รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

อนุกรมวิธานและพันธุศาสตร์เชิงประชากร ของแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae)ในประเทศไทย

โดย รศ. ดร. เฉลียว กุวังคะดิลก นายไพโรจน์ ประมวล
และนางสาวอัญชุลี เหลือล้น

ตุลาคม 2549

RECEIVED
BY [illegible] DATE 28/4/51

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

อนุกรมวิธานและพันธุศาสตร์เชิงประชากร ของแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae)ในประเทศไทย

โดย รศ. ดร. เฉลียว กุวังคะดิลก นายไพโรจน์ ประมวล
และนางสาวอัญชุลี เหลือล้น

ตุลาคม 2549

รหัสโครงการ BRT R_248004

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

อนุกรมวิธานและพันธุศาสตร์เชิงประชากร ของแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae)ในประเทศไทย

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. รศ. ดร. เฉลียว กุวังคะดิลก	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. นายไพโรจน์ ประมวล	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. นางสาวอัญชุลี เหลือล้น	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการ
จัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
(โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศาสตราจารย์วิสุทธิ์ ใบไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำแนะนำพร้อมทั้งให้ทุนสนับสนุนเพิ่มเติม ศาสตราจารย์ PeterH. Adler Department of Entomology, Soil & Plant Sciences, Clemson University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้คำแนะนำการศึกษาโครโมโซม นางสาวอุบล ตังควานิช และนางสาวเสน่ห์ จิตต์กลาง ที่ช่วยเก็บตัวอย่างในภาคสนาม

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R_248004 และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (RDG4530034)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRT R_248004

ชื่อโครงการ: อนุกรมวิธานและพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย

ชื่อหัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์เฉลียว กุวังคะดิลก

ชื่อผู้ช่วยวิจัย: นายไพโรจน์ ประมวล และนางสาวอัญชุลี เหลือล้น

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: scckv@mahidol.ac.th

ระยะเวลาดำเนินการ: 1 ปี (1 ตุลาคม 2548 - 30 กันยายน 2549)

สรุปผลงานวิจัย

การศึกษานี้พบแมลงริ้นดำที่ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แล้วจำนวน 41 ชนิด ริ้นดำเหล่านี้เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ 58 แห่งในบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย ริ้นดำทั้งหมดจัดจำแนกอยู่ใน 6 สกุลย่อยของสกุล *Simulium* Latreille s.l. ริ้นดำชนิด *S. (G.) tahanense* เป็นริ้นดำที่พบในประเทศมาเลเซียแต่งานวิจัยนี้ได้พบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ได้ทำการศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนแมลงริ้นดำชนิด *Simulium siamense* ที่ได้แยกเพศแล้ว จำนวน 1,828 ตัว ที่เก็บมาจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ 33 แห่ง ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคกลางของประเทศไทย โดยอาศัยความแตกต่างของอินเวอร์ชันที่คงที่ ความแตกต่างของโครโมโซมเพศและความแตกต่างของชนิดและความถี่ของอินเวอร์ชันที่ไม่คงที่ ทำให้แยกประชากรของแมลงริ้นดำ *S. siamense* ออกเป็น 5 cytoforms ได้แก่ cytoforms A, B, C, D และ E แมลงริ้นดำชนิด *S. siamense* มีลักษณะเด่นต่างจากแมลงริ้นดำชนิดอื่น โดยระบบการตัดสินเพศของเพศเมียเป็นแบบเฮเทอโรแกเมทิก (XY) และเพศผู้เป็นแบบโฮโมแกเมทิก (XX) cytoform A มีลักษณะต่างจาก cytoforms อื่น โดยมีอินเวอร์ชันบนออโทโซมที่ไม่คงที่จำนวน 23 อินเวอร์ชัน และมีโครโมโซมเพศที่ยังไม่ดิฟเฟอเรนทิเอท (คือโครโมโซม Y_0 ไม่ดิฟเฟอเรนทิเอทจากโครโมโซม X_0) cytoforms B, C และ D มีโครโมโซม Y ในเพศเมียต่างกัน (Y_1, Y_2 และ Y_3) cytoform E มีลักษณะต่างจาก cytoforms อื่น โดยมีอินเวอร์ชันที่คงที่ 2 อินเวอร์ชัน ได้แก่ IS-1 และ IIIS-1 cytoform A มีการกระจายอย่างกว้างขวางในบริเวณภาคเหนือ

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคกลาง ในขณะที่ cytoforms B, C และ D มีการกระจายจำกัดเฉพาะแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบางแห่งในภาคกลาง ถึงแม้ว่าตัวอ่อนของ 5 cytoforms จะมีรูปร่างลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันแต่ดูเหมือนมีแหล่งที่อยู่อาศัยต่างกันซึ่งควรจะได้ศึกษานิเวศวิทยาของแต่ละ cytoform ให้ละเอียดขึ้น ปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปสถานะภาพด้านอนุกรมวิธานของ cytoforms ของแมลงริ้นดำชนิด *S. siamense* ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าประชากรของแมลงริ้นดำชนิด *S. siamense* ประกอบด้วย cytoforms ที่ต่างกันอย่างน้อยที่สุด 5 cytoforms ซึ่งมี cytoform B เด่นที่สุด โดย cytoform B มีอินเวอร์ชันที่สัมพันธ์กับเพศอย่างสมบูรณ์และไม่แซร์อินเวอร์ชันบนออโทโซมที่ไม่คงที่กับ cytoforms อื่น

Abstract

Project Code: BRT R_248004

Project Title: Systematics and population genetics of black fly (Diptera: Simuliidae) in Thailand

Investigators: Chaliow Kuvangkadilok, Pairot Pramual, Anchulee Lualon
Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address: scckv@mahidol.ac.th

Project period: 1 October 2005 - 30 September 2006

Methodology and Results:

A total of 41 known *Simulium* species collected from 58 locations in northern, northeastern and central Thailand were identified based on morphological characters of larvae and pupae. All species are placed into 6 subgenera of the genus *Simulium* Latreille s.l. One known species namely *S.* (*G.*) *tahanense* was described in Malaysia but newly recorded for the first time from Thailand. Larval polytene chromosomes of 1,824 individuals of *Simulium siamense* from 32 locations in northern, northeastern, eastern and central Thailand were examined. Differences in sex chromosomes, fixed inversions and the kind and frequency of floating inversions revealed five cytoforms (A, B, C, D, and E). In contrast to most *Simulium* species, females of *S. siamense* are the heterogametic sex (XY) and males the homogametic sex (XX). Cytoform A differs from the others by having 23 floating inversions and undifferentiated sex chromosomes (Y_0 was undifferentiated from the X_0). Cytoforms B, C, and D differ from each other by having different Y chromosomes (Y_1, Y_2 and Y_3) in females. Cytoforms E is characterized by having two fixed inversions, *IS-1* and *IIIS-2*. Cytoform A is widely distributed throughout the geographic ranges of the species in northern, northeastern, eastern and central Thailand whereas cytoforms B, C, and D are restricted to a few locations in central Thailand. Although the larvae of the five cytoforms are morphologically similar, they seem

to occupy different ecological habitats, which should be further investigated. At present, no definite conclusion can be drawn as to the taxonomic status of the cytoforms of *S. siamense*. However, this study indicates that *S. siamense* is represented by at least five cytoforms, of which cytoform B is the most distinct by having complete sex linkage and no floating inversions.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

แมลงริ้นดำเพศเมียเป็นพาหะสำคัญของพยาธิและเชื้อโรคหลายชนิด เช่น พยาธิ *Onchocerca* ในคนและวัวควาย และถ่ายทอดโปรโตซัวสกุล *Leucocytozoon* ในนก ปัจจุบันการศึกษาแมลงริ้นดำมีความก้าวหน้ามาก โดยมีการศึกษาอนุกรมวิธานของวงศ์ (family) เป็นหลักสำคัญซึ่งรวมทั้งการศึกษา cytotaxonomy, molecular taxonomy และการสร้างความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการ อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับ cytotaxonomy ของแมลงริ้นดำในประเทศไทยมีน้อยมาก จากการศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนของโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนริ้นดำ แสดงให้เห็นว่าประชากรของแมลงริ้นดำบางชนิดแยกออกเป็น cytotypes ต่างๆ และบางทีอาจเป็นซิบลิงสปีชีส์ (sibling species) ของกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้แบบแผนการเรียงตัวของแบนด์และตำแหน่งของเครื่องหมายต่างๆบนโพลีทีนโครโมโซมยังเป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละสปีชีส์ ซึ่งสามารถใช้จำแนกชนิดของแลงริ้นดำได้อย่างแม่นยำ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษา cytotaxonomy ให้กว้างขวางมากขึ้นนอกเหนือไปจากการศึกษา morphotaxonomy แต่เพียงอย่างเดียว งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทั้งภาคสนามและภาคปฏิบัติในห้องทดลอง งานในภาคสนามได้ออกสำรวจเก็บตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงริ้นดำเพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิด พร้อมทั้งศึกษาการแพร่กระจายของริ้นดำชนิดต่างๆที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรทางกายภาพของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์ของตัวอ่อน ในห้องปฏิบัติการได้แยกชนิดโดยศึกษารูปร่างลักษณะของตัวอ่อน และการเตรียมสไลด์โพลีทีนโครโมโซมจากตัวอ่อนเพื่อศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์และพันธุศาสตร์เชิงประชากร

จากการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวอ่อนที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง สามารถแยกริ้นดำที่มีชื่อวิทยาศาสตร์แล้วจำนวน 41 ชนิด การกระจายของริ้นดำเหล่านี้ไม่เป็นอิสระ บางชนิดมีการกระจายทางภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวางขณะที่แมลงริ้นดำ 2-3 ชนิดอาศัยในแหล่งเพาะพันธุ์จำเพาะ จากการวิเคราะห์ผลโดยวิธี PCA ทำให้เห็นความสัมพันธ์ของการกระจายของชนิดกับปัจจัยทางกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์ เช่น ความเร็วของกระแสน้ำและขนาดของลำธาร นอกจากนี้การวิเคราะห์ผลโดยวิธี DFA แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำและชนิดของแมลงริ้นดำระหว่างภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง จากผลการศึกษาความแตกต่างของอินเวอร์ชันที่คงที่ ความแตกต่างของโครโมโซมเพศ และชนิดและความถี่ของอิน

เวอร์ชันบนออโตโซมที่ต่างกัน ทำให้แยกแมลงริ้นดำชนิด *S. siamense* ออกเป็น 5 cytoforms (A-E) โดย cytoform B มีลักษณะเด่นมากที่สุดเนื่องจากมีอินเวอร์ชันที่สัมพันธ์กับเพศอย่างสมบูรณ์และไม่แชร์อินเวอร์ชันที่ไม่คงที่กับ cytoforms อื่น cytoform A มีการกระจายอย่างกว้างขวางในบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศ ขณะที่ cytoforms B, C และ D มีการกระจายจำกัดเฉพาะแหล่งน้ำบางแห่งในภาคกลาง ส่วน cytoform E มีการกระจายในแหล่งน้ำบางแห่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออกและภาคกลาง นอกจากนี้ cytoforms A และ E อาศัยในแหล่งเพาะพันธุ์เดียวกันแบบซิมพาทริก แม้ว่าตัวอ่อนของ 5 cytoforms มีรูปร่างคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่ดูเหมือนว่าตัวอ่อนของ cytoforms เหล่านี้อาศัยในแหล่งน้ำที่มีระบบนิเวศวิทยาต่างกันซึ่งควรจะได้ทำการศึกษาต่อไป

Executive summary

Female adults of black flies have been well known as important vectors of some parasites and pathogens such as *Onchocerca* species in humans and cattles and *Leucocytozoon* speciies in birds. The study of black flies has advanced markedly in recent years. Significant advanced have been made in the systematics of the family, including cytotaxonomy, molecular taxonomy, and phylogenetic reconstruction. At present, knowledge of the cytotaxonomy of black flies from Thailand has been little studied. The previous studies of larval polytene chromosomes of black flies have revealed the existence of different cytotypes and/or sibling species complex within apparently uniform morphologies. Moreover, the banding patterns and the positions of landmarks of the polytene chromosomes are species specific which can be used to identify the species. It is therefore of interest to further study of cytotaxonomy other than morphotaxonomy. Both field work and laboratory studies were included in this research. Field work was focused on species diversity and species distribution relating to the physical parameters of the breeding sites. Laboratory techniques involved with morphological study and larval polytene chromosomes preparation for cytotaxonomic and population genetic studies.

On the basis of external morphological characters, 41 *Simulium* species in northern, northeastern and central Thailand were identified. The distributions of larval black fly were not random. Some species were geographically widespread while a few species were restricted to certain localities. Principal component analysis (PCA) indicated the correlation of species distribution and some physical parameters such as, water velocity and stream size. Moreover, the discriminant function analysis (DFA) showed differences in some physical parameters of the breeding sites and species distributions among northern, northeastern and central Thailand. Additionally, the populations of *S. siamense* collected from different localities in northern, northeastern, eastern and central Thailand were divided into 5 cytoforms (A-E) based on fixed inversions, sex chromosome differentiation and

the kind and frequency of autosomal inversions, of which cytoform B is the most distinct by having complex sex linkage and no floating inversions. Cytoform A widely distributed in northern, northeastern, eastern and central Thailand whereas cytoforms B, C, and D were restricted to a few locations in central Thailand. Cytoform E were found in some locations in northeast, east and central. Cytoforms A and E occurred sympatrically in some locations. Although the larvae of five cytoforms are morphologically indistinguishable, they seem to occupy different ecological habitats, which should be further investigated.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ง
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ฉ
Executive summary	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฎ
1 บทนำ	1
2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	6
4 ผลการศึกษา	10
5 วิจารณ์และสรุปผล	59
6 ปัญหา อุปสรรคและการแก้ไข	60
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำชนิดต่างๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย	17
2	ปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์ของแมลงริ้นดำในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย	29
3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำกับ Principal components โดยวิธี PCA และ Correlation analysis	35
4	Regression analysis ของการกระจายของแมลงริ้นดำกับปัจจัยทางกายภาพ (principal components)	36
5	แสดงความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพของแหล่งอาศัยและชนิดของริ้นดำที่พบแต่ละภูมิภาค โดยวิธี Discriminant Function Analysis (DFA)	37
6	แหล่งเก็บตัวอย่างและการกระจายของ cytoforms A-E ของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium siamense* ในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย	40
7	แสดงความถี่ของ floating inversions (ยกเว้น sex-linked inversions IS-2,3, IS-6 และ IS- 7) ใน cytoforms A ,C, D และ E ของ *Simulium siamense*	52
8	แสดงอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแขนสั้นแท่งที่ 1และแท่งที่ 3 ของตัวอ่อนเพศผู้และเพศเมียของ cytoforms A-E ของ *Simulium siamense*	54
9	ลักษณะจำเพาะของโครโมโซมใน cytoforms A, B, C, D และE ของ *Simulium siamense*	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงจังหวัดที่ศึกษาแมลงริ้นดำสัญลักษณ์จังหวัดดูในเนื้อหา	7
2	ตัวอ่อนแมลงริ้นดำชนิดต่างๆ a, *Simulium* (*N.*) *fruticosum*; b, *S.* (*G*) *asakoae*; c, *S.* (*S.*) *baimaii*; d, *S.* (*S.*) *chaliowae*; e, *S.* (*S.*) *fenestratum*; f, *S.* (*S.*) *yuphae*; g, headcapsule of *S.* (*G.*) *siamense* (dorsal view); h, head capsule (ventral view) showing postgenal cleft; ca=cephalic apotome; lf=labral fan; pc= postgenal cleft.	25
3	ตัวดักแด้ที่มีปลอกหุ้มแบบรองเท้าแตะและรองเท้าหุ้มส้นของริ้นดำชนิดต่างๆ a, *Simulium* (*N.*) *fruticosum*; b, *S.* (*N.*) *caudisclerum*; c, *S.* (*G.*) *asakoae*; d, *S.* (*S.*) *baimaii*; e, *S.* (*S.*) *chaliowae*; f, *S.* (*A.*) *oblongum*; gf=gill filaments	26
4	ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียของแมลงริ้นดำชนิดต่างๆ a, *Simulium* (*G.*) *asakoae* เพศผู้; b, เพศเมีย; c, *S.* (*S.*) *fenestratum* เพศผู้; d, เพศเมีย; e, *S.* (*S.*) *chiangmaiense* เพศผู้; f, เพศเมีย	27
5	กราฟ Discriminant function scores ของปัจจัยทางกายภาพ 9 ปัจจัยของแหล่งน้ำแต่ละภูมิภาค จากกราฟแสดงให้เห็นปัจจัยทางกายภาพมีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค	37
6	กราฟ Discriminant function scores ของชนิดริ้นดำที่พบแต่ละภูมิภาค จากกราฟแสดงให้เห็นว่าชนิดที่พบมีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค	38
7	แสดงแหล่งที่เก็บและการกระจายของ 5 cytoforms ของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium siamense*	43
8	โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนสั้นของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและขีดเส้นใต้คือ fixed inversion และที่ไม่ขีดคือ floating inversions เส้นประแสดง sex-linked inversions. C = เซนโตรเมียร์ NO= นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์	44
9	โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนยาวของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและไม่ขีดเส้นใต้คือ floating inversions. C = เซนโตรเมียร์	45
10	โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนสั้นของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่ที่แสดงโดยเส้นทึบและไม่ขีดเส้นใต้คือ floating inversions. C = เซนโตรเมียร์ db= ดับเบิลบับเบิล BR= วงแหวนบัลบิอนิ T= ทราปิซอยด์	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
11 โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนยาวของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและไม่ขีดเส้นใต้คือ floating inversions. C = เซนโตรเมียร์ Pb= พาราบัลบิอนิ gB=เกรย์แบนด์	46
12 โครโมโซมแท่งที่ 3 แขนสั้นของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและขีดเส้นใต้คือ fixed inversion อินเวอร์ชันที่ไม่ขีดคือ floating inversion. C = เซนโตรเมียร์ Bl= บลิสเตอร์	47
13 โครโมโซมแท่งที่ 3 แขนยาวของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและไม่ขีดเส้นใต้คือ floating inversions. C = เซนโตรเมียร์	47
14 Idiograms ของ 5 cytoforms ของ *Simulium siamense*: A, cytoform A; B, cytoform B; C, cytoform C; D, cytoform D; E, cytoform E. Fixed inversions แสดงโดยเส้นทึบด้านซ้ายมือและ ขีดเส้นใต้ Floating inversions แสดงโดยเส้นทึบด้านขวามือและไม่ขีดเส้น Sex-linked inversions แสดงโดยเส้นประ C= เซนโตรเมียร์, NO= นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์, db= ดับเบิลบับเบิล, Ss= ซูสตริง,BR= วงแหวนบัลบิอนิ, Pb= พาราบัลบิอนิ, gB= เกรย์แบนด์, Bl= บลิสเตอร์	51

1. บทนำ

ริ้นดำ (Black flies) หรือ คุ่น ซึ่งเป็นชื่อเรียกของชาวดอยบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย จัดอยู่ในอันดับ (Order) Diptera วงศ์ (Family) Simuliidae ปัจจุบันมีริ้นดำทั้งหมดจำนวน 1,809 ชนิด (species) ซึ่งจัดจำแนกอยู่ใน 32 สกุล (Genus) และพบเฉพาะฟอสซิลจำนวน 11 ชนิด ในสกุล *Cretoceosimulium* และ *Mesasimulium* (Crosskey และ Howard, 2004) ริ้นดำตัวเมียที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจในหลายประเทศตามแถบภูมิภาคต่างๆ ของโลกมี 4 สกุล คือ สกุล *Simulium* (มี 1,400 ชนิด) *Austrosimulium* (มี 25 ชนิด) *Prosimulium* (มี 103 ชนิด) และ *Cnephia* (มี 10 ชนิด) สกุล *Simulium* เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดและมีความสำคัญมากที่สุด ซึ่งประกอบด้วยริ้นดำจำนวน 1,400 ชนิดที่จัดจำแนกอยู่ใน 41 สกุลย่อย (Crosskey and Howard, 2004) ปัจจุบันจำนวนริ้นดำในประเทศไทยที่มีรายงานการพบ และตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แล้วมีทั้งหมดประมาณ 72 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นริ้นดำชนิดใหม่ที่รายงานการพบตั้งแต่ปี 2541-2550 จำนวน 35 ชนิด (Takaoka and Kuvangkadilok, 1999; Kuvangkadilok and Takaoka ,2000; Takaoka, 2001; Takaoka and Choochote, 2002; Takaoka and Choochote, 2004a-c; Takaoka and Choochote 2005a-j; Takaoka and Choochote 2006a-e; Jitklang and Kuvangkadilok 2007) ริ้นดำเหล่านี้จัดจำแนกอยู่ใน 6 สกุลย่อย (subgenus) ได้แก่ สกุลย่อย *Asiosimulium* (2 ชนิด) *Davisellum* (2 ชนิด) *Gomphostilbia* (17 ชนิด) *Montisimulium* (4 ชนิด) *Nevermannia* (6 ชนิด) และ *Simulium* (41 ชนิด) และแพร่กระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆของประเทศโดยเฉพาะภาคเหนือและภาคใต้ (เฉลียวและคณะ, 2544a; เฉลียวและคณะ, 2544b; Kuvangkadilok et al., 1999; Kuvangkadilok et al., unpublished data)

แมลงริ้นดำเพศเมียมีความสำคัญทางด้านการแพทย์และเศรษฐกิจ ทางด้านการแพทย์แมลงริ้นดำเพศเมียเป็นพาหะสำคัญของพยาธิ *Onchocerca volvulus* ตัวอ่อนพยาธิชนิดนี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Onchocerciasis (หรือโรค river blindness) ของคนที่อาศัยในทวีปอาฟริกา อเมริกากลาง อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ คาดว่าประชาชนมากกว่า 100 ล้านคนเสี่ยงต่อการเป็นโรค Onchocerciasis นอกจากนี้ประชากรประมาณ 18 ล้านคนมีพยาธินี้อยู่ในร่างกาย (Richards et al., 2000) และประชากรประมาณ 800,000 คน มีสายตาเสีย และ 270,000 คน ตาบอด ซึ่งเป็นผลมาจากการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณตาโดยตัวอ่อนของพยาธิ ตัวอ่อนของพยาธิยังมีผลทำให้ต่อมน้ำเหลืองบวม อักเสบ อุดตัน และอาจเกิดเป็นโรคเท้าช้างประเภทหนึ่ง ถ้าตัวอ่อนของพยาธิตายจะ

มีผลทำให้เกิดพิษบริเวณผิวหนัง โดยเกิดอาการคันมากและรงควัตถุสีที่ผิวหนังจะลดลง ควบคู่กับการขาดวิตามินเอ ผิวหนังสูญเสียการยืดหยุ่นทำให้มีลักษณะคล้ายโรคเรื้อน คนที่ถูกริ้นดำกัดมากๆจะเกิดอาการแพ้ เป็นไข้ ปวดหัว คลื่นไส้ และมีอาการหอบหืดเรียกว่า "ไข้ริ้นดำ" (black fly fever) ซึ่งพบในทหารอากาศซึ่งประจำอยู่ที่สถานีเรดาร์บนยอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนี้ผิวหนังของคนที่ถูกริ้นดำกัดจะมีลักษณะบวมแดง อักเสบ และคันมาก ในรายของคนที่มีอาการแพ้ริ้นดำ ผิวหนังจะบวมแดงและอักเสบมาก ต้องไปพบแพทย์ทำการรักษา ดังนั้นริ้นดำจึงเป็นแมลงที่เป็นอันตรายต่อนักท่องเที่ยวที่นิยมกางเต็นท์และดูนกบนภู บนดอยและในอุทยานแห่งชาติเป็นอย่างมาก แหล่งที่พบริ้นดำเป็นจำนวนมากที่ก่อกวนทำความรำคาญ และเป็นอันตรายต่อนักท่องเที่ยวคือ บริเวณช่องเย็น อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร-นครสวรรค์ ภูสอยดาว จังหวัดอุตรดิตถ์ และอ่างกา บริเวณยอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนี้ชาวบ้านและสัตว์เลี้ยงที่บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ถูกรบกวนโดยฝูงริ้นดำเช่นกัน

แมลงริ้นดำยังถ่ายทอดพยาธิ *Onchocerca* ชนิดอื่นๆไปสู่สัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า เช่น วัว ควาย เป็ด ไก่ เก้ง กวาง และหมูป่า และถ่ายทอดโปรโตซัวสกุล *Trypanosoma* และ *Leucocytozoon* ระหว่างพวกสัตว์ปีก เช่น นก และไก่ ทำให้เกิดโรค Leucocytozoonosis ในพวกสัตว์ปีก และเป็นตัวถ่ายทอดไวรัสและอะโบไวรัส (aboviruses) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆในสัตว์หลายชนิด เช่นโรค myxomatosis ในกระต่าย (Kettle, 1990)

แม้ไม่มีรายงานการเกิดโรค Onchocerciasis ในประเทศไทยเนื่องจากไม่มีพยาธิชนิด *Onchocerca volvulus* แต่เมื่อเร็วๆนี้ได้มีรายงานการพบตัวอ่อนพยาธิ *Onchocerca* ที่ไม่ทราบชนิดในเพศเมียของริ้นดำชนิด *S. nodosum* ที่เก็บมาจากกระบือที่บ้านปางแฟน ตำบลป่าเมี่ยง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ (Takaoka et al., 2003) และพบตัวอ่อนของพยาธิ *Onchocerca* ที่ไม่ทราบชนิดเช่นกันในตัวเมียของริ้นดำชนิด *S. nigrogilvum* ที่ดูดเลือดคนที่บ้านสบหาด ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ (Fukuda et al.; 2003) ดังนั้นแมลงริ้นดำในบ้านเราเป็นพาหะของพยาธิ *Onchocerca* ซึ่งอาจทำให้เกิดโรคชนิดใดชนิดหนึ่งในธรรมชาติ

ความสำคัญของแมลงริ้นดำด้านเศรษฐกิจ ได้มีรายงานการโจมตีสัตว์เลี้ยงโดยฝูงริ้นดำในภูมิภาคต่างๆของโลกก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก เช่น ไก่งวงและเป็ดเกิดเป็นโรค leucocytozoonosis ล้มตายเป็นจำนวนมากในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา (Adler et al, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานเมื่อปี 1974 ในประเทศ

ออสเตรเลียที่การโจมตีของแมลงริ้นดำมีผลทำให้น้ำหนักวัว และการผลิตน้ำนมลดลง 15% (Kettle, 1990)

ในการแยกชนิดของแมลงริ้นดำ ส่วนใหญ่จะแยกโดยหลักอนุกรมวิธานทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย (morphotaxonomy) (เช่น Crosskey 1973; Peterson 1984; Takaoka and Davies 1995) แต่การแยกชนิดโดยการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาอย่างเดียวมักมีปัญหาในกรณีที่ 1) เกิดการแปรผันของรูปร่างลักษณะภายนอกระหว่างประชากรของสปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่ง ที่เก็บมาจากแหล่งเพาะพันธุ์ต่างกัน อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมของแหล่งเพาะพันธุ์ต่างกัน เช่นลักษณะสีของตัวอ่อนของริ้นดำชนิด *S. nakhonense* ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติต่างๆจะมีสีน้ำตาลและสีค่อนข้างดำต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากสภาพและชนิดของแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย เช่น substrate 2) สปีชีส์ต่างกันแต่ประชากรของสองสปีชีส์มีรูปร่างคล้ายคลึงกัน อาจทำให้เข้าใจผิดว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน เช่น ลักษณะตัวอ่อนของ *S. sheilae* และ *S. angulistylum* ที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกันมาก 3) ซิบลิงสปีชีส์ของกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน (species complex) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถแยกได้โดยอาศัยหลักอนุกรมวิธานทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

การศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมควบคู่กับการศึกษารูปร่างสัณฐานวิทยาภายนอก จะช่วยให้การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงริ้นดำมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์โดยการศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมที่มาจากต่อมน้ำลายของตัวอ่อน ซึ่งมีขนาดใหญ่และย้อมติดสีสวยจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เพื่อประโยชน์ในการแยกชนิดแมลงต่างๆ (cytospecies) เช่น แมลงริ้นดำ ยุง และหนอนแดง การศึกษาโพลีทีนโครโมโซมสามารถวินิจฉัยสปีชีส์และซิบลิงสปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนได้เนื่องจากเหตุผลดังต่อไปนี้ คือ (Rothfels, 1981) 1) โพลีทีนโครโมโซมมีแบบแผนการเรียงตัวที่ละเอียดและจำเพาะ 2) ซิบลิงสปีชีส์แตกต่างกันโดยการเกิดอินเวอร์ชัน เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมและการจัดเรียงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ใหม่บนโพลีทีนหนึ่งแท่งหรือมากกว่าหนึ่งแท่ง ซึ่งทราบได้จากการเปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซม หลักการที่แสดงให้เห็นว่าซิบลิงสปีชีส์มีโครโมโซมต่างกันคือ a) มีการเรียงของแบนด์ที่จำเพาะ (fixed inversion) ในแต่ละซิบลิงสปีชีส์ b) มีระบบโครโมโซมเพศต่างกันโดยศึกษาจากความสัมพันธ์ระหว่างอินเวอร์ชันกับเพศ (sex-linked inversion) c) มีความถี่ของ inversion polymorphisms ต่างกัน ได้มีรายงานการพบ cytotypes และซิบลิงสปีชีส์ของแมลงริ้นดำที่เป็นพาหะของโรค Onchocerciasis จำนวนมากในทวีปอาฟริกา อเมริกา

กลาง และอเมริกาใต้ เช่นกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. damnosum* ในทวีปอาฟริกาที่มีผู้รายงานการพบซิบลิงสปีชีส์เพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 25 cytotypes ในอดีต (เช่น Dunbar, 1976; Vajime and Dunbar, 1975) เพิ่มมาเป็นอย่างน้อยที่สุด 40 cytotypes ในปัจจุบัน (เช่น Mafuyai *et al.*, 1996; Vajime *et al.*, 2000) กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. ochraceum* ในเม็กซิโกมี 3 cytotypes A, B และ C (Millest, 1992; Hirai *et al.*, 1994) กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. guianense* ในบราซิลมี 4 cytotypes คือ A, B, C และ D (Charalambous *et al.*, 1996) กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. exiguum* ในอีคัวดอร์มี 4 cytotypes (Charalambous *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนในทวีปอเมริกาเหนือ แคนาดา และออสเตรเลีย ในอเมริกาเหนือและแคนาดามีกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. pictipes* ประกอบด้วย 3 ซิบลิงสปีชีส์คือ *S. longistylatum*, *S. pictipes* A และ *S. pictipes* B สปีชีส์เหล่านี้มีโครโมโซม Y ต่างกัน (Bedo, 1975) กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. vittatum* มีสปีชีส์ IIIL-1 และ IS-7 ซึ่งอยู่ในสภาพซิมแพทริค แยกออกจากกันโดยอินเวอร์ชันบนโครโมโซม Y และอินเวอร์ชันบนโครโมโซม X (Rothfels and Featherson, 1981) ในประเทศออสเตรเลียมีกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. ornatipes* (species A และ B) และ *S. neomatipes* (species 1 และ 2) (Bedo, 1977) นอกจากนี้ในประเทศยุโรปตะวันออกมีกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *S. noelleri* ที่ประกอบด้วย cytotype A, B และ C (Adler and Kachvorian, 2001) นอกจากนี้แบบแผนการเรียงของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมที่ต่างกัน สามารถนำมาศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสปีชีส์ต่างๆของแมลงริ้นดำ (เช่น Bedo, 1977; Rothfels, 1979, 1981).

แมลงริ้นดำมีวงจรชีวิตสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ซึ่งมีระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวดักแด้อาศัยอยู่ในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหล (lotic environment) เนื่องจากตัวอ่อนของแมลงริ้นดำสามารถปรับตัวได้ดีกับแหล่งน้ำไหลจึงพบเป็นจำนวนมาก และมีการกระจายค่อนข้างหนาแน่นมาก กว่าแมลงน้ำกลุ่มอื่นๆ ดังนั้นตัวอ่อนแมลงริ้นดำจึงเหมาะสำหรับการศึกษาด้านความหลากหลายและนิเวศวิทยาในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหลเป็นอย่างยิ่ง โดยทั่วไปปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพมีผลต่อการกระจายของแมลงทุกชนิดที่อาศัยในแหล่งน้ำ (Allan, 1995) โดยอาศัยหลักการทางนิเวศวิทยาพบว่า สิ่งมีชีวิตมักอาศัยได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ดังนั้นเมื่อสภาวะแวดล้อมเกิดการเปลี่ยนแปลงจะส่งผลกระทบต่อความหลากหลาย และรูปแบบกระจายของสิ่งมีชีวิตอย่างชัดเจน แมลงริ้นดำแต่ละชนิดมักมีการกระจายในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน บางชนิดมีการกระจายในทุกสภาพแวดล้อม แต่บางชนิดมีการกระจายจำกัดในสภาพแวดล้อมใดสภาพแวดล้อมหนึ่งเท่านั้น ซึ่งแสดงถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีความเหมาะสมและความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

กับการกระจายตัวของแมลงริ้นดำ ตัวอย่างปัจจัยต่างๆ เช่น ขนาดของแหล่งน้ำ (stream size) อัตราความเร็วของกระแสน้ำ (water velocity) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) ค่าความขุ่นของน้ำ (turbidity) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) แหล่งอาศัยย่อย (microhabitats) อุณหภูมิน้ำ (water temperature) ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล (altitude) ค่าระยะห่างจากบริเวณที่ไหลลงสู่แม่น้ำ (lake outlets) และการมีลักษณะบ่อน้ำขัง (impoundment) เป็นต้น (Corkum and Currie, 1987; McCreadie et al, 1995) มีรายงานการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium perflavum* ในประเทศบราซิล พบว่าการกระจายของแมลงริ้นดำชนิดนี้สัมพันธ์กับบริเวณที่เป็นบ่อน้ำขัง (Hamada and McCreadie, 1999) ในรายงานต่อมาได้มีการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงริ้นดำจำนวน 11 ชนิดในแหล่งน้ำ 58 แห่งในประเทศบราซิล พบว่าการกระจายของแมลงริ้นดำเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับขนาดแหล่งน้ำ การมีบ่อน้ำขังและลักษณะการปกคลุมของเรือนยอด (canopy cover) (Hamada et al, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างซิบลิงสปีซีส์ของแมลงริ้นดำกับสภาวะแวดล้อมของแหล่งอาศัย เช่น ซิบลิงสปีซีส์ของกลุ่มสปีซีส์ซับซ้อน *S. tuberosum* อาศัยในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในอเมริกาเหนือ (Adler and McCreadie, 1977) และซิบลิงสปีซีส์ของกลุ่มสปีซีส์ซับซ้อน *S. damnosum* มีความสัมพันธ์กับบริเวณทุ่งหญ้าหรือบริเวณป่าในอาฟริกาใต้ (Boakye *et al.*, 1998). Joy และ Conn (2001) พบว่าการปรับตัวต่อแหล่งอาศัยของตัวอ่อนที่ต่างกัน เช่น ชนิดของลำธารต่างกัน จะเป็นกลไกแรกของการเกิดสปีซีส์ใหม่ของแมลงริ้นดำบนเกาะ Society

รายงานการศึกษาด้านนิเวศวิทยาของแมลงริ้นดำในประเทศไทยมีน้อยมาก Kuvangkadilok et al. (1999) ได้รายงานการศึกษาการกระจายของตัวอ่อนแมลงริ้นดำในเขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าการกระจายของแมลงริ้นดำมีความสัมพันธ์กับความสูงเหนือระดับน้ำทะเล และปัจจัยบางชนิด เช่น อุณหภูมิน้ำและความเร็วน้ำ และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของการแพร่กระจายของตัวอ่อนริ้นดำในเขตภาคใต้พบความสัมพันธ์ของการกระจายของตัวอ่อนริ้นดำบางชนิดกับอุณหภูมิของน้ำ ความกระด้าง และระดับความสูงของแหล่งน้ำ (เฉลียวและคณะ, 2544b)

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาความหลากหลายของชนิดและการแพร่กระจายของแมลงริ้นดำในภูมิภาคต่างๆของประเทศ พร้อมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของชนิดและการแพร่กระจายกับปัจจัยทางกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์

2. ศึกษาเปรียบเทียบแบนด์โพลีทีนโครโมโซม เพื่อจะได้ทราบว่าประชากรที่แพร่กระจายในแหล่งเพาะพันธุ์ต่างๆแยกเป็น cytoforms หรือ cytospecies หรือ sibling species ที่ต่างกันหรือไม่

3. วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การศึกษาภาคสนาม

1.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

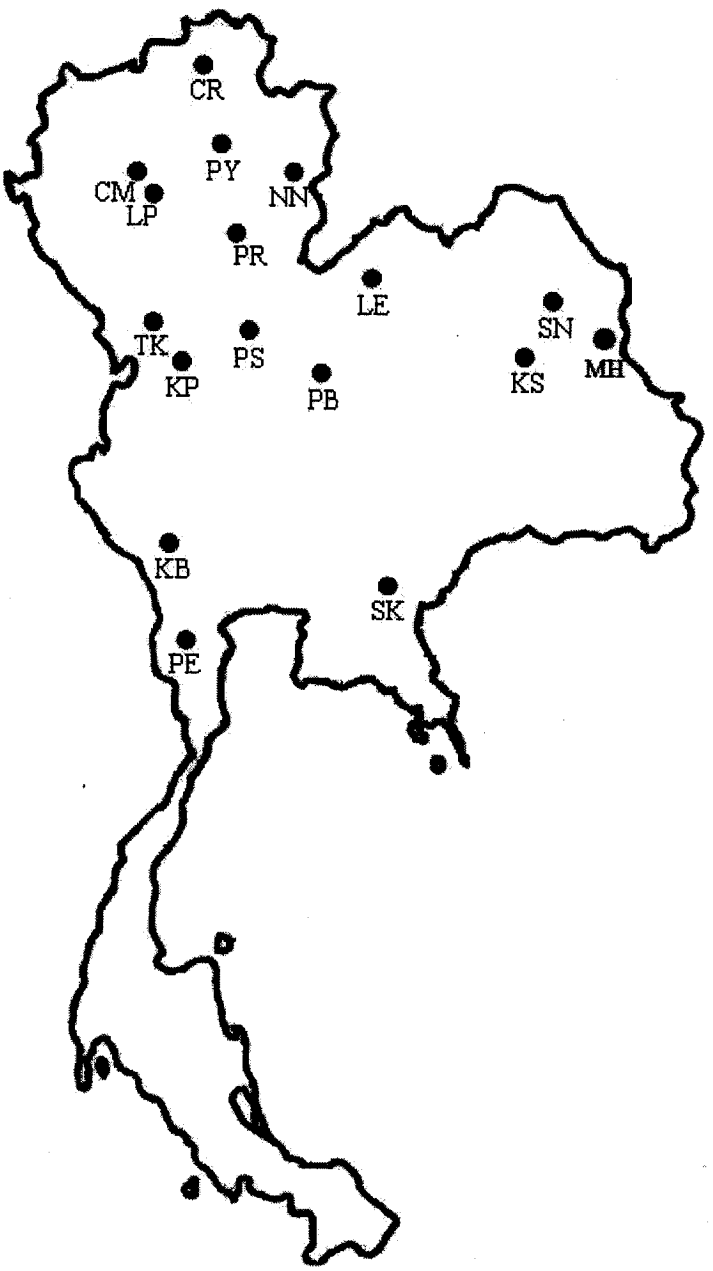
ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน 2548 – เดือนกุมภาพันธ์ 2549 ได้ทำการศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของตัวอ่อนริ้นดำในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจำนวน 58 แห่งบริเวณ 17 จังหวัดในเขตภาคเหนือ (34 แห่ง) ภาคกลาง (11 แห่ง) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (13 แห่ง) (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) ได้ทำการเก็บตัวอ่อนและตัวดักแด้จากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติที่ไหลมาจากน้ำตกและภูเขา อาจเป็นร่องน้ำไหลเล็กๆ หรือลำธารที่มีขนาดความกว้าง ความลึก ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล และปัจจัยทางกายภาพต่างกัน (ตารางที่ 2) ในบริเวณภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย ดังนี้

ภาคเหนือ 10 จังหวัดได้แก่ จังหวัดเชียงราย (CR, 1แห่ง) เชียงใหม่ (CM, 14แห่ง) พะเยา (PY, 4 แห่ง) ลำปาง (LA, 2 แห่ง) แพร่ (PR, 1 แห่ง) น่าน (NN, 2 แห่งตาก (TK, 2 แห่ง) กำแพงเพชร (KP, 5 แห่ง) เพชรบูรณ์ (PB, 2 แห่ง) และพิษณุโลก (PS, 1, แห่ง)

ภาคกลาง 3 จังหวัดได้แก่ เพชรบุรี (PE, 2 แห่ง) กาญจนบุรี (KB, 8 แห่ง) และสระแก้ว (SK, 1 แห่ง)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 4 จังหวัดได้แก่ กาฬสินธุ์ (KS, 2 แห่ง) สกลนคร (SN, 5 แห่ง) มุกดาหาร (MH, 4 แห่ง) และเลย (LE, 2 แห่ง)

แหล่งน้ำเพาะพันธุ์ริ้นดำมีระดับความสูงต่ำสุดตั้งแต่ 67 เมตรถึงระดับสูงสุดประมาณ 2400 เมตร



ภาพที่ 1 แสดงจังหวัดที่ศึกษาแมลงริ้นดำสัญลักษณ์จังหวัดดูในเนื้อหา

1.2 วิธีการเก็บ

เก็บตัวอย่างโดยใช้ปากคีบปลายแหลมคีบตัวอ่อนที่เกาะบนหิน ต้นหญ้า ใบไม้สดและเศษวัสดุต่างๆที่ลอยในน้ำไหล แบ่งตัวอ่อนที่จับได้เป็น 3 ส่วน ตัวอ่อนส่วนที่หนึ่งดองใน Carnoy's fixative (2 ส่วน absolute ethanol: 1 ส่วน glacial acetic acid)

สำหรับศึกษาโพลีทีนโครโมโซม ตัวอ่อนส่วนที่สองเก็บไว้ใน 80% ethanol เพื่อศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยา การเก็บรักษาต่อมน้ำลายและโพลีทีนโครโมโซมให้อยู่ในสภาพดีต้องเปลี่ยนน้ำยา fixative หลังจากใส่ตัวอ่อนประมาณ 2 นาที 10 นาที และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ และต้องแช่หลอดเก็บตัวอย่างในน้ำแข็งตลอดเวลา สำหรับตัวดักแด้ดองบางส่วนใน 80% ethanol แต่ส่วนใหญ่จะเลี้ยงในหลอดให้เจริญเป็นตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยบางส่วนได้จากการจับโดยใช้สวิงและบางส่วนได้จากการใช้คนเป็นเหยื่อล่อ ดองตัวเต็มวัยบางส่วนใน 80% ethanol และ absolute ethanol และเก็บบางส่วนของตัวเต็มวัยเป็นตัวอย่างแห้ง

1.3 วิธีศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ

ในการศึกษาภาคสนามได้ทำการวัดค่าปัจจัยทางกายภาพของน้ำที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของริ้นดำและจดบันทึกลักษณะทั่วไปของแหล่งเพาะพันธุ์ ดังนี้ บันทึกวันที่ (collection date) วัดความสูงเหนือระดับน้ำทะเล (altitude) วัดความกว้างของแหล่งน้ำ (stream width) โดยใช้ตลับเมตรหรือเชือก วัดความลึกของแหล่งน้ำ (stream depth) โดยใช้ไม้เมตร วัดอัตราความเร็วกระแสน้ำ (water velocity) โดยใช้ Global Flow Probe FP201 วัดอุณหภูมิน้ำ (water temperature) และค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (total dissolved oxygen) โดยใช้เครื่องมือ YSI (Yellow Springs Instrument, Co., model 55) วัดค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ (conductivity) และค่าความเค็มของน้ำ (salinity) โดยใช้เครื่องมือ YSI (Model 30) ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH-meter แบบปากกา วัดความชื้นของอากาศและอุณหภูมิอากาศ ค่าปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำได้ทำการวัด 3 ครั้งในแต่ละแห่งเพื่อหาค่าเฉลี่ย นอกจากนี้ยังทำการบันทึกสภาพนิเวศวิทยาทั่วไปของแหล่งน้ำไหลที่สามารถสังเกตได้

1.4 วิธีวิเคราะห์ข้อมูลปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์

วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.0 (SPSS Inc.) เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ (correlation analysis) ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำต่างๆกับ Principal Component โดยวิธี Principal Component Analysis (PCA) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายของชนิดแมลงริ้นดำกับ Principal Component โดยใช้วิธี Stepwise regression analysis ตรวจสอบความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์ในแต่ละภูมิภาคและความแตกต่างของชนิดแมลงริ้นดำที่พบในแต่ละภูมิภาค โดยใช้วิธี Discriminant Function Analysis (DFA)

2. การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.1 การจำแนกชนิดแมลงริ้นดำโดยการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยา

ทำการจำแนกชนิดของแมลงริ้นดำในระยะตัวอ่อนและตัวดักแด้ โดยการเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวอ่อน และตัวดักแด้ที่ได้มีรายงานการศึกษาจากประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย ดังนี้ ประเทศไทย (Takaoka and Suzuki, 1984; Takaoka and Saito, 1996; Takaoka and Adler, 1997; Takaoka and Kuvangkadilok, 1999; Kuvangkadilok and Takaoka ,2000; Takaoka, 2001; Takaoka and Choochote, 2002; Takaoka and Choochote, 2004a, b, c; Takaoka and Choochote 2005a, b, c, d, e, f, g, h, i, j) มาเลเซีย (Takaoka and Davies, 1995) อินเดีย (Datta,1974) ไต้หวัน (Takaoka, 1979) และญี่ปุ่น (Takaoka, 1977) ลักษณะสำคัญของตัวอ่อนที่ใช้แยกชนิด คือ สีของลำตัว การมีหรือไม่มี ventral papillae และลักษณะของ postgenal cleft สำหรับตัวดักแด้ลักษณะสำคัญที่ใช้แยกคือ ลักษณะของปลอกหุ้มดักแด้ (cocoon) และจำนวนและแบบแผนการเรียงตัวของ gill filaments

2.2 วิธีศึกษาโพลีทีนโครโมโซมและวิธีแยกเพศ

โพลีทีนโครโมโซมของริ้นดำเตรียมจากต่อมน้ำลายของตัวอ่อนที่เจริญเติบโตระยะสุดท้าย (สังเกตจาก gill spot สีดำบริเวณด้านข้างของปล้องอก) ทำการย้อมโพลีทีนโครโมโซมตามวิธีของ Rothfels และ Dundar (1953) ดังนี้ เปิดส่วนท้องด้านล่างของตัวอ่อนที่ดองในน้ำยา Carnoy's fixative ภายใต้กล้องสเตอริโอ แช่ตัวอ่อนในน้ำกลั่น 20 นาทีและแช่ในกรด HCl 1N ที่อุณหภูมิ 62-65 °C ประมาณ 10 นาที แล้วแช่ตัวอ่อนในสี Feulgen ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อย้อมโพลีทีนโครโมโซม หลังจากนั้นแช่ตัวอ่อนใน sulfer water ประมาณ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเย็น 2 ครั้ง เขี่ยต่อมน้ำลายและวางต่อมน้ำลายใน 50% acetic acid บนแผ่นสไลด์แล้วปิดด้วย coverslip และกด coverslip ด้วยหัวแม่มือเพื่อให้โพลีทีนโครโมโซมกระจาย แล้วหยดสี 2% carmine ที่ขอบของ coverslip เพื่อให้โพลีทีนโครโมโซมติดสีเข้มขึ้น หลังจากนั้นทำการศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูปโครโมโซมที่เห็นแบนด์ชัดเจนสำหรับทำแผนที่มาตรฐานของโครโมโซม การย้อมโดยวิธีนี้สามารถตรวจเพศของแมลงริ้นดำได้ภายใต้กล้องสเตอริโอ โดยศึกษาลักษณะรูปร่างอวัยวะเพศที่อยู่ด้านบนของปล้องท้องที่ 6 อัณฑะของเพศผู้จะมีลักษณะเล็กและกลม ขณะที่รังไข่ของเพศเมียมีลักษณะยาวรี

4. ผลการศึกษา

1. การแพร่กระจายและชนิดของแมลงริ้นดำ

งานวิจัยนี้ได้พบริ้นดำที่มีผู้รายงานการพบ และตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แล้วจำนวน 41 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นริ้นดำที่มีชื่อวิทยาศาสตร์แล้วแต่เพิ่งรายงานการพบในประเทศไทยเป็นครั้งแรก 1 ชนิด คือ *Simulium tahanense* เปอร์เซนต์และจำนวนของริ้นดำแต่ละชนิดที่จับได้แสดงในตารางที่ 1 ตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียของริ้นดำบางชนิดที่พบแสดงในภาพที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ริ้นดำทั้งหมดอยู่ในสกุล (Genus) *Simulium* และถูกจัดจำแนกอยู่ใน 6 สกุลย่อย (Subgenus) ริ้นดำเหล่านี้มีการแพร่กระจายในจังหวัดต่างๆต่อไปนี้

1. สกุลย่อย *Asiosimulium* Takaoka and Choochote พบ 1 ชนิดได้แก่

1. ***Simulium oblongum*** พบ 2 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ กิโลเมตรที่ 27+900 ทางหลวงหมายเลข 2330 จังหวัดสกลนคร และ น้ำตกผานางคอย อำเภอนาคู จังหวัดกาฬสินธุ์

2. สกุลย่อย *Daviesellum* Takaoka and Adler พบ 1 ชนิด ได้แก่

2. **Simulium *pahangense*** พบ 1 แห่งที่ น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

3. สกุลย่อย *Gomphostilbia* Enderlein พบจำนวน 11 ชนิด ซึ่งจำแนกอยู่ใน 3 กลุ่มสปีชีส์ (species-group) ดังนี้

A. *batoense* – group

3. ***Simulium angulistylum*** พบ 4 แห่งในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงและภาคกลาง ได้แก่ แก่งผานางคอยในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร กิโลเมตรที่ 1-2 ทางหลวงหมายเลข 2106 จังหวัดสกลนคร และบ้านกลางแคมป์ และทางขึ้นเขาพะเนินทุ่ง กิโลเมตรที่17 ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

4. ***Simulium decuplum*** พบ 6 แห่งในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง และน้ำตกแม่เหียน อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา ทางขึ้นช่องเย็นกิโลเมตรที่ 72+250 ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร ห้วยขมีนน้อยในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก และบ้านกลางแคมป์ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

5. ***Simulium dentistylum*** พบ 1 แห่งในภาคเหนือ ได้แก่ ข้างโรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก

6. ***Simulium gombakense*** พบ 3 แห่งในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ ช่องเย็นในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร น้ำตกไตช่องถ่อง และน้ำตกเกริงกระเวีย จังหวัดกาญจนบุรี

7. ***Simulium parahiyangum*** พบ 6 แห่งในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ ห้วยแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยา แก่งผานางคอยในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร น้ำตกตาดหมอก จังหวัดเพชรบูรณ์ ห้วยปากคอกและบ้านอู่ล่อง อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และทางขึ้นเขาพะเนินทุ่งในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

8. ***Simulium siamense*** พบ 25 แห่งในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ได้แก่ บ้านทุ่งยาว อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย ห้วยแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยา กิโลเมตรที่ 50 ทางหลวงหมายเลข 101 และห้วยสาคร จังหวัดน่าน ข้างโรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก คลองบางปลาสร้อย อำเภอปางศิลาทอง และแก่งผานางคอยในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร ห้วยองธิ ห้วยเขย่ง ห้วยปากคอก และ บ้านอู่ล่อง จังหวัดกาญจนบุรี บ้านกลางแคมป์และทางขึ้นเขาพะเนินทุ่ง ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี บ้านน้ำพุ กิโลเมตรที่ 26-27 ทางหลวงหมายเลข 2330 สพานกิโลเมตรที่ 27 + 900 ทางหลวงหมายเลข 2330 กิโลเมตรที่ 1-2 ทางหลวงหมายเลข 2106 และบ้านสร้างแก้ว จังหวัดสกลนคร กิโลเมตรที่ 24 ทางหลวงหมายเลข 2287 อำเภอเขาวง จังหวัดกาฬสินธุ์ น้ำตกตาดโตน อำเภอหนองสูง น้ำตกตาดโตน อำเภอคำชะอี ห้วยคันแท และน้ำตกภูสีฐาน จังหวัดมุกดาหาร และน้ำตกบ้านด่านคู่ อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย

9. ***Simulium tahanense*** พบ 6 แห่งในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ อุทยานแห่งชาติเชียงดาว และแม่น้ำแม่เกี๋ยง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ คลองบางปลาสร้อย อำเภอปางศิลาทอง แก่งผานางคอยและทางขึ้นช่องเย็น กิโลเมตรที่ 72+250 ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร และบ้านโป่ง อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย

B. *ceylonicum* - group

10. ***Simulium asakoae*** พบ 8 แห่งในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียง เหนือ ได้แก่ โครงการหลวงและน้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์

น้ำตกดอยปุยในอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อุทยานแห่งชาติเชียงดาว แม่น้ำปิง อำเภอเชียงดาว อุทยานแห่งชาติแม่ฝาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง น้ำตกแม่เหยียน อำเภอแม่ใจ และบ้านท่ากลอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ข้างโรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก แก่งผานางคอยและทางขึ้นช่องเย็น กิโลเมตรที่ 72+250 ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร ห้วยขมิ้นน้อยในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก กิโลเมตรที่ 26-27 ทางหลวงหมายเลข 2330 จังหวัดสกลนคร น้ำตกภูสีฐาน จังหวัดมุกดาหาร น้ำตกบ้านด่านคู่และบ้านโป่ง อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย

11. ***Simulium inthanonense*** พบ 1 แห่งในภาคเหนือ ได้แก่ น้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

12. ***Simulium sheilae*** (*S.* sp. g) พบ 2 แห่งในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ น้ำตกห้วยทรายเหลืองในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่และน้ำตกเกริงกระเวีย จังหวัดกาญจนบุรี

C. *varicorne* – group

13. ***Simulium burtoni*** พบ 6 แห่งในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่บ้านทุ่งยาว จังหวัดเชียงราย น้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์และบ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ข้างโรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก ทางขึ้นช่องเย็น กิโลเมตรที่ 72+250ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร บ้านกลางแคมป์ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี และสพานกิโลเมตรที่ 27 + 900 ทางหลวงหมายเลข 2330 จังหวัดสกลนคร

4. สกุลย่อย *Montisimulium* Rubtsov พบเพียง 1 ชนิด คือ

14. ***Simulium merga*** (*S.* sp. G) พบเฉพาะที่อ่างกายอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

5. สกุลย่อย *Nevermannia* Enderlein พบ 4 ชนิด ซึ่งจำแนกอยู่ใน 3 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่

A. *feuerborni* – group

15. ***Simulium fruticosum*** พบ 4 แห่งในภาคเหนือ ได้แก่ โครงการหลวงและน้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์และน้ำตกดอยปุยในอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ และช่องเย็นในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

16. ***Simulium* sp. nr. *feuerborni*** พบที่น้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

B. *ruficorne* – group

17. ***Simulium aureohirtum*** พบ 12 แห่งในภาคเหนือ และ ภาคตะวันออก เฉียงเหนือ ได้แก่ บ้านท่ากลอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง ช่องเย็นในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร ห้วยขมิ้นน้อยในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก คลองท่ากระบาก อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว บ้านน้ำพุและบ้านสร้างแก้ว จังหวัดสกลนคร กิโลเมตรที่ 24 ทางหลวงหมายเลข 2287 อำเภอเขาวง จังหวัดกาฬสินธุ์ น้ำตกตาดโตน อำเภอหนองสูงและน้ำตกภูสีฐาน จังหวัดมุกดาหาร น้ำตกบ้านด่านคู่และบ้านโป่ง อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย

C. *vernum* – group

18. ***Simulium caudisclerum*** พบเฉพาะที่น้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

6. สกุลย่อย *Simulium* Latreille s. str. พบ 23 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ใน 7 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่

A. *griseifrons* – group

19. ***Simulium grossifilum*** พบที่ทางขึ้นช่องเย็น กิโลเมตรที่ 72+250ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

20. ***Simulium mediocoloratum*** พบ 2 แห่งในภาคเหนือ ได้แก่ น้ำตกดอยปุยในอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ และน้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

21. ***Simulium nigrogilvum*** พบ 3 แห่งในภาคเหนือ ได้แก่ น้ำตกห้วยทรายเหลืองในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ และบ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ และอุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง

22. ***Simulium phayaoense*** พบเฉพาะที่น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

23. ***Simulium phukaengense*** พบเฉพาะที่น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

24. ***Simulium rudniki*** พบ 4 แห่งในภาคเหนือ ได้แก่น้ำตกแม่ยะและน้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ คลองบางปลาสร้อย อำเภอปางศิลาทอง และแก่งผานางคอยในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

B. *multistriatum* – group

25. ***Simulium chaliowae*** พบเฉพาะที่น้ำตกห้วยโรง อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่

26. ***Simulium fenestratum*** พบ 12 แห่งในภาคเหนือ ได้แก่ บ้านทุ่งยาว จังหวัดเชียงราย น้ำตกห้วยทรายเหลือง โครงการหลวง น้ำตกสิริภูมิและกิ่วแม่ปานในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด อุทยานแห่งชาติเชียงดาว แม่น้ำปิง และแม่น้ำแม่เกี๋ยง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่น้ำตกแม่เหยียน อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง และทางขึ้นช่องเย็นกิโลเมตรที่ 72+250ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

27. ***Simulium sp. nr. fenestratum*** พบ 2 แห่งในภาคเหนือ ได้แก่ น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา และห้วยขมื่นน้อยในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก

28. ***Simulium lampangense*** พบเฉพาะที่น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

29. ***Simulium takense*** พบ 3 แห่งในภาคกลาง ได้แก่ น้ำตกไดช่องถ่องและน้ำตกเกริงกระเวีย จังหวัดกาญจนบุรี และทางขึ้นเขาพะเนินทุ่ง กิโลเมตรที่17 ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

C. *nobile* – group

30. ***Simulium nodosum*** พบ 10 แห่งในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ บ้านทุ่งยาว จังหวัดเชียงราย บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด อุทยานแห่งชาติเชียงดาว แม่น้ำปิงและถ้ำดับเต่า อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ข้างโรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก บ้านแปลง 2 ห้วยปากคอก และบ้านอู่ล่อง จังหวัดกาญจนบุรีและบ้านโป่ง อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย

D. *striatum* – group

31. ***Simulium chiangmaiense*** พบเฉพาะในภาคเหนือจำนวน 6 แห่ง ได้แก่ บ้านทุ่งยาว จังหวัดเชียงราย บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด แม่น้ำปิง แม่น้ำแม่

เกี๋ยง อำเภอเชียงดาวและถ้ำตับเต่า อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ และคลองบางปลาสร้อย อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร

32. ***Simulium nakhonense*** พบ 19 แห่งในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียง เหนือ และภาคกลางได้แก่ บ้านทุ่งยาว จังหวัดเชียงราย น้ำตกวังควาย ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด แม่น้ำปิง แม่น้ำแม่เกี๋ยง อำเภอเชียงดาวและถ้ำตับเต่า อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง ห้วยแม่สาคร จังหวัดน่าน คลองบางปลาสร้อย อำเภอปางศิลาทอง แก่งผานางคอยในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร น้ำตกตาดหมอก จังหวัดเพชรบูรณ์ ห้วยองธิ บ้านแปลง 2 ห้วยเขย่ง ห้วยปากคอก และบ้านอู่ล่อง จังหวัดกาญจนบุรี บ้านกลางแคมป์และทางขึ้นเขาพะเนินทุ่ง ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรีและน้ำตกบ้านด่านคู่ อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย

33. ***Simulium quinquestriatum*** พบ 13 แห่งในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางได้แก่ บ้านทุ่งยาว จังหวัดเชียงราย น้ำตกแม่ยะและน้ำตกวังควาย ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง คลองบางปลาสร้อย อำเภอปางศิลาทอง แก่งผานางคอยในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร บ้านอู่ล่อง น้ำตกไดซ่องถ่อง และน้ำตกเกริงกระเวีย จังหวัดกาญจนบุรี บ้านกลางแคมป์ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี น้ำตกตาดโตน อำเภอหนองสูง จังหวัดมุกดาหาร และน้ำตกบ้านด่านคู่ อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย

E. *tuberosum* – group

34. ***Simulium doipuiense*** (*S.* sp. E) พบเฉพาะที่น้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์และน้ำตกดอยปุยในอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่

35. ***Simulium rufibasis*** พบในภาคเหนือที่น้ำตกห้วยทรายเหลือง โครงการหลวง น้ำตกสิริภูมิและกิ่วแม่ปานในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

36. ***Simulium sp. nr. rufibasis*** พบที่น้ำตกห้วยทรายเหลืองและโครงการหลวง ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

37. ***Simulium setsukoae*** พบเฉพาะที่อ่างกายอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

38. ***Simulium tani*** พบ 14 แห่งในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ บ้านทุ่งยาว จังหวัดเชียงราย น้ำตกสิริภูมิในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด แม่น้ำแม่เกี๋ยง อำเภอเชียงดาวและถ้ำตับเต่า อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมืองและน้ำตกแม่เหียน อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง แก่งผานางคอยในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร น้ำตกตาดหมอก จังหวัดเพชรบูรณ์ ห้วยขมื่นน้อยในอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก บ้านกลางแคมป์และทางขึ้นเขาพะเนินทุ่ง ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรีและน้ำตกบ้านด่านคู่ อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย

39. ***Simulium weji*** พบ 3 แห่งในภาคเหนือ และภาคกลาง ได้แก่น้ำตกธารทอง จังหวัดลำปาง กิโลที่ 5 ทางหลวงหมายเลข 1090 แม่สอด-พบพระ อำเภอแม่สอด จังหวัดตากและน้ำตกไตช่องถ่อง จังหวัดกาญจนบุรี

40. ***Simulium yuphae*** พบเฉพาะในภาคเหนือจำนวน 3 แห่งได้แก่ น้ำตกดอยปุยในอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยาและทางขึ้นช่องเย็น กิโลเมตรที่ 72+250ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

F. *variegatum* – group

41. ***Simulium chamlongi*** พบเฉพาะในภาคเหนือ ได้แก่ น้ำตกห้วยทรายเหลือง โครงการหลวง น้ำตกสิริภูมิและกิ่วแม่ปานในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ และแม่น้ำปิง จังหวัดเชียงใหม่

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำชนิดต่าง ๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย

Location (Altitude)	Collection date	Number analyzed	*S. (A.) oblongum*	*S. (D.) pahangense*	*S. (G.) angulistylum*	*S. (G.) decuplum*	*S. (G.) dentatylum*	*S. (G.) gombakense*	*S. (G.) parahyangum*	*S. (G.) siamense*	*S. (G.) tahanense*	*S. (G.) asakoae*	*S. (G.) inthanonense*	*S. (G.) ahelise*	*S. (G.) burtoni*	*S. (M.) merga*	*S. (N.) fruticosum*	*S. (N.) sp. nr. feuerborni*	*S. (N.) aurnohitum*	*S. (N.) caudiaclarum*	*S. (S.) grassitium*	*S. (S.) mediocoloratum*	*S. (S.) nigrogilvum*	*S. (S.) phayaoense*	*S. (S.) phukaenganse*	*S. (S.) rudnicki*	*S. (S.) challowae*	*S. (S.) fenestratum*	*S. (S.) sp. nr. fenestratum*	*S. (S.) lampangense*	*S. (S.) takense*	*S. (S.) nodosum*	*S. (S.) chiangmaiense*	*S. (S.) nakhonense*	*S. (S.) quinquestriatum*	*S. (S.) dolpulense*	*S. (S.) rufibasis*	*S. (S.) sp. nr. rufibasis*	*S. (S.) seksukoae*	*S. (S.) tani*	*S. (S.) wuji*	*S. (S.) yuphae*	*S. (S.) chamlongi*	unknown
North																																											
Chiang Rai																																												
1. Ban Thong Yao, Wiang Pa Pao District (665 m)	23 Jul 05	610	–	–	–	–	–	–	–	0.2 (1)	–	–	–	–	2.3 (14)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3.9 (18)	–	–	–	2.0 (12)	11.8 (72)	78.0 (476)	2.6 (16)	–	–	–	–	0.2 (1)	–	–	–	–
Chiang Mai																																												
2. Mae Ya WF (520 m)	24 Jul 05	857	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	60.8 (521)	–	–	–	–	–	–	–	–	39.2 (336)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Wang Khwai WF (421 m)	24 Jul 05	422	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	90.3 (381)	9.7 (41)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4. Huai Sai Luaeng WF (1,050 m)	24 Jul 05	133	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.5 (2)	–	–	–	–	–	–	–	–	3.0 (4)	–	–	–	–	76.7 (102)	–	–	–	–	–	–	–	–	18.0 (24)	–	–	–	–	–	0.8 (1)
	25 Jan 06	117	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	98.3 (115)	–	–	–	–	0.9 (1)	0.9 (1)
5. Royal Project (1,400 m)	24 Jul 05	300	–	–	–	–	–	–	–	–	–	33.3 (100)	–	–	–	–	53.7 (161)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.3 (4)	–	–	–	–	–	–	–	–	9.3 (28)		–	–	–	–	2.3 (7)	–

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นตำชนิดต่างๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (ต่อ)

| | | |

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำชนิดต่างๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (ต่อ)

| | | |

ารางที่ 1 เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำชนิดต่าง ๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (ต่อ)

22. Km. 50 Road No. 101(389 m)	26 Jul 05	51	–	–	–	–	–	–	–	100.0 (51)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23. Huai Mae Sa Khon (389 m)	26 Jul 05	66	–	–	–	–	–	–	–	98.5 (65)		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.5 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Phrae																																															
24. Huai Rong WF, Rong Kwang District (402 m)	26 Jul 05	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	100.0 (4)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Tak																																															
25. Km 5 Road No. 1090 Maesod-Phobpra, Maesod District (423 m)	22 Jul 05	19	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	68.4 (13)	–	–	31.6 (6)		
26. Phoppra Hospital, Phoppra District (400 m)	22 Jul 05	67	–	–	–	–	1.5 (1)	–	–	53.7 (36)	–	13.4 (9)	–	–	19.4 (13)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	11.9 (8)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Khampangphet																																															
27. Klong Bang Pla Soi, Pangsilathong District (168 m)	24 Nov 05	613	–	–	–	–	–	–	–	0.2 (1)	0.2 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2 (1)	–	–	–	–	–	–	1.3 (8)	54.8 (336)	43.4 (266)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
28. Kang Pha Nang Koi (1) (313 m)	24 Nov 05	115	–	–	6.1 (7)	–	–	–	10.4 (12)	1.7 (2)	55.7 (64)	2.6 (3)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	23.5 (27)	–	–	–	–				
29. Kang Pha Nang Koi (2) (310 m)	24 Nov 05	741	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.4 (3)	–	–	–	–	–	–	–	14.7 (108)	84.9 (629)	–	–	–	–	0.1 (1)	–	–	–	–

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำชนิดต่างๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (ต่อ)

30. Chong Yen (1,300 m)	25 Nov 05	312	–	–	–	–	–	0.3 (1)	–	–	–	–	10.9 (34)	–	–	–	86.5 (276)	–	0.3 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
31. Road to Chong Yen Km 72+250 (486 m)	25 Nov 05	261	–	–	–	1.5 (4)	–	–	–	–	2.7 (7)	0.4 (1)	–	–	0.8 (2)	–	–	–	–	–	11.9 (31)	–	–	–	–	–	–	77.0 (201)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.5 (4)		4.2 (11)					
Phetchabun																																															
32. Tad Mork WF 1 (520 m)	27 Jul 05	415	–	–	–	–	–	–	0.7 (3)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	91.8 (381)	–	–	–	–	–	6.8 (28)	–	–	–	0.7 (3)		
33. Tad Mork WF 2 (520 m)	27 Jul 05	317	–	–	–	–	–	–	0.6 (2)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	87.4 (277)	–	–	–	–	–	12.0 (38)	–	–	–	–		
Phitsanulok																																														
34. Huai Khamunnoi (1,226 m)	26 Jul 05	621	–	–	–	0.2 (1)	–	–	–	–	–	19.5 (121)	0.2 (1)	–	–	–	–	–	0.2 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	69.9 (434)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	8.2 (51)	–	1.6 (10)	–	0.3 (2)		
Central																																														
Kanchanaburi																																														
35. Huai Ong Thi, Thong Pha Phum District (106 m)	22 Nov 05	135	–	–	–	–	–	–	–	20.0 (27)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	80.0 (108)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
36. Ban Plang 2, Thong Pha Phum District (150 m)	22 Nov 05	118	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	100.0 (118)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
37. Huai Khayeng Ban Lampilok, Thong Pha Phum District (191 m)	22 Nov 05	267	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.7 (2)	–	91.4 (244)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำชนิดต่างๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (ต่อ)

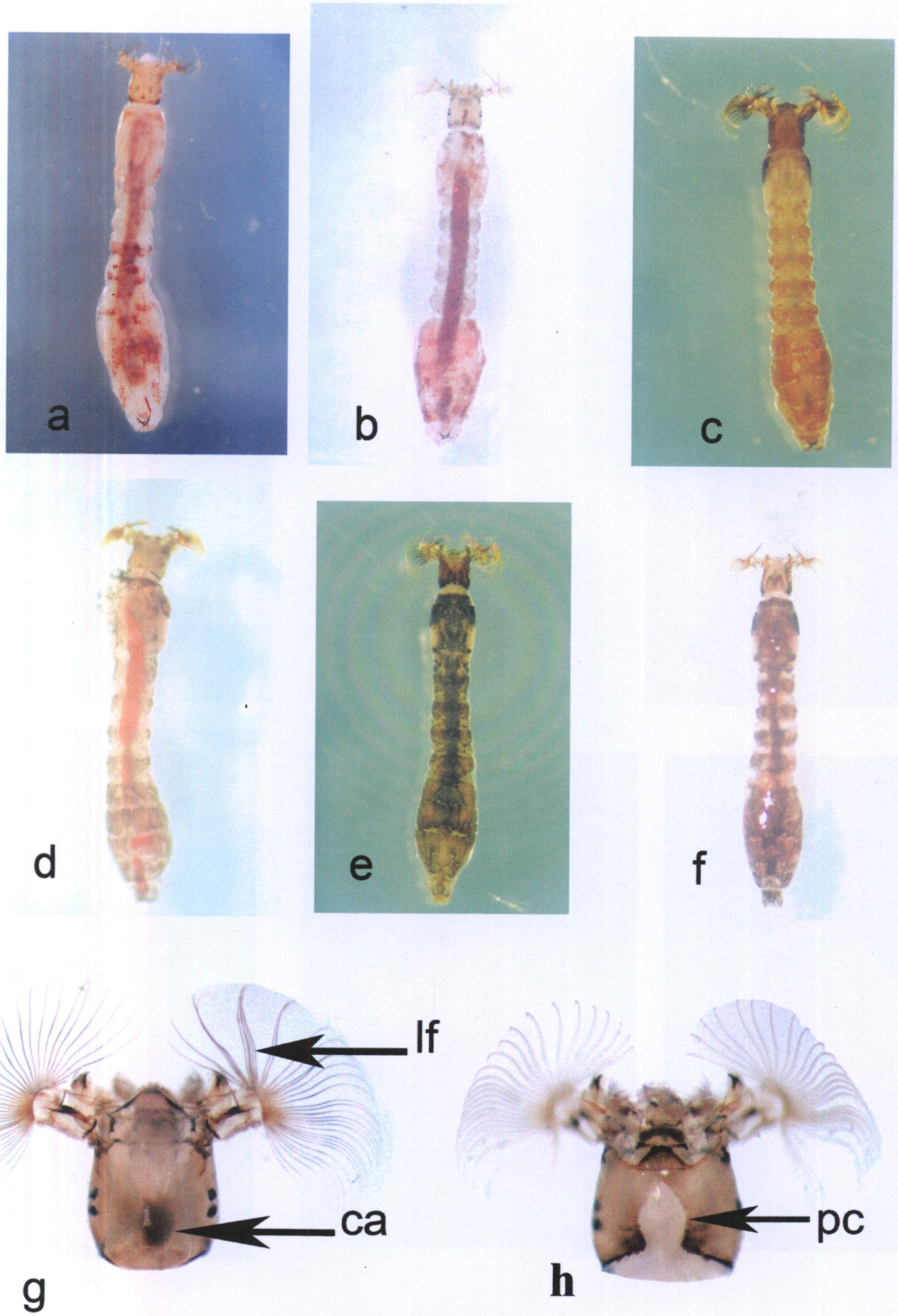
38. Huai Pak Kok 1, Thong Pha Phum District (180 m)	22 Nov 05	34	–	–	–	–	–	–	2.9 (1)	55.9 (19)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5.9 (2)	–	35.3 (12)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
39. Huai Pak Kok 2, Thong Pha Phum District (201 m)	22 Nov 05	13	–	–	–		–	–	–	46.2 (6)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	46.2 (6)	–	7.7 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	
40. Ban U-long, Thong Pha Phume District (162 m)	23 Nov 05	244	–	–	–	–	–	–	0.4 (1)	1.6 (4)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5.7 (14)	–	91.8 (224)	0.4 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–
41. Dai Chong Tong WF, Thong Pha Phume District (177 m)	23 Nov 05	132	–	–	–	–	–	2.3 (3)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	28.8 (38)	–	–	–	24.2 (32)	–	–	–	–	–	2.3 (3)	–	–	42.4 (56)
42. Krengkrawia WF, Thong Pha Phume district (246 m)	23 Nov 05	156	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4.5 (7)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	60.9 (95)	–	–	–	33.3 (52)	–	–	–	–	–	–	–	–
Petchaburi																																									
43.Ban Krang Kamp (318 m)	27 Nov 05	1,267	–	–	1.3 (16)	0.4 (5)	–	0.2 (2)	–	29.4 (372)	–	–	–	–	0.1 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	35.8 (454)	1.9 (24)	–	–	–	–	31.0 (393)	–	–	–	–
44. Road to Khao Pha Nern Thung Km 17 (347 m)	27 Nov 05	311	–	–	3.5 (11)	–	–	–	0.3 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.6 (2)	–	–	2.6 (8)	–	–	–	–	–	66.9 (208)	–	–	–
Srakeaw																																									
45. Klong Thakabark, Wattananakhon District (67 m)	12 Jun 05	13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	100.0 (13)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Northeast																																									

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำชนิดต่างๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (ต่อ)

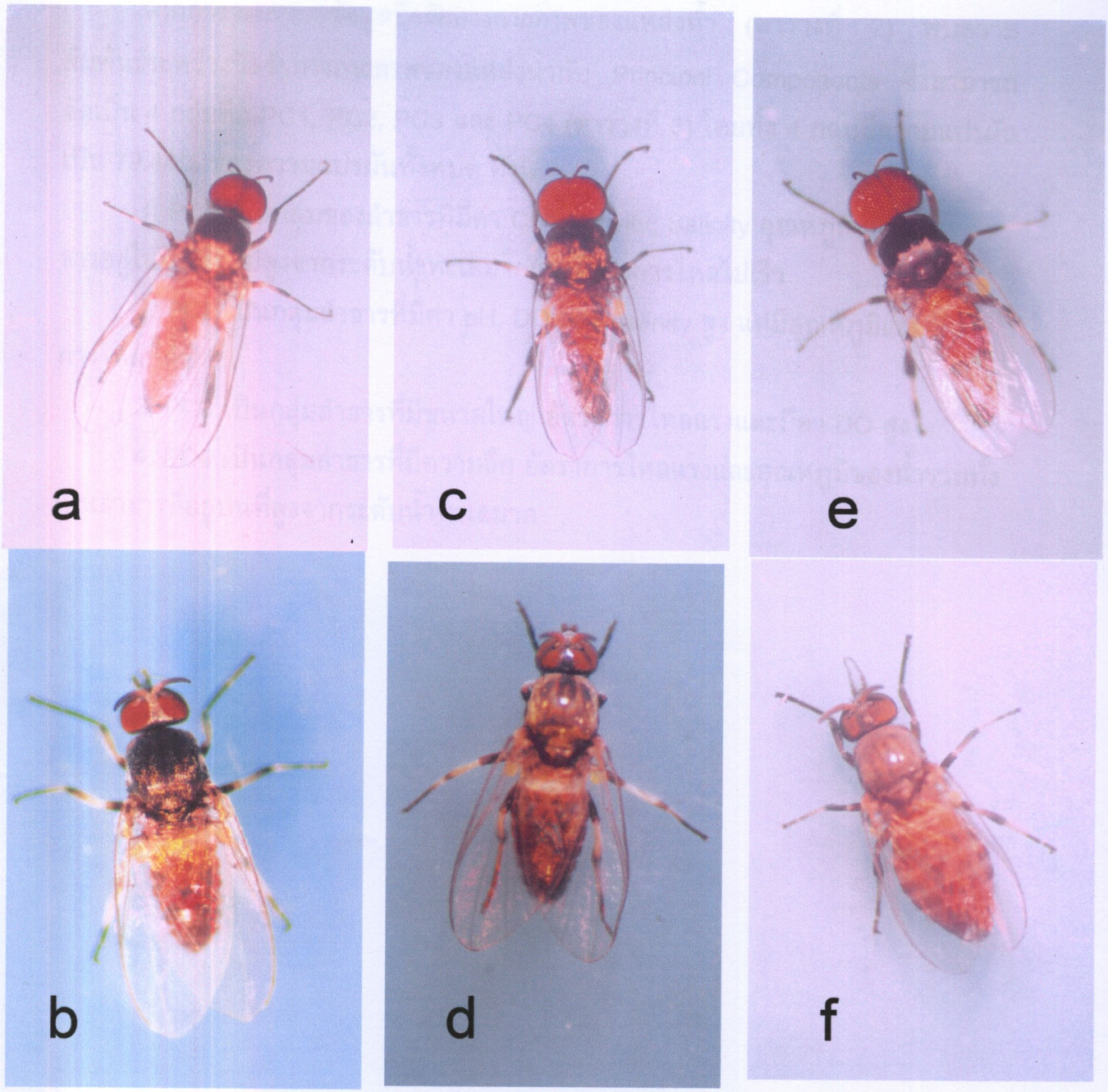
| | | |

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์และจำนวนตัวอ่อนของแมลงริ้นดำชนิดต่างๆในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย (ต่อ)

55. Huai Khan Ta, Khamcha-e District (300 m)	26 Dec 05	108	–	–	–	–	–	–	–	100.0 (108)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
56. Phusrithan WF, Khamcha-e district (300 m)	26 Dec 05	85	–	–	–	–	–	–	–	60.0 (51)	–	28.2 (24)	–	–	–	–	–	–	11.8 (10)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Loei																																											
57. Ban Dan Ku WF, Dan Sai District (350 m)	18 Feb 06	178	–	–	–	–	–	–	–	0.6 (1)	–	0.6 (1)	–	–	–	–	–	–	0.6 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	2.8 (5)	–	–	–	–	–	11.8 (21)	80.9 (144)	–	–	–	–	2.8 (5)	–	–	–	–
58. Ban Pong, Dan Sai District (300 m)	18 Feb 06	72	–	–	–	–	–	–	–	12.5 (9)	1.4 (1)	34.7 (25)	–	–	–	–	–	–	43.1 (31)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4.2 (3)	4.2 (3)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–



ภาพที่ 2 ตัวอ่อนแมลงริ้นดำชนิดต่าง ๆ a, *Simulium* (*N.*) *fruticosum*; b, *S.* (*G*) *asakoae*; c, *S.* (*S.*) *baimaii*; d, *S.* (*S.*) *chaliowae*; e, *S.* (*S.*) *fenestratum*; f, *S.* (*S.*) *yuphae;* g, headcapsule of *S.* (*G.*) *siamense* (dorsal view); h, head capsule (ventral view) showing postgenal cleft; ca=cephalic apotome; lf=labral fan; pc= postgenal cleft.



ภาพที่ 4 ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียของแมลงริ้นดำชนิดต่าง ๆ a, *Simulium* (*G.*) *asakoae* เพศผู้; b, เพศเมีย; c, *S.* (*S.*) *fenestratum* เพศผู้; d, เพศเมีย; e, *S.* (*S.*) *chiangmaiense* เพศผู้; f, เพศเมีย

2. นิเวศวิทยาของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์

2.1 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำต่าง ๆด้วยวิธี Principal Components Analysis (PCA)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำ (ตารางที่ 2) พบความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำกับ Principal Components ซึ่งสามารถจัดเป็น 4 กลุ่มคือ PC1, PC2, PC3 และ PC4 (ตารางที่ 3) โดยทั้ง 4 กลุ่มมีความแปรผันเป็น 79.44% ของความแปรผันทั้งหมด ดังนี้

1. PC1 เป็นกลุ่มของลำธารที่มีค่า Conductivity, Salinity อุณหภูมิของน้ำสูง ลำธารอยู่ในพื้นที่ที่ไม่สูงจากระดับน้ำทะเลมากและอัตราการไหลไม่เร็ว

2. PC2 เป็นกลุ่มลำธารที่มีค่า pH, DO และ salinity สูง แต่มีอุณหภูมิและอัตราการไหลที่ต่ำ

3. PC3 เป็นกลุ่มลำธารที่มีขนาดใหญ่ อัตราการไหลแรงและมีค่า DO สูง

4. PC4 เป็นกลุ่มลำธารที่มีความลึก อัตราการไหลแรงและอุณหภูมิของน้ำรวมทั้งเป็นลำธารที่อยู่บนที่สูงจากระดับน้ำทะเลมาก

ตารางที่ 2 ปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์ของแมลงริ้นดำในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย

Location	Collection date	Altitude (m)	Water temperature (C^0)	Water velocity (m/s)	Dissolved oxygen (mg/l)	Conductivity (s/cm)	pH	Salinity (ppt)	Width (m)	Depth (m)
North										
Chiang Rai										
1. Ban Thong Yao, Wiang Pa Pao District	23 Jul 05	665	24.7	0.75	5.98	54.26	7.6	0.0	5.30	0.33
Chiang Mai										
2. Mae Ya WF, Doi Inthanon National Park	24 Jul 05	520	23.2	0.89	8.90	67.70	8.1	0.0	10.00	0.12
3. Wang Khwai WF, Doi Inthanon National Park	24 Jul 05	421	23.8	0.63	6.40	45.06	8.0	0.0	11.00	0.23
4. Huai Sai Luaeng WF, Doi Inthanon National Park	24 Jul 05	1,050	19.0	0.97	6.81	10.66	7.3	0.0	5.00	0.34
	25 Jan 06	1,050	16.3	0.91	7.60	10.50	7.8	0.0	4.70	0.12
5. Royal Project, Doi Inthanon National Park	24 Jul 05	1,400	19.6	0.17	6.03	16.10	7.4	0.0	1.60	0.67
	25 Jan 06	1,400	16.2	0.80	7.69	38.50	8.0	0.0	0.40	0.07
6. Siriphum WF, Doi Inthanon National Park	24 Jul 05	1,480	18.5	0.76	6.52	13.70	7.0	0.0	1.00	0.12
	25 Jan 06	1,300	16.3	0.36	6.62	39.60	8.0	0.0	0.70	0.23

7. Kew Mae Pan, Doi Inthanon National Park	25 Jan 06	2,300	11.1	0.64	7.56	5.10	7.8	0.0	1.60	0.03
8. Ang Ka, Doi Inthanon National Park	25 Jan 06	2,400	16.8	0.01	5.40	8.40	7.6	0.0	0.30	0.03
9. Ban Pang Fan Doi SaKet District	25 Jul 05	700	24.8	0.70	6.38	32.20	7.3	0.0	5.30	0.35
10. Doi Pui WF, Suthep-Pui National Park	24 Jan 06	1,235	15.8	0.17	7.03	23.70	8.0	0.0	1.30	0.67
11. Chiang Dao National Park, Chiangdao District	23 Jan 06	580	21.4	0.69	7.46	514.30	8.3	0.0	0.40	0.09
12. Ping River, Chiangdao district	23 Jan 06	677	15.5	0.57	8.28	53.10	8.1	0.0	2.80	0.17
13. Mae Kieang River, Chiangdao District (733 m)	23 Jan 06	733	17.5	0.83	8.34	194.80	8.4	0.1	3.40	0.15
14. Tham Thap Tao, Chaiprakarn District	23 Jan 06	540	20.7	0.60	7.76	122.70	8.0	0.1	5.50	0.37
15. Mae Fang NP, Fang District	23 Jan 06	554	23.3	0.10	6.58	125.90	8.0	0.1	0.30	0.02
Phayao										
16. Huai Mae Tham	25 Jul 05	558	24.4	0.38	5.43	324.90	7.0	0.2	1.00	0.14
17. Champathong WF, Meung District	24 Jan 06	600	21.1	0.43	6.88	128.70	8.4	0.1	0.50	0.10
	19 Feb 06	600	23.6	0.30	6.55	173.50	8.3	0.1	2.00	0.08
18. Mae Yian WF, Mae Jai	19 Feb 06	611	22.0	0.53	6.69	232.10	8.4	0.1	1.80	0.20

District										
19. Ban Tha Klong, Mueng District	19 Feb 06	411	25.4	0.32	6.08	121.70	7.9	0.1	0.90	0.06
Lampang										
20. Jaechon NP (1)	23 Jul 05	395	23.4	0.59	6.62	38.40	7.5	0.0	3.20	0.58
Jaechon NP (2)	23 Jul 05	395	24.8	0.53	6.10	44.30	7.7	0.0	0.70	0.05
21. Thantong WF, Wangnue District	24 Jan 06	607	23.5	0.52	6.37	52.60	8.5	0.3	2.70	3.33
Nan										
22. Km. 50 Road No. 101	26 Jul 05	389	25.1	0.74	5.51	77.26	7.0	0.0	2.30	0.30
23. Huai Mae Sa Khon	26 Jul 05	389	25.0	0.75	5.48	68.16	7.0	0.0	2.20	0.24
Phrae										
24. Huai Rong WF, Rong Kwang District	26 Jul 05	402	23.7	0.55	6.60	397.30	7.0	0.2	3.30	0.24
Tak										
25. Km 5 Road No. 1090 Maesod-Phobpra, Maesod District	22 Jul 05	423	25.6	0.42	6.11	542.00	8.1	0.2	1.20	0.88
26. Phoppra Hospital, Phoppra District	22 Jul 05	400	25.6	0.20	5.40	558.66	8.1	0.3	1.60	0.17
Khampangphet										
27. Klong Bang Pla Soi, Pangsilathong District	24 Nov 05	168	22.8	0.10	7.88	76.77	7.7	0.0	3.20	0.42

28. Kang Pha Nang Koi (1), Mae Wong National Park	24 Nov 05	313	22.4	0.03	7.94	81.37	7.1	0.0	3.70	0.17
29. Kang Pha Nang Koi (2), Mae Wong National Park	24 Nov 05	310	22.1	0.70	8.67	63.03	7.6	0.0	5.70	0.18
30. Chong Yen, Mae wong National Park	24 Nov 05	1,300	19.4	–	7.43	38.43	8.1	0.0	0.30	0.01
31. Road to Chong Yen Km 72+250	24 Nov 05	486	19.3	0.04	8.55	51.10	7.8	0.0	2.60	0.13
Phetchabun										
32. Tad Mork WF 1	27 Jul 05	520	22.5	1.00	6.71	100.10	7.0	0.1	4.80	0.34
33. Tad Mork WF 2	27 Jul 05	520	22.5	1.83	6.71	88.86	7.0	0.0	2.70	0.34
Phitsanulok										
34. Huai Khamunnoi	26 Jul 05	1,226	19.4	1.51	6.71	10.93	7.0	0.0	3.00	0.17
Central										
Kanchanaburi										
35. Huai Ong Thi, Thong Pha Phum District	22 Nov 05	106	23.4	0.04	7.84	293.07	8.2	0.1	2.80	0.34
36. Ban Plang 2, Thong Pha Phum District	22 Nov 05	150	24.3	0.09	7.80	231.17	7.9	0.1	4.60	0.24
37. Huai Khayeng Ban Lampilok, Thong Pha Phum District	22 Nov 05	191	26.2	0.02	6.93	318.93	8.0	0.2	4.20	0.41
38. Huai Pak kok 1, Thong Pha	22 Nov 05	180	23.5	0.01	6.90	131.73	7.5	0.1	1.80	0.15

Phum District										
39. Huai Pak kok 2, Thong Pha Phum District	22 Nov 05	201	22.8	0.39	7.35	127.60	7.9	0.1	2.00	0.10
40. Ban U-long, Thong Pha Phume District	22 Nov 05	162	20.2	0.69	8.36	181.60	8.2	0.1	8.20	0.26
41. Dai Chong Tong WF, Thong Pha Phume District	22 Nov 05	177	22.0	0.99	7.88	295.70	8.0	0.2	1.40	0.13
42. Krengkrawia WF, Thong Pha Phume district	22 Nov 05	246	22.1	0.12	7.54	314.17	8.1	0.2	3.20	0.35
Petchaburi										
43.Ban Krang Kamp	27 Nov 05	318	22.2	0.88	7.98	176.37	7.9	0.1	1.70	0.20
44. Road to Khao Pha Nern Thung Km 17	27 Nov 05	347	27.7	0.43	7.67	189.13	7.9	0.1	2.60	0.13
Srakeaw										
45. Klong Thakabark, Wattananakhon District	12 Jun 05	67	30.2	0.15	2.05	39.10	6.2	0.0	1.20	0.28
Northeast										
Sakhonnakhon										
46. Ban Nam Phu Km 13 Road No. 2330	10 Jun 05	317	27.6	0.50	5.79	20.20	7.1	0.0	2.00	0.40
47. Km 26-27 Road No. 2330	10 Jun 05	204	25.9	0.05	5.48	138.20	7.1	0.1	3.00	0.05
48. Km 27+900 Road No.2330	10 Jun 05	200	27.0	0.10	5.90	28.50	7.1	0.0	0.60	0.10

49. Km 1-2 Road No. 2106	11 Jun 05	210	25.9	0.05	5.00	128.20	7.4	0.1	0.30	0.05
50. Ban Sangkeaw	11 Jun 05	306	28.4	0.05	5.30	40.10	7.1	0.0	0.80	0.30
Kalasin										
51. Pha Nang Koi WF, Na Khu District	10 Jun 05	189	26.6	0.30	6.34	48.00	7.9	0.0	1.50	0.20
52. Km 74 Road No. 2287, Khao Wong District	11 Jun 05	304	27.0	0.10	2.83	79.10	6.8	0.0	0.50	0.03
Mukdahan										
53. Tad Ton WF (1), Nong Sung District	26 Dec 05	250	22.0	–	–	–	6.5	–	1.50	0.20
54. Tad Ton WF (2), Khamcha-e District	26 Dec 05	300	23.0	–	–	–	6.5	–	1.50	0.15
55. Huai Khan Ta, Khamcha-e District	26 Dec 05	300	18.0	–	–	–	6.5	–	1.00	0.10
56. Phusrithan WF, Khamcha-e district	26 Dec 05	300	30.0	–	–	–	6.5	–	2.00	0.10
Loei										
57. Ban Dan Ku WF, Dan Sai District	18 Feb 06	350	26.3	0.04	6.61	95.38	7.8	0.0	7.00	0.13
58. Ban Pong, Dan Sai District	18 Feb 06	300	25.3	0.03	6.87	76.50	7.9	0.0	2.00	0.15

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำกับ Principal components โดยวิธี PCA และ Correlation analysis

Variable	Principal components			
	PC1	PC2	PC3	PC4
Width	-0.060	0.081	0.856*	-0.105
Depth	0.030	-0.179	0.653*	0.517*
Velocity	-0.339*	-0.428*	0.439*	0.291*
pH	0.265*	0.838*	-0.071	-0.115
Conductivity	0.850*	0.255	0.028	-0.017
Salinity	0.812*	0.319*	-0.119	0.115
Altitude	-0.618*	0.242	-0.199	0.396*
DO	-0.126	0.709*	0.383*	-0.146
Temperature	0.557*	-0.644*	0.031	-0.298*
% Variance Explained	26.96	24.64	16.51	11.33
Cumulative	26.96	51.60	68.10	79.44

* $p<0.05$

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายของชนิดกับ principal components โดยวิธี stepwise regression analysis

ผลการวิเคราะห์จำนวนชนิดริ้นดำที่พบมากกว่า 10% ของแหล่งน้ำทั้งหมดพบว่ามี 10 ชนิด ได้แก่ *S. parahiyangum, S. siamense, S. tahanense, S. asakoae, S. burtoni, S. nodosum, S. chiangmaiense, S. nakhonense, S. quinquestriatum,* และ *S. tani* แต่มีเพียง 5 ชนิด (ตารางที่ 4) ที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปัจจัยทางกายภาพ (PCs) ของแหล่งอาศัย ได้แก่

S. siamense มีการกระจายสัมพันธ์กับ PC-1, และ PC-2 ซึ่งมีลักษณะร่วมกันคืออัตราการไหลของน้ำไม่เร็วและอยู่ในพื้นที่ที่ไม่สูงจากระดับน้ำทะเลมาก

S. asakoae, S. nakhonense, S. quinquestriatum และ *S. tani* มีการกระจายสัมพันธ์กับ PC-3 ซึ่งเป็นกลุ่มลำธารที่มีขนาดใหญ่และอัตราการไหลแรง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าขนาดและอัตราการไหลของลำธารมีความสำคัญต่อการกระจายของแมลงริ้นดำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆทั้งในอเมริกาใต้และอเมริกาเหนือ

ตารางที่ 4 Regression analysis ของการกระจายของแมลงริ้นดำกับปัจจัยทางกายภาพ (principal components)

Species	Regression coefficient					
	B_0	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	*P*
S. siamense	0.339	0.132	-0.163	-	-0.122	0.001
S. asakoae	0.339	-	-	-0.155	-	0.012
S. nakhonense	0.373	-	-	0.261	-	<0.001
S. quinquestriatum	0.203	-	-	0.229	-	<0.001
S. tani	0.271	-	-	0.143	-	0.014

หมายเหตุ จำนวนชนิดที่นำมาวิเคราะห์คือชนิดที่พบในแหล่งที่เก็บตัวอย่างอย่างน้อย 10% ของจำนวนแหล่งที่เก็บตัวอย่างทั้งหมด

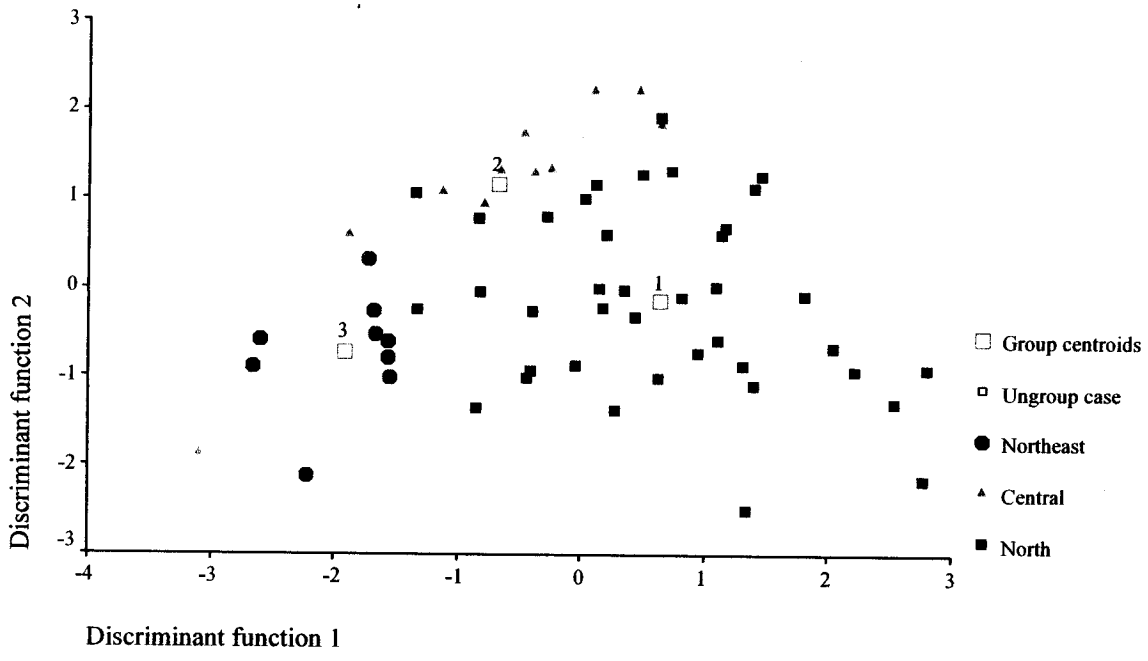
2.3 ศึกษาความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพของแหล่งอาศัยและชนิดของริ้นดำที่พบในภาคเหนือ กลาง และตะวันออกเฉียงเหนือ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Discriminant Function Analysis (DFA)

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลซึ่งวิเคราะห์เฉพาะแหล่งน้ำที่มีข้อมูลครบ (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าแต่ละภูมิภาคมีความแตกต่างกันทั้งด้านลักษณะทางกายภาพของแหล่งน้ำ (ภาพที่ 5) และชนิดของริ้นดำ (ภาพที่ 6) โดยปัจจัยทางกายภาพของแหล่งอาศัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างภูมิภาคมากที่สุด 5 อันดับแรก คือ ความเร็วของกระแสน้ำ รองลงมาคือ pH, Conductivity, Altitude และ Salinity ตามลำดับ นอกจากนี้ชนิดของริ้นดำในแต่ละภูมิภาคมีความแตกต่างกัน ชนิดที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างภูมิภาคมากที่สุด 5 อันดับแรกคือ *S. grossifilum* รองลงมาคือ *S. tani, S. siamense, S. oblongum* และ *S. chiangmaiense* โดยแมลงริ้นดำชนิด *S. grossiffilum* และ *S. chiangmaiense* พบเฉพาะภาคเหนือ ในขณะที่ *S. oblongum* พบเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *S. tani* พบในภาคเหนือและภาคกลาง ส่วน *S. siamense* พบทั้งภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง

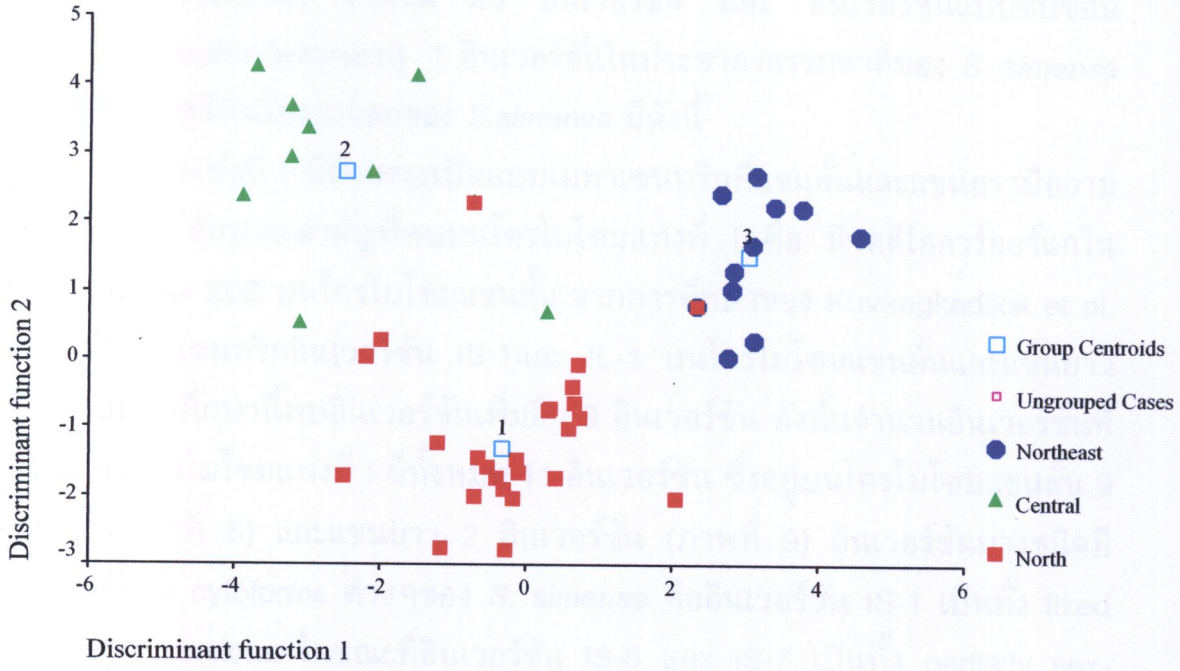
ตารางที่ 5 แสดงความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพของแหล่งอาศัยและชนิดของริ้นดำที่พบแต่ละภูมิภาค โดยวิธี Discriminant Function Analysis (DFA)

% Correct (N)	Discriminating variable			
	Stream site conditions		Stream fauna	
North (39)	72		95	
Central (11)	82		91	
Northeast (9)	100		100	
Standardized coefficients*	Velocity	0.712	*S. grossifilum*	1.402
	pH	0.274	*S. tani*	1.003
	Conductivity	0.257	*S. siamense*	0.947
	Altitude	0.221	*S. oblongum*	0.777
	Salinity	0.210	*S. chinagmaiense*	0.739

*แสดงเฉพาะ 5 อันดับแรกที่มีอำนาจในการจำแนกมากที่สุด



ภาพที่ 5 กราฟ Discriminant function scores ของปัจจัยทางกายภาพ 9 ปัจจัยของแหล่งน้ำในแต่ละภูมิภาค จากกราฟแสดงให้เห็นความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพในแต่ละภูมิภาค



ภาพที่ 6 กราฟ Discriminant function scores ของชนิดริ้นดำที่พบในแต่ละภูมิภาค จากกราฟแสดงให้เห็นความแตกต่างของชนิดที่พบในแต่ละภูมิภาค

3. การศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนริ้นดำชนิด *Simulium siamense*

3.1 รูปร่างลักษณะของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium siamense*

ศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของ แมลงริ้นดำชนิด *S. simense* จำนวน 1,824 ตัว ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจำนวน 32 แห่งในบริเวณภาคเหนือ ตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 7) เปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมกับแผนที่มาตรฐานที่ได้ตีพิมพ์แล้ว (Kuvangkadilok *et al.*, 2003) *S. simense* มีโครโมโซมจำนวน 3 คู่ (2n=6) เช่นเดียวกับแมลงริ้นดำชนิดอื่น โครโมโซมแท่งที่ I, II และ III มีความยาวเรียงตามลำดับ โครโมโซมแท่งที่ I เป็นแท่งที่ยาวที่สุดและแท่งที่สั้นที่สุดคือ แท่งที่ III โครโมโซมแต่ละแท่งประกอบด้วยแขนสั้น (IS) และแขนยาว (IL) ซึ่งความยาวของแขนอาจจะเท่ากันหรือไม่ขึ้นอยู่กับตำแหน่งเซนโทรเมียร์ นอกจากนี้ยังมีลักษณะจำเพาะบางอย่าง เช่น นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ (NO) ดับเบิลบัลเบิล (db) และ วงแหวนบัลบิอานิ (BR) ที่ช่วยในการแยกริ้นดำชนิดนี้จากริ้นดำชนิดอื่น การศึกษานี้พบพาราเซนทริกอินเวอร์ชัน

(paracentric inversions) จำนวน 23 อินเวอร์ชัน และ อินเวอร์ชันแบบขับข้อน (overlapping complex inversion) 1 อินเวอร์ชันในประชากรธรรมชาติของ *S. simense* รายละเอียดของโพลีทีนโครโมโซมของ *S.simense* มีดังนี้

โครโมโซมแท่งที่ I มีลักษณะเป็นแบบเมทาเซนทริกที่แขนสั้นและแขนยาวมีความยาวเกือบเท่ากัน ลักษณะสำคัญที่พบบนโครโมโซมแท่งที่ I คือ นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ ตรงตำแหน่ง 20B บนโครโมโซมแขนสั้น จากการศึกษาของ Kuvangkadilok et al. (2003) พบพาราเซนทริกอินเวอร์ชัน IS-1และ IL-1 บนโครโมโซมแขนสั้นและแขนยาวตามลำดับ ในการศึกษานี้พบอินเวอร์ชันเพิ่มอีก 9 อินเวอร์ชัน ดังนั้นจำนวนอินเวอร์ชันที่พบทั้งหมดบนโครโมโซมแท่งที่ I มีทั้งหมด 11 อินเวอร์ชัน ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแขนสั้น 9 อินเวอร์ชัน (ภาพที่ 8) และแขนยาว 2 อินเวอร์ชัน (ภาพที่ 9) อินเวอร์ชันบางชนิดมีบทบาทต่างกันใน cytoforms ต่างๆของ *S. simense* คืออินเวอร์ชัน IS-1 เป็นทั้ง fixed และ floating inversions ในขณะที่อินเวอร์ชัน IS-6 และ IS-7 เป็นทั้ง partially sex-linked และ floating inversions นอกจากนี้ overlapping inversion, IS-2,3 เป็น completely sex-linked.

โครโมโซมแท่งที่ II ลักษณะรูปร่างเป็นแบบเมทาเซนทริก ลักษณะสำคัญที่พบบนโครโมโซมแขนสั้น (IIS) คือมี double bubble (ตำแหน่ง 46AB) และอยู่ใกล้กับ Ring of Balbiani (ตำแหน่ง 47B) นอกจากนี้โครโมโซมแขนสั้นยังมีแบนด์หนาทึบอยู่เรียงกัน 3 แบนด์ใกล้เซนโทรเมียร์ เรียกแบนด์เหล่านี้ว่า "trapezoidal" และมี parabalbiani ที่เป็นแบนด์ลักษณะเฉพาะบนโครโมโซมแขนยาว (IIL) (ตำแหน่ง 63) จากการศึกษาของ Kuvangkadilok et al. (2003) พบเฉพาะอินเวอร์ชัน IIL-1 บนโครโมโซมแขนยาว ในการศึกษานี้พบพาราเซนทริกอินเวอร์ชันเพิ่มอีก 6 อินเวอร์ชัน รวมป็น 7 อินเวอร์ชันบนโครโมโซมแขนยาว (ภาพที่ 10) และ 1 อินเวอร์ชัน บนโครโมโซมแขนสั้น (ภาพที่ 11)

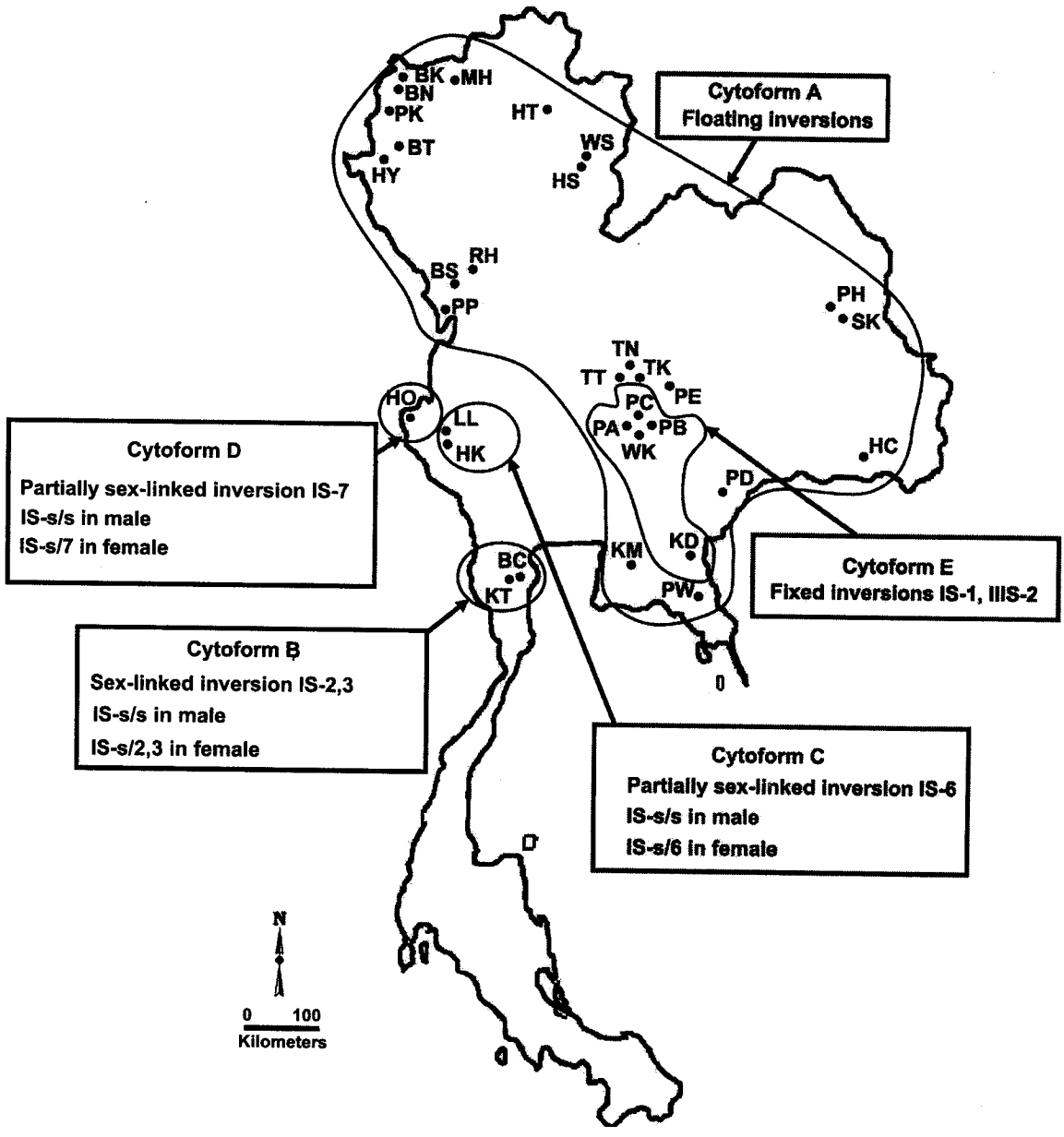
โครโมโซมแท่งที่ III เป็นแท่งที่สั้นที่สุด ลักษณะแบบซับเมทาเซนทริก ลักษณะสำคัญที่พบบนโครโมโซมนี้คือ มีแบนด์ดำหนา 2-3 แบนด์ที่เรียกว่า "heavy" อยู่ใกล้กับ blister บนโครโมโซมแขนซ้าย อินเวอร์ชันที่เกิดบนโครโมโซมแท่งนี้มีจำนวน 6 อินเวอร์ชัน ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแขนสั้น 2 อินเวอร์ชัน (ภาพที่ 12) และ 4 อินเวอร์ชัน บนโครโมโซมแขนยาว (ภาพที่ 13) อินเวอร์ชัน IIIS-2 เป็นทั้ง fixed และ floating inversions

ตารางที่ 6 แหล่งเก็บตัวอย่างและการกระจายของ cytoforms A-E ของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium siamense* ในภูมิภาคต่าง ๆของประเทศไทย

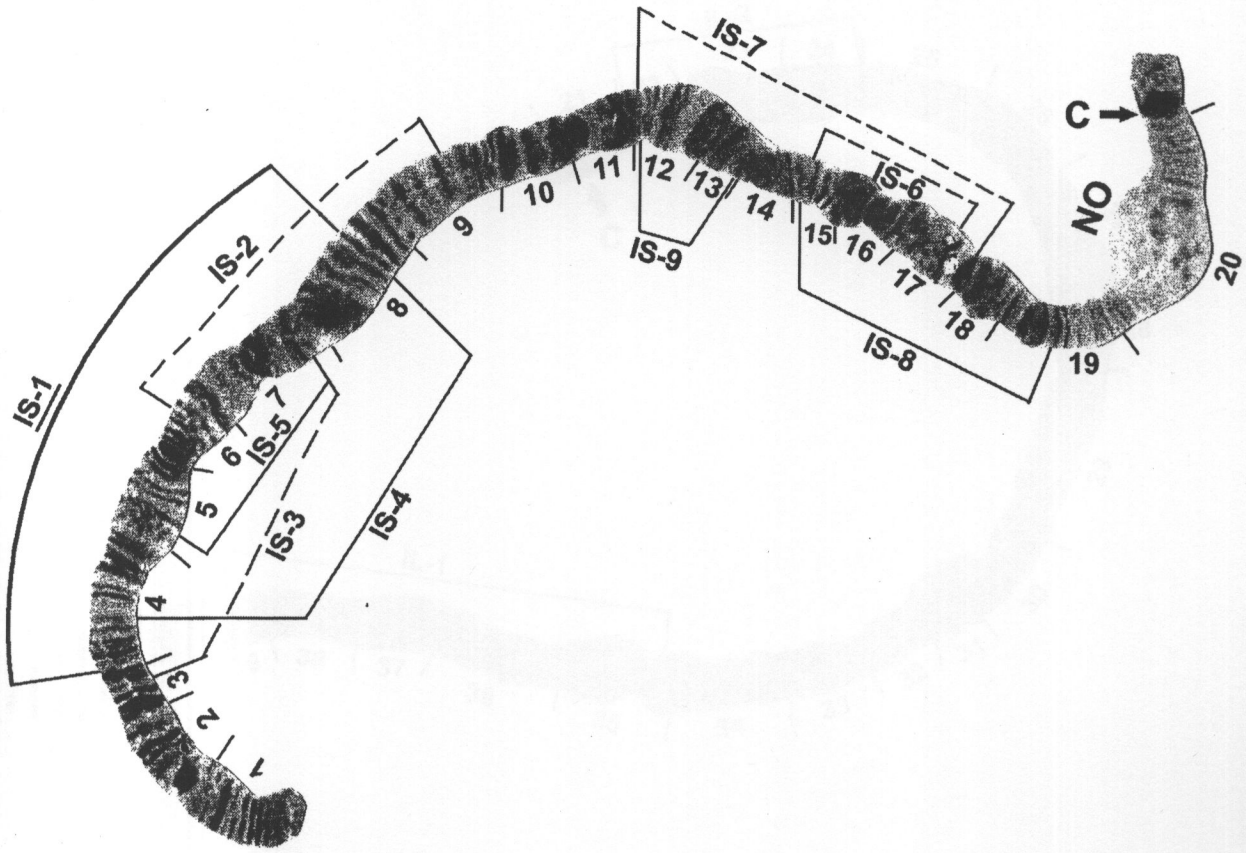
Collection site	Code	No. of larvae analyzed (♂:♀)	Latitude/Longitude	Altitude (m)	Date (d/m/y)	Taxon
North						
Mae Hong Son Province						
Huai Yuak	HY	107 (57:50)	18° 33'N, 97° 55'E	388	04/06/03	form A
Ban Mae To	BT	37 (19:18)	18° 34'N, 97° 56'E	417	30/11/03	form A
Ban Mae Sa Nga	BN	46 (26:20)	19° 25'N, 97° 57'E	242	05/06/03	form A
Ban Nam Kad						
Collection 1	BK1	17 (10:7)	19° 29'N, 98° 03'E	500	02/12/03	form A
Collection 2	BK2	9 (6:3)	19° 29'N, 98° 03'E	500	13/12/04	form A
Mae Hee						
Collection 1	MH1	6 (4:2)	19° 17'N, 98° 29'E	525	02/12/03	form A
Collection 2	MH2	19 (8:11)	19° 17'N, 98° 29'E	525	16/04/04	form A
Phu Klone	PK	9 (5:4)	19° 27'N, 97° 58'E	247	15/04/04	form A
Phayao Province						
Huai Mae Tum	HT	57 (29:28)	18° 56'N, 100° 04'E	558	25/07/05	form A
Nan Province						
Huai Mae Sakorn	HS	38 (24:14)	18° 29'N, 100° 30'E	389	26/07/05	form A
Wiang Sa-Rong Kwang	WS	31 (10:21)	18° 29'N, 100° 30'E	389	26/07/05	form A
Tak Province						
Ban Lan Sang	BS	11 (4:7)	16° 46'N, 99° 01'E	250	21/12/03	form A
Phob Phra	PP	28 (13:15)	16° 23'N, 98° 42'E	400	22/07/05	form A
Sukhothai Province						
Ram Kam Haeng National Park	RH	4 (2:2)	16° 48'N, 98° 59'E	270	21/12/03	form A
Northeast						
Chaiyaphum Province						

Thep Thong Kam WF	TK	82 (45:37)	15° 40'N, 101° 33'E	300	07/02/02	form A
Thep Pra Than WF	TT	26 (13:13)	15° 36'N, 101° 28'E	350	07/02/02	form A
Thep Pha Na WF	TN	26 (10:16)	16° 12'N, 101° 20'E	300	23/11/03	form A
Pha Eiang WF	PE	21 (8:13)	15° 57'N, 101° 55'E	300	17/11/98	form A
Sri Sa Ket Province Huai Chan	HC	118 (65:53)	14° 31'N, 104° 22'E	206	06/09/03	form A
Sakon Nakhon Province Km 26-27 Road No.2330	SK	24 (14: 10)	16° 55'N, 104° 06'E	204	10/06/05	form A
Phu Pan National Park	PH	114 (56:58)	17° 04'N, 103° 58'E	210	11/06/05	form A
Nakhon Ratchasima Province **Khao Yai National Park** Pha Kluai Mai A	PA	8 (5:3)	14° 25'33" N, 101° 24'40"E	600	20/11/04	forms A, E
Pha Kluai Mai B	PB	17 (11:6)	14° 25'38" N, 101° 24'44"E	600	20/11/04	Forms A, E
Pha Kluai Mai C	PC	23 (8:15)	13° 59'N, 99°50'E	300	25/07/04	forms A, E
Central **Petchaburi Province** **Keang Kra Chan National Park** Ban Krang Camp Collection 1 Collection 2	 BC1 BC2	 379 (83:296) 78 (32:46)	 12° 47'N, 99° 27'E 12° 47'N, 99° 27'E	 318 318	 16/08/03 27/11/05	 form B form B
Khao Pha Nern Tung Collection 1 Collection 2	 KT1 KT2	 84 (39:45) 7 (1:6)	 12° 48'N, 99° 26'E 12° 48'N, 99° 26'E	 347 347	 16/08/03 27/11/03	 form B form B
Kanchanaburi Province Lam Pi Lok	LL	60 (29:31)	14° 38'15"N, 98°	200	20/02/05	form C

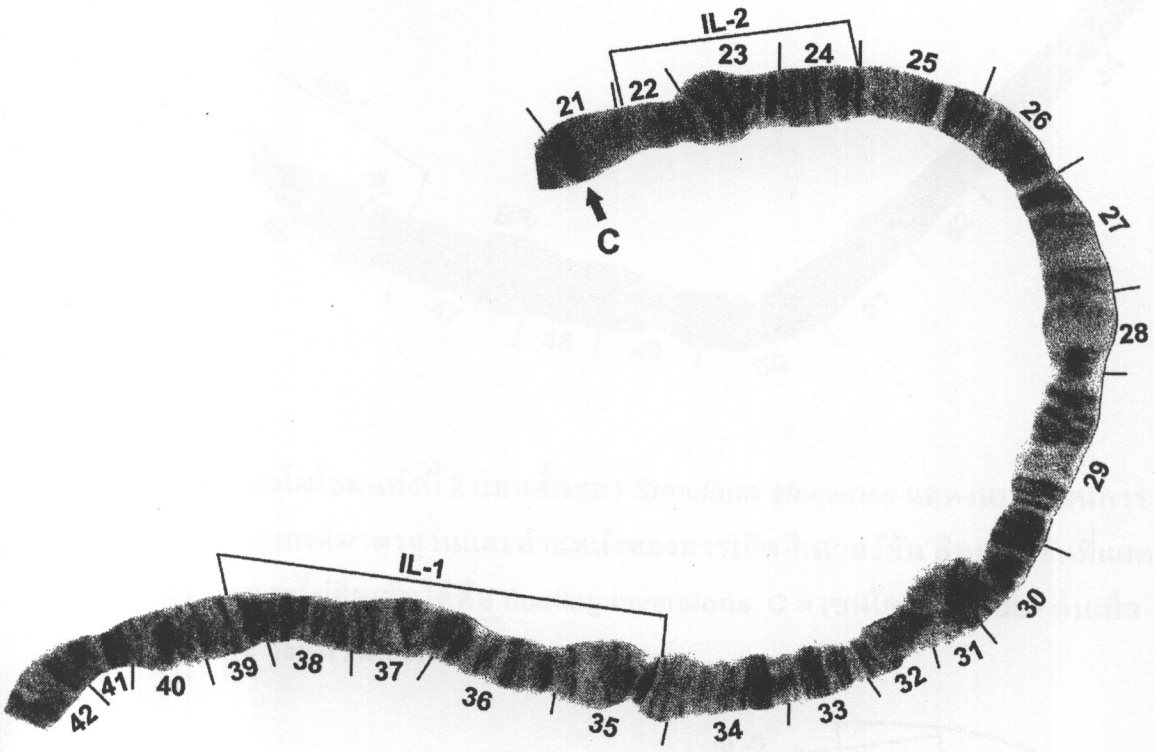
			34'16"E			
Ban Huai Khayeng	HK	15 (5:10)	14° 38'05"N, 98° 33'59"E	200	20/02/05	form C
Huai Ong Thi	HO	57 (17:40)	14° 42'N, 98° 40'E	109	28/02/04	form D
Sra Keaw Province						
Pang Si Da WF						
Collection 1	PD1	15 (10:5)	13° 59'N, 102° 12'E	250	24/07/04	form A
Collection 2	PD2	10 (4:6)	13° 59'N, 102° 12'E	250	21/11/04	form A
Nakhon Nayok Province						
Wang Ta Krai WF	WK	6 (4:2)	12° 19'N, 101° 18'E	240	26/07/04	forms A, E
East						
Rayong Province						
Khao Cha-Mao WF	KM	20 (10:10)	12° 54'N, 101° 43'E	200	05/06/04	form A
Chantaburi Province						
Khao Soi Dao						
Collection 1	KD1	40 (20:20)	13° 06'N, 102° 11'E	320	20/06/03	forms A, E
Collection 2	KD2	65 (32:33)	13° 06'N, 102° 11'E	320	06/06/04	form A
Ban Pat Tha Wee						
Collection 1	PW1	74 (33:41)	12° 48'N, 102° 15'E	60	20/06/03	form A
Collection 2	PW2	36 (23:13)	12° 48'N, 102° 15'E	60	06/06/04	form A



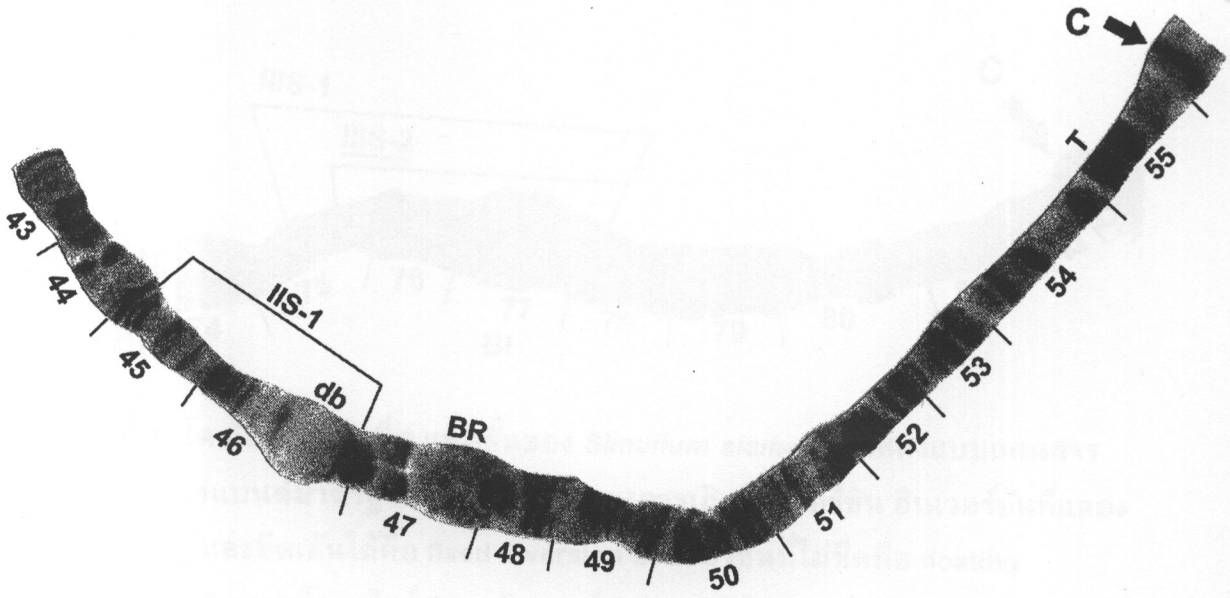
ภาพที่ 7 แสดงแหล่งที่เก็บและการกระจายของ 5 cytoforms ของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium siamense*



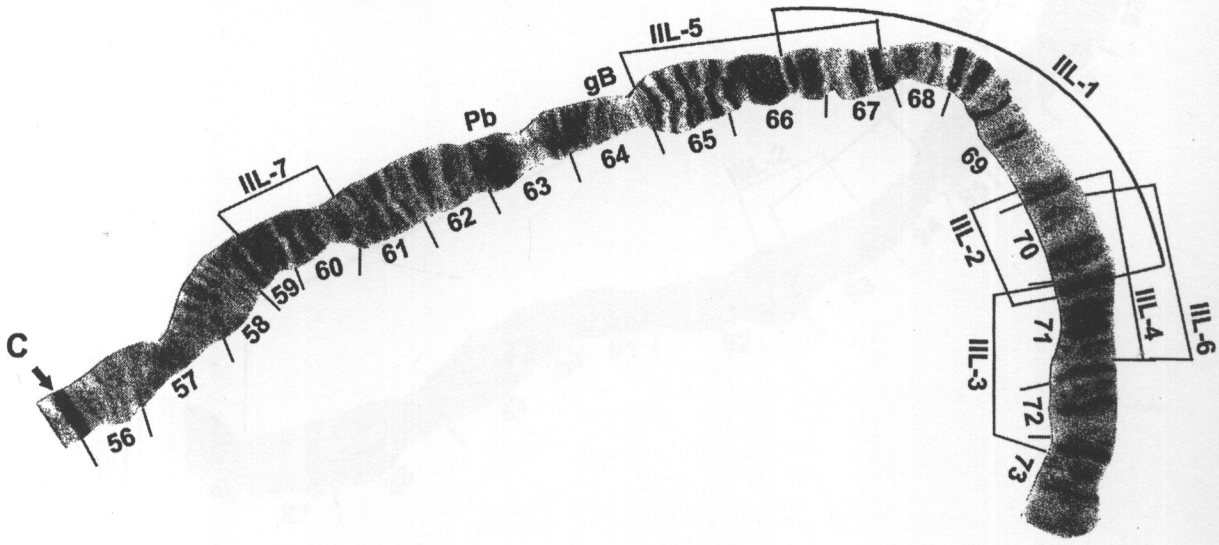
ภาพที่ 8 โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนสั้นของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและขีดเส้นใต้คือ fixed inversion และที่ไม่ขีดคือ floating inversions เส้นประแสดง sex-linked inversions. C = เซนโตรเมียร์ NO= นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์



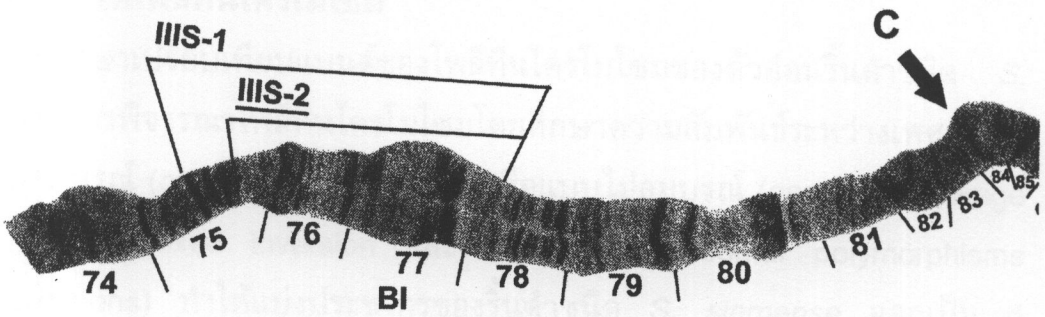
ภาพที่ 9 โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนยาวของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและไม่ขีดเส้นใต้คือ floating inversions. C = เซนโตรเมียร์



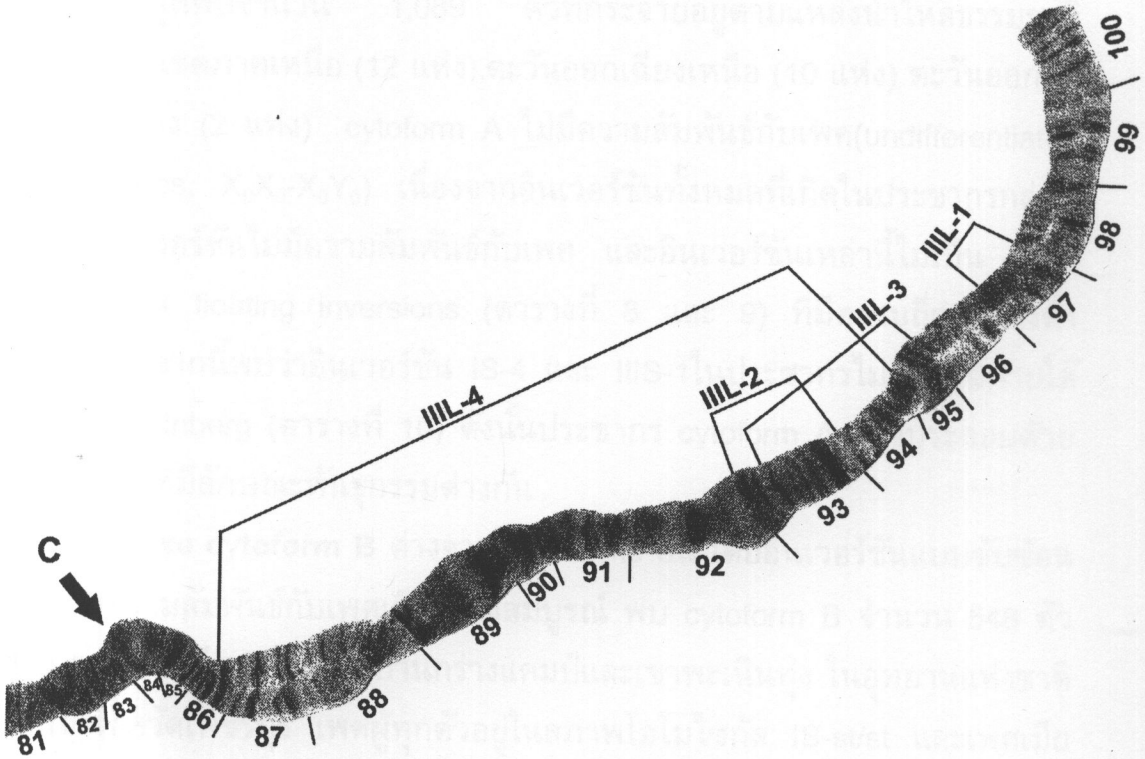
ภาพที่ 10 โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนสั้นของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและไม่ขีดเส้นใต้คือ floating inversions. C = เซนโตรเมียร์ db= ดับเบิลบับเบิล BR= วงแหวนบัลบิอานิ T= ทราปิซอยด์



ภาพที่ 11 โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนยาวของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและไม่ขีดเส้นใต้คือ floating inversions. C = เซนโตรเมียร์ Pb= พาราบัลบิอานิ gB=เกรย์แบนด์



ภาพที่ 12 โครโมโซมแท่งที่ 3 แขนสั้นของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและขีดเส้นใต้คือ fixed inversion อินเวอร์ชันที่ไม่ขีดคือ floating inversion. C = เซนโตรเมียร์ BI= บลิสเตอร์



ภาพที่ 13 โครโมโซมแท่งที่ 3 แขนยาวของ *Simulium siamense* แสดงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์มาตรฐานและตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันที่แสดงโดยเส้นทึบและไม่ขีดเส้นใต้คือ floating inversions. C = เซนโตรเมียร์

2. การแยกชนิดประชากรแมลงริ้นดำชนิด *Simulium siamense* โดยการศึกษาเปรียบเทียบแบนด์โพลีทีนโครโมโซม

ทำการศึกษาเปรียบเทียบแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนริ้นดำชนิด *S. siamense* จากการพิจารณาโพลีทีนโครโมโซมโดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับอินเวอร์ชันแบบสมบูรณ์ (complete sex-linkage) หรือแบบไม่สมบูรณ์ (partial sex-linkage inversion) การเกิด fixed inversion และรูปแบบของ autosomal polymorphisms (floating inversions) ทำให้แบ่งประชากรของริ้นดำชนิด *S. siamense* ออกเป็น 5 cytoforms ดังนี้ *S. siamense* cytoform A, cytoform B, cytoform C, cytoform D และ cytoform E ที่กระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย (ภาพที่ 7) ภาพที่ 14 แสดง Idiograms ของโครโมโซมพร้อมทั้งการเกิดอินเวอร์ชันของ cytoforms A-E รายละเอียดของแต่ละ cytoform มีดังต่อไปนี้

***S. siamense* cytoform A** ประชากรกลุ่มนี้เป็นประชากรกลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลายมากที่สุดพบจำนวน 1,089 ตัวที่กระจายอยู่ตามแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจำนวน 27 แห่งในเขตภาคเหนือ (12 แห่ง),ตะวันออกเฉียงเหนือ (10 แห่ง) ตะวันออก (3 แห่ง) และภาคกลาง (2 แห่ง) cytoform A ไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ(undifferentiated sex chromosomes, X_0X_0-X_0Y_0) เนื่องจากอินเวอร์ชันทั้งหมดที่เกิดในประชากรกลุ่มนี้จำนวน 23 อินเวอร์ชันไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ และอินเวอร์ชันเหล่านี้ไม่เป็น fixed inversions แต่เป็น floating inversions (ตารางที่ 8 และ 9) ที่มีความถี่ค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 7) นอกจากนี้พบว่าอินเวอร์ชัน IS-4 และ IIIS-1ในประชากรไม่สมดุลย์ภายใต้กฎของ Hardy-Weinberg (ตารางที่ 10) ดังนั้นประชากร cytoform A อาจประกอบด้วยประชากรกลุ่มย่อยที่มีลักษณะพันธุกรรมต่างกัน

***S. siamense* cytoform B** ต่างจาก cytoforms อื่น โดยอินเวอร์ชันแบบซับซ้อนชนิด IS-2,3 มีความสัมพันธ์กับเพศเมียอย่างสมบูรณ์ พบ cytoform B จำนวน 548 ตัว (เพศผู้ 155 และเพศเมีย 393) จากบ้านกร่างแคมป์และเขาพะเนินทุ่ง ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี เพศผู้ทุกตัวอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส IS-st/st และเพศเมียทั้งหมดอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส IS-st/2,3 (ตารางที่ 8) แสดงว่าอินเวอร์ชัน IS-2,3 มีความสัมพันธ์กับโครโมโซม Y_1 (อยู่บนโครโมโซม Y_1) ของเพศเมีย ดังนั้นกลไกการตัดสินเพศของ cytoform B เป็น heterogametic female คือ X_0X_0 (ในเพศผู้) และ X_0Y_1 (ในเพศเมีย) ซึ่งต่างจากริ้นดำชนิดอื่นที่กลไกการตัดสินเพศเป็นแบบ heterogametic male นอกจากนี้ไม่พบ floating inversions ใน cytoform B

***S. siamense* cytoform C** ประชากรกลุ่มนี้มีจำนวน 75 ตัวเก็บมาจากร่องน้ำห้วยเขย่งและพุทธสถานห้วยเขย่ง จังหวัดกาญจนบุรี ประชากร cytoform C มีอินเวอร์ชัน IS-6 สัมพันธ์กับโครโซม Y_2 (อยู่บนโครโซม Y_2) ของเพศเมียแบบไม่สมบูรณ์ โดยประชากรเพศเมียส่วนใหญ่อยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/6 แต่มีเพศเมียบางตัวอยู่ในสภาพโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/st ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับเพศผู้ทั้งหมด ดังนั้นกลไกการตัดสินเพศของ cytoform C เป็น คือ X_0X_0 (ในเพศผู้) และ X_0Y_2 (ในเพศเมีย) นอกจากนี้ยังพบอินเวอร์ชัน IIIS-2 ในประชากรค่อนข้างสูง (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่าอินเวอร์ชัน IIIS-2 เป็นอินเวอร์ชันที่เด่นในประชากร cytoform C

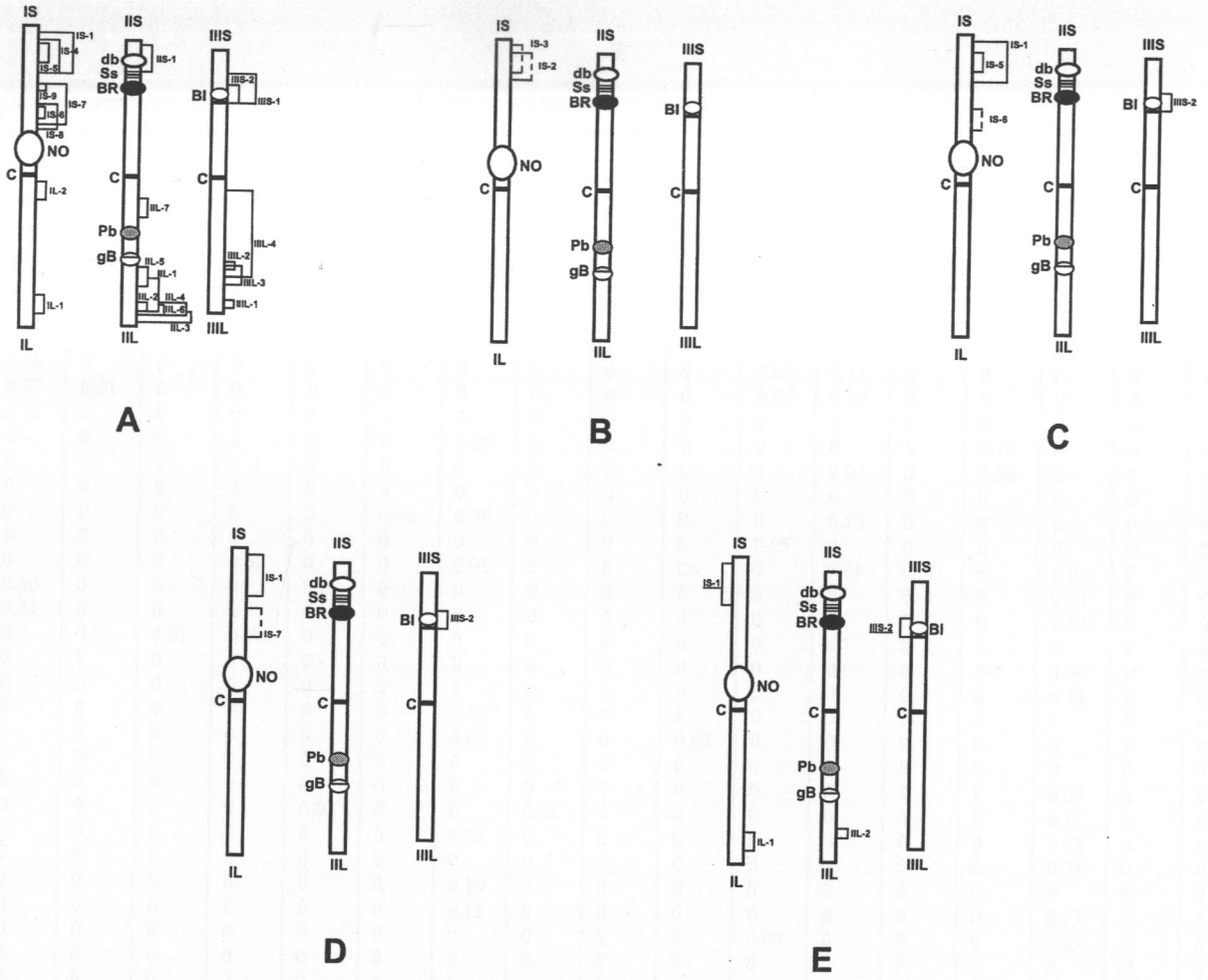
ในการศึกษาริ้นดำจำนวน 60 ตัว (เพศผู้ 29 ตัว และเพศเมีย 31 ตัว) จากร่องน้ำห้วยเขย่งพบเฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/6 ในเพศเมียจำนวน 29 ตัว (93.5%) และพบโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/st ในตัวผู้ทุกตัว (100%) และในตัวเมีย 2 ตัว (6.5%) (ตารางที่ 8) ดังนั้นอินเวอร์ชัน IS-6 ประชากรกลุ่มนี้สัมพันธ์กับโครโซม Y_2 (อยู่บนโครโซม Y_2) ของเพศเมียแบบไม่สมบูรณ์ จากการทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชัน IS-6 กับเพศโดยวิธี *G*-test พบว่าอินเวอร์ชัน IS-6 ที่เกิดในประชากรร่องน้ำห้วยเขย่งมีความสัมพันธ์กับเพศอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.001$) ประชากรกลุ่มนี้ยังมี fixed inversion IIIS-2 ที่อยู่ในรูปแบบโฮโมไซกัส IIIS-2/2 จำนวน 58 ตัว (96.7%) (เป็นเพศผู้ 28 ตัว และเพศเมีย 30 ตัว) จากจำนวนทั้งหมด 60 ตัว และพบตัวอ่อน 2 ตัวที่อยู่ในสภาพเฮเทโรไซกัส IIIS-st/2 (3.3%) ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IIIS-2 ในประชากรกลุ่มนี้มีค่าเท่ากับ 0.98 นอกจากนี้ยังพบ floating inversionsอีก 2 รูปแบบคือ อินเวอร์ชัน IS-1และอินเวอร์ชัน IS-5 ที่มีค่าความถี่เท่ากับ 0.02และ0.03ตามลำดับ

สำหรับพุทธสถานห้วยเขย่งศึกษาจำนวน15 ตัว (เพศผู้ 5 ตัวและเพศเมีย 10 ตัว) พบอินเวอร์ชัน IS-st/st ในเพศผู้ทั้งหมด และเพศเมียทุกตัวมีอินเวอร์ชันแบบ IS-st/6 (ตารางที่ 8) นอกจากนี้ตัวอ่อนทุกตัวมี fixed inversion IIIS-2 (IIIS-2/2) ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IIIS-2 ในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 1 และไม่พบ floating inversion บนโครโมโซม

***S. siamense* cytoform D** **พบ**ประชากรกลุ่มนี้ที่ห้วยองธิ จังหวัดกาญจนบุรี cytoform D มีอินเวอร์ชันIS-7 สัมพันธ์กับเพศเมียแต่ไม่สมบูรณ์และมีอินเวอร์ชัน IIIS-2 เด่นในประชากร จากจำนวนตัวอ่อนที่ศึกษาทั้งหมด 57 ตัว (เพศผู้ 17 ตัว และเพศเมีย 40 ตัว) พบอินเวอร์ชันแบบ IS-st/7 ในเพศเมีย 32 ตัว(80.0%) และเพศผู้ 1ตัว (5.9%) และพบอินเวอร์ชันแบบ IS-st/st ในเพศผู้ 16 ตัว (94.1%) และเพศเมีย 5 ตัว (12.5%) จากการทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี *G*-test พบว่า

อินเวอร์ชัน IS-7 ที่เกิดในประชากรห้วยองธิมีความสัมพันธ์กับริ้นดำเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ (G=0.001) ซึ่งแสดงว่าอินเวอร์ชัน IS-7 มีความสัมพันธ์กับโครโซม Y_3 (อยู่บนโครโซม Y_3) ของเพศเมีย ดังนั้นกลไกการตัดสินเพศของ cytoform C เป็น X_0X_0 (ในเพศผู้) และ X_0Y_3 (ในเพศเมีย) นอกจากนี้ตัวอ่อนจำนวน 54 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว และเพศเมีย 39 ตัว) (94.7%) มีอินเวอร์ชันแบบ IIIS-2/2 ซึ่งมีค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIIS-2 ในประชากรเท่ากับ 0.96 และยังพบ floating inversion IS-1 ในสภาพ heterozygous inversions (IS-st/1) ในริ้นดำ จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IS-1 ที่พบในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 0.03

***S. siamense* cytoform E** ประชากรกลุ่มนี้มี fixed inversions IS-1 และ IIIS-2 ซึ่งอยู่ในรูปของโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน (ตารางที่ 8) และไม่พบอินเวอร์ชันใดสัมพันธ์กับเพศ ดังนั้น cytoform E ไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ(undifferentiated sex chromosomes, X_0X_0-X_0Y_0) พบประชากร cytoform E จำนวน 55 ตัวในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจำนวน 5 แห่งในภาคตะวันออก (น้ำตกเขาสอยดาว1) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (น้ำตกผากล้วยไม้ 1, 2 และ 3)และภาคกลาง (น้ำตกวังตะไคร้) ประชากร cytoform E เหล่านี้อาศัยร่วมกับ cytoform A นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 2 แบบในประชากร cytoform E คือ IL-1 และ IIL-2



ภาพที่ 14 Idiograms ของ 5 cytoforms ของ *Simulium siamense*: A, cytoform A, B, cytoform B, C, cytoform C, D, cytoform D, E, cytoform E. Fixed inversions แสดงโดยเส้นทึบด้านซ้ายมือและ ขีดเส้นใต้ Floating inversions แสดงโดยเส้นทึบด้านขวามือและไม่ขีดเส้น Sex-linked inversions แสดงโดยเส้นประ C= เซนโตรเมียร์, NO= นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์, db= ดับเบิลบับเบิล, Ss= ซูสตริง, BR= วงแหวนบัลบิอานิ, Pb= พาราบัลบิอานิ, gB= เกรย์แบนด์, Bl= บลิสเตอร์

ตารางที่ 7 แสดงความถี่ของ **floating inversions** (ยกเว้น **sex-linked inversions IS-2,3, IS-6** และ **IS-7**) ใน **cytoforms A ,C, D** และ **E** ของ ***Simulium siamense***

Cytoform Collection site (Collection date)[1]	♂:♀ Larvae	IS-1	IS-4	IS-5	IS-6	IS-7	IS-8	IS-9	IL-1	IL-2	IIS-1	IIL-1	IIL-2	IIL-3	IIL-4	IIL-5	IIL-6	IIL-7	IIIS-1	IIIS-2	IIIL-1	IIIL-2	IIIL-3	IIIL-4
Cytoform A																								
HY	57:50	0	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0.11	0	0	0	0	0.01	0	0.10	0	0	0
BT	19:18	0	0.27	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0.19	0	0	0	0	0.01	0	0.04	0	0	0
BN	26:20	0	0.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0
BK1(2 Dec 2003)	10:7	0.91	0	0	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0	0	0	0.76	0	0	0.74	0	0.11	0	0	0
BK2 (13 Dec 2004)	6:3	0.78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0.38	0	0	0.55	0	0.17	0	0	0
MH1 (2 Dec 2003)	4:2	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.17	0	0	0
MH2 (16 Apr 2004)	8:11	0.63	0	0	0	0	0	0.05	0.08	0	0	0	0	0.10	0	0	0	0	0.16	0	0.05	0	0	0
PK	5:4	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0	0	0.22	0	0.05	0	0	0
HT	29:28	0.04	0	0	0	0.02	0	0	0.01	0	0	0	0	0.01	0	0	0.05	0	0.29	0	0.04	0	0	0.01
HS	24:14	0	0.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.21	0	0.03	0	0.17	0	0	0.07
WS	10:21	0	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0.08	0	0.03	0	0	0
PP	13:15	0.04	0	0.02	0.02	0.09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.70	0	0	0	0	0
BS	4:7	0.82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0	0.36	0	0.04	0	0	0
RH	2:2	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13	0	0.75	0	0	0	0	0
TK	45:37	0.01	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TT	13:13	0.02	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TN	10:16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PE	8:13	0.07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HC	65:53	0.13	0	0	0	0	0.01	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0	0	0	0
SK	14:10	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0.11	0	0.15	0	0	0	0	0
PH	56:58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0.17	0	0	0	0	0
PA	2:3	0.50	0	0	0	0	0	0	0.10	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0.13	0	0	0	0	0
PB	2:2	0.50	0	0	0	0	0	0	0.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.20	0.10	0.10	0	0
PC	5:14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13	0	0	0.50	0	0	0	0
PD1 (24 Jul 2004)	10:5	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0	0.03	0	0	0.11	0.03	0.03	0.03	0.03
PD2 (21 Nov 2004)	4:6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.33	0	0	0	0	0
WK	1:1	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.30	0	0	0	0	0
KM	10:10	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0
KD1 (20 Jun 2003)	4:5	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0.02	0.10	0	0	0	0	0	0	0	0
KD2 (6 Jun 2004)	32:33	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0	0	0	0.06	0.06	0	0	0	0	0	0.06	0	0	0	0
PW1 (20 Jun 2003)	33:41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0	0	0
PW2 (6 Jun 2004)	23:13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0.01	0.01	0.05	0	0	0	0	0.06
Cytoform C																0.01	0	0	0	0	0	0	0	0
LL	29:31	0.02	0	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.98	0	0	0	0

HK	5:10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0
Cytoform D																								
HO	17:40	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.96	0	0	0	0
Cytoform E																								
PA	3:0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0
PB	9:4	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0
PC	3:1	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0
WK	3:1	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0
KD1 (20 Jun 2003)	16:15	1.00	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0

[1] Date are given only when collections were made at a site on 2 separate occasions.

ตารางที่ 8 แสดงอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแขนสั้นแท่งที่ 1และแท่งที่ 3 ของตัวอ่อนเพศผู้และเพศเมียของ cytoforms A-E ของ *Simulium siamense*

Collection site	Date (d/m/y)	sex	IS-s/s	IS-s/1	IS-1/1	IS-s/2,3	IS-s/4	IS-4/4	IS-s/5	IS-s/6	IS-s/7	IS-s/8	IS-s/9	IIIS-s/s	IIIS-s/1	IIIS-1/1	IIIS-s/2	IIIS-2/2	Cytoforms
HY	04/06/03	♂57	27	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	57	0	0	0	0	A
		♀50	24	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	49	1	0	0	0	
BT	30/11/03	♂19	5	0	0	0	13	0	1	0	0	0	0	18	1	0	0	0	A
		♀18	10	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	
BN	05/06/03	♂26	22	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	A
		♀20	14	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	
BK1	02/12/03	♂10	0	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	7	0	0	A
		♀7	1	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	5	0	0	
BK2	13/12/04	♂6	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	0	0	A
		♀3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	
MH1	02/12/03	♂4	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	A
		♀2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
MH2	16/04/04	♂8	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	6	0	2	0	0	A
		♀11	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	1	9	2	0	0	0	
PK	15/04/04	♂5	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	A
		♀4	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	
HT	25/07/05	♂29	28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	17	9	3	0	0	A
		♀28	25	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	16	6	6	0	0	
HS	26/07/05	♂24	10	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	21	3	0	0	0	A
		♀14	6	0	0	0	7	1	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	
WS	26/07/05	♂10	7	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	A
		♀21	9	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	18	1	2	0	0	
PP	22/07/05	♂13	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	8	0	0	A
		♀15	6	2	0	0	0	0	1	1	5	0	0	3	1	11	0	0	
BS	21/12/03	♂4	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	A

		♀7	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	3	0	0	
RH	21/12/03	♂2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	A
		♀2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	
TK	07/02/02	♂45	44	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45	0	0	0	0	A
		♀37	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	0	
TT	07/02/07	♂13	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	A
		♀13	12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	
TN	23/11/03	♂10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	A
		♀16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	
PE	17/11/98	♂8	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	A
		♀13	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	
HC	06/09/03	♂65	58	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	58	0	7	0	0	A, E
		♀53	44	0	9	0	0	0	0	0	0	2	0	42	1	10	0	0	
SK	10/06/05	♂14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	3	1	0	0	A
		♀10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	3	0	0	0	
PH	11/06/05	♂56	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43	7	6	0	0	A
		♀58	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	5	3	0	0	
PA	20/11/04	♂5	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	A
		♀3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	
PB	20/11/04	♂11	1	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	9	A, E
		♀6	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5	
PC	25/07/04	♂8	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	3	A, E
		♀15	14	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	3	
BC1	16/08/03	♂83	83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B
		♀296	0	0	0	296	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BC2	27/11/05	♂32	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B
		♀46	0	0	0	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
KT1	16/08/03	♂39	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B
		♀45	0	0	0	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
KT2	27/11/05	♂1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B

		♀6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LL	20/02/05	♂29	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	28	C
		♀31	2	3*	0	0	0	0	3*	29	0	0	0	0	0	0	1	30	
HK	20/02/05	♂5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	C
		♀10	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	10	
HO	28/02/04	♂17	16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	15	D
		♀40	5	3	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	1	39	
PD1	24/07/04	♂10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	2	0	0	A
		♀5	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0	
PD2	21/11/04	♂4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	A
		♀6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	0	0	
WK	26/07/04	♂4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	A, E
		♀2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
KM	05/06/04	♂10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	A
		♀10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
KD1	20/06/03	♂20	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	16	A, E
		♀20	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	15	
KD2	06/06/04	♂32	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	4	A
		♀33	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	1	
PW1	20/06/03	♂33	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	1	0	0	A
		♀41	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	1	0	0	
PW2	06/06/04	♂23	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	A
		♀13	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	

Note* inversions IS-s/1 and IS-s/5 were linked with IS-st/6 in each 3 larvae.

ตารางที่ 9 ลักษณะจำเพาะของโครโมโซมใน cytoforms A, B, C, D และE ของ *Simulium siamense*

Cytoform	Chromosomal characteristics[1]
A	23 floating inversions; X&Y undifferentiated
B	X_0Y_1; no floating inversions
C	X_0Y_2; 3 floating inversions
D	X_0Y_3 ; 2 floating inversions
E	*IS-1&IIIS-2*; X&Y undifferentiated; 2 floating inversions

[1] X_0 = IS-s in males

Y_1 = IS-2, 3 in females

Y_2 = IS-6 in females

Y_3 = IS-7 in females

Italics indicate fixation of inversions.

ตารางที่ 10 การทดสอบสภาวะสมดุลภายใต้กฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ของอินเวอร์ชัน IS-4, IS-7, IIL-2, IIL-3, IIL-4, IIL-5, IIL-6, IIIS-1, IIIS-2, IIIL-1 และ IIIL-4 ในcytoform A ของ *Simulium siamense*.

Autosomal inversion	Collection site Date	Observed Expected	Inversion frequency			χ^2	*P*
			ss	si	ii		
IS-4	HY	Obs.	51	56	0	11.97**	<0.001
		Exp.	58.59	41.47	4.23		
IS-4	BT	Obs.	16	21	0	5.94	>0.05
		Exp.	19.18	14.91	2.90		
IS-4	HS	Obs.	16	21	1	3.55	>0.10
		Exp.	18.09	16.25	3.65		
IS-4	WS	Obs.	16	15	0	3.15	>0.10
		Exp.	17.81	11.37	1.81		
IS-7	PP	Obs.	23	5	0	0.27	>0.75
		Exp.	23.18	4.58	0.23		
IIL-2	HY	Obs.	101	6	0	0.09	>0.95
		Exp.	100.68	6.23	0.09		
IIL-3	HY	Obs.	95	12	0	0.38	>0.75
		Exp.	95.35	13.31	0.34		
IIL-3	BT	Obs.	30	7	0	0.41	>0.75
		Exp.	30.37	6.30	0.33		
IIL-4	PW 1 20 June 2003	Obs.	65	9	0	0.32	>0.75
		Exp.	65.39	8.35	0.27		
IIL-5	PW 1 20 June 2003	Obs.	67	7	0	0.18	>0.90
		Exp.	66.78	7.03	0.18		
IIL-6	HT	Obs.	51	6	0	3.23	>0.10
		Exp.	50.36	6.43	0.20		
IIL-6	HS	Obs.	22	16	0	2.69	>0.25
		Exp.	23.65	12.65	1.69		
IIL-6	WS	Obs.	26	5	0	0.23	>0.75
		Exp.	26.18	4.61	0.20		
IIL-6	HC	Obs.	91	27	0	1.87	>0.25
		Exp.	91.38	24.92	1.7		
IIIS-1	PP	Obs.	8	1	19	23.78**	<0.001
		Exp.	2.52	11.76	13.72		
IIIS-1	HT	Obs.	33	15	9	7.39**	<0.01
		Exp.	28.73	23.47	4.79		
IIIS-1	HC	Obs.	100	1	17	107.97**	<0.001
		Exp.	85.26	30.09	2.66		
IIIS-1	PH	Obs.	93	12	9	32.91**	<0.001
		Exp.	85.89	26.12	1.99		
IIIS-2	KD2 6 June 2004	Obs.	60	0	5	5.23	>0.05
		Exp.	55.01	4.87	5.2		
IIIL-1	HY	Obs.	86	21	0	1.23	>0.50
		Exp.	86.67	19.26	1.07		
IIIL-1	HT	Obs.	52	5	0	0.11	>0.90
		Exp.	52.09	4.79	0.11		
IIIL-1	HS	Obs.	25	13	0	1.60	>0.25
		Exp.	26.05	10.82	1.12		
IIIL-4	HS	Obs.	33	5	0	0.18	>0.90
		Exp.	33.15	4.68	0.16		

Note** the computed value of χ^2 is equal or to greater than the critical value of chi-square ($\chi^2_{0.05,2}=5.99$

5. วิจารณ์และสรุปผล

การศึกษาการแพร่กระจายและชนิดของแมลงริ้นดำในภูมิภาคต่างๆของประเทศได้พบริ้นดำที่ได้ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แล้วทั้งหมดจำนวน 41 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นริ้นดำที่เพิ่งรายงานการพบในประเทศไทยเป็นครั้งแรก 1 ชนิด ได้แก่ *S. tahanense,* ริ้นดำเหล่านี้มีการแพร่กระจายต่างกัน บางชนิดมีการแพร่กระจายจำกัดเฉพาะจังหวัดใดจังหวัดหนึ่ง หรือภาคใดภาคหนึ่งเท่านั้น เช่น *S. merga*, *S. setsukoae*, *S. caudisclerum* และ *S. fruticosum* พบเฉพาะที่จังหวัดเชียงใหม่ *S. chaliowae* พบเฉพาะที่จังหวัดแพร่ และ *S. phayaoense*, *S. phukaengense* และ *S. lampangense* พบเฉพาะที่น้ำตกจำปาทอง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ส่วน *S. mediocoloratum*, *S. nigrogilvum*, *S. siripoomemense S. chiangmaiense* และ *S. yuphae* พบเฉพาะในจังหวัดภาคเหนือ แต่ *S. oblongum* พบเฉพาะจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในทางตรงข้ามมีริ้นดำหลายชนิดที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทุกภูมิภาคของประเทศ เช่น *S. aureohirtum*, *S. angulistylum*, *S. decuplum*, *S. asakoae*, *S. siamense*, *S. tani* และ *S. nakhonense* ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแต่ละภูมิภาคมีความแตกต่างของชนิดของริ้นดำ นอกจากนี้ริ้นดำบางชนิดมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่อาศัยย่อยบางชนิด เช่น *S. siamense* ชอบอาศัยในลำธารที่น้ำไหลช้าซึ่งตรงข้ามกับ *S. nakhonense, S. quinquestriatum, S tani* และ *S. asakoae* ที่ชอบอาศัยในน้ำที่ไหลเร็ว จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าปัจจัยทางกายภาคของแหล่งน้ำมีผลต่อการกระจายทางภูมิศาสตร์ของแมลงริ้นดำในประเทศไทย โดยปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดคืออัตราการไหลของน้ำและขนาดของลำธาร นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยทางกายภาคของแหล่งน้ำในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความแตกต่างกันซึ่งอาจเป็นผลอธิบายความแตกต่างของชนิดที่พบในแต่ละภูมิภาค โดยเฉพาะชนิดที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีความแตกต่างจากภูมิภาคอื่น

ในการศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนริ้นดำชนิด *S. siamense* จำนวน 1,824 ตัว ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ 32 แห่งในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ตะวันออก และ ภาคกลาง จากการพิจารณาความแตกต่างของลักษณะโพลีทีนโครโมโซม 3 ประการ คือ ความแตกต่างของโครโมโซมเพศ การมี fixed inversions และ การมีชนิดและความถี่ของ floating inversions ต่างกัน สามารถแบ่งประชากรริ้นดำชนิด *S. siamense* ออกเป็น 5 cytoforms คือ cytoforms A, B, C ,D และ E โดย cytoform B เป็น cytoformที่เด่นที่สุดเนื่องจากอินเวอร์ชัน IS-2,3 มีสัมพันธ์กับเพศอย่างสมบูรณ์

และไม่มี floating inversions ลักษณะที่สำคัญของ *S. siamense* คือเพศเมียมีโครโมโซมเพศแบบ heterogametic sex (XY) และเพศผู้แบบ homogametic sex (XX) ซึ่งเป็นลักษณะตรงข้ามกับแมลงริ้นดำส่วนใหญ่ ประชากรริ้นดำชนิด *S. siamense* มีโครโมโซม X 1 แบบคือ X_0 และมีโครโมโซม Y 4 แบบคือ Y_0, Y_1, Y_2 และ Y_3 ดังนั้นประชากรเพศผู้มีโครโมโซมเพศแบบเดียวคือ X_0X_0 และเพศเมียมีโครโมโซมเพศ 4 รูปแบบคือ X_0Y_0, X_0Y_1, X_0Y_2 และ X_0Y_3

6. ปัญหา อุปสรรคและการแก้ไข

1. ช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างขึ้นกับสภาพทางภูมิอากาศ เนื่องจากตัวอ่อนและตัวดักแด้อาศัยในน้ำไหล ดังนั้นช่วงเวลาที่เหมาะของการเก็บตัวอย่างคือ ช่วงปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาว (กรกฎาคม – มกราคม) เพราะแหล่งน้ำไหลมีน้ำไม่มากไปหรือน้อยไป ในช่วงฤดูฝนหรือช่วงที่มีลมมรสุมฝนตกหนักน้ำไหลแรง ตัวอ่อนและตัวดักแด้จะไหลไปกับกระแสน้ำซึ่งเป็นปัญหาในการเก็บตัวอย่างอย่างยิ่งโดยเฉพาะในภาคใต้และภาคเหนือ แต่ในแหล่งน้ำเพาะพันธุ์ที่มีขนาดเล็กปริมาณน้ำน้อยน้ำจะไม่ไหลหรือแห้งในปลายฤดูหนาวและฤดูร้อนซึ่งเกิดกับแหล่งน้ำเป็นจำนวนมากในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนั้นต้องมีการกำหนดเวลาและวางแผนในการเก็บตัวอย่างให้ดีเพื่อจะได้ไม่เสียเวลาและเสียเงินกับการออกไปเก็บตัวอย่าง
2. ไม่สามารถเลี้ยงริ้นดำในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีผลทำให้ไม่สามารถศึกษาพฤติกรรมบางอย่างได้ เช่น พฤติกรรมการผสมพันธุ์ มีรายงานการทดลองเลี้ยงริ้นดำในห้องปฏิบัติการและประสบความสำเร็จในต่างประเทศ แต่ต้องใช้เนื้อที่และงบประมาณพอประมาณซึ่งไม่สามารถทำได้ในการทดลองนี้
3. การทำสไลด์โพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำที่จะให้สวยและอ่านผลได้นั้นต้องใช้ตัวอ่อนที่อยู่ในระยะพอดีคืออายุต้องไม่น้อยไปและไม่แก่ไปและขึ้นกับความสมบูรณ์ของตัวอ่อนด้วย แต่เนื่องจากตัวอ่อนที่เก็บมามีอายุแตกต่างกันและมีความสมบูรณ์ต่างกันจึงต้องทำสไลด์โพลีทีนโครโมโซมเป็นจำนวนมากจึงจะอ่านผลได้ นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งน้ำบางแห่ง เช่น จากอุทยานแห่งชาติบาลาฮาบา จังหวัดนราธิวาศ ที่ไม่สามารถอ่านผลได้เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บได้อายุน้อยจึงทำให้ขาดข้อมูลตัวอย่างทางภาคใต้

เอกสารอ้างอิง

เฉลียว กุวังคะดิลก ชัยณรงค์ บุญเข็มทอง และสุวรรณี พยุหเสนา 2544a. ความหลากหลายและพันธุศาสตร์เชิงประชากรของสปีชีส์ของริ้นดำในประเทศไทย ใน: รายงานวิจัยโครงการ BRT 2544, วิสุทธิ์ ใบไม้ และรังสิมา คุ้มหอม (บรรณาธิการ) หน้า 286-311 จัดพิมพ์โดยโครงการ BRT บริษัทจิรวัฒน์เอ็กเพรส จำกัด กรุงเทพฯ

เฉลียว กุวังคะดิลก สุวรรณี พยุหเสนา ชัยณรงค์ บุญเข็มทอง และ วิสุทธิ์ ใบไม้ 2544b การแพร่กระจาย สัณฐานวิทยา และเซลล์พันธุศาสตร์ของตัวอ่อนริ้นดำในภาคใต้ของประเทศไทย ใน: พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 จัดพิมพ์โดย บริษัทเท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 123-130

Adler, P.H., Currie, D.C. and Wood, D.M. 2004. The black flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, Ithaca, New York.

Adler, P.H. and Kachvorian, E.A. 2001. Cytogenetics of the Holarctic black fly *Simulium noelleri* (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool. 79:1972-1979.

Adler, P.H. & McCreadie, J.W. (1997). The hidden ecology of black flies; sibling species and ecological scale. *American Entomologist*, Fall, 153-161.

Allan, J. D. 1995. Stream Ecology: Structure and function of running waters. Kluwer Academi Publishers, The Netherlands, 388 pp.

Bedo, D.G. 1975. C-banding in polytene chromosomes in pupal and adult blackflies (Diptera: Simuliidae). Chromosoma 51: 291-300.

Bedo, D.G. 1977. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). I. Sibling speciation. Chromosoma 64: 37-65.

Boakye, D.A., Back, C., Fiasorgbor, G.K., Sib, A.P.P. & Coulibaly, Y. (1998). Sibling species distributions of the *Simulium damnosum* complex in the West African Onchocerciasis Control Programme Area during the decade 1984-93 following intensive larviciding since 1974. *Medical and Veterinary Entomology*, 12, 345-358.

Charalambous, M., Ready, P.D., Shelley, A.J., Arzube, M. and Lowry, C.A. 1993. Cytological and isoenzyme analysis of the Bucay and Quevado cytotypes of the onchocerciais vector *Simulium exiguum* (Diptera: Simuliidae) in Ecuador. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 88: 39-48.

Charalambous, M., Shelley, A.J., Herzog M.M. and Dias, A.P. 1996. Four new cytotypes of the onchocerciasis vector blackfly *Simulium guianense* in Brazil. Met Vet. Entomol. 10: 111-120.

Corkum, L.D. and Currie, D.C. 1987. Distributional patterns of immature Simuliidae (Diptera) in northwestern of North America. Freshwater Biol. 17: 201-221.

Crosskey, R.W. and Howard, T.M. 2004. A revised taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera: Simuliidae). The Natural History Museum, London.

Crosskey, R.W. 1973. Family Simuliidae. In M.D. Delfinado and D. E. Hardy (eds.). A catalog of the Diptera of the Oriental region, pp. 423-430. University of Hawaii Press, Honolulu.

Datta, M. 1974. Some black flies (Diptera: Simuliidae) of the subgenus *Simulium* Latreille (s. str.) from the Darjeeling area (India). *Oriental Insects* 8: 15-27.

Dunbar, R.W. 1976. The East African situation and review of the *Simulium Damnosum* complex as a whole. WHO/VBC/SC/76.20. Mimeogr. Doc.

Fukuda, M., Choochote, W., Bain, O., Aoki, C. and Takaoka, H. 2003. Natural infections with filarial larvae in two species of black flies (Diptera: Simuliidae) in norhthern Thailand. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 99-102.

Hamada, N. and McCreadie, J.W.1999. Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in BrazilianAmazonia. Hydrobiologia.397: 71-78.

Hamada, N., McCreadie, J. W. and Adler, P.H. 2002. Species richness and spatial distribution of blackflies (Diptera: Simuliidae) in streams of Central Amazonia, Brazil. Freshwater Biology 47: 31-40.

Hirai, H., Procunier, W.S., Ochoa, J.O. and Uemoto, K. 1994. A cytogenetic analysis of the *Simulium ochraceum* species complex (Diptera: Simuliidae) in central America. Genome 37: 36-53.

Jitklang, S., and Kuvangkadilok, C. 2007. A new species of *Simulium* (*Gomphostilbia*)(Diptera: Simuliidae) from southern Thailand, with description of its chromosomes. Stud. Diptero. (In press).

Kettle, D.S. 1990. Medical and Veterinary Entomology. CAP Intertional UK.

Kuvangkadilok, C. and Takaoka, H. 2000. Taxonomic notes on Simuliidae (Diptera) from Thailand : description of a new species and new species distributional records of nine known species. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 28; 167-175.

Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C. and Phayuhasena, S. 1999 Distribution of the larvae of blackflies (Diptera: Simuliidae) at Doi Inthanon national Park, northern Thailand. *Southeast Asian J. Med. Publ. Hlth.* 30: 328-337.

Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C., Phayuhasena, S. and Baimai, V. 2003. Larval polytene chromosomes of black flies (*Simulium*) of Thailand. I. Comparison among five species in the subgenus *Gomphostilbia* Enderlein. *Genetica* 118: 69-81.

Mafuyai, H.B., Post, R.J. Vajime, C.G. and Molyneux, D.H. 1996. Cytotaxonomic identification of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae) from Nigeria. *Trop. Med. Int. Health* 1: 779-785.

McCreadie, J.W., Adler, P.H. and Colbo, M.H. 1995. Community structure of larval black flies (Diptera: Simuliidae) from the Avalon Peninsula Newfoundland. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 88: 51-57.

Millest, A.L. 1992. Identification of members of the *Simulium ochraceum* complex in the three onchocerciasis foci in Mexico. *Med. Vet. Entomol.* 6: 23-28.

Peterson, B.V. 1984. Simuliidae. In R.W. Merritt and K.W. Cummins (eds.). An introduction to the aquatic insects of North America, pp. 534-550. Kenda/Hunt, Dubugue, Iowa.

Richards, F., Hopkins, D. and Cupp, E.D. 2000. Programatic goals and approaches to onchocerciasis. *The Lancet.* 335: 1663-1664.

Rothfels, K.H. (1979). Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). *Ann Review of Ento*, 24, 507-539.

Rothfels, K.H. 1981. Cytological approaches to the study of blackfly systematics and evolution. Application of Genetics and Cytology in Insect Systematics and Evolution (ed. by M. W. Stock),

pp 67-83. Forestry, Wildlife and Range Experiment Station. University of Idaho, Moscow, Idaho, U.S.A.

Rothfels, K.H. and Dunbar, R.W. 1953. The salivary gland chromosomes of the back fly Simulium vittatum Zett. *Can. J. Zool.* 31: 226-241.

Rothfels, K.H. and Featherson, D.W. 1981. The population structure of *Simulium vittatum* (Zett): the IIIL-1 and IS-7 sibling species. *Can. J. Zool.* 51: 1857-1883.

Takaoka, H. 1977. Studies on black flies of the Namsei islands, Japan (Diptera: Simuliidae) III. In six species of the subgenus *Simulium* latreille. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 28: 193-217.

Takaoka, H. 1979. The black flies of Taiwan (Diptera: Simuliidae). *Proc. Insects.* 20: 365-403.

Takaoka, H. 2001. *Simulium* (*Simulium*) *weji* sp. nov. (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 349-354.

Takaoka, H. and Adler, P.H. 1997. A new subgenus, *Simulium* (*Daviesellum*), and a new species *S.* (*D.*) *courtneyi*, (Diptera: Simuliidae) from Thailand and Peninsular Malaysia. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 25: 17-27.

Takaoka, H and Choochote, W. 2002. Taxonomic notes on the *Griseifrons* species-group in *Simulium* (*Simulium*)(Diptera; Simuliidae) from Thailand : Descriptions of two new species and description of the male, pupa and larva of *S.* (*S.*) *digrammicum* Edwards. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 115-132.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2004a. Two new species of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Trop. Med. Hlth.* 32: 31-36.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2004b. A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Trop. Med. Hlth* 32: 189-197.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2004c. Taxonomic notes on the *Griseifrons* species-group of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand. *Trop. Med. Hlth.* 32: 311-327.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005a. Two new species of *Simulium* (*Montisimulium*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56: 21-31.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005b. A new subgenus and a new species of *Simulium* s.l. (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56: 33-41.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005c. A new species of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56: 43-47.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005d. Two new species of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56: 99-110.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005e. Two new species of *Simulium* Latreille Diptera: Simuliidae) from northwestern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56:123-133.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005f. Two new species of the *Griseifrons*-species-group of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand *Med. Entomol. Zool.* 56: 219-235.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005g. A new species of *Simulium* (*Simulium*) from northern Thailand (Diptera: Simuliidae). *Trop. Med. Health.* 33: 95-101.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005h. Two new species of *Simulium* (*Nevermannia*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Trop. Med. Hlth.* 33: 133-141.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005i. Two new species of black flies (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56: 319-334.

Takaoka, H. and Choochote, W. 2005j. Discovery of two more new species of *Simulium* (*Montisimulium*) (Diptera: Simuliidae) in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai. *Trop. Med. Hlth.* 33: 209-215.

Takaoka, H. & Choochote, W. (2006a). A new species of the subgenus *Simulium* (*Asiosimulium*) (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 57, 45-48.

Takaoka, H. & Choochote, W. (2006b). A new species of *Simulium* (*Nevermannia*) from northern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 57, 83-92.

Takaoka, H. & Choochote, W. (2006c). A new species of the *griseifrons* species-group of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 57, 115-124.

Takaoka, H. & Choochote, W. (2006d). A new species of *Simulium* (*Gomphostilbia*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 57, 229-233.

Takaoka, H., and Choochote, W. 2006e. A new species of *Simulium* (*Gomphostilbia*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. Med. Entomol. Zool. 57: 229-233.

Takaoka, H. and Davies D.M. 1995. The black flies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia. Kyushu University Press, Fukuoka. 175 pp.

Takaoka, H. and Kuvangkadilok, C. 1999. Four new species of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 497-509.

Takaoka, H. and Saito, K. 1996. A new species and new records of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 163-169.

Takaoka, H. and Suzuki, H. 1984. The blackflies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 35: 7-45.

Vajime, C.G. and Dunbar, R.W. 1975. Chromosomal identification of eight species of the subgenus *Edwardsellum* near and including *Simulium* (*Edwardsellum*) *damnosum* theobald (Diptera: Simuliidae). *Tropenmed. Parasitol.* 26: 111-138.

Vajime, C.G., Tombala, P.A., Kruger, A. and Post, R.J. 2000. The cytotaxonomy of *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae) from the Thyolo onchocersis focus in Malawi and description of a new member of the complex. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94: 279-290.

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่งานวิจัย

แมลงริ้นดำมีความสำคัญทางการแพทย์ สัตว์แพทย์ และเศรษฐกิจ เนื่องจากแมลงริ้นดำเพศเมียเป็นพาหะสำคัญในการถ่ายทอดโปรโตรซัวอย่างน้อยที่สุด 15 ชนิด พยาธิ 12 ชนิด และไวรัส 1 ชนิด มันแพร่กระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆของโลก และมีชื่อเรียกต่างๆกัน ในประเทศไทยเรียกแมลงริ้นดำว่า "คุ่น" ซึ่งก่อความรำคาญรบกวนและกัดชาวดอย ชาวบ้าน นักท่องเที่ยว และสัตว์เลี้ยง ในท้องที่ต่างๆเช่น บริเวณบ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ บริเวณช่องเย็น อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร-นครสวรรค์ ซึ่งเป็นจุดสูงสุดของถนนสายคลองลาน-อุ้มผาง และเป็นสถานที่ดูนกที่หายากของประเทศไทย บริเวณลานสนภูสอยดาว จังหวัดอุตรดิตถ์ ที่มีป่าสนสามใบและพรรณดอกไม้นานาชนิด เช่น ดอกสร้อยสุวรรณมีดอกสีเหลืองและบริเวณอ่างกายอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นแอ่งน้ำธรรมชาติขนาดใหญ่ที่อยู่สูงที่สุดของประเทศไทย มีความสูงประมาณ 2,500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล และมีพันธุ์ไม้ที่หายาก เช่น กุหลาบพันปีและข้าวตอกฤาษี คุ่นที่ดูดเลือดคนมีหลายชนิดและมีแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่างกัน เช่น *S. rufibasis* อาศัยในแหล่งน้ำไหลที่มีความสูงประมาณ 2,300 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล คุ่นชนิด *S. nigrogilvum* ชอบอาศัยในแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลปานกลางประมาณ 1,100-1,600 เมตร และ *S. nodosum* คุ่นชนิดนี้มีแหล่งเพาะพันธุ์ระดับต่ำประมาณ 600 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ดังนั้นจึงควรจะได้ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติ รวมทั้งนิเวศวิทยาของแหล่งเพาะพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดและควบคุมแมลงริ้นดำให้มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหลากหลายของชนิดและการแพร่กระจายของแมลงริ้นดำในบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย จากการศึกษารูปร่างลักษณะของตัวอ่อนสามารถแยกริ้นดำสกุล *Simulium* ได้ 41 ชนิดซึ่งอาศัยในแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีปัจจัยทางกายภาพเหมือนกันหรือต่างกัน การกระจายของริ้นดำบางชนิดมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางกายภาคของแหล่งเพาะพันธุ์ เช่น ริ้นดำชนิด *S. nakhonense* และ *S. asakoae* ซึ่งเป็นริ้นดำที่ดูดเลือดคนและสัตว์ ชอบอาศัยในแหล่งน้ำไหลที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างต่ำถึงปานกลาง ขนาดของแหล่งน้ำกว้างและกระแสน้ำไหลเร็ว แต่ *S. siamense* ที่มีรายงานว่าดูดเลือดคนเช่นกัน ชอบอาศัยใน

ลำธารหรือร่องน้ำขนาดเล็กและกระแสน้ำไหลช้า ดังนั้นข้อมูลการศึกษานิเวศวิทยาจึงมีประโยชน์ในการป้องกันและกำจัดแมลงริ้นดำในอนาคต นอกจากนี้ผลการศึกษาเปรียบเทียบการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนประชากรริ้นดำชนิด *S. siamense* ที่เก็บจากแหล่งน้ำในภูมิภาคต่างๆ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของการเกิดวิวัฒนาการที่มีการแบ่งแยกประชากรออกเป็นกลุ่มย่อย โดยประชากรมีลักษณะโครโมโซมต่างกัน จากการศึกษาได้แบ่งประชากรของ *S. siamense* ออกเป็น 5 cytoforms (A-E) ที่มีรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนคล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างของโครโมโซมเพศ อินเวอร์ชันที่คงที่ และชนิดและความถี่ของอินเวอร์ชันที่ไม่คงที่ นอกจากนี้แต่ละ cytoform มีแหล่งเพาะพันธุ์ต่างกันซึ่งควรจะได้ศึกษา microhabitats ของแหล่งเพาะพันธุ์ของ cytoforms เหล่านี้ในอนาคต