Thesis Title Search for New Sibling Species in the Taxon *Anopheles barbirostris* Species Complex

Author Mr. Sittiporn Suwannamit

Degree Doctor of Philosophy (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Wej Choochote	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Narissara Jariyapan	Co-advisor

ABSTRACT

DNA sequence analyses of second internal transcribed spacer (ITS2), cytochrome c oxidase subunit I (COI) and cytochrome c oxidase subunit II (COII) genes from 42 isoline colonies of *Anopheles barbirostris* species complex strains from Chiang Mai, Phetchaburi and Kanchanaburi provinces revealed a new sibling species. It was discovered in Chiang Mai province, northern Thailand and temporarily designated as *An. barbirostris* species A4. The large sequence divergences of the ITS2 (0.116-0.615), COI (0.023-0.048) and COII (0.030-0.040) genes between *An. barbirostris* species A4/A1 (Chiang Mai), A4/A2 (Phetchaburi), A4/A3 (Kanchanaburi) and A4/*A. campestris*-like Form E (Chiang Mai) provided good supporting evidence. However, *An. barbirostris* species A1, A2, A3 and A4 shared identical metaphase karyotypes of Form A (X_1, X_2, Y_1).

Crossing experiments between *An. barbirostris* species A4 and the other 4 species, *i.e*., *An. barbirostris* species A1, A2 and A3 and *An. campestris*-like Form E, yielded strong reproductive isolation, and provided low rates of embryonic-developed eggs; few hatched- and/or non-hatched eggs; low rates of larva, pupa and adult survival; asynaptic salivary gland polytene chromosome arms of F_1-hybrid larvae; and atrophy of the reproductive systems of F_1-hybrid females and males. Hence,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

molecular and crossing evidence strongly supported the discovery of a new sibling species, namely *An. barbirostris* species A4.

Crossing experiments among 12 and 7 isolines of different karyotypic forms of *An. barbirostris* species A1 (A, B, C, D) and A2 (A, B), respectively, yielded fertile and viable F_1-progenies. Thus, 4 and 2 different karyotypic forms occurring in natural populations of *An. barbirostris* species A1 and A2, respectively, merely represent intraspecies variation of sex chromosomes, due to extra blocks of heterochromatin.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การค้นหาซิบลิงส์สปีชีส์ใหม่ในยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนชนิด *Anopheles barbirostris*

ผู้เขียน นายสิทธิพร สุวรรณมิตร

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ. ดร. เวช ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. อุดม ชัยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. ปรัชญา สมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวังโกศล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. นริศรา จริยะพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ร

ผ

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่ง ITS2, COI และ COII ของยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนชนิด *Anopheles barbirostris* จำนวน 42 ไอโซไลน์ จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี และกาญจนบุรี ทำให้ค้นพบซิบลิงส์สปีชีส์ใหม่เพิ่มเติมจากเดิมอีก 1 สปีชีส์ จึงตั้งชื่อชั่วคราวเป็นยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A4 ระยะห่างทางพันธุกรรมที่สูงในยีนตำแหน่ง ITS2 (0.116-0.615), COI (0.023-0.048) และ COII (0.030-0.040) ระหว่างยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A4/A1 (จังหวัดเชียงใหม่), A4/A2 (จังหวัดเพชรบุรี), A4/A3 (จังหวัดกาญจนบุรี) และ A4/*An. campestris*-like รูปแบบ E (จังหวัดเชียงใหม่) ถือเป็นหลักฐานที่สนับสนุนการค้นพบยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A4 อย่างไรก็ตาม ยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A1, A2, A3 และ A4 นั้น มีลักษณะของเมตาเฟสคาริโอไทป์เป็นรูปแบบ A (X_1, X_2, Y_1) ที่เหมือนกัน

การทดลองผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์ระหว่างยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A4 กับยุงอีก 4 สปีชีส์ คือ ยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A1, A2 และ A3 และยุง *An. campestris*-like รูปแบบ E พบว่ายุงทั้ง 5 สปีชีส์ มีพันธุกรรมที่เข้ากันไม่ได้ โดยให้อัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนในไข่ต่ำ ไม่มีการฟักตัวของตัวอ่อนออกจากไข่และ/หรือมีอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนออกจากไข่ต่ำ ตัวอ่อนที่ฟักตัวออกจากไข่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ ตัวอ่อนที่รอดชีวิตมีลักษณะแขนของโพลีทีนโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายที่ไม่เข้าคู่กัน มีอัตราการรอดชีวิตของ ตัวโหม่งและตัวเต็มวัยต่ำ ตัวเต็มวัยเพศเมียมีรังไข่ที่ฝ่อ และตัวเต็มวัยเพศผู้มี accessory gland และอัณฑะที่ฝ่อ ดังนั้น หลักฐานทาง โมเลกุลและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์จึงถือเป็นหลักฐานที่สำคัญที่สนับสนุนการค้นพบยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A4

จากการทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์และ/หรือข้ามรูปแบบ เมตาเฟสคาริโอไทป์ ระหว่างยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A1 รูปแบบ A, B, C และ D จำนวน 12 ไอโซไลน์ และยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A2 รูปแบบ A และ B จำนวน 7 ไอโซไลน์ พบว่ามีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ โดยให้ลูกรุ่น F_1 ที่แข็งแรง ดังนั้น ยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A1 มีรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้ 4 รูปแบบ คือ รูปแบบ A, B, C และ D และยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A2 มีรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้ 2 รูปแบบ คือ รูปแบบ A และ B ที่สามารถพบได้ในประชากรธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของเฮเทโรโครมาทินในโครโมโซมเพศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved