

*Serangga 9(1-2): 185-199*

*ISSN 1394-5130 © 2004, Centre for Insect Systematics, UKM*

**KAJIAN FILOGENETIK KE ATAS SUBFAMILI  
ICHNEUMONIDAE (HYMENOPTERA) DI  
MALAYSIA BERDASARKAN PENJUJUKAN  
FRAGMEN GEN 16S RIBOSOMAL DNA**

**PHYLOGENETIC STUDY OF THE SUBFAMILY  
ICHNEUMONIDAE BASED ON 16S RIBOSOMAL  
DNA SEQUENCES FRAGMENT**

**M.M. Mohd-Isa, A. Mohd-Adnan, B.F.M. Hoong,  
B.M. Md-Zain\* & A.B. Idris\***

School of Biosciences and Biotechnology

\* School of Environmental and Natural Resource Sciences

Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia,  
43600 Bangi, Selangor, Malaysia

**ABSTRAK**

Kajian ke atas pertalian filogenetik di kalangan subfamili Ichneumonidae di Malaysia telah dilakukan berdasarkan data penjujukan dari 831 pasangan bes fragmen gen 16S rDNA mitokondria. Sebanyak 18 individu yang mewakili empat subfamili Ichneumonidae (Acaenitinae, Metopiinae, Pimplinae dan Cryptinae) telah digunakan manakala dua individu daripada subfamili Braconidae telah digunakan sebagai kumpulan luar. Pohon filogeni telah dibina menggunakan Neighbor Joining (NJ) dan Maximum Parsimony (MP). Kedua-dua analisis menghasilkan

topologi yang hampir sama yang menyokong pembahagian serangga penyengat berasaskan ciri-ciri morfologi.

### ABSTRACT

The study on phylogenetic relationships among subfamilies of Ichneumonidae in Malaysia was conducted based on 831 bp of the mitochondrial 16S rDNA gene. A total of eighteen individuals representing four subfamilies of Ichneumonidae (Acaenitinae, Metopiinae, Pimplinae and Cryptinae) were used while two other individuals of Braconidae were included as the outgroup. The phylogeny tree was constructed by Neighbor Joining (NJ) and Maximum Parsimony (MP). Both analyses resulted in similar topologies that support the subdivision of the Ichneumonids based on morphological characters.

### PENDAHULUAN

Ichneumonidae merupakan famili terbesar dalam order Hymenoptera yang diwakili oleh 39 subfamili dengan anggaran spesies sebanyak 60 000 (Porter 1998; Yu & Horstmann 1997). Walaupun taburannya tertumpu di kawasan temperat utara, ia juga turut ditemui di hutan hujan tropika, artik tundra dan padang pasir (Townes 1970). Ichneumonidae bertindak sebagai parasitoid terhadap kumpulan artropoda terutamanya pada peringkat larva dan pupa. Menyedari keunikan Ichneumonidae sebagai agen kawalan biologi, banyak kajian telah dilakukan untuk memahami sejarah evolusi dan pertalian filogeni di kalangan Ichneumonidae (Gibson 1985; Sharkey & Wahl 1992).

Kajian terdahulu telah menunjukkan bahawa Ichneumonidae mempunyai kelimpahan yang tinggi di rantau Indo-Australia khususnya di Malaysia (Townes et al. 1961). Sebanyak 22 subfamili Ichneumonidae telah direkodkan di Malaysia termasuk dua subfamili yang baru dikenalpasti iaitu Agriotypinae dan Phrudinae (Idris et al. 2001). Walaubagaimanapun, kajian kepelbagaian dan taksonomi subfamili Ichneumonidae tertumpu kepada subfamili Pimplinae (Townes & Chiu 1970; Idris 1999) dan Cryptinae (Nur Azura & Idris 1998) kerana bilangan

spesiesnya yang tinggi. Cryptinae terutamanya merupakan serangga parasitik yang paling umum dan mudah ditemui di kebanyakan hutan di Semenanjung Malaysia disebabkan oleh sifat semulajadinya yang berupaya memparasit pelbagai jenis perumah. Kebanyakan kajian tertumpu di Semenanjung Malaysia disebabkan oleh kekurangan pengumpulan spesies di Sabah dan Sarawak.

Walaupun kajian terhadap famili Ichneumonidae yang berasaskan ciri-ciri morfologi (Townes 1969, 1970; Wahl & Gauld 1998) telah dilakukan sejak 30 tahun yang lalu, pertalian di kalangan ahli-ahlinya masih lagi tidak dapat difahami sepenuhnya (Mardulyn & Whitfield 1999). Kepelbagaian ciri morfologi yang ditonjolkan oleh Ichneumonidae telah menimbulkan pelbagai persoalan dan pertikaian disebabkan darjah keserupaan keserupaan yang tinggi di kalangan ahlinya disamping saiznya yang kecil. Ichneumonidae juga sering dilihat sebagai kumpulan yang sama seperti serangga penyengat yang lain disebabkan oleh kehadiran struktur seperti sengat. Walau bagaimanapun pada kumpulan serangga yang parasitik, struktur tersebut dikenali sebagai ovipositor yang berfungsi untuk menyuntik telur ke dalam badan perumah (Idris et al. 2001). Dengan perkembangan teknologi biologi molekul pada masa kini, pendekatan secara molekul telah mencetuskan dimensi baru terhadap bidang sistematik untuk membantu memahami pengkelasan sedia ada.

Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk memahami hubungan filogeni yang lebih jelas bagi beberapa subfamili Ichneumonidae di Malaysia dengan menggunakan pendekatan molekul berasaskan sebahagian daripada fragmen gen 16S rDNA. Pemilihan gen 16S ini adalah kerana kesesuaiannya sebagai penanda genetik dalam mengkaji pertalian filogenetik di kalangan populasi dan spesies dalam Hymenoptera (Mardulyn & Whitfield 1999; Smith et al. 1999). Hasil daripada kajian ini diharapkan dapat menjelaskan pertalian di kalangan beberapa taksa yang dikelaskan ke dalam subfamili Ichneumonidae.

## BAHAN DAN KAEDAH

### Sampel

Sebanyak 18 sampel yang telah diawet dalam larutan alkohol 80% telah digunakan dalam kajian ini (Jadual 1). Sampel tersebut yang mewakili empat subfamili Ichneumonidae (Acaenitinae, Metopiinae, Pimplinae, dan Cryptinae) telah diperolehi daripada Pusat Sistemik Serangga, Universiti Kebangsaan Malaysia. Pengelasan setiap individu ke peringkat subfamili, genus dan spesies seterusnya adalah mengikut Townes (1969) yang berdasarkan ciri-ciri morfologi seperti saiz, struktur ovipositor, panjang sayap hadapan dan corak areolet pada sayap.

### Tindakbalas Rantaian Polimerase (PCR) dan Penjujukan

Pemencilan DNA dilakukan mengikut kaedah ekstraksi fenol-kloroform (Hillis et al. 1996). Fragmen gen 16S rDNA diamplifikasi secara tindakbalas rantaian polimerase dengan menggunakan sepasang pencetus universal iaitu 16S-F 5' CAC CGT TTT ATC AAA AAC AT 3' dan pencetus 16S-R 5' CGT CGA TTT GAA CTC AAA TC 3'. Campuran komponen untuk tindakbalas rantaian polimerase PCR disediakan dalam isipadu 50ml dan mengikut parameter tindak balas PCR seperti dalam Jadual 2. Produk amplifikasi tersebut seterusnya ditulenkan menggunakan 'QIAquick PCR Purification Kit' (Qiagen, #28106). Hasil dari penulenan ini diperlakukan dengan langkah penjujukan berkisar PCR dan dihantar ke Pusat Analisis Gen dan Teknologi, UKM untuk penjujukan menggunakan alat 'ABI Prism 377 automated sequencer' (Perkin-Elmer Applied Biosystem).

### Analisis Data

Data penjujukan disusun dan disejajarkan bersama jujukan dua individu (No Akses: # AY004042 & AY004043) daripada subfamili Braconidae sebagai kumpulan luar dengan menggunakan program CLUSTAL W (Thompson *et al*, 1994). Pembinaan pohon filogeni melibatkan dua kaedah utama iaitu kaedah matriks jarak ('distance method') dan kaedah ciri ('character state method') (Hillis et al. 1996). Analisis 'Neighbour Joining' (NJ) menggunakan prinsip kaedah jarak dan dilakukan

menggunakan algoritma Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993). Analisis 'Maximum Parsimony' (MP) adalah berdasarkan kaedah ciri dan pencarian pohon secara heuristik sebanyak 1000 replikasi dijalankan secara 'unweighted' menggunakan 'tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping'. Berdasarkan pada topologi pohon yang paling parsimoni, kedua-dua Indeks Konsistensi dan Homoplasi, nilai transisi dan tranversi serta panjang pohon diperoleh. Kesemua analisis data dilakukan menggunakan perisian 'Phylogenetic Analysis Using Parsimony' (PAUP) versi 4.0b8 (Swofford 1999). Kedua-dua kaedah MP dan NJ melibatkan analisis aras keyakinan iaitu 'bootstrap' sebanyak 1000 replikasi untuk mengangkar aras keyakinan bagi setiap nod.

## HASIL DAN PERBINCANGAN

Daripada 831 ciri yang dianalisis dengan menggunakan perisian (PAUP), sebanyak 496 ciri didapati konstan (Jadual 3). Nilai ini menunjukkan bahawa 60% jujukan gen 16S rDNA adalah konservatif. Didapati 224 pasangan bes (26.95%) mempunyai ciri parsimoni berinformatif manakala 111 pasangan bes (13.36%) lagi mempunyai ciri parsimoni tidak berinformatif.

Analisis MP telah dilakukan dengan menggunakan pencarian pohon secara heuristik yang menggunakan pilihan konsensus tegas. Analisis ini menghasilkan sebanyak 11 pohon konsensus dengan panjang pohon sebanyak 643. Indeks Konsistensi (CI) sebanyak 0.46 telah diperoleh manakala Indeks Homoplasi (HI) pula adalah 0.36. Nilai nisbah transisi dan tranversi (TI/TV) adalah 0.5:1 manakala nilai TI/TV pula menunjukkan perbezaan bes berpasangan sebanyak 0.47 yang diperoleh daripada analisa PAUP. Oleh itu, kadar evolusi yang berlaku dalam jujukan gen 16S rDNA adalah tidak begitu tinggi. Namun begitu kajian ini menyokong kesahihan bahawa gen ini merupakan jujukan bes yang mempunyai nilai ciri informatif yang lebih tinggi berbanding gen daripada DNA nuklear (Md-Zain et al. 2002).

Kedua-dua analisis memberikan topologi yang hampir sama yang mengandungi dua klad (Rajah 1 & 2). Klad pertama terdiri daripada kumpulan ektoparasit (Cryptinae, Acaenitinae dan Pimplinae) manakala klad kedua mengandungi kumpulan

endoparasit (Metopiinae). Dua subklad juga didapati dalam subfamili Cryptinae: tribus Hemigasterini yang mengandungi spesies *Hemigaster* dan tribus Mesostenini yang mengandungi spesies Cryptinae yang selebihnya (*Stenarella*, *Rufobosalis*, *Thrybius*, *Goryphus*, *Mesoxanthus*, *Amauromorpha* dan *Synech*). Berbanding dengan persampelan Cryptinae yang lebih luas, sampel daripada subfamili Acaenitinae, Pimplinae dan Metopiinae hanya diwakili oleh satu spesies sahaja.

Walaupun kedua-dua analisis menghasilkan topologi yang hampir sama, terdapat sedikit perbezaan di kalangan spesies dalam kumpulan ektoparasit. Dalam klad pertama, pertalian di antara Acaenitinae (*Phorotrophus*) dan Pimplinae (*Cnatis*) tidak disokong dalam analisis MP manakala analisis NJ menyokong pertalian di antara kedua subfamili tersebut sebagai taksa bersaudara dengan nilai aras keyakinan sebanyak 84%.

Hasil kajian ini jelas menyokong kajian Townes (1969) yang membezakan di antara kumpulan kumpulan ektoparasit (Cryptinae, Acaenitinae dan Pimplinae) dan kumpulan endoparasit (Metopiinae). Perbezaan sifat dan ciri parasitisme didapati berkait rapat dengan struktur ovipositor yang berperanan penting dalam proses oviposisi. Ini adalah kerana kebanyakan kumpulan endoparasit biasanya mempunyai ovipositor yang lebih panjang untuk memudahkan penyuntikan telur pada perumah yang sukar dicapai. Di samping itu, ketiga-tiga subfamili dalam kumpulan ektoparasit ini dilaporkan lebih cenderung untuk memparasit perumah pada peringkat larva (Townes 1969; Le Lannic & Nnon 1999).

Kajian ini juga menyokong pertalian yang wujud di antara subfamili Acaenitinae dan Pimplinae. Acaenitinae dan Pimplinae masing-masing adalah individu yang bersaiz besar dan berwarna-warni berbanding Cryptinae pula adalah jauh lebih kecil. Keupayaan memparasit perumah juga berbeza-beza di mana Acaenitinae dan Pimplinae mempunyai julat perumah yang sangat luas (Gauld et al. 2002) berbanding Cryptinae. Jadual 4 menunjukkan purata jarak genetik di antara subfamili Acaenitinae dan Pimplinae berbanding Cryptinae adalah di antara 12% hingga 14.67%. Di samping itu, kedua-dua subfamili tersebut mempunyai organ tergit yang terpisah pada individu jantan (Gauld

et al. 2002). Walaubagaimanapun pertalian taksa bersaudara di antara subfamili Acaenitinae dan Pimplinae tidak disokong dalam analisis MP. Oleh itu, kajian selanjutnya menggunakan penanda molekul yang lain adalah perlu untuk memastikan hasil tersebut.

Dalam subfamili Cryptinae, kedua-dua tribus Hemigasterini dan Mesostenini adalah monofiletik. Walaupun pertalian ini menyokong data morfologi terdahulu (Townes et al. 1961; Townes 1969) ianya tidak disokong oleh sebarang nilai aras keyakinan dalam pohon NJ. Pertalian yang sama juga turut dilaporkan dalam kajian terdahulu yang berasaskan fragmen gen 28S rRNA (Md-Zain et al. 2002). Secara morfologinya, individu jantan bagi kedua-dua tribus ini mempunyai muka yang berwarna putih atau kuning.

Secara keseluruhannya kedua-dua analisis menyokong pengelasan subfamili Ichneumonidae sedia ada yang berdasarkan ciri morfologi. Data molekul dalam kajian ini didapati memberikan hasil yang memuaskan pada peringkat subfamili. Walaubagaimanapun untuk mendapatkan gambaran yang lebih jelas di kalangan subfamili Ichneumonidae di Malaysia, persampelan yang lebih luas adalah perlu.

## **PENGHARGAAN**

Penyelidikan ini dibiayai dari peruntukan projek IRPA 09-02-02-0111 dan 09-02-02-0017-EA072. Terima kasih ditujukan kepada kakitangan Pusat Sistematik Serangga dan Pusat Analisis dan Teknologi Gen (CGAT), Fakulti Sains dan Teknologi, UKM.

## **RUJUKAN**

Gauld, I.D., Wahl, D.B. & Broad, G.R. 2002. The suprageneric groups of the Pimplinae (Hymenoptera: Ichneumonidae): a cladistic re-evaluation and evolutionary biological study. *Zoological Journal of Linnean Society*. 136: 421-485.

- Gibson, G.A.P. 1985. Some pro-and mesothroracic of structures important for phylogenetic analysis of Hymenoptera, with a review of terms used for structures. *Canadian Entomology*. 117: 1395-1143.
- Hillis, D.M., Moritz, C. & Marble, B.K. 1996. *Molecular Systematic*. Massachusset: Sinauer.
- Idris, A.B. 1999. Catalogue of Pimplinae (Hymenoptera: Ichneumonidae) from Penisular Malaysia. *Pan Pacific Entomologist*. 75(2): 73-81. P.W. 1984 Insect Ecology, John Wiley & Sons, Toronto.
- Idris, A.B., Sajap, A.S., Noor Farikha, H., Yaakob, A.B. and Ruslan, M.Y. 2001. Preliminary Study On Diversity and Abundance of Ichneumonids & Braconids (Insecta: Hymenoptera) at the Ayer Hitam Forest Reserve. *Pertanika Journal of Agricultural Science*. 24(1): 43-48.
- Le Lannic, J. & Ninon, J.P. 1999. Functional morphology of the ovipositor in *Megarhyssa atrata* (Hymenoptera, Ichneumonidae) and its penetration into wood. *Zoomorphology*. 119: 73-99.
- Mardulyn, P. & Whitfield, J.B. 1999. Phylogenetics Signal in the C01, 16S and 28S Genes for Inferring Relationships among Genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): Evidence of a High Diversification Rate in This Group of Parasitoids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12: 282-294.
- Md-Zain, B.M., Idris, A.B., Hoong, B.F.M & Mohd. Adnan, A. 2002. Kajian Awal Sistemik Molekul Subfamili Cryptinae (Hymenoptera : Ichneumonidae) Berdasarkan Penjujukan Fragmen Gen 28S rRNA. *Serangga* 7(1-2): 261-273.



- Nur Azura & Idris, A.B. (1998). New Records of Cryptinae (Hymenoptera: Ichneumonidae) from Malaysia. *Serangga* 4(1): 79-81.
- Porter, C.C. 1998. Gula de los géneros de Ichneumonidae en la región Neantártica del sur de Sudamérica. *Opera Lilloana*. Dlm. Quicke, D.L.J., Fitton, M.G., Notton, D.G., Broad, G.R. & Dolphin, K. (pnyt). Phylogeny of the subfamilies of Ichneumonidae (Hymenoptera): A simultaneous molecular and morphological analysis. *Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and biological Control*. 20: 74-81.
- Sharkey, M.J. & Wahl, D.B. 1992. Cladistics of the Ichneumonoidea (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*. 1: 15-24.
- Smith, P.T., Kambhampati, S., Volkl, W. & Mackauer, M. 1999. A phylogeny of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) inferred from mitochondrial NADH 1 dehydrogenase gene sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 11: 236-245.
- Swofford, D.L. 1999. *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0b8*, Illinois Natural History Survey. Champaign.
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* . 10: 512-526.
- Thompson, J., Higgins, D. & Gibbon, T. 1994. CLUSTAL W improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.

- Townes, H., Townes, M & Gupta V.K 1961. *A catalogue and Reclassification of the Indo-Australian Ichneumonidae*. Memoirs of the American Entomological Institution, number 1. Michigan: The American Entomological Institution.
- Townes, H. 1969. The Genera of Ichneumonidae, 2. *Memoirs of the American Entomological Institution*, no. 12.
- Townes, H. 1970. The genera of Ichneumonidae 2. *Memoirs of the American Entomological Institute*. 13: 1-307. Yu, D.S. & Hortsman, K. 1997. *Memoirs of the American Entomological Institute*. The American Entomological Institute.
- Townes, H., & Chiu, S. 1970. The Indo-Australian species of *Xantopimpla* (Ichneumonidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 14: 1-367. The American Entomological Institute.
- Wahl, D.B. & Gauld, I.D. 1998. The cladistics and higher classification of the Pimpliformes (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Systematic Entomology*. 23: 299-303.
- Yu, D.S. & Hortsman, K. 1997. *Memoirs of the American Entomological Institute*. The American Entomological Institute.

**Jadual 1** Pencirian individu yang digunakan dalam kajian ini.

No	Subfamili	Spesies	Lokasi	Kod
1	Acaenitinae	<i>Phorotrophus</i> sp.	Hutan Bangi (UKM)	S04
2		<i>Phorotrophus</i> sp.	Hutan Bangi (UKM)	S05
3	Metopiinae	<i>Hypsicera</i> sp.	Hutan Bangi (UKM)	S19
4		<i>Hypsicera</i> sp.	Hutan Bangi (UKM)	S09
5		<i>Hypsicera</i> sp.	Hutan Bangi (UKM)	S10
6	Pimplinae	<i>Cnastis</i> sp.	Wang Kelian, Perlis	S03
7		<i>Cnastis</i> sp.	Wang Kelian, Perlis	S31
8	Cryptinae	<i>Amauromorpha</i> sp.	Wang Kelian, Perlis	006
9		<i>Goryphus mesoxanthus</i>	Kuala Lompat, Pahang	034
10		<i>Goryphus</i> sp.	Kuala Lompat, Pahang	026
11		<i>Goryphus</i> sp.	Kuala Lompat, Pahang	027
12		<i>Stenarella</i> sp.	Kuala Lompat, Pahang	C08
13		<i>Synech</i> sp.	Hutan Bangi (UKM)	C27
14		<i>Thrybius</i> sp.	Hutan Bangi (UKM)	C11
15		<i>Hemigaster</i> sp.	Kuala Lompat, Pahang	C13
16		<i>Hemigaster</i> sp.	Kuala Lompat, Pahang	C14
17		<i>Goryphus rufobosallis</i>	Kuala Lompat, Pahang	GR1
18		<i>Goryphus rufobosallis</i>	Kuala Lompat, Pahang	GR2

**Jadual 2** Campuran tindakbalas dan aturcara dalam program PCR.

<b>Komponen tindakbalas</b>	<b>Isipadu komponen PCR (ml)</b>	<b>Kepekatan komponen PCR</b>
ddH <sub>2</sub> O	32.5	-
Penimbal 10X	5	1X
dNTPs	1	800 mM
Templat DNA	2	50-120 ng
Pencetus 16S-F	0.5	10 pmol
Pencetus 16S-R	0.5	10 pmol
MgCl <sub>2</sub>	8.0	3 mM
<i>Taq</i> polymerase	0.5	2.5 unit

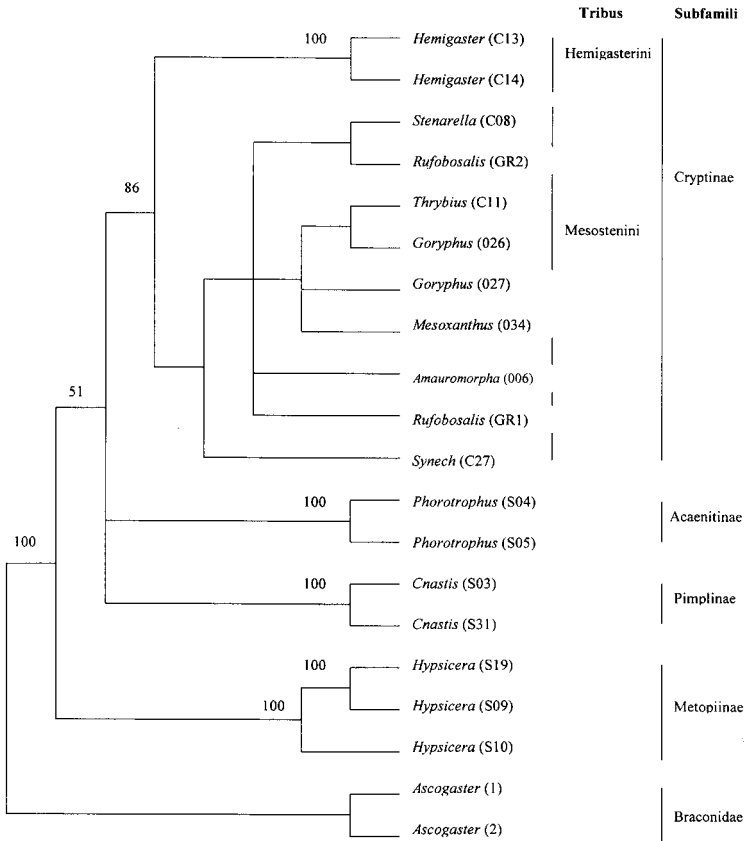
<b>Aturcara</b>	<b>Bilangan kitaran</b>	<b>Suhu</b>	<b>Masa</b>
Penyahhasilan awal	1	94 °C	4 minit
Penyahhasilan penyepuhan	35	94 °C	50 saat
pemanjangan	49 °C	2 minit	
Pemanjangan akhir	72 °C	1.5 minit	
	1	72 °C	9 minit

**Jadual 3** Ringkasan variasi penjujukan 16S rDNA setiap taksa.

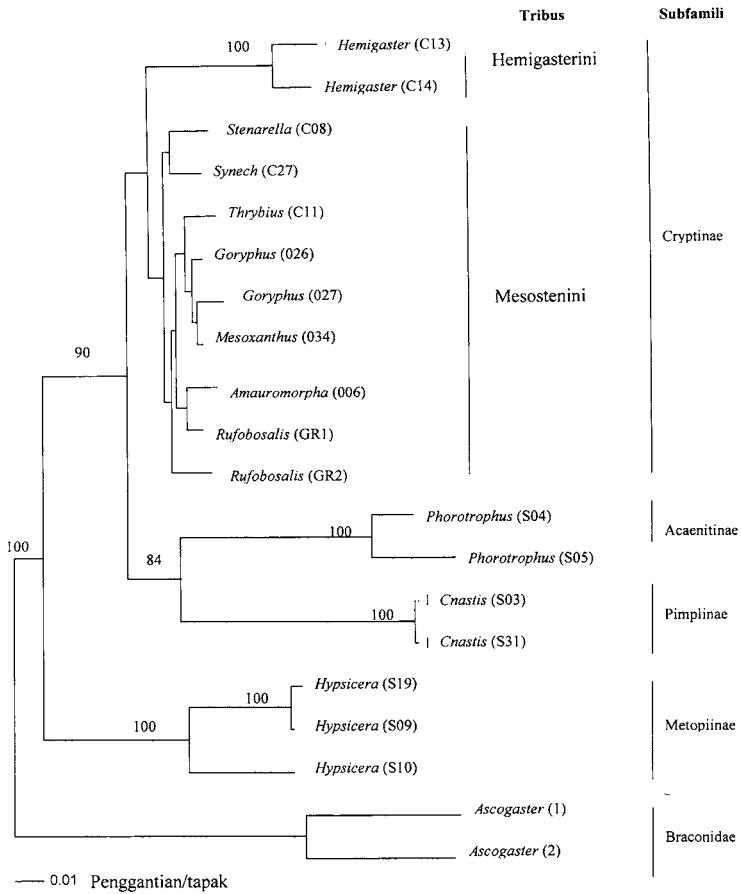
<b>Jumlah ciri yang dikaji</b>	<b>831</b>
Ciri konstan	496
Ciri parsimoni tidak berinformasi	111
Ciri parsimoni berinformasi	224
% Ciri parsimoni berinformasi	26.95 %
Nisbah TI/TV yang dikira dari perbezaan bes berpasangan	0.47
Panjang pohon	643

**Jadual 4** Purata peratusan nilai jarak pencapahan genetik antara 4 subfamili Ichneumonidae dan Braconidae berdasarkan Tamura-Nei parameter (Tamura & Nei 1993).

<b>Subfamili</b>	<b>Cryptinae</b>	<b>Acaeni- tinae</b>	<b>Pimpli- nae</b>	<b>Metopi- nae</b>	<b>Braconi- dae</b>
1 Cryptinae	-				
2 Acaenitinae	14.67	-			
3 Pimplinae	12.01	14.64	-		
4 Metopiinae	15.71	22.41	15.71	-	
5 Braconidae	19.81	31.13	27.16	25.10	-



**Rajah 1** Pohon filogeni maksimum parsimoni yang dihasilkan secara heuristik. Nilai aras keyakinan ditunjukkan di atas ranting pohon filogeni.



**Rajah 2** Pohon filogeni ‘Neighbor Joining’ yang dihasilkan dengan algoritma ‘Tamura-Nei’. Nilai aras keyakinan ditunjukkan di atas ranting pohon filogeni.