

Thesis Title	Genetics and Mating Behavior of <i>Anopheles minimus</i> Species C and Species E in Laboratory	
Author	Mr. Damrongpan Thongwat	
M.S.	Parasitology	
Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Chairman
	Assoc. Prof. Wej Choochote	Member
	Dr. Wannapa Suwonkerd	Member

ABSTRACT

Two sibling species (A and C) of the *Anopheles minimus* complex have been well documented in Thailand, Vietnam and China. Recently, *An. minimus* species E has been described from the Ryukyu Archipelago, Japan, based on crossing experiments (A and E), DNA analysis of the D3 rDNA, mitotic karyotypes and some morphological characteristics. The present study reports the hybridization between species C and E in order to support the specific status of species E. Crossing experiments between the progeny of DNA-identified *An. minimus* species C from Kanchanaburi Province (KAN strain), Thailand, and the laboratory ISG strain (species E) from Ishigaki Island revealed postzygotic genetic incompatibility. Although hybrid progenies were obtained from both directions of crosses, the hybrid males from C female X E male cross were completely sterile with atrophied testes and accessory glands, whereas the ovaries of hybrid females looked normal. In addition, the external terminalia of these males was never completely rotated and they failed to copulate by

artificial mating. In E female x C male crosses, the hybrid males showed partially sterile testes in which most spermatozoa were abnormal (enlarged head) and inactive, whereas the ovaries of hybrid females looked normal. The polytene chromosomes of F₁ hybrid larvae from species C female x species E male showed fixed heterozygous inversion on 3L arm whereas those of F₁ hybrids from species E female x species C male showed partial asynapsis on 2R, 3R and 3L arms and fixed heterozygous inversion on 3R arm. The hybrid males failed to inseminate with KAN and ISG females, but had a little success with the hybrid females producing F₂ hybrids. However, the egg hatching rate, the pupation rate and the adult emergence rate were significantly low and the testes of the F₂ hybrid males were partially sterile with abnormal spermatozoa. When the F₁ hybrid females from both directions of crosses were backcrossed with either KAN or ISG males, they produced male progenies having abnormal spermatozoa.

Biological studies revealed that the larval period of species C was significantly shorter than species E. The longevity of females of species C was a bit longer than species E. By contrast, species C males had shorter longevity than species E males. In addition, *An. minimus* species C has no stenogamous behavior, but the species E males had a little success in inseminating with species C females. This study has provided strong evidence of genetic incompatibility between *An. minimus* species C and E, supporting previous data that species E is clearly a distinct species in the *An. minimus* complex.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	พันธุศาสตร์และพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของยุง ก้นปล่องชนิด <i>Anopheles minimus</i> Species C และ Species E ในห้องปฏิบัติการ	
ชื่อผู้เขียน	นายดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์	
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สาขาวิชาปรสิตวิทยา	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ปรัชญา สมบูรณ์	ประธานกรรมการ
	รศ. เวช ชูโชติ	กรรมการ
	ดร. วรณภา สุวรรณเกิด	กรรมการ
	บทคัดย่อ	

ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles minimus* เป็นยุงชนิดซับซ้อน ประกอบด้วยสมาชิกอย่างน้อยสองชนิด (A และ C) ที่พิสูจน์แล้ว ในประเทศไทย เวียดนาม และจีน จากการศึกษาล่าสุด มีรายงานพบยุง *An. minimus* E จากหมู่เกาะ Ryukyo ประเทศญี่ปุ่น ด้วยหลักฐานทางการผสมข้ามพันธุ์ (A กับ E) การวิเคราะห์ลำดับ DNA ที่ตำแหน่ง D3 rDNA การศึกษา mitotic karyotypes และ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ การศึกษาครั้งนี้เป็นการรายงานการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างยุง *An. minimus* C และ E เพื่อที่จะสนับสนุนสถานะของ *An. minimus* E ในการเป็นยุงชนิดใหม่ในสมาชิก

ของ *An. minimus* complex โดยการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างยุง *An. minimus* C (สายพันธุ์ KAN) จากจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งได้รับการจำแนกชนิดโดยหลักฐานทาง DNA กับ สายพันธุ์ ISG (species E) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการที่นำมาจากเกาะ Ishigaki ผลการศึกษาพบว่ามีความไม่เข้ากันทางพันธุกรรมระหว่างยุงทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามสามารถพบลูกผสมเกิดขึ้นได้จากการผสมพันธุ์กันของยุงทั้งสอง โดยลูกผสมเพศผู้ที่เกิดจากการผสมระหว่าง C เพศผู้ และ E เพศเมียเป็นหมันโดยสมบูรณ์ มีอวัยวะ และ accessory glands แคระแกร็น ในขณะที่ลูกผสมเพศเมียมีรังไข่ลักษณะปกติ นอกจากนี้อวัยวะเพศภายนอกของลูกผสมเพศผู้มีการหมุนที่ไม่สมบูรณ์ และไม่สามารถผสมพันธุ์กับเพศเมียได้ด้วยวิธีผสมเทียม ส่วนในลูกผสมเพศผู้ที่เกิดจากการผสมระหว่าง E เพศผู้ และ C เพศเมีย มีอวัยวะที่เป็นหมันบางส่วน โดยมีอสุจิที่ผิดปกติ (หัวโต) และเคลื่อนไหวช้า ในขณะที่ลูกผสมเพศเมียมีรังไข่ลักษณะปกติ จากการศึกษา polytene โครโมโซม พบว่า ลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง C เพศผู้ และ E เพศเมีย พบ fixed heterozygous inversion ที่โครโมโซม 3L ส่วนลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง E เพศผู้ และ C เพศเมียพบ partial asynapsis ที่โครโมโซม 2R 3R และ 3L และยังพบ fixed heterozygous inversion ที่ปลายโครโมโซม 3R ลูกผสมเพศผู้ที่เกิดขึ้นไม่สามารถผสมพันธุ์กับยุงรุ่นพ่อแม่ทั้ง KAN และ ISG เพศเมีย อย่างไรก็ตามลูกผสมเพศผู้บางส่วนประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์กับลูกผสมเพศเมีย และสามารถสร้างลูกผสมรุ่นที่ 2 แต่มีอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนจากไข่ที่ต่ำ และอวัยวะของลูกผสมเพศผู้รุ่นที่ 2 เป็นหมันบางส่วน โดยมีอสุจิที่ผิดปกติ เมื่อลูกผสมเพศเมียผสมพันธุ์กับรุ่นพ่อแม่ทั้ง KAN และ ISG เพศผู้ พบลูกผสมเพศผู้ที่มีอสุจิผิดปกติ

จากการศึกษาด้านชีววิทยาพบว่า ระยะเวลาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนของ C สั้นกว่า E อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ C เพศเมีย มีอายุขัยยาวกว่า E เล็กน้อย ในทางกลับกัน เพศผู้ของ C มี

อายุขัยสั้นกว่า E และนอกจากนี้ *An. minimus* C ไม่มีพฤติกรรมการผสมพันธุ์ในกรง ในขณะที่เพศผู้ของ E บางส่วน สามารถผสมพันธุ์กับ C เพศเมียได้ การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงความไม่เข้ากันทางพันธุกรรมระหว่าง *An. minimus* C และ E ซึ่งสนับสนุนว่า *An. minimus* E เป็นยุงชนิดใหม่ใน *An. minimus* complex

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University