

BARKOD DNA SPESIES KOYA (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) DAN SEMUT (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) YANG BERASOSIASI DENGAN TANAMAN NANAS DI BINTULU, SARAWAK, MALAYSIA

[DNA BARCODE OF MEALYBUGS (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) AND ANTS SPECIES (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) SPECIES THAT ASSOCIATED WITH PINEAPPLE IN BINTULU, SARAWAK, MALAYSIA]

Muhamad Azmi Mohammed^{1*}, Ameyra Aman-Zuki¹, Marthiuz Ghany Buang¹, Nur Hasanah Hamdan¹, Martha Sani¹, Patricia King Jie Hung¹ & Salmah Yaakop²

¹Jabatan Sains Tanaman,
Fakulti Sains Pertanian dan Perhutanan,
Universiti Putra Malaysia Kampus Bintulu Sarawak (UPMKB),
Jalan Nyabau, 97008 Bintulu, Sarawak, Malaysia.

²Pusat Sistemik Serangga,
Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi,
Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM),
43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

*Email Pengarang: mm_azmi@upm.edu.my

Pengantaran: 21 Jun 2022; Penerimaan: 19 Oktober 2022

ABSTRAK

Tanaman nanas merupakan antara tanaman komoditi yang signifikan di Malaysia, termasuk di Sabah dan Sarawak. Namun begitu, tanaman nanas ini tidak terlepas dari serangan serangga perosak seperti koya yang berperanan sebagai vektor kepada penyakit *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaV) yang mampu mengurangkan hasil dan kualiti penghasilan nanas. Pengusaha nanas mengalami kesukaran dalam mengawal dan mengenalpasti spesies koya yang menyerang tanaman nanas disebabkan oleh saiznya yang kecil dan mempunyai variasi yang tinggi dengan dan antara spesies yang hampir. Maka, kajian ini bertujuan untuk melakukan pengecaman spesies koya dan semut yang berasosiasi dengan tanaman nanas di Sarawak dengan menggunakan analisis DNA barkod. Pensampelan aktif bagi sampel koya dan semut telah dijalankan ditiga lokasi penanaman nanas di bahagian Bintulu, Sarawak, Malaysia (Samarakan, Kuala Tatau dan Universiti Putra Malaysia Kampus Bintulu (UPMKB)). Tiga spesies koya yang berasosiasi dengan tanaman nanas di Bintulu telah berjaya dikenalpasti iaitu *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell), *Ferrisia virgata* (Cockerell) dan *Planococcus minor* (Maskell), serta lima spesies semut iaitu *Anoplolepis gracilipes* (Smith), *Meranoplus bicolor* (Guérin-Méneville), *Iridomyrmex anceps* (Roger), *Tapinoma indicum* (Forel) dan *Crematogaster* sp. Hasil kajian ini dapat membantu dalam pengecaman spesies yang tepat dan menambahbaik senarai spesies koya dan semut yang berasosiasi dengan tanaman nanas di Sarawak khususnya dan Malaysia amnya. Selain itu, hubungan simbiosis di antara koya dan semut sebagai agen penyebaran bagi koloni koya di kawasan penanaman nanas turut dibincangkan.

Pengenalpastian spesies yang jitu diharap dapat membantu pengusaha dalam membangunkan kaedah pengawalan serangga perosak yang lestari.

Kata kunci: Pengecaman, serangga perosak, vektor, simbiosis, Pseudococcidae

ABSTRACT

Pineapple is one of the significant commodity crops in Malaysia, including in Sabah and Sarawak. However, this commodity is not immune to pest attacks such as mealybugs which acts as a vector for the Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus (PMWaV) disease, which can reduce the yield and quality of pineapple production. Pineapple farmers experience difficulties in controlling and identifying the mealybug species infesting the pineapple crops due to their small size and high variation within and between closely related species. Therefore, this study aim to identify mealybug and ant species associated with pineapple crops in Sarawak by using the DNA barcoding analysis. Active sampling of mealybug and ant samples was conducted at three locations of pineapple cultivations in Bintulu, Sarawak, Malaysia (Samarakan, Kuala Tatau and Universiti Putra Malaysia Bintulu Campus (UPMKB)). Three mealybugs species associated with pineapple crops in Bintulu were successfully identified, namely *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell), *Ferrisia virgata* (Cockerell) and *Planococcus minor* (Maskell), as well as five ants species, namely *Anoplolepis gracilipes* (Smith), *Meranoplus bicolor* (Guérin-Méneville), *Iridomyrmex anceps* (Roger), *Tapinoma indicum* (Forel) and the genus *Crematogaster* sp. The results of this study can help in accurate species identification and improve the list of mealybug and ant species associated with pineapple crops in Sarawak in particular and Malaysia in general. In addition, the symbiotic relationship between the mealybugs and ants as the spreading agent for mealybug colonies in pineapple cultivation areas is also discussed. The accurate species identification is expected to assist agropreneurs in developing sustainable pest control methods.

Keywords: Identification, insect pest, vector, symbiosis, Pseudococcidae

PENGENALAN

Tanaman nanas (*Ananas comosus* L. Merr.) di Malaysia pada mulanya diperkenalkan sebagai tanaman kontan pada tahun 1921 di negeri Johor dan Selangor (Salleh & Sukadarin 2018). Negara pengeluar nanas terbesar di dunia adalah Costa Rica dengan pengeluaran sebanyak 3,328,100 metrik tan (MT) pada tahun 2020, di mana Malaysia berada pada kedudukan ke-23 dengan pengeluaran sebanyak 299,912 MT (Lembaga Perindustrian Nanas Malaysia 2020). Lembaga Perindustrian Nanas Malaysia (LPNM) sedang mempergiatkan usaha untuk meningkatkan produktiviti nanas supaya mencapai tahap sara diri bertepatan dengan matlamat Dasar Agromakanan Negara (DAN) 2011-2020 dan Rancangan Malaysia Ke-11 (RMK11).

Negeri Sarawak berada pada tempat kedua dalam jumlah pengeluaran nanas iaitu 47, 586,83 MT selepas Johor (212, 129.64 MT) pada tahun 2020 (Lembaga Perindustrian Nanas Malaysia 2020). Industri nanas di Sarawak dijangka semakin meningkat berikutan peluasan kawasan ladang perusahaan dan pekebun nanas yang semakin bertambah, selain Kementerian Pertanian dan Industri Makanan Malaysia (MAFI) mensasarkan untuk meningkatkan sehingga 4,000 hektar ladang nanas di Sarawak menjelang 2024 (Sinar Harian 2022). LPNM menjangkakan Sarawak bakal menjadi negeri pengeksport nanas terbesar di Malaysia pada penghujung RMK12 (Bernama 2022). Antara varieti nanas yang ditanam di Sarawak adalah jenis Sawit, Josephine, Sarawak, MD2 dan pelbagai lagi.

Penanaman nanas di Sarawak mampu membantu sosio-ekonomi pekebun tempatan, memandangkan pasaran domestik dan eksport nanas negara yang semakin berkembang. Namun begitu, tanaman nanas juga tidak terkecuali dengan gangguan daripada serangga perosak yang mampu mengganggu hasil dan kualiti tanaman dan nanas yang dihasilkan. Serangga koya merupakan salah satu daripada serangga perosak utama untuk tanaman nanas (Dos Santos Ferreira et al. 2015) dan tanaman nanas di Sarawak juga tidak terkecuali daripada serangan perosak ini.

Koya merupakan serangga dari order Hemiptera yang bersaiz kecil, hidup secara berkoloni, menghisap sap tumbuhan dan badan dilitupi bebenang lilin bewarna putih. Beberapa spesies koya yang dilaporkan menyebabkan kerosakan kepada tanaman nanas adalah daripada spesies *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) dan *D. neobrevipes* Beardsley yang merupakan vektor untuk *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaV). Penyakit ini menyebabkan daun tanaman nanas layu, bewarna merah kecoklatan dan kering pada hujungnya (Dey et al. 2018). Kesan penyakit ini mempengaruhi hasil dan kualiti tanaman nanas. Manakala, semut pula mempunyai hubungan simbiosis dengan koya apabila semut bertindak sebagai agen pergerakan dan penyebaran bagi serangga koya di kawasan penanaman nanas. Semut turut mendapatkan makanan daripada *honeydew* atau nektar yang dihasilkan oleh koya (Joy et al. 2012). Kehadiran semut di sesuatu koloni koya akan membantu menyebarkan koya dari pokok ke pokok nanas yang berhampiran. Namun begitu, saiz serangga koya yang kecil dan mempunyai ciri morfologi yang mirip menyukarkan proses pengecaman spesies dilakukan dengan tepat dan cepat.

Kurangnya dokumentasi dan senarai semak spesies serangga perosak dengan tanaman nanas di Sarawak menyebabkan kurangnya maklumat berkenaan spesies koya dan semut yang berasosiasi dengan tanaman nanas. Pengecaman spesies untuk koya dan semut adalah penting untuk pembangunan kaedah pengawalan perosak yang berkesan dan lestari. Oleh itu, objektif kajian ini adalah untuk mengecamkan spesies dengan menggunakan analisis barkod DNA bagi koya dan semut yang berasosiasi dengan tanaman nanas di Bintulu, Sarawak, Malaysia. Selain itu, hasil kajian ini dapat mengemaskini senarai spesies koya dan semut yang berasosiasi dengan tanaman nanas di Sarawak khususnya dan Malaysia amnya.

BAHAN DAN KAEDAH

Pensampelan Spesies Koya Dan Semut

Pensampelan spesies kajian telah dijalankan ditiga lokasi sekitar Bintulu, Sarawak, Malaysia iaitu di ladang nanas di Samarakan, Kuala Tatau dan Universiti Putra Malaysia Kampus Bintulu (UPMKB) dari Februari sehingga Mei 2021. Sampel koya dan semut dikumpul dengan menggunakan kaedah pensampelan aktif iaitu kutipan menggunakan tangan. Sampel koya dan semut yang berada di pangkal pohon, buah dan daun dikumpul ke dalam tiub emparan 1.5ml yang berisi etanol 80%. Sampel yang dikumpul dibawa pulang ke Makmal Entomologi, UPMKB untuk proses pengisihan berdasarkan ciri morfologi sebelum dipilih bagi menjalani proses pengecaman spesies menggunakan maklumat DNAny.

Pengekstrakan DNA

Sampel koya dan semut dibilas terlebih dahulu dengan menggunakan etanol tulen dan air suling untuk membuang debu, habuk atau kotoran yang boleh menyebabkan pencemaran kepada sampel. Sampel dibiarkan kering sebelum dipindahkan ke tiub emparan 1.5ml yang telah diautoklaf. Pengekstrakan DNA telah dijalankan dengan menggunakan DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, USA) dan mengikuti kaedah yang telah dimodifikasi Yaakop et al.

(2013) supaya struktur morfologi luaran sampel tidak rosak. Sejumlah 180µl penimbal ATL dan 20µl proteinase K dimasukkan ke dalam setiap tiub emparan sebelum divorteks dan inkubasi pada suhu 56°C selama 10 minit. Kemudian, tiub sampel disimpan selama 48 jam pada suhu -20°C, sebelum diteruskan dengan langkah-langkah yang selanjutnya. Sampel DNA kajian yang telah diekstrak kemudian disimpan di dalam suhu -20°C sebelum digunakan untuk proses yang seterusnya.

Tindak Balas Berantai Polimerase

Kesemua sampel DNA melalui proses Tindak Balas Berantai Polimerase (PCR) untuk kawasan genom sitokrom oksidase subunit I (*COI*). Pasangan pencetus yang digunakan untuk sampel koya adalah C1-J-2183 dan C1-N-2568 daripada Brady et al. (2000), manakala bagi semut pula adalah LCO1490 dan HCO2198 daripada Folmer et al. (1994). Campuran PCR yang digunakan berjumlah 25µl terdiri daripada 12.5µl penimbal Green Mastermix (Promega, USA), 6.5µl ddH₂O, 4.0µl templat DNA dan 1.0µl untuk setiap pasangan pencetus dan campuran PCR ini adalah sama untuk kedua-dua jenis sampel kajian (Mohammed et al. 2017). Profil PCR yang digunakan adalah 95°C selama 3 min untuk pra-nyahasli, 30 kitaran yang terdiri daripada 95°C selama 30s untuk nyahasli, 47°C selama 1 m untuk penyepuhan dan 72°C selama 30s untuk pemanjangan dan diakhiri dengan pemanjangan akhir bersuhu 72°C selama 10 min. Profil PCR ini digunakan untuk kedua-dua sampel kajian. Hasil PCR yang berjaya digandakan dihantar ke Apical Scientific Sdn. Bhd. (Serdang, Selangor) bagi proses penjujukan DNA.

Penyuntingan jujukan, analisis BLAST dan BOLD

Kesemua sampel yang berjaya dijujuk telah melalui proses penyuntingan untuk menggabungkan jujukan hadapan dan belakang dengan menggunakan perisian BioEdit ver. 7.2.5 (Hall 1999). Jujukan sampel kemudiannya melalui analisis *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan *Barcode of Life Data System* (BOLD) (Altschul et al. 1990; Ratnasingham & Hebert 2007) untuk menentukan integriti jujukan dan mengesahkan spesies melalui kaedah molekul.

Analisis Neighbour-Joining (NJ)

Data jujukan kajian terdiri daripada data koya dan semut telah melalui proses penjajaran berganda dengan menggunakan perisian MEGA ver. 10.1.8 (Kumar et al. 2018) dan ClustalW (Larkin et al. 2007). Jujukan yang telah menjalani penjajaran kemudiannya melalui analisis kriteria jarak dengan menggunakan model Kimura 2-parameter (Kimura 1980). Kemudian, setiap satu set data kajian melalui analisis *Neighbour-Joining* (NJ) dengan menggunakan perisian PAUP4 (Swofford 2002) untuk menentukan dan menyokong hasil pengenalpastian spesies menerusi kaedah molekul. Spesies serangga teritip *Cryptococcus fagisuga* (DQ125283.1) dan lebah madu *Apis mellifera* (MW340140.1) masing-masing dipilih untuk dijadikan kumpulan luaran bagi penjanaan pohon NJ untuk koya dan semut. Jujukan rujukan daripada GenBank untuk setiap spesies juga ditambah untuk menyokong pembentukan kumpulan spesies kajian. Pohon dijana dengan menggunakan model Kimura 2-parameter, dan nilai butstrap didapatkan melalui replikasi butstrap sebanyak 1000. Pohon NJ yang telah dijana menjalani proses suntingan menggunakan perisian FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018).

HASIL

Analisis Barkod DNA

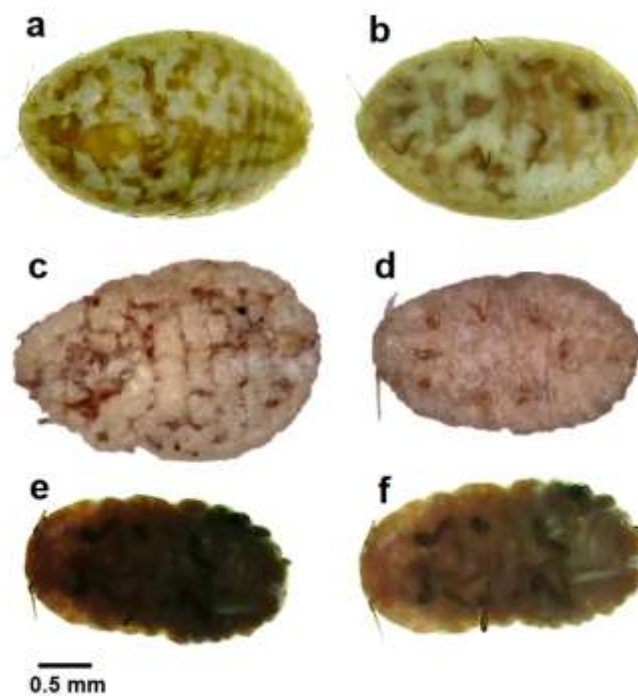
Sejumlah 10 individu koya dan lima individu semut yang dikumpul daripada tiga kawasan kajian telah dipilih bagi pengecaman molekul. Set data koya terdiri daripada 434 pasangan bes, yang mana daripada jumlah tersebut 368 bes merupakan kawasan terpulihara, 67 bes kawasan

yang bervariasi, 54 bes parsimoni informatif dan 12 bes tunggal. Purata untuk komposisi nukleotida bagi set data koya adalah seperti berikut; T sebanyak 41.4%, C sebanyak 9.9%, A sebanyak 37.3% dan G sebanyak 11.5%. Set data semut pula terdiri daripada 699 pasangan bes, yang mana 444 bes merupakan kawasan terpulihara, 255 bes kawasan yang bervariasi, 119 bes kawasan parsimoni informatif dan 136 bes tunggal. Bagi set data semut, purata untuk komposisi nukleotida adalah seperti berikut; T sebanyak 38.6%, C sebanyak 19.3%, A sebanyak 28.9% dan G sebanyak 13.2%.

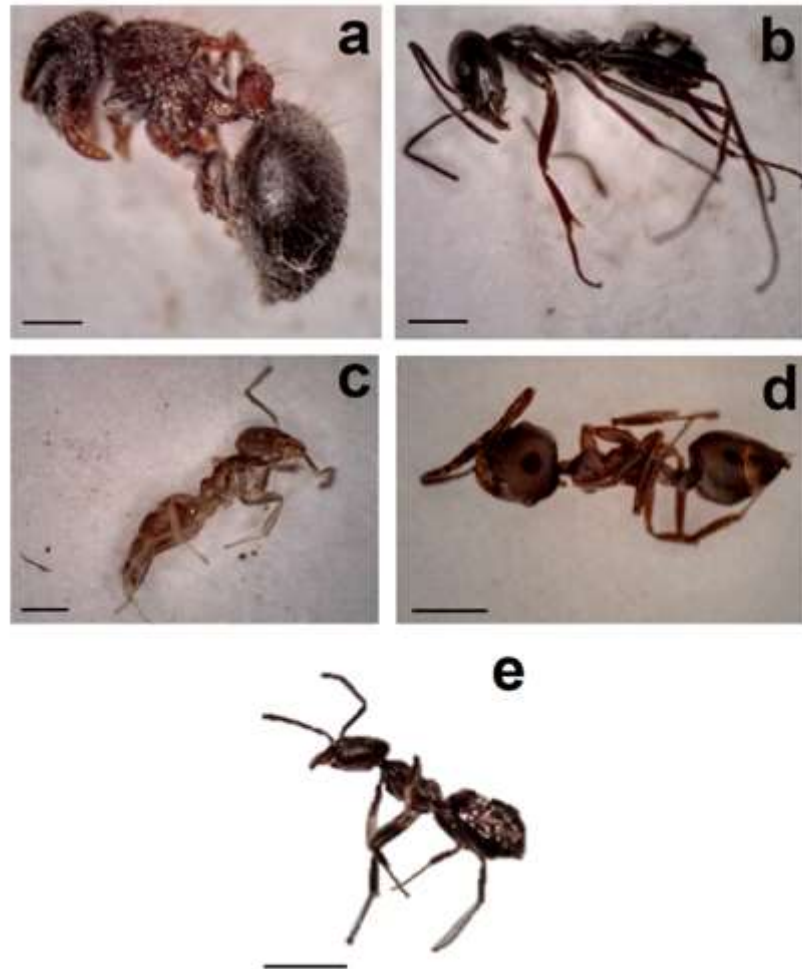
Analisis BLAST dan BOLD

Sepuluh individu koya yang dikumpul terdiri daripada tiga spesies dengan peratusan persamaan sebanyak 98.93-99.73% daripada analisis BLAST manakala 95.83-100% daripada analisis BOLD. Lima individu semut terdiri daripada lima spesies yang berbeza dengan peratusan persamaan 84.43-100% daripada analisis BLAST dan 90.78-100% daripada analisis BOLD. Kesemua sampel koya dan semut yang telah dikenal pasti menerusi kaedah molekul BLAST dan BOLD disenaraikan dalam Jadual 1 dan 2.

Melalui hasil daripada BLAST dan BOLD, tiga spesies koya yang dikenal pasti adalah *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell), *Ferrisia virgata* (Cockerell) dan *Planococcus minor* (Maskell), manakala lima spesies semut adalah *Anoplolepis gracilipes* (Smith), *Meranoplus bicolor* (Guérin-Méneville), *Iridomyrmex anceps* (Roger), *Tapinoma indicum* (Forel) dan genus *Crematogaster* sp. Lund. Untuk individu semut V1 (*Crematogaster* sp.), hasil analisis berjaya mengenal pasti genus dengan nilai peratusan identiti daripada BLAST sebanyak 85% dan peratusan persamaan daripada BOLD sebanyak 90.78%. Gambarfoto habitus untuk setiap spesies koya dan semut kajian ini ditunjukkan dalam Rajah 1 dan 2.



Rajah 1 Habitus spesies koya yang berasosiasi dengan tanaman nanas, a, dorsal *Dysmicoccus brevipes*; b, ventral *D. brevipes*, c, dorsal *Planococcus minor*, d, ventral *P. minor*, e, dorsal *Ferrisia virgata*; f, ventral *F. virgata*



Rajah 2. Habitus spesies semut yang berasosiasi dengan tanaman nanas; a, *Meranoplus bicolor*; b, *Iridomyrmex anceps*; c, *Anoplolepis gracilipes*; d, *Crematogaster* sp.; e, *Tapinoma indicum*. Bar skala= 0.5mm

Analisis Neighbour-Joining

Berdasarkan jarak genetik daripada kajian ini, nilai pencapahan inter-spesies untuk koya adalah 0.102-0.107, intra-spesies adalah 0.02-0.03 dan jarak berpasangan (*pairwise*) antara individu koya adalah 0.00-0.13. Manakala kecapahan inter-spesies untuk semut pula adalah 0.18- 0.28. Nilai jarak genetik sampel kajian ditunjukkan dalam Jadual 3 dan 4.

Pohon NJ untuk spesies koya berjaya dijana dengan spesies kajian berada dalam klad dalaman dan terpisah dengan kumpulan luaran (Rajah 3). Setiap kumpulan spesies kajian berjaya membentuk monofiletik mengikut jujukan rujukan masing-masing dengan sokongan butstrap sebanyak 99-100%. Begitu juga dengan pohon NJ spesies semut kajian, pembentukan klad dalaman spesies kajian terpisah dengan kumpulan luaran berada di dasar pohon (Rajah 4). Setiap kumpulan spesies kajian membentuk monofiletik mengikut jujukan rujukan masing-masing dengan sokongan daripada butstrap sebanyak 99-100%.

Jadual 1. Senarai spesies koya kajian yang dikumpul daripada ladang nanas di Bintulu dengan nilai peratus dan peratusan persamaan daripada BLAST dan BOLD

No	Tempat	Kod dan Nombor Kemasukan NCBI		BLAST					BOLD		
				Skor Maksimum	Jumlah Skor	Liputan Pertanyaan (%)	Nilai E	Peratus Identiti (%)	Nombor Akses	Peratusan persamaan (%)	
1	Kuala Tatau	KTMPA	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	682	682	85%	0	99.73	MG869724.1	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	100
2		KTMPA	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	776	776	97%	0	99.53	LC121502.1	Hemiptera	100
3		KTMPB	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	684	684	85%	0	99.73	MG869724.1	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	100
4		KTMPB	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	684	684	85%	0	99.73	MG869724.1	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	100
5	UPMKB	MU1	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	776	776	97%	0	99.53	LC121502.1	Hemiptera	100
6		MU2	<i>Dysmicoccus brevipes</i>	776	776	97%	0	99.53	LC121502.1	Hemiptera	100
7	Samarakan	MS1	<i>Ferrisia virgata</i>	671	671	85%	0	98.93	AY179434.1	<i>Pseudococcus comstocki</i>	95.83
8		MS2	<i>Ferrisia virgata</i>	671	671	85%	0	98.93	AY179434.1	<i>Pseudococcus comstocki</i>	95.83
9		MS3	<i>Planococcus minor</i>	782	782	99%	0	99.31	LC121494.1	<i>Planococcus minor</i>	100
10		MS4	<i>Ferrisia virgata</i>	671	671	85%	0	98.93	AY179434.1	<i>Pseudococcus comstocki</i>	95.83

Jadual 2. Senarai spesies semut kajian yang dikumpul daripada ladang nanas di Bintulu dengan nilai peratus identiti dan peratusan persamaan daripada BLAST dan BOLD

No	Tempat	Kod dan Nombor Kemasukan NCBI		BLAST					BOLD		
				Skor Maksimum	Jumlah Skor	Liputan Pertanyaan (%)	Nilai E	Peratus Identiti (%)	Nombor Akses	Peratusan Persamaan (%)	
1	Kuala Tatau	KTA	<i>Anoplolepis gracilipes</i>	778	778	60%	0	99.07	KX051604.1	<i>Anoplolepis gracilipes</i>	99.84

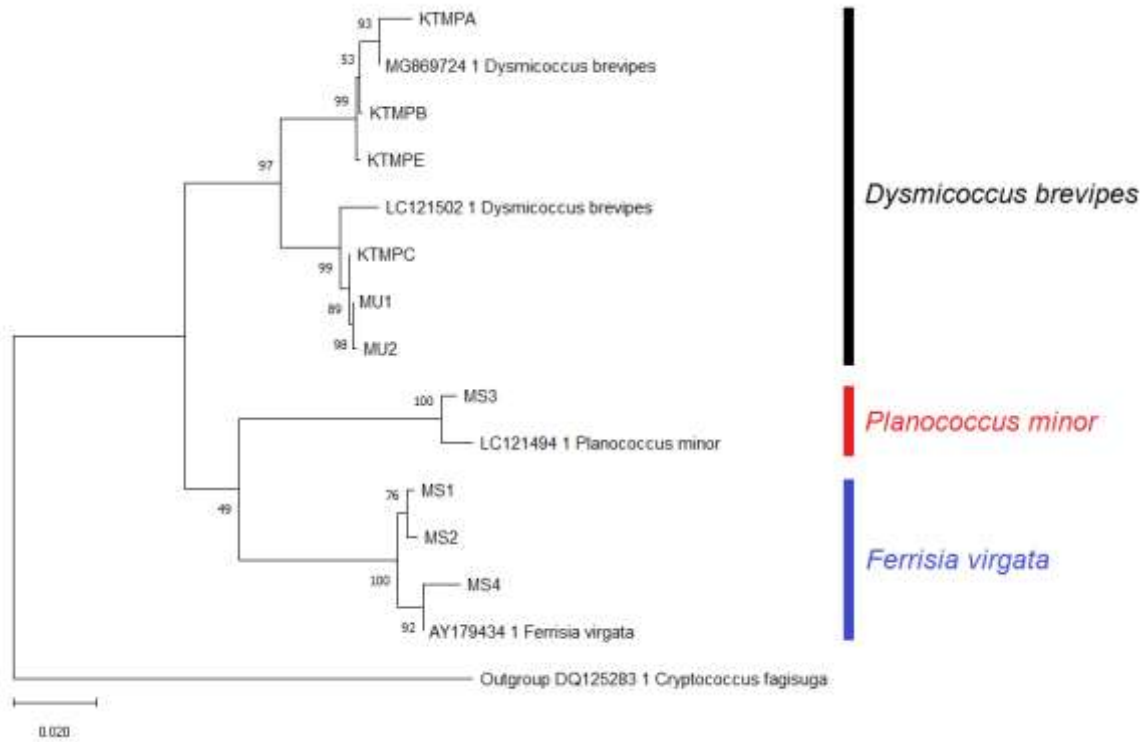
2		KTB ON738364	<i>Meranoplus bicolor</i>	1218	1218	97%	0	97.74	OK183534.1	<i>Meranoplus bicolor</i>	98.9
3	UPMKB	Z2 ON738365	<i>Iridomyrmex anceps</i>	946	946	89%	0	92.92	MH754295.1	<i>Iridomyrmex anceps</i>	100
4		T1 ON738366	<i>Tapinoma indicum</i>	1122	1122	86%	0	100	MT522033.1	<i>Tapinoma indicum</i>	100
5	Samarakan	V1 ON738367	<i>Crematogaster vagula</i>	568	568	85%	5e-157	84.43	MH754501.1	<i>Crematogaster rogenhoferi</i>	90.78

Jadual 3. Nilai jarak genetik pasangan demi pasangan (*pairwise*) antara individu koya kajian menggunakan model Kimura 2-parameter

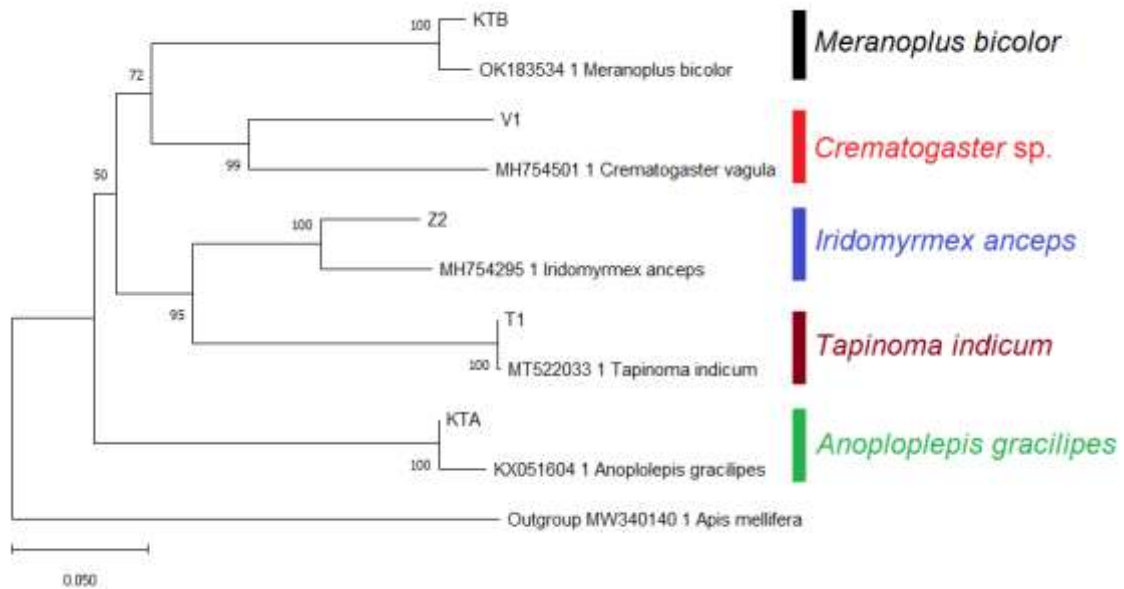
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	KTMPA <i>Dysmicoccus brevipes</i>	-									
2	KTMPC <i>Dysmicoccus brevipes</i>	0.05	-								
3	KTMPE <i>Dysmicoccus brevipes</i>	0.02	0.04	-							
4	KTMPB <i>Dysmicoccus brevipes</i>	0.01	0.04	0.00	-						
5	MU1 <i>Dysmicoccus brevipes</i>	0.05	0.00	0.04	0.04	-					
6	MU2 <i>Dysmicoccus brevipes</i>	0.05	0.00	0.04	0.04	0.00	-				
7	MS1 <i>Ferrisia virgata</i>	0.11	0.10	0.09	0.09	0.10	0.10	-			
8	MS2 <i>Ferrisia virgata</i>	0.10	0.11	0.09	0.09	0.10	0.10	0.00	-		
9	MS3 <i>Planococcus minor</i>	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.11	0.11	0.11	-	
10	MS4 <i>Ferrisia virgata</i>	0.10	0.13	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12	0.09	-

Jadual 4. Nilai jarak genetik berpasangan (*pairwise*) antara individu semut kajian menggunakan model Kimura 2-paramater

		1	2	3	4	5
1	KTA <i>Anoplolepis gracilipes</i>	-				
2	KTB <i>Meranoplus bicolor</i>	0.25	-			
3	Z2 <i>Iridomyrmex anceps</i>	0.25	0.23	-		
4	T1 <i>Tapinoma indicum</i>	0.28	0.29	0.18	-	
5	V1 <i>Crematogaster sp.</i>	0.25	0.24	0.27	0.27	-



Rajah 3 Pohon *Neighbour-Joining* spesies koya kajian bersama jujukan rujukan daripada GenBank. Pohon dijana dengan menggunakan kriteria jarak dan nilai sokongan butstrap dinyatakan pada dahan pohon



Rajah 4 Pohon *Neighbour-Joining* spesies semut kajian bersama jujukan rujukan daripada GenBank. Pohon dijana dengan menggunakan kriteria jarak dan nilai sokongan butstrap dinyatakan pada dahan pohon

PERBINCANGAN

Pengenalpastian Spesies Koya Dan Semut

Kaedah barkod DNA adalah tidak asing dalam kajian pengenalpastian spesies sama ada untuk haiwan ataupun tumbuhan dan begitu juga dengan serangga. Dengan menggunakan analisis DNA barkod, spesies kriptik atau spesies yang sukar untuk dicamkan dengan menggunakan ciri morfologi dapat dikenalpasti dengan kaedah molekul, contohnya kajian daripada Malausa et al. (2011) berjaya membezakan spesies kriptik koya yang mempunyai morfologi yang hampir menyerupai dengan *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti) dan *Ps. maritimus* (Ehrhorn). Begitu juga dengan kajian daripada Schär et al. (2022) berjaya mengenalpasti spesies novel semut *Lasius ponderosae* yang merupakan kriptik spesies kepada *L. niger* (L.). Dalam kajian ini, tiga spesies koya berjaya dikenalpasti daripada 10 sampel kajian iaitu spesies *Dysmicoccus brevipes*, *Ferrisia virgata* dan *Planococcus minor* dengan menggunakan kaedah molekul. Begitu juga dengan lima individu semut, yang dikenalpasti sebagai *Anoplolepis gracilipes*, *Tapinoma indicum*, *Iridomyrmex anceps*, *Crematogaster* sp. dan *Meranoplus bicolor*. Pengenalpastian kesemua spesies koya dan semut kajian mendapat hasil persamaan 98-100% samada daripada BLAST atau BOLD. Menurut Avise (2000), pencapahan intraspesifik adalah jarang melebihi 2% dan kebanyakannya kurang daripada 1%. Ini dibuktikan dalam kajian, yang mana jarak kecapahan antara spesies koya adalah 10.2-10.7% dan 18-28% untuk semut.

Pengenalpastian spesies koya dan semut kajian juga disokong dengan penjanaan pohon NJ yang mana hasilnya menunjukkan pembentukan kumpulan spesies monofiletik untuk spesies kajian. Pembentukan klad yang monofiletik ini juga disokong kuat dengan nilai butstrap yang tinggi (99-100%). Pembentukan pohon NJ bukanlah untuk membina hubungan filogeni antara spesies kajian, namun tujuannya adalah untuk menubuhkan spesies monofiletik yang sekaligus menyokong pengenalpastian spesies melalui kaedah DNA barkod (Hebert et al. 2003).

Assosiasi Koya Dengan Nanas

Terdapat beberapa spesies serangga perosak yang telah direkodkan untuk tanaman nanas, dan koya merupakan antara serangga perosak utama untuk tanaman ini. Spesies *Dysmicoccus brevipes* atau dikenali juga dengan koya nanas merah jambu merupakan spesies koya perosak utama untuk tanaman nanas. *D. brevipes* ini diberikan nama sebagai koya nanas merah jambu kerana mempunyai badan yang berwarna merah jambu dan berhabitat di pangkal pohon, daun dan buah nanas. Dalam kajian ini, *D. brevipes* dijumpai di Kuala Tatau dan di ladang nanas UPMKB. Spesies ini menyebabkan kerosakan dengan memakan sap tumbuhan dan juga merupakan vektor untuk penyakit *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaV) (Dos Santos Ferreira et al. 2015; Sartiami 2006). Penyakit PMWaV kepada tanaman nanas menyebabkan daun tanaman layu, mengurangkan hasil dan kualiti nanas sekaligus menyumbang kepada kerugian kepada petani (Jahn et al. 2003) (Rajah 5).



Rajah 5. Kesan dan simptom penyakit *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaV) yang ditemui di ladang nanas kajian. Pokok tanaman nanas kelihatan layu, daun berwarna merah kecoklatan dan kelihatan terbakar pada hujung daun

Spesies *Ferrisia virgata* atau dikenali juga dengan koya berjalar merupakan spesies koya perosak kepada pelbagai jenis tumbuhan. *Ferrisia virgata* merupakan perosak polifagus dan mampu menyerang beberapa jenis sayuran dan tanaman hiasan (Ata et al. 2019). Dalam kajian ini, spesies ini dijumpai di ladang nanas di Samarakan. Spesies *F. virgata* dikatakan spesies koya polifagus yang mempunyai perumah yang pelbagai dan juga mengancam tanaman pertanian seperti kapas, koko dan pisang (García Morales et al. 2016). Spesies koya *F. virgata* akan memakan sap tumbuhan dan seterusnya mengganggu pertumbuhan sesuatu tanaman (Franco et al. 2009). Selain daripada itu, pengeluaran cecair tumbuhan hasil pemakanan koya yang dipanggil *honeydew* atau nektar boleh mendatangkan pertumbuhan kulat dan kulapuk yang seterusnya menyebabkan kerosakan pada tanaman atau buah-buahan (Franco et al. 2009). Beberapa serangan *F. virgata* ke atas tanaman nanas telah direkodkan oleh kajian terdahulu seperti Ben-Dov (2013), Culik et al. (2009) dan dicatatkan juga dalam Laporan Biosekuriti New Zealand (Biosecurity Act 1993).

Dalam kajian ini, spesies *Planococcus minor* direkodkan juga berasosiasi dengan tanaman nanas dan sampel dikumpul dari lokaliti Samarakan. Spesies ini pernah direkodkan oleh Ben-Dov (1994) dan Culik et al. (2009) menyerang tanaman nanas dan dikenali sebagai koya pohon menjalar. Spesies *Pl. minor* merupakan vektor untuk penyakit *Piper Yellow Mottle Virus* (PYMoV) pada tanaman lada hitam (De Silva et al. 2002) dan ia juga merupakan spesies koya polifagus yang mempunyai tumbuhan perumah yang pelbagai (García Morales et al. 2016). Serangga koya ini mendatangkan masalah pada tanaman apabila populasi mereka meningkat dan aktiviti menghisap sap tumbuhan menyebabkan kerosakan simptom daun layu (Nguyen et al. 2016). Pembentukan kulat dan kulapuk daripada *honeydew* yang dihasilkan oleh koya membantutkan proses fotosintesis tumbuhan seterusnya menyebabkan pengurangan nilai kepada hasil tanaman tersebut (Joy et al. 2012).

Asosiasi Semut Dengan Koya Dan Nanas

Dalam beberapa kajian lepas, semut telah dilaporkan sebagai agen penyebaran bagi spesies koya dan juga arthropoda yang lain (Gullan & Kosztarab 1997; Malsch et al. 2001; Ranjan 2006). Kehadiran semut membolehkan koya menyebarkan populasinya dan menghisap kuantiti sap pokok perumah dengan kadar yang lebih tinggi (Degen & Gersani 1989). Malah, beberapa spesies semut juga telah terbukti bertindak sebagai agen perlindungan bagi koya dengan melindungi mereka daripada musuh semulajadi dan persekitaran yang tidak diingini (Franco et al. 2009; Helms & Vinson 2002).

Dalam kajian ini, lima spesies semut yang dikumpul berasosiasi dengan tanaman nanas adalah *Anoplolepis gracilipes*, *Tapinoma indicum*, *Iridomyrmex anceps*, *Crematogaster* sp. dan *Meranoplus bicolor*. Semut mempunyai hubungan simbiosis bersaling dengan koya kerana semut memakan *honeydew* yang dihasilkan oleh koya, manakala koya pula menggunakan semut sebagai agen dalam pergerakan sekaligus membantu menyebarkan koloni koya dengan lebih meluas (Joy et al. 2012). Spesies *A. gracilipes* dan *M. bicolor* dikumpul dari lokaliti Kuala Tatau bersama spesies koya *D. brevipes*. Spesies *A. gracilipes* pernah direkodkan berasosiasi dengan *D. brevipes* di tanaman nanas (Jose 2017), manakala *M. bicolor* pula pernah direkodkan berasosiasi dengan *F. virgata* di tanaman jambu batu (Burikam & Kantha 2014).

Spesies *T. indicum* dan *I. anceps* pula dikumpul dari ladang UPMKB juga bersama dengan spesies koya *D. brevipes*. Kajian daripada Wetterer (2009) merekodkan spesies terdekat kepada *T. indicum*, iaitu *T. melanocephalum* (Fabricius) direkodkan sebagai perosak tanaman kerana bersimbiosis dengan koya. Spesies *I. anceps* pernah direkodkan berasosiasi dengan koya *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti) dan *P. calceolariae* (Maskell), selain direkodkan di tanaman anggur dan sitrus (Lester et al. 2003). Hanya satu spesies semut yang dikumpul di lokaliti Samarakan iaitu *Crematogaster* sp. bersama-sama dua spesies koya iaitu *F. virgata* dan *Pl. minor*. Semut *Crematogaster* sp. pernah direkodkan hadir bersama koya *Dysmicoccus obesus* (Lobdell) pada pokok pinus dan *C. nigriceps* Emery direkodkan bersama koya *Acaciococcus* spp. pada pokok akasia (Sundararaj & Mani 2016). Selain daripada itu, *Crematogaster* sp. juga pernah direkodkan bersama spesies koya perosak pokok kopi (Sundararaj & Mani 2016).

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, tiga spesies koya *Dysmicoccus brevipes*, *Ferrisia virgata* dan *Planococcus minor* dan lima spesies semut *Anoplolepis gracilipes*, *Tapinoma indicum*, *Iridomyrmex anceps*, *Crematogaster* sp. dan *Meranoplus bicolor* yang berasosiasi dengan tanaman nanas berjaya dikenalpasti dengan menggunakan analisis DNA barkod. Pengenalpastian spesies berjaya mendapatkan hasil persamaan 98-100% daripada analisis BLAST dan BOLD, selain pembentukan klad spesies monofiletik dengan sokongan butstrap yang tinggi (99-100%) melalui analisis NJ. Maklumat hubungan asosiasi antara spesies koya, semut dan nanas boleh digunapakai dalam membangunkan strategi Pengurusan Perosak Bersepadu (IPM) yang lebih berkesan untuk spesies perosak iaitu koya yang disasarkan di kawasan penanaman nanas di Bintulu, Sarawak. Oleh itu, pengusaha turut perlu mengawal populasi semut di kebun nanas mereka sama ada secara mekanikal, kimia atau biologi. Pengurangan dan pengawalan populasi semut dapat menghadkan aktiviti penyebaran koya, sekaligus meningkatkan pengeluaran nanas dan secara langsung meningkatkan pendapatan pekebun nanas di Bintulu.

PENGHARGAAN

Penulis merakamkan penghargaan dan terima kasih kepada pihak Sarawak Research and Development Council (SRDC) kerana telah memberi penajaan melalui geran RDCRG/RIF/2019/16.

PERCANGGAHAN KEPENTINGAN

Tiada.

RUJUKAN

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- Ata, T.E., El-Awady, S.M., El-Khouly, A.S. & Metwally, M.M. 2019. population density of the striped mealybug *Ferrisia virgata* (Ckll.)(Hemiptera: Pseudococcidae) on the ornamental corn shrubs, *Dracena fragrans* in relation to biotic and abiotic factors in Al-Zohria Gardens, Cairo, Egypt. *Journal of Plant Protection and Pathology* 10(2): 141-146.
- Avise, J.C. 2000. Phylogeography. *The History and Formation of Species*. Harvard University Press: Massachusetts.
- Ben-Dov, Y. 2013. Cyber Extension: ScaleNet, Pseudococcidae Catalogue. <http://scalenet.info/catalogue/ferrisia%20virgata/> [30 May 2022]
- Ben-Dov, Y. 1994. *A Systematic Catalogue of the Mealybugs of the World (Insects: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidea)*. Intercept Limited: Andover.
- Bernamea. 2022. Sarawak mungkin atasi Johor sebagai pengeluar nanas terbesar negara <https://www.bernama.com/bm/news.php?id=2065963> [2 February 2022]
- Biosecurity Act. 1993. *Import Health Standard. Commodity Sub-Class: Fresh Fruit/Vegetables Pineapple, Ananas comosus from Fiji*. New Zealand: Ministry of Agriculture and Forestry.
- Brady, S.G., Gadau, J. & Ward, P.S. 2000. Systematics of the ant genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae): A preliminary analysis using data from the mitochondrial gene cytochrome oxidase I. Hymenoptera: Evolution, biodiversity and biological control. *Fourth International Hymenoptera Conference Canberra, Australia, January 1999*, pp. 131-139.
- Burikam, I. & Kantha, D. 2014. Mutualistic relationships between the shield ant, *Meranoplus bicolor* (Guérin-Méneville) (Hymenoptera: Formicidae) and honeydew-producing hemipterans in guava plantation. *Sociobiology* 61(3): 286-292.
- Culik, M.P., Ventura, J.A. & dos S. Martins, D. 2009. Scale insects (Hemiptera: Coccidae) of pineapple in the State of Espírito Santo, Brazil. *Acta Horticulturae* 822: 215-218.
- Degen, A. A., & Gersani, M. 1989. Environmental effects on activity and honeydew collection by the weaver ant *Polyrhachis simplex* (Hymenoptera: Formicidae) when attending the mealybug *Trabutina* sp. (Homoptera: Pseudococcidae). *Journal of Zoology* 218(3): 421-432.
- Dey, K.K., Green, J.C., Melzer, M., Borth, W. & Hu, J.S. 2018. Mealybug wilt of pineapple and associated viruses. *Horticulturae* 4(52): 1-21.
- Dos Santos Ferreira, K.D., Dolinski, C., De Freitas Ferreira, T. & Moreira de Souza, R. 2015. Potential of entomopathogenic nematodes (Rhabditida) for control of pink pineapple

- mealybug adult females, *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), under laboratory conditions. *Nematoda* 2: e092015.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Franco, J.C., Zada, A. & Mendel, Z. 2009. Novel approaches for the management of mealybug pests. In I. Ishaaya and A.R. Horowitz (eds.). *Biorational Control of Arthropod Pests*, pp. 233-278. Dordrecht: Springer.
- García Morales, M., Denno, B.D., Miller, D.R., Miller, G.L., Ben-Dov, Y. & Hardy, N.B. 2016. ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics. *Database* 2016: 1-5.
- Gullan, P.J. & Kosztarab, M. 1997. Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology* 42(1): 23-50.
- 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.
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S. & De Waard, J.R. 2003. Barcoding animal life: Cytochrome C oxidase subunit 1 divergence among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270: S96-S99.
- Helms, K. R., & Vinson, S. B. 2002. Widespread association of the invasive ant *Solenopsis invicta* with an invasive mealybug. *Ecology* 83(9): 2425-2438.
- Jahn, G.C., Beardsley, J.W. & González-Hernández, H. 2003. A review of the association of ants with mealybug wilt disease of pineapple. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 36: 9-28.
- Jose, J. 2017. Host diversity of mealybugs in Thrissur District, Kerala State, India. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research* 3(3): 973-979.
- Joy, P.P., Anjana, R. & Soumya, K.K. 2012. Insect pests of pineapple and their management. In. Pandey, A.K. & Mall, P. (eds.). *Insect Pests Management of Fruit Crops*, pp. 471-492. Biotech: New Delhi.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111-120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. & Thompson, J.D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

- Lester, P.J., Baring, C.W., Longson, C.G. & Hartley, S. 2003. Argentine and other ants (Hymenoptera: Formicidae) in New Zealand horticultural ecosystems: Distribution, hemipteran hosts, and review. *New Zealand Entomologist* 26(1): 79-89.
- Lembaga Perindustrian Nanas Malaysia. 2020. Laporan Tahunan LPNM 2020 <https://www.parlimen.gov.my/ipms/eps/2022-07-21/ST.78.2022%20%20ST%2078.2022.pdf> [15 March 2022]
- Malausa, T., Fenis, A., Warot, S., Germain, J.F., Ris, N., Prado, E., Botton, M., Vanlerberghe-Masutti, F., Sforza, R., Cruaud, C. & Couloux, A. 2011. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied Entomology* 135(1-2): 142-155.
- Malsch, A.K.F., Kaufmann, E., Heckroth, H.P., Williams, D. J., Maryati, M. & Maschwitz, U. 2001. Continuous transfer of subterranean mealybugs (Hemiptera, Pseudococcidae) by *Pseudolasius* spp.(Hymenoptera, Formicidae) during colony fission?. *Insectes Sociaux* 48(4): 333-341.
- Mohammed, M.A., Aman-Zuki, A., Yusof, S., Md-Zain, B.M. & Yaakop, S. 2017. Prevalence and evolutionary history of endosymbiont *Wolbachia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) associated with *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) infesting carambola. *Entomological Science* 20(1): 382-395.
- Nguyen, T.K., Vo, T.K.L., Nguyen, T.L., Tran, T.T.A. & Nguyen, H.H.T. 2016. Phytosanitary irradiation of the mealybugs, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Planococcus lilacinus*, and *Planococcus minor* (Hemiptera: Pseudococcidae), infesting dragon fruit in Vietnam. *Florida Entomologist* 99(2): 159-165.
- Rambaut, A. 2018. FigTree v. 1.4. 4. Computer program and documentation distributed by the author. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [20 May 2022]
- Ranjan, R. 2006. Economic impacts of pink hibiscus mealybug in Florida and the United States. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment* 20(5): 353-362.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D. 2007. BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7(3): 355-364.
- Sartiami, D., 2006. Keberadaan *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) sebagai vektor *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaV) pada tanaman nanas. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 11(1): 1-6.
- Salleh, N.F.M. & Sukadarin, E.H. 2018. Defining human factor and ergonomic and its related issues in Malaysia Pineapple Plantations. *MATEC Web of Conferences* 150: 05047.
- Schär, S., Talavera, G., Rana, J.D., Espadaler, X., Cover, S.P., Shattuck, S.O. & Vila, R. 2022. Integrative taxonomy reveals cryptic diversity in North American *Lasius* ants, and an overlooked introduced species. *Scientific Reports* 12(1): 1-12.

- De Silva, D.P.P., Jones, P. & Shaw, M. W. 2002. Identification and transmission of Piper yellow mottle virus and Cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka. *Plant Pathology* 51(5): 537-545.
- Sinar Harian 2022. MAFI sasar 4,000 hektar tanaman nanas di Sarawak menjelang 2025 <https://www.sinarharian.com.my/article/178088/BERITA/Nasional/MAFI-sasar-4000-hektar-tanaman-nanas-di-Sarawak-menjelang-2025> [31 January 2022]
- Sundararaj, R. & Mani, M. 2016. Forest plants. In: Mani, M. & Shivaraju, C. (eds.). *Mealybugs and their Management in Agricultural and Horticultural Crops*, pp. 607-619. Springer: New Delhi.
- Swofford, D.L. 2002. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Wetterer, J.K. 2009. Worldwide spread of the ghost ant, *Tapinoma melanocephalum* (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* 12: 23-33.
- Yaakop, S., van Achterberg, C., Idris, A.B. & Aman, A.Z. 2013. Freezing method as a new non-destructive modification of DNA extraction. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 36(4): 373-392.