

Thesis Title	Genetic Study of <i>Anopheles aconitus</i>	
Author	Miss Anuluck Junkum	
Degree	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Wej Choochote	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Member
	Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Member
	Assist. Prof. Dr. Benjawan Pitasawat	Member
	Assist. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Member
	Assist. Prof. Dr. Narissara Jariyapan	Member

ABSTRACT

Iso-female lines (isolines) of *Anopheles aconitus* collected from Mae Hong Son, Phetchaburi and Chiang Mai provinces were successfully identified to karyotypic forms. The results of identification revealed that *An. aconitus* Form B (X_1, X_2, Y_2) was obtained from 4 and 48 isolines in Phetchaburi and Chiang Mai provinces, respectively, and Form C (X_1, X_2, Y_3) was recovered from 3 and 41 isolines in Mae Hong Son and Chiang Mai provinces, respectively.

Morphological study of the major diagnostic points of 4th instar larvae, pupae and adult females demonstrated that all of them generally agreed with the characteristics that were described by Harrison (1980). The combined characteristics plotted on a scatter diagram between coeloconic sensillae and palpal ratios in *An. aconitus* Form B and C could separate *An. aconitus* Form B and C at a 20% level.

Comparative morphometric and morphological studies of eggs under scanning electron microscope (SEM) were undertaken in the three strains of two karyotypic forms of *An. aconitus*, i.e., Form B (Chiang Mai and Phetchaburi strains) and Form C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains). Morphometric examination revealed the intraspecific variation with respect to the float width: Form C, Chiang Mai strain ($36.77 \pm 2.30 \mu\text{m}$), was equal to Form B, Chiang Mai strain ($38.49 \pm 2.78 \mu\text{m}$), and Form B, Phetchaburi strain ($39.06 \pm 2.37 \mu\text{m}$), but broader than Form C, Mae Hong Son strain ($32.40 \pm 3.52 \mu\text{m}$), and the number of posterior tubercles on the deck: Form B, Phetchaburi strain (2.40 ± 0.52), was equal to Form B, Chiang Mai strain (2.70 ± 0.82), but less than Form C, Chiang Mai strain (3.10 ± 0.32), and Form C, Mae Hong Son strain (3.20 ± 0.42), whereas the surface topography of eggs among the three strains of two karyotypic forms were morphologically similar.

When comparing band to band on the same arm of ovarian nurse cell polytene chromosomes of *An. aconitus* Form B (Phetchaburi strain: 4 isolines) and C (Mae Hong Son strain: 3 isolines, Chiang Mai strain: 20 isolines) to the standard chromosome mapping of *An. aconitus* Form B (Chiang Mai strain: 20 isolines), no major chromosomal rearrangements that related to the karyotype variations were demonstrated.

The investigations on allelic frequencies of 4th instar larvae and adult females of 3 (Form C: Mae Hong Son strain), 4 (Form B: Phetchaburi strain), 41 (Form C: Chiang Mai strain) and 48 (Form B: Chiang Mai strain) isolines suggested that *An. aconitus* Form B and C of all strains have similar allelic frequencies. This was

observed at 10 isoenzymes 16 loci in 4th instar larvae, and 11 isoenzymes 13 loci in adult females.

Hybridization tests among the four laboratory-raised isolines of *An. aconitus* Form B (Chiang Mai and Phetchaburi strains) and C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains) were employed by induced copulation. The results of crosses indicated that they were genetically compatible, providing viable progeny and completely synaptic salivary gland polytene chromosomes.

The complete sequences of rDNA internal-transcribed spacer two (ITS2) and partial sequences of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I and II (COI and COII) from genomic DNA of 6 isolines in each *An. aconitus* Form B and C were identified. Total sequence lengths (ITS2+COI+COII) of *An. aconitus* isolines varied from 1550bp to 1556bp. Conspecific relationships between the two *An. aconitus* forms were well supported by low values of intraspecific distances (ranging from 0.1% to 1.0%) and genetic differentiation (d_{xy} : 0.01322) between the two forms.

Four laboratory-raised colonies of two karyotypic forms of *An. aconitus*, *i.e.*, Form B (Chiang Mai and Phetchaburi strains) and C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains), were experimentally infected with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* using an artificial membrane feeding technique, and they were dissected 8 and 12 days after feeding for oocyst and sporozoite rates, respectively. The results revealed that *An. aconitus* Form B and C were susceptible to *P. falciparum* and *P. vivax*, *i.e.*, Form B (Chiang Mai and Phetchaburi strains/*P. falciparum* and *P. vivax*) and Form C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains/*P. vivax*). Comparative statistical analyses of the

oocyst rates, average number of oocysts per infected midgut and sporozoite rates among all strains of *An. aconitus* Form B and C to the ingroup control vectors, *An. minimus* A and C, mostly exhibited no significant differences, confirming the high potential vector of the two *Plasmodium* species. The sporozoite-like crystals found in the median lobe of the salivary glands, which could be a misleading factor in the identification of true sporozoites in salivary glands, were found in both *An. aconitus* Form B and C.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาพันธุศาสตร์ของยุงก้นปล่องชนิด <i>Anopheles aconitus</i>	
ผู้เขียน	นางสาวอนุตม์กมล จันทร์คำ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. เวช ชูโชติ	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. อุดม ชัยทอง	กรรมการ
	รศ. ดร. ปรัชญา สมบูรณ์	กรรมการ
	ผศ. ดร. เบญจวรรณ ปีตาสวัสดิ์	กรรมการ
	ผศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวง โกศล	กรรมการ
	ผศ. ดร. นริศรา จริยะพันธุ์	กรรมการ
	บทคัดย่อ	

ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles aconitus* ที่จับมาจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน เพชรบุรี และ เชียงใหม่ โดยนำมาเลี้ยงแบบ iso-female lines (isolines) เพื่อวินิจฉัยรูปแบบคาริโอไทป์ จากการวินิจฉัยยุงทั้งหมด 96 isolines พบคาริโอไทป์รูปแบบ B (X_1, X_2, Y_2) จากจังหวัดเพชรบุรี 4 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ 48 isolines รูปแบบ C (X_1, X_2, Y_3) จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 isolines และจาก จังหวัดเชียงใหม่ 41 isolines

การศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาในตัวอ่อนระยะที่ 4, ระยะคักเค้ และตัวเต็มวัยเพศเมียของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่แตกต่างกัน และยังเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Harrison ในปี ค.ศ. 1980 จากการวิเคราะห์กราฟแสดง

การกระจายตัวของ coeloconic sensillae ที่สัมพันธ์กับ palpal ratio ในยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C พบว่าสามารถใช้ในการแยกยุงทั้งสองรูปแบบออกจากกันได้ร้อยละ 20

ผลการศึกษเปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของไข่ยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C จากทั้งสามสายพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกวด พบว่ามีความแปรปรวนในความกว้างของ float และจำนวน posterior tubercles บน deck กล่าวคือ ยุง *An. aconitus* รูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ (36.77 ± 2.30 ไมโครเมตร) มีความกว้างของ float เท่ากับ รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ (38.49 ± 2.78 ไมโครเมตร) และ รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี (39.06 ± 2.37 ไมโครเมตร) แต่กว้างกว่ารูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน (32.40 ± 3.52 ไมโครเมตร) และจำนวน posterior tubercles บน deck ของรูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี (2.40 ± 0.52) เท่ากับ รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ (2.70 ± 0.82) แต่น้อยกว่ารูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ (3.10 ± 0.32) และ รูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน (3.20 ± 0.42) สำหรับผิวของไข่ยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C จากทั้งสามสายพันธุ์นั้น พบว่ามีรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงกัน

ผลการศึกษเปรียบเทียบแถบสีบนแขนของโพลีทิน โครโมโซมที่ได้จากเซลล์รังไข่ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี 4 isolines และรูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 isolines และสายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ 20 isolines กับโครโมโซมมาตรฐานของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ ไม่พบความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของแถบสีบนแขนของโครโมโซมที่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบของคาริโอไทป์

การศึกษาเพื่อหาความแตกต่างทางไอโซเอนไซม์ในตัวอ่อนระยะที่ 4 และตัวเต็มวัยเพศเมีย ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี 4 isolines สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ 48 isolines รูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 isolines และสายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ 41 isolines โดยใช้เอนไซม์ทั้งหมด 19 ชนิด เพื่อเปรียบเทียบความถี่ของแอลลีล พบว่าไอโซเอนไซม์ 10 ชนิด 16 โลไซ ในตัวอ่อนระยะที่ 4 และไอโซเอนไซม์ 11 ชนิด 13 โลไซ ในยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย ของยุง *An. aconitus* ทั้งสองรูปแบบมีความคล้ายคลึงกัน

จากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างยุง *An. aconitus* รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดเชียงใหม่ และรูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอนและจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ายุงทั้งสองรูปแบบให้ลูกผสมที่แข็งแรง และมีแขนของโพลีทินโครโมโซมทุกแขนที่ได้จากต่อมน้ำลายของตัวอ่อนระยะที่ 4 รุ่นลูกผสมที่จับคู่กันอย่างเนบสนิท

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง ITS2 และไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง COI และ COII ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C รูปแบบละ 6 isolines พบว่ายุง *An. aconitus* ทั้งสองรูปแบบจากสามสายพันธุ์ มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ (ITS2+COI+COII) ขนาด 1550 ถึง 1556 คู่เบส และมี intraspecific distance (0.1-1.0%) และ gene differentiation (d_{xy} : 0.01322) ต่ำมาก ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้ได้สนับสนุนความสัมพันธ์ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C เป็นแบบ conspecific

ได้นำยุง *An. aconitus* รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดเชียงใหม่ และรูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอนและจังหวัดเชียงใหม่ ที่เลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ มาศึกษา

การยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* โดยวิธีการกินเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียผ่านเมมเบรน และทำการผ่าเยื่อเพื่อหาอัตราการติดเชื้อระยะ โอโอซิสต์และสปอโรซอยต์ หลังจากยุงกินเลือดแล้วเป็นเวลา 8 และ 12 วันตามลำดับ พบว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C มีความสามารถในการยอมรับเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยที่ยุงรูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่และเพชรบุรีมีความสามารถในการยอมรับเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ส่วนยุงรูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่และแม่ฮ่องสอนมีความสามารถในการยอมรับเชื้อ *P. vivax* เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อของ โอโอซิสต์ ค่าเฉลี่ยของ โอโอซิสต์ต่อลำไส้ ส่วนกลางที่ติดเชื้อ และอัตราการติดเชื้อของสปอโรซอยต์ โดยเปรียบเทียบกับยุงพาหะในกลุ่มเดียวกัน คือ *An. minimus* A และ C พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลจากการศึกษาได้ยืนยันว่ายุง *An. aconitus* ทั้งสองรูปแบบมีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิดได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C มีคริสตัลที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับสปอโรซอยต์ในพุงกลางของต่อมน้ำลาย โดยอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การวินิจฉัยสปอโรซอยต์ในต่อมน้ำลายยุงผิดพลาดได้