

การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* (Hendel) complex
(Diptera: Tephritidae) ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมในประเทศไทย

Molecular Identification of Pest Species in Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) Species Complex in Thailand

ยุวรินทร์ บุญทบ ณิชฐิมา โฆษิตเจริญกุล ชมัยพร บัวมาศ จารุวัฒน์ แต้กุล
กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากพื้นที่ภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันตก โดยการใช้กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet budget trap) ร่วมกับสารล่อแมลงวันผลไม้ 2 ประเภท ได้แก่ CUE lure และ Methyl eugenol รวมทั้งเก็บรวบรวมจากพืชอาหารต่างๆ พบแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ทั้งหมด จำนวน 397 ตัวอย่าง และในการจำแนกเบื้องต้นพบแมลงวันผลไม้ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis* Hendel, *B. carambolae* Drew & Hancock และ *Bactrocera* spp. เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของสารพันธุกรรม (DNA) สกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยยีน cytochrome c oxidase I (COX1) และตรวจสอบ DNA ด้วยวิธีทางอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ซึ่งได้ DNA barcode ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* complex ทั้งหมด จำนวน 20 ตัวอย่าง จากตัวอย่างแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวน 10 ตัวอย่าง และ *B. carambolae* จำนวน 10 ตัวอย่าง

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-01-60

คำนำ

ปัจจุบันการส่งออกผักผลไม้เป็นรายได้หลักของเกษตรกรไทยและจากความเคร่งครัดในการนำเข้าผลไม้จากไทยไปยังตลาดโลกนั้นมีมาตรฐานที่สูงขึ้น อีกทั้งจากสภาวะการแข่งขันการส่งออกของประเทศในภูมิภาคอาเซียนที่สูงขึ้นนั้น การจัดทำแนกศัตรูพืชที่มีโอกาสติดไปกับการส่งออกนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการจำแนกชนิดแมลงศัตรูพืชโดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของผักผลไม้ในประเทศให้มีความถูกต้องรวมทั้งมีมาตรฐานในการศึกษาชนิดมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ในทวีปเอเชียพบว่าสกุล *Bactrocera* นั้นก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างสูงนั้นมีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่ใกล้เคียงกันมาก (Krosch *et al.*, 2012; Schutze *et al.*, 2012) จึงมีการจัดแมลงวันผลไม้หลายชนิดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความซับซ้อน (Complex) เนื่องจากมีความยากเป็นอย่างยิ่งในการใช้เพียงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก โดยเฉพาะกลุ่ม *B. dorsalis* complex นั้นก่อให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้มีความแตกต่างแปรผันทางรูปร่างลักษณะ ภายนอก ซึ่งยากต่อการตัดสินใจว่าเป็นความแปรผันทางสัณฐานภายในชนิดเดียวกันหรือเป็นความแตกต่างระหว่างชนิดนี้ๆ (Ibrahim & Ibrahim, 1990; Stone, 1942; Drew & Hancock, 1994; Saelee *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2010; Schutze *et al.*, 2012; Kitthawee & Rungsri, 2011; Hernández-Ortiz *et al.*, 2012) และมีการนำเทคโนโลยีต่างๆ เช่น การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcoding) มาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ทำให้พบว่า แมลงวันในกลุ่ม *B. dorsalis* complex หลายๆ ชนิดนั้นน่าจะเป็นชนิดเดียวกัน (Krosch *et al.*, 2012; Krosch *et al.*, 2013; Schutze *et al.*, 2012) จะเห็นได้ว่าเทคโนโลยีด้านโมเลกุลได้มีบทบาทความสำคัญเป็นอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้จัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจากข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โคด ของแมลงแต่ละชนิดในครั้งนี้จะสามารถนำมาใช้ในการจำแนกและยืนยันชนิดของแมลงผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ในประเทศไทยได้และยังจะเป็นการปรับปรุงแก้ไขข้อมูลของแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้ให้มีความทันสมัยตามหลักสากล ซึ่งจะก่อให้เกิดผลดีทั้งด้านอนุกรมวิธานและการนำเข้าส่งออกพืชผักผลไม้ของไทยสู่ตลาดโลกอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์ใช้ในการวาดภาพ
- คอมพิวเตอร์
- เต้าไฟฟ้า
- กล้องรักษาความเย็นขนาด 68 ควอทซ์

- ตู้อบ / เครื่องอุ่นสไลด์
- เอกสารประกอบการจำแนกแมลงวันผลไม้
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก, ก๊อบติกแมลงวันผลไม้ แบบ Wet budget สารฟีโรโมนที่ใช้ล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ Cue lure และ Methyl Eugenol รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (Propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), Agarose gel (SeaKem) และ TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag HS Red DNA Polymerase และ $MgCl_2$
- สารเคมีและ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- ชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอ (PCR clean up kit: Isolate PCR and Gel kit)
- อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ (กระดาษ แท่งบันทึกข้อมูล หมึกพิมพ์)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2561)

วิธีดำเนินการวิจัยเก็บตัวอย่างทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

- การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมลงวันทองจากพื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ แต่เนื่องจากแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex มีการเข้าทำลายพืชอาหารแตกต่างกัน ดังนั้น จึงต้องพยายามเก็บรวบรวมตัวอย่างตัวอ่อนจากพืชอาหารที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลาย ให้ได้มีความหลากหลายที่สุด โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) ซึ่งคาดว่าจะภายในหนึ่งปีจะสามารถเก็บตัวอย่างได้ 3 ภาค ภาคละ 3-5 จังหวัด และในแต่ละจังหวัดจะเก็บสามจุดสำรวจ และใช้กับดักฟีโรโมน 2 ประเภท ได้แก่ CUE lure และ Methyl Eugenol โดยติดตั้งในพื้นที่เก็บตัวอย่างละ 5 อัน/ต่อจุดสำรวจ บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) โดยแบ่งเป็น พื้นที่ต่างๆ ดังนี้

- (1) แปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง ถั่วฝักยาว
- (2) แปลงผลไม้ เช่น มะเฟือง ชมพู ฝรั่ง มะม่วง พุทรา
- (3) พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น สวนพฤกษศาสตร์ อุทยานแห่งชาติ

รายละเอียดจังหวัดที่เป็นตัวแทนพื้นที่ปลูกพืชที่ต้องการไปเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ ปี 2560 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 3 ภาคดังนี้

- (1) ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี และนครนายก
- (2) ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ราชบุรี และเพชรบุรี
- (3) ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง และลำพูน

ปี 2561 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 3 ภาคดังนี้

- (1) ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ปราจีนบุรี ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด
- (2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด ขอนแก่น เลย หนองคาย หนองบัวลำภู และอุดรธานี
- (3) ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ตรัง

และสงขลา และสตูล

- นำส่วนของพืชที่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ไปยังห้องปฏิบัติการ แยกชนิดของตัวหนอนและทำการดองด้วยแอลกอฮอล์ 95-100% (เพื่อให้นำไปศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอ่อน) นำตัวอ่อนที่เหลือใส่กล่องพลาสติกที่มีตะแกรงรองกันซึ่งด้านล่างใส่ซีลี้อย และนำกล่องพลาสติกใส่ในกรงผ้าเพื่อให้ตัวเต็มวัยเจริญออกมา ให้อาหาร คือ น้ำตาลผสม บริเวอรี่สตีโนอัตรา 1:4 เพื่อให้สับนลำตัวพัฒนาได้ดี

- นำตัวเต็มวัยบางส่วนดองไว้ในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

- เตรียมตัวอย่างตัวเต็มวัยบางส่วนเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและเป็นข้อมูลอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์ โดยใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยที่อบแห้งหรือฆ่า ด้วยเอทิลอาซิเตด หรือเก็บแมลงใส่หลอดแก้ว แช่ในช่องน้ำแข็ง 4 - 5 ชั่วโมง วิธีนี้จะทำให้สีไม่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้ตัวอย่างแล้ว ใช้เข็มขนาดเล็ก (micropin) แทงบริเวณ ด้านข้างของส่วนอกใต้ปีก ให้ไปทางด้านหน้าของลำตัว แล้วจึงเสียบ micropin กับโพมหรือ ค็อกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็ก ๆ บันทึกกำกับบอกสถานที่ วันเดือนปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืช ที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

2. วิธีการดำเนินการวิจัยสำหรับการศึกษาลำดับพันธุกรรม (ดำเนินการปี 2560-2561)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด และสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงวันผลไม้ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อยืนยันชนิดของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis complex* ที่พร้อมจะนำไปทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2.2 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัด ดีเอ็นเอ (DNA Extraction) จำนวน 5-10 ตัวอย่าง/ชนิด ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic

DNA kit; Cat No. BIO-52067) ซึ่งเป็นชุดสกัดดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับเนื้อเยื่อของมนุษย์และสัตว์
 ดังวิธีการต่อไปนี้

- การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation): นำขาด้านขวาจำนวนสามข้างของแมลงวันผลไม้ (25 mg) มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml โดยแมลงที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างใน พิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)

- เตรียมการสลายผนังเซลล์ (pre-lysis): โดยการเติม Lysis Buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วย พาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง

- ทำการย่อยตัวอย่าง (Lyse sample): เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ

- เตรียมพร้อมในการจับสารพันธุกรรม (Adjust DNA binding conditions): เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอ

- ทำการจับดีเอ็นเอ (Bind DNA): ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน ISOLATE II Genomic DNA tube และตกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

- ล้างตะกอน (Wash silica membrane): โดยการเติม Wash Buffer GW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน

- ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง (Dry silica membrane): ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอด ทดลองขนาดเล็ก 1.5 ไมโครลิตร

- ละลายดีเอ็นเอ (Elute DNA): โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาณ 50 ไมโครลิตร จากนั้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ในวิธีการต่อไป

2.3 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดย ใช้ *COX1* เป็น primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26

โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยกรรมวิธีดังนี้

เตรียมสารเคมี (Master Mixed) และ DNA template ดังนี้

		1 reaction (µl)
Buffer	5X Buffer	5
Tag	MyTag; Cat No. BIO-21114	0.01
MgCl	MgCl	0.1
Water	H ₂ O	15.8
Primer Forward	LCO1490	1
Primer Reverse	HCO2198	1
DNA		2
Total		25

- นำดีเอ็นเอต้นแบบพร้อมด้วย Master Mixed ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (PCR machine) โดยใช้อุณหภูมิ และระยะเวลาดังนี้ denaturing ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย annealing ที่อุณหภูมิ 94°C for 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 50°C for 30 วินาที 72 °C for 30 วินาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

2.4 ตรวจสอบ PCR product โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการให้ประจุของสารที่มีประจุแยกออกจากกัน ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยด PCR product ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.5 % (1.5% agarose gel) และให้ PCR product เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที

2.5 ทำให้ PCR product มีความบริสุทธิ์โดยการ แยกความบริสุทธิ์ ด้วย Isolate II PCR and Gel kit ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

- การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation): โดยการนำ PCR product มาเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาณ 30 ไมโครลิตร และเติม Binding Buffer CB
- ทำการจับดีเอ็นเอ (Bind DNA): คูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน ISOLATE II PCR and GEL Column และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน
- ล้างตะกอน (Wash silica membrane): โดยการเติม Wash Buffer CW ปริมาณ 700 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน(ทำซ้ำสองครั้ง)

- ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง (Dry silica membrane): ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5 ไมโครลิตร

- ละลายดีเอ็นเอ (Elute DNA): โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาณ 15 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่บริสุทธิ์ (Purified DNA) ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ในวิธีการต่อไป

2.6 ทำการ ถอดรหัสข้อมูลดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยส่งตัวอย่าง DNA ที่บริสุทธิ์ของแมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini มายัง Molecular Genetics Research Facility ของ Queensland University of Technology

2.7 นำข้อมูลของดีเอ็นเอที่ผ่านการถอดรหัส (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999).

2.8 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่าBarcode นำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิดกับ Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นอกจากนี้ยังสามารถนำ ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ ที่ได้มาศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมต่อได้อีก

- การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูล DNA barcode ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- 3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้ พร้อมทั้งรายละเอียดของพืชอาหารที่พบแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย เช่น ชนิดพืช ชื่อวิทยาศาสตร์

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2559 - กันยายน 2561

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ของภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากพื้นที่ภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันตก โดยได้ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex จากการใช้กับดักแมลงวันผลไม้ ร่วมกับสารล่อที่ใช้ CUE lure และ Methyl eugenol ซึ่งจากการศึกษาเปรียบเทียบการติดกับดักแมลงวันผลไม้แบบ steiner ซึ่งเป็นกับดักที่ไวกันอย่างกว้างขวางในประเทศไทยนั้น พบว่าตัวอย่างแมลงวันที่ได้จากการสำรวจ จะมีลักษณะแห้ง และแตกหักทำให้ไม่สามารถนำตัวอย่างแมลงวันผลไม้มาศึกษา DNA barcode ได้ ดังนั้นจึงมีการนำเอา กับดักแบบถังเปียก (wet budget trap) ซึ่งเป็นกับดักที่มีลักษณะเป็นถ้วยพลาสติกใสสีขาว ซึ่งพบว่ามีช่องว่างขนาด 1.5 เซนติเมตร อยู่รอบ ๆ กับดัก ซึ่งเป็นทางเข้าของแมลง และมีฝาปิดโดยภายในมีที่ใส่สารล่อซึ่งผสมยาฆ่าแมลงติดอยู่ กับดักประเภทนี้เหมาะสำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ศึกษาด้านโมเลกุล เนื่องจากสามารถป้องกันความร้อน ความชื้น ลม ฝน และเชื้อรา นอกจากนี้ภายในบรรจุสารโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำให้ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ต้องการนำมาศึกษานั้นยังคงสภาพดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี (Figure 1) ซึ่งจากการสำรวจด้วยกับดักแมลงวันผลไม้พร้อมสารล่อรวมทั้งการรวบรวมจากพืชอาหารต่างๆ สามารถรวบรวมแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex (Figure 2) ได้ จำนวน 397 ตัวอย่าง และในการจำแนกเบื้องต้นพบแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis* Hendel, *B. carambolae* Drew & Hancock และ *Bactrocera* spp. (Figure 3 และ Table 1) และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปสกัด DNA และศึกษา DNA barcode ต่อไป

2. DNA Barcode ของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex

สกัด DNA ของแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* 10 ตัวอย่าง และ *B. dorsalis* 10 ตัวอย่าง และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย COX1 และตรวจสอบขนาดของยีน COX1 (600 คู่เบส) จาก PCR product ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) จากแมลงวันผลไม้ 2 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* (Figure 4) และจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า *cox1* สามารถใช้แยกความแตกต่างของแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ออกจากกันได้ แต่ในแมลงวันผลไม้กลุ่ม

B. dorsalis complex นั้น พบว่า *COX1* ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของแมลงวันผลไม้บางตัวได้อย่างชัดเจน

ตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ของแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* จำนวน 10 ตัวอย่าง และ *B. dorsalis* จำนวน 10 ตัวอย่าง บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode นำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิดกับ Gene Bank เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูล DNA barcode จัดเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

รายละเอียดของ DNA Barcode ของ *B. carambolae* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 BD01

```
AAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAAACCTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCT
GTTAATACTACTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTT
ACTGCTCCTAAAATTGAGGAAATACCTGCTAAGTGAAGTGAATAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGA
TGATAGGGGTGGGTAACCTGTTCAACCTGTACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGGAGGAGGTAA
TAATCAAATCTTATATTATTCATTCTGCGGAAATGCTATATCGGGAGCTCCTAATATTAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACC
AATTATAATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCATGAGCTGTTACAATTACATTATAAAATTTGATCGTCACCGATTAA
AGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATCTAAGGGATGTTCTACTATTCTGCTCAGGCTCCGAAGATAAAATATA
AAGTTCCAATATCTTTATGTTT
```

ตัวอย่างที่ 2 BD02

```
TCAGNGCAGGAATANTAAGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGANCTCGGTCAACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAA
ATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGAC
TTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATT
ACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAG
GAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAA
TTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTGAGCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTAT
CATTACCAGTTTTAGCAGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAG
ACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTGATTTTTTGGTCACCT
```

ตัวอย่างที่ 3 BD03

```
GCGAGGGTCAAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAAACCTGGTAATGATAATAAAA
GTAATAAAGCTGTTAATACTACTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTG
TAATGAAATTTACTGCTCCTAAAATTGAGGAAATACCTGCTAAGTGAAGTGAATAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGC
GCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAACCTGTTCAACCTGTACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGG
GAAGGAGGTAATAATCAAATCTTATATTATTCATTCTGCGGAAATGCTATATCGGGAGCTCCTAATATTAAGGAACAAGTCAATTT
CCAAATCCACCAATTATAAATGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCATGAGCTGTTACAATTACATTATAAAATTTGATCG
TCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATCTAAGGGATGTTCTACTATTCTGCTCAGGCTCCGAA
GATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTATGTTT
```

ตัวอย่างที่ 4 BD04

```
TAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTG
TAACAGCTCATGCTTTGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTCTTTAATATT
```

AGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAG
 TATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATC
 TAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGA
 CAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGGAGCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGC
 AGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCA
 ACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCT

ตัวอย่างที่ 5 BD05

TAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACCTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTG
 TAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGNAATTGACTTGTCTTTAATATT
 AGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAG
 TATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATC
 TAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGA
 CAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGGAGCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGC
 AGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCA
 ACATTTATTTTGATTTTTT

ตัวอย่างที่ 6 BD06

AAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCTGCTAAAACCTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCTGTTAATA
 CTAAGTCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTC
 CTAATAATGAGGAAATACCTGCTAAGTGAAGTGAATAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGG
 GGTGGTAAACTGTTCAACCTGTACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAA
 AATCTTATATTATTCTTCGTGGAAATGCTATATCGGGAGCTCCTAATATTAAGGAACAAGTCAATTTCCAATCCACCAATTATA
 ATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCATGAGCTGTTACAATTACATTATAAAATTTGATCGTACCAGTAAAGCTCCT
 GGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATCTAAGGGATGTTCTACTATTCTGCTCAGGCTCCGAAGATAAAAATATAAAGTTCC
 AATATCTTTA

ตัวอย่างที่ 7 BD07

AGNGCAGGAATANTAAGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGANCTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAAT
 TTATAATGTAATTTGAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATGACTT
 GTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTA
 CTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGG
 AGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAAT
 TAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGGAGCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATC
 ATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGA
 CCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTC

ตัวอย่างที่ 8 BD08

AGGGTCAAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCTGCTAAAACCTGGTAATGATAATAAAAGTAA
 TAAAGCTGTTAATACTACTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTGATCGTATATTAATTACTGTTGTAAT
 GAAATTTACTGCTCTAAAATTGAGGAAATACCTGCTAAGTGAAGTGAATAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAA
 TAACAGATGATAGGGTGGGTAACCTGTTCAACCTGTACCAGTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAG
 GAGGTAATAATCAAATCTTATATTATTCTTCGTGGAAATGCTATATCGGGAGCTCCTAATATTAAGGAACAAGTCAATTTCAA
 ATCCACCAATTATAATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCATGAGCTGTTACAATTACATTATAAAATTTGATCGTCCAC

CGATTAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCTACTATTCTGCTCAGGCTCCGAAGATA
AAATATAAGTTCGAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 9 BD09

ACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTAAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACA
GCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAG
CTCCCGATATAGCATTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACACTATTAGTAAGAAGTATAG
TAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGACTAGCT
ATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGA
ATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTGTTGAGCAGTAGTATAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGG
GCTATTACTATATACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACAT
TTATTTTGATTTTTTGGTCA

ตัวอย่างที่ 10 BD10

AGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTAAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGT
AACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGNAATTGACTTGTTCCTTTAATATTA
GGAGCTCCCGATATAGCATTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACACTATTAGTAAGAAGT
ATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGACT
AGCTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGAC
AGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTGTTGAGCAGTAGTATAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCA
GGGGCTATTACTATATACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAA
CATTTATTTGA

DNA Barcode ของ *B. carambolae* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 BC01

TACATACCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTAAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAA
CAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGG
AGTCCCGATATAGCATTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACACTATTAGTAAGAAGTAT
AGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGACTAG
CTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAG
GAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTGTTGAGCAGTTGTATAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAG
GGGCTATTACTATACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAAC
ATTTATTTGATTTTTTGGT

ตัวอย่างที่ 2 BC02

ACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTAAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACA
GCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAG
CTCCCGATATAGCATTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACACTATTAGTAAGAAGTATAG
TAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGACTAGCT
ATTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGA
ATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTGTTGAGCAGTTGTATAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGG
GCTATTACTATACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACAT
TTATTTTGATTTTTTGG

ตัวอย่างที่ 3 BC03

CATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAG
 CTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGC
 TCCCGATATAGCATTTCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGT
 AGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTA
 TTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAA
 TCACCTTTGATCGAATACCTTATTCTGTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGG
 CTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGTATCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATT
 TATTTTGATTTTTTGGTC

ตัวอย่างที่ 4 BC04

TGAGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAAT
 TTATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTTGGAAATTGACTT
 GTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTA
 CTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGG
 AGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAAT
 TAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTTATTCTGTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATC
 ATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGTACCTGCCGGAGGAGGAGA
 TCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTATTTTTTGTATCA

ตัวอย่างที่ 5 BC05

TGAGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAAT
 TTATCaATGTAATCGTAACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTTGGAAATTGACT
 TGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATT
 ACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAG
 GAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAA
 TTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTTATTCTGTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTAT
 CATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGTACCTGCCGGAGGAGGAG
 ATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTA

ตัวอย่างที่ 6 BC06

ACATACCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAAC
 AGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGA
 GCTCCCGATATAGCATTTCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATA
 GTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGC
 TATTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGG
 AATCACCTTTGATCGAATACCTTATTCTGTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGG
 GGCTATTACTATANTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGTACCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACA
 TTTATTTTGATTTTTTGG

ตัวอย่างที่ 7 BC07

ATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGC
 TCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCT

CCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTA
 GAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTAT
 TTTTTCACCTCAGTACGGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAAT
 CACCTTTGATCGAATACCTCTATTTCGTTTGAGCAGTTGATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGC
 TATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTT
 ATTTTGA

ตัวอย่างที่ 8 BC08

ATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTAAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAAACAGC
 TCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCT
 CCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTA
 GAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTAT
 TTTTTCACCTCAGTACGGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAAT
 CACCTTTGATCGAATACCTTATTTCGTTTGAGCAGTTGATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGC
 TATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTT
 ATTTTGAATTTTTTG

ตัวอย่างที่ 9 BC09

AGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTAAATCGGTGACGATCAAATTT
 ATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGT
 TCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACT
 ATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAG
 CTTGAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTA
 ATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTTCGTTTGAGCAGTTGATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCAT
 TACCAGTTTTAGCAGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGATC
 CTATTCTTTACCAACATTTATTTA

ตัวอย่างที่ 10 BC10

AGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTAAATCGGTGACGATCAAATTT
 ATCaATGTAATCGTAACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTG
 TTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACT
 ATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAG
 CTTGAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTA
 ATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTTCGTTTGAGCAGTTGATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCAT
 TACCAGTTTTAGCAGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGATC
 CTATTCTTTACCAACATTTATTTA

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากพื้นที่ภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันตก โดยการใช้กับดักแมลงวันผลไม้ ร่วมกับสารล่อที่ใช้ CUE lure และ Methyl eugenol รวมทั้งการรวบรวมจากพืชอาหารต่างๆ พบแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ทั้งหมด จำนวน 397 ตัวอย่าง และในการจำแนกเบื้องต้นพบแมลงวันผลไม้ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis*, *B. carambolae* และ *Bactrocera* spp. และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของ DNA สกัด DNA ทำ PCR ด้วยยีน *COX1* และ gel electrophoresis และ DNA sequencing ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวน 10 ตัวอย่าง และ *B. carambolae* จำนวน 10 ตัวอย่าง แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การนำ *COX1* มาใช้ศึกษาแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex นั้น ยังมีความคลุมเครือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *B. dorsalis* กับ *B. carambolae* ได้อย่างชัดเจน และการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สิ้นสุดจึงควรมีการศึกษา DNA Barcode ของแมลงวันในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex ด้วยไพรเมอร์ ITS1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการแยกความแตกต่างระหว่างแมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex

เอกสารอ้างอิง

- Cameron, E.C., Sved, J.A. & Gilchrist, A.S. 2010. Pest fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northwestern Australia: one species or two? *Bulletin of Entomological Research* 100: 197-206.
- Drew, R.A.I. & Hancock, D.L. 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. *Bulletin of Entomological Research Supplement Series* 2: 1-68.
- Hernández-Ortiz, V., Bartolucci, A.F., Morales-Valles, P., Frias, D. & Selivon, D. 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America* 105: 305-318.
- Ibrahim, R. & Ibrahim, G.A. 1990. *Handbook on Identification of Fruit Flies in the Tropics*. Kuala Lumpur, Malaysia, Universiti Pertanian Malaysia Press.

- Kitthawee, S. & Rungsri, N. 2011. Differentiation in wing shape in the *Bactrocera tau* (Walker) complex on a single fruit species in Thailand. *Science Asia* 37: 308-313.
- 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* doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.006
- Krosch, M.N., Schutze, M.K., Armstrong, K.F., Boontop, Y., Boykin, L.M., Chapman, T.A., Englezou, A., Cameron, S.L. & Clarke, A.R. 2013. Piecing together an integrative taxonomic puzzle: microsatellite, wing shape and aedeagus length analyses of *Bactrocera dorsalis* s.l. (Diptera: Tephritidae) find no evidence of multiple lineages in a proposed contact zone along the Thai/Malay Peninsula. *Systematic Entomology* 38: 2-13.
- Saelee, A., Tigvattananont, S., & Baimai, V. 2006. Allozyme electrophoretic evidence for a complex of species within the *Bactrocera tau* group (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 28: 249-259.
- Schutze, M.K., Jessup, A. & Clarke, A.R. 2012. Wing shape as potential discriminator of morphologically similar pest taxa within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of Entomological Research* 102: 103-111.
- Stone, A. 1942. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. *United States Department of Agriculture Miscellaneous Publications* 439: 1-112.
- Vera, M.T., Cáceres, C., Wornoyaporn, V., Islam, A., Robinson, A.S., De la Vega, M.H., Hendrichs, J. & Cayol, J.P. 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) *Annals of the Entomological Society of America* 99: 387-397.

Table 1 Scientific name, number of samples, host plants, distribution and type of attractants.

	Scientific name	Number of samples	Host plants	Distribution	Type of attractants
1	<i>B. dorsalis</i>	50	guava rose apple mango	Bangkok Pathumthani Kanchanaburi Pitsanulok Suratthani	Methyl eugenol
2	<i>B. carambolae</i>	22	star fruit rose apple mango	Bangkok Suratthani	Methyl eugenol
3	<i>Bactrocera</i> sp.	325	guava rose apple mango melon orange	Bangkok Pathumthani Kanchanaburi Pitsanulok Suratthani	Methyl eugenol and Cue lure



Figure 1 Fruit fly trap; wet budget trap for molecular work

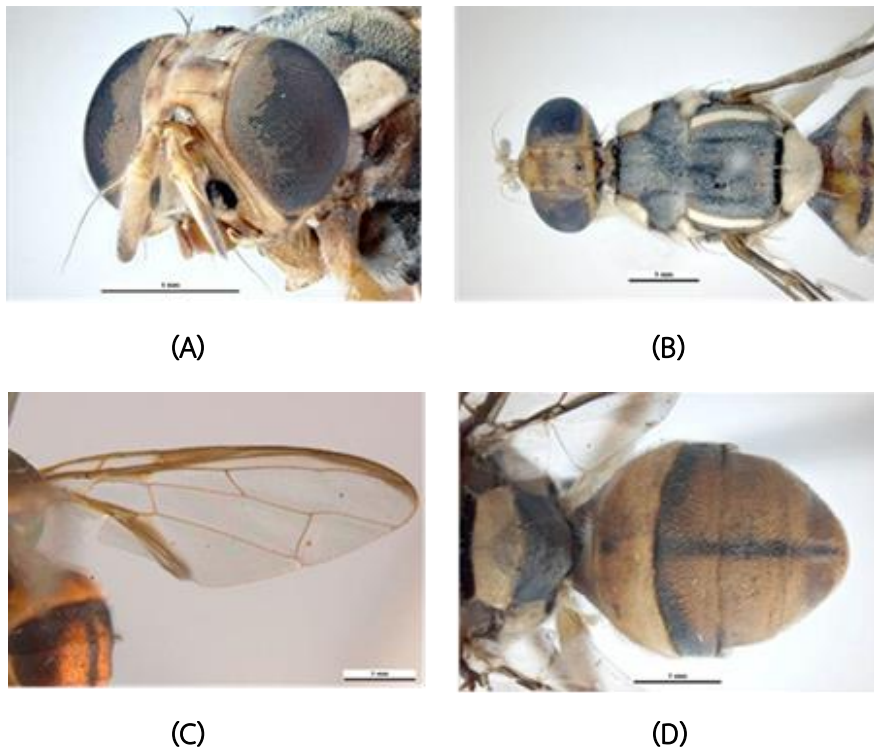


Figure 2 Morphological character of *Bactrocera dorsalis* complex

- (A) Head
- (B) Thorax
- (C) Wing
- (D) Abdomen



Figure 3 *Bactrocera dorsalis* complex

(A) *B. dorsalis* Hendel

(B) *B. carambolae* Drew & Hancock

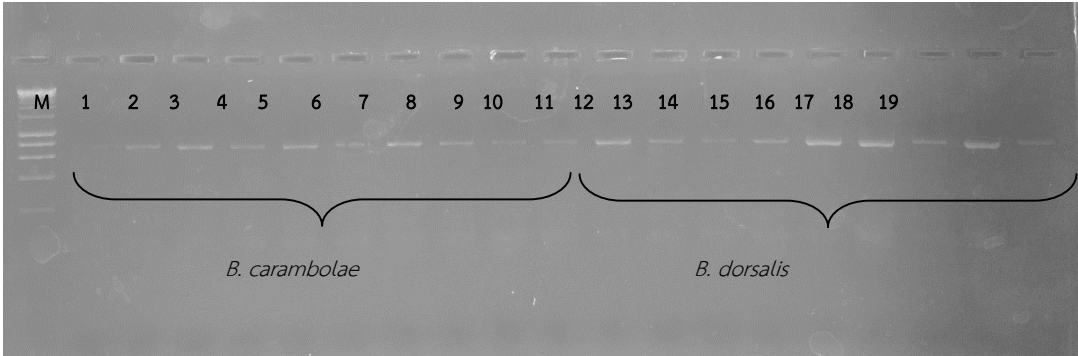


Figure 4 PCR product from *COX1* (600 basepair) of *Bactrocera carambolae* and *B. dorsalis*.