

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อ การวิจัยพัฒนาด้านการ
อารักขาพืช

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

2. โครงการวิจัย : การจัดจำแนกชนิดและศึกษาอนุกรมวิธาน ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของ
ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

Taxonomy, Biology and Species Identification by DNA Barcoding
of Pests and Natural Enemies for The Plant Protection Research
in Thailand

กิจกรรม : การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดย ดีเอ็นเอ บาร์โค้ด

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis*
complex (Diptera: Tephritidae) ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมในประเทศไทย

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

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ยุวรินทร์ บุญทบ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ญัฐธิมา โฆษิตเจริญกุล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ชมัยพร บัวมาศ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

จารุวัตร แต่กุล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร
อย่างสูงนั้นมีรูปร่างลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมาก ก่อให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานเป็นอย่างยิ่ง
ดังนั้นการใช้เทคนิคชีวโมเลกุลช่วยในการวินิจฉัยชนิด จะทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น
วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ การใช้ลักษณะทางพันธุกรรม เช่นดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำแนกและยืนยันชนิด
แมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และ
สกัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *cox1* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับ
นิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบแมลงวันผลไม้กลุ่ม
B. dorsalis complex ที่สามารถยืนยันชนิดได้มี 2 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* และจาก
การศึกษความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex โดย

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *cox1* จาก 70 ตัวอย่าง ได้แก่ *B. dorsalis* complex จำนวน 61 ตัวอย่าง และแมลงวันผลไม้ในวงศ์ Tephritidae จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ *Anastrata ludens*, *B. tryoni*, *B. cucumis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *B. zonata*, *B. correcta*, *Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* มาวิเคราะห์ด้วย Maximum Likelihood และ Bayesian analysis พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน โดยแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex เป็น sister group ของแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ใน Family Tephritidae อย่างชัดเจน และพบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มทั้ง *B. dorsalis* และ *B. carambolae* นั้นมีลักษณะเป็น polyphyletic ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ *B. dorsalis* ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *B. dorsalis* complex ต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ด้วย

คำหลัก: แมลงวันผลไม้ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พันธุกรรม

Abstract

One of most serious groups of horticultural pests, the *Bactrocera dorsalis* complex, is of particular biosecurity/quarantine concern. Unfortunately, species of this complex are notoriously difficult to identify using morphology. Molecular diagnostic tools provide valuable support for the rapid and accurate identification of morphologically indistinct fruit fly species. DNA barcoding of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (*cox1*) gene could be employed to increase the accuracy of fruit fly identifications. Fresh material of *B. dorsalis* complex was collected from all regions of Thailand. Sequences were analysed using a 'barcode' approach and also phylogenetic analysis. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GENBANK. Two species of the dorsalis complex (*B. dorsalis* and *B. carambolae*) were found. Phylogenetic analyses (Maximum Likelihood and Bayesian analysis) of the sequences gave consistent results. Neighbor-joining distance and Bayesian analysis analyses were used to investigate patterns of clustering of the dorsalis complex sequences with other pest species of fruit flies. *Cox1* proved effective in resolving *dorsalis* and *carambolae* from other fruit fly species but failed to resolve *B. dorsalis* from *B. carambolae*. This study provides basic information on the number of species of *B. dorsalis* complex present in Thailand. However, an understanding of the classification within the *B. dorsalis* complex group will requires further study making use of additional genes.

Keywords: Fruit fly, DNA barcoding, molecular diagnostics

6. คำนำ

ผักและผลไม้ของไทย ถือเป็นอีกหนึ่งประเภทสินค้าที่มีความสำคัญของประเทศ ซึ่งเป็นรายได้หลักของเกษตรกรไทย ปัจจุบันสถานะการแข่งขันการส่งออกผักและผลไม้ของประเทศในภูมิภาคอาเซียนที่สูงขึ้น เพราะฉะนั้นการส่งออกผักผลไม้ไปตลาดต่างประเทศจะต้องมีมาตรฐานการรับรอง และมีการตรวจสอบคุณภาพที่เข้มงวด การจัดจำแนกศัตรูพืชที่มีโอกาสติดไปกับการส่งออกให้มีความถูกต้องนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของผักผลไม้

ในทวีปเอเชียพบว่าแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างสูง และพบว่าแมลงวันผลไม้ในกลุ่มนี้มีรูปร่างทางสัณฐานวิทยายากจนที่ใกล้เคียงกันมาก (Vergilo *et al.*, 2015) จึงมีการจัดแมลงวันผลไม้หลายชนิดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความซับซ้อน (complex) เนื่องจากมีความยากเป็นอย่างยิ่งในการใช้เพียงลักษณะสัณฐานวิทยายากจนมาเป็นตัวจัดจำแนก โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้กลุ่ม *dorsalis* complex นั้นก่อให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานแมลงเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้มีความแปรผันทางรูปร่างลักษณะภายนอก ยากต่อการตัดสินใจว่าเป็นความแปรผันทางสัณฐานภายในชนิดเดียวกันหรือเป็นความแตกต่างระหว่างชนิดนั้นๆ (Cameron *et al.*, 2010; Schutze *et al.*, 2012; Kitthawee & Rungsri, 2011; Hernández-Ortiz *et al.*, 2012) ดังนั้นจึงมีการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ เช่น การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) มาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex (Krosch *et al.*, 2012; Krosch *et al.*, 2013; Schutze *et al.*, 2012)

การนำเทคโนโลยีทางชีวโมเลกุลมาใช้จำแนกสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถจำแนกและยืนยันชนิดของสิ่งมีชีวิตให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดในครั้งนี้จะสามารถนำมาใช้ในการจำแนกและยืนยันชนิดของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ในประเทศไทยได้และยังจะเป็นการปรับปรุงแก้ไขข้อมูลของแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้ให้มีความทันสมัยตามหลักสากลซึ่งจะก่อให้เกิดผลดีทั้งด้านอนุกรมวิธานและการนำเข้าส่งออกพืชผักผลไม้ของไทยสู่ตลาดโลกอีกด้วย

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล้องพลาสติก ถังพลาสติก กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) สารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ เมทิล ยูจีนอล (methyl Eugenol) รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline,

Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag (Bioline, Australia) HS Red DNA Polymerase และ $MgCl_2$

- สารเคมี และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2561)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.1 การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากพื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ แต่เนื่องจากแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex มีการเข้าทำลายพืชอาหารแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องพยายามเก็บรวบรวมตัวอย่างตัวอ่อนจากพืชอาหารที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลาย ให้มีความหลากหลายที่สุด โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) ซึ่งภายในหนึ่งปีสามารถเก็บตัวอย่างได้ 3 ภาค ภาคละ 3-5 จังหวัด และในแต่ละจังหวัดจะเก็บสามจุดสำรวจ และใช้กับดักฟีโรโมนได้แก่ methyl Eugenol โดยติดตั้งในพื้นที่เก็บตัวอย่างละ 5 อันต่อจุดสำรวจ บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Global Positioning System: GPS) โดยแบ่งเป็น พื้นที่ต่าง ๆ ดังนี้

(1) แปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง ถั่วฝักยาว

(2) แปลงผลไม้ เช่น มะเฟือง ชมพู ฝรั่ง มะม่วง พุทรา

(3) พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น สวนพฤกษศาสตร์ อุทยานแห่งชาติ

รายละเอียดจังหวัดที่เป็นตัวแทนพื้นที่ปลูกพืชที่ต้องการไปเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

ปี 2560 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 3 ภาค ดังนี้

(1) ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี และนครนายก

(2) ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ราชบุรี และเพชรบุรี

(3) ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง และลำพูน

ปี 2561 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 3 ภาค ดังนี้

(1) ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ปราจีนบุรี ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด

(2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น เลย หนองคาย หนองบัวลำภู บุรีรัมย์ สุรินทร์ และอุดรธานี

(3) ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง พังงา สตูล สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ตรัง และสงขลา

1.2 นำส่วนของพืชที่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้มาล้างทำความสะอาด นำตัวอ่อนที่เหลือใส่กล่องพลาสติกที่มีตะแกรงรองกันซึ่งด้านล่างใส่ขี้เลื่อย และนำกล่องพลาสติกใส่ในกรงผ้าเพื่อเลี้ยงตัวอ่อน

ให้เจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยเจริญออกมาให้อาหาร คือ น้ำตาลผสม บริเวอร์ยีสต์ในอัตรา 1:4 เพื่อให้สับนลำตัวพัฒนาได้ดี

1.3 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากแนวทางวินิจฉัยด้วย *The Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia (Drew and Hancock, 1994) และ Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew and Romig, 2016)

1.4 นำตัวเต็มวัยบางส่วนดองไว้ในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.5 เตรียมตัวอย่างตัวเต็มวัยบางส่วนเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและเป็นข้อมูลอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์ โดยใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยที่อบแห้งหรือฆ่า ด้วยเอทิลอะซิเตท หรือเก็บแมลงใส่หลอดแก้ว แช่ในช่องน้ำแข็ง 1 - 2 ชั่วโมง วิธีนี้จะทำให้สัไม่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้ตัวอย่างแล้ว ใช้เข็มขนาดเล็ก (micropin) แทงบริเวณ ด้านข้างของส่วนอกใต้ปีก ให้ไปทางด้านหน้าของลำตัว แล้วจึงเสียบ micropin กับโฟมหรือ ค็อกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็ก ๆ บันทึกรำกับ บอก สถานที่ วัน เดือน ปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืช ที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

2. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ดำเนินการปี 2560-2561)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop, 2016 ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้วนขาจำนวนสามข้างของขาแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ตัวอย่างแมลงที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็น Voucher specimen) เติมน lysis buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ proteinase K solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง แล้วเติมน lysis buffer G3 ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เขย่าให้สม่ำเสมอ เติมนแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน ISOLATE II Genomic DNA tube ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติมน wash buffer GW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติมน wash buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และชะล้างอีเอ็นเอด้วยสารละลาย elution buffer G ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอ ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26

เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

	1 reaction (ไมโครลิตร)
5X Buffer	5
MyTag	0.1
ddH ₂ O	15.9
Primer Forward LCO1490	1
Primer Reverse HCO2198	1
DNA	2
Total	25

นำปฏิกิริยา PCR ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 35 รอบ) จากนั้น final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลิตภัณฑ์ PCR ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.5 % และให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 400 mp เป็นเวลา 45 นาที

2.4 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของแมลงวันผลไม้ที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดยบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี

2.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *cox1* ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999).

2.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดนำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิดกับฐานข้อมูล Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.7 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อยืนยันความถูกต้องในการจัดจำแนก โดยการประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สองเกณฑ์มาตรฐาน 2 ประเภท คือ Maximum Likelihood และ Bayesian Inference โดยการเตรียมชุดข้อมูลที่จะใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละวิธี ดังนี้ Maximum Likelihood (ML) เตรียมไฟล์ .phy ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) ในการวิเคราะห์ กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) เริ่มวิเคราะห์จาก random starting tree และ กำหนดค่า 1000 ซ้ำ สำหรับ maximum likelihood bootstrap Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ .nexus ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ Mcmc startingtree=user ngen=10 000 000 temp=0.25 nruns=4samplefreq=1000 pintfreq=1000 nchains=4 savebrlens=yes stoprules=yes stopval=0.01; ปรับค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin เพื่อให้ได้ consensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions โดย AWTY (Nylander *et al.*, 2008)

- การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วย พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- 3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้ พร้อมทั้งรายละเอียดของพืชอาหารที่พบแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย เช่น ชนิดพืช และชื่อวิทยาศาสตร์

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

- 2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

จากการใช้กับดักแมลงวันผลไม้แบบ steiner ซึ่งเป็นกับดักที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในประเทศไทยนั้น พบว่าตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ได้นั้น มีลักษณะแห้งหรือเน่าเสีย ทำให้ไม่สามารถนำตัวอย่างมาศึกษาด้านชีวโมเลกุลได้ ดังนั้นจึงมีการนำเอากับดักแบบถังเปียก (Figure 1) เป็นดักที่มีลักษณะเป็นถ้วยพลาสติกใสสีขาว มีช่องว่างขนาด 1.5 เซนติเมตร อยู่รอบๆ กับดัก ซึ่งเป็นทางเข้าของแมลงวันผลไม้ มีฝาปิดที่ภายในมีที่ใส่สารล่อซึ่งผสมยาฆ่าแมลงติดอยู่ กับดักประเภทนี้เหมาะสำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ศึกษาด้านชีวโมเลกุล เนื่องจากสามารถป้องกันความร้อน ความชื้น ลม ฝน และเชื้อรา นอกจากนี้ภายในถ้วยบรรจุสารโปรไฟลีนไกลคอลซึ่งเป็นสารเคมีที่ช่วยในการคงรักษาสภาพดีเอ็นเอไม่ให้เสื่อมสลายไปตามสภาวะแวดล้อม และจากการใช้กับดักแมลงวันผลไม้ และการรวบรวมจากพืชอาหารต่างๆ สามารถรวบรวมแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex (Figure 2) ได้ จำนวน 397 ตัวอย่าง (Table 1) ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยแนวทางวินิจฉัย Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew & Romig, 2016) พบแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* complex ที่สามารถจำแนกได้ 2 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae* (Figure 3) และ *B. dorsalis* (Figure 4) และยังมีอีกหลายตัวอย่างที่มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาทำให้ไม่สามารถจำแนกได้ และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

จากการสำรวจพืชอาศัย (Table 2) และการแพร่กระจายของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex พบว่าแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* กระจายตัวเฉพาะเขตภาคใต้ของไทย (Figure 5) ซึ่งแตกต่างจาก *B. dorsalis* ที่มีการกระจายตัวทุกภูมิภาคของประเทศไทย (Figure 6)

2. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษารั้วนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* 20 ตัวอย่าง และ *B. dorsalis* 41 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* (Figure 7) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* จำนวน 20 ตัวอย่าง และ *B. dorsalis* จำนวน 41 ตัวอย่าง บันทึกผลนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode (ภาคผนวกที่ 1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่รายงานในฐานข้อมูลสากล คือ Gene Bank เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษามีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลสูงถึง 99 - 100%

แต่จากการศึกษารั้วนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้บางตัวอย่าง เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* มาใช้ศึกษาความแตกต่างของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex นั้น ยังมีความคลุมเครือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *B. dorsalis* กับ *B. carambolae* ได้

อย่างชัดเจนในบางตัวอย่าง จึงใช้ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการแยกความแตกต่างระหว่าง *B. dorsalis* กับ *B. carambolae* คือ ITS1:

ITS7F GAA TTT CGC ATA CAT TGT AT และ

ITS6R AGC CGA GTG ATC CAC CGC T (Boykin *et al.*, 2013)

ซึ่งเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน ITS1 (Figure 8) ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Gene bank พบว่ามีความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์สูงถึง 99 - 100 % (ภาคผนวกที่ 2) และสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *B. carambolae* และ *B. dorsalis* ได้อย่างชัดเจน

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex เพื่อใช้ยืนยันข้อมูลการจัดจำแนกชนิด โดยทำการวิเคราะห์ sequences ของตำแหน่ง *cox1* จาก 70 ตัวอย่าง ได้แก่ *B. dorsalis* complex จำนวน 61 ตัวอย่าง และแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในวงศ์ (Family) Tephritidae 9 ตัวอย่าง ได้แก่ *Anastrata ludens*, *B. tryoni*, *B. cucumis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *B. zonata*, *B. correcta*, *Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* วิเคราะห์ด้วย Maximum Likelihood และ Bayesian analysis พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน (Figures 9 - 10) โดยแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex เป็น sister group ของแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ใน Family Tephritidae อย่างชัดเจน แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้ในแต่ละกลุ่มพบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มทั้ง *B. dorsalis* และ *B. carambolae* นั้นมีลักษณะเป็น polyphyletic ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* สามารถจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ แต่การจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มต้องเพิ่มข้อมูลของดีเอ็นเอของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ ซึ่งยีนตำแหน่ง *cox1* สามารถจำแนกได้เพียงความแตกต่างในระดับกลุ่มของ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* เท่านั้น อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ *B. dorsalis* ในประเทศไทย แต่การยืนยันชนิดหรือจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *B. dorsalis* complex นั้นต้องมีการศึกษาต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากพื้นที่ภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันตก โดยการใช้กับดักแมลงวันผลไม้ ร่วมกับสารล่อที่ใช้ CUE lure และ Methyl eugenol รวมทั้งการรวบรวมจากพืชอาหารต่างๆ พบแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ทั้งหมด จำนวน 397 ตัวอย่าง และในการจำแนกเบื้องต้นพบแมลงวันผลไม้ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis*, *B. carambolae* และ

Bactrocera spp. และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอ ทำพีซีอาร์ บริเวณยีน *cox1* ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวน 41 ตัวอย่าง และ *B. carambolae* จำนวน 20 ตัวอย่าง

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของแมลงวันผลไม้ที่มีความซับซ้อนหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นการยากที่จะใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก และยืนยันว่า *cox1* เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ได้ เนื่องจากยีน *cox1* มีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาด นิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500 - 800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้น ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer จะสามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ ง่ายและรวดเร็ว นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *cox1* ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และการเลือกบริเวณยีนที่จะนำมาใช้มีความสำคัญมาก เพราะหากเลือกขนาดและบริเวณที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจะทำให้สามารถนำไปใช้ได้ง่าย สะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ *cox1* มีบางตัวอย่างที่แสดงผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงมีการศึกษา เพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ ITS1 ซึ่งพบว่าสามารถจำแนกชนิดของ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* ได้อย่างถูกต้องถึง 99-100% นอกจากนี้ยังสามารถใช้ ITS1 ในการแยกความแตกต่างระหว่างแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* และ *B. dorsalis* เพียงแค่การในวิธีการ gel electrophoresis เท่านั้น เนื่องจาก ขนาดของจำนวนคู่เบสนั้นมีความแตกต่างกันประมาณ 44 คู่เบส (Figure 8) ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ในระดับสายตาซึ่งเป็นการตรวจสอบในเบื้องต้นที่มีความน่าเชื่อถือ โดยเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Maximum Likelihood และ Bayesian analysis ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และยืนยันชนิดของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex นั้นพบว่าแยกออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ใน Family Tephritidae อย่างเห็นได้ชัด แต่มีความแตกต่างในการจัดกลุ่ม ซึ่งหากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้น จะต้องมีการใช้จำนวนยีนในการศึกษาเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Boykin *et al.*, 2013 ที่ใช้ยีนถึง 6 ตำแหน่ง (*cox1*, *nad4-3'*, *CAD*, *period*, ITS1, ITS2) หรือ ทำการศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้แบบผสมผสานโดยการประยุกต์ใช้เทคนิคมอร์โฟเมตริกแบบจีโอเมตริก (geometric morphometric) มาผสมผสานกับการศึกษาทางชีวโมเลกุลในแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ซึ่งจะช่วยสนับสนุนและยืนยันการตรวจจำแนกได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับการศึกษาของ Krosch *et al.* (2012, 2013) และ Schutze *et al.*, (2012; 2015)

นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ยังช่วยยืนยันจำนวนชนิดของ *B. dorsalis* ในประเทศไทย ให้มีความสอดคล้องและทันสมัยเทียบเท่าระดับสากล ดังเช่น Schutze *et al.*, 2015 ศึกษาแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ด้วยการศึกษานุกรมวิธานแบบผสมผสาน (Integrative Taxonomy) และยืนยันได้ว่าแมลงวันผลไม้ที่เคยเป็น *B. papayae* และ *B. philipinensis* จริง ๆ แล้วเป็นชนิดเดียวกับ *B. dorsalis* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อนำดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้ *B. papaya* และ *B. philipinensis* มา

ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้น แมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *B. dorsalis* และแยกออกจาก *B. carambolae* อย่างเห็นได้ชัด

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไปซึ่งจากการทดลองจะได้ชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ ที่ถูกต้อง ได้ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ด ของแมลงวันผลไม้ใน *B. dorsalis* complex และสามารถนำมาใช้เพื่อจัดจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ในกลุ่มของ *B. dorsalis* complex ได้อย่างถูกต้องและมาตรฐานสากล นอกจากนี้ยังได้ข้อมูลโครงสร้างดีเอ็นเอเป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุม ป้องกันกำจัด และข้อมูลในการนำเข้าส่งออก ซึ่งเป็นแหล่ง ข้อมูลทางด้านกีฏวิทยาที่สำคัญของประเทศ ซึ่งหน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ หน่วยงานราชการ กระทรวงพาณิชย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บริษัทเอกชนผู้ส่งออก มหาวิทยาลัย โรงเรียน

ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นข้อมูลที่มีความหลากหลายทางชีวภาพที่สามารถนำไปใช้บ่งชี้ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตของประเทศไทย ถือเป็นฐานข้อมูลทางด้านพันธุกรรมที่มีความสำคัญยิ่งสำหรับการนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคต

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : ขอขอบคุณ ดร. ชนินทร ดวงสอาด ผู้ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

12. เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Boykin, L.M, M.K Schutze and M.N. Krosch. 2013. Multi-gene phylogenetic analysis of south-east Asian pest members of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) does not support current taxonomy. *Journal of Applied Entomology* 138(4).
- Cameron, E.C., Sved, J.A. & Gilchrist, A.S. 2010. Pest fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northwestern Australia: one species or two? *Bulletin of Entomological Research* 100: 197-206.
- Drew, R.A.I. & Hancock, D.L. 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. *Bulletin of Entomological Research Supplement Series* 2: 1-68.

- Drew, R.A.I. & Romig, M. 2016. *Keys to the tropical fruit flies of South-East Asia*. CABI, London, UK. 487 pp.
- 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.
- Hernández-Ortiz, V., Bartolucci, A.F., Morales-Valles, P., Frias, D. & Selivon, D. 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America* 105: 305-318.
- Kitthawee, S. & Rungsri, N. 2011. Differentiation in wing shape in the *Bactrocera tau* (Walker) complex on a single fruit species in Thailand. *Science Asia* 37: 308-313.
- Krosch, M.N., Schutze, M., Armstrong, K.F., Graham, G.C., Yeates, D.K. & Clarke, A.R. 2012. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.006
- Krosch, M.N., Schutze, M.K., Armstrong, K.F., Boontop, Y., Boykin, L.M., Chapman, T.A., Englezou, A., Cameron, S.L. & Clarke, A.R. 2013. Piecing together an integrative taxonomic puzzle: microsatellite, wing shape and aedeagus length analyses of *Bactrocera dorsalis* s.l. (Diptera: Tephritidae) find no evidence of multiple lineages in a proposed contact zone along the Thai/Malay Peninsula. *Systematic Entomology* 38: 2-13.
- Nylander, J. A., Wilgenbusch, J. C., Warren, D. L. and D. L., Swofford. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24: 581-583.
- Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Schutze, M.K., Jessup, A. & Clarke, A.R. 2012. Wing shape as potential discriminator of morphologically similar pest taxa within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of Entomological Research* 102: 103-111.
- Schutze, M. K., Aketarawong, N., Amornsak, W., Armstrong, K. F., Augustinos, A. A., Barr, N., ... Clarke, A. R. 2015. Synonymization of key pest species within the *Bactrocera dorsalis*

species complex (Diptera: Tephritidae): taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoecological data. *Systematic Entomology*, 40(2), 456-471.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.

Virgilio, M., Jordaens, K., Verwimp, C., White, I. M., & De Meyer, M. (2015). Higher phylogeny of frugivorous flies (Diptera, Tephritidae, Dacini): Localised partition conflicts and a novel generic classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 85, 171-179.



Figure 1 Fruit fly trap (wet bucket trap) for molecular work

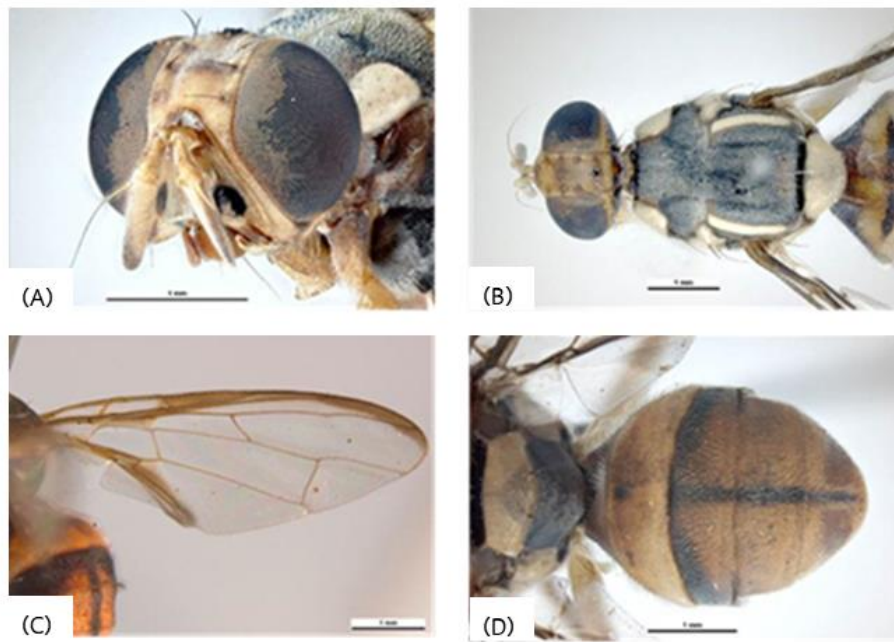


Figure 2 Morphological character of *Bactrocera dorsalis* complex.

- (A) Distinct dark facial spots (B) Lateral postsutural vittae present
 (C) Wing colourless and anal streak (D) Abdominal terga III-V with a dark “T” pattern

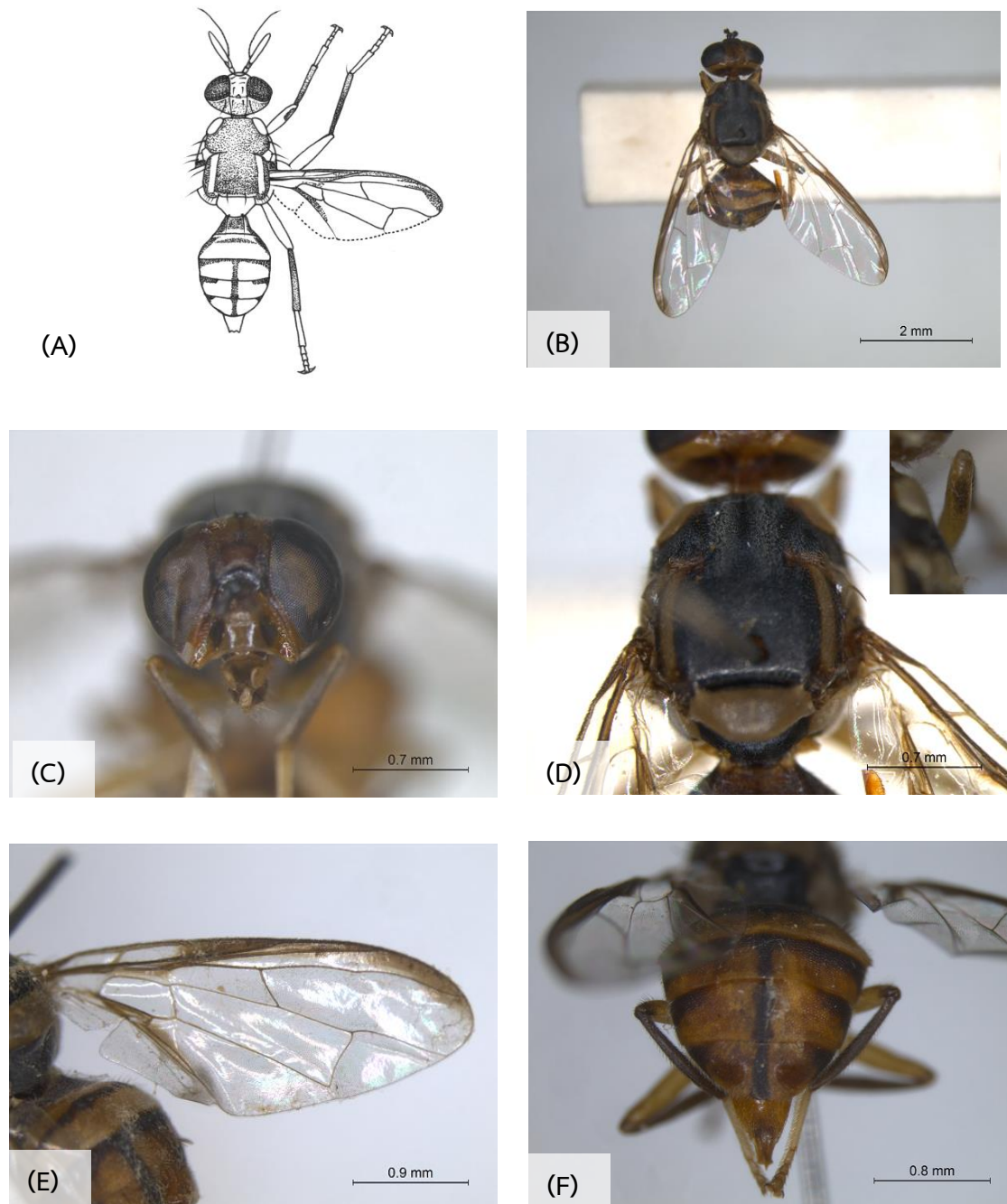


Figure 3 *Bactrocera (Bactrocera) carambolae* Drew & Hancock

(A) Taxonomic characters

(B) Body

(C) Head

(D) Thorax

(E) Wing

(F) Abdomen

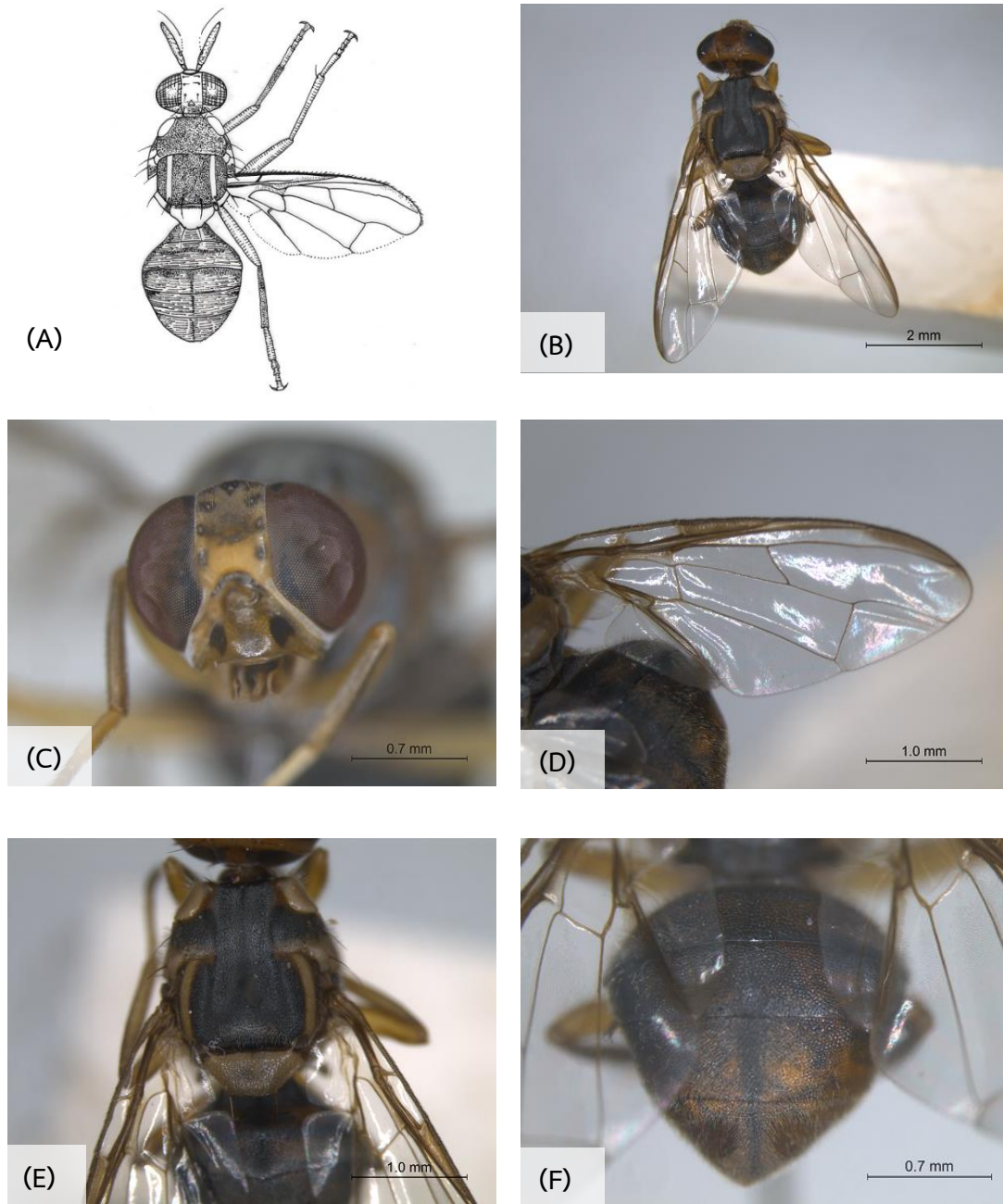


Figure 4 *Bactrocera (Bactrocera) dorsalis* Hendel

- | | |
|--------------------------|-------------|
| (A) Taxonomic characters | (B) Body |
| (C) Head | (D) Thorax |
| (E) Wing | (F) Abdomen |

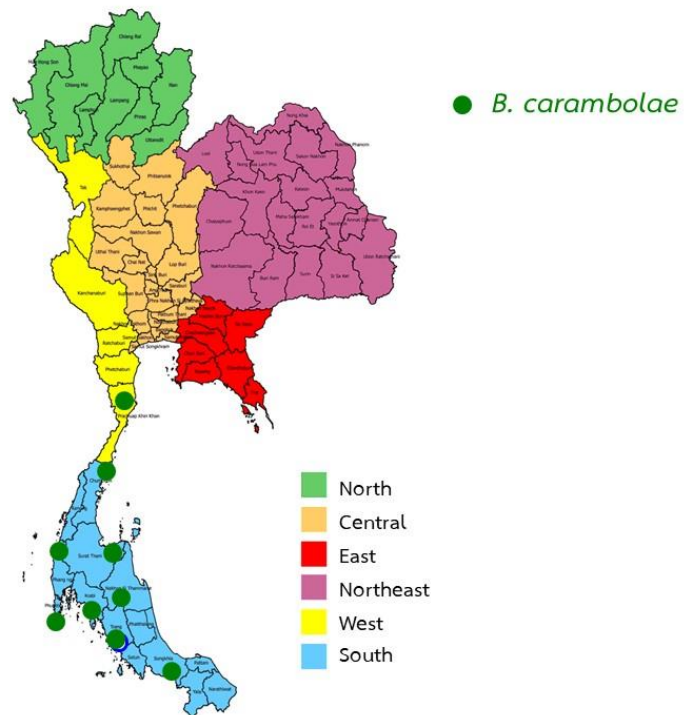


Figure 5 Distribution of *Bactrocera carambolae* in Thailand

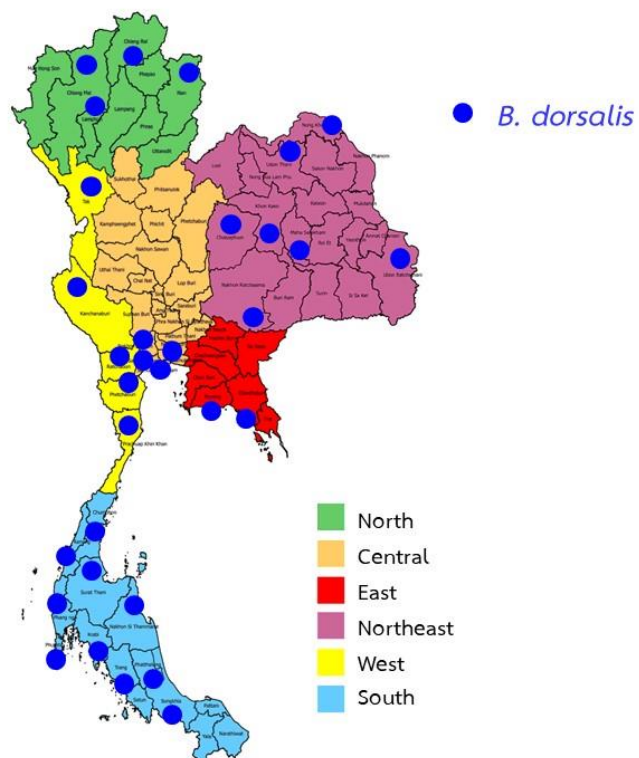


Figure 6 Distribution of *Bactrocera dorsalis* in Thailand

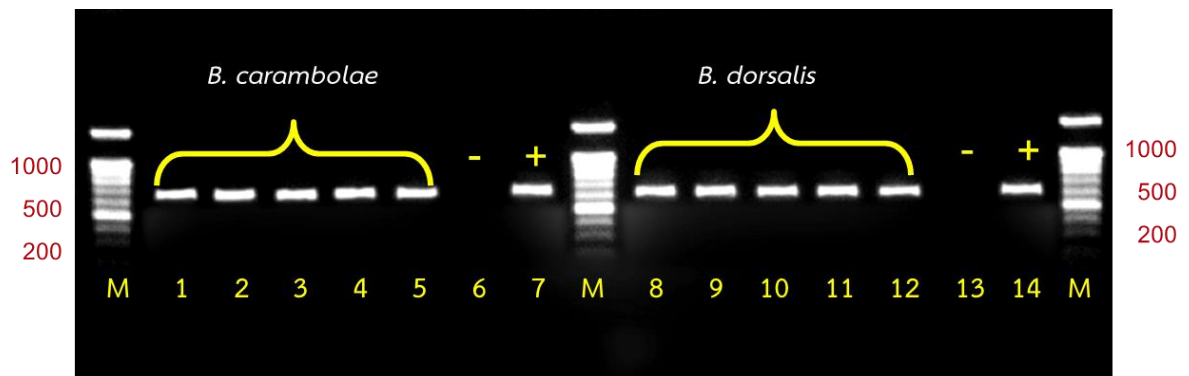


Figure 7 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

Lane 1- 5: *B. dorsalis* from different geographical populations.

Lane 6: negative control (ddH₂O)

Lane 7: Positive control (*Z. cucurbitae*)

Lane 8 -12: *B. carambolae* from different geographical populations.

Lane 13: negative control (ddH₂O)

Lane 14: Positive control (*Z. cucurbitae*)

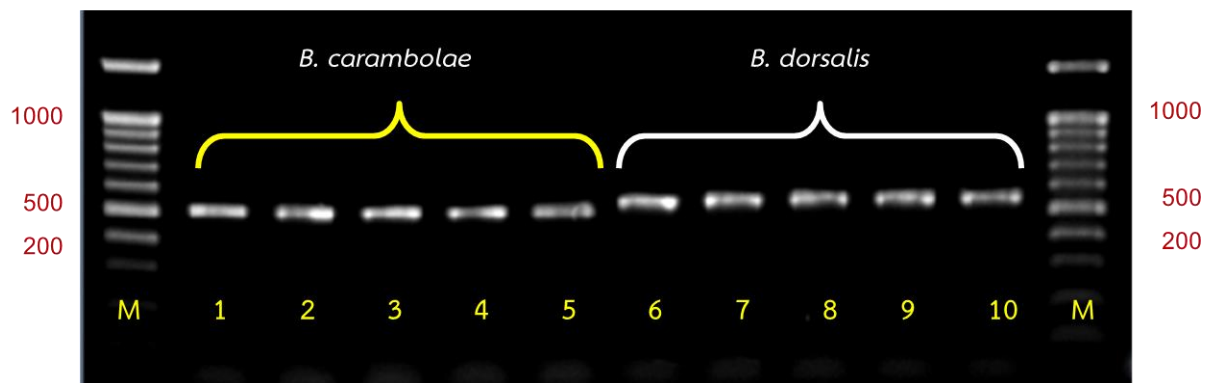


Figure 8 PCR results using the ITS (ITS7F/ITS6R) primer pair.

Lane 1- 5 *B. carambolae* from different geographical populatons;

Lane 6 -10 *B. dorsalis*; Lane 11: negative control (ddH₂O);

Lane M Marker

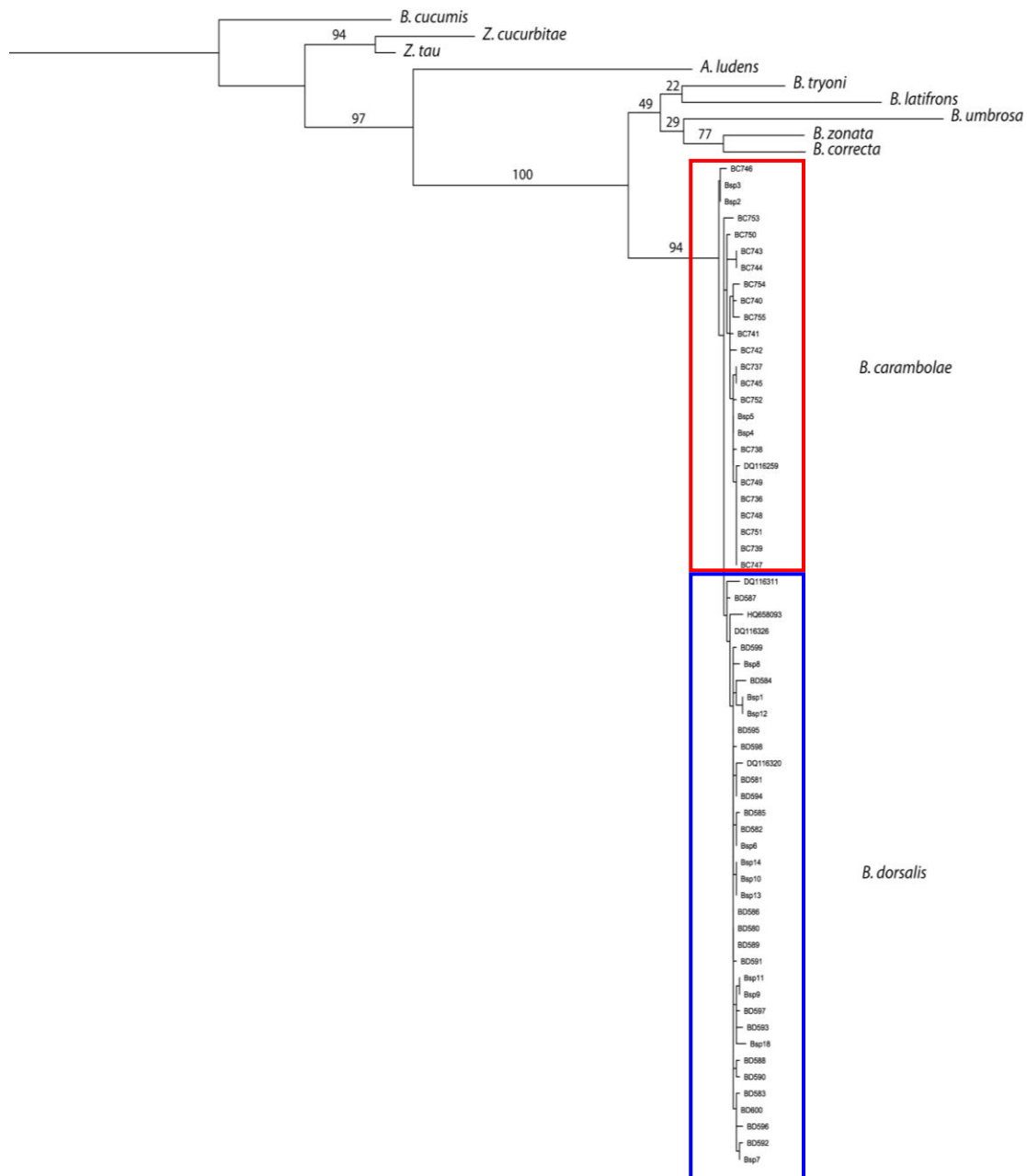


Figure 9 Maximum likelihood phylogenetic tree based on *cox1* gene sequences, showing the phylogenetic relationship among 11 fruit fly species, other *Bactrocera* species, *Zeugodacus* species and *Anastrepha*. *Anastrepha ludens* was used as outgroup. The number of sites are 650, and scale bar = 0.005 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at nodes.

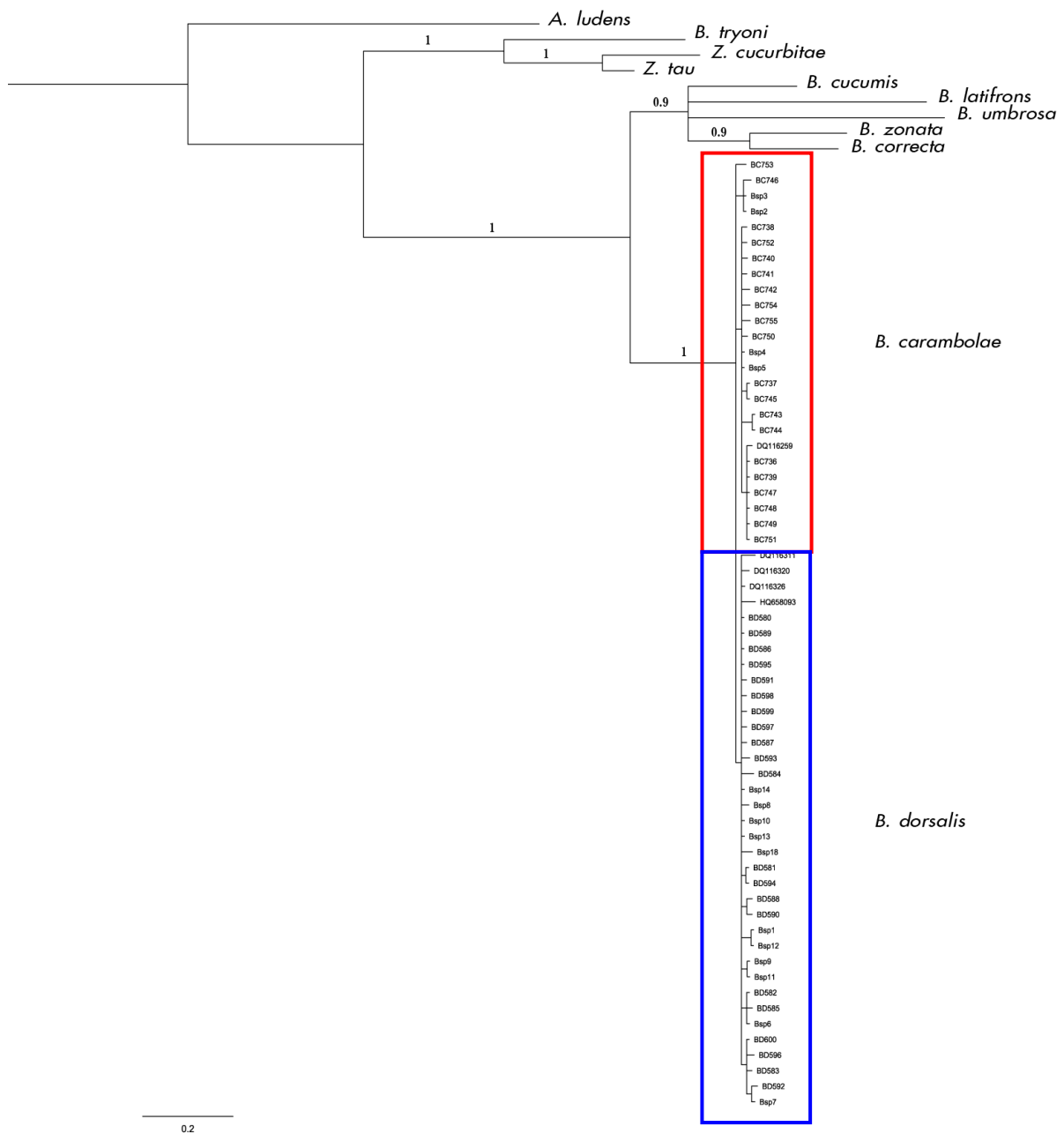


Figure 10 Bayesian analysis phylogenetic tree based on *cox1* gene sequences, showing the phylogenetic positions of 11 fruit fly species, other *Bactrocera* species, *Zeugodacus* species and *Anastrepha*. *A. ludens* was used as outgroup. The scale bar = 0.2 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at nodes.

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

	Scientific Name	Number of samples	Host plants	Distribution
1	<i>B. dorsalis</i>	50	rose apple guava, cucumber winter melon bitter gourd pumpkin, santon guava, mango, jackfruit and water melon	Chiang-mai, Chiang-rai, Lamphun Nan, Nakhon Ratchasima Chaiyaphum, Khon Kaen, Udonthani, Nongkhai, Mahasarakham, Kanchanaburi, Tak, Chanthaburi, Rayong, Suratthani, Chumphon Ranong, Trang, Phatthalung Songkhla, Nakhon Si Thammarat Krabi, Phang-nga, Phuket, Bangkok, Nakhon Pathom, Samut Songkhram, Samut Sakhon, Ratchaburi, Prachuap Khiri khan, Phetchaburi and Ubon Ratchathani
2	<i>B. carambolae</i>	22	star fruit rose apple mango	Prachuap Khiri khan, Chumphon, Trang, Songkhla, Surat Thani, Krabi Nakhon Si Thammarat, Phang-nga, and Phuket
3	<i>Bactrocera</i> spp.	325	rose apple guava, cucumber winter melon bitter gourd pumpkin, santon guava, mango, jackfruit and water melon	Chiang-mai, Chiang-rai, Lamphun Nan, Nakhon Ratchasima Chaiyaphum, Khon Kaen Udonthani, Nongkhai Mahasarakham, Kanchanaburi Tak, Chanthaburi, Rayong Suratthani, Chumphon Ranong, Trang, Phatthalung Songkhla, Nakhon Si Thammarat Krabi, Phang-nga, Phuket Bangkok, Nakhon Pathom Samut Songkhram, Samut Sakhon Ratchaburi, Prachuap Khiri khan Phetchaburi and Ubon Ratchathani

14. ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 DNA Barcode ของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย COX1

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

ตัวอย่างที่ 1 COI4

AAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAACTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCTGTTAATACTA
CTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTCCTAAATGAGGA
AATACCTGCTAAGTGAAGTGAAAAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAACTGTTCAACCTGT
ACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAAAATCTTATATTATTCATTCTGCGAAATGCTATAT
CGGGAGCTCCTAATATTAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACCAATTATAATTGGTATACTATAAGAAAATTATTACGAAAGCATGAGCTGT
TACAATTACATTATAAATTTGATCGTCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCTACTATTCTT
GCTCAGGCTCCGAAGATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 2 COI4.1

TCAGNGCAGGAATANTAAGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGANCTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATG
TAATTGTAACAGCTCATGCTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGA
GCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACG
GAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGC
AGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTCAATACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTT
GAGCAGTAGTATTAACAGCTTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCC
TTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCT

ตัวอย่างที่ 3 COI5

GGCAGGGTCAAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAACTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCT
GTTAATACTACTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTCCTA
AAATTGAGGAAATACCTGCTAAGTGAAGTGAAAAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAACTG
TTCAACCTGTACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAAAATCTTATATTATTCATTCTGTTGA
AATGCTATATCGGAGCTCCTAATATTAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACCAATTATAATTGGTATACTATAAGAAAATTATTACGAAAG
CATGAGCTGTTACAATTACATTATAAATTTGATCGTCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCC
TACTATTCTGCTCAGGCTCCGAAGATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 4 COI5.1

TAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCA
TGCTTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCAT
TTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTG
AACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTT
TAGGAGCAGTAAATTTCAATACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTGAGCAGTAGTATTAAC
AGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCCTGCCG
GAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCT

ตัวอย่างที่ 5 COI3

TAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCA
TGCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGTGGATTGGNAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCAT
TTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTG
AACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCTCTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTT
TAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGAGCAGTAGTATTAAC
AGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCTGCCG
GAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTT

ตัวอย่างที่ 6 COI3.1

AGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCAT
GCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGTGGATTGGNAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATT
TCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGA
ACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCTCTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTT
AGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGAGCAGTAGTATTAACA
GCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCTGCCGG
AGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGA

ตัวอย่างที่ 7 COI4

AAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAACTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCTGTTAATACTACTGCTCA
AACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTCCTAAAATTGAGGAAATACCT
GCTAAGTGAAGTGAAAAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAAACTGTTCAACCTGTACCAGCT
CCGTTTTCTACTATACCTTCTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAAAATCTTATATTATTCATTCGTGGAAATGCTATATCGGGAG
CTCCTAATATTAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACCAATTATAATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCATGAGCTGTTACAATT
ACATTATAAATTTGATCGTCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCTACTATTCTCTGCTCAGG
CTCCGAAGATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTA

ตัวอย่างที่ 8 COI4.1

AGNGCAGGAATANTAAGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGANCTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTA
ATTGTAACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGC
TCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGA
GCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCTCTTCACTTCACTTAGCAG
GTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGA
GCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTT
TTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTC

ตัวอย่างที่ 9 COI5

AGGGTCAAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAACTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCTGTT
AATACTACTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTCCTAAAA
TTGAGGAAATACCTGCTAAGTGAAGTAAAAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAAACTGTTT
AACCTGTACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAAAATCTTATATTATTCATTCGTGGAAAT
GCTATATCGGGAGCTCCTAATATTAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACCAATTATAATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCAT

GAGCTGTTACAATTACATTATAAAATTTGATCGTCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCTCTAC
TATTCCTGCTCAGGCTCCGAAGATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 10 COI5.1

ACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTT
TCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCA
CGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAG
TTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACCTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGA
GCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTAGTATTAACAGCTT
TATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGGA
GGAGACCTTATCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA

DNA Barcode ของ *B. carambolae* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 01501

TACATACCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGC
TTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTTC
CACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAAC
AGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACCTAGCGGGTATTTCTCAATTTTA
GGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAG
CTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGA
GGAGGAGATCCTATCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGT

ตัวอย่างที่ 2 HPA-00701

ACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTT
TCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCA
CGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAG
TTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACCTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGG
AGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCT
TTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGG
AGGAGATCCTATCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGT

ตัวอย่างที่ 3 HPL-00701

CATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTT
CGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCAC
GAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGT
TTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACCTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGGA
GCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTT
TATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGATCCTGCCGGAGGA
GGAGATCCTATCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA

ตัวอย่างที่ 4 HPL-00801

TGAGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAA
TCGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCT

CCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAG
CTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCTACTCCACTTAGCGGG
TATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGAG
CAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTT
TTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTATTTTTTGATCA

ตัวอย่างที่ 5 HPL-00901

TGAGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATCaATGTA
ATCGTAACAGCTCATGCTTTTCTGAATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGC
TCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGA
GCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCTACTCCACTTAGCGG
GATTTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGA
GCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTT
TTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTA

ตัวอย่างที่ 6 01501

ACATACCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCT
TTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCC
ACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACA
GTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCTACTTCACTTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAG
GAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGC
TTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATANTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAG
GAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTG

ตัวอย่างที่ 7 HPA-00701

ATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTC
GTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACG
AATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTT
TACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCTACTTCACTTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGGAG
CAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTA
TTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGGAG
GAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTG

ตัวอย่างที่ 8 HPL-00701.1

ATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTC
GTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACG
AATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTT
TACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCTACTTCACTTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGGAG
CAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTTATTCTGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTA
TTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGATCTGCCGGAGGAGG
AGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTG

ตัวอย่างที่ 9 HPL-00801

AGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATC
GTAACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTCC
CGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCT
GGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCTACTCCACTTAGCGGGTA
TTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGAGCA
GTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCTCTTTT
TGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTA

ตัวอย่างที่ 10 HPL-00901

AGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATCaATGTAAT
CGTAACAGCTCATGCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCTTTAATATTAGGAGCTC
CCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGC
TGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCTACTCCACTTAGCGGGT
ATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCTGTTTGAGC
AGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCTCTTT
TTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTA

ภาคผนวกที่ 2 ตัวอย่างรายละเอียดข้อมูลสารพันธุกรรมบางส่วนที่ได้จากการทำ PCR ด้วยยีน ITS1

แมลงวันผลไม้ *B. carambolae*

ตัวอย่างที่ 1 BC01

TTTAACATATATAGCTGTACTTATTATTATAAAAAATGATAAGTTAATTTGTTACATTAACTGCAATTCCTTTTTATGGTTATTTCTATTTGTGTT
TAAGTATATGTTATATACATGTGTCATATACGTTAGTATAAGTATATGTATTATATACATATCATATACGTAGTATAGTATATAAATACTCTGGTC
TGTTTTTATTCAAGAAGTTATGGTTAAATGCACAAATAAAGANAATAACTAAAACTGGTATTGCTGTTTTGTTGACCTAAGACATGCGCAGCTT
GCAAAATGTTGGGTTTAAATTTACAATTTATTGAAAGATGTGTGGAATTTTATTTAAAAATTTGTTATAAATATTATTATTATTCTTTCAATAA
ATTAAAAACTCTTGACTTTGAATCAAAAAACACAAAAATTTTACTCTAAGCGGTGGACCACTC

ตัวอย่างที่ 2 BC01.1

TGCTTTTGATTCAAGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATATTTATAACAAATTTTAAATAAAATTCACACATCTTTCAA
TAAATTGTAATTTTAAACCAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTAGGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTAGTTATTCTCTTTTATTGTGC
ATTTAACATAACTTCTTGAATAAAAAACAGACCAGAGTATATTTATATACTATACTACGTATATGATATGTATATAATACATATACTTATACTAACGT
ATATGACACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATANAAAATAACCATAAAAAAGGAATTGCACGTTAATGTGAACAAATTAACCTATCATTTTT
ATAATAATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTANCGTTCAAATACAATG

ตัวอย่างที่ 3 BC02

GTGTTTTTATTCAAGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATATTTATAACAAATTTTAAATAAAATTCACACATCTTTCAATAA
ATTGTAATTTTAAACCAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTAGGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTAGTTATTCTCTTTTATTGTGCATGT
ATACCAATCTTCTTGAATAAAAAACAGAGCATATTTATATACTATACTATGTATATGATATGTATATAAAACATATACTATACTACGTATATG
GACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATAGAAAATACCATAAAAAAGGAATTACACGTTAATGTGAACAAATTAACCTATCATTTACATATTT
TTATAAAAAAGATCATTTAACTTTTTATTAATTTTTCATAAATAAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTAGCGTTCAAATACAATGAG

ตัวอย่างที่ 4 BC02.1

TATATAGCTGTACTTATTATTATGAAAAATTAATAAAAAGTTAAATGATCTTTTTATAAAAAATATGTAAATGATAAGTTAATTTGTTACATTAAAC
GTGTAATTCCTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGTTAAGTATATGTTATATACATGTCCATATACGTAGTATATAGTATATGTTTTATACATATC
ATATACATAGTATAGTATATAAATATGCTCTGGTTGTTTTATTCAAGAAGATTGGTATACATGCACAAAATAAGAGAATAACTAAAACTGGTATTG
CTGTTTTGTGGACCTAAGACATGCGCAGCTTGCAAATGTTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTATTTTAAAAATTTG
TTATAAATATTATTATTATTCTTTCAATAAATAAAACTCTTGACTTTGAATTAACAAAAACACAAAAATTTTACTCTAAGCGGTGGTCNA

ตัวอย่างที่ 5 BC03

TGTATAGCTGTACTTATTATTATGAAAAATTAATAAAAAGTTAAATGATCTTTTTATAAAAAATATGTAAATGATAAGTTAATTTGTTACATTAAAC
GTGTAATTCCTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGTTAAGTATATGTTATATACATGTCCATATACGTAGTATATAGTATATGTTTTATACATATC
ATATACATAGTATAGTATATAAATATGCTCTGGTTGTTTTATTCAAGAAGATTGGTATACATGCACAAAATAAGAGAATAACTAAAACTGGTATTG
CTGTTTTGTGGACCTAAGACATGCGCAGCTTGCAAATGTTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTATTTTAAAAATTTG
TTATAAATATTATTATTATTCTTTCAATAAATAAAACTCTTGACTTTGAATTAACAAAAACACAAAAATTTTACTCTAAGCGGTGGTC

แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

ตัวอย่างที่ 1 DS01

TATATAGCTGTACTTATTATTATAAAAAATGATAAGTTAATTTGTTACATTAAACGTGCAATTCCTTTTTATGGTTATTTTCTATTTGTGTTAAGTAT
ATGTTATATACATGTGTCATATACGTTAGTATAAGTATATGTTATTATACATATCATATACGTAGTATAGTATATAAATATACTCTGGTCTGTTTTT
ATTCAGAAGTTATGGTTAAATGCACAAAATAAAGAGAATAACTAAAACTGGTATTGCTGTTTTGTTGACCTAAGACATGCGCAGCTTGCAAATG
TTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTATTTTAAAAATTTGTTATAAATATTATTATTCTTTCAATAAATAAAACT
CTTGACTTTGAATCAAAAAACACAAAAATTTTACTCTAAGCGGTGGTCACTCGGC

ตัวอย่างที่ 2 DS02

TGCTTTTGATTCAAGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATATTATAACAAATTTTAAAAATAAAATCCNACACATCTTTCAATAA
ATTGTAATTTTAAACCCAAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTANGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTANTTATTCTCTTTTATTTGTGCATT
TAACCATAACTTCTTGAATAAAAAACAGACCAGAGTATATTTATATACTATACTACGTATATGATATGTATATAATACATATACTTATACTAACGTATA
TGACACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATANAAAATAACCATAAAAAAGGAATTGCACGTTAATGTGAACAAATTAACCTATCATTTTTATA
ATAATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTANCGTTCAAATACAATGTTG

ตัวอย่างที่ 3 DS01

ACATATAGCTGTACTTATTATTATAAAAAATGATAAGTTAATTTGTTACATTAAACGTGCAATTCCTTTTTATGGTTATTTTCTATTTGTGTTAAG
TATATGTTATATACATGTGTCATATACGTTAGTATAAGTATATGTTATTATACATATCATATACGTAGTATAGTATATAAATATACTCTGGTCTGTT
TTTATTCAAGAAGTTATGGTTAAATGCACAAAATAAAGAGAATAACTAAAACTGGTATTGCTGTTTTGTTGACCTAAGACATGCGCAGCTTGCAA
ATGTTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTATTTTAAAAATTTGTTATAAATATTATTATTATTCTTTCAATAAATTA
AAAACTCTTGACTTTGAATCAAAAAACACAAAAATTTTACTCTAAGCGGTGG

ตัวอย่างที่ 4 DS03

GTTTTTGATTCAAGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATAATATTATAACAAATTTTAAAAATAAAATCCAACACATCTTTCAAT
AAATTGTAATTTTAAACCCAAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTAGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTAGTTATTCTCTTTTATTTGTGCA
TTTAACCATAACTTCTTGAATAAAAAACAGACCAGAGTATATTTATATACTATACTACGTATATGATATGTATATAATACATATACTTATACTAACGTA

TATGACACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATAGAAAATAACCATAAAAAAGGAATTGCACGTTAATGTGAACAAATTAACCTATCATTTTTA
TAATAATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTTAGCGTTCAAATACAATGT

ตัวอย่างที่ 5 DS05

TTGATTCAGGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATATTTATAACAAATTTTTAAATAAAATTCCAACACATCTTCAATAAAT
TGTAATTTTAAACCCAAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTAGGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTTAGTTATTCTCTTTTATTTGTGCATTTA
ACCATAACTTCTTGAATAAAAAACAGACCAGAGTATATTTATATACTATACTACGTATATGATATGTATATAATACATATACTTATACTAACGTATATG
ACACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATAGAAAATAACCATAAAAAAGGAATTGCACGTTAATGTGAACAAATTAACCTATCATTTTTATAAT
AATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTTAGCGTTCAAATACAATGTAA