

หัวข้อวิทยานิพนธ์	พันธุศาสตร์ของยุงก้นปล่องชนิด <i>Anopheles paraliae</i>	
ผู้เขียน	นายกฤษณะ ตาอ้าย	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	อ.ดร. อติพร แซ่อึ้ง รศ.ดร. อุดม ชัยทอง รศ.ดร. ผ่องศรี ทิพวง โกศล รศ.ดร. นริศรา จริยะพันธุ์ ผศ.ดร. อนุลักษณ์ จันทร์คำ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles paraliae* เป็นยุงก้นปล่องในกลุ่มไฮร์คานัส มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางตามแนวชายฝั่งทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย ประเทศมาเลเซีย (คาบสมุทรมลายู รัฐซาบาห์และซาราวัก) ประเทศบรูไน และประเทศเวียดนาม ยุงชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยุงตัวเต็มวัยเพศเมียที่คล้ายคลึงกับยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles lesteri* และมีการกระจายตัวในประเทศแถบอบอุ่น แต่ยุงทั้ง 2 ชนิดนี้มีแหล่งเพาะพันธุ์ของระยะตัวอ่อนที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม สถานะที่แท้จริงระหว่างยุงก้นปล่อง *An. paraliae* และ *An. lesteri* ยังไม่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้ยังไม่เคยมีการรายงานถึงหลักฐานทางเซลล์พันธุศาสตร์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ที่หลากหลายของยุงก้นปล่อง *An. paraliae* ดังนั้น การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาความใกล้ชิดทางด้านพันธุกรรมระหว่างรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ในยุง *An. paraliae* และระหว่างยุง *An. paraliae* กับยุง *An. lesteri* อย่างเป็นระบบ โดยอาศัยการทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์และข้ามรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ที่สัมพันธ์กับความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS2 และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COI และ COII

ทำการจับยุงก้นปล่อง *An. paraliae* จากภาคสนามโดยใช้โคเป็นเหยื่อล่อจาก 4 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี จังหวัดราชบุรี จังหวัดสงขลา และ จังหวัดนครศรีธรรมราช มาเลี้ยงแบบโคลนเดี่ยว จำนวนทั้งสิ้น 21 ไอโซไลน์ ผลจากการวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์พบโครโมโซม X จำนวน 3 รูปแบบ (X_1, X_2, X_3) และโครโมโซม Y จำนวน 5 รูปแบบ ($Y_1, Y_2, Y_3,$

Y_4, Y_5) โดยกำหนดให้เป็นรูปแบบ A (X_3, Y_1), รูปแบบ B (X_1, X_2, X_3, Y_2) รูปแบบ C (X_3, Y_3) รูปแบบ D (X_1, X_2, X_3, Y_4) และรูปแบบ E (X_3, Y_5) ตามลักษณะของโครโมโซม Y โดยรูปแบบ A พบที่จังหวัดสงขลา รูปแบบ B พบที่จังหวัดราชบุรี จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสงขลา รูปแบบ C พบที่จังหวัดจันทบุรี รูปแบบ D พบที่จังหวัดราชบุรี และจังหวัดสงขลา และรูปแบบ E พบที่จังหวัดราชบุรี ผลการทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์และข้ามรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ระหว่างยุงจำนวน 7 ไอโซไลน์โคโลนี ที่เป็นตัวแทนของ 5 รูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ของยุงก้นปล่อง *An. paraliae* พบว่ายุงทั้ง 5 รูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์มีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ โดยให้ยุงลูกผสมรุ่นที่ 1 และ 2 ที่แข็งแรง และมีโพลีทินโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายที่เข้าคู่แบบชิดกันตลอดสายในโครโมโซม ผลการทดลองนี้ ถูกสนับสนุนด้วยค่าความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS2 และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COI และ COII ในระดับต่ำ (ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรม = 0.000-0.002) จึงกล่าวได้ว่ายุงชนิดนี้ สามารถพบรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ที่แตกต่างกันถึง 5 รูปแบบได้ในประชากรธรรมชาติ

การศึกษาเพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างยุงก้นปล่อง *An. lesteri* สายพันธุ์ประเทศเกาหลี และยุงก้นปล่อง *An. paraliae* สายพันธุ์ประเทศไทย จากการนำยุงก้นปล่อง *An. lesteri* และยุงก้นปล่อง *An. paraliae* จำนวน 3 และ 5 ไอโซไลน์โคโลนี ตามลำดับ มาทำการทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์และการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS2 และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COI และ COII ผลการทดลองที่ได้จากการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์และการผสมพันธุ์ของยุงลูกผสมรุ่นที่ 1 ระหว่างยุงก้นปล่อง *An. lesteri* และยุงก้นปล่อง *An. paraliae* บ่งชี้ว่า ยุงทั้งสองชนิดมีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ โดยให้ยุงลูกผสมที่แข็งแรง และมีโพลีทินโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายที่เข้าคู่แบบชิดกัน โดยไม่เกิดอินเวอร์ชันตลอดสายในทุกแขนโครโมโซม และการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายุงทั้งสองชนิดมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอและไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS2, COI และ COII ในระดับต่ำ คือ 0.040, 0.007-0.017 และ 0.008-0.011 ตามลำดับ ดังนั้น ผลการทดลองนี้สนับสนุนว่ายุงก้นปล่อง *An. paraliae* เป็นยุงชนิดเดียวกันกับยุงก้นปล่อง *An. lesteri*

Thesis Title	Genetics of <i>Anopheles paraliae</i>	
Author	Mr. Kritsana Taai	
Degree	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
Advisory Committee	Dr. Atiporn Saeung	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Narissara Jariyapan	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Anuluck Junkum	Co-advisor

ABSTRACT

Anopheles paraliae belongs to the Hyrcanus Group that is distributed widely along the coastal regions of southern Thailand, Malaysia (Malaysian peninsular, Sabah and Sarawak states), Brunei and Vietnam. The morphological characteristics of adult females of this species are similar to those of *Anopheles lesteri*, which are distributed in Palaearctic regions, but their immature habitats are obviously different. However, the true species status between *An. paraliae* and *An. lesteri* is still unclear. Furthermore, the cytological evidence and the genetic proximity among the karyotypic variants of *An. paraliae* has never been reported. Therefore, a systematic investigation of genetic proximity among karyotypic forms of *An. paraliae*, and between *An. paraliae* and *An. lesteri* were carried out in this study, based on cross-mating experiments related to DNA sequence variations of ribosomal DNA (second internal transcribed spacer, ITS2) and mitochondrial DNA (cytochrome *c* oxidase subunit I and II, COI and COII).

A total of twenty-one isoline colonies of *An. paraliae* were established from wild-caught females collected from cow-baited traps in 4 provinces of Thailand, i.e., Chanthaburi, Ratchaburi, Songkhla and Nakhon Si Thammarat. The result of metaphase karyotype identification revealed 3 types of X (X₁, X₂, X₃) and 5 types of Y (Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅) chromosomes, and they were designated as Forms A (X₃, Y₁), B (X₁, X₂, X₃,

Y₂), C (X₃, Y₃), D (X₁, X₂, X₃, Y₄) and E (X₃, Y₅), based on Y chromosome. Form A was found in Songkhla province, Form B in Ratchaburi, Nakhon Si Thammarat and Songkhla provinces, Form C in Chanthaburi province, Form D in Ratchaburi and Songkhla provinces, and Form E in Ratchaburi province. Cross-mating experiments among the 7 isoline colonies, which represented the 5 karyotypic forms of *An. paraliae*, revealed genetic compatibility in providing viable progenies and synaptic salivary gland polytene chromosomes through F₂-generations. These results were supported by the very low intraspecific variation (average genetic distance = 0.000-0.002) of the nucleotide sequences in ribosomal DNA (ITS2) and mitochondrial DNA (COI and COII), thus suggesting the conspecific nature of these 5 karyotypic forms of this species.

Additionally, 3 and 5 isoline colonies of *An. lesteri* from South Korea and *An. paraliae* from Thailand, respectively, were used to assess their genetic relationships by cross-mating experiments and comparison of DNA sequences of ribosomal DNA (ITS2) and mitochondrial DNA (COI and COII). The results of reciprocal and F₁-hybrid crosses between *An. lesteri* and *An. paraliae* indicated that they were genetically compatible by producing viable progenies and complete synaptic salivary gland polytene chromosomes, without inversion loops, in all chromosome arms. The low pairwise genetic distances of ITS2, COI and COII sequences between these species were 0.040, 0.007-0.017 and 0.008-0.011, respectively. Therefore, these results supported the conspecific relationships between *An. paraliae* within the taxon *An. lesteri*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved