



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "MOLECULAR PHYLOGENY AND CYTOPLASMIC INCOMPATIBILITY OF
WOLBACHIA ASSOCIATED WITH RICE FIELD INSECTS AND FRUIT FLIES IN
THAILAND"

โดย นางสาว วันวิสาข์ จำนงค์ลักษณ์ และ รองศาสตราจารย์ ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

**โครงการ "MOLECULAR PHYLOGENY AND CYTOPLASMIC INCOMPATIBILITY OF
WOLBACHIA ASSOCIATED WITH RICE FIELD INSECTS AND FRUIT FLIES IN
THAILAND"**

โดย นางสาววันวิสาข์ จำนงค์ลักษณ์ และ รองศาสตราจารย์ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "MOLECULAR PHYLOGENY AND CYTOPLASMIC INCOMPATIBILITY OF
WOLBACHIA ASSOCIATED WITH RICE FIELD INSECTS AND FRUIT FLIES IN
THAILAND"

โดย นางสาววันวิสาข์ จำนงค์ลักษณ์ และ รองศาสตราจารย์ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

ปรากฏการณ์ที่เกิดจากความผิดปกติในการผสมพันธุ์ของแมลงและมีผลให้ลูกผสมที่ได้ไม่สามารถเจริญตามปกติซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้น จัดเป็นการแยกผสมพันธุ์แบบหนึ่ง โดยไม่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดหน่วยพันธุกรรม ในกรณีการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเจ้าบ้านที่เพศผู้มีแบคทีเรียแต่เพศเมียไม่มีแบคทีเรียจะมีผลให้ได้ไข่ที่ไม่สามารถเจริญตามปกติ แต่ในทางกลับกันถ้าเพศผู้ไม่มีแบคทีเรียแต่เพศเมียมีแบคทีเรีย เมื่อผสมพันธุ์กันจะได้ไข่ที่มีแบคทีเรียอยู่และสามารถเจริญตามปกติ ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่าความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมแบบทางเดียว(unidirectional cytoplasmic incompatibility)

ดังนั้น แมลงเจ้าบ้านที่มีแบคทีเรียอยู่ในเซลล์สืบพันธุ์จะได้เปรียบในการถ่ายทอดหน่วยพันธุกรรมไปยังรุ่นต่อ ๆ ไปจนในที่สุดประชากรแมลงเจ้าบ้านที่มีแบคทีเรียอยู่ซึ่งมีเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จะเข้าแทนที่ประชากรแมลงเจ้าบ้านที่ไม่มีแบคทีเรียในสภาพธรรมชาติ คุณสมบัตินี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นพาหะนำยีนที่เป็นประโยชน์ต่อการควบคุมประชากรแมลงพาหะนำโรคเข้าไปในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะซึ่งเป็นแมลงเจ้าบ้านได้ นอกจากนี้ยังมีปรากฏการณ์ความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมแบบสองทาง (bidirectional cytoplasmic incompatibility) ซึ่งปรากฏการณ์นี้จะเกิดเมื่อมีการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเจ้าบ้านเพศผู้ และ เพศเมียที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างชนิดกัน ดังนั้น ด้วยปรากฏการณ์นี้สามารถทำให้เกิดกลไกที่ป้องกันการผสมพันธุ์กันระหว่างประชากรของแมลงเจ้าบ้านที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างชนิดกัน เมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ได้

การศึกษาการวิวัฒนาการเชิงชีวโมเลกุลของแบคทีเรีย *Wolbachia* และแมลงเจ้าบ้านชนิดต่าง ๆ จะเปิดโอกาสให้เราเข้าใจวิวัฒนาการร่วมกัน ระหว่างแบคทีเรียและแมลงเจ้าบ้านมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีความหลากหลายของแมลง เช่น แมลงในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน ความรู้ความเข้าใจในชีววิทยาขั้นพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการร่วมกันมาเช่นนี้จะช่วยให้นักวิทยาศาสตร์แสวงหามาตรการควบคุม และการจัดการกับแมลงศัตรูและแมลงพาหะอย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนั้นการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากร ยังช่วยให้การอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพและความหลากหลายทางชีวภาพดำเนินไปในทิศทางที่ถูกต้องและสอดคล้องกับธรรมชาติของท้องถิ่นไทยต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการกระจายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ที่อยู่ในแมลงวันผลไม้ที่ติดเชื้อ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* และ *Bactrocera tau*

เนื้อหาทางวิจัย

1. บทนำ

ตามหลักพันธุศาสตร์การเกิดสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ใหม่เป็นผลจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อมของประชากรนั้นๆ ลักษณะทางพันธุกรรมของบรรพบุรุษย่อมถ่ายทอดให้ลูกหลาน สปีชีส์ทางชีววิทยา หมายถึง กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทั่วไปและลักษณะทางกรรมพันธุ์คล้ายคลึงกัน สามารถผสมพันธุ์กันได้และสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมให้ลูกหลานได้เป็นปกติ หรืออาจกล่าวว่สปีชีส์เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีกลุ่มยีนหรือยีนพูล(gene pool) ของประชากรจากบรรพบุรุษเดียวกัน

การที่สิ่งมีชีวิตชนิดใหม่สามารถดำรงอยู่ได้ก็เนื่องจากมีกลไกของการแยกกันในเชิงพันธุศาสตร์ (genetic isolation) บางกรณีอาจเป็นเพราะต่างก็แยกกันอยู่คนละที่ (geographic isolation) และในบางกรณีก็เป็นเพราะมีกลไกที่แยกกันอย่างเด่นชัด เพื่อป้องกันการผสมพันธุ์กันระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกัน (reproductive isolation) โดยกลไกที่ป้องกันการผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์กันนั้น สามารถเกิดจากปัจจัยหลายชนิด เช่น ความแตกต่างกันของฤดูการผสมพันธุ์ ฤดูการวางไข่ หรือเกิดจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรียหรือไวรัส ที่ก่อให้เกิดการเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน ซึ่งนับเป็นปรากฏการณ์ที่เอื้อให้ทั้งสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านและสิ่งมีชีวิตร่วมอาศัยสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นต่อไปได้ จัดว่าเป็นภาวะที่สิ่งมีชีวิตทั้งสองอาศัยอยู่ร่วมกันในเชิงพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันที่เรียกว่า ซิมไบโอซิส (symbiosis) โดยเรียกสิ่งมีชีวิตร่วมอาศัยว่า ซิมไบออน (symbiont)

ได้มีการรายงานการพบซิมไบออนในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ขาปล้องชนิดต่างๆโดยเฉพาะในแมลง ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มของซิมไบออนได้หลายกลุ่มตามอวัยวะที่พบ เช่น กลุ่มที่พบในอวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive symbionts) กลุ่มที่พบในทางเดินอาหาร (extracellular nutritional symbionts) เป็นต้น โดยแบคทีเรียนับว่าเป็นซิมไบออนกลุ่มใหญ่ที่สุดที่มีการศึกษาวิจัย

แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นซิมไบออนที่พบในสัตว์ขาปล้องรวมทั้งหนอนพยาธิ ซึ่งจะพบทั้งในอวัยวะสืบพันธุ์และอวัยวะอื่น ๆ ของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน โดยแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถทำให้เกิดการผันแปรของการสืบพันธุ์ (reproductive alteration) ในสัตว์ขาปล้อง เช่น ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เกี่ยวข้องกับความเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมของแมลงเจ้าบ้าน (cytoplasmic incompatibility) รวมทั้งปรากฏการณ์ที่แมลงเจ้าบ้านจำพวก ต่อ แตน สามารถมีลูกเพศเมียได้ โดยไม่ต้องมีการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเพศผู้และเพศเมีย (parthenogenesis) ปรากฏการณ์ที่สิ่งมีชีวิตจำพวก Isopod มีลูกเพศเมียมากกว่าเพศผู้ (feminization) และในพยาธิหนอนตัวกลมแบคทีเรีย *Wolbachia* ยังมีความสัมพันธ์แบบ mutualistic อีกด้วย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(ก)
บทคัดย่อไทย	(ข)
บทคัดย่ออังกฤษ	(ค)
1. บทนำ	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. วิธีการทดลอง	3
3.1 <i>Wolbachia</i> ในแมลงวันผลไม้	3
3.2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้	4
3.3 <i>Wolbachia</i> ในแมลงในนาข้าว	7
4. ผลการศึกษา	16
4.1 <i>Wolbachia</i> ในแมลงวันผลไม้	16
4.2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้	24
4.3 <i>Wolbachia</i> ในแมลงในนาข้าว	38
5. บทวิจารณ์	42
5.1 <i>Wolbachia</i> ในแมลงวันผลไม้	42
5.2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้	44
5.3 <i>Wolbachia</i> ในแมลงในนาข้าว	45
6. หนังสืออ้างอิง	47
7. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสกว.	53
8. ภาคผนวก	55

Project Code: BGJ4380016

Project Title: Molecular phylogeny and cytoplasmic incompatibility of *Wolbachia*
associated with rice field insects and fruit flies in Thailand

Investigator: Wanwisa Jamnongluk Faculty of Science, Mahidol University

Pattamaporn Kittayapong Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address: tewjn@mahidol.ac.th

Project Period: September 2000 - August 2001

Objectives: To study the phylogenetic relationships of the endosymbiotic bacteria, *Wolbachia*, in fruit flies and insects living in the rice community. This study also focus on the phylogenetic relationships among fruit fly species which are members of species complexes and are not members of species complex. The knowledge of this study will, therefore, gives us basic knowledge for better understanding of evolutionary processes and for development of strategies for biological control of these pests.

Based on the 638 bp mitochondrial gene encoding subunit of cytochrome oxidase, the evolutionary relationships among *Bactrocera* fruit flies in two species complexes, *B. dorsalis* and *B. tau*, as well as among four *Bactrocera* subgenera, *Asiadacus*, *Bactrocera*, *Hemigymnodacus* and *Zeugodacus*, were investigated. High nucleotide sequence divergence among members in both the *B. dorsalis* and *B. tau* complexes was found which suggests a fast evolutionary rate for the mtDNA genome within *Bactrocera* species complexes. The phylogenetic relationships of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in tephritid fruit flies were also studied. Five distinct strains of *Wolbachia* in *B. ascita* sp. B were found. Four of the five *Wolbachia* strains found in this species were in the same groups as those found in other tephritid fruit flies suggesting possible horizontal transmission of *Wolbachia* from other fruit flies into *B. ascita* sp. B. Moreover, my findings suggest that *Wolbachia* might have been involved in the speciation process of two sibling species of the *B. dorsalis* complex as well as for other closely related species, namely for *B. correcta* sp. A and *B. correcta* sp. B and for *B. ascita* sp. A and *B. ascita* sp. B. PCR based typing of *Wolbachia* strains was compared with typing by sequencing and found to be unreliable. Therefore, final determination of group affiliation needs to be verified with *wsp* sequence data. In the rice field community, *Wolbachia* might be horizontally transferred through predator-prey feeding relation which is the new hypothesis proposed.

Keywords: *Wolbachia*, tephritid fruit flies, rice-field insects, species complex

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BGJ4380016

ชื่อโครงการ: Molecular phylogeny and cytoplasmic incompatibility of *Wolbachia* associated with rice field insects and fruit flies in Thailand

ชื่อนักวิจัย: วันวิสาข์ จันทลักษณ์, ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์

E-mail Address: tewjn@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: กันยายน 2543 – สิงหาคม 2544

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้และแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว ซึ่งเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย อีกทั้งได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้ ทั้งจัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนและไม่จัดอยู่ในกลุ่ม ซึ่งจะเป็นรากฐานสำคัญสำหรับการหามาตรการควบคุมแมลงเหล่านี้อย่างยิ่งย่นต่อไปในอนาคต

เนื้อหางานวิจัย: งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* และ *B. tau* และแมลงวันผลไม้สปีชีส์อื่นๆ จาก 4 ชนิด ได้แก่ *Asiadacus*, *Bactrocera*, *Hemigymnodacus* และ *Zeugodacus* โดยใช้ยีน Cytochrome Oxidase I ของไมโทคอนเดรีย พบว่าแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างของลำดับเบสเป็นจำนวนมาก จึงอาจกล่าวได้ว่าแมลงวันผลไม้ ชนิด *Bactrocera* มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการสูง และกระบวนการเกิดสปีชีส์ใหม่ อาจะยังคงเกิดขึ้นในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนของแมลงวันผลไม้ชนิดนี้ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ที่ร่วมอาศัยอยู่ในแมลงวันผลไม้ พบว่า *B. ascita* sp. B มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 5 สายพันธุ์ โดย 4 สายพันธุ์ที่พบนั้นอยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ที่พบในแมลงวันผลไม้สปีชีส์อื่นๆ จึงสันนิษฐานได้ว่าอาจมีการถ่ายทอดสายพันธุ์ *Wolbachia* จากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นเข้าสู่ *B. ascita* sp. B นอกจากนี้ *Wolbachia* อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดสปีชีส์ใหม่ระหว่างแมลงวันผลไม้ 2 ชนิดในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* และในกลุ่มแมลงวันผลไม้ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันอีก 2 กลุ่ม ได้แก่ *B. correcta* spp. และ *B. ascita* spp. จากการเปรียบเทียบวิธีการจำแนกกลุ่มของสายพันธุ์ *Wolbachia* ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์เฉพาะกลุ่ม และวิธีการหาลำดับเบส พบว่าวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่สามารถเชื่อถือได้ ดังนั้นการจำแนกกลุ่มของสายพันธุ์ *Wolbachia* ควรใช้วิธีการหาลำดับเบส

จากการศึกษาการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวพบว่าจะมีการถ่ายทอดสายพันธุ์ *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ของแมลงให้อาศัยโดยผ่านทางห่วงโซ่อาหาร ซึ่งจากการวิจัยนี้ได้เสนอสมมุติใหม่ของการถ่ายทอดสายพันธุ์ *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ของแมลงให้อาศัย

คำหลัก: *Wolbachia*, แมลงวันผลไม้, แมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว, กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัย องค์ความรู้ใหม่ในการสร้างนักวิจัยระดับปริญญาเอก รุ่นที่ 1 ปี 2543 (BGJ4380016) จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยได้ดำเนินการระหว่างเดือน กันยายน 2543 ถึงเดือนสิงหาคม 2544 โดยการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาเอก ของ นางสาววันวิสาข์ จำนงค์ลักษณ์

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วิสุทธิ์ ไบไม้ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และ ดร. จอห์น มิลล์ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยและช่วยวิจารณ์งานวิจัย และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยหลายท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยดำเนินไปด้วยดี

3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้จิ้งนัส *Bactrocera* ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Wolbachia* และแมลงวันผลไม้ห้ำห้อย
5. เพื่อศึกษาการกระจายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ที่อยู่ในแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว

3. วิธีการทดลอง

3.1 *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้

(ก) ในการตรวจสอบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ *Wolbachia* นั้น ในแมลงวันผลไม้ที่พบการติดเชื้อ *Wolbachia* ทั้ง 9 สปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 2 (Kittayapong et al., 2000) ได้นำยีน *wsp* ซึ่งมีความผันแปรของลำดับเบสสูงกว่ายีน *ftsZ* มาใช้ โดยได้ทำการเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของยีน *wsp* เข้ากับ pGEM-T vector (Promega) โดยใช้ 1 μ l ของ PCR product และ incubate ที่ 4°C นาน 14-16 ชั่วโมง และทำการโคลน pGEM-T vector โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่ พลาสมิดของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5- α จากนั้นนำพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอของยีน *wsp* มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Qiaprep Plasmid Miniprep Kit (Qiaagen) และพลาสมิดจำนวนอย่างน้อย 3 โคลน ได้นำไปหาลำดับเบสด้วยวิธีหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (Automate Sequencing) โดยหน่วยบริการชีวภาพ, สวทช

ตารางที่ 1 แสดงไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Primer name	Sequence (5'→3')	Reference
UEA7	TAC AGT TGG AAT AGA CGT TGA TAC	Lunt etal. (1995)
UEA10	TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATTA	Lunt etal. (1995)
wspF	TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC	Zhou etal. (1998)
wspR	AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA	Zhou etat. (1998)
ftsZ F	GGA CCG GAT CCG TAT GCC CAT TGC AGA GCT TG	Holden etal (1993)
ftsZ R	GGA CCG AAT TCG CCA TGA GTA TTC ACT TGG CT	Holden etal (1993)

(ข) ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธี Maximum Parsimony, Neighbor-Joining และ Maximum Likelihood ด้วยโปรแกรม PAUP version 2 beta 2 (Swofford, 1997) โดยค่า bootstrap value ซึ่งสนับสนุนแต่ละกิ่งของต้นไม้วิวัฒนาการ ได้คำนวณ 1,000 ซ้ำ ในการคำนวณแบบ Maximum Parsimony และ Neighbor-Joining และได้คำนวณ 100 ซ้ำ ในการคำนวณแบบ Maximum Likelihood นอกจากนี้ความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *wsp* ยังถูกนำมาคำนวณโดยวิธี Kimura-2-parameter (Kimura, 1980)

ตารางที่ 2 แสดงสปีชีส์ของแมลงวันผลไม้ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ที่ใช้ในการศึกษา

Species	Collection Code	Host plant species (Family)
<i>B. cucurbitae</i>	SK(D) 5	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. caudata</i>	RB(C) 14	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. dorsalis</i> ^a	MS(E) 17	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)
<i>B. pyrifoliae</i> ^a	MS(E) 17	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)
<i>B. dorsalis</i> sp. A1 ^a	RB(U) 11	<i>Siphonodon celastrineus</i> (Celastraceae)
<i>B. diversa</i>	AC (C) 1	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. modica</i>	PH(M) 10	<i>Diplocyclos palmatus</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. ascita</i> sp. B	MS(E) 16	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)
<i>Dacus destillatoria</i>	UB(I) 2	<i>Luffa cylindrica</i> (Cucurbitaceae)

3.2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้

(ก) ในการศึกษานี้ได้ใช้ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ของไมโตคอนเดรีย UEA 7 และ UEA10 (Lunt et al., 1995) ดังลำดับเบสที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยไพรเมอร์ UEA 7 และ UEA10 นั้นมีความจำเพาะต่อลำดับเบสที่ได้สามารถนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ รวมทั้งในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* complex และ *Bactrocera tau* complex ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

(ข) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ซึ่งมีขนาด 636 bp โดยวิธี PCR ได้ทำในสารละลายปฏิกิริยาขนาด 20 μ l โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ : 12.5 μ l dd H₂O , 2 μ l 10x PCR buffer (Promega), 2 μ l 25 mM MgCl₂ , 0.5 μ l dNTPs (เบสละ 10 mM) , 0.5 μ l 20 uM ไพรมเมอร์จำเพาะUEA 7 และ UEA10 (สำหรับ Cytochrome Oxidase Subunit I) และ 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงวันผลไม้ จำนวน 2 μ l จากนั้นสารละลายที่ได้ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Hybaid , UK) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ : ที่ 94°C นาน 3 นาทีจำนวน 1 รอบและ ที่ 94°C นาน 1 นาที , 50°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาทีจำนวน 35 รอบ

(ค) PCR product จำนวน 10 μ l ถูกนำมาวิ่งบน gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ที่ต้องการ จากนั้นได้ทำการเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้ากับ pGEM-T vector (promega) โดยใช้ 1 μ l ของ PCR product incubate ที่ 4°C นาน 14-16 ชั่วโมง และทำการโคลน pGEM-T vector โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่พลาสมิดของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5- α จากนั้นนำพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Qiaprep Plasmid Miniprep Kit (Qiagen) และ พลาสมิดจำนวน 3 โคลนได้นำไปหาลำดับเบสด้วยวิธีหาลำดับแบบอัตโนมัติ (Automate Sequencing) โดยศูนย์บริการชีวภาพ , สวทช

(ง) ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธี maximum parsimony, neighbor-joining และ maximum likelihood ด้วยโปรแกรม PAUP version 2 beta 2 (Swofford , 1997) โดยค่าbootstrap value ซึ่งสนับสนุนแต่ละกิ่งของต้นไม้วิวัฒนาการ ได้คำนวณ 1,000 ซ้ำ ในการคำนวณแบบ maximum parsimony และ neighbor-joining และได้คำนวณ 100 ซ้ำ ในการคำนวณแบบ maximum likelihood นอกจากนี้ความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ของไม้ดอกชนิดต่างๆในแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆยังถูกนำมาคำนวณโดยวิธี Kimura-2-parameter(Kimura,1980)

ตารางที่ 3 แสดงสปีชีส์ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera* ที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้

Taxon name	Location	Plant Host species (Family)
<i>B. arecae</i> (Drew and Hancock)	Chumporn	<i>Areca catechu</i> (Palmae)
<i>B. carambolae</i> (Drew and Hancock)	Ranong	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)
<i>B. dorsalis</i> (Hendel)	Ranong	<i>Sandorium koetjape</i> (Meliaceae)
<i>B. dorsalis</i> sp. L	Ranong	<i>Platea</i> sp. (Icaninaceae)
<i>B. dorsalis</i> sp. O	Ranong	<i>Willughbeia firma</i> (Aponaceae)
<i>B. pyrifoliae</i> (Drew and Hancock)	Chiangmai	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)
<i>B. raiensis</i> (Drew and Hancock)	Ranong	<i>Sandorium koetjape</i> (Meliaceae)
<i>B. tau</i> (Walker)	Kanchanaburi	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. tau</i> sp. B	Kanchanaburi	<i>Siphonodosa celastrineus</i> (Celastraceae)
<i>B. tau</i> sp. C	Kanchanaburi	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. tau</i> sp. D	Ranong	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. tau</i> sp. E	Kanchanaburi	<i>Strychnos thorelii</i> (Strychnaceae)
<i>B. tau</i> sp. F	Ranong	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> (Flacouriaceae)
<i>B. tau</i> sp. I	Songkhla	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Bactrocera) dorsalis</i> (Hendel)	Ranong	<i>Sandorium koetjape</i> (Meliaceae)
<i>B. (Bactrocera) dorsalis</i> sp. A1	Ranong	<i>Siphonodon celastrineus</i> (Celastraceae)
<i>B. (Bactrocera) correcta</i> (Bezzi)	Ranong	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae)
<i>B. (Bactrocera) correcta</i> sp. B	Ranong	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae)
<i>B. (Bactrocera) latifrons</i> (Hendel)	Chiangmai	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Solanaceae)
<i>B. (Bactrocera) tuberculata</i> (Bezzi)	Ranong	<i>Careya sphaerica</i> (Barringtoniaceae)
<i>B. (Asiadacus) modica</i> (Hardy)	Phetchaburi	<i>Diplocyclos palmatus</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Hemigymnodacus) diversa</i> (Coquillett)	Amnat Charoen	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Zeugodacus) ascita</i> (Hardy)	Kanchanaburi	<i>Lagenaria siceraria</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Zeugodacus) ascita</i> sp. B	Maehongsorn	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Zeugodacus) caudate</i> (Fabricius)	Ranong	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)
<i>B. (Zeugodacus) cucurbitae</i> (Coquillett)	Chiangmai	<i>Lycopersicon seculentum</i> (Solanaceae)
<i>B. (Zeugodacus) tau</i> (Walker)	Kanchanaburi	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)

3.3 *Wolbachia* ในแมลงในนาข้าว

การสำรวจหา *Wolbachia* จากแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวทั้งสิ้น 2,585 ตัว จาก 209 สปีชีส์จากทุกภาคของประเทศไทย โดยนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับยีนควบคุมวงชีวิตของเซลล์ (cell cycle gene, *ftsZ*) (Holden et al., 1993) และยีนโปรตีนหุ้มเปลือกนอก (*Wolbachia* outer surface protein gene, *wsp*) (Zhou et al., 1998) ซึ่งในการศึกษานี้ได้ใช้ไพรเมอร์จำเพาะชนิดพิเศษที่มีความอ่อนไหวสูงโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณน้อยๆได้ (Jeyaprakash and Hoy, 2000) ดังลำดับเบสที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 จากนั้นลำดับเบสที่ได้สามารถนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวชนิดต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4

(ก) ได้ทำการเก็บตัวอย่างแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวจาก 29 จังหวัดจากทุกภาคของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึง ตุลาคม 2543 โดยใช้ตาข่ายจับแมลงและเครื่องช่วยดูดแมลงซึ่งตัวอย่างแมลงจะถูกแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง และนำมาทำการจำแนกชนิดของแมลงในนาข้าวโดยวิธีทางสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการ ต่อมาได้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมลงในนาข้าวโดยใช้สารละลาย STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0; O'Neill et al., 1992) ซึ่งสารละลายที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอถูกนำมาตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

(ข) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *wsp* ซึ่งมีขนาด 606 bp และ *ftsZ* ซึ่งมีขนาด 750 bp โดยวิธี PCR ได้ทำในสารละลายปฏิกิริยาขนาด 20 μ l โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ : 12.5 μ l dd H₂O, 2 μ l 10x PCR buffer (Promega), 2 μ l 25 mM MgCl₂, 0.5 μ l dNTPs (เบสละ 10mM), 0.5 μ l 20 uM ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง *wsp* F และ *wsp* R (สำหรับ *Wolbachia*) และ *ftsZ* F และ *ftsZ* R (สำหรับ *ftsZ* I) และ 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงเบียน จำนวน 2 μ l จากนั้นสารละลายที่ได้ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Hybaid, UK) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ : ที่ 94°C นาน 3 นาทีจำนวน 1 รอบและที่ 94°C นาน 1 นาที, 50°C นาน 1 นาทีและ 72°C นาน 1 นาทีจำนวน 35 รอบ PCR product จำนวน 10 μ l ถูกนำมาวิ่งบน gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของยีน *wsp* และ *ftsZ* ที่ต้องการ

(ค) ในการตรวจสอบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ *Wolbachia* นั้น ได้นำยีน *wspL* ซึ่งมีความผันแปรของลำดับเบสสูงกว่ายีน *ftsZ* มาใช้ โดยได้ทำการเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของ

ยีน *wsp* เข้ากับ pGEM-T vector (Promega) โดยใช้ 1 μ l ของ PCR product และ incubate ที่ 4°C นาน 14-16 ชั่วโมง และทำการโคลน pGEM-T vector โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่พลาสมิดของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5- α จากนั้นนำพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอของยีน *wsp* มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Qiaprep Plasmid Miniprep Kit (Qiaagen) และพลาสมิดจำนวนอย่างน้อย 3 โคลน ได้นำไปหาลำดับเบสด้วยวิธีหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (Automate Sequencing) โดยหน่วยบริการชีวภาพ, สวทช

(ง) ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธี Maximum Parsimony, Neighbor-Joining และ Maximum Likelihood ด้วยโปรแกรม PAUP version 2 beta 2 (Swofford, 1997) โดยค่า bootstrap value ซึ่งสนับสนุนแต่ละกิ่งของต้นไม้วิวัฒนาการ ได้คำนวณ 1,000 ครั้ง ในการคำนวณแบบ Maximum Parsimony และ Neighbor-Joining และได้คำนวณ 100 ครั้ง ในการคำนวณแบบ Maximum Likelihood นอกจากนี้ความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *wsp* ยังถูกนำมาคำนวณโดยวิธี Kimura-2-parameter (Kimura, 1980)

ตารางที่ 4 แสดงสปีชีส์ที่พบของแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว

Order and Species	Common name	Total no. tested	no. positive	<i>Wolbachia</i> strain	Acession number
BLATTARIA					
<i>Blattella germanica</i> (Linnaeus)	German cockroach	3	0		
COLEOPTERA					
<i>Adoretus</i> sp.	Scarab beetle	4	0		
<i>Aeoloderma brachmana</i> (Candeze)	Click beetle	2	0		
<i>Anomala humeralis</i> (Burmester)	Scarab beetle	3	0		
<i>Apalochrus rufofasciatus</i> Pic	Soft-winged flower beetle	2	0		
<i>Berosus</i> sp.	Water scavenger beetle	8	0		
<i>Brumoides lineatus</i> (Weise)	Lady beetle	2	0		
<i>Brumoides suturalis</i> (Fabricius)	Lady beetle	1	0		
<i>Chlaenius circumdatus</i> (Brulle)	Ground beetle	1	0		
<i>Chlaenius quadricolor</i> Fabricius	Ground beetle	6	0		
<i>Chlaenius</i> sp. 1	Ground beetle	3	0		

<i>Chlaenius</i> sp. 2	Ground beetle	3	B (1) ^a	-	-
<i>Chlaenius</i> sp. 3	Ground beetle	3	0		
<i>Chlaenius</i> sp. 4	Ground beetle	1	0		
<i>Chlaenius</i> sp. 5	Ground beetle	3	0		
<i>Cicindela</i> sp.	Tiger beetle	1	0		
<i>Coccinella repanda</i> Thunberg	Lady beetle	2	0		
<i>Dicladyspa armigera</i> (Oliver)	Hispa beetle	12	B (1) ^b	wDic	AF481160
<i>Drypta japonica</i> (Bates)	Ground beetle	1	0		
<i>Echinocnemus oryzae</i> Marshall	Weevil	2	0		
<i>Ectomoconis biguttulus</i> Stal	Ground beetle	1	0		
<i>Formicomus braminus</i> La Ferte Senectere	Anthicid beetle	6	0		
<i>Formicomus</i> sp.	Anthicid beetle	1	0		
<i>Harmonia octomaculata</i> (Fabricius)	Lady beetle	5	0		
<i>Hydronomidius molitor</i> Faust	Paddy-root weevil	1	A (1) ^b	wMol	AF481161
<i>Hydrophilus acuminatus</i> Motschulsky	Water scavenger beetle	7	0		
<i>Lissorhoptrus oryophilus</i> Kuschel	Weevil	2	0		
<i>Micraspis discolor</i> (Fabricius)	Lady beetle	131	0		
<i>Micraspis vincta</i> (Gorham)	Lady beetle	5	0		
<i>Monolepta signata</i> Olivier	Leaf beetle	33	0		
<i>Ophionea indica</i> (Thunberg)	Ground beetle	15	0		
<i>Ophionea ishii hoashii</i> Habu	Ground beetle	1	0		
<i>Ophionea ishii ishii</i> Habu	Ground beetle	2	0		
<i>Ophionea nigrofasciata</i> Schmidt-Goebel	Ground beetle	4	0		
<i>Oulema</i> sp.	Leaf beetle	1	0		
<i>Paederus fuscipes</i> Curtis	Rove beetle	17	0		
<i>Paederus tamulus</i> Erichson	Rove beetle	2	0		
<i>Paederus</i> sp.	Rove beetle	4	0		
<i>Pentagonica</i> sp.	Ground beetle	5	0		
<i>Pheropsophus</i> sp.	Ground beetle	1	0		
<i>Propylaea japonica</i> (Thunberg)	Lady beetle	1	0		
<i>Scarites</i> sp.	Ground beetle	3	0		
<i>Submera latifrons</i> (Dejean)	Ground beetle	7	0		

DERMAPTERA

<i>Euborellia philippinensis</i> Srivastava	Earwig	1	0		
---	--------	---	---	--	--

DIPTERA

<i>Agromyza oryzae</i> (Munakata)	Leaf-miner fly	2	B (2) ^b	wAory	AF481201
<i>Argyrophylax nigrotibialis</i> Baranov	Tachinid fly	8	0		
<i>Argyrophylax phoeda</i> Townsend	Tachinid fly	6	0		
<i>Argyrophylax</i> sp.	Tachinid fly	7	0		
<i>Carcelia</i> sp.	Tachinid fly	1	0		
<i>Ceracia</i> sp.	Tachinid fly	1	0		
<i>Ceratitis</i> sp.	Fruit fly	3	0		
<i>Chironomus dorsalis</i> Meigen	Midge	1	0		
<i>Chironomus kiiensis</i> Tokunaga	Midge	7	0		
<i>Chironomus tepperi</i> Skuse	Midge	3	0		
<i>Chironomus</i> sp. 1	Midge	6	A (1) ^a	-	-
<i>Chironomus</i> sp. 2	Midge	12	0		
<i>Chironomus</i> sp. 3	Midge	10	0		
<i>Chironomus</i> sp. 4	Midge	4	0		
<i>Chlorops oryzae</i> Matsumura	Chloropid fly	15	A (3) ^a	-	-
<i>Diopsis apicalis</i> Dalman	Stalk-eyed borer	3	A (2) ^b	wApi	AF481162
<i>Drapetis</i> sp.	Humpbacked fly	3	0		
<i>Hydrellia</i> sp. 1	Whorl maggot	7	A (2) ^b	wHyd	AF481163
<i>Hydrellia</i> sp. 2	Whorl maggot	9	0		
<i>Hydrellia</i> sp. 3	Whorl maggot	12	0		
<i>Hydrellia</i> sp. 4	Whorl maggot	3	0		
<i>Notiphila</i> sp.	Ephydrid fly	2	0		
<i>Ochthera brevitibialis</i> de Meijere	Ephydrid fly	5	0		
<i>Orseolia oryzae</i> (Wood-Mason)	Gall midge	38	B (7) ^b	wOry	AF481164
<i>Palexorista</i> sp.	Tachinid fly	2	0		
<i>Pipunculus javanensis</i> de Meijere	Pipunculid fly	4	0		
<i>Pipunculus orientalis</i> (Koizumi)	Pipunculid fly	1	0		
<i>Pipunculus</i> sp.	Pipunculid fly	10	0		
<i>Poecilotrapphera taeniata</i> (Macquart)	Picture-winged fly	7	0		
<i>Psilopa</i> sp.	Ephydrid fly	1	0		
<i>Tipula aino</i> Alexander	Crane fly	17	B (14) ^b	wAin	AF481165
<i>Tomosvaryella subvirescens</i> (Loew)	Pipunculid fly	1	B (1) ^b	wPyr	AF481166

EPHEMEROPTERA

<i>Ephemera</i> sp.	Mayfly	1	0		
---------------------	--------	---	---	--	--

HEMIPTERA

<i>Aethus indicus</i> (Westwood)	Burrower bug	8	0		
<i>Andrallus spinidens</i> (Fabricius)	Stink bug	1	0		
<i>Anisops sardea</i> (Herr-Schaff)	Back swimmer	16	0		
<i>Cletus trigonus</i> (Thunberg)	Coreid bug	1	0		
<i>Cyrtorhinus lividipennis</i> Reuter	Mirid bug	221	B (51) ^b	wLiv	AF481167
<i>Dysdercus</i> sp.	Red bug	1	0		
<i>Eysarcoris ventralis</i> Distant	Stink bug	6	0		
<i>Geotomus pygmaeus</i> (Dallas)	Burrower bug	8	0		
<i>Geotomus</i> sp.	Burrower bug	1	0		
<i>Hydrometra vittata</i> Stal	Marsh treader	4	0		
<i>Leptocorisa acuta</i> (Thunberg)	Rice stink bug	1	0		
<i>Leptocorisa oratorius</i> (Fabricius)	Rice stink bug	49	0		
<i>Limnogonus fossarum</i> (Fabricius)	Water strider	3	0		
<i>Limnogonus nitidus</i> (Mayr)	Water strider	2	0		
<i>Lygaeus hospes</i> Fabricius	Lygaeid bug	2	0		
<i>Menida formosa</i> (Westwood)	Stink bug	2	0		
<i>Mesovelis</i> sp.	Water treader	2	0		
<i>Micronecta quadristrigata</i> Breddin	Water boatman	8	0		
<i>Mononyx</i> sp.	Toad bug	1	0		
<i>Nabis</i> sp. 1	Damsel bug	3	0		
<i>Nabis</i> sp. 2	Damsel bug	22	0		
<i>Nezara viridula</i> (Linnaeus)	Green stink bug	3	0		
<i>Ninus insignis</i> Stal	Lygaeid bug	1	? (1) ^c	-	-
<i>Pachybrachius pacificus</i> Stal	Lygaeid bug	1	0		
<i>Pachybrachius sobrinus</i> (Distant)	Lygaeid bug	1	0		
<i>Paraeucosmetus pallicornis</i> (Dallas)	Lygaeid bug	8	A, B (1) ^a	-	-
<i>Polytoxus</i> sp. 1	Assassin bug	5	0		
<i>Polytoxus</i> sp. 2	Assassin bug	2	0		
<i>Polytoxus</i> sp. 3	Assassin bug	10	0		
<i>Pygomenida</i> sp. 1	Stink bug	1	0		
<i>Pygomenida</i> sp. 2	Stink bug	1	0		
<i>Pygomenida</i> sp. 3	Stink bug	4	0		
<i>Rhinocoris</i> sp.	Assassin bug	1	0		
<i>Riptortus linearis</i> (Fabricius)	Squash bug	2	0		
<i>Riptortus pedestris</i> (Fabricius)	Squash bug	1	0		
<i>Saldula</i> sp.	Shore bug	6	0		

<i>Scotinophara coarctata</i> (Fabricius)	Black bug	18	A, B (5) ^b	wCoaR	AF481168
				wCoaA	AF481169
				wCoaC	AF481170
<i>Scotinophara inermiceps</i> (Breddin)	Black bug	1	0		0
<i>Scotinophara scotti</i> Horvath	Black bug	1	0		0
<i>Scutellera nobilis</i> Fabricius	Shield-backed bug	1	0		0
<i>Tetroda histeroides</i> Fabricius	Stink bug	1	0		0
<i>Tetroda transversalis</i> Westwood	Stink bug	8	0		0
<i>Tytthus chinensis</i> Stal	Mirid bug	15	B (1) ^b	wChi	AF481171

HOMOPTERA

<i>Balclutha</i> sp.	Leafhopper	25	B (7) ^b	wBal	AF481172
<i>Cicadulina bipunctata</i> (Melichar)	Leafhopper	10	0	-	
<i>Cofana spectra</i> (Distant)	Leafhopper	33	B (1) ^b	wSpe	AF481173
<i>Cofana unimaculata</i> (Signoret)	Leafhopper	7	0		
<i>Empoasca alami</i> (Ahmed)	Leafhopper	37	B (1) ^b	wAla	AF481174
<i>Exitianus</i> sp.	Planthopper	8	0		
<i>Hecalus</i> sp.	Leafhopper	2	0		
<i>Hysteroneura setariae</i> (Thomas)	Aphid	9	0		
<i>Laodelphax striatellus</i> (Fallen)	Planthopper	6	B (1) ^b	wStri	AF481175
<i>Macrostelus strifrons</i> Anufriev	Leafhopper	4	0		
<i>Nephotettix malayanus</i> Ishihara & Kawase	Green leafhopper	6	B (2) ^b	wMal	AF481176
<i>Nephotettix nigropictus</i> (Stal)	Green leafhopper	46	B (3) ^b	wNig	AF481177
<i>Nephotettix virescens</i> (Distant)	Green leafhopper	292	B (35) ^b	wVirP	AF481178
				wVir	AF481179
<i>Nilaparvata bakeri</i> (Muir)	Brown planthopper	9	B (3) ^b	wBak	AF481180
<i>Nilaparvata lugens</i> (Stal)	Brown planthopper	237	B (39) ^b	wLug	AF481181
<i>Nisia nervosa</i> (Motschulsky)	Planthopper	15	B (7) ^b	wNer	AF481182
<i>Oliarus</i> sp.	Planthopper	1	0		
<i>Poophilus costalis</i> Walker	Leafhopper	5	0		
<i>Pyrilla perpusilla</i> (Walker)	Planthopper	3	0		
<i>Recilia dorsalis</i> (Motschulsky)	Zig-zag leafhopper	116	A, B (6) ^b	wRecM	AF481183
				wRecC	AF481184
<i>Sogatella furcifera</i> (Horvath)	White-backed planthopper	275	B (90) ^b	wFur	AF481185
<i>Stirellus</i> sp.	Green leafhopper	6	? (2) ^c	-	-
<i>Tagosodes pusanus</i> (Distant)	Leafhopper	1	0		

Thaia oryzivora Ghauri

Orange-headed
leafhopper

45

0

HYMENOPTERA

Amauromorpha sp.

Parasitic wasp

1

0

Brachymeria excarinata Gahan

Chalcidid wasp

4

A (2)^b

wExc

AF481186

Brachymeria lasus (Walker)

Chalcidid wasp

3

0

Brachymeria megaspila Cameron

Chalcidid wasp

1

0

Camponotus spp.

Ant

5

0

Campsomeris sp.

Parasitic wasp

1

0

Charops brachypterum (Cameron)

Parasitic wasp

2

0

Charops sp.

Parasitic wasp

1

0

Copidosomopsis nacoieiae (Eady)

Parasitic wasp

1

0

Cotesia angustibasis (Gahan)

Parasitic wasp

4

0

Cotesia cypris Nixon

Parasitic wasp

1

? (1)^c

-

-

Cotesia flavipes Cameron

Parasitic wasp

3

A (1)^b

wFla

AF481187

Diacamma sp.

Ant

3

0

Elasmus philippinensis Ashmead

Parasitic wasp

1

0

Gambrus sp.

Parasitic wasp

2

0

Goniozus nr. triangulifer Kieffer

Parasitic wasp

2

0

Goniozus sp.

Parasitic wasp

5

B (1)^b

wGon

AF481188

Macrocentrus philippinensis Ashmead

Parasitic wasp

5

A (1)^b

wMph

AF481189

Macrocentrus sp.

Parasitic wasp

4

0

Neanastatus sp.

Eupelmid wasp

1

0

Oecophylla smaragdina Fabricius

Ant

4

0

Opius sp.

Parasitic wasp

13

B (1)^b

wDveP

AF481190

Platygaster oryzae Cameron

Parasitic wasp

2

0

Polyrachis sp. 1

Ant

1

0

Polyrachis sp. 2

Ant

1

? (1)^c

-

-

Polyrachis sp. 3

Ant

1

0

Polyrachis sp. 4

Ant

3

0

Prosevania sp.

Ensign wasp

1

A (1)^b

wPro

AF481202

Ropalidia cyathiformis (Fabricius)

Yellow jacket

4

0

Ropalidia sp.

Yellow jacket

1

0

Sceliphron madraspatanum conspicillatum

Sphecoid wasp

1

0

(Costa)

Solenopsis sp.

Ant

2

A (1)^a

-

-

<i>Telenomus rowani</i> (Gahan)	Parasitic wasp	1	0		
<i>Temelucha philippinensis</i> (Ashmead)	Parasitic wasp	13	A (4) ^b	wPhi	AF481196
<i>Temelucha stangli</i> (Ashmead)	Parasitic wasp	1	0		
<i>Tetrastichus schoenobii</i> Ferriere	Parasitic wasp	2	0		
<i>Trichogramma</i> sp.	Parasitic wasp	3	0		
<i>Trichogrammatoidea</i> sp.	Parasitic wasp	1	0		
<i>Trichomabopsis apanteloctena</i> (Crawford)	Parasitic wasp	2	B (1) ^b	wApa	AF481191
<i>Trichomma cnaphalocrosis</i> Uchida	Parasitic wasp	15	B (2) ^b	wCnaM	AF481192
				wCnaC	AF481193
<i>Tropobracon schoenobii</i> (Viereck)	Parasitic wasp	4	B (1) ^b	wSch	AF481194
<i>Xanthopimpla flavolineata</i> Cameron	Parasitic wasp	7	0		

LEPIDOPTERA

<i>Chilo suppressalis</i> (Walker)	Rice stem borer	1	0		
<i>Cnaphalocrocis medinalis</i> (Guenee)	Rice leaffolder	86	B (42) ^b	wMed	AF481195
<i>Marasmia</i> sp.	Grass moth	1	A (1) ^a	-	-
<i>Melanitis</i> sp.	Green-horned caterpillar	2	0		
<i>Mythimna separata</i> (Walker)	Ear-cutting caterpillar	1	0		
<i>Nymphula depunctalis</i> (Guenee)	Grass moth	4	B (2) ^a	-	-
<i>Pelopidas mathias</i> (Fabricius)	Skipper	1	0		
<i>Polytremis pellucida</i> (Murray)	Skipper	1	0		
<i>Scirpophaga incertulas</i> (Walker)	Rice yellow stem borer	20	B (2) ^b	wInsO	AF481197
				wInsP	AF481198
<i>Sesamia inferens</i> (Walker)	Pink stem borer	4	0		

MANTODEA

<i>Hierodula</i> sp.	Praying mantid	1	0		
----------------------	----------------	---	---	--	--

ORTHOPTERA

<i>Acrida willemsei</i> Dirsh	Grasshopper	5	0		
<i>Anaxipha longipennis</i> (Serville)	Cricket	6	A (4) ^b	wLon	AF481199
<i>Ceracris fasciata</i> (Brunner)	Grasshopper	1	0		
<i>Conocephalus longipennis</i> (de Haan)	Grasshopper	53	0		
<i>Euscirtus concinnus</i> (Haan)	Cricket	27	0		
<i>Gryllotalpa orientalis</i> Burmeister	Mole cricket	1	0		
<i>Hieroglyphus banian</i> (Fabricius)	Grasshopper	1	0		

<i>Metioche vittaticolis</i> (Stal)	Cricket	5	0		
<i>Oxya japonica japonica</i> (Thunberg)	Grasshopper	44	0		
<i>Teleogryllus</i> sp.	Cricket	1	A (1) ^b	wTel	AF481200
<i>Tettigidea</i> sp.	Pygmy grasshopper	2	0		

THYSANOPTERA

<i>Stenchaetothrips biformis</i> (Bagnall)	Rice thrips	1	0		
--	-------------	---	---	--	--

4. ผลการศึกษา

4.1 *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้

คณะผู้วิจัยได้ทำการเพิ่มจำนวน DNA (cloning) และหาลำดับ DNA (sequencing) ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงวันผลไม้จากแมลงวันผลไม้ที่พบการติดเชื้อ *Wolbachia* ทั้งสิ้น 13 สปีชีส์ โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนหุ้มเปลือกนอกของแบคทีเรีย *Wolbachia* (wsp) ผลการวิจัยพบแมลงวันผลไม้บางชนิดที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* 2 สายพันธุ์อาศัยร่วมอยู่ด้วยกันได้แก่ *Bactrocera* sp. 8 (*B. dorsalis* sp. A1) และ *B. diversa* นอกจากนี้ยังพบว่า *Bactrocera* sp. 1 (*B. ascita* sp. B) มีแบคทีเรีย *Wolbachia* อาศัยร่วมด้วยถึง 5 สายพันธุ์ ซึ่งจัดเป็นการรายงานการพบ multiple infection ในแมลงให้อาศัยที่มากที่สุดเท่าที่เคยรายงานมาแมลงวันผลไม้ชนิดนี้เป็น new species ซึ่งยังไม่ได้มีการรายงานเป็นทางการ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด species ใหม่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างสายพันธุ์กันใน *B. dorsalis* และ *B. pyrifoliae* จากกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* complex ซึ่งอยู่ในผลฝรั่งเช่นเดียวกัน ดังนั้น *Wolbachia* จึงอาจจะเป็นสาเหตุให้เกิดการแยกชนิดของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* complex ดังกล่าวเนื่องจากแมลงวันผลไม้ชนิดเดียวกันที่มีแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่างชนิดกันผสมพันธุ์กันจะได้ลูกที่เป็นหมัน มีผลให้เกิดการแยกผสมพันธุ์โดยคุณสมบัติของ *Wolbachia* ที่เรียกว่า bidirectional cytoplasmic incompatibility ภาพที่ 1 แสดงลำดับ DNA ของสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่พบในแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับลำดับ DNA ของสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่พบในแมลงชนิดอื่นๆ ในต่างประเทศ ส่วนความสัมพันธ์ของการวิวัฒนาการของ *Wolbachia* สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในแมลงวันผลไม้ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2 จากการเปรียบเทียบลำดับ DNA กับแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานไว้แล้ว พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่อาศัยร่วมกับแมลงวันผลไม้มีกลุ่มสายพันธุ์ใหม่ถึง 3 กลุ่มด้วยกัน คือ กลุ่ม Asc พบใน *B. ascitoides* กลุ่ม Cuc พบใน *B. cucurbitae* นอกจากนี้ยังพบใน *B. ascita* sp. B, *B. pyrifoliae* และ *B. dorsalis* sp. A1 และกลุ่ม Des พบใน *D. destillatoria* และ *B. ascitoides*

ภาพที่ 1

<i>B. cucurbitae</i>	A GGT AAA GAA AAG GAT AGT CCC --- --- --- TTA ACA AGA TCT TTT ATA GCT GGT GGT GCA TTT GGT TA
<i>B. caudata</i>	. . . A CC . . . GTT C . GA. . T --- --- --- . A GC.GC.
<i>B. dorsalis</i> sp. A	. . AC .G AGT G.T T.C . . . A --- --- --- . A CC.C.

[illegible]

ภาพที่ 1 (ต่อ)

[illegible]

ภาพที่ 1 (ข้อ)

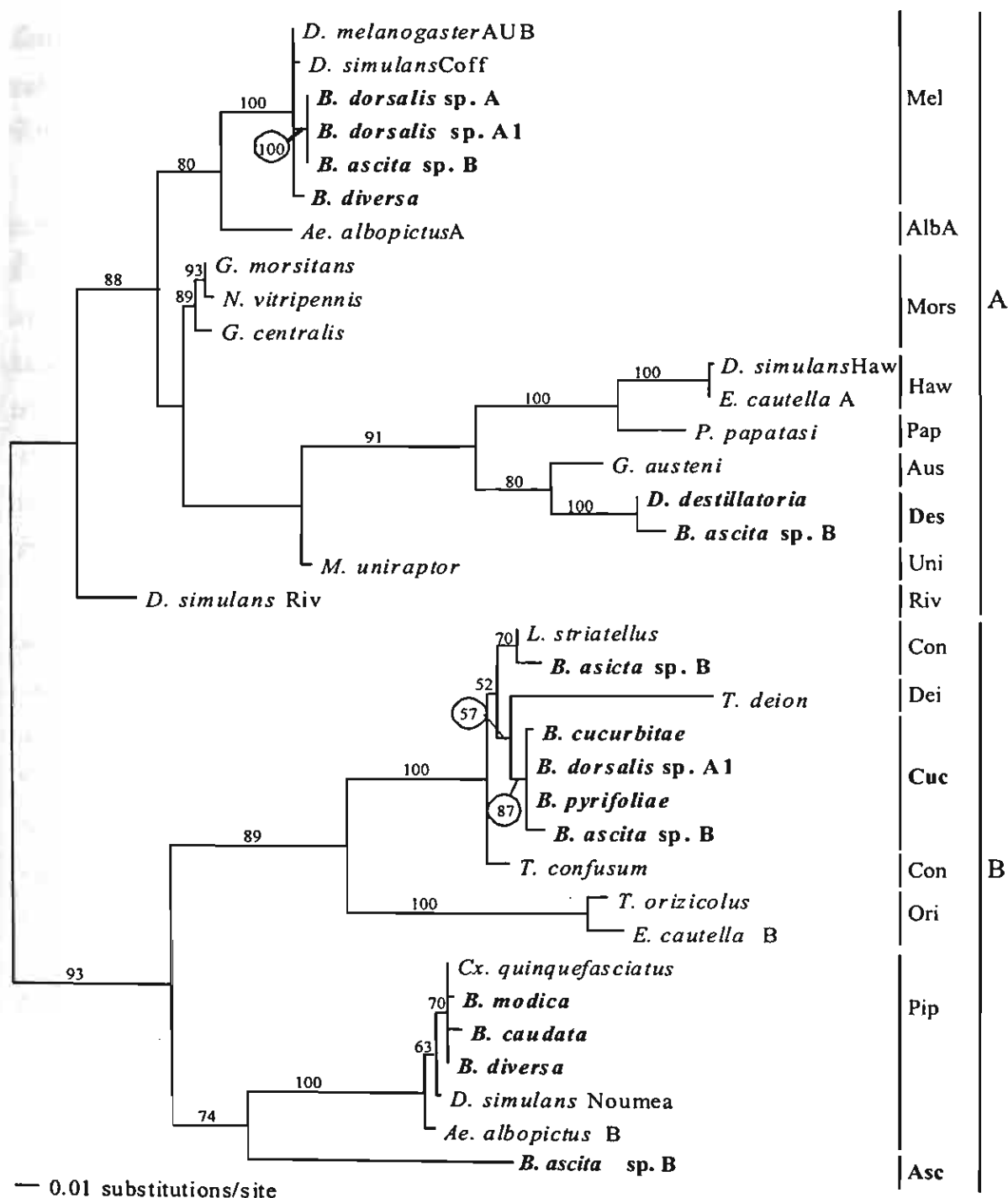
ภาพที่ 1 (ต่อ)

[illegible]

ภาพที่ 1 (ต่อ)

<i>B. cucurbitae</i>	-	---	---	---	---	---	GAT	ACT	GGT	ATC	GAA	AAT	GTT	GTT	TAC	AGC	ACT	TTT	GGT	GCA	GAA	GC
<i>B. caudata</i>	-	---	---	---	---	---	.C.	...	AAA	GAG	ATC	...	.C	...	...	...	G.	...	...	...	...	...
<i>B. dorsalis</i> sp. A	C	AGA	CAG	GTT	ACT	---	---	---	G.A	.C	GCA	T.C	.A	...	C.	...	...	...	G.	...	...	...
<i>B. pyrifoliae</i>	-	---	---	---	---	---	---	---	...	...	...	A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>B. dorsalis</i> sp. Al Mel	C	AGA	CAG	GTT	ACT	---	---	---	...	G.A	.C	GCA	T.C	.A	...	C.	...	...	G.	...	...	...
<i>B. dorsalis</i> sp. Al Cuc	-	---	---	---	---	---	---	---	...	...	...	A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>B. diversa</i> Mel	C	GGA	CAG	GCT	GCT	---	---	---	...	G.A	.C	GCA	T.C	.A	...	C.	...	...	G.	...	...	...
<i>B. diversa</i> Pip	-	---	---	---	---	---	---	---	.C.	...	AAA	GAG	ATC	...	.C	...	...	G.	...	...	...	...
<i>B. modica</i>	-	---	---	---	---	---	---	---	.C.	...	AAA	GAG	ATC	.G.	.C	...	...	G.	...	...	...	...
<i>B. ascita</i> sp. B Mel	C	AGA	CAG	GTT	ACT	---	---	---	...	G.A	.C	GCA	T.C	.A	...	C.	...	...	G.	...	...	...
<i>B. ascita</i> sp. B Des	T	GCT	GCA	GGC	AAA	---	---	---	GAC	AAA	.C	.AA	.G	GAG	CTC	.A	...	C.	...	...	...	...
<i>B. ascita</i> sp. B Con	-	---	---	---	---	---	---	---	...	G.	...	...	A.	...	.C.	...	...	G.	...	...	...	...
<i>B. ascita</i> sp. B Cuc	-	---	---	---	---	---	---	---	...	...	...	A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>B. ascita</i> sp. B Asc	-	--T	AAA	AAA	ATG	AAA	ACA	TCA	CC.	.A.	AAA	GAT	AT.	.C	...	C.	...	...	G.	...	...	...
<i>D. destillatoria</i>	-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	.G	GAA	CTC	.A	...	C.	...	...	G.	...	...	...

ภาพที่ 2 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการของสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Wolbachia* สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในแมลงวันผลไม้ คำนวณโดยวิธี Maximum Likelihood



4.2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในแมลงวันผลไม้ที่พบในประเทศไทย 25 ชนิด ดังตารางที่ 3 โดยใช้ยีน Cytochrome Oxidase Subunit 1 ได้แบ่งกลุ่มแมลงวันผลไม้ที่ศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม คือ แมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* แมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* และแมลงวันผลไม้อื่นๆ ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน

ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสโดยใช้วิธี Kimura2-parameter ระหว่างแมลงวันผลไม้ทั้ง 7 สปีชีส์ พบว่ามีความแตกต่างตั้งแต่ 1% ถึง 16.9% จากจำนวนที่ใช้ศึกษาทั้งสิ้น 638 bp ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* sp. A และ *B. carambolae* มีความแตกต่างของลำดับเบสน้อยที่สุดและแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* sp. L และ *B. arecae* มีความแตกต่างของลำดับเบสมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกรดอะมิโนพบว่ามีความแตกต่างกัน 13 ตำแหน่ง จาก จำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 213 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. arecae* และ *B. dorsalis* sp. L มีความแตกต่างของกรดอะมิโนมากกว่าแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis*

เมื่อทำการศึกษาตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* โดยใช้แมลงวันผลไม้ *B. tau*, *Ceratitis capitata*, ยุงก้นปล่อง *Anopheles gambiae*, แมลงชนิด *Compsomyiops callipes* และแมลง *Locusta migratoria* เป็น Outgroup จากการคำนวณด้วย neighbor-joining พบว่าลำดับเบสที่ได้สามารถแบ่งแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. pyrifoliae* และ *B. dorsalis* sp. L ซึ่งมีค่า bootstrap support เท่ากับ 100 ซึ่งแมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดมีลำดับเบสที่ต่างกันเพียง 1.1% (7 เบส) กลุ่มที่สองประกอบด้วย แมลงวันผลไม้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *B. dorsalis* sp. A, *B. dorsalis* sp. O, *B. carambolae* และ *B. raiensis* ซึ่งมีค่า bootstrap support เท่ากับ 71% ซึ่งความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้มีค่าตั้งแต่ 0.6% (4 เบส) ถึง 2% (12 เบส) และในกลุ่มสุดท้ายประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. arecae* เพียงสปีชีส์เดียว ซึ่งมีค่าแตกต่างของลำดับเบสต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนเดียวกัน 12.1% ถึง 15.4%

ภาพที่ 4 แสดงตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* คำนวณโดยวิธี Maximum Parsimony มีรูปแบบของตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมแบบเดียวกันกับภาพที่ 3 เมื่อคำนวณโดยวิธี Neighbor-Joining ในขณะที่เมื่อคำนวณด้วย Maximum Likelihood พบว่า แมลงวันผลไม้ชนิด *B.*

dorsalis sp. O ได้แยกออกจากกลุ่มที่ 2 ซึ่งรูปแบบตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมได้ต่างจากเมื่อคำนวณด้วยอีกสองวิธีที่กล่าวแล้วข้างต้น (ภาพที่ 5)

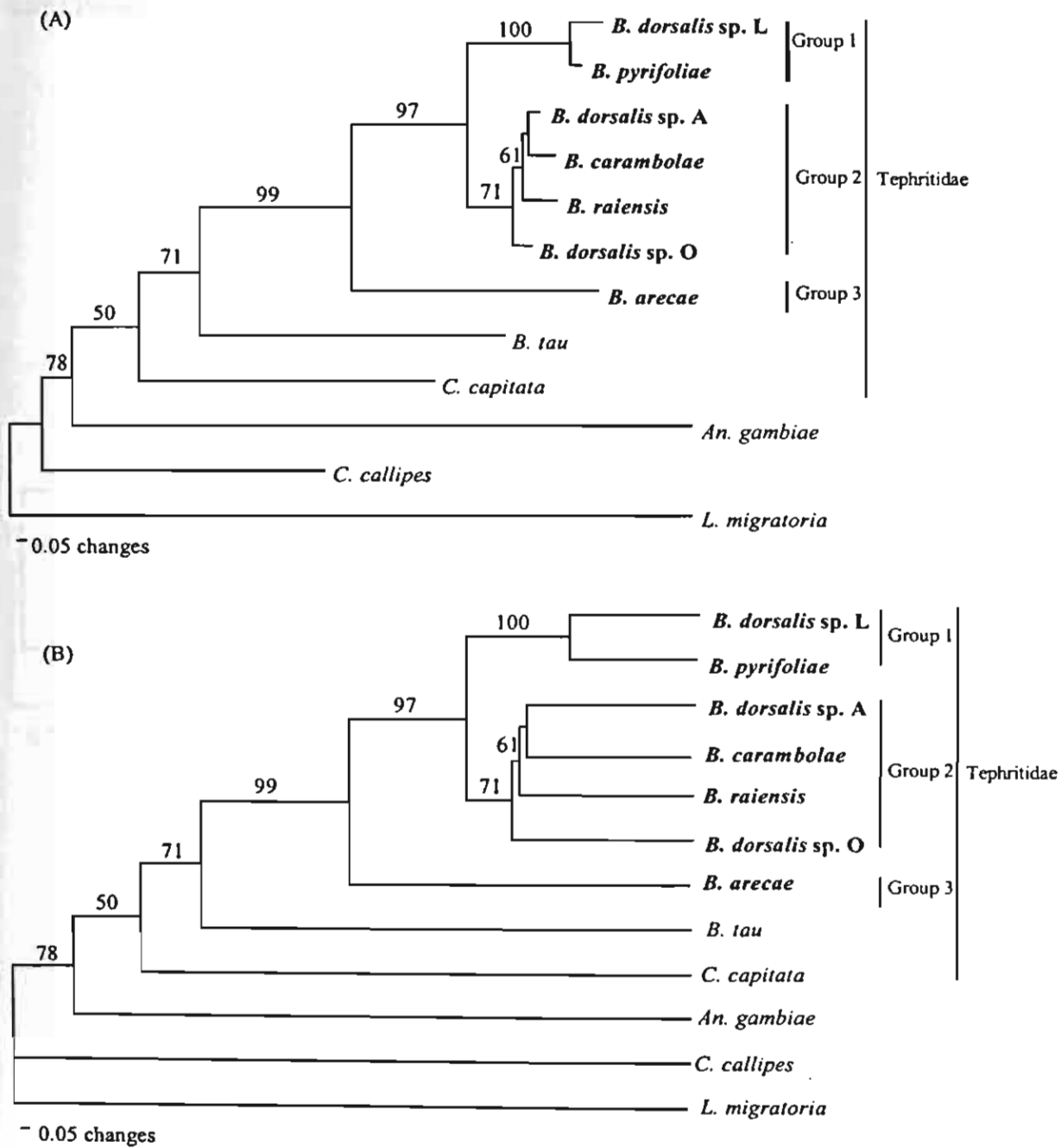
ตารางที่ 5 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis*

Species	1	2	3	4	5	6
1. <i>B. dorsalis</i> sp. A						
2. <i>B. dorsalis</i> sp. O	0.011					
3. <i>B. pyrifoliae</i>	0.053	0.053				
4. <i>B. arecae</i>	0.138	0.131	0.158			
5. <i>B. carambolae</i>	0.010	0.015	0.059	0.154		
6. <i>B. raiensis</i>	0.013	0.015	0.055	0.163	0.017	
7. <i>B. dorsalis</i> sp. L	0.058	0.058	0.011	0.169	0.060	0.060

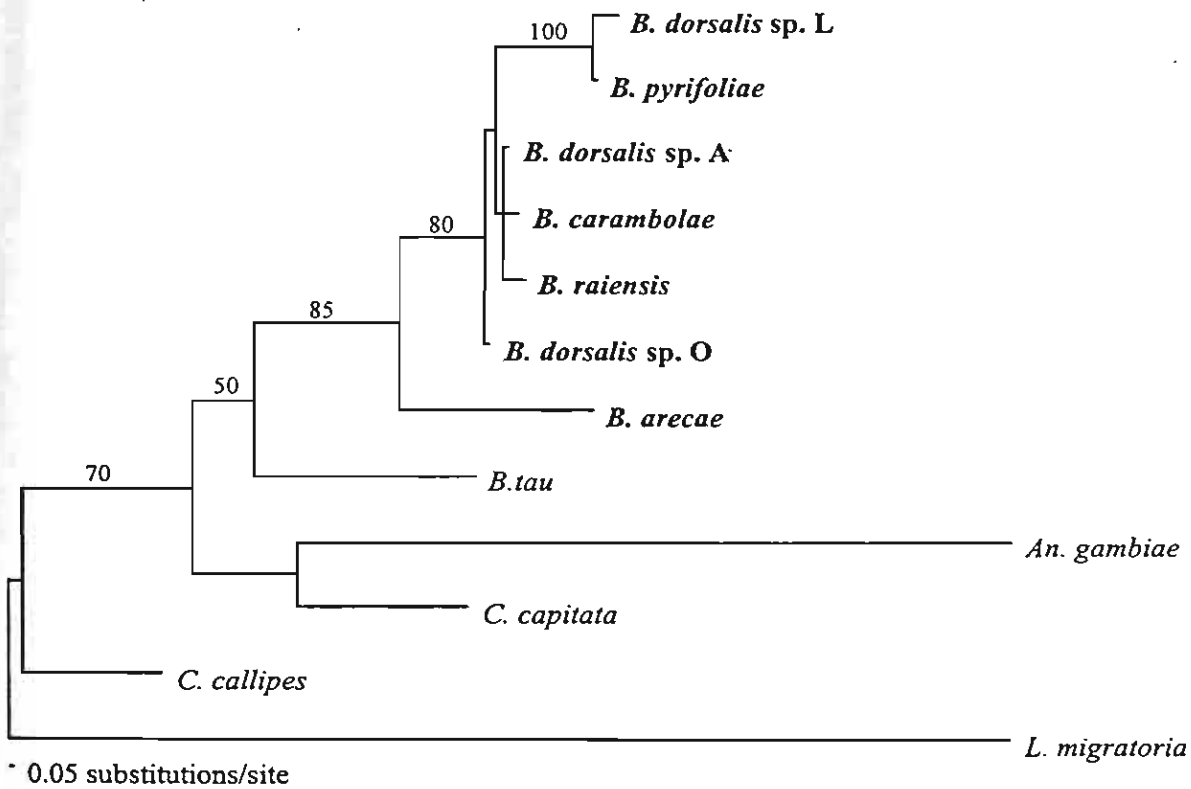
ตารางที่ 6 แสดงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน Cytochrome oxidase subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ *B. dorsalis*

Species	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
	6	6	6	8	8	8	8	9	9	9	9	9	0
	2	7	9	2	2	9	9	1	5	5	8	9	0
	6	8	1	2	4	6	9	4	0	6	9	5	5
<i>B. dorsalis</i> sp. A	F	V	K	V	V	V	T	I	L	N	L	L	N
<i>B. dorsalis</i> sp. O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. carambolae</i>	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. raiensis</i>	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pyrifoliae</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	T
<i>B. dorsalis</i> sp. L	-	-	-	-	-	-	P	V	-	D	M	-	T
<i>B. arecae</i>	-	T	N	-	-	I	-	V	F	-	-	I	-

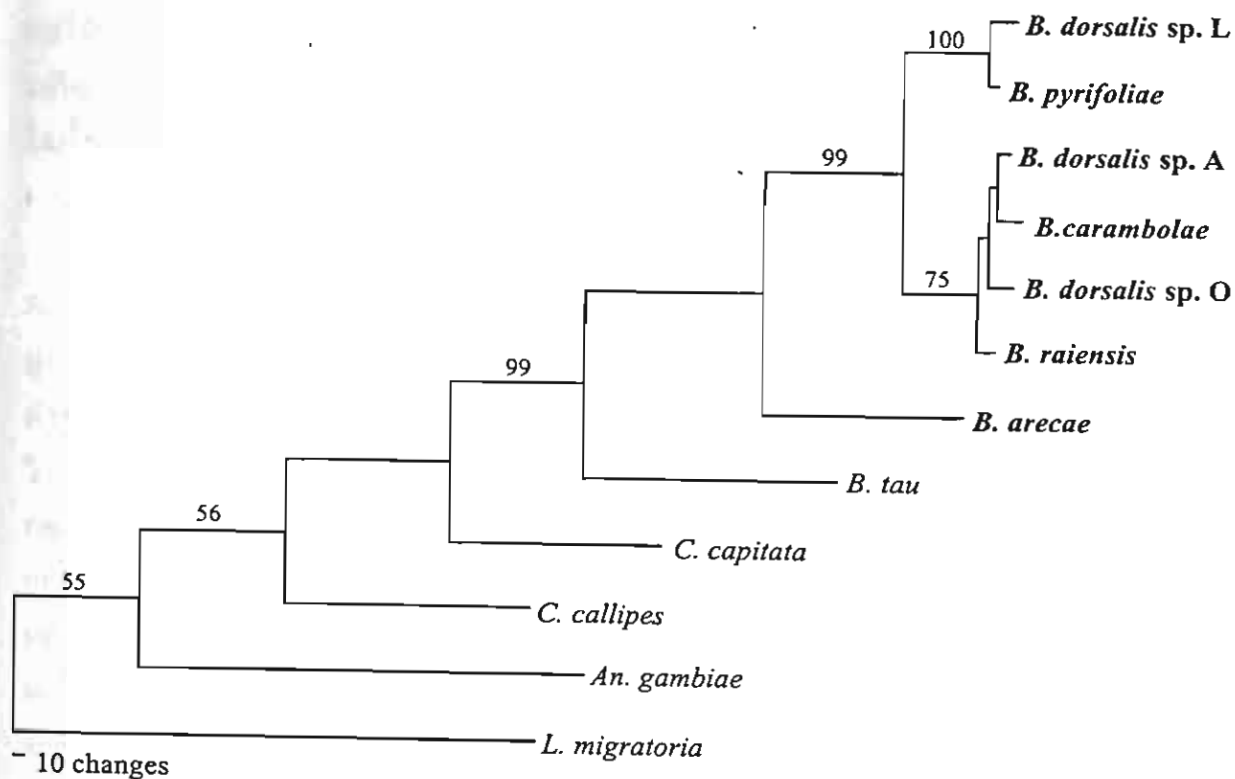
ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* คำนวนโดยวิธี Neighbor-joining



ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* คำนวนโดยวิธี Maximum Parsimony



ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* คำนวนโดยวิธี Maximum Likelihood

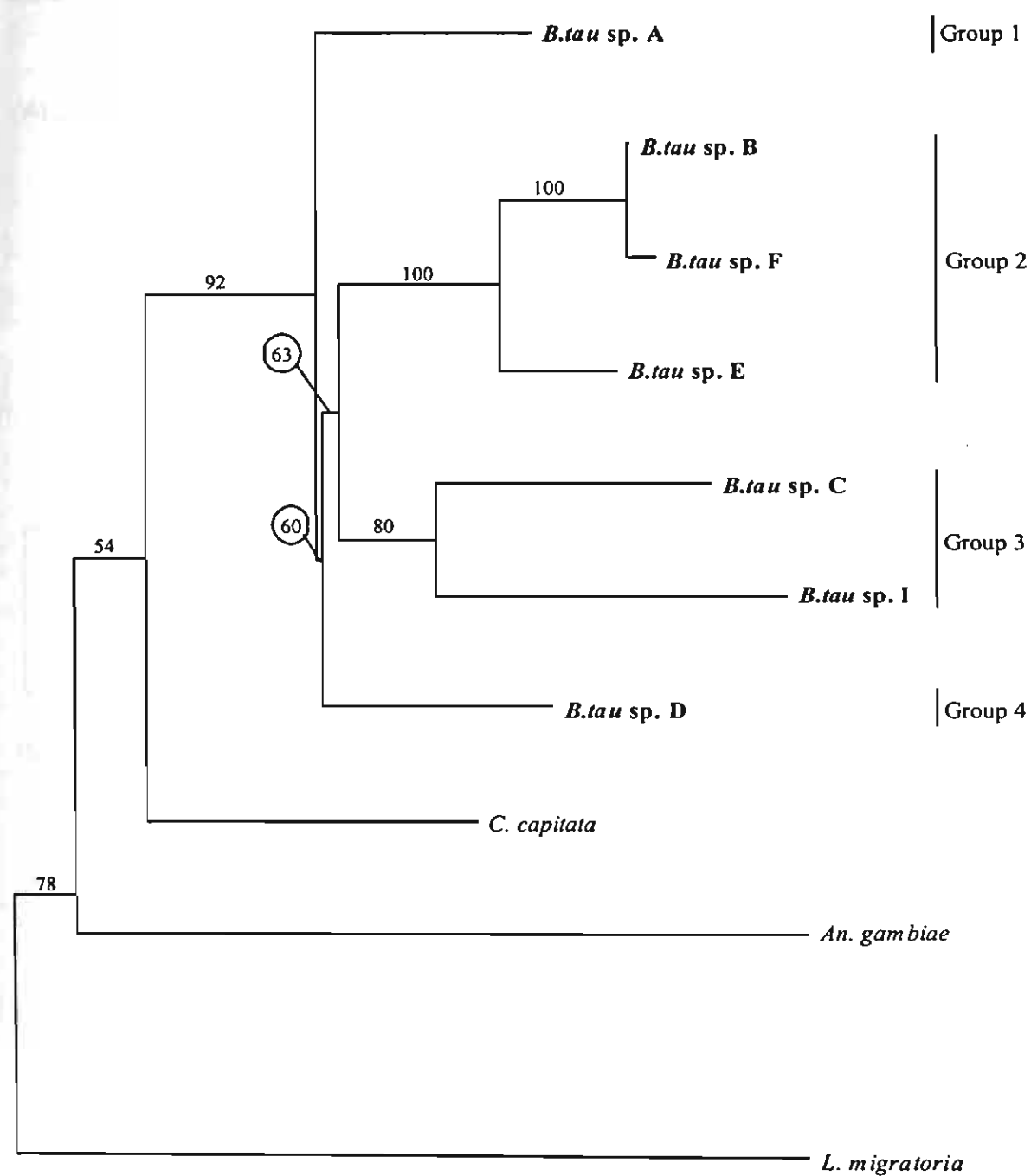


ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสโดยใช้วิธี Kimura2-parameter ระหว่างแมลงวันผลไม้ทั้ง 7 สปีชีส์ พบว่ามีความแตกต่างตั้งแต่ 0.6% ถึง 17.9% จากจำนวนที่ใช้ศึกษาทั้งสิ้น 638 bp ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. B และ *B. tau* sp. F มีความแตกต่างของลำดับเบสน้อยที่สุดและแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. F และ *B. tau* sp. I มีความแตกต่างของลำดับเบสมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกรดอะมิโนพบว่ามีความแตกต่างกัน 9 ตำแหน่งจากจำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 213 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. F และ *B. tau* sp. I มีความแตกต่างของกรดอะมิโนมากกว่าแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau*

เมื่อทำการศึกษาด้านสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* โดยใช้แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata*, ยุงก้นปล่อง *Anopheles gambiae* และแมลง *Locusta migratoria* เป็น outgroup จากการศึกษาด้วยวิธี Neighbor-Joining, Maximum Likelihood และ Maximum Parsimony พบว่า ตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้มีรูปแบบเดียวกัน อีกทั้งลำดับเบสที่ได้สามารถแบ่งแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 6 และ 7 โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. A โดยจากตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมอาจจัดให้แมลงวันผลไม้ชนิดนี้เป็นแมลงวันผลไม้ที่เก่าแก่ที่สุดในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน กลุ่มที่สองประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *B. tau* sp. B, *B. tau* sp. E และ *B. tau* sp. F ซึ่งมีค่า bootstrap support เท่ากับ 100% และความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้มีค่าตั้งแต่ 0.6% (4 เบส) ถึง 5.2% (32 เบส) กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *B. tau* sp. C และ *B. tau* sp. I ซึ่งมีค่า bootstrap support เท่ากับ 80% และมีความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้เท่ากับ 13.5% (77 เบส) และในกลุ่มสุดท้ายประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. D เพียงสปีชีส์เดียวซึ่งมีค่าความแตกต่างของลำดับเบสต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนเดียวกัน 9.6% ถึง 14.7%

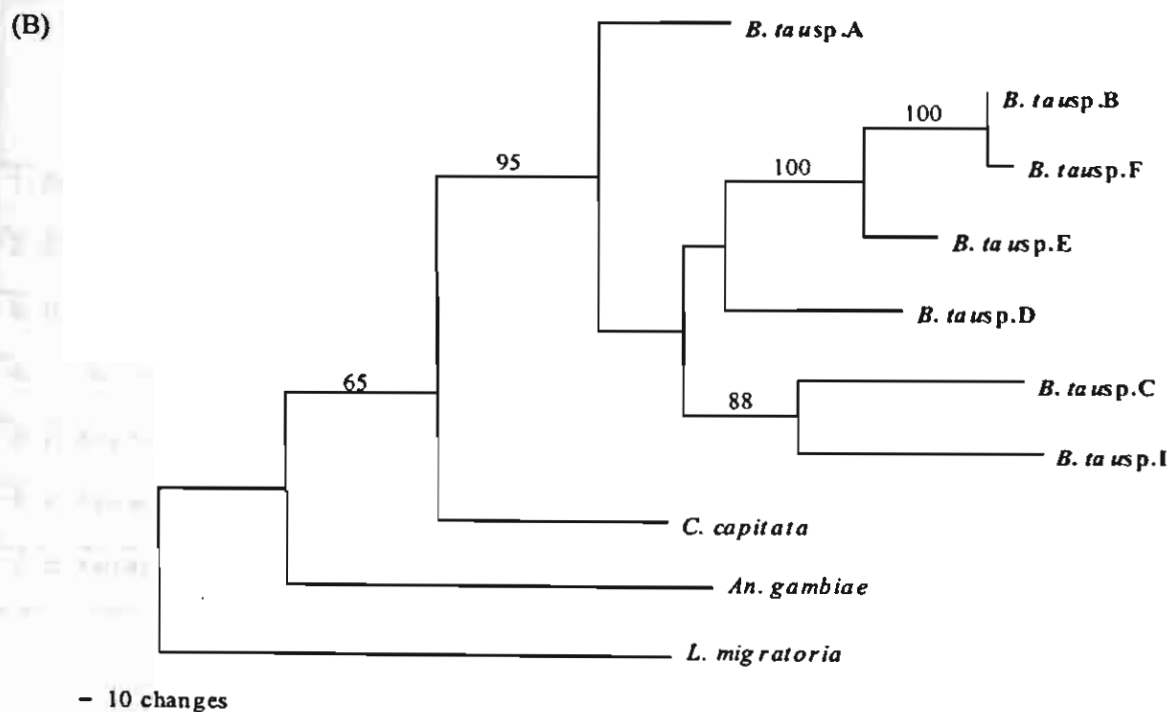
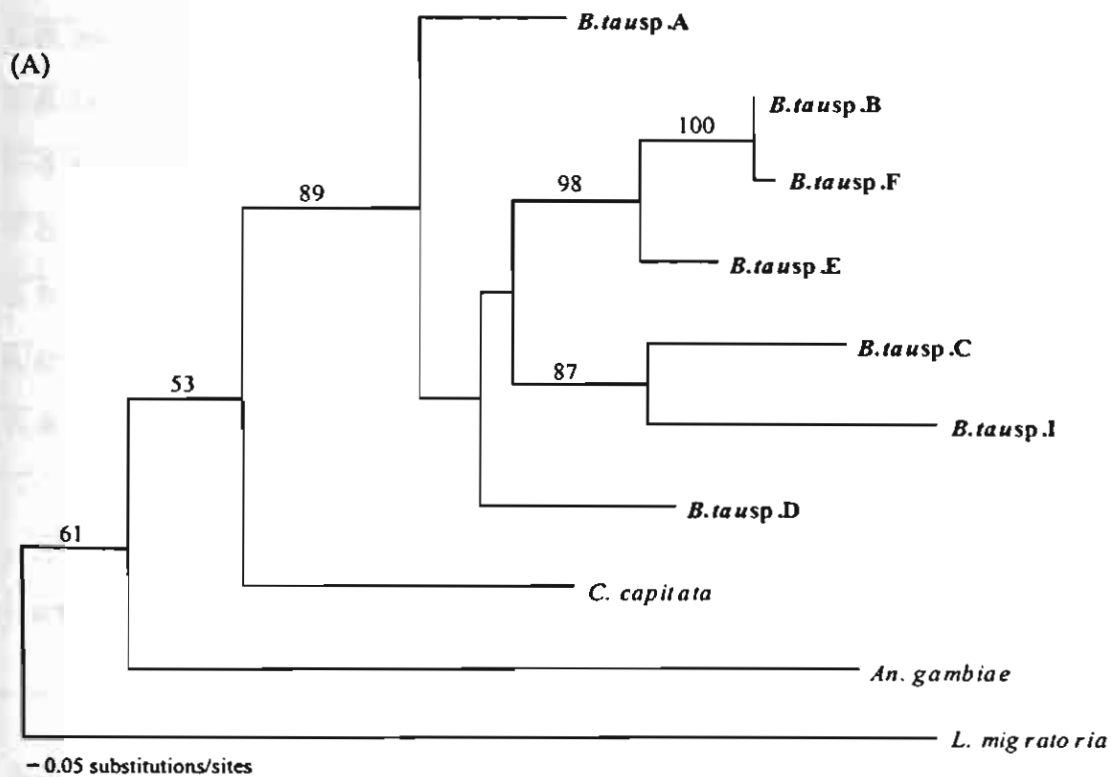
จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนจาก 4 ชนิดของยีน *Bactrocera* พบว่าแมลงวันผลไม้เหล่านี้มีความแตกต่างของลำดับเบสเฉลี่ยเท่ากับ 13.6% โดยลำดับเบสที่ต่างกันได้ แสดงในตารางที่ 9 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างแมลงวันผลไม้ที่อยู่ในชนิดที่ต่างกันพบว่าแมลงวันผลไม้ในชนิด *Bactrocera* และ *Asiadacus* มีความแตกต่างของลำดับเบสสูงที่สุด (15.7%) และแมลงวันผลไม้ชนิด *Hemigymnodacus* และ *Zeugodacus* มีความแตกต่างของลำดับเบสน้อยที่สุด (11.2%) ดังแสดงใน ตารางที่ 15 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกรดอะมิโน พบว่ามีความแตกต่างกัน 18 ตำแหน่งจากจำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 213 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยแมลงวันผลไม้ในชนิด *Bactrocera* มีความแตกต่างของกรดอะมิโน

ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera tau* คำนวณโดยวิธี Neighbor-joining



– 0.05 changes

ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera tau* จำนวนโดยวิธี Maximum Likelihood (A) และวิธี Maximum Parsimony (B)



ตารางที่ 7 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน
Bactrocera tau

Species	1	2	3	4	5	6
1. <i>B. tau</i> sp. A						
2. <i>B. tau</i> sp. B	0.105					
3. <i>B. tau</i> sp. C	0.144	0.124				
4. <i>B. tau</i> sp. D	0.096	0.123	0.132			
5. <i>B. tau</i> sp. E	0.104	0.052	0.130	0.106		
6. <i>B. tau</i> sp. F	0.113	0.006	0.132	0.123	0.059	
7. <i>B. tau</i> sp. I	0.145	0.171	0.135	0.147	0.164	0.179

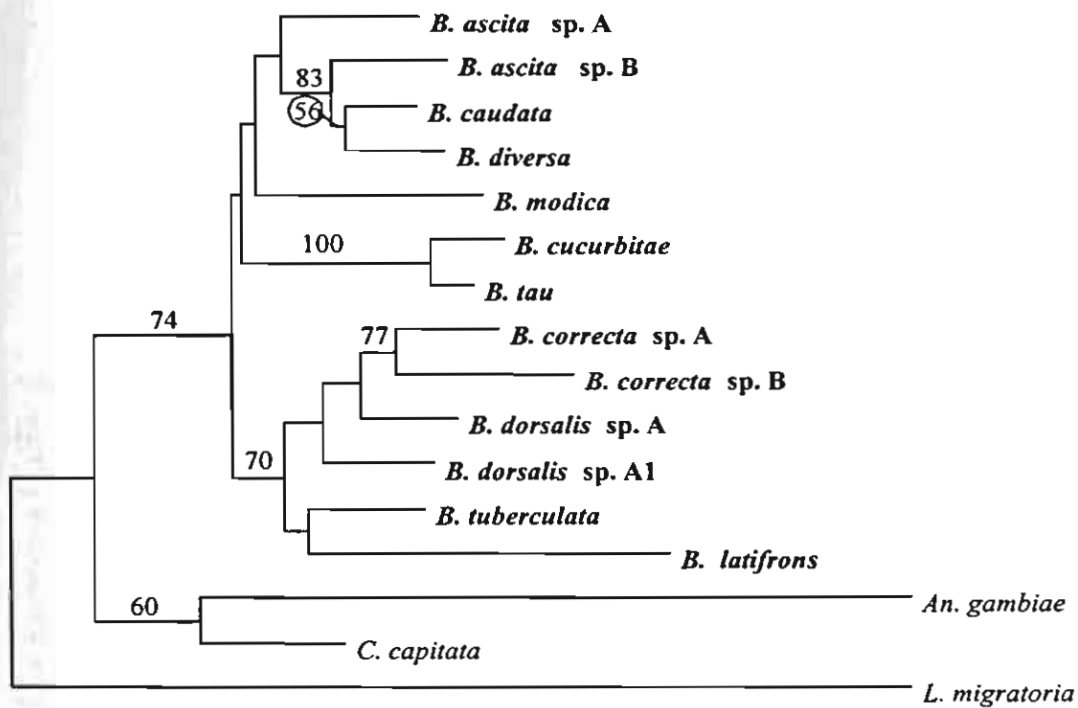
ตารางที่ 8 แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน
Bactrocera tau

Species	2	2	2	2	2	2	2	2	3
	5	5	6	8	8	8	8	9	0
	3	6	7	2	6	9	9	6	0
	9	5	9	5	4	4	7	6	6
1. <i>B. tau</i> sp. A	V	T	V	V	L	L	V	P	N
2. <i>B. tau</i> sp. B	M	I	.	I	I	.	.	.	.
3. <i>B. tau</i> sp. C	.	I	.	.	.	.	.	.	T
4. <i>B. tau</i> sp. D	.	I	.	.	.	.	I	.	.
5. <i>B. tau</i> sp. E	M	I	.	I	.	.	.	.	.
6. <i>B. tau</i> sp. F	M	I	.	I	I	.	.	A	.
7. <i>B. tau</i> sp. I	.	I	T	.	.	M	.	.	T

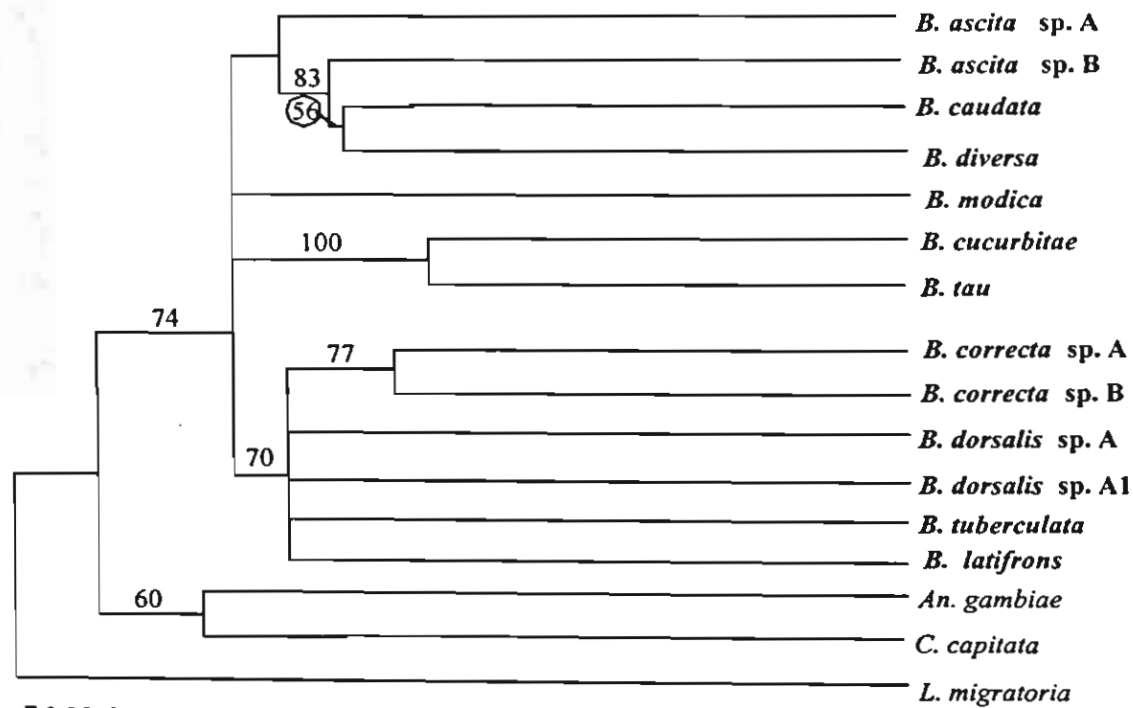
เท่ากับ 12 ตำแหน่ง และแมลงวันผลไม้ในชั้น *Zeugodacus* มีความแตกต่างของกรดอะมิโนเท่ากับ 6 ตำแหน่ง

เมื่อทำการศึกษาตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้ โดยใช้แมลงวันผลไม้ชนิด *Ceratitis capitata*, ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles gambiae* และแมลงชนิด *Locusta migratoria* เป็น outgroup จากการคำนวณด้วยวิธี Neighbor-Joining พบว่าลำดับเบสที่ได้จัดให้แมลงวันผลไม้ในชั้น *Bactrocera* อยู่ในกลุ่มแยกจากแมลงวันผลไม้ชั้นอื่น โดยมีค่า bootstrap support เท่ากับ 70% ดังแสดงในภาพที่ 8 อย่างไรก็ตามจากการที่ได้ยังไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ระหว่างแมลงวันผลไม้สปีชีส์ต่างๆ ในชั้น *Bactrocera* เนื่องจากค่า bootstrap value ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 50% ยกเว้นในกลุ่มของ *B. correcta* sp. A และ *B. correcta* sp. B ซึ่งมีค่า bootstrap value เท่ากับ 77% และ ตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้ พบว่าแมลงวันผลไม้ในชั้น *Hemigymnodacus* และ *Asiadacus* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแมลงวันผลไม้ในชั้น *Zeugodacus* มากกว่าแมลงวันผลไม้ในชั้น *Bactrocera* อีกทั้งยังพบว่าแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* sp. A และ *B. cucurbitae* ซึ่งอยู่ในชั้น *Zeugodacus* และทำลายพืชในตระกูลแตงเหมือนกัน ได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันบนตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมโดยมีค่า bootstrap support เท่ากับ 100% ยิ่งไปกว่านั้น ต้นไม้วิวัฒนาการที่ได้จัดให้แมลงวันผลไม้ชนิด *B. ascita* sp. A และ *B. ascita* sp. B ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันอยู่ในกลุ่มที่ต่างกันบนตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรม โดยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. ascita* sp. B อยู่ในกลุ่มเดียวกับแมลงวันผลไม้ชนิด *B. caudata* และ *B. diversa* โดยมีค่า bootstrap support เท่ากับ 83% ในขณะที่แมลงวันผลไม้ชนิด *B. ascita* sp. A ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแยกจากกลุ่มของ *B. ascita* sp. B เมื่อคำนวณตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 ชั้นด้วยวิธี Maximum Parsimony และ Maximum Likelihood พบว่าแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* และ *B. cucurbitae* ได้แยกกลุ่มออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นๆ โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 100% อย่างไรก็ตามจากการคำนวณด้วยวิธีทั้งสองนี้สามารถแยกแมลงวันผลไม้ในชั้น *Bactrocera* ออกจากแมลงวันผลไม้ในชั้นอื่นได้

ภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I ในแมลงวันผลไม้จิ้งหรีด *Bactrocera* ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* และ *Bactrocera tau* จำนวนโดยวิธี Neighbor-joining



~ 0.05 changes



~ 0.05 changes

ตารางที่ 9 แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของแมลงวันผลไม้ในจีนัส *Bactrocera* ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* และ *Bactrocera tau*

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>B. dorsalis</i> sp. A												
2. <i>B. dorsalis</i> sp. A 1	0.069											
3. <i>B. correcta</i> sp. A	0.088	0.109										
4. <i>B. correcta</i> sp. B	0.099	0.133	0.097									
5. <i>B. latifrons</i>	0.156	0.186	0.152	0.162								
6. <i>B. tuberculata</i>	0.104	0.078	0.124	0.137	0.147							
7. <i>B. modica</i>	0.139	0.128	0.156	0.174	0.180	0.135						
8. <i>B. diversa</i>	0.139	0.130	0.147	0.182	0.180	0.130	0.130					
9. <i>B. ascita</i> sp. A	0.137	0.135	0.149	0.160	0.174	0.126	0.132	0.108				
10. <i>B. ascita</i> sp. B	0.141	0.128	0.154	0.168	0.192	0.133	0.119	0.078	0.100			
11. <i>B. caudata</i>	0.133	0.122	0.132	0.152	0.170	0.122	0.124	0.062	0.093	0.076		
12. <i>B. cucurbitae</i>	0.156	0.143	0.156	0.170	0.188	0.152	0.154	0.143	0.135	0.132	0.133	
13. <i>B. tau</i>	0.152	0.139	0.162	0.168	0.180	0.133	0.149	0.135	0.124	0.132	0.126	0.045

ตารางที่ 10

แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนของแมลงวันผลไม้ในจีนัส *Bactrocera* ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Bactrocera dorsalis* และ *Bactrocera tau*

[illegible]

4.3 *Wolbachia* ในแมลงในนาข้าว

ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* จากแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว จำนวนทั้งสิ้น 2,585 ตัว จาก 209 สปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยพบว่าแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว จำนวน 49 สปีชีส์ (23.4%) มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ซึ่งแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวเหล่านี้ มาจาก 7 อันดับ ได้แก่ แมลงในอันดับ Coleoptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 7.1% แมลงในอันดับ Diptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 30.8% แมลงในอันดับ Hemiptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 11.6% แมลงในอันดับ Homoptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 54.2% แมลงในอันดับ Hymenoptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 31.0% แมลงในอันดับ Lepidoptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 40.0% และแมลงในอันดับ Orthoptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 18.2% โดยแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวที่ใช้ในการศึกษานี้ ส่วนมากมาจากอันดับเหล่านี้และมีแมลง ส่วนน้อยที่ได้มาจากอันดับ Blattaria Dermaptera Ephemeroptera Mantodea และ Thysanoptera ซึ่งแมลงเหล่านี้ไม่พบการติดเชื้อ *Wolbachia*

เมื่อทำการจำแนกความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ *Wolbachia* และความสัมพันธ์ทางห่วงโซ่อาหารของแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวที่ทำการศึกษานี้ พบว่า 51% ของแมลงที่ติดเชื้อ *Wolbachia* เป็นแมลงที่กินพืช และ 34.77 เป็นแมลงที่เป็นตัวห้ำและแมลงเบียน ในขณะที่อีก 14.3% เป็นแมลงที่ไม่ทราบความสัมพันธ์ทางห่วงโซ่อาหาร (ภาพที่ 9) โดยแมลงที่เป็นตัวห้ำ 4 สปีชีส์เป็นแมลงที่กินเหยื่อได้หลายชนิดในขณะที่อีก 2 สปีชีส์ ซึ่งเป็นตัวมวนเป็นแมลงที่กินเหยื่อเฉพาะไข่ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่น ในแมลงเบียนพบว่าแมลงเบียน 9 สปีชีส์ จาก 11 สปีชีส์ เป็นแมลงเบียนของตัวอ่อนของผีเสื้อ เช่น ผีเสื้อหนอนห่อใบข้าวและผีเสื้อหนอนกอ โดยแมลงเบียนบางสปีชีส์ เช่น *Trichomalopsis apantelectena* เป็นแมลงเบียน ทุติยภูมิของแมลงเบียนชนิด *Goniozus* sp. ซึ่งเป็นแมลงเบียนของผีเสื้อหนอนห่อใบข้าว อย่างไรก็ตามได้พบแมลงเบียน 2 ชนิดที่ไม่ได้เป็นแมลงเบียนของหนอนผีเสื้อ ซึ่งได้แก่ แมลงวันตาโตชนิด *Tomosvaryella subvirescence* และแมลงเบียนชนิด *Opius* sp. ซึ่งเป็นแมลงเบียนของเพลี้ยจักจั่นจำพวก *Nephotettix* spp. และ *Hydrellia* spp. ตามลำดับ ภาพที่ 9 A แสดงความสัมพันธ์ทางห่วงโซ่อาหารของแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว จำนวน 29 สปีชีส์ (จากจำนวนทั้งสิ้น 49 สปีชีส์) ที่ทราบความสัมพันธ์ทางห่วงโซ่อาหารและภาพที่ 9 B แสดงชนิดของแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวที่ไม่มีข้อมูลรับรองความสัมพันธ์ทางห่วงโซ่อาหาร

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่พบในแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว ซึ่งในการศึกษานี้ได้นำลำดับเบสของยีน wsp จากสายพันธุ์ *Wolbachia* ทั้งสิ้น 43 สายพันธุ์ของแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าว มาทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของยีน wsp จากสายพันธุ์ *Wolbachia* จากแมลงอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วของ Zhou และคณะ (1998) จำนวน 16

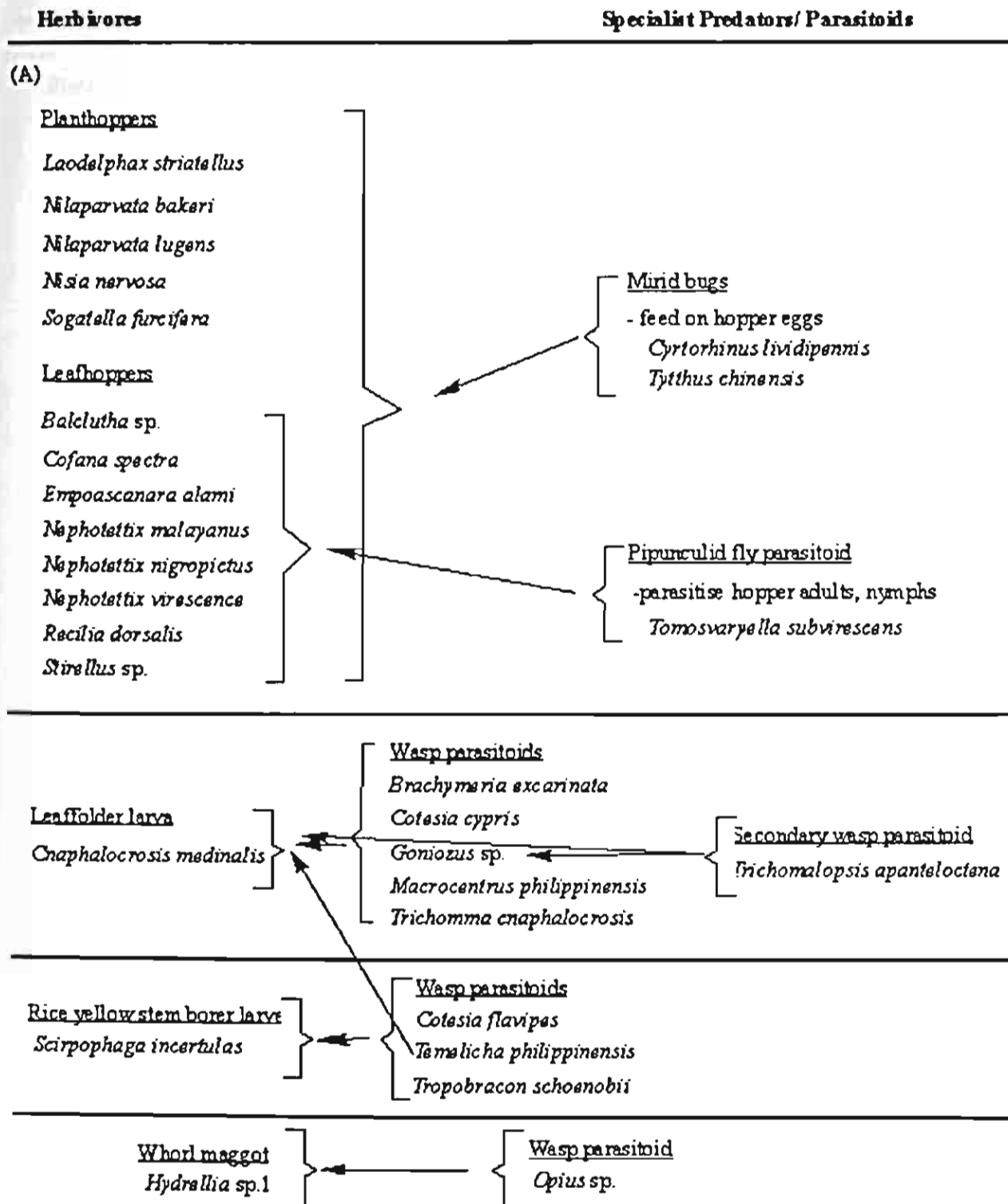
สายพันธุ์โดยใช้วิธี maximum parsimony และ distance ชนิด neighbor-joining วิเคราะห์โดยทั้ง 2 วิธีนี้ได้รูปแบบเดียวกัน โดยภาพที่ 10 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี distance ชนิด neighbor-joining

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้พบกลุ่มย่อยทั้งสิ้น 14 กลุ่ม จากการจัดกลุ่มย่อยของสายพันธุ์ *Wolbachia* จากหลักการที่เสนอโดย Zhou และคณะ (1998) โดยสายพันธุ์ *Wolbachia* จำนวน 29 สายพันธุ์ของแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวจัดอยู่ในกลุ่ม B และอีก 14 สายพันธุ์ จัดอยู่ในกลุ่ม A ดังแสดงในภาพที่ 11 อีกทั้งยังพบว่าแมลงชนิด *Scotinophora coarctata* มี *Wolbachia* อาศัยอยู่ถึง 3 สายพันธุ์ คือ CoaA, CoaC และ CoaR

ในความสัมพันธ์เชิงห่วงโซ่อาหารของเพลี้ยกระโดดและเพลี้ยจักจั่น รวมทั้งมวนที่เป็นตัวห้ำและแมลงเบียนของเพลี้ยกระโดดและเพลี้ยจักจั่น พบว่ามีความสัมพันธ์และความเป็นไปได้ของการถ่ายทอดจุลินทรีย์ *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ โดยล้วนแล้วแต่มี *Wolbachia* สายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม B อีกทั้งพบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Laodelphax striatellus* และเพลี้ยกระโดดชนิด *Sogatella furcifera* ได้ติดเชื้อ *Wolbachia* ที่มีลำดับเบสของยีน wsp เหมือนกัน อย่างไรก็ตามพบว่าเพลี้ยจักจั่นหลังลายชนิด *Recilia dorsalis* มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 2 สายพันธุ์ที่จัดอยู่ในทั้งกลุ่ม A และ B

ในแมลงกลุ่มที่เป็นแมลงเบียนของแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวและแมลงให้อาอาศัย พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงห่วงโซ่อาหาร เช่นเดียวกับกลุ่มเพลี้ยกระโดดและเพลี้ยจักจั่น ตัวอย่างเช่นในแมลงเบียน *Tropobracon schoenobii* และผีเสื้อหนอนห่อใบข้าว *Cnaphalocrosis medinalis* และผีเสื้อหนอนกอ *Scirpophaga incertulus* ซึ่งสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่พบในแมลงทั้ง 3 ชนิดนี้ ล้วนแต่อยู่ในกลุ่มย่อย Pip และมีความแตกต่างของลำดับเบสเท่ากับ 0.37% และ 0.56% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 10 อีกทั้งยังพบว่าในห่วงโซ่อาหารของแมลงเบียนและแมลงให้อาอาศัยของแมลงเบียนนั้น มี *Wolbachia* ทั้งสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม A และกลุ่ม B เช่นเดียวกับแมลงในห่วงโซ่อาหารของเพลี้ยกระโดดและเพลี้ยจักจั่น แมลงในห่วงโซ่อาหารของแมลงเบียนและแมลงให้อาอาศัยของแมลงเบียนนั้น ได้แก่ แมลงเบียนชนิด *Temelucha philippinensis* และ *Macrocentrus philippinensis* มีแมลงที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ที่มีลำดับเบสของยีน wsp เหมือนกัน แม้ว่าแมลงเบียนทั้งสองชนิดนี้จะเป็นแมลงเบียนของแมลงให้อาอาศัยต่างชนิดกันก็ตาม ดังแสดงในภาพที่ 9

ภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ทางห่วงโซ่อาหารของแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวที่ติดเชื้อ *Wolbachia*



ภาพที่ 9 (ต่อ)

Herbivores

Generalist Predators

Others-feeding relations on
rice unknown

(B)

Black bug

Scotinophora coarctata

Fly larvae

Agromyza oryzae

Chlorops oryzae

Gnaphalocrocis medinalis

Orseolia oryzae

Beetle larva

Dicladispa armigera

Moth larva

Marasmia sp.

Paddy root weevil

Hydronomaidius molitor

Cricket

Telsoeryllus sp.

Ants

Solenopsis sp.

Polyrachis sp.2

Ground beetle

Chlaenius sp.2

Cricket

Anaxipha longipennis

Flies

Chironomus sp.1

Diopsis apicalis

Tipula aino

Moths

Nymphula depunctalis

True bugs

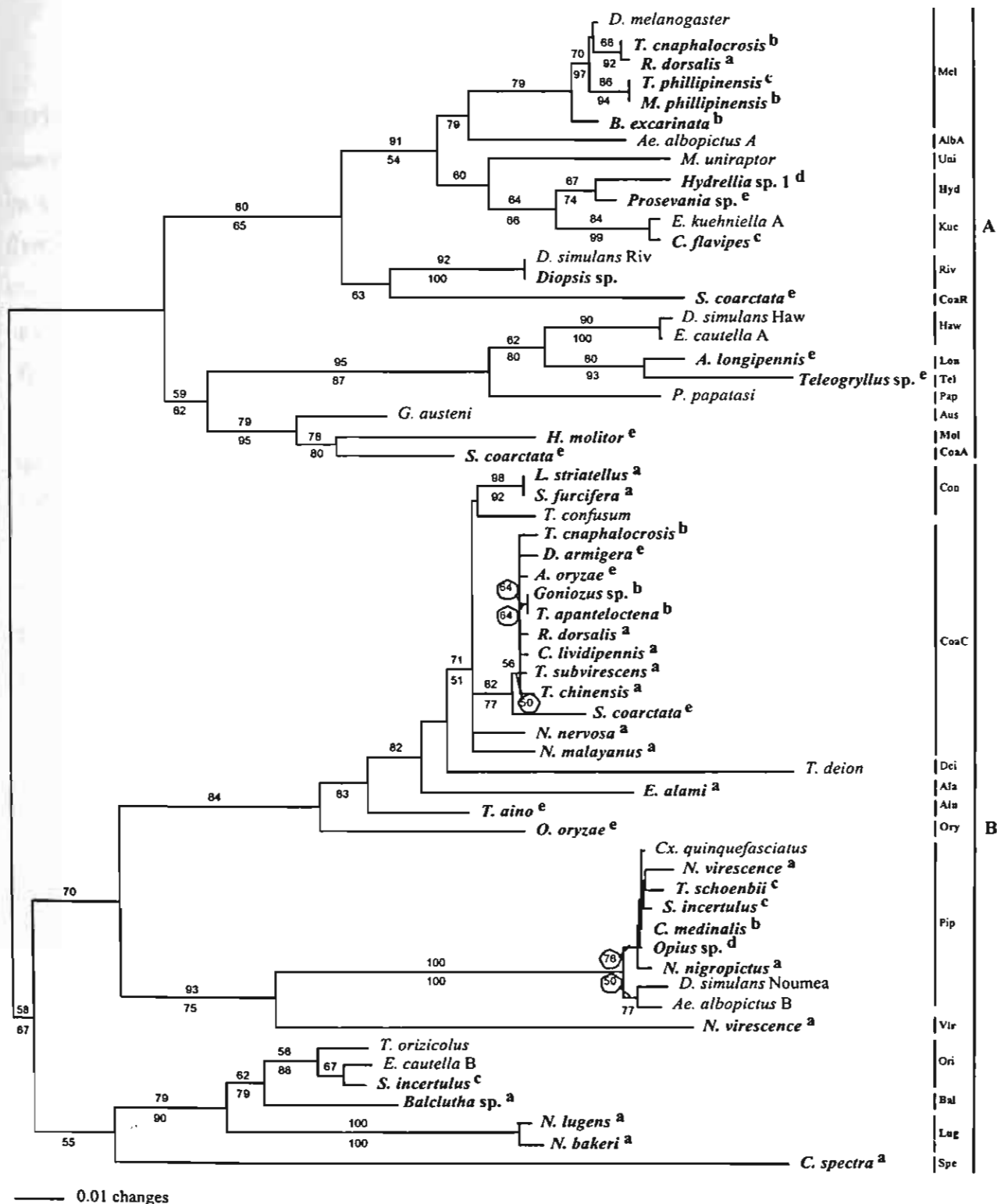
Minus insignis

Paraeucosmetus pallicornis

Wasp

Prosevania sp.

ภาพที่ 10 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการของสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Wolbachia* สายพันธุ์ต่างๆที่พบในแมลงที่อาศัยอยู่ในนาข้าวคำนวณโดยวิธี Neighbor-joining



5.1 *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้

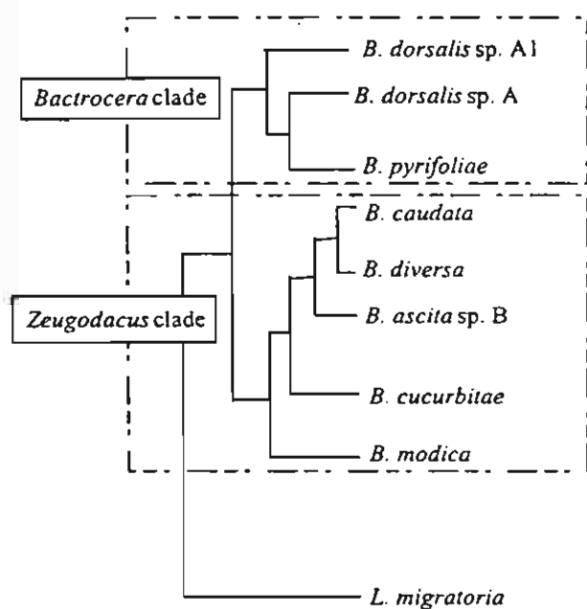
เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ *Wolbachia* และแมลงวันผลไม้ พบว่าตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมทั้งสองมีความสอดคล้องกัน (ภาพที่ 11) โดยพบว่าแมลงวันผลไม้กลุ่ม *Zeugodacus* ต่างติดเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* สายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม B ยกเว้นใน *B. diversa* และ *B. ascita* sp. B ซึ่งติดเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* มากกว่า 1 สายพันธุ์ อีกทั้งยังพบว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Wolbachia* ที่พบในแมลงวันผลไม้กลุ่ม *Zeugodacus* ได้จัดอยู่ในกลุ่มบนตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมกลุ่มเดียวกันกลุ่ม *Pip* ยกเว้น *B. cucurbitae* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Cuc* จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีการถ่ายทอดจุลินทรีย์ *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ในแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae*

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าจุลินทรีย์ *Wolbachia* อาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ในแมลงวันผลไม้จีนัส *Bactrocera* การค้นพบว่าแมลงวันผลไม้สองชนิดในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* (*B. dorsalis* sp. A และ *B. pyrifoliae*) มีการติดเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* ต่างสายพันธุ์กัน อีกทั้งแมลงวันผลไม้สปีชีส์ *B. dorsalis* sp. A1 ติดเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* สองสายพันธุ์ (*Mel*, *Cuc*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Wolbachia* ในแมลงวันผลไม้ สปีชีส์ *B. dorsalis* sp. A และ *B. ascita* sp. B ได้ เนื่องจากแมลงวันผลไม้สปีชีส์ *B. ascita* sp. A ไม่พบรายงานการติดเชื้อ *Wolbachia* ในขณะที่แมลงวันผลไม้สปีชีส์ *B. ascita* sp. B มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ถึง 5 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสปีชีส์ของแมลงให้อาศัยรวมถึงแมลงวันผลไม้จีนัส *Bactrocera* ที่ได้ทำการศึกษาด้วย

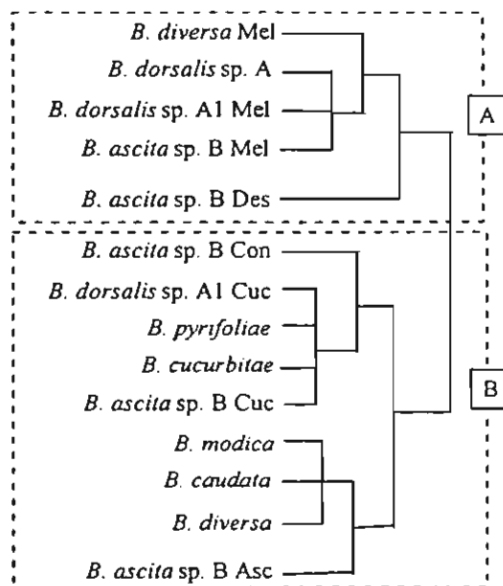
การศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้พบการติดเชื้อจุลินทรีย์ *Wolbachia* ถึง 5 สายพันธุ์ในแมลงวันผลไม้ชนิด *B. ascita* sp. B ซึ่งนับว่าเป็นการค้นพบจำนวนสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ *Wolbachia* ในสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านที่สูงที่สุด จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงอาจเป็นไปได้ที่จะใช้จุลินทรีย์ *Wolbachia* เป็นพาหะในการนำยีนที่เป็นประโยชน์ถ่ายทอดลงไปในประชากรของแมลงพาหะและแมลงศัตรูพืชได้ในอนาคต

ภาพที่ 11
ผลไม่ให้อาศัย

เปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างเชื้อ *Wolbachia* และแมลงวัน



Bactrocera phylogeny



Bactrocera's *Wolbachia* strains
Phylogeny

5.2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้

การปรากฏขึ้นและการเพิ่มจำนวนความหลากหลายของชนิดของพืชมีดอก นับว่าเป็นสมมุติฐานหนึ่งที่ช่วยเร่งอัตราการเกิดวิวัฒนาการในแมลงกินพืชหลายกลุ่มรวมทั้งในกลุ่ม Diptera (Strong et al., 1984) จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแมลงวันผลไม้จำพวก Tephritid จากจีนัสต่างๆ โดย Han และ McPherson ในปี 1998 พบว่าแมลงวันผลไม้จำพวกนี้น่าจะมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่รวดเร็วมาก ในการศึกษาวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงชีวโมเลกุลของแมลงวันผลไม้ในจีนัส *Bactrocera* จำนวนทั้งสิ้น 31 ชนิด โดยมีแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* จำนวน 7 ชนิด, แมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* จำนวน 7 ชนิด และแมลงวันผลไม้อื่นๆ นอกกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน จำนวน 13 ชนิด พบว่าแมลงวันในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนทั้งสองมีค่าความแตกต่างของลำดับเบสสูงกว่าค่าความแตกต่างของลำดับเบสในแมลงกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนอื่นๆ เช่น ตัวกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Pissodes strobi* (Langor และ Sperling, 1997) และมีเชื้อกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Choristoneura* (Sperling และ Hickey, 1994)

จากตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้พบว่าแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. dorsalis* อาจจำแนกได้ตามรูปแบบการทำลายพืช (generalist) และแมลงวันผลไม้ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืช (specialist) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ แมลงวันผลไม้ชนิด *B. arecae* จัดว่าเป็นแมลงวันผลไม้ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืช ได้อยู่ในกลุ่มแยกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนเดียวกันอย่างไรก็จากการคำนวณหาต้นไม้ทางสายวิวัฒนาการได้จัดให้แมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* sp. L ซึ่งเป็นแมลงวันผลไม้ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืช ได้อยู่ในกลุ่มแยกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนเดียวกันอย่างไรก็จากการคำนวณหาต้นไม้ทางสายวิวัฒนาการได้จัดให้แมลงวันผลไม้ชนิด *B. pyrifoliae* ซึ่งเป็นแมลงวันผลไม้ที่ทำลายพืชหลายชนิดและแมลงวันผลไม้ชนิด *B. dorsalis* sp. L ซึ่งเป็นแมลงวันผลไม้ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืช อยู่ในกลุ่มเดียวกันซึ่งผลการศึกษาที่ได้สนับสนุน ผลการวิจัยจากไมโททิกโครโมโซม (Baimai et al., 1999 a และ b)

ในการศึกษาตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* โดยพบว่ารูปแบบตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้มีลักษณะตรงกันกับผลทางโครโมโซม (Baimai et al., 2000 b) และผลทางอิเล็กโตรโฟรีซิส (Saelee, 1999) อีกทั้งยังพบว่าแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนนี้มีค่าความแตกต่างของลำดับเบสสูงโดยค่าที่ได้นี้ตรงกันกับผลการศึกษาจากวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งจากวิธีดังกล่าวได้พบว่าการถ่ายทอดของยีน (gene flow) ระหว่างแมลงวันผลไม้สปีชีส์ต่างๆ ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *B. tau* เป็นอัตราที่ต่ำจึงอาจเป็นไปได้ว่าการขาดการถ่ายทอดของยีนระหว่างสปีชีส์ของแมลงวันผลไม้ ทำให้เกิดการ

แยกกันของการสืบพันธุ์ (reproductive isolation) ของแมลงวันผลไม้ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ได้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้จีนัส *Bactrocera* ทั้งสิ้น 13 สปีชีส์ พบว่ายีน Cytochrome Oxidase Subunit I ของไมโทคอนเดรีย สามารถแยกแมลงวันผลไม้ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย แมลงวันผลไม้จีนัส *Bactrocera* และกลุ่มที่สองประกอบด้วยแมลงวันผลไม้จีนัส *Asiadacus*, *Hemigymnodacus* และ *Zeugodacus* จากการศึกษาของ Brower ในปี 1994 พบว่าเราสามารถวัดค่าความแตกต่างของลำดับเบสประมาณเวลาของชีวโมเลกุล (molecular clock) หรือ สิ่งมีชีวิตจากกลุ่มบนต้นไม้วิวัฒนาการต่างๆ ใช้ในการแยกออกจากกัน โดยเวลาของชีวโมเลกุลสามารถประมาณเท่ากับ 1 ล้านปี หากความแตกต่างของลำดับเบสมีค่าเท่ากับ 2.3% ดังนั้น แมลงวันผลไม้ทั้งสองกลุ่มอาจแยกออกจากกันเมื่อ 6.69 ล้านปีที่แล้ว อีกทั้งผลจากการศึกษาวิจัยพบว่าตามสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมที่ได้มีความสอดคล้องกับผลจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา โดย Hardy (1973)

5.3 *Wolbachia* ในแมลงในนาข้าว

จากการตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงในนาข้าวที่พบในประเทศไทย พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ *Wolbachia* ของแมลงในนาข้าวที่ทำการตรวจสอบมีค่าเท่ากับ 23.4% อย่างไรก็ตามก็คาดว่าจะสามารถพบการติดเชื้อ *Wolbachia* เพิ่มขึ้นหากมีการเพิ่มจำนวนสปีชีส์ของแมลงที่จะทำการตรวจสอบ ซึ่งจากการรายงานที่ผ่านมา (Werren et al. 1995 a, Wenseleers et al 1998, Plantard et al, 1999, Kittayapong et al. 2000 a, b, Werren and Windsor 2000) พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงให้อาศัยมีค่าระหว่าง 16.9% ถึง 53.6%

ในกลุ่มของแมลงให้อาศัยอยู่ในนาข้าวที่ทำการตรวจสอบ พบว่าแมลงในอันดับ Homoptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* สูงที่สุด เท่ากับ 54.2% โดยผลที่ได้ต่างจากรายงานของการศึกษาอื่นที่ผ่านมาซึ่งไม่พบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงอันดับ Homoptera (Werren et al 1995 a, West et al 1998, Werren and Windsor 2000) อย่างไรก็ตามก็ดีเมื่อมีการนำวิธีการ Long PCR มาใช้ ทำให้พบว่าแมลงอันดับ Homoptera มีการติดเชื้อ *Wolbachia* 3 สปีชีส์ จาก 7 สปีชีส์ ที่ทำการตรวจสอบ (Jeyaprakash and Hoy 2000) จึงมีความเป็นไปได้ว่าวิธีการ Long PCR สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงให้อาศัยได้

การแพร่กระจายการติดเชื้อ *Wolbachia* ที่ไม่เท่ากันของแมลงให้อาศัยต่างอันดับกันนั้น อาจเกิดจากความแตกต่างของความสามารถในการยอมรับการติดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของแมลงให้อาศัยและความสามารถในการปรับตัวของเชื้อ *Wolbachia* ในแมลงเจ้าบ้านชนิดใหม่ ซึ่งได้มีผู้เสนอทฤษฎีว่าความไม่สอดคล้องกันของสปีชีส์ของแมลงให้อาศัยและสายพันธุ์

Wolbachia อาจเกิดจากการติดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของแมลงให้อาศัย (O'Neill et al. 1992, Werren et al 1995 b, Zhou et al 1998).

การปฏิสัมพันธ์ทางนิเวศวิทยาาระหว่างสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* นับว่าเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน วิธีการหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงสุดคือการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน โดยการที่แมลงเบียนที่ไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* เข้าดูดกินน้ำเลี้ยงของแมลงเจ้าบ้านที่ติดเชื้อ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่ผ่านมา พบว่าในแมลงเบียนและแมลงเจ้าบ้านของแมลงเบียนมีสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่มีความใกล้ชิดกัน (Werren et al. 1995 b, Van meer et al. 1999, Vavre et al. 1999) อีกทั้งเมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน โดยผ่านทางแมลงเบียนในห้องทดลอง

พบว่าสามารถถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านได้ประสบความสำเร็จ แม้ว่าอัตราการติดเชื้อจะลดลงในรุ่นลูกหลาน (Heath et al. 1999, Huigens et al. 2001) ในการศึกษาครั้งนี้จากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่พบในแมลงในนาข้าวแสดงให้เห็นว่าการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน โดยผ่านทางแมลงเบียนได้เกิดขึ้นในอดีตและกระบวนการนี้ยังคงดำเนินอยู่ ดังแสดงในภาพที่ 9 A ยิ่งไปกว่านั้นเรายังพบว่าการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน อาจเกิดขึ้นได้ในห่วงโซ่อาหารของตัวห้ำและเหยื่อ เช่น ในมวนเขียวดูดไข่ และเหยื่อของมัน ซึ่งได้แก่เพลี้ยกระโดด และเพลี้ยจักจั่น

ในกลุ่มความสัมพันธ์ของแมลงในนาข้าว พบว่าห่วงโซ่อาหารมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Wolbachia* และสายพันธุ์ของเชื้อ *Wolbachia* ที่พบในแมลงเจ้าบ้านที่ติดเชื้อ โดยจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดย Noda และคณะ (2001) พบว่า พยาธิของเพลี้ยกระโดดอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามสปีชีส์ของเพลี้ยกระโดดและจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า มวนเขียวดูดไข่อาจทำให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามสปีชีส์ของเพลี้ยกระโดดและเพลี้ยจักจั่นซึ่งในห่วงโซ่อาหารนี้พบว่าทั้งเพลี้ยกระโดดและเพลี้ยจักจั่น ล้วนแต่มีมวนเขียวดูดไข่ *Cyrtorhinus lividipennis* และมวน *Tytthus chinensis* เป็นตัวห้ำของไข่และตัวอ่อนทั้งสิ้น ดังแสดงในภาพที่ 9 A ซึ่งการที่ตัวมวนได้เจาะดูดกินน้ำเลี้ยงจากไข่หรือจากตัวอ่อนอาจนำไปสู่การถ่ายตอดน้ำเลี้ยงซึ่งมีเชื้อ *Wolbachia* บรรจุอยู่ในอีกกรณีหนึ่งนี้อาจก่อให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านคือผ่านทางแมลงเบียน ซึ่งในห่วงโซ่อาหารของเพลี้ยกระโดดและเพลี้ยจักจั่นจีนีสันมีแมลงวันดาโต *Tomosvaryella subvirescence* เป็นแมลงเบียนของเพลี้ยจักจั่นจีนีสัน *Nephotettix* จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ของเชื้อ *Wolbachia* ที่พบในแมลงที่รวมอยู่ในห่วงโซ่อาหารนี้ ซึ่งได้แก่ *Recilia dorsalis* *Nephotettix malayanus* และ *Nisia nervosa* ซึ่งเป็นเพลี้ยกระโดดและเพลี้ยจักจั่น รวมทั้งตัวห้ำของไข่ *Cyrtorhinus lividipennis* *Tytthus*

chinensis และแมลงเบียนของเพลี้ยจักจั่น *Tomosvaryella subvirescence* ล้วนแล้วแต่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 10

ในกลุ่มห้วงโซ่อาหารของผีเสื้อหนอนท่อใบข้าว *Cnaphalocrocis medinalis* และผีเสื้อหนอนกอ *Scirpophaga incertulas* นั้นมีแมลงเบียนเป็นปัจจัยสำคัญที่อาจก่อให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของแมลงให้อาศัยได้ ซึ่งจากผลที่ได้จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ *Wolbachia* พบว่า สายพันธุ์ *Wolbachia* ที่พบใน ผีเสื้อหนอนท่อใบข้าว ผีเสื้อหนอนกอ และแมลงเบียนของผีเสื้อหนอนกอ *Tropobracon schoenobii* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ อย่างไรก็ตามก็ยังไม่พบว่าแมลงเบียนสปีชีส์อื่นที่ติดเชื้อ *Wolbachia* มีสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าแมลงเบียนของหนอนท่อใบข้าว *Trichomalopsis apanteloctena* และเป็นแมลงเบียนหุติยภูมิของแมลงเบียนชนิด *Goniozus* sp. ซึ่งเป็นแมลงเบียนอีกชนิดหนึ่งของหนอนท่อใบข้าวมีการติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการแบ่งความสัมพันธ์ของแมลงในนาข้าวที่ติดเชื้อ *Wolbachia* โดยแบ่งออกตามห้วงโซ่อาหารเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ อีกทั้งเมื่อทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ *Wolbachia* แต่ละสายพันธุ์พบว่าในแต่ละห้วงโซ่อาหารมีแมลงที่ติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน ซึ่งปรากฏการณ์นี้อาจเกิดจากปรากฏการณ์การถ่ายทอดเชื้อ *Wolbachia* ข้ามชนิดของแมลงให้อาศัย อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังพบว่ามีแมลงในนาข้าวหลายชนิดที่ติดเชื้อ *Wolbachia* อีกทั้งยังมีสายพันธุ์ *Wolbachia* ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่แมลงในนาข้าวเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์ในเชิงห้วงโซ่อาหาร ซึ่งผลที่ได้นี้ทำให้ประสบความสำเร็จในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อ *Wolbachia* เมื่อเปรียบเทียบกับแมลงเจ้าบ้าน

6. หนังสืออ้างอิง

- Baimai V., Trinachartvanit W., Tigvattananont S., Grote P.J., Poramacom R., and Kijchalao U. 1995. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. I. Five sibling species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Genome*, **38**: 1015-1022.
- Baimai V., Phinchogsakuldit J., and Trinachartvanit W. 1999a. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand (III): Six members of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Zool. Stud.* **38**: 110-118.
- Baimai V., Phinchogsakuldit J., and Tigvattananont S. 1999b. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. IV. Evidence for six new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia*. **64**: 371-377.

- Baimai V., Samrandee C., Tigvattananont S., and Trinachartvanit W. 2000a. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. V. Cytotaxonomy of ten additional new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia*, **65**: 409-417.
- Baimai, V., Phinchongsakuldit, J., Sumrandee, C., and Tigvattananont, S. 2000b. Cytological evidence for a complex of species within the taxon *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Biol. J. Linn Soc.* **69**: 399-409.
- Barrion AT and Litsinger JA (1994) Taxonomy of rice insect pests and their arthropod parasites and predators. *In*: Biology and Management of Rice Insects (Edited by Heinrichs EA), pp. 13-359. Wiley Eastern Limited, New Delhi.
- Beard, C. B., Hamm, D. M., and Collins, F. H. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.* **2**: 103-124.
- Beckenbach, A.T., Wei, Y.W., and Liu, H. 1993. Relationships in the *Drosophila obscura* species group, inferred from mitochondrial cytochrome oxidase II sequences. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 619-634.
- Brower, A.V.Z. 1994. Phylogeny of *Heliconius* butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **3**: 159-174.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., and Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* **18**: 225-239.
- DeSalle, R., Freedman, T., Prager, E.M., and Wilson, A.C. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **26**: 157-164.
- Drew, R.A.I. 1989. The tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australasian and Oceanian regions. *Mem. Queensl. Museum*, **26**: 1-521.
- Drew, R.A.I., and Romig, A.C. 1997. Overview-Tephritidae in the Pacific and Southeast Asia. *In* Management of fruit flies in the Pacific: a regional symposium. Edited by A.J. Allwood, and R.A.I. Drew. Australian Center for International Agriculture Research Proceeding Number 76, Canberra. pp. 46-53.
- Farrell, B.D. 1998. "Inordinate fondness" explained: Why are there so many beetles? *Science*, **281**: 555-558.

- Feder, J.L., Chilcote, C. A., and Bush G. L. 1988. Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, **336**: 61-64.
- Flook, P. K., Rowell, C. H., and Gellissen, G. 1995. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* genome. *J. Mol. Evol.* **41**: 928-941.
- Foot, R.H., Blanc, F.L., and Norrbom, A.L. 1993. Handbook of the Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico. Comstock, Ithaca, NY.
- Han, H., and McPherson, B.A. 1997. Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta: Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**: 17-32.
- Hardy, D.E. 1974. The fruit flies (Tephritidae-Diptera) of Thailand and bordering countries. *Pac. Insect Monograph*. **62**: 1-353.
- Heath, B.D., Butcher, R.D.J., Whitfield, W.G.F. and Hubbard, S.F. 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr. Biol.* **9**: 313-16.
- Heong, K.L., Aquino, G.B. and Barrion, A.T. 1991. Arthropod community structures of rice ecosystems in the Philippines. *Bull. Entomol. Res.* **81**: 407-16.
- Holden, P.R., Brookfield, J.F.Y., Jones, P. 1993. Cloning and characterization of an *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 213-220.
- Hurst, G.D.D., Hurst, L.D. and Majerus, M.E.N. 1992. Selfish genes move sideways. *Nature* **356**: 659-60.
- Huigens, M.E., Luck, R.F., Klaassen, R.H., Maas, M.F., Timmermans, M.J. and Stouthamer, R. 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature* **405**: 178-179.
- Jamnongluk, W. 2001. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* and their *Wolbachia* endosymbionts. Ph.D. thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Jeyaprasath, A. and Hoy, M.A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* **9**: 393-405.
- Kittayapong, P., Baisley, K.J., Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Ent.* **37**: 340-45.

- Kittayapong P., Milne J.R., Tigvattananont S., and Baimai V. 2000. Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. *Sci. Asia*. **26**: 93-103.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Kumar, S., Tamura, K. Jakobsen, I.B., and Nei, M. 2001. *MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software*. Bioinformatics, (submitted).
- Langor, D.W., and Sperling, F.A.H. 1997. Mitochondrial DNA sequence divergence in weevils of the *Pissodes strobi* complex (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Mol. Biol.* **6**: 255-265.
- Lunt, D.H., Zhang, D.-X., Szymura, J.M., and Hewitt, G.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* **5**: 153-165.
- McPherson, B.A., Smith, D.C., and Berlocher, S.H. 1988. Genetic differences between host races of *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, **336**: 61-64.
- Meksongsee, M., Liewvanich, A., and Jirasuratana, M. 1991. Fruit flies in Thailand. *In* 1st International symposium on fruit flies in the tropics. *Edited by* S. Vijayasegaran and A.G. Ibrahim. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MRDI), Selangor. pp. 83-98.
- Nei, M., and Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**: 418-426.
- Noda, H., Koizumi, Y., Zhang, Q., and Deng, K. 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**: 727-737.
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M.E., Karr, T.L., and Robertson, H.M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 2699-2702.
- Ooi, P.A.C. and Shepard, B.M. 1994. Predators and parasitoids of rice insect pests. *In*: *Biology and Management of Rice Insects* (Edited by Heinrichs EA), pp. 585-612. Wiley Eastern Limited, New Delhi.

- Plantard, O., Rasplus, J-Y., Mondor, G., Le Clainche, I. and Solignac, M. 1999. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* inducing thelytoky in Rhoditini and 'Aylacini' (Hymenoptera: Cynipidae). *Insect Mol. Biol.* 8: 185-91.
- Posada, D., and Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14(9)**, 817-818.
- Reissig, W.H., Heinrichs, E.A., Litsinger, J.A., Moody, K., Fiedler, L., Mew, T.W. and Barrion, A.T. 1985. Illustrated Guide to Integrated Pest Management of Rice in Tropical Asia. International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna, Philippines.
- Roffey, J. 1979. Locusts and grasshoppers of economic importance in Thailand. Centre for Overseas Pest Research. Southampton: Hobbs the Printers of Southampton.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. and Solignac, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B* 250: 91-98.
- Saelee, A. 1999. Electrophoretic study of *Bactrocera tau* complex (Diptera: Tephritidae) in certain populations in Thailand. M.Sc. thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Schilthuizen, M. and Stouthamer, R. 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in Trichogramma wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264: 361-66.
- Shepard, B.M., Barrion, A.T. and Litsinger, J.A. 1987. Helpful Insects, Spiders, and Pathogens: Friends of the Rice Farmer. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1995. Biometry. W. H. Freeman and Company, New York.
- Spanos, L., Koutroumbas, G., Kotsyfakis, M., and Louis, C. 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect. Mol. Biol.* **9**: 139-144.
- Sperling, F.A.H., and Hickey, D.A. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.* **11**: 656-665.
- Swofford, D.L. 1999. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 beta 1. Champaign, IL: Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey.
- Tigvattananont, S. 1986. The importance of *Dacus tau* (Walker) in Thailand. *Kaen Kaset* **14**: 114-118.

- Van Meer, M.M.M., Witteveldt, J. and Stouthamer, R. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the wsp gene. *Insect Mol. Biol.* 8: 399-408.
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P. and Bouletreau, M. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1711-23.
- Wenseleers, T. and Billen, J. 2000. No evidence for *Wolbachia*-induced parthenogenesis in the social Hymenoptera. *J. Evol. Biol.* 13: 277-80.
- Wenseleers, T., Ito, F., Van Borm, S., Huybrechts, R., Volckaert, F. and Billen, J. 1998. Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 1447-52.
- Werren, J.H. and Windsor, D.M. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 1277-85.
- Werren, J.H., Windsor, D. and Guo, L. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 262: 197-204.
- Werren, J.H., Zhang, W. and Guo, L.R. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 261, 55-71.
- West, S.A., Cook, J.M., Werren, J.H. and Godfray, H.C.J. 1998. *Wolbachia* in two host-parasitoid communities. *Mol. Ecol.* 7: 1457.
- White, I.M., and Elson-Harris, M.M. 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Centre for Agriculture and Biosciences International.
- Wilson, M.R. and Claridge, M.F. 1991. Handbook for the identification of leafhoppers and planthoppers of rice. Oxon: CAB International.
- Wood, T.K., and Keese, M.C. 1990. Host-plant-induced assortative mating in *Echenopa* tree hoppers. *Evolution*, 44: 619-928.
- Yang, Z. 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J. Mol. Evol.* 39: 105-111.
- Yasumatsu, K., Okuma, C., Wongsiri, T., Wongsiri, N., Tirawat, C. and Lewvanich, A. 1982. An illustrated guide to some natural enemies of rice insect pests in Thailand. Jap. Int. Coop. Agen. (JICA). EXF/JR/82-2.
- Zhou, W., Rousset, F. and O'Neill, S.L. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 509-15.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Jamnongluk, W., Kittayapong, P., Baimai, V. and O'Neill, S.L. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: evidence for five distinct strains in a single host species. *Curr. Microbiol.*, 2002. 45: 255-260.

Jamnongluk, W., Baimai, V. and Kittayapong, P. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene. *Genetica.*, 2003. 1802: 1-7.

Jamnongluk, W., Baimai, V. and Kittayapong, P. Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial COI sequences. *Genome.*, 2003. 46: 112-118.

Kittayapong, P., **Jamnongluk, W.**, Thipaksorn, A., Milne, J.R., and Sindhusake, C. *Wolbachia* infection complexity in insects of the tropical rice-field community. *Mol. Ecol.* In press.

Thipaksorn, A., **Jamnongluk, W.** and Kittayapong, P. Evidence of *Wolbachia* infection in Odonate and molecular phylogeny of *Wolbachia* in damselfly. *Curr. Microbiol.* In press.

Jamnongluk, W., Baimai, V. and Kittayapong, P. Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera dorsalis* complex using the mitochondrial COI sequences. Submitted.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ

Jamnongluk, W., Kittayapong, P., Baimai, V. and O'Neill, S.L. Molecular phylogeny of *Wolbachia* in insects sampled from rice paddies in Thailand. Poster session presented at the First International *Wolbachia* Conference, Kolymbari, Crete, Greece, June 7-12 2000.

Jamnongluk, W., Kittayapong, P., Baimai, V. and O'Neill, S.L. Molecular phylogeny of *Wolbachia*, a reproduction modifying endosymbiont, in tephritid fruit flies in Thailand, Kanchanaburi, Thailand, May 2-4 2000.

Jamnongluk, W., Kittayapong, P., Baimai, V. and O'Neill, S.L. Five distinct *Wolbachia* strains in individual tephritid fruit flies and the phylogenetic relationship between *Wolbachia* and their tephritid hosts. Poster session presented at the Second International *Wolbachia* Conference, Kolymbari, Crete, Greece, July 9-15 2002.

Kittayapong, P., Jamnongluk, W. and Baimai, V. Diversity and distribution of *Wolbachia* infections among tropical tephritid fruit fly parasitoids. Poster session presented at the Second International *Wolbachia* Conference, Kolymbari, Crete, Greece, July 9-15 2002.

Kittayapong, P., Sanoamuang, L. and Jamnongluk, W. *Wolbachia* infections in tropical freshwater crustaceans: strain diversity, feminization effect and horizontal transfer between hosts. Poster session presented at the Second International *Wolbachia* Conference, Kolymbari, Crete, Greece, July 9-15 2002.

Wolbachia Infections of Tephritid Fruit Flies: Molecular Evidence for Five Distinct Strains in a Single Host Species

Wanwisa Jamnongluk,^{1,2} Pattamaporn Kittayapong,¹ Visut Baimai,¹ Scott L. O'Neill^{2*}

Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

²Section of Vector Biology, Department of Epidemiology and Public Health, Yale University School of Medicine, 60 College Street, New Haven, CT 06520, USA

Received: 12 December 2001 / Accepted: 11 January 2002

Abstract. Endosymbiotic bacteria of the genus *Wolbachia* are widespread among arthropods and can induce cytoplasmic incompatibility, thelytokous parthenogenesis, male-killing or feminization in their hosts. Here, we report phylogenetic relationships of *Wolbachia* in tephritid fruit flies based on *wsp* gene sequences. We also report, for the first time, five distinct strains of *Wolbachia* in *Bactrocera ascita* sp. B. Four of the five *Wolbachia* strains found in this species were in the same groups as those found in other tephritid fruit flies, suggesting possible horizontal transmission of *Wolbachia* from other fruit flies into *B. ascita* sp. B. The unreliability of *wsp*-specific group primers demonstrated in this study suggests that these primers might be useful only for preliminary identification of *Wolbachia*. Final determination of group affiliation needs to be verified with *wsp* sequence data.

Wolbachia are maternally inherited obligatory intracellular bacteria widely found in arthropods and nematodes. A recent survey with a long PCR detection method showed that around 76% of 62 arthropod species are infected with *Wolbachia* [7]. If this study is representative, then *Wolbachia* are one of the most ubiquitous parasites yet described. *Wolbachia* infections have been associated with various alterations of host reproduction, including cytoplasmic incompatibility (CI) in many arthropod species, parthenogenesis in wasps, feminization of genetic males in isopods, male-killing and classic mutualism in filarial nematodes [2, 6, 14, 16].

Multiple *Wolbachia* infections within individual hosts are known to occur in nature [9, 12, 17, 19, 20]. Higher-order infections of *Wolbachia* are presumed to be stable owing to the additive properties of the CI phenotype in insects [11], where males carrying higher-order infections are incompatible with females carrying lower-order infections. It has been suggested that it may be possible to use *Wolbachia* superinfections to sweep foreign genes into pest populations repeatedly [13].

The extent of natural higher-order infections is likely to have been vastly underestimated since few molecular markers have been available with which to type *Wolbachia* strains. Previous markers, such as the 16S rRNA or *ftsZ* gene, are not variable enough to detect multiple infections of closely related strains. The recent use of the *Wolbachia wsp* gene as a highly variable marker [20] has opened the way to obtain more accurate estimates of both the prevalence of higher-order infections, as well as the upper limit on the number of distinct strains a given host might be able to stably maintain.

In a recent survey for *Wolbachia* in tephritid fruit flies collected in Thailand, 13 out of 46 species were shown to be infected with these bacteria [8]. *Wolbachia* subgroup typing showed shared subgroups within these tephritid fruit flies and the possibility of new *Wolbachia* subgroups in the fruit flies that could not be typed with *wsp* subgroup primers [8].

In this study, we used *wsp* gene sequences to investigate the extent of higher-order infections within tephritid hosts. We also investigated the reliability of PCR-based typing of *Wolbachia* strains by comparison of this method with the more laborious full sequencing of *wsp* gene fragments from individual hosts. Data obtained

* Present address: Department of Zoology and Entomology, The University of Queensland, Brisbane 4072, Australia

Correspondence to: P. Kittayapong; email: grpkt@mahidol.ac.th

Table 1. *Wolbachia*-infected fruit flies from Kittayapong et al. [8] that were used in this study

Insect species	Host plant species	Host plant family
<i>Bactrocera cucurbitae</i>	<i>Cucurbita moschata</i>	Cucurbitaceae
<i>B. caudata</i>	<i>Cucurbita moschata</i>	Cucurbitaceae
<i>B. dorsalis</i> sp. A ^a	<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae
<i>B. diversa</i>	<i>Cucurbita moschata</i>	Cucurbitaceae
<i>B. modica</i>	<i>Diplocyclos palmatus</i>	Cucurbitaceae
<i>B. pyrifoliae</i> ^a	<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae
<i>B. ascita</i> sp. B	<i>Trichosanthes tricuspidata</i>	Cucurbitaceae
<i>B. dorsalis</i> sp. A1 ^a	<i>Siphonodon celastreus</i>	Celastraceae
<i>Dacus desillatoria</i>	<i>Luffa cylindrica</i>	Cucurbitaceae

^a Member of the *B. dorsalis* complex [1, 4, Baimai et al., unpublished data].

from sequencing was used to construct a phylogeny of the *Wolbachia* strains examined.

Materials and Methods

Template preparation and PCR amplification. DNA samples of Kittayapong et al. [8] were used in this study. The species name of these fruit flies and their host plants are listed in Table 1. *Wolbachia*-infected *Aedes albopictus* was used as positive control in PCR reactions, and negative controls were run by substituting doubly distilled water for template DNA.

PCR was used to test for the presence of *Wolbachia*, using general *wsp* primers [3]: PCR amplification was done in 20- μ l reaction volumes: 13.5 μ l dd H₂O, 2 μ l 10 $\times$ buffer (Promega), 2 μ l 25 mM MgCl₂, 0.5 μ l dNTPs (10 mM each), 0.5 μ l 20 μ M forward and reverse primers, and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Promega). The thermal profile was: 1 cycle of initial denaturation at 94°C 3 min, followed by 35 cycles of 94°C 1 min, 55°C 1 min, and 72°C 1 min, and final extension at 72°C 30 min.

Cloning and sequencing. For cloning, 1 μ l of the PCR product was directly ligated into pGEM-T vector (Promega). At least three clones for each *Wolbachia* strain were purified and sequenced on an ABI automated sequencer. In addition, at least two independent PCR reactions were run to obtain a product for cloning. Consensus sequences from each *Wolbachia* strain were constructed and used for subsequent analyses.

Restriction enzyme digestion. To assist in obtaining clones of rare *Wolbachia* strains in superinfected hosts, we used a restriction digestion approach prior to ligation to remove the PCR fragments of the most abundant strain. In the case of *B. ascita* sp. B, the PCR product was phenol-chloroform extracted, followed by ethanol precipitation. Three micrograms of PCR product was then digested with *Nla*IV (6 U), followed by *Hind*III (20 U) (New England Biolabs) according to the manufacturer's protocol. The resulting fragments were run on a 1% low-melt agarose gel, and the uncut PCR product was extracted from the gel by freeze-thaw and then directly ligated into the vector as described above.

Phylogenetic analysis. The analysis was done with 15 *wsp* sequences from this study and 20 reference *wsp* sequences [20]. The *Wolbachia* strains used in this study are given in Table 2. All *wsp* sequences were aligned by using the clustal algorithm, followed by manual modifica-

tion based on amino acid translation of the different genes. The third hypervariable region of the gene (positions 519–559) [3] was excluded from the analysis because it could not be aligned with confidence. The alignment was then deposited in the EMBL alignment database and is available by FTP from <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/embl/align/> under accession number DS44078. The *wsp* sequences from this study have been deposited in GenBank under accession numbers AF295340–AF295354. The data set was analyzed by both maximum parsimony and maximum likelihood by using PAUP 4.0 b1 [15] and Modeltest 2.0 [10]. For maximum parsimony analysis, heuristic searches were performed, gaps were treated as missing data, and bootstrap analysis was done with 1000 replications. For maximum likelihood analysis, we used step-wise addition, using a HKY model with consideration of gamma-distributed rate heterogeneity across sites. Bootstrap analysis was done with 500 replications. Owing to lack of suitable outgroup, the resulting trees were midpoint rooted.

Group typing and bacterial clones with *wsp*-specific primers. One DNA sample of each of the nine fruit fly species recorded as being infected by Kittayapong et al. [8] was checked with the various *wsp*-specific group primers, which should yield products from 403 to 556 bp [20] to compare with groups assigned by full sequence analysis. In addition to individual hosts, plasmids containing individual cloned *wsp* gene fragments were also screened with *wsp*-specific group primers to examine inconsistencies between the two methods.

Results

***Wolbachia* superinfections.** In this study we examined nine tephritid species known to be infected with *Wolbachia*. Of these nine, three were shown to contain multiple infections (at least two *Wolbachia* strains found in one insect) based on *wsp* gene sequencing. *Bactrocera diversa* and *B. dorsalis* sp. A1 were found to be infected with two different *Wolbachia* strains, and *B. ascita* sp. B was shown to be infected with five different *Wolbachia* strains. This is the first report of five distinct *Wolbachia* strains infecting a single host. The *Wolbachia* strains found in this fruit fly are in the *Mel*, *Des*, *Cuc*, *Con*, and *Asc* groups which span both A and B supergroups.

The *wsp* gene sequences of the *Wolbachia* strains in the *Des*, *Cuc*, and *Con* groups have at least 0.9–1.2% sequence divergence from other *Wolbachia* strains in the same groups, whereas the strain from the *Mel* group, *B. diversa*, has a *wsp* sequence identical to previously reported *Mel* group *Wolbachia*. The fifth strain belongs to a new group that we designate as the *Asc* group.

Phylogenetic analysis. Partial sequences of the *wsp* genes amplified from each of the tephritid host species together with previously described sequences [20] were analyzed by both maximum parsimony and maximum likelihood. Both methods produced similar tree topologies except for sequences associated with the *Con* group. Parsimony analysis placed the *Wolbachia* strains found in the *Bactrocera* group together with the *Wolbachia* strain from *Tribolium confusum* with bootstrap support of 90% (tree not shown). Maximum likelihood analysis

Table 2. Strains used in this study including *Wolbachia* group nomenclature, host species and GenBank accession number

<i>Wolbachia</i> group	Host species	Associated <i>Wolbachia</i> strains (reference strain in bold)	GenBank accession number
Mel	<i>Drosophila melanogaster</i> (AUB)	wMel	AF020063
	<i>D. simulans</i> (Coffs Harbour)	wCof	AF020067
	<i>Bactrocera dorsalis</i> sp. A	wDor	AF295340
	<i>B. ascita</i> sp. B	wAscM	AF295341
	<i>B. dorsalis</i> sp. A1	wSipM	AF295342
	<i>B. diversa</i>	wDveM	AF295343
AlbA	<i>Aedes albopictus</i>	wAlbA	AF020059
Mors	<i>Glossina morsitans</i>	wMors	AF020079
	<i>Nasonia vitripennis</i>	wVitA	AF020081
	<i>G. centralis</i>	wCen	AF020078
Haw	<i>D. simulans</i> (Hawaii)	wHa	AF020068
	<i>D. sechellia</i>	wHa	AF020073
	<i>Ephestia cautella</i> (A)	wCauA	AF020075
Pap	<i>Phlebotomus papatasi</i>	wPap	AF020082
Aus	<i>G. austeni</i>	wAus	AF020077
Des	<i>Dacus destillatoria</i>	wDes	AF295344
	<i>B. ascita</i> sp. B	wAscD	AF295345
Uni	<i>Muscidifurax uniraptor</i>	wUni	AF020071
Riv	<i>D. simulans</i> (Riverside)	wRi	AF020070
	<i>D. auraria</i>	wRi	AF020062
Con	<i>Tribolium confusum</i>	wCon	AF020083
	<i>Laodelphax striatellus</i>	wStri	AF020080
Cuc	<i>B. ascita</i> sp. B	wAscCo	AF295346
	<i>B. cucurbitae</i>	wCuc	AF295347
	<i>B. ascita</i> sp. B	wAscCu	AF295348
	<i>B. pyrifoliae</i>	wPyr	AF295349
	<i>B. dorsalis</i> sp. A1	wPyr	AF295350
Dei	<i>Trichogramma deion</i>	wDei	AF020084
CauB	<i>Ephestia cautella</i>	wCauB	AF020076
	<i>Tagosodes orizicolus</i>	wOri	AF020085
Pip	<i>Culex quinquefasciatus</i>	wPip	AF020061
	<i>B. modica</i>	wMod	AF295351
	<i>B. caudata</i>	wCad	AF295352
	<i>B. diversa</i>	wDveP	AF295353
	<i>D. simulans</i> (DSW/MAU)	wMa	AF020069
Asc	<i>Ae. albopictus</i>	wAlbB	AF020059
	<i>B. ascita</i> sp. B	wAscA	AF295354

showed the same strains grouping with the *Wolbachia* strain found in *Trichogramma deion* with a bootstrap value of 57% (Fig. 1). Most of the *Wolbachia* strains examined clustered with other fruit fly *Wolbachia* except for the Mel group strain infecting *B. diversa*, which groups with *Drosophila melanogaster* AUB and *D. simulans* Coffs Harbour, but not with other *Bactrocera* Mel group *Wolbachia*. According to the grouping criterion of 2.5% sequence difference as proposed by Zhou et al. [20], three new groups—Des, Cuc, and Asc—are proposed.

Group typing of clones using *wsp*-specific primers. In order to test the robustness of the proposed PCR typing method of Zhou et al. [20], we first PCR typed insect specimens, using the methodology of Zhou et al. [20].

We then cloned and sequenced partial fragments of the *wsp* gene (using *wsp* 81F and 691R primers) from these same insects. Finally, we took individual plasmids containing cloned *wsp* gene fragments and repeated the subgroup typing on the individual clones (Table 3). The results clearly show inconsistencies between PCR typing of strains and full sequence analysis. These inconsistencies include examples where PCR typing indicated hosts contained multiple infections, whereas cloning and sequencing of *wsp* gene fragments found only single infections, and cases where subgroup typing could not assign the infections to any established groups, but sequence analysis revealed the presence of *Wolbachia* strains that belonged to previously undescribed groups. Subsequent PCR typing of plasmids containing the

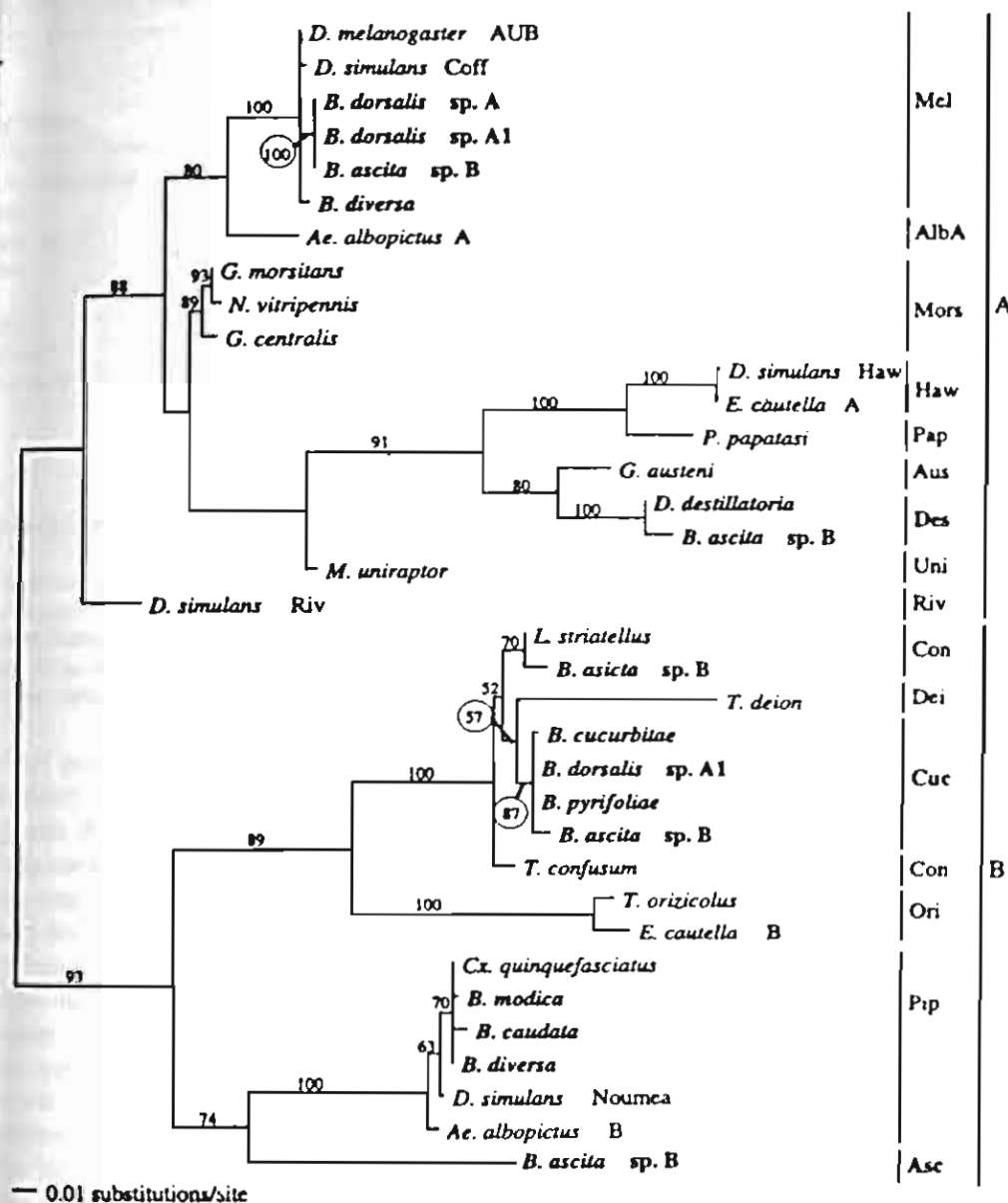


Fig. 1. Maximum likelihood tree based on *wsp* gene sequences showing the relationships among arthropod hosts and *Wolbachia*. Tree generated by step-wise addition method using HKY model with consideration of gamma-distributed rate heterogeneity across sites and was midpoint rooted. Bootstrap values (500 replicates) are labeled above branches. The fruit fly hosts, *Wolbachia* strains, and new *Wolbachia* subgroups are represented in bold.

cloned *wsp* fragments indicated that nearly all of these inconsistencies could be explained by cross-reacting primers used in PCR typing. The only case that could not be explained this way was *B. pyrifoliae*, where PCR typing indicated the presence of a *Dei* group infection, but sequence analysis of cloned fragments could not detect a *Dei* group infection, and *Dei* group PCR primers did not cross-react with plasmids containing the only *wsp* fragment found in this species. It is possible in this case that another infection may exist in this species, but we could not detect it in the sequence analysis we did.

Discussion

In this study, we found 15 *Wolbachia* strains infecting nine fruit flies species. Five *Wolbachia* infections were

found to simultaneously infect *B. ascita* sp. B, and two infected hosts (*B. diversa* and *B. dorsalis* sp. A1) each harbored two *Wolbachia* strains. Examination of the phylogenetic tree in Fig. 1 shows that the five infections of *B. ascita* sp. B are all divergent, implying that each strain was independently acquired. This is in contrast to a recent report suggesting seven *Wolbachia* *ftsZ* gene sequences in the beetle *Byturus tomentosus* [9]. In this case the different sequences constituted a monophyletic clade that would suggest a radiation from a single infection event. It is also not clear to what extent these latter sequences represent within-strain variation or actually represent distinct strains. Laboratory studies had indicated that *Drosophila* hosts could maintain three infections with no competitive effects between individual strains [11], suggesting that higher-order infections

Table 3. Group typing *Wolbachia* strains with specific *wsp* primers [20]

fruit fly species	PCR typing of total DNA from insect hosts ^a	Strain typing by sequence analysis	No. of clones sequenced	PCR typing of plasmids carrying individual clones used from previous sequence analysis (no. of positive clones)
<i>Crocera cucurbitae</i>	Con	Cuc	3	Con (3)
<i>caudata</i>	Pip	Pip	3	Pip (3)
<i>dorsalis</i> sp. A ^b	Dei, Pip	Mel	3	Mel (3), Dei (3), Pip (0)
<i>diversa</i>	No amplification	Pip	3	Pip (3), Mel (0)
		Mel	3	Pip (0), Mel (3)
<i>modica</i>	Pip	Pip	3	Pip (3)
<i>pyrifoliae</i> ^b	Dei, Pip	Cuc	3	Con (3), Dei (0), Pip (0)
<i>ascita</i> sp. B ^c	No amplification	Mel	3	Mel (3), Con (1), Pip (0), Aus (0)
		Des	3	Mel (0), Con (3), Pip (0), Aus (3)
		Con	3	Mel (0), Con (3), Pip (0), Aus (0)
		Cuc	3	Mel (0), Con (3), Pip (0), Aus (0)
		Asc	3	Mel (0), Con (2), Pip (0), Aus (0)
<i>dorsalis</i> sp. A1 ^b	No amplification	Mel	5	Mel (5), Con (5)
		Cuc	3	Mel (0), Con (3)
<i>acus destillatoria</i>	Aus, Dei	Des	3	Aus (3), Dei (3)

^aData from Kittayapong et al. [8].

^bMember of the *B. dorsalis* complex [1, 4].

^c*Wolbachia* multiply infected tephritid fruit fly species.

could be possible. In this case, the presence of five independently acquired infections in field-caught tephritids suggests that at least five independent infections must be able to coexist without detrimental competitive effects between strains. It is not clear if this represents an upper boundary for *Wolbachia* superinfections or if other cases will be found in which even higher order of superinfections with distinct strains exist. Future studies are needed to assess the transmission efficiency of these strains between generations as well as the relative densities of each strain in different strain backgrounds so as to provide evidence for possible competitive effects.

The high level of multiple infections found in some tephritid species could be explained by several hypotheses. For example, it may be possible that certain tephritid species are predisposed to invasion of new *Wolbachia* strains through a combination of their habitats and susceptibility to parasitoids or their ability to physiologically support diverse *Wolbachia* strains. At the present time, only limited data exist indicating how *Wolbachia* invade new species, but parasitic Hymenoptera are one incriminated vector [19]. Alternatively, insects may cycle *Wolbachia* infections through time, as has been theoretically proposed [5], with new infections being gained and old infections lost. It may be possible that certain insect hosts maintain higher levels of superinfection by a steady accumulation of strains over time without any subsequent loss of strains. Alternatively, some fruit fly species may be predisposed to environmental mixing of strains through exposure to naturally occurring antibiotics.

It has been proposed that *Wolbachia* might act as a speciation agent by generating reproductive isolation [18]. Our observations found different *Wolbachia* strains infecting *B. dorsalis* species complex fruit flies collected from the same host fruit. As such it may be possible that *Wolbachia* has contributed to the generation of reproductive isolation in this complex.

The use of group-specific *wsp* primers was proposed as a fast method for typing *Wolbachia* infections without the need to clone and sequence *wsp* genes from individual hosts [20]. Our data clearly show that the PCR-based typing system cannot adequately predict *Wolbachia* infections in new hosts. We found that some of these primers cross-reacted with other groups with our materials. In fruit fly hosts that had more than one strain of *Wolbachia*, group primers gave no amplification, whereas in single infected hosts, more than one primer set gave PCR amplification (Table 3). For preliminary identification of *Wolbachia*, *wsp* group primers might be used, but they cannot be reliably used without supporting sequence data of *wsp* gene fragments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank John R. Milne and Elizabeth A. McGraw for helpful suggestions and for reviewing the manuscript; Saen Tigvattananont for collecting part of the original samples; Samnieng Theinthong and Nutchaya Klinpikul for their technical assistance. This work was supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training (BRT 139026) and the Thailand Research Fund (RTA /01/2541, RGJ/PHD/0095/2541 and BGJ/16/2543).

Literature Cited

- Baimai V, Trinachartvanit W, Tigvattananont S, Grote PJ, Poramarcom R, Kijchalao U (1995) Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. I. Five sibling species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Genome* 38:1015-1022
- Bourtzis K, O'Neill SL (1998) *Wolbachia*, infections and arthropod reproduction. *BioScience* 48:287-293
- Braig HR, Zhou W, Dobson S, O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *J Bacteriol* 180:2373-2378
- Drew RAI, Hancock DL (1994) The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. Oxford: CAB International
- Hurst LD, McVean GT (1996) Clade selection, reversible evolution and the persistence of selfish elements: the evolutionary dynamics of cytoplasmic incompatibility. *Proc R Soc Lond B* 263: 97-104
- Hurst GDD, Jiggins FM, von der Schulenburg JHG, Bertrand D, West SA, Goriacheva II, Zakharov IA, Werren JH, Stouthamer R, Majerus MEN (1999) Male-killing *Wolbachia* in two insect species. *Proc R Soc Lond B* 266:735-740
- Jeyaprasath A, Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Proc R Soc Lond B* 267:1277-1285
- Kittayapong P, Milne JH, Tigvattananont S, Baimai V (2000) Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit fly hosts in Thailand. *Sci Asia* 26:93-103
- Malloch G, Fenton B, Butcher RD (2000) Molecular evidence for multiple infections of a new subgroup *Wolbachia* in the European raspberry beetle *Byturus tomentosus*. *Mol Ecol* 9:77-90
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818
- Rousset F, Braig HR, O'Neill SL (1999) A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects. *Heredity* 82:620-627
- Sinkins SP, Braig HR, O'Neill SL (1995) *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc R Soc Lond B* 261:325-330
- Sinkins SP, Curtis CF, O'Neill SL (1997) The potential application of inherited symbiont systems to pest control. In: O'Neill SL, Hoffmann AR, Werren JH (eds) *Influential passengers. Inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford: Oxford University Press, pp 155-175
- Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Luck RF, Werren JH (1993) Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361:66-68
- Swofford DL (1999) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 beta 1. Champaign, IL: Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey
- Taylor MJ, Hoerauf A (1999) *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* 15:437-442
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulétreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16:1711-1723
- Werren JH (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 42:587-609
- Werren JH, Zhang W, Guo LR (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B* 261:55-63
- Zhou W, Rousset F, O'Neill SL (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strain using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B* 265:509-515

Wolbachia infection complexity among insects in the tropical rice-field community

P. KITTAYAPONG^{*,†}, W. JAMNONGLUK^{*,†}, A. THIPAKSORN^{*,†}, J. R. MILNE[†] and C. SINDHUSAKE[‡]

^{*}Center for Vectors and Vector-Borne Diseases and [†]Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand; [‡]Entomology and Zoology Division, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand

Abstract

Wolbachia are a group of intracellular bacteria that cause reproductive alterations in their arthropod hosts. Widely discordant host and *Wolbachia* phylogenies indicate that horizontal transmission of these bacteria among species sometimes occurs. A likely means of horizontal transfer is through the feeding relations of organisms within communities. Feeding interactions among insects within the rice-field insect community have been well documented in the past. Here, we present the results of a polymerase chain reaction-based survey and phylogenetic analysis of *Wolbachia* strains in the rice-field insect community of Thailand. Our field survey indicated that 49 of 209 (23.4%) rice-field insect species were infected with *Wolbachia*. Of the 49 infected species, 27 were members of two feeding complexes: (i) a group of 13 hoppers preyed on by 2 mirid species and parasitized by a fly species, and (ii) 2 lepidopteran pests parasitized by 9 wasp species. *Wolbachia* strains found in three hoppers, *Recilia dorsalis*, *Nephotettix malayanus* and *Nisia nervosa*, the two mirid predators, *Cyrtorhinus lividipennis* and *Tytthus chinensis*, and the fly parasitoid, *Tomosvaryella subvirescens*, were all in the same *Wolbachia* clade. In the second complex, the two lepidopteran pests, *Cnaphalocrocis medinalis* and *Scirpophaga incertulas*, were both infected with *Wolbachia* from the same clade, as was the parasitoid *Tropobracon schoenobii*. However, none of the other infected parasitoid species in this feeding complex was infected by *Wolbachia* from this clade. Mean ($\pm$ SD) genetic distance of *Wolbachia* *wsp* sequences among interacting species pairs of the hopper feeding complex (0.118 ± 0.091 nucleotide sequence differences), but not for the other two complexes, was significantly smaller than that between noninteracting species pairs (0.162 ± 0.079 nucleotide sequence differences). Our results suggest that some feeding complexes, such as the hopper complex described here, could be an important means by which *Wolbachia* spreads among species within arthropod communities.

Keywords: endosymbiont, horizontal transfer, natural enemies, rice pests, *Wolbachia*

Received 2 October 2002; revision received 9 December 2002; accepted 6 January 2003

Introduction

Endosymbiotic bacteria of the genus *Wolbachia* are widespread in insect species. Recent polymerase chain reaction (PCR)-based surveys for *Wolbachia* using a standard PCR approach have detected these bacteria in 16.9% of neotropical insects (Werren *et al.* 1995a), 50% of Indo-Australian ants (Wenseleers *et al.* 1998), 53.6% of Cynipid gall wasps (Plantard *et al.* 1999), 28.1% of southeast Asian

mosquitoes (Kittayapong *et al.* 2000a), 28.3% of tephritid fruit flies (Kittayapong *et al.* 2000b) and 19.3% of temperate North American insects (Werren & Windsor 2000), although *Wolbachia* has not been detected in some surveyed insect groups, for example, aphids and aphid parasitoids (West *et al.* 1998), and thelytokous social Hymenoptera (Wenseleers & Billen 2000). Using a long PCR approach, i.e. one in which two polymerase enzymes were used, 76% of tested insect species were found to be infected with *Wolbachia* (Jeyaprakash & Hoy 2000). Long PCR is more sensitive than standard PCR for amplifying *Wolbachia* sequences (Jeyaprakash & Hoy 2000), probably

Correspondence: Dr P. Kittayapong. Tel. +66 220 15935; Fax: +66 220 15923; E-mail: grpkt@mahidol.ac.th

resulting in the high proportion of *Wolbachia*-infected species detected.

Sequencing of *Wolbachia* genes from different host species has revealed patterns of closely related *Wolbachia* strains distributed across widely divergent hosts (O'Neill *et al.* 1992; Rousset *et al.* 1992; Werren *et al.* 1995b; Schilthuisen & Stouthamer 1997). Horizontal transmission between insect species has been hypothesized to explain this lack of concordance between host and *Wolbachia* phylogenies.

For *Wolbachia* transmission between species, an ecological interaction between the two species is necessary to provide the means of transfer (Hurst *et al.* 1992). The types of interaction that have received the most research attention as a potential means of *Wolbachia* horizontal transmission are those between parasitoids and their hosts. *Wolbachia* has, indeed, been found to infect both hosts and parasitoids. Thus, West *et al.* (1998) detected *Wolbachia* in 38.1% of leaf-mining Gracillariid moths and 27.8% of their associated wasp parasitoids, whereas Schilthuisen & Stouthamer (1997) found *Wolbachia* in four of the seven wasp parasitoids associated with the galls of the Cynipid wasp, *Diplolepis rosae*. However, no close relationships were detected using phylogenetic analysis between *Wolbachia* strains in the hosts and parasitoids of either study. In contrast, Vavre *et al.* (1999) determined close relationships between several *Wolbachia* strains infecting *Drosophila* species and their wasp parasitoids. Werren *et al.* (1995b), and Van Meer *et al.* (1999) each reported a close phylogenetic relationship between a parasitoid and its host. In only one case, reported in Heath *et al.* (1999), has horizontal transmission between a host and its parasitoid been shown in the laboratory.

Feeding interactions other than that of parasitoid-host relationships may potentially result in *Wolbachia* transmission between species and remain to be explored. The insect community of a rice field is perhaps one of the best studied insect communities with numerous feeding interactions among insect species that have been well documented (e.g. Yasumatsu *et al.* 1982; Heong *et al.* 1991; Ooi & Shepard 1994). Here, we present the results of a PCR-based survey and phylogenetic analysis of *Wolbachia* among the rice-field insects of Thailand. In particular, we identify participant species in interactions within the rice insect community, which are infected with closely related *Wolbachia* strains. Such interactions may have been in the past, or may still be, important for the horizontal transmission of these bacteria within the rice-field insect community.

Materials and methods

Collection of rice insects

Insects were collected from rice fields in 29 provinces in different regions of Thailand between June 1997 and

October 2000 using simple sweep nets and aspirators. All specimens were frozen in dry ice and transported to the laboratory in Bangkok where adults were identified using morphological keys (Barrion & Litsinger 1994; Roffey 1979; Reissig *et al.* 1985; Shepard *et al.* 1987; Wilson & Claridge 1991). Only adult specimens were tested for *Wolbachia*. Some specimens were stored at -70 °C before they were tested.

DNA extraction

Individual insect specimens were dissected for ovaries or testes in distilled water using sterile dissecting equipment. For very small insects, whole bodies were used for DNA extraction. The DNA extraction method followed O'Neill *et al.* (1992). Whole bodies or gonads of each insect were ground using a hand-held polypropylene homogenizer in a 1.5-mL microcentrifuge tube filled with 100 µL of STE buffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0). The homogenate was heated at 95 °C for 10 min and then centrifuged at 1400 g for 1 min. One microlitre of the supernatant was used to PCR screen for *Wolbachia*.

Polymerase chain reaction

PCRs were performed in 20 µL reaction volumes: 50 mM Tris (pH 9.2), 16 mM ammonium sulfate, 1.75 mM MgCl₂, 350 µM dNTPs, 0.5 µL of 20 µM forward and reverse primers (Jeyaprakash & Hoy 2000), 1 unit of *Pwo* and 5 units of *Taq* DNA polymerase. The *ftsZ* primers for long PCR were used to screen for *Wolbachia* infection and primers based on the mitochondrial 12S rDNA gene of host insects were used to check for the quality of DNA extraction. Samples negative for 12S rRNA were discarded. The thermal profile for DNA amplification was according to Jeyaprakash & Hoy (2000). Ten microlitres of each PCR product were run on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under a UV transilluminator to determine the presence and size of amplified DNA. One specimen of each species that was *Wolbachia*-negative using the standard PCR method described above but positive for 12S rRNA when tested again for *Wolbachia* using long PCR (Jeyaprakash & Hoy 2000). DNA extracts of *Wolbachia*-infected *Aedes albopictus* were used as positive controls. Negative controls containing only double-distilled water were also included to check for contamination.

Cloning and sequencing

Insect samples that were positive using *ftsZ* primers were reamplified with *wsp* primers using long PCR with the PCR conditions described above (Jeyaprakash & Hoy 2000). PCR products were cloned into a plasmid (pGEM-T vector; Promega) and transformed into *Escherichia coli* cells.

Plasmids with inserts were then purified using QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) and sequenced on an ABI automated sequencer. At least three independent clones were sequenced from each *Wolbachia* strain in order to identify polymerase errors. Both strands of the plasmids were sequenced using T7 and SP6 primers. Consensus sequences from each *Wolbachia* strain were constructed and used for subsequent analyses.

Phylogenetic analysis

The *wsp* sequences from this study as well as sequences described previously (Zhou *et al.* 1998) were used in this analysis. All *wsp* sequences were aligned using the CLUSTAL algorithm followed by manual modification based on amino acid translation of the different genes. The third hypervariable region of the gene (positions 519–559) Braig *et al.* (1998) was excluded from the analysis because it could not be aligned with confidence. The *wsp* sequences from this study have been deposited in GenBank under accession number AF481160–AF481202.

Phylogenies were generated using both maximum parsimony and distance (neighbour-joining; Saitou & Nei 1987) methods using PAUP* 4.0 (Swofford 2000). In the maximum parsimony analysis, heuristic searches were performed, gaps were treated as missing data and bootstrap analysis was carried out with 1000 replications. A neighbour-joining tree was generated using a HKY distance model with consideration of the proportion of invariable sites and of the gamma shape parameter which was chosen using the MODELTEST program (Posada & Crandall 1998). The neighbour-joining tree was assessed using 1000 bootstrap replicates.

Feeding relationships of *Wolbachia*-infected insects

The feeding relations of those insect species on rice plants infected with *Wolbachia* were determined from Yasumatsu *et al.* (1982) and Ooi & Shepard (1994). Although only adults were tested for *Wolbachia*, it is often the larval stage that is the important feeding stage on rice. Where appropriate, therefore, the larval stage was used to indicate the feeding relations of an insect species within the rice-field community. Insect species were classified as rice herbivores, generalist predators, specialist predators or specialist parasitoids. Specialist predators/parasitoids were linked with their prey/hosts.

Results

A total of 2585 insects from tropical rice fields comprising 209 species were tested for *Wolbachia* (Table 1). Forty-nine species (23.4%) were found to be infected. These infected species represented the seven orders, Coleoptera (7.1% of species infected), Diptera (30.8%), Hemiptera (11.6%),

Homoptera (54.2%), Hymenoptera (31.0%), Lepidoptera (40.0%) and Orthoptera (18.2%). Most insects that were collected were from these orders. Few insects (< 4) were collected from each of the other five orders, Blattaria, Dermaptera, Ephemeroptera, Mantodea and Thysanoptera, and none of these insects was infected.

Twenty-five of the 49 insect species (51.0%) infected with *Wolbachia* were rice herbivores and 17 (34.7%) were predators or parasitoids (Fig. 2). The feeding relations of seven species were unknown. Of the predator species, four were generalists (Fig. 2B), whereas two (mirid bugs, Fig. 2A) were specialists that fed on planthopper and leafhopper eggs. Most (9/11) parasitoid species parasitized larvae of two pest Lepidoptera, i.e. the leafroller and the rice yellow stem borer. One of these parasitoids, i.e. *Trichomalopsis apantelectena*, is also a secondary parasitoid of the wasp, *Goniozus* sp., which in turn parasitizes leafroller larvae. However, two parasitoids, the pipunculid fly, *Tomosvaryella subvirescens*, and the wasp, *Opius* sp., parasitize non-lepidopteran hosts, i.e. *Nephotettix* spp. and *Hydrellia* spp., respectively. In total, 29 of the 49 infected species (59.2%) are participants in known feeding interactions between species (Fig. 2A). The remaining infected species (Fig. 2B) may be involved in feeding interactions with other infected species, e.g. as predator or prey, but information concerning the feeding relations of these species was unavailable.

Partial sequences of the 43 *wsp* genes amplified from each of the insect host species together with 16 sequences described previously (Zhou *et al.* 1998) were analysed using both maximum parsimony and distance methods. Phylogenetic trees generated using both phylogenetic methods produced similar tree topologies. There were 200 most parsimonious trees with 944 steps. The tree calculated using the neighbour-joining method is shown in Fig. 1, which also shows neighbour-joining and maximum parsimony bootstrap support for the different clades.

Of 43 *Wolbachia* strains found in insects in the rice-field community, 29 were in the B supergroup and the remaining 14 were in the A supergroup (Fig. 1). The black bug, *Scotinophara coarctata* was found to be infected with three *Wolbachia* strains, each from a different clade.

Most *Wolbachia* strains found in planthoppers and leafhoppers as well as their mirid predators and the hopper parasitoid, *Tomosvaryella subvirescens* (Fig. 2A) were in the B supergroup. The leafhopper, *Recilia dorsalis*, however, was doubly infected with both A and B supergroups. Identical *wsp* sequences were found in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*.

A close relationship among *Wolbachia* strains was also found for the wasp parasitoid, *Tropobracon schoenobii* and its two lepidopteran rice pest hosts, *Cnaphalocrosis medinalis* and *Scirpophaga incertulus*. All three strains were in the same clade with sequence differences of 0.37 and 0.56%, respectively (Fig. 1). *Wolbachia* strains were found in both

Table 1 PCR-based distribution of *Wolbachia* in insects collected from rice fields in Thailand from January 1998 to November 2000

Order and species	Common name	Total no. tested	No. positive	<i>Wolbachia</i> strain	Accession no.
Blattaria					
<i>Blattella germanica</i> (Linnaeus)	German cockroach	3	0		
Coleoptera					
<i>Adoretus</i> sp.	Scarab beetle	4	0		
<i>Aeoloderma brachmanus</i> (Candeze)	Click beetle	2	0		
<i>Anomala humeralis</i> (Burmeister)	Scarab beetle	3	0		
<i>Apalochrus rufofasciatus</i> Pic	Soft-winged flower beetle	2	0		
<i>Berosus</i> sp.	Water scavenger beetle	8	0		
<i>Brumoides lineatus</i> (Weise)	Lady beetle	2	0		
<i>Brumoides suturalis</i> (Fabricius)	Lady beetle	1	0		
<i>Chlaenius circumscriptus</i> (Brulle)	Ground beetle	1	0		
<i>Chlaenius quadricolor</i> Fabricius	Ground beetle	6	0		
<i>Chlaenius</i> sp. 1	Ground beetle	3	0		
<i>Chlaenius</i> sp. 2	Ground beetle	3	B (1)*	—	—
<i>Chlaenius</i> sp. 3	Ground beetle	3	0		
<i>Chlaenius</i> sp. 4	Ground beetle	1	0		
<i>Chlaenius</i> sp. 5	Ground beetle	3	0		
<i>Cicindela</i> sp.	Tiger beetle	1	0		
<i>Coccinella repanda</i> Thunberg	Lady beetle	2	0		
<i>Diadaspis armigera</i> (Olivier)	Hispa beetle	12	B (1)†	wDic	AF481160
<i>Drypta japonica</i> (Bates)	Ground beetle	1	0		
<i>Echinocnemus oryzae</i> Marshall	Weevil	2	0		
<i>Ectomocoris biguttatus</i> Stal	Ground beetle	1	0		
<i>Formicomus braminus</i> La Ferte Serenectere	Anthicid beetle	6	0		
<i>Formicomus</i> sp.	Anthicid beetle	1	0		
<i>Harmonia octomaculata</i> (Fabricius)	Lady beetle	5	0		
<i>Hydromedius molitor</i> Faust	Paddy-root weevil	1	A (1)†	wMol	AF481161
<i>Hydrophilus acuminatus</i> Motschulsky	Water scavenger beetle	7	0		
<i>Lissorhynchus oryzae</i> Kuschel	Weevil	2	0		
<i>Microspis discolor</i> (Fabricius)	Lady beetle	131	0		
<i>Microspis mixta</i> (Gorham)	Lady beetle	5	0		
<i>Monolepta signata</i> Olivier	Leaf beetle	33	0		
<i>Ophionea indica</i> (Thunberg)	Ground beetle	15	0		
<i>Ophionea ishii hoashii</i> Habu	Ground beetle	1	0		
<i>Ophionea ishii ishii</i> Habu	Ground beetle	2	0		
<i>Ophionea nigrofasciata</i> Schmidt-Goebel	Ground beetle	4	0		
<i>Oulema</i> sp.	Leaf beetle	1	0		
<i>Pandorus fuscipes</i> Curtis	Rove beetle	17	0		
<i>Pandorus tanulius</i> Erichson	Rove beetle	2	0		
<i>Pandorus</i> sp.	Rove beetle	4	0		
<i>Pentagonia</i> sp.	Ground beetle	5	0		
<i>Pteroporus</i> sp.	Ground beetle	1	0		
<i>Propylaea japonica</i> (Thunberg)	Lady beetle	1	0		
<i>Scarites</i> sp.	Ground beetle	3	0		
<i>Submersa latifrons</i> (Dejean)	Ground beetle	7	0		
Dermaptera					
<i>Euborellia philippinensis</i> Srivastava	Earwig	1	0		
Diptera					
<i>Agromyza oryzae</i> (Murakata)	Leaf-miner fly	2	B (2)†	wAory	AF481201
<i>Argyrophylax nigrotibialis</i> Baranov	Tachinid fly	8	0		
<i>Argyrophylax phoeda</i> Townsend	Tachinid fly	6	0		
<i>Argyrophylax</i> sp.	Tachinid fly	7	0		
<i>Ceratia</i> sp.	Tachinid fly	1	0		
<i>Ceratia</i> sp.	Tachinid fly	1	0		
<i>Ceratitis</i> sp.	Fruit fly	3	0		
<i>Chironomus dorsalis</i> Meigen	Midge	1	0		
<i>Chironomus kienensis</i> Tokunaga	Midge	7	0		
<i>Chironomus tepperi</i> Skuse	Midge	3	0		
<i>Chironomus</i> sp. 1	Midge	6	A (1)*	—	—

Table 1 Continued

Order and species	Common name	Total no. tested	No. positive	Wolbachia strain	Accession no.
<i>Chironomus</i> sp. 2	Midge	12	0		
<i>Chironomus</i> sp. 3	Midge	10	0		
<i>Chironomus</i> sp. 4	Midge	4	0		
<i>Chlorops oryzae</i> Matsumura	Chloropid fly	15	A (3)*	—	—
<i>Diopsis apicalis</i> Dalman	Stalk-eyed borer	3	A (2)†	wApi	AF481162
<i>Drupetis</i> sp.	Humpbacked fly	3	0		
<i>Hydrellia</i> sp. 1	Whorl maggot	7	A (2)†	wHyd	AF481163
<i>Hydrellia</i> sp. 2	Whorl maggot	9	0		
<i>Hydrellia</i> sp. 3	Whorl maggot	12	0		
<i>Hydrellia</i> sp. 4	Whorl maggot	3	0		
<i>Notiphila</i> sp.	Ephydrid fly	2	0		
<i>Ockthera brevitubulus</i> de Meijere	Ephydrid fly	5	0		
<i>Oseolia oryzae</i> (Wood-Mason)	Gall midge	38	B (7)†	wOry	AF481164
<i>Palexorista</i> sp.	Tachinid fly	2	0		
<i>Pipunculus jatanensis</i> de Meijere	Pipunculid fly	4	0		
<i>Pipunculus orientalis</i> (Kolczumi)	Pipunculid fly	1	0		
<i>Pipunculus</i> sp.	Pipunculid fly	10	0		
<i>Pocillotraphera taeniata</i> (Macquart)	Picture-winged fly	7	0		
<i>Psilopa</i> sp.	Ephydrid fly	1	0		
<i>Tipula sino</i> Alexander	Crane fly	17	B (14)†	wAin	AF481165
<i>Tomosturella subvirescens</i> (Loew)	Pipunculid fly	1	B (1)*	wPyr	AF481166
phemeroptera					
<i>Ephemera</i> sp.	Mayfly	1	0		
hemiptera					
<i>Aethus indicus</i> (Westwood)	Burrower bug	8	0		
<i>Andrallus spinulens</i> (Fabricius)	Stink bug	1	0		
<i>Anisops sardes</i> (Herr-Schaff)	Back swimmer	16	0		
<i>Cletus trigonus</i> (Thunberg)	Coreid bug	1	0		
<i>Cyrtorhinus lindipennis</i> Reuter	Mind bug	221	B (51)†	wLiv	AF481167
<i>Dysdercus</i> sp.	Red bug	1	0		
<i>Eysarcoris ventralis</i> Distant	Stink bug	6	0		
<i>Geotomus pygmaeus</i> (Dallas)	Burrower bug	8	0		
<i>Geotomus</i> sp.	Burrower bug	1	0		
<i>Hydrometra vittata</i> Stal	Marsh treader	4	0		
<i>Leptocoris acuta</i> (Thunberg)	Rice stink bug	1	0		
<i>Leptocoris oratorius</i> (Fabricius)	Rice stink bug	49	0		
<i>Limnogonus fossarum</i> (Fabricius)	Water strider	3	0		
<i>Limnogonus nitidus</i> (Mayr)	Water strider	2	0		
<i>Lygaeus hospes</i> Fabricius	Lygaeid bug	2	0		
<i>Menida formosa</i> (Westwood)	Stink bug	2	0		
<i>Mesocelia</i> sp.	Water treader	2	0		
<i>Micronecta quadristrigata</i> Breddin	Water boatman	8	0		
<i>Monomys</i> sp.	Toad bug	1	0		
<i>Nabis</i> sp. 1	Damsel bug	3	0		
<i>Nabis</i> sp. 2	Damsel bug	22	0		
<i>Nezara viridula</i> (Linnaeus)	Green stink bug	3	0		
<i>Ninus insignis</i> Stal	Lygaeid bug	1	? (1)†	—	—
<i>Pachybrachius pacificus</i> Stal	Lygaeid bug	1	0		
<i>Pachybrachius sobrinus</i> (Distant)	Lygaeid bug	1	0		
<i>Paracuosmetus pallicornis</i> (Dallas)	Lygaeid bug	8	A, B (1)*	—	—
<i>Polytoxus</i> sp. 1	Assassin bug	5	0		
<i>Polytoxus</i> sp. 2	Assassin bug	2	0		
<i>Polytoxus</i> sp. 3	Assassin bug	10	0		
<i>Pygomenida</i> sp. 1	Stink bug	1	0		
<i>Pygomenida</i> sp. 2	Stink bug	1	0		
<i>Pygomenida</i> sp. 3	Stink bug	4	0		
<i>Rhinocoris</i> sp.	Assassin bug	1	0		
<i>Riptortus linearis</i> (Fabricius)	Squash bug	2	0		

Table 1 Continued

Order and species	Common name	Total no. tested	No. positive	Wolbachia strain	Accession no.
<i>Riptortus pedestris</i> (Fabricius)	Squash bug	1	0		
<i>Saldula</i> sp.	Shore bug	6	0		
<i>Scotinophara coarctata</i> (Fabricius)	Black bug	18	A, B (5)†	wCoaR	AF481168
				wCoaA	AF481169
				wCoaC	AF481170
<i>Scotinophara inermiceps</i> (Breddin)	Black bug	1	0		0
<i>Scotinophara scotti</i> Horvath	Black bug	1	0		0
<i>Scutellera nobilis</i> Fabricius	Shield-backed bug	1	0		0
<i>Tetradia histeroides</i> Fabricius	Stink bug	1	0		0
<i>Tetradia transversalis</i> Westwood	Stink bug	8	0		0
<i>Tytthus chinensis</i> Stal	Mind bug	15	B (1)†	wChi	AF481171
Homoptera					
<i>Balclutha</i> sp.	Leafhopper	25	B (7)†	wBal	AF481172
<i>Cicadulina bipunctata</i> (Melichar)	Leafhopper	10	0	—	
<i>Cofena spectra</i> (Distant)	Leafhopper	33	B (1)†	wSpe	AF481173
<i>Cofena unimaculata</i> (Sagnoret)	Leafhopper	7	0		
<i>Empoasca alani</i> (Ahmed)	Leafhopper	37	B (1)†	wAla	AF481174
<i>Eutettix</i> sp.	Planthopper	8	0		
<i>Hecalus</i> sp.	Leafhopper	2	0		
<i>Hysteronura setariae</i> (Thomas)	Aphid	9	0		
<i>Leodelphax striatellus</i> (Fallen)	Planthopper	6	B (1)†	wStri	AF481175
<i>Macrostelus strifrons</i> Anufriev	Leafhopper	4	0		
<i>Nephotettix malayanus</i> Ishihara & Kawase	Green leafhopper	6	B (2)†	wMal	AF481176
<i>Nephotettix nigropictus</i> (Stål)	Green leafhopper	46	B (3)†	wNig	AF481177
<i>Nephotettix virescens</i> (Distant)	Green leafhopper	292	B (35)†	wVirP	AF481178
				wVir	AF481179
<i>Nilaparvata bakeri</i> (Muir)	Brown planthopper	9	B (3)†	wBak	AF481180
<i>Nilaparvata lugens</i> (Stål)	Brown planthopper	237	B (39)†	wLug	AF481181
<i>Nisus nervosa</i> (Motschulsky)	Planthopper	15	B (7)†	wNer	AF481182
<i>Otiurus</i> sp.	Planthopper	1	0		
<i>Psophodes costalis</i> Walker	Leafhopper	5	0		
<i>Pyrilla perpusilla</i> (Walker)	Planthopper	3	0		
<i>Recilia dorsalis</i> (Motschulsky)	Zig-zag leafhopper	116	A, B (6)†	wRecM	AF481183
				wRecC	AF481184
<i>Sogatella furcifera</i> (Horvath)	White backed planthopper	275	B (90)†	wFur	AF481185
<i>Stirellus</i> sp.	Green leafhopper	6	? (2)†	—	—
<i>Togodes pictus</i> (Distant)	Leafhopper	1	0		
<i>Thaia oryzivora</i> Ghauri	Orange-headed leafhopper	45	0		
Hymenoptera					
<i>Amasomorphus</i> sp.	Parasitic wasp	1	0		
<i>Brachymeria excarinata</i> Gahan	Chalcidid wasp	4	A (2)†	wExc	AF481186
<i>Brachymeria lasus</i> (Walker)	Chalcidid wasp	3	0		
<i>Brachymeria megaspila</i> Cameron	Chalcidid wasp	1	0		
<i>Camponotus</i> sp.	Ant	5	0		
<i>Camponotus</i> sp.	Parasitic wasp	1	0		
<i>Charops brachypterus</i> (Cameron)	Parasitic wasp	2	0		
<i>Charops</i> sp.	Parasitic wasp	1	0		
<i>Cepidosemopsis nacoletiae</i> (Eady)	Parasitic wasp	1	0		
<i>Cotesia angustibasis</i> (Gahan)	Parasitic wasp	4	0		
<i>Cotesia cypris</i> Nixon	Parasitic wasp	1	? (1)†	—	—
<i>Cotesia flavipes</i> Cameron	Parasitic wasp	3	A (1)†	wFla	AF481187
<i>Diacamma</i> sp.	Ant	3	0		
<i>Elasmus philippinensis</i> Ashmead	Parasitic wasp	1	0		
<i>Gambus</i> sp.	Parasitic wasp	2	0		
<i>Goniozus nr. triangulifer</i> Kieffer	Parasitic wasp	2	0		
<i>Goniozus</i> sp.	Parasitic wasp	5	B (1)†	wGon	AF481188
<i>Macrocentrus philippinensis</i> Ashmead	Parasitic wasp	5	A (1)†	wMph	AF481189
<i>Macrocentrus</i> sp.	Parasitic wasp	4	0		

Table 1 Continued

Order and species	Common name	Total no. tested	No. positive	Wolbachia strain	Accession no.
<i>Nezestatus</i> sp.	Eupelmid wasp	1	0		
<i>Oncophylla smaragdina</i> Fabricius	Ant	4	0		
<i>Opius</i> sp.	Parasitic wasp	13	B (1)†	wDveP	AF481190
<i>Platygaster oryzae</i> Cameron	Parasitic wasp	2	0		
<i>Polyrachis</i> sp. 1	Ant	1	0		
<i>Polyrachis</i> sp. 2	Ant	1	7 (1)‡	—	—
<i>Polyrachis</i> sp. 3	Ant	1	0		
<i>Polyrachis</i> sp. 4	Ant	3	0		
<i>Proctosmia</i> sp.	Ensign wasp	1	A (1)‡	wPro	AF481202
<i>Ropalidia cyathiformis</i> (Fabricius)	Yellow jacket	4	0		
<i>Ropalidia</i> sp.	Yellow jacket	1	0		
<i>Sceliphron madraspatanum conspicillatum</i> (Costa)	Sphexid wasp	1	0		
<i>Solenopsis</i> sp.	Ant	2	A (1)*	—	—
<i>Telenomus rowani</i> (Gahan)	Parasitic wasp	1	0		
<i>Temelucha philippinensis</i> (Ashmead)	Parasitic wasp	13	A (4)†	wPhi	AF481196
<i>Temelucha stangli</i> (Ashmead)	Parasitic wasp	1	0		
<i>Tetrastichus schoenobii</i> Ferrière	Parasitic wasp	2	0		
<i>Trichogramma</i> sp.	Parasitic wasp	3	0		
<i>Trichogrammatoides</i> sp.	Parasitic wasp	1	0		
<i>Trichomalopsis apantelectera</i> (Crawford)	Parasitic wasp	2	B (1)†	wApa	AF481191
<i>Trichomma craphalocrenis</i> Uchida	Parasitic wasp	15	B (2)†	wCnaM	AF481192
				wCnaC	AF481193
				wSch	AF481194
<i>Tropobracon schoenobii</i> (Viereck)	Parasitic wasp	4	B (1)†		
<i>Xanthopimpla flutolineata</i> Cameron	Parasitic wasp	7	0		
Lepidoptera					
<i>Chilo suppressalis</i> (Walker)	Rice stem borer	1	0		
<i>Cnaphalocrectus medinalis</i> (Guenee)	Rice leaf folder	56	B (42)†	wMed	AF481195
<i>Marasmia</i> sp.	Grass moth	1	A (1)*	—	—
<i>Melanitis</i> sp.	Green-horned caterpillar	2	0		
<i>Mythimna separata</i> (Walker)	Ear-cutting caterpillar	1	0		
<i>Nymphula depunctalis</i> (Guenee)	Grass moth	4	B (2)*	—	—
<i>Pelopidas mathias</i> (Fabricius)	Skipper	1	0		
<i>Polytremis pellucida</i> (Murray)	Skipper	1	0		
<i>Scirpophaga incertulas</i> (Walker)	Rice yellow stem borer	20	B (2)†	wInsO	AF481197
				wInsP	AF481198
<i>Sesamia inferens</i> (Walker)	Pink stem borer	4	0		
Mantodea					
<i>Hierodula</i> sp.	Praying mantid	1	0		
Orthoptera					
<i>Acrula willmeri</i> Durr	Grasshopper	5	0		
<i>Anaxipha longipennis</i> (Serville)	Crick	6	A (4)†	wLon	AF481199
<i>Ceracris fasciata</i> (Brunner)	Grasshopper	1	0		
<i>Conocephalus longipennis</i> (de Haan)	Grasshopper	53	0		
<i>Euscirtus concinnus</i> (Haan)	Crick	27	0		
<i>Gryllotalpa orientalis</i> Burmeister	Mole cricket	1	0		
<i>Hieroglyphus banian</i> (Fabricius)	Grasshopper	1	0		
<i>Metochr vittaticolis</i> (Stål)	Crick	5	0		
<i>Oryza japonica japonica</i> (Thunberg)	Grasshopper	44	0		
<i>Teleogryllus</i> sp.	Crick	1	A (1)†	wTel	AF481200
<i>Tettigidea</i> sp.	Pygmy grasshopper	2	0		
Thysanoptera					
<i>Stenchaetothrips biformis</i> (Bagnall)	Rice thrips	1	0		

*Wolbachia group described by A-B group specific primers (Zhou et al. 1998).

†Wolbachia group described by sequence typing.

‡Unidentified Wolbachia group.

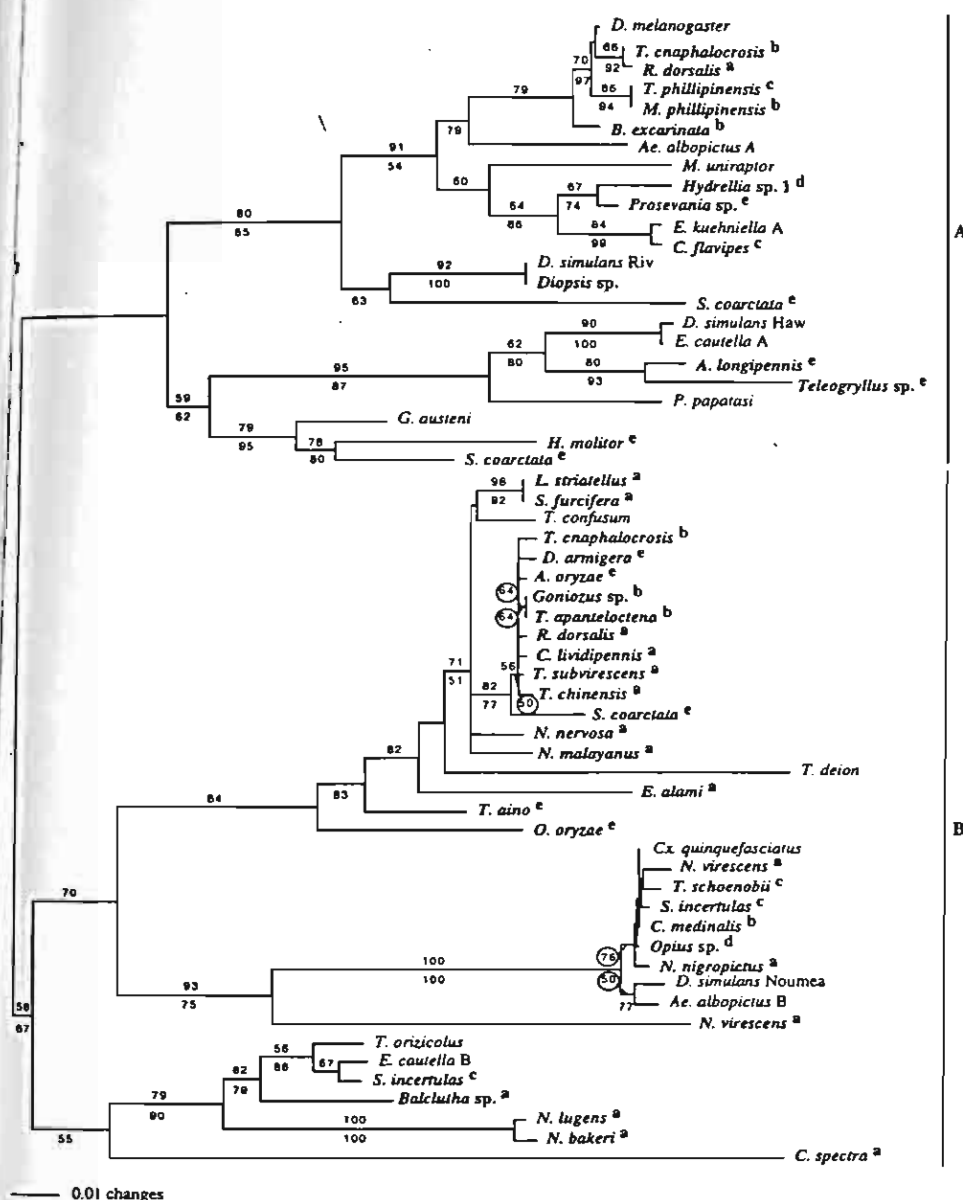


Fig. 1 Phylogenetic relationships of *Wolbachia* strains found in insects of the rice field community. The figure shows the neighbour-joining tree based on *wsp* gene sequences. Bootstrap values (1000 replicates) for nodes are shown for both neighbour-joining (above the branch) and maximum parsimony (below the branch) analyses. *Wolbachia* strains are named according to their insect host and are represented in bold. Superscript letters: a represents *Wolbachia* strains from the hopper feeding complex, b represents *Wolbachia* strains from the leaf-folder feeding complex, c represents *Wolbachia* strains from the yellow stem borer feeding complex, d represents *Wolbachia* strains from the whorl maggot feeding complex, and e represents *Wolbachia* strains from rice-field insects with uncertain feeding relationships.

A and B supergroups for both hosts and parasitoids. Identical *wsp* sequences were found in *Temelucha philippinensis* and *Macrocentrus philippinensis*, although they parasitize different hosts, i.e. *S. incertulas* and *C. medinalis*, respectively. No relationship was found between the *Wolbachia* strains in the whorl maggot, *Hydrellia* sp., and its parasitoid, *Opius* sp. (Fig. 1).

A total of 29 *Wolbachia*-infected insect species were grouped into three feeding complexes based on their known feeding relations (Fig. 2A): a hopper feeding complex, a lepidopteran feeding complex based on the rice leafroller, *C. medinalis*, and the rice yellow stem borer, *S. incertulas*, and a whorl maggot feeding complex. The feeding relations of the remaining 20 infected species (Fig. 2B) were too poorly known for the species to be grouped. The mean *wsp* genetic distance among species pairs that interacted within the hopper feeding complex

and within the lepidopteran complex was each statistically compared with the mean genetic distance among all pairs that did not interact within a complex. The whorl maggot complex had too few interactions ($n = 1$) for statistical analysis. For the hopper complex comparison, variances were not homogeneous, so a *t*-test assuming unequal variances (SPSS 1997) was used to analyse the data. Mean ($\pm$ SD) genetic distance among interacting pairs of the hopper complex (0.118 ± 0.091 nucleotide sequence differences) was found to be significantly smaller than that of all noninteracting pairs (0.162 ± 0.079 nucleotide sequence differences) ($t = 2.905$, d.f. = 38.5, $P = 0.006$). For the lepidopteran complex comparison, variances were homogeneous, so a *t*-test assuming equal variances (SPSS 1997) was used. Mean genetic distance among interacting pairs within this complex (0.159 ± 0.080 nucleotide sequence differences) was not significantly different to that among

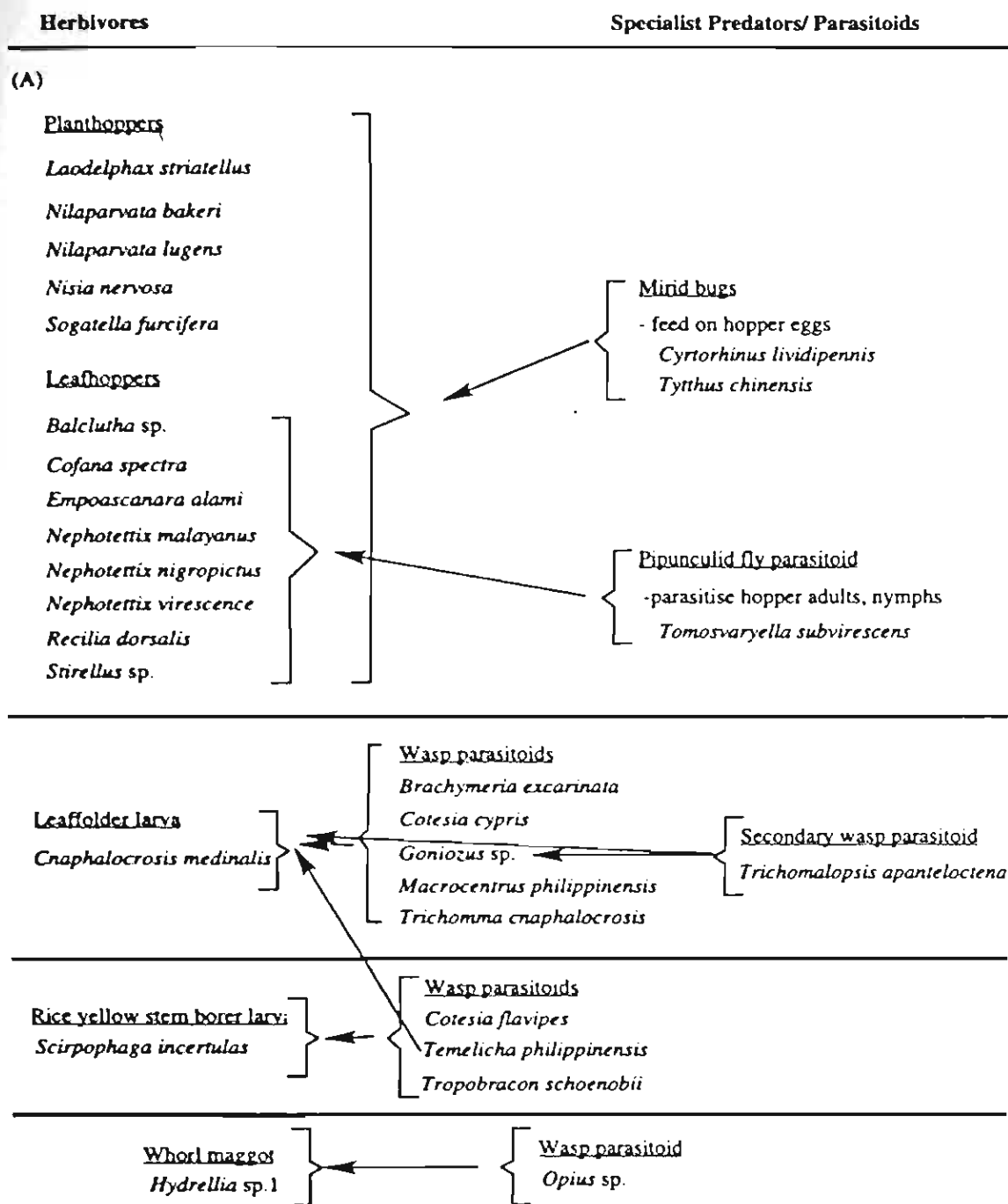


Fig. 2 *Wolbachia*-infected rice insects classified by their feeding relations. Insects were caught as adults. For many species, however, the larval stage is the important feeding stage on rice. For such species, the larval stage is indicated. (A) Interactions between herbivores and specialist predators and parasitoids. The arrow begins at the predator/parasitoid and ends at the prey/host. (B) *Wolbachia*-infected rice insects for which feeding interactions were uncertain or unknown.

noninteracting pairs (0.160 ± 0.070 nucleotide sequence differences) ($t = -0.12$, d.f. = 905, $P = 0.991$).

Discussion

Our field survey has indicated that 23.4% of tropical rice-field insect species are infected with *Wolbachia*, although this percentage would undoubtedly increase if more speci-

mens were tested per species or different methods of DNA extraction or PCR were used. Previous field surveys (Werren *et al.* 1995a; Wenseleers *et al.* 1998; Plantard *et al.* 1999; Kittayapong *et al.* 2000a,b; Werren & Windsor 2000) detected *Wolbachia* in insects from 16.9% (Werren *et al.* 1995a) to 53.6% (Plantard *et al.* 1999) of species.

Among rice-field insects, the order Homoptera had the highest proportion of species (54.2%) infected with

Herbivores	Generalist Predators	Others-feeding relations on rice unknown
(B)		
<u>Black bug</u> \		
<i>Scotinophora coarctata</i>		
<u>Fly larvae</u>	<u>Ants</u>	<u>Flies</u>
<i>Agromyza oryzae</i>	<i>Solenopsis</i> sp.	<i>Chironomus</i> sp. 1
<i>Chlorops oryzae</i>	<i>Polyrachis</i> sp. 2	<i>Diopsis apicalis</i>
<i>Chaphalocrocis medinalis</i>	<u>Ground beetle</u>	<i>Tipula aino</i>
<i>Orseolia oryzae</i>	<i>Chlaenius</i> sp. 2	<u>Moths</u>
<u>Beetle larva</u>		<i>Nymphula depunctalis</i>
<i>Dicladispa armigera</i>	<u>Cricket</u>	<u>True bugs</u>
	<i>Anaxipha longipennis</i>	<i>Ninus insignis</i>
<u>Moth larva</u>		<i>Paraecusmetus pallicornis</i>
<i>Marasmia</i> sp.		
<u>Paddy-root weevil</u>		<u>Wasp</u>
<i>Hydronomidius molitor</i>		<i>Prosevania</i> sp.
<u>Cricket</u>		
<i>Teleogryllus</i> sp.		

Fig. 2 Continued

Wolbachia. Although *Wolbachia* infection has been reported before for natural populations of the two homopteran species, *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus* (Noda *et al.* 2001), extensive surveys for these bacteria in populations of many homopteran species have not been reported previously for this insect order. Werren *et al.* (1995a), West *et al.* (1998) and Werren & Windsor (2000) tested two (*F. Cicadidae*), four (*F. Aphidae*) and three (*F. Aphidae*, *F. Cicadellidae*, *F. Membracidae*) homopteran species, respectively, and none of them were positive. Using a long PCR method, Jeyaparakash & Hoy (2000) detected *Wolbachia* in three of seven homopteran species during a survey of mainly laboratory colonies. Therefore, long PCR might improve *Wolbachia* DNA amplification.

The next three orders, in order of species infection rates, were Lepidoptera (40.0%), Hymenoptera (31.0%) and Diptera (30.8%). These same three orders had the highest species infection rates in the survey of Werren *et al.* (1995a), but only Hymenoptera and Orthoptera had species infection rates > 20% in the survey conducted by Werren & Windsor (2000). Hymenoptera are also reported to have high species infection rates in other published surveys. Thus *Wolbachia* has been found in 62.5% of wasp species

inhabiting *Diplolepis rosae* galls (Schilthuizen & Stouthamer 1998), 50% of Indo-Australian ant species (Wenseleers *et al.* 1998), 27.8% of leaf-miner parasitoids (West *et al.* 1998) and 59.3% of Cynipid gallwasps (Plantard *et al.* 1999).

The widespread distribution of *Wolbachia* in some orders compared with others may be because species of some orders are more favoured for *Wolbachia* horizontal transmission and establishment of *Wolbachia* infections within new species. A lack of concordance is commonly observed between host and *Wolbachia* phylogenies, which is explained most parsimoniously by extensive horizontal transmission among species (e.g. O'Neill *et al.* 1992; Werren *et al.* 1995b; Zhou *et al.* 1998).

An ecological interaction between an infected and uninfected species is considered necessary for horizontal transmission to occur. A possible route for *Wolbachia* horizontal transmission is through one insect becoming infected when it feeds on another infected insect. In particular, the relatedness of *Wolbachia* between parasitoids and their hosts has been targeted in recent studies. Several phylogenies, in which closely related *Wolbachia* strains occur in both the host and parasitoid species, have been published (e.g. Werren *et al.* 1995b; Van Meer *et al.* 1999; Vavre *et al.*

1999). In addition, a laboratory study (Heath *et al.* 1999) has recently demonstrated that *Wolbachia* transfer from host to parasitoid is possible, although the infection rate eventually decreased to zero with subsequent generations. Based on phylogenetic relations among *Wolbachia* strains, our results suggest several such host-parasitoid interactions in the rice insect community through which horizontal transmission may have occurred in the past or still occur (Fig. 2A). In addition, we found a new possible route of *Wolbachia* transfer between specialist predators, i.e. mirid bugs, and their prey, i.e. leaf- and planthoppers, which may be important for horizontal transmission between predator and prey. This hypothesized route could be either way, i.e. from prey to predator or from predator to prey. Thus, a mirid bug could possibly acquire *Wolbachia* by feeding on infected hopper eggs. Alternatively, probing of hopper eggs by an infected mirid bug might lead to injection of *Wolbachia*-contaminated fluid into an egg.

Within the rice-field insect community it seems that infected species tended to group together such that feeding 'complexes' of *Wolbachia*-infected species were apparent. Planthopper and leafhopper species were all interconnected through the two mirid species, *Cartharinus lividipennis* and *Tytthus chinensis*, which feed on hopper eggs (Fig. 2A). A highly specialized parasitoid, the pipunculid fly, *Tomostaryella subvirescens*, is also part of this hopper feeding complex by means of parasitizing leafhoppers of the genus, *Nephotettix*, which are among the rice hopper assemblage infected with *Wolbachia*. From our phylogenetic analysis, *Wolbachia* strains found in the hoppers, *Recilia dorsalis*, *Nephotettix malayanus* and *Nisa nervosa*, their egg predators, *Cartharinus lividipennis* and *Tytthus chinensis*, and the *Nephotettix* parasitoid, *Tomostaryella subvirescens*, are all in the same *Wolbachia* clade (Fig. 1). Furthermore, the average genetic distance between interacting pairs in this feeding complex was significantly smaller than for noninteracting pairs, which suggests possible *Wolbachia* horizontal transfer among members of this complex.

Another feeding 'complex' is centred on two lepidopteran larval pests of rice, i.e. larvae of the leafroller, *Cnaphalocrocis medinalis*, and the rice yellow stem borer, *Scirpophaga incertulas* (Fig. 2A). Larvae of each species are parasitized by several *Wolbachia*-infected parasitoid species, thus indicating possible routes of horizontal *Wolbachia* transfer. The leafroller and the stem borer were both infected with *Wolbachia* from the same clade, as was the parasitoid, *Tropobracon schoenobii*, which parasitizes larvae of the rice yellow stem borer. However, none of the other infected parasitoid species were infected by *Wolbachia* of this clade. Another parasitoid species, *Trichomalopsis apantelectena*, parasitizes not only leafroller larvae, but also larvae of another parasitoid species, *Gomozus* sp., which in turn parasitizes leafroller larvae. The two parasitoid species have *Wolbachia* strains of the same clade. However,

statistical support for this feeding complex being important for *Wolbachia* horizontal transfer was not found.

Although these results point to potential *Wolbachia* horizontal transmission routes, they can, however, only be regarded as speculative for at least three reasons. First, the insect samples were collected from not just one rice field but from 29 rice fields throughout Thailand and, so, infected species may not be directly linked in one area. Second, many insect species would not have been sampled using our methods and, so, key feeding interactions that may be important for horizontal transmission have probably been overlooked. For example, there is good evidence that the strepsipteran endoparasite, *Elenchus japonicus*, may mediate *Wolbachia* transfer between two of the rice planthoppers sampled in this study, *L. striatellus* and *S. furcifera* (Noda *et al.* 2001), but our sampling methods never picked up this parasite. Third, even though rice-field insect communities have been much studied, there are probably still many species whose exact feeding relations are unknown. For example, we recorded seven *Wolbachia*-infected species whose feeding relations in tropical rice fields have not been determined. An understanding of these species place in the rice food web may highlight other potential horizontal transmission routes.

We have classified interactions among *Wolbachia*-infected species from the rice-field insect community into two major feeding complexes. When relationships among *Wolbachia* strains were compared, we found that some strains were closely related within each feeding complex. The feeding interactions of the species having closely related *Wolbachia* strains may therefore be of potential importance to *Wolbachia* horizontal transmission. Of particular interest is the hopper feeding complex in which *Wolbachia* sequences in three hopper species occurred in the same clade as their mirid predators as well as a *Nephotettix* leafhopper parasitoid. However, many insect species with *Wolbachia* strains in the same clade were not ecologically connected by any known feeding interaction, thus highlighting the difficulty in unravelling the evolutionary history of *Wolbachia* relations with their hosts.

Acknowledgements

The authors would like to thank Scott L. O'Neill for helpful advice and suggestions, Monpop Tripop for his help in specimen collection, Samneng Themthong and Natchaya Klinpikul for their technical assistance. The work was supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training (BRT 139026) and the Thailand Research Fund (BGI/16/2543).

References

- Barrión AT, Litsinger JA (1994) Taxonomy of rice insect pests and their arthropod parasites and predators. In: *Biology and Management of Rice Insects* (ed. Heinrichs EA), pp. 13–359. Wiley Eastern Limited, New Delhi.

- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology*, 180, 2373–2378.
- Heath BD, Butcher RDJ, Whitfield WGF, Hubbard SF (1999) Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology*, 9, 313–316.
- Heong KL, Aquino GB, Barrion AT (1991) Arthropod community structures of rice ecosystems in the Philippines. *Bulletin of Entomological Research*, 81, 407–416.
- Hurst GDD, Hurst LD, Majerus MEN (1992) Selfish genes move sideways. *Nature*, 356, 659–660.
- Jeyaparakash A, Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9, 393–405.
- Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V, O'Neill SL (2000a) Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37, 340–345.
- Kittayapong P, Milne JR, Tigvattananont S, Baimai V (2000b) Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. *Scienceasia*, 26, 93–103.
- Noda H, Miyoshi T, Zhang Q, Watanabe K, Deng K, Hoshizaki S (2001) *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission. *Molecular Ecology*, 10, 2101–2106.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89, 2699–2702.
- Ooi PAC, Shepard BM (1994) Predators and parasitoids of rice insect pests. In: *Biology and Management of Rice Insects* (ed. Heinrichs EA), pp. 585–612. Wiley Eastern Limited, New Delhi.
- Plantard O, Rasplus J-Y, Mondor G, Le Clainche I, Solignac M (1999) Distribution and phylogeny of *Wolbachia* inducing thelytoky in 'Rhoditini' and 'Aylacini' (Hymenoptera: Cynipidae). *Insect Molecular Biology*, 8, 185–191.
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817–818.
- Reissig WH, Heinrichs EA, Litsinger JA et al. (1985) *Illustrated Guide to Integrated Pest Management of Rice in Tropical Asia*. International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna, Philippines.
- Roffey J (1979) *Locusts and Grasshoppers of Economic Importance in Thailand*. Centre for Overseas Pest Research, Southampton.
- Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M (1992) *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 250, 91–98.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Schilthuisen M, Stouthamer R (1997) Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 264, 361–366.
- Shepard BM, Barrion AT, Litsinger JA (1987) *Helpful Insects, Spiders, and Pathogens: Friends of the Rice Farmer*. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry*. W.H. Freeman, New York.
- SPSS (1997) *SPSS for Windows, Release 7.5.2*. SPSS Inc., Cary, NC.
- Swofford DL (2000) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Van Meer MMM, Witteveldt J, Stouthamer R (1999) Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Molecular Biology*, 8, 399–408.
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Bouletreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host–parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1711–1723.
- Wenseleers T, Billen J (2000) No evidence for *Wolbachia*-induced parthenogenesis in the social Hymenoptera. *Journal of Evolutionary Biology*, 13, 277–280.
- Wenseleers T, Ito F, Van Borm S, Huybrechts R, Volckaert F, Billen J (1998) Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 265, 1447–1452.
- Werren JH, Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267, 1277–1285.
- Werren JH, Windsor D, Guo L (1995a) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 262, 197–204.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR (1995b) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 261, 55–71.
- West SA, Cook JM, Werren JH, Godfray HCJ (1998) *Wolbachia* in two host–parasitoid communities. *Molecular Ecology*, 7, 1457.
- Wilson MR, Claridge MF (1991) *Handbook for the Identification of Leafhoppers and Planthoppers of Rice*. CAB International, Wallingford, UK.
- Yasumatsu K, Okuma C, Wongsiri T, Wongsiri N, Tirawat C, Lewvanich A (1982) *An Illustrated Guide to Some Natural Enemies of Rice Insect Pests in Thailand*. Japan International Cooperation Agency (JICA). EXF/JR/82-2.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill SL (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 265, 509–515.

Pattamaporn Kittayapong and Wanwisa Jamnongluk research interests include host reproductive alterations caused by *Wolbachia* as well as evolutionary relationships among *Wolbachia* strains. John Milne's research focuses on interactions among insects, plants and associated microorganisms. Apisit Thipaksorn and Chalern Sindhuse are interested in the taxonomy and ecology of agricultural insect pests.

Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial COI sequences

Wanwisa Jamnongluk, Visut Baimai, and Pattamaporn Kittayapong

Abstract: We compared sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of eight species of the *Bactrocera tau* complex using *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera pyrifoliae*, *Ceratitis capitata*, *Anopheles gambiae*, and *Locusta migratoria* as outgroups. A 639-bp variable region was sequenced. The sequence divergence between species in the *B. tau* complex ranged from 0.06 to 28%, and up to 29% between the complex and its tephritid outgroups, *B. dorsalis* and *C. capitata*. According to the phylogenetic relationships, these members of the *B. tau* complex could be classified into four clades. Thus, species A and D form clades 1 and 3, respectively, while species C and I belong to clade 4. However, species B, E, and F form a distinct group, clade 2, and infested the fruits of non-cucurbit hosts. Host-plant shifts resulting in adaptive radiation and premating isolation among species might play an important role in species differentiation of the *B. tau* complex.

Key words: *Bactrocera*, cytochrome oxidase I, species complex, mitochondrial DNA, phylogeny.

Résumé : Les auteurs ont comparé les séquences du gène codant pour la cytochrome oxydase I mitochondriale chez huit espèces du complexe *Bactrocera tau*, en utilisant *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera pyrifoliae*, *Ceratitis capitata*, *Anopheles gambiae* et *Locusta migratoria* comme groupes externes. Une région variable de 639 bp a été séquencée. La divergence nucléotidique au sein des espèces du complexe *B. tau* variait entre 0,06 et 28 % ; elle atteignait jusqu'à 29 % entre le complexe et les tephritidés *B. dorsalis* et *C. capitata*, utilisées comme groupe externe. Selon les relations phylogénétiques, les membres du complexe *B. tau* forment quatre clades. Les espèces A et C forment les clades 1 et 3, respectivement, tandis que les espèces C et I appartiennent au clade 4. Cependant, les espèces B, E et F forment un groupe distinct, le clade 2. Des changements dans les espèces hôtes auraient résulté en une radiation adaptative et un isolement précédant la reproduction pourraient jouer un rôle important au niveau de la différenciation des espèces au sein du complexe *B. tau*.

Mots clés :

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

The fruit flies of the family Tephritidae are one of the most diverse families comprising some 4000 species distributed throughout the world. Some of these fruit flies are important agricultural pests (Foote et al. 1993). In Thailand and other Southeast Asian countries, fruit flies of the genus *Bactrocera* (Tribe Dacinae, Family Tephritidae), particularly the *Bactrocera dorsalis* species of the subgenus *Bactrocera*, are known to be one of the major pests of tropical fruits (Drew and Romig 1997). Hence, this genus of tephritid fruit flies is an excellent candidate for study of species diversity

and evolutionary processes. Recently, it has been demonstrated that the taxon *Bactrocera dorsalis* s.l. is a species complex comprising at least 40 species (Drew 1989; Baimai et al. 1995, 1999a, 1999b, 2000a). Moreover, *Bactrocera tau* s.l. of the subgenus *Zeugodacus* is another taxon considered to consist of closely related species or sibling species (Drew and Romig 1997). These fruit flies have a strong preference for attacking plants in the Cucurbitaceae family, e.g., cucumber, luffa, and young melon fruit, throughout Thailand (Tigvattananont 1986; Meksongsee et al. 1991) and other regions in the Far East (White and Elson-Harris 1992).

Although *B. tau* is a major cucurbit pest, little work has been done on the genetic relationships among members of this species complex. Morphologically, members of the *B. tau* complex show differences in the three yellow stripes on the thorax and the size and shape of dark bands on the dorsal abdomen (S. Tigvattananont, Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's University of Technology, Bangkok, Thailand, personal communication). However, some species of the *B. tau* complex could not be easily distinguished morphologically. Recently, mitotic karyotype and electrophoresis analyses of the *B. tau* complex have been demonstrated

Received 15 January 2002. Accepted 23 October 2002.
Published on the NRC Research Press Web site at
<http://genome.nrc.ca> on xx xxxx 2003.

Corresponding Editor: B. Golding.

W. Jamnongluk, V. Baimai, and P. Kittayapong.¹ Center for Vectors and Vector-borne Diseases and Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Bangkok 10400, Thailand.

¹Corresponding author (e-mail: grpkt@mahidol.ac.th).

Table 1. List of eight species of the *Bactrocera tau* complex used in this study.

Species	Host plant species (Family)	Location*	Accession No.
A	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	KB	AF400067
B	<i>Siphonodosa celastreus</i> (Celastraceae)	KB	AF400068
C	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae)	KB	AF400069
D	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	RN	AF400070
E	<i>Strychnos thorelii</i> (Strychnaceae)	KB	AF400071
F	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> (Flacourtiaceae)	RN	AF400072
G	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> (Flacourtiaceae)	KB	AY151138
I	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae)	SO	AF400073

*Abbreviated name of locations where fruit flies have been collected: KB, Kanchanaburi Province (western Thailand); RN, Ranong Province (southern Thailand); and SO, Songkhla Province (southern Thailand).

to be useful tools for separation of these closely related species, although the methods are some what tedious and time consuming (Saelee 1999; Baimai et al. 2000b).

In this study, we used the variable region of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene to obtain better estimates of divergence for each species among the eight members of the *B. tau* complex. The phylogenetic relationships among these species and between the outgroups were determined.

Materials and methods

Insect samples

Tephritid fruit fly larvae were collected from fruits and flowers in different parts of Thailand. Details of specimen collections and storage procedures are given in Kittayapong et al. (2000). The identification of collected tephritid fruit flies was done by S. Tigvattananont based on the band pattern of the adult's dorsal thorax and abdomen, the size and shape of their ovipositors, and the flies' preferred host plants. The voucher specimens of each species were kept by S. Tigvattananont at the Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's University of Technology, Bangkok, Thailand. A single fruit fly of each species was randomly sampled. Species and sample localities for sequenced specimens are listed in Table 1.

DNA extraction

Total DNA was extracted from the ovaries or testes of individual fruit fly adults using the crude boiling methods (O'Neill et al. 1992). The ovaries or testes were homogenized with a sterilized pestle in a 1.5-mL microcentrifuge tube filled with 100 μ L of STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)). The homogenate was heated at 95°C for 10 min before being centrifuged at 14 000 rpm for 1 min at room temperature. Two microlitres of supernatant was used as the DNA template for the polymerase chain reaction (PCR).

PCR amplification and sequencing

A 639-bp-long COI fragment was polymerized by using the sense primer UEA 7 and the antisense primer UEA 10, both of which were developed by Lunt et al. (1996). PCR amplification was done in 20- μ L reaction volumes: 12.5 μ L ddH₂O, 2 μ L 10 $\times$ PCR buffer (Promega, Madison,

Wis.), 2 μ L of 25 mM MgCl₂, 0.5 μ L dNTP (10 mM each), 0.5 μ L of 20 μ M forward and reverse primers, and 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega). PCR amplification was done with initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and final extension step at 72°C for 30 min. Ten microlitres of PCR product was run on a 1% w/v agarose gel to determine the presence and size of amplified DNA.

One microliter of the PCR product was directly ligated into a pGEM-T vector (Promega) in a 10- μ L reaction by incubation at 4°C for two nights. Plasmids were isolated using the Qiaprep plasmid miniprep kit (Qiagen, Valencia, Calif.) and sequenced on an ABI Prism automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). At least three independent clones were sequenced from each tephritid fruit fly specimen. Both strands of the plasmids were sequenced using T7 and SP6 primers. Consensus sequences of COI fragments from each fruit fly specimen were constructed and used for later analyses. Sequences of all eight tephritid fruit fly species have been deposited in GenBank under accession Nos. AF400067–AF400073 and AY151138.

Data analysis

The alignment was done manually; however, there were no gaps in any of the analyzed sequences. Using MEGA software version 2.0 (Kumar et al. 2001), nucleotide and amino acid sequence differences among the eight tephritid species of the *B. tau* complex were calculated. The Kimura two-parameter distance method (Kimura 1980) was used to calculate nucleotide sequence differences and the *p* distance method was used to calculate amino acid sequence differences. The overall transition–transversion ratio was calculated by the general time reversible method (Yang 1994) chosen by the Modeltest program (Posada and Crandall 1998). A synonymous substitution rate was determined by the MEGA program version 2.0 (Kumar et al. 2001), which employed Nei and Gojobori calculation methods (Nei and Gojobori 1986).

Maximum parsimony, maximum likelihood, and neighbor-joining methods were used in phylogeny reconstruction using PAUP version 4.0 b2 (Swofford 1999). *Bactrocera dorsalis* (Jamnongluk 2001), *B. pyrifoliae* (Jamnongluk 2001), *C. capitata* (Spanos et al. 2000), *An. gambiae* (Beard et al. 1993), and *L. migratoria* (Flook et al. 1995) were used as outgroups in all analyses. A maximum parsimony analysis was performed using a heuristic search procedure with 1000 bootstrap replications. Characters were weighted

Table 2. Proportion of substitutions represented by transition–transversion ratio (above diagonal) and nucleotide sequence differences (below diagonal) of the cytochrome oxidase I gene of the tephritid fruit flies *Bactrocera* spp. and *Ceratitidis capitata* using the Kimura two-parameter distance method.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(1) <i>B. tau</i> sp. A		4.704	5.119	5.033	6.335	4.772	1.685	4.208	1.790	2.353	1.142
(2) <i>B. tau</i> sp. B	0.136		4.68	5.989	4.168	3.053	2.727	6.414	2.003	2.871	1.223
(3) <i>B. tau</i> sp. C	0.204	0.167		4.410	4.656	4.776	2.825	9.483	2.558	3.659	1.625
(4) <i>B. tau</i> sp. D	0.122	0.166	0.180		5.212	5.448	1.631	4.313	2.085	2.282	1.169
(5) <i>B. tau</i> sp. E	0.135	0.054	0.178	0.137		4.167	2.540	5.585	1.796	2.401	1.571
(6) <i>B. tau</i> sp. F	0.148	0.006	0.181	0.166	0.068		2.847	6.526	2.002	2.861	1.222
(7) <i>B. tau</i> sp. G	0.164	0.162	0.225	0.161	0.162	0.176		2.408	1.154	1.425	0.885
(8) <i>B. tau</i> sp. I	0.205	0.262	0.193	0.209	0.246	0.281	0.258		1.794	2.174	1.479
(9) <i>B. dorsalis</i>	0.211	0.227	0.243	0.189	0.233	0.235	0.247	0.226		9.738	1.255
(10) <i>B. pyrifoliae</i>	0.245	0.283	0.285	0.193	0.275	0.212	0.278	0.232	0.051		1.337
(11) <i>C. capitata</i>	0.205	0.231	0.286	0.223	0.239	0.239	0.290	0.311	0.220	0.240	

equally. For maximum likelihood analysis, we used step wise addition using a general time reversible model chosen by the above calculation with consideration of gamma distributed rate across sites. Bootstrap analysis was done with 100 replications. In the neighbor-joining analysis, a phylogenetic tree was produced based on the above calculated Kimura two-parameter distance method with gamma correction. Bootstrap analysis was performed with 1000 replications.

Results and discussion

We observed 145 synonymous and 35 non-synonymous substitutions totaling 180 sites scattered across the entire 639-bp downstream region of COI among the 8 species of the *B. tau* complex. The average transition–transversion ratio was 4.490 (range from 1.631–9.483, Table 2). Except for *B. tau* sp. G, strong transition bias was also found. High transition bias was found among *B. tau* spp. C and I. These two tephritid species were morphologically identical, but were found in different host plant species and feeding habitats (Fig. 1). A strong transition bias for nucleotide substitutions of mtDNA sequences between closely related taxa has been repeatedly observed (Brown et al. 1982; DeSalle et al. 1987; Beckenbach et al. 1993). Beckenbach et al. (1993) proposed that transitions are involved in sequence divergence among closely related species because transitions at silent sites reached saturation more quickly than do silent transversions. The majority of transitions (72%) were thymine–cytosine substitutions. The bias in A+T content of the 639-bp downstream segment of COI in the *B. tau* complex was 65% (ranged from 63–68%); it is relatively similar to the *B. dorsalis* complex (66%). However, it is lower than that of other outgroup species along the same segment (69–71%). The biases were much stronger for third-base positions (80%) than for second- (61%) and first-base positions (57%). An A+T bias has been found in most insect mtDNA genes (Lunt et al. 1996; Han and McPherson 1997; Langor and Sperling 1997) and it has been suggested that regions with high A+T content might be useful for studying phylogenetic relationships among insect species in a species complex (Lunt et al. 1996).

Using the Kimura two-parameter method, the mean sequence divergence among the eight species of the *B. tau* complex ranged from 0.6 to 28% and between the

Fig. 1. Map of Thailand showing the collection localities for each of the eight forms of the *B. tau* complex. The symbols representing each locality are as follows: ●, *B. tau* sp. A; ■, *B. tau* sp. B; ◇, *B. tau* sp. C; □, *B. tau* sp. D; ★, *B. tau* sp. E; ▼, *B. tau* sp. F; ▲, *B. tau* sp. G; and ◆, *B. tau* sp. I.

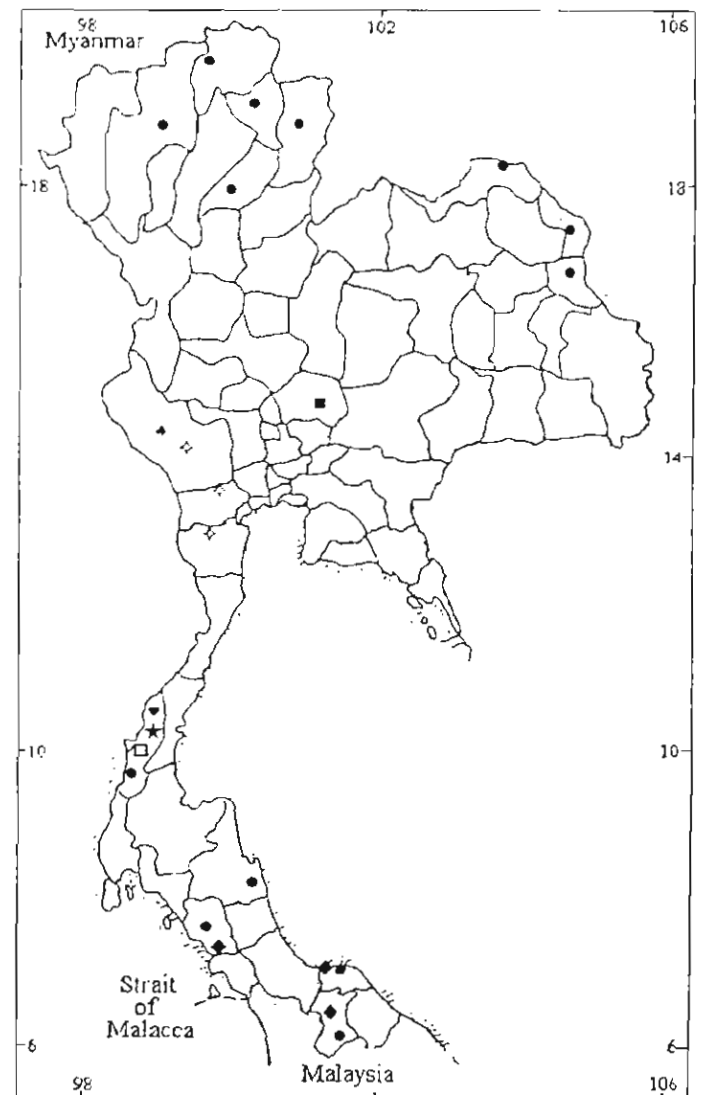
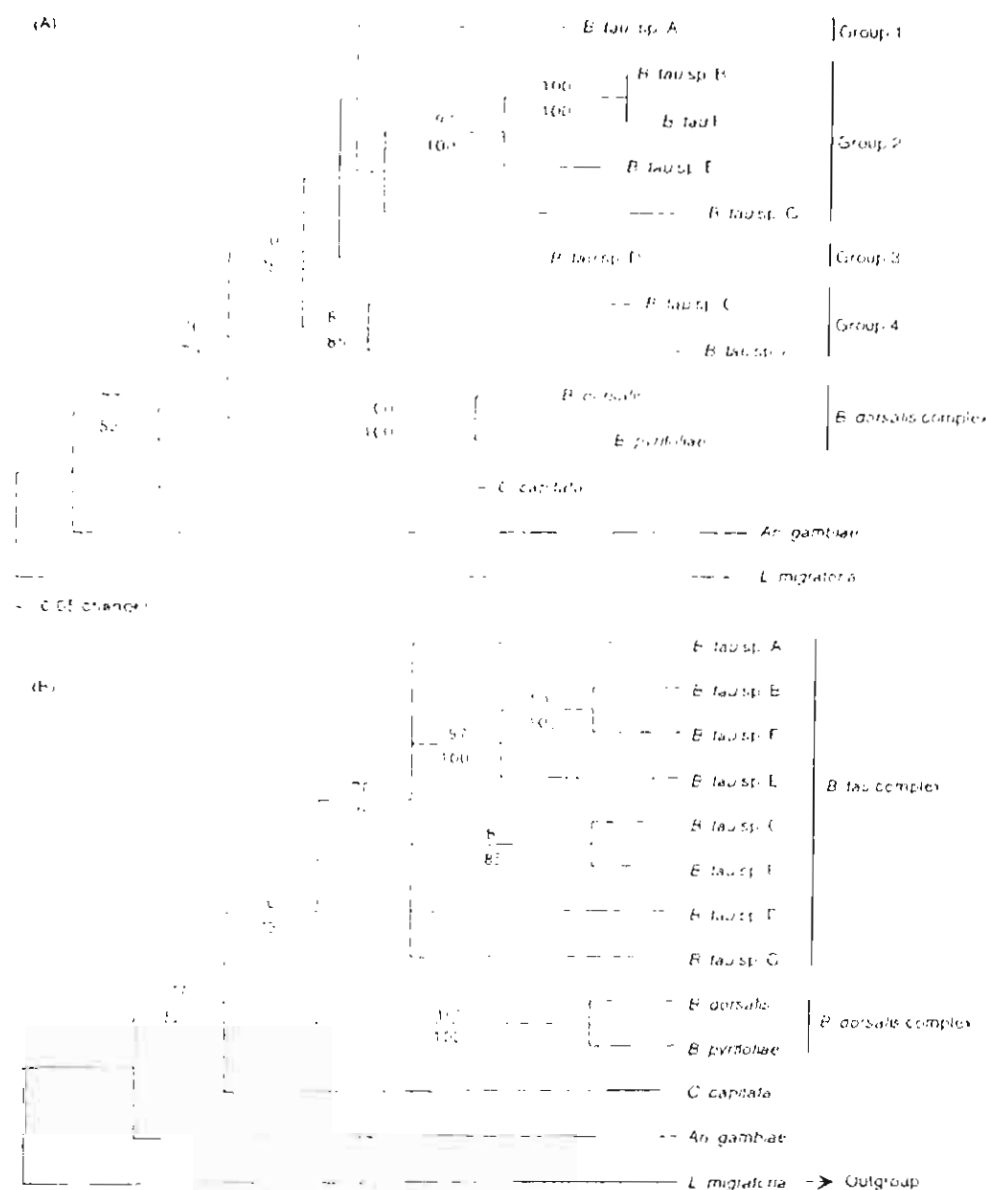


Fig. 2. (A) Maximum parsimony tree based on COI gene sequences showing the relationships between eight members of the *Bactrocera tau* complex. The tree was generated by a heuristic method and was rooted at *L. migratoria*. (B) Same tree topology after collapsing branches with bootstrap values <50. Numbers above and below the branches are bootstrap values calculated by neighbor joining (1000 replicates) and maximum parsimony (1000 replicates), respectively. Two *Bactrocera dorsalis* complex species, *B. dorsalis*, AY053507; *B. pyriferae*, AY053514, Jattinongluk 2001), *Ceratitis capitata* (AJ242872; Spanos et al. 2000), *Anopheles gambiae* (L20934; Beard et al. 1993), and *Locusta migratoria* (X80245; Flock et al. 1995) were used as outgroups.

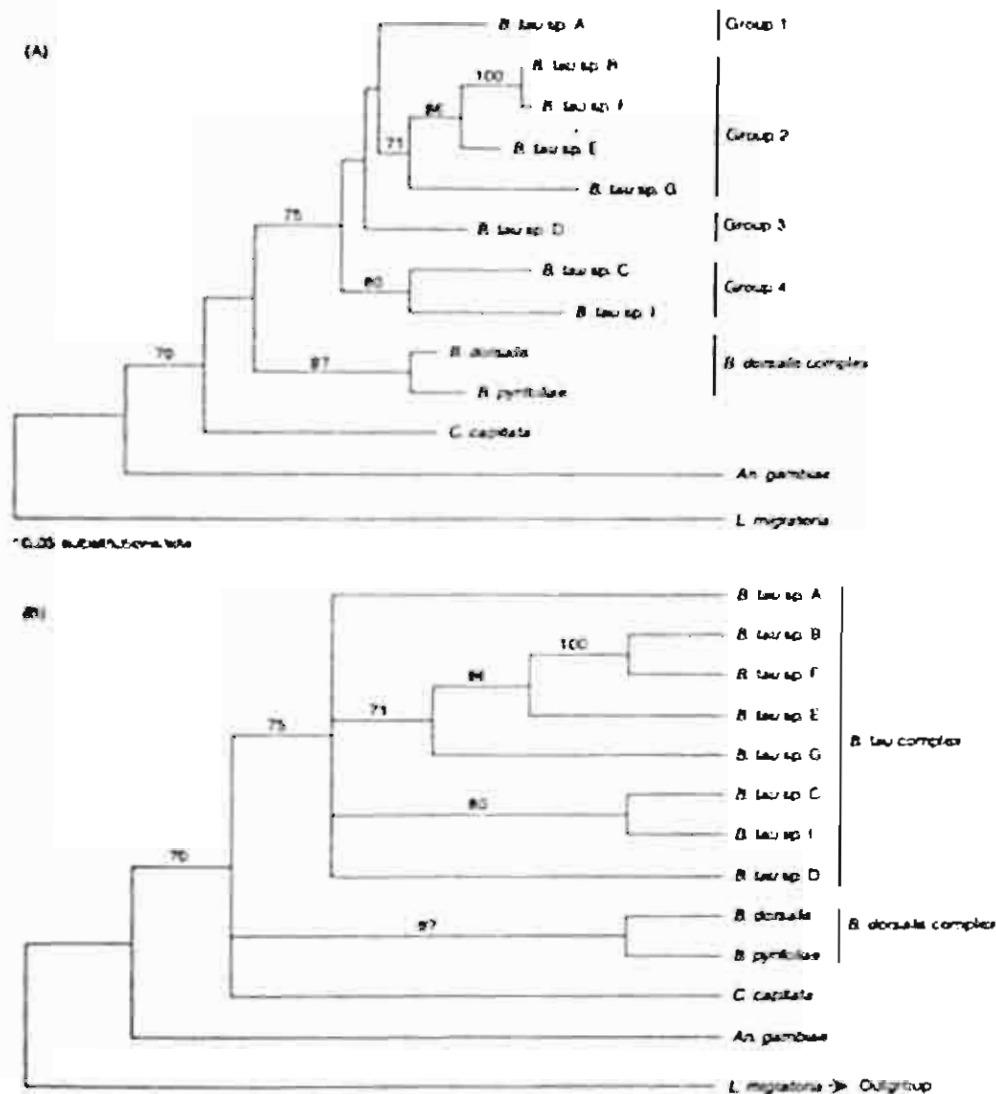


B. dorsalis and *B. tau* complexes it ranged from 19 to 29% (Table 2). Therefore, the saturation of nucleotide sequence might occur. Interspecific sequence divergences for the *B. tau* complex are much higher than for other insects studied thus far (reviewed in Langor and Sperling 1997). High sequence divergence in the *B. tau* complex is in accordance with the results of gel electrophoresis based on 12 loci (Saelec 1999). Moreover, the gel electrophoresis data suggested a low gene flow value ($N_m < 1$) among members of the *B. tau* complex.

Previous studies on the phylogenetic relationships among Tephritidae using the 16S rRNA gene showed no significant

statistical support in the higher classification (Han and McPherson 1997). Based on studies of insect mtDNA, Brower (1994) suggested that the molecular clock could be calibrated to 2.3% pairwise sequence divergence per million years. Using this value, the *B. tau* complex could have arisen some 5 million years ago, which is apparently older than other species complexes that have been studied (Langor and Sperling 1997). Using the same ratio, the possible time that the *B. tau* complex diverged from the closely related tephritid species, *B. dorsalis* complex, and the divergence time between *Bactrocera* and their sister tephritid species, *C. capitata*, could also be estimated. The *B. tau* complex

Fig. 3. (A) Maximum-likelihood tree based on COI gene sequences showing the relationships among eight members of the *Bactrocera tau* complex. The tree was generated by the step-wise addition method using a general time reversible model with consideration of gamma-distributed rate heterogeneity across sites ($-\ln L = 3472.1213$, gamma shape parameter = 0.3482). Trees were rooted with *L. migratoria*. (B) Same tree topology after collapsing branches with bootstrap values <50. Bootstrap values were calculated by maximum likelihood (100 replicates). Two *Bactrocera dorsalis* complex species (*B. dorsalis*, AY053507; *B. pyrifoliae*, AY053514; amongluk 2001), *Ceratitis capitata* (AJ242872; Spanos et al. 2000), *Anopheles gambiae* (L20934; Beard et al. 1993), and *Locusta migratoria* (X80245; Flook et al. 1995) were used as outgroups.



might have diverged from the *B. dorsalis* complex approximately 10.6 million years ago. The phylogenetic tree showed that *B. tau* and *B. dorsalis* shared a common ancestor and might have diverged from *C. capitata* approximately 87 000 years ago. On the other hand, the mtDNA genome of the *B. tau* complex could have evolved at a much faster rate than for other insects. Rapid adaptive radiation of tephritid fruit flies has been proposed by Han and McPherson (1997). Moreover, selective forces like genetic drift might also be involved in the evolutionary divergence of the fruit fly species in the *B. tau* complex.

Phylogenetic trees of the *B. tau* complex generated by maximum likelihood, maximum parsimony, and neighbor-joining analyses showed similar tree topologies. Our data

showed that all eight species of the *B. tau* complex formed a monophyletic grouping with support of at least 70% of 1000 bootstrap replicates, 75% of 1000 bootstrap replicates, and 75% of 100 bootstrap replicates when calculated using the distance and (or) neighbor-joining, maximum parsimony, and maximum likelihood methods, respectively, (Figs. 2 and 3). Phylogenetic relationships among the eight species of the *B. tau* complex clearly exhibited four clades (Figs. 2 and 3). Thus clades 1 and 3 containing species A and D, respectively, form somewhat remote groups among the eight species of the complex. These results are similar to the previously reported cytological data and are identical to the phylogenetic tree calculated from allozyme data of the *B. tau* species complex (Baumai et al. 2000b; SacLee 1999).

- Amnongluk, W. 2001. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* and their *Wolbachia* endosymbionts. Ph.D. thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Amura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Uttayapong, P., Milne, J.R., Tigvattanant, S., and Baimai, V. 2000. Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. *Sci. Asia* 26: 93-103.
- Cumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., and Nei, M. 2001. *MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software*. Bioinformatics, (submitted).
- Angor, D.W., and Sperling, F.A.H. 1997. Mitochondrial DNA sequence divergence in weevils of the *Passodes strabi* complex (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Mol. Biol.* 6: 255-265.
- Li, D.H., Zhang, D.-X., Szymura, J.M., and Hewitt, G.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5: 153-165.
- McPherson, B.A., Smith, D.C., and Berlocher, S.H. 1988. Genetic differences between host races of *Rhagoletis pomonella*. *Nature (London)*, 336: 61-64.
- Mekhongsee, M., Liewvanich, A., and Jirasuratana, M. 1991. Fruit flies in Thailand. In 1st International symposium on fruit flies in the tropics. Edited by S. Vijayaregaram and A.G. Ibrahim. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI), Selangor, Malaysia. pp. 83-98.
- Nei, M., and Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M.E., Karr, T.L., and Robertson, H.M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2699-2702.
- Posada, D., and Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Saelee, A. 1999. Electrophoretic study of *Bactrocera tau* complex (Diptera: Tephritidae) in certain populations in Thailand. M.Sc. thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Spaner, L., Koutroumbas, G., Kotsyfakis, M., and Louis, C. 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 9: 139-144.
- Swofford, D.L. 1999. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 beta 1. Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill.
- Tigvattanant, S. 1986. The importance of *Dacus tau* (Walker) in Thailand. *Kaen Kaset*, 14: 114-118.
- White, I.M., and Elson-Harris, M.M. 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Centre for Agriculture and Biosciences International.
- Wood, T.K., and Keese, M.C. 1990. Host-plant-induced assortative mating in *Echenopa* tree hoppers. *Evolution*, 44: 619-628.
- Yang, Z. 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J. Mol. Evol.* 39: 105-111.

Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene

Wanwisa Jamnongluk¹, Visut Baimai^{1,2} & Pattamaporn Kittayapong^{1,2,*}

¹Center for Vectors and Vector-Borne Diseases, ²Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand; *Author for correspondence: Center for Vectors and Vector-Borne Diseases, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand (Phone: +66-2-201-5935; Fax: +66-2-247-7050; E-mail: grpkt@mahidol.ac.th)

Received 28 December 2001 Accepted 24 October 2002

Key words: *Bactrocera* spp., cytochrome oxidase I gene, mitochondrial DNA, molecular phylogeny

Abstract

Fruit flies of the genus *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) are one of the major economically important insects in Asia and Australia. Little attention has been given to analyses of molecular phylogenetic relationships among *Bactrocera* subgenera. By using mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) sequences, the phylogenetic relationships among four subgenera, *Asiadacus*, *Bactrocera*, *Hemigymnodacus*, and *Zeugodacus*, were investigated. Nucleotide diversity within subgenera ranged from 11.7 to 12.4%, and the net divergence among subgenera ranged from 11.2 to 15.7%. Phylogenetic trees calculated from both maximum parsimony and neighbor-joining phylogenetic analysis methods were highly congruent in terms of tree topologies. Phylogenetic analysis of mitochondrial COI sequences suggests that tephritid fruit fly species, which attack cucurbit plants, that is, *Asiadacus*, *Hemigymnodacus* and *Zeugodacus*, were more closely related to each other than to fruit fly species of the subgenus *Bactrocera*, which attack plants of numerous families. Our data supports previous classification of *Bactrocera* based on morphological characters. However, the phylogenetic tree showed the polyphyletic of fruit flies in subgenus *Zeugodacus*. Possible causes of speciation among fruit flies species in this genus was also discussed.

Introduction

Tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) are widespread in Asia and Australia. Several *Bactrocera* species are serious pests of fruits and vegetables (Allwood et al., 1999). The genus *Bactrocera* is highly diverse and is a large genus with many species still to be described (Drew & Hancock, 2000). At least 28 *Bactrocera* subgenera have been described and these are divided into four groups, namely *Bactrocera*, *Melanodacus*, *Queenslandacus*, and *Zeugodacus* (Drew, 1989). In Southeast Asia, tephritid fruit flies from the *Bactrocera* and *Zeugodacus* groups are dominant groups in terms of the number of species (Allwood et al., 1999) and cause serious reductions in yields and quality of fruits and vegetables in this region (Hardy, 1973). At least 50% of all known species in the *Zeugodacus* group are cucurbit feeders whereas

fruit flies in the *Bactrocera* group infest more diverse host plants (Allwood et al., 1999). Therefore, host plants might be one of the factors that cause species diversity in *Bactrocera* fruit flies.

Four subgenera of *Bactrocera* fruit flies from two groups, namely the subgenus *Bactrocera* from the *Bactrocera* group and the subgenera, *Asiadacus*, *Hemigymnodacus* and *Zeugodacus*, from the *Zeugodacus* group were used in the study. These taxa have been defined on the basis of morphological characters and ecological data. However, genetic data in relation to phylogenetic relationships among these groups are poorly known. Preliminary work on mitotic karyotypes of some species of the genus *Bactrocera* was reported by Hunwattanukul and Baimai (1994). Recently, cytological and allozyme studies of the *Bactrocera dorsalis* and the *Bactrocera tau* complexes have been conducted (Baimai et al., 1995, 2000a,b).

Baimai, Phinchongsakuldit & Trinachartvanit. 1999; Baimai, Sumrandee & Tigvattanant. 1999; Saelee. 1999).

Mitochondrial DNA has become the common molecular marker in phylogenetic analysis and population genetic studies in animals (Boyce, Zwick & Aquadro. 1994; Langor & Sperling. 1997). The advantage of using mitochondrial genes in evolutionary study is that mutations that create new haplotypes are rare. Therefore, two individuals that share the same haplotype are likely to have a common ancestor (Li. 1997). Mitochondrial DNA has also been used in phylogenetic relationship among tephritid fruit fly species but the relationship among higher taxa could not be resolved (Han & McPherson. 1997; Han. 2000). Recently, by using 1.6 kb sequences of mitochondrial DNA, the more resolved phylogenetic relationship among higher taxa of genus *Bactrocera* has been reported (Muraji & Nakahara. 2001).

In this study, we used shorter nucleotide sequence, the 639 bp variable region of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) (Lunt et al., 1996) for construction phylogenetic relationships among the four subgenera of *Bactrocera* fruit flies. Thus, it could reduce calculation time for phylogenetic relationship among higher taxa of the genus *Bactrocera*.

Materials and methods

Fruit fly collection and handling

Fruits and flowers infested with tephritid larvae were collected from nine host plant species in different parts of Thailand (Table 1). The larval specimens were reared to adult in the laboratory at Mahidol University, Bangkok. The adults were allowed to mature, identified and then stored at -70°C until required for molecular analysis.

Template preparation and DNA manipulation

Total DNA was extracted from the ovaries or testes of individual adult flies using the STE boiling method (O'Neill et al., 1992). The ovaries or testes were then homogenized with a sterilized polypropylene pestle in a 1.5 ml microcentrifuge tube filled with 100 μl of STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA). The homogenate was heated at 95°C for 10 min before being centrifuged at 14,000 rpm for 1 min at room temperature.

Partial sequences of the mitochondrial COI gene was amplified from all genomic DNA samples by polymerase chain reaction (PCR) using the forward primer (UEA7) and reverse primer (UEA 10) developed by Lunt et al. (1996).

PCR amplification was done in 20 μl reaction volumes: 12.5 μl dd H_2O , 2 μl 10 $\times$ PCR buffer (Promega), 2 μl 25 mM MgCl_2 , 0.5 μl dNTPs (10 mM each), 0.5 μl 20 μM forward and reverse primers and 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega). Two microliters of supernatant were used as DNA template for the PCR. Thermal cycling consisted of an initial denaturation period of 3 min at 94°C , followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 30 min. Ten microliters of each PCR product was run on a 1% agarose gel to determine the presence and size of amplified DNA.

One microliter of the PCR product was directly ligated into a pGEM-T vector (Promega) in a 10 μl reaction and incubated at 4°C for two nights. Plasmids were isolated using a Qiaprep Plasmid miniprep kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Three independent clones were sequenced from individual tephritid fruit fly specimens. The sequencing of inserts in both directions was carried out on an ABI 377 automated sequencer of a commercial laboratory (Bioservice Unit, NSTDA, Bangkok, Thailand) using T7 and SP6 primers.

Data analysis

A consensus sequence of COI fragments from one specimen of each fruit fly species was constructed by using the SeqMan program (DNASTar, Lasergene). The sequences of the 13 species of *Bactrocera* have been deposited in GenBank. Accession numbers are listed in Table 1.

In addition to mitochondrial COI gene sequences of the 13 *Bactrocera* species, COI sequences of the same region for *Ceratitis capitata*, *Anopheles gambiae*, and *Locusta migratoria* were used in the analysis as outgroups. The sequences were initially aligned using the Crustal algorithm of the MegAlign program (DNASTar, Lasergene) and then adjusted by eye.

Nucleotide and amino acid sequence differences among the 13 species of *Bactrocera* were calculated using MEGA software 2.1 (Kumar et al., 2001). The overall transition-transversion ratio was calculated by the general time reversible method (Yang. 1994) chosen using the modeltest program (Posada &

Table 1. List of *Bactrocera* species used in this study, and their collection locations, and host plants.

Species	Location	Host plant species (Family)	Accession number
<i>B. (B.) correcta</i> sp. A ^a (Hendel)	Ranong	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae) ^b	AF423102
<i>B. (B.) correcta</i> sp. B ^a	Ranong	<i>Syzygium samarangense</i> (Myrtaceae) ^b	AF423104
<i>B. (B.) dorsalis</i> sp. A ^a (Bezzi)	Ranong	<i>Sandoricum koetjape</i> (Meliaceae) ^b	AY053507
<i>B. (B.)</i> sp.	Ranong	<i>Siphonodon celsastrimens</i> (Celastraceae) ^b	AF423112
<i>B. (B.) laurifrons</i> (Hendel)	Chiangmai	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Solanaceae) ^b	AF423103
<i>B. (B.) tuberculata</i> (Bezzi)	Ranong	<i>Careya sphacelata</i> (Barringtoniaceae) ^b	AF423105
<i>B. (A.) modica</i> (Hardy)	Phetchaburi	<i>Diplocystis palmatus</i> (Cucurbitaceae) ^c	AF423106
<i>B. (H.) diversa</i> (Coquillett)	Amnat Charoen	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae) ^c	AF423107
<i>B. (Z.) yasuni</i> sp. A ^a (Hardy)	Kanchanaburi	<i>Lagenaria siceraria</i> (Cucurbitaceae) ^c	AF423108
<i>B. (Z.) yasuni</i> sp. B ^a	Maehongsoth	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> (Cucurbitaceae) ^c	AF423111
<i>B. (Z.) caudata</i> (Fabricius)	Ranong	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae) ^c	AF423109
<i>B. (Z.) caudata</i> (Coquillett)	Chiangmai	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Solanaceae) ^b	AF423110
<i>B. (Z.) tau</i> (Walker)	Kanchanaburi	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae) ^c	AF408067

^a Members of sibling species.^b *Bactrocera* fruit flies collected from fruits.^c *Bactrocera* fruit flies collected from flowers.

Crandall, 1998). The Jukes-Cantor distance method (Jukes & Cantor, 1969) was used to calculate nucleotide sequence differences. The p distance method was used to calculate amino acid sequence differences. Synonymous substitution rates were determined by the MEGA program version 2.1 (Kumar et al., 2001), which employs the Nei and Gojobori method (Nei & Gojobori, 1986).

We conducted a neighbor-joining (NJ) analysis using heuristic searches in the Jukes-Cantor model (Jukes & Cantor, 1969) with gamma parameter of 0.3048 (from previous calculation). Bootstrap analyses were done with 1000 replicates using PAUP, version 4.0 b2 (Swofford, 1999).

The data set was also analyzed by maximum parsimony method using PAUP, version 4.0 b2 (Swofford, 1999). The maximum parsimony tree was reconstructed by heuristic search procedure with TBR swapping and 100 maxtree options. We first performed unweighted parsimony search, only one most parsimonious tree was obtained from the analysis. Then we performed character weighting using the REWEIGHT command with an index = RC option of PAUP*, treating the consensus tree of the unweighted parsimony analysis as the starting tree. Bootstrap support was performed with 1000 replications.

Results and discussion

A total of 639 bp nucleotide sequences of the COI gene among the genus *Bactrocera* were used in the anal-

yses. The overall mean sequence divergence among the 13 species of *Bactrocera* was 13.6%. Between different subgenera, the highest nucleotide sequence divergence was found between *Bactrocera* and *Asiadacus* (15.7%) and the lowest between *Hemigymnodacus* and *Zeugodacus* (11.2%).

Among the 203 variable sites found in this study, only 19 were non-synonymous substitutions while 184 were synonymous substitutions. The overall transition to transversion ratio was 2.037. The nucleotide substitutions were biased toward thymine-cytosine transitions (62.5%). From the analyses, parsimony uninformative and informative characters were 104 and 190, respectively. Like other insects (Langor & Sperling, 1997), the COI gene in *Bactrocera* was most variable at the third position in a codon and least variable in the second position. In the subgenus *Zeugodacus*, only six non-synonymous substitutions out of a total of 122 variable sites were found, whereas 13 non-synonymous substitutions from a total of 149 variable sites were encountered in the subgenus *Bactrocera*.

The A + T content of the 639 bp downstream segment of COI in species of the genus *Bactrocera* was slightly lower (63–68%) than those found in other insects over the same segment, for example, 71% in *L. migratoria* (Flook, Rowell & Gellissen, 1995), 69% in *An. gambiae* (Beard, Hamm & Collins, 1993) and 70% in *C. capitata* (Spanos et al., 2000).

Amino acids varied at 18 locations across the 213 amino acid sequences of the downstream segment of COI among the 13 *Bactrocera* species (Table 2).

Table 2. Amino acid variation among 13 tephritid fly species of the genus *Bactrocera* within a 658 bp segment of COI gene. Vertical numbers at the tops of columns represent the variable nucleotide sites of the *Drosophila melanogaster* COI gene (Lewis, Egan & Kaguni, 1995). The symbol indicates the same amino acid sequence as that in the first row.

Species	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	5	4	4	4	4	5	5	6	5	5	5	6	5	5	5	9	6	6
	5	1	1	1	5	5	6	9	1	4	5	6	1	7	6	6	6	1
	5	4	4	5	5	4	4	6	5	1	6			6	7	5	5	1
<i>B. dorsalis</i> A	S	I	I	V	I	V	C	K	I	I	R	C	V	I	V	P	N	I
<i>B. correcta</i> A																		
<i>B. correcta</i> B	W		Q			C						C					I	
<i>B. latitrons</i>				I				I							I	I		
<i>B. subcinctata</i>											W		I					F
<i>Bactrocera</i> sp.																		F
<i>B. medea</i>		R			M									I				F
<i>B. diversa</i>								I						I				F
<i>B. aseta</i> A									S									F
<i>B. aseta</i> B								I					I	L	I			F
<i>B. condalia</i>								I						L				F
<i>B. cucurbitata</i>																		F
<i>B. tau</i>							1											F

Within the subgenus *Bactrocera*, 12 amino acid variation sites were found, whereas fewer amino acid variation sites (six sites) were found within the *Zeugodacus* subgenus.

A phylogenetic tree of the 13 tephritid fruit fly species representing four subgenera of *Bactrocera* was reconstructed by both neighbor-joining method based on Jukes-Cantor distances and maximum parsimony method. Tree topologies calculated from both methods were identical and revealed the existence of two distinct mitochondrial DNA lineages. The first lineage clade consisted of the subgenera *Zeugodacus*, *Hemigymnodacus* and *Asiadacus*. This clade will be defined here as the *Zeugodacus* group. The second lineage clade consisted of the subgenus *Bactrocera*. Figure 1 shows weighted parsimonious tree with tree length: 244.9, CI: 0.842, RI: 0.736, RC: 0.620.

The divergences of both nucleotide and amino acid sequences within the *Bactrocera* group were higher than those of the *Zeugodacus* group. The nucleotide and amino acid sequence divergences within the *Bactrocera* clade were 12.4 and 2.0%, respectively. In *Zeugodacus*, the nucleotide and amino acid sequence divergences were 11.7 and 1.5%, respectively.

From the phylogenetic analyses, our data support the morphological group classification, *Bactrocera* group (*Bactrocera*) and *Zeugodacus* group (*Zeugodacus* + *Hemigymnodacus* + *Asiadacus*), (Drew &

Hancock, 2000). However, our results disagree with the morphologically based classification in grouping tephritid fruit fly species of the subgenus *Zeugodacus*. The disagreement between morphological classification and molecular phylogeny was also reported previously (Muraji & Nakahara, 2001). With regard to the subgenus *Zeugodacus*, tree topologies calculated from both neighbor-joining and maximum parsimony showed that fruit flies in this subgenus are polyphyletic. *B. tau* and *B. cucurbitata* were clustered in the distinct clade from other fruit flies in the *Zeugodacus* subgenus. This was supported by bootstrap analyses with confidence levels equal to 100%. Unlike *Zeugodacus* subgenus, fruit flies of the *Bactrocera* subgenus were monophyletic with bootstrap support of 97%.

In this study, we found two sibling species of *B. aseta* and *B. correcta*. The sibling species of *B. aseta* s.s. was morphologically identical with the previously described species, *B. aseta* s.s. (sp. A) but was found in different host plants and locations. Therefore, it was designated as *B. aseta* sp. B. The *B. correcta* s.s. (sp. A) was morphologically similar to its sibling species, namely *B. correcta* sp. B and was found in the same host fruit species collected from the same location. An undescribed species, *Bactrocera* sp., was

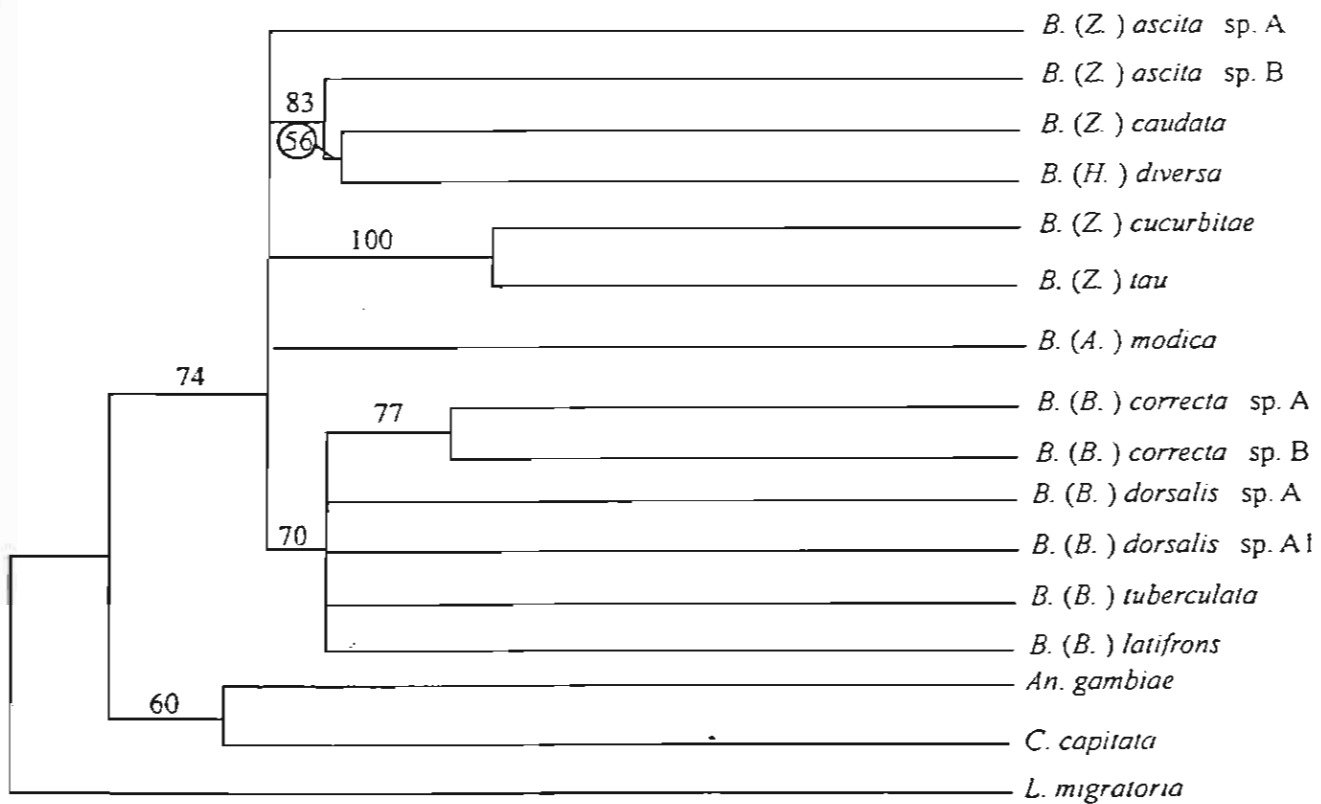
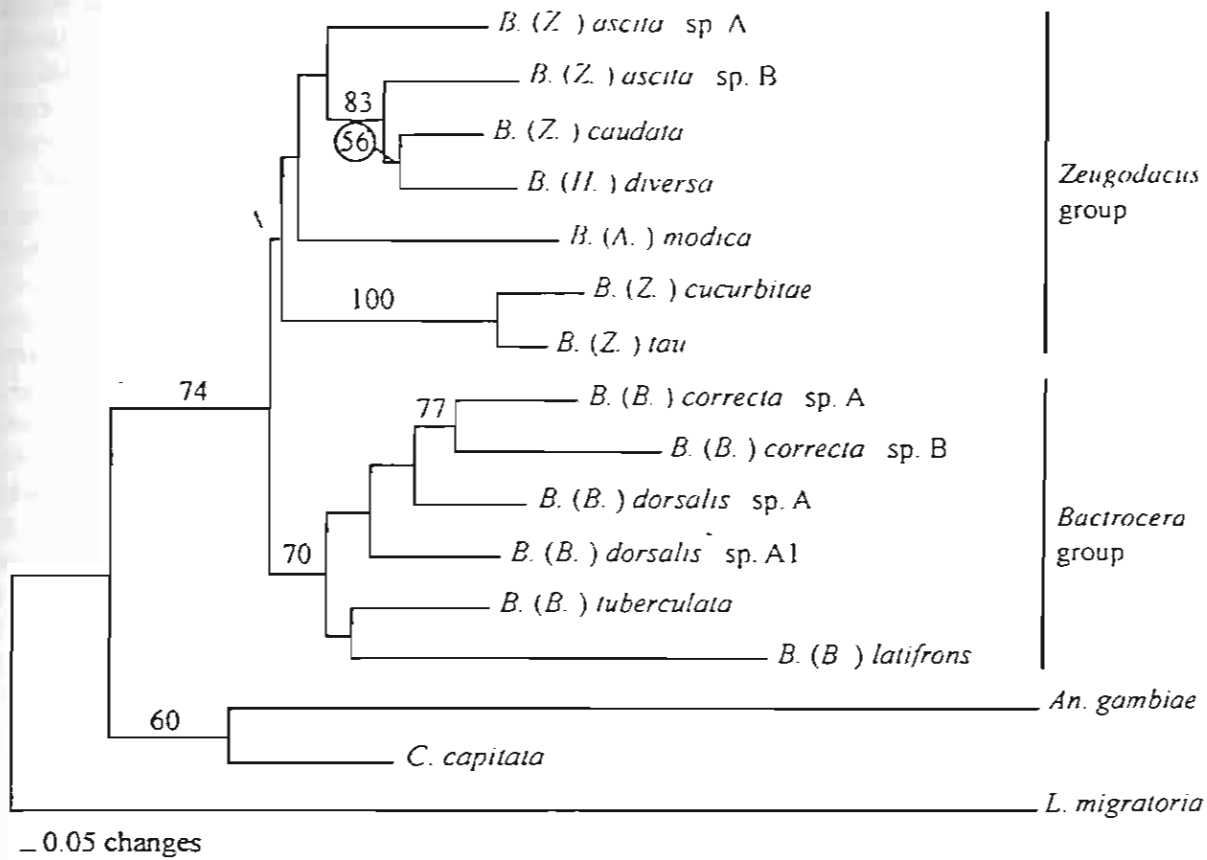


Figure 1. The unrooted most parsimonious tree (tree length: 244.9, CI: 0.842) was generated by reweighing of the result of equally weighted parsimonious analysis. Bootstrap support values of 1000 replications are given on the nodes. *Ceratitis capitata* (AJ242872; Spanos et al., 2000), *Anopheles gambiae* (L20934; Beard, Hamm & Collins, 1993) and *Locusta migratoria* (X80245; Flook, Rowell & Gellisen, 1995) were used as outgroups.

highly specific to both host plant and location. It was found only in *Siphonodon celastrineus* fruit in the southern part of Thailand. Although this insect has not been described as a new species, our data revealed that this species is a member of the subgenus *Bactrocera*.

We have observed associations between plant species and mitochondrial haplotypes of the tephritid fruit flies that infest their fruits and flowers. In the *Zeugodacus* clade, *B. cucurbitae* and *B. tau* were closely related with 100% bootstrap support and they often share the same host plant species. The findings of a close relationship between these two species are supported by both cytological and allozyme data (Baimai et al., 1995; Saelee, 1999). Likewise, close phylogenetic relationships of the two sibling species, *B. ascita* sp. A and *B. ascita* sp. B, seem to be closely associated with host plant species. *B. ascita* sp. A has been found infesting several species of the host plant family Cucurbitaceae, such as *Lagenaria siceraria* and *Luffa cylindrica*, while *B. ascita* sp. B. infests only in flowers of *Trichosanthes tricuspidata* which is also in the family Cucurbitaceae (Kittayapong et al., 2000). However, it is not known if these two fruit flies are reproductively isolated.

Adaptation to host plants might accelerate speciation in *Bactrocera*. The classic example of genetic change caused by host plant adaptation is that of another tephritid species, the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* (Bush, 1969). It has been determined that sympatric host races of *Rhagoletis* are genetically differentiated (Feder, Chilcote & Bush, 1988; McPherson, Smith & Berlocher, 1988).

Reproductive isolation may sometimes be caused by inherited elements that are not conventional genes (Hurst & Pomiankowski, 1991). In this regard, it is interesting to note that one of these inherited elements, namely the bacteria *Wolbachia*, has been recently found in several *Bactrocera* species (Kittayapong et al., 2000). These bacteria are known to cause hybrid inviability in many insect species. *Wolbachia* bacteria occur at least in five orders of insects (O'Neill et al., 1992; Werren, Zhang & Guo, 1995). Infection of a single population produces inviability in only one direction of a cross, but different infections in geographically isolated populations can cause partial or complete reproductive isolation (Hoffmann & Turelli, 1997).

Wolbachia, by causing reproductive isolation between populations, might be a possible speciation agent or accelerate speciation rates among sibling species of the tephritid fruit flies. For example, *Wolbachia*

infection has been reported in *B. ascita* sp. B whereas no infection has been found in *B. ascita* sp. A (Kittayapong et al., 2000). Similarly, *Wolbachia* might also be involved in the speciation process of the two sibling within the *B. correcta* complex. The *B. correcta* sp. A fruit flies have been found infected with *Wolbachia* whereas no *Wolbachia* infection have been found in its sibling species, *B. correcta* sp. B. These two species have been found infesting the same host plant in certain populations (V. Baimai, unpublished data).

In the present study, only 13 species of tephritid fruit flies genus *Bactrocera* were included in the phylogenetic analyses. However, our results can resolve the *Bactrocera* relationships at various taxonomic levels, which might be useful information for further taxonomic classification of genus *Bactrocera*. We also found associations between host plant species and the tephritid flies that infest them. Tephritid fruit flies that infested the same host plant species and lived sympatrically were more closely related than the ones that infested different host plants. Therefore, our data suggests that adaptation to the environmental conditions produced by the host plants might play a role in speciation of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera*. Moreover, infection of tephritid flies by *Wolbachia* bacteria, which can cause cytoplasmic incompatibility, might accelerate speciation rates among *Bactrocera* sibling species as evidenced from the present study. It has been demonstrated that studies on the population biology of tephritids have contributed to a better understanding of speciation and evolutionary processes (Bush, 1975; Feder, Chilcote & Bush, 1988). Thus, the existence of sibling species and closely related taxa of the *Bactrocera* in Thailand and Southeast Asia warrants further molecular study of this group of tephritid fruit flies in this region.

Acknowledgements

We would like to thank John Milne for critically editing the manuscript; and Saen Tigvattananont and Anchalee SaeLee for collecting and identifying insect samples. This work was supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training (BRT 139026) and the Thailand Research Fund (RGJ/PHD/0095/2541, RTA/01/2541, and BGJ/16/2543).

References

- Allwood, A.J., A. Chinajariyawong, S. Kritsaneechai, R.A.I. Drew, E.L. Hamacek, D.L. Hancock, C. Hengsawad, J.C. Jipani, M. Jirasurat, C. Kong Krong, C.T.S. Leong & S. Vijayasegaran, 1999. Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Southeast Asia. *Raffles Bull. Zool. Suppl.* 7: 1-92.
- Baimai, V., W. Trichavarnit, S. Tigvattanont, P.J. Grote, R. Poramacom & U. Kijchalao, 1995. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. I. Five sibling species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Genome* 38: 1015-1022.
- Baimai, V., J. Phinchongsakuldit & W. Trinacharnvanit, 1999. Metaphase karyotypes of fruit flies in Thailand. III. Six members of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Zool. Stud.* 38: 110-118.
- Baimai, V., J. Phinchongsakuldit & S. Tigvattanont, 1999. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. IV. Evidence for six new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia* 64: 371-377.
- Baimai, V., C. Sumrandee, S. Tigvattanont & W. Trinacharnvanit, 2000a. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. IV. Cytotaxonomy of ten additional new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia* 65: 409-417.
- Baimai, V., J. Phinchongsakuldit, C. Sumrandee & S. Tigvattanont, 2000b. Cytological evidence for a complex of species within the taxon *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Biol. J. Linn. Soc.* 69: 399-409.
- Beard, C.B., D.M. Hamm & F.H. Collins, 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.* 2: 103-124.
- Boyce, T.M., M.E. Zwick & C.F. Aquadro, 1994. Mitochondrial DNA in the bark weevils: phylogeny and evolution in the *P. strobi* group. *Mol. Biol. Evol.* 11: 183-194.
- Brower, A.V.Z., 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6491-6495.
- Bush, G.L., 1969. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution* 23: 237-251.
- Bush, G.L., 1975. Modes of animal speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 6: 339-364.
- Drew, R.A.I., 1989. The tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australasian and Oceanian regions. *Mem. Queensl. Museum* 26: 1-521.
- Drew, R.A.I. & D.L. Hancock, 2000. Phylogeny of the tribe Dacini (Dacinae) based on morphological, distributional, and biological data. pp. 491-504 in *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*, edited by M. Aluja & A.L. Norrbom. CRC Press, New York.
- Feder, J.L., C.A. Chilcote & G.L. Bush, 1988. Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature* 336: 61-64.
- Flook, P.K., C.H. Rowell & G. Gellissen, 1995. The sequence, organization and evolution of the *Locusta migratoria* genome. *J. Mol. Evol.* 41: 928-941.
- Han, H. & B.A. McPherson, 1997. Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta: Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Mol. Phylogent. Evol.* 7: 17-32.
- Hardy, D.E., 1973. The fruit flies (Tephritidae - Diptera) of Thailand and bordering countries. *Pac. Insects Monogr.* 31: 1-353.
- Hoffmann, A.A. & M. Turelli, 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. pp. 42-80 in *Influential Passengers. Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*, edited by S.L. O'Neill, A.A. Hoffmann & J.H. Oxford University Press, New York.
- Hunwattanakul, N. & V. Baimai, 1994. Mitotic karyotypes of four species of fruit flies (*Bactrocera*) in Thailand. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 28: 142-148.
- Hurst, L.D. & A. Pomiankowski, 1991. Causes of sex bias may account for unisexual sterility in hybrids: a new explanation of Haldane's rule and related phenomena. *Genetics* 128: 841-858.
- Jukes, T.H. & C.R. Cantor, 1969. Evolution of protein molecules. pp. 21-132 in *Mammalian Protein Metabolism*, edited by H.N. Munro. Academic Press, New York.
- Kitayapong, P., J.R. Milne, S. Tigvattanont & V. Baimai, 2000. Distribution of the reproductive-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. *Sci. Asia* 26: 1-19.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen & M. Nei, 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* (submitted).
- Langor, D.W. & F.A.H. Sperling, 1997. Mitochondrial DNA sequence divergence in weevils of the *Pissodes strobi* species complex (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Mol. Biol.* 6: 255-265.
- Lewis, D.L., C.L. Farr & L.S. Kaguni, 1995. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. *Insect Mol. Biol.* 4: 263-278.
- Li, W.H., 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Lunt, D.H., D.X. Zhang, J.M. Szymura & G.M. Hewitt, 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5: 153-165.
- McPherson, B.A., D.C. Smith & S.H. Berlocher, 1988. Genetic differences between host races of *Rhagoletis pomonella*. *Nature* 336: 61-64.
- Muraji, M. & S. Nakahara, 2001. Phylogenetic relationships among fruit flies, *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae), based on the mitochondrial rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 10: 549-559.
- Nei, M. & T. Gojobori, 1986. Simple methods for estimating the number of synonymous and nonsynonymous substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.
- O'Neill, S.L., R. Giordano, A.M.E. Colbert, T.L. Karr & H.M. Robertson, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2699-2702.
- Posada, D. & K.A. Crandall, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Saelee, A., 1999. Electrophoretic study of *Bactrocera tau* complex (Diptera: Tephritidae) in certain populations in Thailand. Ph.D. Thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Spanos, L., G. Koutroumbas, M. Kotsyfakis & C. Louis, 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 9: 139-144.
- Swofford, D.L., 1999. PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony, version 4.0 beta 1. Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
- Werren, J.H., W. Zhang & L.R. Guo, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*-reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B* 261: 55-63.
- White, I.M. & M.M. Elson-Harris, 1992. *Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics*. Centre for Agriculture and Biosciences International.
- Yang, A., 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J. Mol. Evol.* 39: 105-111.

MOLECULAR EVIDENCE OF *WOLBACHIA* INFECTION IN NATURAL POPULATIONS OF AN ODONATE.

Apisit Thipaksorn², Wanwisa Jamnongluk¹, and Pattamaporn Kittayapong ^{1,2*}

¹ Center for Vectors and Vector-borne Diseases, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

² Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

Running Title: *Wolbachia* infections in an Odonate

Author for Correspondence: Dr. Pattamaporn Kittayapong

Department of Biology, Faculty of Science
Mahidol University, Rama 6 Road
Bangkok 10400, Thailand
Tel.: 66-2-201-5935
Fax: 66-2-247-0079
E-mail: grpkt@mahidol.ac.th

ABSTRACT

Wolbachia are endosymbiotic bacteria that cause reproductive alterations in numerous arthropod species. Using a PCR-based method, we found that, out of 33 odonate species, four species were infected with *Wolbachia*. This finding represents the first record of *Wolbachia* infection in tropical odonates. Identical *wsp* gene sequences were found in the *Wolbachia*-infected common odonate species, *Agriocnemis f. femina*, collected from different locations in Thailand. The infection frequencies in several natural populations suggest that replacement of uninfected populations by *Wolbachia*-infected ones has recently occurred in this damselfly species.

Introduction

Wolbachia comprise a group of α -proteobacteria that infect reproductive tissues of numerous arthropod species. *Wolbachia* are transmitted through the egg cytoplasm and are the cause of several types of reproductive alterations in their arthropod hosts. *Wolbachia* have been associated with post-zygotic cytoplasmic incompatibility (CI) in a wide range of insects [6, 20], parthenogenesis induction (PI) in wasps [23], and feminization in an isopod [22].

By using polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing of the bacterial 16S rDNA genes [6, 20, 22, 23] and *ftsZ* genes [28], it has been found that cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis and feminizing bacteria form a closely related group in *Wolbachia* phylogeny. *Wolbachia* bacteria have been divided into two major groups (designated A and B groups) by *ftsZ* gene sequence differences [28]. Both groups are widespread in insects, based upon synonymous substitution rates. Bacterial 16S rDNA sequence divergence is estimate to be 1-2 % per 50 million years [17, 18].

Wolbachia have been found in over 500 arthropod species [16, 20, 23, 28-31]. Even though most of these hosts are insects, *Wolbachia* have also been found in 88 crustaceans [3, 22, 30], 17 arachnids [5, 29, 30], 2 Chilopoda and 1 Diplopoda [30]. Among insects, *Wolbachia* have been found in all major orders, including Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera and Orthoptera [29].

Odonates are common insects of paddy fields in Thailand. They usually have two or three generations per year and their larval stage is found in stagnant water in and around rice fields [2]. They are important predators of rice pests such as leafhoppers, planthoppers [8], and rice stem borers [17]. In addition, [27] reported 7 species of Odonata larvae found in a paddy as predators of mosquito larvae. Using a normal PCR method, three neotropical dragonflies were tested for *Wolbachia* infection; however, none of them were found positive [29, 30]. Recently, the long PCR method has been used to improve the detection of *Wolbachia* infection [15]. Based on the long PCR method, a single odonate species, *Perithemis tenera*, has been found positive with *Wolbachia*. However, there has been no published report of a systematic survey for *Wolbachia* in the order Odonata collected from a tropical region.

The purpose of our study is to investigate the presence and distribution of *Wolbachia* among the tropical odonates collected from rice fields in Thailand using a polymerase chain reaction (PCR) amplification of the *Wolbachia wsp* protein-coding gene. Relationships of *Wolbachia* strains found in tropical odonates were also determined based on *wsp* nucleotide sequence data.

Materials and Methods

Specimen collection and handling

Adult odonates were collected using a simple sweep net from rice fields in 36 provinces representing the four major regions of Thailand. Collections were carried out during the month of October in 1998, 1999 and 2000. Live odonates were fixed at -78°C in a foam box filled with dry ice and transported to the laboratory at Mahidol University in Bangkok for further analysis. Odonate specimens were identified to species by using morphological keys [1, 7, 9, 10, 11]. After identification, the specimens were temporarily kept in a -20°C freezer until DNA was extracted.

DNA extraction and polymerase chain reaction

Individual insect specimens were dissected for ovaries or testes using a sterile technique. The DNA extraction method followed O'Neill et al. [20], insect gonads were ground in 100 µl of STE buffer (100 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0). The homogenate was heated at 95°C for 10 minutes. One microliter of supernatant was used in polymerase chain reactions.

Polymerase chain reactions were performed in 20 µl reaction volumes containing 2 µl of 10X buffer (Promega), 2 µl of 25 mM MgCl₂, 0.5 µl of dNTPs (10 mM each), 0.5 µl of forward and reverse *wsp* primers [32] and 1 unit of *Taq* DNA polymerase. The thermal profile for DNA amplification was: 95°C for 1 min., 55°C for 1 min., and 72°C for 1 min. per cycle for a total of 35 cycles. If the samples were negative with *wsp* primers, DNA was then amplified using a long PCR procedure with *wspL* primers following the methods of Jeyaprakash and Hoy [15]. DNA samples that failed to amplify using both methods were then amplified again using 12S DNA primer [20] to check for the quality of DNA extraction. Ten microliters of each PCR product was run on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under a UV transilluminator. DNA extracts of *Wolbachia*-infected *Aedes albopictus* were used as positive controls.

Cloning and sequencing

For cloning, PCR products were incubated for an additional time of 90 minutes at 72°C after 35 cycles of amplification. One microliter of PCR product was then directly ligated into a pGEM-T vector (Promega) in a 10 µl reaction for 2 nights at 4°C. Three independent clones were sequenced for each of three *Wolbachia* strains in order to make sure that there was no polymerase error. Plasmids were purified using a High Pure Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim). Sequencing was carried out on an ABI automated sequencer. Both strands of the plasmids were fully sequenced using T7 and SP6 primers.

Sequence alignment and phylogenetic analysis

Wolbachia DNA sequences from *A. f. femina* were aligned together with 22 previously published *Wolbachia* strains [32] using a clustal algorithm followed by manual modifications based on the amino acid translation of different genes. The third hypervariable region of the gene (position 519-559) [4] was excluded because no accurate alignment could be made. *Wolbachia* *wsp* sequences from tropical odonates are deposited under the accession numbers XXXX-XXXX (please add). The data set was analyzed by maximum parsimony, maximum likelihood and neighbor-joining methods using PAUP 4.0 b1 [24] and Modeltest 2.0 [21]. For maximum parsimony analysis, heuristic searches were done, gaps were treated as missing data and bootstrap analysis was done with 1,000 replications. For maximum likelihood analysis, we performed step-wise addition using a general time reversible model with consideration of a gamma-distributed rate of heterogeneity across sites. Bootstrap analysis was conducted with 100 replications. A neighbor-joining tree was generated using a general time-reversible DNA/RNA distance approach and bootstrap analysis was done with 1,000 replications. Trees were unrooted. Nucleotide substitution rates were determined using Kimura two-parameter distances (K) in PAUP 4.0 b1 [24].

Results and Discussion

A total of 427 odonate individuals from 19 genera and 33 species (17 species of Zygoptera and 16 species of Anisoptera) were screened for *Wolbachia* by both regular and long PCR assay using *Wolbachia*-specific *wsp* gene primers. The infection status of each odonate species tested and the number of individuals screened are listed in Table 1. Four odonate species, *Agriocnemis f. femina*, *Pseudagrion pruinosum* (Zygoptera), *Brachythemis contaminata*, *Neurothemis t. tullia* (Anisoptera), were found to be infected with *Wolbachia*. The percentage of *Wolbachia* infection among species of the Order Odonata was 12.12 % (4/33) which is very low. Based on the data presented here, it appears that *Wolbachia* is not widespread in the Odonate species that we tested. Only four odonate species, i.e., two zygopteran and two anisopteran species, were found infected with *Wolbachia*. In the common odonate species, *Agriocnemis f. femina*, a total of 69 individuals of this infected species were tested and six samples (8.7%) from three provinces were found positive (Table 2). Infection rates were 100% (2/2) in Chaityaphum, 25% (1/4) in Nakornratsima and 21.4% (3/14) in Suphanburi. In the common odonate species, *A. f. femina*, low infection rate was also found. Only 8.7% of tested individuals were infected. However, when only infected populations are considered, more than 20% of individuals were found infected. Of the other three infected species, only a single individual from each species was infected with *Wolbachia*.

Low *Wolbachia* densities in insect individuals may have caused false negatives and have led to low *Wolbachia* infection frequencies being recorded for Odonate species. A survey of *Wolbachia* using the long PCR method indicated that 76% of 62 tested arthropod species were infected [15], which is considerably higher than that previously reported using the standard PCR technique [28]. From our study, long PCR method was found to be more sensitive for amplifying *Wolbachia* DNA in odonates and could give positive amplification in insect samples originally found negative for *Wolbachia* using standard PCR.

A phylogenetic analysis of *Wolbachia* strains found in infected odonates with nine, including the strain from the odonate, *Perithemis tenera*, and two previously published A group *Wolbachia* strains [15, 32] was conducted. All procedures used for phylogenetic reconstruction (maximum parsimony, maximum likelihood and neighbor-joining methods) place all odonate *Wolbachia* strains in a monophyletic group with those of B group *Wolbachia* with bootstrap values of 100 (from maximum likelihood and neighbor-

joining analysis). Figure 1 shows the phylogenetic tree obtained using the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates. The *Wolbachia* strains found in the four rice field odonate species were in the Con and Pip subgroups. The *wsp* gene sequences of *A. f. femina* and *B. contaminata* were in the Pip subgroup with 100% of sequences similar to those of *Cx. quinquefasciatus* while the *wsp* gene sequences of *N. t. tullia* and *P. prunosum* were identical and in the same subgroup as those of *Perithemis tenera*, i.e., Con, with bootstrap support of 97% for the maximum likelihood and 94% for the neighbor-joining analyses (Figure 1).

The low *Wolbachia* infection frequencies and identical *wsp* gene sequences in related odonate species that are not closely related suggest that *Wolbachia* might have recently invaded rice field odonate populations through some means of horizontal transmission. Several studies have shown that *Wolbachia* may have transferred from a single host species to unrelated uninfected host species [12, 26, 29]. Identical *wsp* gene sequences were found from all three positive populations of *A. f. femina* collected from different regions of Thailand. This finding supports the hypothesis that *Wolbachia*-infected damselflies spread into uninfected populations. Further study should be done to investigate the rates at which *Wolbachia*-infected damselflies could spread into uninfected populations. Because damselflies are one of the major predators of rice pests, an understanding of the spreading mechanism of *Wolbachia*-infected damselflies might be useful for future use of infected damselflies as a biological control agent of rice pests.

Acknowledgements

We would like to thank Mr. Monphob Triphob, Mr. Worawit Uamcharoen and Mr. Kitt Theinthong for their help in collecting specimens around Thailand. We also thank Mrs. Samnieng Thienthong and Miss Natchaya Klinpikul for their help in PCR and cloning methods. We are also indebted to Bro. Amnuay Pinratana for loaning odonate references and specimens, to Dr. John R. Milne for reading the manuscript and his comments and to Dr. Chalerm Sindhusake for guidance in field sampled. This work was supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training (BRT 139026).

References

1. Asahina S (1976) An illustrated key to the dragonflies found in the paddy field in Thailand. IABCR-NEWS. 4: 3-10.
2. Asahina S, Wongsiri T, Nagatomi A (1972) The paddy field Odonata taken at Bangkok, Bangkok. Mushi. 46(8): 107-109.
3. Bouchon D, Rigaud T, Juchault T (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. Proc R Soc Lond B 265: 1081-1090.
4. Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. J Bacteriol 180: 2373-2378.
5. Breeuwer JAJ (1997) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. Heredity 79: 41-47.
6. Breeuwer JAJ, Stouthamer R, Burns DA, Pelletier DA, Weisburg WG, Werren JH (1992) Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16s ribosomal DNA sequences. Insect Mol Biol 1: 25-36.
7. Chanthachume K (1979). Survey of dragonfly from certain parts of Thailand. M.S.thesis, Mahidol Univ., Bangkok.
8. Che Salmah MR, Hassan STS, Ali A, Abu Hassan A (1999) Life history of *Neurothemis tullia* (Drury) in a tropical rainfed rice field (Anisoptera: Libellulidae). Odonatologica 28(1): 1-11.
9. Eak-Amnuay P (1982). Taxonomy of the family Libellulidae in the central area of Thailand. M.S. thesis, Kasetsart Univ., Bangkok.
10. Fraser FC (1933) The fauna of British India including Ceylon and Burma: Odonata, Vol. 1. Taylor & Francis, London.
11. Fraser FC (1936) The fauna of British India including Ceylon and Burma: Odonata, Vol. 3. Taylor & Francis, London.
12. Heath MD, Butcher RDJ, Whitfield WGF, Hubbard SF (1999) Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by naturally occurring mechanism. Cur Biol 9: 313-316.

13. Holden PR, Brookfield JFY, Jones P (1993) Cloning and characterization of an *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 240(2): 213-220.
14. Hoshizaki S, Shimada T (1995) PCR-based detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in population of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in central Japan: has the distribution of *Wolbachia* spread recently?. *Insect Mol Biol* 4(4): 237-243.
15. Jeyaprakash A, Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* 9(4): 393-405.
16. Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V, O'Neill SL (2000) Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Ent* 37(3): 340-345.
17. Li CS (1970) Some aspects of the conservation of natural enemies of rice stem borers and the feasibility of harmonizing chemical and biological control of these pests in Australia. *Mushi* 44(3): 15-23.
18. Moran N, Baumann P (1994) Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. *Trends Ecol Evol* 9(1): 15-20.
19. Ochman H, Wilson AC (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* 26(1-2): 74-86.
20. O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM (1992). 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2699-2702.
21. Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
22. Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M. (1992) *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond B* 250: 91-98.
23. Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Luck RF, Werren JH (1993) Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature Lond* 361: 66-68.
24. Swofford DL (2000) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

25. Turelli M, Hoffmann AA (1995) Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics* 140: 1319-1338.
26. Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Bouletreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16(12): 1711-1723.
27. Watanabe M, Wada Y, Itano K, Suguri S (1968) Studies on predators of larvae of *Culex tritaeniorhynchus summosus* Dyar. *Jap J Sanit Zool* 19(1): 35-38.
28. Werren JH, Jaenike J (1995a) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity* 75: 320-326.
29. Werren JH, Windsor D, Guo LR (1995b) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc R Soc Lond B* 262: 197-204.
30. Werren JH, Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. *Proc R Soc Lond B* 267: 1277-1285.
31. West SA, Cook JM, Werren JH, Godfray HCJ (1998) *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol Ecol* 7: 1457-1465.
32. Zhou W, Rousset F, O'Neill SL (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B* 265: 509-515.

Table 1. Results of PCR-screening for *Wolbachia* using specific *wsp* primers in Odonates sampled from different regions of Thailand.

Taxon	No.	Standard	Long PCR	Infection
	tested	PCR		status
Zygoptera				
<i>Aciagrion occidentale</i> Laidlaw	2	-	-	-
<i>Agriocnemis clauseni</i> Fraser	1	-	-	-
<i>Agriocnemis f. femina</i> (Brauer)	69	6	6 (B)	6 (B)
<i>Agriocnemis minima</i> Selys	5	-	-	-
<i>Agriocnemis nana</i> (Laidlaw)	1	-	-	-
<i>Agriocnemis pygmaea</i> (Rambur)	235	-	-	-
<i>Ceriagrion a. auranticum</i> Fraser	3	-	-	-
<i>Ceriagrion azureum</i> (Selys)	3	-	-	-
<i>Ceriagrion cerinorubellum</i> (Brauer)	6	-	-	-
<i>Ceriagrion indochinense</i> Asahina	9	-	-	-
<i>Ceriagrion o. olivaceum</i> Laidlaw	2	-	-	-
<i>Enallagma cyathigerum</i> (Charpentier)	3	-	-	-
<i>Enallagma parvum</i> Selys	4	-	-	-
<i>Ischnura a. aurora</i> (Brauer)	10	-	-	-
<i>Ischnura senegalensis</i> (Rambur)	2	-	-	-
<i>Pseudagrion microcephalum</i> (Rambur)	2	-	-	-
<i>Pseudagrion pruinatum</i> (Burmeister)	3	-	1 (B)	1 (B)
Anisoptera				
<i>Acisoma p. panorpoides</i> Rambur	2	-	-	-
<i>Aethriamanta aethra</i> Ris	4	-	-	-
<i>Brachydiplax c. chalybea</i> Brauer	2	-	-	-
<i>Brachythemis contaminata</i> (Fabricius)	4	-	1 (B)	1 (B)
<i>Crocothemis s. servilia</i> (Drury)	7	-	-	-
<i>Diplacodes nebulosa</i> (Fabricius)	2	-	-	-
<i>Diplacodes trivialis</i> (Rambur)	14	-	-	-
<i>Neurothemis fluctuans</i> (Fabricius)	1	-	-	-
<i>Neurothemis intermedia atalanta</i> Ris	1	-	-	-
<i>Neurothemis t. tullia</i> (Drury)	16	-	1 (B)	1 (B)
<i>Orthetrum s. sabina</i> (Drury)	2	-	-	-
<i>Pantala flavescens</i> (Fabricius)	1	-	-	-
<i>Rhyothemis p. phyllis</i> (Sulzer)	2	-	-	-
<i>Tholymis tillarga</i> (Fabricius)	1	-	-	-
<i>Trithemis aurora</i> (Burmeister)	3	-	-	-
<i>Urothemis s. signata</i> (Rambur)	5	-	-	-

Table 2. Infection rates of *Wolbachia* in different infected populations of *A. f. femina*.

Province (Region)	No. tested	No. PCR-positive	Infection rate
North			
Chiangmai	4	0	0
Phayao	2	0	0
Phrae	2	0	0
Northeast			
Chaiyaphum	2	2	100%
Nakhonratchasima	4	1	25%
Roi-et	6	0	0
Surin	7	0	0
Ubonratchathani	3	0	0
Yasothon	1	0	0
Central			
Chainat	2	0	0
Pathumthani	8	0	0
Suphanburi	14	3	21.4%
South			
Chumphon	2	0	0
Nakhonsrithammarat	5	0	0
Pattani	5	0	0
Suratthani	2	0	0
Total	69	6	8.7

Figure 1. A phylogenetic tree of *Wolbachia* based on *wsp* gene sequences that includes *Wolbachia* strains from odonates. The tree was generated using the neighbor-joining method. The tree was midpoint rooted. Bootstrap values of 1,000 replicates are presented above the branch (bootstrap scores less than 50 are not shown). Sequences are identified by the host species from which they were isolated.

Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera dorsalis* complex using the mitochondrial COI sequences.

Wanwisa Jamnongluk, Pattamaporn Kittayapong *, and Visut Baimai

Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University
Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

Keywords: *Bactrocera dorsalis*, cytochrome oxidase I, complex species, mitochondrial DNA, phylogeny

Running Title: Phylogeny of the *Bactrocera dorsalis* complex

Author for Correspondence: Dr. Pattamaporn Kittayapong
Department of Biology, Faculty of Science
Mahidol University, Rama 6 Road
Bangkok 10400, Thailand
Tel.: 66-2-201-5254
Fax.: 66-2-247-0079
E-mail: grpkt@mahidol.ac.th

Abstract

The *Bactrocera* (*Bactrocera*) *dorsalis* complex consists of more than 50 species whose evolutionary relationships are poorly known. We analyzed 638 coding nucleotides downstream from the mitochondrial gene encoding subunit I of cytochrome oxidase (COI) in ten species of the *B. dorsalis* complex and five outgroups, *B. (Zeugodacus) tau*, *Ceratitis capitata*, *Anopheles gambiae*, *Compsomyiops callipes*, and *Locusta migratoria*. Based on Kimura-2 parameter method, sequence divergence between the fruit flies of this species complex ranged from 0.6 to 16.2%. As in other insects, A+T content and transition bias in the *B. dorsalis* complex were high. However, amino acid sequence divergence within the species complex was low. According to the phylogenetic relationships, these members of the *B. dorsalis* complex could be classified into three clades. Except for *B. dorsalis* sp. A, *B. dorsalis* sp. O and *B. carambolae*, the phylogenetic relationships among fruit fly species in the *B. dorsalis* complex are concordance with mitotic chromosome data. Possible causes of speciation among fruit flies species in this species complex was also discussed.

Introduction

The fruit flies of the genus *Bactrocera* belonging to the subfamily Dacinae (Diptera: Tephritidae) are widely distributed in subtropical and tropical forests of Southeast Asia, Australia, and the Pacific region. A total of 234 species have been recognized and formally described in this genus (Hardy and Adachi, 1954, Hardy, 1973, Drew 1989, Drew and Hancock, 1994). Among the fruit flies of Southeast Asia and Australia, the *B. dorsalis* group has received close attention because of its species diversity, cryptic species problems and the economic importance of several member species (White and Elson-Harris, 1992). Based on morphological and geographical distributions, the *B. dorsalis* complex consists of at least 40 fruit flies species (Drew, 1989). Cytologically, Baimai and coworkers have described mitotic karyotypes of 27 species of the *B. dorsalis* complex (Baimai *et al.*, 1995, 1999 a, b, 2000).

Mitochondrial DNA (mtDNA) has become the common molecular marker in phylogenetic and population genetic studies in animals. The advantage of using mitochondrial genes in evolutionary studies is that their DNA represents a lineage of historical events that can reflect species differences since mitochondria are vertically transmitted without recombination (Strickberger, 2000). In this regard, the region of COI gene was a good candidate for constructing the phylogenetic relationships in species complex or sibling species (Lunt *et al.*, 1996).

The appearance and radiation of the angiosperms has been hypothesized to accelerate the evolution of several herbivorous insect orders including Diptera (Strong *et al.*, 1984). From previous phylogenetic study of tephritid fruit flies, rapid evolution of this fruit fly group was suggested (Han and McPherson, 1997). In the present study, the mtDNA was used to determine the phylogenetic relationships of ten species of the *B. dorsalis* complex using the variable region (638 bp) of the mitochondrial gene

encoding subunit I of cytochrome oxidase (COI). The effect of host plant on the *B. dorsalis* fruit fly species diversity has also been investigated.

Materials and methods

The specimens

The ten species of the *B. dorsalis* complex were collected from naturally infested fruits from different parts of Thailand (Table 1). The larval specimens were reared to adult in the laboratory at Mahidol University, Bangkok. The adults were allowed to mature, identified and then stored at -70°C until required for molecular analysis.

Template preparation and DNA manipulations

Total DNA was extracted from the ovaries or testes of individual adult flies using the STE boiling method (O'Neill et al., 1992). The ovaries or testes were then homogenized with a sterilized polypropylene pestle in a 1.5 μl microcentrifuge tube filled with 100 μl of STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM TrisCl pH 8.0, 1 mM EDTA). The homogenate was heated at 95°C for 10 min before being centrifuged at 14,000 rpm for 1 min at room temperature.

Partial sequences of mitochondrial COI gene were amplified from all genomic DNA samples by polymerase chain reaction using sense primer (UEA 7; 5'-TAC AGT TGG AAT AGA CGT TGA TAC-3') and antisense primer (UEA 10; 5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3') developed by Lunt et al. (1996). PCR amplification was done in 20 μl reaction volumes: 12.5 μl dd H_2O , 2 μl 10X PCR buffer (Promega), 2 μl 25 mM MgCl_2 , 0.5 μl dNTPs (10 mM each), 0.5 μl 20 μM of both primers and 1 units of Taq DNA polymerase (Promega). Thermal cycling used an initial denaturation period of 3 min at 94°C , followed by 35 cycles of 94°C for 1 min., 50°C for 1 min. and 72°C for 1 min. and final extension step at 72°C for 30

min. Ten microliters of PCR product was run on a 1% agarose gel to determine the presence and size of amplified DNA.

One microliter of the PCR product was directly ligated into pGEM-T vector (Promega) in a 10 µl reaction and incubated at 4 °C for 2 nights. Plasmids were isolated using Qiaprep Plasmid miniprep kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendation. At least three independent clones were sequenced from each tephritid fruit fly specimens. The sequencing of inserts in both directions was carried out using T7 and SP6 primers on an ABI 377 automated sequencer (Bioservice Unit, NSTDA). Consensus sequences of COI fragments from each fruit fly specimens were constructed and used for later analyses. The sequences for the ten species of the *B. dorsalis* complex were deposited in GenBank. The accession numbers are listed in Table 1.

Data analysis

The nucleotide sequence differences among ten species of the *B. dorsalis* complex were calculated using MEGA software version 2.0 (Kumar et al., 2001). Kimura-2-parameter distance methods (Kimura, 1980) were used to calculate nucleotide sequence differences. The overall transition-transversion ratio was calculated by general time reversible method (Yang, 1994) chosen by Modeltest program (Posada and Crandall, 1998). Synonymous substitution rate was determined by the MEGA program version 2.0 (Kumar et al., 2001), which employed Modified Nei and Gojobori (Nei and Gojobori, 1986).

In addition to the ten species of the *B. dorsalis* complex, mitochondrial COI gene sequence of the same region from *B. tau* s.s., *Ceratitis capitata*, *Anopheles gambiae*, *Compsomyiops callipes* and *Locusta migratoria* were used in the analysis as outgroups. The sequences were initially aligned using the clustal algorithm and then

adjusted by eye. The data set was analyzed by maximum parsimony (Fitch, 1971), neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) and maximum likelihood (Felsenstein, 1981) using PAUP 4.0 b1 (Swofford, 2000). The maximum parsimony trees were reconstructed by heuristic search and bootstrap test was performed with 1,000 replicates. The characters were weighted equally. The neighbor-joining tree was reconstructed by heuristic search using the Kimura-2-parameters model (Kimura, 1980) and bootstrap analyses were performed with 1,000 replicates. For maximum likelihood tree, the initial tree searching and model fitting were calculated using Modeltest 2.0 (Posada and Crandall, 1998). The estimated rates for six nucleotide substitution types, nucleotide frequencies and the proportion of invariable sites were used in the later analyses. Rates of substitution at variable sites were assumed to follow a gamma distribution of four rate categories, with the average rate for each category represented by the mean. The shape parameter of gamma distribution was set to 0.4396 from the previous calculation. The likelihood model is a general time-reversible (Yang, 1994) with rate heterogeneity. Heuristic search was conducted with step-wise addition method using the model parameters mentioned previously. Bootstrap test was performed with 500 replicates.

Results

From 638 bp, downstream region of COI gene, the average nucleotide divergence in the *B. dorsalis* complex ranged from 0.6% to 16.2%. Among 90 variable sites found in the *B. dorsalis* complex, 15 were non-synonymous substitutions and 75 were synonymous substitutions. Transition to transversion ratios ranged from 0 to 9.56. The majority (67.14 %) of transitions were thymine-cytosine substitutions, while most of transversions were adenine-thymine (41.94 %) and

adenine-cytosine (45.16 %). The third and second codon positions were biased towards adenine and thymine (81.3 % and 80.3 %, respectively).

There was variation in amino acids at 15 locations across the 213 COI amino acid sequences downstream (Table 2). From the total 15 locations of amino acid variation, *B. arecae* and *B. dorsalis* sp. L had the highest amino acid divergence complex with ten amino acid differences compared with other species of the *B. dorsalis* complex used in this study.

We reconstructed a phylogenetic tree for ten species of the *B. dorsalis* complex together with five outgroup species including *B. tau* s.s. Tree topologies calculated from three phylogenetic analysis methods, neighbor-joining, maximum likelihood and maximum parsimony were similar. Figure 1 shows the maximum likelihood tree based on General time reversible model with gamma shape parameter = 0.44. Its reliability was assessed with 500 replications of the bootstrap algorithm. The fruit flies of the *B. dorsalis* complex clustered together with 99% bootstrap support when calculated using maximum likelihood and neighbor-joining methods and 100% bootstrap support when calculated using maximum parsimony method. Within the *B. dorsalis* complex, the phylogenetic tree represents three distinct clades. First, the clade consisting of *B. pyrifoliae* and *B. dorsalis* sp. L showed bootstrap support of 100% when calculated using all three methods. The sequence divergence between these two species was 1.1% (7 bp difference). Second, the clade consists of seven species, *B. dorsalis* s.s. (sp. A), *B. dorsalis* sp. D, *B. dorsalis* sp. J, *B. dorsalis* sp. O, *B. kanchanaburi*, *B. carambolae*, and *B. raiensis*, with bootstrap support of at least 82%. In this clade, the sequence divergences were ranged from 0.6 % (4 bp difference) to 1.8% (11 bp difference). The third clade has only one species in this

study, i.e., *B. arecae*, which represents the oldest lineage within this species complex, with 12.7% - 16.2% divergence from the other species.

Using the same model, the neighbor-joining trees were also reconstructed based on either transition or transversion sites. Some branching orders in the neighbor-joining tree using only transition sites (Ti-NJ) were not compatible with those using only transversion sites (Tv-NJ). In the Ti-NJ tree, *B. dorsalis* sp. L and *B. pyrifoliae* formed a monophyletic clade, but it is not so in the Tv-NJ tree (tree not shown).

Discussion

Tephritid fruit flies of the genus *Bactrocera* have been considered a large group of species diversity with economical importance (Drew, 1989, Hardy, 1973, Hardy and Adachi, 1954). Of these, the *B. dorsalis* complex represents a good candidate for study of species complexity. Morphological identification of the fruit flies belonging to the *B. dorsalis* complex has been problematic for taxonomists (White and Elson-Harris, 1994). We used 638 bp of the downstream COI gene to infer the phylogenetic relationships among ten species of the *B. dorsalis* complex. According to our phylogenetic tree, the ten species of the *B. dorsalis* complex are monophyletic and it is related to *B. tau* s.s. more than other outgroups. High nucleotide sequence divergence was found among members of the *B. dorsalis* complex similar to those in the *B. tau* complex (Jamnongluk *et al*, 2002).

Like other closely related species groups, the nucleotide sequence substitution of COI gene in the *B. dorsalis* complex was transition bias. Beckenbach *et al.* (1993) suggested that transition substitutions might involve in sequence divergence among closely related species because transitions at silent sites reach saturation more quickly than do silent transversions. Phylogenetic tree reconstructed from only transitional

1 sites showed similar tree topology to phylogenetic tree reconstructed from all sites.
2 However, the bootstrap supporting for all branches of Ti-NJ tree was less than the tree
3 constructed from all sites.

4 Based on mitotic chromosome evidence, 27 species of the *B. dorsalis* group in
5 Thailand were roughly classified into six cytological groups (Baimai *et al.*, 1995,
6 1999 a, b, 2000). Based on partial mitochondrial COI gene in this study, we could
7 arrange the ten species of the *B. dorsalis* complex into three groups (Figure 1). The
8 phylogenetic analyses of tephritid fruit fly species in the *B. dorsalis* complex revealed
9 the concordance of mitotic chromosome and mitochondrial COI sequence data
10 (Figure 1).

11 The simplest model of speciation process leading to geographical isolation and
12 subsequently reproductive isolation between populations as a by-product of
13 adaptation to alternative selection process could possibly apply to some members of
14 the *B. dorsalis* complex. Several species of the *B. dorsalis* complex were host-plant
15 specific and found only in certain areas. For example, the two closely related species,
16 *B. dorsalis* sp. D and *B. dorsalis* sp. J, were found infested different host plants in
17 different locations in Thailand (Baimai, unpublished data). A true specialist, *B.*
18 *arecae* attacks only palm nuts of the Arecaceae family (Allwood *et al.*, 1999).
19 Adaptation to specific host-plant species could have led to genetic differentiation and
20 subsequently reproductive isolation between *B. arecae* and its ancestor.

21 The cytoplasmic incompatible-inducing bacteria, *Wolbachia* might also be one
22 of the speciation agents involving in the *Bactrocera* species complex by means of
23 cytoplasmic incompatibility mechanism. The cytoplasmic incompatibility phenomena
24 has been found in several insect species (Hoffmann and Turelli, 1997) and suggested
25 to be possible cause of reproductive isolation (Werren, 1997). The bidirectional

cytoplasmic incompatibility phenomenon has been found when insect hosts were infected with different *Wolbachia* strains (Hoffmann and Turelli, 1997). Therefore, *Wolbachia* have been suggested to be possible agent causing reproductive isolation and speciation in their host (Bordenstein *et al.*, 2001). The phylogenetic evidences showed a non-concordance of *Wolbachia* strains in two sympatric species of *B. dorsalis* complex, *B. dorsalis* sp. A and *B. pyrifoliae* (Jamnongluk *et al.*, 2001). Thus, through bidirectional incompatibility mechanism, *Wolbachia* might cause speciation between these two *B. dorsalis* complex species.

As in other phytophagous insects, i.e. the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* (Bush, 1969) and the pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* (Via, 1999), speciation a daptation to different host plant species in t ephritid fruit flies in the *B. dorsalis* complex is indicated in our results. Moreover, reproductive isolation caused by *Wolbachia* via the bidirectional cytoplasmic incompatibility phenomenon might lead to speciation between two sibling species, which infected with two different *Wolbachia* strains.

Acknowledgements:

2 We would like to thank Saen Tigvattananont, Anchalee SaeLee and Challow
3 Samrandee for collecting and identifying part of the original samples and Elizabeth
4 McGraw for reviewing the manuscript. This work was supported by the
5 TRF/BIOTEC Special Program for Research and Training in Biodiversity (BRT
6 139026) and the Thailand Research Fund (RGJ/PHD/0095/2541, RTA /01/2541, and
7 BGJ/16/2543).

References:

- Allwood A J, Chinajariyawong A, Kritsaneepaiboon S, Drew R A I, Hamacek E L, Hancock D L, Hengsawad C, *et al.* (1999). Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Southeast Asia. *Raffles Bull Zool Suppl.* 7: 1-92.
- Baimai V, Trichartvanit W, Tigvattananont S, Grote P J, Poramacom R, Kijchalao U (1995). Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. I. Five sibling species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Genome* 38: 1015-1022.
- Baimai V, Phinchongsakuldit J, Trinachartvanit W (1999) a. Metaphase karyotypes of fruit flies in Thailand (III): Six members of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Zool Stud* 38: 110-118.
- Baimai V, Phinchongsakuldit J, Tigvattananont S (1999) b. Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. IV. Evidence for six new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia* 64: 371-377.
- Baimai V, Sumrandee C, Tigvattananont S, Trinachartvanit W (2000). Metaphase karyotypes of fruit flies of Thailand. IV. Cytotaxonomy of ten additional new species of the *Bactrocera dorsalis* complex. *Cytologia* 65: 409-417.
- Beard C B, Hamm D M, Collins F H (1993). The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol Biol* 2: 103-124.
- Beckenbach A T, Wei Y W, Liu H (1993). Relationships in the *Drosophila obscura* species group, inferred from mitochondrial cytochrome oxidase II sequences. *Mol Biol Evol* 10: 619-634.

- 1 Bordenstein S R, O'Hara F P, Werren J H (2001). *Wolbachia*-induced
2 incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* 409:
3 707-710.
- 4 Bush G L (1969). Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies
5 of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution* 23: 237-251.
- 6 Drew R A I (1989). The tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the
7 Australian and Oceanian regions. *Mem Queensl Mus* 26: 1-521.
- 8 Drew R A I, Hancock D L (1994). The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies
9 (Diptera: Tephritidae). *Asia Bull Entomol Res Suppl.* 2: 1-68.
- 10 Felsenstein J (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum
11 likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376.
- 12 Fitch W M (1971). Toward defining the course of evolution: Minimum change for a
13 specific tree topology. *Syst Zool* 20: 406-416.
- 14 Flook P K, Rowell C H, Gellissen G. (1995). The sequence, organization, and
15 evolution of the *Locusta migratoria* genome. *J Mol Evol* 41: 928-941.
- 16 Han H, McPherson B A (1997). Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta:
17 Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Mol*
18 *Phylogent Evol* 7: 17-32.
- 19 Hardy D E, Adachi M S (1954). Studies in the fruit flies of the Philippine Islands,
20 Indonesia, and Malaya. Part I. Dacini (Tephritidae-Diptera). *Pac Sci* 8: 147-204.
- 21 Hardy D E (1973). The fruit flies (Tephritidae-Diptera) of Thailand and bordering
22 countries. *Pac Insects Monogr* 31: 1-353.
- 23 Hoffmann A A, Turelli M (1997). Cytoplasmic incompatibility in insects. In: O'Neill
24 SL, Hoffmann AA, Werren JH (eds) *Influential passengers: inherited*

1 *microorganisms and arthropod reproduction*, Oxford University Press: New
2 York. pp 42-80.

3 Jamnongluk W (2001). Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus
4 *Bactrocera* and their *Wolbachia* endosymbionts. PhD Thesis, Mahidol University,
5 Bangkok, Thailand.

6 Jamnongluk W, Kittayapong P, Baimai V, O'Neill S L (2002) a. *Wolbachia* infections
7 of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host
8 species. *Curr Microbiol* 45: 225-230.

9 Jamnongluk W, Baimai V, Kittayapong P. (2002) b. Molecular phylogeny of tephritid
10 fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial *COI* sequences.
11 *Genome* 46: 112-118.

12 Jamnongluk W, Baimai V, Kittayapong P. (2002) c. Molecular evolution of tephritid
13 fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene.
14 *Genetica* 1802: 1-7.

15 Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base
16 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:
17 111-120.

18 Kittayapong P, Milne J R, Tigvattananont S, Baimai V (2000). Distribution of the
19 reproductive-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid
20 fruit flies in Thailand. *Sci Asia* 26: 1-19.

21 Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, Nei M (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary
22 Genetics Analysis software, *Bioinformatics* 17: 1244-1245.

23 Lewis D L, Farr C L, Kaguni L S (1995). *Drosophila melanogaster* mitochondrial
24 DNA completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. *Insect*
25 *Mol Biol* 4: 263-278.

- 1 Li W H (1997). *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 2 Lunt D H, Zhang D X, Szymura J M, Hewitt G M (1996). The insect cytochrome
3 oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic
4 studies. *Insect Mol Biol* 5: 153-165.
- 5 Nei M, Gojobori T (1986). Simple methods for estimating the numbers of
6 synonymous and nonsynonymous substitutions. *Mol Biol Evol* 3: 418-426.
- 7 Posada D, Crandall K A (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution.
8 *Bioinformatics* 14: 817-818.
- 9 Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for
10 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- 11 Spanos L, Kouriumbas G, Kotsyfakis M, Louis C. (2000). The mitochondrial
12 genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratittis capitata*. *Insect Mol Biol* 9: 139-
13 144.
- 14 Strong D R, Lawton J H, Southwood T R E (1984). *Insect on plants. Community*
15 *patterns and mechanisms*. Blackwell Science: Oxford.
- 16 Strickberger M W (2000). *Evolution* 3rd ed. Jones and Bartlett Publisher: London.
- 17 Swofford D L (2000). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other
18 Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- 19 Via S (1999). Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene
20 flow restriction and habitat choice. *Evolution* 53: 1446-1457.
- 21 Wells J D, Sperling F A (2001). DNA based identification of forensically important
22 Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int* 120: 109-114.
- 23 Werren J H (1997). Biology of *Wolbachia*. *Ann Rev Entomol* 42: 587-609.

- 1 White I M, Elson-Harris M M (1992). *Fruit flies of economic significance: their*
2 *identification and bionomics*. Centre for Agriculture and Biosciences
3 International.
- 4 Yang Z (1994). Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J Mol Evol* 39: 105-
5 111.

1 Table 1. Taxa examined

Taxon name	Accession number	Plant Host (Family)	Reference
Diptera: Tephritidae			
<i>Bactrocera arecae</i>	AY053508	<i>Areca catechu</i> (Palmae)	This study
<i>Bactrocera carambolae</i>	AY053509	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	This study
<i>Bactrocera dorsalis</i> s.s. (RN-SK)	AY053507	<i>Sandoricum koetjape</i> (Meliaceae)	Jamnongluk <i>et al.</i> 2002
<i>Bactrocera dorsalis</i> s.s. (RN-MA)		<i>Musa acuminata</i> (Musaceae)	This study
<i>Bactrocera dorsalis</i> s.s. (KB-PG)		<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	This study
<i>Bactrocera dorsalis</i> sp. D		<i>Solanum erianthum</i>	This study
<i>Bactrocera dorsalis</i> sp. J		<i>Syzygium claviflora</i>	This study
<i>Bactrocera dorsalis</i> sp. L	AY053511	<i>Platea</i> sp. (Icacinaceae)	This study
<i>Bactrocera dorsalis</i> sp. O	AY053512	<i>Willughbeia firma</i> (Apocynaceae)	This study
<i>Bactrocera kanchanaburi</i>		<i>Artabotrys siamensis</i>	This study
<i>Bactrocera pyrifoliae</i>	AY053514	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	This study
<i>Bactrocera raiensis</i>	AY053515	<i>Sandoricum koetjape</i> (Meliaceae)	This study
<i>Bactrocera tau</i> s.s.	AF400067	<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	Jamnongluk <i>et al.</i> 2002 b
<i>Ceratitis capitata</i>	AJ242872	Many species (Mediterranean fruit fly)	Spanos <i>et al.</i> , 2000
Diptera: Culicidae			
<i>Anopheles gambiae</i>	L20934	-	Beard <i>et al.</i> , 1993
Diptera: Calliphoridae			
<i>Comptosyiops callipes</i>	AF295549	-	Wells and Sperling, 2001
Orthoptera: Acrididae			
<i>Locusta migratoria</i>	X80245	Sorghum	Flook <i>et al.</i> , 1995

1 Table 2. Amino acid variation among ten species of the *B. dorsalis* complex within a
2 638 bp segment of mtDNA. Vertical numbers at top of columns represent the
3 nucleotide site that varies. The nucleotide locations were according to *Drosophila*
4 *melanogaster* mitochondrial DNA (Lewis *et al.*, 1995)

Species	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
	5	6	6	6	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	0
	9	2	7	9	2	2	9	9	0	1	5	5	8	9	0
	6	6	8	1	2	4	6	9	8	4	0	6	9	5	5
<i>B. dorsalis</i> sp. A 1	F	F	V	K	V	V	V	T	Q	I	L	N	L	L	N
<i>B. dorsalis</i> sp. A 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. dorsalis</i> sp. A 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. dorsalis</i> sp. D	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.
<i>B. dorsalis</i> sp. J	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. dorsalis</i> sp. O	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. kanchanaburi</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. carambolae</i>	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. raiensis</i>	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>B. pyrifoliae</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	T
<i>B. dorsalis</i> sp. L	.	.	.	.	G	.	.	P	.	V	.	D	M	.	T
<i>B. arecae</i>	.	.	T	N	.	.	I	.	.	V	F	.	.	I	.