ระดับโครงการ

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

Research and Development of Pest Detection by Serology and Molecular Biology technique for the Import and Export of Agricultural Products

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล

(Mrs. Nuttima Kositcharoenkul)

ปี2564

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามาในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ประกอบด้วย 2 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชกักกัน จำนวน 8 ชนิด ให้ทันสมัย รวดเร็ว แม่นยำมากขึ้น ได้แก่แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus, C. michiganensis* subsp. *nebraskensis, Burkholderia glumae, Ralstonia solanacearum species complex, Pseudomonas fuscovaginae,* ไวรัส*African Cassava Mosaic Virus, Sri Lankan cassava mosaic virus* และ รา *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามารุกรานในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชกักกัน

กิจกรรมที่ 2 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชที่สำคัญในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดให้ทันสมัย มีประสิทธิภาพ ลดขั้นตอนการจำแนกชนิด สามารถตรวจหาศัตรูพืชอย่างถูกต้องได้อย่างรวดเร็ว นำมาสู่การแนะนำการควบคุมโรคในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพได้แก่ ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris pv. campestris* ในพืชตระกูลกระหล่ำ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ชุดตรวจ(strip test) เชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้ม และชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* ในกระเทียม วิธีการตรวจหาวิธีการตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* ในไม้ผลหลายชนิด ได้แก่ สม้โอ ฝรั่ง กล้วย แก้วมังกร ทับทิม ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยใช้primers ที่ออกแบบจากยีน immunodominant membrane protein genes (IDPs) วิธีการตรวจสอบราในสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรด้วยเทคนิค PCR วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* และ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* และแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* ด้วยเทคนิคPCR วิธีการตรวจแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค real-time PCR วิธีการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification และวิธีการตรวจจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค multiplex PCR นอกจากนี้ยังได้ แอนติบอดีที่เฉพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้แก่ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (PAb-SCMV-NSW) โพลิโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMPจาก *imp* gene ที่ความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล และแอนติบอดีที่เฉพาะต่อศัตรูพืชที่ได้ที่พัฒนาได้ในโครงการนี้ สามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมี

กรมวิชาการเกษตร

ประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และเพื่อการป้องกันกำจัด และ ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย ย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ดำเนินการในช่วงปี พ.ศ. 2563 – 2564 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามาในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ประกอบด้วย 2 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร ประกอบไปด้วย 7 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ได้แก่แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus, C. michiganensis* subsp. *nebraskensis, Burkholderia glumae, Ralstonia solanacearum species complex, Pseudomonas fuscovaginae,* ไวรัส*African Cassava Mosaic Virus, Sri Lankan cassava mosaic virus* และ รา *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เพื่อป้องกันไม่ให้เข้ามารุกรานในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชกักกัน โดยจากผลการทดลองพบว่า สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชให้ทันสมัย ตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย จะก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตรของประเทศไทย อีกทั้งสนับสนุนการเตรียมรับมือกับสถานการณ์การแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรงในปัจจุบัน

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก ประกอบไปด้วย 17 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและ นำไปใช้ในการนำไปใช้ในการตรวจศัตรูพืชอย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ผลการทดลองสามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ได้แก่ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้ม เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลจำนวน 9 วิธี 10 ชนิดศัตรูพืช ได้แก่ *Phyllosticta citriasiana* ราสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเชื้อไวรอยด์ *Pepper chat fruit viroid* แบคทีเรีย*X. campestris* pv. *campestris* ไส้เดือยนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* แมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* และ แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* และการผลิตแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช จำนวน 5 ชนิด ได้แก่แบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* เชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* เชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล และแอนติบอดีที่เฉพาะต่อศัตรูพืชที่ได้ที่พัฒนาได้ในโครงการนี้ สามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมี

กรมวิชาการเกษตร

ประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และเพื่อการป้องกันกำจัด และ ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย ย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Research and development project for pest detection by serological and molecular biology technique for the Import and Export of Agricultural Products were Implemented during the year 2017-2021. The objective of the project to develop a highly efficient, rapid, and accurate method of detecting pests by serological and molecular biology techniques for use as a tool to prevent the serious foreign or quarantine pests from entering the country and certify agricultural products for export according to the conditions of trading partner countries, consisting of 2 activities as follows:

Activity 1 Development of quarantine pest detection for agricultural import consists of 7 experiments. The objective of the activity was to develop modern and effective detection methods for quarantine pests: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonic*us, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Burkholderia glumae*, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Pseudomonas fuscovaginae*, *African cassava Mosaic Virus, virus. Sri Lankan cassava mosaic* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 to prevent invasion in Thailand and maintain the condition of quarantine pests. The results showed that the methods of pest detection are developed as a modern and quickly and accurately, saving time in diagnosis. It will be of great benefit to the development of pest detection techniques for importing agricultural products in Thailand. It also supports preparation to deal with the current fast and severe pest epidemic situation.

Activity 2 Development of pest and natural enemies' detection In the country for pest control and export, 17 experiments were conducted with the aim of developing efficient, rapid and highly accurate pest detection methods using serology and molecular biology techniques for used as a pest certification tool for agricultural exports and rapid detection of pests for pest control. The results showed that methods for detecting pests at the serology and molecular biology method could be developed. Including four serological kits for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, phytoplasma caused sugarcane white leaf disease, *Citrus Tristeza virus*, *Leek yellow stripe virus* and 9 molecular detection methods, 10 pests: *Phyllosticta citriasiana*, *Neoscytalidium sp*. and *N. dimidiatum*, Phytoplasma caused sugarcane white leaf disease, *Pepper chat fruit viroid*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica, M. Arenaria*, and *M. enterolobii*, Fruit flies: *Zeugodacus cucurbitae* and *Bactrocera correcta*. In addition, specific antibodies were produced against five plant pathogens: *X. campestris pv. campestris*, *Watermelon silver mottle virus*, *Leek yellow stripe virus*, *sugarcane mosaic virus* and the phytoplasma caused sugarcane white leaf disease.

กรมวิชาการเกษตร

The methods for pest detection and antibodies specific to the pests developed in this project could be used as a tool to detect pests in agricultural products, prevent serious foreign pests or quarantine pests from entering the country and for the prevention and control of pests for international trade. The methods are accepted for standardized method of pest detection. The methods could detect pests in small quantities and reduce the period of identification for keep up with the international trade situation and prevention and elimination in a timely manner. In addition, it saves money on importing test kits from abroad and It is the development of research by Thai academics to be accepted by foreign countries.

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร เป็นโครงการที่มุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ วิธีทางด้านเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล นำมาปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น PCR และ Real time PCR และ ทางเซรุ่มวิทยา เช่น การผลิตแอนติซีรั่มของไวรัสสาเหตุโรคพืชโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย การพัฒนาชุดตรวจสอบศัตรูพืช Immuno strip และ lateral flow test strip เพื่อใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืช ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัด และ การตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูงเพิ่มขึ้น เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อยและพัฒนาให้รวดเร็วยิ่งขึ้น สามารถย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

มกราคม 2565

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	4
กิตติกรรมประกาศ	8
สารบัญ	9
บทที่ 1 บทนำ	10
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	13
บทที่ 3 ผลการศึกษา	23
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	31
เอกสารอ้างอิง	36

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

<u>วิสัยทัศน์</u>

<u>พันธกิจ</u>

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง

เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน

เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์

คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษ

และภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม

สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาส

ให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตร

ต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ

การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปี 2564 และโปรดระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับ Program ของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
P7. โจทย์ท้าทายด้านทรัพยากรสิ่งแวดล้อม และการเกษตร	2,097,200

กรมวิชาการเกษตร

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

จากการเจรจาการค้าภายใต้ข้อตกลงระหว่างประเทศว่าด้วยภาษีศุลกากรและการค้า (GATT) มีมติในการจัดตั้งองค์การการค้าโลก(World Trade Organization; WTO) ทำหน้าที่กำกับดูแลการค้าระหว่างประเทศ ลดอุปสรรคและข้อกีดกันทางการค้าและจัดทำกฎระเบียบการค้าระหว่างประเทศเพื่อสนับสนุนให้การค้าโลกมีความเสรียิ่งขึ้น บนพื้นฐานของการแข่งขันที่เท่าเทียมกัน ทำให้มาตรการกีดกันได้แก่มาตรการทางภาษี และการจำกัดการนำเข้าและส่งออกลดลง แต่ในขณะเดียวกันมาตรการกีดกันทางการค้าที่มิใช่ภาษีศุลกากร (non tariff barrier, NTB) มีบทบาทเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการใช้ศัตรูพืชเป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตรแทนมาตรการกีดกันด้านภาษีศุลกากร ทำให้ศัตรูพืชมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการค้าระหว่างประเทศ มาตรการที่สำคัญที่อยู่ภายใต้ข้อตกลงของ WTO คือมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) เป็นมาตรการที่ใช้ในการจำกัดการนำเข้าสินค้าเกษตรเพื่อปกป้องและคุ้มครองชีวิตและสุขภาพของมนุษย์พืช สัตว์ภายในประเทศของตนเอง เพื่อลดความเสี่ยงต่ออันตรายจากสิ่งมีชีวิตที่ติดมากับพืช สัตว์และผลิตภัณฑ์รวมทั้งสารเจือปนในอาหาร สารพิษหรือจุลินทรีย์ที่เป็นพาหะของโรค โดยมีการกำหนดระดับความปลอดภัยและการตรวจสอบมาตรฐานสินค้านำเข้าจะต้องสอดคล้องกับอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention, IPPC และตั้งอยู่บนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือได้ โดยให้องค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) ของแต่ละประเทศดำเนินการ ซึ่งมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตร โดยอ้างการตรวจพบเชื้อโรคพืชแมลง และอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบการค้าของระหวางประเทศ นอกจากนี้ยังใช้การออกกฎระเบียบใหม่ใช้ศัตรูพืชกักกันมาเป็นเงื่อนไขในการนำเข้าสินค้าเกษตร ประเทศไทยมีพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551ซึ่งเป็นกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร โดยมีกรมวิชาการเกษตรในฐานะ องค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศไทย ทำหน้าที่กำกับดูแลป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศไทย และยังต้องทำหน้าที่ในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรในการส่งออก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชที่รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และต้องพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ทันสมัย ทันต่อสถานการณ์ มีประสิทธิภาพในการตรวจหาศัตรูพืช และต้องเป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ป้องกันการถูกตีกลับของสินค้าเกษตรเนื่องจากตรวจพบศัตรูพืชและ ป้องกันศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศติดเข้ามากับสินค้าเกษตรนำเข้า ทำให้เกิดการระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกพืชของไทย นอกจากนี้ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชในระบบการผลิตพืชภายในประเทศที่รวดเร็วและเม่นยำทำให้แก้ไขหรือป้องกันกำจัดได้ทันสถานการณ์

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ พัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ วิธีทางด้านเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล นำมาปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เพื่อการป้องกันกำจัด และ ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็น

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย ย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้า

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามาในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า

ขอบเขตการศึกษา

โครงการวิจัยนี้ครอบคลุมตามวัตถุประสงค์ของโครงการ โดยนำเทคนิคทางเซรุ่มวิทยามาพัฒนาได้แก่ การผลิตแอนติบอดีโดยระบบเซลล์แบคทีเรีย การผลิตชุดตรวจสอบศัตรูพืชสำเร็จรูป immuno strip และแบบ lateral flow test strip ให้มีประสิทธิภาพ สะดวก รวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำ การพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้แก่ PCR, Real time PCR, multiplex real-time PCR และ LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) ในการตรวจสอบศัตรูพืช ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และแม่นยำสูง สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคพืชในระดับความเข้มข้นต่ำๆ.

นิยามศัพท์

การตรวจสอบ, ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป, เทคนิค real-time PCR, เทคนิคทางอณูชีววิทยา, เทคนิคแลมป์, ศัตรูพืชกักกัน, สุขอนามัยพืช, แอนติบอดีของโปรตีนลูกผสม

antibody, antiserum, Bacterial cell system, cox1 marker, Detection, GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test), Immuno strip, immunodominant membrane protein genes (IDPs), LAMP, lateral flow strip Membrane protein (Imp), Molecular Biology, Plant quarantine, real-time PCR, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR, SecA translocate protein (SecA), seed borne pathogen, Serology, Translocation Gene

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1.วิธีการดำเนินการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร

การทดลองที่ 1.1 การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real time PCR (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 1.2 การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้า โดยเทคนิค Real time PCR (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 1.3 การตรวจเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) ศัตรูพืชกักกันในมันสำปะหลังด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยา (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 1.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR (2562-2564)

การทดลองที่ 1.5 พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย (2562-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ (2562)

ขั้นตอนที่ 2 คัดเลือกไพรเมอร์และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (2562-2563)

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิคในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (2563)

ขั้นตอนที่ 4 ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิคในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (2563)

ขั้นตอนที่ 5 ทดสอบเทคนิคในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืช (2564)

บันทึกข้อมูล

บันทึกโปรแกรมที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

บันทึกความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

บันทึกความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

บันทึกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืช

การทดลองที่ 1.6 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) (2563-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ (2563)

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย P. fuscovaginae (2563)

ขั้นตอนที่ 3 ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา LAMP (2564)

ขั้นตอนที่ 4 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย P. fuscovaginae (2564)

ขั้นตอนที่ 5 ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMPในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย P. fuscovaginae (2564)

ขั้นตอนที่ 6 ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย P. fuscovaginae จากตัวอย่างพืช (2564)

กรมวิชาการเกษตร

บันทึกข้อมูล

บันทึกโปรแกรมที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

บันทึกความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

บันทึกความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

บันทึกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืช

การทดลองที่ 1.7 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเชื้อราและสกัดดีเอ็นเอ (2564)

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 (2564)

ขั้นตอนที่ 3 ตรวจสอบชนิดของ Foc TR4 (2564)

บันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาตัวอย่างแห้ง สายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ ตัวอย่างเก็บรักษาในรูปแบบตัวอย่างแห้ง ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 1.8 การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) (2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างเชื้อไวรัสและสกัดดีเอ็นเอ (2564)

ขั้นตอนที่ 2 ตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) (2564)

ขั้นตอนที่ 3 การเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA) (2564)

ขั้นตอนที่ 4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) (ปี 2564)

ขั้นตอนที่ 5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัส (2564)

บันทึกข้อมูล

บันทึกผลการตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

บันทึกผลการเพิ่มปริมาณจีโนมของไวรัสโดยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA)

บันทึกผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสโดยเทคนิค Next generation sequencing (NGS)

บันทึกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืช

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก

การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.2 การผลิตแอติบอดีของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ในระบบเซลล์แบคทีเรีย (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.3 การตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* Wulandari,Crous and Gruyter ดวยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (การทดลองสิ้นสุด)

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.4 พัฒนาเทคนิคการตรวจหา immunodominant membrane protein genes (IDPs) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.5 การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.6 การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ดวยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.7 การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) กับเมล็ดพันธมะเขือเทศ (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.8 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบโรคใบด่างลายของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อไวรัส Sugarcane mosaic virus (SCMV) (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.9 พัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) จากแอนติบอดีของโปรตีนลูกผสม SecA ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลอง 2.10 การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้ม (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.11 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae) ด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (การทดลองสิ้นสุด)

การทดลองที่ 2.12 การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะ ต่อ immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย (2562-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 เก็บตัวอย่างโรคใบขาวอ้อย (2562-2563)

การบันทึกผลข้อมูล ด้วยการจดบันทึกระหว่างการเก็บตัวอย่างโรคและถ่ายภาพลักษณะอาการโรค

ขั้นตอนที่ 2 แยกสกัดดีเอ็นเอ (2562-2563)

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Germany) จากตัวอย่างอ้อยใบขาวทั้งในส่วนกาบใบ ก้านใบ และใบ

การบันทึกข้อมูล ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260/280 นาโนเมตร

ขั้นตอนที่ 3 สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (2562)

ขั้นตอนที่ 4 เตรียม DNA PCR product ให้บริสุทธิ์ (2562)

ขั้นตอนที่ 5 โคลน purified imp gene (2562)

ขั้นตอนที่ 6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (2562)

ขั้นตอนที่ 7 การเพิ่ม adapter เข้าชิ้นส่วนของ imp gene (2562-2563)

นำพลาสมิดสายผสม imp gene เป็นต้นแบบสำหรับเพิ่มส่วน adapter ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะของ XhoI (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) เข้าเชื่อมกับชิ้นส่วนของ imp gene ด้วยปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอนที่ 8 การตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบ Double digestion (2562-2563)

นำชิ้นยีน imp gene adapter และพลาสมิดพาหะ pBAD/His A expression vector มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI และ EcoRI (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) แบบ Double digestion ตรวจสอบผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การบันทึกข้อมูล ด้วยเทคนิค gel agarose electrophoresis

ขั้นตอนที่ 9 การโคลน digested imp gene adapter (2563)

กรมวิชาการเกษตร

นำชิ้น digested imp gene adapter เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ digested pBad/HisA Expression vector และถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ completent cell แบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) ทำการเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรียมาตรวจด้วยเทคนิค colony PCR หรือทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI และ EcoR I ตรวจสอบผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การบันทึกข้อมูล ด้วยเทคนิค colony PCR

ขั้นตอนที่ 10 ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โปรตีน imp-adapter/6xHisTag ในเซลล์แบคทีเรีย (2563)

นำโคลนแบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมชิ้นยีนของ imp-adapter/6xHisTag ใน pBad/HisA Expression vector มาทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โปรตีน imp-adapter/6xHisTag ในเซลล์แบคทีเรีย ที่ 30 นาที 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ นำมาแยกสกัดโปรตีนจากเซลล์และวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ด้วย เทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrphoresis (SDS-PAGE) ตรวจดูขนาดและปริมาณของ fusion protein เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight markers Cat.No. SMO431, LabAid, USA)

การบันทึกข้อมูล ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

ขั้นตอนที่ 11 การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ (2563-2564)

การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย E.coli สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมในช่วงเวลาที่มีการผลิตโปรตีนมากที่สุด

ขั้นตอนที่ 12 การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง (2563-2564)

ผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองโดยผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง(subcutaneous) บริเวณคอประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์อีก 5 ครั้ง นำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส อีก 24 ชั่วโมง ริน่ส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ที่ค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

การบันทึกข้อมูล ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA

การทดลองที่ 2.13 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR (2562-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 สืบค้น specific primer (2562)

ขั้นตอนที่ 2 การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA) (2562)

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-time PCR (2562-2663)

โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ

กรมวิชาการเกษตร

ปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real-time PCR เพื่อหา crossing point และวิเคราะห์หา melting curve

ขั้นตอนที่ 4 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR (2563)

ในการตรวจเชื้อ Xcc เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้ข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะและความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ primer

โดยใช้ดีเอ็นเอและเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย Xcc ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 50 นาโนกรัม และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 108 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *X. axonopodis* pv *citri, X. axonopodis* pv *vesicatoria, X. axonopodis* pv *glycines, X. axonopodis* pv *dieffenbachiae, X. oryzae* pv *oryzae, X. oryzae* pv *oryzicola, Erwinia* spp. และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบคะน้า

ทดสอบความไว (sensitivity)

ใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย Xcc ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย Xcc ที่ความเข้มข้น 108 107 106 105 104 103 102 101 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 5 ทดสอบวิธี Real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้า (2564)

5.1 ทดสอบวิธี Real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้าที่ติดเชื้อ

ปลูกเชื้อ Xcc ลงเมล็ดคะน้าให้มีปริมาณเชื้อ 104 หน่วยโคโลนี/เมล็ด จากนั้นนำเมล็ดคะน้าที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยเพิ่มในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10000 ต่อจำนวนเมล็ดดี 10,000 เมล็ด ตรวจด้วย Real-time PCR เปรียบเทียบกับการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR และการตรวจสอบเชื้อด้วยอาหาร semi-selective สำหรับแยกเชื้อ Xcc

5.2 ทดสอบวิธี Real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้าที่สุ่มตรวจ

สุ่มตรวจเมล็ดขั้นต่ำไม่น้อยกว่า 30,000 เมล็ด และทำการแบ่งออกเป็นตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 10,000 เมล็ด ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association) เปรียบเทียบกับการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR และการตรวจสอบเชื้อด้วยอาหาร semi-selective สำหรับแยกเชื้อ Xcc

การทดลองที่ 2.14 การตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิคแลมป์(2562-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 เก็บตัวอย่างและจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค PCR (2562)

ขั้นตอนที่ 2 การตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค LAMP (2563)

การสกัดดีเอ็นเอจากกลุ่มไข่ นำไส้เดือนฝอย *M. incognita* จำนวน 1 กลุ่มไข่ มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GF-1 DNA Extraction® ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ทำการทดสอบหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทาปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เติมในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1.6 µM MeFIP และ MeBIP, 0.2 µM MeF3 และ MeB3, 0.8 µM MeLF และ MeLB (Niu et al. 2012) 1.6. µM dNTPs, 0.8 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH4)2SO4, 6 mM MgSO4 , 0.1% Triton X-100 และ 8U Bst DNA polymerase แล้วทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

60 และ 65 องศาเซลเซียส และทดสอบเวลาที่ใช้นาน 30, 45 ,60 และ 75 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากเทคนิค LAMP ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสเพื่อดูผลของปฏิกิริยา โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ใน 0.5X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วย Red safe®ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ใช้ดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยที่ต้องการทดสอบ เติมในปฏิกิริยา LAMP ทำปฏิกิริยาที่สภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และ *M. javanica* เปรียบเทียบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส

ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP

นำดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมที่สกัดได้มาทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100 และ1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ส่วนที่เหลือเก็บไว้ทำซ้ำ 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส

ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* จากรากพืชและตัวอย่างดิน นำตัวอย่างปมรากที่ได้ผ่านการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* จำนวน 20 ตัวอย่าง และดินผ่านการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* จำนวน 20 ตัวอย่าง ใช้ตัวอย่างปมรากและดินผ่านการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย M. incognita เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ โดยยืนยันการย้อมรากด้วย fuchsin acid และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำตัวอย่างปมราก 5 มิลลิกรัม บดให้สารละลายบัฟเฟอร์ (50 mM KCl, 10mM Tris pH 8.2, 2.5mM MgCl, 60 µg mL-1 proteinnase K, 0.45 % Tween 20 และ 0.01% gelatin) (Niu et al., 2012, Castagnone-Sereno et al., 1995) ปั่นเหวี่ยงแล้วดูดส่วนใสปริมาตร 3 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยา LAMP ส่วนนำตัวอย่างดินที่ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยจำนวน 10,000 ตัว ในดินปลอดเชื้อ 100 กรัม แล้วเก็บตัวอย่างดิน 100 มิลลิกรัม ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด PowerSoil™ DNA Isolation Kit ดูด 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสและตรวจด้วยตาเปล่า (visual detection) โดยใช้สารเรืองแสง SYBR Green I (Invitrogen) ที่ความเข้มข้น 1:10 เติมลงไปในหลอดหลังทาปฏิกิริยาเสร็จ สังเกตการเรืองแสงของสาร

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้เทคนิค LAMP (2564)

เก็บตัวอย่างดินและพืชในพื้นที่ปลูกที่มีรายงานการแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม เช่นพื้นที่ปลูกฝรั่ง มันฝรั่ง พริก พริกไทย มะเขือเทศ ขิง มันสำปะหลัง มันขี้หนู และพื้นเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ในพื้นที่ประเทศไทย

บันทึกผลการทดลอง

ระบุชนิดไส้เดือนฝอยทางสัณฐานวิทยา สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ผลผลิตที่ได้จากเทคนิค LAMP ความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ประสิทธิภาพการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม M. enterolobii จากรากพืชและตัวอย่างดินด้วยเทคนิค LAMP

การทดลองที่ 2.15 การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้าและส่งออกด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง(2562-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่าง (2562)

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาลำดับรหัสพันธุกรรม (2562)

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบและออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* (2563)

กรมวิชาการเกษตร

3.1 ทดสอบ species - specific primer ที่ได้จากการสืบค้นข้อมูลจาก Jiang และคณะ (2013) ว่ามีความเหมาะสมในการนำมาตรวจสอบกับแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ในประเทศไทย โดยเตรียม Master Mixed และดีเอ็นเอต้นแบบ ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (PCR machine) โดยใช้อุณหภูมิ และระยะเวลาดังนี้ denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที, ตามด้วย annealing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 30 วินาที, 72 °C นาน 30 วินาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 30 รอบ

3.2 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ด้วยวิธีการเจลอิเล็คโตรโฟริซิส

ขั้นตอนที่ 4 ออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* (2563 - 2564)

4.1 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cox1 จากแมลงที่ทำการสำรวจ และแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ ที่เป็นแมลงกักกันจากข้อมูลของ Genebank มาจัดลำดับและทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม chromas (เวอร์ชั่น 2.33) และ BioEdit (เวอร์ชั่น 7.0.9.0) เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* เท่านั้น โดยเลือกตำแหน่ง single - nucleotide polymorphism (SNP)

4.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยใช้โปรแกรม GeneFisher นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ primer, dimer hairpin และ false priming sites โดยใช้โปรแกรม Oligo (version 6.0) software

4.3 วิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของ specific primer ที่ออกแบบไว้จากข้อ 4.2 โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจง

4.4 นำไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงสำหรับแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ออกแบบได้ มาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในตัวอย่างแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะต่างๆ จากตัวอย่างแมลงวันแตงที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและจากแมลงวันที่สำรวจพบในพืช ผัก และผลไม้ที่พบในภูมิภาคต่างๆ ของไทยรวมทั้งจากผัก ผลไม้ที่ส่งออกจากด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

4.5 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยวิธีการเจลอิเล็คโตรโฟริซิส และทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป QIAquickGel Extraction Kit, Qiagen (Germany)

4.6 ส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank

ขั้นตอนที่ 5 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* (2563 - 2564)

5.1 นำไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอย่างแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ ในระยะต่างๆ ด้วยวิธี PCR

5.2 ทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โค้ดกับแมลงวันที่พบในพืช ผัก และผลไม้ที่พบบริเวณด่านตรวจพืชที่มีการส่งออกด้วยวิธี PCR

5.3 ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

การบันทึกข้อมูล

1. ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ได้จากการเลี้ยงและรวบรวมจากกับดักล่อแมลง บันทึกข้อมูลโดย มีป้ายเล็ก ๆ บันทึกกำกับ บอก สถานที่ วันเดือนปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืช ที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

2. ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

การทดลองที่ 2.16 การใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita, M. javanica, M. arenaria* และ *M. enterolobii* (2563-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita, M. javanica, M. arenaria* และ *M. enterolobii* สำหรับการทดสอบ (2563)

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม เช่น พื้นที่ปลูกมันฝรั่ง จ. ตาก พื้นที่ปลูกขิง จ. เพชรบูรณ์ พื้นที่ปลูกพริก จ. อุบลราชธานี พื้นที่ปลูกฝรั่ง จ. นครปฐม จ. สมุทรสาคร จ. ราชบุรี พื้นที่ปลูกพริกไทย จ. จันทบุรี พื้นที่ปลูกมันขี้หนู จ. สุราษฎร์ธานี เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตรโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมหากพบในพื้นที่

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการล้างตัวอย่างดิน และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยใช้ปากคีบๆ กลุ่มไข่ 1 กลุ่มแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่าง ตรวจดูการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานโดยเปรียบเทียบลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย (perineal patterns) เปรียบเทียบลักษณะ ความกว้างยาวและสัดส่วนของอวัยวะต่างๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้

ขั้นตอนที่ 2 การสกัด genomic DNA จากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง (2563)

ใช้วิธีการตาม Schizas et al., 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับ

ขั้นตอนที่ 3 การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม (2563)

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ molecular diagnostic key ที่พัฒนาโดย Adam et al., (2007) ร่วมกับวิธีทางสัณฐานวิทยาโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลในตำราและวารสารวิชาการ

ขั้นตอนที่ 4 ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่างๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม M. incognita, M. javanica, M. arenaria และ M. enterolobii (2564)

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่างๆ กับตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด และทดสอบหาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR (Hu et al., 2011; Kalendar et al., 2009; Meng et al., 2004; Zijlstra et al., 2000; Long et al., 2006)

คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Species	Sequence of primers	Size	References
Meloidogyne spp. (universal primer)	MF 5'-GGGGATGTTTGAGGCAGATTTG-3'		
	MR 5'-AACCGCTTCGGACTTCCACCAG-3'	500bp	Hu et al. (2011)

กรมวิชาการเกษตร

Meloidogyne incognita	Mi-F 5'-GTGAGGATTCAGCTCCCCAG-3'		
	Mi-R 5'-ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC-3'	1,000bp	Hu et al. (2011)
	Mi2F4 5'-ATGAAGCTAAGACTTTGGGCT-3'		
	Mi1R1 5'-TCCCGCTACACCCTCAACTTC-3'	300bp	Kalendar et al. (2009)
Meloidogyne javanica	Fjav 5'-GGTGCGCGATTGAACTGAGC-3'		
	Rjav 5'-CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC-3'	700bp	Meng et al. (2004)
Meloidogyne arenaria	Far 5'-TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3'		
	Rar 5'-TCGGCGATAGACACTACAAACT-3'	420bp	Zijlstra et al. (2000)
Meloidogyne enterolobii Me-F	5'-AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG-3'		
	Me-R 5'-TCAGTTCAGGCAGGATCAACC-3'	200bp	Long et al. (2006)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ที่ได้ โดยมีไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* เป็นตัวเปรียบเทียบ

ขั้นตอนที่ 5 ทดสอบความสามารถในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช (2564)

ปลูกเชื้อต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์อายุ 1 เดือน ที่ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตรบรรจุดินอบฆ่าเชื้อ ด้วยตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 จำนวน 200 ตัวต่อกระถาง โดยใช้ไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 4 ชนิด และใช้การปลูกเชื้อโดยใช้น้ำเปล่าเป็นวิธีการเปรียบเทียบ สกัดดีเอ็นเอจากปมรากมะเขือเทศ 15 20 และ 30 วันหลังปลูกเชื้อ 10 ปมต่อราก ของต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด สำหรับวิธีการที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า จะตัดชิ้นส่วนรากมาสกัดดีเอ็นเอ ตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย multiplex PCR

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมทั้งทางสัณฐานวิทยาและอนูชีววิทยา ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและ ความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา multiplex PCR ผลการตรวจปมรากพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดต่างๆ

การทดลองที่ 2.17 การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (2563-2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 สกัด IgG จากแอนติซีรัมของเชื้อ LYSV (2563)

โดยนำแอนติซีรัม LYSV จำนวน 1 ml มาสกัด IgG โดยผสมกับ น้ำกลั่น 9 ml แล้วผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอน 8,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 250C ละลายตะกอนด้วย 4 ml ของ ½ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อละลาย ammonium sulfate ออกให้หมด โดยแช่ ใน ½ PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ที่ได้ด้วย spectrophotometer เพื่อ ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD280=1.4 มีความเข้มข้นของโปรตีน =1 mg/ml ทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยวิธี NCM-ELISA โดยเจือจาง IgG เป็น 1:500 เตรียมอนุภาคของทองให้ได้ขนาดอนุภาคประมาณ 40 nm จากการต้ม HAuCl4 ผสมกับ sodium citrate เพื่อให้ได้อนุภาคของทองที่บริสุทธิ์ และมีขนาดตามต้องการแล้วนำสารละลายของ Colloidal Gold ไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส LYSV ที่เข้มข้น

ขั้นตอนที่ 2 การติดฉลาก IgG ของ LYSV ด้วยอนุภาคทอง (colloidal gold) (2563)

ขั้นตอนที่ 3 ทำการเตรียมเส้น Test line, control line และประกอบเป็น GLIFT kit (2563)

กรมวิชาการเกษตร

โดยพ่น IgG ลงบนแผ่น NCM ทดลองใช้ประมาณ 1, 1.5 และ 2 µl/cm แยกกันคนละเส้น ทดลองใช้ GAR ในการทำเส้น control line ในปริมาณ 1 µl/cm แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 370C นาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาประกอบกันแล้วตัดเป็น strip บรรจุลงในตลับพลาสติกเป็นชุดนำไปทดสอบตรวจ ตัวอย่างใบกระเทียมที่เป็นโรคจากเชื้อ LYSV และทดลองหยดน้ำคั้นจากพืชที่เจือจางเป็น 1:100, 1:200, 1:500 และ 1:1000 เพื่อดูความไวในการตรวจของ GLIFT kit

ขั้นตอนที่ 4 เปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ใน sample pad buffer (2563)

เปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ ใน sample pad buffer-Na2BO3 กับการใช้ Extraction buffer ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพืชในการตรวจสอบโรคไวรัสของพืชด้วยวิธี NCM-ELISA แล้วดูดน้ำคั้นหยอดลงในตลับ GLIFT kit แล้วเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

ขั้นตอนที่ 5 ทดสอบหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (2563)

ในการเตรียมน้ำคั้นจากกระเทียมในการตรวจ เชื้อ LYSV ในใบกระเทียมทดลองนำ sample pad buffer-Na2BO3 มาเติมสาร Na2SO3 เปรียบเทียบกันในปริมาณ 0.4, 0.6 และ 0.8 % นำมาบดตัวอย่างใบกระเทียมเป็นน้ำคั้นหยอดลงในตลับ GLIFT kit แล้วตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 6 ตรวจสอบเชื้อ YLSV ในกระเทียม (2564)

ทดลองตรวจสอบเชื้อ YLSV จากส่วนต่างๆ ของกระเทียมเป็นโรค ได้แก่ ส่วนใบ และ ส่วนเนื้อของหัวกระเทียม เปรียบเทียบกับหน่ออ่อนอายุ 1 ½ เดือน ใบกระเทียมป็นโรคและใบกระเทียมไม่เป็นโรค

ขั้นตอนที่ 7 ทดสอบจำนวนหยดที่เหมาะสมโดยทดลองเปรียบเทียบจำนวนหยดที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจนโดยทดสอบที่จำนวน 3, 4 และ 5 หยด

การบันทึกข้อมูล

ความไวในการตรวจของ GLIFT kit ที่ผลิตได้

สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำคั้นจากกระเทียม

ประสิทธิภาพของชุด GLIFT kit ในตรวจสอบเชื้อ YLSV จากส่วนต่างๆ ของกระเทียม

จำนวนหยดที่เหมาะสมของตัวอย่างในการตรวจสอบ

2. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

☑ไม่มี ❑ มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)

☑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง เปลี่ยนหมวดค่าใช้สอยเป็นหมวดค่าวัสดุ 20%.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

สรุปผลการดำเนินงานที่ทำได้จริง โดยให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของโครงการ (สรุปภาพรวมของโครงการ)

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามาในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ประกอบด้วย 2 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชกักกัน จำนวน 8 ชนิด ให้ทันสมัย รวดเร็ว แม่นยำมากขึ้น ได้แก่ แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus, C. michiganensis* subsp. *nebraskensis, Burkholderia glumae, Ralstonia solanacearum species complex, Pseudomonas fuscovaginae,* ไวรัส*African Cassava Mosaic Virus, Sri Lankan cassava mosaic virus* และ รา *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามารุกรานในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชกักกัน

กิจกรรมที่ 2 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชที่สำคัญในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดให้ทันสมัย มีประสิทธิภาพ ลดขั้นตอนการจำแนกชนิด สามารถตรวจหาศัตรูพืชอย่างถูกต้องได้อย่างรวดเร็ว นำมาสู่การแนะนำการควบคุมโรคในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพได้แก่ ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris pv. campestris* ในพืชตระกูลกระหล่ำ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ชุดตรวจ(strip test) เชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้ม และชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* ในกระเทียม วิธีการตรวจหาวิธีการตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* ในไม้ผลหลายชนิด ได้แก่ ส้มโอ ฝรั่ง กล้วย แก้วมังกร ทับทิม ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยใช้primers ที่ออกแบบจากยีน immunodominant membrane protein genes (IDPs) วิธีการตรวจสอบราในสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรด้วยเทคนิค PCR วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* และ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* และแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* ด้วยเทคนิคPCR วิธีการตรวจแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค real-time PCR วิธีการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification และวิธีการตรวจจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค multiplex PCR นอกจากนี้ยังได้ แอนติบอดีที่เฉพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้แก่ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (PAb-SCMV-NSW) โพลิโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMPจาก *imp* gene ที่ความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล และแอนติบอดีที่เฉพาะต่อศัตรูพืชที่ได้ที่พัฒนาได้ในโครงการนี้ สามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และเพื่อการป้องกันกำจัด และ ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย ย่นระยะเวลาการ

กรมวิชาการเกษตร

ตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. ผลงานตีพิมพ์			**1. ผลงานตีพิมพ์**				
1.1 วารสารระดับชาติ	11	เรื่อง	1.1 วารสารระดับชาติ	11	เรื่อง	1. การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะจากยีน Cytochrome Oxidase I เพื่อตรวจวินิจฉัยแมลงวันแตง*Zeugodacus cucurbitae*(Coquillett) (Diptera: Tephritidae) เพื่อส่งเสริมการส่งออก **หลักฐานเชิงประจักษ์ อยู่ในผนวก ก** 2. การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real time PCR **<u>อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ</u>** 3. การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้า โดยเทคนิค Real time PCR **<u>อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ</u>** 4.การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR **<u>อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ</u>** 5. พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย **<u>อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ</u>**	เทคนิคการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามาในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
						6. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction **อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ** 7. การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) **อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ** 8. การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า **อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ** 9. การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR **อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ**	

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
						10. การตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิคแลมป์ **<u>อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ</u>** 11. การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้าและส่งออกด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง **<u>อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ</u>**	
1.2 วารสารระดับนานาชาติ	4	เรื่อง	1.2 วารสารระดับนานาชาติ	4	เรื่อง	การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบชนิดศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพรวดเร็วและความแม่นยำสูง **<u>อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ</u>**	เทคนิคการตรวจหาศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพรวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงเข้ามาในประเทศ และตรวจรับรองสินค้าเพื่อการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
2. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับชาติ	5	เรื่อง	**2. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับชาติ**	5	เรื่อง	การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบชนิดศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง **<u>อยู่ในระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ</u>**	เทคนิคการตรวจหาศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงเข้ามาในประเทศ และตรวจรับรองสินค้าเพื่อการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า
2. ต้นแบบผลิตภัณฑ์			**2. ต้นแบบผลิตภัณฑ์**				
ระดับภาคสนาม	1	ต้นแบบ	ระดับภาคสนาม	4	ต้นแบบ	1. ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris pv. campestris* ในพืชตระกูลกระหล่ำ **<u>หลักฐานเชิงประจักษ์ผนวก ข ภาพที่ 1</u>** 2. ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย **<u>หลักฐานเชิงประจักษ์ผนวก ข ภาพที่. 2</u>** 3. ชุดตรวจ(strip test) เชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้ม **<u>หลักฐานเชิงประจักษ์ผนวก ข ภาพที่ 3</u>**	ชุดตรวจสอบ มีความเฉาะเจาะจง สามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้อย่างถูกต้อง ในเวลารวดเร็วภายในระยะเวลา 5-10 นาที สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
						4. ชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* ในกระเทียม **<u>หลักฐานเชิงประจักษ์ผนวก ข ภาพที่ 4</u>**	
3. ต้นแบบเทคโนโลยี			**3. ต้นแบบเทคโนโลยี**				
ระดับห้องปฏิบัติการ	9	ต้นแบบ	ระดับห้องปฏิบัติการ	16	ต้นแบบ	1. การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real time PCR 2. การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้า โดยเทคนิค Real time PCR 3. การตรวจเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV)ศัตรูพืชกักกันในมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยา 4. เทคโนโลยีตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR 5. เทคโนโลยีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย 6. เทคโนโลยีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP	ต้นแบบเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูง

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
						7 เทคโนโลยีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction 8. เทคโนโลยีการตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) 9. วิธีการตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* ในไม้ผล ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล 10. วิธีการตรวจสอบราใน *Neoscytalidium. dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรด้วยเทคนิค PCR 11. วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Pepper chat fruit viroid (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 12. การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* 13. เทคโนโลยีการตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv.*campestris* ที่ติดมากับเมล็ด ด้วยเทคนิคreal-time PCR	

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
						14. เทคโนโลยีการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera:Tephritidae) เพื่อการนำเข้าและส่งออกด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง 15. วิธีการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification 16. เทคโนโลยีการใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita, M. javanica, M. arenaria* และ *M. enterolobii* **อยู่ในระหว่างการรวบรวมต้นฉบับเพื่อจัดพิมพ์เป็นเอกสารวิชาการและคู่มือการตรวจ**	

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
4. กระบวนการใหม่			**4. กระบวนการใหม่**				
ระดับห้องปฏิบัติการ	1	แบบ	ระดับห้องปฏิบัติการ	1	แบบ	การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย **อยู่ในระหว่างการรวบรวมต้นฉบับเพื่อจัดพิมพ์เป็นเอกสารวิชาการและคู่มือการตรวจ**	กระบวนการผลิตแอนติซีรั่มของแบคทีเรียและไวรัสสาเหตุโรคพืชที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
วิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลถูกนำไปใช้ในการในการติดตามและเฝ้าระวังศัตรูพืชต่างถิ่นหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และใช้ในการยืนยันสถานภาพของศัตรูพืชในประเทศและใช้ในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรส่งออกทำให้สามารถส่งออกสินค้าเกษตรได้ทำให้มีรายได้เข้าประเทศ รวมทั้งใช้ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชเพื่อการอารักขาพืชในประเทศด้วยเจ้าหน้าโดยเฉพาะชุดตรวจสอบศัตรูพืช strip test kit ที่สามารถนำไปใช้ตรวจในภาคสนามได้โดยผู้ตรวจไม่จำเป็นต้องมีความชำนาญสามารถตรวจได้และเป็นผลิตภัณฑ์ของไทยทำให้ไม่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ	2564

* ผลลัพธ์: ผลสำเร็จที่เกิดจากการนำผลผลิต (Output)ไปต่อยอด การเปลี่ยนรูปของผลผลิตไปสู่รูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง หรือการเคลื่อนผลผลิตไปสู่กิจกรรมที่ต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Change) ที่ปรากฏชัด และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
1. ใช้ในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรส่งออกทำให้สามารถส่งออกสินค้าเกษตรโดยไม่ถูกตีกลับจากประเทศคู่ค้าทำให้มีรายได้เข้าประเทศ	2564
2. การติดตามและเฝ้าระวังทำให้ศัตรูพืชต่างถิ่นไม่เข้ามาระบาดภายในประเทศและทำให้ทราบสถานภาพศัตรูพืชที่สำคัญในประเทศ	2564

* ผลกระทบ : ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงตามผลลัพธ์ (Results of the change) ซึ่งวัดได้อย่างชัดเจนและมีหลักฐานปรากฏชัด (Evidence-based) ทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ทั้งที่วัดในเชิงปริมาณได้และไม่ได้ ผลกระทบอาจเป็นได้ทั้งทางบวกและทางลบ

กรมวิชาการเกษตร

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์)

จัดทำคู่มือวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันและศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจและอบรมวิธีการตรวจสอบให้กับเจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืชและ เจ้าหน้าด่านตรวจพืชเพื่อนำไปใช้ในการติดตามและเฝ้าระวังศัตรูพืชต่างถิ่นหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศและใช้ในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรส่งออก รวมทั้งใช้ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชเพื่อการอารักขาพืช

ด้านนโยบาย โดยใคร.....(ระบุใครเป็นผู้นำไปใช้).....

อย่างไร..... (ระบุผลที่เกิดจากการนำไปใช้ประโยชน์ก่อให้เกิดผลอย่างไร).....

ด้านสังคม โดยใคร.....(ระบุใครเป็นผู้นำไปใช้).....

อย่างไร (ระบุผลที่เกิดจากการนำไปใช้ประโยชน์ก่อให้เกิดผลอย่างไร).....

ด้านเศรษฐกิจ โดย เจ้าหน้าที่ภาครัฐ โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่ปฏิบัติตาม พรบ กักพืช พ.ศ. 2507 แก้เพิ่มเติม รวมทั้งภาคเอกชนหรือเกษตรกร .....

อย่างไร นำวิธีการตรวจสอบที่พัฒนาเพื่อการตรวจหาศัตรูพืชในโครงการไปใช้ในการในการติดตามและเฝ้าระวังศัตรูพืชต่างถิ่นหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศทำให้ไม่ต้องเสียงบประมาณในการป้องกันกำจัดและใช้ในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรส่งออกทำให้สามารถส่งออกสินค้าเกษตรได้ทำให้มีรายได้เข้าประเทศ รวมทั้งใช้ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชเพื่อการอารักขาพืชในประเทศด้วยเจ้าหน้าโดยเฉพาะชุดตรวจสอบศัตรูพืช strip test kit ที่สามารถนำไปใช้ตรวจในภาคสนามได้โดยผู้ตรวจไม่จำเป็นต้องมีความชำนาญสามารถตรวจได้และเป็นผลิตภัณฑ์ของไทยทำให้ไม่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ .....

ด้านวิชาการ โดย นักวิชาการด้านอารักขาพืช เจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืชและ เจ้าหน้าด่านตรวจพืช .....

อย่างไร.. นำองค์ความรู้จากผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ ไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบศัตรูพืชอย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัด และนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชในสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและนำเข้า

*** คำจำกัดความการนำใช้ประโยชน์ในแต่ละด้าน**

1. ด้านนโยบายและสาธารณะ การนำความรู้จากงานวิจัยไปใช้ในกระบวนการกำหนดนโยบาย อาจเป็นนโยบายระดับประเทศ ระดับภูมิภาค ระดับจังหวัด ระดับท้องถิ่นการใช้ประโยชน์ด้านนโยบายจะรวมทั้งการนำองค์ความรู้ไปสังเคราะห์เป็นนโยบายหรือทางเลือกเชิงนโยบาย (Policy options) แล้วนำนโยบายนั้นไปสู่ผู้ใช้ประโยชน์ในวงกว้างเพื่อประโยชน์ของสังคม และประชาชนทั่วไป เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชน สร้างสังคมคุณภาพ และส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม

2. ด้านพาณิชย์/เศรษฐกิจ เป็นผลงานวิจัยที่เน้นสร้างนวัตกรรม เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ใหม่ หรือการพัฒนาจากสิ่งที่มีอยู่เดิม โดยเป็นการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์หรือลดการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศ หรือนำไปสู่การพัฒนารูปแบบธุรกิจใหม่ โดยมีเป้าหมายเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและบริการ

3. ด้านสังคมและชุมชน การนำกระบวนการ วิธีการ องค์ความรู้ การเปลี่ยนแปลงการเสริมพลัง อันเป็นผลกระทบ ที่เกิดจากการวิจัยและพัฒนาชุมชน ท้องถิ่นพื้นที่ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์การขยายผลต่อชุมชน ท้องถิ่น หรือรวมถึงสังคมอื่น

4. ด้านวิชาการ เป็นผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ การนำองค์ความรู้จากผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ระดับชาติหนังสือ ตำรา บทเรียน ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ การเรียนการสอนในวงนักวิชาการและผู้สนใจด้านวิชาการ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอดสื่อสาธารณะ การเผยแพร่ความรู้จาก

กรมวิชาการเกษตร

ผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ผ่านทางหนังสือพิมพ์ / วารสาร / โทรทัศน์ / วิทยุ / คู่มือ / แผ่นพับ การฝึกอบรม และสื่อสังคมออนไลน์ต่าง ๆ เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผล:

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร เนื่องจากแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus, C. michiganensis* subsp. *nebraskensis, Burkholderia glumae, Ralstonia solanacearum species complex, Pseudomonas fuscovaginae,* ไวรัส *African Cassava Mosaic Virus, Sri Lankan cassava mosaic virus* และ รา *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบศัตรูพืชเหล่านี้เพื่อป้องกันไม่ให้เข้ามารุกรานในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชกักกัน โดยจากผลการทดลองพบว่า สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชให้ทันสมัย รวดเร็ว แม่นยำมากขึ้น โดยไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* และ Cmn probe ความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดย Cms probe มีความไวในการตรวจที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ปฏิกิริยา และ Cmn probe มีความไวในการตรวจที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 50 pg/ปฏิกิริยา การพัฒนาตรวจสอบไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง ได้ออกแบบไพร์เมอร์ สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส ACMV เชื้อไวรัส CMVs รวมจำนวน 2 ชุด ได้แก่ **ชุดที่ 1** ประกอบด้วยไพร์เมอร์ทั้งหมดจำนวน 3 คู่ ได้แก่ ไพร์เมอร์คู่ที่ 1.1 และ ไพร์เมอร์คู่ที่ 1.2 สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV และ CMVs ได้อย่างแม่นยำ และไพร์เมอร์คู่ที่ 1.3 สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) และ SLCMV **ชุดที่ 2** ประกอบด้วยไพร์เมอร์ทั้งหมดจำนวน 4 คู่ ได้แก่ **ไพร์เมอร์คู่ที่ 2.1-2.4** ที่สามารถใช้สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) และ SLCMV การตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้ไพรเมอร์ BG1F/BG1R สำหรับตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่มีความเฉพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจแบคทีเรียความเข้มข้นเซลล์ 15 โคโลนี/มิลลิลิตร การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ได้อย่างเฉพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจเซลล์ความเข้มข้น 2.6×10^{3} โคโลนี/มิลลิลิตร และ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 5 พิโคกรัม/ไมโครลิตร การทดสอบเทคนิค LAMP สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในข้าว พบว่าชุดไพรเมอร์ Pf8 เกิดผลบวกกับแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* และ *B. glumae* มีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร วิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 โดยพบว่าไพร์เมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 สามารถตรวจได้จากทั้ง DNA template ที่สกัดได้จากตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่แสดงอาการของโรคตายพรายจากเชื้อรา Foc TR4 จากการตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ DNA-A และ DNA-B ของไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง จำนวน 12 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Next generation sequencing และนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree พบว่าเชื้อ SLCMV ของไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ SLCMV ที่ก่อให้เกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบรายงานในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม ลาว และจีน

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก

ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชที่สำคัญในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ผลการพัฒนาทำให้ได้ วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชที่ทันสมัย มีประสิทธิภาพ ลดขั้นตอนการจำแนกชนิด สามารถตรวจหาศัตรูพืชอย่างถูกต้องได้อย่างรวดเร็ว นำมาสู่การแนะนำการควบคุมโรคในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพได้แก่

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ในพืชตระกูลกระหล่ำ มีความไวในการตรวจเชื้อ Xcc 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV ที่สร้างจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV ค่าความเจือจางของแอนติซีรั่มสูงสุดที่ 16,384 เท่า

วิธีการตรวจสอบรา *P. citriasiana* ในไม้ผลหลายชนิด ได้แก่ สม้โอ ฝรั่ง กล้วย แก้วมังกร ทับทิม ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่ ได้แก่ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ITS4 และ PcDOAF3/ PcDOAR3

วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยใช้primers ที่ออกแบบจากยีน immunodominant membrane protein genes (IDPs)

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้ไวรัส LYSV โดยมีค่าไตเตอร์ 1:102400 โดยวิธี ELISA

วิธีการตรวจสอบราในสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อรา*N. dimidiatum* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 ที่สามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ NAD, คู่ไพรเมอร์ PC2 และคู่ไพรเมอร์ PCFVd ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนและคมชัด สามารถนำไปใช้กับงานในห้องปฏิบัติการที่เป็นงานประจำได้อย่างดีและเหมาะสม

การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SCMV-NSW (PAb-SCMV-NSW) มีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 6,400 - 12,800 โดยอัตราความเจือจางที่ 1:1,000 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพด และมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพด

การพัฒนาต้นแบบ (Prototype) ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย แต่ยังไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบได้ เนื่องจากความเข้มข้นไม่เหมาะสำหรับนำมาพัฒนาชุดตรวจสอบ แต่สามารถนำแอนติซีรัมที่ผลิตไปใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA แทนได้

การพัฒนาชุดตรวจ(strip test) เชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้มโดยใช้ crude CTV-IgG จากแอนติบอดีของไวรัสทริสเทซ่าเชื่อมเข้ากับ อนุภาคทองเท่ากับ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ standard 14 เป็น conjugate release และเมมเบรนชนิด CN140 (analytical memebrane) แสดงผลปฏิกิริยาได้ชัดเจน ผลปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นประมาณ 5-15 นาที ชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่าแบบ strip test ช่วยให้การตรวจสอบทำได้รวดเร็ว สะดวกโดยเฉพาะกับการนำไปตรวจในสภาพแปลง

กรมวิชาการเกษตร

การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สามารถใช้จำแนกแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ทุกระยะการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยเพื่อเฝ้าระวังแมลงศัตรูพืชและการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย

การผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMPจาก *imp* gene ที่ความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อย มีค่าไตเตอร์ 1:128 - 1:16,384 เท่า มีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

การพัฒนาวิธีการตรวจแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดได้ในอัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี เพียงแค่ที่อัตรา 1:100 เทคนิค real-time PCR จึงมีความไวเหมาะสมที่นำไปใช้เพื่อการตรวจเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

วิธีการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification เป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็วใช้เวลาประมาณ 30 นาที มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม

การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* สามารถใช้จำแนกทุกระยะการเจริญเติบโต (ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) ได้ภายระยะเวลา 2 – 3 ชั่วโมง สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยเพื่อเฝ้าระวังแมลงศัตรูพืชและการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย

วิธีการตรวจจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค multiplex PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดตรงตามเป้าหมาย และสามารถจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม ทั้ง 3 ชนิด ได้ในการทำปฏิกิริยาครั้งเดียว มีความจำเพาะเจาะจงและแม่นยำในการตรวจ และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืชได้

การพัฒนาชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส LYSV สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างน้ำคั้นใบกระเทียมที่เป็นโรค ที่ความเข้มข้น 1:10 เห็นผลภายในเวลา 5-6 นาที โดยสามารถตรวจหาไวรัส LYSV ในสภาพแปลงปลูกเพื่อคัดเลือกและตรวจสอบกระเทียมก่อนนำไปใช้ในการผลิตหัวพันธุ์กระเทียมปลอดโรคหรือการปรับปรุงพันธุ์กระเทียมได้ด้วยโดยสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้ด้วยตนเอง

อภิปรายผล: โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ดำเนินการในช่วงปี พ.ศ. 2563 – 2564 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามาในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ประกอบด้วย 2 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร ประกอบไปด้วย 7 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ได้แก่ แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus, C. michiganensis* subsp. *nebraskensis, Burkholderia glumae, Ralstonia solanacearum species complex, Pseudomonas fuscovaginae,* ไวรัส*African Cassava Mosaic Virus, Sri Lankan cassava mosaic virus* และ รา *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เพื่อ

กรมวิชาการเกษตร

ป้องกันไม่ให้เข้ามารุกรานในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชกักกัน โดยจากผลการทดลองพบว่า สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชให้ทันสมัย ตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย จะก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตรของประเทศไทย อีกทั้งสนับสนุนการเตรียมรับมือกับสถานการณ์การแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรงในปัจจุบัน

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก ประกอบไปด้วย 17 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและ นำไปใช้ในการนำไปใช้ในการตรวจศัตรูพืชอย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ผลการทดลอง สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ได้แก่ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้ม เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลจำนวน 9 วิธี 10 ชนิดศัตรูพืช ได้แก่ *Phyllosticta citriasiana* ราสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเชื้อไวรอยด์ *Pepper chat fruit viroid* แบคทีเรีย*X. campestris* pv. *campestris* ไส้เดือยนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* แมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* และ แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* และการผลิตแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช จำนวน 5 ชนิดได้แก่แบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* เชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* เชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล และแอนติบอดีที่เฉพาะต่อศัตรูพืชที่ได้ที่พัฒนาได้ในโครงการนี้ สามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศและเพื่อการป้องกันกำจัด และ ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย ย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

.....

.....

.....

.....

กรมวิชาการเกษตร

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

.....

.....

.....

.....

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ. 2559. สถิติการส่งออกข้าวโพด เดือนธันวาคม 2558. http://www.dft.go.th/Default.aspx?tabid=164

กรมส่งเสริมการเกษตร. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านเกษตร online. 2562. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: https://production.doae.go.th/service/report-product-statistic/ (11 กุมภาพันธ์ 2562).

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554, โรคผักและการป้องกันกำจัด, หน้า 138.

จันทร์เพ็ญ ปุ๊กสูงเนิน. 2551. การสำรวจและการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 88 หน้า.

ธีระ สูตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. บริษัทฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย กาญจนา วาระวิชะนี และวันเพ็ญ ศรีชาติ. 2555. การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1859-1889.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภาควิชาโครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว 2542. โรคใบขาวของอ้อยและยุทธการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว 2542. โรคใบขาวของอ้อยและยุทธการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว, ยุพา หาญบุญทรง พิศาล ศิริธร สมคิด บุญครอง และชุตินันท์ ชูสาย. 2541. การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระดับไร่โดยวิธี DNA probe. รายงานการประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติครั้งที่ 3, หน้า 50-61. กรุงเทพฯ. สมาคมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติร่วมกับสำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2544. มอลลิคิวท์สาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช สุธามาศ ณ น่าน บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และ ไมตรี พรหมมินทร์. 2550. โรคจุดดำของส้มโอสาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citricarpa*. หน้า 1-12. *ใน* การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยใต้ร่มพระบารมี” ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก. 20-22 พฤศจิกายน 2550.

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร ดวงสะอาด. 2558. การจำแนกชนิดของราสกุล *Phyllosticta* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม *ใน* รายงานความก้าวหน้าสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

พิสวรรณ เจียมสมบัติ อมรรัตน์ หล้าพรหม วิมล สีเทา และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2549. การตรวบพบ *Maize chlorotic mottle virus* ข้าวโพดหวานร่วมกับ *Sugarcane mosaic virus*. ประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติครั้งที่ 2 วันที่ 9-11 มีนาคม 2549 ณ สีดารีสอร์ท อ. เมือง จ. นครนายก (โปสเตอร์).

กรมวิชาการเกษตร

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ อมรรัตน์ หล้าพรหม และ วิมล สีเทา. 2547. การตรวจพบ *Maize chlorotic mottle virus* เข้าทำลายข้าวโพดหวานร่วมกับ Sugarcane mosaic virus. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2543. เอกสารประกอบคำบรรยาย เรื่องไวรัสสาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม 45 หน้า.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2544. โรคของมะเขือเทศที่เกิดจาก tomato spotted wilt virus. รายงานประจำปี 2544. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

ไมตรี พรหมมินทร์ แสนชัย คำหล้า และมนต์ชัย คงสมโอษฐ์. 2555. โรคที่สำคัญของส้ม. หน้า 9 – 25. ใน. การประชุมวิชาการส้ม “เหลียวหลัง แลหน้า อนาคตส้มไทย”. กรมวิชาการเกษตร และสมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย 21 -22 กุมภาพันธ์ 2555 ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่

ไมตรี พรหมมินทร์. 2534. โรคทริสเทซ่าและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรคกรีนนิ่ง. เอกสารวิชาการเทคโนโลยีป้องกันและกำจัดโรคส้ม กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 41 – 47.

ยุพา โพธิ์แก้ว. 2556. การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์นารันต์ สุรศักดิ์ แสนโคตร ทักษิณา ศันสยะวิชัย และสุนี ศรีสิงห์ 2555. SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูง. ผลงาวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตรประจำปี 2555. หน้า 1-15.กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN : 978-974-436-832-4.

รัชนีวรรณ ทวีแก้ว. 2549. **เทคนิคเรื่อง PCR**. รายวิชาวิทยาไวรัสเบื้องต้น ภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2549. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

รัตนา สดุดี. 2555. การพัฒนาการตรวจโรคทริสเตซาของส้มโดยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟิคลาเทอรัลโฟล์. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ลำพึง เรียงวงษ์ สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. หน้า 110-117.

วิกิพิเดีย สารานุกรมเสรี (2557). กระเทียม สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2557 Web site: http://th. wikipedia.org/wiki/กระเทียม

วิมล สีเทา. 2548. การตรวจวินิจฉัยและจำแนกทอสโพไวรัสของพริก มะเขือ แตงโม และถั่วลิสง ที่พบในประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

ศศิประภา มาราช คนึงนิตย์ เหรียญวรากร สุพัฒน์ อรรถธรรม และรัชนี ฮงประยูร. 2550. ผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้าที่เกิดจากเชื้อ *Columnea latent viroid*. **วารสารโรคพืช**. ปีที่ 21 เล่มที่ 1-2. หน้า 47-60.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2551. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ครั้งที่ 1. 25 น.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. กล้วย: เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2551 – 2561. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/banana.pdf (11 กุมภาพันธ์ 2562).

กรมวิชาการเกษตร

สำนักข่าวแห่งชาติ กรมประชาสัมพันธ์. 2551. ไบโอเทคพัฒนาชุดตรวจโรคใบขาวในอ้อย ชุดแรกของโลก แก้ปัญหาชาวไร่อ้อย. แหล่งที่มา :(http://thainews.prd.go.th/view.php?m_newsid= 255108050293&tb=N255108, 24 สิงหาคม 2554)

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. สถิติการส่งออก. http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php

สุภาพร กลิ่นคง พิสสวรรณ เจียมสมบัติ สุพัฒน์ อรรถธรรม และรุ่งโรจน์ อุทัศน์. 2540. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพืชบางชนิดที่พบในประเทศไทย,น.418 - 425.ในการประชุม ทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่35 สาขาพืช ส่งเสริมและนิเทศศาสตร์ เกษตร อุตสาหกรรมเกษตร วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพฯ.

สุรภี กีรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ เยาวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์” กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

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

Athipunyakom P, S. Seemadua and C. Doungsa-ard. 2015. Diseases of dragon fruit in Thailand: Incidence and Management Strategies pp. 95-106. In International Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing, Frengshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.

Barbara, D. J., Mortor, A., Clark, M. F., and Davies, D. L. 2002. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasma in the aster yellows clade (chlorante aster yellow and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. Microbiology. 148 : 157-167.

Bentley S., N.Y. Moore and J. Pattemore. 2003. *Fusarium wilt diagnostics laboratory manual*. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane.

Berg, M., Davies, D. l., Clark, M. F., Vetten, H. J., Maier, G., Marcone, C. and Seemuller, E. 1999. Isolation of gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. Microbiology. 145 : 1937-1943.

Blomquist, C. L., Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., and Kirkpatrick, B. C. 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. Microbiology. 147 : 571-580.

Blomquist, C. L., Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., and Kirkpatrick, B. C. 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. Microbiology. 147 : 571-580.

Boonham, N., P. Smith, K. Walsh, J. Tame, J. Morris, N. Spence, J. Bennison and I. Barker. 2002. The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). J. Virol. Methods. 101: 37-48.

Boontop, Yuvarin. 2016. Natural variation and biogeography of *Zeugodacus cucurbitae* in south-east Asia and the west-Pacific. Ph.D. Thesis. Queensland University of technology, Brisbane, Australia. 346 pp.

Bos, L. 1983. Viruses and virus diseases of Allium species. Acta Horticulturae 127: 11-29.

กรมวิชาการเกษตร

Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D.Z. 1978. Leek yellow stripe virus and its relationships to Onion yellow dwarf virus - characterization, ecology, and possible

Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera- sequence comparisons. *Arch. Virol*. 160, 1593-1619.

Calvert L.A. and J.M. Thresh. 2002. The Viruses and Virus Diseases of. Cassava,chapter 12. *In* CAB Internacional 2002. Cassava : Biology, Production and Utilization (ed. K. J. Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti) Kent ME4 4TB,UK. : 237-260.

Cenis, J.L., Perez, P., Fereres, A., 1993. Identification of aphid (*Homoptera*, Aphidae) species and clones by Random amplified polymorphic DNA, Ann. Entomol Soc Am. 86 : 545-550.

Cerovska, N., T. Moravec, P. Rosecka, P. Dedic and M. Filigarova. 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of Potato mop-top virus. Journal of Phytopathology 151 (4) : 195-200.

Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993 A simple and efficient method for isolating RNA from pine. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116.

Chittarath, K., Jimenez, J., Vongphachanh, P., Leiva, A.M., Sengsay, S., Lopez-Alvarez, D., Bounvilayvong, T., Lourido, D., Vorlachith, V., Cuellar, W.J., 2021. First report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and Cassava Mosaic Disease in Laos. *Plant Dis*. 105 (6). 1861.

Conde, B.D. and R.N. Pitkethley. 2001. The discovery, identification and management of banana Fusarium wilt outbreaks in the Northern Territory of Australia. In: Molina AB, Nik Masdek NH, Liew KW (eds) Banana Fusarium wilt management: towards sustainable cultivation. *Proceedings of the International workshop on the banana Fusarium wilt disease, Genting Highlands Resort, Malaysia*, 18–20 October 1999. INIBAP, Montpellier. p 260–265.

control. Netherlands Journal of Plant Pathology 84(5): 185-204. CAB International. 2007. Crop Protection Compendium 2007 Edition. (Computer Program).CAB International. Wallingford, UK.

Cove, D.J. 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity* 36, 191-203.

De Meyer, M., Delatte, H., Mwatawala, M., Quilici, S., Vayssieres, J. F., & Virgilio, M. (2015). A review of the current knowledge on *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)(Diptera, Tephritidae) in Africa, with a list of species included in Zeugodacus. *ZooKeys*, *(540)*, 539.

De Queiroz, K. (2007). Toward an integrated system of clade names. *Systematic Biology*, *56*(6), 956-974.

Dhillon, M. K., Singh, R., Naresh, J. S., & Sharma, H. C. (2005). The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. *Journal of Insect Science*, *5*(1), 40. doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.006

Dita M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, Jr M.T. Souza and G.H.J. Kema. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology* 59: 348-357.

Dita, M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, M.T. Jr Souza and G.H. Kema. 2011. Corrigendum. *Plant Pathology* 60: 384.

กรมวิชาการเกษตร

Divinagracia, G.G., B.L. Candole and E.T. Cadapan. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cattleyae* (Pavarino) saverlesco. Summary in Philippine Phytopathology 20: 3-4.

Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D.W. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44: 25-30.

Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44: 25-30.

Drew, R. A. I., & Romig, M. C. (2013). *Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia*. CABI.

Druka, A., T. Burns, S. Zhang and R. Hull. 1996. Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. J. Gen. Virology. 77: 1975-1983.

Dutt, N., Briddon, R.W., Dasgupta, I., 2005. Identification of a second begomovirus, *Sri Lankan cassava mosaic virus*, causing cassava mosaic disease in India. Arch. Virol. 150, 2101-2108.

Eran, O., Dana, B., Stephanie G., Jonathan B. and Tom R. 2005. The Bacterial ATPase SecA Functions as a Monomer in Protein Translocation. The Jounal of Biological Chemistry. 280(10) : 9097-9105.

Eran, O., Dana, B., Stephanie G., Jonathan B. and Tom R. 2005. The Bacterial ATPase SecA Functions as a Monomer in Protein Translocation. The Jounal of Biological Chemistry. 280(10) : 9097-9105.

Fargette, D., M. Jeger., C. Fauquet. and L.D. Fishpool. 1994. Analysis of Temporal Disease Progress of African Cassava Mosaic Virus. Phytopathology 54 ; 1 91-98.

Fauquet C. and D Fargette. (1990) African Cassava Mosaic Virus: Etiology, Epidemiology, and Control. Laboratoire de Phytovirologie, ORSTOM, Abidjan, Ivory Coast. Plant Disease. 74 : 404-411.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. FAOSTAT Database. Rome, Italy: FAO. Retrieved on June 2019 from http://www.fao.org/ faostat/en/#data/QC.

Fraser-Smith, S., E. Czislowski, R.A. Meldrum, M. Zander, G.R. Balali and E.A.B. Aitken. 2014. Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Patholology* 63: 1044 –1052. doi: 10.1111/ppa.12184.

Freeman W. M., S. J. Walker and K. E. Vrana. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. BioTechniques. 26(1): 112-22, 124-5.

Garland, D.L., S. Leuy, R. Miller, S. Moore and S. Reicherg. 1986. Comparison of techicon latex particle immunoassay for theophyline with the abbot TDX and high pressure liquid chromatography methods. Clinical Chemistry 32: 1104.

Gemechu A.L., Chiemsombat P., Attathom S.,Reanwarakorn K. and Lersrutaiyotin R. 2006. Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of *Sugarcane mosaic virus* isolated from sugarcane and maize in Thailand. Arch Virol. 151: 167–172

German, TL., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospoviruses : diagnisis, molecular biology, phytogeny, and vector relationships

Gross DC, Vidaver AK, 1979. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. Phytopathology, 69(1):82-87

Guamán Sarango (2009). Monitoring and pest control of Fruit flies in Thailand. Retrieved from http://stud.epsilon.slu.se/699/

Gudmestad, N. C., Mallik, I., Pasche, J. S., Anderson, N. R., and Kinzer, K. 2009. A real-timePCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. Plant Dis. 93:649-659.

Gudmestad, N. C., Mallik, I., Pasche, J. S., Anderson, N. R., and Kinzer, K. 2009. A real-timePCR assay for the detection of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus based on the cellulose A gene sequence. Plant Dis. 93:649-659.

Gutierrez, C., 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 19, 792-799.

Harrison, B.D. and D.J. Robinson. 2002. Green shoots of geminivirology. Physio. and Mol. Plant Pathology 60 : 215-218.

Higuchi, R., Dollinger, G, Walsh,P.S. and Griffith,R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY) 10:413-417.

Higuchi, R., Dollinger, G, Walsh,P.S. and Griffith,R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY) 10:413-417.

Hillocks R.J. and J. M. Thresh. 2000. Cassava Mosaic and Cassava Brown Streak Virus Disease in Africa : Acomparative guide to symptoms and aetiologies. *In* Roots7 (1) Special Issue December 2000. Kent ME4 4TB,UK. : 1-8.

Hiroyuki, M. and Koreaki, I. (2001). The Sec protein-traslocation pathway. TRENDS in Microbiology. 9(10) : 494-500.

Hiroyuki, M. and Koreaki, I. 2001. The Sec protein-traslocation pathway. TRENDS in Microbiology. 9(10) : 494-500.

Ibrahim, R. & Ibrahim, G.A. 1990. Handbook on Identification of Fruit Flies in the Tropics. Kaulalumpur, Malaysia, Universit Pertanian Malaysia Press.

Ie, T.S. 1970. Tomato Spotted wilt Virus. C.M.I./A.A.B. Plant Virus Deseription No. 39. 4 p.

Jeffries, C. and J. Tina. 2 n.d. 2004. Protocol for the Diagnosis of Quarantine Organism: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, EH 12 8NJ, United Kingdom.

Jiang, F., Jin, Q., Liang, L., Zhang, A. B., & Li, Z. H. (2014). Existence of species complex largely reduced barcoding success for invasive species of Tephritidae: a case study in *Bactrocera* spp. *Molecular ecology resources*, *14*(6), 1114-1128.0

Jiang, F., Li, Z. H., Deng, Y. L., Wu, J. J., Liu, R. S., &Buahom, N. (2013). Rapid diagnosis of the economically important fruit fly, *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker. *Bulletin of entomological research*, *103*(03), 363-371.

กรมวิชาการเกษตร

Jose, A., Makeshkumar T. and Edison S., 2008. Host range of *Sri Lankan cassava mosaic virus*. *J. Root Crops* 334, 21-25.

Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hosh, A., Maejima. K., Jung H.-Y., Yamaji, Y., and Namba, S., 2009. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas.

Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung H.-Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S.-I., Ugaki, M., and Namba, S., 2001. Cloning and Expression Analysis of Phytoplasma Protein Translocation Genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 14(9) : 1043-1050.

Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S, Ugaki, M., and Namba, S., 2004. Secretion of immunodominant membrane protein. from onion yellow phytoplasma through the Sec protein-ranslocation system in *Escherichia coli*. Microbiology. 150 : 135-142.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.

Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.

Klinkong, S. and Seemuller, E., 1993. Detection and differentiation of the mycoplasmalike organism associated with sugarcane white leaf disease using cloned extrachromosomal DNA probe. Kasetsart J. 27 : 98-103.

Kotze, I.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. Plant Disease 65:945-950.

Koyama, J., Kakinohana, H., &Miyatake, T. (2004). Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. *Annual Reviews in Entomology, 49*, 331-349.

Krosch, M.N., Schutze, M., Armstrong, K.F., Graham, G.C., Yeates, D.K. & Clarke, A.R. 2012. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol*. 35, 1547-1549.

Kumar, T., Sankar, A., R Nair, R., Edison, S., 2005. Detection of Cassava mosaic virus in India: Using polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization technique. *J. Root Crops* 31, 1-6.

Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., Gronenborn, B., 1995. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. Biochimie 77, 765-773.

กรมวิชาการเกษตร

Lee, I M., Hammond, R.W., Davis, R.E., and Gunderson. D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16 SrDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms Phytopathology 83 : 834-842.

Li, L., Wang, X. F., and Zhou G., 2004. Study on seed transmission of *Sugarcane mosaic virus*. Acta Phytopath. Sinica. 34(1): 37-42.

Li, L., Wang, X.F., and Zhou G., 2007. Analyses of maize embryo invasion by *Sugarcane mosaic virus*. Plant Sci. 172(1): 132-138.

Linderman J. R. and A. S. Greene. 2001. Distribution of agiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. Microcirculation. 8(4): 275-81.

Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., and Delecolle, B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Disease 82(12): 1381-1385.

Lunello, P., Ducasse, D.A., Heiguera, M., Nome, S.F., and Conci, V.C. 2002. An Argentinean isolate of Leek yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. Journal of Plant Pathology 84(1): 11-17.

MacKenzie, D.J., M.A. Mclean, S. Mukerji and M. Green. 1997. Improved RNA extraxtion from woody plant for the detection of virol pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Dis. 81 : 222-226.

Maryani, N; L. Lombard, Y.S. Poerba, S. Subandiyah, P.W. Crous and G.H.J. Kema. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92:155-194.

Marzachì, C., 2006. Molecular Diagnosis of Phytoplasmas. Arab J. Pl. Prot. 24 : 139-142.

Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94:61-68.

Morton, A., Davies, DL., Blomquist, CL., and Barbara, DJ., 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasma. Mol. Plant Pathol. 4 : 109-114.

Nader, M.M.E. 2005. Development and validation of lateral flow device (LDF) field test kit for diagnosis of potato ring rot. M.S. Thesis, Newcastle upon Tyne University.

Nakashima, K., Chaleeprom, W., Wongkaew, P., and Sirithorn, P., 1994. Detection of mycoplasmalike organism associated with white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA probes. JIRCAS. 1 : 57-67.

Nickel Osmar, Maria, L.P.N. Targon, Thor V.M. Fajardo, Marcos A. Machado and A. Trivilin. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of Apple stem grooving virus expressed in Escherichia coli : production and use in immunodiagnosis. Fitopatologia Brasileira 29 (5) : 558-562.

Nurhadi, Kamaruzaman Sijam and Inon Saiman.2003.Production of polyclonal antibody to the coat protein of Citrus tristeza virus in chicken eggs. Indonesian Jouranal od Agricultural Science 4(1) : 18 -26.

กรมวิทยาศาสตร์

O'Donnell, K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044–2049.

Opina, N.L. and S.A. Miller. 2005. Evaluation of immunoassays for detection of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of tomato and eggplant in the Philippines. Acta Horticulturae 695: 353-356.

Or E., Boyd, D., Gon, S., Beckwith, J., and Rapoport, T., 2005. The Bacterial ATPase SecA Functions as a Monomer in Protein Translocation. The Journal of Biological Chemistry. 280(10) : 9097-9105.

Pastrik K-H and Rainey FA. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. Journal of Phytopathology 147, 687-693..

Patrick Ollitraul and Luis Navarro in Marisa L.Badenes and David H. Byrne editor. 2012. Handbook of Plant Breeding.Springer press,N.Y.892 p.

Paul Campbell. 2015. Handout of virus training in Thailand by Mr. Murray Sharman and Mr. Paul Campbell.

PestID. 2012. Pest Identification Database (PestID). United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. https://mokcs14.aphis.usda.gov/aqas/login.jsp. (Archived at PERAL).

Peter, D. and R. Goldbach. 1995. The biology of tospoviruses, pp. 199-210. In R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Volume III : Viruses&Viroide. Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford.

Piñero, J. C., Ja´come, I., Vargas, R., &Prokopy, R. J. (2006).Response of female melon fly, *Bactroceracucurbitae*, to host-associated visual and olfactory stimuli. *EntomologiaExperimentalisetApplicata*, *121*, 261-269.

Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179–183.

Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnurn. 2011. First report of natural in fection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. New Disease Reports 24, 6.

Reischi, U. and Kochanowski B. 1999. Quantitative PCR. In Method in Molecur Medicine: Quantitative PCR Protocol. Edited by Kochanowski B.and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30.

Reischi, U. and Kochanowski B. 1999. Quantitative PCR. In Method in Molecur Medicine: Quantitative PCR Protocol. Edited by Kochanowski B.and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74, 5463-5467.Uke, A., Hoat, T.X., Quan, M.V., Liem, N.V., Ugaki, M., Natsuaki, K.T., 2018. First Report of *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* Infecting Cassava in Vietnam. *Plant Dis*. 102, 2669.

Santos C. F., E. B. Oliveira, M. C. O. Salgado and A. S. Greene. 2002. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastas-2, an angiotensin II-forming enzyme. J Cardiovasc Pharmacol. 39(5): 628-35.

Schubert, T., B. Sutton, and A. Jeyaprkash. 2010. Pest Alert: Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*)discovered in Florida (DACS-P-01723). Plant Pathology Section, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, FL.

Seemuller, E., Schneider, B., Murer, R., Ahrens, U., Daire, X., kison, H., Lorenz, k.-h., Hoffmann, A., Firrao, G., Avinet, L., and Stackebrandt, E., 1994. Phylogenetic Classification of Plant pathogenic mycoplasmas by sequence analysis of 16S rDNA. IOM letter 3 : 224-225.

Seemuller, E., Schneider, B., Murer, R., Ahrens, U., Daire, X., kison, H., Lorenz, k.-h., Hoffmann, A., Firrao, G., Avinet, L., and Stackebrandt, E., 1994. Phylogenetic Classification of Plant pathogenic mycoplasmas by sequence analysis of 16S rDNA. IOM letter. 3 : 224-225.

Seif. A.A. 1982. Effect of cassava mosaic virus on yield of cassava. Plant disease Reporter 66 (8): 661-662.

Shen,W.C. and Lin, C.P., 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organisms associated with sweetpotato witches'broom. Phytopathol. 83 : 671-675.

Shen,W.C. and Lin, C.P., 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organisms associated with sweetpotato witches'broom. Phytopathol. 83 : 671-675.

Shikata, E., Teng, W.S., and Matsumoto, T.,. 1969. Mycoplasma or PLT-like micro-organism detected in leaf of sugarcane plant infected with white leaf disease and suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetracycline group, J.Fac.Agri.,Hokkaido Univ. 56(2) : 70-90.

Shikata, E., W.S. Teng and T. Matsumoto, 1969. Mycoplasma or PLT-like micre-organism detected in leaf of sugarcane plant infected with white leaf disease and suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetra cycline grop , J.Fac. Agri., Hokkaido Univ. 56(2) : 70-90.

Singer, J.M. and C.M. Plotz. 1956. The latex fixation test application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. American Journal of Medicine 21: 888-892.

Snyder, W.C. and H.N. Hansen. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27:64-67.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.

Sutton, B.C and J.M Waterson. 1966. *Guignardia citricarpa*. No. 85 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Tamura, K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol. 30(12): 2725-2729.

Tosic, M. and R.E. Ford. 1972. Grass differentiating *sugarcane mosaic virus* and *maize dwarf mosaic virus*. Phytopathology 62: 1466-1470.

Virgilio, M., Jordaens, K., Verwimp, C., White, I. M., & De Meyer, M. 2015. Higher phylogeny of frugivorous flies (Diptera, Tephritidae, Dacini): Localised partition conflicts and a novel generic classification. *Molecular phylogenetics and evolution*85: 171-179.

Viswanathan, R., Karuppaiah, R. and Balamuralikrishnan, M. 2010. Detection of three major RNA viruses infecting sugarcane by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (multiplex-RT-PCR). *Australas.* Plant Path. 39(1): 79-84.

Wang, D., Yao, X.M., Huang, G.X., Shi, T., Wang, G.F., Ye, J., 2019. First Report of *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* Infected Cassava in China. *Plant Dis.* 103, 1437.

กรมวิชาการเกษตร

Wang, D., Zhang, X., Yao, X., Zhang, P., Fang, R., Ye, J., 2020. A 7-Amino-Acid Motif of Rep Protein Essential for Virulence Is Critical for Triggering Host Defense Against *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 33, 78-86.

Wang, H.L., Cui, X.Y., Wang, X.W., Liu, S.S., Zhang, Z.H., Zhou, X.P., 2016. First Report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* Infecting Cassava in Cambodia. *Plant Dis.* 100, 1029.

Wang, X., G. Chen, F. Huang, J. Zhang, K. D. Hyde, and H. Li. 2012. Phyllosticta species associated with citrus diseases in China. Fungal Diversity 52:209-224.

Warman, N.M. and E.A.B. Aitken. 2018. The Movement of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-9.

White, I. M., & Hancock, D. L. (1997). CABIKEY to the Dacini (Diptera, Tephritidae) of the Asia Pacific Australasian regions. Wallingford, UK: CAB International.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), pp. 315-322. Academic Press.

Wikee, S., D. Udayanga, P. W. Crous, E. Chukeatirote, E. H. C. McKenzie, A. H. Bahkali, D.-Q. Dai, and K. D. Hyde. 2011. Phyllosticta—an overview of current status of species recognition. Fungal Diversity 51:43-61.

Wu, Y., Li, Z. H., & Wu, J. J. (2009). Polymorphic microsatellite markers in the Melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology Resources,9*, 1404-1406.

Wulandari, N. F., C. To-anun, K. D. Hyde, L. M. Duong, J. de Gruyter, J. P. Meffert, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2009. Phyllosticta citriasiana sp. nov., the cause of Citrus tan spot of Citrus maximain Asia. Fungal Diversity 34:23-39.

Xia, X.C., Melchinger, A.E., Kuntez, L and Lubberstedt, T., 1999. Qualtitative trait loci mapping of resistance to *Sugarcane mosaic virus* in maize. Phytopathology 89(8): 660-667.

Yallow, R.S. and S.A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184: 1648-1649.

YE Lu-fei, SU Han, ZHOU Guo-liang, YIN Li-ping, LI Xiao-jun, YANG Sai-jun, YI Jian-ping, 2014. Detection of Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis in imported corn by PCR. ACTA Phytopathological sinica 44(2) 121-128.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ผนวก ก

กรมวิชาการเกษตร

การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะจากยีน Cytochrome Oxidase I เพื่อตรวจวินิจฉัยแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) เพื่อส่งเสริมการส่งออก

Development of Cytochrome Oxidase I Gene Specific Primers for Diagnosis of Melon Fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) for Export Promotion

ยุวรินทร์ บุญทบ [1*] ณัฏฐมา โฆษิตเจรญีกลุ [1] และ นพรัตน์ บัวหอม [2]
Yuvarin Boontop [1*], Nutthima Kositcharoenkul [1] and Nopparat Buahom [2]

[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 19000
[1] *Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 19000, Thailand*
[2] สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 19000
[2] *Office of Agricultural Regulation, Department of Agriculture, Bangkok 19000, Thailand*
**Corresponding author: Email: Yuvarin9320@gmail.com*

(Received: 8 March 2021; Accepted: 6 June 2021)

Abstract: The melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett), is a quarantine pest species for many countries. Larvae of melon fly are intercepted by quarantine inspections, but their morphological similarity to other fruit fly species makes identification difficult and unreliable. Rapid, precise identification of immature fruit flies associated with imported/exported fresh produce is essential to ensure appropriate biosecurity decisions at quarantine barriers, or where commodities are inspected prior to export. Species-specific primers were designed by amplifying the cytochrome oxidase I (*cox1*) gene to identify *Z. cucurbitae* in its various life stages. The species-specific assay demonstrated high specificity, sensitivity and reliability for 11 species examined (*Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. umbrosa, Dacus longicornis, Zeugodacus apicalis, Z. caudatus, Z. cilifera, Z. cucurbitae* and *Z. tau*). This study demonstrated the feasibility of using species-specific diagnostic tools (utilising 83 base pair sequences) for identifying fruit fly populations from all regions of Thailand. The primers were also validated on samples intercepted by plant inspections at Suvarnabhumi airport of agricultural products destined for exporting from Thailand. The primer pairs from this research are accurate, fast and efficient. Thus, they make it possible to detection of quarantine pests at early points in the production and export pathway. The present study is a model for developing diagnostic techniques for various pests which will in turn : promote trading partner confidence in Thai certification systems and enhance the diversity, quality and value of Thai agricultural products.

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

วารสารเกษตร 37(3): 289 - 303 (2564)

Keywords: Species-specific primer, fruit flies, melon fly

บทคัดย่อ: แมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) เป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก และจากการสุ่มตรวจศัตรูพืชในการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทยมักพบตัวหนอนแมลงวันผลไม้ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการกีดกันทางการค้าจากลักษณะสัณฐานของตัวหนอนที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้การระบุชนิดทำได้ยาก ดังนั้นการจำแนกชนิดของตัวหนอนแมลงวันแตงด้วยเทคนิคที่มีความรวดเร็วถูกต้อง แม่นยำ นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการส่งออกผลิตผลทางการเกษตร การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อศัตรูพืชนั้นถือว่าเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงมาก งานวิจัยนี้ได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์จำเพาะยีน *Cytochrome c oxidase subunit I* (*cox1*) ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* โดยทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. umbrosa, Dacus longicornis, Zeugodacus apicalis, Z. caudatus, Z. cilifera, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* ซึ่งให้ผลบวกเฉพาะ *Z. cucurbitae* มีขนาดดีเอ็นเอ 83 คู่เบส และพบว่าสามารถใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างแมลงวันแตงในระยะไข่หนอน ดักแด้และตัวเต็มวัยจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย รวมทั้งจากตัวหนอนที่ตรวจพบการปนเปื้อนในผลไม้ที่ต้องการส่งออกไปขายยังต่างประเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็วมีประสิทธิภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือวินิจฉัยเพื่อระบุชนิดแมลงวันผลไม้อันการส่งออกผักผลไม้ได้ทั้งสามารถเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ นำไปสู่การสร้างความมั่นใจให้กับประเทศคู่ค้า เพิ่มขีดความสามารถในการส่งออกสินค้าพืชผลทางการเกษตรของประเทศไทยและการเพิ่มมูลค่าของสินค้าเกษตรของไทย

คำสำคัญ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ แมลงวันผลไม้ แมลงวันแตง

คำนำ

แมลงวันแตง (melon fly): *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) สามารถเข้าทำลายและสร้างความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจมากกว่า 125 ชนิด (Piñero *et al*., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชวงศ์แตง เช่น แตงกวา แตงโม แคนตาลูป บวบเหลี่ยม ฟักทอง และมะระ เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพของผลผลิต พบความเสียหายจากการเข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรอยู่ระหว่าง 30 - 100 % (Dhillon *et al*., 2005) โดยพบความเสียหายต่อมะม่วง (12 - 60 %) ฝรั่ง (40 - 90 %) และมะละกอ (12 - 60 %) (Allwood and Leblanc, 1997) จัดเป็นศัตรูพืชที่มีสำคัญอันดับหนึ่งของพืชผัก ก่อให้เกิดผลกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไปยังตลาดโลก (De Meyer *et al*., 2015) เนื่องจากมักพบแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เข้าทำลายและพบปัญหาการปนเปื้อนของตัวหนอนแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ติดไปกับพืชผักที่ต้องการส่งออก ส่งผลกระทบต่อเนื่องในการส่งออกพืชผักผลไม้ของไทยไปยังต่างประเทศ เป็นสาเหตุหลักในการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย (Koyama *et al*., 2004; Piñero *et al*., 2006) และในปัจจุบันจากความเข้มงวดในการนำเข้าผักผลไม้จากไทยไปสู่ตลาดโลกมีมาตรฐานสูงขึ้น และมีการแข่งขันการส่งออกพืชผักและผลไม้ของประเทศในภูมิภาคอาเซียนสูงขึ้นตามลำดับ การจำแนกชนิดแมลงศัตรูพืชที่มีอีกวิธีไปกับการส่งออกหรือนำเข้านั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการใช้เป็นข้อมูลประกอบการส่งออกและนำเข้า แต่ปัจจุบันมีพบปัญหาการปนเปื้อนจากแมลงในพืชผักที่ต้องการส่งออก ผู้ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องปฏิบัติงานด้วยความรวดเร็วถูกต้องและแม่นยำ แต่หากมีการปนเปื้อนจากแมลงศัตรูพืชในระยะไข่หรือตัวหนอนนั้น หากใช้การตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิม (traditional taxonomy) จะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง

เพื่อให้ได้โปรโตคอลที่ดีที่สุดในการตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ที่ถูกต้องและรวดเร็ว จะสามารถช่วยประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (species - specific primer) ต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากยีน *cox1* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น DNA barcode (ดังเช่นมาตรฐานบรรณานุกรม ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้) ซึ่งเป็นการพัฒนาการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพให้เป็นไปตามมาตรฐานสากลมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจรับรองและจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชเพื่อให้เป็นไปตามเงื่อนไขการส่งออก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด (Figure 1) ใช้บัดกรอย่

Figure 1. Locations of sampling sites at different six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) where fruit flies were collected

กรมวิชาการเกษตร

วารสารเกษตร 37(3): 289 - 303 (2564)

แมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd., Australia ซึ่งประกอบด้วย สารล่อชนิดสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 2 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจีนอล (methyl eugenol) และคิวลัวร์ (cue lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 - กันยายน พ.ศ. 2561 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ด้วยลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd., Switzerland) ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ของ Drew and Romig (2013, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ต้องในแอลกอฮอล์ 95 % และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นรักษาอุณหภูมิ 20 °C

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้มาสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีของ Boontop *et al.* (2017) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่นิยมมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ขาของแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis Buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 - 20 ชั่วโมง หากการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์ร้อยละ (ethanol 100 %) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 1,000x g นาน 1 นาที ล้างตะกอน โดยการเติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 1,000x g นาน 1 นาที ตามด้วย Wash Buffer GW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 1,000x g นาน 1 นาที ทิ้งของเหลวที่เหลือ ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 1,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ละลายดีเอ็นเอโดยการเติม Elution Buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เย็นรักษาอุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal primer จากยีน *cox1*: LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al.*, 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 ไมโครเมตร ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 ไมโครเมตร ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial - denaturing 94 °C นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 °C 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 °C 30 วินาที 4) extension ที่ 72 °C 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2 - 4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 °C 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 % ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต์ (UV) บันทึกผลด้วย

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบระดับความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากงานวิจัยนี้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ด้วยการ BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) และเก็บบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจาเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษา (ข้อ 2) และแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานจากฐานข้อมูล GenBank มาจัดลำดับและทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Chromas (version, 2.33, Technelysium Pty Ltd., Australia) และ BioEdit เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* คัดเลือกตำแหน่ง single - nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งจะใช้ระบุชนิดของแมลง *Z. cucurbitae* เท่านั้นจากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง โดยอาศัยโปรแกรม Vector NTI (Invitrogen) Version 11.5.5 (https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html) โดยเลือกความยาวของไพรเมอร์ที่มีขนาด 18 - 25 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบมาวิเคราะห์ dimer hairpin และ false priming sites ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) และนำไพรเมอร์ออกแบบไว้มาวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงโดยการBLAST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง*Z. cucurbitae*

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง*Z. cucurbitae* กับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เก็บจากการสำรวจในประเทศไทย

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง*Z. cucurbitae* ในระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ โดยทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (laboratory samples) ในระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง*Z. cucurbitae* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations) จากตัวอย่างแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ที่เก็บรวบรวมมาจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง*Z. cucurbitae* กับตัวหนอนที่เจาะปนเปื้อนในพืช ผัก และผลไม้ที่เก็บจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) จากเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

4.5 ยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA,

กรมวิชาการเกษตร

วารสารเกษตร 37(3): 289 - 303 (2564)

USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักล่อโปรตีนชนิดน้ำจากสารละลายเมทิลยูจินอลและคิวลัวร์จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคใต้ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคตะวันตกของไทย นำตัวอย่างที่ได้มาจำแนกชนิดเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์พบแมลงวันผลไม้ทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. umbrosa, D. longicornis, Z. apicalis, Z. caudatus, Z. cilifera, Z. cucurbitae* และ *Z. tau*

2. การเตรียมดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490/HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 2) เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (Table1) และจากข้อมูลที่อ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. umbrosa, Dacus longicornis, Zeugodacus apicalis, Z. caudatus, Z. cilifera, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมของแมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ GenBank มาจัดลำดับและตรวจหาตำแหน่ง single - nucleotide polymorphisms (SNPs) ด้วยโปรแกรม Vector NTI (Invitrogen) พบตำแหน่ง SNPs ที่มีเฉพาะแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเป็นตำแหน่งที่เหมาะในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ มาออกแบบ forward primer และ reverse primer ได้ 1 คู่ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมที่ตำแหน่งเริ่มต้นที่ 488 จำนวน 25 คู่เบส และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 580 จำนวน 22 คู่เบส (Figure 3) เมื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo cal พบว่าเปอร์เซ็นต์ GC ของ forward และ reverse primers เท่ากับ 48 และ 59 ตามลำดับ มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ช่วงอุณหภูมิ 53 และ 60 °C (Table 2) ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้ ตั้งชื่อ Forward และ Reverse primers แต่ละเส้นว่า (*Zeugodacus cucurbitae* Forward: Zcu-F1 และ *Zeugodacus cucurbitae* Reverse: Zcu-R1) โดยไพรเมอร์คู่นี้สังเคราะห์ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 83 คู่เบส (Table 2) จากการวิเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นด้วยโปรแกรม Primer map พบว่าทั้งไพรเมอร์มีตำแหน่งอยู่บนยีน *cox1* ของแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์โดยโปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล GenBank พบว่าไพรเมอร์คู่นี้เส้นมีความเหมือนที่ 99 - 100 % กับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากยีน *cox1* (Table 3)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้ได้จริงโดยทำการทดสอบ 4 กรรมวิธี

กรมวิชาการเกษตร

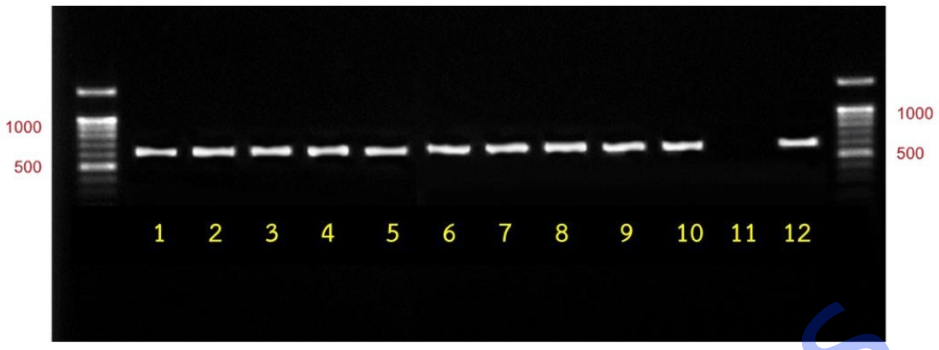


Figure 2. PCR results using the *cox1* (LCO1490 / HCO2198) universal primer pair

Lane 1 = *B. carambolae*	Lane 2 = *B. dorsalis*	Lane 3 = *B. latifrons*
Lane 4 = B. *umbrosa*	Lane 5 = *B. correcta*	Lane 6 = *D. longicornis*
Lane 7 = *Z. apicalis*	Lane 8 = *Z. caudatus*	Lane 9 = *Z. cilifera*
Lane 10 = *Z. tau*	Lane 11 = *Negative* (ddH2O)	Lane 12 = Positive (*Z. cucurbitae*)

Table 1. Collection details (scientific name, accession number, number of specimens and voucher specimen) of fruit flies in Thailand used in this study

	Scientific name	Accession number	No of specimens	Voucher specimen
1	*Bactrocera carambolae*	MW052780 - 84	10	EMBT.L(SEM) 1301 - 1320
		MW093419 - 23		
2	*Bactrocera correcta*	MW067300 - 09	10	EMBT0601.L(SEM) - 0620
3	*Bactrocera dorsalis*	MW052785 - 89	10	EMBT0701.L(SEM) - 0720
		MW093424 - 28		
4	*Bactrocera latifrons*	MW136282 - 93	12	EMBT0901.L(SEM) - 0920
5	*Bactrocera umbrosa*	MW376156 - 73	14	EMBT1301 - EMBT1320
6	*Dacus longicornis*	MW376179 - 83	5	EMBT0201 - EMBT0209
7	*Zeugodacus apicalis*	MW376174 - 77,	5	EMBT.0401 - EMBT0410
8	*Zeugodacus caudatus*	MW376156 - 73	14	EMBT1501 - EMBT1520
9	*Zeugodacus cilifera*	MW376133 - 41	9	EMBT2001 - EMBT2020
10	*Zeugodacus cucurbitae*	MW045505 - 14	20	EMBT1601.L(SEM) - 1620
		MW052790 - 94		
11	*Zeugodacus tau*	MW052795 - 99	10	EMBT1901.L(SEM) - 1920
		MW093429 - 33		

กรมวิทยาศาสตร์

วารสารเกษตร 37(3): 289 - 303 (2564)

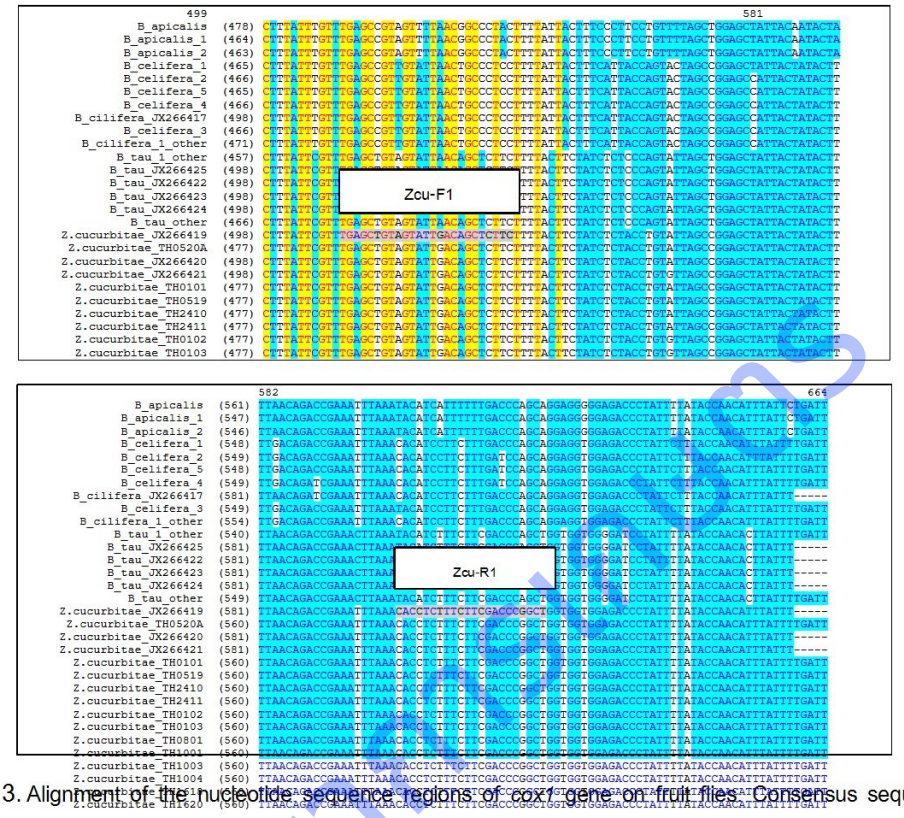


Figure 3. Alignment of the nucleotide sequence regions of cox1 gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad - spectrum primers for *Zeugodacus cucurbitae*. Nucleotide sequences of ZcuF1 and ZcuR1 primers are highlighted

Table 2. Nucleotide of sequences and properties of broad - spectrum primer set used in *Zeugodacus cucurbitae* screening in this study primer (primer name, sequences, position, no. of base pair, temperature (Tm), % GC and size of PCR product)

Primer name	Sequences	Position	No. of base pair	Tm	% GC	Size of PCR product
Zcu - F1 (Forward)	TGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTTC	518 - 542	25	53	48	83
Zcu - R1 (Reverse)	AGCCGGGTCGAAGAAAGAGGTG	580 - 601	22	60	59	83

Table 3. Nucleotide sequence analysis of the 83 bp DNA fragments from 20 melon fly samples amplified by species-specific primers compared with the GenBank database

No.	Melon fly with Acc. no. in GenBank	Voucher specimens	Primer	Samples with Acc. No	% Identity
1	MW363765	EMBT(SS)1601	Zcu - F1	KY615958.1	100 %
2	MW363766	EMBT(SS)1602	Zcu - R1	MF095182.1	100 %
3	MW363767	EMBT(SS)1603	Zcu - F1	MF095183.1	100 %
4	MW363768	EMBT(SS)1604	Zcu - R1	MG384735.1	99 %
5	MW363769	EMBT(SS)1605	Zcu - F1	MH667305.1	100 %
6	MW363770	EMBT(SS)1606	Zcu - R1	MH751503.1	100 %
7	MW363771	EMBT(SS)1607	Zcu - F1	MK296116.1	100 %
8	MW363772	EMBT(SS)1608	Zcu - R1	MN016981.1	100 %
9	MW363773	EMBT(SS)1609	Zcu - F1	MN256073.1	100 %
10	MW363774	EMBT(SS)1610	Zcu - R1	MN256082.1	100 %
11	MW363775	EMBT(SS)1611	Zcu - F1	MN256083.1	100 %
12	MW363776	EMBT(SS)1612	Zcu - R1	MN256084.1	100 %
13	MW363777	EMBT(SS)1613	Zcu - F1	MN256090.1	100 %
14	MW363778	EMBT(SS)1614	Zcu - R1	MN256092.1	100 %
15	MW363779	EMBT(SS)1615	Zcu - F1	MN256098.1	100 %
16	MW363780	EMBT(SS)1616	Zcu - R1	MN256101.1	100 %
17	MW363781	EMBT(SS)1617	Zcu - F1	MN256102.1	100 %
18	MW363765	EMBT(SS)1618	Zcu - R1	MN256103.1	100 %
19	MW363766	EMBT(SS)1619	Zcu - F1	MT474907.1	100 %
20	MW363767	EMBT(SS)1620	Zcu - R1	MT474908.1	100 %

4.1 การทดสอบประสทิธภิาพของไพรเมอร์ทมีคีวามจาเพาะต่อแมลงวนัแตง *Z. cucurbitae* กบัแมลงวนัผลไมช้นดิอนื ๆ

การทดสอบไพรเมอรก์บัตวัอย่างแมลงวนัผลไม้ 11 ชนดิ ไดแ้ก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. umbrosa, D. longicornis, Z. apicalis, Z. caudatus, Z. cilifera, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* พบวา่เมอืท าปฏกิริยิาPCR ดว้ยคูไ่พรเมอร์ทอีอกแบบ และตรวจวเิคราะหข์นาดของผลติภณัฑ์พซีอีารท์สีงัเคราะหไ์ดจ้ากคูไ่พรเมอรพ์บแถบดเีอน็เอขนาด 83 คูเ่บส ทจีา เพาะตอ่แมลงวนัแตง*Z. cucurbitae* ไดอ้ย่างชดัเจน และไมต่ดิปฏกิริยิากบัแมลงวนัผลไม้ชนดิอนื ๆ (Figure 4) แสดงใหเ้หน็วา่ไพรเมอรท์ีออกแบบนมีคีวามจ าเพาะตอ่แมลงวนัแตง*Z. cucurbitae* และมีความเหมาะสมส าหรบัการน าไปใชแ้ยกแมลงวนัแตง *Z. cucurbitae* ออกจากแมลงวนัผลไมช้นดิอนื ๆ

4.2 การทดสอบประสทิธภิาพของไพรเมอร์ทมีคีวามจาเพาะต่อแมลงวนัแตง *Z. cucurbitae* ต่อระยะการเจรญิเตบิโต (life stages) ต่าง ๆ

จากการทดสอบไพรเมอรท์มีคีวามจ าเพาะตอ่แมลงวนัแตง *Z. cucurbitae* ดว้ยเทคนคิ PCR กบัแมลงวนัแตง *Z. cucurbitae* ทเีลยีงจากหอ้งปฏบิตักิาร

กรมวิชาการเกษตร

วารสารเกษตร 37(3): 289 - 303 (2564)

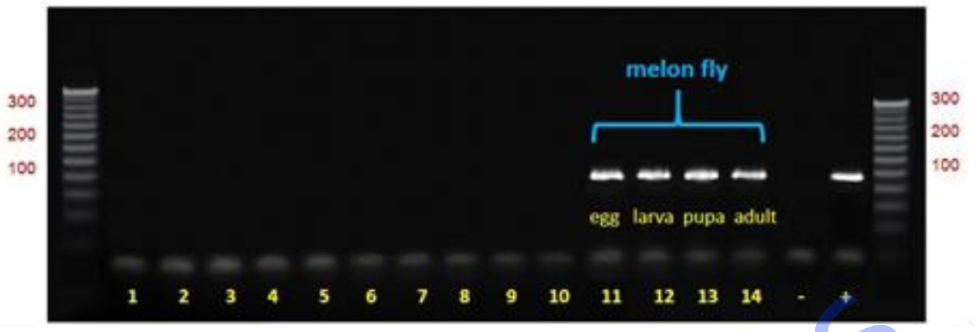


Figure 4. Specificity testing of the Zcu-F/Zcu-R *Zeugodacus cucurbitae*-specific primer pair

Lane 1 = *B. carambolae* Lane 2 = *B. dorsalis* Lane 3 = *B. latifrons* Lane 4 = *B. umbrosa*
Lane 5 = *B. correcta* Lane 6 = *D. longicornis* Lane 7 = *Z. apicalis* Lane 8 = *Z. caudatus*
Lane 9 = *Z. cilifera* Lane 10 = *Z. tau* Lane 11-14 = *Z. cucurbitae*
Lane 15 = Negative (ddH_2O) Lane 16 = Positive (*Z. cucurbitae*)

ในระยะไข่หนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย ระยะละ 50 ตัวอย่าง รวมเป็น จำนวน300 ตัวอย่าง และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอขนาด 83 คู่เบส ในทุกระยะการเจริญเติบโต (Figure 5) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนี้สามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* และมีความถูกต้อง 99 - 100 %

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations)

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับตัวอย่างแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จาก 6 ภูมิภาคของไทย ได้แก่ ภาคใต้ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคตะวันตก ทำการทดสอบกับลำดับตัวอย่างแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ภูมิภาคละ 50 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 300 ตัวอย่าง ผลที่ได้สามารถยืนยันได้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้สามารถใช้ได้กับตัวอย่างแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากภูมิภาคต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Figure 6)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* กับตัวหนอนที่พบปนเปื้อนในการส่งออก (intercepted samples)

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้กับลำดับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่พบการปนเปื้อนจากผักและผลไม้ที่มีการส่งออกไปขายยังต่างประเทศ จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง (Table 4) จากการสุ่มตรวจ ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 83 คู่เบส จากตัวอย่างหนอนที่พบการปนเปื้อนในถั่วฝักยาวที่มีการส่งออกไปประเทศอังกฤษ และสวิตเซอร์แลนด์ (Figure 7) และยืนยันความถูกต้องโดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99-100% แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้มีความจำเพาะกับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* และจากการนำตัวหนอนที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างบางส่วนมาเลี้ยงไว้เพื่อให้เป็นดักแด้เต็มวัย

กรมวิชาการเกษตร

และจัดจ าแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน และพบว่า ผลที่ได้จากนี้สอดคล้องกับข้อมูล าดับนิวคลีโอไทด์

ปัจจุบันหากมีการส ารวจพบระยะไข่หรือตัวหนอนของแมลงวันผลไม้นั้นติดไปกับพืช ผัก และผลไม้เพื่อการส่งออกหรือการน าเข้านั้นใช้การตรวจสอบชนิดศัตรูพืชแบบดั้งเดิมด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของตัวเต็มวัยเพียงเท่านั้น แต่การจ าแนกชนิดจากรูปร่างลักษณะของไข่หรือตัวหนอนนั้นเป็นเรื่องที่ ากการศึกษาได้ยาก เพราะไข่และตัวหนอนของแมลงวันผลไม้นั้นมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก (Boontop *et al*., 2020) ดังนั้น ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่ใช้ในการส่งออกหรือน าเข้านั้น หากมีการส ารวจพบระยะไข่หรือตัวหนอนของแมลงวันผลไม้นั้นติดไปกับพืช ผัก และผลไม้ก็จะท าให้ต้องเสียเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้ได้โตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน ดังนั้นระยะเวลาที่ต้องเสียไปในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ในระยะไข่หรือตัวหนอนเพื่อให้ได้โตเป็นตัวเต็มวัยนั้นเป็นสิ่งที่ต้องค านึงถึงเป็นอย่างมาก เพราะความล่าช้าที่เกิดขึ้นนี้จะส่งผลกระทบต่อการส่งออกและน าเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศ (Armstrong and Ball, 2005) ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคต้นชีวโมเลกุล เช่น การออกแบบไพรเมอร์ที่จาเพาะจงมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้จึงมีความจ าเป็นอย่างยิ่งซึ่งปัจจุบันมีการออกแบบไพรเมอร์ที่จาเพาะจงต่อแมลงวันผลไม้เพียง 3 ชนิด ได้แก่ *B. correcta* (Jiang *et al*., 2013) และ *B. zonata* และ *B. tau* (Asokan *et al*., 2011) แต่ในปัจจุบันทั่วโลกยังไม่มีข้อมูลการออกแบบไพรเมอร์ที่จาเพาะจงต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่ได้ท าการออกแบบไพรเมอร์ที่จาเพาะจงต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

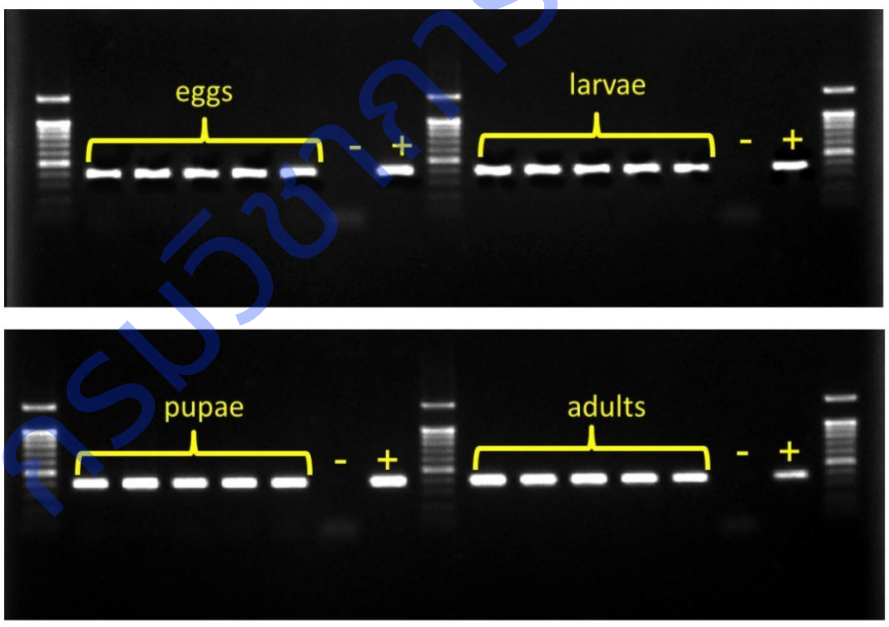


Figure 5. DNA from all stages of *Zeugodacus cucurbitae* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *Z. cucurbitae* -specific primer pair Zcu - F1 and Zcu - R1. Negative control is ddH_2O. Positive control sample is *Z. cucurbitae*

กรมวิชาการเกษตร

วารสารเกษตร 37(3): 289 - 303 (2564)

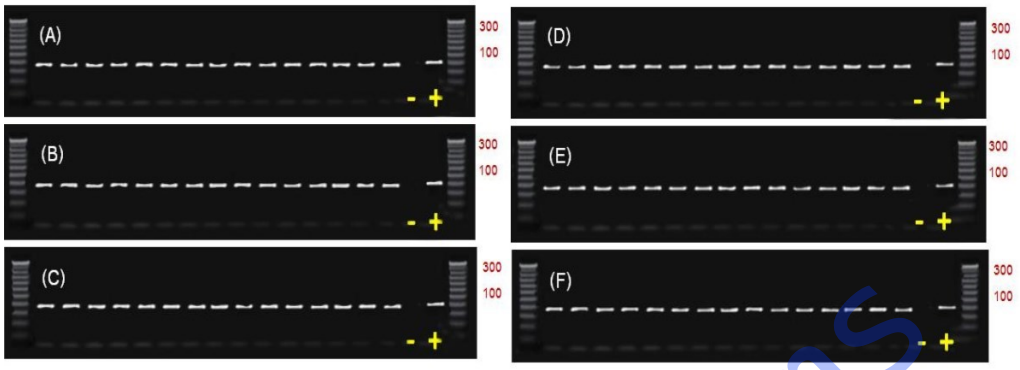


Figure 6. DNA of *Zeugodacus cucurbitae* from six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) was amplified using the *Z. cucurbitae* -specific primer pair Zcu-F1 and Zcu-R1. Negative control is ddH_2O. Positive control sample is *Z. cucurbitae*

Table 4. Detection of *Zeugodacus cucurbitae* intercepted using species-specific primer (ZcuF1 - ZcuR1). The details of intercepted fruits, scientific name, destination country, number of samples, results and scientific name of fruit fly were intercepted at plant quarantine, Suvarnabhumi Airport, Bangkok, Thailand

Intercepted fruits	Scientific name	Destination country	No. of samples	Results	Scientific name of fruit fly
1. Rose apple	*Syzygium samarangense* (Blume)	England	10	-	*B. correcta*
2. Yard long bean	*Vigna unguiculata* L.	England	10	+	*Z. cucurbitae*
3. Burmese grape	*Baccaurea ramiflora* Lour.	Spain	10	-	*B. carambolae*
4. Custard apple	*Annona reticulata* L.	China	10	-	*B. dorsalis*
5. Mango	*Mangifera indica* L.	Switzerland	10	-	*B. correcta*
6. Lychee	*Litchi chinensis* Sonn.	Switzerland	10	-	*B. dorsalis*
7. Custard apple	*Annona reticulata* L.	Denmark	10	-	*B. dorsalis*
8. Yard long bean	*Vigna unguiculata* L.	Switzerland	10	+	*Z. cucurbitae*
Total			80		

กรมวิชาการเกษตร

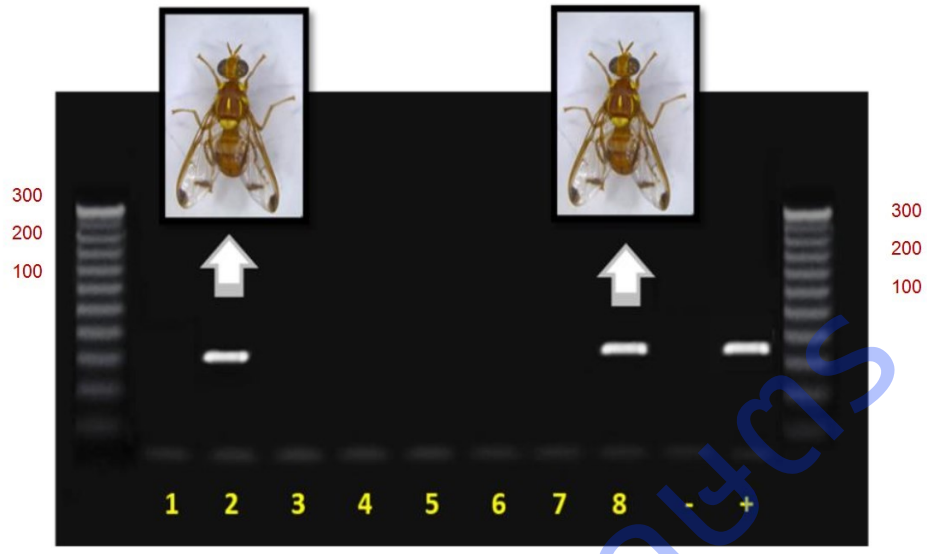


Figure 7. DNA from unknown larvae species was amplified using the *Zeugodacus cucurbitae* - specific primer pair Zcu - F1 and Zcu - R1
Lanes 1 - 8: Intercepted fruit fly larvae Lane 9: Negative ddH_2O Lane 10: Positive (*Z. cucurbitae*)

โดยการประยุกต์หลักการพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR กับ species specific DNA barcode และใช้เพียงขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรซีส ดังนั้น ระยะเวลาที่ใช้ในการระบุชนิดแมลงวันผลไม้เพียง 2 - 3 ชั่วโมง เท่านั้น สามารถตรวจวินิจฉัยได้ว่าเป็นแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* หรือไม่นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้ สามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ไม่ว่าจะเป็นระยะ ไข่หนอน ดักแด้หรือตัวเต็มวัย จึงสามารถจำแนกได้ว่าแมลงวันผลไม้ที่ตรวจพบนั้นเป็นแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* หรือไม่จากประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเจาะจง มีความรวดเร็ว และประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัยนับว่าให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย

สรุป

การศึกษาครั้งนี้สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากส่วนของยีน *cox1* ซึ่งใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ได้ทุกระยะการเจริญเติบโตเป็นอย่างดี และจากการนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไปใช้จำแนกชนิดของแมลงวันแตงที่ปนเปื้อนในผลผลิตที่ส่งออกไปขายยังต่างประเทศนั้น พบว่าสามารถใช้จำแนกได้จริง มีความแม่นยำ รวดเร็วและให้ผลสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงแมลงจนเป็นตัวเต็มวัย

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งกับการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญของประเทศไทยให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วตามมาตรฐานสากล นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการกักพืชต่อการวินิจฉัยเพื่อเฝ้าระวังแมลงศัตรูพืชและการนำเข้าและส่งออกผลผลิตของประเทศไทย

วารสารเกษตร 37(3): 289 - 303 (2564)

เอกสารอ้างอิง

Allwood, A.J. and L. Leblanc. 1997. Losses caused by fruit flies (Diptera: Tephritidae) in seven Pacific Island countries. pp. 208-211. *In*: A.J. Allwood and R.A.I. Drew (eds.). Management of Fruit Flies in the Pacific. ACIAR Proceedings No. 76, Canberra.

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

Asokan, R., K.B. Rebijith, S.K. Singh, A.S. Sidhu, S. Siddharthan, P.K. Karanth, R. Ellango and V.V. Ramamurthy. 2011. Molecular identification and phylogeny of *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae). Florida Entomologist 94(4): 1026-1035.

Boontop, Y., C. Buamas, K. Sonsiri, J. Duangthisan and S. Kaewsawat. 2020. Identification of economically important fruit fly larvae of Dacini (Diptera: Tephritidae) in Thailand using scanning electron microscopy (SEM). Thai Agricultural Research Journal 38(3): 293-306.

Boontop, Y., M.K. Schutze, A.R. Clarke, S.L. Cameron and M.N. Krosch. 2017. Signatures of invasion: using an integrative approach to infer the spread of melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), across Southeast Asia and the West Pacific. Biological Invasions 19(5): 1597-1619.

De Meyer, M., H. Delatte, M. Mwatawala, S. Quilici, J-F. Vayssieres and M. Virgilio. 2015. A review of the current knowledge on *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) in Africa, with a list of species included in *Zeugodacus*. ZooKeys 540: 539-557.

Dhillon, M.K., R. Singh, J.S. Naresh and H.C. Sharma. 2005. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. Journal of Insect Science 5(1): 40, doi: 10.1093/jis/5.1.40.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia. CABI, Wallingford. 653 p.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2016. Keys to the Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Diptera) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia. CABI, Wallingford. 487 p.

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

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

Jiang, F., Z.H. Li, Y.L. Deng, J.J. Wu, R.S. Liu and N. Buahom. 2013. Rapid diagnosis of the economically important fruit fly, *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker. Bulletin of Entomological Research 103(3): 363-371.

กรมวิชาการเกษตร

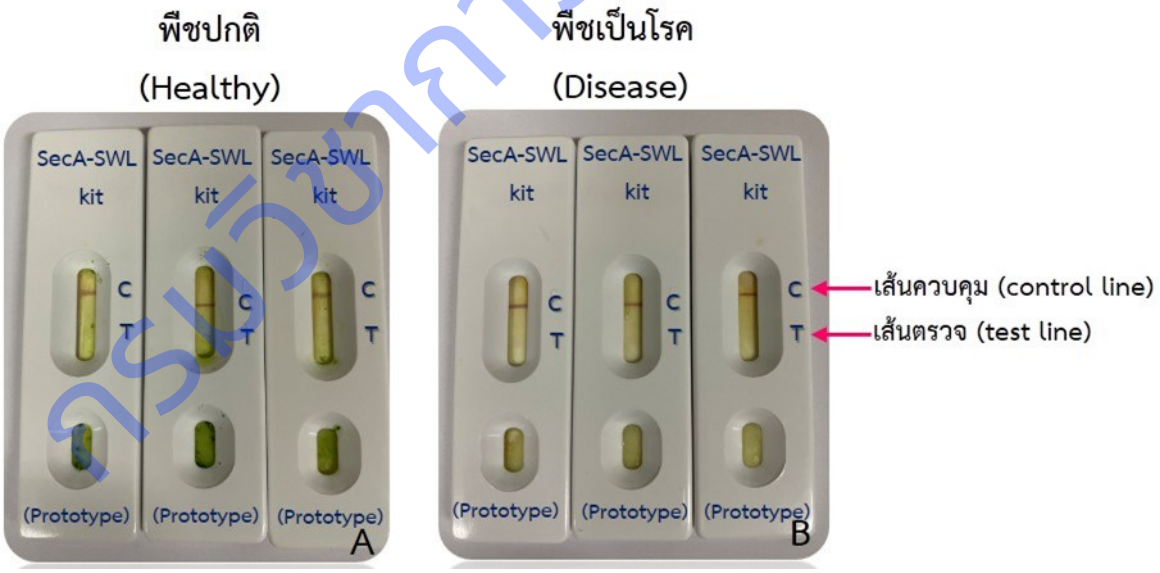
Koyama, J., H. Kakinohana and T. Miyatake. 2004. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. Annual Reviews of Entomology 49: 331-349.

Piñero, J.C., I. Jacome, R. Vargas and R.J. Prokopy. 2006. Response of female melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, to host-associated visual and olfactory stimuli. Entomologia Experimentalis et Applicata 121(3): 261-269.

กรมวิชาการเกษตร

ผนวก ข

ภาพที่ 1 ต้นแบบชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ในพืชตระกูลกระหล่ำ



ภาพที่ 2 ต้นแบบชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3 ต้นแบบชุดตรวจ(strip test) เชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้ม

ภาพที่ 4 ต้นแบบชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส Leek yellow stripe virus ในกระเทียม

กรมวิชาการเกษตร