รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อ การวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืช

The Establishment of Pests and Natural Enemies Database for Plant Protection Research and Development in Thailand

2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

กิจกรรม : การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae) ด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (ปีเริ่มต้น 2560 - 2563)

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development diagnostic technique of the economically important fruit fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae) using species specific primer

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ยุวรินทร์ บุญทบ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นายนพรัตน์ จันทร์หอม สังกัดสำนักควบคุมวัสดุทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

แมลงวันแตง (melon fly); *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) เป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก และจากการสุ่มตรวจศัตรูพืชในการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทยมักพบตัวอ่อนแมลวันผลไม้ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการกีดกันทางการค้า จากลักษณะสัณฐานของตัวอ่อนที่คล้ายคลึงกันมากทำให้การระบุชนิดนั้นทำได้ยาก ดังนั้นการจำแนกชนิดของตัวอ่อนแมลงวันแตงด้วยเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการส่งออกผลิตผลทางการเกษตร การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อศัตรูพืชนั้นถือว่าเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงมาก งานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์จากยีน *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, Z. apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* ซึ่งให้ผลบวกเฉพาะ *Z. cucurbitae* มีขนาดดีเอ็นเอ 83 คู่เบส และพบว่าสามารถใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างแมลงวันแตงในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย รวมทั้งจากตัวอ่อนที่ตรวจพบการปนเปื้อนในผักผลไม้ที่ต้องการส่งออกไป

กรมวิชาการเกษตร

ขายยังต่าง ประเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพแสดงให้เห็นว่าไพร์เมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือวินิจฉัยเพื่อระบุชนิดแมลงวันผลไม้ก่อนการส่งออกผัก ผลไม้ อีกทั้งสามารถเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ นำไปสู่การการสร้างความมั่นใจให้กับประเทศคู่ค้า เพิ่มขีดความสามารถในการส่งออกสินค้าพืชผลทางการเกษตรของประเทศไทยและการเพิ่มมูลค่าของสินค้าเกษตรของไทย

คำสำคัญ: การจำแนกชนิด แมลงวันผลไม้ แมลงวันแตง

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 identifications 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 differentiate *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, Z. apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, 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 export 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.

Keywords: Diagnostic, fruit flies, Melon fly

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

แมลงวันแตง (melon fly): *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) สามารถเข้าทำลายและสร้างความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจมากกว่า 125 ชนิด (Piñero *et al*., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงโม แคนตาลูป บวบเหลี่ยม ฟักทอง และมะระ เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพของผลผลิต พบความ

เสียหายจากการเข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรอยู่ระหว่าง 30 - 100 เปอร์เซ็นต์ (Dhillon *et al*., 2005) โดยพบความเสียหายต่อมะม่วง (12-60%) ฝรั่ง (40-90%) และมะละกอ (12-60%) (Allwood and Leblanc, 1997) จัดเป็นศัตรูพืชที่มีสำคัญอันดับหนึ่งของพืชผัก ก่อให้เกิดผลกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไปยังตลาดโลก (Meyer *et al*., 2015) เนื่องจากมักพบแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เข้าทำลายและพบปัญหาการปนเปื้อนของตัวอ่อนแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ติดไปกับพืชผักที่ต้องการส่งออก ส่งผลกระทบต่อเนื่องในการส่งออกพืช ผักผลไม้ของไทยไปยังต่างประเทศ เป็นสาเหตุหลักในการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย (Piñero *et al*., 2006; Koyama *et al*., 2004) และในปัจจุบันจากความเข้มงวดในการนำเข้าผักผลไม้จากไทยไปสู่ตลาดโลกมีมาตรฐานสูงขึ้น และมีการแข่งขันการส่งออกพืช ผัก และผลไม้ของประเทศในภูมิภาคอาเซียนสูงขึ้นตามลำดับนั้น การจำแนกชนิดแมลงศัตรูพืชที่มีโอกาสติดไปกับการส่งออกหรือนำเข้านั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการใช้เป็นข้อมูลยืนยันประกอบการส่งออกและนำเข้า แต่ปัจจุบันเมื่อพบปัญหาการปนเปื้อนจากแมลงในพืชผักที่ต้องการส่งออก ผู้ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องปฏิบัติงานด้วยความรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ แต่หากมีการปนเปื้อนจากแมลงศัตรูพืชในระยะไข่ หรือตัวอ่อนนั้น หากใช้การตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิม (traditional taxonomy) จะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งส่งผลกระทบต่อเนื่องต่อผู้ผลิตที่ต้องการส่งออก รวมทั้งก่อให้เกิดผลกระทบต่อการส่งออกและนำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศอีกด้วย (Armstrong and Ball, 2005)

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ใช้การศึกษาทางอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมซึ่งใช้ลักษณะทางสัณฐานภายนอกเท่านั้น ดังนั้นการจำแนกชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ให้มีความถูกต้อง และรวดเร็ว จะสามารถช่วยประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งสร้างมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยให้เทียบเท่าระดับสากลจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (species - specific primer) ต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากยีน *cox1* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น DNA Barcode (ดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณสั้น ๆ ที่มีศักยภาพในการใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้) ซึ่งเป็นการพัฒนาการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพให้เป็นตามมาตรฐานสากลนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจรับรองและจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชเพื่อให้เป็นไปตามเงื่อนไขการส่งออก

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) สารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ เมทิล ยูจีนอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ

- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag (Bioline, Australia) HS Red DNA Polymerase และ $MgCl_2$

- สารเคมี และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด (Figure 1) ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd, Australia ซึ่งประกอบด้วยสำลีชุบสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 2 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจินอล (Methyl Eugenol) และคิวลัวร์ (CUE lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 - กันยายน พ.ศ. 2561 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ของ Drew and Romig (2013, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ดองในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้มาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธี Boontop *et al*., (2017) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ข้างของแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis Buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารลาย Protinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 20 ชั่วโมง ทำการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ล้างตะกอน โดยการเติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ตามด้วย Wash Buffer GW2 ปริมาตร 500

กรมวิชาการเกษตร

ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ทิ้งของเหลวที่เหลือตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ละลายดีเอ็นเอ โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal primer จากยีน *cox1*: LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al*., 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 µM 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 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบระดับความเหมือน (% 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*

กองวิทยทรัพยากร

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษา (ข้อ 2) และแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชกักกันจากฐานข้อมูล GenBank มาจัดลำดับและทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม chromas (version, 2.33, Technelysium Pty Ltd, Australia) และ BioEdit เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* คัดเลือกตำแหน่ง single - nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งจะใช้ระบุชนิดของแมลง *Z. cucurbitae* เท่านั้น จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยโปรแกรม GeneFisher (http://www.bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher/) โดยเลือกความยาวของไพรเมอร์ที่มีขนาด 18 - 25 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบมาวิเคราะห์ dimer hairpin และ false priming sites ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) และนำไพรเมอร์ออกแบบไว้มาวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงโดยการ BLAST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* กับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจในประเทศไทย

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

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

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนในพืช ผัก และผลไม้ที่พบจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) จากเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

4.5 ยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ให้บริสุทธิ์และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

- **การบันทึกข้อมูล**

1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

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

2. การเตรียมดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490 / HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 2) เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (Table1) และจากข้อมูลที่ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. umbrosa, D. longicornis, Z. apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ GenBank มาจัดลำดับและตรวจหาตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) ด้วยโปรแกรม Vector NIT (invitrogen) (https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html) พบตำแหน่ง SNPs ที่มีเฉพาะแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ มาออกแบบ Forward primer และ Reverse primer ได้ 1 คู่ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมที่ตำแหน่งเริ่มต้นที่ 488 จำนวน 25 คู่เบส และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 580 จำนวน 22 คู่เบส (Figure 3) เมื่อนำไป

กรมวิชาการเกษตร

วิเคราะห์คุณสมบัติของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) พบว่า % GC ของ Forward และ Reverse primers เท่ากับ 48 และ 59 ตามลำดับ มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ที่อุณหภูมิ 53 และ 60 องศาเซลเซียส (Table 2) ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้ ตั้งชื่อ Forward และ Reverse primers แต่ละเส้นว่า (***Z****eugodacus* ***cu****curbitae* **F**orward: Zcu-F1 และ ***Z****eugodacus* ***cu****curbitae* **R**everse: Zcu-R1) โดยไพรเมอร์คู่นี้สังเคราะห์ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 83 คู่เบส จากการวิเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นด้วยโปรแกรม Primer map (https://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html) พบว่าทุกไพรเมอร์มีตำแหน่งอยู่บนยีน *cox1* ของแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ โดยโปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล GenBank พบว่าไพรเมอร์ทุกเส้นมีความเหมือนที่ 99 -100% กับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากยีน *cox1* (Table 3)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพและสามารถใช้ได้จริงโดยทำการทดสอบ 4 กรรมวิธี

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. umbrosa, D. longicornis, Z. apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ และตรวจวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้จากคู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 83 คู่เบส ที่จำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ได้อย่างชัดเจน และไม่เกิดปฏิกิริยากับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ (Figure 4) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* และมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้แยกแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ต่อระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ด้วยเทคนิค PCR กับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ที่เลี้ยงจากห้องปฏิบัติการในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ระยะละ 50 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวน 300 ตัวอย่าง และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอขนาด 83 คู่เบส ในทุกระยะการเจริญเติบโต (Figure 5) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* และมีความถูกต้อง 99 - 100%

กรมวิชาการเกษตร

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

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

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

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่พบการปนเปื้อนจากผักและผลไม้ที่ต้องการส่งออกไปขายยังต่างประเทศ จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง (Table 4) จากการสุ่มตรวจ ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 83 คู่เบส จากตัวอย่างหนอนที่พบการปนเปื้อนในถั่วฝักยาวที่ต้องการส่งออกไปประเทศอังกฤษ และสวิตเซอร์แลนด์ (Figure 7) และยืนยันความถูกต้องโดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100% แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะกับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* และจากการนำตัวหนอนที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างบางส่วนมาเลี้ยงไว้เพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย และจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน และพบว่าผลที่ได้จากนั้นสอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ปัจจุบันหากมีการสำรวจพบระยะไข่ หรือตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้นั้นติดไปกับพืช ผัก และผลไม้ ที่ต้องการส่งออกหรือการนำเข้านั้นใช้การตรวจสอบชนิดศัตรูพืชแบบดั้งเดิมด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของตัวเต็มวัยเพียงเท่านั้น แต่การจำแนกชนิดจากรูปร่างลักษณะของไข่ หรือตัวอ่อนนั้นเป็นเรื่องที่ทำการศึกษาได้ยาก เพราะไข่และตัวหนอนของแมลงวันผลไม้นั้นมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก (ยุวรินทร์ และคณะ, 2562) ดังนั้นในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่พบในการส่งออกหรือนำเข้านั้น หากมีการสำรวจพบระยะไข่ หรือตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้นั้นติดไปกับพืช ผัก และผลไม้ ก็จะทำให้ต้องเสียเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน ดังนั้นระยะเวลาที่ต้องเสียไปในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ หรือตัวหนอนเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัยนั้นเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างมาก เพราะความล่าช้าที่เกิดขึ้นนั้นจะส่งผลกระทบต่อการส่งออกและนำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศ (Armstrong and Ball, 2005) ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุล เช่นการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งปัจจุบันมีการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันผลไม้เพียง 2 ชนิด ได้แก่ *B. correcta* (Jiang *et al*., 2013) และ *B. zonata* และ *B. tau* (Asokan *et al.*, 2011) แต่ในปัจจุบันทั่วโลกยังไม่มีข้อมูลการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* โดยการประยุกต์หลักการพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR กับ species specific DNA Barcode และใช้เพียงขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบ

กรมวิชาการเกษตร

ขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการระบุชนิดแมลงวันผลไม้จะสั้นมากเพียง 2-3 ชั่วโมง เท่านั้น ก็สามารถตรวจวินิจฉัยยืนยันได้ว่าเป็นแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* หรือไม่ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ไม่ว่าจะเป็นระยะ ไข่ หนอน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัย จึงสามารถได้ว่าแมลงวันผลไม้ที่ตรวจพบนั้นเป็นแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* หรือไม่ จากประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเจาะจง มีความรวดเร็ว และประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัยนั้นก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อ การส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจวินิจฉัยชนิดศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับการส่งออกหรือนำเข้าสินค้าเกษตร เมื่อพบปัญหาการปนเปื้อนจากศัตรูพืช เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชหรือนักอนุกรมวิธานแมลงผู้ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องปฏิบัติงานด้วยความรวดเร็วและแม่นยำ แต่หากพบการปนเปื้อนจากแมลงศัตรูพืชในระยะไข่ ตัวอ่อน หรือดักแด้นั้น ถ้าใช้การตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิมจะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งเวลาที่สูญเสียไปนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงชนิดนั้น ๆ และการเสียเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เป็นตัวเต็มวัยนั้นก่อให้เกิดผลกระทบต่อการนำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศอีกด้วย ดังนั้นเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลที่มีความรวดเร็ว จึงเข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากในการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชที่ปนเปื้อนกับการส่งออกและนำเข้า ดังนั้นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จึงก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งกับการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของไทยให้มีความถูกต้องตามมาตรฐานสากล แม่นยำ และรวดเร็วทันเหตุการณ์ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถใช้ได้กับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ทุกระยะการเจริญเติบโต ทำให้สามารถจำแนกชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการกักกันพืช ต่อการวินิจฉัยเพื่อเฝ้าระวังแมลงศัตรูพืชและการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย

ผลลัพธ์จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยเป็นต้นแบบและสามารถนำไปต่อยอดในการตรวจวินิจฉัยชนิดการตรวจสอบจำแนกชนิดศัตรูพืชอีกหลายชนิด อีกทั้งยังสามารถนำไพรเมอร์ที่ออกขึ้นมาอย่างจำเพาะเจาะจงไปพัฒนาเทคนิคการตรวจตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช อย่างเช่น Multiplex PCR, Real-time PCR หรือ Loop-Mediated Isothermal Amplification หรือชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ หรือพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบในภาคสนาม ลดขั้นตอนความยุ่งยาก และมีค่าใช้จ่ายที่ลดน้อยลง ถือเป็นการสร้างและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมของประเทศ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. แก้ไขปัญหาการขาดแคลนบุคลากรที่มีความชำนาญหรือประสบการณ์ในการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ เนื่องจากเทคนิคที่มีการพัฒนาขึ้นมานั้น ใช้ง่ายและไม่จำเป็นต้องใช้ประสบการณ์หรือความชำนาญในการปฏิบัติ

2. ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการกักกันพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

3. เพิ่มความเชื่อมั่นและสร้างความน่าเชื่อถือในการเจรจาต่อรองเพื่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยไปสู่ตลาดโลก เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย ส่งผลในองค์รวมต่อความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของประชาชนชาวไทย

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) -

12. เอกสารอ้างอิง

ยุวรินทร์ บุญทบ ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนสิริ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร สิทธิสิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2562. การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphometrics ในตัวเต็มวัย. หน้า 402-417 ใน การประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 14 ระหว่างวันที่ 12-14 พฤศจิกายน 2562 โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี.

Allwood, A.J. and L. LeBlanc, 1997. Losses caused by fruit flies in seven Pacific island countries. In: Allwood, A.J. and Drew, R.A.I., ed., Management of fruit flies in the Pacific. Canberra, ACIAR Proceedings No. 76, 208-211.

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, Shakti K. Singh, A. S. Sidhu, S. Siddharthan, Praveen. K. Karanth, R. Ellango, and V.V. Ramamurthy. 2011. Molecular identification and phylogeny of *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae). The Florida Entomologist 94(4): 1026-035.

Boontop, Y., M. K. Schutze, A.R. Clarke, Cameron, S.L. 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, 1-23 pp.

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.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia. CABI. London, UK. 664 pp.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2016. Keys to the tropical fruit flies of South-East Asia. CABI, London, UK. 487 pp.

กรมวิชาการเกษตร

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. In 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(03): 363-371.

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 in Entomology 49: 331-349.

Piñero, J.C., I. Ja´come, R. Vargas and R.J. Prokopy. 2006. Response of female melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, to host-associated visual and olfactory stimuli. Entomologia Experimentaliset Applicata 121: 261-269.

กรมวิชาการเกษตร

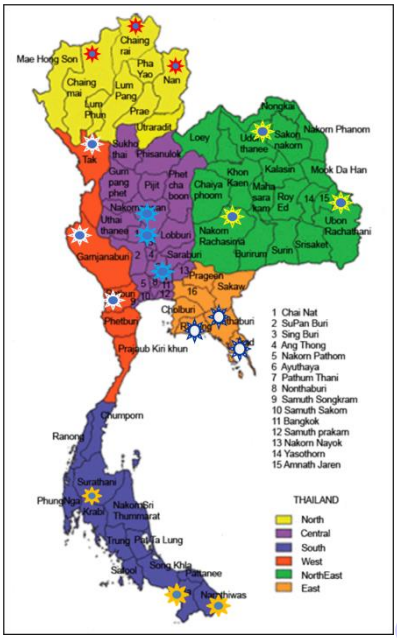

Figure 1 Locations of sampling sites in the six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) at which fruit flies were collected.

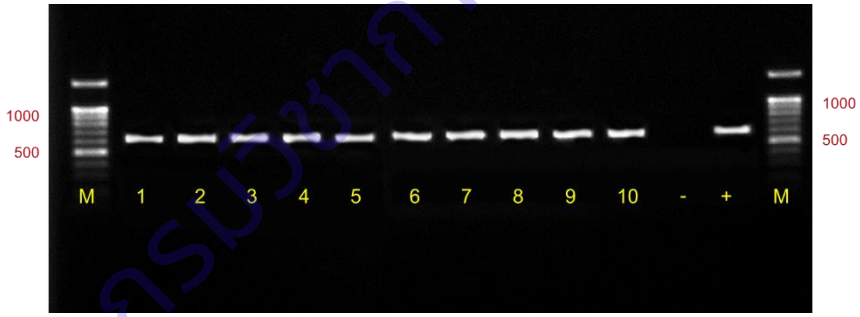

Figure 2 PCR results using the cox1 (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

Lane 1 = *Bactrocera carambolae* Lane 2 = *B. dorsalis* Lane 3 = *B. latifrons*

Lane 4 = *B. umbrosa* Lane 5 = *B. correcta* Lane 6 = *Dacus longicornis*

Lane 7 = *Zeugodacus caudatus* Lane 8 = *Z. apicalis* Lane 9 = *Z. cilifera*

Lane 10 = *Z. tau* Lane 11 = Negative

Lane 12 = Positive (*Z. cucurbitae*)

กรมวิชาการเกษตร

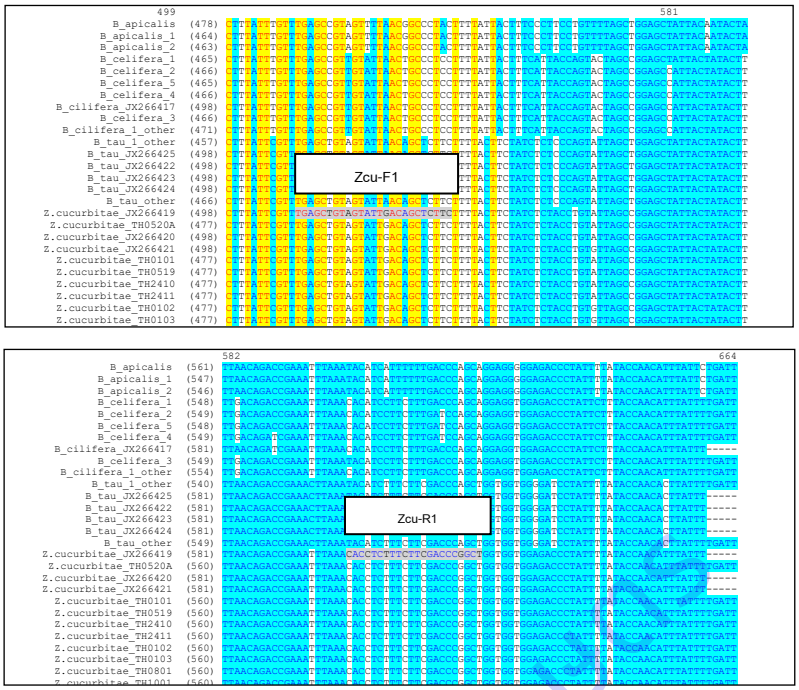

Figure 3 Alignment of the nucleotide sequence regions of *cox1* gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Zeugodacus cucurbitae*. Nucleotide sequences of ZcuF1 and ZcuR1 primers are highlighted.

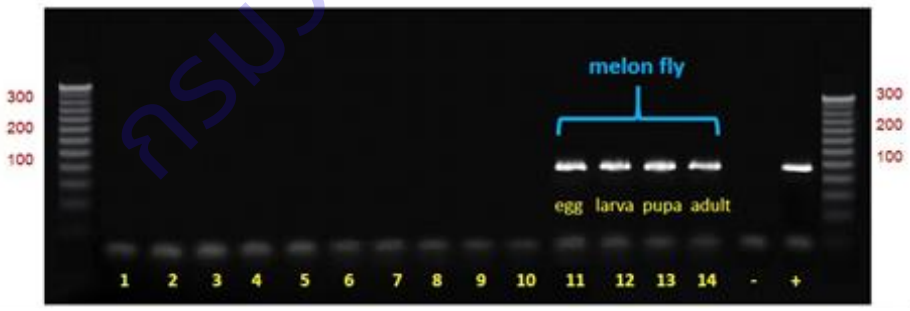

Figure 4 Specificity testing of the Zcu-F/ Zcu-R *Zeugodacus cucurbitae*-specific primer pair.

Lane 1 = *Bactrocera carambolae* Lane 2 = *B. dorsalis* Lane 3 = *B. latifrons*

Lane 4 = *B. umbrosa* Lane 5 = *B. correcta* Lane 6 = *Dacus longicornis*

Lane 7 = *Zeugodacus caudatus* Lane 8 = *Z. apicalis* Lane 9 = *Z. cilifera*

Lane 10 = *Z. tau* Lane 11-14 = *Z. cucurbitae*

Lane 15 = Negative (ddH_2O) Lane 16 = Positive (*Z. cucurbitae*)

กรมวิชาการเกษตร

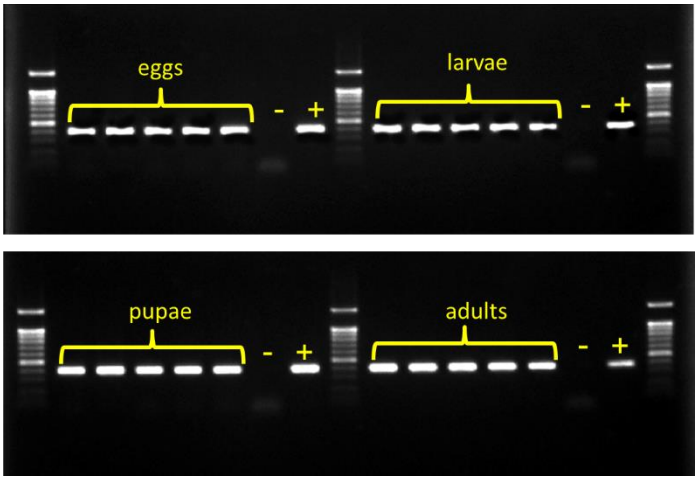

Figure 5 DNA from all stage of *Zeugodacus cucurbitae* (eggs, lavae, pupae and adults) was amplified using the *Z. cucurbitae* -specific primer pair Zcu-F1 and Zcu-R1. Negative control is ddH2O. Positive control sample is *Z. cucurbitae*. Lane M: D2000 Marker.

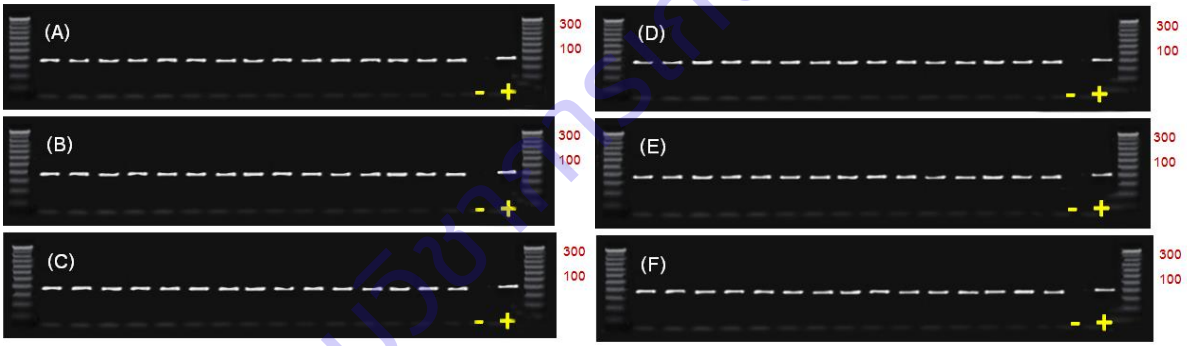

Figure 6 DNA of *Zeugodacus cucurbitae* from six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) was amplified using the *Z. cucurbitae* -specific primer pair Zcu-F1 and Zcu-R1. Negative control is ddH2O. Positive control sample is *Z. cucurbitae*. Lane M: D2000 Marker.

กรมวิชาการเกษตร

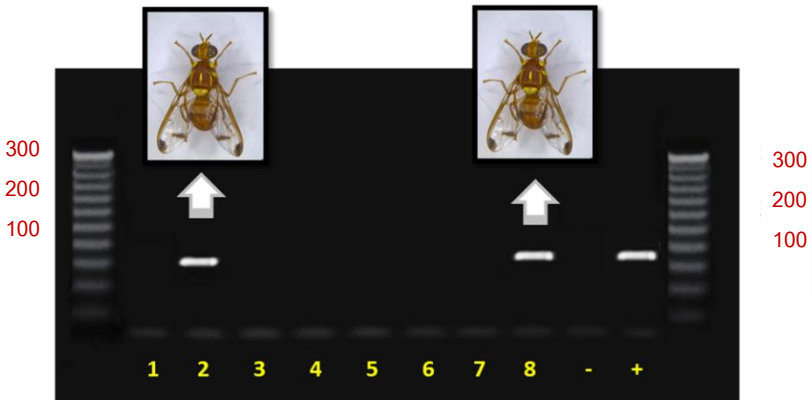

Figure 7 DNA from unknown larvae species was amplified using the *Zeugodacus cucurbitae*-specific primer pair Zcu-F2 and Zcu-R1.

Lanes 1- 8: intercepted fruit fly larvae.

Lane 9: negative control ddH_2O.

Lane 10: *Z. cucurbitae* positive control sample.

Lane M: D2000 Marker

กรมวิชาการเกษตร

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

	Scientific name	Accession number	No of specimens	Voucher specimen
1	*Bactrocera carambolae*	MW052780 - 84 MW093419 - 23	10	EMBT.L(SEM) 1301 - 1320
2	*Bactrocera correcta*	MW067300 - 09	10	EMBT0601.L(SEM) - 0620
3	*Bactrocera dorsalis*	MW052785 - 89 MW093424 - 28	10	EMBT0701.L(SEM) - 0720
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 cilifer*	MW376133 - 41	9	EMBT2001 - EMBT2020
10	*Zeugodacus cucurbitae*	MW045505 - 14 MW052790 - 94	20	EMBT1601.L(SEM) - 1620
11	*Zeugodacus tau*	MW052795 - 99 MW093429 - 33	10	EMBT1901.L(SEM) - 1920

กรมวิทยาศาสตร

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	1-Zcu-F1	KY615958.1	100%
2	MW363766	EMBT(SS)1602	1-Zcu-R1	MF095182.1	100%
3	MW363767	EMBT(SS)1603	1-Zcu-F1	MF095183.1	100%
4	MW363768	EMBT(SS)1604	1-Zcu-R1	MG384735.1	99%
5	MW363769	EMBT(SS)1605	1-Zcu-F1	MH667305.1	100%
6	MW363770	EMBT(SS)1606	1-Zcu-R1	MH751503.1	100%
7	MW363771	EMBT(SS)1607	1-Zcu-F1	MK296116.1	100%
8	MW363772	EMBT(SS)1608	1-Zcu-R1	MN016981.1	100%
9	MW363773	EMBT(SS)1609	1-Zcu-F1	MN256073.1	100%
10	MW363774	EMBT(SS)1610	1-Zcu-R1	MN256082.1	100%
11	MW363775	EMBT(SS)1611	1-Zcu-F1	MN256083.1	100%
12	MW363776	EMBT(SS)1612	1-Zcu-R1	MN256084.1	100%
13	MW363777	EMBT(SS)1613	1-Zcu-F1	MN256090.1	100%
14	MW363778	EMBT(SS)1614	1-Zcu-R1	MN256092.1	100%

กรมวิชาการเกษตร

15	MW363779	EMBT(SS)1615	1-Zcu-F1	MN256098.1	100%
16	MW363780	EMBT(SS)1616	1-Zcu-R1	MN256101.1	100%
17	MW363781	EMBT(SS)1617	1-Zcu-F1	MN256102.1	100%
18	MW363765	EMBT(SS)1618	1-Zcu-R1	MN256103.1	100%
19	MW363766	EMBT(SS)1619	1-Zcu-F1	MT474907.1	100%
20	MW363767	EMBT(SS)1620	1-Zcu-R1	MT474908.1	100%

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

	Intercepted fruits	Scientific name (host plants)	Exporting country	No. of samples	Results	Scientific name (fruit fly)
1	Rose apple	*Syzygium samarangense*	England	10	-	*B. correcta*
2	Yard long bean	*Vigna unguiculata* L.	England	10	+	*Z. cucurbitae*
3	Ramble Bambi	*Baccaurea ramiflora* Lour.	Spain	10	-	*B. carambolae*
4	Custard apple	*Annona reticulate* 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 reticulate* L.	Denmark	10	-	*B. dorsalis*
8	Yard long bean	*Vigna unguiculata* L.	Switzerland	10	+	*Z. cucurbitae*
	Total			**80**		

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร