

หัวข้อคุณสมบัติ	การผสมพันธุ์และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอระหว่างรูปแบบ คาร์ิโอไทป์ของยุง <i>Anopheles nigerrimus</i> และ <i>An. nitidus</i>	
ผู้เขียน	นางสาวศิริพรรณ ส่งสวัสดิ์เกียรติ	
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ. ดร.อดิพร แซ่อึ้ง รศ. ดร.ผ่องศรี ทิพวงโกศล อ. ดร.สรวิวัฒน์ ทองสงวน	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles nigerrimus* Giles, 1900 และ *Anopheles nitidus* Harrison, Scanlon, and Reid, 1973 เป็นยุงก้นปล่องในกลุ่มไฮร์คานัส มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในประเทศไทยและบางประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ยุงก้นปล่อง *An. nigerrimus* เป็นยุงพาหะสงสัยในการนำโรคไข้มาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ในประเทศไทย และเป็นยุงพาหะร่อนนำโรคเท้าช้างที่เกิดจากหนอนพยาธิฟิลาเรียชนิด *Wuchereria bancrofti* และยุงก้นปล่อง *An. nitidus* นั้น เป็นยุงที่มีนิสัยในการกัดกินเลือดคนและปศุสัตว์อย่างคู้ร้าย ยุงทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยุงตัวเต็มวัยเพศเมียที่คาบเกี่ยวกัน อาจนำไปสู่ความผิดพลาดในการจำแนกชนิด แม้เคยมีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมของยุงก้นปล่องทั้งสองชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างรูปแบบเมตาเฟสคาร์ิโอไทป์ที่หลากหลายภายในยุงก้นปล่องเหล่านี้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาความใกล้ชิดทางด้านพันธุกรรมระหว่างรูปแบบเมตาเฟสคาร์ิโอไทป์ในยุงก้นปล่อง *An. nigerrimus* และ *An. nitidus* อย่างละเอียดแบบเป็นระบบที่มีทิศทาง โดยใช้วิธีการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์และข้ามรูปแบบเมตาเฟสคาร์ิโอไทป์ที่สัมพันธ์กับความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS2 ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ และตำแหน่ง COI และ COII ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ทำการจับยุงก้นปล่อง *An. nigerrimus* ตัวเต็มวัยเพศเมีย จากภาคสนามโดยใช้โคเป็นเหยื่อล่อ จาก 4 จังหวัดในประเทศไทย (จังหวัดลำปาง จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดสงขลา และจังหวัด

นครศรีธรรมราช) และประเทศกัมพูชาอีก 1 จังหวัด คือ จังหวัดรัตนคีรี นำมาเลี้ยงแบบโคโลนีเดี่ยว จำนวนทั้งสิ้น 13 ไอโซไลน์โคโลนี ผลจากการวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ พบโครโมโซม X จำนวน 3 รูปแบบ ( $X_1, X_2, X_3$ ) และโครโมโซม Y จำนวน 4 รูปแบบ ( $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4$ ) ตามลักษณะของ ปริมาณเฮเทอโรโครมาดินที่เพิ่มขึ้น โดยกำหนดให้เป็น 4 รูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ ตามรูปร่าง ลักษณะที่แตกต่างกันของโครโมโซม X และ Y ได้แก่ รูปแบบ A ( $X_1, X_2, X_3, Y_1$ ), รูปแบบ B ( $X_2, X_3, Y_2$ ) รูปแบบ C ( $X_1, Y_3$ ) และรูปแบบ D ( $X_3, Y_4$ ) โดยรูปแบบ C และ D เป็นรูปแบบเมตาเฟสคาริโอ ไทป์รูปแบบใหม่ que พบในการศึกษาครั้งนี้ รูปแบบ A พบได้ทั่วไปทั้งในประเทศไทยและประเทศ กัมพูชา รูปแบบ B และ รูปแบบ D พบได้เฉพาะที่ภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในขณะที่รูปแบบ C พบค่อนข้างจำกัดที่ประเทศกัมพูชา การทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์และ ข้ามรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ระหว่าง 8 ไอโซไลน์โคโลนี ที่เป็นตัวแทนของ 4 รูปแบบเมตาเฟสคา ริโอไทป์ของยุงก้นปล่อง *An. nigerrimus* พบว่ายุงทั้ง 4 รูปแบบเมตาเฟสคาริโอ ไทป์มีพันธุกรรมที่เข้า กันได้ โดยให้ยุงลูกผสมรุ่นที่ 1 และ 2 ที่แข็งแรง และมีโพลีทินโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายที่เข้า คู่แบบซิกกันตลอดสายในโครโมโซม จึงกล่าวได้ว่ายุงชนิดนี้ สามารถพบรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ ที่แตกต่างกันถึง 4 รูปแบบ ผลการทดลองนี้ ถูกสนับสนุนด้วยค่าความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของไรโบโซมอดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS2 และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COI และ COII ใน ระดับต่ำ (ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรม = 0.002-0.007)

ทำการจับยุงก้นปล่อง *An. nitidus* ตัวเต็มวัยเพศเมีย จากภาคสนามโดยใช้โคเป็นเหยื่อล่อ จาก จังหวัดพังงา และ จังหวัดอุบลราชธานี นำมาเลี้ยงแบบโคโลนีเดี่ยว จำนวนทั้งสิ้น 21 ไอโซไลน์ โคโลนี ผลจากการวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ พบโครโมโซม X จำนวน 3 รูปแบบ ( $X_1, X_2, X_3$ ) และโครโมโซม Y จำนวน 5 รูปแบบ ( $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5$ ) โดยกำหนดให้เป็น 5 รูปแบบเมตาเฟส คาริโอไทป์ ได้แก่ รูปแบบ A ( $X_1, Y_1$ ), รูปแบบ B ( $X_1, Y_2$ ) รูปแบบ C ( $X_2, Y_3$ ) รูปแบบ D ( $X_1, X_3, Y_4$ ) และ รูปแบบ E ( $X_1, X_2, X_3, Y_5$ ) โดยรูปแบบ A, B และ C เป็นรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ที่พบได้ จำกัดในจังหวัดพังงา ในขณะที่รูปแบบ D และ E พบที่จังหวัดอุบลราชธานี การทดลองผสมพันธุ์ข้าม สายพันธุ์และข้ามรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ระหว่าง 5 ไอโซไลน์โคโลนี ที่เป็นตัวแทนของ 5 รูปแบบเมตาเฟสคาริโอ ไทป์ของยุงก้นปล่อง *An. nitidus* พบว่ายุงทั้ง 5 รูปแบบเมตาเฟสคาริโอ ไทป์มี พันธุกรรมที่เข้ากันได้ โดยให้ยุงลูกผสมรุ่นที่ 1 และ 2 ที่แข็งแรง และมีโพลีทินโครโมโซมจากเซลล์ ต่อมน้ำลายที่เข้าคู่แบบซิกกันตลอดสายในโครโมโซม จึงกล่าวได้ว่ายุงชนิดนี้ สามารถพบรูปแบบเม ตาเฟสคาริโอไทป์ที่แตกต่างกันถึง 5 รูปแบบ ผลการทดลองนี้ ถูกสนับสนุนด้วยค่าความแปรผันของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS2 และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COI และ COII ในระดับต่ำ (ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรม = 0.002-0.008)

**Dissertation Title** Hybridizations and DNA Sequence Analyses Among Karyotypic Forms of *Anopheles nigerrimus* and *An. nitidus*

**Author** Miss Siripan Songsawatkiat

**Degree** Doctor of Philosophy (Parasitology)

**Advisory Committee**

Asst. Prof. Dr. Atiporn Saeung	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-advisor
Dr. Sorawat Thongsahuan	Co-advisor

**ABSTRACT**

*Anopheles nigerrimus* Giles, 1900 and *Anopheles nitidus* Harrison, Scanlon, and Reid, 1973 belong to the Hyrcanus Group of the Myzorrhynchus Series, and have wide distributed in Thailand and some countries in East, South and Southeast Asian regions. *Anopheles nigerrimus* is a suspected vector of *Plasmodium vivax* and secondary vector of *Wuchereria bancrofti*, and *An. nitidus* is a vicious biter of humans and an economic pest to livestock. The morphological characteristics of adult females of both species exhibit overlapping that leads to misidentification. Even though genetic diversity at the chromosomal level of both species has been reported, there is still a complete lack of directed systematic knowledge of genetic proximity among karyotypic variants within these taxa. Hence, a systematic investigation of genetic proximity among karyotypic forms of *An. nigerrimus* and *An. nitidus* was carried out in this study, by using 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 thirteen isoline colonies of *An. nigerrimus* were established from individual wild-caught females collected from cow-baited traps at 4 (Lampang, Ubon

Ratchathani, Songkhla and Nakhon Si Thammarat provinces) locations and 1 allopatric (Ratanakiri province) location in Thailand and Cambodia, respectively. Three types of X ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) and 4 of Y ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ) chromosomes were recovered, according to differing amounts of extra heterochromatin. Four karyotypic forms were designed depending upon apparently distinct figures of X and Y chromosomes, i.e., Form A ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $Y_1$ ), B ( $X_2$ ,  $X_3$ ,  $Y_2$ ), C ( $X_1$ ,  $Y_3$ ) and D ( $X_3$ ,  $Y_4$ ). Form C and D were new metaphase karyotypes discovered in this study. Form A appeared to be common in both Thailand and Cambodia. Form B and D were found to be rather specific to southern and northeastern Thailand, respectively, whereas Form C was confined somewhat to Cambodia. Hybridization experiments among the 8 isoline colonies, which were representative of 4 karyotypic forms of *An. nigerrimus*, demonstrated genetic compatibility in giving viable progenies and synapctic salivary gland polytene chromosomes through  $F_2$ -generations. These results elucidated the conspecific relationship, comprising 4 cytological forms within this taxon. Supportive evidence was confirmed further by very low intraspecific sequence variations (average genetic distance = 0.002-0.007) of the nucleotide sequences in ribosomal DNA (ITS2) and mitochondrial DNA (COI and COII).

A total of twenty-one isoline colonies of *An. nitidus* were established from individual wild-caught females collected from cow-baited traps in Phang Nga and Ubon Ratchathani provinces of Thailand. Three types of X ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) and 5 of Y ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ) chromosomes were recovered. Five karyotypic forms were designed, i.e, Form A ( $X_1$ ,  $Y_1$ ), Form B ( $X_1$ ,  $Y_2$ ), Form C ( $X_2$ ,  $Y_3$ ), Form D ( $X_1$ ,  $X_3$ ,  $Y_4$ ) and Form E ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $Y_5$ ). Forms A, B and C were confined to Phang Nga province, whereas Forms D and E were restricted to Ubon Ratchathani province. Cross-mating experiments among the 5 isoline colonies, which were representative of 5 karyotypic forms of *An. nitidus*, revealed genetic compatibility by providing viable progenies and synapctic salivary gland polytene chromosomes through  $F_2$ -generations. The results suggest that the Forms are conspecific and *An. nitidus* comprises five cytological races. The very low intra-specific sequence variations (average genetic distances = 0.002-0.008) of the nucleotide sequences in ribosomal DNA (ITS2) and mitochondrial DNA (COI, COII) among the five karyotypic forms gave very good supportive evidence.