รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย แผนวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมที่ 1 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อยที่ 1.3 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) ในประเทศไทยโดยเทคนิค real-time PCR

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Real-time PCR assay for the identification of *Thirps palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง จารุวัตถ์ แต้กุล สังกัดกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน อิทธิพล บรรณาการ[1/] รุ่งนภา ทองเครง[2/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[2/]

5. บทคัดย่อ

เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด ปัจจุบันเป็นปัญหาที่สำคัญของกล้วยไม้ส่งออก สำนักงานอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention: IPPC) ได้กำหนดวิธีตรวจวินิจฉัยเพลี้ยไฟชนิดนี้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเรียกว่า real-time PCR assay for *Thrips palmi* ลงใน ISPM No.27: Annex 01 อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการทดลองอย่างจริงจังเกี่ยวกับวิธีการนี้กับเพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์ในประเทศไทยมาก่อน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิค real-time PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม แม่นยำและมีเสถียรภาพ ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2556 – กรกฎาคม 2558 โดยใช้ตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้ายที่เก็บจากแหล่งปลูกกล้วยไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออก

ที่สำคัญ ในเขตปริมณฑลกรุงเทพฯ ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำไพรเมอร์และโพรบทั้งชนิด COI (Cytochrom oxydase Subunit I) และ SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) ทดสอบในปฏิกิริยา real-time PCR เพื่อตรวจจับ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้าย พบว่าสภาพที่แนะนำโดย ISPM สามารถตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้ายได้โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดให้ค่า Cp ต่ำกว่า 35 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพบว่าที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ COI และ SCAR ได้แก่ 900 และ 300 nM ตามลำดับ โดยใช้โพรบความเข้มข้นเท่ากันคือ 100 nM ส่วนการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยา โดยใช้ตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้าย 5 ตัวอย่างทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเปรียบเทียบกับเพลี้ยไฟชนิดอื่นอีก 14 ตัวอย่างพบว่าไพรเมอร์และโพรบทั้ง 2 ชนิดมีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายโดยไพรเมอร์ COI มีค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.92 – 27.76 และไพรเมอร์ SCAR มีค่า Cp อยู่ระหว่าง 25.14 – 28.25 ผลการทดลองนอกจากได้วิธีการในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายในกล้วยไม้ตัดดอกก่อนการนำเข้าและส่งออกแล้วยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชกักกันที่สำคัญชนิดอื่นๆ ในอนาคต

Thrips palmi Karny (Thysanoptera: Thripidae) is one of the most important phytophagous pests in Thailand. This pest plays a critical impact on exporting agricultural products, especially the export of orchid-cutting flower to EU. The International Plant Protection Convention (IPPC) has endorsed the identification of *T. palmi* using the real-time PCR assay into the International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) No. 27: Annex 01. Despite its importance, the use of this molecular technique has not yet been intensely studied in Thailand. The primary goal of this study is to employ environmental conditions of the assay provided by IPPC to detect Thai strain *T. palmi*, as well as to obtain the suitable molecular technique for precise identification. The experiment was carried out from October 2013 to July 2015. The results were drawn from 40 *Thirps* samples collected from major exported-orchid farms around Bangkok, and from the real-time PCR reactions using both COI and SCAR primers. The environmental condition and approach provided by ISPM could detect Thai strain of *T. palmi* with the Cp value below 35 in both primers. The sensitivity test suggested that the suitable concentration of COI and SCAR markers were 900 and 300 nM respectively at 100 nM of probe concentration. The results of specificity test were assessed from 19 samples, 5 of which were *T. palmi* including a single sample of the last-instar lava. The real time reaction could detect all 5 *T. palmi* sample at the Cp value from 23.92 - 27.76 for COI marker and 25.14 – 28.25 for SCAR marker. Our results can be used in the detection of *T. palmi* at port of entry for both export and import agricultural commodities. The detection protocol can be modified for other insect quarantine pests in the long run.

Keywords: *Thrips palmi*, melon *Thrips*, real-time PCR, quantitative PCR

คำนำ

เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด (polyphagous pests) โดยส่วนใหญ่พบเข้าทำลายพืชผักและไม้ดอก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชในสกุล Cucurbitaceae และ Solanaceae. มีถิ่นกำเนิดมาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแพร่ระบาดกระจายครอบคลุมเขตร้อนชื้น กึ่งร้อนชื้น ตลอดถึงชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกและแคริบเบียน มีรายงานการแพร่กระจายในเขตอเมริกาเหนือ อเมริกากลางและอเมริกาใต้ตลอดถึงแอฟริกา (Murai, 2002; PaDIL, 2007; EPPO, 2013) ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเข้าทำลายพืชโดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชในส่วนยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอกและผลทำให้ใบเกิดรอยด่างมีสีซีด การทำลายเห็นชัดเจนเมื่อพบเข้าทำลายกลีบดอกในไม้ดอก (ศิริณี, 2544) สำนักงานอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention: IPPC) ภายใต้มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary: SPS) ได้จัดเพลี้ยไฟฝ้ายให้เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ และต้องเฝ้าระวังในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร การตรวจวิเคราะห์วินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้ายที่ถูกต้องและรวดเร็วจึงเป็นหัวใจสำคัญของการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรในปัจจุบัน

การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟฝ้ายออกจากเพลี้ยไฟศัตรูพืชชนิดอื่น สามารถทำได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยชนิดมักเกิดความคลาดเคลื่อน เนื่องจากสาเหตุหลายประการได้แก่ 1) ขนาดลำตัวที่มีขนาดเล็กยากต่อการวินิจฉัย 2) ปัญหาทางด้าน cryptic species คือการมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนหรือใกล้เคียงกันแต่เป็นชนิดที่แตกต่างกัน 3) ความคิดเห็นในการตรวจวินิจฉัยของนักอนุกรมวิธานไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้แล้วการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถวินิจฉัยได้เฉพาะระยะตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟ แต่ใช้ไม่ได้ในเพลี้ยไฟระยะตัวอ่อน ระยะก่อนเข้าดักแด้และระยะดักแด้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่เพียงพอในการตรวจวินิจฉัย ในปัจจุบันเพื่อให้ได้การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชชนิดนี้ที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว IPPC จึงได้บรรจุการตรวจจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟฝ้ายโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ลงใน ISPM No.27: Annex 01 ว่าด้วย การตรวจจำแนกชนิดศัตรูพืชควบคุม (Diagnostic protocols for regulated pests) ซึ่งดำเนินการโดยใช้วิธีตรวจสอบทางชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ วิธีดังกล่าวนี้เรียกว่า “Real-time PCR assay for *Thrips palmi*” (FAO, 2006a; FAO, 2009)

เทคนิค real-time PCR เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุล ที่ผสมผสานระหว่างการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ (regular PCR) กับโพรบฟลูออเรสเซนต์ (probe) ที่จับกับผลผลิต DNA (fluorescent detection) ในแต่ครั้งที่ทำการเพิ่มปริมาณ (amplified product) ในกระบวนการโพรบฟลูออเรสเซนต์ ทำหน้าที่เสมือนรายงานผล ซึ่งทำให้สามารถติดตามดูความคืบหน้าของปฏิกิริยาได้ทุกระยะในขณะกำลังดำเนินการ (real time) และทำให้ทราบถึงปริมาณความหนาแน่นของผลผลิต DNA เทคนิค real-time PCR เป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว มีความเฉพาะเจาะจงสูง และง่ายในการดำเนินงานโดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวินิจฉัยชนิดของสิ่งมีชีวิต

Walsh *et al*. (2005) ได้ออกแบบวิธีการในการตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยไฟฝ้าย โดยเทคนิค real-time PCR ร่วมกับการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่เรียกว่า Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) ซึ่ง

แนวทางการวินิจฉัยนี้เรียกว่า “SCAR marker-generated sequence-based real-time PCR assay for *Thrips palmi*” วิธีการนี้ได้นำมาใช้เป็นมาตรฐานควบคุมสุขอนามัยพืช (phytosanitary authorities) ในประเทศอังกฤษ และเวลส์ การสังเคราะห์ไพรเมอร์ดำเนินการโดยใช้วิธี Random Amplified Polymorphic DNA analysis และตรวจสอบโดยวิธี Southem blot analysis ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อเพลี้ยไฟฝ้าย จากการทดสอบโดยใช้เพลี้ยไฟในอันดับ Thysanoptera 21 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* 10 ตัวอย่าง จากประเทศโดมินิกัน รีพับบลิค ญี่ปุ่น ไทย และ สหราชอาณาจักร พบว่าสามารถใช้วิธี real-time PCR ตรวจวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้ายที่ค่า cycle threshold (Ct) อยู่ระหว่าง 18.75 – 26.41 การวินิจฉัยมีความรวดเร็วโดยใช้เวลาประมาณ 45 นาที ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง real-time PCR assay และการจำแนกโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา จากเพลี้ยไฟ 152 ตัวอย่าง พบว่าทั้ง 2 วิธีการ มีความสอดคล้องกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความมีเสถียรภาพในการตรวจวินิจฉัย

มาตรฐานควบคุมสุขอนามัยพืช (phytosanitary authorities) ณ ประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้ใช้กรรมวิธีการตรวจวินิจฉัยชนิดเพลี้ยไฟฝ้าย โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลของ Kox *et al*. (2005) ตาม ISPM No.27 เรียกวิธีการนี้ว่า “COI sequence-based real-time PCR assay for *Thrips palmi*” ซึ่งเป็นการใช้ยีน Cytochrome OxydaseI (COI) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค real-time PCR ทั้งนี้ primers ที่ใช้มีความเฉพาะเจาะจงสูง อย่างไรก็ตามเมื่อนำ primers ดังกล่าวมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยา PCR ปกติพบว่า ชิ้นส่วน DNA ดังกล่าวไม่มีความเฉพาะเจาะจง จากผลการทดลองพบว่าจากตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้าย 23 ตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์ชนิดได้เพียงแค่ 1 ตัวอย่าง (Kox *et al.*, 2005) แต่เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี real-time PCR detection พบว่าวิธีการนี้ให้ผลที่มีประสิทธิภาพ ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 3 ชั่วโมง นอกจากนั้นแล้วไพรเมอร์ที่ใช้ยังมีความเฉพาะเจาะจงสูงและสามารถใช้ได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยไฟฝ้าย อย่างไรก็ตามมีรายงานทดลองพบว่าโพรบ (TaqMan probe) ที่ Kox *et al*. ใช้ในเทคนิคข้างต้นไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างบางส่วนของเพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์จากประเทศอินเดีย ซึ่งลายพิมพ์ DNA เหล่านี้ได้ถูกเก็บไว้ใน GenBank และยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้เมื่อนำลายพิมพ์ DNA ดังกล่าวมาเปรียบเทียบความแตกต่างทั้งในแง่อนุกรมวิธานและความสัมพันธุ์ในเชิงวิวัฒนาการ (Phylogeny) (Asokan *et al.*, 2007)

การทดลองนี้เป็นการนำเทคนิค real-time PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม แม่นยำรวดเร็วและมีเสถียรภาพ (reliability) ของการตรวจวินิจฉัย ซึ่งประกอบไปด้วยความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ (primers) และโพรบ (probe) ต่อสายพันธุ์เพลี้ยไฟฝ้านในประเทศไทย สภาพการทดลองและวิธีดำเนินงาน ตลอดถึงความรวดเร็วและแม่นยำของการวินิฉัยจำแนกชนิด ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยเพลี้ยไฟฝ้ายในสินค้าเกษตรก่อนนำเข้าและส่งออก กรรมวิธีและรูปแบบการวิจัยยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับแมลงศัตรูพืชกักกันที่สำคัญชนิดอื่นๆ ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟเพื่อการสกัด DNA ได้แก่ พู่กันขนาดเล็ก แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % หลอดพลาสติ กเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 ml (eppendorf tube) อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูลเช่น เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) สมุดบันทึก เป็นต้น
2. ชุดสกัด DNA ได้แก่ QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue
3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำสไลด์ถาวรสำหรับตัวอย่างเพลี้ยไฟ ก่อนและหลังสกัด DNA ประกอบด้วย sodium hydroxide ความเข้มข้น 5% แอลกอฮอล์ Cannada balsum mounting media สไลด์และกระจกปิดสไลด์
4. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับเก็บตัวอย่างและสารเคมี หม้อนึ่งความดันไอน้ำสูง เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่อง real-time PCR
5. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตริโอ และแบบคอมพาวด์ แว่นขยายขนาด 10 เท่าขึ้นไป
6. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่งความละเอียดสูง เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง เป็นต้น
7. อุปกรณ์ในจัดเก็บและจัดการตัวอย่างเพื่อการสืบค้น เช่น เครื่องพิมพ์บาร์โค้ด กล่องสไลด์

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่างเพลี้ยไฟ (Acquisition of *Thrips* material)

ดำเนินการเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟจากแปลงปลูกกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญและแปลงพืชผักสวนครัวที่เป็นแหล่งอาศัยของเพลี้ยไฟใกล้แปลงปลูกกล้วยไม้ หลังจากเก็บตัวอย่างทำการบันทึกรายละเอียดตามข้อกำหนดใน ISPM No.6 (FAO, 2006b) ได้แก่ แหล่งที่เก็บ พิกัดทางภูมิศาสตร์ พืชอาศัย วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง เป็นต้น เก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟชนิดอื่นนอกเหนือจากเพลี้ยไฟฝ้าย เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ เช่น *Thrips hawaiiensis*, *Scirtothips dorsalis* เก็บรักษาตัวอย่างเพลี้ยไฟในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (95 % ethanol) หลังจากนั้นนำตัวอย่างแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (°C) แบ่งตัวอย่างที่เก็บออกเป็น 2 ส่วน ตัวเต็มวัยส่วนหนึ่งเก็บเพื่อทำสไลด์ถาวร (ตัวอย่างแห้ง) โดยดำเนินการตามกรรมวิธีของ ศิริณีและคณะ (2554) อีกส่วนเก็บทั้งระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยและดักแด้ เพื่อนำไปสกัด DNA (ตัวอย่างสด) ทำการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดำเนินการตามคู่มือการตรวจจำแนกชนิดโดย ศิริณี (2554) ดำเนินการ ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การสกัด DNA จากตัวอย่างเพลี้ยไฟ (DNA extraction)

ทำการสกัด DNA จากเพลี้ยไฟ โดยกระบวนการสกัด DNA เพื่อการเก็บรักษาตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction protocol) ข้อดีของวิธีนี้คือ หลังจากทำการสกัด DNA แล้วตัวอย่างยังคงสมบูรณ์และสามารถนำตัวอย่างใช้ในการทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้อ้างอิงต่อไป (voucher specimens) วิธีการสกัด DNA นี้ได้พัฒนาประยุกต์มาจากวิธีการสกัด DNA ของแตนเบียนไข่โดย Taekul *et al.* (2013) และวิธีการสกัด DNA จากเพลี้ยไฟที่เรียกว่า “salting-out” ซึ่งพัฒนาจาก Sunnucks & Hales (1996) และ Rugman-Jones *et al.*

(2006) เริ่มดำเนินการโดยนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เก็บไว้ในในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % ที่อุณหภูมิ -20 °C มาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA ของ QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit นำตัวอย่างเพลี้ยไฟเปลี่ยนถ่ายลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง (25±1 °C) นาน 24 ชั่วโมงเพื่อทำให้ผนังลำตัวและเนื้อเยื่อของตัวอย่างมีความอ่อนตัวลง หลังจากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนที่แนะนำจาก Kit Protocol โดยประยุกต์ในขั้นตอนเริ่มต้น คือการเติมสารทำละลายบัฟเฟอร์ ATL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร (µl) และเอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteinase K) 20 µl หลังจากนั้นนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่อยู่ในหลอดทดลองอบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายสารละลายส่วนบน (supernatant) ลงในหลอดทดลองใหม่ หลังจากนั้นดำเนินการตามวิธีการสกัด DNA ของ Kit Protocol สำหรับส่วนของตัวอย่างที่เหลือในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาณ 300 µl หลังจากเติมน้ำกลั่นทิ้งไว้ประมาณ 45 นาทีถึง 1 ชั่วโมง เติมแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 700 µl ทั้งนี้การเติมแอลกอฮอล์โดยตรงลงบนตัวอย่างอาจทำให้ตัวอย่างแข็งตัวอย่างรวดเร็วและผนังลำตัวแตกได้ เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 °C เพื่อการทำสไลด์ถาวรต่อไป

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค real-time PCR (real-time PCR: TaqMan assay)

เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ 2 ชุด ตามวิธีการที่ระบุใน ISPM No.27: Annex 01 ว่าด้วยการตรวจจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟฝ้ายด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่งประกอบด้วย

1) ไพรเมอร์ CO I (CO I sequence-based real-time PCR assay) พัฒนาประยุกต์วิธีการทดลองตาม Kox *et al*. (2005) ไพรเมอร์และโพรบ ที่ใช้สำหรับการทดลองได้แก่

PCR primer: Tpalmi 139F* (5’-TCATGCTGGAATTTCAGTAGATTTAAC -3’)

PCR primer: Tpalmi 286R* (5’-TCACACTRAATAATCTTAGTTTTTCTCTTG-3’)

TaqMan probe: TpP (6-FAM 5’-TAGCTGGGGTATCCTCAA-3’ MGB)

2) ไพรเมอร์ SCAR (SCAR marker-generated sequence-based real-time PCR assay) พัฒนาประยุกต์วิธีการตาม Walsh *et al*. (2005) ไพรเมอร์และโพรบ ที่ใช้สำหรับการทดลองได้แก่

PCR primer: P4E8-362F (5’-CCGACAAAATCGGTCTGATGA-3’)

PCR primer: P4E8-439R (5’-GAAAAGTCTCAGGTACAACCCAGTTC-3’)

TaqMan probe: P4E8-385T (FAM 5’-AGACGGATTGACTTAGACGGGAACGGT-3’)

ดำเนินการโดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ DNA สำเร็จรูป (core reagent kit) TaqMan PCR โดยชุดสารละลาย DNA ตั้งต้น (reaction mixture) มีปริมาณ 20 µl ซึ่งประกอบไปด้วย TaqMan Universal Master Mix (Light Cycler 480 Probes Master) 10 µl ไพรเมอร์แต่ละชนิดความเข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์ (µM) ใช้ปริมาณ 1.8 µl และโพรบ (TaqMan probe for *T. palmi*) ซึ่งใช้เป็นตัวตรวจจับชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย โดยในแต่ละไพรเมอร์ใช้ความเข้มข้น 0.1 µM ปริมาณ 0.2 µl ใช้ DNA ตั้งต้น 5 µl ตรวจจับการเพิ่มของปริมาณ DNA โดยใช้ fluorescence ของ ABI Prism 7700 หรือ ABI 7900HT (Sequence Detection Systems) ตัวอย่างจะทำ

ปฏิกิริยาในถาดพลาสติกหลุมมีจำนวน 96 หลุม (LightCycler® 480 Mutiwell plate 96) ในการทำปฏิกิริยาจำเป็นต้องมีตัวควบคุมลบ (negative control) ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทน DNA ของเพลี้ยไฟในทุกครั้ง

ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ pre-incubation ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 10 นาที หลังจากนั้น amplification จำนวน 40 รอบ โดยแต่ละรอบใช้อุณหภูมิ 95 °C นาน 10 วินาทีและ 60 °C นาน 1 นาที ในขณะทำปฏิกิริยาในเครื่อง LightCycler® 480 DNA Probes ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเพลี้ยไฟฝ้ายจะเข้าไปจับกับเส้น DNA ที่สร้างขึ้นใหม่ในแต่ละรอบและจะเปล่งแสง fluorescence ออกมาที่มีการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นและแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semilog curve) ที่เกิดสะสมในแต่ละรอบของปฏิกิริยา real-time PCR ซึ่งค่า crossing point (Cp values) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งแสดงถึงค่าเริ่มต้นที่มีการเปล่งแสงหรือเกิด annealing Cp ดังนั้นจึงใช้ค่าดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีปริมาณผลผลิต PCR เป้าหมาย และบอกได้ถึงปริมาณผลผลิต PCR เป้าหมาย โดยถ้ามีผลผลิต PCR เป้าหมายมากค่า Cp จะต่ำ จากรายงานของ Kox *et al.* (2005) พบว่าหากสารละลายตั้งต้นเป็น DNA จากตัวอย่างของ *T. palmi* ค่า Cp values ควรมีค่าต่ำกว่า 40

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกอุณหภูมิของ PCR thermocycler steps และค่า Crossing point (Cp) เมื่อมีการตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้าย บันทึกระยะเวลาในการตรวจจับในแต่ละตัวอย่าง ส่วนในกรณีที่ค่า Cp สูงกว่า 35 แสดงว่าไม่มีการพบเพลี้ยไฟฝ้ายถึงแม้ว่ามีปริมาณผลผลิต DNA อย่างไรก็ตามถ้าตัวอย่างที่ศึกษาทดลองเป็นเพลี้ยไฟฝ้ายจริงให้ปรับเปลี่ยนค่า PCR thermocycler steps หลังจากนั้นทำการทดลองซ้ำ หากยังไม่มีการตรวจพบให้บันทึกผลเป็นลบ (negative result)

เวลาและสถานที่

เวลา: ตุลาคม 2556 – กรกฎาคม 2558

สถานที่:

- แปลงปลูกกล้วยไม้ส่งออก ในเขตปริมณฑลได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร สมุทรปราการ ปทุมธานี และนนทบุรี
- พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
- ห้องปฏิบัติการวิจัยกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้ายและเพลี้ยไฟในสกุลใกล้เคียงที่พบปะปนในแปลงกล้วยไม้ บันทึกข้อมูลการเก็บตัวอย่าง ระบุเลขรหัสเพื่อใช้อ้างอิงในห้องปฏิบัติการ (Ref. code) และติดตั้งบาร์โค้ดตัวอย่างที่ได้หลังจากการสกัด DNA แล้ว (Museum voucher ID หรือรหัส QR code) ซึ่งขึ้นต้นด้วยรหัสของพิพิธภัณฑ์แมลง EMBT ENT

(Entomology and Zoology Museum Bangkok Thailand, Entomology Collection) ซึ่งตามด้วยรหัสตัวเลขหรือ “BARCODE”ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีรหัสตัวเลขที่ไม่ซ้ำกัน ระบบ Museum voucher ID เป็นระบบสากลซึ่งแต่ละพิพิธภัณฑ์ทั่วโลกได้ลงทะเบียนไว้ในฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของโลก จึงทำให้ชื่อรหัสย่อในแต่ละพิพิธภัณฑ์ทั่วโลกไม่ซ้ำกัน นอกจากนี้แล้วตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีรายละเอียดข้อมูลที่ไม่ซ้ำกัน (unique identifiers) รหัสบาร์โค้ดนี้บรรจุรายละเอียดของข้อมูลที่สำคัญได้แก่ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง วันเดือน ปี ที่เก็บ สถานที่และพิกัดภูมิศาสตร์ ความสูงจากระดับน้ำทะเล เทคนิคในการเก็บตัวอย่าง ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต ชนิดที่ทำการวินิจฉัยและผู้วินิจฉัย เป็นต้น รายละเอียดเหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากเป็นข้อกำหนด ในการส่งข้อมูลไปเก็บยังฐานข้อมูลสากลเช่น ฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (Barcode of Life Data Systems: BOLDsystem) หรือการส่งลายพิมพ์ DNA ไปเก็บยัง GenBank ตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองได้ดำเนินการตามข้อกำหนดดังกล่าว ปัจจุบันเก็บรวบในฐานข้อมูลท้องถิ่น (local database) พิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตรและสามารถสืบค้นตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองได้จาก museum voucher ID (Table 1)

การสกัด DNA จากเพลี้ยไฟโดยกระบวนการสกัดเพื่อการเก็บรักษาตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction protocol) เป็นวิธีการที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัด DNA ของแตนเบียนไข่โดย Taekul *et al.* (2013) ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ที่ไม่เคยมีการใช้วิธีการนี้มาก่อนในแมลงปากดูดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพลี้ยไฟ ตัวอย่างที่เคยมีการรายงานวิธีการสกัด DNA จากเพลี้ยไฟที่ผ่านมาได้แก่ Sunnucks and Hales (1996) และ Rugman-Jones *et al*. (2006) ทำการสกัดเพลี้ยไฟเพื่อเก็บรักษาตัวอย่างโดยกระบวนการที่เรียกว่า “salting-out” โดยนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลอง ใช้เข็มขนาดเล็ก (sterilized minute pin) เจาะตรงบริเวณส่วนท้องของเพลี้ยไฟ ซึ่งถือเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน Kox *et al.* (2005) ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ดำเนินการสกัด DNA โดยวิธีการการบดตัวอย่าง (destructive techniques) โดยใช้หลอดขนาดเล็ก (micropestle) บดเพลี้ยไฟในสารละลาย Lysis buffer หลังจากนั้นทำการสกัด ดี เอ็น เอ โดยใช้เอ็นไซม์เพื่อย่อยสลายโปรตีนตามวิธีการโดยทั่วไปของการสกัด DNA จากสิ่งมีชีวิต ถึงแม้ว่าสามารถทดลองในตัวอย่างที่เป็น ตัวอ่อน ดักแด้และตัวเต็มวัย แต่จำเป็นต้องบดมากถึง 9 ตัวอย่างในแต่ละ reaction เพื่อทดสอบความไวของ primers อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างเพียง 1 ตัวอย่าง สามารถให้ผลผลิต DNA ที่เพียงพอต่อการทดลอง นอกจากนี้แล้วข้อดีของวิธีนี้คือหลังจากทำการสกัด DNA แล้วตัวอย่างยังคงสมบูรณ์ ตัวอย่างสามารถนำมาทำเป็นสไลด์ถาวรเพื่อใช้อ้างอิงเปรียบเทียบ จากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการสกัด DNA มีความใสมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการสกัด DNA เนื่องจากเนื้อเยื่อของเพลี้ยไฟถูกย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ Protenase K ซึ่งมีความชัดเจนและง่ายต่อการตรวจวินิจฉัยและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การทดสอบชุดไพรเมอร์และโพรบในปฏิกิริยา real-time PCR (Selection of primers and probe for real-time PCR)

ทดสอบชุดไพรเมอร์และโพรบทั้ง COI และ SCAR กับเพลี้ยไฟฝ้ายที่เก็บจากแปลงกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญของเกษตรกรแถบจังหวัดนครปฐมจำนวน 19 ตัวอย่างโดยมีน้ำเป็น negative control อีก 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้ตัวเต็มวัยทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001603 – 0001614, 0001617 – 0001621)

และตัวอ่อนระยะสุดท้ายจำนวน 2 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001615 – 0001616) ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดรวบรวมตาม Table 1 ในการทดลองนี้ไม่ได้ใช้ตัวอย่างที่เป็นไข่และดักแด้เนื่องจากเพลี้ยไฟเป็นแมลงปากดูดที่มีขนาดเล็กและจะวางไข่ที่มีขนาดเล็กและสีค่อนข้างใสในเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ ส่วนดักแด้ของเพลี้ยไฟมีขนาดเล็ก ส่วนใหญ่อยู่ในดินและวัสดุปลูก ซึ่งเป็นไปได้ค่อนข้างยากและมีความซับซ้อนในการเก็บตัวอย่างเพื่อการทดลอง นอกจากนี้ระยะการเจริญเติบโตที่สำคัญของเพลี้ยไฟศัตรูพืชที่ติดไปกับกล้วยไม้ส่งออกที่มีการตรวจพบได้แก่ ระยะตัวเต็มวัย ดำเนินการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR กับเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบจะทำปฏิกิริยาในถาดพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler 480 Mutiwell plate 96) สำหรับการทดสอบสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR กับไพรเมอร์ และโพรบที่เลือกไว้ในแต่ละปฏิกิริยา (reaction) ใช้ปริมาณรวมของสารที่ใช้ในการทดสอบไพรเมอร์ COI และ SCAR ในแต่ละปฏิกิริยา (reaction) จำนวน 20 µl ประกอบด้วยส่วนประกอบตามที่กล่าวมาในวิธีการข้างต้น ซึ่งผลจากการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR กับไพรเมอร์ COI (139F/286R) พบว่าสามารถตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้ายได้ (positive result) โดยให้ค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.71 – 28.95 (Figure 1) ซึ่งได้นำตัวอย่างที่มีค่า Cp value ต่ำที่สุดมาทดสอบหาความไวของ primer (sensitivity test) ต่อไป น้ำกลั่นที่ใช้เป็น control reaction ในการทดลองให้ผลเป็นลบ (negative results) ส่วนผลจากการทดสอบปฏิกิริยากับไพรเมอร์ SCAR (P4E8-362F/ P4E8-439R) พบว่าสามารถตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้ายได้เช่นกันโดยให้ค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.92 – 31.72 (Figure 2)

การทดสอบสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR (Optimization of real-time PCR)

การทดสอบความไวของไพรเมอร์ (sensitivity test) หรือสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยาดำเนินการโดยทำการเจือจางความเข้มข้นของ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้ายที่ 1, 10, 100 และ 1000 เท่าจาก DNA ที่สกัดได้จากเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่าง ซึ่งเลือกจากตัวอย่างที่ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดจากการทดสอบกับเพลี้ยไฟฝ้าย 19 ตัวอย่างข้างต้นกับไพรเมอร์ COI ได้แก่ตัวอย่างรหัส EMBT ENT 0001605 (Table 1)ในการทดสอบความไวของไพรเมอร์ COI (139F/286R) และไพรเมอร์ SCAR (P4E8-362F/ P4E8-439R) ต่อการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายในปฏิกิริยา real-time PCR ดำเนินการที่มีความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่แตกต่างกันคือ 50, 150, 300, 900 และ 1200 nM และใช้ probe ที่ความเข้มข้นคงที่คือ 100 nM ผลการทดลองแสดงใน Table 2 (ไพรเมอร์ COI) และ 3 (ไพรเมอร์ SCAR) พบว่าทั้ง 2 ไพรเมอร์ไม่สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ทดสอบคือ 50 nM ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Kox *et al.* (2005) อย่างไรก็ตามเริ่มตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ที่ไพรเมอร์ความเข้มข้น 150 nM โดยทั้ง 2 ไพรเมอร์สามารถตรวจจับเพลี้บไฟฝ้ายได้ที่ DNA ความเข้มข้นตั้งต้น เจือจาง 10 เท่าและ 100 เท่า แต่ไม่สามารถตรวจจับได้ที่ความเจือจางของ DNA 1000 เท่า ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ COI ตั้งแต่ 300 – 1200 nM มีความสามารถในการตรวจจับ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้ายที่เจือจางตั้งแต่ 1 เท่าถึง 1000 เท่า หรือกล่าวได้ว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวอัตราการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายต่อประชากรเพลี้ยไฟชนิดอื่นคือ 1:1000 ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1200 nM ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดคือ 22.88 เมื่อทดสอบกับความเข้มข้นของ DNA ที่ไม่ถูกเจือจาง อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นเดียวกันเมื่อทดสอบกับ DNA ของเพลี้ยไฟที่เจือจาง 1000 เท่าให้ค่า Cp สูงถึง 33.17

ซึ่งมีความใกล้เคียงกับค่า Cp ที่ไม่สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ (>35) จึงมีแนวโน้มว่าค่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ COI ที่เหมาะสมในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งแต่ 1 – 1000 เท่าคือ 900 nM (Table 2, Figure 3)

ไพรเมอร์ SCAR ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถตรวจจับ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้ายที่เจือจาง 1000 เท่าโดยเห็นได้จากค่า Cp ที่มากกว่า 35 อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ตั้งแต่ 150 – 1200 nM มีความสามารถในการตรวจจับ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้ายที่เจือจางตั้งแต่ 1 เท่าถึง 100 เท่า ซึ่งหมายถึงไพรเมอร์ SCAR ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีอัตราการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายต่อประชากรเพลี้ยไฟชนิดอื่นคือ 1:100 ซึ่งให้ค่าการตรวจจับน้อยกว่าไพรเมอร์ COI ถึง 10 เท่า ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 300 nM ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดคือ 24.46 เมื่อทดสอบกับความเข้มข้นของ DNA ที่ไม่ถูกเจือจาง และที่ความเข้มข้นเดียวกันให้ค่า Cp ต่ำสุดเมื่อทดสอบกับ DNA เพลี้ยไฟฝ้ายที่เจือจาง 10 เท่าและ 100 เท่าคือ 28.57 และ 32.02 ตามลำดับ (Table 3, Figure 4) จึงกล่าวได้ว่าค่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ SCAR ที่เหมาะสมในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งแต่ 1 – 100 เท่าคือ 300 nM

การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา real-time PCR (Specificity of real-time PCR)

ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ COI และ SCAR ในปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้ตัวอย่างเพลี้ยไฟตาม Table 1 ซึ่งเป็นตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เก็บจากแปลงกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญเขตภาคกลาง รวมถึงเพลี้ยไฟในแปลงพืชอาหารใกล้เคียง เนื่องจากเพลี้ยไฟเหล่านี้มีโอกาสพบปะปนในกล้วยไม้ส่งออก เพลี้ยไฟที่ใช้ในการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยา real-time PCR มีทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *Thrips palmi* จำนวน 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวเต็มวัย 4 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001622, 0001625, 0001627 – 0001628) และตัวอ่อนระยะสุดท้ายจำนวน 1 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001624) ซึ่งเก็บจากแหล่งปลูกกล้วยไม้จังหวัดนครปฐม ปทุมธานีและสมุทรสาคร เพลี้ยไฟ *Thrips hawaiiensis* จำนวน 3 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001629 – 0001631) *Thrips parvispinus* จำนวน 1 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001640) *Scirtothips dorsalis* ซึ่งเป็นเพลี้ยไฟที่มีลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับเพลี้ยไฟฝ้ายจำนวน 3 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001632 – 0001634) เพลี้ยไฟ *Frankliniella schultzei* จำนวน 2 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001637 – 0001638) เพลี้ยไฟ*Megalurothips usitatus* จำนวน 2 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001639, 0001641) และเพลี้ยไฟ *Caliothrips indicus* (EMBT ENT 0001642) *Rhipiphorothrips cruentatus* (EMBT ENT 0001636) อย่างละ 1 ตัวอย่าง ดำเนินการสกัด DNA จากเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างในแต่ละปฏิกิริยา (reactions) โดยใช้วิธีการสกัดแบบการไม่ทำลายตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction protocol)

ผลจากการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ COI (139F/286R) และโพรบสำหรับเพลี้ยไฟฝ้าย (TpP) พบว่า DNA ของตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้ายทั้ง 5 ตัวอย่างทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยให้ผลเป็นบวก (positive result) โดยมีค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.92 – 27.76 ในขณะที่ตัวอย่างของเพลี้ยไฟชนิดอื่นอีก 14 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบ (negative result) เช่นเดียวกันกับปฏิกิริยาที่ใช้น้ำกลั่นเป็นมาตรฐานควบคุม (control reaction) ซึ่งกล่าวได้ว่าฟลูออเรสเซนต์โพรบที่ใช้ตาม ISPM No.27: Annex 01 (Kox *et al.* 2005) มีความเฉพาะเจาะจงในการ

ตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย สายพันธุ์ในประเทศไทย (Figure 5) ส่วนการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ SCAR (P4E8-362F/P4E8-439R) และโพรบสำหรับเพลี้ยไฟฝ้าย (P4E8-385T) ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันกับไพรเมอร์ COI คือ ผลของปฏิกิริยาที่ใช้ DNA ของตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้ายทั้ง 5 ตัวอย่างทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยให้ผลเป็นบวก (positive result) โดยมีค่า Cp อยู่ระหว่าง 25.14 – 28.25 ในขณะเดียวกันพบ DNA ของตัวอย่างเพลี้ยไฟ *Bathrips melanicornis* (EMBT ENT 0001635) ซึ่งไม่ใช่เพลี้ยไฟฝ้ายให้ผลเป็นบวกเช่นกันโดยมีค่า Cp 33.40 ตัวอย่างของเพลี้ยไฟชนิดอื่นอีก 13 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบ (negative result) เช่นเดียวกันกับปฏิกิริยาที่ใช้น้ำกลั่นเป็นมาตรฐานควบคุม จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าฟลูออเรสเซนต์โพรบ SCAR สำหรับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ใช้ตาม ISPM No.27: Annex 01 (Walsh *et al.*, 2005) ค่อนข้างมีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย สายพันธุ์ในประเทศไทย (Figure 6)

มีข้อสังเกตในรายงาน ISPM No. 27 (FAO, 2006a) ว่ามีตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้ายจำนวนหนึ่งที่เก็บได้จากประเทศอินเดีย ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดโดยใช้โพรบ (COI TaqMan probe) ที่ Kox *et al*. (2005) ได้รายงานไว้ใน ISPM ซึ่งลายพิมพ์ DNA ดังกล่าวได้ถูกเก็บไว้ใน GenBank เพื่อการอ้างอิงศึกษานอกจากนี้แล้วยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้ในแง่การจัดจำแนกเปรียบเทียบความแตกต่างทั้งในแง่อนุกรมวิธานและความสัมพันธุ์ในเชิงวิวัฒนาการหรือ Phylogeny ของลายพิมพ์ DNA เหล่านี้ (Asokan *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามหลังจากทดลองกระบวนการตรวจวิเคราะห์เพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์ในประเทศไทยโดยเทคนิค real-time PCR พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้องแม่นยำ โดยมีค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.71 – 28.94 (ไพรเมอร์ COI, Figure 1) และ 23.92 – 31.72 (ไพรเมอร์ SCAR, Figure 2) ซึ่งถือเป็นค่าที่ต่ำกว่าคำแนะนำใน ISPM โดยให้ใช้ค่า Ct (Cp ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่อง real-time) ที่ต่ำกว่า 40 ในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย (FAO, 2006a) แต่สำหรับสายพันธุ์ในประเทศไทยนั้น พบว่าค่า Cp ในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายมีค่าต่ำกว่า 35 และสำหรับการทดสอบถึงสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR สำหรับไพรเมอร์และโพรบ COI Kox *et al*. (2005) ได้สรุปว่าอัตราในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 300 และ 900 nM สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตรา 1:100 (ประชากรเพลี้ยไฟฝ้าย *T.palmi* ต่อประชากรเพลี้ยไฟทั้งหมด) และที่ความเข้มข้นของ probe 25 – 100 nM สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตรา 1:1000 ของประชากรเพลี้ยไฟทั้งหมด อย่างไรก็ตามจากการทดลองให้ผลแตกต่างจากที่ได้มีการรายงานใน ISPM คือ ที่ความเข้มข้นของ primers 300 และ 900 nM และความเข้มข้นของ probe ที่ 100 nM สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตราที่ 1:1000 ซึ่งประเมินจากความเจือจางของ DNA 1000 เท่า ซึ่งเป็นค่าอัตราการตรวจจับเพลี้ยไฟที่สูงกว่าที่ Kox *et al*. (2005) ได้เคยรายงานไว้ถึง 10 เท่า (Table 2) ผลจากการใช้ไพรเมอร์และโพรบ SCAR ให้ผลการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.92 – 31.72 ซึ่งถือว่าสูงกว่าค่าที่ Walsh *et al.* (2005) ได้รายงานไว้คือ 18.75 – 26.41 ส่วนอัตราที่เหมาะสมของไพรเมอร์ SCAR ในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายคือ 150 – 1200 nM สามารถตรวจจับ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้ายที่เจือจางถึง 100 เท่า ซึ่งให้ค่าการตรวจจับน้อยกว่าไพรเมอร์ COI ถึง 10 เท่า อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ SCAR ในการตรวจจับ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้ายคือ 300 nM เมื่อดำเนินการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ทั้ง 2 พบว่าไพรเมอร์และโพรบของ COI มีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย แต่ไพรเมอร์และโพรบของ SCAR ค่อนข้างมีความเฉพาะเจาะจงเนื่องจากสามารถตรวจพบตัวอย่างเพลี้ยไฟ

B. melanicornis ซึ่งไม่ใช่เพลี้ยไฟฝ้ายโดยมีค่า Cp 33.40 จึงมีแนวโน้มที่ต้องดำเนินการทดลองโดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* และเพลี้ยไฟ *B. melanicornis* เพื่อยืนยันถึงความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์นี้อีกครั้ง อย่างไรก็ตามจากการทดลองของทั้ง 2 ไพรเมอร์พบว่า การวินิจฉัยมีความรวดเร็วโดยใช้เวลาประมาณ 2 – 3 ชั่วโมงรวมการเตรียมตัวอย่างสารละลายในแต่ละปฏิกิริยา ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง real-time PCR assay และการจำแนกโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา จากตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ทดลองทั้งหมดพบว่าทั้ง 2 วิธีการมีความสอดคล้องกัน 100 เปอร์เซ็นต์แสดงถึงความมีเสถียรภาพในการตรวจวินิจฉัย

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปฏิกิริยา real-time PCR จัดเป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ได้รับการรับรองจาก สำนักงานอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ และได้รับการบรรจุอยู่ในมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ศัตรูพืชสำคัญ ISPM No.27: Annex 01 เทคนิคนี้เป็นวิธีการที่ สะดวก รวดเร็วและแม่นยำ การทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ COI (139F/286R) พบว่าสามารถตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้ายได้โดยให้ค่า Cp ระหว่าง 23.71 – 28.94 ไพรเมอร์ความเข้มข้น 300 และ 900 nM และความเข้มข้นของ probe ที่ 100 nM สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตราประชากรเพลี้ยไฟฝ้ายต่อประชากรของเพลี้ยไฟทั้งหมดที่อัตรา 1:1000 ค่าความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ความเข้มข้นของ DNA ที่แตกต่างกันคือ 900 nM ส่วนไพรเมอร์ SCAR (P4E8-362F/P4E8-439R) ตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้โดยมีค่า Cp 23.92 – 31.72 ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบเท่ากับ COI แต่สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตราประชากรเพลี้ยไฟฝ้ายต่อประชากรของเพลี้ยไฟทั้งหมดที่อัตรา 1:100 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบทั้ง 2 ชนิดต่อการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายพบว่า COI มีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ค่า Cp ต่ำกว่า 35 ส่วนไพรเมอร์และโพรบ SCAR ค่อนข้างมีความเฉพาะเจาะจงเนื่องจากตรวจจับได้เพลี้ยไฟชนิดอื่นที่ค่า Cp ต่ำกว่า 35 อย่างไรก็ตามเทคนิค real-time PCR นี้สามารถตรวจสอบและทราบผลภายใน 2 – 3 ชั่วโมง โดยเห็นผลการตรวจสอบตามเวลาที่แท้จริง (real-time) นอกจากนี้ยังทำให้สามารถทราบถึงปริมาณผลผลิต DNA ที่ได้รับจากปฏิกิริยา (quantitative PCR: qPCR) วิธีการดังกล่าวสะดวกกว่าการเพิ่มปริมาณ DNA ปกติโดยใช้เทคนิค conventional PCR ไม่ต้องนำไปเข้ากระบวนการ gel electrophoresis ในแผ่น agarose gel และย้อมสีด้วย ethedium bromide ซึ่งเป็นสารอันตรายที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ผลการทดลองสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้านซึ่งประกอบด้วย การยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในกรณีผลการตรวจวินิจฉัยชนิดไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน เป็นประโยชน์ในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายในสินค้าเกษตรทั้งก่อนการนำเข้าและส่งออกเสนอต่อ IPPC ถึงผลของความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบทั้งสองต่อสายพันธ์เพลี้ยไฟฝ้ายในประเทศไทยเพื่อนำไปแก้ไขปรับปรุงใน ISPM กรรมวิธีที่ได้จากการทดลองสามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชกักกันชนิดอื่นๆ ที่สำคัญของประเทศไทยในอนาคต

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยโดยใช้ลักษณะ ทางสัณฐานวิทยาในกรณีผลการตรวจวินิจฉัยชนิดไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

2. เป็นประโยชน์ในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายในสินค้าเกษตรทั้งก่อนการนำเข้าและส่งออก

3. ผลของความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบทั้งสอง ต่อสายพันธุ์เพลี้ยไฟฝ้ายในประเทศไทยที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปเสนอต่อ CPM เพื่อขอปรับปรุงเพิ่มเติมในมาตรการสุขอนามัยพืชในการตรวจวิเคราะห์ศัตรูพืชสำคัญ (ISPM No.27: Annex 01) เช่น ข้อเสนอแนะในการใช้ไพรเมอร์และโพรบ COI ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงสูงกว่าการใช้ไพรเมอร์และโพรบ SCAR

4. เป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชกักกันชนิดอื่นๆ ที่สำคัญของประเทศไทยได้ต่อไปในอนาคต

5. เป็นแนวทางในการตรวจพิสูจน์แมลงชนิดอื่นที่ปนเปื้อนไปกับสินค้าเกษตร หรือสินค้าเกษตรแปรรูป ที่อาจเป็นประเด็นการขัดแย้งทางการค้า

11. คำขอบคุณ

การทดลองนี้ไม่สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ ถ้าขาดห้องปฏิบัติการวิจัยที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานจากกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ขอขอบคุณ ดร. ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ผู้ช่วยชี้แนะแนวทางซึ่งทำให้เกิดที่มาของการทดลอง ดร. มานิตา คงชื่นสิน ในการช่วยทบทวนและอ่านต้นฉบับ นอกจากนี้แล้วขอขอบคุณนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยครั้งนี้ทุกท่าน ทั้งในแง่การเก็บตัวอย่าง ประสานงานและให้การสนับสนุน

12. เอกสารอ้างอิง

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ Terebrantia. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. 75 หน้า

ศิริณี พูนไชยศรี, ชลิดา อุณหวุฒิ, พรรณเพ็ญ ชโยภาส, รัตนา ชนะพงษ์, ลัขณา บำรุงศรี, สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี, ยุวรินทร์ บุญทบ และ ณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2554. แมลงการจำแนกและการเก็บตัวอย่าง. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 100 หน้า.

Asokan, R., N.K. Krishna Kumar, V. Kumar and H.R. Ranganath. 2007. Molecular differences in the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and development of a species-specific marker for onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, and melon thrips, *T. palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae), vectors of tospoviruses (Bunyaviridae). Bulletin of Entomological Research. 97: 461–470.

EPPO. 2013. Available www.eppo.org. .(8 April, 2013)

FAO. 2006a Diagnostic protocols for regulated pests (2006). The international Plant Protection Convention (IPPC). International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM No. 27.

FAO. 2006b Guidelines for surveillance (1997). The International Plant Protection Convention (IPPC). International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM No. 6.

FAO. 2009 Annex to ISPM No.27 (Diagnostic protocols for regulated pests) *Thrips palmi*. The international Plant Protection Convention (IPPC). International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM No. 27.

Kox, L.F.F., H.E. van den Beld, C. Zijlstra, and G. Vierbergen. 2005. Real-time PCR assay for the identification of *Thrips palmi*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 35: 141–148.

Murai, T. 2002. The pest and vector from the East: *Thrips palmi*. pp. 19–32. *In*: R. Marullo, & L.A. Mound, eds. *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*. Italy, 2–7 July 2001. Canberra, Australian National Insect Collection.

PaDIL. 2013. Pests and Diseases Image Library. Available www.padil.gov.au (9 April, 2013)

Quarantine pests for Europe, 2nd edition. Wallingford, UK, CAB International. 1425 pp.

Rugman-Jones, P.F., M.S. Hoddle, L.A. Mound and R. Stouthamer. 2006. Molecular identification key for pest species of Scirtothrips (Thysanoptera: Thripidae). Journal of Econommic Entomology. 99(5): 1813–1819

Sunnucks, P. and D.F. Hales. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus Sitobian (Hemiptera: Aphididae). Molecular Biology and Evolution. 13: 510–524

Taekul, C., A. A. Valerio, A. D. Austin, H. Klompen and N. F. Johnson. 2013. Molecular phylogeny of telenomine egg parasitoids (Hymenoptera: Platygastridae s.l.: Telenominae): evolution of host shifts and implications for classification. Systematic Entomology. (2013), DOI:10.111/syen.1203

Walsh, K., N. Boonham, I. Barker and D.W. Collins. 2005. Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips *Thrips palmi* (Thysanoptera, Thripidae). Journal of Applied Entomology, 129 (5): 272–279.

Table 1 List of *Thrips* used in this study, each sample associated with the reference code using in the laboratory, the unique identifiers defined by the specimen barcode number prefixed with EMBT ENT, host plant and collected locality

Species	Ref. code	Museum voucher ID "EMBT ENT"	Host Plant	Collected locality
Thrips palmi	ct1.1-1	0001603	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.1-2	0001604	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.1-3	0001605	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.1-5	0001606	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-1	0001607	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-2	0001608	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-3	0001609	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-4	0001610	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-5	0001611	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-1	0001612	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-2	0001613	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-3	0001614	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-4	0001615	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-5	0001616	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-1	0001617	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-2	0001618	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-3	0001619	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-4	0001620	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-5	0001621	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct2.1	0001622	*Dendrobium sp.*	Samut Sakhon
	ct2.3	0001623	*Dendrobium sp.*	Samut Sakhon
	ct2.4	0001624	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct3.1	0001625	*Dendrobium sp.*	Samut Sakhon
	ct3.2	0001626	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	iti1-1B	0001627	*Ocimum basilicum*	Pathum Thani
	iti1-3B	0001628	*Salanum xanthocarpum*	Pathum Thani
Thrips hawaiiensis	iti1-1C	0001629	*Ocimum basilicum*	Pathum Thani
	iti2-5A	0001630	*Zea mays*	Pathum Thani
	iti6-9A	0001631	*Salanum xanthocarpum*	Nakhon Pathom

Table 1 *Continued*

Species	Ref. code	Museum voucher ID "EMBT ENT"	Host Plant	Collected locality
Thrips parvispinus	ni1-1E	0001640	*Carica papaya*	Pathum Thani
Scirtothirps dorsalis	iti2-6A	0001632	*Capsicum frutescens*	Pathum Thani
	iti3-7C	0001633	*Vigna sesquipedalis*	Pathum Thani
	ni2-2D	0001634	*Capsicum frutescens*	Pathum Thani
Bathrips melanicornis	iti1-1A	0001635	*Ocimum basilicum*	Pathum Thani
Rhipiphorothrips cruentatus	iti1-1D	0001636	*Ocimum basilicum*	Pathum Thani
Frankliniella schultzei	iti1-2B	0001637	*Ocimum sanctum*	Pathum Thani
	ni4-4A	0001638	*Salanum xanthocarpum*	Pathum Thani
Megalurothrips usitatus	iti1-3A	0001639	*Salanum xanthocarpum*	Pathum Thani
	ni7-7A	0001641	*Luffa acutangula*	Nakhon Pathom
Caliothrips indicus	iti3-7B	0001642	*Vigna sesquipedalis*	Pathum Thani

Table 2 Cycle thresholds at different concentrations of COI primer and different-fold dilutions of DNA template (100 nM probe)

Dilution of DNA (1 adult)	Cp value				
	50 nM primers	150 nM primers	300 nM primers	900 nM primers	1200 nM primers
1	>35	26.02	23.56	23.22	22.88
10	>35	30.13	27.01	26.61	26.54
100	>35	32.71	30.32	30.19	29.77
1000	-	35	33.07	31.85	33.17
water	-	-	-	-	-

Table 3 Cycle thresholds at different concentrations of SCAR primer and different-fold dilutions of DNA template (100 nM probe)

Dilution of DNA (1 adult)	Cp value				
	50 nM primers	150 nM primers	300 nM primers	900 nM primers	1200 nM primers
1	-	24.50	24.46	24.81	24.68
10	-	28.86	28.57	28.99	29.08
100	-	32.74	32.02	32.45	32.20
1000	-	>35	>35	>35	>35
water	-	-	-	-	-

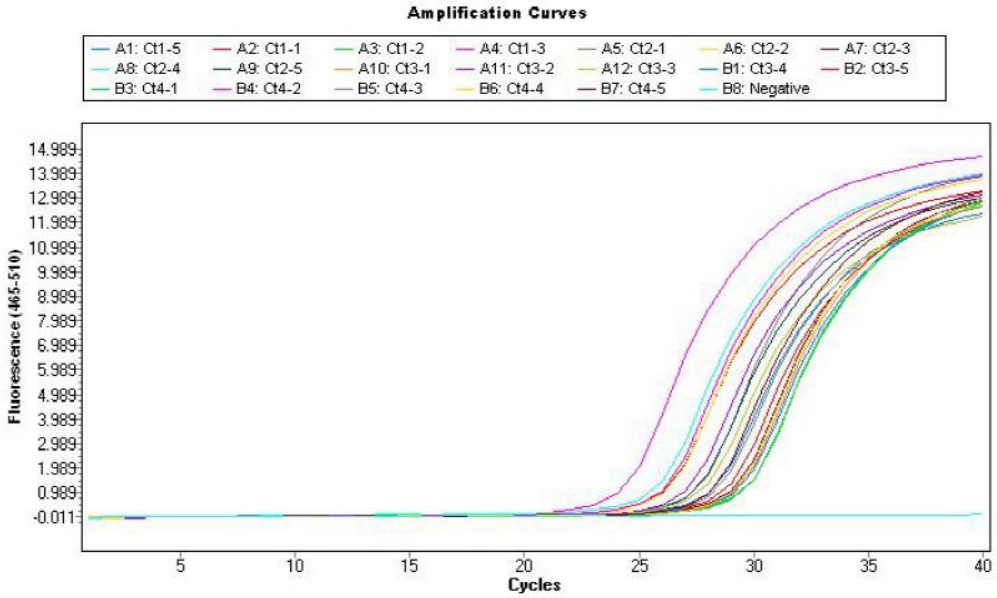

Figure 1 COI sequence-based real-time PCR assay for 20 samples of *Thrips palmi* including negative control using primers and probe follows ISPM No. 27 Annex 1 (Diagnostic protocol for *Thrips palmi*).

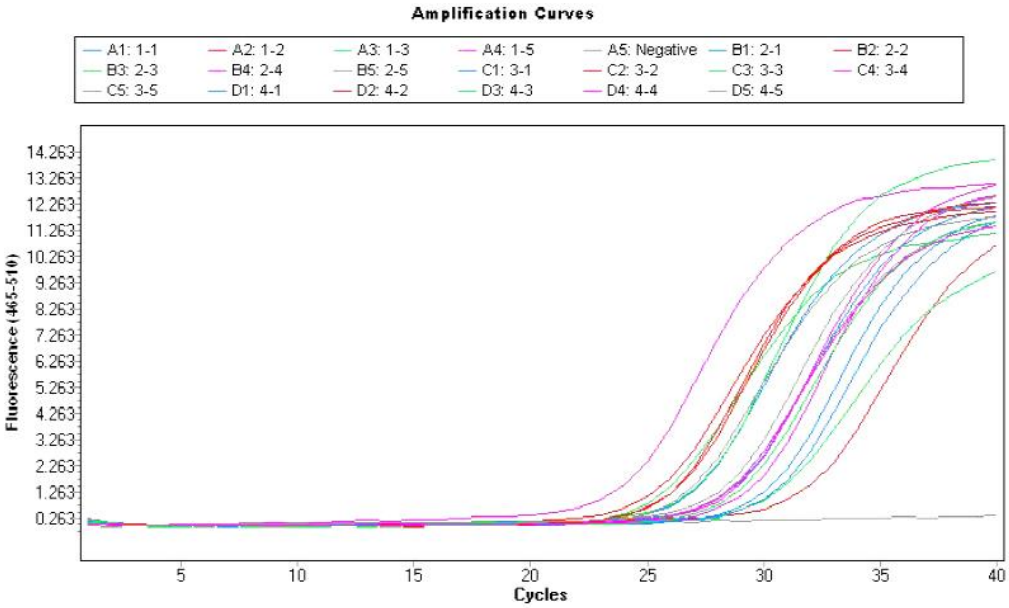

Figure 2 SCAR marker-generated sequence-based real-time PCR assay for 20 samples of *Thrips palmi* including negative control using primers and probe follows ISPM No. 27 Annex 1 (Diagnostic protocol for *Thrips palmi*).

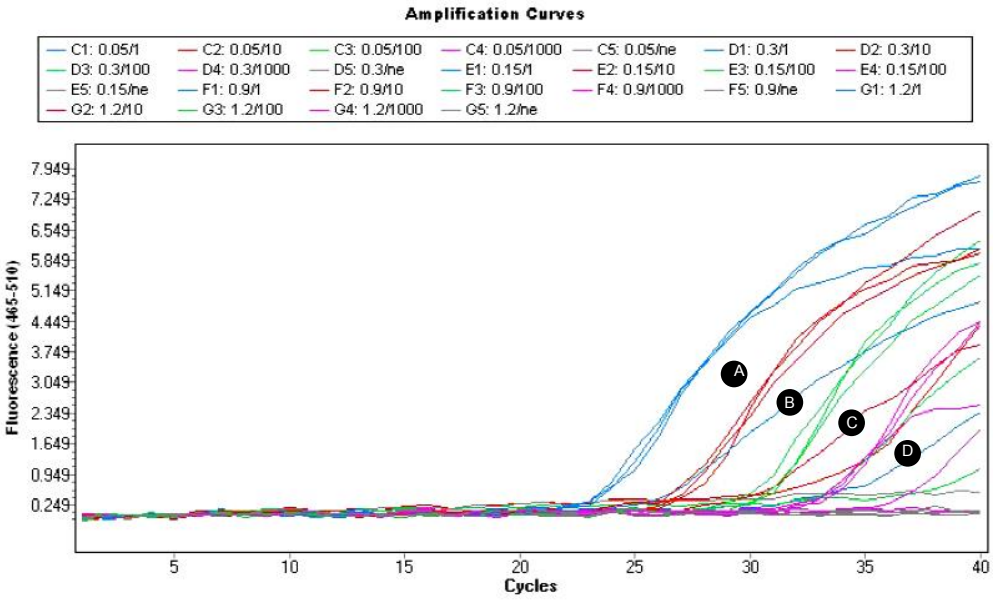

Figure 3 Sensitivity test for COI sequence-based real-time PCR assay using different primer concentrations (100 nM probe): A. dilution of 1 adult DNA, B. 10-fold dilution of DNA, C. 100-fold dilution of DNA, and D.1000-fold dilution of DNA

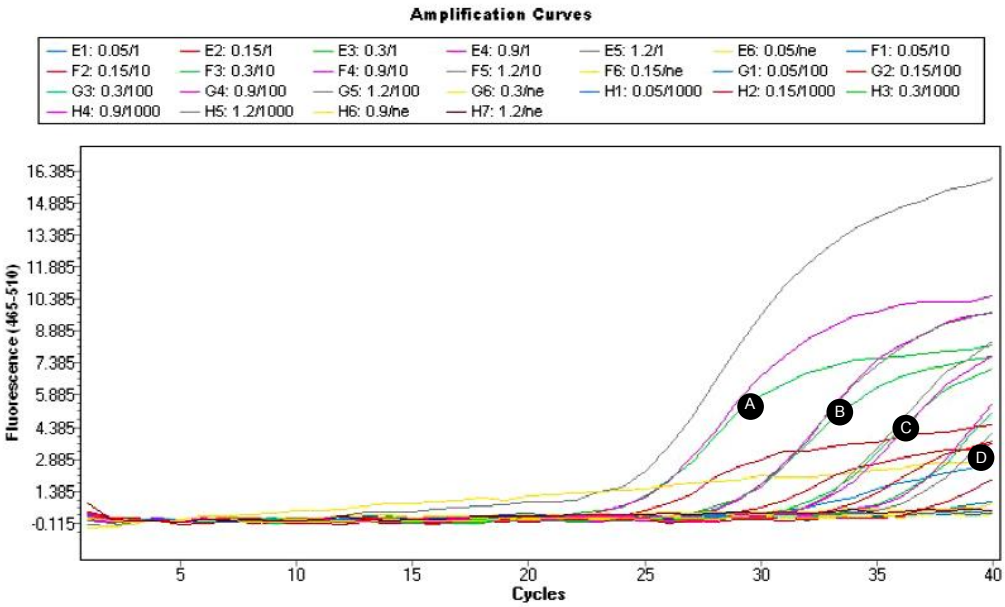

Figure 4 Sensitivity test for SCAR marker-generated sequence-based real-time PCR assay using different primer concentrations (100 nM probe): A. dilution of 1 adult DNA, B 10-fold dilution of DNA, C. 100-fold dilution of DNA, and D. 1000-fold dilution of DNA

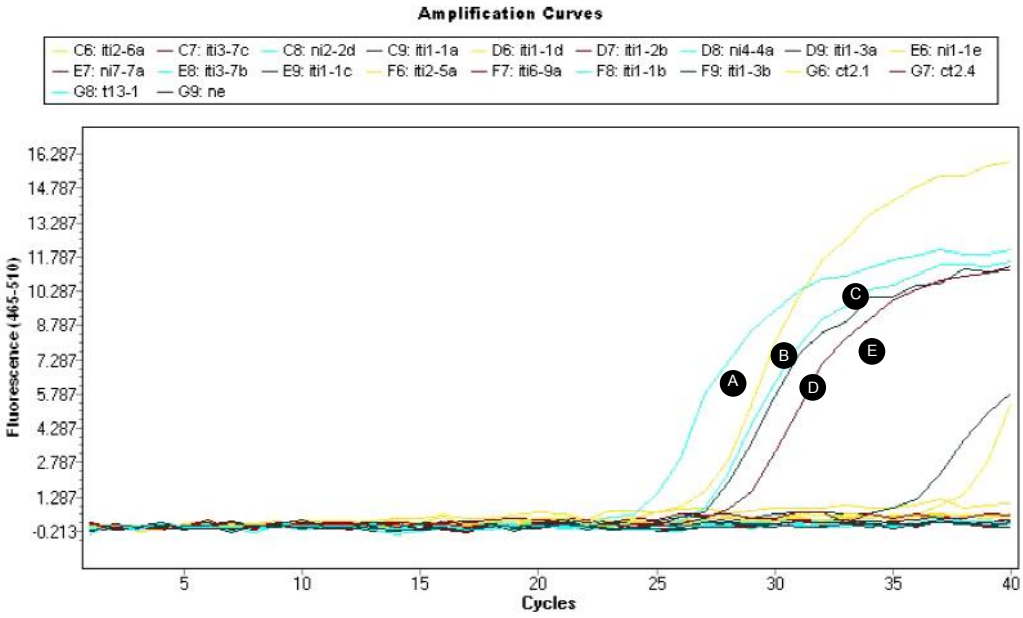

Figure 5 Specificity test for COI sequence-based real-time PCR assay using 19 samples of Thysanoptera, 5 of which are *Thrips palmi* detected at different Cp values: A. 23.92, B. 26.17, C. 26.48, D. 26.53, and E. 27.76.

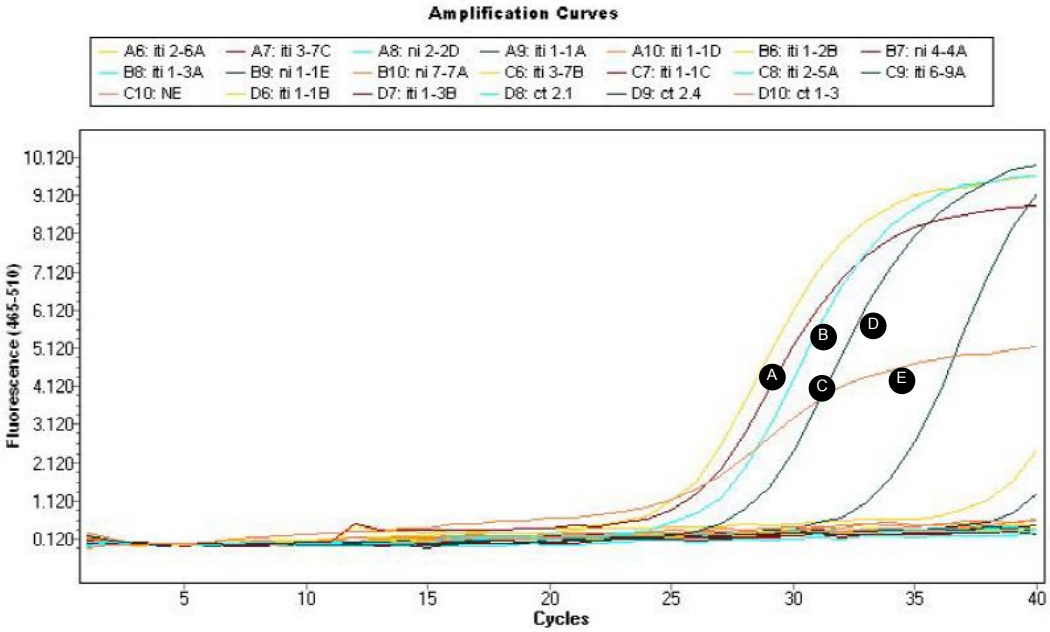

Figure 6 Specificity test for SCAR marker-generated sequence-based real-time PCR assay using 19 samples of Thysanoptera, 5 of which are *Thrips palmi* detected at different Cp values: A. 25.21, B. 25.74, C. 26.78, D. 28.25, and E. 25.14.