

Thesis Title Studies on the Species Complex of
Anopheles (Anopheles) barbirostris
in Chiang Mai Province

Author Miss Benjawan Tookyang

M.Sc. Parasitology

Examining Committee :

 Assoc. Prof. Wej Choochote Chairman
 Assoc. Prof. Dr. Charin Chesdapan Member
 Assoc. Prof. Dr. Yupha Rongsriyam Member

Abstract

A study and survey for species members of Anopheles (Anopheles) barbirostris species complex were performed during May, 1990 to August, 1991 in 10 Amphoe of Chiang Mai province, i.e., Muang, Saraphi, San Sai, San Pathong, San Kamphaeng, Mae Rim, Mae Tang, Doi Saket, Chom Thong and Hang Dong. A total of 424 engorged adult females collected and reared individually under laboratory deposited 52,823 eggs (average 124 eggs per female), of which 83.09 % hatched. Morphological study, cytogenetic observation and hybridization were attempted to differentiate and find out the genetic relationship among these species members of

An. barbirostris. The laboratory colony of An. barbirostris was established from the progenies of 22 wild-caught females from Amphoe Muang by using forced mating technique for studying colonization and hybridization.

The life cycle of An. barbirostris had been studied from the laboratory colonies. At $27 \pm 2^\circ \text{C}$, 80-90% relative humidity, the life duration of eggs, larvae, pupae and adults were observed. The egg and larval stage lasted 3.13 and 9.17 days respectively. The duration of pupal stage was about 2 to 4 days and nearly all pupae reached the adult stage. Slightly more males were emerged than females but estimation sex ratio 1:1 was still obtained. Female and male longevity were 31.14 and 16.61 days respectively in the insectary. The best age of male for artificial mating was 3-5 days and 5 days old of female was the best feeder. Morphological examination on egg, larva, pupa and adult were able to verify the identification of collected Anopheles barbirostris in this study. Examination of 424 rearing females revealed a number of specimens with adult characters like those described for Anopheles campestris : 12.26% with wing vein Cu (vein 5) mostly dark-scaled ; 4.24% with abundant pale scales on the abdominal sterna; but none of the specimens had wing with a distinct preapical pale band . Therefore, none of the specimens possessed all of these characters. However, over 15% of the adult females possessed

one or more campestris - like characters. These results demonstrated the importance of using reared adults with associated immature skins when identifying members of the barbirostris group. Although there were some variations in adult, if the identification of species based on associated immature skins of reared adults, only Anopheles barbirostris was found in 10 Amphoe of Chiang Mai province. Observation on larval and pupal skins together with the adult morphology showed some evidence of the following characters: pupal range of the sum of both seta 2-VI branches was 8 to 21 (mean 13.39, mode 13) ; larval range of the sum of both seta 13-I branches was 14-31 and difference between sum of the branches of both 13-III and sum of the branches of both 5-VII was range from 0 to 13.

Hybridization experiments of An. barbirostris between laboratory strain (Amphoe Muang) and various strains (9 Amphoe) in Chiang Mai province gave viable hybrids which successfully developed to adults. The polytene chromosome of salivary gland stained with Aceto-lactic orcein consisted of five elements ; four arms of autosomal (2L, 2R, 3L and 3R) and X chromosome which was the shortest in complement. The salivary chromosome of parental colonies showed homosequential banding patterns without any rearrangement when compared with standard chromosome described by Chowdaiah

et al., (1970) and all the F_1 hybrids' chromosome showed complete synapsis along the whole length of all autosomes and X chromosome.

The characters of mitotic karyotype were also observed by using Aceto-lactic orcein stain for cytogenetic aspects. The mitotic karyotypes of neuroblast cells, ovary and testis revealed that there were six chromosomes ($2n = 6$), consisting of two pairs of autosomes (slightly submetacentric and metacentric) and one pair of subtelocentric sex-chromosome showing two types ; homologous long form (XX) and heterozygous long and short form (XY). Male and female sex - chromosomes were differentiated by Y chromosome which was shorter than X chromosome.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การศึกษายุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนชนิด Anopheles(Anopheles) barbirostris ในจังหวัดเชียงใหม่

ชื่อผู้เขียน

นางสาว เบญจวรรณ ภูก้อย่าง

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาปรสิตวิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

รองศาสตราจารย์ เวช ชูโชติ ประธานกรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ชรินทร์ เจษฎาพันธ์ กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ยุพา รongศรีแย้ม กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาและสำรวจยุงก้นปล่องชนิด Anopheles (Anopheles) barbirostris species group ในพื้นที่ทั้งหมด 10 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อำเภอเมือง, อำเภอสารภี, อำเภอสันทราย, อำเภอสันป่าตอง, อำเภอสันกำแพง, อำเภอแม่ริม, อำเภอแม่แตง, อำเภอดอยสะเก็ด, อำเภอจอมทอง และอำเภอหางดง ระหว่างเดือน พฤษภาคม 2533 ถึงเดือนสิงหาคม 2534 ได้ยุงตัวเต็มวัยเพศเมียทั้งหมด 424 ตัว จากการจับโดยใช้ วัสดุวางเป็นเหยื่อล่อ จากนั้นได้นำมาแยกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และสามารถวางไข่ได้ทั้งหมด 52,823 ฟอง เฉลี่ยแล้วประมาณ 124 ฟองต่อตัวเมีย 1 ตัว โดยสามารถพักเป็นตัวได้ทั้งหมด 83.09%

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ การเพาะเลี้ยง (colonization), กายรูปวิทยา (morphology), เซลล์วิทยาที่เกี่ยวกับกรรมพันธุ์ศาสตร์ (cytogenetics) รวมไปถึง ผลของการผสมต่างพันธุ์ (hybridization) เพื่อจำแนกชนิดและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ระหว่างยุงกลุ่มนี้ ส่วนสายพันธุ์ทางห้องปฏิบัติการที่เลี้ยงไว้และทำการ

ขยายพันธุ์โดยวิธี artificial mating technique เพื่อใช้ในการศึกษาถึง การเพาะเลี้ยง (colonization) และการผสมต่างพันธุ์ (hybridization) จะได้จากส่วนหนึ่งของอำเภอเมือง จำนวน 22 ตำบล

ในการศึกษาถึงวงจรชีวิต (life cycle) ของยุงก้นปล่องจากสายพันธุ์ทางห้องปฏิบัติการที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80-90% ในระยะไข่, ลูกน้ำ, ดักแด้ และ ตัวเต็มวัย พบว่าในระยะไข่และลูกน้ำใช้เวลา 3.13 และ 9.17 วันตามลำดับ ส่วนระยะดักแด้ใช้เวลา 2-4 วัน โดยดักแด้ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนไปเป็นตัวเต็มวัยได้หมด และได้ยุงตัวผู้มากกว่า ยุงตัวเมียเล็กน้อย แต่สามารถเทียบเป็นอัตราส่วนของเพศได้ประมาณ 1:1 ซึ่งยุงตัวเมียและยุงตัวผู้จะมีอายุเฉลี่ยภายใต้ห้องปฏิบัติการประมาณ 31.14 และ 16.61 วันตามลำดับ สำหรับช่วงอายุที่เหมาะสมของยุงตัวผู้ในการทำ artificial mating คือ 3-5 วัน ส่วนตัวเมียที่มีอายุ 5 วัน จะสามารถกินเลือดได้มากที่สุด นอกจากนั้นการศึกษารูปร่างของไข่, ลูกน้ำ, ดักแด้และตัวเต็มวัย สามารถนำมาใช้ในการแยกชนิดของยุง *An. barbirostris* กลุ่มนี้ได้ โดยจากการตรวจสอบยุงตัวเมียทั้งหมด 424 ตัว ที่ได้จาก F₁ progenies ของยุงตัวเมียแต่ละตัวที่จับได้จากอำเภอต่างๆ พบว่ามียุงตัวเต็มวัยที่แสดงลักษณะคล้ายกับ *An. campestris* คือมีปีกสีดำ 12.26%, มีเกล็ดขาวจำนวนมากบริเวณหน้าท้อง 4.24% แต่ไม่มียุงตัวใดที่มีแถบสีขาวบริเวณ preapical ของปีก และไม่มียุงตัวใดที่มีลักษณะเหล่านี้ครบทั้ง 3 แบบ อย่างไรก็ตามจากการที่ยุงตัวเต็มวัยมากกว่า 15% มีลักษณะที่คล้ายกับ *An. campestris* ในหนึ่งลักษณะหรือมากกว่า ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญในการใช้ระยะตัวเต็มวัยร่วมกับคราบตัวอ่อนในการจำแนกชนิดของยุงกลุ่มนี้ ถึงแม้ว่าจะมีความแปรปรวนทางกายวิภาควิทยา (morphology) ของตัวเต็มวัยตัวเมียอยู่บ้าง แต่ถ้าหากใช้ลักษณะของคราบตัวอ่อนที่สัมพันธ์กันกับตัวเต็มวัยร่วมเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาด้วย จะพบว่ายุงทั้งหมดที่จับได้จากแหล่งต่างๆ ในพื้นที่ 10 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ เป็นยุง *An. barbirostris* เพียงชนิดเดียวเท่านั้น โดยที่คราบดักแด้ของตัวเต็มวัย 424 ตัวข้างต้นนั้น จะมีผลรวมของขนคู่ที่ 2-VI อยู่ในช่วง 8 - 21 (ค่าเฉลี่ย 13.39, ความถี่สูงสุด 13) ส่วนผลรวมของขนคู่ที่ 13-I ของลูกน้ำอยู่ในช่วง 14-31 และมีความแตกต่างระหว่างขนคู่ที่ 13-III กับ 5-VII อยู่ในช่วง 0-13

จากการผสมพันธุ์ *An. barbirostris* ระหว่างสายพันธุ์ทางห้องปฏิบัติการ (อำเภอเมือง) กับสายพันธุ์อื่น ๆ จาก 9 อำเภอในจังหวัดเชียงใหม่ ให้ลูกผสมซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่ระยะตัวเต็มวัยได้อย่างสมบูรณ์ โดยมี polytene chromosome จากต่อมน้ำลายของยุง ที่ย้อมด้วย Aceto-lactic orcein stain ประกอบด้วยโครโมโซมทั้งหมด 5 เส้น เป็นออโตโซม (autosome) 4 เส้น คือ 2L, 2R, 3L และ 3R และ X chromosome อีก 1 เส้น ซึ่งเป็นโครโมโซมที่มีขนาดสั้นที่สุด ในรุ่นพ่อแม่พบว่าจะมี polytene chromosome ที่มีลักษณะและลำดับของแถบสีเหมือนกันทุกประการ (homosequential banding patterns) เมื่อเปรียบเทียบกับโครโมโซมมาตรฐานของ Chowdaiyah, 1970 และโครโมโซมของลูกผสมในรุ่น F₁ ทั้งหมดมี polytene chromosome ที่สามารถจับคู่กันได้อย่างสมบูรณ์ (complete synapsis) ตลอดความยาวของออโตโซม (autosome) และโครโมโซมเพศ

ส่วนลักษณะของ mitotic karyotype ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ระหว่างยุงกลุ่มนี้โดยใช้สีย้อมชนิด Aceto-lactic orcein stain จากผลการทดลองพบว่า mitotic karyotypes ที่ได้จากเซลล์สมอง (neuroblast cell), รังไข่ (ovary) และอัณฑะ (testis) ประกอบด้วยโครโมโซมทั้งหมด 6 เส้น ($2n = 6$) คือ โครโมโซมร่างกาย 2 คู่ มีลักษณะเป็น metacentric และ slightly submetacentric และโครโมโซมเพศ 1 คู่ เป็น subtelocentric ที่สามารถพบได้ 2 ลักษณะ คือ ชนิดแรกจะเป็นโครโมโซมเพศเมียซึ่งมีรูปแบบที่ยาวเหมือนกัน (XX) และชนิดหลังเป็นโครโมโซมเพศผู้ที่มีรูปแบบที่สั้นและยาว (XY) โดยโครโมโซม Y จะมีขนาดสั้นกว่าโครโมโซม X จึงทำให้สามารถแยกโครโมโซมเพศผู้และโครโมโซมเพศเมียออกจากกันได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved