การตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยเทคนิค Duplex และ Multiplex PCR เพื่อสนับสนุนการส่งออกสินค้าเกษตร

Accurate and Rapid Identification of Economically Important Fruit Flies Using Duplex and Multiplex PCR Techniques

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

Yuvarin Boontop[1/] Nuttima Kositcharoenkul[2/] Nathamon Kaewnuy[2/] Chutikarn Jailae[3/]

ABSTRACT

The guava fruit fly (*Bactrocera correcta*) and the melon fly (*Zeugodacus cucurbitae*) are important agricultural pests in Thailand and are listed as quarantine pests by several trading partner countries due to their potential to cause significant damage to exported vegetables and fruits. The detection of larval stages in agricultural commodities can lead to serious trade implications. However, species identification based on larval morphology is challenging due to their high morphological similarity. This study aimed to develop a duplex PCR technique for the rapid and accurate identification of *B. correcta* and *Z. cucurbitae*. The results demonstrated that the developed technique effectively distinguished *B. correcta* and *Z. cucurbitae* from 20 other fruit fly species. Furthermore, when combined with species - specific primers from previous studies, the primer set for *Z. cucurbitae* was successfully adapted into a multiplex PCR system capable of simultaneously identifying four fruit fly species: *Z. cucurbitae*, *Z. cilifer*, *B. dorsalis*, and *B. tuberculata*. However, the *B. correcta* - specific primer could not be integrated into the multiplex system due to annealing temperature limitations. These findings highlight the high potential of the developed duplex and multiplex PCR techniques for rapid and accurate identification of fruit fly species, with reduced diagnostic costs. The approach is well - suited for applications in plant quarantine, inspection of export commodities, and could be further extended to the diagnosis of other pest species in the future.

Keywords: fruit flies, guava fruit fly, melon fly, duplex PCR and multiplex PCR

[1/] กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[1/] Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

[2/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[2/] Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

[3/] ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3/] Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station, Office of Agricultural Regulation, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900. Thailand

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

บทคัดย่อ

แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* และแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทยและเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศคู่ค้าหลายประเทศเนื่องจากสามารถสร้างความเสียหายต่อพืชผักและผลไม้ส่งออก การตรวจพบระยะตัวหนอนในสินค้าเกษตรอาจส่งผลกระทบต่อการส่งออกอย่างมาก แต่เนื่องจากลักษณะสัณฐานของตัวหนอนแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกัน การจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสันฐานวิทยาจึงทำได้ยาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค duplex PCR สำหรับใช้ตรวจสอบและจำแนกชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* อย่างรวดเร็วและ แม่นยำ ผลการทดสอบพบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถจำแนกชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากแมลงวันผลไม้จำนวน 20 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพและเมื่อประยุกต์ใช้ร่วมกับไพรเมอร์จำเพาะจากงานวิจัยอื่น พบว่าไพรเมอร์ของแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สามารถพัฒนาต่อเป็นเทคนิค multiplex PCR ที่ใช้จำแนกแมลงวันผลไม้ได้พร้อมกันถึง 4 ชนิด ได้แก่ *Z. cucurbitae*, *Z. cilifer*, *B. dorsalis* และ *B. tuberculata* ขณะที่ไพรเมอร์ของ *B. correcta* ไม่สามารถพัฒนาเป็น multiplex PCR ได้เนื่องจากข้อจำกัดด้านอุณหภูมิการทำงาน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นมีศักยภาพสูงสำหรับการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ลดต้นทุนการตรวจสอบ เหมาะสำหรับประยุกต์ใช้ในงานกักกันพืช การตรวจสอบสินค้าเกษตรส่งออก และสามารถต่อยอดสู่ระบบการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นในอนาคต

คำสำคัญ: แมลงวันผลไม้ แมลงวันทองฝรั่ง แมลงวันแตง duplex PCR และ multiplex PCR

บทนำ

แมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* และ *Zeugodacus* เป็นกลุ่มแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชผักและผลไม้หลากหลายชนิด (Drew and Romig, 2013) โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจเพื่อการส่งออกของประเทศไทย ในจำนวนนี้ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และ แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เป็นชนิดที่พบระบาดบ่อยและมีสถานะเป็นแมลงศัตรูพืชกักกัน (quarantine pests) ในหลายประเทศ เนื่องจากสามารถสร้างความเสียหายทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต อีกทั้งการปนเปื้อนของตัวหนอนในสินค้าเกษตรยังอาจส่งผลกระทบต่อการรับรองด้านสุขอนามัยพืช และก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ

ความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นความท้าทายที่สำคัญในการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ โดยเฉพาะในระยะตัวหนอนหรือในกรณีที่ตัวอย่างไม่สมบูรณ์ ซึ่งส่งผลให้การจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยวิธีดั้งเดิมขาดความแม่นยำและใช้เวลานาน และในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาประเทศไทยนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcoding) และการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงรายชนิด (species - specific primers) โดย ยุวรินทร์ และคณะ (2564; 2566) ได้มีการพัฒนาเทคนิคจนได้ไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และ แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ในการระบุชนิดแมลงวันผลไม้ได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังมีข้อจำกัดด้านต้นทุน และระยะเวลา เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้เพียง 1 ชนิดต่อครั้ง ดังนั้นหนึ่งในแนวทางที่ได้รับความสนใจในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชคือ เทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบแมลงศัตรูพืชได้มากกว่าหนึ่งชนิดภายในปฏิกิริยาเดียว ด้วยหลักการของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันภายใต้ปฏิกิริยาเดียวกัน (จิราภรณ์ และนภสร, 2549)

ซึ่งช่วยลดขั้นตอน ค่าใช้จ่าย และเวลาเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค conventional PCR งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค duplex PCR สำหรับการจำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* รวมทั้งพัฒนาเทคนิค multiplex PCR จากการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ที่มีการออกแบบไว้ร่วมกับชุดไพรเมอร์จากงานวิจัยก่อนหน้า (Jiang, 2015; Afroz et al., 2022) เพื่อตรวจสอบชนิดแมลงวันผลไม้ได้หลากหลายชนิดพร้อมกันภายในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว เช่นเดียวกับที่เคยมีการใช้เทคนิค multiplex PCR ในการจำแนกแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในทวีปแอฟริกาใต้ (Andrews et al., 2022)

วิธีดำเนินการ

1. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้โดยใช้ขาขวา 3 ขาจากตัวเต็มวัยที่เก็บรวบรวม นำใส่ในหลอดขนาด 1.5 มล. แล้วดำเนินการสกัดด้วยชุดน้ำยาสกัด ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline, Australia) เติม Lysis buffer GL 180 µL และ Proteinase K 25 µL เขย่าเบา ๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. นานข้ามคืน จากนั้นเติม Lysis buffer G3 ปริมาตร 200 µL เขย่าเบา ๆ และบ่มต่อที่ 70°ซ. นาน 10 นาที หลังจากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 210 µL เขย่าให้เข้ากัน และนำไปใส่ในคอลัมน์กรองก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer GW1 ปริมาตร 500 µL และปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทส่วนที่กรองได้ทิ้ง และล้างคอลัมน์ซ้ำด้วย Wash buffer GW2 ปริมาตร 600 µL ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที และปั่นซ้ำอีกครั้งโดยไม่เติมสารละลายเพื่อกำจัด ethanol ที่ตกค้าง ต่อมาย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ และชะล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม Elution buffer G ที่อุ่นไว้ที่ 70°ซ. ปริมาตร 50 µL บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 2 นาที ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 และเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อµL ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *cox1* โดยใช้ universal primer ได้แก่ LCO1490 (5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’) และ HCO2198 (5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’) (Folmer et al., 1994) โดยกำหนดขั้นตอนและระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประยุกต์จากวิธีของ ยุวรินทร์ และคณะ (2565) นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบด้วยด้วยเทคนิค duplex PCR ต่อไป

2. ทดสอบความจำเพาะเจาะจงและความใช้ได้ของคู่ไพร์เมอร์ ในการทำปฏิกิริยา duplex PCR ต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

2.1 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และทดสอบความใช้ได้ (Validation) ของไพรเมอร์จำเพาะชนิดต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากงานวิจัยก่อนหน้า (ยุวรินทร์ และคณะ, 2564; 2566) (Table 1) โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่รวบรวมจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (duplex condition optimization) เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา duplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ภายในปฏิกิริยาเดียวกัน จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นที่มีรายงานพบในประเทศไทย

2.3 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 % ที่ผสม RedSafe™ dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในน้ำยา 1X TAE buffer โดยผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตรวจสอบ

แถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล Gel Documentation XR รุ่น Universal Hood II (Bio-Rad, USA) พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย

Table 1 Nucleotide sequences and characteristics of primer sets used for screening *Bactrocera correcta* and *Zeugodacus cucurbitae* in this study.

No.	Primer name	Sequences	Position	No. of base pair	Tm	%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	
1	Zcur-F1	TGAGCTGTAGTATTGACAGCTC TTC	518 - 542	25	52	44	83
2	Zcur-R1	AGCCGGGTCGAAGAAAGAGGTG	580 - 601	22	60	59	

Noted: F= Forward primer, R= Reverse primer

3. ทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ร่วมกับคู่ไพรเมอร์อื่น ๆ ด้วยเทคนิค multiplex PCR

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ จากงานวิจัย (Jiang, 2015; Afroz et al., 2022) ทดสอบร่วมกับไพรเมอร์จำเพาะของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับการตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้หลายชนิดในปฏิกิริยาเดียว โดยพิจารณาคู่ไพรเมอร์ที่มีอุณหภูมิ annealing ใกล้เคียงกันและผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดต่างกันอย่างชัดเจน เพื่อให้สามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนหลังวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส งานวิจัยนี้ทำการปรับความความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมี และไพรเมอร์ ทดสอบความเหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา multiplex PCR ตั้งแต่ 55 - 60℃ เพื่อหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจแมลงวันผลไม้หลายชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน และตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการโดยใช้ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่มีรายงานในประเทศไทย วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2.5% ผสม RedSafe™ dye ในน้ำยา 1X TAE buffer โดยใช้สนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล Gel Documentation XR รุ่น Universal Hood II (Bio - Rad, USA) พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้ในครั้งนี้ให้ผลลัพธ์ที่มีคุณภาพดี โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่อัตราส่วน A260/A280 อยู่ในช่วง 1.7 - 1.9 (Table 2) แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในเทคนิคการศึกษาทางอณูชีววิทยา (molecular biology) และผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ LCO1490/HCO2198 ซึ่งเป็น universal primers ของยีน *cox1* (*cytochrome c oxidase subunit* I)

สามารถขยายชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 650 - 700 คู่เบส ซึ่งเป็นช่วงขนาดที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โคดแมลงวันผลไม้ (Hebert et al., 2003) นอกจากนี้ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้แสดงค่าความเหมือน (sequence identity) กับข้อมูลในฐานข้อมูลสากลในระดับ 99 - 100% ยืนยันว่าเทคนิคการสกัดและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความถูกต้อง แม่นยำ สามารถจำแนกชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่ระบุว่ายีน *cox1* เป็นยีนที่มีความคงที่สูงในระดับ intra-species และมีความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างชนิด (inter-species divergence) จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับใช้ในการจำแนกชนิดแมลงด้วยวิธี DNA barcoding หรือการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการวินิจฉัยในเทคนิคต่าง ๆ เช่น conventional PCR, multiplex PCR หรือ LAMP (Folmer et al., 1994; Armstrong and Ball, 2005)

Table 2 Concentration of DNA of fruit flies for this study

No.	Sample	Purity (A260/A280)			Concentration (ng/µl)		
		1	2	Mean	1	2	Mean
1	*B. carambolae* (Adult)	1.89	1.84	**1.87**	37.26	39.28	**38.27**
2	*B. cilifera* (Adult)	2.07	2.12	**2.10**	287.84	268.99	**278.41**
3	*B. correcta* (Adult)	2.11	2.13	**2.12**	267.26	261.01	**264.13**
4	*B. dorsalis* (Adult)	2.07	2.04	**2.06**	548.13	537.45	**542.79**
5	*B. umbrosa* (Adult)	2.05	2.07	**2.06**	470.53	454.09	**462.31**
6	*B. zonata* (Adult)	2.00	2.01	**2.00**	226.88	214.09	**220.48**
7	*Z. caudata* (Adult)	2.15	2.09	**2.12**	284.18	279.66	**281.92**
8	*Z. cucurbitae* (Adult)	2.00	2.01	**2.01**	257.93	249.47	**253.70**
9	*Z. isolata* (Adult)	2.10	1.88	**1.99**	124.66	137.74	**131.20**
10	*Z. tau (Adult)*	2.11	2.11	**2.11**	273.99	274.28	**274.13**
11	*B. carambolae* (Larve)	2.00	2.07	**2.04**	790.05	777.55	**783.80**
12	*B. correcta* (Larve)	2.11	2.12	**2.12**	1438.03	1367.55	**1402.79**
13	*B. dorsalis* (Larve)	2.15	2.16	**2.15**	1517.88	1487.69	**1502.79**
14	*B. latifrons* (Larve)	2.04	2.11	**2.07**	1270.10	1165.48	**1217.79**
15	*Z. cucurbitae* (Larve)	2.16	2.17	**2.17**	1806.92	1744.42	**1775.67**
16	*Z. tau* (Larve)	2.04	2.07	**2.06**	679.62	677.50	**678.56**

2. ทดสอบความจำเพาะเจาะจงและความใช้ได้ของคู่ไพร์เมอร์ ในการทำปฏิกิริยา duplex PCR ต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

2.1 ทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะสำหรับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ดำเนินการกับตัวอย่างจากประชากรทุกภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และภาคเหนือ โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับแต่ละชนิด ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ถูกวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าไพรเมอร์จำเพาะสำหรับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 141 คู่เบส (Figure 1) ขณะที่ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับแมลงวันแตง

Z. cucurbitae ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 83 คู่เบส (Figure 2) โดยไม่เกิดแถบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific bands) ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะและประสิทธิภาพในการตรวจสอบชนิดแมลงวันผลไม้จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ได้อย่างชัดเจน

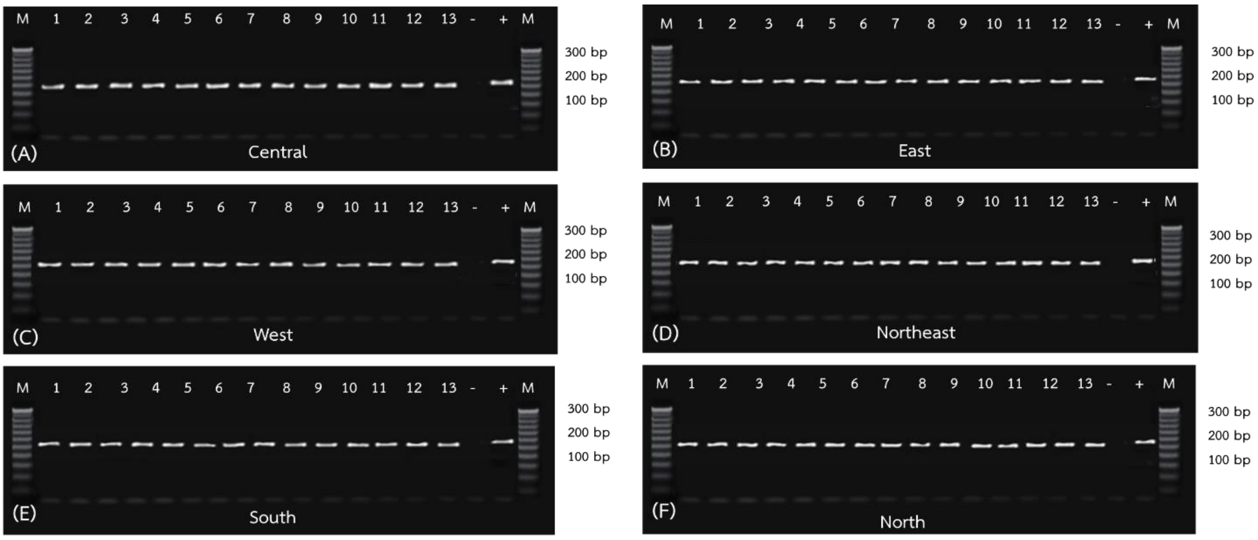

Figure 1 PCR product of *Bactrocera correcta* from six Thai biogeographical regions (Central, East, West, Northeast, South, and North) was amplified using the *B. correcta*-specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control was ddH_2O. Positive control sample was *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker

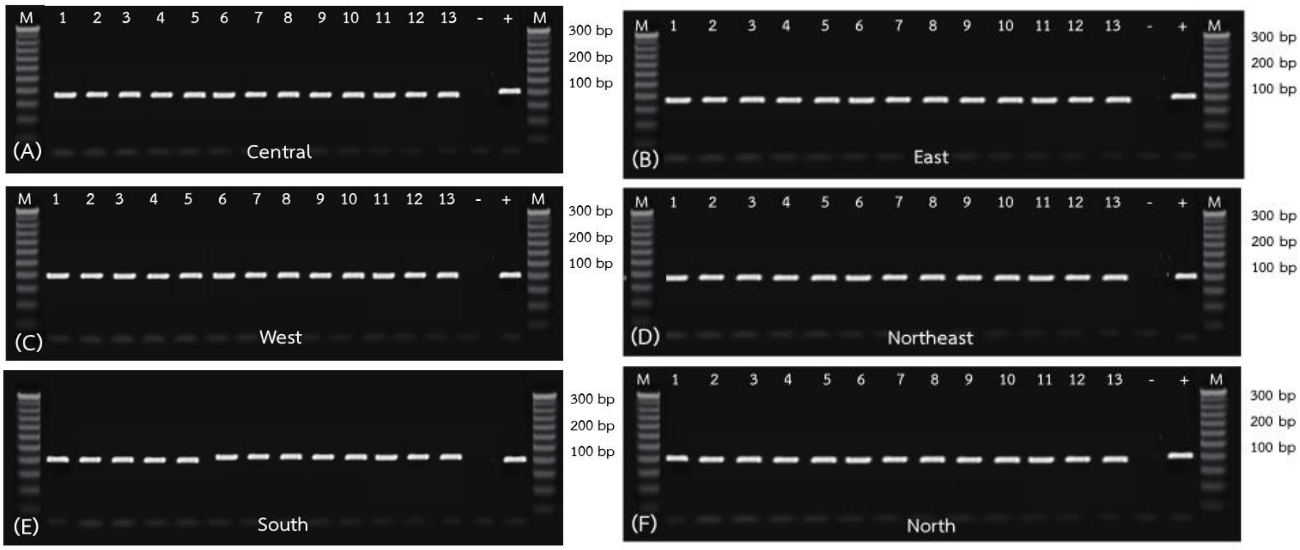

Figure 2 PCR product of *Zeugodacus cucurbitae* from six Thai biogeographical regions (Central, East, West, Northeast, South, and North) was amplified using the *Z. curcubitae*-specific primer pair Zcu-F1 and Zcu-R1. Negative control was ddH_2O. Positive control sample was *Z. cucurbitae*. Lane M: D2000 Marker

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สามารถตรวจสอบตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาด 141 คู่เบส สำหรับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และ 83 คู่เบส สำหรับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ผลลัพธ์ดังกล่าวสะท้อนถึงความจำเพาะ (specificity) และความเสถียร (stability) ของไพรเมอร์ทั้งสองคู่ สภาวะการเกิดปฏิกิริยามีความเหมาะสม แม้จะมีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์และพันธุกรรมบางประการระหว่างประชากรแมลงแต่ละภูมิภาคก็ตาม ความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้จากประชากรในภูมิภาคต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งยีนที่มีความคงที่สูง (highly conserved regions) ซึ่งเป็นหลักการสำคัญในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวินิจฉัยในระดับชนิดซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rogriguez et al. (2015) ที่กล่าวว่าการออกแบบไพรเมอร์และโพรบเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับเทคนิค PCR นอกจากนี้การทดสอบความใช้ได้ของโพรบและไพรเมอร์ก่อนจะใช้ก็มีความสำคัญเช่นกันถึงแม้ว่าจะใช้โปรแกรมที่น่าเชื่อถือในการออกแบบก็ตาม

2.2 วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ด้วยเทคนิค duplex PCR ได้ดำเนินการโดยใช้ species-specific primers ของทั้งสองชนิดร่วมกันในการตรวจตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย โดยมีการกำหนดส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Table 3) และสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับการทำ duplex PCR (Table 4) ผลการทดลองพบว่าวิธีดังกล่าวสามารถแยกชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีขนาด 141 คู่เบส และผลิตภัณฑ์ของแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* มีขนาด 83 คู่เบส สำหรับแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยอีก 18 ชนิดที่ทดสอบ ได้แก่ *Bactrocera albistrigata, B. carambolae, B. dorsalis, B. latifrons, B. limbifera, B. nigrotibialis, B. tuberculata, B. umbrosa, B. zonata, Dacus formosanus, Zeugodacus apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. hochii, Z. incisus, Z. isolatus, Z. platamus* และ *Z. tau* ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคนี้ในการตรวจสอบชนิดแมลงวันผลไม้เป้าหมาย (Figure 3) โดยไม่เกิดผลการทดสอบลวงกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

Table 3 Preparation of the PCR Reaction Mixture with a Final Volume of 25 µL.

Reagents	Volume (µl) per reaction
dH2O	6.5
2x Green PCR Master Mix Direct-load (Biotechrabbit)	12.5
10 µM Bco-F1	1
10 µM Bco-F1	1
10 µM Zcu-F1	1
10 µM Zcu-R1	1
DNA template	2
Final volume	**25**

Table 4 PCR amplification conditions used in this study, including temperatures, durations, and number of cycles for each step of the reaction.

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	94°C	4 min	1 cycle
denaturation	94°C	30 sec	
annealing	58°C	30 sec	35 cycles
extension	72°C	30 sec	
final extension	72°C	5 min	1 cycle

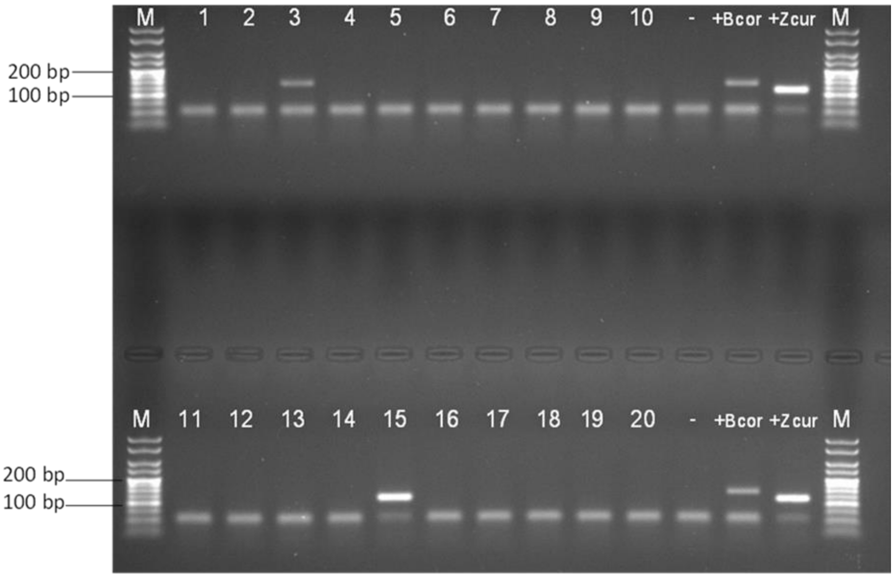

Figure 3 PCR amplification of *Bactrocera correcta* and *Zeugodacus cucurbitae* using the *B. correcta* - specific primer pair (Bco - F1 and Bco - R). Sterile distilled water (ddH_2O.) was used as the negative control (–). The positive controls included *B. correcta* (+Bcor) and *Z. cucurbitae* (+Zcur). Lane M: D2000 DNA marker. Lanes 1-20 represent the following fruit fly species:

1. *Bactrocera albistrigata*
2. *Bactrocera carambolae*
3. *Bactrocera correcta*
4. *Bactrocera dorsalis*
5. *Bactrocera latifrons*
6. *Bactrocera limbifera*
7. *Bactrocera tuberculata*
8. *Bactrocera umbrosa*
9. *Bactrocera zonata*
10. *Dacus longicornis*
11. *Dacus spaeroidalis*
12. *Zeugodacus apicalis*
13. *Zeugodacus caudatus*
14. *Zeugodacus cilifer*
15. *Zeugodacus cucurbitae*
16. *Zeugodacus hochii*
17. *Zeugodacus incisus*
18. *Zeugodacus isolatus*
19. *Zeugodacus platamus*
20. *Zeugodacus tau*

จากการพัฒนาและทดสอบเทคนิค duplex PCR ด้วยการนำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงของ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ดำเนินการในปฏิกิริยาเดียว ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่สามารถทำงานร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยสามารถจำแนกแมลงวันทั้งสองชนิดได้พร้อมกันภายในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งช่วยลดเวลาและทรัพยากรในการดำเนินการได้อย่าง มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการทำ PCR แยกชนิด (singleplex PCR) (LabLife-Real-time PCR, 2015) และที่สำคัญผลการทดลองไม่พบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ใด ๆ ในกลุ่มตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นจำนวน 18 ชนิด การไม่พบผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นแม้อยู่ในสกุล (Genus) เดียวกันสะท้อนถึงความแม่นยำในการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถแยกชนิดเป้าหมายได้โดยไม่มีผลกระทบจากแมลงวันผลไม้ที่มีลำดับดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่มีความจำเพาะต่อชนิด (species-specific) สูง และไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในงานด้านอนุกรมวิธาน งานกักกันพืชและการตรวจสอบสินค้าส่งออก

3. ผลการทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ร่วมกับคู่ไพร์เมอร์อื่น ๆ ด้วยเทคนิค Multiplex PCR

จากการนำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* มาประยุกต์ร่วมกับงานวิจัยก่อนหน้า (Jiang, 2015; Afroz et al., 2022) นั้น พบว่าไพรเมอร์ที่มีจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* (Zcur-F2 และ Zcur-R1) สามารถพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจสอบแมลงวันผลไม้ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบสามารถทำงานร่วมกับไพรเมอร์ BBDF, B. tuberculata และ BZCIF (Table 5) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (Table 6) และสภาวะปฏิกิริยา Multiplex PCR ที่เหมาะสมสำหรับจำแนกแมลงวันผลไม้ด้วยวิธี PCR พบว่าช่วงอุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 ชนิด พร้อมกันที่อุณหภูมิ 60°ซ. กำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle (Table 7) และเมื่อนำมาทดสอบกับแมลงวันผลไม้ที่มีรายงานในประเทศไทย 20 ชนิด ได้แก่ *B. albistrigata, B. carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. limbifera, B. tuberculata, B. umbrosa, B. zonata, D. longicornis, D. spaeroidalis, Z. apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae, Z. hochii, Z. incisus, Z. isolatus, Z. platamus* และ *Z. tau* การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีการด้วยการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส พบว่าได้ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 216, 225, 159 และ 113 คู่เบส (Figure 4) ซึ่งเป็นขนาดของแมลงวันผลไม้ 4 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis, B. tuberculata, Z. cilifer* และ *Z. cucurbitae* ตามลำดับ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ถึงแม้ว่าขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. tuberculata* จะมีขนาดที่ใกล้เคียงกันแต่อย่างไรก็ตามยังสามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยสายตาเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเปรียบเทียบบวก (positive control) ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR นั้นสามารถยืนยันการตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันผลไม้ 4 ชนิด โดยสามารถใช้ตรวจสอบแมลงวันผลไม้ที่เข้าทำลายพืชผักเศรษฐกิจของไทย ได้แก่ *Z. cucurbitae, Z. cilifer, B. dorsalis* และ *B. tuberculata* และสอดคล้องกับผลที่ได้จากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* นั้นไม่สามารถนำมาพัฒนาร่วมกับงานวิจัยอื่น ๆ เนื่องจากไม่สามารถหาอุณหภูมิที่เหมาะสมได้

Table 5 Nucleotide sequences and characteristics of primer sets used for screening *Bactrocera dorsalis, Bactrocera tuberculata, Zeugodacus cilifer,* and *Zeugodacus cucurbitae* in this study.

Primers name	Sequences	% CG	Tm (ºC)	Size (bp)	Reference
BBDF-F	GCTATTTTTTCACTTCACTTAACG	33.33	55.34	216	Afroz et al.,
BBDF-R	AGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAG	33.33	54.68		2022
B. tuberculata-F	TTTTCACTCCACTTAGCCAGG	47.62	57.86	225	Jiang, 2015
B. tuberculata-R	GGGGTCAAAAAATGAAGTATTTAAG TTC	32.14	58.10		
BZCIF-F	GGCTGTAAATTTTATCACTACAGTC	56.27	56.27	159	Afroz et al.,
BZCIF-R	CGGTCTGTCAAAAGTATAGTAATG	55.40	55.40		2022
Zcur-F2	CTTCTATCTCTACCTGTGTTAGCCG	48	53	113	Boontop., 2021
Zcur-R1	AGCCGGGTCGAAGAAAAGAGGTG	59	60		

Table 6 Reagent composition used in the multiplex PCR assay described in this study, showing the final volume per 25 µl reaction.

Reagents	Volume (µl) per reaction
Multiplex PCR Master mix (2X, Biotechrabbit, Germany)	12.5
10 µM B. dorsalis-F	0.5
10 µM B. dorsalis-R	0.5
10 µM B. tuberculata-F	0.5
10 µM B. tuberculata-R	0.5
10 µM Z. cilifer-F	0.5
10 µM Z. cilifer-R	0.5
10 µM Zcur-F2	1.0
10 µM Zcur-R1	1.0
Template DNA	1
Nuclease free water	6.5
Final volume	**25.0**

Table 7 Thermal cycling conditions used for multiplex PCR amplification, including temperatures, durations, and number of cycles for each step of the reaction.

Step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
1. Pre-denaturation	95	3 min	1
2. Denaturation	95	30 sec	
3. Annealing	55 - 60	45 sec	30
4. Extension	72	45 sec	
5. Final - extension	72	5 min	1

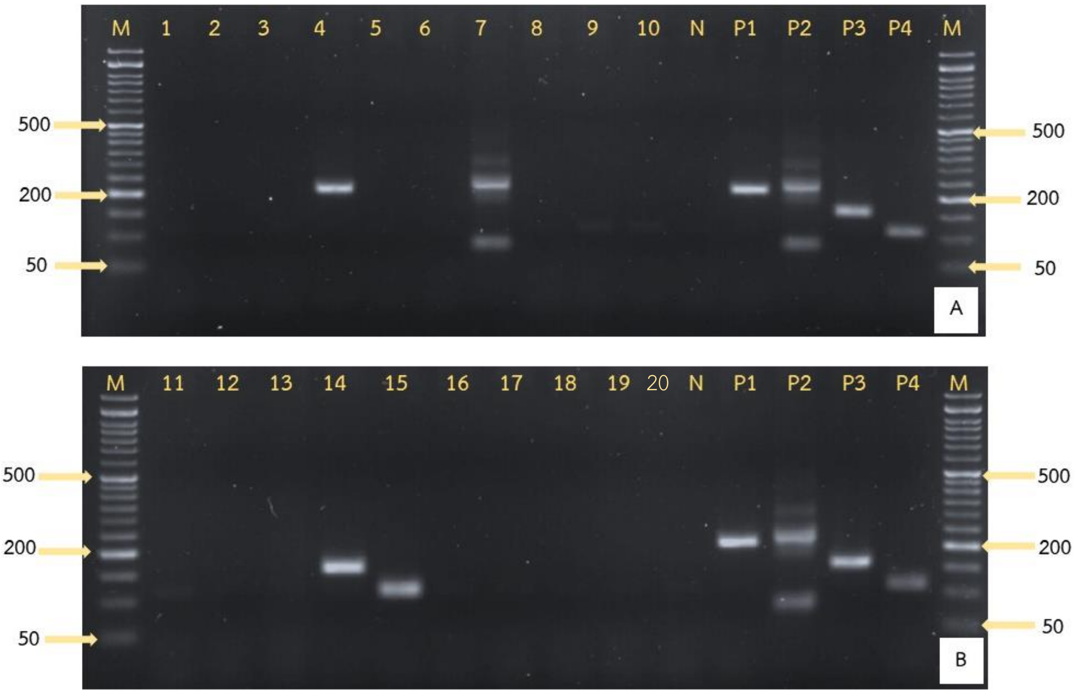

Figure 4 Multiplex PCR amplification of DNA from 19 fruit fly species using species - specific primers. Each lane represents the PCR product obtained from a different fruit fly species. Sterile distilled water (ddH_2O) was used as a negative control (N). Positive controls were as follows: P1 = *Bactrocera dorsalis*, P2 = *Bactrocera tuberculata*, P3 = *Zeugodacus cilifer*, and P4 = *Zeugodacus cucurbitae*. Lane M: D2000 DNA marker. (A) Lanes 1 - 10; (B) Lanes 11 - 20. Lanes 1 - 20 correspond to

1. *Bactrocera albistrigata*
2. *Bactrocera carambolae*
3. *Bactrocera correcta*
4. *Bactrocera dorsalis*
5. *Bactrocera latifrons*
6. *Bactrocera limbifera*
7. *Bactrocera tuberculata*
8. *Bactrocera umbrosa*
9. *Bactrocera zonata*
10. *Dacus longicornis*
11. *Dacus spaeroidalis*
12. *Zeugodacus apicalis*
13. *Zeugodacus caudatus*
14. *Zeugodacus cilifer*
15. *Zeugodacus cucurbitae*
16. *Zeugodacus hochii*
17. *Zeugodacus incisus*
18. *Zeugodacus isolatus*
19. *Zeugodacus platamus*
20. *Zeugodacus tau*

การศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นเพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 ชุดสามารถทำงานร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะ PCR ที่กำหนดโดยเฉพาะช่วงอุณหภูมิการจับคู่ของไพรเมอร์ (annealing) ที่ 60°ซ. และสามารถวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ได้พร้อมกัน 4 ชนิด ได้แก่ *Z. cucurbitae B. dorsalis*, *B. tuberculata* และ *Z. cilifer* ภายในการตรวจสอบเพียงครั้งเดียว ซึ่งแสดงถึงความเหมาะสมในการออกแบบลำดับไพรเมอร์และสภาวะปฏิกิริยา (PCR conditions) เทคนิค Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มขยายผลิตภัณฑ์ DNA ได้อย่างชัดเจน โดยให้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 216 คู่เบส (*B. dorsalis*), 225 คู่เบส (*B. tuberculata*), 159 คู่เบส (*Z. cilifer*) และ 113 คู่เบส (*Z. cucurbitae*) ตามลำดับ และไม่มีการเกิดแถบที่ไม่จำเพาะกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นที่ทดสอบทั้ง 16 ชนิด ซึ่งรวมถึงชนิดที่อยู่ในสกุลเดียวกัน และชนิดใกล้เคียงทางพันธุกรรม ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่นำมาใช้มีความจำเพาะสูง (high specificity) และสามารถแยกชนิดแมลงวันผลไม้ได้อย่างแม่นยำ แม้ขนาดแถบบางชนิด เช่น *B. dorsalis* และ *B. tuberculata* จะอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน (ยุวรินทร์และคณะ, 2566) แต่ยังสามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนด้วยการเปรียบเทียบกับแถบของ positive control ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับหลักการของเทคนิค multiplex PCR ที่เน้นการใช้ไพรเมอร์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (no cross - reactivity) และมีความแตกต่างของขนาดผลิตภัณฑ์ที่มากพอสำหรับการตรวจแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซีส ความสำเร็จในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ 4 ชนิดในครั้งเดียว เป็นประโยชน์ในทางปฏิบัติ โดยเฉพาะในบริบทของการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่ปะปนกับสินค้าพืชผักและผลไม้ของไทย เทคนิค multiplex PCR ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแมลงวันผลไม้จากตัวอย่างที่อยู่ในระยะต่าง ๆ ได้โดยไม่จำเป็นต้องเลี้ยงจนถึงระยะตัวเต็มวัยสอดคล้องกับ ยุวรินทร์และคณะ (2564, 2566) ซึ่งช่วยลดเวลาและเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยในภาคปฏิบัติได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ไม่สามารถนำมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้กับเทคนิค multiplex ร่วมกับไพรเมอร์อื่นได้ เนื่องจากไม่สามารถกำหนดอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานร่วมกันของไพรเมอร์ทุกชุดโดยไม่ลดทอนประสิทธิภาพการทำงาน ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดสำคัญของการออกแบบไพรเมอร์ที่ต้องทำงานร่วมกันของเทคนิค multiplex PCR ที่ต้องคำนึงถึงความเหมาะสมของไพรเมอร์ทั้งในด้านความจำเพาะ ขนาดของไพรเมอร์ และอุณหภูมิในการทำงาน สาเหตุหนึ่งอาจมาจากความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสในยีน *COI* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ นั้นมีความใกล้เคียงกันทำให้การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงทำได้ยาก (Jiang et al., 2013) ซึ่งในอนาคตอาจประยุกต์ใช้เทคนิค real-time PCR แบบ probe-based เช่น TaqMan ซึ่งสามารถเพิ่มความจำเพาะและความไวได้ดีกว่า และถูกนำมาใช้จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera* และ *Zeugodacus* ได้อย่างแม่นยำ (Kayattukandy et al., 2025) หรือการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมจากยีนอื่น ๆ ที่มีความจำเพาะและความไวสูงกว่า และไม่มีการ cross-reaction เช่น ยีน ATP6 และ ND2 เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความครอบคลุมในการตรวจจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ (Castellanos et al., 2025)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิค multiplex PCR สำหรับการตรวจจำแนกยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 ชนิด (*Z. cucurbitae*, *Z. cilifer*, *B. dorsalis* และ *B. tuberculata*) ได้พร้อมกันภายในการทดสอบเพียงครั้งเดียว โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงในสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสม ผลการศึกษานี้ไม่เพียงแสดงให้เห็นว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถแยกชนิดแมลงผลไม้ได้อย่างแม่นยำและจำเพาะ แต่ยังแสดงให้เห็น

ถึงศักยภาพในการพัฒนาเครื่องมือวินิจฉัยที่ประหยัดเวลาและต้นทุนมากกว่าการตรวจแบบ conventional PCR ที่ต้องแยกทำรายชนิด และปฏิบัติงานหลายครั้ง (Lab Life-Real-time PCR, 2015) นอกจากนี้ยังเป็นการลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง การรวมปฏิกิริยา PCR ให้สามารถตรวจสอบได้หลายชนิดในคราวเดียว และการใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสเพื่อแสดงผลได้อย่างชัดเจน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เทคนิค duplex PCR ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถตรวจสอบและจำแนกแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชที่สำคัญ ได้แก่ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ได้พร้อมกันภายในการทำปฏิกิริยาเดียว โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงประกอบกับกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ซึ่งให้ผลแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจากทุกภูมิภาคของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ยังสามารถใช้ร่วมกับไพรเมอร์จากงานวิจัยอื่นในการตรวจสอบแมลงวันผลไม้อีก 3 ชนิด (*B. dorsalis, B. tuberculata* และ *Z. cilifer*) ภายในปฏิกิริยาเดียว จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยศัตรูพืชในผลผลิตเพื่อการส่งออก เทคนิคดังกล่าวมีข้อได้เปรียบกว่า conventional PCR ในด้านการลดขั้นตอน เวลา และต้นทุนในการตรวจสอบ ทั้งยังสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยตัวอย่างที่อยู่ในระยะไข่ ตัวหนอน หรือดักแด้ ซึ่งไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว จึงเหมาะสำหรับประยุกต์ใช้ในงานอนุกรมวิธาน กักกันพืช การเฝ้าระวัง และการควบคุมคุณภาพสินค้าเกษตรก่อนการส่งออกอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐานการค้าระหว่างประเทศในปัจจุบัน และสามารถต่อยอดเพื่อใช้กับแมลงศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ ในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในอนาคตควรมุ่งเน้นการพัฒนาเทคนิค real-time PCR (qPCR) เพื่อเพิ่มความสามารถในการจำแนกชนิดเพื่อลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจาก real-time PCR สามารถตรวจวิเคราะจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ได้โดยไม่ต้องรอให้สิ้นสุดปฏิกิริยา หรือไม่ต้องตรวจสอบภายใต้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส หรือควรพัฒนาเทคนิค LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) ที่สามารถประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้โดยไม่ต้องใช้เครื่อง thermal cycler รวมทั้งควรส่งเสริมการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปในรูปแบบ lateral flow หรือ chip-based ที่สามารถตรวจสอบแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดพร้อมกันโดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชในระดับพื้นที่และด่านตรวจสินค้าเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และผลการศึกษานี้ไม่เพียงมีความสำคัญเชิงวิชาการในการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้อย่างแม่นยำ หากยังสามารถนำไปใช้จริงในงานกักกันพืช การเฝ้าระวัง การควบคุมคุณภาพสินค้าส่งออก และการสนับสนุนระบบการตรวจสอบด้านสุขอนามัยพืชของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณข้าราชการ พนักงานราชการและลูกจ้าง กลุ่มงานอนุกรมวิธาน กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ เหรียญทอง และ นภสร จรุงธนาภิบาล. 2549. การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัตถ์ แต้กุล ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ และ สุนัดดา เชาวลิต. 2565. การจำแนกชนิดและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในประเทศไทย โดยยีน *COX1*. วารสารเกษตร. 38(2): 159-173.

ยุวรินทร์ บุญทบ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ณฐมน แก้วนุ้ย นพรัตน์ บัวหอม และ ชุติกาญจน์ ใจแล. 2566. การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง. วารสารวิชาการเกษตร. 41(3): 236-250.

ยุวรินทร์ บุญทบ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ณฐมน แก้วนุ้ย และ นพรัตน์ บัวหอม. 2564. การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะจากยีน Cytochrome Oxidase I เพื่อตรวจวินิจฉัยแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) เพื่อส่งเสริมการส่งออก. วารสารเกษตร. 37(3): 289-303.

Afroz, S., S. Nomana, Y. Zhang, Y. Ali, R. Mahmud and Z. Li. 2022. Species identification of economic important adult fruit flies based on DNA Barcoding (MT DNA COI) and larvae based on species specific primers from Central and South part of Bangladesh. Malays. J. Sustain. Agric. 6: 103-109.

Andrews, K. J., R. Bester, A. Manrakhan, and H. J. Maree. 2022. A multiplex PCR assay for the identification of fruit flies (Diptera: Tephritidae) of economic importance in South Africa. Scientific reports. 12(1): 13089. https://doi.org/10.1038/s41598-022-17382-x.

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.

Castellanos, N. L., J. Yan, D. N. Gunawardana, B. McCarthy, S. George and D. Li. 2025. DNA barcodes for fruit fly species from Pacific Islands and development of multiplex real-time PCR assay for *Bactrocera facialis, B. passiflorae, B. kirki and B. distincta* (Tephritidae: Diptera). Applied Sciences. 15(16): 8889. https://doi.org/10.3390/app15168889

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

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

Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 270: 313-321.

Jiang, F. 2015. Technique system for molecular identification of quarantine fruit flies in China. PhD dissertation, China Agricultural University, Beijing.

Jiang, F., Q. Jin, L. Liang, A.B. Zhang, Z.H. Li, Z. Zhao, Z. and R. J. Zhang. 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. https://doi.org/10.1017/

LabLife-Real-time PCR. 2015. Compare and contrast: multiplex real vs singleplex PCR. Roche Life Science. Postedon September 19,2015. Available at: https://www.lifescience.roche.com/en_th/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplexreal-vs-singleplex-pcr.html. Accessed: 12 August, 2019.

Rogriguez, A., M. Rodriguez, J.J. Cordoba and MJ. Andrade. 2015. Design of primers and probes for quantitative Real-time PCR method. Methods Mol Biol. 1275: 31-56.