

หัวข้อคุณสมบัติ	การตั้งโคลอนี่ที่ผสมพันธุ์กันตามธรรมชาติของยุงก้นปล่องกลุ่มไอร์คานัส และการค้นหาเทคโนโลยีในการควบคุมพฤติกรรมผสมพันธุ์ในที่แคบ	
ผู้เขียน	นายอดุลย์ศักดิ์ วิจิตร	
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ. ดร.อดิพร แซ่อึ้ง ผศ. ดร.อนุลักษณ์ จันทร์คำ ดร.สรวิวัฒน์ ทองสงวน	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ยุงก้นปล่องที่เป็นสมาชิกในกลุ่มไอร์คานัสที่มีการรายงานในประเทศไทย มีจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Anopheles argyropus*, *Anopheles crawfordi*, *Anopheles nigerrimus*, *Anopheles nitidus*, *Anopheles paraliae*, *Anopheles peditaeniatu*, *Anopheles pursati* และ *Anopheles sinensis* ใน การศึกษานี้ ได้จับยุงก้นปล่องทั้ง 8 ชนิด จากภาคสนามโดยใช้โคเป็นเหยื่อล่อ จาก 6 จังหวัดในภาค ตะวันตกและภาคใต้ของประเทศไทย นำมาจำแนกชนิดโดยใช้ไข่ ตัวอ่อน คราบตัวโม่ง และตัวเต็มวัย เพศเมีย ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่สมบูรณ์ และประสบความสำเร็จในการตั้งโคลอนี่แบบเดี่ยว จำนวนทั้งสิ้น 40 ไอโซไลน์โคลอนี่ นอกจากนี้ ยีนไมโทคอนเดรียในตำแหน่ง cytochrome c oxidase subunit I (COD) ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องเหล่านี้ ผลที่ได้ จากการศึกษาี้ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์สำหรับนำมาใช้จำแนก ชนิดยุงก้นปล่องที่เป็นสมาชิกในกลุ่มไอร์คานัส จำนวน 8 ชนิด ในประเทศไทยได้

ยุงก้นปล่องแต่ละชนิด ถูกสร้างโคลอนี่ตั้งต้น โดยใช้ยุงจำนวน 5 ไอโซไลน์โคลอนี่มารวมกัน จากนั้นทำการตรวจหาพฤติกรรมผสมพันธุ์ในที่แคบของยุงก้นปล่องกลุ่มไอร์คานัสทั้ง 8 ชนิดใน เบื้องต้น โดยการนำยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย จำนวน 200 ตัว และยุงตัวเต็มวัยเพศผู้ จำนวน 300 ตัว รุ่นที่ 9 มาอาศัยอยู่ร่วมกันในกรงขนาด 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ หลังจากวางไข่ ทำ การตรวจหาการปรากฏของน้ำอสุจิในถุงเก็บอสุจิของยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย จำนวน 100 ถุง

ผลการศึกษาพบว่ายุง *An. peditaeniatus* มีพฤติกรรมผสมพันธุ์ในที่แคบ ซึ่งอัตราการผสมพันธุ์ มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 61-86 ในขณะที่ยุงชนิดอื่น ๆ จำนวน 7 ชนิด (*An. argyropus*, *An. crawfordi*, *An. paraliae*, *An. pursati*, *An. nigerrimus*, *An. nitidus* และ *An. sinensis*) ไม่สามารถผสมพันธุ์กันในกรงขนาดเล็กได้

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของยุงทั้ง 8 ชนิด ในการผสมพันธุ์ในที่แคบในกรงขนาด 10, 20 และ 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีความหนาแน่นของพื้นผิวเกาะพักขนาด 3.6 และในกรงขนาด 10, 20, 30 และ 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีความหนาแน่นของพื้นผิวเกาะพักขนาด 7.2 พบว่ายุงทั้ง 8 ชนิด มีพฤติกรรมผสมพันธุ์ในที่แคบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ยุง *An. peditaeniatus* ซึ่งมีอัตราการผสมพันธุ์เฉลี่ยในที่แคบสูง พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกรงที่มีขนาดแตกต่างกัน นอกจากนี้ ยุง *An. peditaeniatus* มากกว่าร้อยละ 60 มีความหนาแน่นของน้ำอสุจิในถุงเก็บอสุจิของยุงตัวเต็มวัยเพศเมียสูง (3+ และ 4+) ในกรงทุกขนาดและความหนาแน่นของพื้นผิวเกาะพักขนาด 3.6 และ 7.2 ในขณะที่ยุง *An. crawfordi* และ *An. nitidus* มีอัตราการผสมพันธุ์เฉลี่ยในที่แคบต่ำ ระหว่างร้อยละ 0 ถึง 9 โดยมีความหนาแน่นของน้ำอสุจิในถุงเก็บอสุจิของยุงตัวเต็มวัยเพศเมียต่ำ (1+)

การศึกษาเปรียบเทียบด้วยการวัดขนาดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จำเพาะในยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย (ปีก และ maxillary palpomere) และยุงตัวเต็มวัยเพศผู้ (ปีก) แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของอัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างของปีกยุงตัวเต็มวัยเพศผู้ และอัตราส่วนของ maxillary palpomere ของยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย ระหว่างยุงที่มีพฤติกรรมผสมพันธุ์ในที่แคบและที่กว้าง

การนับจำนวน sensilla coeloconica บนแต่ละปล้องของหนวดยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย สามารถนับได้ในยุงเพียง 6 ชนิด ที่มี sensilla coeloconica มีลักษณะเป็นหลุมเดี่ยว และค่าเฉลี่ยของจำนวน sensilla coeloconica ของยุงทั้ง 6 ชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับยุง *An. argyropus* และ *An. peditaeniatus* พบ sensilla coeloconica อยู่เป็นกลุ่มจำนวน 4-7 sensilla จมอยู่ในก้นหลุม ซึ่งพบเป็นส่วนใหญ่บนหนวดปล้องที่ 3-7 ของยุงก้นปล่องทั้ง 2 ชนิด

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของขนาดอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ระหว่างยุงที่มีพฤติกรรมผสมพันธุ์ในที่แคบและที่กว้าง โดยพบว่ายุง *An. peditaeniatus* มี gonostylus ขนาดเล็กกว่ายุงที่มีพฤติกรรมผสมพันธุ์ในที่กว้างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความถี่ในการเคลื่อนไหวของ clasper และระยะเวลาที่ใช้ในการผสมพันธุ์ที่สั้นของยุง *An. peditaeniatus* อาจเป็นกลไกที่สำคัญที่ควบคุมพฤติกรรมผสมพันธุ์ในที่แคบของยุงชนิดนี้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Dissertation Title	Establishment of a Natural Mating Colony of the Hyrcanus Group and Search for Mechanisms to Control Stenogamous Behavior	
Author	Mr. Adulsak Wijit	
Degree	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Atiporn Saeung	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Anuluck Junkum	Co-advisor
	Dr. Sorawat Thongsahuan	Co-advisor

ABSTRACT

In Thailand, eight species of the Hyrcanus Group of *Anopheles* have been reported so far, i.e., *Anopheles argyropus*, *Anopheles crawfordi*, *Anopheles paraliae*, *Anopheles peditaeniatus*, *Anopheles pursati*, *Anopheles nigerrimus*, *Anopheles nitidus* and *Anopheles sinensis*. A total of 40 iso-female lines (isolines) of eight species were collected from cow-baited traps in six provinces of western and southern Thailand, and were identified using intact morphology of eggs, larvae, pupal skins and adult females, and then established successfully in this study. In addition, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene-based DNA barcoding was applied for identifying these species. Results herein demonstrate that the COI-based DNA barcoding is a useful tool for complementing taxonomy-based identification of eight species of the Hyrcanus Group.

The stenogamy, one of the mating behaviors of the eight species belonging to the Hyrcanus Group was screened by pooling five isoline colonies of each species, in order to establish stock colonies. Then, each of eight species was investigated for stenogamy by co-habiting 200 and 300 newly emerged adult females and males mosquitoes (the 9th generation, F₉), respectively, in a 30 cubic cm cage for one week. After oviposition, 100 spermathecae of females were examined for the presence or absence of sperms. It is shown that *An. peditaeniatus* is stenogamous, which had

insemination rates that ranged from 61-86%, whereas seven other species (*An. argyropus*, *An. crawfordi*, *An. paraliae*, *An. pursati*, *An. nigerrimus*, *An. nitidus* and *An. sinensis*) are eurygamous, failing to copulate in a small cage.

The abilities of adult mosquitoes to mate naturally in a 10, 20 and 30 cubic cm cage at a Density Resting Surface (DRS) of 3.6 and 10, 20, 30 and 40 cubic cm cages at a Density Resting Surface (DRS) of 7.2 among the eight species were compared, results demonstrated a statistically significant difference ($p < 0.05$). However, *An. peditaeniatus*, which had high mean insemination rates, showed no statistically significant difference among cage sizes ($p > 0.05$). Furthermore, more than 50% of inseminated-female *An. peditaeniatus* showed high sperm density (3+ and 4+) in spermathecae in all cage sizes at two DRS values, 3.6 and 7.2, while *An. crawfordi* and *An. nitidus* showed very low mean insemination rates ranged between 0 to 9, with low sperm density (1+) in their spermathecae.

Comparative measurements of specific diagnostic characters in adult females (wing and maxillary palpomere) and males (wing) between the stenogamous and eurygamous species demonstrated their statistically significant difference ($p < 0.05$) in the male wing ratio and female palpomere ratio.

The numbers of large sensilla coeloconica on flagellum of female antennae were counted only in six species, in which their sensilla were presented as a single pit. The cluster of 4-7 large sensilla coeloconica located in sacculi were found mostly on flagellomeres 3-7 of *An. argyropus* and *An. peditaeniatus*. There was no statistically significant difference ($p > 0.05$) in the mean number per female of those large antennal sensilla coeloconica among six of the eurygamous species.

This study demonstrates differences in the size of male genitalia between the stenogamous and eurygamous species. The gonostylus length of *An. peditaeniatus* is significantly shorter than the gonostylus of the eurygamous species ($p < 0.05$).

The results of this study show that the lower frequency of clasper movement and shorter mating time could be important mechanisms that control the stenogamous behavior of *An. peditaeniatus*.