

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

- 1. แผนงานวิจัย** การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืช
The Establishment of Pests and Natural Enemies Database for Plant Protection Research and Development in Thailand
- 2. โครงการวิจัย** อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืช
Taxonomy, Biology and Species Identification by DNA barcoding of Pests and Natural enemies for the Plant Protection Research in Thailand
- 3. ชื่อการทดลอง** การทดลองที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
การทดลองที่ 3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว
Rapid Identification of Quarantine Pest Species of Genus *Tribolium* spp. Based on DNA barcoding

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าโครงการวิจัย	นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
หัวหน้าการทดลอง	นายณพรัตน์ บัวหอม	สังกัด สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	1. นางสาวชลธิชา รักใคร่	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	2. นางสาวชนิทร ดวงสอด	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	3. นางช่อทิพย์ ศัลยพงษ์	สังกัด สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
	4. นายอิทธิพล บรรณาการ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	5. นายมนตรี ธารส	สังกัด สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

5. บทคัดย่อ

มอดแป้ง (Flour beetle) คือ แมลงในอันดับ Coleoptera วงศ์ Tenebrionidae สกุล *Tribolium* เป็นแมลงศัตรูโรงเก็บที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถทำลายแป้งจากพืช และเมล็ดธัญพืช เป็นต้น สร้างความเสียหายแก่ผลิตภัณฑ์ในโรงเก็บเป็นจำนวนมากในแต่ละปี องค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) หลายประเทศจึงกำหนดมอดแป้งบางชนิดให้เป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) แต่เนื่องจากมอดแป้งมีขนาดเล็ก บางชนิดมีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

จึงค่อนข้างยาก โดยเฉพาะตัวอย่างที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ หรืออยู่ไม่อยู่ในระยะตัวเต็มวัย การทดลองนี้ ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2560 โดยประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนก ชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว ด้วยการใช้นิวคลีโอไทด์ mtDNA *COI* ที่มีความยาว 658 bp เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่รวบรวมได้จากโรงสีข้าว และด่านตรวจพืชท่าเรือ กรุงเทพมหานคร จำนวน 103 ตัว นำมาจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าประกอบด้วย 4 ชนิด คือ มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) มอดพื้นเลื้อย (*Oryzaephilus surinamensis*) ตัวงวงข้าวโพด (*Sitophilus oryzae*) ตัวงั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) และมีตัวอย่างบางส่วนไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากไม่ อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จากนั้น นำตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด และตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกได้ จำนวน 24 ตัว มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีน mtDNA *COI* ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าผลการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดให้ผลตรงกันกับการจำแนกด้วยลักษณะทาง สัณฐานวิทยา และตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ มอดแป้งชนิด *T. castaneum* โดยค่า sequences similarity ทั้งหมดอยู่ที่ระดับ 98.94% ขึ้นไป ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยการสร้าง Maximum Likelihood tree ด้วยแบบจำลอง K2P ได้ยืนยันความถูกต้องของการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ด โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับ นิวคลีโอไทด์มาตรฐานของแต่ละชนิดที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยมอดแป้งชนิด *T. castaneum* และชนิด *T. fremani* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ และการทดลองนี้ได้ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด ป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank โดยได้รับ Accession numbers คือ MK649848 – MK649857 ดังนั้น การทดลองนี้จึงสามารถใช้เป็นพื้นฐานใน การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นอย่างถูกต้อง และรวดเร็ว ช่วยอำนวยความสะดวกในการตรวจสอบกักกันสินค้าพืชและผลิตผลพืชนำเข้าส่งออก และเป็นพื้นฐานสำหรับ การศึกษาวิจัยพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

Flour beetles of the genus *Tribolium* (Coleoptera: Tenebrionidae) are economically important stored – product pests of flours and grain, etc. Therefore, National Plant Protection Organization (NPPO) considered some species of flour beetle as quarantine pests. Because *Tribolium* individuals is small and similar in morphological characteristics for some species, especially damaged samples and non – adults state, it is difficult to identify base on external characteristics alone. The study carried out molecular identification of the genus *Tribolium* base

on DNA barcoding, using mtDNA *COI* gene (length 658 bp), during October, 2016 – September, 2018. We collected 103 stored – product pest individuals from rice mills and Bangkok port plant quarantine station and identified base on external morphological characteristics, the results showed that the individuals consisted of 4 species of pest, including *T. castaneum*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus maculatus*, and some individuals could not identified cause damaged. We applied molecular identification on 24 samples from 4 species individuals and damaged individuals, through DNA extraction, PCR amplification, sequencing and sequences alignment in GenBank. Results of two identification techniques are consistent, sequences similarity is highly at 98.94% above, and the damaged sample is *T. castaneum*. Phylogenetics analysis based on Maximum Likelihood method using K2P parameter further verified the molecular identification results above. Each species are in the same clade to the species got from GenBank. Genetics relationship between *T. castaneum* and *T. freemani* are very close, and conformed to previous studies. We submitted nucleotide sequences of 4 species to GenBank, accession numbers are MK649848 – MK649857. Therefore, the study can provide technical reference and support to rapid identification of other pests, which can provide convenience in release of plants and plant products consignments in entry - exit inspection and quarantine, and can also be a basis of population genetics study.

6. คำนำ

มอดแป้ง (Flour beetle) เป็นแมลงในอันดับ Coleoptera วงศ์ Tenebrionidae สกุล *Tribolium* MacLeay 1825 ปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบมอดแป้งแล้ว 36 ชนิด (Angelini และ Jockusch, 2008) โดยมี 10 ชนิดที่แมลงศัตรูโรงเก็บที่สำคัญ ได้แก่ *Tribolium castanum* ซึ่งพบการแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย *T. confusum* ซึ่งพบการแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลก แต่ยังไม่มียางานการตรวจพบในประเทศไทย (Crop Protection Compendium, 2019) รวมถึง *T. destructor*, *T. audax*, *T. madens*, *T. freemani*, *T. anaphe*, *T. brevicorne*, *T. parallelus* และ *T. thusa* (Wang, 2015; Crop Protection Compendium, 2019) โดยมอดแป้งเหล่านี้สามารถเข้าทำลายแป้งจากพืช เมล็ดธัญพืช เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วชนิดต่างๆ และเมล็ดพืชที่ให้น้ำมัน ได้ทั้งในระยะหนอนและตัวเต็มวัย ด้วยการเข้าทำลายภายหลังจากที่แมลงชนิดอื่นทำลายเมล็ดพืชจนเป็นรูหรือรอยแตกแล้ว โดยตัวเต็มวัยจะหลั่งสารบางชนิดที่มีกลิ่นเหม็นทำให้แป้งจากพืชหรือ เมล็ดพืชที่ถูกทำลายจับตัวเป็นก้อน ขึ้นรา และมีกลิ่นเหม็น ไม่สามารถรับประทานได้

สร้างความเสียหายแก่ผลผลิตในโรงเก็บเป็นจำนวนมากในแต่ละปี (Li et al., 2011) นอกจากนี้ มอดแป้งยังมีความสามารถในการขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว มีวงจรชีวิตที่ยาวนาน และมีความปราดเปรียวรวดเร็ว หากไม่มีมาตรการควบคุมป้องกันที่มีประสิทธิภาพ อาจส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหารได้ (Rees, 2004) ด้วยเหตุนี้หน่วยงานอารักขาพืช (National Plant Protection Organizations, NPPOs) หลายประเทศทั่วโลกกำหนดให้มอดแป้งเป็นศัตรูพืชกักกัน เช่น ประเทศจีนกำหนดให้มอดแป้งชนิด *T. destructor* เป็นศัตรูพืชกักกัน (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the P.R. China, 2017) ประเทศไทยโดยกรมวิชาการเกษตรได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า มอดแป้งชนิด *T. confusum* มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน (ณัฐพร และคณะ, 2553) ด้วยเหตุนี้ จึงกำหนดให้มีการรมยาด้วยสารเมทิลโบรไมด์ หรือสารฟอสฟีนเพื่อกำจัดมอดแป้ง และแมลงศัตรูพืชชนิดอื่น

การค้าสินค้าเกษตรระหว่างประเทศที่ขยายตัวเพิ่มสูงขึ้น ทำให้โอกาสที่มอดแป้งจะติดปะปนไปกับสินค้าเกษตร และแพร่กระจายไปยังพื้นที่ใหม่ ๆ เพิ่มสูงขึ้น จากการรายงานของกระทรวงควบคุมคุณภาพตรวจสอบและกักกันโรคแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน (the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of P. R. China, AQSIQ) พบว่าระหว่างปี 2551 – 2554 ด่านตรวจพืชทั่วสาธารณรัฐประชาชนจีนมีการตรวจพบมอดแป้งในสินค้าเกษตรนำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมด 32,718 ครั้ง เฉพาะในปีพ.ศ. 2555 ตรวจพบทั้งหมด 21,036 ครั้ง โดยตรวจพบ มอดแป้ง 5 ชนิด คือ *T. castanum*, *T. confusum*, *T. destructor*, *T. madens* และ *T. freeman* โดยตัวอย่างมอดแป้งที่ตรวจพบบางส่วนสามารถจำแนกได้ถึงระดับสกุลเท่านั้น (Wang และคณะ, 2015) ปัจจุบัน การจำแนกชนิดของมอดแป้งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเท่านั้น การจำแนกชนิดของมอดแป้งในระยะไข่ หนอน และดักแด้ รวมถึงเศษชิ้นส่วนตัวเต็มวัยมีความยากลำบาก และต้องใช้เวลาชานาน โดยเฉพาะมอดแป้ง 2 ชนิด คือ *T. castanum* และ *T. confusum* ที่มีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา และขนาดใกล้เคียงกัน แต่ในงานด้านการกักกันพืชมีการตรวจพบแมลงศัตรูพืชกักกันทุกระยะการเจริญเติบโต รวมถึงเศษชิ้นส่วนของแมลงศัตรูพืชกักกัน ดังนั้น การศึกษาค้นคว้าเทคนิคใหม่ที่สามารถตรวจสอบแมลงศัตรูพืชกักกันได้ทุกระยะการเจริญเติบโต รวมถึงเศษชิ้นส่วนของแมลงศัตรูพืชกักกัน ได้อย่างรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง (Zhang และคณะ, 2013)

ในระยะไม่กี่ปีที่ผ่านมา การตรวจจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular identification) เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological identification) (Liu และคณะ, 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ถูกรวบรวม

คิดค้นโดย Hebert และคณะ (2003) กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการตรวจวินิจฉัยชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นลำดับของดีเอ็นเอที่สั้นและมีมาตรฐาน เหมาะสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดในระดับโมเลกุล ได้รับการยอมรับและถูกกำหนดให้เป็นวิธีหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่ชุกกักกันในมาตรฐาน ISPM No. 27 เรื่อง Diagnostic protocols for regulated pests (FAO, 2006) เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นการนำเอาดีเอ็นเอมาตรฐานที่สามารถใช้ระบุชนิดของของสิ่งมีชีวิตได้ มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้ววิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูลสากล เช่น ฐานข้อมูลของ GenBank เป็นต้น และสร้าง phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ทำให้สามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว โดยสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลง ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ไม่ว่าจะตัวอย่างจะอยู่ในสภาพสมบูรณ์หรือไม่ก็ตาม (วุฒิพงษ์, 2554) โดยยีนที่นิยมนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในปัจจุบันคือ ยีน *COI* ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย (mtDNA *COI*) มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงพอที่จะใช้จำแนกชนิดสัตว์ได้ (Hebert และคณะ, 2003; วุฒิพงษ์, 2554) การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการจำแนกชนิดของมอดแป้ง สามารถช่วยอำนวยความสะดวกทางการค้าลดระยะเวลาในการตรวจปล่อย และสามารถให้ผลการจำแนกในระดับชนิด (species) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยหากด่านตรวจพืชมีการตรวจพบมอดแป้งที่เป็นศัตรูพืชชุกกักกันในแปงจากพืช หรือเมล็ดพืชนำเข้าจากต่างประเทศแล้ว กรมวิชาการเกษตรสามารถใช้ผลตรวจดังกล่าวเป็นข้อมูลแจ้งเตือนถึงปัญหาการไม่เป็นไปตามข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืช (The notification of non-compliance) ไปยังหน่วยงานอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศผู้ส่งออก เพื่อให้เพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบกักกันก่อนการส่งออก ป้องกันการเข้ามา (introduction) ของมอดแป้งต่างถิ่นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และอาจส่งผลกระทบต่อการผลิตผลในโรงเก็บของประเทศไทย

จากการตรวจสอบเอกสารวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกชนิดของมอดแป้งด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลในต่างประเทศ ดังนี้ Mestrovic และคณะ (2006) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างมอดแป้งสกุล *Tribolium* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเชื่อมต่อดำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ที่มีความยาว 642 bp และยีน 16S rDNA ที่มีความยาวระหว่าง 448 – 452 bp พบว่า phylogenetic tree สามารถแบ่งมอดแป้งสกุลดังกล่าวออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *T. brevicornis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *T. castanum*, *T. freemani*, *T. madens* และ *T. audax* และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *T. confusum*, *T. anaphe* และ *T. destructor* โดยมอดแป้งชนิด *T. castanum* กับ *T. freemani* และมอดแป้งชนิด *T. madens* กับ *T. audax* เป็น sibling species pairs กัน Angelini และ Jockusch (2008) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ด้วยการใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุลหลายชนิด ได้แก่ ยีน *COI* ยีน 16S rDNA ยีน 28S rDNA และ wingless พบว่า มอดแป้งชนิด *T. castanum* และ *T. confusum* ต่างเป็น monophyletic ส่วน Nowaczyk และคณะ (2009) ศึกษาวิธีการ

จำแนกชนิดของมอดแป้งชนิด *T. confusum* โดยใช้เทคนิค Real-time PCR มีการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS และ ยีน *COI* ของมอดแป้งชนิด *T. confusum* ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยมีการพิสูจน์ความน่าเชื่อถือและความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ได้ ทำให้ได้วิธีการจำแนกชนิดที่มีความรวดเร็วและแม่นยำ Ming และคณะ (2015) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมอดแป้ง 2 ชนิด คือ *T. castanum* และ *T. confusum* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และยีน *Cytb* ซึ่งอยู่บนไมโทคอนเดรีย จากตัวอย่างมอดแป้งชนิดละ 100 ตัวอย่างพบว่า มอดแป้งทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างทางพันธุศาสตร์ระหว่างกัน ถึงแม้ว่ารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดจะใกล้เคียงกันมากก็ตาม โดยเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับมอดแป้งอีก 2 ชนิด คือ *T. freemani* และ *T. destructor* พบว่ากลุ่มมอดแป้งชนิด *T. castanum* กับ *T. freemani* และ *T. confusum* กับ *T. destructor* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่ากลุ่มมอดแป้ง *T. castanum* และ *T. confusum* นอกจากนี้ ได้พิสูจน์แล้วว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และ ยีน *Cytb* สามารถใช้ในการศึกษาการแบ่งแยกทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสปีชีส์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาล้ำคลึงกัน ส่วนในประเทศไทย ปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนั้น การทดลองนี้จึงเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* และสามารถใช้ต่อยอดในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) หรือการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific primers) สำหรับมอดแป้งสกุล *Tribolium* ได้

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) ตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บ (stored – product pest)
- 2) วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมี
- 3) อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง เช่น หลอดทดลอง พู่กัน ที่คีบแมลง และ micropip เป็นต้น
- 4) กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope)
- 5) เครื่อง PCR thermal cycler
- 6) เครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA sequencer)
- 7) เครื่อง gel electrophoresis แบบแนวนอน และเครื่องอ่านวิเคราะห์ gel
- 8) เครื่อง autoclave
- 9) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 10) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge)
- 11) เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยมสองตำแหน่ง (๒ digit digital scale)

- 12) ตู้เย็น (refrigerator)
- 13) เครื่องเขย่าสาร (vortex)
- 14) เครื่องอบไมโครเวฟ
- 15) โปรแกรม DNAMAN V. 7.0, โปรแกรม MEGA V. 5.0, โปรแกรม ClustalX และโปรแกรม BLAST

วิธีการ

- 1) การเก็บรวบรวมตัวอย่าง (sample collection)

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บระยะเต็มวัย ด้วย 2 วิธีการ ดังนี้

- (1) เก็บรวบรวมจากด้านตรวจพืช

พนักงานเจ้าหน้าที่ของด้านตรวจพืช เช่น ด้านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด้านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง เป็นต้น ทำการสุ่มตรวmlinค้าธัญพืชนำเข้าจากต่างประเทศ ระหว่างปี 2559 - 2561 โดยหากสุ่มตรวจพบแมลงศัตรูโรงเก็บระยะเต็มวัย ทั้งที่มีสภาพสมบูรณ์ และสภาพไม่สมบูรณ์ ในสินค้าธัญพืชนำเข้าใดให้นำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้มาแช่ในหลอดทดลองที่มีเอทานอลเข้มข้น 95% แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 20 C บันทึกข้อมูลผู้เก็บตัวอย่าง ชื่อที่อยู่ผู้ส่งออกและผู้นำเข้า ชนิดของสินค้าธัญพืช จำนวนและปริมาณของสินค้าธัญพืช ประเทศผู้ส่งออก วันที่นำเข้า เป็นต้น

- (2) เก็บรวบรวมจากโรงสีข้าว หรือโรงเก็บผลิตผลเกษตร

เก็บรวบรวมแมลงศัตรูโรงเก็บระยะเต็มวัยจากโรงสีข้าว ทั้งที่มีสภาพสมบูรณ์ และมีสภาพไม่สมบูรณ์ ระหว่างการตรวจประเมินเพื่อขึ้นทะเบียนผู้ผลิตและแปรรูปข้าวส่งออกไปสาธารณรัฐประชาชนจีน หรือจากโรงเก็บผลิตผลเกษตร โดยนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้มาแช่ในหลอดทดลองที่มีเอทานอลเข้มข้น 95% แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 20 C บันทึกข้อมูลผู้เก็บตัวอย่าง วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง ชื่อและที่อยู่ของโรงปรับปรุงคุณภาพข้าวหรือโรงสีข้าว

- 2) การตรวจจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological identification)

หากตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บอยู่ในระยะตัวเต็มวัย และมีสภาพสมบูรณ์ให้นำมาตรวจจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ก่อนการจำแนกด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ตามเอกสารแนวทางการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บ ภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) บันทึกภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อใช้ยืนยันผลการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด แต่หากตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บมีสภาพไม่สมบูรณ์ให้ข้ามไปดำเนินการในข้อ 3

- 3) การสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR (DNA extraction and PCR amplification)

การสกัดดีเอ็นเอ

(1) เตรียมความพร้อมของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ โดยนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บออกจากตู้เย็น และวางไว้บนกระดาษซับเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เอทานอลเข้มข้น 95% ระเหยจนหมด และตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บแห้งสนิท เหมาะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ เมื่อแห้งแล้วให้นำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL และเขียนหมายเลขกำกับ นำปิเปตทิปขนาด 1,000 μ L ที่ผ่านการนึ่งความดันสูงเพื่อฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้ว มาลนด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ เพื่อปิดปลายรูด้านที่ใช้ดูดสารเคมี ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น 10 นาที

(2) เตรียมชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ QIAamp DNA Mini Kit (GIA GEN, Germany) โดยเติมเอทานอลเข้มข้น 95% ลงในสารละลายต่างๆ ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด

(3) เติมนิโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 C) ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บในปริมาตรประมาณ 3/4 ของหลอดทดลอง จากนั้น เมื่อปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 1/4 ของหลอดทดลอง ให้ใช้ปิเปตทิปที่เตรียมไว้ บดตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บให้ละเอียดด้วยความระมัดระวัง ระวังมิให้ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บกระเด็นออกมานอกหลอดทดลอง

(4) เตรียมการสลายผนังเซลล์ (pre - lysis) โดยการเติม Buffer ATL ปริมาณ 180 μ L และเติม proteinase K solution ปริมาณ 20 μ L ปิดปากหลอดทดลองให้สนิท พันด้วยพาราฟิน (paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน แล้วสั่นสะเทือนเพื่อผสมสารกับตัวอย่างแมลงให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้น นำหลอดทดลองใส่ในฟูลอย แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 56 C เป็นเวลา ๓ ชั่วโมง โดยระหว่างการบ่ม ให้พลิกหลอดทดลองกลับไปมา 3 – 4 ครั้ง ทุก 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่างแมลงศัตรูพืช ย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อขจัดหยดน้ำที่ติดบนฝาภายในหลอดทดลอง

(5) ย่อยตัวอย่าง (lyse samples) โดยการเติม Buffer AL ปริมาณ 200 μ L ลงในหลอดทดลอง จากนั้น สั่นสะเทือนเพื่อผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อขจัดหยดน้ำที่ติดบนฝาภายในหลอดทดลอง

(6) เตรียมพร้อมในการจับสารพันธุกรรม (adjust DNA binding conditions) โดยการเติมเอทานอลเข้มข้น 100% ปริมาณ 200 μ L จากนั้น สั่นสะเทือนเพื่อผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 15 วินาที

(7) การจับดีเอ็นเอ (Bind DNA) โดยการดูดสารละลายทั้งหมดจากหลอดทดลองข้างต้น มาใส่ใน QIAamp Mini spin column ที่บรรจุหลอด collection tube ขนาด 2 mL ปิดฝาแล้ว ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งหลอด collection tube ที่ภายในมีสารละลาย แล้วเปลี่ยนหลอด collection tube ขนาด 2 mL ลงไปแทน

(8) การล้างตะกอน (wash silica membrane) โดยการเติม Washing Buffer AW1 ปริมาณ 500 μ L ปิดฝาแล้ว ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งหลอด collection tube ที่ภายในมีของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน แล้วเปลี่ยนหลอด collection tube ขนาด 2 mL ขึ้นใหม่ลงไปแทน จากนั้น เติม Washing Buffer AW1 ปริมาณ 500 μ L ปิดฝาแล้ว ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งหลอด collection tube ที่ภายในมีของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน จากนั้น นำ Mini spin column ใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL ขึ้นใหม่

(9) การละลายดีเอ็นเอ (Elute DNA) โดยการเติม Elution Buffer AE ปริมาณ 50 μ L และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีแล้วปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ดูดสารละลายที่อยู่ในหลอดทดลองมาใส่ใน Mini spin column อีกครั้ง บ่มไว้ 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที ทิ้ง Mini spin column จากนั้น นำหลอดทดลองที่อยู่ในบรรจุ genomic DNA ปริมาณ 50 μ L เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 C เพื่อรอการตรวจสอบคุณภาพ

(10) ตรวจสอบคุณภาพของ genomic DNA ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose จำนวน 150 กรัม ผสมกับสารละลาย 1 x TBE (Tris – Borate, EDTA) ปริมาณ 100 ml แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องอบไมโครเวฟประมาณ 5 นาที จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนใช้มือสัมผัสแล้วไม่ถูกความร้อนลวก จากนั้น เติมสารย้อมสี fluorescent GelRed ลงไปใน 1.5% agarose gel ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงไปในถาด รอให้เย็นลงจนแข็งตัวเป็นก้อน แล้วย้ายถาด 1.5% agarose gel ลงไปในเครื่อง electrophoresis ที่มีสารละลาย 1 x TBE

เตรียม genomic DNA ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ ปริมาณ 5 μ L ผสมกับ 6 x loading dye (Promega) และนำ PCR marker (G316A, Promega) ปริมาณ 5 μ L ผสมกับ 6 x loading dye จากนั้น นำ PCR products และ PCR marker ที่ผสมแล้ว หยดลงไปใน agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5% และให้ PCR products และ PCR marker เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย 1 x TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า

ปริมาณ 100 โวลต์ 400 mp (voltage) เป็นเวลา 40 นาที จากนั้น นำ 1.5% agarose gel ไปตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านวิเคราะห์ gel เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR

(1) สั้เคราะห์ *COI* universal primers (Folmer และคณะ, 1994) โดยบริษัท Sigma – Aldrich จำกัด ดังนี้

Primer name	Sequence	Length (bp)
LCO 1490	5' – GGTCACAAATCATAAAGATATTGG – 3'	25
HCO 2198	5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA – 3'	26

(2) เตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (μL)
1. 2X PCR Marter Mix (Promega)	12.5
2. LCO 1490 (10 μM)	0.5
3. HCO 2198 (10 μM)	0.5
4. DNA template	1.5
5. ddH ₂ O	10
Total volume	25

(3) เพิ่มปริมาณยีน *COI* ด้วยเทคนิค PCR โดยมี Thermo cycling condition คือ

pre – denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที	} จำนวน 35 cycles
denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที	
annealing ที่อุณหภูมิ 52 °C เป็นเวลา 1 นาที	
extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที	
final – extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที	

(4) ตรวจสอบคุณภาพของ PCR products ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose จำนวน 150 กรัม ผสมกับสารละลาย 1 x TBE (Tris – Borate, EDTA) ปริมาณ 100 ml แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องอบไมโครเวฟประมาณ 5 นาที จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนใช้มือสัมผัสแล้วไม่ถูกความร้อนลวก จากนั้น เติมสารย้อมสี fluorescent GelRed

ลงไปใน 1.5% agarose gel ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงไปในถาด รอให้เย็นลงจนแข็งตัวเป็นก้อน แล้วย้าย ถาด 1.5% agarose gel ลงไปในเครื่อง electrophoresis ที่มีสารละลาย 1 x TBE

เตรียม PCR product ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ ปริมาณ 5 μ L ผสมกับ 6 x loading dye (Promega) และนำ PCR marker (G316A, Promega) ปริมาณ 5 μ L ผสมกับ 6 x loading dye จากนั้น นำ PCR products และ PCR marker ที่ผสมแล้ว หยดลงไปใน agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5% และให้ PCR products และ PCR marker เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย 1 x TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า ปริมาณ 100 โวลต์ 400 mp (voltage) เป็นเวลา 40 นาที

จากนั้น นำ 1.5% agarose gel ไปตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านวิเคราะห์ gel เพื่อตรวจสอบคุณภาพ ของ PCR products ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ

4) การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing)

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (bidirectional sequencing) ของ PCR products ของตัวอย่าง แมลงศัตรูโรงเก็บ โดยทำ PCR products ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purification kit จากนั้น ใช้เครื่องอ่าน ลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA sequencer) ของ Solgen Analysis Service ประเทศ เกาหลีใต้ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บแล้ว ใช้โปรแกรม DNAMAN V.7.0 ในการตัดต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บให้เป็นเส้นเดียวกัน โดยนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทางที่ได้ และลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของยีน *COI* จากฐานข้อมูล GenBank มาใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบกัน เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเกินทิ้งไป ทำให้ได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์เส้นเดียวที่มีความยาว 658 bp ของแต่ละตัวอย่าง

5) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing analysis)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้ มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอ ไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อตรวจค่า sequences similarity (%) หรือความคล้ายคลึงกัน เพื่อจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของแมลงศัตรูโรงเก็บชนิดที่เกี่ยวข้อง และตั๊กแตนไฟ (*Ceracris kiansu*) จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้น ใช้โปรแกรม Clustal X ในการเรียงเรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้ และนิวคลีโอไทด์มาตรฐานทั้งหมด ให้อยู่ในไฟล์เดียวกัน และบันทึกข้อมูลในรูปแบบ FASTA เพื่อใช้วิเคราะห์ข้อมูลในขั้นตอนต่อไป

ใช้โปรแกรม MEGA V. 5.0 ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ การ สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยวิธี Maximum Likelyhood (ML

tree) ด้วยแบบจำลอง Kimura – 2 – Parameter (K2P) (Nei และ Kumar, 2000) ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการทดลองนี้ใช้ ตั๊กแตนไม้ (*Ceracris kiangsu*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) เพื่อยืนยันผลการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ด และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างแมลงศัตรูโรงเก็บแต่ละชนิดในการทดลอง

6) การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ สรุปลำดับของแมลงศัตรูโรงเก็บแต่ละชนิดที่ได้ และนำมาเปรียบเทียบกับผลการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อยืนยันผลการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทั้ง 2 อย่าง (เฉพาะตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่มีสภาพสมบูรณ์) ทั้งนี้หากพบว่า แมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ให้ทำการแจ้งเตือนปัญหาการไม่ปฏิบัติตามข้อกำหนดในการนำเข้า ไปยังองค์การอารักขาพืชของประเทศผู้ส่งออก เพื่อให้เพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบกักกันสินค้าธัญพืชก่อนการส่งออกมายังประเทศไทย

ใช้โปรแกรม DNAMAN V.7.0 แปลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้จากการทดลอง เป็นลำดับโปรตีนที่ไม่มี termination coding จากนั้น นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับโปรตีนที่มีคุณภาพดีของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่เป็นตัวแทน ป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BankIt บันทึกข้อมูล GenBank Accession Numbers

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง ดำเนินการทดลองระหว่าง เดือน ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง

- 1) ด้านตรวจพืช ของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (สคว.) เช่น ด้านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ
ด้านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง เป็นต้น
- 2) โรงสีข้าว หรือ โรงเก็บผลิตผลการเกษตร
- 3) ห้องปฏิบัติการของกลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สคว.
- 4) ห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (สอพ.)
- 5) ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานอนุกรมวิธาน กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สอพ.

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต จากโรงสีข้าว จำนวน 3 แห่งในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดชลบุรี และจังหวัดสุพรรณบุรี รวมถึงการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่มีชีวิตจากสินค้าธัญพืชนำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 2 ครั้ง ณ ด้านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ระหว่างเดือนสิงหาคม 2559 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2560 แล้วนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่มีสภาพสมบูรณ์ มาจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตามเอกสารแนวทางการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บแล้ว พบว่าได้ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 4 ชนิด คือ มอดแป้ง (*T. castaneum*) จำนวน 35 ตัว มอดฟันเลื่อย (*Oryzaephilus surinamensis*) จำนวน 20 ตัว ตัวงวงข้าวโพด (*Sitophilus oryzae*) จำนวน 30 ตัว ตัวงั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) จำนวน 15 ตัว รวม 100 ตัว และพบว่าไม่สามารถจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จำนวน 3 ตัว รวมทั้งสิ้น 103 ตัว (ตารางที่ 1) (ภาพที่ 2 – 4) โดยแมลงศัตรูโรงเก็บแต่ละชนิดในการทดลองมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

- 1) มอดแป้ง: *Tribolium castanum* ชื่อสามัญ: red flour beetle
วงศ์: Tenebrionidae อันดับ: Coleoptera
ลักษณะที่สำคัญ: ตัวเต็มวัยมีสีน้ำตาลปนแดง ลำตัวแบนยาว มีความยาวประมาณ 2.3 – 4.4 มิลลิเมตร ปลายหนวดเป็นรูปกระบอก มีลักษณะเป็นปล้อง โดย 3 ปล้องสุดท้ายเป็นตุ่มใหญ่เห็นได้ชัดเจน
พืชอาศัย: เมล็ดธัญพืช แป้ง รำข้าว เป็นต้น (อูร์ญากร และคณะ, 2540; พรทิพย์ และคณะ, 2548)
- 2) มอดฟันเลื่อย: *Oryzaephilus surinamensis* ชื่อสามัญ: Saw – toothed grain beetle

วงศ์: Silvanidae

อันดับ: Coleoptera

ลักษณะที่สำคัญ: ตัวเต็มวัยสีน้ำตาลเข้ม แบนยาว ขนาดลำตัวยาวประมาณ 2.5 – 3.0 มิลลิเมตร
ลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากแมลงชนิดอื่น คือ ขอบด้านข้างของส่วนอกจะมีลักษณะเป็นฟันเลื่อย
ข้างละ 6 ซี่

พืชอาศัย: เมล็ดธัญพืชทุกชนิด ข้าวสาร ถั่ว เป็นต้น

- 3) ตัวงวงข้าวโพด *Sitophilus zeamais* ชื่อสามัญ: maize weevil

วงศ์: Curculionidae

อันดับ: Coleoptera

ลักษณะที่สำคัญ: ตัวเต็มวัยมีสีน้ำตาลอ่อน ขนาดลำตัวยาวประมาณ 3.0 – 3.8 มิลลิเมตร ส่วนหัว
จะยื่นออกมาเป็นงวง (snout)

พืชอาศัย: เมล็ดธัญพืชทุกชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด เป็นต้น

- 4) ตัวงั่วเขียว *Callosobruchus maculatus* ชื่อสามัญ: Cowpea weevil

วงศ์: Bruchidae

อันดับ: Coleoptera

ลักษณะที่สำคัญ: ตัวเต็มวัยมีสีน้ำตาล ปีกสั้นไม่คลุมมิดลำตัว และมีแถบหรือจุดสีน้ำตาลเข้มบนปีก
ทั้งสองข้าง ปลายปีกมีสีดำ ลำตัวเรียวแคบไปทางส่วนหัว ทำให้หัวเล็ก และขุมเข้าหาส่วนอก หนวด
เป็นแบบ subserrate ขนาดลำตัวยาวประมาณ 3.0 – 4.5 มิลลิเมตร

พืชอาศัย: เมล็ดถั่วทุกชนิด ยกเว้นถั่วเหลือง (พรทิพย์ และคณะ, 2548; Rees, 2004)

ผลการนำตัวอย่างมอดแบ่งที่เก็บรวบรวมได้จากโรงสีข้าวของบริษัท พูนผลเทรดดิ้ง จำกัด จำนวน
10 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 1 - 10) จากโรงข้าวของ บริษัท เอช. เอช. แอล. อินเตอร์เทรด จำกัด จำนวน
10 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 11 - 20) ตัวอย่างมอดฟันเลื่อยที่เก็บรวบรวมได้จากโรงสีข้าวของบริษัท พูนสิน
ไทยโกลเด้นไรซ์ จำกัด จำนวน 1 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 21) ตัวอย่างตัวงวงข้าวโพด และตัวงั่วเขียว
ที่เก็บรวบรวมได้ ณ ด้านตรวจท่าเรือกรุงเทพ จำนวนชนิดละ 1 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 21 และ 22
ตามลำดับ) รวมถึงตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บไม่ทราบชนิดที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ที่เก็บรวบรวมได้จาก
โรงสีข้าวของบริษัท พูนผลเทรดดิ้ง จำกัด จำนวน 1 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 24) รวมทั้งหมด 24 ตัวอย่าง
มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ QIAamp DNA Mini Kit (GIAGEN, Germany) ตามวิธีการ
ที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด จากนั้น ตรวจสอบคุณภาพของ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง
24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis และตรวจภายใต้เครื่องวิเคราะห์ gel พบว่า genomic
DNA ทั้งหมดมีความเข้มข้น เพียงพอสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR (ภาพที่ 5)

เมื่อนำ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บข้างต้น จำนวน 24 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ ยีน *COI* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers คือ LCO – 1490 และ HCO – 2198 จากนั้น ตรวจสอบคุณภาพของ PCR products ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วตรวจภายใต้เครื่องวิเคราะห์ gel พบว่า PCR products ทั้งหมดมีความเข้มข้น มากกว่า 50 นาโนกรัม สามารถส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ (ภาพที่ 6)

การทดลองนี้ได้นำ PCR products ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บข้างต้น จำนวน 24 ตัวอย่าง มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purification kit จากนั้นตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA sequence) และใช้โปรแกรม DNAMAN v.7.0 ในการตัดต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตัดลำดับเบสของ primers ที่ไป นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทางที่ได้ และลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของยีน *COI* ของมอดแป็ง หมายเลข KM207082 ความยาว 658 bp จากฐานข้อมูล GenBank มาใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบกัน เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเกินทิ้งไป ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวที่มีความยาว 658 bp ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บแต่ละตัวอย่าง (ภาพที่ 8)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดแป็ง หมายเลข 1 ความยาว 658 bp

```
AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGTACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAGCAGAA
CTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCACGCATTCATCA
TAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCTTTAATACTAGGAGC
CCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCATCCCTTTCACTTCTTCTC
ATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATCCACCCCTCTCATCAAACATTGCA
CATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTAGCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCA
GTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGGAATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTT
GAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTTATCTCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCT
TACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGACCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCT
ATTC
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดพันเลื้อย หมายเลข 21 ความยาว 658 bp

```
AACTTTATACTTTCTTTTTGGAGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACATCCTTAAGAATCTTAATTCGAACAGAA
CTAGGAACAGCAGGTTCACTAATTGGAAATGATCAAATCTACAATACAATTGTAACCGCCCATGCATTTATTA
TAATTTTCTTTATAGTAATACCAGTAGTTATTGGAGGATTTGGAAACTGATTAATCCCTTTAATAATTGGGGC
TCCTGATATAGCATTCCCACGACTTAATAATATAAGATTCTGATTATTACCCCCCTCAATCTCCCTTCTCTTA
```

ATCAGAAGAATTGTAGAAAAGGGGACAGGAACAGGATGAACAGTATACCCCCCTCTCTCATCCAATTTAGCC
CACAACGGAACATCTGTTGACCTAGCAATCTTTAGATTACATTTAGCAGGAATTTCCCTCCATTTTAGGAGCAA
TTAACTTTATTTCTACAATTTTCAATATAAAAACCAAAAAAATAAATATAGATCAAATACCTTTATTCTGTTGA
GCTGTAATAATCACAGCCATTCTACTCCTTCTTTCCCTCCCAGTCTTAGCAGGAGCTATCACCATACTACTAA
CAGACCGAAATCTAAATACATCCTTCTTTGACCCCTCAGGAGGAGGAGACCCTATTTTATAACCAACACCTGTT
T

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างด้วงงวงข้าวโพด หมายเลข 22 ความยาว 658 bp

TACATTATACTTTATTTTTGGGGCCTGAGCTGGAATAGCAGGTACCTCACTAAGAATATTAATTCGAGCCGAA
TTAGGTAACCCAGGATCACTAATTGGAAATGATCAAATTTATAACGTAATCGTTACTGCACATGCTTTTCATTA
TAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGAGGATTCGGAAACTGACTTGTTCCCCTAATATTAGGAGC
CCCTGATATGGCTTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCTCCCTCATTAAATTCTCCTTTTA
ATAAGAAGACTAGTCGAAAGGGGGCAGGTAAGTGGTGAACAGTTTACCCACCATTGCCAGTAACATTGCC
CATAGAGGATCATCTGTTGACTTAGCCATTTTTAGGCTTCATTTAGCAGGAATCTCCTCTATTCTAGGAGCTG
TAAATTTTATTACTACTGTAATCAATATACGACCAAGAGGAATAAAAATAGACCAAATACCCCTATTCTCATG
GGCAGTTACAATCACAGCAATTTTACTCCTTCTTTCACTCCCAGTATTAGCCGGTGCTATTACCATATTATTA
ACAGACCGAAATTTAAACACTTCATTCTTTGACCCCGCAGGAGGAGGAGACCCCATTTCTCTATCAACACTTAT
TT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างด้วงถั่วเขียว หมายเลข 23 ความยาว 658 bp

AACATTATACTTTATTTTTGGAGCATGATCAGGAATAGTGGGAACCTCATTGAGTTTACTAATTCGGGCTGAA
TTAGGGAATCCTGGATCATTAAATTGGAAATGATCAAATTTACAATACTATTGTTACAGCTCACGCATTCATTA
TAATTTTCTTTATAGTGATACCTATTATAATTGGAGTTTTCGGAAACTGATTAGTCCCCTAATACTAGGAGC
CCCAGATATAGCATTCCCACGATTAACAATATAAGGTTCTGATTACTCCCTCCATCATTAAATTCTTTTATTA
ATAAGAAGATTCAATTGAAAAAGGTGCCGGAACAGGATGAACTGTTTATCCCCATTATCCTCAAATATTGCAC
ACGAAGGAGCCTCTGTTGATTTAGCAATTTTTAGTCTTCATATAGCAGGATTTTCATCTATTCTTGGAGCTAT
TAATTTTATTTCTACTACTTATAATATACGCCCCTCCGGTATATTATCAGATCGAATAACTTTATTTATTTGAG
CAGTTAGAATTACAGCCATTCTTCTTTTACTTAGATTACCTGTTTTAGCTGGAGCAATCACTATGCTTCTTAC
TGATCGTAATATCAATACCTCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGCGGAGACCCTATTCTCTATCAACACTTATTT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ ไม่สามารถระบุชนิดได้
หมายเลข 24 ความยาว 658 bp

```
AACACTTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAGCAGAA  
CTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCCACGCATTCATCA  
TAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCTTTAATACTAGGAGC  
CCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCCATCCCTTTCACTTCTTCTC  
ATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATCCACCCCTCTCATCAAACATTGCA  
CATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTAGCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCA  
GTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGGAATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTGTTTT  
GAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTTATCTCTTCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCT  
TACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGACCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCT  
ATTC
```

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้งหมด 24 ลำดับ มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast เพื่อตรวจค่า sequences similarity (%) หรือความคล้ายคลึงกัน พบว่า ผลการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 23 ตัวอย่างด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ให้ผลตรงกันกับผลการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา กล่าวคือตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บในการทดลองนี้มีจำนวน 4 ชนิด คือ มอดแป้งชนิด *T. castaneum* มอดฟันเลื่อย ตัวงวงข้าวโพด และตัวงั่วเขียว ส่วนผลการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จำนวน 1 ตัวอย่าง พบว่าเป็นมอดแป้งชนิด *T. castaneum* โดยค่า sequences similarity ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ กับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank อยู่ในระดับ 98.94% ขึ้นไป โดยเฉพาะตัวอย่างที่ 24 ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ มีค่า sequences similarity กับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของมอดแป้งถึง 99.85% (ตารางที่ ๒) (ภาพที่ ๘)

การทดลองนี้ได้เตรียมลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของมอดแป้งสกุล *Tribolium* จำนวน 6 ชนิด รวม 8 ลำดับ ของมอดฟันเลื่อย ตัวงวงข้าวโพด ตัวงั่วเขียว และตั๊กแตงไผ่ ชนิดละจำนวน 1 ลำดับ จากฐานข้อมูล GenBank ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน จำนวน 12 ลำดับ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทดลองนี้จำนวน 24 ลำดับ รวม 36 ลำดับ ความยาวแต่ละลำดับคือ 658 bp มาเรียบเรียงให้อยู่ในไฟล์เดียวกันโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X และบันทึกข้อมูลในรูปแบบ FASTA ทำให้ได้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างแมลงศัตรูโรงเก็บชนิดที่เกี่ยวข้อง (ตารางที่ 3) (ภาพที่ 9)

จากการใช้โปรแกรม MEGA V. 5.0 ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 24 ตัวอย่างในการทดลองนี้ พบว่าค่าเฉลี่ยของเบส A, T, G, และ C คือ 29.5% 31.0% 16.0% และ 23.5% ตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ยของ A+T คือ 60.50% มากกว่าค่าเฉลี่ยของ G+C คือ 39.5% อย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับลักษณะเด่นขององค์ประกอบของเบสใน mitochondria ของแมลง (ตารางที่ 4)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 24 ตัวอย่างในการทดลอง และจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 12 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 36 ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม MEGA V. 5.0 ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธี Maximum Likelihood พบว่า ML tree สามารถแบ่งออกเป็น 4 clade โดยมอดแป้ง มอดฟันเลื่อย ตัวงวงข้าวโพด และตัวงั่วเขียวอยู่ต่าง clade กันอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิดมีระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกันอย่างชัดเจน มอดแป้งสกุล *Tribolium* ทั้งหมดอยู่ใน clade ใหญ่เดียวกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* จำนวน 21 ลำดับที่ได้จากการทดลอง อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* จำนวน 2 ลำดับที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank และอยู่ต่าง clade ย่อยกับมอดแป้งสกุล *Tribolium* ชนิดอื่น ได้แก่ *T. confusum*, *T. destructor*, *T. madens*, *T. fremani* และ *T. brevicornis* อย่างเห็นได้ชัด โดย ML tree แสดงให้เห็นว่ามอดแป้งชนิด *T. castaneum* และ *T. freman* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Mestrovic และคณะ (2006) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของมอดฟันเลื่อย ตัวงวงข้าวโพด และตัวงั่วเขียวที่ได้จากการทดลองต่างก็อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ตามแต่ละชนิดเช่นกัน ดังนั้น การทดลองนี้จึงยืนยันได้ว่าการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บ โดยเฉพาะมอดแป้งสกุล *Tribolium* ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ใช้ยีน mtDNA COI เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย ให้ผลตรงกันกับการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ได้อย่างแม่นยำ สอดคล้องกับการรายงานของ Ming และคณะ (2015) (ภาพที่ 10)

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดแป้ง หมายเลข 1 – 5, 7 และ 13 จำนวน 7 ลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดฟันเลื่อยตัวงวงข้าวโพด และตัวงั่วเขียว จำนวนชนิดละ 1 ลำดับ รวมทั้งหมด 10 ลำดับ ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมด ใช้โปรแกรม DNAMAN V.7.0 ในการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับโปรตีน โดยเลือกลำดับโปรตีนของแต่ละตัวอย่างจาก frame ที่ไม่มี termination codon และนำข้อมูลที่เกี่ยวข้องป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BankIt เพื่อใช้เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยด้านพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) และการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (ตารางที่ 5) (ภาพที่ 11)

ตัวอย่างแสดงผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดแป้งชนิด *T. castaneum* เข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank

GenBank accession number: MK649848

LOCUS Seq1 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq1

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion *Tribolium castaneum* (red flour beetle)

ORGANISM *Tribolium castaneum*

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;
Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;
Tribolium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

/organism="Tribolium castaneum"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="TH1"

/db_xref="taxon:7070"

/country="Thailand-Surin"

/collection_date="2016-8-16"

/collected_by="B. Nopparat"

CDS <1..>658

/codon_start=2

/transl_table=5

/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"

/translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA

AFIMIFFMVMPIVIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNMNSFWLLPPSLSLLLMSSIV

ESGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM

TLERMPLFWAVVITAILLLSLPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILYQHL

F"

BASE COUNT 193 a 157 c 106 g 202 t

ORIGIN

1 aacactttat ttcattttcg gāgcatgāt c aggaatagta ggtacttcat taagactcct
61 aattcgagca gaactaggaa atcctggctc ctttaattgga gatgaccaa ttataatgt
121 tattgttact gccacgcat tcatcataat tttcttcata gtaataccea tcgtaattgg
181 aggattcgga aactgattag tcccttaat actaggagcc cctgatatag cattccacg
241 aataaacaac ataagattct gactactcc cccatccctt tcacttctc tcataagaag
301 aattgttgaa agaggagcag gaacagggtg aaccgtttat ccaccctct catcaaacat
361 tgcacatggc ggatcctctg ttgatcttgc cattttcaga ctacacttag caggaatctc
421 atcaattctg ggagcagtta atttcattac aacagtaatc aatatacgac cccaaggaat
481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgcaa ttttacttct
541 cttatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

9.1 สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ที่เป็นศัตรูพืชกักกันอย่างรวดเร็ว โดยการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้งที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตในระยะตัวเต็มวัย ทั้งที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ และไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์จากโรงสีข้าว จำนวน 3 แห่งในจังหวัดสุรินทร์ จังหวัดสุพรรณบุรี และจังหวัดชลบุรี ระหว่างการตรวจประเมิน (pre - audit) เพื่อขึ้นทะเบียนผู้ผลิตและแปรรูปข้าวส่งออกไปสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 58 ตัวอย่าง และเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บระยะตัวเต็มวัยที่ไม่มีชีวิตจากสินค้าธัญพืช คือ เมล็ดข้าวสาลีนำเข้าจากเครือรัฐออสเตรเลีย และเมล็ดถั่วเขียวนำเข้าจากสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมาร์ โดยเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ระหว่างปี 2559 -2560 จำนวน 45 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 103 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว พบว่าเป็นตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 4 ชนิด คือ มอดแป้ง จำนวน 45 ตัว มอดพื้นเลื้อย จำนวน 20 ตัว ตัวงวงข้าวโพด จำนวน 30 ตัว ตัวงวงถั่วเขียว จำนวน 15 ตัว และไม่สามารถระบุชนิดได้เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จำนวน 3 ตัว จากนั้น นำตัวอย่างของมอดแป้ง จำนวน 20 ตัว ตัวอย่างของมอดพื้นเลื้อย ตัวงวงข้าวโพด ตัวงวงถั่วเขียว และตัวอย่างที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ อย่างละ 1 ตัว รวมทั้งสิ้น 24 ตัว มาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ ยีน *COI* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ universal primers (LCO – 1490 และ HCO - 2198) ภายใต้อุณหภูมิ PCR volume และ thermal condition ที่กำหนด ทำให้ได้ PCR products ที่มีคุณภาพของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ สำหรับนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างให้เป็นเส้นเดียวกัน ความยาว 658 bp แล้วนำไปวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าค่า sequences similarity ที่ได้มีค่าสูงถึง 98.94% ขึ้นไป และให้ผลการจำแนกชนิดตรงกับผลการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ พบว่าเป็นตัวอย่างของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* โดยมีค่า sequences similarity สูงถึง 99.85%

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานจากฐานข้อมูล GenBank ของมอดแป้งชนิด *T. castaneum*, *T. confusum*, *T. destructor*, *T. madens*, *T. freemany* และ *T. brevicornis* มอดพื้นเลื้อย ตัวงวงข้าวโพด ตัวงวงถั่วเขียว และตุ๊กแตนไฟ (outgroup) รวม 12 ลำดับ มาวิเคราะห์

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยวิธี Maximum Likelihood (ML tree) ด้วยแบบจำลอง Kimura – 2 – Parameter (K2P) ร่วมกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บจำนวน 24 ลำดับ พบว่าแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิดมีระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกันอย่างชัดเจน มอดแป้งสกุล *Tribolium* ทั้งหมดอยู่ใน clade เดียวกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* จำนวน 21 ลำดับที่ได้จากการทดลอง อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* จำนวน 2 ลำดับที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank และอยู่ต่าง clade ย่อยกับมอดแป้งสกุล *Tribolium* ชนิดอื่นอย่างเห็นได้ชัด ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของมอดพื้นเลื้อยตัวงวงข้าวโพด และตัวงวงข้าวที่ได้จากการทดลองต่างก็อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ตามแต่ละชนิดเช่นกัน จึงยืนยันได้ว่าการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บ โดยเฉพาะมอดแป้งสกุล *Tribolium* ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ให้ผลตรงกันกับการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ได้อย่างแม่นยำ

ผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดแป้ง จำนวน 7 ลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดพื้นเลื้อยตัวงวงข้าวโพด และตัวงวงข้าว จำนวนชนิดละ 1 ลำดับ รวมทั้งหมด 10 ลำดับ ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง ป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank ทำให้ได้ GenBank Accession Number คือ MK649848 – MK649857 ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการวิจัยด้านพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) และการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในอนาคต นอกจากนี้ การทดลองนี้ได้พิสูจน์ยืนยันแล้วว่า ยีน *COI* สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับการรายงานของ Ming และคณะ (2015)

9.2 ข้อเสนอแนะ

การจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยในการจำแนกชนิดของสัตว์และพืช ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว แต่การใช้เทคนิคนี้ในพืชยังมีข้อจำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้จำแนกชนิดของสัตว์ โดยเทคนิคนี้สามารถใช้จำแนกชนิดได้ ไม่ว่าจะตัวอย่างสัตว์จะอยู่ในสภาพสมบูรณ์หรือไม่สมบูรณ์ และอยู่ในระยะเติบโตใด (วุฒิพงศ์, 2011) ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานที่นิยมนำมาใช้ในการเปรียบเทียบในปัจจุบัน คือ ยีน *COI* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับภายในชนิดต่ำ หรือแทบไม่มีการแปรผัน และมีการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดเพียงพอที่จะใช้ในการจำแนก สามารถเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ง่าย และส่วนของยีนที่นำมาวิเคราะห์

มีความยาวไม่มากนัก เพียง 658 bp มี universal primers ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า mtDNA *COI* ยีนเองก็มีข้อจำกัด ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาจำแนกชนิดที่เป็น complex (Jiang และคณะ, 2014) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* complex ดังนั้น เพื่อให้การจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อาจจำเป็นต้องมีการใช้ยีนตัวอื่นเพิ่มเติม เช่น 16s rDNA, ND6 และ ITS เป็นต้น ในอนาคต

9.3 ปัญหาและอุปสรรค

การทดลองนี้มีข้อจำกัดด้านตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บ โดยเฉพาะตัวอย่างของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ซึ่งมีจำนวนกว่า 36 ชนิด และมี 10 ชนิดที่เป็นแมลงศัตรูโรงเก็บที่สำคัญ โดยเฉพาะชนิด *T. castaneum* ซึ่งพบได้ทั่วไปในประเทศไทย และชนิด *T. confusum* ที่พบได้ในหลายประเทศทั่วโลก แต่ยังไม่มีการพบในประเทศไทย (CPC, 2019) ทำให้ชนิดของตัวอย่างมอดแป้งที่นำมาทดลองยังไม่เพียงพอ จึงต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของ มอดแป้งสกุล *Tribolium* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ดังนั้น การแก้ไขข้อจำกัดนี้จึงจำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือระหว่างประเทศ ในการรวบรวมชนิดของตัวอย่างมอดแป้งสกุล *Tribolium* ให้มีจำนวนมากที่สุด และหลากหลาย sampling sites มากที่สุด ซึ่งจะทำให้ข้อมูลมีความสมบูรณ์ครบถ้วนมากยิ่งขึ้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดมอดแป้งชนิดสำคัญที่ยังไม่มีรายงานการพบในประเทศไทย และมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันได้ในอนาคต โดยเฉพาะมอดแป้งชนิด *T. confusum* โดยเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล และถูกกำหนดไว้ใน ISPM No. 27 “Diagnostic Protocol for Regulated Pests” สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ไม่ว่าจะอยู่ในสภาพสมบูรณ์หรือไม่ก็ตาม ก้าวข้ามขีดจำกัดของการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่ตัวอย่างที่สุ่มตรวจพบต้องอยู่ในระยะตัวเต็มวัยและมีสภาพสมบูรณ์ เหมาะกับงานด้านการตรวจสอบกักกันพืชที่ต้องใช้ความรวดเร็วในการตรวจปล่อยสินค้า

นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้จากการทดลองได้ถูกนำเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นฐานข้อมูลในระดับสากล สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ระหว่างแมลงศัตรูโรงเก็บในแหล่งต่างๆ ทั่วโลก ทำการศึกษาแหล่งกำเนิด เส้นทางการแพร่กระจาย แนวโน้มทิศทางการแพร่กระจายในอนาคต เพื่อวางแผนในการเฝ้าระวัง (surveillance) การเข้ามาของศัตรูพืชต่างถิ่น (alien pest species) เพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบกักกันการนำเข้าส่งออกสินค้าธัญพืช

11. คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหารกรมวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (สอพ.) และสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (สคว.) ที่ได้ให้การสนับสนุนการดำเนินการทดลองนี้ ขอขอบคุณคุณพรพิมล อธิปัญญาคม ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช ดร. ณีฎฐิมา โฆษิตเจริญกุล คุณทิพวรรณ กัณหาญาติ และเจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิจัยโรคพืช คุณยุวรินทร์ บุญทบ กลุ่มงานอนุกรมวิธาน กลุ่มกีฏและสัตววิทยา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ในการดำเนินการทดลอง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร กลุ่มบริหารโครงการวิจัย และฝ่ายบริหารทั่วไป สคว. ที่ได้ให้การสนับสนุนการทดลองนี้ในด้านต่างๆ ทำให้การดำเนินการเป็นไปอย่างราบรื่น บรรลุผลสำเร็จตามเป้าหมายที่กำหนดไว้

12. เอกสารอ้างอิง

ณัฐพร อุทัยมงคล, วาสนา ฤทธิ์ไธสง, ชลิดา อุณหวุฒิ. 2553. การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากสหรัฐอเมริกา. *คลังผลงานวิจัยกรมวิชาการเกษตร: ผลงานวิจัยและพัฒนาปี 2553*. หน้า 1147 – 1174

พรทิพย์ วิสารทานนท์, กุสุมา นวลวัฒน์, บุชรา จันทร์แก้วมณี, และคณะ. 2548. แมลงที่พบในผลิตผลเกษตรและการป้องกันกำจัด. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, กรมวิชาการเกษตร, จตุจักร, กรุงเทพฯ, 158 หน้า

วุฒิพงศ์ มหาคำ. 2554. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 3(1): 1 – 30

อรุณญากร จันทร์แสง, มาลี บรรจบ, นิภา เบญจพงศ์ และคณะ. 2540. การศึกษาชนิดของแมลงที่เข้าทำลายพืชสมุนไพรในโรงเก็บ. *วารสารองค์การเภสัชกรรม*, 23(1): 1 - 9

Amgelini DR, Jockusch EL. 2008. Relationship among pest flour beetles of the genus *Tribolium* (Tenebrionidae) inferred from multiple molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(1): 127 – 141

Crop Protection Compendium. 2019. CABI International, Wallingford, UK. <https://www.cabi.org/cpc/>, accessed on February 4, 2019

FAO. 2006. ISPM No.27: diagnosis protocols for regulated pests. International Standards for Phytosanitary Measures 1 to 29 (2007 edition), Secretariat of the International Plant Protection Convention, Rome, pp. 341 – 352

Folmer O, Black M, Venhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294 - 299

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al.. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Science*, 270(1512): 313 – 321

Jiang F, Jin Q, Liang L, et al. 2014. Existence of species complex largely reduced barcoding success for invasive species of Tephritidae: a case study in *Bactrocera* spp.. *Molecular Ecology Resources*, 14: 1114 - 1128

Li CJ, Wang YQ, Liu X, et al.. 2011. Progress on study of functional genome of *Tribolium castaneum*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1544 - 1552

Liu LJ, Liu JQ, Wang QL, et al.. 2011. Identification of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) from Burendi, based on morphological characteristics and DNA barcode. *African Journal of Biotechnology*, 10(62): 13623 – 13630

Ming QL, Shen JF, Cheng C, et al.. 2015. Genetic Relationship between *Tribolium castaneum* and *T. confusum* based on mitochondrial DNA sequences. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(5): 1405 – 1412

General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the P.R. China. 2017. List of Import Plant Quarantine Pest of the P.R. China. http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk_13386/zvfg/gfxwj/dzwjy/201706/t20170614_490858.htm.

Accessed on July 30, 2017

Mestrovic N, Mravinac B, Plohl M, et al.. 2006. Preliminary phylogeny of *Tribolium* beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) resolved by combined analysis of mitochondrial genes. *European Journal of Entomology*, 103: 709 – 715

Nei M, Kumar S (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press

Nowaczyk K, Obrepalska-Stepelowska A, Gawlak M, et al.. 2009. Molecular techniques for detection of *Tribolium confusum* infestations in stored products. *Journal of Economic Entomology*, 102(4): 1691 -1695

Rees David. 2004. *Insects of Stored Products*. Csiro Publishing. Collingwood. Australia. 181 p.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolutions*, 4(4): 406-425

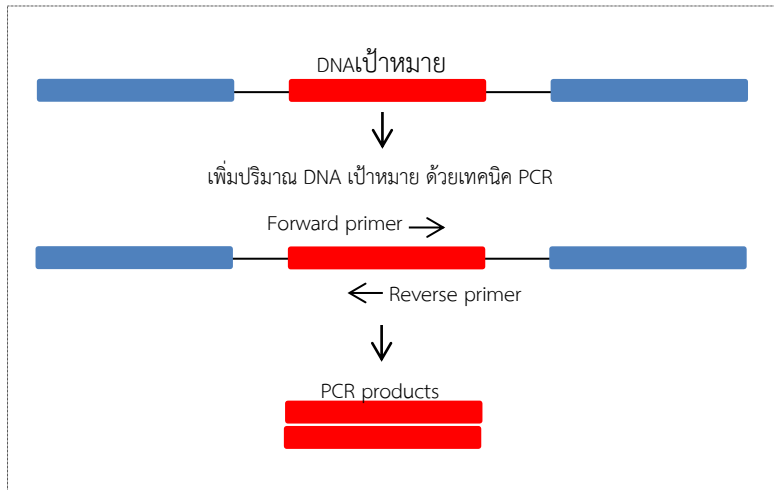
Wang YJ. 2015. *Molecular Techniques for identification of Stored Tribolium*. China Agricultural University

Zhang CW, Xu LP, Lu M, et al.. 2013. Rapid Molecular Identification of *Tribolium destructor*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*. 41(24): 9924 - 9926

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ



3. สกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค PCR



4. nucleotide sequencing : AGCTGGGTTT//AGCT

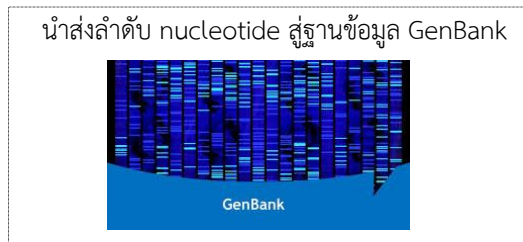


5. วิเคราะห์ลำดับ nucleotide



6. วิเคราะห์ผลการทดลอง

นำส่งลำดับ nucleotide สู่อินเทอร์เน็ต GenBank



ภาพที่ 1 ภาพแสดงวิธีการทดลอง (ดัดแปลงจาก วุฒิพงษ์ มหาคำ, 2011)



ภาพที่ 2 ก. การเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บจากโรงสีข้าว ข. การเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ ณ ด้านตรวจพืช

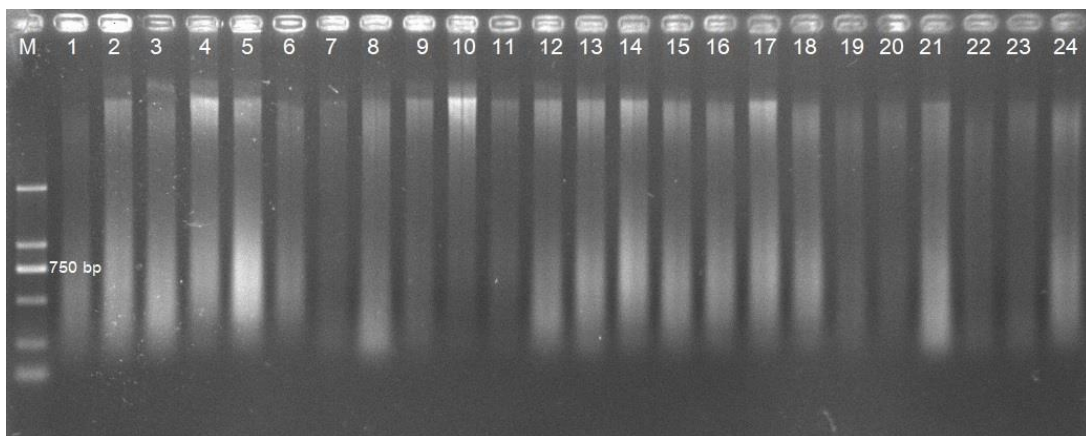


ภาพที่ 3 การจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

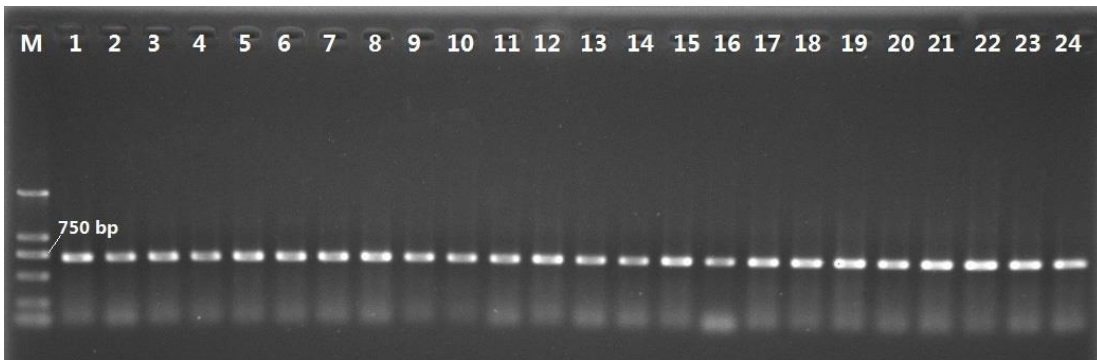


ภาพที่ 4 ภาพตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บ

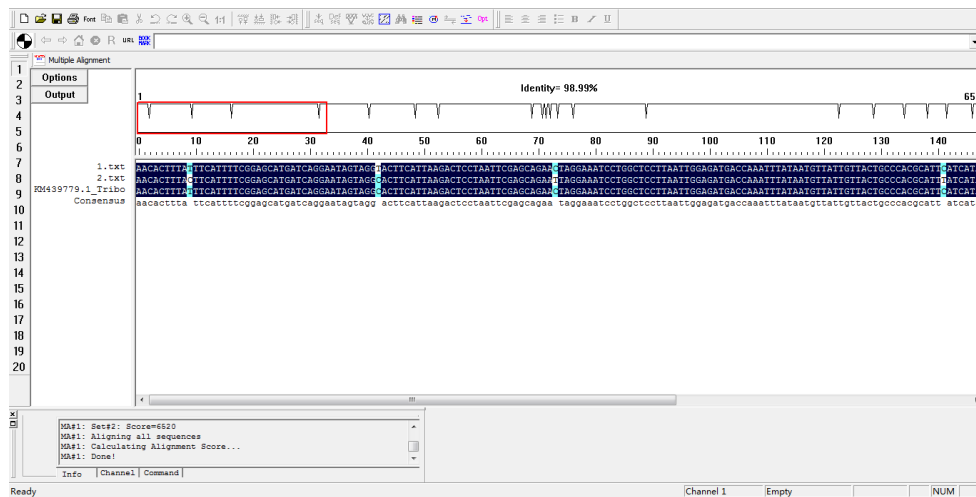
ก. มอดแป้ง ข. มอดพื้นเลื้อย ค. ตัวงวงข้าวโพด ง. ตัวงั่วเขียว



ภาพที่ 5 ผลวิเคราะห์คุณภาพของ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน ๒4 ตัวอย่าง
 M: Marker; 1 – 20: ตัวอย่างมอดแป้ง; 21: ตัวอย่างมอดพื้นเลื้อย; 22: ตัวอย่างตัวงวงข้าวโพด;
 23: ตัวอย่าง ตัวงั่วเขียว; 24: ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่ทราบชนิด



ภาพที่ 6 ผลวิเคราะห์คุณภาพของ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน ๒4 ตัวอย่าง
 M: Marker; 1 – 20: ตัวอย่างมอดแป้ง; 21: ตัวอย่างมอดพินเลื่อย; 22: ตัวอย่างด้วงวงงข้าวโพด;
 23: ตัวอย่าง ด้วงถั่วเขียว; 24: ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่ทราบชนิด



ภาพที่ 7 แสดงผลการตัดต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNAMAN V 7.0

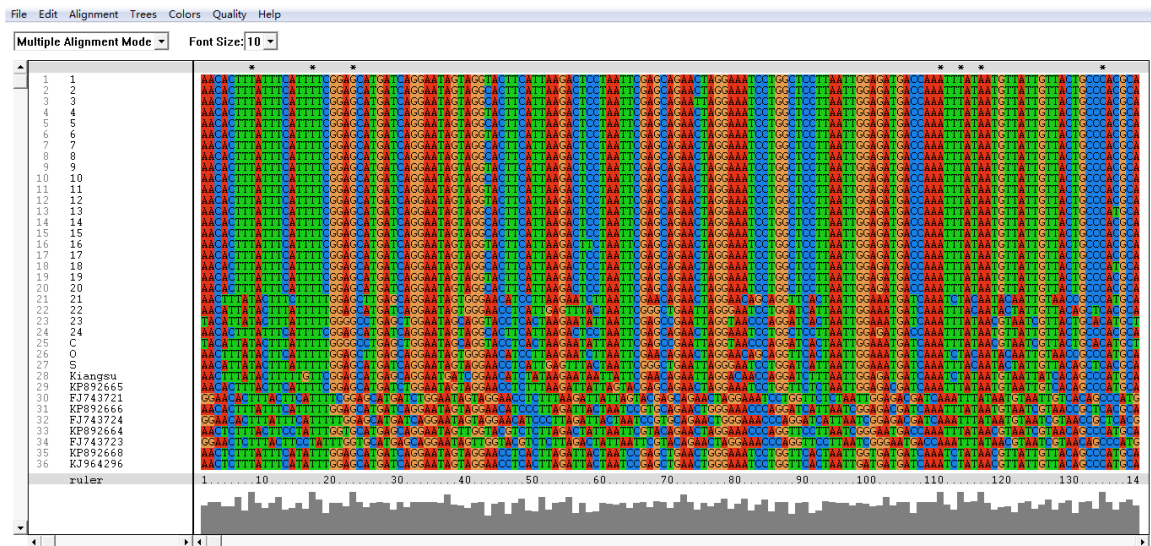
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

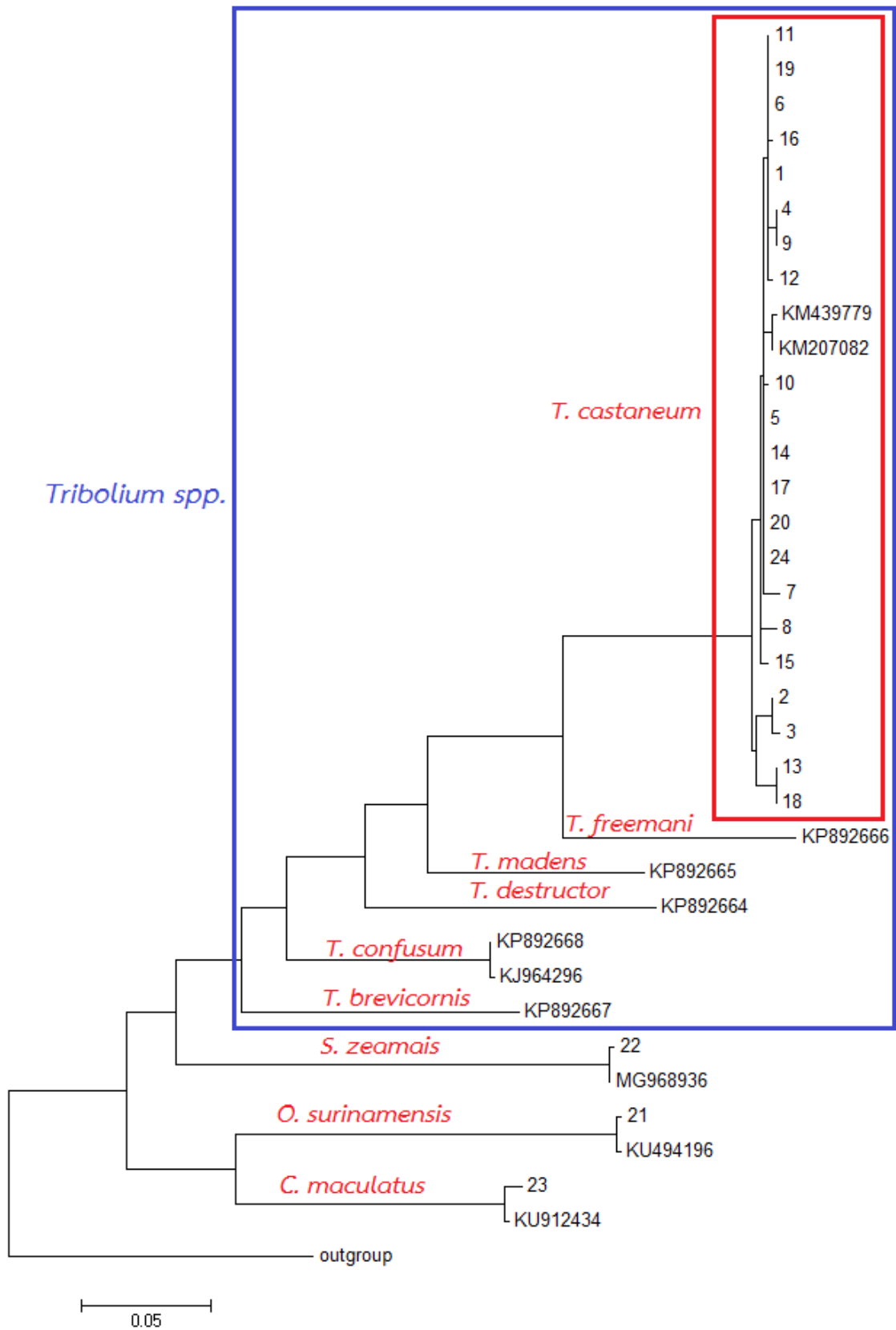
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Tribolium castaneum isolate Tca-CN-XC1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1216	1216	100%	0.0	100.00%	KP892686.1
Tribolium castaneum isolate Tca-CN-XJ1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1216	1216	100%	0.0	100.00%	KP892684.1
Tribolium castaneum isolate Tca-US-K1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1216	1216	100%	0.0	100.00%	KP892678.1
Tribolium castaneum cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1216	1216	100%	0.0	100.00%	KJ003352.1
Tribolium castaneum voucher CCOC11344_0103 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1212	1212	100%	0.0	99.85%	KU494280.1
Tribolium castaneum voucher ZFMK-TIS-2530844 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1210	1210	100%	0.0	99.85%	KU906846.1
Tribolium castaneum voucher CCOC08165_0101 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1210	1210	100%	0.0	99.85%	KU494273.1
Tribolium castaneum isolate Tca-CN-IN1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1205	1205	100%	0.0	99.70%	KP892689.1
Tribolium castaneum isolate Tca-CN-XC2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1205	1205	100%	0.0	99.70%	KP892687.1
Tribolium castaneum isolate Tca-CN-G22 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1205	1205	100%	0.0	99.70%	KP892683.1
Tribolium castaneum voucher CCOC11344_0104 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1201	1201	100%	0.0	99.54%	KU494281.1
Tribolium castaneum voucher FF0H00185_0101 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1199	1199	100%	0.0	99.54%	KU494271.1
Tribolium castaneum mitochondrion, complete genome	1199	1199	100%	0.0	99.54%	KM24466.1
Tribolium castaneum voucher SZYD13031871-A cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1199	1199	100%	0.0	99.54%	KM207082.1
Tribolium castaneum complete mitochondrial genome	1199	1199	100%	0.0	99.54%	AJ312413.2
Tribolium castaneum voucher ZFMK-TIS-14334 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1194	1194	100%	0.0	99.39%	KU913057.1
Tribolium castaneum voucher ZFMK-TIS-2505512 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1194	1194	100%	0.0	99.39%	KU907035.1
Tribolium castaneum isolate Tca-CN-XJ2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1194	1194	100%	0.0	99.39%	KP892685.1
Tribolium castaneum isolate Tca-CN-BH2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1194	1194	100%	0.0	99.39%	KP892685.1
Tribolium castaneum isolate Tca-FR-B1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1194	1194	100%	0.0	99.39%	KP892685.1

ภาพที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Blast ในฐานข้อมูล GenBank




File C:\Users\Administrator\Desktop\total samples.txt loaded.

ภาพที่ 9 แสดงผลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 36 ลำดับ โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X



ภาพที่ 10 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้างโดยโปรแกรม MEGA V. 5.0 ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML tree)

← → ↻ 🏠 🔒 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?form=final&sid=2204177&tool=genbank

 **My NCBI**
Welcome Nopparat Buahom (nopparat2784). [Sign Out](#)

GenBank Submissions

Submission # 2204177

Submission Completed

Thank you for using the GenBank Submissions Tool.

You have requested that your sequence data be released **immediately after processing**.

Your Submission ID is **2204177**. This is *not* an accession number. GenBank accession numbers will be assigned to your submissions and sent to you by email within two working days, unless there are issues with your submission that we must ask you to explain first. If you have any questions or corrections regarding your submissions before you receive these, be sure to refer this Submission ID in your email.


Your submission data have been sent to GenBank. For each complete sequence submission, you will receive the following at the email address you provided:

1. an automatic reply confirming our receipt of your submissions;
2. GenBank accession numbers (within two working days); and
3. the final GenBank records, processed by the GenBank Annotation staff and incorporating the information you have provided for you to review before they are released to the public database.

If you do not receive this information from us by email within the time frame indicated, please send an inquiry to gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov and be sure to include the Submission ID and the email address used in your submission.

[Start a New Submission](#)

[Contact](#) | [Copyright](#) | [Disclaimer](#) | [Privacy](#) | [Accessibility](#)
National Center for Biotechnology Information · US National Library of Medicine
8500 Rockville Pike · Bethesda, MD USA 20894



ภาพที่ 11 แสดงการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 1 แสดงสถานที่เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ

ลำดับ	สถานที่เก็บรวบรวมตัวอย่าง	ชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บ	จำนวนที่เก็บได้/ ที่นำมาทดลอง (ตัว)	ชื่อพืชอาศัย	ผู้เก็บตัวอย่าง/ วันที่เก็บตัวอย่าง
1	โรงสีข้าว บริษัท พูนผล เทรคดิง จำกัด ต.เนินยง อ.เมือง จ.สุรินทร์	มอดแป้ง (<i>T. castaneum</i>) ไม่ทราบชนิด*	20/10 3/1	ข้าว	18 ส.ค. 2559/ นพรัตน์ บัวหอม
2	โรงสีข้าว บริษัท พูนสินไทยโกลเด้นไรซ์ จำกัด ต.กระจัน อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	มอดฟันเลื่อย (<i>O. surinamensis</i>)	20/1	ข้าว	7 ธ.ค. 2559/ นพรัตน์ บัวหอม
3	ด่านตรวจพืชทำเรือกรุงเทพ สำนักควบคุมพืชและวัสดุ การเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตคลองเตย กรุงเทพฯ	ด้วงวงข้าวโพด** (<i>S. zeamais</i>)	30/1	ข้าวสาลี	30 ก.ย. 2559/ มนตรี ธารส
4	ด่านตรวจพืชทำเรือกรุงเทพ สำนักควบคุมพืชและวัสดุ การเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตคลองเตย กรุงเทพฯ	ด้วงถั่วเขียว*** (<i>C. maculatus</i>)	15/1	ถั่วเขียว	19 ม.ค. 2560/ มนตรี ธารส
5	โรงสีข้าว บริษัท เอช. เอช. แอล. อินเตอร์เทรค จำกัด ต. หนองเสือข้าง อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี	มอดแป้ง	15/10	ข้าว	24 พ.ย. 2560/ นพรัตน์ บัวหอม

*ตัวอย่างอยู่ในระยะตัวเต็มวัย แต่สภาพไม่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้

**พบด้วงวงข้าวโพดที่ไม่มีชีวิตในตัวอย่างของเมล็ดข้าวสาลี (Australian Hard Wheat) นำเข้าจากเครือรัฐออสเตรเลีย เมื่อวันที่ 30 กันยายน 2559

***พบด้วงถั่วเขียวที่ไม่มีชีวิตในตัวอย่างของเมล็ดถั่วเขียว นำเข้าจากสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมาร์ เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2560

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ลำดับของ ตัวอย่าง	ผลการจำแนกชนิดด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ผลการจำแนกชนิดด้วย เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด	ค่า sequences similarity (%)
1	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	100
2	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.09
3	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	98.94
4	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.70
5	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.85
6	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	100
7	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.39
8	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.39
9	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.70
10	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.70
11	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	100
12	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.85
13	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.78
14	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.85
15	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.70
16	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.85
17	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.85
18	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.78
19	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	100
20	<i>T. castaneum</i>	<i>T. castaneum</i>	99.85
21	<i>O. surinamensis</i>	<i>O. surinamensis</i>	99.70
22	<i>S. zeamais</i>	<i>S. zeamais</i>	100
23	<i>C. maculatus</i>	<i>C. maculatus</i>	99.24
24	ไม่สามารถระบุได้	<i>T. castaneum</i>	99.85

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน จำนวน 12 ลำดับ ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank

ชนิดของแมลงที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank	จำนวนลำดับ	GenBank Accession Numbers	
มอดแป้ง	<i>T. castaneum</i>	2	KM207082, KM439779
	<i>T. confusum</i>	2	KJ964296, KP892668
	<i>T. destructor</i>	1	KP892664
	<i>T. madens</i>	1	KP892665
	<i>T. freemani</i>	1	KP892666
	<i>T. brevicornis</i>	1	KP892667
มอดฟันเลื่อย	<i>O. surinamensis</i>	1	KU494196
ด้วงวงข้าวโพด	<i>S. zeamais</i>	1	MG968936
ด้วงถั่วเขียว	<i>C. maculatus</i>	1	KU912434
ตั๊กแตนไฟ	<i>Ceracris kiangsu</i>	1	KJ667509 (outgroup)

ตารางที่ 4 แสดงองค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บในการทดลอง

ลำดับของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ	ค่าเฉลี่ยของเบส (%)			
	T	C	A	G
1	30.7	23.9	29.3	16.1
2	30.7	23.9	29.2	16.3
3	30.7	23.9	29.2	16.3
4	30.4	24.0	29.5	16.1
5	30.5	24.0	29.3	16.1
6	30.7	23.9	29.3	16.1
7	30.7	24.0	29.3	16.0
8	30.7	23.6	29.6	16.1
9	30.4	24.0	29.5	16.1
10	30.5	24.0	29.2	16.3
11	30.7	23.9	29.3	16.1
12	30.7	23.9	29.2	16.3
13	30.9	23.7	29.2	16.3
14	30.5	24.0	29.3	16.1
15	30.4	24.2	29.6	15.8
16	30.9	23.7	29.3	16.1
17	30.5	24.0	29.3	16.1
18	30.9	23.7	29.2	16.3
19	30.7	23.9	29.3	16.1
20	30.5	24.0	29.3	16.1
21	31.2	21.9	32.8	14.1
22	36.5	18.8	29.3	15.3

23	32.2	21.0	30.7	16.1
24	30.5	24.0	29.3	16.1
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด	31.0	23.5	29.5	16.0

ตารางที่ 5 แสดงผลการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	หมายเลขของตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	GenBank Accession Numbers
1	1	<i>T. castaneum</i>	MK649848
2	2	<i>T. castaneum</i>	MK649849
3	3	<i>T. castaneum</i>	MK649850
4	4	<i>T. castaneum</i>	MK649851
5	5	<i>T. castaneum</i>	MK649852
6	7	<i>T. castaneum</i>	MK649853
7	13	<i>T. castaneum</i>	MK649854
8	21	<i>O. surinamensis</i>	MK649855
9	22	<i>S. zeamais</i>	MK649856
10	23	<i>C. maculatus</i>	MK649857

13. ภาคผนวก

13.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 24 ตัวอย่าง

>Seq1 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTA CTTCATTAAG ACTCCTAATTCG
AGCAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCC
ACGCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTC
CCTTTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCACGAATAAACAACATAAGATTCTGACTACTTCC
CCCATCCCTTTCACCTTCTTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTT
ATCCACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACAC
TTAGCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCA
AGGAATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTT
ATCTCTTCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTT
TGACCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq2 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCCAC
GCATTTATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGGGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCACGAATAAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACCTTCTTCATAAGAAGAATTGTTAAAAGAGGAGCGGGGACAGGATGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTTAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq3 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAATTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGGGGATTCGGAAACTGATTAGTCCC

TTTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
CATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTAAAAGAGGAGCGGGGACAGGATGAACCGTTTAT
CCACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTTAGACTACACTT
AGCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAG
GAATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTGTTTTGAGCAGTAGTAATTAAGTCAATTTACTTCTCTTAT
CTCTTCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTG
ACCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq4 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCC
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
CATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTAT
CCACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTT
AGCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATA TACGACCCCA
AGGAATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTGTTTTGAGCAGTAGTAATTAAGTCAATTTACTTCTCTT
ATCTCTTCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTT
TGACCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTACACCAGCACCTATTC

>Seq5 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACCTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGA ATACCCCTAT TCGTTTTGAGCAGTAGTAATTAAGTCAATTTACTTCTCTT
ATCTCTTCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTT
TGACCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq6 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTA CTTT CATT AAGACTCCTAATTCGAG
CAGA ACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq7 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTT CATT AAGACTCCTAATTCGAG
CAGA ACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGAGGGGCTGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq8 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTT CATT AAGACTCCTAATTCGAG
CAGA ACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTACCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGATGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA

GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCACTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATGCTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGTGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq9 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTACACCAGCACCTATTC

>Seq10 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCGTCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq11 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC

GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq12 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGGGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq13 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAT
GCATTTATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGGGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCACGAATAAACACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGGGCAGGAACAGGATGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC

TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGAGGGGGTGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq14 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq15 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGATGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
CCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGAGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq16 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTACTTCATTAAGACTTCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCC

ATCCCTTTCACCTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq17 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACCTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq18 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTTATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGGGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACCTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGGGCAGGAACAGGATGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGAGGGGGTGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq19 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq20 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACCTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>Seq21 *Oryzaephilus surinamensis*

AACTTTATACTTTCTTTTTGGAGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACATCCTTAAGAATCTTAATTCGAA
CAGAACTAGGAACAGCAGGTTCACTAATTGGAAATGATCAAATCTACAATACAATTGTAACCGCCCAT
GCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATAACCAGTAGTTATTGGAGGATTTGGAAACTGATTAATCCCT
TTAATAATTGGGGCTCCTGATATAGCATTCCCACGACTTAATAATATAAGATTCTGATTATTACCCCC
TCAATCTCCCTTCTCTTAATCAGAAGAATTGTAGAAAAGGGGACAGGAACAGGATGAACAGTATACCC
CCCTCTCTCATCCAATTTAGCCCAACGGAACATCTGTTGACCTAGCAATCTTTAGATTACATTTAG
CAGGAATTTCCCTCCATTTTAGGAGCAATTAACCTTTATTTCTACAATTTTCAATATAAAACCAAAAAAA

TAAATATAGATCAAATACCTTTATTCTGTTGAGCTGTAATAATCACAGCCATTCTACTCCTTCTTTCCC
TCCCAGTCTTAGCAGGAGCTATCACCATACTACTAACAGACCGAAATCTAAATACATCCTTCTTTGAC
CCCTCAGGAGGAGGAGACCCTATTTTATACCAACACCTGTTT

>Seq22 *Sitophilus zaemais*

AACATTATACTTTATTTTTGGAGCATGATCAGGAATAGTGGGAACCTCATTGAGTTTACTAATTCGGG
CTGAATTAGGGAATCCTGGATCATTAAATTGGAAATGATCAAATTTACAATACTATTGTTACAGCTCAC
GCATTCATTATAATTTTCTTTATAGTGATACCTATTATAATTGGAGGTTTCGGAAACTGATTAGTCCCA
CTAATACTAGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCACGATTAACAATATAAGGTTCTGATTACTCCCTCC
ATCATTAAATTCCTTTATTAATAAGAAGATTCATTGAAAAAGGTGCCGGAACAGGATGAACTGTTTATC
CCCCATTATCCTCAAATATTGCACACGAAGGAGCCTCTGTTGATTTAGCAATTTTTAGTCTTCATATAG
CAGGTATTTTCATCTATTCTTGGAGCTATTAATTTTATTCTACTACTTATAATATACGCCCTCCGGTA
TATTATCAGATCGAATAACTTTATTTATTTGAGCAGTTAGAATTACAGCCATTCTTCTTTTACTTAGAT
TACCTGTTTTAGCTGGAGCAATCACTATGCTTCTTACTGATCGTAATATCAATACCTCTTTTTTTGATC
CTGCTGGAGGCGGAGACCCTATTCTCTATCAACACTTATTT

>Seq23 *Callosobruchus maculatus*

TACATTATACTTTATTTTTGGGGCCTGAGCTGGAATAGCAGGTACCTCACTAAGAATATTAATTCGAG
CCGAATTAGGTAACCCAGGATCACTAATTGGAAATGATCAAATTTATAACGTAATCGTTACTGCACAT
GCTTTCATTATAATTTTTTTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGAGGATTCGGAAACTGACTTGTCC
CTAATATTAGGAGCCCCTGATATGGCTTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCTCC
CTCATTAAATTCCTTTTAATAAGAAGACTAGTCGAAAGGGGGCAGTACTGGGTGAACAGTTTACC
CACCATTTGCCAGTAACATTGCCCATAGAGGATCATCTGTTGACTTAGCCATTTTTAGGCTTCATTTA
GCAGGAATCTCCTCTATTCTAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATCAATATACGACCAAGAGG
AATAAAAATAGACCAAATACCCCTATTCTCATGGGCAGTTACAATCACAGCAATTTTACTCCTTCTTTC
ACTCCCAGTATTAGCCGGTGCTATTACCATATTATTAACAGACCGAAATTTAAACACTTCATTCTTTGA
CCCCGCAGGAGGAGGAGACCCATTCTCTATCAACACTTATTT

>Seq24 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCAATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACCTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC

GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>KU912434 *Callosobruchus maculatus*

TACATTATACTTTATTTTTGGGGCCTGAGCTGGAATAGCAGGTACCTCACTAAGAATATTAATTCGAG
CCGAATTAGGTAACCCAGGATCACTAATTGGAAATGATCAAATTTATAACGTAATCGTTACTGCACAT
GCTTTCATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGGGGATTCGGAACTGACTTGTCCC
CTAATATTAGGAGCCCCTGATATGGCTTTCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCTCCC
TCATTAATTCTCCTTTTAATAAGAAGACTAGTTGAAAGGGGGCAGGTACTGGGTGAACAGTTTACCC
CCCATTAGCCAGTAACATTGCCCATAGAGGATCATCTGTTGACTTAGCCATTTTLAGGCTTCATTTAG
CAGGAATCTCCTCTATTCTAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATCAATATACGACCAAGAGGA
ATAAAAATAGACCAAATACCTCTATTCTCATGGGCAGTTACAATCACAGCAATTTTACTCCTTCTTTCA
CTCCCAGTATTAGCCGGTGCTATTACCATATTATTAACAGACCGAAATTTAAACACTTCATTCTTTGAC
CCCGCAGGAGGAGGAGACCCCATCTCTATCAACACTTATTT

>KU494196 *Oryzaephilus surinamensis*

AACTTTATACTTCATTTTTGGAGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACATCCTTAAGAATCTTAATTCGAA
CAGAACTAGGAACAGCAGGTTCACTAATTGGAAATGATCAAATCTACAATACAATTGTAACCGCCCAT
GCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAGTAGTTATTGGAGATTTGGAACTGATTAATCCCT
TTAATAATTGGGGCTCCTGATATAGCATTCCCACGACTTAATAATATAAGATTCTGATTATTACCCCC
TCAATCTCCCTTCTTAAATCAGAAGAATTGTAGAAAAGGGGACAGGAACAGGATGAACAGTATACCC
CCCTCTCTCATCCAATTTAGCCACAACGGAACATCTGTTGACCTAGCAATCTTTAGATTACATTTAG
CAGGAATTTCTCCATTTTAGGAGCAATTAACTTTATTTCTACAATTTTCAATATAAAACCAAAAAAAA
TAAATATAGATCAAATACCTTTATTCTGTTGAGCTGTAATAATCACAGCCATTCTACTCCTTCTTTCCC

TCCCAGTCTTAGCAGGAGCTATCACCATACTACTAACAGACCGAAATCTAAATACATCCTTCTTTGAC
CCCTCAGGAGGAGGAGACCCTATTTTATACCAACACCTGTTT

>MG968936 *Sitophilus zeamais*

AACATTATACTTTATTTTTGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGAACCTCATTGAGTTTACTAATTCGGG
CTGAATTAGGGAATCCTGGATCATTAAATTGGAAATGATCAAATTTACAATACTATTGTTACAGCTCAC
GCATTCATTATAATTTTCTTTATAGTGATACCTATTATAATTGGAGGTTTCGGAAACTGATTAGTCCCA
CTAATACTAGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCACGATTAACAATATAAGGTTCTGATTACTCCCTCC
ATCATTAAATCTTTTATTAATAAGAAGATTCATTGAAAAAGGTGCCGGAACAGGATGAACTGTTTATC
CCCCATTATCCTCAAATATTGCACACGAAGGAGCCTCTGTTGATTTAGCAATTTTTAGTCTTCATATAG
CAGGTATTTTCATCTATTCTTGGAGCTATTAATTTTATTTCTACTACTTATAATATACGCCCTCCGGTA
TATTATCAGATCGAATAACTTTATTTATTTGAGCAGTTAGAATTACAGCCATTCTTCTTTTACTTAGAT
TACCTGTTTTAGCTGGAGCAATCACTATGCTTCTTACTGATCGTAATATCAATACCTCTTTTTTTGATC
CTGCTGGAGGCGGAGACCCTATTCTCTATCAACACTTATTT

>outgroup *Ceracris Kiangsu*

AACTTTATACTTTTTGTTCGGAGCATGAGCAGGAATGATCGGAACATCTATAAGAATAATTATTCGAA
CAGAATTAGGACAACCAGGATCTTTAATTGGAGATGATCAAATCTATAATGTAATTATCACAGCCCAT
GCATTCGTAATAATTTTCTTTATAGTAATAACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAACTGACTTGTACCA
CTAATAATTGGGGCTCCTGATATGGCATTTCCTCGAATAAATAATATAAGATTCTGATTATTACCACCT
TCATTGACCCTTCTTCTTATATCCTCCATAGTTGATATAGGAGCAGGTACAGGGTGAAGTGTCTATCC
ACCACTAGCTGGAGCTATTGCACACGGTGGAGCATCAGTTGACTTAGCTATTTTCTCACTACATTTA
GCCGGTGTATCATCTATTTTAGGAGCAGTAACTTTATTACAACAGCAATTAATATACGATCAGAAAG
AATAACATTAGATCAAACACCATTATTTGTATGATCAGTGGCAATTACAGCACTATTACTTTTATTATC
GTTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTGTTAACCGATCGTAACCTAAATACATCATTCTTTGA
CCCTGCAGGAGGGGGTGATCCAATCCTTTATCAACACTTATTC

>KP892665 *Tribolium madens*

AACTTTTACTTCATTTTCGGAGCATGATCTGGAATAGTAGGAACCTCTTTAAGATTATTAGTACGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGTTCTCTAATTGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTCACAGCCCAT
GCATTTATTATAATTTTCTTCATAGTTATACTATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCA
CTTATACTAGGAGCACCTGATATAGCATTTCCTCGAATAACAATATAAGATTCTGACTTCTACCCCC

TTCCTTATCCCTATTGTTAATAAGAAGAATCGTAGAAAGAGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTATATC
CCCCACTATCATCCAATATTGCCACGGAGGATCATCCGTAGACCTAGCAATTTTTAGACTACATTTA
GCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAGTAACTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCACAAGG
AATAACTCTTGAACGAATACCATTATTTGTCTGAGCTGTGGTAATTACAGCAATTTTACTATTACTATC
TCTACCCGTA TAGCAGGTGCTATTACTATATTACTAACCGACCGAAACATTAATACCTCATTCTTTGA
CCCAGCTGGGGGAGGTGATCCAATCCTATATCAACATTTATTT

>KP892666 *Tribolium freemani*

AACACTTTATTTTCAATTTTTGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGATTACTAATCCGTG
CAGAACTGGGAAACCCAGGATCATTAAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACCGCTCAC
GCATTTATCATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTGTTATTGGAGGCTTTGGAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGGGCTCCCGACATAGCATTCCCTCGAATAAATAACATAAGATTCTGACTCCTACCCCC
TTCCCTTTCTCTTCTTAATAAGAAGAATTGTAGAAAGAGGAGCGGGGACAGGATGAACTGTTTATC
CACCTCTTTTCACTAATATTGCGCACGGAGGATCATCCGTAGATTTAGCAATTTTCAGGTTACACTTA
GCTGGTATCTCATCAATTCTTGGAGCTGTTAATTTTATCACAAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
GATATCCCTAGAACGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACCGCTATTCTTCTACTTCTTTC
ACTTCCAGTTCTAGCAGGAGCCATTACCATACTCCTTACCGATCGAAATATTAATACATCATTCTTTGA
CCCAGCCGGGGGGGAGACCCAATTCTCTACCAACACTTATTC

>KP892664 *Tribolium destructor*

AACTCTTACTTCCTATTTGGTGCATGAGCAGGAATAGTTGGTACGTCTCTTAGACTATTAATTCGTAC
AGAACTAGGAAACCCAGGTTCCCTAATCGGGAATGACCAAATTTATAACGTAATCGTAACAGCCCATG
CATTATTATAATTTTCTTCATAGTAATACCTATAATAATCGGAGGTTTCGGTAACTGATTAGTACCAT
TAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCACGAATAACAATATAAGATTCTGACTATTGCCACCT
TCCCTTAGACTCTTATTAATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGTGCAGGAACCGGTTGAACAGTTTATCC
CCCATTATCATCTAATATTGCCACAGAGGATCTTCAGTTGACCTAGCAATTTTTAGACTTCATTTAGC
TGGAATCTCATCAATTTTAGGAGCTATTACTTCATTACCACAGTAATCAATATACGACCTATAGGAAT
ATCATTCGAACGAATACCCCTATTCGTTTGAGCTGTAGTAATTACAGCAGTTCTATTACTTTTATCACT
TCCTGTTCTTGCAGGAGCAATTACTATATTATTAACAGATCGAAATATTAACACCTCTTCTTTGACCC
TGCAGGGGGAGGAGACCCAATCTTATATCAACACTTATTC

>KP892668 *Tribolium confusum*

AACTCTTTATTTTCATATTTGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGAACCTCACTTAGATTACTAATCCGAG
CTGAACTGGGAAATCCTGGTTCACTAATTGGTGATGATCAAATCTATAACGTTATTGTTACAGCCCAT
GCATTTATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATTATAAATTGGAGGCTTTGGAAATTGATTAGTACCA
CTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCCGAATAAATAACATAAGATTCTGGCTCCTGCCACC
CTCATTAAGACTTCTTATCATAAGAAGAGTAGTAGAAAGAGGGGCAGGAACAGGATGAACTGTTTACC
CCCCTTTATCATCTAATATCGCTCACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCAATTTTTAGATTACACTTA
GCTGGTATTTCTTCAATCTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAATATACGACCTACAGGA
ATATCATTTGAACGAATACCTTTATTTGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCTATTTTACTTCTATTATCA
CTACCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAATATCAATACATCGTTTTTTGAC
CCTGCAGGTGGGGGAGACCCAATTCTATATCAACACCTATTC

>KJ964296 *Tribolium confusum*

AACTCTTTATTTTCATATTTGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGAACCTCACTTAGATTACTAATCCGAG
CTGAACTGGGAAATCCTGGTTCACTAATTGATGATGATCAAATCTATAACGTTATTGTTACAGCCCAT
GCATTTATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATTATAAATTGGAGGCTTTGGAAATTGATTAGTACCA
CTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCCGAATAAATAACATAAGATTCTGGCTCCTGCCACC
CTCATTAAGACTTCTTATCATAAGAAGAGTAGTAGAAAGAGGGGCAGGAACAGGATGAACTGTTTACC
CCCCTTTATCATCTAATATCGCTCACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCAATTTTTAGATTACACTTA
GCTGGTATTTCTTCAATCTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAATATACGACCTACAGGA
ATATCATTTGAACGAATACCTTTATTTGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCTATTTTACTTCTATTATCA
CTACCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAATATCAATACATCGTTTTTTGAC
CCTGCAGGTGGGGGAGACCCAATTCTATATCAACACCTATTC

>KM439779 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACCTTCATTAAGACTCCTAATTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGGGCCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGGGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTACC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG

AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>KM207082 *Tribolium castaneum*

AACACTTTATTTTCAATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTTCGAG
CAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCAC
GCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATAACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAACTGATTAGTCCCT
TTAATACTAGGGGCCCTGATATAGCATTTCACGAATAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCC
ATCCCTTTCACTTCTTCTCATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTACC
CACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCTTGCCATTTTCAGACTACACTTA
GCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTTATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGG
AATAACCCTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATC
TCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCTTACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGA
CCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

>KP892667 *Tribolium brevicornis*

AACTCTTTATTTTCTATTTGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGATCATCTCTAAGACTATTAATTTCGAG
CAGAACTAGGTAATCCCGGATCGTTAATTGGAGATGACCAAACCTATAACGTAATCGTTACAGCTCAC
GCATTCATTATAATTTTCTTTATAGTAATAACCAATCATAATTGGTGGATTCGGAACTGATTAGTTCCA
CTAATACTAGGCGCCCCAGACATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGATTTTGACTTCTTCCACC
CTCATTAACACTCCTACTAATAAGAAGAATCGTAGAAAATGGTGCAGGAACCGGATGAACAGTTTACC
CCCCACTATCATCCAATATCGCACACAGAGGTTTCATCTGTAGATCTAGCCATCTTTAGATTACATTTA
GCAGGAATTTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATTCTACAGTTATTAATATACGACCTCAAGGA
ATAACATTCGATCGAATACCTCTATTTGTATGAGCAGTAGCAATTACAGCTTTTACTTTTACTTTCA
CTCCAGTGTTAGCCGGTGAATTAATTAACCGACCGAAACATCAATACATCATTCTTCGA
CCCAGCAGGTGGGGGTGATCCAATCCTTTATCAACATCTATTC

13.2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่นำเข้าสู่ฐานข้อมูล

GenBank accession number : MK649848

LOCUS Seq1 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq1

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE **mitochondrion Tribolium castaneum (red flour beetle)**

ORGANISM Tribolium castaneum

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;

Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;

Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;

Tribolium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

/organism="Tribolium castaneum"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="TH1"

/db_xref="taxon:7070"

```

/country="Thailand-Surin"
/collection_date="2016-8-16"
/collected_by="B. Nopparat"
CDS      <1..>658
/codon_start=2
/transl_table=5
/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"
/translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA
HAFIMIFFMVMPIVIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLLLLLMSSIV
ESGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM
TLERMPLFWAVVITAILLLLSPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILYQHL
F"

```

BASE COUNT 193 a 157 c 106 g 202 t

ORIGIN

```

1 aacactttat ttcatcttcg gagcatgac aggaatagta ggtacttcat taagactcct
61 aattcgagca gaactaggaa atcctggctc ctaattgga gatgaccaa ttataatgt
121 tattgttact gccacgcat tcatacaat tttctcata gtaatacaa tcgtaattgg
181 aggattcggg aactgattag tcccttaat actaggagcc cctgatatag cattccacg
241 aataaacaac ataagattct gactacttcc cccatccctt tcacttctc tcataagaag
301 aattgttgaa agaggagcag gaacagggtg aaccgttat ccaccctct catcaaacat
361 tgcacatggc ggatcctctg ttgatcttgc catttcaga ctacacttag caggaatctc
421 atcaattctg ggagcagtta attcattac aacagtaac aatatacagc cccaaggaat
481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgcaa tttacttct
541 cttatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa
601 cacatcattc ttgaccctg ctgggggagg cgatccaatc cttaccagc acctattc

```

//

GenBank accession number : MK649849

LOCUS Seq2 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq2

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE **mitochondrion Tribolium castaneum (red flour beetle)**

ORGANISM Tribolium castaneum

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;

Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;

Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;

Tribolium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

/organism="Tribolium castaneum"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="TH2"

/db_xref="taxon:7070"

/country="Thailand-Surin"

/collection_date="2016-8-16"

/collected_by="B. Nopparat"

CDS <1..>658

/codon_start=2

/transl_table=5

/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"

/translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA

HAFIMIFFMVMPIVIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLLLLLMSSIV

KSGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM

TLERMPLFWAVVITAILLLLSPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILYQHL

F"

BASE COUNT 192 a 157 c 107 g 202 t

ORIGIN

1 aacactttat ttcattttcg gagcatgatac aggaatagta ggcacttcat taagactcct
61 aattcgagca gaactaggaa atcctggctc ctaattgga gatgaccaa tttataatgt
121 tattgttact gccacgcat ttatcataat tttctcata gtaatacaa tcgtaattgg
181 gggattcggg aactgattag tcccttaat actaggagcc cctgatatag cattcccacg
241 aataaacaac ataagattct gactacttcc cccatccctt tcacttctc tcataagaag
301 aattgttaaa agaggagcgg ggacaggatg aaccgtttat ccaccctct catcaaacat
361 tgcacatggc ggcactctg ttgatctgc cattttaga ctacacttag caggaatctc
421 atcaattctg ggagcagta attcattac aacagtaac aatatacagc cccaaggaat
481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgcaa tttacttct
541 cttatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa
601 cacatcattc ttgaccctg ctgggggagg cgatccaatc cttaccagc acctattc

//

GenBank accession number : MK649850

LOCUS Seq3 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq3

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE **mitochondrion Tribolium castaneum (red flour beetle)**

ORGANISM Tribolium castaneum

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;

Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;

Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;

Tribolium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658
/organism="Tribolium castaneum"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="TH3"
/db_xref="taxon:7070"
/country="Thailand-Surin"
/collection_date="2016-8-16"

```

/collected_by="B. Nopparat"
CDS      <1..>658
        /codon_start=2
        /transl_table=5
        /product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"
        /translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA
HAFIMIFFMVMPIVIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLLLLLMSSIV
KSGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM
TLERMPLFWAVVITAILLLLSPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILYQHL
F"

```

BASE COUNT 192 a 157 c 107 g 202 t

ORIGIN

```

1 aacactttat ttcatttcg gagcatgac aggaatagta ggcacttcat taagactcct
61 aattcgagca gaattaggaa atcctggctc ctaattgga gatgaccaa tttataatgt
121 tattgttact gcccacgcat tcataataat tttcttcata gtaataccea tcgtaattgg
181 gggattcggg aactgattag tcccttaata actaggagcc cctgatatag cattcccacg
241 aataaacaac ataagattct gactacttcc cccatccctt tcacttctc tcataagaag
301 aattgttaaa agaggagcgg ggacaggatg aaccgtttat ccaccctct catcaaacat
361 tgcacatggc ggatcctctg ttgatcttgc cattttaga ctacacttag caggaatctc
421 atcaattctg ggagcagtta atttcattac aacagtaac aatatacgac cccaaggaat
481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgcaa ttttacttct
541 cttatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa
601 cacatcattc tttgaccctg ctgggggagg cgatccaatc cttaccagc acctattc

```

//

GenBank accession number : MK649851

LOCUS Seq4 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq4

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE **mitochondrion Tribolium castaneum (red flour beetle)**

ORGANISM Tribolium castaneum

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;
Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;
Tribolium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658
/organism="Tribolium castaneum"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="TH4"
/db_xref="taxon:7070"
/country="Thailand-Surin"
/collection_date="2016-8-16"
/collected_by="B. Nopparat"

CDS <1..>658
 /codon_start=2
 /transl_table=5
 /product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"
 /translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA
 HAFIMIFFMVMPIVIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLLLMSIV
 ESGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM
 TLERMPLFWAVVITAILLLLSPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILHQHL
 F"

BASE COUNT 194 a 158 c 106 g 200 t

ORIGIN

1 aacactttat ttcattttcg gagcatgac aggaatagta ggtacttcat taagactcct
 61 aattcgagca gaactaggaa atcctggctc ctaattgga gatgaccaa ttataatgt
 121 tattgttact gccacgcat tcatacaat tttctcata gtaatacaa tcgtaattgg
 181 aggattcggg aactgattag tcccttaat actaggagcc cctgatatag cattccacg
 241 aataacaac ataagattct gactacttcc cccatccctt tcacttctc tcataagaag
 301 aattgtttaa agaggagcag gaacagggtg aaccgtttat ccaccctct catcaaacat
 361 tgcacatggc ggatcctctg ttgatcttgc catttcaga ctacacttag caggaatctc
 421 atcaattctg ggagcagtta attcattac aacagtaac aatatacgac cccaaggaat
 481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgcaa tttacttct
 541 ctatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa
 601 cacatcattc tttgaccctg ctgggggagg cgatccaatc ctacaccagc acctattc

//

GenBank accession number : MK649852

LOCUS Seq5 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq5

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE **mitochondrion Tribolium castaneum (red flour beetle)**

ORGANISM Tribolium castaneum

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;
Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;
Tribolium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..658
	/organism="Tribolium castaneum"
	/organelle="mitochondrion"
	/mol_type="genomic DNA"
	/isolate="TH5"
	/db_xref="taxon:7070"
	/country="Thailand-Surin"
	/collection_date="2016-8-16"
	/collected_by="B. Nopparat"
CDS	<1..>658

```
/codon_start=2
/transl_table=5
/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"
/translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA
HAFIMIFFMVMPIVIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLLLMSSIV
ESGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM
TLERMPLFWAVVITAILLLSLPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILYQHL
F"
```

BASE COUNT 193 a 158 c 106 g 201 t

ORIGIN

```
1 aacactttat ttcattttcg gagcatgac aggaatagta ggcacttcat taagactcct
61 aattcgagca gaactaggaa atcctggctc ctaattgga gatgaccaa ttataatgt
121 tattgttact gccacgcat tcataataa tttctcata gtaatacaa tcgtaattgg
181 aggattcggg aactgattag tcccttaat actaggagcc cctgatatag cattccacg
241 aataaacaac ataagattct gactacttcc cccatccctt tcacttctc tcataagaag
301 aattgttgaa agaggagcag gaacagggtg aaccgttat ccaccctct catcaaacat
361 tgcacatggc ggatcctctg ttgatctgc catttcaga ctacacttag caggaatctc
421 atcaattctg ggagcagtta attcattac aacagtaac aatatacgac ccaaggaat
481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgca ttttacttct
541 ctatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa
601 cacatcattc ttgaccctg ctgggggagg cgatccaatc cttaccagc acctattc
```

//

GenBank accession number : MK649853

LOCUS Seq6 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq6

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion *Tribolium castaneum* (red flour beetle)

ORGANISM *Tribolium castaneum*

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;
Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;
Tribolium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..658 /organism=" <i>Tribolium castaneum</i> " /organelle="mitochondrion" /mol_type="genomic DNA" /isolate="TH6" /db_xref="taxon:7070" /country="Thailand-Surin" /collection_date="2016-8-16" /collected_by="B. Nopparat"
CDS	<1..>658 /codon_start=2


```
/transl_table=5
/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"
/translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA
HAFIMIFFMVMPVIGGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLLLMSSIV
ESGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM
TLERMPLFWAVVITAILLLSLPVLGAIITMLLTDRNINTSFFDPAGGADPILYQHL
F"
```

BASE COUNT 193 a 158 c 105 g 202 t

ORIGIN

```
1 aacactttat ttcattttcg gagcatgac aggaatagta ggcacttcat taagactcct
61 aattcgagca gaactaggaa atcctggctc ctaattgga gatgaccaa ttataatgt
121 tattgttact gcccacgcat tcataataa tttctcata gtaatacaa tcgtaattgg
181 aggattcggg aactgattag tcccttaat actaggagcc cctgatatag cattccacg
241 aataaacaac ataagattct gactacttcc cccatccctt tcacttctc tcataagaag
301 aattgttgaa agaggagcag gaacagggtg aaccgtttat ccaccctct catcaaacat
361 tgcacatggc ggatcctctg ttgatcttgc catttcaga ctacacttag caggaatctc
421 atcaattctg ggagcagtta attcattac aacagtaac aatatacagc cccaaggaat
481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgcaa tttacttct
541 cttatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa
601 cacatcattc tttgaccctg ctggaggggc tgatccaatc cttaccagc acctattc
```

//

GenBank accession number : MK649854

LOCUS Seq7 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq7

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion *Tribolium castaneum* (red flour beetle)

ORGANISM *Tribolium castaneum*

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;
Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;
Tribolium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

 /organism="Tribolium castaneum"

 /organelle="mitochondrion"

 /mol_type="genomic DNA"

 /isolate="TH7"

 /db_xref="taxon:7070"

 /country="Thailand-Chonburi"

 /collection_date="2017-11-24"

 /collected_by="B. Nopparat"

CDS <1..>658

 /codon_start=2

 /transl_table=5

/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"
/translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA
HAFIMIFFMVMPIVIGGFNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLLLMSSIV
ESGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM
TLERMPLFWAVVITAILLLSLPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILYQHL
F"

BASE COUNT 192 a 156 c 107 g 203 t

ORIGIN

1 aacactttat ttcatcttcg gagcatgac aggaatagta ggcacttcat taagactcct
61 aattcgagca gaactaggaa atcctggctc ctaattgga gatgaccaa ttataatgt
121 tattgttact gccatgcat ttatcataat tttctcata gtaatacaa tcgtaattgg
181 gggattcggg aactgattag tcccttaata actaggagcc cctgatatag cattcccacg
241 aataaacaac ataagattct gactacttcc cccatccctt tcacttctc tcataagaag
301 aattgttgaa agaggggagc gaacaggatg aaccgtttat ccaccctct catcaaacat
361 tgcacatggc ggcactctg ttgatcttgc cattttcaga ctacacttag caggaatctc
421 atcaattctg ggagcagtta attcattac aacagtaac aatatacagc cccaaggaat
481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgcaa ttttacttct
541 cttatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa
601 cacatcattc ttgaccctg ctggaggggg tgatccaatc cttaccagc acctattc

//

GenBank accession number : MK649855

LOCUS Seq8 658 bp DNA linear INV 15-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq1

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE **mitochondrion *Oryzaephilus surinamensis* (saw-toothed grain beetle)**

ORGANISM *Oryzaephilus surinamensis*

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;

Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;
Cucujiformia; Silvanidae; Silvaninae; Oryzaeophilus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:3

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

/organism="Oryzaeophilus surinamensis"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="1"

/db_xref="taxon:41112"

/collection_date="2016-12-07"

/collected_by="B. Nopparat"

CDS <1..>658

/codon_start=2

/transl_table=5

/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"

/translation="TLYFLFGAWAGMVGTSLSILIRTELGTAGSLIGNDQIYNTIVTA

HAFIMIFFMVMPVWIGGFGNWLIPLMIGAPDMAFPRLNNMSFWLLPPSISLLLISSIV

EKGTGTGWTVYPPLSSNLAHNGTSVDLAIIFSLHLAGISSILGAINFISTIFNMKPKKM
NMDQMPLFCWAVMITAILLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSFFDPSGGGDPILYQHL
F"

BASE COUNT 216 a 144 c 93 g 205 t

ORIGIN

1 aactttatac tttcttttg gagcttgagc aggaatagtg ggaacatcct taagaatcct
61 aattcgaaca gaactaggaa cagcaggttc actaattgga aatgatcaaa tctacaatac
121 aattgtaacc gcccatgcat ttattataat tttctttata gtaataccag tagttattgg
181 aggatttggga aactgattaa tccctttaat aattggggct cctgatatag cattcccacg
241 acttaataat ataagattct gattattacc ccctcaatc tcccttctct taatcagaag
301 aattgtagaa aaggggacag gaacaggatg aacagtatac ccccctctct catccaattt
361 agcccacaac ggaacatctg ttgacctagc aatctttaga ttacatttag caggaatttc
421 ctccatttta ggagcaatta actttatttc tacaatttc aatataaac caaaaaaat
481 aatatagat caaacatctt tattctgttg agctgtaata atcacagcca ttctactct
541 tctttccctc ccagtcttag caggagctat caccatacta ctaacagacc gaaatctaa
601 tacatccttc ttgaccctc caggaggagg agaccctatt ttataccaac acctgttt

//

GenBank accession number : MK649856

LOCUS Seq9 658 bp DNA linear INV 15-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq2

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion *Sitophilus zeamais* (maize weevil)

ORGANISM *Sitophilus zeamais*

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;

Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;

Cucujiformia; Curculionidae; Dryophthorinae; *Sitophilus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:3

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

 /organism="Sitophilus zeamais"

 /organelle="mitochondrion"

 /mol_type="genomic DNA"

 /isolate="1"

 /db_xref="taxon:7047"

 /collection_date="2016-9-30"

 /collected_by="T. Montri"

CDS <1..>658

 /codon_start=2

 /transl_table=5

 /product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"

 /translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGLIGNDQIYNTIVTA
HAFIMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRLNNMSFWLLPPSLILLMLSSFI
EKGAGTGWTVYPPLSSNIAHEGASVDLAIFSLHMAGISSILGAINFISTTYNMRPSGM
LSDRMTLFIWAVSITAILLLLSPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILYQHL
F"

BASE COUNT 193 a 124 c 101 g 240 t

ORIGIN

1 aacattatac tttatTTTTg gagcatgac aggaatagtg ggaacctcat tgagtttact
61 aattcgggct gaattagga atcctggacgc attaattgga aatgatcaaa ttacaatac
121 tattgttaca gctcacgcat tcattataat tttctttata gtgataccta ttataattgg
181 aggtttcggg aactgattag tcccactaat actaggagcc ccagatatag cattccccacg
241 attaaacaat ataaggttct gattactccc tccatcatta attcttttat taataagaag
301 attcattgaa aaaggtgccg gaacaggatg aactgtttat cccccattat cctcaaatat
361 tgcacacgaa ggagcctctg ttgatttagc aatTTTTtagt ctcatatag caggtatttc
421 atctattctt ggagctatta atTTTTttc tactacttat aatatacgcc cctccggtat
481 attatcagat cgaataactt tatttatttg agcagttaga attacagcca ttcttctttt
541 acttagatta cctgttttag ctggagcaat cactatgctt ctactgacg gtaatatcaa
601 tacctctttt ttgatcctg ctggagcgg agaccctatt ctctatcaac acttattt

//

GenBank accession number : MK649857

LOCUS Seq10 658 bp DNA linear INV 15-MAR-2019

DEFINITION cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.

ACCESSION Seq3

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE **mitochondrion Callosobruchus maculatus (cowpea weevil)**

ORGANISM Callosobruchus maculatus

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;

Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;

Cucujiformia; Chrysomeloidea; Chrysomelidae; Bruchinae; Bruchini;

Callosobruchus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:3

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

/organism="Callosobruchus maculatus"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="1"

/db_xref="taxon:64391"

/collection_date="2017-1-19"

/collected_by="T. Montri"

CDS <1..>658

/codon_start=2

/transl_table=5

/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"

/translation="TLYFIFGAWAGMAGTSL SMLIRAELGNPGSLIGNDQIYNVIVTA

HAFIMIFFMVMPIMIGGFGNWL VPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLILLMSSLV

ESGAGTGWTVYPPFASNIAHSGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPSGM

KMDQMPLFSWAVTITAILLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSFFDPAGGGDPILYQHL

F"

BASE COUNT 202 a 138 c 106 g 212 t

ORIGIN

1 tacattatac tttatTTTTg gggcctgagc tggaatagca ggtacctcac taagaatatt
61 aattcgagcc gaattagga acccaggatc actaattgga aatgatcaaa ttataacgt
121 aatcgttact gcacatgctt tcattataat ttttttata gttataccaa ttataattgg
181 aggattcggga aactgacttg ttcccctaat attaggagcc cctgatatgg cttcccacg
241 aataaataat ataagatTTT gattactacc tcctcatta attctcctt taataagaag
301 actagtcgaa aggggggag gTactgggtg aacagttac ccaccattg ccagtaacat
361 tgcccataga ggatcatctg ttgacttagc catttttagg cttcatttag caggaatctc
421 ctctattcta ggagctgtaa atTTTattac tactgtaatc aatatacgac caagaggaat
481 aaaaatagac caaatacccc tattctcatg ggcaGttaca atcacagcaa ttttactcct
541 tctttcactc ccagtattag ccggtgctat taccatatta ttaacagacc gaaatttaa
601 cacttcattc ttgaccccg caggaggagg agacccatt ctctatcaac acttatt

//