- ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างที่ได้รับการยืนยันการ identify อย่างถูกต้อง คือ *Diachasmimorpha longicaudata* v. A, *Psyttalia incisi* และ *Fopius vandenboschi* [NP(TC)-3] จากห้องปฏิบัติการของรศ.ดร.สังวรณ์ กิจทวี แห่งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงเบียน

รูปที่ 4 แสดงผลของการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงเบียนโดยใช้ DNeasy Tissue Kit (Qiagen Ltd.)
Lane 1: *D. longicaudata* v. A; lane 2: *P. incisi*; lane 3: *F. vandenboschi*; lane 4: KB(CG)-10M

3. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.1 การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง

- ใช้คู่ไพรเมอร์ "ITS1F" และ "ITS2R" ซึ่งเสนอโดย Schlötterer *et al.* (1994) ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และพบว่า PCR product ที่ได้ส่วนใหญ่มีหลายขนาด ตั้งแต่ 500 - >1000 bp จึงได้นำเฉพาะ specific PCR product ของ BK(PL)-2-PspM ขนาด ~650 bp ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์
  - จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้อย่างละเอียดโดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Drosophila melanogaster* (GenBank accession number: M21017) แสดงให้เห็นว่าบริเวณ ITS ของ BK(PL)-2-PspM นั้นสิ้นผิดปกติ
  - หลังจากที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BK(PL)-2-PspM ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆใน GenBank โดยใช้ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BK(PL)-2-PspM มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า PCR product ของ BK(PL)-2-PspM มีการปนเปื้อนด้วยรา

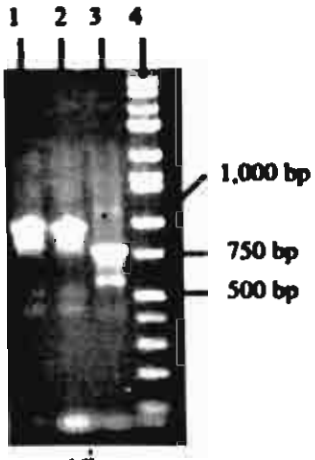
- ใช้คู่ไพรเมอร์ "18JF" และ "28ZR" (สำหรับบริเวณ ITS ทั้งหมด)
  - PCR product ที่ได้ส่วนใหญ่ยังคงมีหลายขนาด ตั้งแต่ 2000 - 4000 bp ถึงแม้ว่าจะได้พยายามปรับ PCR condition โดยการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และเพิ่ม annealing temperature

แล้วก็ตาม ดังนั้นจึงได้นำเฉพาะ specific PCR product ของ BK(PL)2-PspM (~2000 bp) และ KB(CG)101-PFF (~4000 bp) ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ทั้ง forward primer ("18JF") และ reverse primer ("28ZR")

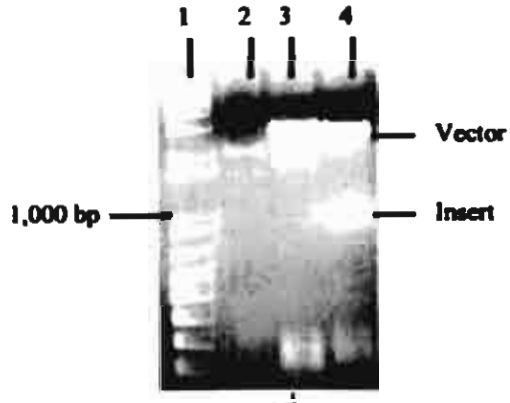
- ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้เนื่องจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เป็นผลสำเร็จ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มี N (A/T/C/G) เป็นจำนวนมาก

3.2 การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์หลังการ cloning

- ใช้คู่ไพรเมอร์ "18S-KF" และ "5.8SR" (สำหรับบริเวณ ITS1)



รูปที่ 5

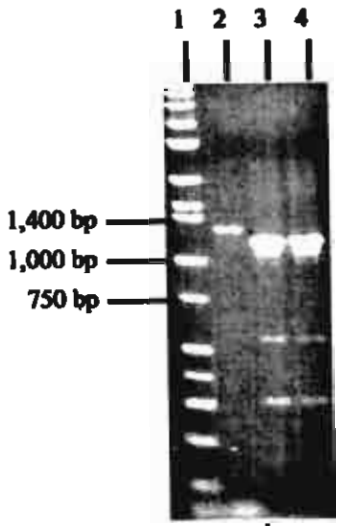


รูปที่ 6

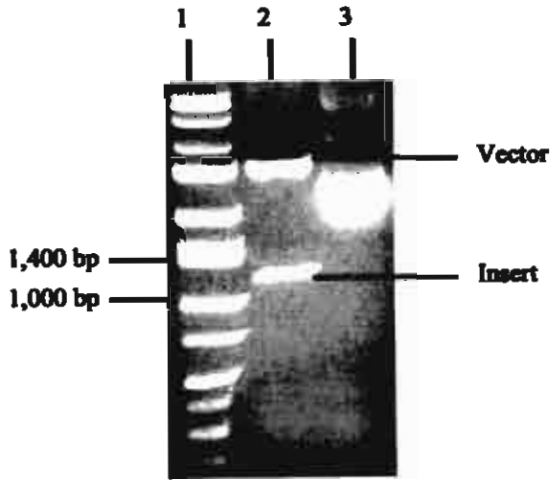
รูปที่ 5 แสดง PCR products บริเวณ ITS1 ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ "18S-KF" และ "5.8SR"
Lane 1: *D. longicaudata* v. A; lane 2: RN(GH)-3-DLM; lane 3: *Chelonus* sp. [Outgroup(ZM)-B.1]; lane 4: Hi-Lo marker

รูปที่ 6 แสดงผลการคัดเลือกหา insert ที่มีขนาดเท่ากับ PCR product ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ "18S-KF" และ "5.8SR" (ขนาดระหว่าง 750-1000 bp) Lane 1: Hi-Lo marker; lane 2: RN(GH)-3-DLM clone 1; lane 3: RN(GH)-3-DLM clone 2; lane 4: RN(GH)-3-DLM clone 3 (พบ insert ที่ต้องการขนาด ~ 1000 bp)

- ใช้คู่ไพรเมอร์ "5.8SF" และ "28SR" (สำหรับบริเวณ ITS2)



รูปที่ 7



รูปที่ 8

รูปที่ 7 แสดง PCR products บริเวณ ITS2 ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ "5.8SF" และ "28SR"

Lane 1: Hi-Lo marker; lane 2: *P. incisi*; lane 3: *D. longicaudata* v. A; lane 4: RN(GH)-3-DLM

รูปที่ 8 แสดงผลการคัดเลือกหา insert ที่มีขนาดเท่ากับ PCR product ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ "5.8SF" และ "28SR" (ขนาดระหว่าง 1000-1400 bp) Lane 1: Hi-Lo marker; lane 2: *D. longicaudata* v. A clone 1 (พบ insert ที่ต้องการขนาด ~ 1300 bp); lane 3: *D. longicaudata* v. A clone 2

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

- ใช้ทั้ง forward และ reverse primers จะทำให้ได้ forward และ reverse sequences ซึ่งช่วยให้การตรวจและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์มีความละเอียด แม่นยำ และถูกต้องมากขึ้น

บริเวณ ITS1:

D. longicaudata v. A (Forward primer: "18S-KF")

NGNGNGCTNNANTGAAGGAATAGCGTGTCTTCCCTGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCT
TCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCAATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAA
GCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGT
GAGGTCTTCGGACTGGTGCGCGGCAATGTTTCGGCATTGCCGATGTTTCCGGGAAGATGACCAAACTTG
ATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGTG
TTATTCCAAAGAGAGAATATAAAATTTTGTATTTTTATTCTTCATATTTTGATATAATATTATTATATC
AAAAAAAAAAAAATCATACGTTATATGGTGTAAAACATGTGAAAACATGTAACCATATTATATACGTAT
GATAATATAATGAAATTTATAAATCATCAGTATATCATCGATTATGTGGGGTAACCTATTTGATGGGAA
TTTTTTTTTCATCATGATGGGTATTTAACGTGCCCAAGGTTTAGTAATGATTTTCGCCACACAAGATCA
ATTGGGTGATGATGATTTTATATAAATTCGAATTTTTTTTTCTTCATGCCCGTAAGTAATTGGATGGAT
ACTTTGTTCGCAAAGTTGATATTCTTTTTCCGNGTNCGGTAAAGTGAATACANGTCTGAATNGTAATAA
AAATTGAATTTTGGGTTGCTTAGGCATCTTGTNTTTCTNTTTGNAACAANATTGCGAGAATGGGATTGA
ATATTTTTATTTTCAATGACTGGTTTTTTTCAAAAAAAAAAAAATTTTTTTTTTTNTGATACCCCGGACC
GGGGGATCCCTTGG

D. longicaudata v. A (Reverse primer: "5.8SR")

GTCATTGAATATAAAAATATTCAATCCAATCTCGCAATCTTGTTTNNATAGAAATACAAGATGCCTAAG
CAAACACAAAATTCAATTTTATTACTATTCAGACTTGTATTCACTTTACCGTACACGGAAAAAGAATAT
CAACTTTGCGAACAAAGTATCCATCCAATTACTTACGGCATGAAGAAAAAAAAATTCGAAATTTATATA
AAATCATCATCACCAATTGTATCTTGTGTGGCGAAAATCATTACTAAACCTTGGGCACGTTAAATACCC
ATCATGATGAAAAAAAAATTCCCATCAAATAGGTTACCCCACATAATCGATGATATACTGGATGATTTA
TAAATTTCATTATATTATCATACGTATATAATATGGTTACATGTTTTCACATGTTTTACACCATATAAC
GTATGGATTTTTTTTTTTTTGNTATAATAATATTATATCCAAATNTGAAGAATAAAAATACAAAATTTT
ATATTCTCTCTTTGGAATAACACGTTAATGGATCCTTCCGCAGGGTTCACCTACGGAAACCTTGGTTAC
GACTTTTACTTCCTCTAAATGGATCAAGTTTGGTCATCTTTCCGGAAAACATCCGGCAATGNCCNAAAC
ATTGCCGCGCACCAGTCCNNAAAACCTCACTAAATCATTCAATCGGTANTANCGACGGGCGGTGTGNNC
AAANGGCANGGGACNTAATCAACGCGAGCTTATGNACTCGCGCNTACTGGGGAATTCCCCNNTCCTGGG
GGAATAATNGCAAGCCCCCAATCCCTAACACNAAGGNAGTTCAACGGGTTACCCNGGGCCTTTCGNCCA
GGGAAAAC

บริเวณ ITS2:

D. longicaudata v. A (Forward primer: "5.8SF")

GNNGGANCATGAACATGACATTTNGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCCAATTCCCGGACTACGCCTA
GCTGAGGGTCGTTTGTTTAAAAAAAAACTGCTTACAATTTTATTTGTATTTTTCTGTCTATATGACAGA
AAAATATTTGAAAAATTGTACAAGCGTGTGTGTAAAATGAATGCTCGTCAAGATATAAGTATTTAAATT
ACGACGTCATTTAAAATTATGTATTGGAAAATGATATATTATCAATTTTTAATATATTATTTGACGATA
TAAAGAAAAAGAAGTTGTTGTTGTTAATATATTTATAGCCCATTGTCAGTTGTCTAAAAATGGTTTTTA
ACGAACAAACTTTGAAATGATGTCCACAAATTATATATCACTGTGGTTAATCATCGAGTCCCCGAGATA
TCTCATTCTCAGAGTTGGGACCGGATCATGGATTATTTTCATTTCTAAAGTTTTGTTTTTTAGACACGG
GATGTTGAGGATTTTTTTTTTATAAATAAAAGGCGCGCTTGCAACAACAACTTTTATACACTTATAACA
TGGACGACCTCAGAANTAGGTGAGGACTACCCGCTGGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAAGA
AACTAACTANGATTTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAACAGGAAAAAGCCCAGCACTGAATCCCACNATTAT
GTTGTTGGGAAATGTANTGGTTGGGANGATCCATTTATCCTGGAATGGTATTTGGGATCCCAGNNCCAT
CTTGGATGGGGGCATTTTACCCATANAGGGTGNCCNGNCCCCAANGGATCNAAATACATTTCAGGAGGG
ATTCCTCCTTAGAATCNGGTTGCTTGNAAANNGCCACC

D. longicaudata v. A (Reverse primer: "28SR")

GTNAAGCAATANTACAAGTNGTAACCTATATCATAACTTATATATATACAAAATGAGCTGACGATGAAT
CTCCCCATTCGATCTTTTGGGTTTCTCAGGTTTACCCCTGAACGGTTTCACGTACTCTTGAACTCTCTC
TTCAAAGTTCTTTTCAACTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCGTGGTCATATTTAGCCTT
AGATGGAGTTTACCACCCACTTAGAGCTGCACTCTCAAGCAACCCGACTCTAAGGAGAAATCCTCCTGA
AATGTATTTTGATCACTACGGGCCTGGCACCCTCTATGGGTAAATGGCCCCATTCAAGATGGACTTGGA
TACAAGATAGCATTACAGGATAAATGGATCCTCCCAAACACTACATTTCCCAACAACATAATTGTGGGA
TTCAGTGCTGGGCTTTTTCCTGTTCGCTCGCCGCTACTAAGGAAATCCTAGTTAGTTTCTTTTCCTCCG
CTTAGTAATATGCTTAAATTCAGCGGGTAGTCTCACCTACTCTGANGNCGTCATGTTATAAGTGTATAA
AAGTTGTTGTTGCAAGCGCGCCTTTTATTTATAAAAAAAAAATCTCAACATCCGTGTCTAAAAAACAAA
ACTTTAGAAATGAAAATAATCATGATCNGTCCAACTCTGANAATGANAAATCTCGGGGACTCGATGATT
TANCACAGNGATATATNATTTGGGGACATCATTTCAAAGTTTGGTCGTTNAAAACCATTTTANACACTG
ACAATGGCTNTNAATATATTAACAACCACCACCTTCTTTTTCTTTNTATCGCCNAATAATATTTTNAAA
AATGGATAATNTATCATTTTCCAATACATAATTTTAAATGACGTCGNAATTTAAANACTTATTTTTTGG
CCAGCCTTCATTTTTANNCCCCCCCTTGNCCAATTTTTNAAAAANTTTTTTGGCTTTNAACAAAAAAA

5. การทำ data analysis

- ใช้ Clustal X (version 1.64b) ในการทำ automatic multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พร้อมทั้งตรวจและแก้ไข alignment อีกครั้งอย่างละเอียด

บริเวณ ITS1 (มีบริเวณ 18S บางส่วน) :

```
                                *         20         *         40         *          6
Outgroup          : TGGCCGAAAGGCCCGGGTAATCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCA : 59
P._incisi         : TGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCA : 59
P._fletcheri      : TGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCA : 59
BKPL2_PspF        : TGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCA : 59
D._longicaudata   : TGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCA : 59
KBCG_10M          : TGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGAATTGGGGCTTGCA : 59
RNGH3_DLM         : TGGCCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCA : 59
F._vandenboschi   : TGGTCGAAAGGCCCGGGTAACCCGCTGAACCTCCTTCGTGCTAGGGATTGGGGCTTGCA : 59

                  0         *        80         *        100         *         1
Outgroup          : ATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTA : 118
P._incisi         : ATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTA : 118
P._fletcheri      : ATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTA : 118
BKPL2_PspF        : ATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGACTA : 118
D._longicaudata   : ATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTA : 118
KBCG_10M          : ATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTA : 118
RNGH3_DLM         : ATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTA : 118
F._vandenboschi   : ATTATTCCCCATGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTA : 118

                  20         *        140         *        160         *
Outgroup          : CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGG : 177
P._incisi         : CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGG : 177
P._fletcheri      : CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGG : 177
BKPL2_PspF        : CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGG : 177
D._longicaudata   : CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGG : 177
KBCG_10M          : CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGG : 177
RNGH3_DLM         : CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGG : 177
F._vandenboschi   : CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGG : 177

                  180         *        200         *        220         *
Outgroup          : TCTTCGGACTGATACACGACGATGTTTCGGCATTGCCGATGTTGTCGGAAAGATGACCA : 236
P._incisi         : TCTTCGGACTGGTGCGCGGCAATGTTTCGGCATTGCCGATGTTGCCGGGAAGATGACCA : 236
P._fletcheri      : TCTTCGGACTGGTGCGCGGCAATGTTTCGGCATTGCCGATGTTGCCGGGAAGATGACCA : 236
BKPL2_PspF        : TCTTCGGACTAGTGCGCGGCAATGTTTCGGCATTGCCGATGTTGCCGGGAAGATGACCA : 236
D._longicaudata   : TCTTCGGACTGGTGCGCGGCAATGTTTCGGCATTGCCGATGTTTCCGGGAAGATGACCA : 236
KBCG_10M          : TCTTCGGACTGGTGCGCGGCAATGTTTCGGCATTGCCGATGTTTCCGGGAAGATGACCA : 236
RNGH3_DLM         : TCTTCGGACTGGTGCGCGGCAATGTTTCGGCATTGCCGATGTTTCCGGGAAGATGACCA : 236
F._vandenboschi   : TCTTCGGACTGGTGCGCGGCAATGTTTCGGCATTGCCGATGTTGCTGGGAAGATGACCA : 236

                  240         *        260         *        280         *
Outgroup          : AACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG : 295
P._incisi         : AACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG : 295
P._fletcheri      : AACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG : 295
BKPL2_PspF        : AACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG : 295
D._longicaudata   : AACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG : 295
KBCG_10M          : AACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG : 295
RNGH3_DLM         : AACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG : 295
F._vandenboschi   : AACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG : 295

                  300         *        320         *        340         *
Outgroup          : AAGGATCATTAACGTATAA---C-AAAATTAAA-----TATAA-ATTTTG------TAT : 338
P._incisi         : AAGGATCATTAACGTATCA--CC-AAGAATAA--------TAATATTTTG--TTTTTAT : 341
P._fletcheri      : AAGGATCATTAACGTATCA--CC-AAGAATAA--------TAATATTTTG--TTTTTAT : 341
BKPL2_PspF        : AAGGATCATTAACGTATCA----AAAGAATAAA------ATAATATCTTG--TTTTTAT : 342
D._longicaudata   : AAGGATCATTAACGTGTTATTCCAAAGA-----GAGAATATAAAATTTTGTATTTTTAT : 349
KBCG_10M          : AAGGATCATTAACGTTTTATTCCAAAAAAAAA---GAATATAAAATTTTGAATTTTTAT : 351
RNGH3_DLM         : AAGGATCATTAACGTATTATTCCAAAGA-----GAGAATATAAAATTTTGTATTTTTAT : 349
F._vandenboschi   : AAGGATCATTAACGTATAA-----AACATA--------TACAATATTTTG------TAA : 335

                  360         *        380         *        400         *
Outgroup          : ACTT----------------------------------------TGACAATAATACAT-- : 356
P._incisi         : TCTTCATGATATTATCACATATGATGTGA----------TGA-AATAATGTATTT : 385
P._fletcheri      : TCTTCATGATATTATCACATATGATGTGA----------TGA-AATAATGTATTT : 385
BKPL2_PspF        : TCTTCATT----------GATCATA----------ATGA-AATA-TGTATTT : 372
D._longicaudata   : TCTTCATATTTTGATATAATATTATTATATCAAAAAAAAAAA-----AATCATACGTTA : 403
KBCG_10M          : TCTTCATAT----------------------------AA----AATCTTACGTTA : 374
```

```
RNGH3_DLM       : TCTTCATATTGATATAATATCATTTTATATCAAAAAAAAAAAA----AATCGTACGTTA : 404
F._vandenboschi : ------------------------------AAAGAAAGAAAA----AGTGAGATATTA : 359

                      420          *         440          *         460          *
Outgroup        : ---------ACTCA-----AAATGTGCTGACGC---ACA----AATACTAAAGAT---- : 390
P._incisi       : GGACATGTAAATCATGTGAAAGCATG-TTATTCCAAATACCTTTAAAATATATATTACA : 443
P._fletcheri    : GGACATGTAAATCATGTGAAAGCATG-TTATTCCTAATACCTTTAAAATATATATTACA : 443
BKPL2_PspF      : TGC---GTAAATCATGTGAAAACATG-TAATT--AAATACAACGAAA-TATATAT---- : 420
D._longicaudata : TATGGTGTAAAACATGTGAAAACATG-TAACC----ATA---TTATA-TACGTATG---- : 450
KBCG_10M        : TATGGTGTAAAACATGTGAAAACATG-TAACC----ATA---TTATA-TACGTATG---- : 421
RNGH3_DLM       : TATGGTGTAAAACATGTGAAAACATG-TAACC----ATA---TTATA-TACGTATG---- : 451
F._vandenboschi : TGCG----AAAGCATATATAAACAAACTCACTT---ATA---TTATA-TATTTATA---- : 404

                      480          *         500          *         520          *
Outgroup        : ----------TA-ATCCA------CGAATTATCGAG----CT---TGTGAACATCAT-- : 423
P._incisi       : AGAAATTCAATATATATAAAATCTTTTAATGTATTAGCATCAATATAAAAATAATAATA : 502
P._fletcheri    : AGAAATTCAATATATATAAAATCTTTTAATGTATTAGCATCAATATAAAAATAATAATA : 502
BKPL2_PspF      : ---------ATATATATA-----TTGAAATTCAATA-------TATAAAAAAATTGTTC : 458
D._longicaudata : ---------ATA-ATATAA-----TGAAATTTATAA--ATCA---TCAGTATATCATCG : 489
KBCG_10M        : ---------ATA-ATATAA-----TGAAATTTATAA--ATCA---TCACTATATCATCG : 460
RNGH3_DLM       : ---------ATA-ATATAA-----TGAAATTTATAA--ATCA---TCACTATATCATCG : 490
F._vandenboschi : ---------ATA-ATATAAAA--CGAAATTTTAGTA--ATCA---TMTTAATATAAT-- : 444

                      540          *         560          *         580          *
Outgroup        : --------------------GGTAACCTAGT--AAAGGTGATCCTTCT-CACTGAGAGG : 459
P._incisi       : GTAAT---GTGCGGTAGGGTGGTAACCTATT-GATAATTTCTTTTTAT-CATGATGGGG : 556
P._fletcheri    : ATAATGATGTGCGGTAGGGTGGTAACCTATT-GATAATTTCTTTTTAT-CATGATGGGG : 559
BKPL2_PspF      : ATATT---ATCAATTTGTGGGGTAACCTATT-GACAATTAATTGTATT-AATTATTGTC : 512
D._longicaudata : ATTAT-----------GTGGGGTAACCTATTTGATGGGAATTTTTTTTTCATCATGATG : 537
KBCG_10M        : ATTAT-----------GTGGGGTAACCTATTTGATGGGAATTTTTTTTTCATCATGATG : 508
RNGH3_DLM       : ATTAT-----------GTGGGGTAACCTATTTGATGGGAATTTTTTTTT-CATCATGATG : 537
F._vandenboschi : ATTTT-----------TGTGGTAACCTATT-GACAATAATTTATTAT-TGTTATAAAG : 489

                      600          *         620          *         640
Outgroup        : ATTGTTGG--------------------GGTTTTTAAATGAATTTTCGCCATGATAAA : 497
P._incisi       : GTGCT-----CTTAAAAAAGCGCCTCCAAGGTTTAGCAATGA-TTTTCGCCACCCACAC : 609
P._fletcheri    : GTGCT-----CTTAAAAAAGCGCCTCCAAGGTTTAGCAATGA-TTTTCGCCACCCACAC : 612
BKPL2_PspF      : ATGATGGGTTCTTAAAAATGC----CCAAGGTTTAGAAATGA-TTCTCGCCA--CACA- : 563
D._longicaudata : GGTAT------TTAA-----CGTGCCCAAGGTTTAGTAATGA-TTTTCGCCA--CACA- : 581
KBCG_10M        : GGTAT------TTAA-----CGTGCCCAAGGTTTAGTAATGA-TTTTCGCCA--CACA- : 552
RNGH3_DLM       : GGTAT------TTAAAA---CGTGCCCAAGGTTTAGTAATGA-TTTTCGCCA--CACA- : 583
F._vandenboschi : GATCTGT--------AAATG---ATCCAAGGTTGGGCAATGAATTTTCGCCA--CATAA : 535

                    *         660          *         680          *         700
Outgroup        : -TA-------AGCATCCTATGTGGATTAGTTCTATGCTGTAACATATCGATGAT----A : 544
P._incisi       : ATATACCCACAAAATTTTATATTGATG-ATGATTTTATATGAATTTCACATTGT--AAA : 665
P._fletcheri    : ATATACCCACAAAATTTTATATTGGTG-ATGATTTTATATGAATTTCACATTGT--AAA : 668
BKPL2_PspF      : ------------ATTTTATTGATAATG-ATTTTTTTATATGAATTACATATT------- : 602
D._longicaudata : ----------AGATACAATTGGTGATG-ATGATTTTATATAAATTTCGAATTTTT---- : 625
KBCG_10M        : ----------AGATACAATTGGTGATG-ATGATTTTATATAAATTTCGAATTTTT---- : 596
RNGH3_DLM       : ----------AGATACAATTGGTGATG-ATGATTTTATATAAATTTCAAATTTTT---- : 627
F._vandenboschi : A---------TTATTTYTATGATTATATATTATATGAAAAAAAATTCGTMATTTTT--- : 582

                    *         720          *         740          *         760
Outgroup        : ---TAGCCAATACAC--ATTTATTACACCTGTGATTTATGTGTATGTTATTTTGAAAA- : 597
P._incisi       : ATTTTTCTTTTGCCGTAAGTAACGGGGAATGAAATACTTTTTTTT-AAACTTTAAAATT : 723
P._fletcheri    : ATTTTTATTTTGCCGTAAGTAACGGGGAATGAAATACTTTTTTTTTAAACTTTAAAATT : 727
BKPL2_PspF      : --------TATGCCGTAAGTAAT-------TGAA-----------------TTAATAT- : 628
D._longicaudata : -TTTTCTTCATGCCGTAAGTAATTGG---ATGGATACTTTGTTCGCAAAG-TTGATAT- : 678
KBCG_10M        : --TTTCTTCATGCCGTAAGTAATTGG---ATGGATACTTTGTTCTCAAAG-TTGATAT- : 648
RNGH3_DLM       : ---TTCCCCATGCCGTAAGTAATTGG---ATGGATACTTTGTTCTCAAAG-TTGATAT- : 678
F._vandenboschi : -TTATTCCAATGCCGTAAGTAATTGAATAGAAAATTTTTTTTCTTTNGAAATAAAAAGT : 640

                    *         780          *         800          *         820
Outgroup        : -----------TAAAATAC-GTATA--GATGAAATTGATCTAAAATAATACTGATTAAT : 642
P._incisi       : AAAGTTTCATTTCTTTTACTGTGTAACGGTCAAAGTGAAC-ACAAGTTTGAATAATATT : 781
P._fletcheri    : AAAGTTTCATTTCTTTTACTGTGTAACGGTCAAAGTGAAC-ACAAGTTTGAATAATATT : 785
BKPL2_PspF      : -----------TCTTTTACTGTGTA-CGGTCAAAGTGAAC-ACAAGTATGAAAAATATT : 674
D._longicaudata : -----------TCTTTTTCCGTGTA-CGGT-AAAGTGAAT-ACAAGTCTGAATAGTAAT : 723
KBCG_10M        : -----------TCTTTTTCCGTGTA-CGGT-AAAGTGAAC-ACAAGTCTGAATAGTAAT : 693
RNGH3_DLM       : -----------TCTTTTGCCGTGTA-CGGT-AAAGTGAAC-ACAAGTCTGAATAGTAAT : 723
F._vandenboschi : AAT-----ATTTCTTTTAC-GTGTAACGGT-CAAGTGAGCCACAAGTCTTAATAATAAT : 692

                    *         840
Outgroup        : AACAGA--TGATTATT : 656
P._incisi       : AAAAT---TATATTTT : 794
P._fletcheri    : AAAAT---TATATTTT : 798
```

```
BKPL2_PspF       : TTAATATATAAATTTT : 690
D._longicaudata  : AAAAT---TGAATTTT : 736
KBCG_10M         : AAAAT---TGAATTTT : 706
RNGH3_DLM        : AAAAT---TGAATTTT : 736
F._vandenboschi  : GCTATAT-TAAATTTT : 707
```

ตารางที่ 2 แสดง Sequence characteristics ของบริเวณ ITS1 (และบริเวณ 18S บางส่วน) ของแมลงเบียน 8 taxa

Sequence characteristics	ITS1 region (plus partial 18S region)
Length range (total) (bp)	656-798
Length mean (total) (bp)	727.9
Length range (ingroup) (bp)	690-798
Length mean (ingroup) (bp)	738.1
Length (outgroup) (bp)	656
Aligned length without coded gaps (bp)	842
G+C content range (%)	34.4-38.6
G+C content mean (%)	36.3
Sequence divergence range (total) (%)	0.5-24
Sequence divergence range (ingroup) (%)	0.5-16.5
Number of constant sites (%)	573 (68.1)
Number of variable sites (%)	269 (31.9)
Number of parsimony informative sites (%)	117 (13.9)

ตารางที่ 3 แสดง Pairwise distance matrix ของบริเวณ ITS1 (และบริเวณ 18S บางส่วน) ของแมลงเบียน 8 taxa

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8
1 Outgroup	-							
2 *P. incisi*	0.23341	-						
3 *P. fletcheri*	0.23769	**0.00504**	-					
4 BK(PL)-2-PspF	0.21469	0.10347	0.10502	-				
5 *D. longicaudata* v. A	0.22087	0.14663	0.14781	0.12333	-			
6 KB(CG)-10M	0.22262	0.14028	0.14150	0.12390	0.01126	-		
7 RN(GH)-3-DLM	0.21588	0.14510	0.14769	0.11964	0.02323	0.01273	-	
8 *F. vandenboschi*	**0.24029**	0.16299	0.16428	0.14552	0.16386	**0.16510**	0.15894	-

บริเวณ ITS2 (มีบริเวณ 28S บางส่วน) :

```
                                *         20          *         40          *
Outgroup          : TACGGACGCAATTCCCAGACCACACTTGGCTGAGGGTCGTATCTACATATCAAA-CTG :   57
P._incisi         : CACGGATCTAATTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATTATATAAAAAACTG :   58
P._fletcheri      : CACGGATCTAATTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATTATATAAAAAACTG :   58
BKPL2_PspF        : CACGGATCCAATTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTACATAATAAAAAACTG :   58
D._longicaudata   : CACGGATCCAATTCCCGGACTACGCCTAGCTGAGGGTCGTTTGTTTAAAAAAAAACTG :   58
KBCG_10M          : CACGGATCCAATTCCCGGACTACGCCTAGCTGAGGGTCGTTTGTTTTACAAAAAACTG :   58
RNGH3_DLM         : CACGGATCCAATTCCCGGACTACGCCTAGCTGAGGGTCGTTTGTTTTCAAAAAAACTG :   58
F._vandenboschi   : CACGGATCCAATTCCCGGACCACACCTGGCTGAGGGTCGTTTAAAATATTAAAAACTG :   58

                    60          *         80          *        100          *
Outgroup          : CATT----TGTTTAT------------------------------------------- :   68
P._incisi         : C-TTACAATTATTGTTGTTGTTGATG-------TTTTGTTA-TTTTTTTTTGATTATA :  107
P._fletcheri      : C-TTACAATTATTGTTGTTGTTGATG-------TTTTGTTA-TTTTTTTTTGATTATA :  107
BKPL2_PspF        : C-TTACAATTGTTGTTA----------------TTTTCAT------------------ :   81
D._longicaudata   : C-TTACAATTTTATTTGTATTTTTCT--GTTTATAT-----GACAGAAAAATATTTGA :  108
KBCG_10M          : C-TTACAATTTTATTTGTGTTTTTCTCTGTTTATAATATGAGAGAGAAAAATATTAGA :  115
RNGH3_DLM         : C-TTACAATTTTATTTGTATTTATCT--GTCTATAT-----GATAGAAAAATATTTGA :  108
F._vandenboschi   : C-TTACAATT--TGTT----------------------------------------- :   71

                    120         *         140         *         160         *
Outgroup          : ------------------------------------------------------------ :    -
P._incisi         : AATATATAACAAACGCAATGCACAATTCTTGTACTAGCGTGTACTTATTAATT------ :  160
P._fletcheri      : AATATATAACAAACGCAATGCACAATTCTTGTACTAGCGTGTATTTATTAATT------ :  160
BKPL2_PspF        : AATATTCAACA-----------CAAT--TTGTACGAGCGTATGCATATTT--------- :  118
D._longicaudata   : AAAATTGTACAAGCGT-GTGTGTAAA--ATGAATGCTCGTCAAGATAT----------- :  153
KBCG_10M          : AAAATTGTACAAGCGTCGTGTGTAAG--TTGAATGCTCGTCAAGATTTTTATAATATT : 171
RNGH3_DLM         : AAAATTGTACAAGCGT---GTATAAG--TTGAATGTTCGTCAAGAT------------ :  149
F._vandenboschi   : ------GTACAAGCGT-----ATGATGC-TGAATGTTCATTTAAAATT---------- :  107

                      180         *         200         *         220         *
Outgroup          : -------------------------AATGCGAATTTAACACAATGAGTTTTCACCACT :  101
P._incisi         : -----TACAATACATCTGATGATTGTTCGTTGGTAATATT-TGAAGAAATTCAAATTT :  212
P._fletcheri      : -----TACAATACATCTGATGATTGTTCGTTGATAATATT-TGAAGAAATTCAAATTT :  212
BKPL2_PspF        : -----TATATAAACT-----GAATGTTCATTGTTAAAAATCTCAAGAAATTGAAATTT : 166
D._longicaudata   : --------------------------AAGTATTTAAATTACGACGTCATTTAAAATT : 184
KBCG_10M          : TTTGAATGAGATATTGAATTTCTTCTCAAATATTTAAATTACGACGTCATTTAAAATT : 229
RNGH3_DLM         : ------------------------AATTATATAAATTACGACGTCATTTAAAATT : 180
F._vandenboschi   : ---------------------ATTGTCCATAATTTTAAAT-----GTCATTTGAAATT : 139
                        240         *         260         *         280         *
Outgroup          : ------------------------------------------------TGCCTCTG :  109
P._incisi         : TGGATACGTCTATTTAAATCATTATATATACATATAATAA--ATGATAA-TCATTTTA :  267
P._fletcheri      : TGGATACGTCTATTTAAATCATTATATATACATATAATAA--ATGATGA-TCATTTTA :  267
BKPL2_PspF        : TTGTCATGTCATTTTAAATTATATTAAAAGGAAATAATAATAATAATAAATTACTTTA :  224
D._longicaudata   : ATGTATTGGAAAATGATAT-ATTATCAATTTTTA--ATAT--ATTATT--TGACGATA :  235
KBCG_10M          : ATGTATTGGAAAATGATAT-ATTATGAACTTTTA--ATAT--ATTATT--TGACGATA :  280
RNGH3_DLM         : ATGTATTGGAAAATGATAT-ATTATGAATTTTTTTTATAT--ATTATT--TGACGATA :  233
F._vandenboschi   : A--TATTGAATATAAAAGTTATTGTTAATAATAATAATAATAATCATC--------TA :  187

                          300         *         320         *         340
Outgroup          : CAAGT----------------CGTGTTA------------------------------ :  121
P._incisi         : TATTTGTCATTTTAATAAAGTATATTTATAAAAGTT--GTTGCTGCCCGTTGTCGGTT :  323
P._fletcheri      : GATTTGTCATTTTAATAAAGTATATTTATAAAAGTT--GTTGCTGCCCGTTGTCGGTT :  323
BKPL2_PspF        : TTATTGTTTTTTTTTGTTTTTCTTTTTATAATATAAAAGTTGTTGCCCATTGTTGGTT :  282
D._longicaudata   : TAAAGAAAAAGAA--GTTGTTGTTGTTAATATATTT-----ATAGCCCATTGTCAGTT :  286
KBCG_10M          : TAAAGAAAAAGAAAAGTTGTTGTTGTTAATATATTTG-ATTATAGCCCATTGTCAGTT :  337
RNGH3_DLM         : TAAAAAAAAATAA--GGTGGTGGTGTTAATATATTT-----ATAGCCCATTGTCAGGT :  284
F._vandenboschi   : TAATACCATTGTT--GGT--TGTCTTGATAATTTTT-----ATGGCTGATTASATCGA :  236

                        *         360         *         380         *         400
Outgroup          : ---CTTGAAAT------------------------------------------------ :  129
P._incisi         : GT-CTTGACA---ACTTTTACAAATTTTTGA---------TGATGAGACACATACATA :  368
P._fletcheri      : GT-CTTGACA---ACTTTTACAAATTTTTGA---------TGATGAGACACATATATA :  368
BKPL2_PspF        : GT-CTTAACA---GCTTTAACAAAAATTTGA---------TGATATATA--------- :  318
D._longicaudata   : GT-CTAAAAATGGTTTTTAACGAACA----AACTTTGAAATGATGTCCA--------- :  330
KBCG_10M          : GT-CTTAAAATGGTTTTTAACCAACAT-CAAACTTTAAAATGAAATCCA--------- :  384
RNGH3_DLM         : GT-CTAAAAATAATTTTTAACGAACCCCCAAACTTTGAAATGAAAACCA--------- :  332
F._vandenboschi   : GTCCCTGAGCTATAATTTAATTTAGTTTTAA-------AATGAGGACAGT-------- :  279

                        *         420         *         440         *         460
Outgroup          : GATAGATCGATGAC-------------TAAT-------GGACGCAGATCGGGT----- :  162
P._incisi         : CATAAATTATTT-------TGTGGC--CGATCGTCGAGTCCCTGAGCTATTATA---T :  414
P._fletcheri      : CATAAATTATTT-------TGTGGC--CGATCGTCGAGTCCCTGAGCTATTATA---T :  414
BKPL2_PspF        : CACAA--TATAT-------TGTGGC--CGATCGTCGAGTCCCTGGGATATAATAAAAT :  365
```

```
D._longicaudata : CAAA--TTATATATCAC--TGTGGT--TAATCATCGAGTCCCCGAGAT---ATC---- :  375
KBCG_10M        : CAAAAATTATATATTAC--TGTGGTGTTAATCATCGAGTCCCAGAGATGATATC---- :  436
RNGH3_DLM       : CAAA--TTATATATATCACTGGGGT--TAATCATCGAGCCCCAGAGAT---ATC---- :  379
F._vandenboschi : CATAA-TTGTATATAAA--TGTACT---AATACT---GTGCATCACACC--ATA---- :  322

                        *       480         *       500         *       520
Outgroup        : ------------------------------------------------------------ :    -
P._incisi       : ATA-------TTAGTTTATAAAAGAGG--ACAGACCATGATTGTGATTGCTATAAAAA :  463
P._fletcheri    : ATA-------TTAGTTTATAAAAGAGG--ACAGACCATGATTGTGATTGCTATAAAAA :  463
BKPL2_PspF      : ATAATATAATTTATTTTATAAAAGAGG--ACAGATCATGATTGTGATTGCCACAAAA- :  420
D._longicaudata : ----------TCATTCTC-AGAGTTGG--ACCGATCATGATTATT------TTCATTT :  414
KBCG_10M        : ----------TCATTCTC-CGATTTGG--ACCGATCATGATTATTATTATTTTCATTT :  481
RNGH3_DLM       : ----------TTATTCTC-CGAGGTGG--ACCGATCAAGAT-ATT------TTCATTT :  417
F._vandenboschi : ----------CTTTTA------TG---CCATATTATTATAATT-TTA--TTAAGAC :  356

                        *       540         *       560         *       580
Outgroup        : ----------------------------------------TAATCGTCGAGTCC :  176
P._incisi       : TGAATGTTGTGTGGTGTTTCTTTTTTTTTCATCAAAATTTTGTA-TGTCTTGACACGA :  520
P._fletcheri    : TGAATGTTGTGTGGTGTTTCTTTTTTTTTCATCAAAATTTTGTA-TGTCTTGACACGA :  520
BKPL2_PspF      : -TA-TGTT-------------------------------TTTTGT--TGTTTTGACACAA :  445
D._longicaudata : CTAAAGTTT--------------------------------TGT--TTTTTAGACACGG :  439
KBCG_10M        : CTAAAGTTTCGT----------------------------TTTGT--TTTTTAGACACGG :  511
RNGH3_DLM       : CTAAAGTTGTGT----------------------------TTTGTTTTGTTTTTTTAAMA :  449
F._vandenboschi : ACAAATGTGTTT-----------------------------TTATTATATTTTCACAATATAG :  390

                                *       600         *       620         *       6
Outgroup        : AAGAATGATTACTTTGTATCGT------GAAAGGACAGATTGA--------------- :  213
P._incisi       : ACGTCTAA-CTTCTACTTCTCTATATAAAATAGACGAAGAGAGGAGGAGGCCTTTTAA :  577
P._fletcheri    : ACGTCTAA-CTTCTACTTCTCTATATAAAATAGAAGAAGAGAGGAGGAGGCCTTTTAA :  577
BKPL2_PspF      : ATGTTC-----------------------------------------AGGCAAAATAA :  462
D._longicaudata : ATGTTGAG-ATTTTTTTTTTATAAATAAAA-----------------GGCGCGCTTG :  478
KBCG_10M        : ACGTGATTTATTTTTTTTTTAGAAATAAAA-----------------GGCGCTC--G :  549
RNGH3_DLM       : CCGGGTTGTATTTTTTTTTTATAAATAAA-------------------GGCGCTC--G :  486
F._vandenboschi : AGGGATGATGTAACATAACTTTTATATGGAAAGAAAAAAAAAAACAATAATAATAATT :  448

                  40        *       660         *       680         *
Outgroup        : ---------TTTATAACTTATTTT----TGCGTCCACTCA---TTTCTTTTATCAGCG :  255
P._incisi       : AATATTATATTCAACTTTTATATTGCTATATATA--ACTTTATTTCATGTGAC-GACC :  632
P._fletcheri    : AATATTATATTCAACTTTTATATTGCTATATATATAACTTTATTTCATATGAC-GACC :  634
BKPL2_PspF      : TATATTATA--AAATTTT----------TATATA--------TTTTATTTGAC-GACC :  499
D._longicaudata : CA----ACAA-CAACTTTTA--------TA--CAC------TTATAACATGAC-GACC :  514
KBCG_10M        : CA----ATAA-CAACTTTTA--------TATACAC------TTCTAACATGAC-GACC :  587
RNGH3_DLM       : CA----CCAA-CAACTTTT---------TATACAG------TTTTTACATGAC-GACC :  523
F._vandenboschi : TAATATATA--TATACATTTTTTTTTTTTTTTCTTCAAAA-----ATTTATATGACG :  499

                  700       *       720         *       740         *
Outgroup        : ACCTCAGATTAAGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAA :  313
P._incisi       : TCAA--GAGTAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAA :  688
P._fletcheri    : TCA---GAGTAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAA :  689
BKPL2_PspF      : TCA---GAGTAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAA :  554
D._longicaudata : TCA---GAGTAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAA :  569
KBCG_10M        : TCA---GAGTAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAA :  642
RNGH3_DLM       : TCA---GAGTAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAA :  578
F._vandenboschi : ACCTCAGAGTAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAA :  557

                    760       *       780         *       800         *
Outgroup        : GAAACTAACAAGGATTTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAACAGGAATAAGCCCAGCACTAA :  371
P._incisi       : GAAACTAACTAGGATTTCCTTAGTAGCGGCGGGCGAACAGGAAAAAGCCCAGCACTGA :  746
P._fletcheri    : GAAACTAACTAGGATTTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAACAGGAAAAAGCCCAGCACTGA :  747
BKPL2_PspF      : GAAACTAACTAGGATTTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAACAGGAAAAAGCCCAGCACTGA :  612
D._longicaudata : GAAACTAACTAGGATTTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAACAGGAAAAAGCCCAGCACTGA :  627
KBCG_10M        : GAAACTAACTAGGATTTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAACAGGAAAAAGCCCAGCACTGA :  700
RNGH3_DLM       : GAAACTAACTAGGATTTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAACAGGAAAAAGCCCAGCACTGA :  636
F._vandenboschi : GAAACTAACTAGGATTTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAATAGGAAAAAGCCCAGCACTGA :  615

                    820       *       840         *       860         *
Outgroup        : ATTCCGTAGTTCATGCTACTGGAAGATGTAGTGTTTAGGAGGAATCAATTAACCCGTG :  429
P._incisi       : ATCCCAC-GATTATGTCGTTGGGAAATGTAGTGTTTGGGAGGATCCATTTATCCCGTA :  803
P._fletcheri    : ATCCCAC-GATTATGTCGTTGGGAAATGTAGTGTTTGGGAGGATCCATTTATCCCGTA :  804
BKPL2_PspF      : ATCCCAC-GATTATGTCGTTGGGAAATGTAGTGTTTGGGAGGATCCATTTATCCCGTG :  669
D._longicaudata : ATCCCAC-AATTATGTTGTTGGGAAATGTAGTGTTTGGGAGGATCCATTTATCCTGTA :  684
KBCG_10M        : ATCCCAC-AATTATGTTGTTGGGAAATGTAGTGTTTGGGAGGATCCATTTATCCTGTG :  757
RNGH3_DLM       : ATCCCAC-AATTATGTTGTTGGGAAATGTAGTGTTTGGGAGGATCCATTTATCCTGTG :  693
F._vandenboschi : ATTCCAATGATTATGTCATTGGAAAATGTAGTGTTTGGGAGGATCCATTTATCCTGTG :  673
```

```
                          880         *         900         *         920
Outgroup          : GCATTATTTCATGTCCAAGTCCATCTTGAATGGGGCCACTTACCCATAGAGGGTGCCA :  487
P._incisi         : GTGTTATTTTGTGTCCAAGTCCATCTTGAATGGGGCCTTTTACCCATAGAGGGTGCCA :  861
P._fletcheri      : GTGTTATTTTGTGTCCAAGTCCATCTTGAATGGGGCCATTTACCCATAGAGGGTGCCA :  862
BKPL2_PspF        : GTGTTATCTTGTGTCCAAGTCCATCTTGAATGGGGCCATTTACCCATAGAGGGTGCCA :  727
D._longicaudata   : ATGCTATCTTGTATCCAAGTCCATCTTGAATGGGGCCATTTACCCATAGAGGGTGCCA :  742
KBCG_10M          : ATGTTATTTTGTATCCAAGTCCATCTTGAATGGGGCCATTTACCCATAGAGGGTGCCA :  815
RNGH3_DLM         : ATGTTATTTTGTATCCAAGTCCATCTTGAATGGGGCCATTTACCCATAGAGGGTGCCA :  751
F._vandenboschi   : GTGTTATTTTGTGTCCAAGTCCATCTTGAATGGGGCCATTTACCCATAGAGGGTGCCA :  731

                     *         940         *         960         *         980
Outgroup          : GGCCCGTAGTGACTGAAATATGTTTCGGGTGATTCTCTCCTTAGAGTCGGGTTGCTTG :  545
P._incisi         : GGCCCGTAGTGACCGAAATACATTTCGGGAGGATTTCTCCTTAGAGTCGGGTTGCTTG :  919
P._fletcheri      : GGCCCGTAGTGACCGAAATACATTTCGGGAGGATTTCTCCTTAGAGTCGGGTTGCTTG :  920
BKPL2_PspF        : GGCCCGTAGTGACCGAGATACATTTCGGGTGGATTTCTCCTTAGAGTCGGGTTGCTTG :  785
D._longicaudata   : GGCCCGTAGTGATCAAAATACATTTCAGGAGGATTTCTCCTTAGAGTCGGGTTGCTTG :  800
KBCG_10M          : GGCCCGTAGTGATCAAAATACATTTCAGGAGGATTTCTCCTTAGAGTCGGGTTGCTTG :  873
RNGH3_DLM         : GGCCCGTAGTGATCAAAATACATTTCAGGAGGATTTCTCCTTAGAGTCGGGTTGCTTG :  809
F._vandenboschi   : GGCCCGTAGTGACCGAGATACATTACAGGAGGATTTCTCCTTAGAGTCGGGTTGCTTG :  789

                        *        1000         *        1020         *        1040
Outgroup          : AGAGTGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATTGTTACGAGAC :  603
P._incisi         : AGAGTGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATGACCACGAGAC :  977
P._fletcheri      : AGAGTGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATGACCACGAGAC :  978
BKPL2_PspF        : AGAGTGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATGACCACGAGAC :  843
D._longicaudata   : AGAGTGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATGACCACGAGAC :  858
KBCG_10M          : AGAGTGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATGACCACGAGAC :  931
RNGH3_DLM         : AGAGTGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATGACCACGAGAC :  867
F._vandenboschi   : AGAGTGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATGACCACGAGAC :  847

                           *        1060         *        1080         *        1100
Outgroup          : CGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAA :  661
P._incisi         : CGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAA : 1035
P._fletcheri      : CGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAA : 1036
BKPL2_PspF        : CGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAA :  901
D._longicaudata   : CGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAA :  916
KBCG_10M          : CGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAA :  989
RNGH3_DLM         : CGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAA :  925
F._vandenboschi   : CGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAA :  905

                              *        1120         *        1140         *        1160
Outgroup          : GAGTACGTGAAACCGTTTAGAAGTAAACCTGAGAAACCCAAAAGATCGAATGAGGAGA :  719
P._incisi         : GAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAAACCCAAAAGATCGAATGGGGAGA : 1093
P._fletcheri      : GAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAAACCCAAAAGATCGAATGGGGAGA : 1094
BKPL2_PspF        : GAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAAACCCAAAAGATCGAATGGGGAAA :  959
D._longicaudata   : GAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAAACCCAAAAGATCGAATGGGGAGA :  974
KBCG_10M          : GAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGGAACCCAAAAGATCGAATGGGGAGA : 1047
RNGH3_DLM         : GAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAAACCCAAAAGATCGAATGGGGAGA :  983
F._vandenboschi   : GAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAAACCCAAAAGATCGAATGGGGAGA :  963

                                 *
Outgroup          : TTCATCGTC:  728
P._incisi         : TTCACCGTC: 1102
P._fletcheri      : TTCATCGTC: 1103
BKPL2_PspF        : TTCATCGTC:  968
D._longicaudata   : TTCATCGTC:  983
KBCG_10M          : TTCATCGTC: 1056
RNGH3_DLM         : TTCATCGTC:  992
F._vandenboschi   : TTCATCGTC:  972
```

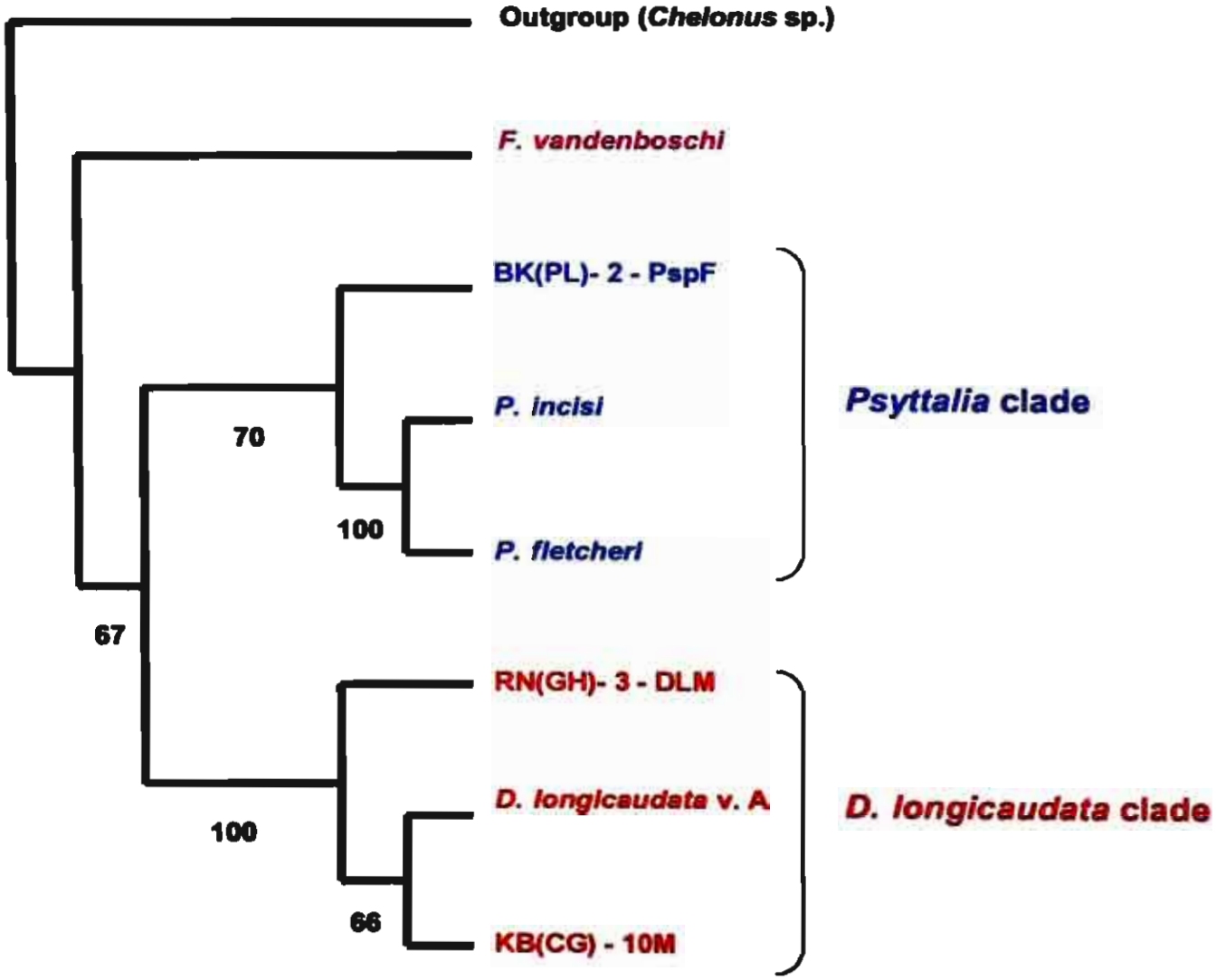
ตารางที่ 4 แสดง Sequence characteristics ของบริเวณ ITS2 (และบริเวณ 28S บางส่วน) ของแมลงเบียน 8 taxa

Sequence characteristics	ITS2 region (plus partial 28S region)
Length range (total) (bp)	728-1103
Length mean (total) (bp)	988
Length range (ingroup) (bp)	968-1103
Length mean (ingroup) (bp)	1025.1
Length (outgroup) (bp)	728
Aligned length without coded gaps (bp)	1169
G+C content range (%)	34.4-42.5
G+C content mean (%)	36.8
Sequence divergence range (total) (%)	0.9-25.2
Sequence divergence range (ingroup) (%)	0.9-23.9
Number of constant sites (%)	690 (59)
Number of variable sites (%)	479 (41)
Number of parsimony informative sites (%)	244 (20.9)

ตารางที่ 5 แสดง Pairwise distance matrix ของบริเวณ ITS2 (และบริเวณ 28S บางส่วน) ของแมลงเบียน 8 taxa

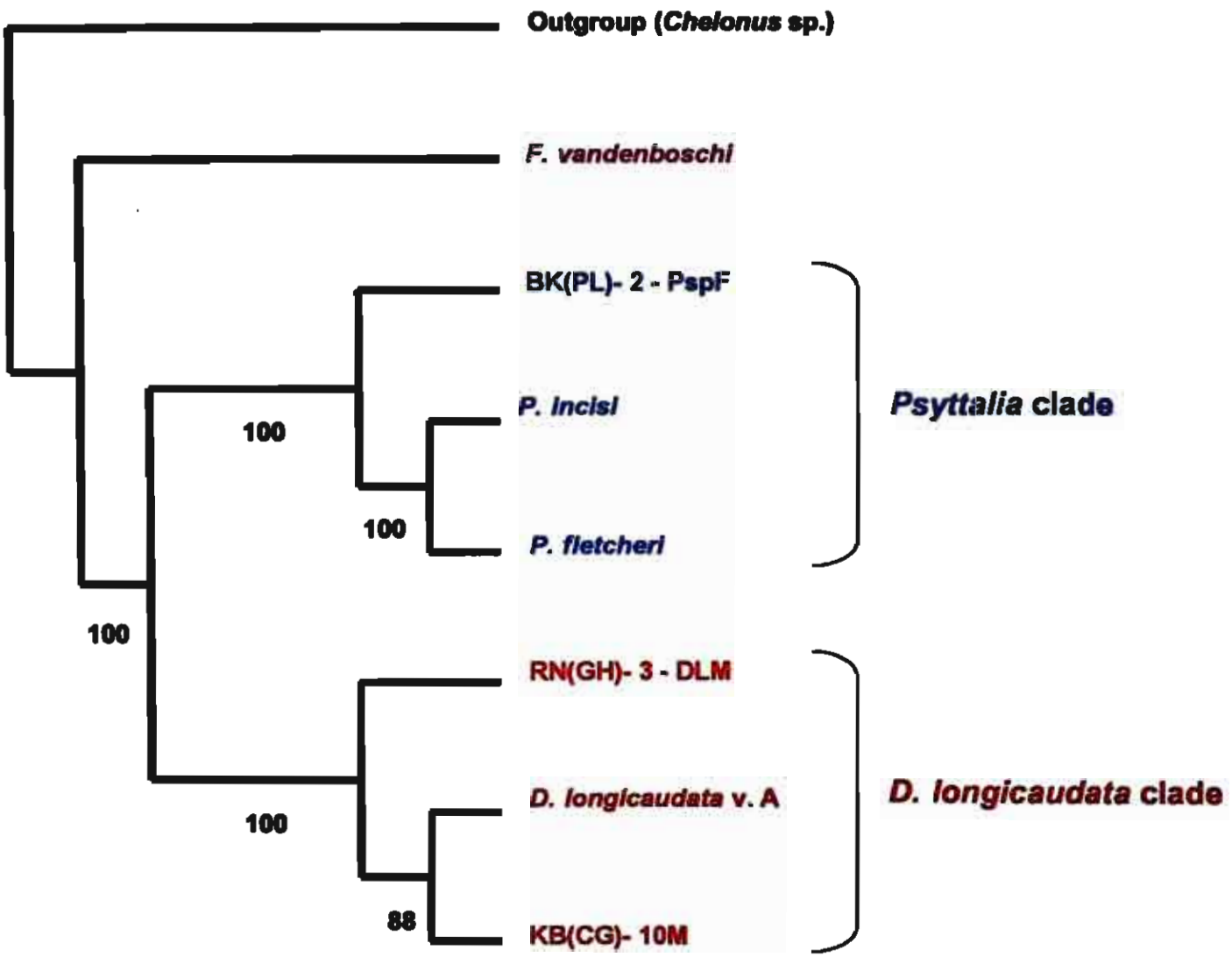
Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8
1 Outgroup	-							
2 *P. incisi*	0.25186	-						
3 *P. fletcheri*	0.24469	0.00908	-					
4 BK(PL)-2-PspF	0.22307	0.11285	0.11289	-				
5 *D. longicaudata* v. A	0.23529	0.20973	0.20762	0.16795	-			
6 KB(CG)-10M	0.24410	0.22595	0.22384	0.18963	0.03466	-		
7 RN(GH)-3-DLM	0.23039	0.21364	0.21153	0.18423	0.05853	0.05791	-	
8 *F. vandenboschi*	0.21547	0.23891	0.23562	0.19740	0.21577	0.21348	0.21374	-

- นำ alignment ที่ได้ไปทำ phylogenetic analysis โดยใช้ PAUP* (version 4.0b10) และทำ statistic analysis (คำนวณ bootstrap values)
  - Phylogenetic analysis: Branch-and-bound search; Addition sequence: furthest; Initial 'MaxTrees' setting = 100; 'MulTrees'option in effect.
  - Bootstrap method with heuristic search: Number of bootstrap replicates = 1000; Starting tree (s) obtained via stepwise addition; Addition sequence: simple; Number of trees held at each step during stepwise addition = 1; Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR); Initial 'MaxTrees' setting = 100; 'MulTrees'option in effect.



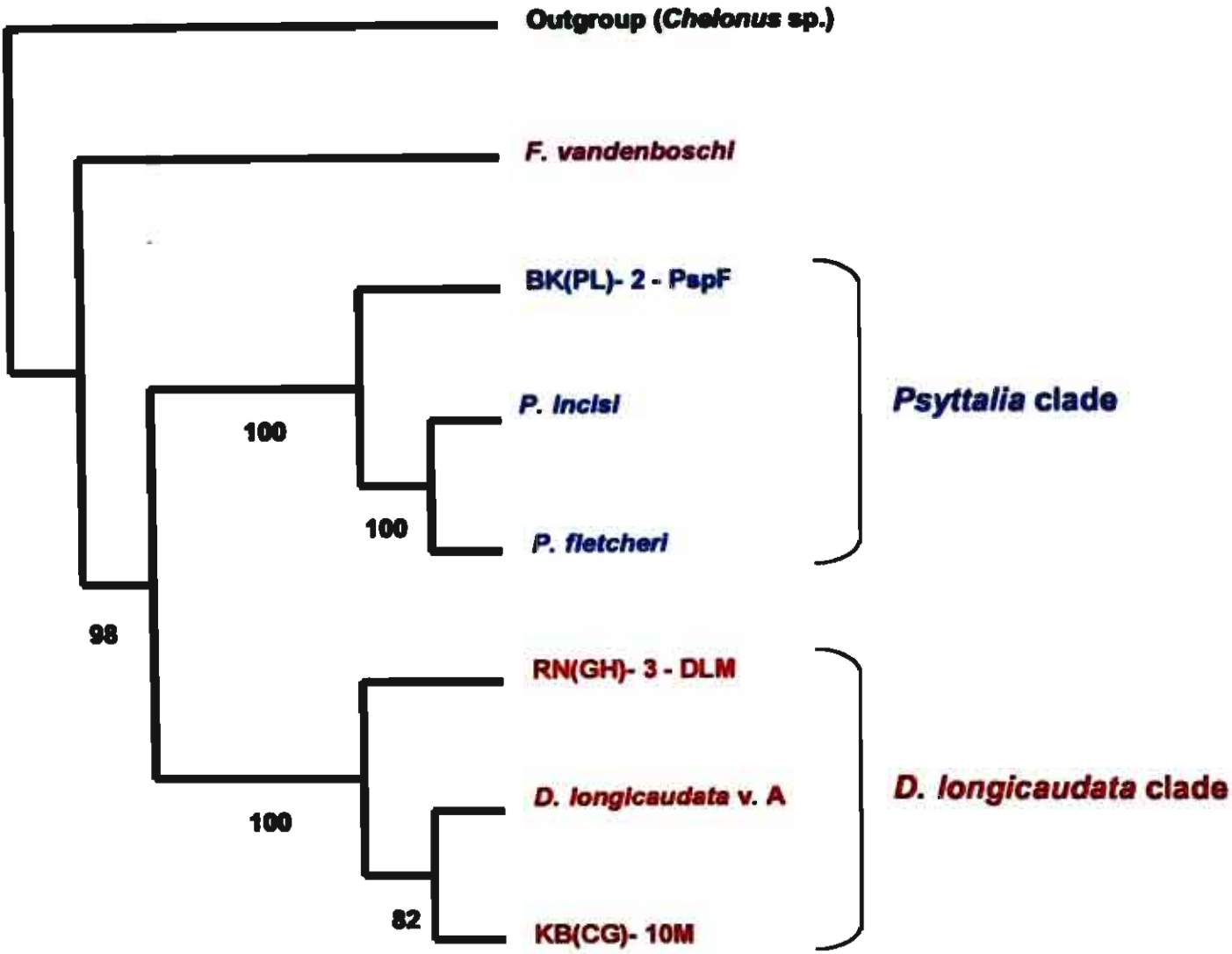
รูปที่ 9 แสดงผล[illegible]hylogenetic analysis ของบริเวณ ITS1 (และบริเวณ 18S บางส่วน)

Descript[illegible] consensus tree: Derived from 2 equally parsimonious trees of length 379 steps; Consiste[illegible]lex (CI) = 0.913; Homoplasy index (HI) = 0.087; Numbers below the branches are boots[illegible]lues (%) of 1000 replicates.



รูปที่ 10 แสดงผลของ phylogenetic analysis ของบริเวณ ITS2 (และบริเวณ 28S บางส่วน)

Descriptions of most parsimonious tree: length 670 steps; Consistency index (CI) = 0.922; Homoplasy index (HI) = 0.078; Numbers below the branches are bootstrap values (%) of 1000 replicates.



รูปที่ 11 แสดงผลของ phylogenetic analysis ของบริเวณ ITS (combined ITS1 + ITS2)

Descriptions of most parsimonious tree: length 1058 steps; Consistency index (CI) = 0.918; Homoplasy index (HI) = 0.082; Numbers below the branches are bootstrap values (%) of 1000 replicates.

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาแมลงเบียนในครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าบริเวณ ITS2 มีความยาวมากกว่าบริเวณ ITS1 ซึ่งตรงข้ามกับผลการศึกษาใน *Drosophila* (Schlötterer *et al.* 1994) ทั้งสองบริเวณมี uniform G+C content (ITS1: 36.3%, ITS2: 36.8) และมี Sequence divergence values ที่ใกล้เคียงกัน (ITS1: 0.5-24%, ITS2: 0.9-25.2%) บริเวณ ITS2 มีจำนวน Parsimony informative sites สูงกว่าบริเวณ ITS1 (ITS1: 13.9%, ITS2: 20.9%)

จากผลการวิเคราะห์บริเวณ ITS1 (รูปที่ 9) บริเวณ ITS2 (รูปที่ 10) และทั้งสองบริเวณ (รูปที่ 11) แสดงให้เห็นว่าบริเวณ ITS1 และ ITS2 สามารถใช้ในการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงเบียนในระดับ intraspecific, interspecific และระดับ intergeneric ได้ โดยที่การวิเคราะห์ให้ผลสอดคล้องกัน และมีค่าทางสถิติ (bootstrap values) ในระดับปานกลางถึงระดับสูง (66-100%) ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้คือ ***D. longicaudata* clade** ประกอบด้วย *D. longicaudata* v. A, KB(CG)-10M และ RN(GH)-3-DLM ซึ่ง *D. longicaudata* v. A มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ KB(CG)-10M มากกว่า RN(GH)-3-DLM phylogenetic trees ที่ได้นี้ยืนยันการศึกษาโดยเทคนิคต่างๆทางสัณฐานวิทยา ที่ทำให้ทราบว่าแมลงเบียนกลุ่ม *D. longicaudata* อาจเป็นกลุ่มชนิดซับซ้อน (complex species) (Wharton & Gilstrap 1983) โดยที่จากการศึกษาของรศ.ดร.สังวรณ์ กิจทวี KB (CG)-10M อาจเป็น *D. longicaudata* v. C หรือ *D. dacusii* และ RN(GH)-3-DLM เป็น *D. longicaudata* v. B นอกจาก *D. longicaudata* clade แล้ว ยังมี ***Psyttalia* clade** ซึ่งประกอบด้วย *P. incisi*, *P. fletcheri* และ BK(PL)-2-PspF ซึ่ง *P. incisi* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *P. fletcheri* มากกว่า BK(PL)-2-PspF ผลการวิเคราะห์ทาง phylogenetic analysis นี้ช่วยสนับสนุนและเพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับตัวอย่าง BK(PL)-2-PspF ว่าเป็น species ในกลุ่ม *Psyttalia* อย่างแน่นอน ถึงแม้ว่าจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา BK(PL)-2-PspF จะมีบางส่วนคล้ายกับกลุ่ม *D. longicaudata* ก็ตาม เป็นที่น่าเสียดายว่า species ในกลุ่ม ***Fopius*** ยังมีน้อยไปสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ดี phylogenetic trees ที่ได้แสดงให้เห็นว่า *F. vandenboschi* ซึ่งเป็น representative ของ *Fopius* นั้นอยู่ใกล้กับ outgroup (*Chelonus* species) ดังนั้น *Fopius* อาจเป็น basal / primitive group ในขณะที่ *D. longicaudata* อาจเป็น advanced group

เอกสารอ้างอิง

Baldwin, B.G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plant: an example from the Compositae. *Molec. Phylogenet. Evol.* **1**: 3-16.

Campbell, C.S., Donoghue, M.J., Baldwin, B.G. & Wojciechowski, M.F. (1995). Phylogenetic relationships in Maloideae (Rosaceae): evidence from sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and its congruence with morphology. *Amer. J. Bot.* **82**: 903-918.

Clausen, C.P. (1978). Tephritidae (Trypetidae, Trupaneidae). In Clausen, C.P. (ed.): *Introduced Parasites and Predators of Arthropod Pests and Weeds: a World Review*, pp. 320-335. US Dep. Agric. Handb. 480.

Dover, G.A. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* **299**: 111-117.

Gerbi, S.A. (1985). Evolution of ribosomal DNA. In MacIntyre, R.J. (ed.): *Molecular Evolutionary Genetics*, pp. 419-517. Plenum: New York.

Gonzalez, I.L., Sylvester, J.E., Smith, T.F., Stambolian, D. & Schmickel, R.D. (1990). Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny. *Molec. Biol. Evol.* **7**: 203-219.

Hillis, D.M. & Davis, S.K. (1988). Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction. *Syst. Zool.* **37**: 63-66.

Kitthawee, S. (2000). Seasonal occurrence of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae) in a guava orchard in central Thailand. *ScienceAsia* **26**: 87-92.

Kitthawee, S., Julsilikul, D., Sharpe, R.G. & Baimai, V. (1999a). Protein polymorphism in natural populations of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Thailand. *Genetica* **105**: 125-131.

Kitthawee, S., Singhapong, S. & Baimai, V. (1999b). Metaphase chromosomes of parasitic wasps, *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Thailand. *Cytologia* **64**: 111-115.

O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.* **22**: 213-220.

Powers, T.O., Todd, T.C., Burnell, A.M., Murray, P.C.B., Fleming, C.C., Szalanski, A.L., Adams, B.A. & Harris, T.S. (1997). The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *J. Nematol.* **29**(4): 441-450.

Schlötterer, C., Hauser, M.-T., von Haeseler, A. & Tautz, D. (1994). Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 11(3): 513-522.

Sutantawong, M. (1991). Fruit flies and their control by the sterile insect technique in Thailand. In Kawasaki, K., Iwahashi, O. & Kaneshiro, K.Y. (eds.): *Proceeding of the International Symposium on the Biology and Control of Fruit Flies*. Ginowan: Japan.

Swofford, D.L. (1998). PAUP*: *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4.0*. Sinauer Associates: Sunderland, MA.

Thompson, J.D., Higgins, D.G & Gibson, T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.

van Herwerden, L., Blair, D. & Agatsuma, T. (1999). Intra- and interindividual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and related species: implications for phylogenetic studies. *Molec. Phylogenet. Evol.* **12**: 67-73.

Varga, J., Tóth, B., Rigó, K., Tèren, J., Hoekstra, R.F. & Kozakiewicz, Z. (2000). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *Fungal Gen. Biol.* **30**(1): 71-80.

Wharton, R.A. (1989). Classical biological control of fruit-infesting Tephritidae. In Robinson, A.S. & Hooper, G. (eds.): *World Crop Pests; Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3B, pp. 303-311. Elsevier: Amsterdam.

Wharton, R.A. & Gilstrap, F.E. (1983). Key to and status of opiine braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus s.l.* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **76**: 721-742.