รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** แผนบูรณาการวิจัยและพัฒนามาตรการสุขอนามัยพืชและเฝ้าระวังศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร
2. **โครงการวิจัย** ชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vectors) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** ชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcidae) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Species of Pineapple Mealybug Wilt-Associated found in Pineapple at Eastern and Southern Thailand (Hemiptera: Pseudococcidae)

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	กาญจนา วาระวิชะนี	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcus) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt; PMWaV) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 เพื่อทราบชนิดของเพลี้ยแป้งและชนิดของโรคไวรัสในสับปะรด รวมทั้งความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหนะนำโรคในสับปะรด โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในแปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันตก ทั้งหมด 41 แปลง 122 ตัวอย่าง ทำการสุ่มตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากต้นที่แสดงอาการโรคเหี่ยวอย่างชัดเจน ตรวจจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้งและตรวจสอบเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ PMWaV 2 ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว พบเชื้อไวรัสจำนวน 117 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่เหลือมาทำการจำแนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุลและสัณฐานวิทยา พบเพลี้ยแป้งจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู *Dysmicococus brevipes* (Cockerell) 2. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทา *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley นอกจากนี้นำตัวอย่างต้นสับปะรดที่พบเพลี้ยแป้งตรวจหาเชื้อไวรัส จำนวน 8 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัสทั้ง 8 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ซึ่งชนิดเพลี้ยแป้งอาจไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสเนื่องจากตรวจพบเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพูและเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาแต่ในเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาพบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเพลี้ยแป้งมีความสัมพันธ์กับต้นสับปะรดที่พบเชื้อไวรัสทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ และพบว่าเพลี้ยแป้งทุกระยะสามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสได้แม้จะเป็นตัวอ่อนระยะที่

1 มีขนาดตัวเล็กและสามารถใช้ตัวอย่างเพลี้ยแป้งเพียง 1 ตัวในการตรวจเชื้อไวรัสได้ และเมื่อทำการศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู พบว่า เพลี้ยแป้งมีอายุ 65 - 110 วัน สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ สามารถวางไข่ได้ประมาณ 250 -700 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุประมาณ 35 – 90 วัน เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำการศึกษาวิจัยด้านชีวโมเลกุลเข้ามาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดและตรวจสอบเชื้อไวรัส รวมทั้งข้อมูลชีววิทยาของเพลี้ยแป้งเบื้องต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อยอดในกระบวนการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้งและความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดเชื้อของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิดต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: เชื้อไวรัส PMWaV 1 PMWaV 2 โรคเหี่ยวสับปะรด เพลี้ยแป้ง

Abstract

Species of Pineapple Mealybug Wilt-Associated found in Pineapple at Eastern and Southern Thailand (Hemiptera: Pseudococcidae) was conducted from October 2017 to September 2019. Survey and specimen collecting were carried out from pine apple orchards in order to detected PMWaV 1 and PMWaV 2 from mealybug and pine apple. Forty-one plot, one hundred twenty two sample were tested and 117 sample were detected PMWaV 1 and PMWaV 2 and 5 species were not presented of Pineapple Mealybug Wilt. Two species of mealybug were identified by using molecular technic; *Dysmicococus brevipes* (Cockerell) and *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley. However, only one of *D. neobrevipes* that presented of Pineapple Mealybug Wilt. In addition, eight specimens of pine apple were tested and also detected PMWaV 1 and PMWaV 2. However, species of mealybug might not be specific to Pineapple Mealybug Wilt because of two species of mealybug and , mealybugs were found to be associated with both symptomatic and asymptomatic pineapple plants. It was found that all stages of mealybug can be a carrier of viral disease even though it is crawler and just only one sample of mealybug can be used for virus testing. And when studying the life cycle of pink pineapple mealybug, it was found that the life cycle of pink mealybug was 65 - 110 days. It can lay about 250 -700 eggs. The adult female is about 35 - 90 days. This study is the study of molecules applied in the classification and detection of virus. Including preliminary biological data of mealybugs so this data can be further studied in the process of transmission of the virus in mealybugs and their relationships in the future transmission of each type of mealybug.

Key words: PMWaV 1, PMWaV, Pineapple Mealybug Wilt, Mealybug

6. คำนำ

เพลี้ยแป้ง (mealybug) จัดอยู่ในวงศ์ Pseudococcidae ทั่วโลกมีรายงานแล้วมากกว่า 266 สกุล 7,800 ชนิด ซึ่งเพลี้ยแป้งจัดเป็นแมลงปากดูด (sucking insect) ที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งพืชสวน และพืชไร่ โดยดูดน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของพืช ทำให้บริเวณที่ถูกทำลายมีลักษณะผิดปกติ เช่น ใบเหลือง หงิกงอ ลำต้นคดงอ และเป็นพาหะ (vector) นำโรคสู่พืชอาศัยที่เข้าทำลายอีกด้วย Hull (2009) รายงานว่ามีเพลี้ยแป้ง จำนวน 19 ชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำโรคที่ก่อให้เกิดโรคจากเชื้อไวรัส เช่น banana streak, grapevine leafroll และ pineapple mealybug-wilt เป็นต้น สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการพบโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt) ครั้งแรกในปี 2532 ซึ่งสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตสับปะรดเป็นอย่างมาก โดยสาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อกลุ่ม closterovirus จำนวน 2 ชนิด คือ pineapple mealybug wilt-associated virus-1 (PMWaV1) ซึ่งต้นที่มีเชื้อชนิดนี้จะไม่แสดงอาการ ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตผิดปกติ และผลผลิตลดลงไปมากในปีถัดไป ในขณะที่ pineapple mealybug wilt-associated virus-2 (PMWaV2) จะแสดงอาหารเหี่ยวอย่างชัดเจน (Sether, 2001) โดยปลายใบจะเริ่มแห้ง พื้นใบสีม่วงแดงลามจากปลายเข้าสู่เนื้อใบ หลังจากนั้นใบจะแห้งคล้ายขาดน้ำ ขอบใบค่อยๆม้วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ใบสลดหรืออ่อนตัวอย่างชัดเจน สุดท้ายใบจะแห้งทั้งกอ รากส่วนใหญ่เน่าแห้งตายแสดงอาการตั้งแต่สับปะรดอายุ 6 เดือน ถึงเก็บเกี่ยวและระบาดมากในชวงบังคับให้ออกดอก เมื่อเกิดระบาดในระยะติดผลจะทำให้ผลเล็กแคระแกร็นคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน หามีการระบาดรุนแรงจะไม่ได้ผลผลิตเลย นอกจากนี้ เกลียวพันธ์และคณะ (2550) รายงานว่า แมลงพาหะนำเชื้อโรคได้แก่ เพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทา หรือ เพลี้ยแป้งน้อยหน่า *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley และมีมดคันไฟ *Solenopsis* sp. และมดง่าม *Pheidole* sp. เป็นตัวแพร่กระจายเพลี้ยแป้งไปยังต้นพืช อื่นๆภายในแปลง ซึ่งมดและเพลี้ยแป้งจะอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย ในปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีป้องกันกำจัดโรคได้ โดยมีเพียงคำแนะนำให้ใช้หน่อพันธุ์ปลอดโรคซึ่งการผลิตหน่อพันธุ์ปลอดโรคยังไม่เพียงพอต่อความต้องการและเป็นเพียงการแก้ปัญหาเฉพาะหน้า นอกจากนี้ในประเทศไทยยังไม่การศึกษาที่สามารถยืนยันได้ว่าเพลี้ยแป้งทั้ง 2 ชนิดมีความจำเพาะกับชนิดไวรัส PMWaV1 หรือ PMWaV2 ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปสู่การศึกษากลไกในการถ่ายทอดเชื้อ และการหาแนวทางในการป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคที่เหมาะสม โดยเฉพาะการป้องกันกำจัดทางชีวภาพ เช่น การใช้ตัวห้ำ (predator) และ ตัวเบียน (parasitoid) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาชนิดของเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับปะรดในครั้งนี้ เพื่อทราบลักษณะทางพันธุกรรมและสัณฐานวิทยาของเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรค

และความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของไวรัส รวมทั้งชนิดมดที่สัมพันธ์กับเพลี้ยแป้งและเป็นพาหนะในการแพร่กระจายของเพลี้ยแป้งและโรค ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่พบในแป้งสับปะรดที่เป็นโรคไวรัส
2. เชื้อไวรัสที่แยกได้จากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง
3. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถุงกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10%, กรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) กรดแกลเชียลอะซิติก (glacial acetic acid) ไซลีน (xylene) กรดคาร์บอลิค (carbolic acid) แอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) เอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) โคล์ฟออย (clove oil) และ แคนาดาบัลซัม (Canada balsam) เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร
5. สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอเช่น โกร่งบดตัวอย่าง ตู้แช่แข็ง -20C อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood) เครื่อง Thermal cycler เครื่อง Gel electrophoresis เครื่อง Gel Documentation UV-trans illuminator ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit),GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), Agarose gel (SeaKem) และ TE Buffer (10 mMTris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag HS Red DNA Polymerase และหลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
6. สารเคมีและ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
7. ชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอ (PCR clean up kit: Isolate PCR and Gel kit)
8. GeneRuler 100bp plus DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)
9. ชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบ One step RT-PCR
10. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermocycler), เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง (Ultracentrifuge), กล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy: TEM)

- วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่าง

1.1) เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกสับปะรด ในภาคตะวันออกและภาคตะวันตกโดยเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแปลงที่แสดงอาการของโรคเหี่ยว เก็บตัวอย่างใส่ในถุงกระดาษแล้วใส่ในถุงพลาสติก ในแต่ละจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างจะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมาก

ที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ จัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิด ศึกษาด้านโมเลกุลของทั้งเพลี้ยแป้งและไวรัสต่อไป

1.2) นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียดก่อนทำการดองตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% และ เก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 3 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมส่วนไคตินที่เหลือนำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen) ส่วนที่ 2 นำไปตรวจหาเชื้อไวรัสโดยทำการคัดแยกเพลี้ยแป้งตามระยะการเจริญเติบโต และส่วนที่ 3 นำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาข้อมูลชีววิทยา

1.3) การบันทึกข้อมูล

-บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ บันทึกรายละเอียดสภาพแวดล้อมของแปลงที่เก็บตัวอย่าง รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ เช่น ขนาดของแปลง อายุของสับปะรด ระยะห่างในการปลูก ปริมาณน้ำฝนและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ เป็นต้น

- บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยแป้ง เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของตัวอย่างก่อนทำการดองตัวอย่างพร้อมทั้งถายภาพประกอบ

-บันทึกรายละเอียดวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งชนิด ตั้งแต่ระยะไข่จนเป็นตัวเต็มวัย รวมทั้งลักษณะการสืบพันธ์ของเพลี้ยแป้ง

2. การศึกษาการจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคเหี่ยวสับปะรดด้านลำดับพันธุกรรมและสัณฐานวิทยา

2.1) <u>วิธีการศึกษาลำดับพันธุกรรม</u>

1) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ดองในแอลกอฮอล์ 95% ที่ไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป ดังวิธีการต่อไปนี้

1.1) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งมาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml โดยไคตินเพลี้ยแป้งที่เหลือนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาและเก็บไว้เป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)

1.2) สลายผนังเซลล์ (Lysis): โดยการเติม Lysis Buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วย พาราฟีน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม ATL Buffer ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ

1.3) จับสารพันธุกรรม (Bind DNA): เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอเขย่าอย่างเร็วประมาณ 15 วินาที

เติมสารละลายบัฟเฟร์ AL ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอ ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน tube และตกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

1.4) ล้างตะกอน (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 จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน

1.5) ตกตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้ง (Dry silica membrane): ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5 ไมโครลิตร

1.6) 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 เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2) ทำการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ C1J2195 และ TL2N3014 ในการเพิ่มปริมาณ DNA

Primer Name	Sequence	Base
C1J2195	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT	24
TL2N3014	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	25

สังเคราะห์ยีน mtCOI ของเพลี้ยแป้งจากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ MyTaq HS Red DNA Polymerase (Bioline, Cat No. BIO-21114) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

Nuclease free water	10.5	ไมโครลิตร
5x MyTaq Red Reaction Buffer	4	ไมโครลิตร
10 pmole CP-F	1	ไมโครลิตร
10 pmole CP-R	1	ไมโครลิตร
MyTaq HS DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) Predenaturation 94 °C 5 นาที

2) Three step-cycling 35 cycles

Denaturation	94 °C	30 วินาที
Annealing	50 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	10 นาที

3) ตรวจสอบ PCR product โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่ต้องการ 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 45 นาที

4) ทำการ ถอดรหัสข้อมูลดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย

5) นำข้อมูลของดีเอ็นเอที่ผ่านการถอดรหัส (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพลี้ยแป้งในวงศ์ Pseudococcidae ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999).

6) นำข้อมูล Barcode ที่ได้มาตรวจสอบชนิด กับ Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นอกจากนี้ยังสามารถนำ ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ ที่ได้มาศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมต่อได้อีก

7) การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยแป้งในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2.2) <u>วิธีการศึกษาด้านสัณฐานวิทยา</u>

1) นำไคตินที่เหลือจากการศึกษาพันธุกรรมและดองในแอลกอฮอล์ 70% ที่ไปทำสไลด์ถาวรโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Williams and Watson (1988) นำตัวอย่างสไลด์ที่ทำเสร็จเรียบร้อยไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอย่างน้อย 3 เดือน ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

2) ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยอาศัยหลักการทางด้านอนุกรมวิธานและวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการ

จำแนกเพลี้ยแป้งแต่ละชนิด และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแป้ง โดยในแนวทางวินิจฉัยจะมีทั้งข้อมูลสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกเพลี้ยแป้งในวงศ์ย่อยนี้จนถึงระดับชนิด

3) จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำบาร์โคด (bar code) ของตัวอย่างเพลี้ยแป้งแต่ละสไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

4) การบันทึกข้อมูล

-ชนิดของเพลี้ยแป้งและรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยแป้งเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่ และ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

3. วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1-2 ในต้นสับปะรดและในเพลี้ยแป้ง

<u>วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1-2</u>

1) สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากเพลี้ยแป้งด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Thermo Scientific

2) สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากสับปะรดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ด้วย GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit ยี่ห้อ Thermo Scientific โดยชั่งตัวอย่างใบพืชที่ต้องการทดสอบให้ได้น้ำหนัก 0.1 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย Plant RNA Lysis Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ แล้วเติม 96% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมเบาๆ ให้เข้ากันด้วยปิเปต แล้วดูดสารละลายปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ purification column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ให้ตะกอนอาร์เอ็นเอเกาะที่แผ่นเมมเบรนของ purification column และล้างด้วย Wash buffer1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และล้างด้วย Wash buffer2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย nuclease-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3) ตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1-2 จากแมลงและพืชด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยนำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 (Sether and Hu, 2002)

ส่วนประกอบปฏิกิริยา One step RT-PCR (Invitrogen)

-น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	4.5	ไมโครลิตร
-2x buffer	12.5	ไมโครลิตร

-ไพรเมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-ไพรเมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-SuperscripIIIRT/platinum Taqmix (Invitogen,0.1 unit/µl)	1	ไมโครลิตร
-อาร์เอ็นเอต้นแบบ	5	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	**ไมโครลิตร**

นำส่วนประกอบของปฏิกิริยา RT-PCR ผสมกันแล้วทำการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยการตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

<u>First strand cDNA synthesis</u>

ขั้นที่ 1:	60°C	นาน 30 นาที	1 รอบ

<u>Predenaturation</u>

ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 1 นาที	1 รอบ

<u>PCR amplification จำนวน 30 รอบ</u>

ขั้นที่ 3: (denature)	94°C	นาน 15 วินาที
ขั้นที่ 4: (anneal)	60°C	นาน 30 วินาที
ขั้นที่ 5: (extend)	68°C	นาน 1 นาที

<u>Final extension (optional)</u>

ขั้นที่ 6:	68°C	นาน 5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 7:	15°C	นาน 20 นาที	1 รอบ

4) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอเป้าหมาย(ชิ้นยีนเป้าหมาย)ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ด้วย 1% agarose gel ในสารละลาย 1X TAE buffer โดยหยด PCR product ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ 1% agarose gel มาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที และแช่น้ำเปล่า 15 นาที และนำแผ่น 1% agarose gel มาตรวจขนาดยีนเป้าหมายด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลการทดลอง

5) การโคลนดีเอ็นเอเป้าหมาย(ชิ้นยีนเป้าหมาย)เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega, USA.) โดยนำ PCR product ของดีเอ็นเอเป้าหมายมาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis ด้วย 0.8% agarose gel ในสารละลาย 1X TAE buffer ทำการตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอเป้าหมายตามขนาดที่ต้องการใส่หลอดไมโคทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักของเจลไม่เกิน 300 มิลลิกรัม และสกัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายออกจากเจลด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquickGel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนเป้าหมายที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector

(Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และถ่ายพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH 5 α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวของแบคทีเรียที่คาดว่ามีพลาสมิดลูกผสมอยู่ เพื่อนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST)

6) การบันทึกข้อมูล
- ชนิดของเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรด
- ชนิดของเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวในเพลี้ยแป้ง

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcus) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt; PMWaV) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในแปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันตกได้แก่จังหวัด ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ทั้งหมด 41 แปลง จำนวน 122 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้ตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ รายละเอียดดังนี้

1. การตรวจสอบหาเชื้อไวรัส PMWaV 1-2 ในเพลี้ยแป้งและต้นสับปะรด

โดยตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัส PMWaV-1 ด้วยคู่ไพร์เมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1 และ PMWaV-2 ด้วยคู่ไพร์เมอร์ Pa224-F2&Pa225-R2 พบเชื้อไวรัสจำนวน 117 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 5 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 นอกจากนี้นำตัวอย่างต้นสับปะรดที่พบเพลี้ยแป้งตรวจหาเชื้อไวรัส จำนวน 8 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัสทั้ง 8 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ซึ่งชนิดเพลี้ยแป้งอาจไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสเนื่องจากตรวจพบเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพูและเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาแต่ในเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาพบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจไวรัส PMWaV 1 และ PMWaV 2 จากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง (+ หมายถึงพบ – หมายถึงไม่พบ)

ตัวอย่างที่	PMWaV-1	PMWaV-2	ตัวอย่างที่	PMWaV-1	PMWaV-2
1	+	+	23	+	+
2	+	+	24	+	+
3	+	+	25	+	+
4	+	+	26	+	+
5	+	+	27	+	+
6	+	+	28	+	+
7	+	+	29	+	+
8	+	+	30	+	+
9	+	+	31	+	+
10	+	+	32	+	+
11	+	+	33	+	+
12	+	+	34	+	+
13	+	+	35	+	+
14	+	+	36	-	+
15	+	+	37	-	+
16	+	+	38	+	-
17	+	+	39	+	-
18	+	+	40	+	-
19	+	+	41	+	+
20	+	+	42	+	-
21	+	+	43	+	+
22	+	+	44	+	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	PMWaV-1	PMWaV-2	ตัวอย่างที่	PMWaV-1	PMWaV-2
45	+	-	84	+	+
46	+	+	85	+	+
47	+	+	86	+	+
48	+	+	87	+	+

49	+	-	88	+	+
50	-	-	89	+	+
51	-	-	90	+	+
52	+	-	91	+	+
53	+	-	92	+	+
54	+	-	93	+	+
55	+	-	94	+	+
56	-	-	95	+	+
57	+	-	96	+	+
58	+	-	97	+	+
59	+	+	98	+	+
60	-	-	99	+	+
61	+	+	100	+	+
62	+	+	101	+	+
63	+	-	102	+	+
64	+	-	103	+	+
65	-	-	104	+	+
66	+	-	105	+	+
67	+	+	106	+	+
68	+	+	107	+	+
69	+	-	108	+	+
70	+	-	109	+	+
71	+	-	110	+	+
72	+	-	111	+	+
73	+	-	112	+	+
74	+	-	113	+	+
75	+	+	114	+	+
76	+	+	115	+	+
77	+	+	116	+	+
78	+	+	117	+	+
79	+	+	118	+	+
80	+	+	119	+	+
81	+	+	120	+	+
82	+	+	121	+	+
83	+	+	122	+	+

2. จำแนกชนิดเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคเหี่ยวสับปะรดด้านลำดับพันธุกรรมและสัณฐานวิทยา

2.1 จำแนกชนิดเพลี้ยแป้งด้วยลำดับพันธุกรรม

การตรวจสอบชนิดของเพลี้ยแป้ง โดยนำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ตรวจสอบพบเชื้อไวรัสทั้ง PMWaV 1-2 จำนวน 117 ตัวอย่างมาทำการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางโมเลกุลและสัณฐานวิทยาประกอบ พบเพลี้ยแป้งจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู *Dysmicococus brevipes* (Cockerell) 2. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทา *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley พร้อมจัดทำ DNA barcode ของเพลี้ยแป้งจำนวน 41 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) โดยพบเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาเพียง 1 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามพบว่าเพลี้ยแป้งมีความสัมพันธ์กับต้นสับปะรดที่ตรวจพบเชื้อไวรัสทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ และพบว่าเพลี้ยแป้งทุกระยะสามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสได้แม้จะเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 มีขนาดตัวเล็กและสามารถใช้ตัวอย่างเพลี้ยแป้งเพียง 1 ตัวในการตรวจหาเชื้อไวรัส นอกจากเพลี้ยแป้งทั้ง 2 ชนิดข้างต้นยังพบเพลี้ยแป้งอีก 3 ชนิดจากการรวบรวมตัวอย่างจากแปลงที่ทำการสำรวจ ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งลาย *Ferrisia virgata* Cockerell 2. เพลี้ยแป้งจุดดำ *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 3. เพลี้ยแป้งแจ็คเบียส *Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel and Miller ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้พบในปริมาณที่น้อย

ตารางที่ 2 DNA Barcode ของเพลี้ยแป้งในสับปะรดที่เป็นพาหนะโรคไวรัส

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	DNA barcode
1	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAAAT AATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAGTAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
2	*D. brevipes*	CAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATA TTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGAT TAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGAC TTTTAATGCCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATC CTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTT TAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATT TGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTA GATAAAAATTTTAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
3	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT

4	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
5	*D. brevipes*	ATTAAAAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTA TTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTAT TATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAAT TGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATA CCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTA ATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAA TTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTAT TATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAA TTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTT
6	*D. brevipes*	ATTAAAAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTA TTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTAT TATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAAT TGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATA CCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTA ATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAA TTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTAT TATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAA TTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
7	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAATAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTGTTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
8	*D. brevipes*	AATAAAATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGGTTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
9	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT

		AATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTT
10	*D. brevipes*	GGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATT ATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTA AGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTT TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACAGGATGAACATTATATCCT CCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTA GTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTG ATCTATGATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGA TAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTGATTT
11	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAATAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTGTTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
12	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGGTTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
13	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
14	*D. brevipes*	ATTAAAAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTA TTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTAT TATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAAT TGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATA CCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTA ATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAA TTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTAT TATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAA TTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCT

15	*D. brevipes*	TTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATA ATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTA TTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCA TTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAAT CAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATT TTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTAT TACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAA TATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
16	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
17	*D. brevipes*	ATTAGGTTTATCAATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAATAATATTATTTA TTATATAATAATTACTATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAA TTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAAT ACCTTCCTTAATATTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTCT AATTAATCAAAATTTTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCA ATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTATTAATGATTTAACTTTATATATTTGATCTA TTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAA ATTTTAATATAAATTTCTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
18	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
19	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
20	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT

		ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
21	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAAAT AATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAGTAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
22	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
23	*D. brevipes*	AAAAATCAAAATAAATGTTGATATAGAATAGGATTTCCATTTCCTAAAGGATTAAAAAAATTTATATTGAAATTTTT ATCTAAAATAATTATAGTAATAGCTCTTGATAAAATAGGAATAGAAATAATAAGTAAAATAGTAGTAATAATAATAG ATCAAATATATAAAGTTAAATTATTTAAAAAAAAATTATTATTATTAATAATAAAAATAGAAACAATAAAATTAATTG AACTAAAAATTGATGATAAACCATTTAAATGTAAAGAAAAAATAATAAAATTTAAAGTGAAAAAATTTTGATTAATT AAAGGAGGATATAATGTTCATCCCGTATTAATATTATCTCTTAATAATATATTTAATAATATAAACATTAATGAAGG TATTAAAAGTCAAAATCTAAAATTATTTAATCGAGGAAATATTAAATCTCTTGATATTAATATTAAAGGTAATAATCA ATTACTTAATCTTCCAATAATAATTGGTATAGTTATAAAAAATTATAATAAATGCATGAATAGTAATTATTATATAAT AAATAATATTGTTATTAAAATTATTATTTATTTTATTAATTCAATTCGAATAATAAAACTTATAGATAAACCTAATAA ACCTGATCAAAATCCAAATATTAAATATATTATTCTGATATTTTTATGT
24	*D. brevipes*	AAAAATATCAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGA ATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATT ATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGA GATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATA TTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTT ATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTA ATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTC TATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGG AAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTTGG
25	*D. brevipes*	AAAAATATCAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGA ATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATT ATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGA GATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATA TTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTT ATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTA ATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTC TATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGG AAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTTGG

26	*D. brevipes*	TTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATT TAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTAT TAAGAGATAATATTAATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTA TTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTGTCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATT CCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAAT GGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTATATTTTAATTTTACCAGGATTT GGAGCTATATCTCAAATTATAAATCAAGAAAGTGGGAAATTAGAAATTTTTAGTAAAATTAATATAATTTTTGCTAT AATTTCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCATCATATATTTACTATTGGATTAGATATTGATACTCAATT ATATTTTATAATAGCTACAATAATCATTGCTATTCCAACAAGAATTAAAATTTTTAG
27	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGATTATTAGGTTTATCAATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAATAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCCTTAATATTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTCTAATTAATCAAAATTTTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTATTAATGATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTTAATATAAATTTCTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
28	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAATAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTGTTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
29	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAATAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTGTTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
30	*D. brevipes*	ATTAAAAAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTA TTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTAT TATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAAT TGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATA CCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTA ATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAA TTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTAT TATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAA TTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTT

31	*D. brevipes*	ATTAAAAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTA TTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTAT TATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAAT TGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATA CCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTA ATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAA TTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTAT TATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAA TTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
32	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
33	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
34	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
35	*D. brevipes*	ATTAAAAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTA TTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTAT TATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAAT TGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATA CCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTA ATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAA TTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTAT TATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAA TTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCT
36	*D. brevipes*	TTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATA ATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTA TTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCA TTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAAT CAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATT TTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTAT

		TACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAA TATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
37	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
38	*D. brevipes*	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATAT TATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATT AAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCC TCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTT GATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAG ATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
39	*D. brevipes*	GGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATT ATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTA AGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTT TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCT CCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTA GTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTG ATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGA TAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
40	*D. brevipes*	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAAT AAATTTAAATAATAATTTTAATAATAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTT CCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATATTATTAAGAGAT AATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTTCT TTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATT TTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTGTTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCTATTTT ATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCC TATTCTTTATCAACATTTATTT
41	*D. neobrevipes*	AAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGA ATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATT ATAATTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGA GATTTAATATTTCCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAAATATA TTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTT ATTATTTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTA ATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTC TATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGG AAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGAC

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคเหี่ยวสับปะรด

Genus *Dysmicoccus* Ferris, 1950

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างคล้ายรูปไข่ ค่อนข้างกลม หนวดมี 8 ปล้อง ช่องเปิดคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว มี 2 คู่ ขายาวเรียว ใกล้ฐานของเล็บมีลักษณะคล้ายเส้นขน 2 เส้น เรียกว่า digitules บริเวณปลายเส้นมีลักษณะเป็นปม (knob) ผิวหน้าเล็บหยักคล้ายฟัน กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มี 6-17 คู่ ไม่มีคู่ที่ 2 ที่อยู่บนส่วนหัว แต่ละอันประกอบด้วยรูเปิดรูปสามเหลี่ยม ขนปลายแหลมคล้ายรูปกรวยขนาดใหญ่จำนวน 5-6 เส้น และมีขนเส้นเล็กบาง โดยทั่วไปมีวงของแผ่นแข็ง ไม่มีท่อที่รอบปากท่อเป็นขอบแข็ง ขนด้านล่างของลำตัวมีลักษณะเป็นเส้นเรียวยาวคล้ายแส้ แต่อาจมีขนปลายแหลมคล้ายรูปกรวยปะปน ลอนปลายปล้องท้องแต่ละอันอาจมีหรือไม่มีแผ่นแข็ง (sclerotized area) ปรากฏอยู่ และไม่มีแถบแคบ

Dysmicoccus brevipes (Cockerell, 1893)

ชื่อสามัญ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู (pink pineapple mealybug)

รูปร่างลักษณะ

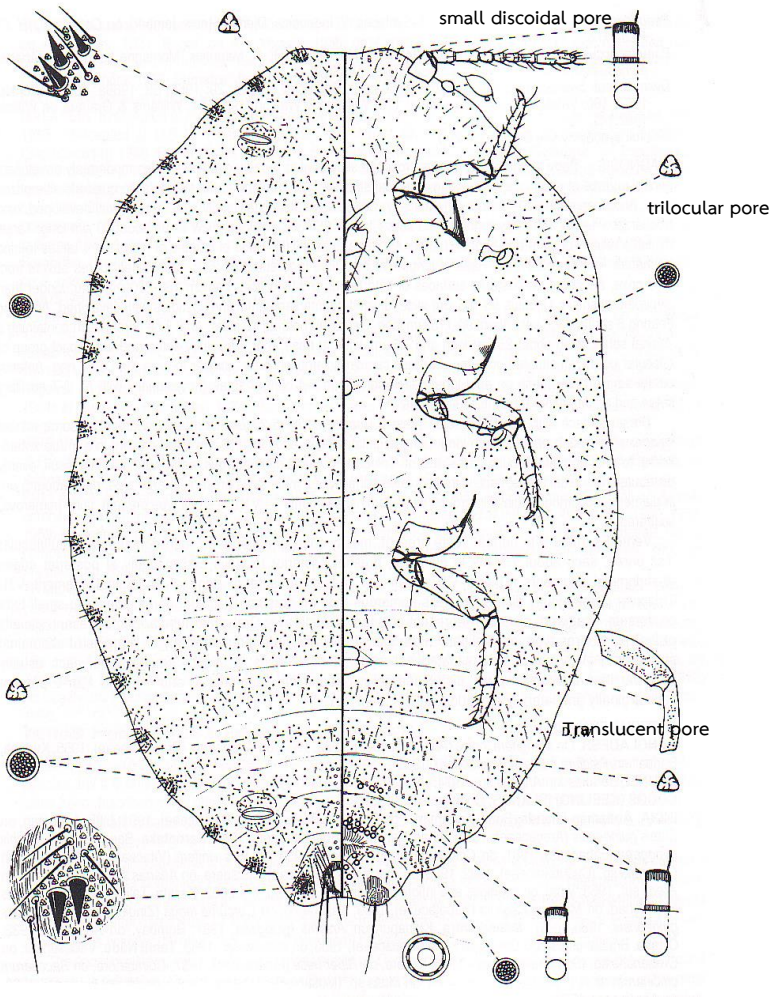
ลักษณะในธรรมชาติ ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างค่อนข้างกลม ผนังลำตัวสีชมพู ปกคลุมด้วยไขแป้งสีขาว ด้านข้างรอบลำตัวมีเส้นแป้งสั้นๆ เส้นแป้งด้านท้ายของลำตัวยาวกว่าด้านข้างเล็กน้อย ไม่มีการสร้างถุงไข่หุ้ม โดยวางไข่ใต้ส่วนท้อง มักพบบริเวณกาบใบ ส่วนเหง้า ราก หรือฐานของผลสับปะรด

ลักษณะบนแผ่นสไลด์แก้ว (ภาพที่ 1) ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างค่อนข้างกลม ลำตัวยาว 2.3-3.0 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-2.7 มิลลิเมตร หนวดมี 8 ปล้อง ขายาวเรียว มีรูโปร่งแสงที่ต้นขาและน่องขาของขาคู่หลัง กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มี 17 คู่ คู่สุดท้ายตั้งอยู่บนแผ่นแข็งรูปสี่เหลี่ยม แต่ละอันประกอบด้วยรูเปิดรูปสามเหลี่ยมและขนปลายแหลมคล้ายรูปกรวย ลอนปลายส่วนท้อง มีขนขนาดใหญ่ 2 เส้น และมีขนเส้นเล็กๆ บางๆ 6 เส้น ช่องเปิดคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว มี 2 คู่

ผนังลำตัวด้านบน (dorsum) มีขนสั้นปลายแหลม รวมทั้งขนที่อยู่บนลอนปลายส่วนท้อง มีรูเปิดรูปสามเหลี่ยมเป็นจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป รูกลมมีขนาดต่างๆ กันกระจายอยู่บนผนังลำตัว แต่ละรูมีขอบหนาและผิวหน้ามีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (granular) วงแหวนปลายส่วนท้องประกอบด้วยขน 6 เส้น

ผนังลำตัวด้านล่าง (venter) มีขนสั้นๆ ยกเว้นที่ส่วนหัวและปล้องท้องปล้องท้ายๆ ซึ่งมีขนาดยาวกว่า รูเปิดรูปวงกลม เรียงเป็นแถวที่ขอบด้านล่างของปล้องท้องปล้องที่ 7 รูเปิดรูปสามเหลี่ยมและรูกลม กระจายอยู่

ทั่วไป มีรูกลมเล็ก จำนวน 2-3 รูอยู่บริเวณด้านหลังของขอบรอบตา ท่อชนิดที่ปากท่อเป็นแผ่นแข็ง มี 2 ขนาด ขนาดเล็กจะมีความยาวของท่อเท่ากับรูเปิดรูปวงกลม และปากท่อกว้างเท่ากับรูเปิดรูปสามเหลี่ยม โดยเรียงกันเป็นแถวจำนวน 1 แถวหรือ 2 แถวตามขวางโดยผ่านกลางปล้องท้องปล้องที่ 5-7



ภาพที่ 1 ตัวเต็มวัยเพศเมีย *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell, 1893) ปรับปรุงจาก Williams (2004)

Dysmicoccus neobrevipes Beardsley, 1959

ชื่อสามัญ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทา/เพลี้ยแป้งน้อยหน่า (grey pineapple mealybug)

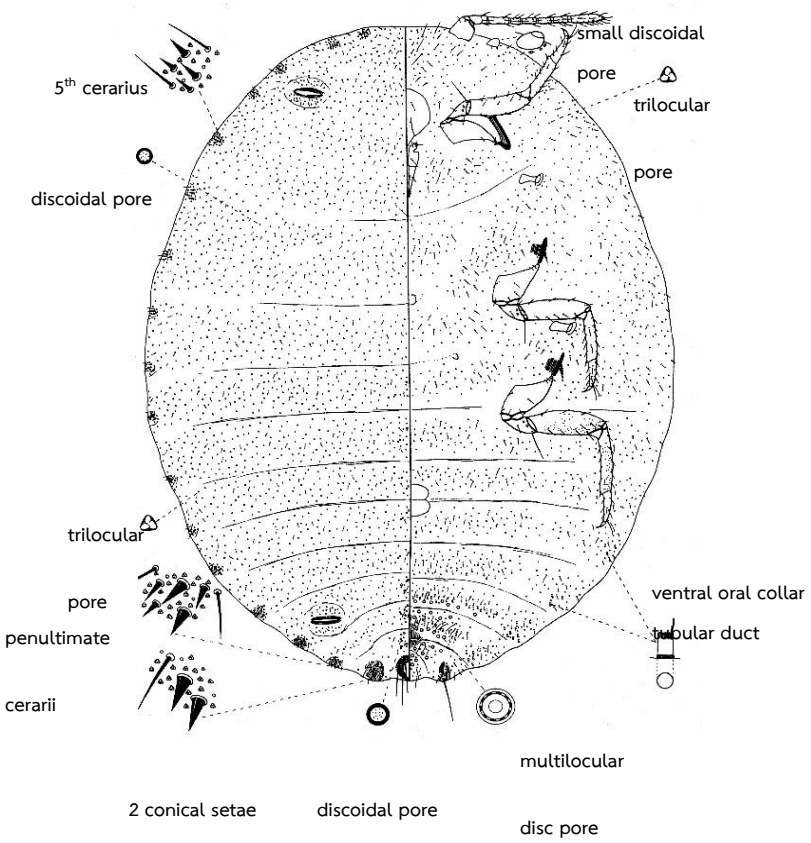
รูปร่างลักษณะ

ลักษณะในธรรมชาติ ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างค่อนข้างกลม ผนังลำตัวสีเทาหรือสีน้ำตาลเข้ม ปกคลุมด้วยไขแป้งสีขาว ด้านข้างรอบลำตัวมีเส้นแป้งสั้นๆ เส้นแป้งด้านท้ายของลำตัวยาวกว่าด้านข้างเล็กน้อย เล็กน้อย ไม่มีการสร้างถุงไข่หุ้ม โดยวางไข่ใต้ส่วนท้อง มักพบริเวณผลหรือใบของสับปะรด

ลักษณะบนแผ่นสไลด์แก้ว (ภาพที่ 2) ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างค่อนข้างกลม ลำตัวยาว 3.3-3.4 มิลลิเมตร กว้าง 2.7-3.1 มิลลิเมตร หนวดมี 8 ปล้อง ขายาวเรียว มีรูโปร่งแสงที่ต้นขาและน่องขาของขาคู่หลัง กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มี 17 คู่ คู่สุดท้ายตั้งอยู่บนแผ่นแข็งรูปทรงรี แต่ละอันประกอบด้วยรูเปิดรูปสามเหลี่ยมและขนปลายแหลมคล้ายรูปกรวย ลอนปลายส่วนท้อง มีขนขนาดใหญ่ 2 เส้น และมีขนเส้นเล็กๆบางๆ 4-6 เส้น ช่องเปิดคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว มี 2 คู่

ผนังลำตัวด้านบน (dorsum) มีขนสั้นปลายแหลม รวมทั้งขนที่อยู่บนลอนปลายส่วนท้อง มีรูเปิดรูปสามเหลี่ยมเป็นจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป รูกลมมีขนาดต่างๆ กันกระจายอยู่บนผนังลำตัว แต่ละรูมีขอบหนา และผิวหน้ามีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (granular) วงแหวนปลายส่วนท้องประกอบด้วยขน 6 เส้น

ผนังลำตัวด้านล่าง (venter) มีขนสั้นๆ ยกเว้นที่ส่วนหัวและปล้องท้องปล้องท้ายๆ ซึ่งมีขนาดยาวกว่า รูเปิดรูปวงกลม เรียงเป็นแถวที่ขอบด้านล่างของปล้องท้องปล้องที่ 7 รูเปิดรูปสามเหลี่ยมและรูกลม กระจายอยู่ทั่วไป มีรูกลมเล็ก จำนวน 2-3 รูอยู่บริเวณด้านหลังของขอบรอบตา ท่อชนิดที่ปากท่อเป็นแผ่นแข็ง มี 2 ขนาด ขนาดเล็กจะมีความยาวของท่อเท่ากับรูเปิดรูปวงกลม และปากท่อกว้างเท่ากับรูเปิดรูปสามเหลี่ยม โดยเรียงกันเป็นแถวจำนวน 1 แถวหรือ 2 แถวตามขวางโดยผ่านกลางปล้องท้องปล้องที่ 5-7



ภาพที่ 2 ตัวเต็มวัยเพศเมีย *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley, 1959 ปรับปรุงจาก Williams (2004

3. วงจรชีวิต

การศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู โดยนำตัวอย่างเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู มาเลี้ยงด้วยฟักทองในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ปิดกล่องให้มีความมืด พบว่า เพลี้ยแป้งมีอายุ 65 - 110 วัน สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ สามารถวางไข่ได้ประมาณ 250 -700 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุประมาณ 35 – 90 วัน การเลี้ยงเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพูจำเป็นต้องสร้างสภาพแวดล้อมให้มิดชิด ให้มีแสงน้อยที่สุด เนื่องจากในสภาพธรรมชาติเพลี้ยแป้งชนิดนี้จะอยู่บริเวณกาบใบของสับปะรด และอยู่บริเวณเหง้าและราก ซึ่งมักไม่ได้สัมผัสแสงสว่าง เพลี้ยแป้งจึงจะเจริญเติบโตได้ดี หากไม่มีการสร้างสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสม เพลี้ยแป้งจะไม่เจริญเติบโตและไม่สามารถเลี้ยงในฟักทองได้

ภาพที่ 3 ก.-ค .แปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรคเหี่ยว ค.-ฉ. เพลี้ยแป้งที่สำรวจพบในแปลงสัปปะรด

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcus) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt; PMWaV) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย เพื่อทราบชนิดของเพลี้ยแป้งและชนิดของโรคไวรัสในสับปะรด รวมทั้งความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหนะนำโรคในสับปะรด โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในแปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันตก ทั้งหมด 41 แปลง 122 ตัวอย่าง ทำการสุ่มตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากต้นที่แสดงอาการโรคเหี่ยวอย่างชัดเจน ตรวจจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้งและตรวจสอบเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ PMWaV 2 ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว พบเชื้อไวรัสจำนวน 117 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ตรวจพบเชื้อไวรัสมาตรวจสอบชนิดของเพลี้ยแป้งด้วยเทคนิคทางโมเลกุลและสัณฐานวิทยา พบเพลี้ยแป้งจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู *Dysmicococus brevipes* (Cockerell) 2. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทา *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley นอกจากนี้ยังพบเพลี้ยแป้งอีก 3 ชนิด แต่พบในปริมาณ

ที่น้อยและพบเพียง 3 แปลงจากทั้งหมดที่ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ **1.** เพลี้ยแป้งลาย *Ferrisia virgata* Cockerell 2. เพลี้ยแป้งจุดดำ *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 3. เพลี้ยแป้งแจ็คเบียส *Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel and Miller แต่ไม่พบเชื้อไวรัส นอกจากนี้นำตัวอย่างต้นสับปะรดที่พบเพลี้ยแป้งตรวจหาเชื้อไวรัส จำนวน 8 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัสทั้ง 8 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ซึ่งชนิดเพลี้ยแป้งอาจไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสเนื่องจากตรวจพบเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพูและเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาแต่ในเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาพบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเพลี้ยแป้งมีความสัมพันธ์กับต้นสับปะรดที่พบเชื้อไวรัสทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ และพบว่าเพลี้ยแป้งทุกระยะสามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสได้แม้จะเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 มีขนาดตัวเล็กและสามารถใช้ตัวอย่างเพลี้ยแป้งเพียง 1 ตัวในการตรวจเชื้อไวรัสได้ และเมื่อทำการศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู พบว่า เพลี้ยแป้งมีอายุ 65 - 110 วัน สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ สามารถวางไข่ได้ประมาณ 250 -700 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุประมาณ 35 – 90 วัน เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำการศึกษาวิจัยด้านชีวโมเลกุลเข้ามาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดและตรวจสอบเชื้อไวรัส รวมทั้งข้อมูลชีววิทยาของเพลี้ยแป้งเบื้องต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อยอดในกระบวนการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้งและความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดเชื้อของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิดต่อไปในอนาคต

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ นำไปใช้เป็นองค์ความรู้ที่ถูกต้องของข้อมูลศัตรูพืชที่มีความสามารถในการเป็นแมลงพาหะนำโรค และโรคพืชที่เกิดจากแมลงเหล่านั้น รวมทั้งนักวิจัยด้านชีววิทยา ด้านเกษตร เช่น กีฏวิทยา โรคพืช รวมทั้งหน่วยงานราชการ หน่วยงานที่ต้องการข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เช่น กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงพาณิชย์ ตลอดจนเอกชนที่ทำการค้าสินค้าเกษตรกับต่างประเทศ มหาวิทยาลัยต่างๆ โรงเรียน บริษัทเอกชนผู้ส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร รวมทั้งเกษตรกรและบุคคลทั่วไป ทั้งในและต่างประเทศ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้างกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

12. เอกสารอ้างอิง

เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์ มาลี ชวนพงษ์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย สมพร เหรียญรุ่งเรือง จารินี จันทร์คำ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2550. โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูสับปะรดเพื่อแก้ปัญหาโรคเหี่ยว. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ 38 น..

วันเพ็ญ ศรีทองชัย ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ และกาญจนา วาระวิชะนี. 2555. ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไวรัส *pineapple mealybug wilt-associated virus* กับชนิดของเพลี้ยแป้งในการก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในสับปะรด. รายงานผลการการวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 199-208.

Hull, R. 2009. Comparative plant virology. Elsevier Academic Press, London. 376 pp.

Larson, L.D. 1910. Diseases of pineapple. Hawaii Sugar Plantters Association Pathology & Physiology Series, Experiment Station Bulletin: 10-12.

Sether, D.M. 2001. Differentation, Distribution and Elimination of Two different Pineapple mealybug wilt-associated virus Found in pineapple. Plant Disease 85(8): 856-864.

Williams, D.J. and G.W. Watson. 1988. The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region Part I, the armored scale (Diaspididae). CAB Intemational Institute of Entomology, Wallingford. 290 pp.

Williams, D.J. 2004. Mealybugs of southern Asia. United Selangor Press Sdn. Bhd., Kuala Lumpur. 896 pp.