

Thesis Title	Genetic Study of <i>Anopheles campestris</i> -like	
Author	Mr. Sorawat Thongsahuan	
Degree	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Wej Choochote	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Co-Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Nimit Morakote	Co-Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-Advisor
	Asst. Prof. Dr. Narissara Jariyapan	Co-Advisor
	Asst. Prof. Dr. Anchalee Wannasan	Co-Advisor
	Dr. Anuluck Junkum	Co-Advisor
	Dr. Atiporn Saeung	Co-Advisor

ABSTRACT

Anopheles campestris-like, the predominant anopheline mosquito species was considered a potential vector that played an important role in the increasing cases of *Plasmodium vivax* infection in Thailand. Its markedly karyotypic variations and taxonomic relationship remain unclear, thus, the genetic proximity among karyotypic forms were determined by using multi-disciplinary researches. In addition, its laboratory vector-competence to malaria was elucidated.

Thirty-four isolines of *An. campestris*-like, derived from human-biting females, demonstrated 3 karyotypic forms, *i.e.*, Form B (X_2, Y_2), E (X_1, X_2, X_3, Y_5) and a new karyotypic form (X_2, Y_6), designated as Form F. Likewise, 37 isolines of *An. campestris*-like, derived from animal-biting females, revealed 3 karyotypic forms, *i.e.*, Form B (X_2, Y_2), E (X_2, Y_5) and F (X_2, X_3, Y_6). All 71 isolines in this study had an average branch summation of seta 2-VI pupal skins with 20.3-30.0 branches, which was in the range of *An. campestris* (17-58 branches).

An isoline colony of *An. campestris*-like Form E was established successfully for more than 40 consecutive generations under laboratory conditions. The eggs per deposited female ranged from 19-308 eggs. The duration of egg-hatching was 2-4 days, in which the percentage embryonation and hatchability were 81-99% and 78-

96%, respectively. The larval instars matured in 7-10 days. Pupation duration ranged from 2-3 days, and more than 80% of first instar larvae eventually pupated. More than 85% of pupae emerged successfully to adults. A satisfactory percentage of blood-fed females was obtained from both direct feeding on a white rat in a cage (62%) and artificial membrane-feeding on bovine heparinized-blood in a paper cup (78%), indicating two feeding methods that could be used routinely. The best age for artificial mating in males was 5-days-old with 86.67% insemination, while males aged 4 to 8 days old could be used satisfactorily (insemination rates: 80.00-85.71%). The forced laying of eggs by placing gravid adult females in a plastic-cup ovipot proved to be a satisfactory method for egg deposition. Furthermore, the present rearing procedure also proved to be a promising method for obtaining a high yield of brain metaphase and salivary gland polytene chromosomes.

Crossing studies among 12 isolines of *An. campestris*-like Form B, E and F indicated their genetic compatibility by providing viable progenies, suggesting a conspecific relationship between the 3 karyotypic forms. Additionally, the very low intraspecific sequence variation (genetic distance < 0.005) of the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 2 (ITS2) of rDNA, and mitochondrial cytochrome c oxidase subunits I and II (COI and COII) of 28 isolines of *An. campestris*-like Form B, E and F, clearly supported their conspecific relationships.

Comparative morphological investigations of eggs, larvae, pupae and adults under light microscope of the 71 isolines of *An. campestris*-like Form B, E and F indicated that no diagnostic characters could be used to separate *An. campestris*-like forms. In addition, the surface topography of eggs among *An. campestris*-like forms under scanning electron microscopy (SEM) were morphologically similar.

Comparative salivary gland polytene chromosome examinations, among 12 isolines of *An. campestris*-like Form B, E and F, revealed the homosequential banding pattern that existed in sympatric and/or allopatric populations.

Investigation of the vector potential of *An. campestris*-like Form B, E and F to *P. vivax* and *P. falciparum* revealed that only *An. campestris*-like Form B and E, Chiang Mai strain, were susceptible to *P. vivax* with 100% oocyst rates, and sporozoite rates of 66.67 and 64.29%, respectively.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาพันธุศาสตร์ของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ <i>Anopheles campestris</i>	
ผู้เขียน	นายสรวิวัฒน์ ทองสงวน	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. เวช ชูโชติ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ดร. อุดม ชัยทอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. นิมิตร มรกต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวงโกศล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. นริศรา จริยะพันธุ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. อัญชลี วรรณสาร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. อนุลักษณ์ จันทร์คำ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. อติพร แซ่อึ้ง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *Anopheles campestris* เป็นยุงที่พบได้มากและได้รับการพิจารณาว่าเป็นยุงที่มีศักยภาพและบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ในประเทศไทย ความแปรผันของรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ที่เด่นชัดและความสัมพันธ์ด้านอนุกรมวิธานของยุงชนิดนี้ยังมีความไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงศึกษาความใกล้ชิดทางด้านพันธุกรรมระหว่างรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ของยุงชนิดนี้โดยใช้วิธีวิจัยแบบสหวิทยาการ รวมถึงการศึกษาความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ

จากการวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* ที่กักคนจำนวน 34 ไอโซไลน์ และกักสัตว์จำนวน 37 ไอโซไลน์ พบว่ามีรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ 3 รูปแบบ คือ รูปแบบ B (X_2, Y_2), E (X_1, X_2, X_3, Y_5) และ F (X_2, X_3, Y_6) ซึ่งรูปแบบ F นั้นเป็นรูปแบบใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่งของยุงทั้ง 71 ไอโซไลน์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่งเท่ากับ 20.3-30.0 แขนง ซึ่งอยู่ในช่วงของยุง *An. campestris*

ไอโซไลน์โคโลนีของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ E สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องทดลองมากกว่า 40 รุ่น โดยยุงตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่จำนวน 19-308 ฟอง

หลังจากนั้นประมาณ 2-4 วัน ตัวอ่อนจึงฟักตัวออกจากไข่ โดยไข่มีอัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนในไข่เท่ากับ 81-99% และอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนออกจากไข่เท่ากับ 78-96% ตัวอ่อนที่ฟักตัวออกจากไข่ใช้เวลา 7-10 วันในการเจริญเติบโตเป็นตัวโม่ง และใช้เวลา 2-3 วันจึงลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย โดยมีอัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยมากกว่า 85% ยุงตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถกินเลือดหนูขาวในกรงได้ดีพอๆ กับการกินเลือดวัวในถ้วยกระดาษผ่านเมมเบรน โดยมีอัตราการกินเลือดเท่ากับ 62% และ 78% ตามลำดับ ยุงตัวเต็มวัยเพศผู้อายุ 5 วันสามารถผสมพันธุ์เทียบกับยุงตัวเต็มวัยเพศเมียได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการฉีดน้ำอสุจิเข้าสู่ถุงเก็บอสุจิของยุงเพศเมียเท่ากับ 86.67% ในขณะที่ยุงตัวเต็มวัยเพศผู้อายุ 4-8 วันสามารถผสมพันธุ์เทียบกับยุงตัวเต็มวัยเพศเมียได้ดีพอสมควร โดยมีอัตราการฉีดน้ำอสุจิเข้าสู่ถุงเก็บอสุจิของยุงเพศเมียอยู่ในช่วงระหว่าง 80-85.71% การวางไข่ในถ้วยพลาสติกของยุงตัวเต็มวัยเพศเมียพบว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับยุงชนิดนี้ นอกจากนี้เทคนิคที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงในครั้งนี้พบว่า เป็นเทคนิคที่ใช้เพาะเลี้ยงยุงเพื่อให้นักศึกษามาตาเฟสโครโมโซมจากเซลล์สมองและ โพลีทินโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายของลูกน้ำยุงได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ

จากการทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ระหว่างยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E, และ F จำนวน 12 ไอโซไลน์ ผลที่ได้จากการศึกษาทดลองพบว่ายุงทั้ง 12 ไอโซไลน์ มีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ โดยให้ลูกรุ่น F_1 และ/หรือ F_2 ที่แข็งแรง ซึ่งผลจากการศึกษาได้สนับสนุนความสัมพันธ์ของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F เป็นแบบ conspecific นอกจากนี้ระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำในยีนทั้ง 3 ตำแหน่ง (ITS2, COI และ COII < 0.005) ถือเป็นหลักฐานทางอณูชีววิทยาที่สนับสนุนความสัมพันธ์ของยุงทั้ง 3 รูปแบบได้เป็นอย่างดี

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่ ตัวอ่อน ตัวโม่ง และตัวเต็มวัยของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F จำนวน 71 ไอโซไลน์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ไม่พบที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาที่จะใช้แยกยุงทั้ง 3 รูปแบบได้ และจากผลการศึกษาลักษณะผิวของไข่ยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงกัน

จากการศึกษาเปรียบเทียบแถบสับบนแขนของโพลีทินโครโมโซมที่ได้จากเซลล์ต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F ในยุงทั้ง 12 ไอโซไลน์ ไม่พบความแตกต่างของการเรียงตัวของแถบสับบนแขนของโครโมโซมในยุงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

จากการศึกษาความสามารถในการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* ของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F พบว่ามีเพียงยุงรูปแบบ B และ E สายพันธุ์จากจังหวัดเชียงใหม่เท่านั้นที่ยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* โดยให้อัตราโอโอซิตส์ 100% และอัตราสปอโรซอยต์ 66.67 และ 64.29% ตามลำดับ