphum: CP2	Marsh	8 April 2023	16.40045 N/ 102.12954 E

พหุณ ปณ จิตโต ชีเว



ภาพที่ 16 พื้นที่ศึกษา

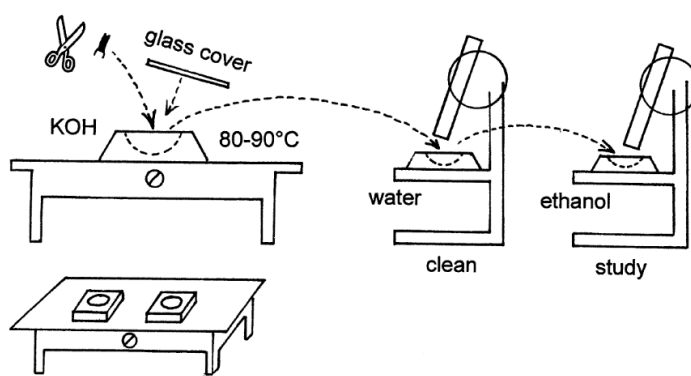
จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในเอทานอล (ethanol) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำแนกสปีชีส์ของแมลงหนองปลอกน้ำในห้องปฏิบัติการ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope) จำแนกสปีชีส์โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา รวมถึงคำอธิบายลักษณะของแมลงหนองปลอกน้ำตัวเต็มวัย ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Malicky, 2010) และทวีปยุโรป (Malicky, 2004)





ภาพที่ 17 กับดักแสงไฟ (UV black light trap)

ทั้งนี้ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกสปีชีส์ของแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัย อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) หากไม่สามารถมองเห็นลักษณะได้อย่างชัดเจน สามารถนำอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ไปทำให้ตัวอย่างใส (clearing) โดยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นย้ายตัวอย่างไปแช่ในน้ำที่ผสมสารลดแรงตึงผิวไว้ ใช้เข็มเขี่ยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหรือกล้ามเนื้อออกจนได้ตัวอย่างใส (Malicky, 2010) (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 การเตรียมตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของแมลงหนอนปลอกน้ำในโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์
(ที่มา: Malicky, 2010)

3.2 การศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุล

นำตัวอย่างแมลงหนองปลอกน้ำตัวเต็มวัย ที่ได้รับการระบุสปีชีส์ตามลักษณะสัณฐานวิทยาแล้ว สปีชีส์ละ 10 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอจากส่วนขา โดยใช้ GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ตำแหน่งยีน Cytochrome c oxidase I (COI) ความยาวประมาณ 650 bp ใช้ไพรเมอร์สองคู่ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม LCO1490: 5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG-3' และ HCO2198: 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer et al., 1994) การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ในปริมาตรรวม 25 µl มีองค์ประกอบได้แก่ 10× PCR buffer 2.5 µl, MgCl₂ (50 mM) 0.36 µl, dNTP mixture (2.5 mM) 0.8 µl, ไพรเมอร์ (10 µM) อย่างละ 1 µl, Taq DNA polymerase 0.2 µl (Vivantis, Malaysia) เติมน้ำ DNA template 1 µl และเติมน้ำ ddH₂O ให้ครบปริมาตร 25 µl และใช้เครื่อง Biometra Tone เพื่อปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยา ดัดแปลงจากวิธีการของ Folmer et al. (1994) มีรายละเอียดดังนี้

Initial denaturation	1 cycle	94 °C	2 นาที
Amplification	36 cycles	94 °C	30 วินาที
		45 °C	1 นาที
		72 °C	1 นาที
Final extension	1 cycle	72 °C	4 นาที

ตรวจสอบ PCR product ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel) (Vivantis, Malaysia) นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท ATCG Limited (Thailand Science Park: TSP) จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.3.1 การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแมลงหนองปลอกน้ำ จากฐานข้อมูลใน NCBI GenBank และ BOLD และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงหนองปลอกน้ำสปีชีส์ที่มีความคล้ายคลึงกัน นำข้อมูลทั้งหมดมา วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์และระหว่างสปีชีส์

โดยใช้โมเดล Kimura's 2-parameter model (K2P) ด้วยโปรแกรม MEGA 11 (Tamura et al., 2021)

วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการร่วมกัน ที่ตำแหน่งยีน COI ด้วย 2 วิธี ได้แก่ (1) วิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้ Kimura's 2-parameter model (K2P) ด้วยโปรแกรม MEGA 11 (Tamura et al., 2021) คำนวณค่าสนับสนุนของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ bootstrap value จำนวน 1,000 ซ้ำ (2) วิธี Maximum likelihood (ML) วิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วย โปรแกรม RAxML (<https://embnet.vital-it.ch/raxml-bb/>) (Stamatakis et al., 2008) วิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรม (uncorrected pairwise divergences: p-distance) ภายในสปีชีส์ ด้วยโปรแกรม MEGA 11 (Tamura et al., 2021)



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ความหลากหลายของแมลงหนอนปลอกน้ำ

จากพื้นที่ศึกษาทั้งหมด 6 แห่ง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบแมลงหนอนปลอกน้ำทั้งหมด 1186 ตัวอย่าง จำแนกเป็น 4 วงศ์ 8 สกุล 13 สปีชีส์ (ตารางที่ 4) แมลงหนอนปลอกน้ำที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Leptocerus posticus* Banks, 1911 จำนวน 213 ตัวอย่าง รองลงมา ได้แก่ *Oecetis* sp. จำนวน 141 ตัวอย่าง สปีชีส์ที่พบน้อยที่สุด ได้แก่ *Oecetis bengalica* Martynov, 1836 จำนวน 4 ตัวอย่าง

จากพื้นที่ศึกษา 6 แห่ง พบว่า อ.บึงโขงหลง จังหวัดบึงกาฬ (BK) มีความหลากหลายชนิดของแมลงหนอนปลอกน้ำระยะตัวเต็มวัยมากที่สุด พบจำนวน 11 สปีชีส์ โดยสปีชีส์ *L. posticus* มีจำนวนมากที่สุด พบน้อยที่สุดคือ *Aethaloptera sexpunctata* (ตารางที่ 4) พื้นที่ที่พบมีความหลากหลายชนิดและจำนวนตัวอย่างน้อยที่สุด คือ ต. บางทรายใหญ่ อ.เมือง จังหวัดมุกดาหาร (MD) และ อ.จตุรัส จังหวัดชัยภูมิ (CP1) ทั้งสองพื้นที่ พบจำนวน 10 ตัวอย่าง 1 สปีชีส์

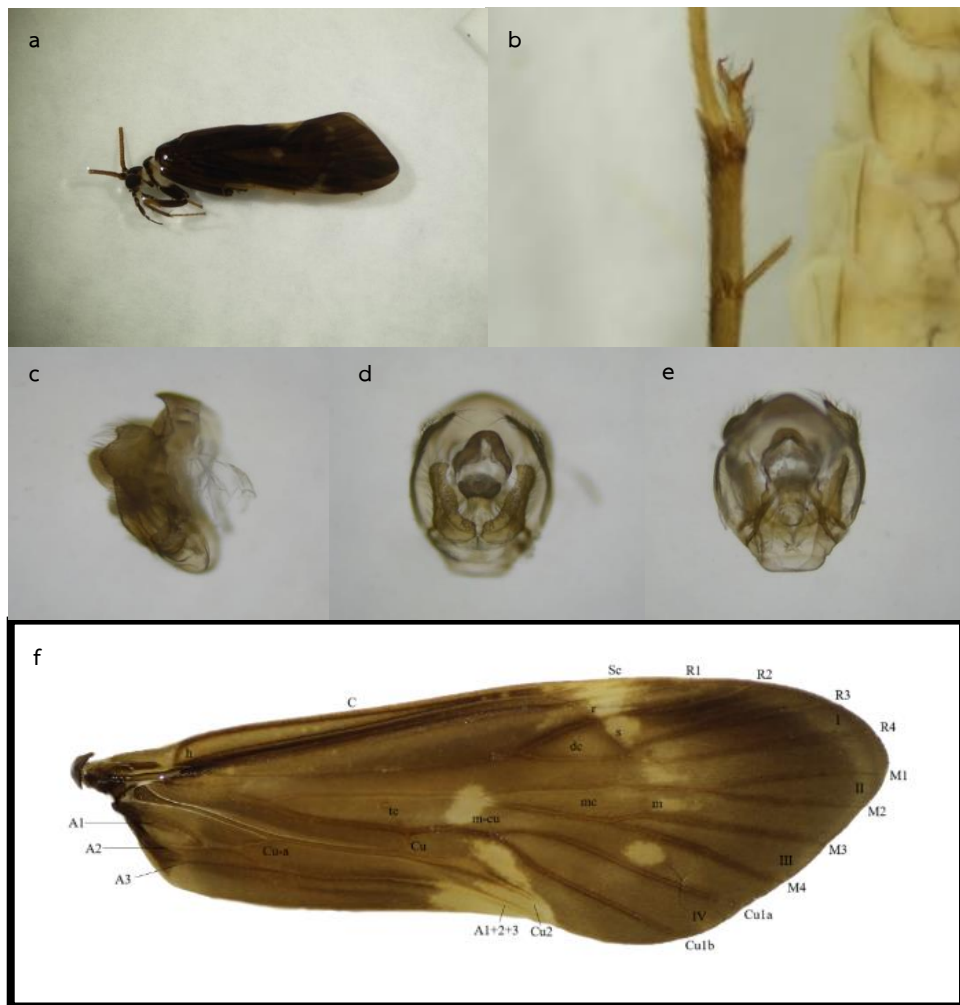
สปีชีส์ที่มีความแตกต่างไปจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ Malicky, (2010) ระบุไว้ คือ สปีชีส์ *Dipsuedopsis* nr. *robustior andamanensis* (ภาพที่ 19) อยู่ในกลุ่มสปีชีส์ที่มีความแปรผันของลักษณะอวัยวะเพศผู้ ลวดลายของปีกและ hind tibial spurs ที่มีการเปลี่ยนรูปโดยการแตกออกเป็น 2 แฉก (bifid) และเป็นอีกหนึ่งลักษณะเด่นของกลุ่มสปีชีส์นี้ (ภาพที่ 19b) *D. nr. r. andamanensis* มี hind tibial spur และ inferior appendage ของอวัยวะเพศผู้ เหมือนกับ *D. r. andamanensis* Weaver & Malicky 1994 ภาพที่ (20a-c) แต่ลวดลายของปีกคล้ายกับ *D. knappi* Schmid & Denning, 1979 (ภาพที่ 20d) จึงไม่สามารถระบุว่าเป็น *D. r. andamanensis* ได้อย่างชัดเจน

พหุบัน ปณ จิตโต ชีเว

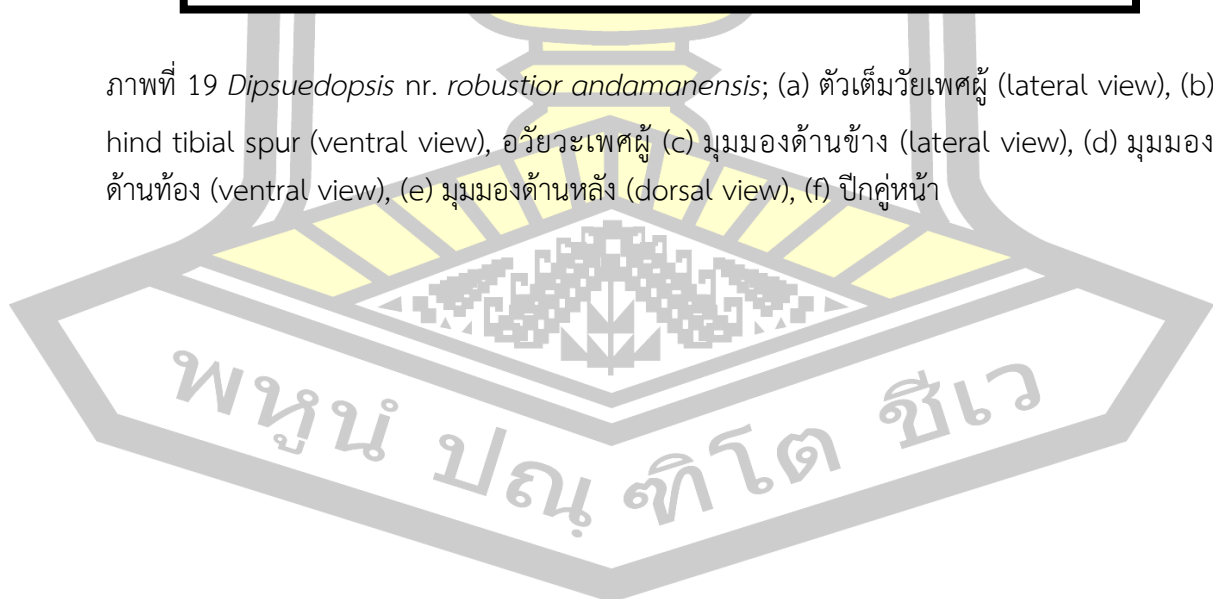
ตารางที่ 4 พื้นที่ศึกษา ความหลากหลายชนิดและจำนวนของตัวอย่างแมลงหนอนปลอกน้ำตัวเต็มวัย

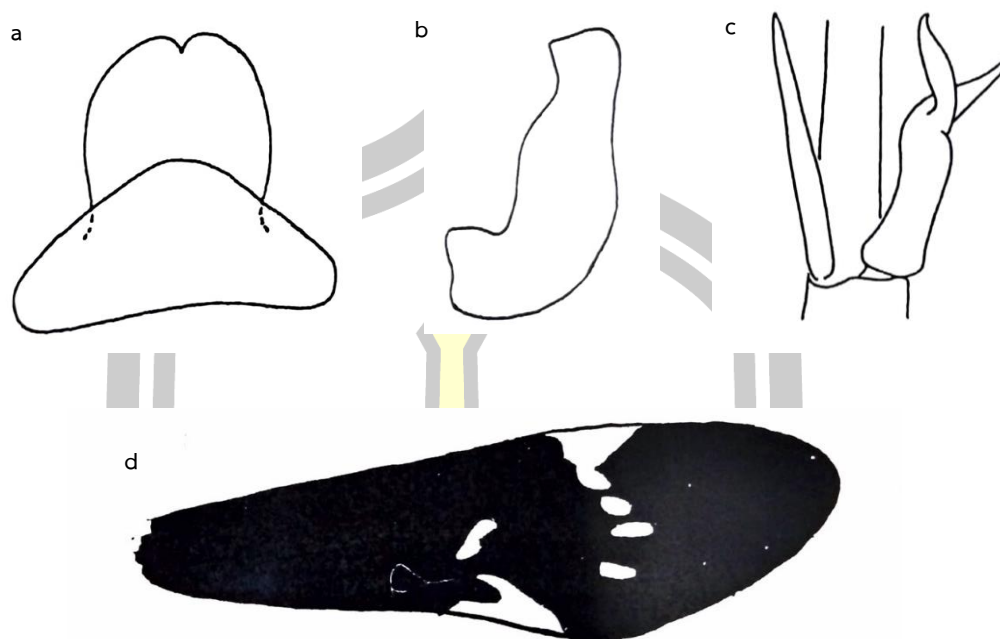
Location: Type: Code	Morphological Species	Male (n)	Female (n)	S	N
Bueng Khong Long, Bueng Kan: Marsh: BK	<i>Dipsuedopsis</i> nr. <i>robustior</i> <i>andamanensis</i>	61	9	11	1186
	<i>Oecetis bengalica</i>	3	1		
	<i>Oecetis biramosa</i>	22	28		
	<i>Oecetis</i> sp.	42	99		
	<i>Triplectides buengkanensis</i> sp. nov.	27	42		
	<i>Leptocerus posticus</i>	137	76		
	<i>Ecnomus argonautos</i>	86	-		
	<i>Cheumatopsyche lucida</i>	5	5		
	<i>Cheumatopsyche</i> <i>schwendingeri</i>	3	4		
	<i>Aethaloptera sexpunctata</i>	1	1		
	<i>Macrostemum dione</i>	2	6		
	<i>Ecnomus</i> *	-	526		
Ban Yang, Kantharawichai, Maha Sarakhm: Pond: MK	<i>Dipsuedopsis</i> nr. <i>robustior</i> <i>andamanensis</i>	6	0	1	6
Waritchaphum, Sakhon Nakhon: Pond: SK	<i>Dipsuedopsis</i> nr. <i>robustior</i> <i>andamanensis</i>	7	22	1	29
Bang Sai Yai, Mukdahan: River: MD	<i>Cheumatopsyche</i> <i>schwendingeri</i>	5	5	1	10
Chatturat, Chaiyaphum: Marsh: CP1	<i>Aethaloptera sexpunctata</i>	4	6	1	10
Phu Khiao, Chaiyaphum: Marsh: CP2	<i>Ecnomus obtusus</i>	100	-	2	246
	<i>Ecnomus mammus</i>	18	-		
	<i>Ecnomus</i> *	-	128		

หมายเหตุ: *เพศเมียของแมลงหนอนปลอกน้ำสกุล *Ecnomus* ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้; S = ความหลากหลายชนิด, N = จำนวนตัวอย่างของแต่ละสปีชีส์



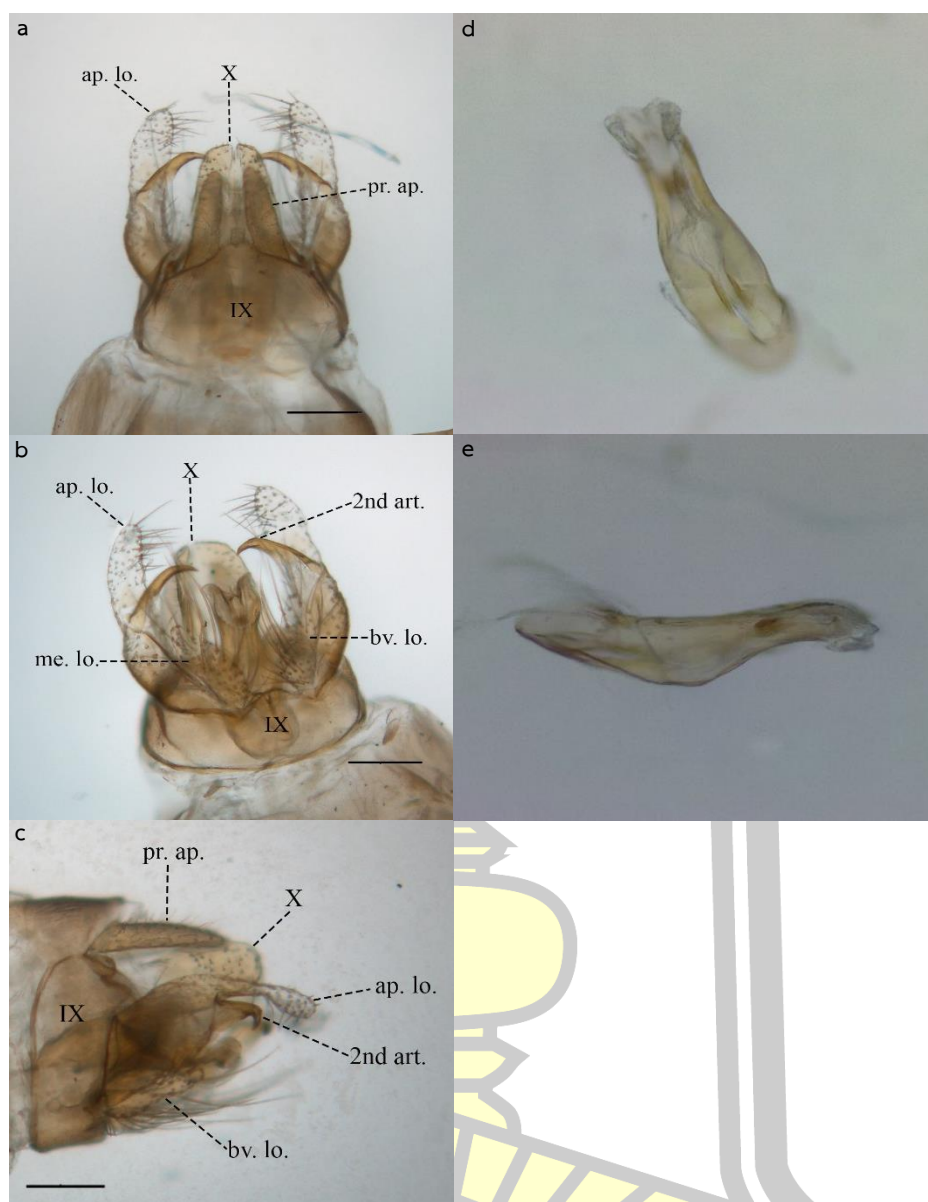
ภาพที่ 19 *Dipsuedopsis* nr. *robustior andamanensis*; (a) ตัวเต็มวัยเพศผู้ (lateral view), (b) hind tibial spur (ventral view), อวัยวะเพศผู้ (c) มุมมองด้านข้าง (lateral view), (d) มุมมองด้านท้อง (ventral view), (e) มุมมองด้านหลัง (dorsal view), (f) ปีกคู่หน้า



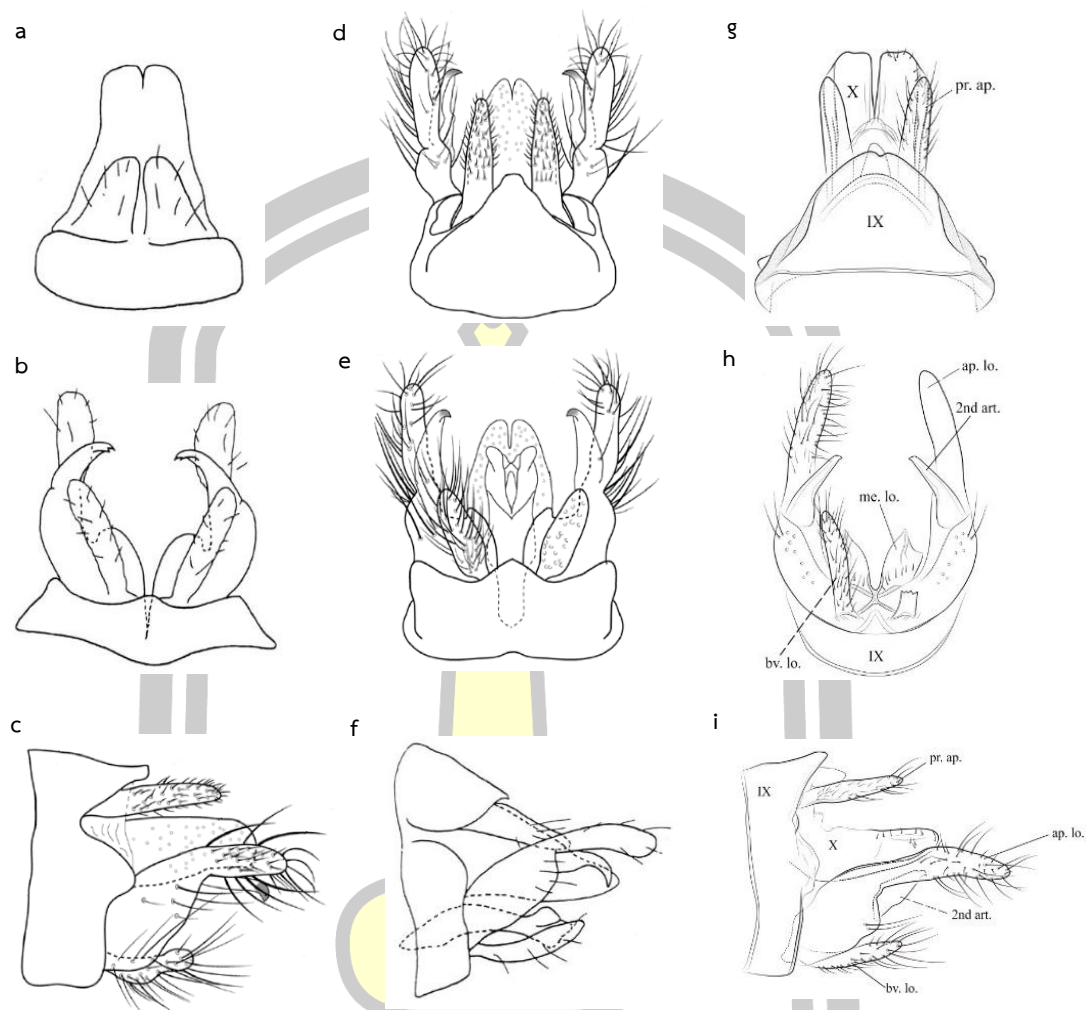


ภาพที่ 20 *Dipsuedopsis robustior andamanensis* Weaver & Malicky, 1994 (a, b & c) และ *Dipsuedopsis knappi* Schmid & Denning, 1979 (d); (a) tergite ปล้องที่ 10, (b) inferior appendage ของอวัยวะเพศผู้ (มุมมองด้านท้อง), (c) hind tibial spur, (d) ปีกคู่หน้า (ที่มา: Malicky, 2010)

สปีชีส์ *Triplectides indicus* Walker, 1852 (ภาพที่ 22a-c) เป็นเพียงสปีชีส์เดียวของสกุล *Triplectides* Kolenati, 1859 ในรายงานของ Malicky, (2010) ที่ได้ทำการศึกษาแมลงหนอนปลอกน้ำในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การศึกษาครั้งนี้ พบตัวอย่างจากพื้นที่ศึกษา อ.บึงโขงหลง จ.บึงกาฬ (BK) *Triplectides buengkanensis* sp. nov. (ภาพที่ 21) ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับรายงานของ Malicky (2010) แต่ยังมีบางส่วนของอวัยวะเพศผู้ ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน อีกทั้งอวัยวะเพศผู้ยังคล้ายกับสปีชีส์ใกล้เคียง *Triplectides misakianus* Matsumura, 1931 (ภาพที่ 22d-f) ที่มีการรายงานไว้โดย Katsuma & Kuranishi ในปี 2016 และ *Triplectides nessimiani* Desdério & Pes โดย Desério และ Pes ในปี 2020 (ภาพที่ 22g-i) อวัยวะเพศเมียคล้ายคลึงกับสปีชีส์ *T. misakianus* (ภาพที่ 23) โดยจะมีการอธิบายอย่างละเอียดในหัวข้อที่ 4.5

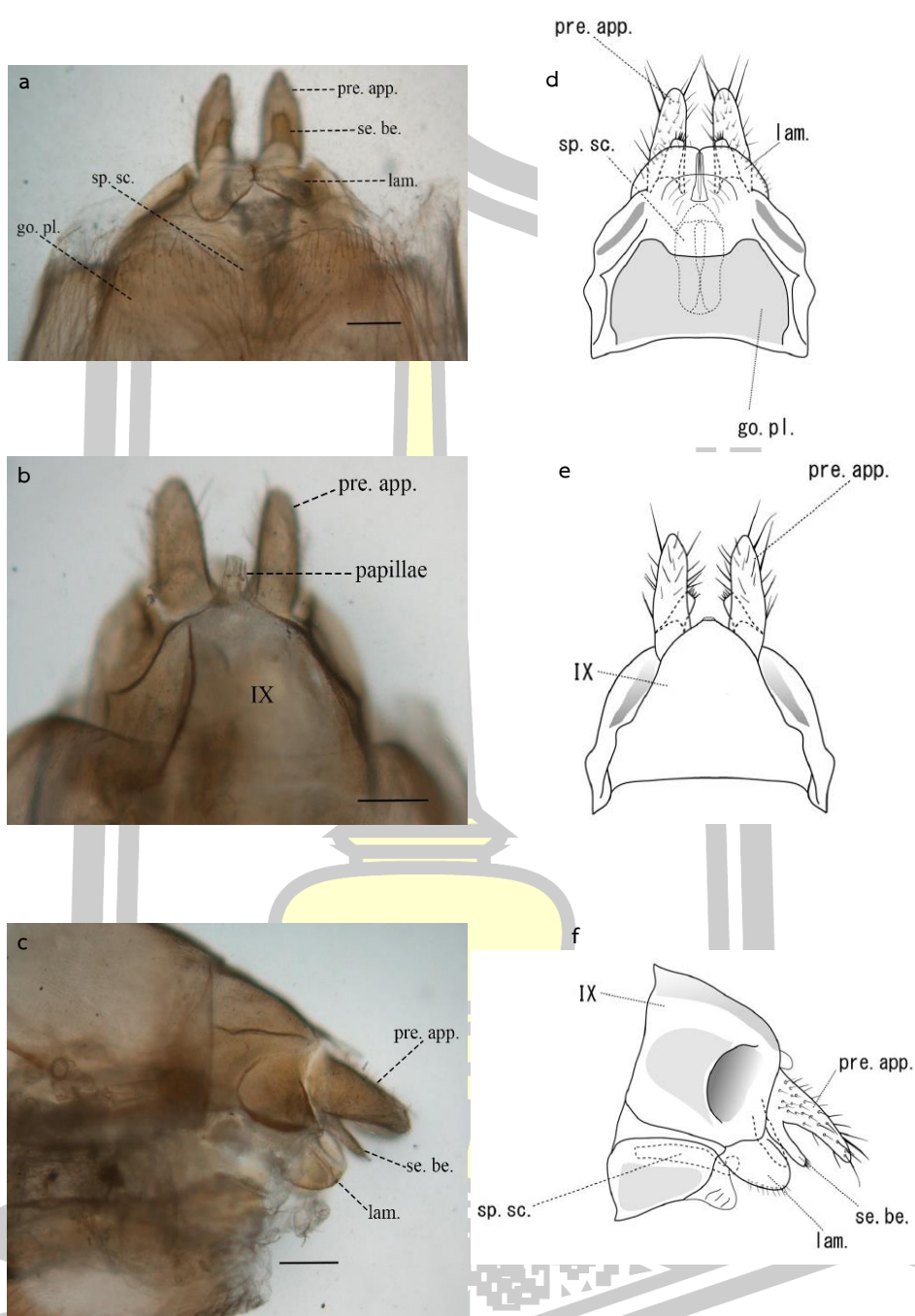


ภาพที่ 21 ภาพถ่ายอวัยวะเพศผู้ของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov.; (a) dorsal view, (b) ventral view, (c) lateral view, (d) phallic apparatus (dorsal view), (e) phallic apparatus (lateral view); scale bars= 0.1 mm; abbreviation: ap. lo. = apicodorsal lobe, IX= segment IX, X= segment X, bv. lo. = basoventral lobe, me. lo. = mesal lobe, ph. sc. = phallotremal sclerite, pr. ap. = preanal appendages, 2nd art. = second article



ภาพที่ 22 อวัยวะเพศผู้ของ *Triplectides indicus* Walker, 1852 (a-c), *Triplectides misakianus* Matsumura, 1931 (d-f) และ *Triplectides nessimiani* Desdério & Pes (g-i); (a, d, g) dorsal view, (b, e, h) ventral view, (c, f, i) lateral view; abbreviation: ap. lo. = apicodorsal lobe, IX= segment IX, X= segment X, bv. lo. = basoventral lobe, me. lo. = mesal lobe, ph. sc. = phallotremal sclerite, pr. ap. = preanal appendages, 2nd art. = second article

(ที่มา: Katsuma & Kuranishi, 2016, Malicky, 2010 และ Desério and Pes, 2020)



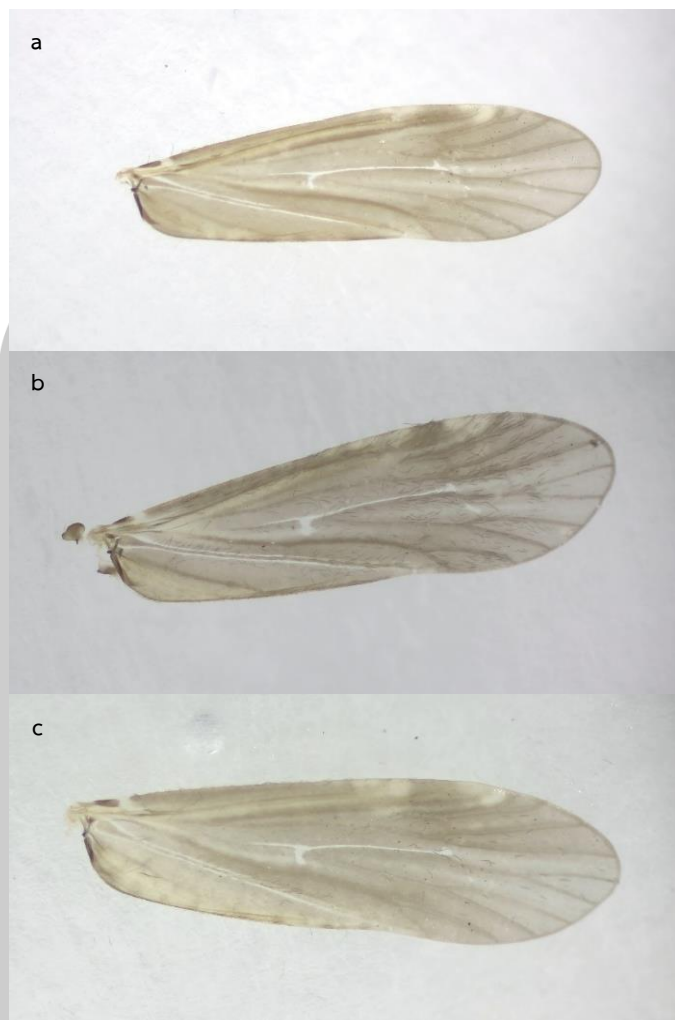
ภาพที่ 23 อวัยวะเพศเมียของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov. (a-c) และ *Triplectides misakianus* Matsumura, 1931 (d-f); (a) ventral view, (b) lateral view, (c) dorsal view; abbreviation: IX = segment IX, pr. ap. = preanal appendage, sp. sc. = spermathecal sclerite, se. be. = sensilla-bearing process, lam. = lamella, go. pl. = gonopod plate (ที่มา: Katsuma & Kuranishi, 2016)

สปีชีส์ในสกุล *Ecnomus* McLachlan, 1864 ได้แก่ *Ecnomus argonautos* Laudee & Malicky, 1999 จากพื้นที่ศึกษา อ.บึงโขงหลง จ.บึงกาฬ (BK) *Ecnomus mammus* M&C, 1993 และ *Ecnomus obtusus* Ulmer, 1910 จากพื้นที่ศึกษา อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ (CP2) เพศผู้ของ ทั้ง 3 สปีชีส์ มีลักษณะของอวัยวะเพศผู้ที่ตรงกันกับรายงานก่อนหน้า แต่เพศเมียไม่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันชัดเจนจนสามารถจัดจำแนกได้ เนื่องจากลักษณะของปีก (ภาพที่ 25) และ setal warts บริเวณหัว pronotum scutum และ scutellum (dorsal view) และอวัยวะเพศเมีย ไม่มีความแตกต่างกันที่ชัดเจน และมีลักษณะที่แปรผันภายในสปีชีส์เดียวกัน แตกต่างกันเพียงความเข้มของสี โดยที่เพศเมียของ *E. argonautos* และ *E. mammus* จะมีสีเข้มกว่า *E. obtusus* (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ตัวเต็มวัยเพศเมีย; (a) *Ecnomus argonautos* Laudee & Malicky, 1999 จากพื้นที่ศึกษา อ.บึงโขงหลง จ.บึงกาฬ (BK), (b) *Ecnomus mammus* M&C, 1993 และ (c) *Ecnomus obtusus* Ulmer, 1910 จาก อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ (CP2)





ภาพที่ 25 ปีกนอกของตัวเต็มวัยเพศเมีย (a) *Ecnomus argonautos* Laudee & Malicky, 1999 จากพื้นที่ศึกษา อ.บึงโขงหลง จ.บึงกาฬ (BK), (b) *Ecnomus mammus* M&C, 1993 และ (c) *Ecnomus obtusus* Ulmer, 1910 จาก อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ (CP2)

4.2 การจำแนกสปีชีส์โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

จากการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกสปีชีส์ โดยการนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล BOLD systems พบว่า จากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้งหมด สามารถจำแนกแมลงหนอนปลอกน้ำได้เป็น 13 สปีชีส์ โดยที่สปีชีส์ *Oecetis bengalica* Martynov, 1836, *Cheumatopsyche lucida* Ulmer, 1907 และ *Aethaloptera sexpunctata* Kolenati, 1859 มีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในฐานข้อมูลแล้ว และเมื่อเปรียบเทียบกับ การจำแนกสปีชีส์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จาก Malicky, (2010) พบว่าไม่มีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกันกับ *Oecetis biramosa* Martynov, 1936 ที่อาจไม่ได้มีการระบุให้เป็นสปีชีส์ *Oecetis biramosa* ตรงกันกับฐานข้อมูล BOLD systems แต่มีความแตกต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 2.55% และไม่ได้มีลักษณะที่แตกต่างกันกับที่เคยระบุไว้

ในส่วนของสปีชีส์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงกันกับที่มีการระบุเอาไว้ แต่ยังไม่มีการ รายงานไว้ในฐานข้อมูล ได้แก่ *Leptocerus posticus* Banks, 1911, *Ecnomus mammus* M&C, 1993, *Ecnomus argonautos* Laudee & Malicky, 1999, *Ecnomus obtusus* Ulmer, 1910 และ *Macrostemum dione* M&C, 1998

เมื่อเปรียบเทียบดีเอ็นเอบาร์โค้ดกับฐานข้อมูล พบว่าสปีชีส์ *Oecetis* sp. และ ยังไม่มีข้อมูล ดีเอ็นเอบาร์โค้ด และไม่สามารถจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ ต่างจากสปีชีส์ *Dipsuedopsis* nr. *robustior andamanensis* และ *Triplectides buengkanensis* sp. nov. ที่มี ลักษณะใกล้เคียงกับการศึกษาของ Malicky, (2010) แต่มีลักษณะบางอย่าง เช่น inferior appendage ของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov. ที่มีลักษณะแตกต่างจากที่เคยระบุเอาไว้ โดยที่สปีชีส์ *D. nr. r. andamanensis* นั้นยังไม่มีดีเอ็นเอบาร์โค้ดในฐานข้อมูล ต่างจากสปีชีส์ *Triplectides indicus* Walker, 1852 ที่ได้มีการรายงานดีเอ็นเอบาร์โค้ดไว้ในฐานข้อมูลแล้ว เป็น ตัวอย่างจากประเทศไทย ลาวและอินโดนีเซีย แต่เมื่อนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov. ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้ระบบ BOLD Identification engine ของ BOLD systems พบว่า *Triplectides misakianus* ที่เป็นสปีชีส์ใกล้เคียง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ แตกต่างกัน 2.74% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุสปีชีส์ จากฐานข้อมูล BOLD systems

Morphological Species (n)	Code	BOLD Identification (BIN of the Specimen in the Present Study)	Nearest Neighbor BIN (min. Distance)	Nearest Neighbor BIN Species
Maha Sarakham: MK				
<i>Dipsuedopsis</i> nr. <i>robustior andamanensis</i> (3)	DroMK	No match	ACH0369 (9.22)	<i>Dipsuedopsis</i> <i>Infuscata</i>
Sakhon Nakhon: SK				
<i>Dipsuedopsis</i> nr. <i>robustior andamanensis</i> (3)	DroSK	No match	ACH0369 (11.54)	<i>Dipsuedopsis</i> <i>Infuscata</i>
Bueng Kan: BK				
<i>Dipseudopsis</i> nr. <i>robustior andamanensis</i> (6)	DroBK	No match	ACH0369 (8.87)	<i>Dipsuedopsis</i> <i>Infuscata</i>
<i>Oecetis bengalica</i> (1)	ObeBK	<i>Oecetis bengalica</i> (ACH0590)	AAK2966 (11.95)	<i>Oecetis furva</i>
<i>Oecetis biramosa</i> (7)	ObiBK	No match	ACH0362 (2.55)	<i>Oecetis biramosa</i>
<i>Oecetis</i> sp. (2)	OspBK	No match	ABX5039 (12.4)	<i>Oecetis</i> nr. <i>avara</i>
<i>Triplectides</i> <i>buengkanensis</i> sp. nov. (15)	TindBK	No match	ACQ1816 (2.74)	<i>Triplectides</i> <i>misakianus</i>
<i>Leptocerus posticus</i> (4)	LpoBK	No match	AEA5449 (13.38)	<i>Oecetis searica</i>
<i>Ecnomus argonautos</i> (8)	EarBK	No match	AAZ5014 (13.6)	<i>Ecnomus miriwud</i>
<i>Cheumatopsyche lucida</i> (4)	CluBK	<i>Cheumatopsyche</i> <i>lucida</i> (AAW6472)	ABW1868 (11.32)	<i>Cheumatopsyche</i> <i>afra</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ) การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุสปีชีส์ จากฐานข้อมูล BOLD systems

Morphological Species (n)	Code	BOLD Identification (BIN of the Specimen in the Present Study)	Nearest Neighbor BIN (min. Distance)	Nearest Neighbor BIN Species
<i>Cheumatopsyche schwendingeri</i> (4)	CscBK	<i>Cheumatopsyche</i> XZ sp. CN16 (AAW6486)	AAW6481 (12.14)	<i>Cheumatopsyche amurensis</i>
<i>Aethaloptera sempunctata</i> (2)	AsexBK	<i>Aethaloptera sempunctata</i> (ADI6236)	AAD9193 (14.21)	<i>Aethaloptera dispar</i>
<i>Macrostemum dione</i> (2)	MspBK	No match	AAF7513 (15.31)	<i>Macrostemum fenestratum</i>
Chaiyaphum: CP1				
<i>Aethaloptera sempunctata</i> (1)	AsexCP1	<i>Aethaloptera sempunctata</i> (ADI6236)	AAD9193 (14.21)	<i>Aethaloptera dispar</i>
Chaiyaphum: CP2				
<i>Ecnomus mammus</i> (12)	EmaCP2	No match	ADF0950 (16.25)	<i>Ecnomus</i> sp. EJ4
<i>Ecnomus obtusus</i> (11)	EobCP2	No match	AAZ5014 (11.46)	<i>Ecnomus</i> sp.
Mukdahan: MD				
<i>Cheumatopsyche schwendingeri</i> (4)	CschMD	<i>Cheumatopsyche</i> XZ sp. CN16 (AAW6486)	AAW6481 (11.96)	<i>Cheumatopsyche amurensis</i>

4.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรม

ความแปรผันภายในสปีชีส์ *Ecnomus obtusus* มีค่าน้อยที่สุด (0%) และมากที่สุดภายในสปีชีส์ *Dipsuedopsis robustior andamanensis* (8%) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลมาวิเคราะห์ร่วม พบว่า *Cheumatopsyche lucida* (14.41%) และ *Triplectides indicus* (13.43%) มีค่า intraspecific genetic divergent ที่เพิ่มมากขึ้นมาก ขณะที่ *Oecetis bengalica* และ

Oecetis biramosa เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล พบว่าค่า intraspecific genetic divergent มีค่ามากขึ้นเล็กน้อย (ตารางที่ 6)

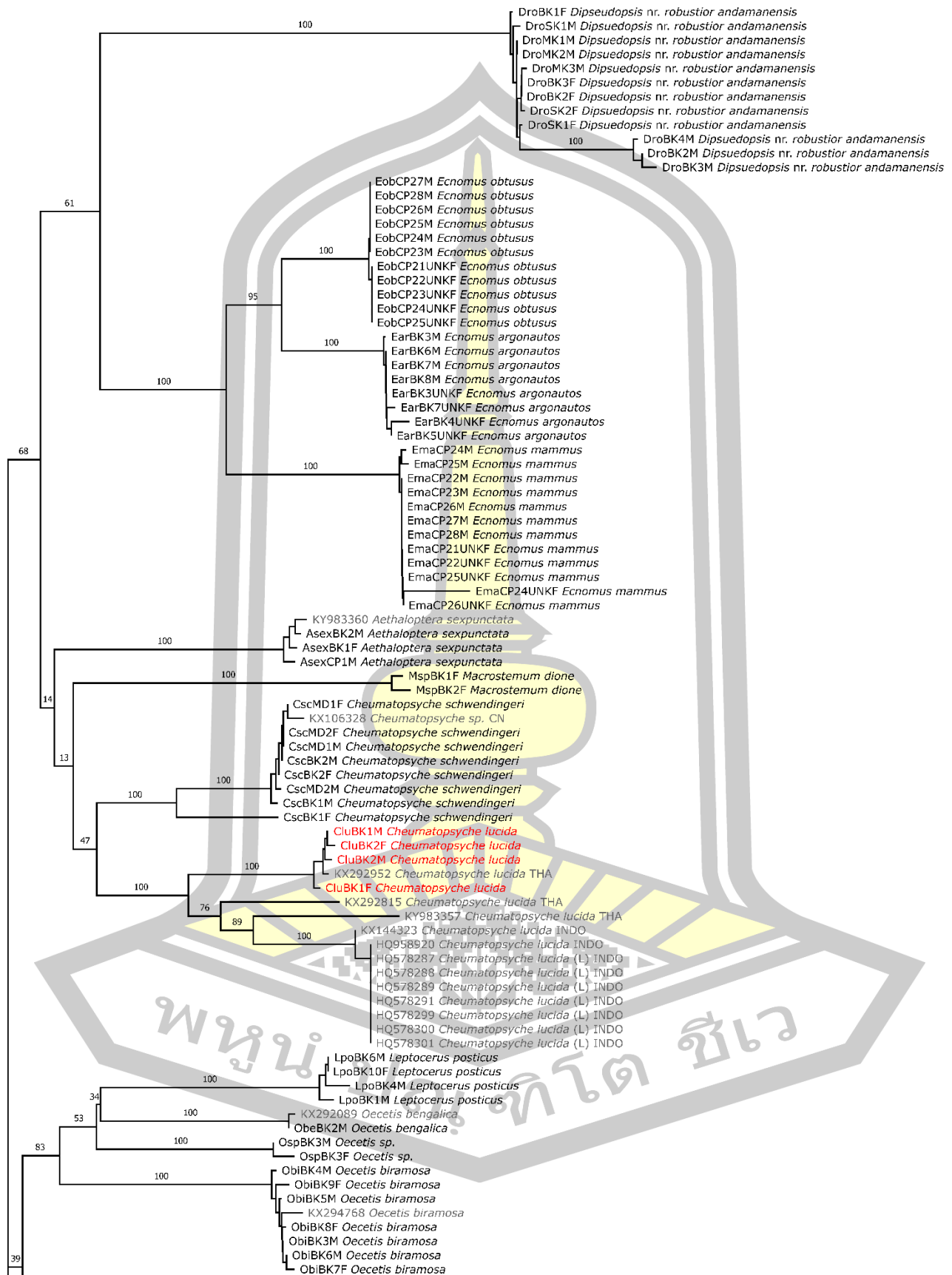
ตารางที่ 6 ค่า Minimum และ Maximum intraspecific genetic divergent และการระบุสปีชีส์ โดยใช้ฐานข้อมูล BOLD systems

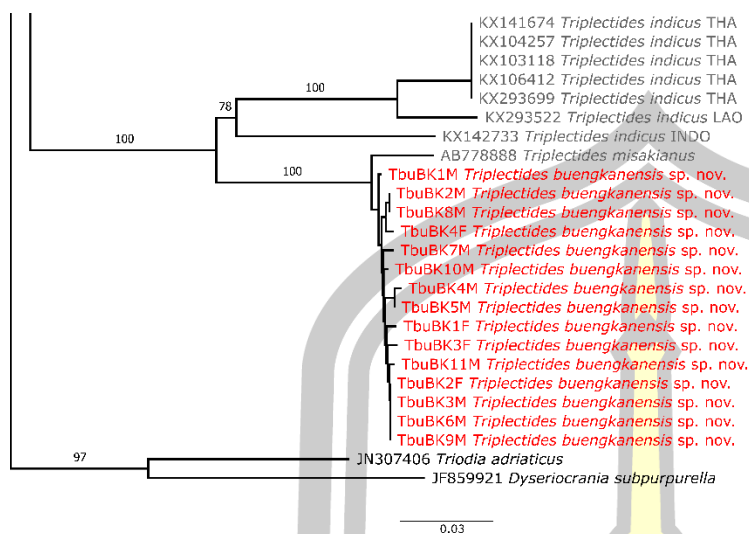
Family/ Species	Min. – Max. p-distance (%) (this study) (n)	Min. – Max. p-distance (included public data) (n)	BOLD identification
Dipseudopsidae			
<i>Dipseudopsis</i> nr. <i>robustior</i>	0 – 8 (12)	No record	No match
<i>andamanensis</i>			
Hydropsychidae			
<i>Cheumatopsyche lucida</i>	0.36 – 1.09 (4)	0 – 14.41 (16)	<i>C. cognita/C. lucida</i>
<i>Cheumatopsyche</i>	0 – 2.36 (8)	No record	<i>Cheumatopsyche</i>
<i>schwendingeri</i>			XZ sp. CN16
<i>Macrostemum dione</i>	1.27 (2)	No record	No match
<i>Aethaloptera sexpunctata</i>	0.54 – 1.45 (3)	0.54 – 1.45 (4)	<i>A. sexpunctata</i>
Ecnomidae			
<i>Ecnomus argonautos</i>	0 – 1.99 (8)	No record	No match
<i>Ecnomus mammus</i>	0 – 3.08 (12)	No record	No match
<i>Ecnomus obtusus</i>	0 (11)	No record	No match
Leptoceridae			
<i>Leptocerus posticus</i>	0 – 1.45 (4)	No record	No match
<i>Oecetis bengalica</i>	NA (1)	0.18 (2)	<i>O. bengalica</i>
<i>Oecetis biramosa</i>	0.18 – 1.09 (7)	0.18 – 1.63 (8)	No match
<i>Oecetis</i> sp.	0.18 (2)	No record	No match
<i>Triplectides</i>	0 – 1.09 (15)	0 – 13.43% (22)	No match
<i>buengkanensis</i> sp. nov.			

4.4 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างด้วยวิธีการ Neighbor-joining จากนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) จากการศึกษา 89 ร่วมกับ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากฐานข้อมูล GenBank พบว่า ทั้ง 13 สปีชีส์ จัดอยู่เป็นกลุ่ม monophyletic group (ภาพที่ 26) แต่มีความแตกต่างกันภายในสปีชีส์ *Dipseudopsis* nr. *robustior andamanensis* มีความแปรผันภายในสปีชีส์สูง ตัวเต็มวัยเพศเมียจาก จังหวัดบึงกาฬ (BK) มีการแยกสายวิวัฒนาการกับเพศผู้ และรวมกลุ่มกับตัวอย่างจาก จังหวัดสกลนคร (SK) และจังหวัดมหาสารคาม (MK) *Cheumatopsyche lucida* ที่มีการแยกเป็น 4 สายวิวัฒนาการ โดยที่ตัวอย่างจากการศึกษานี้อยู่ร่วมสายวิวัฒนาการเดียวกันกับตัวอย่างจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน ประเทศไทย (KX292952) ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูลโดย Zhou et al. ในปี 2016 อีก 3 สายวิวัฒนาการประกอบไปด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ (1) ตัวอย่างจากจังหวัดน่าน ประเทศไทย (KX292815) (2) ตัวอย่างจากประเทศไทย (KY983357) และ (3) ประเทศอินโดนีเซีย (HQ578301, HQ578300, HQ578299, HQ578291, HQ578289, HQ578288, HQ578287) ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูลโดย Zhou et al. ในปี 2016 และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0 – 14.41% และสปีชีส์ *Triplectides Indicus* แยกออกเป็น 3 สายวิวัฒนาการ โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Triplectides* nr. *Indicus* (15 sequences) ในการศึกษาครั้งนี้ แยกสายวิวัฒนาการออกจาก ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์ร่วม สายวิวัฒนาการของ *T. Indicus* จากฐานข้อมูล ประกอบด้วย (1) ตัวอย่างจากประเทศอินโดนีเซีย (KX142733) และ (2) ตัวอย่างจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน (KX141674, KX103118, KX106412) และตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย (KX293699) อยู่ร่วมสายวิวัฒนาการกับตัวอย่างจากประเทศลาว (KX293522) และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ระหว่าง 0 – 13.86%







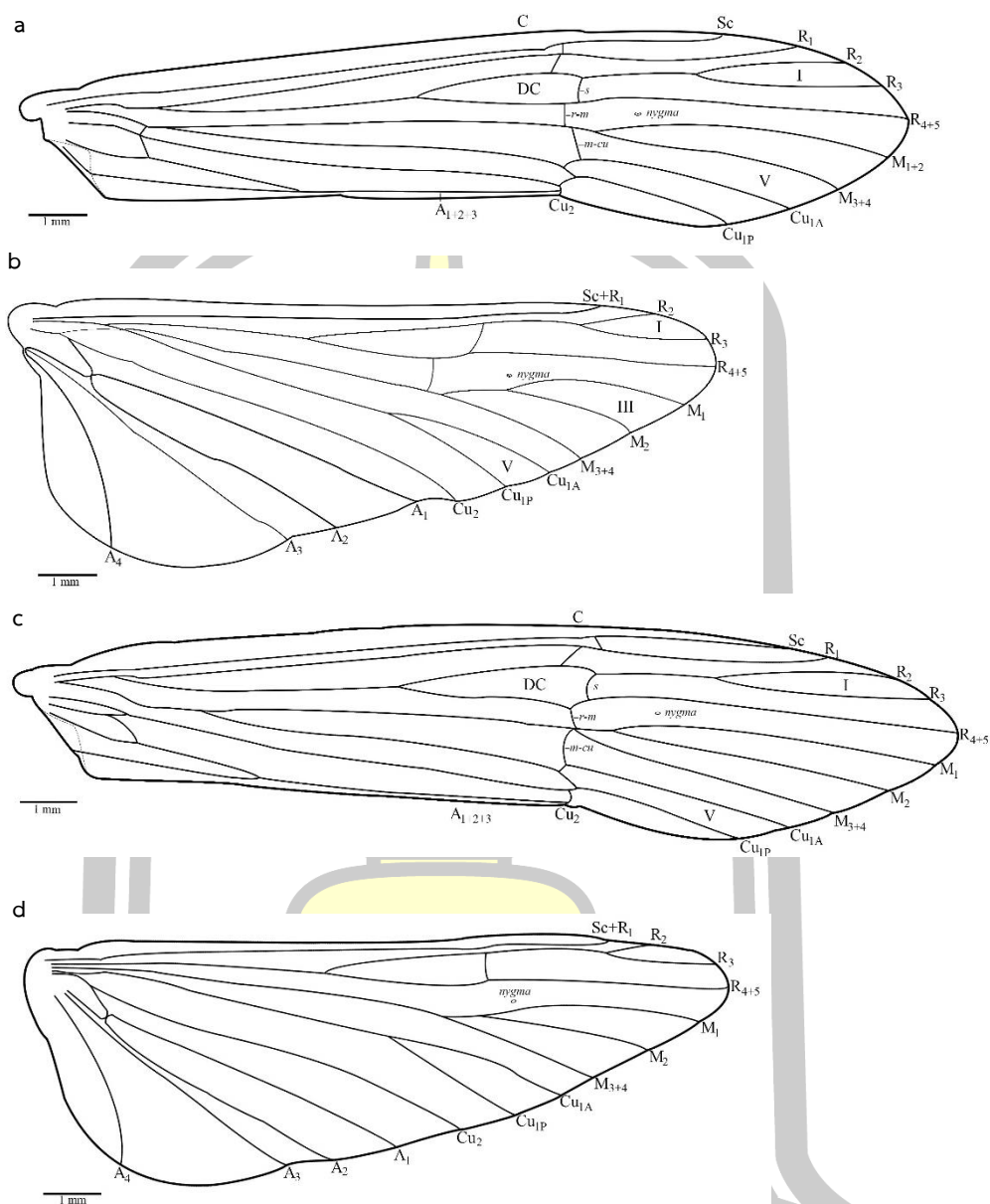
ภาพที่ 26 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Neighbor-joining) จาก 115 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก 13 สปีชีส์ ใน การศึกษาครั้งนี้ (สีดำและแดง) ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล Genbank (สีเทา) (Bootstrapping 1000 ซ้ำ)

4.5 การเขียนบรรยายลักษณะของสปีชีส์ *Triplectides buengkanensis* sp. nov.



ภาพที่ 27 ตัวเต็มวัยของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov; (a) เพศผู้, (b) เพศเมีย; scale bars = 2 mm





ภาพที่ 28 ปีกนอกและปีกในของสปีชีส์ *Triplectides buengkanensis* sp. nov.; (a) ปีกนอกตัวเต็มวัยเพศผู้, (b) ปีกในตัวเต็มวัยเพศผู้, (c) ปีกนอกตัวเต็มวัยเพศเมีย, (d) ปีกในตัวเต็มวัยเพศเมีย; scale bars = 1 mm; abbreviation: DC = discoidal cell, C = costal vein, Sc = subcostal vein, R = radial vein, M = median vein, Cu = cubital vein, A = anal vein, s = sectoral crossvein, r-m = radial-medial crossvein, m-cu = median-cubital crossvein, nygma = opaque thickened spot in membrane

Species description

Triplectides buengkanensis sp. nov.

Diagnosis (ภาพที่ 22)

อวัยวะเพศผู้ของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov. มีความคล้ายคลึงกับ *Triplectides indicus* Walker, 1852 (Malicky, 2010) *Triplectides misakianus* Matsumura, 1931 (Kuranishi, 1999) จากประเทศญี่ปุ่นและ *Triplectides nessimiani* Desdério & Pes, (Desério and Pes, 2020) จากประเทศบราซิล ส่วน inferior appendages ของทุกสปีชีส์ข้างต้นมีส่วนฐานที่ใหญ่ จนถึง ครึ่งหนึ่งของความยาวของแผ่นคลุมด้านหลังปล้องที่ 10 (มุมมองด้านข้างของลำตัว) และลดรูปลง จนมีลักษณะเรียวยาว มี setae ยาวปกคลุมที่ส่วนปลาย แต่ *T. buengkanensis* sp. nov. มี apicodorsal lobe ของ inferior appendages ที่เรียวเล็กกว่า *T. indicus*, *T. misakianus* และ *T. nessimiani* ส่วนปลายมีลักษณะคล้ายรูปหยดน้ำ (จากทางด้านข้าง) และ *T. buengkanensis* sp. nov. มีส่วนรยางค์ปล้องที่สอง (2nd article) ของ inferior appendages ที่เป็นปลายแหลม และโค้งเข้าหาจุดกึ่งกลาง จนกระทั่งเข้าไปซ้อนหน้าพื้นผิวของแผ่นคลุมด้านหลังปล้องที่ 10 หากมองจากทางด้านท้อง ต่างจากสปีชีส์ *T. misakianus* และ *T. nessimiani* และ preanal appendages ที่เรียว ยาวเท่ากับ 3/4 ของ แผ่นคลุมด้านหลังปล้องที่ 10 ต่างจาก *T. indicus* ที่สั้นกว่าครึ่งหนึ่งของแผ่นคลุมด้านหลังปล้องที่ 10

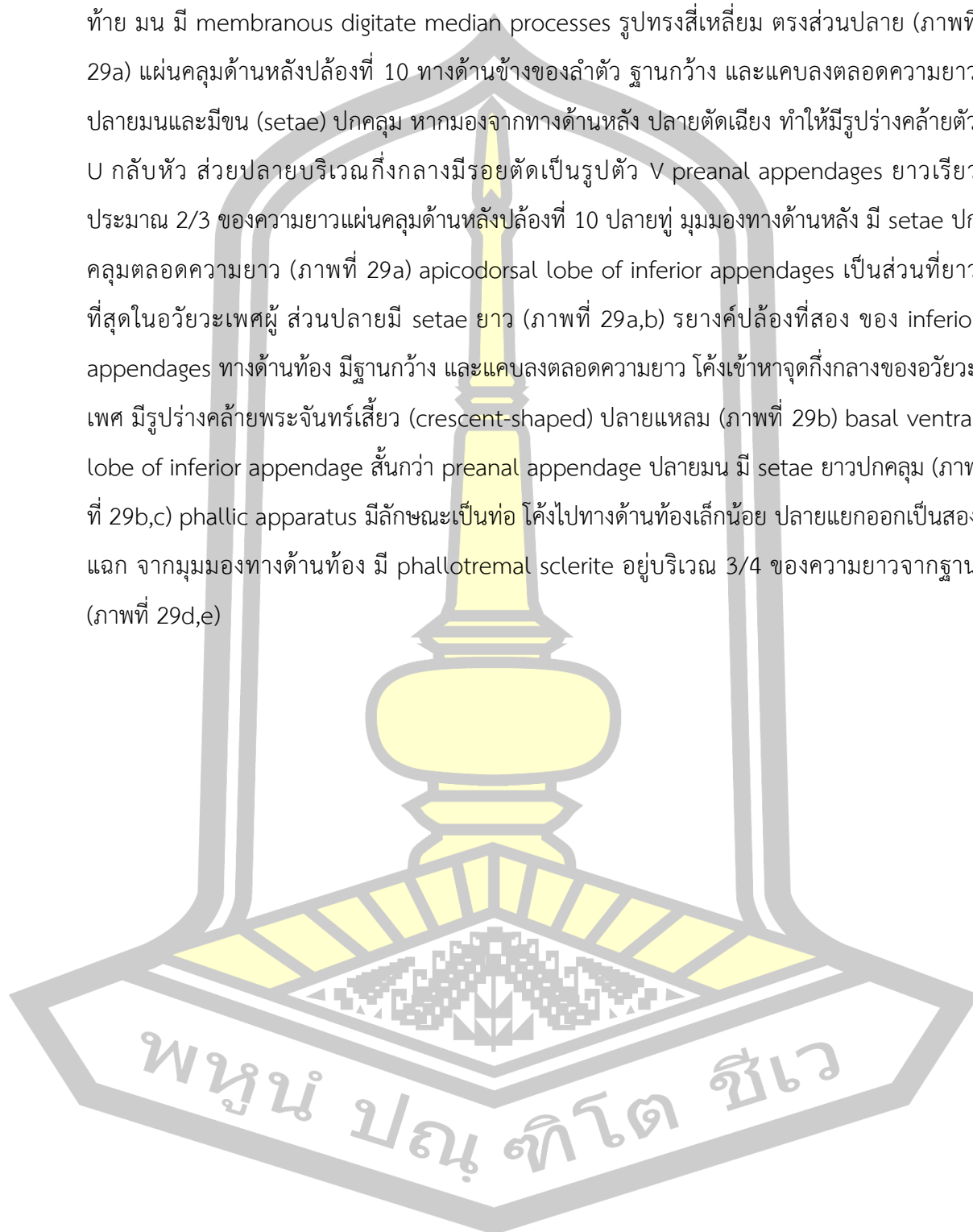
Description (ภาพที่ 27)

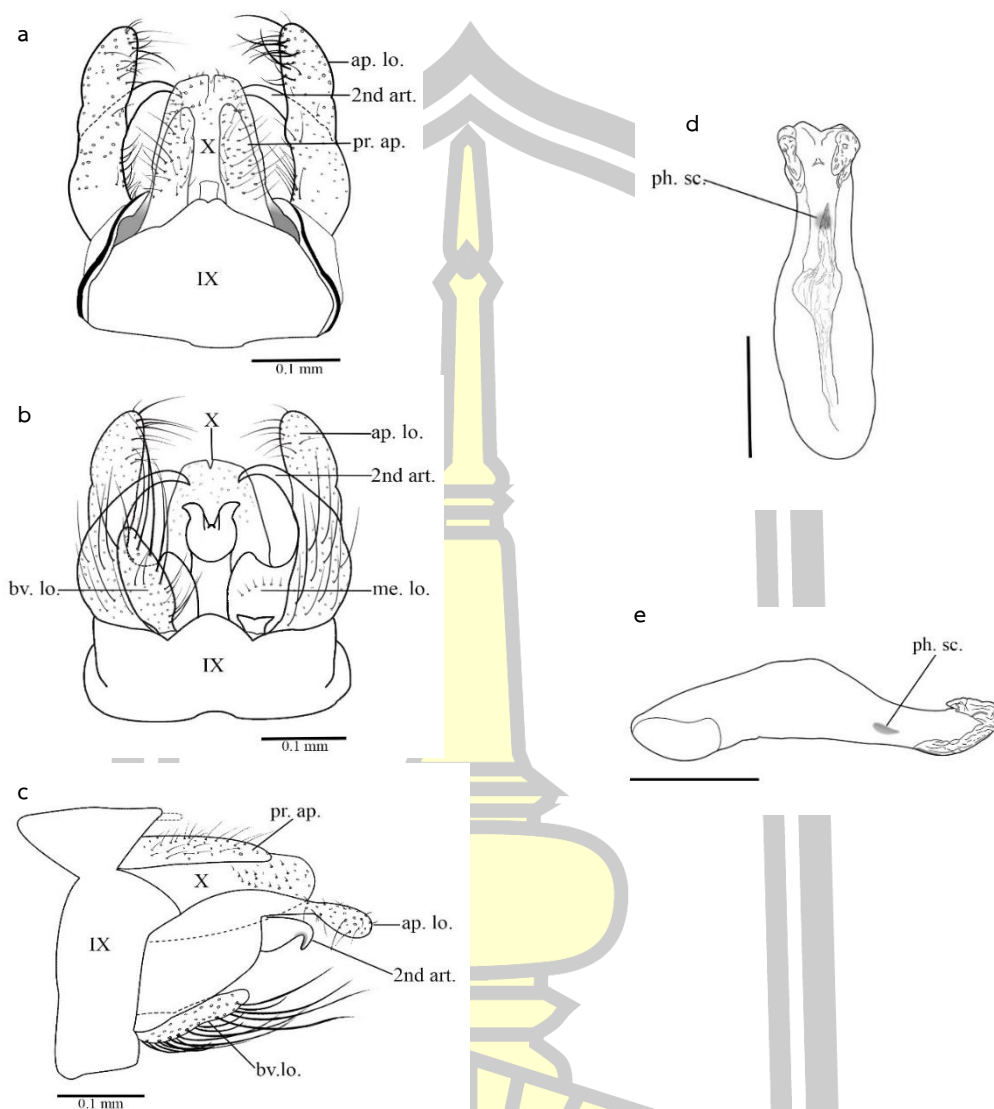
ส่วนหัวและปล้องอก มีสีเหลืองเข้ม-น้ำตาล ปล้องท้องเป็นสีเหลืองอ่อน เพศเมียมีสีเข้มกว่าเพศผู้ ความยาวของลำตัวเพศผู้ประมาณ 7.5 – 9 มิลลิเมตร (n=12) เพศเมียลำตัวยาวประมาณ 8 – 11 มิลลิเมตร (n=11) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่มีตาเดี่ยว (ocelli) antenna มีความยืดหยุ่น ยาวประมาณ 2 เท่าของลำตัว (ขณะปักแนบลำตัว) ขามีสีน้ำตาล – เหลือง มีจำนวน tibial spur บนขาคู่หน้า กลางและหลังจำนวน 2-2-2 ตามลำดับ maxillary pulp มี 5 ปล้อง มีขน (setae) ปกคลุมหนาแน่น โดยเฉพาะปล้องที่ 1-3 ปล้องที่ 4-5 มีเล็กน้อย ปีกนอกของเพศผู้ยาวประมาณ 11 - 12.5 มิลลิเมตร ปีกนอกของเพศเมียยาวประมาณ

Male genitalia (ภาพที่ 29)

ปล้องท้องที่ 9 คล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้า (subrectangular shape) มุมมองจากทางด้านข้างของลำตัว (ภาพที่ 29c) จากมุมมองทางด้านหลัง มีการเว้าของ sclerotize ทำให้มีลักษณะคล้าย

สามเหลี่ยม (subtriangular shape) มุมมองจากด้านหลังของแผ่นคลุมด้านหลังปล้องที่ 9 ขอบด้านท้าย มน มี membranous digitate median processes รูปทรงสี่เหลี่ยม ตรงส่วนปลาย (ภาพที่ 29a) แผ่นคลุมด้านหลังปล้องที่ 10 ทางด้านข้างของลำตัว ฐานกว้าง และแคบลงตลอดความยาว ปลายมนและมีขน (setae) ปกคลุม หากมองจากทางด้านหลัง ปลายตัดเฉียง ทำให้มีรูปร่างคล้ายตัว U กลับหัว ส่วนปลายบริเวณกึ่งกลางมีรอยตัดเป็นรูปตัว V preanal appendages ยาวเรียว ประมาณ $\frac{2}{3}$ ของความยาวแผ่นคลุมด้านหลังปล้องที่ 10 ปลายทู่ มุมมองทางด้านหลัง มี setae ปกคลุมตลอดความยาว (ภาพที่ 29a) apicodorsal lobe of inferior appendages เป็นส่วนที่ยาวที่สุดในอวัยวะเพศผู้ ส่วนปลายมี setae ยาว (ภาพที่ 29a,b) รยางค์ปล้องที่สอง ของ inferior appendages ทางด้านท้อง มีฐานกว้าง และแคบลงตลอดความยาว โค้งเข้าหาจุดกึ่งกลางของอวัยวะเพศ มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent-shaped) ปลายแหลม (ภาพที่ 29b) basal ventral lobe of inferior appendage สั้นกว่า preanal appendage ปลายมน มี setae ยาวปกคลุม (ภาพที่ 29b,c) phallic apparatus มีลักษณะเป็นท่อ โค้งไปทางด้านท้องเล็กน้อย ปลายแยกออกเป็นสอง แฉก จากมุมมองทางด้านท้อง มี phallotremal sclerite อยู่บริเวณ $\frac{3}{4}$ ของความยาวจากฐาน (ภาพที่ 29d,e)

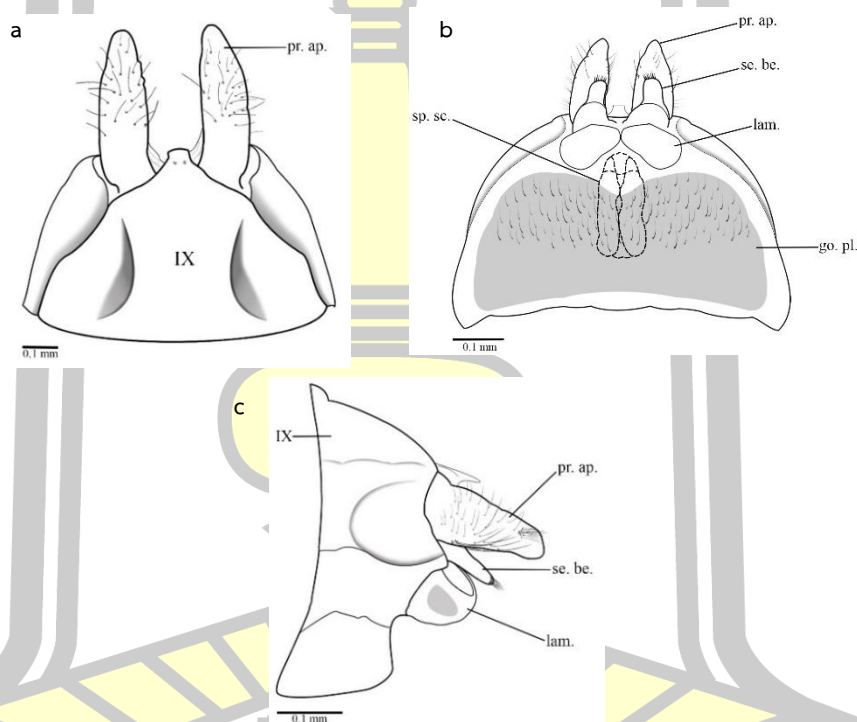




ภาพที่ 29 ภาพวาดอวัยวะเพศผู้ของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov.; (a) dorsal view, (b) ventral view, (c) lateral view, (d) phallic apparatus (dorsal view), (e) phallic apparatus (lateral view); scale bars = 0.1 mm; abbreviation: ap. lo. = apicodorsal lobe, IX= segment IX, X= segment X, bv. lo. = basoventral lobe, me. lo. = mesal lobe, ph. sc. = phallotremal sclerite, pr. ap. = preanal appendages, 2nd art. = second article

Female genitalia (ภาพที่ 30)

แผ่นคลุมด้านหลังของปล้องท้องที่ 9 ลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปลายทั้ง 2 ด้านเว้าเป็นลักษณะคล้ายครึ่งวงกลม (ด้านข้างลำตัว) (ภาพที่ 30c) จากทางด้านหลัง ลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยมและมี papillae เล็กๆ (ภาพที่ 30a) ที่ส่วนปลาย preanal appendages ยาว ปลายมน มี setae ปกคลุม sensilla-bearing process ยาวประมาณ 3/4 ของ preanal appendage ปลายหยัก และมี setae 6-7 เส้น (ภาพที่ 30b) lamellae เป็นรูปคล้ายทรงกลม (semicircular) (ด้านข้างลำตัว) (ภาพที่ 30c) gonopod plate และ spermatheca คล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้า แต่ปลายทั้งด้าน anterior และส่วนท้ายของ spermatheca มน (ทางด้านท้อง)



ภาพที่ 30 อวัยวะเพศเมียของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov.; (a) ventral view, (b) lateral view, (c) dorsal view; scale bars= 0.1 mm; abbreviation: IX = segment IX, pr. ap. = preanal appendage, sp. sc. = spermathecal sclerite, se. be. = sensilla-bearing process, lam. = lamella, go. pl. = gonopod plate

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 แหล่งที่อยู่อาศัย (habitat)

แมลงหนอนปลอกน้ำวงศ์ Hydropsychidae มีความหลากหลายชนิดมากที่สุดในประเทศไทย (Malicky 2010; Laudee & Prommi, 2016) มีการระบุสปีชีส์ไว้ 120 สปีชีส์ ในประเทศไทย (Malicky 2010) ตัวอ่อนอาศัยในแหล่งน้ำไหล ปลาเปิดช่องปลอกมีตาข่าย เพื่อใช้ในการดักจับซากอินทรีย์ (Wiggins, 1996, Uy-Yabut et al., 2018) ในการศึกษาครั้งนี้พบ แมลงหนอนปลอกน้ำ วงศ์ย่อย Macronematinae อาศัยในแหล่งน้ำไหลช้า สกุล *Macrostemum* ที่สร้างปลอกจากทรายและเส้นไหม ภายในปลอกมีตาข่ายที่ใช้ดักอินทรีย์วัตถุขนาดเล็ก ปลอกติดอยู่กับหิน ขวางทางน้ำไหล (Wiggins, 1996) และสกุล *Aethaloptera* ที่อาศัยในแหล่งน้ำไหลช้าเช่นกัน วงศ์ย่อย Hydropsychinae พบสกุล *Chemathopsyche* ที่อาศัยในแหล่งน้ำไหลช้า (Wiggins, 1996) การพบแมลงหนอนปลอกน้ำวงศ์ Hydropsychidae ในพื้นที่ศึกษาบึงโขงหลง จังหวัดบึงกาฬ (BK) ซึ่งเป็นแหล่งน้ำนิ่ง แต่เนื่องจากเป็นแหล่งน้ำนิ่งขนาดใหญ่และมีการสัญจรของเรืออยู่เป็นประจำ ทำให้บึงโขงหลงมีลักษณะคล้ายแหล่งน้ำไหลช้า และบึงโขงหลงเป็นแหล่งน้ำขนาดใหญ่ที่เชื่อมต่อกับแหล่งน้ำไหล มีห้วยน้ำเมาและห้วยบังอี่ เชื่อมโยงกับบึงโขงหลง และมีประตูระบายน้ำจากบึงโขงหลงสู่แม่น้ำสงครามซึ่งไหลลงสู่แม่น้ำโขงอีกต่อหนึ่ง (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2545) ทั้งนี้ *Aethaloptera sexpunctata* Kolenati, 1859 ที่พบในพื้นที่ศึกษา อ.จตุรัส จังหวัดชัยภูมิ (CP1) ซึ่งเป็นแหล่งน้ำนิ่งนั้น กับดักแสงไฟอาจดักตัวเต็มวัยที่ฟักออกจากกระยะดักแด่ จากแม่น้ำชี ที่อยู่ห่างกันประมาณ 100 เมตร

แมลงหนอนปลอกน้ำที่ตัวอ่อนอาศัยในแหล่งน้ำนิ่ง ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ วงศ์ Leptoceridae สกุล *Leptocerus* อาศัยในแหล่งน้ำนิ่ง มีลักษณะพิเศษของขาคู่หลัง ที่มี setae ปกคลุมหนาแน่น ช่วยในการว่ายน้ำ (Wiggins, 1996) สกุล *Oecetis* (Wiggins, 1996; Quinteiro & Calor 2012) และ *Triplectides* (Holzenthal & Calor, 2017) พบได้ทั้งในแหล่งน้ำไหลและน้ำนิ่ง วงศ์ Leptoceridae พบในพื้นที่ศึกษาบึงโขงหลง จังหวัดบึงกาฬ (BK)

วงศ์ Ecnomidae สกุล *Ecnomus* สร้างปลอกโดยใช้เส้นไหม เชื่อมเม็ดทรายเข้าด้วยกัน ปลอกติดกับหิน ไม้หรือพืชใต้น้ำ (submerged plant) สามารถพบได้ทั้งในแหล่งน้ำไหลและน้ำนิ่ง (Holzenthal & Calor, 2017) พบในพื้นที่ศึกษาบึงโขงหลง (BK) และหนองเชียงสา จังหวัดชัยภูมิ

(CP2) สปีชีส์เด่น คือ *Ecnomus argonautos* Laudee & Malicky, 1999 และ *Ecnomus obtusus* Ulmer, 1910 ตามลำดับ

วงศ์ Dipseudopsidae สกุล *Dipseudopsis* สร้างปลอกโดยใช้ทรายและโคลน พบได้ทั้งแหล่งน้ำไหลและน้ำนิ่ง (Weaver & Malicky, 1994) ในพื้นที่ศึกษา บ้านแห่ อ.กันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (MK) และ อ.วาริชภูมิ จังหวัดสกลนคร (SK) ได้ทำการวางกับดักแสงไฟไว้ข้างบ่อเลี้ยงปลา พบแมลงหนอนปลอกน้ำสกุล *Dipseudopsis* 6 และ 29 ตัวอย่าง ตามลำดับ แต่พื้นที่ศึกษาในจังหวัดสกลนคร (SK) นั้นอยู่ใกล้คลองปลาหาง ประมาณ 150 เมตร ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่า *Dipseudopsis* nr. *robustior andamanensis* อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนิ่งหรือน้ำไหล ทั้งนี้อาจต้องเก็บตัวอย่างตัวอ่อนเพื่อทำการยืนยันรูปแบบของแหล่งที่อยู่อาศัยของตัวอ่อน

5.2 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและการค้นพบสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species)

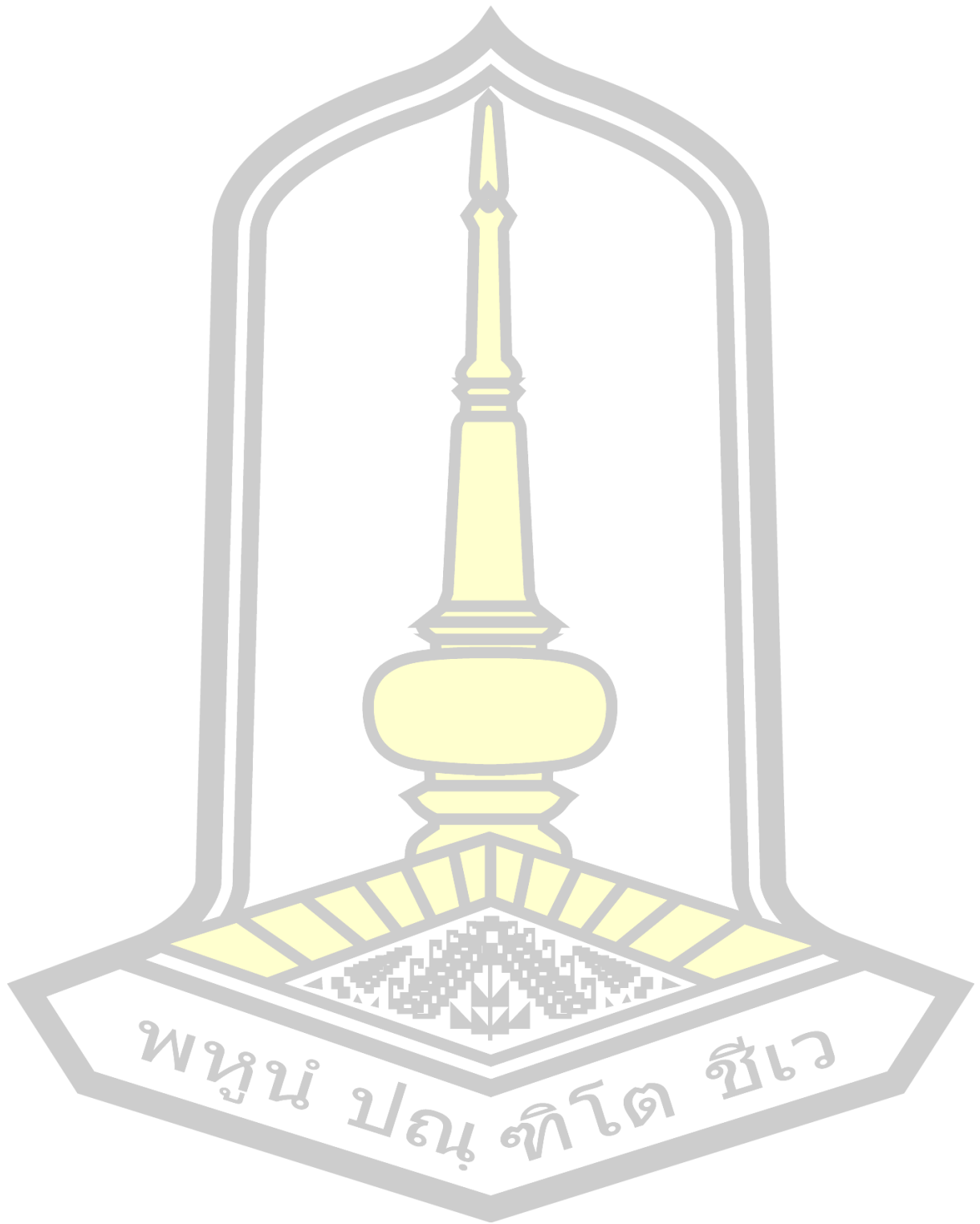
แมลงหนอนปลอกน้ำ *Triplectides buengkanensis* sp. nov. ในการศึกษาครั้งนี้ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจาก *Triplectides indicus* Walker, 1852 ที่เคยรายงานไว้ หลังจากวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า สายวิวัฒนาการของ *Triplectides buengkanensis* sp. nov. แยกออกจาก *Triplectides indicus* จากภาคเหนือ ในประเทศไทย ลาว และอินโดนีเซีย โดยมีค่า bootstrap support 100% และค่า intraspecific genetic divergent จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank มาวิเคราะห์ร่วม ทำให้มีค่ามากถึง 13.43% เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Graf et al., (2015) พบว่าแมลงหนอนปลอกน้ำ สกุล *Anisogamus* มีค่า intraspecific genetic divergent อยู่ระหว่าง 0.2 - 1%, 0 - 9% (Zhou et al., 2007), 5.9% (Paul et al., 2010), 0 - 3% (Kučinić et al., 2016) และ 0.2 - 1.7% (Kučinić et al., 2020) และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า interspecific divergence จากการศึกษาของ Johanson, (2007) มีค่าอยู่ระหว่าง 8.06 - 15.65%, 8.05 - 21.7% ระหว่างสปีชีส์ภายในสกุล *Smicridea* (Paul et al., 2010), สกุล *Anisogamus* 8.2% (Graf et al., 2015), สกุล *Tinodes* 10 - 24% (Kučinić et al., 2016) และ สกุล *Triaenodes* 10.6% (Kučinić et al., 2020b) ซึ่งให้เห็นว่า สปีชีส์ *T. buengkanensis* sp. nov. และ *T. indicus* นั้นมีความสัมพันธ์กันแบบ interspecific divergence ประกอบกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างจากสปีชีส์ *T. indicus* และสปีชีส์ใกล้เคียง สามารถกล่าวได้ว่า สปีชีส์ *Triplectides buengkanensis* sp. nov. เป็นสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species)

จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความแตกต่างทางพันธุกรรม พบว่าสปีชีส์ *Cheumatopsyche lucida* Ulmer, 1907 และ *Dipseudopsis* nr. *robustior andamanensis* มีการแยกสายวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ เป็น 3 กลุ่ม และ 2 กลุ่ม ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ 14.41% และ 8% ตามลำดับ ซึ่งมีความมากกว่าค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ ที่กล่าวมาข้างต้น แต่ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในฐานข้อมูลของ *C. lucida* ในฐานข้อมูล BOLD systems ไม่ได้มีการระบุลักษณะของตัวอย่างไว้ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากการศึกษาครั้งนี้ได้ และสปีชีส์ *D. nr. r. andamanensis* ที่มีลักษณะคล้ายกับ 2 สปีชีส์ภายในสกุลเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากความแปรผันของลักษณะภายในสปีชีส์ ทั้งนี้ ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ สกุล *Dipseudopsis* มีเพียง 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก 6 สปีชีส์ จากการระบุสปีชีส์ โดยใช้ BOLD identification engine พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างจาก *D. infuscata* McLachlan, 1875 สปีชีส์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปีกและอวัยวะเพศผู้แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ถึง 8.87 - 11.54%

การเลือกใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ยีนไมโทคอนเดรียตำแหน่งยีน COI ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถช่วยในการจัดจำแนกสปีชีส์ได้เป็นอย่างดี (Zhou et al., 2007; Kučinić et al., 2016; Kučinić et al., 2020; Barcelos-Silva et al., 2018; Pauls et al., 2010) และเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำให้พบสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species) *Triplectides buengkanensis* sp. nov. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำในประเทศไทย ยังคงพบสปีชีส์ที่น่าสนใจ โดยเฉพาะในแหล่งน้ำนิ่ง ยังคงมีอีกหลายพื้นที่ที่ยังไม่มีการสำรวจ และสปีชีส์ที่มีความแปรผันภายในสปีชีส์สูง *Cheumatopsyche lucida* และ *Dipseudopsis* nr. *robustior andamanensis* ที่ต้องมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไปในอนาคต เพื่อกำหนดขอบเขตของสปีชีส์ใหม่อีกครั้ง

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงหนอนปลอกน้ำในประเทศไทย ยังคงพบสปีชีส์ที่น่าสนใจ โดยเฉพาะในแหล่งน้ำนิ่ง ยังคงมีอีกหลายพื้นที่ที่ยังไม่มีการสำรวจ และสปีชีส์ *C. lucida* และ *D. nr. r. andamanensis* ที่ต้องมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไปในอนาคต เพื่อกำหนดขอบเขตของสปีชีส์ใหม่อีกครั้ง

บรรณานุกรม



- Ab Hamid, S. & MD Rawi, C. (2017). Application of aquatic insects (Ephemeroptera, plecoptera and trichoptera) in water quality assessment of Malaysian headwater. *Tropical Life Sciences Research*, 28(2), 143–162. <https://doi.org/10.21315/tlsr2017.28.2.11>
- Armitage, P. D., Moss, D., Wright, J. F., & Furse, M. T. (1983). The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Res*, 17(3), 333–347.
- Barcelos-Silva, P., Pes, A. M., Andrade-Souza, V., & Holzenthal, R. W. (2018). Associating larvae and adults of the Neotropical caddisfly genus *Synoestropsis* Ulmer (Trichoptera: Hydropsychidae) using morphology and DNA mitochondrial sequences. *Zoologischer Anzeiger*, 277, 169–189. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2018.08.002>
- Barrett, R. D. H., & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83(3), 481–491. <https://doi.org/10.1139/z05-024>
- Bonada, N., Prat, N., Resh, V. H., & Statzner, B. (2006). Developments in aquatic insect biomonitoring: A comparative analysis of recent approaches. *Annual Review of Entomology*, 51, 495–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151124>
- Boonsoong, B., Sangpradub, N., & Barbour, M. T. (2009). Development of rapid bioassessment approaches using benthic macroinvertebrates for Thai streams. *Environmental Monitoring and Assessment*, 155(1–4), 129–147. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0423-2>
- Borisenko, A. V., Sones, J. E., & Hebert, P. D. N. (2009). The front-end logistics of DNA barcoding: Challenges and prospects. *Molecular Ecology Resources*, 9(SUPPL. 1), 27–34. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02629.x>
- De Moor, F. C., & Ivanov, V. D. (2008). Global diversity of caddisflies (Trichoptera: Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 393–407. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9113-2>

- Desidério, G. R., Pes, A. M., Barcelos-Silva, P., & Hamada, N. (2020). *Triplectides* Kolenati (Trichoptera: Leptoceridae) from Brazil: A new species, new records and an identification key. *European Journal of Taxonomy*, (677). <https://doi.org/10.5852/ejt.2020.677>
- Dolédec, S., & Statzner, B. (2008). Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: An assessment of specific types of human impact. *Freshwater Biology*, 53(3), 617–634. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01924.x>
- Erasmus, D. J., Yurkowski, E. A., & Huber, D. P. W. (2018). DNA barcode-based survey of Trichoptera in the Crooked River reveals three new species records for British Columbia. *PeerJ*, 6. <https://doi.org/10.7717/peerj.4221>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Genco, M. S., Morse, J. C., Caterino, M. S., Murray-Stoker, K. M., & Pham, T. H. (2020). Larvae and adults of Vietnamese species of *Drepanocentron* and *Hydromanicus* (Trichoptera: Xiphocentronidae, Hydropsychidae). *Zoosymposia*, 18(1), 72–92. <https://doi.org/10.11646/zoosymposia.18.1.11>
- Geraci, C. J., Al-Saffar, M. A., & Zhou, X. (2011). DNA barcoding facilitates description of unknown faunas: A case study on Trichoptera in the headwaters of the Tigris River, Iraq. *Journal of the North American Benthological Society*, 30(1), 163–173. <https://doi.org/10.1899/10-011.1>
- Graf, W., Vitecek, S., Previšić, A. & Malicky, H. (2015) New species of Limnephilidae (Insecta: Trichoptera) from Europe: Alps and Pyrenees as harbours of unknown biodiversity. *Zootaxa*, 3911 (3), 381–395. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3911.3.5>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270 (1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & DeWaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817.
- Hjalmarsson, A. E., Graf, W., Jähnig, S. C., Vitecek, S., & Pauls, S. U. (2018). Molecular association and morphological characterisation of *himalopsyche* larval types (Trichoptera, Rhyacophilidae). *ZooKeys*, 773, 79–108. <https://doi.org/10.3897/zookeys.773.24319>
- Hüllen, S., Mandl, C., Geiger, M. F., Hadiaty, R. K., Wahyudewantoro, G., Ziegler, T., & Herder, F. (2021). On the challenge to correctly identify Rasboras (Teleostei: Cyprinidae: Danioninae) inhabiting the Mesangat Wetlands, East Kalimantan, Indonesia. *Diversity*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/d13010008>
- Hogg, I. D., Smith, B. J., Banks, J. C., Dewaard, J. R., & Hebert, P. D. N. (2009). Testing use of mitochondrial COI sequences for the identification and phylogenetic analysis of New Zealand caddisflies (Trichoptera). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 43(5), 1137–1146. <https://doi.org/10.1080/00288330.2009.9626536>
- Holzenthal, R. & Calor, A. (2017). Catalog of the Neotropical Trichoptera (Caddisflies). *ZooKeys*, 654, 1-566. <https://doi.org/10.3897/zookeys.654.9516>.
- Johanson, K. A. (2007). Association and description of males, females and larvae of two New Caledonian *Xanthochorema* species (Trichoptera: Hydrobiosidae) based on mitochondrial 16S and COI sequences. *Entomological Science*, 10(2), 179–199. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2007.00212.x>
- Katsuma, N. & Kuranishi, R. (2016). Redescription of *Triplectides misakianus* (Matsumura 1931) (Trichoptera, Leptoceridae) in Japan with notes on its habitat. *Zoosymposia*, 10, 234-242. [10.11646/zoosymposia.10.1.21](https://doi.org/10.11646/zoosymposia.10.1.21).

- Kilian, I. C., Espeland, M., Mey, W., Wowor, D., Hadiaty, R. K., von Rintelen, T., & Herder, F. (2022). DNA barcoding unveils a high diversity of caddisflies (Trichoptera) in the Mount Halimun Salak National Park (West Java; Indonesia). *PeerJ*, 10. <https://doi.org/10.7717/peerj.14182>
- Kjer, K. M., Blahnik, R. J., & Holzenthal, R. W. (2001). Phylogeny of Trichoptera (Caddisies): Characterization of Signal and Noise Within Multiple Datasets. *Syst. Biol.*, 50(6), 781–816.
- Kučinić, M., Cukusic, A., Podnar, M., Landeka, M., Plavec, H., Plantak, M., Akimbekova, N. & Žalac, S. (2016). The first record of *Tinodes antonioi* Botosaneanu & Taticchi-Viganò, 1974 (Insecta, Trichoptera) in Croatia with DNA barcoding and ecological data and notice of biodiversity and distribution of the genus *Tinodes* in Croatia. *Natura Croatica*, 25, 131-149. <https://doi.org/10.20302/NC.2016.25.9>
- Kučinić, M., Čukušić, A., Žalac, S., Delić, A., Cerjanec, D., Podnar, M., Čuk, R., Vučković, I., Previšić, A., Vuković, M., Koštroman, S. S., Bukvić, V., Šalinović, A., & Plantak, M. (2020a). Springs : DNA barcoding of caddisflies (Insecta , Trichoptera) in Croatia with notes on taxonomy and conservation biology. *Natura Croatica*, 29(1), 73–98. <https://doi.org/10.20302/NC.2020.29.8>
- Kučinić, M., Cukusic, A., Ibrahimi, H., Plantak, M., Vuković, M., Bukvić, V. & Vučković, Ivan. (2020b). DNA barcoding and a new taxonomic status of the *Triaenodes ochreellus lefkas* Malicky, 1974 (Insecta, Trichoptera) with new distribution data. *Ecologica Montenegrina*, 83, 172-185. <https://doi.org/10.20302/NC.2016.25.910.37828/em.2020.38.26>.
- Lancaster, J., & Glaister, A. (2019). Egg masses of some stream-dwelling caddisflies (Trichoptera: Hydrobiosidae) from Victoria, Australia. *Austral Entomology*, 58(3), 561–568. <https://doi.org/10.1111/aen.12360>
- Laudee, P. (2008). Larval morphology and diagnosis of the Giant Microcaddisfly species, *Ugandatrichia* spp. (Hydroptilidae: Trichoptera) in Thailand. *Zootaxa*, 1825, 29–39.

- Laudee, P. & Prommi, T. (2016). Description of the larva of *Cheumatopsyche lucida* (Ulmer 1907) (Trichoptera: Hydropsychidae). *Zoosymposia*, 10, 272-277. <https://doi.org/10.11646/zoosymposia.10.1.25>.
- Malicky, H. (2004). *Atlas of European Trichoptera* (2nd ed). Springer Science+Business Media Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3026-0>
- Malicky, H., Chantaramongkol, P., & Thamsenanupap, P. (2005). Description of caddis larvae (Trichoptera) from northern Thailand of the genera *Himalopsyche* (Rhyacophilidae), *Arctopsyche* (Arctopsychidae), cf. *Eoneureclipsis* (Psychomyiidae) and *Inthanopsyche* (Odontoceridae). *Braueria*, 32, 7-11.
- Malicky, H. (2010). *Atlas of Southeast Asian Trichoptera*. Chiang Mai: Biology Department, Faculty of Science, Chiang Mai University.
- Mccullagh, B. S., Wissinger, S., & Marcus, J. M. (2017). Identifying PCR primers to facilitate molecular phylogenetics in Caddisflies (Trichoptera). *Zoological Systematics*, 40(4), 459–469. <https://doi.org/10.11865/zs.20150>
- Merritt, R. W., Cummins, K. W., & Berg, M. B. (2019). *An Introduction to the Aquatic Insects of North America* (5th ed.). Kendall Hunt publishing company.
- Molina, C. I., Gibon, F.-M., Dominguez, E., Pape, T., & Rønsted, N. (2017). Associating immatures and adults of aquatic insects using DNA barcoding in high Andean streams. *Ecología en Bolivia*, 52(2), 88-99.
- Morse, J. C. (2009). Trichoptera (Caddisflies). *Encyclopedia of Insects*, 5(10), 1015–1020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00266-6>
- Morse, J. C., Frandsen, P. B., Graf, W., & Thomas, J. A. (2019). Diversity and ecosystem services of trichoptera. *Insects*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/insects10050125>
- Moya, N., Hughes, R. M., Domínguez, E., Gibon, F. M., Goitia, E., & Oberdorff, T. (2011). Macroinvertebrate-based multimetric predictive models for evaluating the human impact on biotic condition of Bolivian streams. *Ecological Indicators*, 11(3), 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.10.012>
- Mustow, S. E. (2002). Biological monitoring of rivers in Thailand: use and adaptation of the BMWP score. *Hydrobiologia*, 479, 191–229.

- Nagy, Z. T., Sonet, G., Glaw, F., & Vences, M. (2012). First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. *PLoS ONE*, 7(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034506>
- Orfinger, A. B., Morse, J. C., Hix, R. L., Morse, P., Banks, P., & Ross, P. (2022). Associating life stages and sexes of *Nearctic Polycentropus* Curtis, 1835 (Trichoptera: Polycentropodidae) using mitochondrial DNA barcoding. *Ecology and Evolution*, 12. <https://doi.org/10.1002/ece3.8741>
- Pauls, S. U., Blahnik, R. J., Zhou, X., Wardwell, C. T., & Holzenthal, R. W. (2010). DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean Smicridea (Smicridea) (Trichoptera: Hydropsychidae). *Journal of the North American Benthological Society*, 29(3), 1058–1074. <https://doi.org/10.1899/09-108.1>
- Peng, L., Zang, H., Sun, C., Wang, L., & Wang, B. (2023). Four New Species of the Genus *Eoneureclipsis* (Trichoptera: Psychomyiidae) from China Inferred from Morphology and DNA Barcodes. *Insects*, 14(2).
<https://doi.org/10.3390/insects14020158>
- Permkam, S., & Malicky, H. (2006). The immature stages of *Pseudoleptonema quinquefasciatum* MART., and *P. supalak* MAL. & CHANT. (Trichoptera: Hydropsychidae). *BRAUERIA*, 33, 26-30.
- Pirvu, M., & Pacioglu, O. (2012). The ecological requirements of caddisflies larvae (Insecta: Trichoptera) and their usefulness in water quality assessment of a river in south-west Romania. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 407. <https://doi.org/10.1051/kmae/2012029>
- Prommi, T. (2018). Ecological and Economic Importance of Trichoptera (Aquatic Insect). *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 11(1), 127-148.
- Prommi, T., Laudee, P., & Chareonviriyaphap, T. (2014). Biodiversity of Adult Trichoptera and Water Quality Variables in Streams, Northern Thailand. *APCBEE Procedia*, 10, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.10.055>

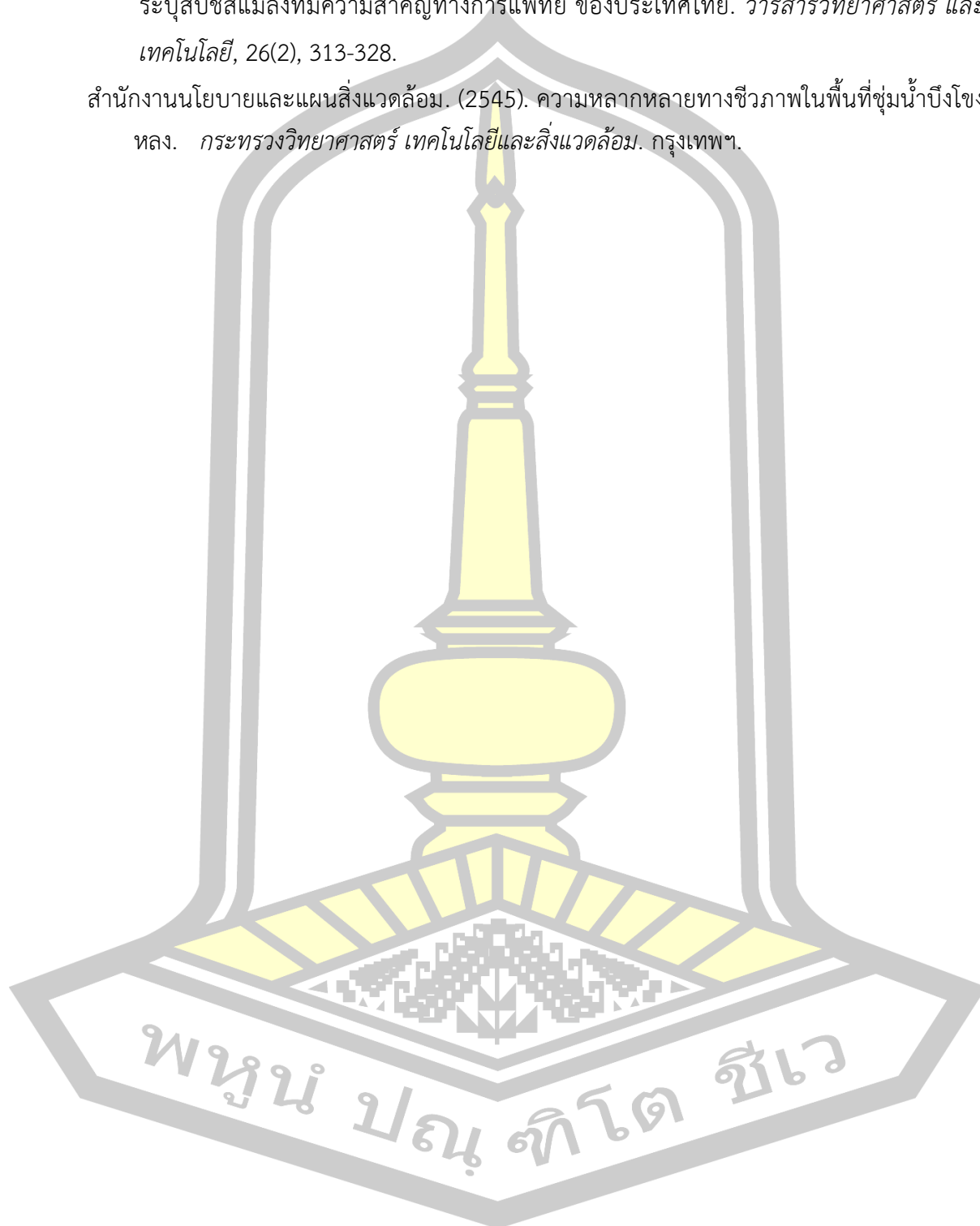
- Prommi, T., & Permkam, S. (2015). Larvae of *Hydromanicus* (Insecta: Trichoptera: Hydropsychidae) from Thailand. *Zootaxa*, 3914(4), 467–482. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3914.4.6>
- Prommi, T., Permkam, S., & Sites, R. W. (2006). Description of the larva and pupa of *Potamyia phaidra* Malicky and Chantaramongkol (Trichoptera: Hydropsychidae) from southern Thailand. *Zootaxa*, 1357, 21–29.
- Prommi, T., Seetapan, K., & Thamsenanupap, P. (2012). Diversity and seasonality of caddisflies (Insecta: Trichoptera) at Champathong waterfall, northern Thailand. *SDU Research Journal*, 5(2), 120–132.
- Prommi, T. O., & Thani, I. (2014). Diversity of Trichoptera Fauna and its Correlation with Water Quality Parameters at Pasak Cholasit reservoir, Central Thailand. *Environment and Natural Resources J*, 12(2), 35–41.
- Quinteiro, F. B. & Calora, A. R. (2012). New species of *Oecetis* McLachlan, 1877 (Trichoptera: Leptoceridae) from Southeast Brazil: Validation of an unpublished species. *Zootaxa*, 3442, 53–61. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3442.1.2>
- Ruiter, D. E., Boyle, E. E., & Zhou, X. (2013). DNA barcoding facilitates associations and diagnoses for Trichoptera larvae of the Churchill (Manitoba, Canada) area. *BMC Ecology*, 13(5).
- Sandin, L., Schmidt-Kloiber, A., Svenning, J.-C., Jeppesen, E., & Friberg, N. (2014). A trait-based approach to assess climate change sensitivity of freshwater invertebrates across Swedish ecoregions. *Current Zoology*, 60(2), 221–232.
- Schmidt-Kloiber, A., & Hering, D. (2015). An online tool that unifies, standardises and codifies more than 20,000 European freshwater organisms and their ecological preferences. *Ecological Indicators*, 53, 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.02.007>
- Sripanya, J., Rattanawilai, K., Vongsombath, C., Vannachak, V., Hanjavanit, C., & Sangpradub, N. (2022). Benthic Macroinvertebrates and Trichoptera Adults for Bioassessment Approach in Streams and Wadeable Rivers in Lao People's Democratic Republic. *Tropical Natural History*, (22), 12–24.

- Stamatakis, A., Hoover, P., & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology*, 57(5), 758–771. <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>
- Suhaila, A. H., & Che Salmah, M. R. (2017). Application of aquatic insects (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera) in water quality assessment of Malaysian headwater. *Tropical Life Sciences Research*, 28(2), 143–162. <https://doi.org/10.21315/tlsr2017.28.2.11>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tyagi, K., Kumar, V., Kundu, S., Pakrashi, A., Prasad, P., Caleb, J. T. D., & Chandra, K. (2019). Identification of Indian Spiders through DNA barcoding: Cryptic species and species complex. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50510-8>
- Uy-Yabut, C. J. & Malicky, H. & Bae, Y. (2018). Review of the filter-feeding caddisfly subfamily Macronematinae (Trichoptera: Hydropsychidae) in tropical Southeast Asia. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 66, 664–703.
- Wallace, J. B., Grubaugh, J. W., & Whiles, M. R. (1996). Biotic indices and stream ecosystem processes: Results from an experimental study. *Ecological Applications*, 6(1), 140–151. <https://doi.org/10.2307/2269560>
- Waringer, J., Graf, W., Pauls, S. U., Vicentini, H., & Lubini, V. (2008). DNA based association and description of the larval stage of *Drusus melanchaetes* McLachlan, 1876 (Trichoptera: Limnephilidae: Drusinae) with notes on ecology and zoogeography. *Limnologica*, 38(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2007.09.001>
- Weaver, J. & Malicky, H. (1994). The genus *Dipseudopsis* from Asia (Trichoptera: Dipseudopsidae). *Tijdschrift voor Entomologie*, 137 (1), 95–142.

- Wickson, S. J., Chester, E. T., Valenzuela, I., Halliday, B., Lester, R. E., Matthews, T. G., & Miller, A. D. (2014). Population genetic structure of the Australian caddisfly *Lectrides varians* Mosely (Trichoptera: Leptoceridae) and the identification of cryptic species in south-eastern Australia. *Journal of Insect Conservation*, 18(6), 1037–1046. <https://doi.org/10.1007/s10841-014-9711-z>
- Wiggins, G. B. (1996). *Larvae of the North American Caddisfly Genera (Trichoptera)* (2nd ed., Vol. 2). University of Toronto Press.
- Yong, C. M. Y., Sen, H., Yule, C. M., & Sen, Y. H. (2004). *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*. Academy of Sciences Malaysia.
- Zhou, X., Kjer, K. M., & Morse, J. C. (2007). Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(4), 719–742. <https://doi.org/10.1899/06-089.1>
- Zhou, X., Robinson, J. L., Geraci, C. J., Parker, C. R., Flint, O. S., Etnier, D. A., Ruiter, D., Dewalt, R. E., Jacobus, L. M., & Hebert, P. D. N. (2011). Accelerated construction of a regional DNA-barcode reference library: caddisflies (Trichoptera) in the Great Smoky Mountains National Park, *Journal of the North American Benthological Society*, 30(1), 131–162. <https://doi.org/10.1899/10-010.1>
- Zhou, X., Frandsen, P. B., Holzenthal, R. W., Beet, C. R., Bennett, K. R., Blahnik, R. J., Bonada, N., Cartwright, D., Chuluunbat, S., Cocks, G. V., Collins, G. E., Dewaard, J., Dean, J., Flint, O. S., Hausmann, A., Hendrich, L., Hess, M., Hogg, I. D., Kondratieff, B. C., Kjer, K. M. (2016). The Trichoptera barcode initiative: A strategy for generating a species-level tree of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0025>
- กิตติยา ถาวโรฤทธิ์ และ นฤมล แสงประดับ. (2559). ความหลากหลายสปีชีส์และการกระจายตัวของตัวอ่อนแมลงหนอนปลอกน้ำในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*, 8(1), 101-110.

เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร, ณรงค์ จัตูรัส และ นพวรรณ บุญชู. (2561). ดีเอ็นเอบาร์และโค้ดสำหรับการระบุพืชชี้สมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย ของประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 26(2), 313-328.

สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. (2545). ความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่ชุ่มน้ำบึงโขงหลง. *กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม*. กรุงเทพฯ.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายชวนัฐ เจริญชัยวัฒนโชติ
วันเกิด วันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2536
สถานที่เกิด อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน 51 หมู่ที่ 20 ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150
chavanut.j@gmail.com
ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนมุกดาหาร อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
พ.ศ. 2567 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูน ปณ ภัโต ชีวะ