# การจำแนกชนิดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพลี้ยแป้ง cryptic species สกุล *Planococcus* Ferris 1950 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

# Species identification and phylogenetic relationship of mealybug cryptic species genus *Planococcus* Ferris 1950 by molecular techniques

**ชมัยพร บัวมาศ ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต**
**กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

---

## Abstract

Identification of mealybugs, genus *Planococcus* Ferris 1950, was conducted between October 2021 and September 2022 to identify the species, host plant, distribution. Survey and specimen collecting were carried out from various agricultural crops in central, northeast and north of Thailand. Three species of *Planococcus* were identified by using molecular technique (cox1): 1. *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905), 2. *Planococcus minor* (Maskell, 1897), and 3. *Planococcus citri* (Risso, 1813).

**Keyword:** mealybug, DNA, *Planococcus*

## บทคัดย่อ

การจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* Ferris 1950 ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2564 ถึงเดือนกันยายน 2565 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้จำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล จากยีน *cox1* สามารถจำแนกได้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1. *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905) 2. *Planococcus minor* (Maskell, 1897) และ 3. *Planococcus citri* (Risso, 1813)

**คำสำคัญ:** เพลี้ยแป้ง ดีเอ็นเอ สกุล *Planococcus*

## คำนำ

เพลี้ยแป้ง (mealybug) สกุล *Planococcus* Ferris, 1950 วงศ์ Pseudococcidae พบลงทำลายในพืชต่างๆ ได้หลากหลาย เช่น พืชผัก ไม้ดอก ไม้ผล และพืชไร่ ทั่วโลกพบรายงานแล้ว 48 ชนิด สำหรับในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีรายงานแล้ว 15 ชนิด (García *et al.,* 2016) สำหรับในประเทศไทย พบเพลี้ยสกุลนี้ จำนวน 2 ชนิด คือ *P. lilacinus* (Cockerell) ซึ่งพบลงทำลายใน เงาะ ทุเรียน น้อยหน่า และสละ เป็นต้น และ *P. minor* (Maskell) พบลงทำลายใน ทุเรียน กล้วยน้ำว้า น้อยหน่า เงาะ ลางสาด งอนไก่ มันฝรั่ง และมะม่วงหิมพานต์ (บุปผาและชลิดา, 2543) นอกจากนี้ Williams (2004) ได้รายงานว่า ประเทศไทยพบเพลี้ยแป้งชนิด *P. citri* (Risso) ซึ่งเพลี้ยแป้งในสกุลนี้มีความคล้ายคลึงด้านสัณฐานวิทยาเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะชนิด *P. minor* และ *P. citri* เนื่องจากพืชอาศัยที่พบเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ความถูกต้องแม่นยำในการจำแนกชนิดจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญซึ่งจะเป็นอย่างยิ่งหากเราสามารถนำเทคโนโลยีสมัยใหม่มาประยุกต์ใช้การการจัดจำแนกชนิดมีความถูกต้องแม่นยำ และยอมรับในระดับสากล และยังสามารถพัฒนาต่อยอดสู่การวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจสอบให้รวดเร็ว ทันต่อสถานการณ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบศัตรูพืชในการนำเข้าสินค้าเกษตรของไทย และการวางแผนในการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมในอนาคตต่อไปได้

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซอง กระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ได้แก่ เตาไฟฟ้า ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่อง Thermal cycler เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ เครื่อง Gel electrophoresis เครื่อง Gel Documentation UV-trans illuminator

4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope กล้องถ่ายภาพ และเครื่องระบุพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)

5. สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอเช่น ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ 100 bp DNA Ladder Agarose gel และ TE Buffer, MyTag HS Red DNA Polymerase primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และหลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร

### วิธีการ

**1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus***

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* โดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในเขตพื้นที่ภาคกลาง เช่น จังหวัดสระบุรี ชัยนาท อุทัยธานีและกรุงเทพมหานคร ภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา หนองหนองคาย และมหาสารคาม เมื่อพบตัวอย่างเพลี้ยแป้งตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษแล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด ทำการดองตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บรักษาในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนไคติน (chitin) ที่เหลือเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 70% และสามารถนำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเก็บรักษาเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen) ต่อไปได้

**2. จำแนกชนิดเพลี้ยแป้งใน สกุล *Planococcus* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล**

2.1 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ดองในแอลกอฮอล์ 95% ที่ไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Isolate II Genomic DNA Kit MBL-BIO-52066 ซึ่งเป็นชุดสกัดสารพันธุกรรมที่ใช้สำหรับเนื้อเยื่อของมนุษย์และสัตว์ โดยนำตัวอย่างใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ซึ่งไคตินเพลี้ยแป้งที่เหลือนำไปสไลด์ถาวรเพื่อใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาและเก็บไว้เป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen) โดยนำของเหลวที่ได้มาสลายผนังเซลล์ (Lysis) ด้วยการเติม Lysis Buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตรและ Protinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิทพร้อมทั้งพันด้วย พาราฟีน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม ATL Buffer ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ หลังจากนั้นทำการจับสารพันธุกรรมด้วยการเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอเขย่าอย่างเร็วประมาณ 15 วินาทีเติมสารละลายบัฟเฟร์ AL ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 95%) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอ ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน tube และตกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) หลังจากนั้นล้างตะกอน (Wash silica membrane) โดยการเติม Wash Buffer AW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer AW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวที่เหลือแล้วทำการตกตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้ง (Dry silica membrane) ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอดมาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5

ไมโครลิตร ละลายสารพันธุกรรม (Elute DNA) โดยการเติม Elution Buffer AE ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ PcoF1- 5′CCTTCAACTAATCATAAAAATATYAG3′ และ LepR1- 5′ TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA3′ ในการเพิ่มปริมาณ DNA (Park *et al*., 2010) สังเคราะห์ยีน mtCOI ของเพลี้ยแป้งจากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ MyTaq HS Red DNA Polymerase (Bioline, Cat No. BIO-21114) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย Nuclease free water จำนวน 10.5 ไมโครลิตร 5x MyTaq Red Reaction Buffer จำนวน 4 ไมโครลิตร 10 µM CP-F จำนวน 1 ไมโครลิตร 10 µM CP-R จำนวน 1 ไมโครลิตร MyTaq HS DNA Polymerase จำนวน 0.5 ไมโครลิตร DNA template จำนวน 3 ไมโครลิตร รวมทั้งสิ้น 20 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์โดย Predenaturation 94° C 5 นาที Threestep-cycling 35 cycles Denaturation 94° C 30 วินาที Annealing 50° C 30 วินาที Extension 72° C 45วินาที และ Final extension 72° C 10 นาที และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่ต้องการ โดยการให้ประจุของสารที่มีประจุแยกออกจากกัน ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) โดยหยด PCR product ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 % (1% agarose gel) และให้ PCR product เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 30 นาที

2.3 ส่ง PCR product เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพลี้ยแป้งในสกุล *Planococcus* ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลในรูปแบบ FASTA ไฟล์ ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึกและรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

**การบันทึกข้อมูล**

1) พืชอาศัย พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง
2) ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของเพลี้ยแป้ง

**เวลาสถานที่**

**เวลา** เดือนตุลาคม 2564 **ถึง** เดือนกันยายน 2565

**สถานที่** 1. แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus*

โดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในเขตพื้นที่ภาคกลาง เช่น จังหวัดสระบุรี และกรุงเทพมหานคร ภาคเหนือ เช่น จังหวัดพิษณุโลกและเชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม และขอนแก่น และเก็บรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง

### 2. จำแนกชนิดเพลี้ยแป้งใน สกุล *Planococcus* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

สามารถจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PcoF1/ LepR1 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % ในฐานข้อมูล GenBank สามารถจำแนกเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* จำนวน 3 ชนิด (Table 1) ได้แก่ 1. *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905), 2. *Planococcus minor* (Maskell, 1897), และ 3. *Planococcus citri* (Risso, 1813).

## สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในเขตพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 30 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ PcoF1/ LepR1 จากยีน *cox1* สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ได้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1. *Planococcus lilacinus* 2. *Planococcus minor* และ 3. *Planococcus citri* อย่างไรก็ตามเมื่อมีข้อมูลเพิ่มเติมในส่วนของภูมิภาคอื่นๆ เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ข้อมูลมีความสมบรูณ์และพัฒนาต่อไปได้ในอนาคต

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ นำไปรวบรวมเพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืช ซึ่งยังมีข้อมูลอยู่น้อยและไม่เป็นปัจจุบันเพื่อให้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูและข้อมูลเพื่อดำเนินการด้านมาตรการสุขอนามัยในการส่งออกและนำเข้าผลผลิตทางการเกษตรยังประเทศคู่ค้าต่างๆ รวมถึงการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมแก่เกษตรกรในอนาคตต่อไป

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้างกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

## เอกสารอ้างอิง

บุปผา เหล่าสินชัย และชลิดา อุณหวุฒิ. 2543. *เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอยศัตรูพืชที่สำคัญ.* โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว, กรุงเทพฯ. 70 หน้า.

García Morales M, Denno BD, Miller DR, Miller GL, Ben-Dov Y, Hardy NB. 2016. ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics. Database. doi: 10.1093/database/bav118. Accessed March 2020.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.

Park, D.-S., Suh, S.-J., Oh, H.-W. and Hebert, P.D.N. 2010. Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. BMC Genomics 11, 423

Williams, D.J. 2004. *Mealybug of Southern Asia.* The Natural History Museum, Kuala Lumpur: Southdene SDN. BHD, 896 pp.

Figure 1 Field survey of mealybug in central, northeast and north of Thailand

A)

B)

C)

D)

Figure 2 Field view of A) *Planococcus lilacinus* (Cockerell) B) *Planococcus citri* (Risso) and C-D) *Planococcus minor* (Maskell)

Table 1 Nucleotide sequence analysis of the 690 bp DNA fragments from *Planoccus* samples amplified by *cox*1 gene (PcoF1/ LepR1)

| No. | Scientific name | Nucleotide sequence |
|---|---|---|
| 1. | *Planocccus minor* | atcattaaatgaatatattcaactaatcataaaaatattagattaatatacttatt atttggattttgatctggattaataggtttatcaataagatttattattcgaattgaa ctaataaatttaaataataatttttaataataatataatttattatataataattact attcatgcttttattataatttttttttataactatacctatcattattggaagattaa gaaattgactcttaccattaatattaatatcatcagatttaatttttcctcgattaa ataattttagattttgattattaattccatcacttattttaataataataaatataat attatctaataatattaataccggttgaacactttatccccctttaattaatcaaa attttattacattaaatttttattatttttctttacatttaaatgggatttcttctattt ttagatcaattaattttatttcatcaatttttattattaataataataacttttttta aataatattactttatatatttgatccattattattacaactattttattaattattt ctattccaattttatcaagagcaattactataattattttagataataatcttaata taaatt tttttaatccattaggaaatggtaatccaattttatatcaacatttatt |
| 2. | *Planoccus citri* | atcattaaatgaatatattcaactaatcataaaaatattagattaatatacctttt atttggattttgatctggattaataggtttatcaataagatttattattcgaattgaa ctaataaatttaaataataatttttaataacaatataatttattatataataattac tattcatgcttttattataatttttctttataactatacctatcattattggaagatta agaaattgacttttaccattaatattaatatcatcagatttaatttttccccgatta aataattttagattttgattattaattccatcacttattttaataataataaatata atattatctaataatattaatacaggttgaacactttaccctccttttaattaatca aaattttattacattaaatttttattatttttttctttacatttaaatggaatttcttcta ttttttagatcaattaattttatttcatcaatttttattatcaataataataatttttttt taaataatattactttatatatttgatctattattattacaactattttattaattatt tctattccaattttatcaagagcaattactataattattttagataataatcttaat ataaatttttttttaatccattaggaaatggtaatccaattttatatcaacatttatta |
| 3. | *Planoccus lilacinus* | attattaaatgattatattcaactaatcataaaaatatcagtttaatatatttacttt tttggattttgatccggtttaataggattatcaatgagatttattattcgaattgaat taataaatttaaataataacttttaataataatataatttattatataataattact attcatgcttttattataatttttttttataactataccaattattattggaagaataa gaaattgattattaccattaatattaatatcttcagatttaatttttcctcgattaa ataattttagattttgattattaattccttcattaattttaataatattaaatataat tttaataaatataatattaatacgggttgaactttataccctccattaattaatcaaa attttattacattaaatttttattatttttttcattacatttaaatggaatttcttcaatt tttagatcaatcaattttatttcatcaatttttattattaataataataatttttttttt aaataatatttctttatatatttgatcaattattattactacaattttattaattattt ctattcctattttatcaagagcaattactataatcattttagataataatttaaata taaatttttttaatcctttaggaaatggtaatcctattctctatcaacatttaaat |