การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง

Development of a Diagnostic Technique using Species-Specific Primers for the Guava Fruit Fly, *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae)

ยุวรินทร์ บุญทบ[1/*] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ณฐมน แก้วนุ้ย[1/] นพรัตน์ บัวหอม[2/] ชุติกาญจน์ ใจแล[3/]

Yuvarin Boontop[1/*] Nutthima Kositcharoenkul[1/] Nathamon Kaewnuy[1/]

Nopparat Buahom[2/] Chutikarn Jailae[3/]

Received 26 Jan. 2022/Revised 6 July 2023/Accepted 6 July 2023

ABSTRACT

The guava fruit fly, *Bactrocera correcta* (Bezzi) causes major economic losses in fruit and vegetable crops in Thailand and many countries. It is also a quarantine pest of countries currently importing the fly's host commodities from Thailand or are potential new markets. The morphological similarity between immature guava fruit fly and other fruit fly species makes visual identification difficult. Thus, methods for the rapid and accurate identification of immature fruit flies are needed to support quarantine officials at the border stations to make correct decisions when inspecting both importing or exporting commodities. In this study, we used molecular diagnostic methods based on *cytochrome c oxidase subunit I* (*cox1*) and species-specific markers to identify *B. correcta*. DNA barcode sequences obtained from 113 individuals of 11 fruit fly species were used. Based on these 650 bp barcode sequences, we successfully designed species-specific primers for identification of *B. correcta* in all life stages (egg, larva, pupa and adult). The size of the *B. correcta* specific fragment was 141 base pairs. The diagnostic protocol based on these primers elicited no cross-reactions with the other 10 tephritid species tested. A PCR product confirmed the specificity of the primers. The species-specific primers have greatly assisted plant quarantine of imported/exported fresh agricultural produce. The diagnostic protocol from this study can be used by pest diagnostic agencies and research organizations worldwide to develop tools for the rapid, accurate identification of invasive alien fruit fly species.

Keywords: diagnostic, species-specific primers, fruit flies, guava fly

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[1/] Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd. Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

[2/] กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[2/] Plant Standard and Certification Division, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd. Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

[3/] สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3/] Office of Agricultural Regulation, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd. Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

*** Corresponding author: yuvarin9320@gmail.com**

บทคัดย่อ

แมลงวันทองฝรั่ง (guava fruit fly) *Bactrocera correcta* (Bezzi) ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากกับผลไม้และผักหลายชนิดในประเทศไทยและหลาย ๆ ประเทศ นอกจากนี้ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ยังเป็นศัตรูพืชกักกันของหลายประเทศที่นำเข้าสินค้าจากประเทศไทย หรือประเทศที่เป็นตลาดใหม่ที่มีศักยภาพสำหรับการส่งออกของไทย เนื่องจาก หนอนแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ทำให้การระบุชนิดทำได้ยาก ดังนั้น เทคนิคที่มีความรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำสำหรับการจำแนกชนิดหนอนแมลงวันผลไม้ที่เกี่ยวข้องต่อการนำเข้าและส่งออกผลผลิตเกษตรนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการสร้างความเชื่อถือของด่านกักกันของประเทศไทยเมื่อมีการตรวจสอบสินค้าก่อนส่งออก การศึกษานี้ได้นำวิธีการวินิจฉัยระดับโมเลกุลจากยีน *cytochrome c oxidase subunit I (cox1)* และคู่ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงมาใช้ เพื่อระบุชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต (ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) โดยทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด จำนวน 113 ตัว จากลำดับบาร์โค้ด 650 คู่เบส และได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่มีขนาด 141 คู่เบส กระบวนการในการวินิจฉัยที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงเหล่านี้ไม่เกิดปฏิกิริยาเมื่อทำการทดสอบกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นอีก 10 ชนิด ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์สามารถยืนยันความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และช่วยในการระบุชนิดแมลงวันผลไม้ที่ถูกตรวจพบในสินค้าเกษตรที่นำเข้าและส่งออก หน่วยงานวินิจฉัยศัตรูพืชสามารถนำวิธีการวินิจฉัยนี้ไปใช้ในการพัฒนาเครื่องมือสำหรับการระบุชนิดพันธุ์แมลงวันทองต่างถิ่นที่รุกรานได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ

คำสำคัญ: ตรวจวินิจฉัย, ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ, แมลงวันผลไม้, แมลงวันทองฝรั่ง

บทนำ

ปัจจุบันประเทศที่ต้องการส่งออกสินค้าเกษตรโดยเฉพาะผัก และผลไม้จะมีมาตรฐานการส่งออกที่สูงขึ้น หากมีการตรวจพบสิ่งปนเปื้อน โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชที่ติดมากับผลผลิตทางการเกษตร จะต้องมีมาตรการและวิธีการจัดการที่เป็นมาตรฐานระดับสากล วิธีการที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดศัตรูพืชนั้นจะต้องมีความสะดวก รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำและประหยัด สำหรับประเทศไทยพบว่า แมลงวันผลไม้ (fruit fly) เป็นศัตรูพืชที่พบปนเปื้อนสูงมากในสินค้าเกษตรส่งออก เนื่องจาก แมลงวันผลไม้เพศเมียจะวางไข่ในผลไม้ จากนั้น หนอนเจริญเติบโต และกัดกินอยู่ภายในผล ยากต่อการตรวจสอบในระดับสายตา ทำให้มีโอกาสสูงที่จะติดไปภายในผัก และผลไม้ สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากในการส่งออก และก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าตามมาด้วย

ทั่วโลกพบแมลงวันผลไม้มากกว่า 5,000 ชนิด (Aluja and Norrbom, 1999) สำหรับประเทศไทย พบแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* และสกุล *Zeugodacus* สามารถทำลายผลผลิตทางการเกษตรได้หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นผักหรือ ผลไม้ และพบว่า แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* Bezzi เป็นศัตรูที่ก่อให้เกิดความเสียหายและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 30 วงศ์ (Family) ใน 60 ชนิด (species) เช่น ชมพู่ มะม่วง ฝรั่ง เชอรี่ พุทรา และพริก โดยเฉพาะผลไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อการบริโภคภายในประเทศ และส่งออก เช่น ฝรั่ง มะม่วง และชมพู่ (White and Elson-Harris, 1992)

แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เป็นแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญต่อการนำเข้าและส่งออก (Weems and Fasulo, 2011) เนื่องจาก

มีพืชอาหารที่หลากหลายมาก (Kunprom and Pramual, 2016) ปัจจุบันประเทศไทยใช้การตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานภายนอกของตัวเต็มวัยในการตรวจวินิจฉัยเพียงอย่างเดียว ส่วนการตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ ในระยะไข่ หนอน หรือดักแด้ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันมากทำได้ยาก (ยุวรินทร์ และคณะ, 2563) ถ้าหากมีการตรวจพบตัวอ่อนในการส่งออกหรือนำเข้าผลผลิตทางการเกษตรนั้น ผู้ที่ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้ตัวอ่อน หรือดักแด้นั้นเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดซึ่งค่อนข้างใช้เวลานานและเป็นผลเสียต่อการค้าผักและผลไม้ (Armstrong *et al*., 1997) ดังนั้น วิธีการตรวจวินิจฉัยที่สามารถระบุชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้อย่างรวดเร็วและถูกต้องจึงเป็นเรื่องเร่งด่วนที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับงานด้านกักกันพืช ทำให้สามารถป้องกันการแพร่กระจายของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ไปยังพื้นที่ที่ยังไม่พบการแพร่ระบาดได้ทันท่วงที (Jiang *et al*., 2013)

วิธีการตรวจวินิจฉัยเพื่อระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และเป็นที่ยอมรับในระดับสากลวิธีหนึ่งคือวิธีทางชีวโมเลกุล วิธีนี้สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (polymerase chain reaction, PCR) โดยเลือกใช้ species - specific primer จากยีนที่เหมาะสมเพื่อนำมาระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต การตรวจชนิดแมลงวันทองฝรั่งโดยใช้วิธีการดังกล่าวเริ่มขึ้นในประเทศจีนโดย Jiang *et al*., (2013) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง และนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ถูกตรวจพบจากชมพู่ที่ส่งออกไปจากประเทศไทย แต่วิธีการของ Jiang *et al*., (2013) เมื่อนำมาทดสอบกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ได้จากกับดักฟีโรโมน และจากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรนั้น พบว่า มีปัญหาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ทั้งนี้ อาจเนื่องจากไพรเมอร์ไม่เหมาะสมเท่าที่ควร ดังนั้น จึงจำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* โดยใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ species - specific primer จากยีน *cox1*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตรใน 6 ภูมิภาคของประเทศไทย โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด ได้แก่ ภาคกลาง (จ.นครสวรรค์ สิงห์บุรี และอยุธยา) ภาคตะวันออก (จ.จันทบุรี ระยอง และตราด) ภาคเหนือ (จ.เชียงใหม่ เชียงราย และน่าน) ภาคตะวันตก (จ.ตาก กาญจนบุรี และราชบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จ.อุดรธานี นครราชสีมา และอุบลราชธานี) และภาคใต้ (จ.สุราษฎร์ธานี ยะลา และนราธิวาส) ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd, Australia ซึ่งประกอบด้วยสำลีชุบสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 3 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจินอล (methyl eugenol) คิวลัวร์ (cue lure) และลาติลัวร์ (lati lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอล เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2562

จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia (Drew and Romig, 2013) และ Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew and Romig, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ดองในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20°ซ.

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้มาสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธี Boontop *et al*., (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) โดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ข้าง ของแมลงวันผลไม้ (25 มก.) มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. เติม Lysis Buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 16 - 20 ชม. ทำการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ. นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด 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 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ทิ้งของเหลวที่เหลือ ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายตะกอนดีเอ็นเอจากหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ละลายดีเอ็นเอ โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal primer จากยีน *cox1*: LCO1490 (GGTCAACAAATCATA-AAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAAC TTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (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 นำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ กำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94° ซ. นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94°ซ. 30 วินาที 3) annealing ที่ 50°ซ. 30 วินาที 4) extension ที่ 72°ซ. 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (ในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72°ซ. 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis)

ที่ อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต 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 สาธารณรัฐเกาหลี

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ด้วยการ Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และสืบค้นข้อมูลแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genebank มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม chromas (version 2.33, Technelysium Pty Ltd, Australia) เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เริ่มจากการหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีความแตกต่างกัน (single nucleotide polymorphism, SNP) ระหว่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ จากนั้น ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยโปรแกรม Vector NTI (invitrogen) (https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html) เลือกความยาวของไพรเมอร์ที่มีขนาด 18 - 25 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบมาวิเคราะห์ dimer hairpin และ false priming sites ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) และนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงโดยการ BLAST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล สังเคราะห์คู่ไพรเมอร์เพื่อใช้จำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาทดสอบประสิทธิภาพการใช้งาน ดังต่อไปนี้

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่งกับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจในประเทศไทย ชนิดละ 3 ตัวอย่าง

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ โดยทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่งที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (laboratory samples) ระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ระยะละ 5 ตัวอย่าง

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations) จากตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่งที่เก็บรวบรวมมาจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ทำการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ภูมิภาคละ 10 ตัวอย่าง/ชนิด (รวมทั้งหมด 60 ตัวอย่าง)

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนในพืช ผัก และผลไม้ ที่พบจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) จากเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ที่อะกาโรสเจลความความเข้มข้น 1.5% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ โดยการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ให้บริสุทธิ์และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่เก็บด้วยกับดักถังเปียกซึ่งบรรจุสารล่อเมธิลยูจีนอลและคิวลัวร์จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ของไทย พบแมลงวันผลไม้ทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. umbrosa, Dacus longicornis, Zeugodacus apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* นำตัวอย่างที่ได้มาจำแนกชนิดเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

2. การสกัด และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR และลำดับนิวคลีโอไทด์

การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490/ HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % แสดงว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น สามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number (Table 1)

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

Scientific name	No. of specimens	Voucher specimen	Accession number
Bactrocera carambolae	10	EMBT1301 - EMBT1310	MW052780 - 84, MW093419 - 23
Bactrocera correcta	10	EMBT0601 - EMBT0610	MW067300 - 09
Bactrocera dorsalis	10	EMBT0701 - EMBT0710	MW052785 - 89, MW093424 - 28
Bactrocera latifrons	12	EMBT0901 - EMBT 0913	MW136282 - 93
Bactrocera umbrosa	14	EMBT1201 – EMBT1215	MW376156 - 73
Dacus longicornis	5	EMBT0201 – EMBT0220	MW376179 - 83
Zeugodacus apicalis	5	EMBT1401 – EMBT1405	MW376174 - 77,
Zeugodacus caudatus	14	EMBT1501 – EMBT1520	MW376156 - 73
Zeugodacus cilifer	9	EMBT1601 – EMBT1620	MW376133 - 41
Zeugodacus cucurbitae	14	EMBT1601.L(SEM) - 1620	MW045505 - 14, MW052790 - 94
Zeugodacus tau	10	EMBT1901.L(SEM) - 1920	MW052795 - 99, MW093429 - 33

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ทั้ง 11 ชนิด ข้างต้น และลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ GenBank มาเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายกันเพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และตรวจหาตำแหน่ง SNPs ด้วยโปรแกรม Vector NTI (invitrogen) พบตำแหน่ง SNPs ที่มีเฉพาะแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เท่านั้น ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ เลือกตำแหน่งดังกล่าวมาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จำนวน 2 เส้น (Forward 1 เส้น และ Reverse 1 เส้น) โดยพบ Forward ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเริ่มต้นที่ 85 จำนวน 19 คู่เบส และ Reverse 1 เส้น ได้แก่ R1 บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 204 จำนวน 22 คู่เบส (Figure 1)

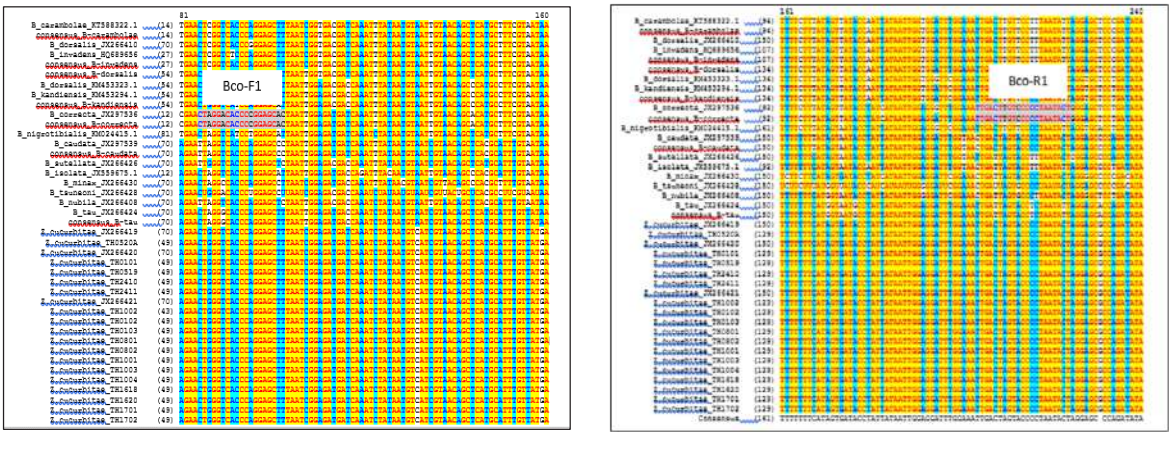

Figure 1 Alignment of the nucleotide sequence regions of *cox1* gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Bactrocera correcta.* Nucleotide sequences of Bco-F1 primers are highlighted

ตั้งชื่อไพรเมอร์ที่ออกแบบ forward และ reverse ดังนี้ ไพรเมอร์ ***B**actrocera **c**orrecta* **F**orward: Bco-F1 และ ***B**actrocera **c**orrecta* **R**everse: Bco-R1) ดังนั้น ไพรเมอร์คู่ที่หนึ่งคือ Bco-F1 และ Bco-R1 และจากการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Oligo พบว่า % GC ของ forward เท่ากับ 68.4° ซ. มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ที่อุณหภูมิ 54.2° ซ. และ reverse primers R1 เท่ากับ 45.5° ซ. มีค่า Tm อยู่ที่อุณหภูมิ 50.3° ซ. ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ขนาดประมาณ 141 คู่เบส (Table 2)

Table 2 Nucleotide of sequences and properties of broad-spectrum primer set used in *Bactrocera correcta* screening in this study primer

No.	Primer name	Sequences	Position	No. of base pair	Tm (˚C)	%GC	Size of PCR product
1	Bco-F1	CTAGGACACCCCGGAGCAC	(85-103)	19	54.2	68.4	141
2	Bco-R1	CAGTATTAGGGGGACAAGTCAA	(204-225)	22	50.3	45.5	

นำดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ระยะการเจริญเติบโต 4 ระยะ (ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) ที่ได้จากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ทั้งสองคู่ (Bco-F1-R1) ด้วยเทคนิค PCR มีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย

Reagents	Volume (μl) per reaction
GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)	10
Forward primer (10 μM)	1.0
Reverse primer (10 μM)	1.0
Nuclease-Free water	6.0
Template	2.0
final volume	**20.0 μl**

สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมสำหรับจำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยวิธี PCR ปรับ annealing temperature ที่ 55°ซ. กำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้

Steps	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
1. initial-denaturing	94	4 min	1
2. denaturing	94	30 sec	35
3. annealing	53/55	30 sec	
4. extension	72	30 sec	
5. final-extension	72	4 min	1

ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากไพรเมอร์ที่ออกแบบ พบว่ามีขนาด PCR product ของ Bco-F1 กับ Bco-R1 ขนาด 141 คู่เบส (Figure 2)

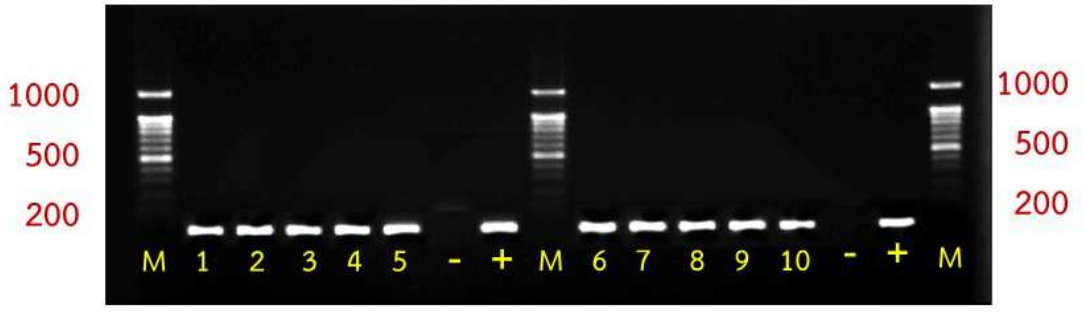

Figure 2 DNA from all stages of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* - specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control was ddH_2O. Positive control sample was *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker

Lane 1 - 2 = eggs Lane 3 - 5 = larvae

Lane 6 - 7 = pupae Lane 8 - 10 = adults

Lane - = Negative (ddH2O) Lane + = Positive (*B. correcta*)

ผลลำดับนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์ที่ออกแบบ บันทึกในฐานข้อมูล Genbank และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการ Blast พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % (Table 3) แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* แต่การบันทึกข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank เพื่อจัดทำ accession number นั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บันทึกลงในฐานข้อมูล Genbank จะต้องมีการตัดส่วนหัวและส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการซ้อนทับกันของพีค (peak) บนโครมาโทแกรม (Chromatogram) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจึงมีขนาดสั้นลง และเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถบันทึกในฐานข้อมูล Genbank ได้นั้นต้องมีขนาดยาวไม่น้อยกว่า 200 คู่เบส ดังนั้นจึงไม่สามารถบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ที่ได้ลงในฐานข้อมูล Genbank

4. ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

จากคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสม และสามารถนำไปพัฒนาใช้ต่อไป เช่น real time polymerase chain reaction หรือ quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) นั้น ไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ได้นั้น ควรเป็นไพรเมอร์สั้น ๆ และไม่ควรมีขนาดเกิน 150 คู่เบส (Life technologies, 2022) ดังนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบ คือ Bco-F1 และ Bco-R1 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

4.1 ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

Table 3 Nucleotide sequence analysis of the 141 bp DNA fragments (Bco-F1 and Bco-R1) from 20 guava fly samples amplified by species-specific primers compared with the GenBank database

No.	Guava fly with Acc. No. in GenBank	Voucher specimens	Samples with Acc. No.	%Identity
1	N/A	EMBT(SS)0601	MN255894.1	100%
2	N/A	EMBT(SS)0602	MN016975.1	100%
3	N/A	EMBT(SS)0603	MN016974.1	100%
4	N/A	EMBT(SS)0604	MH125331.1	100%
5	N/A	EMBT(SS)0605	MF095191.1	100%
6	N/A	EMBT(SS)0606	MF970799.1	100%
7	N/A	EMBT(SS)0607	MF970794.1	100%
8	N/A	EMBT(SS)0608	MF970791.1	100%
9	N/A	EMBT(SS)0609	KU669692.1	100%
10	N/A	EMBT(SS)0610	KU669315.1	100%
11	N/A	EMBT(SS)0611	KU669308.1	100%
12	N/A	EMBT(SS)0612	KU669300.1	100%
13	N/A	EMBT(SS)0613	KJ879920.1	100%
14	N/A	EMBT(SS)0614	KJ879918.1	100%
15	N/A	EMBT(SS)0615	KJ879899.1	100%
16	N/A	EMBT(SS)0616	KJ879861.1	100%
17	N/A	EMBT(SS)0617	KJ879859.1	100%
18	N/A	EMBT(SS)0618	KJ879823.1	100%
19	N/A	EMBT(SS)0619	KJ879812.1	100%
20	N/A	EMBT(SS)0620	KJ879811.1	100%

การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสองคู่ (Bco-F1 และ Bco-R1) และตรวจวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ขนาด 141 คู่เบส ผลการตรวจสอบคู่ไพรเมอร์ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ (Figure 3) และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และมีความถูกต้อง 100% แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ (Bco-F1 และ Bco-R1) ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้จำแนกชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

Figure 3 Specificity testing of the *Bactrocera correcta* - specific primer pair (Bco-F1 and Bco-R1)

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

4.2. ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ต่อระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ

จากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ Bco-F1 และ Bco-R1 ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยเทคนิค PCR ต่อตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงจากห้องปฏิบัติการในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 141 คู่เบส ในทุกระยะการเจริญเติบโต (Figure 4) แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่า เป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และมีความถูกต้อง 100%

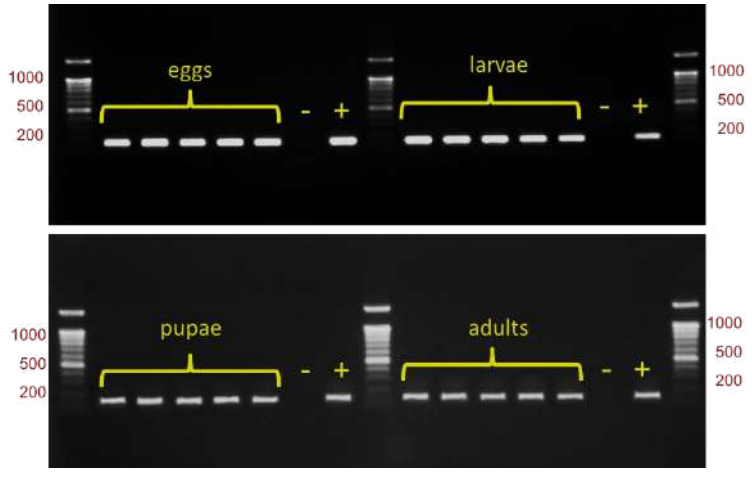

Figure 4 DNA from all stages of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* - specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control was ddH2O. Positive control sample was *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker

4.3 ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบกับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ได้จากการรวบรวมตัวอย่างจาก 6 ภูมิภาคของไทย ผลที่ได้สามารถยืนยันได้ว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นสามารถใช้ได้เป็นอย่างดีกับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากภูมิภาคต่าง ๆ (Figure 5) และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีความถูกต้อง 100% แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพสำหรับการใช้ตรวจสอบชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้เป็นอย่างดี เนื่องจาก สามารถตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ถูกต้องและแม่นยำแม้จะเป็นตัวอย่างที่มาจากภูมิภาคที่แตกต่างกัน

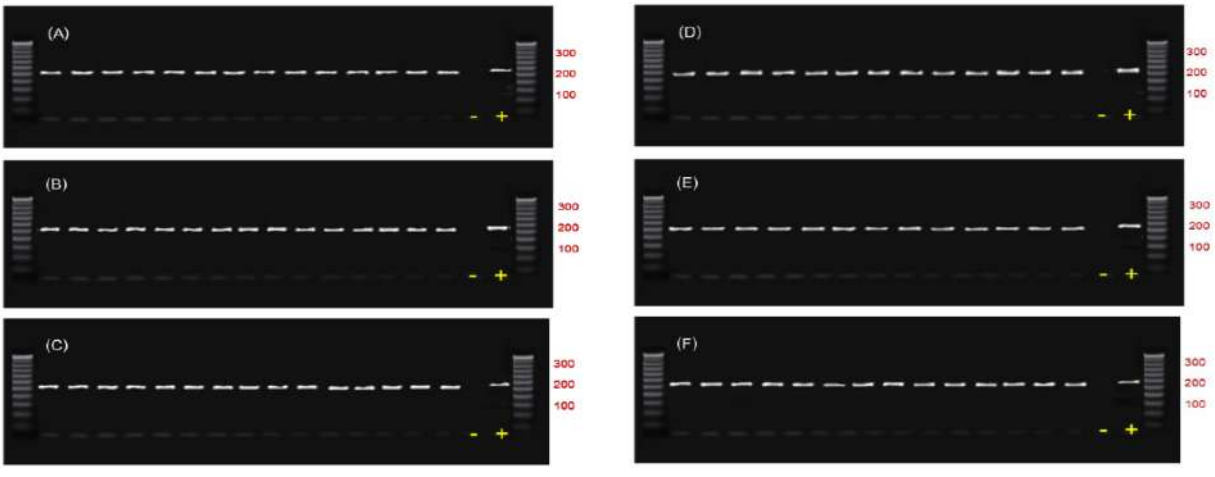

Figure 5 DNA of *Bactrocera correcta* from six Thai biogeographical regions (A=North, B=Central, C=South, D=West, E=Northeast and F=East) was amplified using the *B. correcta* - specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control was ddH_2O. Positive control sample was *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker

4.4 ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนในการส่งออก

จากการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มี ความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนจากการสุ่มตรวจผักผลไม้ (intercepted samples) โดยเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ชมพู่ ถั่วฝักยาว มะไฟ น้อยหน่า มะม่วง และลิ้นจี่ จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง (Table 4) นำตัวอย่างหนอนที่ตรวจพบในตัวอย่างพืชชนิดต่าง ๆ มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* (Bco-F1 กับ Bco-R1) พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 141 คู่เบส จากตัวอย่างหนอนที่พบการปนเปื้อนในชมพู่ และมะม่วงที่ต้องการส่งออกไปประเทศอังกฤษ และสวิตเซอร์แลนด์ (Figure 6)

ยืนยันความถูกต้องโดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ให้ผลการตรวจสอบบวกต่อคู่ไพรเมอร์ Bco-F1 และ Bco-R1 วิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูล GenBank พบความเหมือนที่ 99 - 100% แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

Table 4 Detection of *Bactrocera correcta* intercepted using species-specific primer (Bco-F1 and Bco-R1). 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 fruit	Scientific name (host plant)	Exporting country	Result	Scientific name (fruit flies)
Rose apple	*Syzygium samarangense*	England	+	*Bactrocera correcta*
Yard long bean	*Vigna unguiculata* L.	England	-	*Zeugodacus cucurbitae*
Ramble Bambi	*Baccaurea ramiflora* Lour.	Spain	-	*Bactrocera carambolae*
Custard apple	*Annona reticulate* L.	China	-	*Bactrocera dorsalis*
Mango	*Mangifera indica* L.	Switzerland	+	*Bactrocera correcta*
Lychee	*Litchi chinensis* Sonn	Switzerland	-	*Bactrocera dorsalis*
Custard Apple	*Annona reticulate* L.	Denmark	-	*Bactrocera dorsalis*
Yard long bean	*Vigna unguiculata* L.	Switzerland	-	*Zeugodacus cucurbitae*
Total				

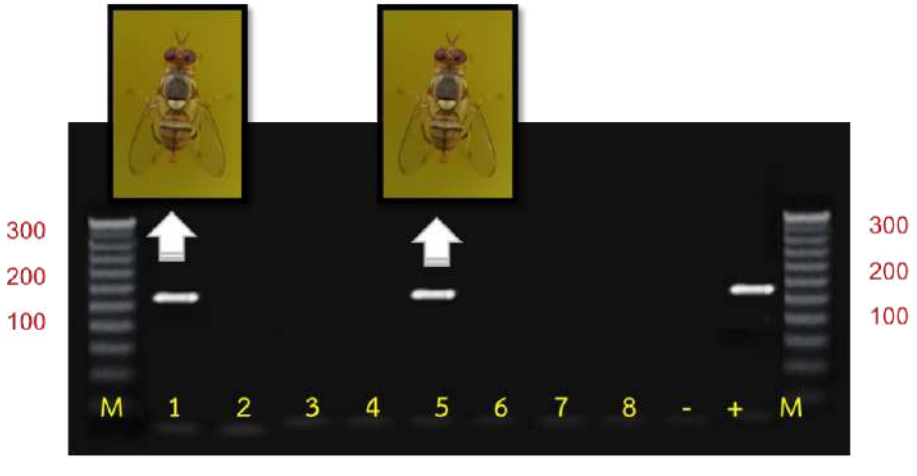

Figure 6 DNA from unknown larvae species was amplified using the *Bactrocera correcta* specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1

Lanes 1- 8: intercepted fruit fly larvae
Lane 9: negative (ddH_2O)
Lane 10: *Bactrocera correcta* positive control sample
Lane M: D2000 Marker

จากการนำหนอนที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างบางส่วนมาเลี้ยงไว้เพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย และจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าผลที่ได้จากการจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานนั้นสอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรวจสอบด้วยใช้ไพรเมอร์ LCO1490/ HCO2198 จากยีน *cox1* และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 100 % ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำไปใช้ในการตรวจสอบแมลงวันผลไม้ที่เป็นศัตรูพืชกักกันในพืชผัก และผลไม้ ก่อนการส่งออกไปยังต่างประเทศ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการวินิจฉัยชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญกับพืชเศรษฐกิจ และมักพบปนเปื้อนไปกับสินค้าเกษตร ผลการศึกษาทำให้ได้ไพรเมอร์ใหม่ที่มีความจำเพาะสูงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ไพรเมอร์ที่ได้สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ทุกระยะการเจริญเติบโต (ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) ได้ภายในระยะเวลา 2 - 3 ชม. ซึ่งในการตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิมโดยนักอนุกรมวิธาน ต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้แมลงเติบโตเป็นตัวเต็มวัยก่อนจึงทำการวินิจฉัยชนิดได้ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 3 - 4 สัปดาห์ ไพรเมอร์ที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยชนิดศัตรูพืช งานด้านการกักกันพืช และการส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย เนื่องจาก ทำให้การวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชมีความสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และถูกต้องตามมาตรฐานสากล

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. กตัญญูฑิตา ดำช่วย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ให้ความช่วยเหลือ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

ยุวรินทร์ บุญทบ ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร และ สิทธิสิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2563. การจำแนกชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. *วารสารวิชาการเกษตร.* 38(3): 293-306.

Aluja, M. and A. Norrbom. 1999. Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior. CRC Press. 846 p.

Armstrong, K.F., C.M. Cameron and E.R. Frampton. 1997. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: A rapid diagnostic technique for quarantine application. *Bulletin of Entomological Research*. 87(2): 111–118.

Boontop, Y. 2016. Natural variation and biogeography of the melon fruit fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), in Southeast-Asia and the West-Pacific. Ph.D. Thesis. Queensland University of Technology, Australia.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia. CABI. London, UK. 664 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. *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(3): 363-371.

Kunprom, C. and P. Pramual. 2016. DNA barcode variability and host plant usage of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Genome*. 59(10): 792-804.

Life technologies. 2022. Real-time PCR handbook. Available at: https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf. Accessed: March 9, 2019.

Weems, H.W. and T.R. Fasulo. 2011. Guava Fruit Fly, *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Insecta: Diptera: Tephritidae). *University of Florida IFAS Extension*, EENY200/IN357.

White, I.M. and M.M. Elson-Harris. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. CAB International, UK. 601 p.