

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของยุงก้นปล่องชนิด

Anopheles barbirostris และ *An. campestris* ในประเทศไทย

โดย รศ. เวช ชูโชติและคณะ

31 กรกฎาคม พ.ศ. 2550

1052/50

DATE	25/7/50
BY	fu/



โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
 c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
 73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
 กรุงเทพฯ 10400

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของยุงก้นปล่องชนิด
Anopheles barbirostris และ *An. campestris* ในประเทศไทย

โดย รศ. เวช ชูโชติและคณะ

31 กรกฎาคม พ.ศ. 2550

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของยุงก้นปล่องชนิด

Anopheles barbirostris และ *An. campestris* ในประเทศไทย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. รศ.เวช ชูโชติ

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ดร.อนุลักษณ์ จันทร์คำ

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. นางสาวอติพร แซ่อึ้ง

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้
และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ
ในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ที่ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRTR_249004 ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ศักดิ์ อังกลสิทธิ์ อธิการบดี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รศ.นพ.นิเวศน์ นันทจิต คณบดีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ รศ.ดร.อุดม ชัยทอง หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุญาตและสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ Professor Hiroyuki Takaoka และ Assistant Professor Yasushi Otsuka ที่ช่วยให้คำปรึกษาและแนะนำการทำวิจัยเป็นอย่างดี

บทคัดย่อไทย-อังกฤษ

Abstract

ภาษาไทย:

ได้จับยุง *Anopheles barbirostris* เพศเมีย โดยใช้กระบือเป็นเหยื่อล่อ จากจังหวัดเชียงใหม่ กาญจนบุรี อุบลราชธานี และเพชรบุรี มาเลี้ยงแบบ iso-female lines (isolines) เพื่อวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ จากการวินิจฉัยยุงทั้งหมด 33 isolines พบเมตาเฟสคาริโอไทป์ 3 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (X_1, X_2, Y_1) จำนวน 3, 3 และ 5 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ กาญจนบุรี และเพชรบุรี ตามลำดับ รูปแบบ B (X_1, X_2, X_3, Y_2) จำนวน 4, 7 และ 8 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี และอุบลราชธานี ตามลำดับ และรูปแบบ C จำนวน 1 และ 2 isolines จากจังหวัดเพชรบุรี และอุบลราชธานี ตามลำดับ ยุง *An. barbirostris* ทั้งหมดจำนวน 33 isolines มีค่าเฉลี่ยผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้เท่ากับ 11.2-13.0 ซึ่งอยู่ในช่วงของยุง *An. barbirostris* (6-18 แขนง) และยุงก้นปล่อง จำนวน 12 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ ที่มีนิสัยชอบกัดกินเลือดคน พบรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ 2 รูปแบบคือ รูปแบบ B (X_2, Y_2) จำนวน 5 isolines และรูปแบบ E (X_2, Y_5 : เป็นรูปแบบใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย) จำนวน 7 isolines โดยมีค่าเฉลี่ยผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้เท่ากับ 22.4-24.5 ซึ่งอยู่ในช่วงของยุง *An. campestris* (17-58 แขนง) เนื่องจากโครโมโซม X_2 ของยุงที่ชอบกัดกินเลือดคนทั้ง 2 รูปแบบมีลักษณะเหมือนโครโมโซม X_2 ของยุง *An. barbirostris* ทุกรูปแบบ และแตกต่างจากโครโมโซม X ของยุง *An. campestris* ดังนั้นจึงเรียกยุงทั้ง 2 รูปแบบว่า *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E ตามลำดับ

จากการทดลองผสมพันธุ์ข้ามรูปแบบระหว่างยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E ผลที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่ายุงทั้งสองรูปแบบมีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ จากการทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ และ/หรือ ข้ามรูปแบบ ระหว่างยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B กับยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A, B และ C ผลที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่ายุงทั้ง 2 สายพันธุ์มีพันธุกรรมที่เข้ากันไม่ได้ จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่ยีนไรโบโซมและยีนไมโทคอนเดรียที่ตำแหน่ง ITS2, COI และ COII พบว่ายุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E มีความสัมพันธ์เป็นแบบ conspecific cytological races เนื่องจากมี intraspecific variation ที่ต่ำมาก (genetic distance < 0.005) และน่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ที่แตกต่างจากยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A, B และ C เนื่องจากมี large sequence divergence ของยีนในส่วน ITS2 (0.203-0.268), COI (0.026-0.032) และ COII (0.030-0.038)

ได้ทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ระหว่างยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A สายพันธุ์จาก 3 จังหวัด คือ เชียงใหม่ กาญจนบุรี และเพชรบุรี เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลจากการศึกษาพบว่ายุง *An. barbirostris* สายพันธุ์จากทั้ง 3 จังหวัดมีพันธุกรรมที่เข้ากัน

ไม่ได้ โดยให้ embryonation rate ต่ำ, อัตราการฟักตัวออกจากไข่ต่ำ และ/หรือ ไม่มีการฟักตัวออกจากไข่เลย, ตัวอ่อนที่ฟักตัวออกจากไข่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ, และมี asynapsis salivary gland polytene chromosome, ตัวเต็มวัยเพศเมียมีความผิดปกติของรังไข่ ตัวเต็มวัยเพศผู้มีการฝ่อของ accessory gland และอัมพาต และเกิด sex distortion ในยุงตัวเต็มวัย ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่ายุง *An. barbirostris* เป็นยุงกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน และจากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่ยีนไรโบโซมและยีนไมโทคอนเดรียที่ตำแหน่ง ITS2, COI และ COII พบว่ามี large sequence divergence ของยีนในส่วน ITS2 (0.240-0.627), COI (0.036-0.056) และ COII (0.042-0.051) ซึ่งสนับสนุนว่ายุง *An. barbirostris* รูปแบบ A สายพันธุ์จากทั้ง 3 จังหวัดมีพันธุกรรมที่เข้ากันไม่ได้

ได้นำ mixed colonies ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A และ B จากจังหวัดเพชรบุรี และยุง *An. campestris*-like รูปแบบ E จากจังหวัดเชียงใหม่ มาศึกษาการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ด้วยเทคนิค artificial membrane feeding และนำมาวิเคราะห์ผลของ oocyst และ sporozoite rates ในวันที่ 8 และ 12 หลังจากยุงกินเลือดที่มี gametocyte ผลจากการศึกษาพบว่ายุง *An. campestris*-like รูปแบบ E มีความสามารถในการยอมรับเชื้อ *P. vivax* สูง คือมีค่า oocyst rates เท่ากับ 100% และ sporozoite rates เท่ากับ 64.29% ในขณะที่ยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A และ B มีความสามารถในการยอมรับเชื้อต่ำคือ มีค่า oocyst rates เท่ากับ 60% และ 40% ตามลำดับ และ sporozoite rates เท่ากับ 10% และ 11.76% ตามลำดับ

ภาษาอังกฤษ:

Thirty three isolines of *Anopheles barbirostris* derived from animal-biting females showed 3 karyotypic forms: Form A (X_1, X_2, Y_1) in 3, 3 and 5 isolines from Chiang Mai, Kanchanaburi and Phetchaburi provinces, respectively; Form B (X_1, X_2, X_3, Y_2) in 4, 7 and 8 isolines from Chiang Mai, Phetchaburi and Ubon Ratchathani provinces, respectively; Form C (X_2, Y_3) in 1 and 2 isolines from Phetchaburi and Ubon Ratchathani provinces, respectively. All 33 isolines exhibited an average branch summation of seta 2-VI pupal skins ranging from 11.2-13.0 branches, which was in the limit of *An. barbirostris* (6-18 branches). Of the 12 human-biting isolines from Chiang Mai province, 5 showed Form B (X_2, Y_2) and 7 exhibited a new karyotypic form designated as Form E (X_2, Y_3). All of the 12 isolines had an average branch summation of seta 2-VI pupal skins ranging from 22.4-24.5 branches, which was in the limit of *An. campestris* (17-58 branches). Thus, they were tentatively designated as *An. campestris*-like Forms B and E.

Hybridization between *An. campestris*-like Forms B and E showed that they were genetically compatible, yielding viable progeny for several generations, and suggesting conspecific relationships of these 2 karyotypic forms. Reproductive isolation among crosses between *An. campestris*-like Form B and *An. barbirostris* Forms A (Phetchaburi), B (Chiang Mai, Ubon Ratchathani) and C (Phetchaburi) strongly suggested the existence of these 2 species. In addition, the very low intraspecific variation (genetic distance < 0.005) in the nucleotide sequence of ITS2 of the rDNA, COI and COII of mitochondrial DNA in the 7 isolines of *An. campestris*-like Forms B and E supported their conspecific relationship. The large sequence divergence of ITS2 (0.203-0.268), COI (0.026-0.032) and COII (0.030-0.038) from genomic DNA of *An. campestris*-like Forms B and E, and the *An. barbirostris* Forms A, B and C, clearly supported cytogenetic and morphological evidence.

Crossing experiments among the three strains of laboratory-raised isolines of *An. barbirostris* Form A (Chiang Mai, Kanchanaburi, Phetchaburi) were employed by induced copulation in order to determine their genetic relationship. The results of reproductive isolation from each other by providing low embryonation, low- and/or non-hatched eggs, inviable progenies, asynapsis of F_1 -hybrid salivary gland polytene chromosomes, abnormal development of ovarian follicles, atrophied of accessory glands and testes, and sex distortion of adults, strongly indicated the existence of species complex in the taxon of *An. barbirostris*. In addition, the large sequence divergence of ITS2 (0.240-0.627), COI (0.036-0.056) and COII (0.042-0.051) from the

genomic DNA of three strains of *An. barbirostris* Form A clearly supported their post-mating reproductive isolation.

Three laboratory-raised colonies of two karyotypic forms of *An. barbirostris* Form A and B (Phetchaburi), and *An. campestris*-like Form E (Chiang Mai) were experimentally infected with *Plasmodium vivax* using an artificial membrane feeding technique, and dissected eight and twelve days after feeding for oocyst and sporozoite rates, respectively. The results revealed that *An. campestris*-like Form E was highly susceptible to *P. vivax* with 100% oocyst rates and 64.29% sporozoite rates, whereas *An. barbirostris* Form A and B had low susceptibility to *P. vivax* with 60% and 40% oocyst rates, and 10% and 11.76% sporozoite rates, respectively.

เนื้อหาของงาน

List of Tables

Table 1 Branch summation of seta 2-VI of <i>An. barbirostris</i> Form A, B and C collected from animal baits, and <i>An. campestris</i> -like Form B and E collected from human baits.....	Page 13
Table 2 Average genetic distances within and between 3 groups, AB1, AB2, and HB for the ITS2, COI, and COII regions.....	Page 14
Table 3 Karyotypic forms of <i>An. barbirostris</i> Forms A, B and C, and <i>An. campestris</i> -like Forms B and E, and their GenBank accession numbers.....	Page 15
Table 4 Average genetic distances within and between groups A1, A2 and A3, for the ITS2, COI and COII regions.....	Page 16
Table 5 Cross-mating among isolines of <i>An. campestris</i> -like Form B and E and <i>An. barbirostris</i> Form A, B and C.....	Page 17
Table 6 Cross-mating among three isolines of <i>An. barbirostris</i> Form A.....	Page 18
Table 7 The oocyst rates of <i>An. cracens</i> , <i>An. campestris</i> -like Form E and <i>An. barbirostris</i> Form A and B after feeding on blood containing gametocytes of <i>P. vivax</i> , all dissected 8 days after feeding.....	Page 19
Table 8 The oocyst and sporozoite rates of <i>An. cracens</i> , <i>An. campestris</i> -like Form E and <i>An. barbirostris</i> Form A and B after feeding on blood containing gametocytes of <i>P. vivax</i> , all dissected 12 days after feeding.....	Page 20

List of Figures

Fig. 1 Metaphase karyotypes of <i>An. barbirostris</i> Form A, B, C and <i>An. campestris</i> -like Form B and E.....	Page 21
Fig. 2 Phylogeny the <i>An. barbirostris</i> Form A, B and C, and <i>An. campestris</i> -like Form B and E based on ITS2.....	Page 22
Fig. 3 Phylogeny the <i>An. barbirostris</i> Form A, B and C, and <i>An. campestris</i> -like Form B and E based on COI.....	Page 23
Fig. 4 Phylogeny the <i>An. barbirostris</i> Form A, B and C, and <i>An. campestris</i> -like Form B and E based on COII.....	Page 24
Fig. 5 Amplification of the entire internal transcribed spacer 2 (ITS2) for three allopatric strains of <i>An. barbirostris</i> Form A on a 1% agarose gel.....	Page 25
Fig. 6 Amplification of the COI and COII PCR products for three allopatric strains of <i>An. barbirostris</i> Form A on a 1% agarose gel.....	Page 26
Fig. 7 Phylogeny of the three allopatric strains of <i>An. barbirostris</i> Forms A based on ITS2.....	Page 27
Fig. 8 Phylogeny of the three allopatric strains of <i>An. barbirostris</i> Forms A based on COI.....	Page 28
Fig. 9 Phylogeny of the three allopatric strains of <i>An. barbirostris</i> Forms A based on COII.....	Page 29
Fig. 10 Salivary gland polytene chromosomes of 4 th larvae, ovaries and testes of parental and F ₁ -hybrids from crosses among three strains <i>An. barbirostris</i> Form A.....	Page 30
Fig. 11 Showing oocysts of <i>P. vivax</i> recovered from midgut of <i>An. cracens</i> and <i>An. campestris</i> -like Form E.....	Page 31
Fig. 12 Showing free flow <i>P. vivax</i> sporozoites from the squashed salivary glands of <i>An. cracens</i> and <i>An. campestris</i> -like Form E.....	Page 32

บทนำ

เมื่อเร็วๆ นี้ยังกันปล่องชนิด *An. barbirostris* และ/หรือ *An. campestris* ถูกรายงานว่าจะ เป็นพาหะที่สำคัญในการนำเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* มาสู่คน ที่อำเภอรัฐประเทศ จังหวัดสระแก้ว และน่าจะเป็นยุงพาหะที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการติดเชื้อ *P. vivax* ใน ประชากรไทย เนื่องจากการจำแนกยุงพาหะทั้งสองชนิดนี้ในภาคสนามโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน วิทยาของตัวเต็มวัยเพศเมียมีความไม่แน่นอนสูง จึงทำให้เกิดความผิดพลาดมากในการศึกษา ทางด้านระบาดวิทยาและ/หรือการควบคุมโรคมาลาเรีย ส่วนการจำแนกยุงทั้งสองชนิดนี้โดยใช้ ผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่ง สามารถแยกยุงทั้งสองชนิดนี้ได้เพียง 95-97% เท่านั้น โดยยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris* จะมีผลรวมของแขนงเส้นขนอยู่ในช่วง ระหว่าง 6-18 และ 17-58 ตามลำดับ วิธีการจำแนกยุงทั้งสองชนิดนี้ได้ถูกต้องและแม่นยำที่สุด ในขณะนี้วิธีเดียวเท่านั้น คือ การใช้ลักษณะของเมตาเฟสคาร์ิโอไทป์จากเซลล์สมองของลูกน้ำยุง กล่าวคือ ยุง *An. barbirostris* จะมีลักษณะของเมตาเฟสคาร์ิโอไทป์ 4 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (X_2, X_3, Y_1), B (X_1, X_2, X_3, Y_2), C (X_2, X_3, Y_3) และ D (X_2, Y_4) สำหรับรูปแบบ D จะพบเฉพาะที่ ประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น ส่วนยุง *An. campestris* สายพันธุ์จังหวัดพระนครศรีอยุธยาจะมีลักษณะ ของเมตาเฟสคาร์ิโอไทป์รูปแบบเดียวเท่านั้น (X, Y) จากการศึกษาเบื้องต้นก่อนที่จะเสนอ โครงการวิจัยนี้ พบว่ายุงกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีนิสัยชอบ กัดกินเลือดคน มีลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเพศเมียที่เป็นได้ทั้งยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris* มีค่าเฉลี่ยผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่งเท่ากับ 22.25 (18-30) แขนง มีลักษณะของเมตาเฟสคาร์ิโอไทป์เป็นรูปแบบใหม่ (X_2, Y_3) ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนใน ประเทศไทย จึงเรียกยุงชนิดนี้ว่า *An. campestris*-like รูปแบบ E จากการทดลองผสมข้ามพันธุ์ ระหว่างยุง *An. campestris*-like รูปแบบ E กับยุง *An. barbirostris* รูปแบบ B สายพันธุ์จังหวัด เชียงใหม่ พบว่ามีพันธุกรรมที่เข้ากันไม่ได้ การทดลองเพิ่มเติมโดยการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเพชรบุรี พบว่ามีพันธุกรรมที่เข้า กันไม่ได้เช่นกัน จากหลักฐานที่ยุงกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* มีความหลากหลายทาง พันธุกรรมอย่างเห็นได้ชัดเจน และในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาวิจัยยุงกลุ่มนี้อย่างละเอียดแบบเป็น ระบบที่มีทิศทาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของยุงกลุ่มนี้ทั่วประเทศ ไทยด้วยวิธีสหวิทยาการ ดังนั้นจุดประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้ คือ การศึกษาถึงรูปแบบคาร์ิโอ ไทป์ต่างๆ ของยุงกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* ที่มีผลต่อการเกิด 1) ความแปรปรวนของ ลักษณะสัณฐานวิทยาของยุงระยะต่างๆ โดยการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกวาด 2) pre-mating barriers โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างภายในของโพลีทีนโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายและรังไข่ 3) post-mating barriers โดยวิธีการผสมข้ามพันธุ์และ/หรือข้ามสายพันธุ์ 4) ความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

DNA ที่ตำแหน่งต่างๆ ของ rDNA และ mtDNA ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา และ 5) ระดับความสามารถในการยอมรับเชื้อ *P. vivax* ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งผลคาดหวังที่จะได้จากการศึกษาวิจัยแบบสหวิทยาการในครั้งนี้ จะทำให้ทราบรายละเอียดของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยุงกลุ่มนี้ทั่วประเทศไทย และการสร้างกฎเกณฑ์ที่เป็นระบบ มีประสิทธิภาพ ที่จะใช้ในการจำแนกยุงกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* แต่ละรูปแบบคาริโอไทป์ในภาคสนามได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว เพื่อที่จะหารูปแบบคาริโอไทป์ของยุงที่เป็นพาหะสำคัญในการนำเชื้อ *P. vivax*

สรุปผลการดำเนินการ

1. การวินิจฉัยรูปแบบคาริโอไทป์

ได้จับยุง *Anopheles barbirostris* ที่บ้านหนองจ้อม อำเภอสันทราย และ บ้านปางไม้แดง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่, บ้านพุน้ำร้อน อำเภอหนองห้วยปลิง จังหวัดเพชรบุรี, บ้านแก่งเรือ อำเภอนาจะหลวย จังหวัดอุบลราชธานี และบ้านท่าลำไย อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี มาวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์และนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้ ผลการวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์และผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ได้สรุปไว้ใน Table 1 และรูปภาพของเมตาเฟสโครโมโซมได้แสดงไว้ใน Fig. 1

ยุงที่จับจากบ้านหนองจ้อม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ สามารถวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้ จำนวน 12 iso-female lines (isolines) ยุงที่จับได้จากการใช้คนเป็นเหยื่อล่อ จำนวน 12 isolines เป็นรูปแบบ B (X_2, Y_2) จำนวน 5 isolines (HCB9, HCB10, HCB13, HCB18, HCB20) และรูปแบบ E (X_2, Y_3 ; รูปแบบใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย) จำนวน 7 isolines (HCE6, HCE7, HCE8, HCE12, HCE14, HCE15, HCE16) จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้ พบว่ารูปแบบ B จำนวน 5 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 24.5 (19-32) แขนง และรูปแบบ E จำนวน 7 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 22.4 (18-30) แขนง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของยุงทั้ง 2 รูปแบบ (12 isolines) อยู่ในช่วงของยุง *An. campestris* (17-58 แขนง) เนื่องจากโครโมโซม X_2 ของยุงทั้ง 2 รูปแบบมีลักษณะเหมือนโครโมโซม X_2 ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A (X_2, X_3, Y_1), B (X_1, X_2, X_3, Y_2) และ C (X_2, X_3, Y_3) และต่างจากโครโมโซม X ของยุง *An. campestris* (X, Y) (Baimai et al., 1995) เนื่องจากผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้ ที่ใช้แยกแยะหว่างยุง *An. barbirostris* (6-18 แขนง) และ *An. campestris* (17-58 แขนง) (Harrison and Scanlon, 1975) ของยุงรูปแบบ B และ E อยู่ในช่วงของยุง *An. campestris* ดังนั้นจึงเรียกยุงทั้ง 2 รูปแบบว่า *An. campestris* -like รูปแบบ B และ E ตามลำดับ

ยุงที่จับได้จากบ้านปางไม้แดง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่โดยใช้กระบือเป็นเหยื่อล่อ สามารถวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้ จำนวน 7 isolines เป็นรูปแบบ A จำนวน 3 isolines

(ACA4, ACA6, ACA8) และรูปแบบ B จำนวน 4 isolines (ACB1, ACB2, ACB3, ACB9) จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้ พบว่ายุงรูปแบบ A จำนวน 3 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 12.1 (13-16) แขนง และรูปแบบ B จำนวน 4 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 11.2 (10-16) แขนง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของยุงทั้ง 2 รูปแบบ (7 isolines) อยู่ในช่วงของยุง *An. barbirostris* (6-18 แขนง)

ยุงที่จับได้จากบ้านพุน้ำร้อน อำเภอหนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรีโดยใช้กระบือเป็นเหยื่อล่อ สามารถวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้ จำนวน 13 isolines เป็นรูปแบบ A จำนวน 5 isolines (APA13, APA14, APA18, APA33, APA34) รูปแบบ B จำนวน 7 isolines (APB4, APB5, APB9, APB20, APB24, APB27, APB31) และรูปแบบ C จำนวน 1 isoline (APC28) จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้ พบว่ายุงรูปแบบ A จำนวน 5 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 12.6 (8-17) แขนง รูปแบบ B จำนวน 7 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 12.6 (10-16) แขนง และรูปแบบ C จำนวน 1 isoline มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 13.0 (10-19) แขนง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของยุงทั้ง 3 รูปแบบ (13 isolines) อยู่ในช่วงของยุง *An. barbirostris* (6-18 แขนง)

ยุงที่จับได้จากบ้านแก่งเรือ อำเภอนาจะหลวย จังหวัดอุบลราชธานีโดยใช้กระบือเป็นเหยื่อล่อ สามารถวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้ จำนวน 11 isolines เป็นรูปแบบ A จำนวน 1 isoline (AUA17) รูปแบบ B จำนวน 8 isolines (AUB2, AUB3, AUB6, AUB9, AUB10, AUB11, AUB15, AUB18) และรูปแบบ C จำนวน 2 isolines (AUC4, AUC16) จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้ พบว่ายุงรูปแบบ A จำนวน 1 isoline มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 12.4 (10-15) แขนง รูปแบบ B จำนวน 8 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 12.8 (8-17) แขนง และรูปแบบ C จำนวน 2 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 12.4 (10-15) แขนง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของยุงทั้ง 3 รูปแบบ (11 isolines) อยู่ในช่วงของยุง *An. barbirostris* (6-18) แขนง

ยุงที่จับได้จากบ้านท่าลำไย อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรีโดยใช้กระบือเป็นเหยื่อล่อ สามารถวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้ จำนวน 3 isolines (AKA2, AKA3, AKA5) จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบดักแด้ พบว่ายุงรูปแบบ A จำนวน 3 isolines มีค่าเฉลี่ยของแขนงเส้นขน 11.9 (8-17) แขนง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของยุงรูปแบบ A (3 isolines) อยู่ในช่วงของยุง *An. barbirostris* (6-18) แขนง

2. การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา (Molecular genetic study)

ในการทำการศึกษานี้ได้ทำการศึกษายีนของไรโบโซมและยีนของไมโทคอนเดรียในยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A, B และ C และยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E ทั้งหมดตามตำแหน่งด้วยกัน คือ ITS2, COI และ COII

ครั้งที่ 1: ได้ทำการสกัด genomic DNA (gDNAs) ของยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles barbirostris* ที่ทำการจับโดยใช้กระป๋องและคนเป็นเหยื่อล่อ จากจังหวัดเชียงใหม่, จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดอุบลราชธานี จำนวนทั้งสิ้น 12 isolines โดยแบ่งเป็น *An. barbirostris* รูปแบบ A จำนวน 4 isolines (APA13, APA14, APA18, APA33) จากจังหวัดเพชรบุรี, ยุง *An. barbirostris* รูปแบบ B จำนวน 3 (ACB1, ACB2, ACB3) และ 4 (AUB2, AUB6, AUB10, AUB11) isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดอุบลราชธานี ตามลำดับ, ยุง *An. barbirostris* รูปแบบ C จำนวน 1 isolate (APC28) จากจังหวัดเพชรบุรี, ยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B จำนวน 3 isolines (HCB9, HCB10, HCB13) และ รูปแบบ E จำนวน 4 isolines (HCE6, HCE7, HCE8, HCE16) จากจังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป คือ DNeasy[®] Tissue Kit สำหรับวิธีการสกัด genomic DNA นั้นทำตาม protocol ที่แนบมาพร้อมกับน้ำยาสำเร็จรูป จากนั้นนำมา amplify ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยรายละเอียดของ primers ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้: ITS2A, 5'-TGTGAAGTGCAGGACACAT-3' และ ITS2B, 5'-TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3' สำหรับ rDNA ITS2 (Beebe and Saul, 1995), LCO1490 (f), 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' และ HCO2198 (r), 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' สำหรับ COI (Folmer et al., 1994), และ LEU (f), 5'-TCTAATATGGCAGATTAGTGCA-3' และ LYS (r), 5'-ACTTGCTTTCAGTCATCTAATG-3' สำหรับ COII (Sharpe et al., 2000).

Determination of ribosomal DNA (rDNA) ITS2 sequences. ทำการ amplify ส่วน rDNA ITS2 จาก gDNAs ของยุงที่สกัดได้ข้างต้นโดยวิธี PCR ดังนี้ PCR reaction mixture (20 µl) ประกอบด้วย 0.5 units of *Ex Taq* (Takara), 1X *Ex Taq* buffer, 2 mM of each dNTP, 0.25 µM of each primer, และ 1 µl ของ DNA sample โดย PCR condition ที่ใช้มีดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation at 95°C, 1 minute ขั้นตอนที่ 2 Denaturation at 95°C, 30 seconds ขั้นตอนที่ 3 Primer annealing at 55°C, 30 seconds ขั้นตอนที่ 4 Primer extension at 72°C, 1 minute (ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นตอนที่ 5 Final extension at 72°C, 10 minutes นำ PCR product ที่ได้ไปทำ electrophoresis เพื่อดูขนาดของ PCR product หลังจากนั้นทำการตัด gel บริเวณที่มี band DNA ของ PCR product ที่เราต้องการ แล้วนำมาสกัดโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป คือ QIAquick[®] gel extraction kit เพื่อให้ได้ pure DNA fragment จากนั้นทำการ cloned เข้าสู่ pCR 2.1 TOPO vector (Invitrogen) แล้ว transformed เข้า *E. coli* Top10 competent cell โดยวิธี heat shock นำ cell suspension ที่ได้ไป

incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำไป spread ลงบน plate ที่มีส่วนผสมของ agar, LB broth และ antibiotic (ampicillin, XGal, IPTG) incubate ที่ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

จากนั้นนำเอา plate ที่มีโคโลนีของ *E. coli* ขึ้นโดยจะเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวขึ้นเท่านั้นมาเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่ผสมด้วย ampicillin แล้วนำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง เมื่อ broth มีสีขาวขึ้นแสดงว่ามีเชื้อ *E. coli* ขึ้นจึงนำไปสกัด plasmid DNA โดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep หลังจากนั้นจึงนำไปทำ electrophoresis เพื่อตรวจเช็คว่ามี plasmid DNA หรือไม่ ถ้าพบว่ามี plasmid DNA ก็นำ plasmid DNA นั้นไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme endonuclease) คือ EcoRI แล้วนำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปทำ electrophoresis ซ้ำอีกครั้งเพื่อดูว่ามี PCR product ที่เราต้องการอยู่หรือไม่ ถ้าพบว่ามี PCR product อยู่ก็นำ plasmid DNA ไปทำ sequencing ด้วยเครื่อง ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) โดยใช้ universal primer คือ M13 reverse (5'-AGCGAATAACAATTTTCACACA-3') และ M13 forward (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Bioedit sequence alignment version 7.0.5.3 และวิธี manual หลังจากที่ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequences) ของยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris*-like ได้ทำการออกแบบ primer เพิ่มขึ้นอีกจำนวน 10 primers โดยใช้ program Primer 3 เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์

ทำการเปรียบเทียบขนาดของ ITS2 PCR products ของยุง *An. barbirostris* (กัดสัตว์) จำนวน 12 isolines และ ยุง *An. campestris*-like (กัดคน) จำนวน 7 isolines พบว่ามีความแตกต่างของขนาดของ ITS2 PCR products แบ่งออกได้เป็น 3 ขนาด หรือ 3 กลุ่ม ดังนี้ 1. Group AB1 (animal-bitten *An. barbirostris* 1) มีขนาด 1,861 bp พบในยุง *An. barbirostris* รูปแบบ B จำนวน 3 isolines (ACB1, ACB2 และ ACB3) และ 4 isolines (AUB2, AUB6, AUB10, AUB11) จากสายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่และสายพันธุ์จังหวัดอุบลราชธานี ตามลำดับ และ 1 isoline (APC28) ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ C จากสายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี, 2. Group AB2 (animal-bitten *An. barbirostris* 2) มีขนาด 1,717 bp พบในยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A จำนวน 4 isolines (APA13, APA14, APA18, APA33) จากสายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี, 3. Group HB (human-bitten *An. campestris*-like) มีขนาด 1,651 bp พบในยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ รูปแบบ E จำนวน 3 isolines (HCB9, HCB10, HCB13) และ 4 isolines (HCE6, HCE7, HCE8, HCE16) จากสายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่

Determination of mitochondrial DNA (mtDNA) COI sequences. ทำการ amplify ส่วน COI โดยวิธี PCR โดย PCR condition ที่ใช้เช่นเดียวกันกับการ amplify ยีนในตำแหน่ง ITS2 จากนั้นนำ PCR product มา purified ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen) นำไปทำ Direct-sequencing แล้วนำข้อมูลที่ได้มาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Bioedit sequence

alignment version 7.0.5.3 และวิธี manual จากนั้นทำการออกแบบ primer เพิ่มขึ้นอีกจำนวน 4 primers เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์

จากการเปรียบเทียบขนาดของ COI PCR products ของยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris*-like พบว่ามีขนาดไม่แตกต่างกัน คือมีขนาด 658 bp โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบ DNA sequences พบว่ามีความแตกต่างของ DNA sequences

Determination of mitochondrial DNA (mtDNA) COII sequences. ทำการ amplify ส่วน COII โดยวิธี PCR โดย PCR condition ที่ใช้เช่นเดียวกันกับการ amplify ยีนในตำแหน่ง ITS2 จากนั้นนำ PCR product มา purified ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen) นำไปทำ Direct-sequencing แล้วนำข้อมูลที่ได้มาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Bioedit sequence alignment version 7.0.5.3 และวิธี manual จากนั้นทำการออกแบบ primer เพิ่มขึ้นอีกจำนวน 4 primers เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์

จากการเปรียบเทียบขนาดของ COII PCR products ของยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris*-like พบว่ามีขนาดไม่แตกต่างกัน คือมีขนาด 685 bp โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบ DNA sequences พบว่ามีความแตกต่างของ DNA sequences

จากผลการศึกษาในยีนทั้งสามตำแหน่งคือ ITS2, COI และ COII เมื่อได้ทำการเปรียบเทียบ DNA sequences พบว่า ยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris*-like มีความแตกต่างของ DNA sequences แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic relationships) ของยุงในกลุ่มนี้ ได้ทำการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี neighbor-joining approach (Saitou and Nei, 1987) พร้อมทั้งตรวจสอบทางสถิติ ด้วยวิธี bootstrap test และคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ของยุงในกลุ่มนี้ ด้วยวิธี Kimura- two parameter (Kimura, 1980)

ผลจากการสร้าง Phylogenetic trees ของยีนทั้งสามตำแหน่ง คือ ITS2, COI และ COII ได้แสดงไว้ใน Fig. 2-4 พบว่าทั้ง 3 trees ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (AB1, AB2 และ HB) ด้วย high bootstrap value (98-100%) และเป็นที่น่าสนใจว่า group AB2 (animal-bitten *An. barbirostris* พบในยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A จำนวน 4 isolines จากสายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี) นั้น แยกออกจาก *An. barbirostris* รูปแบบ B และ รูปแบบ C สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่, สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี และสายพันธุ์จังหวัดอุบลราชธานี และการคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม และระหว่างกลุ่มนั้นได้แสดงไว้ใน Table 2

จาก Phylogenetic tree ของยีนในตำแหน่ง ITS2 นั้น ทั้งสามกลุ่ม ได้แยกออกจากกัน โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (AB1, AB2 และ HB) ตั้งแต่ 0.203 ถึง 0.268 แต่ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มนั้นมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (0.000-0.001) จาก tree จะเห็นว่า group AB1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (Closely related) กับ group HB มากกว่า group AB2

จาก Phylogenetic tree ของยีนในตำแหน่ง COI นั้น ทั้งสามกลุ่ม ได้แยกออกจากกัน โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (AB1, AB2 และ HB) ตั้งแต่ 0.026 ถึง 0.037 ส่วนค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มนั้นมีค่าตั้งแต่ 0.002 ถึง 0.007 จาก tree จะเห็นว่า group AB2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (Closely related) กับ group HB มากกว่า group AB1

จาก Phylogenetic tree ของยีนในตำแหน่ง COII นั้น ทั้งสามกลุ่ม ได้แยกออกจากกัน โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (AB1, AB2 และ HB) ตั้งแต่ 0.030 ถึง 0.044 ส่วนระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มนั้นมีค่าตั้งแต่ 0.001 ถึง 0.013 จาก tree จะเห็นว่า group AB2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (Closely related) กับ group HB มากกว่า group AB1

สรุปผลการศึกษาในยีนทั้งสามตำแหน่งคือ ITS2, COI และ COII จากการเปรียบเทียบ DNA sequences (Genbank accession numbers AB331551-AB331607; Table 3) และการสร้าง phylogenetic trees อาจกล่าวได้ว่า *An. campestris*-like (กัศคน) รูปแบบ B และ รูปแบบ E สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ เป็น conspecific cytological races เนื่องจากมี low intraspecific variation (genetic distance < 0.005) และน่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ที่แตกต่างจากยุง *An. barbirostris* (กัศสัตว์) รูปแบบ A, B และ C สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่, สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี และสายพันธุ์จังหวัดอุบลราชธานี

ครั้งที่ 2: ทำการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาเพิ่มเติมโดยการศึกษาเปรียบเทียบ DNA sequences ในส่วน rDNA (ITS2) และ mtDNA (COI, COII) ในยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A ที่ทำการจับโดยใช้กระป๋องเป็นเหยื่อล่อ จากจังหวัดเชียงใหม่, จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดกาญจนบุรีในประเทศไทย โดยรายละเอียดของขั้นตอนและวิธีการศึกษาเหมือนกับการศึกษาครั้งที่ 1

ได้ทำการสกัด genomic DNA (gDNAs) ของยุงก้นปล่องชนิด *An. barbirostris* ที่ทำการจับโดยใช้กระป๋องเป็นเหยื่อล่อ จากจังหวัดเชียงใหม่ (ACA4, ACA6, ACA8), จังหวัดเพชรบุรี (APA13, APA18, APA33) และจังหวัดกาญจนบุรี (AKA2, AKA3, AKA5) จำนวนทั้งสิ้น 9 isolines

Analysis of ITS2 sequences. ทำการเปรียบเทียบขนาดของ ITS2 PCR products ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A (กัศสัตว์) จำนวน 9 isolines จากทั้งสามสายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างในขนาดของ ITS2 PCR products แบ่งออกได้เป็น 3 ขนาด หรือ 3 กลุ่มอย่างชัดเจน (เรียงลำดับขนาดของ PCR products จากขนาดยาวไปสั้น) ดังนี้ 1. กลุ่ม A1 มีขนาด 1,861 bp พบจำนวน 3 isolines (ACA4, ACA6 และ ACA8) จากจังหวัดเชียงใหม่; 2. กลุ่ม A2 มีขนาด 1,717 bp พบจำนวน 3 isolines (APA13, APA18 และ APA33) จากจังหวัดเพชรบุรี และ 3. กลุ่ม A3 มีขนาด 1,070 bp พบจำนวน 3 isolines (AKA2, AKA3 และ AKA5) จากจังหวัดกาญจนบุรี (Fig. 5) และค่าเฉลี่ยร้อยละของส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ (The average percentages of base composition) ของยีนในส่วน ITS2 ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A ทั้ง 9 isolines มีค่าเฉลี่ยดังนี้ A, 18.4% (17.3- 19.7%); T, 27.2% (26.1-27.5%); G, 31.3% (30.9-31.8%) and C, 23.2% (22.4-24.3%)

Analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) COI sequences. จากการเปรียบเทียบขนาดของ COI PCR products ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A จากจังหวัดเชียงใหม่, จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดกาญจนบุรี พบว่ามีขนาดไม่แตกต่างกัน คือมีขนาด 658 bp (Fig. 6) โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบ DNA sequences พบว่ามีความแตกต่างของ DNA sequences

Analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) COII sequences. จากการเปรียบเทียบขนาดของ COII PCR products ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A จากจังหวัดเชียงใหม่, จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดกาญจนบุรี พบว่ามีขนาดไม่แตกต่างกัน คือมีขนาด 685 bp (Fig. 6) โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบ DNA sequences พบว่ามีความแตกต่างของ DNA sequences

จากผลการศึกษาในยีนทั้งสามตำแหน่งคือ ITS2, COI และ COII เมื่อได้ทำการเปรียบเทียบ DNA sequences ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A จากจังหวัดเชียงใหม่, จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดกาญจนบุรี พบว่ามีความแตกต่างของ DNA sequences แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic relationships) ของยุงในกลุ่มนี้ โดยการสร้าง phylogenetic trees จากข้อมูลอนุพันธุศาสตร์ประกอบด้วยขั้นตอนคร่าวๆ ดังต่อไปนี้ 1. ทำการคัดเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการศึกษาทดลอง 2. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์โดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม และ 4. นำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree ที่เหมาะสมกับข้อมูลและวัตถุประสงค์ของการทดลอง แปลผลการทดลองจาก phylogenetic tree ที่ได้ สำหรับในการศึกษานี้ได้ทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธีระยะห่างทางพันธุกรรมหรือเรียกว่าวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) พร้อมทั้งตรวจสอบทางสถิติ ด้วยวิธี bootstrap test และคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ของยุงในกลุ่มนี้ ด้วยวิธี Kimura- two parameter (Kimura, 1980)

ผลจากการสร้าง Phylogenetic trees ของยีนทั้งสามตำแหน่ง คือ ITS2, COI และ COII ได้แสดงไว้ใน Fig. 7-9 พบว่าทั้ง 3 trees ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A1 (ACA4, ACA6, ACA8), กลุ่ม A2 (APA13, APA18, APA33) และ กลุ่ม A3 (AKA2, AKA3, AKA5) โดยในแต่ละกลุ่มมีลักษณะเป็นกลุ่มวงศ์วานเดี่ยว (monophyletic group หรือ clade) ด้วย high bootstrap value (100%) ซึ่งก็คือ กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะบางอย่างร่วมกันเฉพาะในสปีชีส์ที่อยู่ใน clade นั้น โดยลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะที่สืบทอดร่วมกันมาจากบรรพบุรุษร่วมของสมาชิกภายในกลุ่ม และการคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม และระหว่างกลุ่มนั้นได้แสดงไว้ใน Table 4

จาก Phylogenetic tree ของยีนในตำแหน่ง ITS2 นั้น ทั้งสามกลุ่ม ได้แยกออกจากกัน โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (A1, A2 และ A3) ตั้งแต่ 0.240 ถึง 0.627 แต่ไม่มีความแตกต่างของระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม (0.000) จาก tree จะเห็นว่า group A1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (Closely related) กับ group A2 มากกว่า group A3

จาก Phylogenetic tree ของยีนในตำแหน่ง COI นั้น ทั้งสามกลุ่ม ได้แยกออกจากกัน โดยมี ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (A1, A2 และ A3) ตั้งแต่ 0.036 ถึง 0.056 ส่วนค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มนั้นมีค่าตั้งแต่ 0.001 ถึง 0.007 จาก tree จะเห็นว่า group A1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (Closely related) กับ group A3 มากกว่า group A2

จาก Phylogenetic tree ของยีนในตำแหน่ง COII นั้น ทั้งสามกลุ่ม ได้แยกออกจากกัน โดยมี ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (A1, A2 และ A3) ตั้งแต่ 0.042 ถึง 0.051 ส่วนระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มนั้นมีค่าตั้งแต่ 0.001 ถึง 0.005 จาก tree จะเห็นว่า group A2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (Closely related) กับ group A3 มากกว่า group A1

สรุปผลการศึกษาในยีนทั้งสามตำแหน่งคือ ITS2, COI และ COII ผลจากการเปรียบเทียบ DNA sequences (Genbank accession numbers AB331551-AB331607; Table 3) และการสร้าง phylogenetic tree พบว่า มี large sequence divergence ของยีนในส่วน ITS2 (0.240-0.627), COI (0.036-0.056) และ COII (0.042-0.051) ในยุงทั้งสามสายพันธุ์ของ *An. barbirostris* รูปแบบ A และจากขนาดของ PCR product ดังแสดงใน Fig. 5 (ขนาดยาวไปสั้น) ที่ได้จากการ amplified ยีนในส่วน ITS2 จากยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A จากจังหวัดเชียงใหม่ (1,861 bp), จังหวัดเพชรบุรี (1,717 bp) และจังหวัดกาญจนบุรี (1,070 bp) อาจกล่าวได้ว่าใน taxon ของยุง *An. barbirostris* ประกอบด้วยอย่างน้อย 3 sibling species คือ species A1, A2 และ A3 ตามลำดับ

3. การทำ crossing experiments

ได้นำ F_1 -progenies ของยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B (isoline code: HCB9, สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่) และรูปแบบ E (isoline code: HCE7, สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่) ยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A (isoline code: APA33, สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี), B (isoline code: ACB3, สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่; isoline code: AUB10, สายพันธุ์จังหวัดอุบลราชธานี) และ C (isoline code: APC28, สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี) มาทำการเลี้ยงแบบ isoline เพื่อใช้ในการทำ crossing experiments รายละเอียดดังแสดงไว้ใน Table 5

ผล fertile hybrids ที่ได้จากการทำ reciprocal และ back crosses ระหว่างยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E แสดงให้เห็นว่ายุง *An. campestris*-like ทั้งสองรูปแบบไม่มี post-mating reproductive isolation

ผล low hatchability และ/หรือ low viability ของตัวอ่อนระยะที่ 1 ที่ฟักออกจากไข่ ที่ได้จากการทำ reciprocal crosses ระหว่างยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B กับ *An. barbirostris* รูปแบบ A, B และ C แสดงให้เห็นว่ายุง *An. campestris*-like รูปแบบ B มี post-mating reproductive isolation กับยุง *An. barbirostris* ทั้งสามรูปแบบ

ได้นำ F_1 -progenies ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ (ACA6) สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี (APA13) และสายพันธุ์จังหวัดกาญจนบุรี (AKA5) มาทำการเลี้ยงแบบ isoline เพื่อใช้ในการทำ crossing experiments รายละเอียดดังแสดงไว้ใน Table 6

ผล low embryonation, low hatchability และ low viability ของ F_1 -progenies โดยให้ตัวอ่อนมี asynapsis salivary glands polytene chromosomes ตัวเต็มวัยที่มีรังไข่และอวัยวะที่ฝ่อ และ sex distortion รายละเอียดดังแสดงไว้ใน Table 6 และ Fig.10) แสดงให้เห็นว่า *An. barbirostris* รูปแบบ A ประกอบด้วย sibling species 3 species member ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษายีนทั้งสามตำแหน่ง คือ ITS2, COI และ COII

4. การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของยุง *An. campestris*-like รูปแบบ E และ *An. barbirostris* รูปแบบ A และ B ในการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax*

ได้นำ isolines ของยุง *An. campestris*-like รูปแบบ E (isoline code: HCE6, HCE7, HCE8, HCE16; สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่) และยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A (isoline code: APA13, APA14, APA18, APA33; สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี) และ B (isoline code: APB4, APB20, APB24, APB27; สายพันธุ์จังหวัดเพชรบุรี) มาสร้าง mixed colony ของแต่ละรูปแบบ เพื่อใช้ศึกษาความสามารถในการยอมรับเชื้อ *P. vivax* โดยเปรียบเทียบกับยุงพาหะหลัก *An. cracens* (= *dirus* B) ที่ได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นยุง control ที่ยอมรับเชื้อได้ดีในท้องทดลอง (Junkum et al., 2005) จากการวิเคราะห์ผลของ oocyst rates และ sporozoite rates ในวันที่ 8 และ 11 หลังจากยุงกินเลือดที่มีระยะ gametocyte ของเชื้อ *P. vivax* (gametocyte density = 32 per 1 μ L) โดยใช้วิธี artificial membrane feeding technique (Chomcham et al., 1980) พบว่ายุง *An. campestris*-like รูปแบบ E มีการยอมรับเชื้อ *P. vivax* ได้ดี โดยมี sporozoite rate เท่ากับ 64.29% (9/14) ในขณะที่ยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A และ B มีการยอมรับเชื้อ *P. vivax* ได้ต่ำ โดยมี sporozoite rate กับ 10% (2/20) และ 11.76% (2/17) ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงไว้ใน Table 7-8 และ Fig. 11-12

5. ปัญหา/อุปสรรคในการดำเนินงาน

ไม่พบ

6. งานที่คาดว่าจะดำเนินต่อไปในอีก 6 เดือนข้างหน้า

6.1 การวินิจฉัยรูปแบบคาริโอไทป์

ขณะนี้ได้จับยุง *An. barbirostris* ที่กักกระป๋องจากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา จำนวน 3 isolines และยุง *An. barbirostris* ที่กักคนจากจังหวัดสระแก้ว จำนวน 9 isolines ยุงทั้ง 12 isolines กำลังอยู่ในระหว่างการวินิจฉัยชนิดและรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ และจะจับยุง *An. barbirostris* ที่กักคนและกระป๋องสายพันธุ์จากจังหวัดอื่น ๆ เพิ่มเติม

6.2 การศึกษาด้านอนุชีววิทยา

จะทำการศึกษายีนไรโบโซมและยีนไมโทคอนเดรียในยุง *An. barbirostris* ที่กัดคนและกระบือที่ได้วินิจฉัยรูปแบบการไอโทปไปแล้วจากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา, จังหวัดสระแก้ว และจังหวัดอื่น ๆ

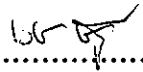
6.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการยอมรับเชื้อมาลาเรีย

Mixed colony ของยุง *An. barbirostris* รูปแบบ A และ B ทุกสายพันธุ์, ยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E สายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ และยุง *An. barbirostris/campestris* ที่กัดคนและสัตว์ในข้อ 6.1 จะนำมาศึกษาความสามารถในการยอมรับเชื้อ *P. vivax* และ/หรือ *P. falciparum* เพื่อวิเคราะห์ oocyst และ sporozoite rates

7. เอกสารอ้างอิง

- 7.1 Baimai V, Rattanarithikul R, Kijchalao U. Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: IV. The barbirostris and umbrosus species groups, subgenus *Anopheles* (Diptera: Culicidae). J Am Mosq Control Assoc 1995; 11: 323-8.
- 7.2 Beebe NW, Saul A. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis. Am J Trop Med Hyg 1995; 53:478-81.
- 7.3 Chomcharn Y, Surathin K, Bunnag D, Sucharit S, Harinasuta T. Effects of a single dose of primaquine on a Thai strain of *Plasmodium falciparum*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1980; 11: 408-9.
- 7.4 Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 3:294-299.
- 7.5 Harrison BA, Scanlon JE. Medical entomology studies. II. The subgenus *Anopheles* in Thailand (Diptera: Culicidae). Contrib Am Entomol Inst 1975; 12: 78.
- 7.6 Junkum A, Jitpakdi A, Jariyapan N, Komalamisra N, Somboon P, Suwonkerd W, et al. Susceptibility of two karyotypic forms of *Anopheles aconitus* (Diptera: Culicidae) to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. Rev Inst Med Trop S Paulo 2005; 47: 333-8.
- 7.7 Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 1980; 16: 111-20.

- 7.8 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-25.
- 7.9 Sharpe RG, Harbach RE, Butlin RK. Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol* 2000; 25: 263-72.

ลงนาม 

รศ. เวช ชูโชติ

(หัวหน้าโครงการ)

วันที่ 19 กรกฎาคม 2550

Table 1 Branch summation of seta 2-VI of *An. barbirostris* Form A, B and C collected from animal baits, and *An. campestris*-like Form B and E collected from human baits

Karyotypic forms (province)	Code of strains	No. isolines ^a								Mean (range)
		1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>An. barbirostris</i> (animal baits)										
Form A (Chiang Mai)	ACA	11.50	14.00	10.80	-	-	-	-	-	12.10 (13-16)
Form A (Phetchaburi)	APA	14.00	11.40	13.00	14.00	10.60	-	-	-	12.60 (8-17)
Form A (Ubon Ratchathani)	AUA	12.40	-	-	-	-	-	-	-	12.40 (10-15)
Form A (Kanchanaburi)	AKA	10.80	13.60	11.40	-	-	-	-	-	11.90 (8-17)
Form B (Chiang Mai)	ACB	11.80	11.20	9.40	12.50	-	-	-	-	11.20 (10-16)
Form B (Phetchaburi)	APB	11.80	12.00	13.60	12.40	12.00	13.60	12.80	-	12.60 (10-16)
Form B (Ubon Ratchathani)	AUB	12.50	9.60	13.60	12.40	11.80	13.40	14.00	15.00	12.80 (8-17)
Form C (Phetchaburi)	APC	13.00	-	-	-	-	-	-	-	13.00 (10-19)
Form C (Ubon Ratchathani)	AUC	12.60	12.20	-	-	-	-	-	-	12.40 (10-15)
<i>An. campestris</i> -like (human baits)										
Form B (Chiang Mai)	HCB	25.40	21.40	21.00	28.60	26.00	-	-	-	24.50 (19-32)
Form E (Chiang Mai)	HCE	23.60	20.60 _g	20.80	27.40	23.60	19.60	21.20	-	22.40 (18-30)

^a Average from 5 progeny specimens of each isolate.

Table 2 Average genetic distances within and between 3 groups, AB1, AB2, and HB for the ITS2, COI, and COII regions

	ITS2	COI	COII
Within group			
AB1	0.000	0.007	0.013
AB2	0.000	0.003	0.002
HB	0.001	0.002	0.001
Between groups			
AB1-AB2	0.236	0.037	0.044
AB1-HB	0.203	0.032	0.038
AB2-HB	0.268	0.026	0.030

Table 3 Karyotypic forms of *An. barbirostris* Forms A, B and C, and *An. campestris*-like Forms B and E, and their GenBank accession numbers

Karyotypic forms	Group	Isoline No.	Length of ITS2 (bp)	Region	Genbank accession number			Reference
					ITS2	COI	COII	
<i>An. barbirostris</i> Form A	AB2	APA13	1,717	ITS2, COI, COII	AB331551	AB331570	AB331589	This study
		APA14	1,717	ITS2, COI, COII	AB331552	AB331571	AB331590	This study
		APA18	1,717	ITS2, COI, COII	AB331553	AB331572	AB331591	This study
		APA33	1,717	ITS2, COI, COII	AB331554	AB331573	AB331592	This study
		ACA4	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		ACA6	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		ACA8	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		AKA2	1,070	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		AKA3	1,070	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		AKA5	1,070	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		ACB1	1,861	ITS2, COI, COII	AB331555	AB331574	AB331593	This study
		ACB2	1,861	ITS2, COI, COII	AB331556	AB331575	AB331594	This study
		ACB3	1,861	ITS2, COI, COII	AB331557	AB331576	AB331595	This study
Form B								
<i>An. campestris</i> -like Form B	AB1	AUB2	1,861	ITS2, COI, COII	AB331558	AB331577	AB331596	This study
		AUB6	1,861	ITS2, COI, COII	AB331559	AB331578	AB331597	This study
		AUB10	1,861	ITS2, COI, COII	AB331560	AB331579	AB331598	This study
		AUB11	1,861	ITS2, COI, COII	AB331561	AB331580	AB331599	This study
		APC28	1,861	ITS2, COI, COII	AB331562	AB331581	AB331600	This study
		HCB9	1,651	ITS2, COI, COII	AB331563	AB331582	AB331601	This study
		HCB10	1,651	ITS2, COI, COII	AB331564	AB331583	AB331602	This study
		HCB13	1,651	ITS2, COI, COII	AB331565	AB331584	AB331603	This study
		HCE6	1,651	ITS2, COI, COII	AB331566	AB331585	AB331604	This study
		HCE7	1,651	ITS2, COI, COII	AB331567	AB331586	AB331605	This study
		HCE8	1,651	ITS2, COI, COII	AB331568	AB331587	AB331606	This study
		HCE16	1,651	ITS2, COI, COII	AB331569	AB331588	AB331607	This study
				COI	AF116836			Oshaghi et al.
				COI	AY729982			Pradeep et al.

* Karyotypic forms were not determined.

Table 4 Average genetic distances within and between groups A1, A2 and A3, for the ITS2, COI, and COII regions

	ITS2	COI	COII
Within group			
A1	0.000	0.001	0.001
A2	0.000	0.001	0.001
A3	0.000	0.007	0.005
Between groups			
A1-A2	0.240	0.038	0.051
A1-A3	0.610	0.036	0.048
A2-A3	0.627	0.056	0.042

Table 5 Cross-mating among isolines of *An. campestris*-like Form B and E and *An. barbirostris* Form A, B and C

Crosses (Female x Male)	Total egg (number) ^a	Embryonation rate ^b	Number hatched (%)	Number pupations (%)	Number emergence (%)	Number from total emergence (%)	
						Female mosquito	Male mosquito
Parental crosses							
APA x APA	398 (166, 232)	82	346 (86.9)	325 (93.9)	283 (87.1)	119 (42.0)	164 (58.0)
ACB x ACB	411 (196, 215)	78	341 (83.0)	280 (82.1)	261 (93.2)	105 (40.2)	156 (59.8)
AUB x AUB	395 (128, 267)	84	308 (78.0)	289 (93.8)	243 (84.1)	117 (48.1)	126 (51.9)
APC x APC	383 (173, 210)	79	287 (74.9)	281 (97.9)	251 (89.3)	108 (43.0)	143 (57.0)
HCB x HCB	486 (227, 259)	91	452 (93.0)	397 (87.8)	349 (87.9)	147 (42.1)	202 (57.9)
HCE x HCE	455 (212, 243)	85	391 (85.9)	356 (91.0)	306 (86.0)	144 (47.1)	162 (52.9)
Reciprocal crosses							
HCB x HCE	462 (142, 320)	88	364 (78.8)	323 (88.7)	294 (91.0)	132 (44.9)	162 (55.1)
HCE x HCB	415 (198, 217)	76	336 (81.0)	292 (86.9)	251 (86.0)	103 (41.0)	148 (59.0)
HCB x APA	379 (121, 258)	80	-	-	-	-	-
APA x HCB	487 (156, 331)	91	15 (3.1)	-	-	-	-
HCB x ACB	422 (208, 214)	10	-	-	-	-	-
ACB x HCB	469 (182, 287)	64	3 (0.6)	-	-	-	-
HCB x AUB	371 (179, 192)	75	19 (5.1)	-	-	-	-
AUB x HCB	433 (211, 222)	87	-	-	-	-	-
HCB x APC	384 (153, 231)	85	-	-	-	-	-
APC x HCB	359 (134, 225)	74	-	-	-	-	-
Back crosses							
(HCB x HCE)F ₁ x HCE	404 (111, 293)	87	358 (88.6)	302 (84.4)	272 (90.1)	119 (43.8)	153 (56.2)
HCE x (HCB x HCE)F ₁	426 (149, 277)	91	417 (97.9)	371 (89.0)	349 (94.1)	150 (43.0)	199 (57.0)
(HCE x HCB)F ₁ x HCB	399 (164, 235)	89	319 (79.9)	283 (88.7)	238 (84.1)	110 (46.2)	128 (53.8)
HCB x (HCE x HCB)F ₁	442 (186, 256)	83	335 (75.8)	314 (93.7)	273 (86.9)	121 (44.3)	152 (55.7)

^a Two selected egg-batches of inseminated females from each cross^b Dissection from 100 eggs.

Table 6 Cross-mating among three isolines of *An. barbirostris* Form A

Crosses (Female x Male)	Total egg (number) ^a	Embryonation rate ^b	Number hatched (%)	Number pupations (%)	Number emergence (%)	Number from total emergence (%)	
						Female mosquito	Male mosquito
ACA x ACA	374 (159, 215)	78	276 (73.80)	207 (75.00)	203 (98.07)	95 (46.80)	108 (53.20)
AKA x AKA	413 (176, 237)	75	335 (81.11)	322 (96.12)	306 (95.03)	144 (47.06)	162 (52.94)
APA x APA	477 (172, 305)	84	385 (80.71)	326 (84.68)	267 (81.90)	112 (41.95)	155 (58.05)
ACA x AKA	364 (152, 212)	32	26 (7.14)	-	-	-	-
AKA x ACA	377 (182, 195)	10	-	-	-	-	-
ACA x APA	400 (141, 259)	76	312 (78.00)	190 (60.90)	85 (44.74)	54 (63.53)	31 (36.47)
APA x ACA	523 (251, 272)	71	214 (40.92)	118 (55.14)	72 (61.02)	64 (88.89)	8 (11.11)
AKA x APA	411 (117, 294)	49	2 (0.49)	-	-	-	-
APA x AKA	299 (98, 201)	91	209 (69.90)	1 (0.48)	-	-	-

^a Two selected egg-batches of inseminated females from each cross

^b Dissection from 100 eggs.

Table 7 The oocyst rates of *An. cracens*, *An. campestris*-like Form E and *An. barbirostris* Form A and B after feeding on blood containing gametocytes of *P. vivax*, all dissected 8 days after feeding

Experiments	Mosquito species and Forms			
	<i>An. cracens</i>	<i>An. campestris</i> -like Form E	<i>An. barbirostris</i> Forms	
			A	B
Oocyst rate (No.)	100% (5/5)	100% (5/5)	60% (3/5)	40% (2/5)
Average No. oocysts per Infected midgut (range)	108.60±38.22 (53-136)	131.00±42.95 (91-194)	25.00±36.43 (2-67)	7.5±2.12 (6-9)

Table 8 The oocyst and sporozoite rates of *An. cracens*, *An. campestris*-like Form E and *An. barbirostris* Form A and B after feeding on blood containing gametocytes of *P. vivax*, all dissected 12 days after feeding

Experiments	Mosquito species and Forms			
	<i>An. cracens</i>	<i>An. campestris</i> -like Form E	<i>An. barbirostris</i> Forms	
			A	B
Oocyst rate (No.)	90% (18/20)	100% (14/14)	75% (15/20)	52.94% (9/17)
Average No. oocysts per Infected midgut (range)	192.61±71.73 (67-310)	125.43±44.61 (42-231)	23.60±35.01 (1-126)	11.33±11.86 (1-33)
Sporozoite rate (No.)	90% (18/20)	64.29% (9/14)	10% (2/20)	11.76% (2/17)

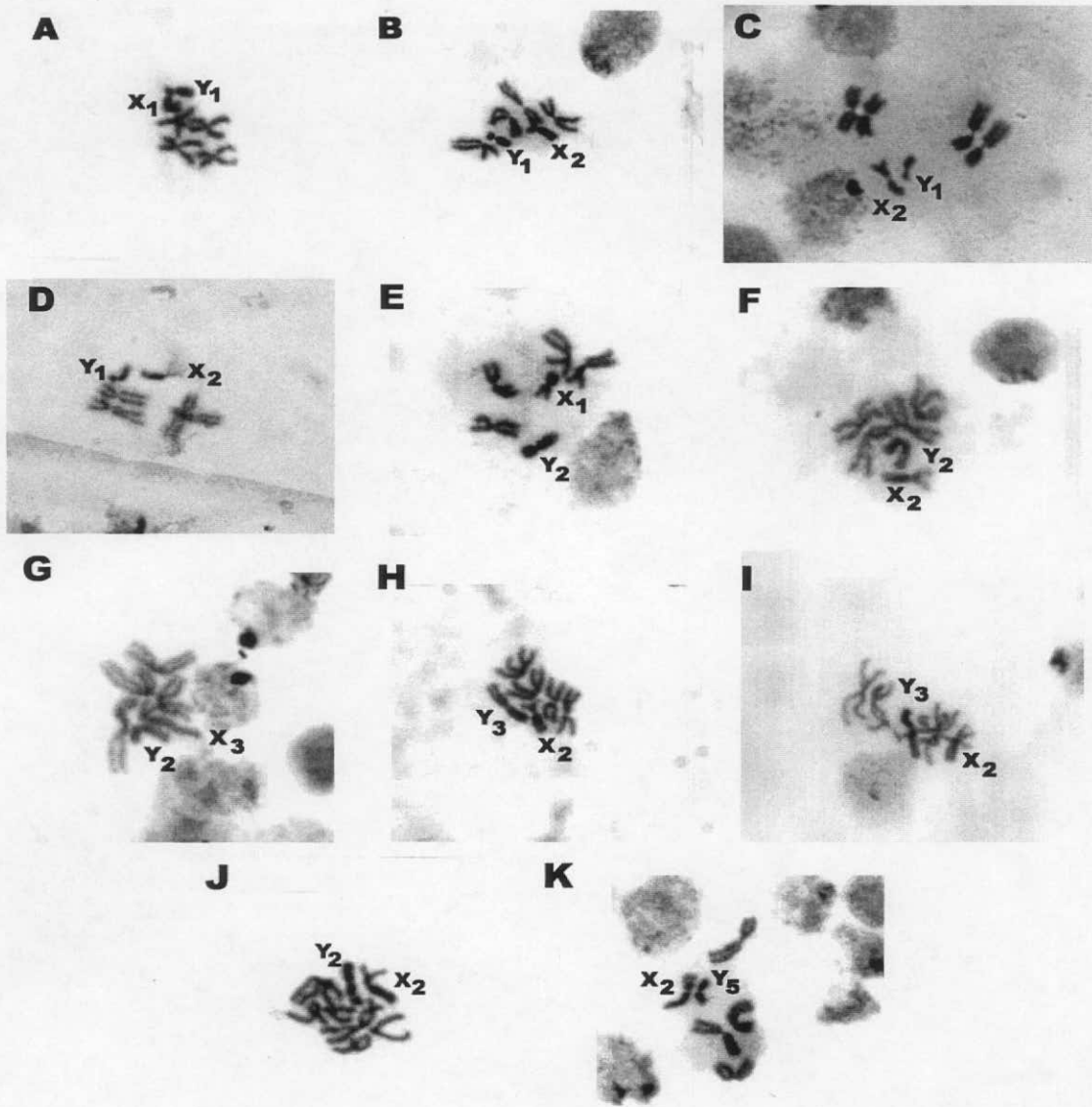


Fig. 1 Metaphase karyotypes of *An. barbirostris* Form A, B and C (Giemsa staining). A: Form A (X_1Y_1 , Chiang Mai strain); B: Form A (X_2Y_1 , Phetchaburi strain); C: Form A (X_2Y_1 , Kanchanaburi strain); D: Form A (X_2Y_1 , Ubon Ratchathani strain); E: Form B (X_1Y_2 , Chiang Mai strain); F: Form B (X_2Y_2 , Phetchaburi strain); G: Form B (X_3Y_2 , Ubon Ratchathani strain); H: Form C (X_2Y_3 , Phetchaburi strain); I: Form C (X_2Y_3 , Ubon Ratchathani strain). Metaphase karyotypes of *An. campestris*-like Form B and E (Giemsa staining). J: Form B (X_2, Y_2 , Chiang Mai strain); K: Form E (X_2, Y_5 , Chiang Mai strain).

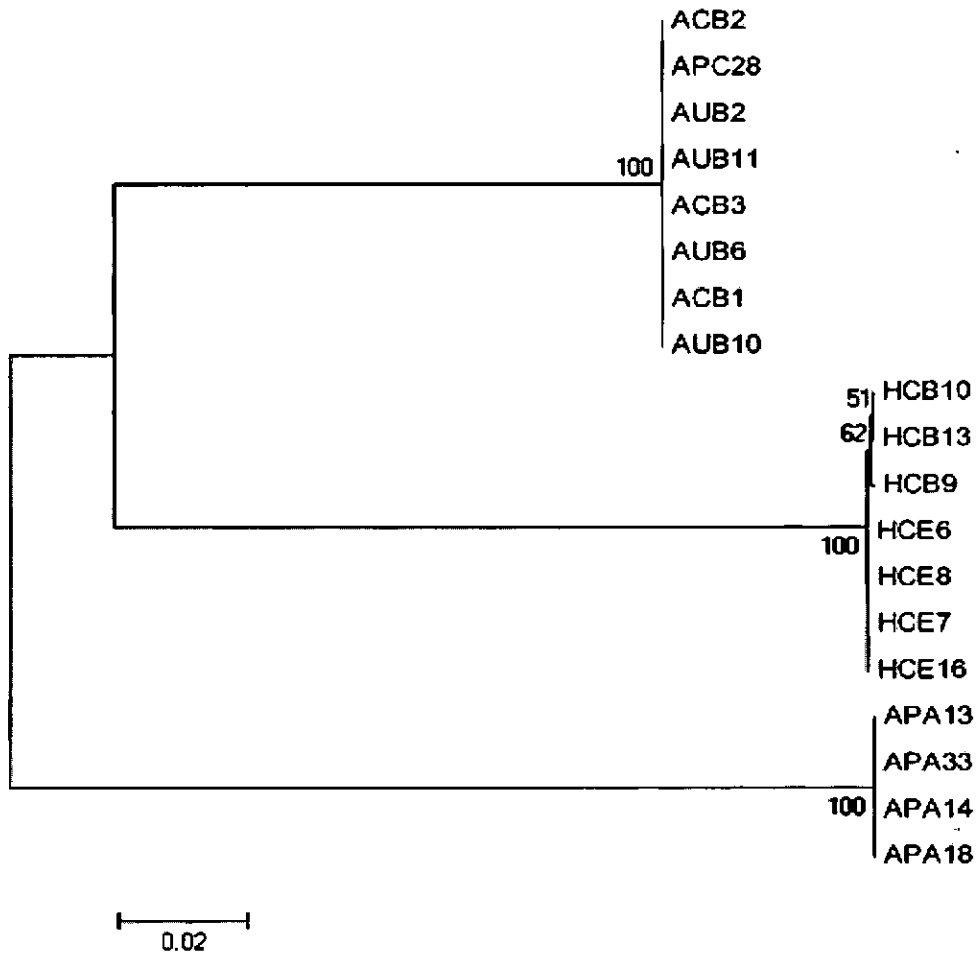


Fig. 2 Phylogeny the *An. barbirostris* Form A, B and C, and *An. campestris*-like Form B and E based on ITS2. The tree shown was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. The probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).

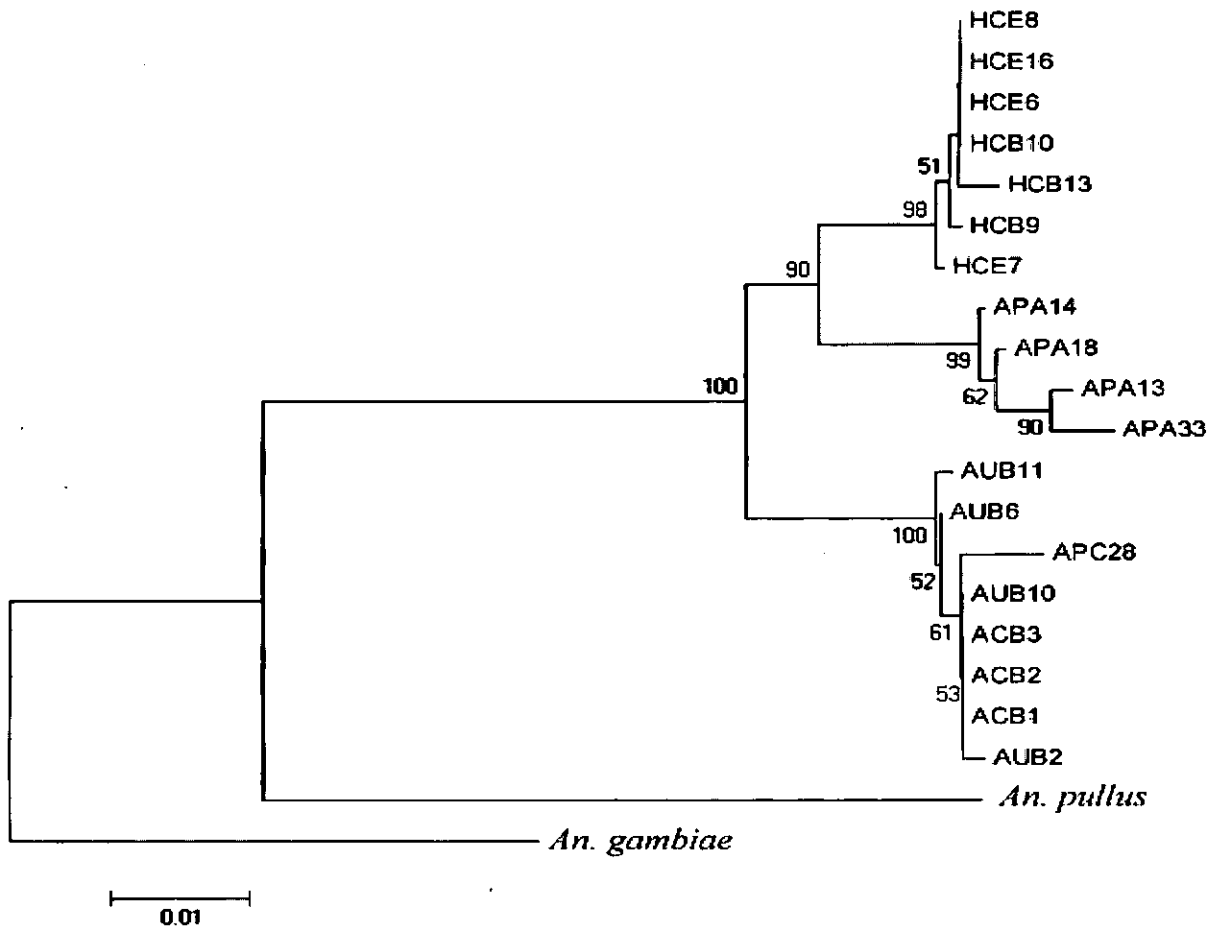


Fig. 3 Phylogeny the *An. barbirostris* Form A, B and C, and *An. campestris*-like Form B and E based on COI. The tree shown was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. The probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).

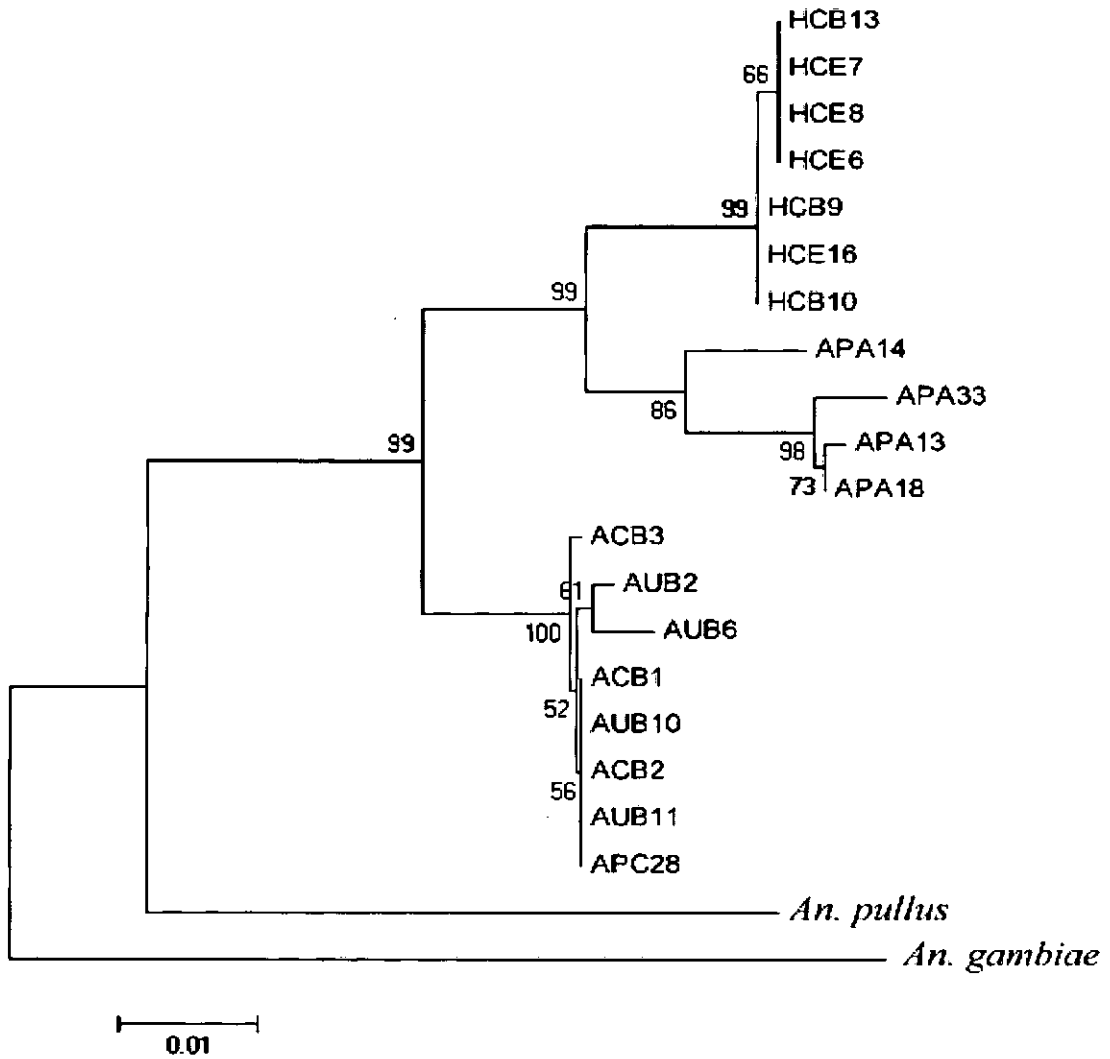


Fig. 4 Phylogeny the *An. barbirostris* Form A, B and C, and *An. campestris*-like Form B and E based on COII. The tree shown was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. The probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).

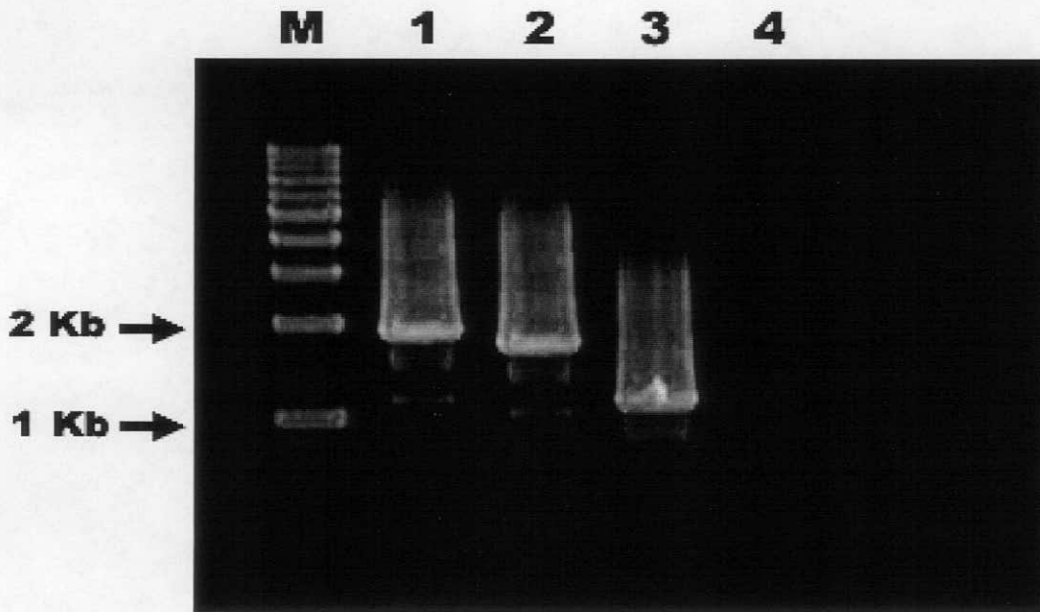


Fig. 5 Amplification of the entire internal transcribed spacer 2 (ITS2) for three allopatric strains of *An. barbirostris* Form A on a 1% agarose gel. Lane 1, Form A (Chiang Mai strain); lane 2, Form A (Phetchaburi strain); lane 3, Form A (Kanchanaburi strain); lane 4, negative control. DNA molecular weight markers (Kb) were loaded in lane M.

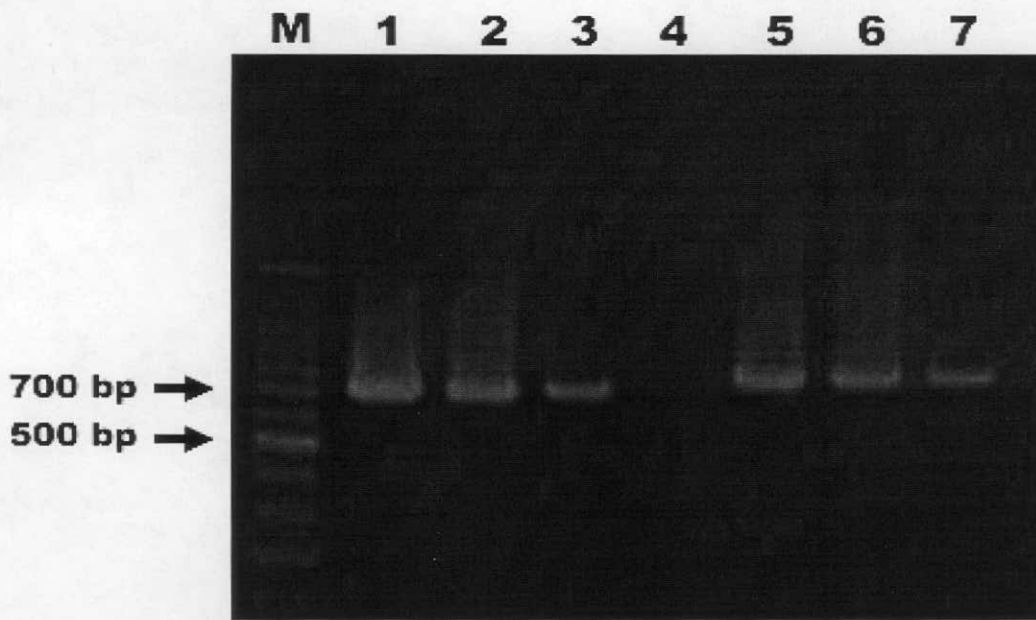


Fig. 6 Amplification of the COI and COII PCR products for three allopatric strains of *An. barbirostris* Form A on a 1% agarose gel. COI (lane 1-3): lane 1, Form A (Chiang Mai strain); lane 2, Form A (Phetchaburi strain); lane 3, Form A (Kanchanaburi strain); lane 4, negative control. COII (lane 5-7): lane 5, Form A (Chiang Mai strain); lane 6, Form A (Phetchaburi strain); lane 7, Form A (Kanchanaburi strain); DNA molecular weight markers (bp) were loaded in lane M.

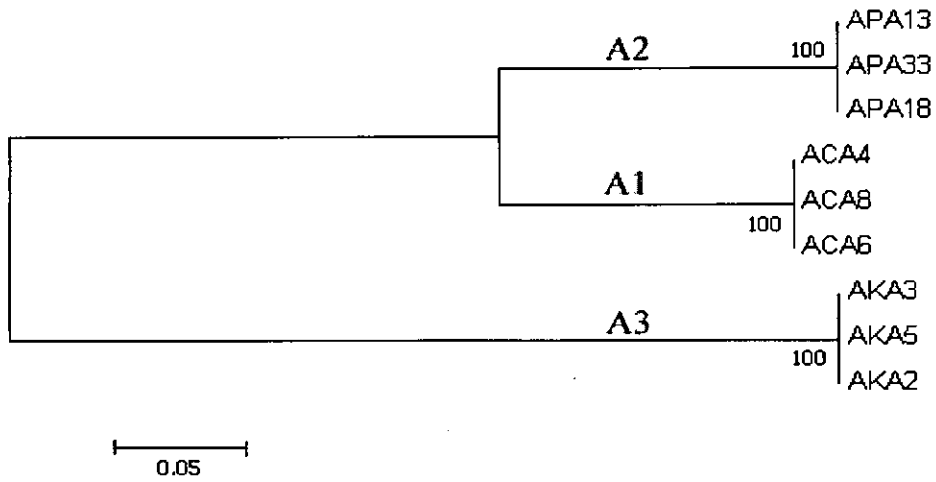


Fig. 7 Phylogeny of the three allopatric strains of *An. barbirostris* Forms A (Chiang Mai: ACA4, ACA6, ACA8; Kanchanaburi: AKA2, AKA3, AKA5; Phetchaburi: APA13, APA18, APA33) based on ITS2. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).

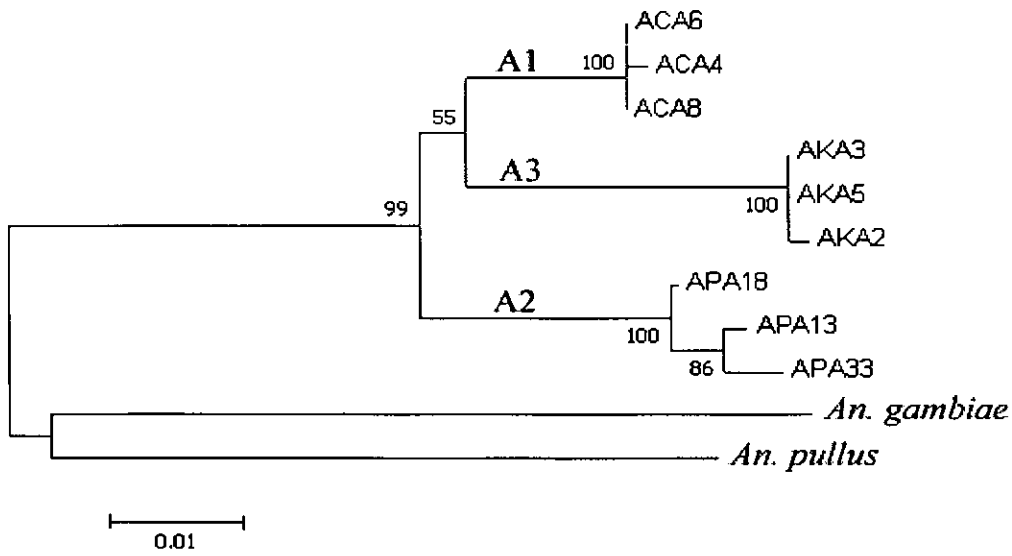


Fig. 8 Phylogeny of the three allopatric strains of *An. barbirostris* Forms A (Chiang Mai: ACA4, ACA6, ACA8; Kanchanaburi: AKA2, AKA3, AKA5; Phetchaburi: APA13, APA18, APA33) based on COI. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).

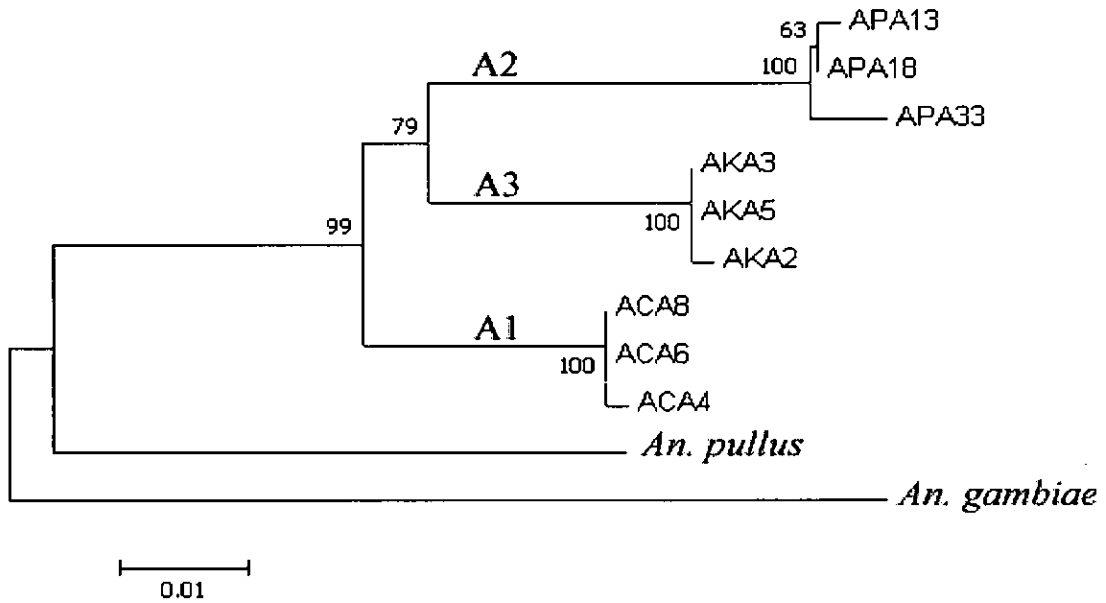


Fig. 9 Phylogeny of the three allopatric strains of *An. barbirostris* Forms A (Chiang Mai: ACA4, ACA6, ACA8; Kanchanaburi: AKA2, AKA3, AKA5; Phetchaburi: APA13, APA18, APA33) based on COII. The tree shown was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).

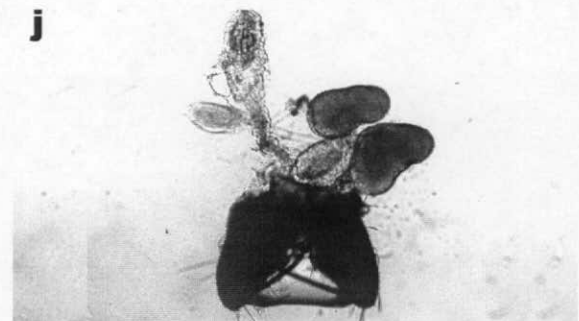
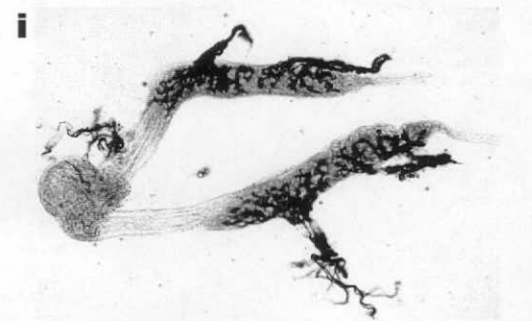
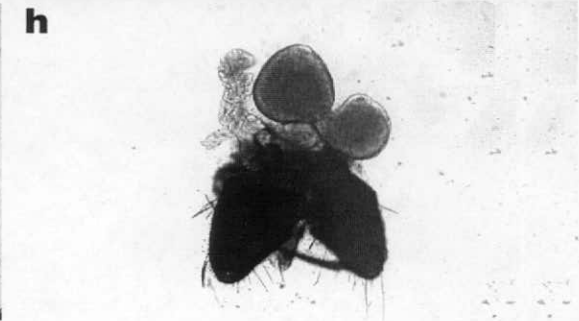
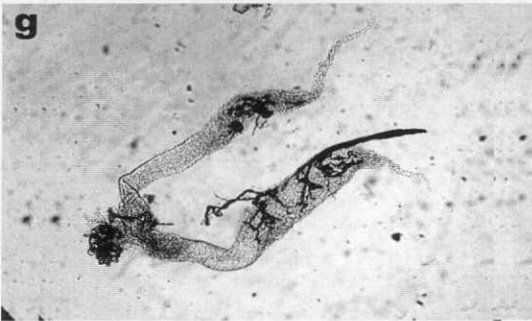
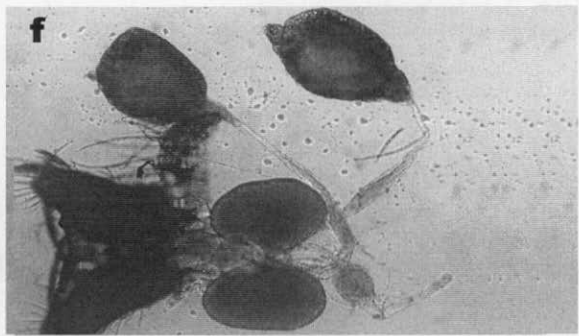
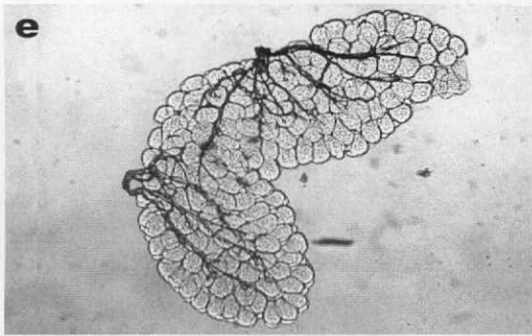
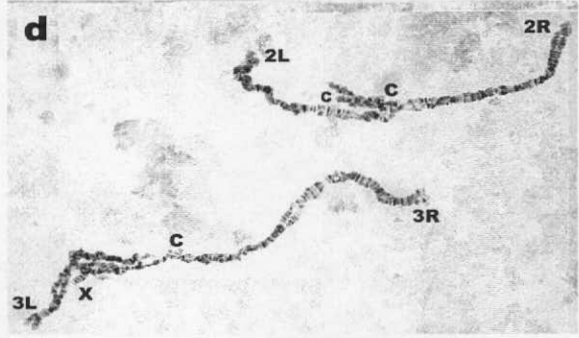
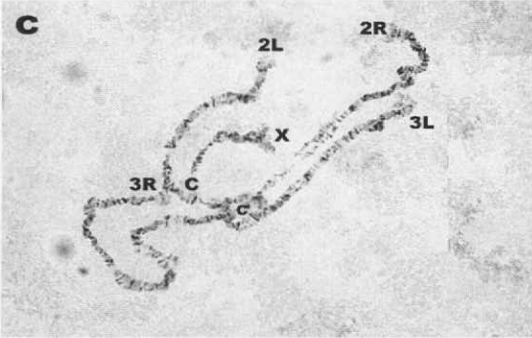
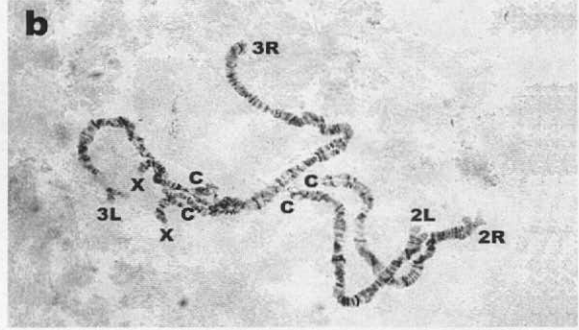
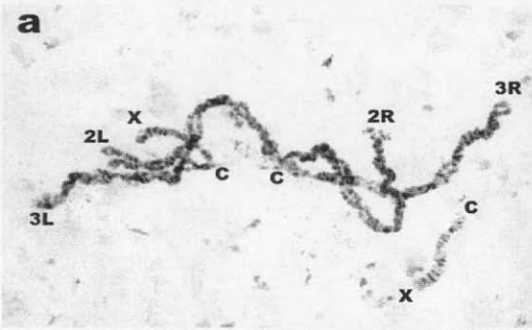


Fig. 10 Salivary gland polytene chromosomes of 4th larvae, ovaries and testes of parental and F₁-hybrids from crosses among three strains *An. barbirostris* Form A. (a) Asynaptic salivary gland polytene chromosome from female Form A (Chiang Mai) x male Form A (Kanchanaburi). (b) Asynaptic salivary gland polytene chromosome from female Form A (Phetchaburi) x male Form A (Kanchanaburi). (c) Asynaptic salivary gland polytene chromosome from female Form A (Chiang Mai) x male Form A (Phetchaburi). (d) Asynaptic salivary gland polytene chromosome from female Form A (Phetchaburi) x male Form A (Chiang Mai). (e) Normal development of ovarian follicles of Form A (Chiang Mai). (f) Normal development of accessory glands and testes of Form A (Phetchaburi). (g) Abnormal development of ovarian follicles from female Form A (Chiang Mai) x male Form A (Phetchaburi). (h) Atrophy of accessory glands and testes from female Form A (Chiang Mai) x male Form A (Phetchaburi). (i) Abnormal development of ovarian follicles from female Form A (Phetchaburi) x male Form A (Chiang Mai). (j) Atrophy of accessory glands and testes from female Form A (Phetchaburi) x male Form A (Chiang Mai). Note: Testes are absent because vasa deferentia were fragile, causing the testes to detach during preparation.

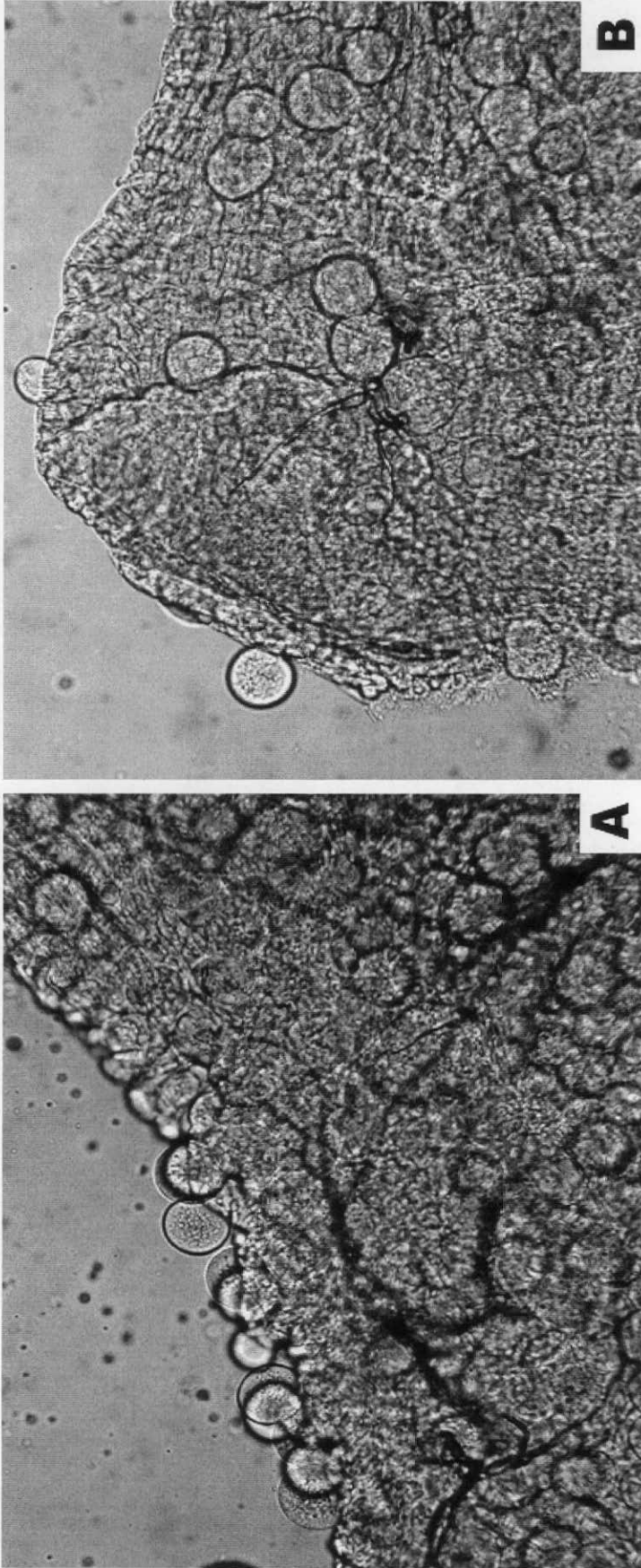


Fig. 11 Showing oocysts of *P. vivax* recovered from midgut of *An. cracens* (A) and *An. campestris*-like Form E (B) on day 8 after infection

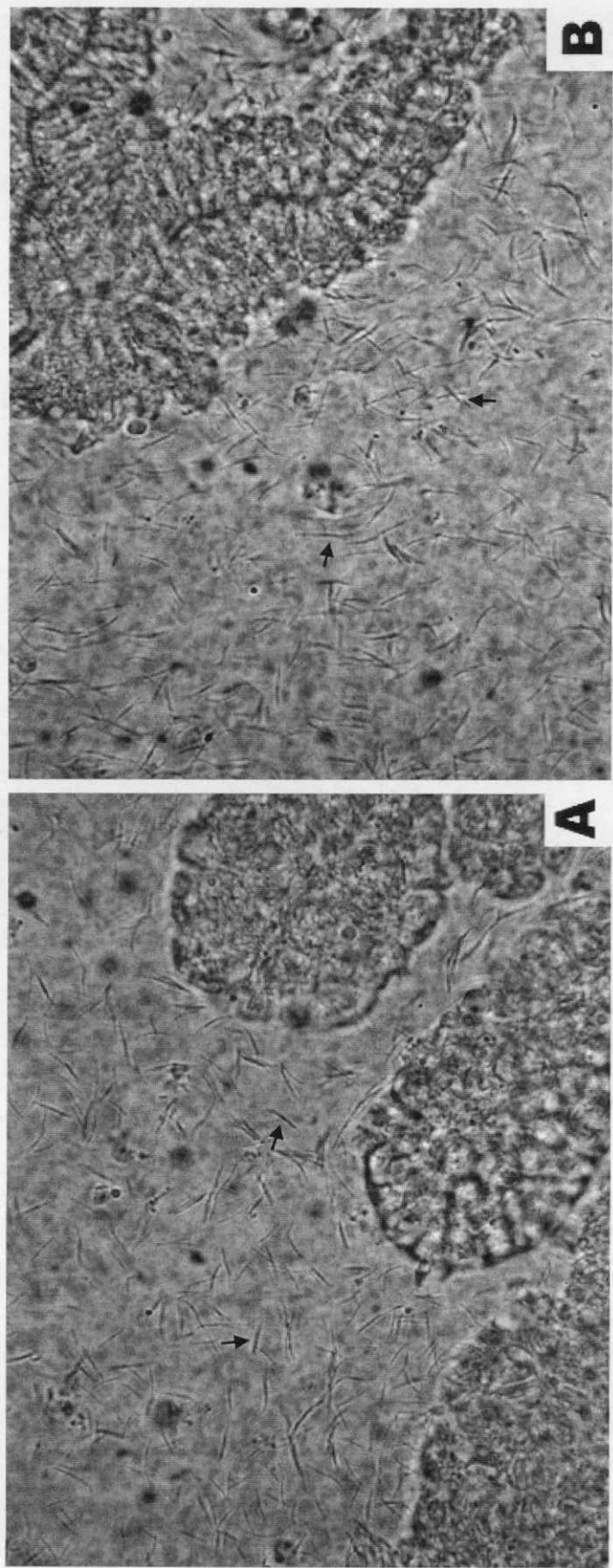


Fig. 12 Showing free flow *P. vivax* sporozoites from the squashed salivary glands of *An. cracens* (A) and *An. campestris*-like Form E (B). Note, the regular spindle-shaped sporozoites (small arrow)

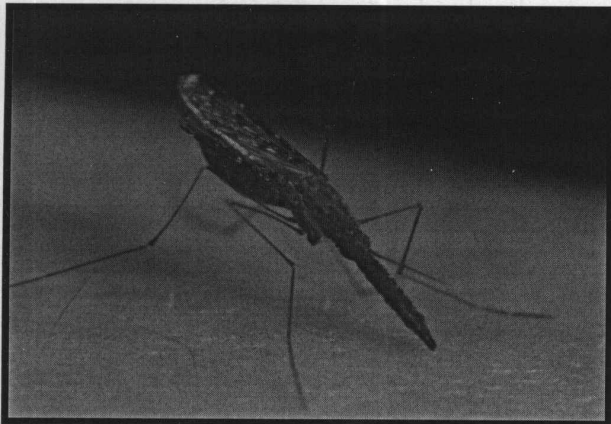
ภาคผนวก



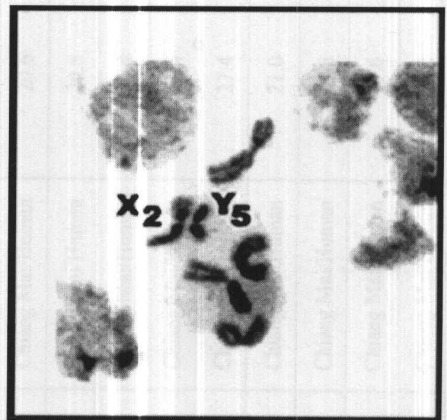
พบยุงกันปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อนกลุ่มใหม่

โรคไข้มาลาเรียที่เกิดจากเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium falciparum* และ *P. vivax*) เป็นโรคติดต่อที่มียุงกันปล่อง (*Anopheles*) เป็นพาหะ ซึ่งโรคนี้ยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและของโลก ในประเทศไทยมียุงกันปล่องอย่างน้อย 73 ชนิด แต่มีเพียง 8 ชนิดเท่านั้นที่ได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นพาหะนำโรคไข้มาลาเรียในประเทศไทย ซึ่งยุงพาหะหลัก (primary vector – ยุงที่สามารถนำเชื้อมาลาเรียได้ดี และมีบทบาทสำคัญในการแพร่โรคในท้องที่ป่าเขาทั่วประเทศ) ได้แก่ ยุง *Anopheles dirus* s.s. (*dirus* A) ยุง *An. baimaii* (*dirus* D) ยุง *An. minimus* s.l. (*minimus* A) และยุง *An. maculatus* s.s. (*maculatus* B) ยุงพาหะรอง (secondary vector – ยุงที่สามารถนำเชื้อมาลาเรียได้ แต่ไม่ดีเท่ากับยุงพาหะหลักและมีบทบาทน้อยในการแพร่โรค) ได้แก่ ยุง *An. aconitus* ยุง *An. epiroticus* (*sundaicus* A) ยุง *An. pseudowillmori* (*maculatus* I) และยุงกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* (เนื่องจากการจำแนกยุงทั้งสองชนิดนี้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเพศเมียไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจนว่าเป็นยุง *An. barbirostris* หรือยุง *An. campestris*)

สำหรับยุงกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* นั้น ได้ถูกรายงานเมื่อเร็วๆ นี้ว่าเป็นพาหะที่สำคัญในการนำโรคไข้มาลาเรียชนิด *P. vivax* และน่าจะเป็นยุงพาหะที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการติดเชื้อ *P. vivax* ในประชากรไทย การจำแนกยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเพศเมียนั้นมีความไม่แน่นอนค่อนข้างสูง จึงทำให้เกิดความผิดพลาดอย่างมาก และการจำแนกยุงทั้งสองชนิดนี้โดยใช้คราบดักแด้ มีความถูกต้องเพียง 95-97% เท่านั้น วิธีการจำแนกยุงทั้งสองชนิดนี้ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำที่สุดในขณะนี้ มีเพียงวิธีเดียวเท่านั้น คือ การใช้ลักษณะของเมตาเพลสคาริโอไทป์จากเซลล์สมองของลูกน้ำ ยุง ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเพศเมีย คราบดักแด้ เมตาเพลสคาริโอไทป์จากเซลล์สมองของลูกน้ำ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ยีนไรโบโซมและยีนไมโทคอนเดรียของยุงในกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* ที่มีนิสัยชอบกัดกินเลือดคน พบว่า ยุงดังกล่าวนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคราบดักแด้เป็นยุง *An. campestris* แต่มีลักษณะของเมตาเพลสคาริโอไทป์รูปแบบหนึ่งเหมือนกับ *An. barbirostris* และยังมีอีกรูปแบบหนึ่ง ที่ไม่เหมือนทั้งยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris* รวมทั้งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลที่แยกออกจากยุง *An. barbirostris* อย่างชัดเจน ดังนั้น จากการศึกษาในครั้งนี้ จึงยืนยันถึงการค้นพบว่ายุงกันปล่องในกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* เป็นยุงกลุ่มชนิดซับซ้อน (species complex) กลุ่มใหม่ อีกกลุ่มหนึ่งในประเทศไทย



ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงในกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* ที่มีนิสัยชอบกัดกินเลือดคน



เมตาเพลสคาริโอไทป์รูปแบบใหม่ของยุงในกลุ่ม *An. barbirostris/campestris* ที่มีนิสัยชอบกัดกินเลือดคน

ข้อมูลและภาพ: นางสาวอดิพร แซ่อึ้ง ดร. อนุลักษณ์ จันทรคำ ดร. เบญจวรรณ ต้อมตัน และรศ. เวช ชูโชติ
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Specimen identification record and deposition

Date/time collection	Isoline code	Location/Type of bait	Branches of seta 2-VI of pupal skins	Karyotype identification	Species identification	DNA investigation	Ovarian nurse cell preparation	Deposition record	Remark
5/08/06	ACB1	Chiang Mai/Animal	11.8	X ₂ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	ACB2	Chiang Mai/Animal	11.2	X ₁ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	ACB3	Chiang Mai/Animal	9.4	X ₂ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	ACA4	Chiang Mai/Animal	11.5	X ₁ Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	ACA6	Chiang Mai/Animal	14.0	X ₂ Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	ACA8	Chiang Mai/Animal	10.8	X ₂ Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	ACB9	Chiang Mai/Animal	12.5	X ₂ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
30/08/06	HCE6	Chiang Mai/Human	23.6	X ₂ Y ₅	<i>An. campestris</i> -like	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
25/09/06	HCE7	Chiang Mai/Human	20.6	X ₂ Y ₅	<i>An. campestris</i> -like	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	HCE8	Chiang Mai/Human	20.8	X ₂ Y ₅	<i>An. campestris</i> -like	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	HCB9	Chiang Mai/Human	25.4	X ₂ Y ₂	<i>An. campestris</i> -like	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	HCB10	Chiang Mai/Human	21.4	X ₂ Y ₂	<i>An. campestris</i> -like	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	HCE12	Chiang Mai/Human	27.4	X ₂ Y ₅	<i>An. campestris</i> -like	-	+	Larva, pupa, adult	
22/10/06	HCB13	Chiang Mai/Human	21.0	X ₂ Y ₂	<i>An. campestris</i> -like	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	HCE14	Chiang Mai/Human	23.6	X ₂ Y ₅	<i>An. campestris</i> -like	-	+	Larva, pupa, adult	
	HCE15	Chiang Mai/Human	19.6	X ₂ Y ₅	<i>An. campestris</i> -like	-	+	Larva, pupa, adult	
	HCE16	Chiang Mai/Human	21.2	X ₂ Y ₅	<i>An. campestris</i> -like	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	HCB18	Chiang Mai/Human	28.6	X ₂ Y ₂	<i>An. campestris</i> -like	-	+	Larva, pupa, adult	
	HCB20	Chiang Mai/Human	26.0	X ₂ Y ₂	<i>An. campestris</i> -like	-	+	Larva, pupa, adult	

Specimen identification record and deposition

Date/time collection	Isoline code	Location/Type of bait	Branches of seta 2-VI of pupal skins	Karyotype identification	Species identification	DNA investigation	Ovarian nurse cell preparation	Deposition record	Remark
2/09/06	APB4	Phetchaburi/Animal	11.8	X ₁ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	APB5	Phetchaburi/Animal	12.0	X ₂ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	APB9	Phetchaburi/Animal	13.6	X ₂ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	APA13	Phetchaburi/Animal	14.0	X ₂ , Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	APA14	Phetchaburi/Animal	11.4	X ₂ , Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
1/10/06	APA18	Phetchaburi/Animal	13.0	X ₂ , Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	APB20	Phetchaburi/Animal	12.4	X ₁ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	APB24	Phetchaburi/Animal	12.0	X ₂ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	APB27	Phetchaburi/Animal	13.6	X ₂ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	APC28	Phetchaburi/Animal	13.0	X ₂ , Y ₃	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	APB31	Phetchaburi/Animal	12.8	X ₁ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	APA33	Phetchaburi/Animal	14.0	X ₁ , Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	APA34	Phetchaburi/Animal	10.6	X ₂ , Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
17/09/06	AUB2	Ubon Ratchathani/Animal	12.5	X ₃ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	AUB3	Ubon Ratchathani/Animal	9.6	X ₂ , Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	

Specimen identification record and deposition

Date/time collection	Isoline code	Location/Type of bait	Branches of seta 2-VI of pupal skins	Karyotype identification	Species identification	DNA investigation	Ovarian nurse cell preparation	Deposition record	Remark
	AUC4	Ubon Ratchathani/ Animal	12.6	X ₂ Y ₃	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	AUB6	Ubon Ratchathani/ Animal	13.6	X ₁ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
9/10/06	AUB9	Ubon Ratchathani/ Animal	12.4	X ₂ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	AUB10	Ubon Ratchathani/ Animal	11.8	X ₂ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	AUB11	Ubon Ratchathani/ Animal	13.4	X ₂ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
6/11/06	AUB15	Ubon Ratchathani/ Animal	14.0	X ₂ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	AUC16	Ubon Ratchathani/ Animal	12.2	X ₂ Y ₃	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	AUA17	Ubon Ratchathani/ Animal	12.4	X ₂ Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	
	AUB18	Ubon Ratchathani/ Animal	15.0	X ₂ Y ₂	<i>An. barbirostris</i>	-	+	Larva, pupa, adult	

Specimen identification record and deposition

Date/time collection	Isoline code	Location/Type of bait	Branches of seta 2-VI of pupal skins	Karyotype identification	Species identification	DNA investigation	Ovarian nurse cell preparation	Deposition record	Remark
23/01/07	AKA2	Kanchanaburi/ Animal	10.8	X ₁ Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	AKA3	Kanchanaburi/ Animal	13.6	X ₂ Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	
	AKA5	Kanchanaburi/ Animal	11.4	X ₂ Y ₁	<i>An. barbirostris</i>	ITS2, COI, COII	+	Larva, pupa, adult	

เอกสารแนบ 1

สรุป OUTPUTS ที่ได้รับการดำเนินงาน

ชื่อโครงการวิจัย “การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles barbirostris* และ *An. campestris* ในประเทศไทย”

ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2549 ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2550

ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ. เวช ชูโชติ

หน่วยงาน ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1. การตีพิมพ์บทความในวารสารวิชาการ

1.1 ผลงานวิจัยชื่อเรื่อง “Cytogenetic and molecular evidence for two species in the *Anopheles barbirostris* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand”

ชื่อผู้แต่ง “Atiporn Saeung et al.”

ผลงานวิจัยนี้ได้ยอมรับเพื่อตีพิมพ์ออกเผยแพร่ใน Parasitology Research ซึ่งเป็นวารสารระดับนานาชาติ (impact factor: 1.236)

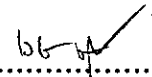
1.2 อยู่ในระหว่างการจัดทำต้นฉบับ (in manuscript) เพื่อส่งลงตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 1 เรื่อง

ชื่อเรื่อง “Post-mating reproductive isolation among three allopatric strains of *Anopheles barbirostris* Form A (Diptera: Culicidae) in Thailand”

ชื่อผู้แต่ง “Atiporn Saeung et al.”

2. ผลสนับสนุนในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาเอก 1 คน

นส. อติพร แซ่เอ็ง รหัส 4867011 กำลังศึกษาระดับปริญญาเอก โดยทำวิจัยในหัวข้อวิทยานิพนธ์ ชื่อเรื่อง “Genetic Study of *Anopheles barbirostris*” ซึ่งมีผลงานวิจัยที่ได้ยอมรับเพื่อตีพิมพ์ออกเผยแพร่แล้วและที่กำลังเตรียมเพื่อส่งลงตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ อยู่ในขอบเขตของงานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ลงนาม 

รศ. เวช ชูโชติ

(หัวหน้าโครงการ)

วันที่ 19 กรกฎาคม 2550

1 Parasitol Res
2 DOI 10.1007/s00436-007-0645-1

3 ORIGINAL PAPER

4 Cytogenetic and molecular evidence for two species 5 in the *Anopheles barbirostris* complex (Diptera: Culicidae) 6 in Thailand

7 Atiporn Saeung · Yasushi Otsuka · Visut Baimai ·
8 Pradya Somboon · Benjawan Pitasawat ·
9 Benjawan Tuetun · Anuluck Junkum ·
10 Hiroyuki Takaoka · Wej Choochote

11 Received: 11 May 2007 / Accepted: 18 June 2007
12 © Springer-Verlag 2007

15 **Abstract** Seventeen isolines of *Anopheles barbirostris*
16 derived from animal-biting female mosquitoes showed three
17 karyotypic forms: Form A (X_2, Y_1) in five isolines from
18 Phetchaburi province; Form B (X_1, X_3, Y_2) in three and
19 eight isolines from Chiang Mai and Ubon Ratchathani
20 provinces, respectively; Form C (X_2, Y_3) in one isolate from
21 Phetchaburi province. All 17 isolines exhibited an average
22 branch summation of seta 2-VI pupal skins ranging from
23 12.1–13.0 branches, which was in the limit of *A. barbirostris*
24 (6–18 branches). Of the 12 human-biting isolines from
25 Chiang Mai province, five isolines showed Form B (X_2, Y_2),
26 and seven isolines exhibited a new karyotypic form
27 designated as Form E (X_2, Y_5). All of 12 isolines had an

average branch summation of seta 2-VI pupal skins ranging 28
from 22.4–24.5 branches, which was in the limit of 29
Anopheles campestris (17–58 branches). Thus, they were 30
tentatively designated as *A. campestris*-like Forms B and E. 31
Hybridization between *A. campestris*-like Forms B and E 32
showed that they were genetically compatible, yielding 33
viable progeny for several generations suggesting conspe- 34
cific relationships of these two karyotypic forms. Reproduc- 35
tive isolation among crosses between *A. campestris*-like 36
Form B and *A. barbirostris* Forms A, B, and C strongly 37
suggested the existence of these two species. In addition, the 38
very low intraspecific variation (genetic distance <0.005) of 39
the nucleotide sequence of ITS2 of the rDNA and COI and 40
COII of mitochondrial DNA of the seven isolines of *A.* 41
campestris-like Forms B and E supported their conspecific 42
relationship. The large sequence divergence of ITS2 (0.203– 43
0.268), COI (0.026–0.032), and COII (0.030–0.038) from 44
genomic DNA of *A. campestris*-like Forms B and E and the 45
A. barbirostris Forms A, B, and C clearly supported 46
cytogenetic and morphological evidence. 47

A. Saeung · P. Somboon · B. Pitasawat · B. Tuetun · A. Junkum ·
W. Choochote (✉)
Department of Parasitology, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University,
Chiang Mai 50200, Thailand
e-mail: wchoocho@mail.med.cmu.ac.th

Y. Otsuka · H. Takaoka
Department of Infectious Disease Control, Faculty of Medicine,
Oita University,
Hasama, Oita 879-5593, Japan

V. Baimai
Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University,
Rama VI Road,
Bangkok 10400, Thailand

V. Baimai
Center for Vectors and Vector-Borne Diseases, Faculty of Science,
Mahidol University,
Rama VI Road,
Bangkok 10400, Thailand

Introduction

The Myzorhynchus Series of *Anopheles* (*Anopheles*) in 50
Thailand consists of at least seven species, i.e., *Anopheles* 51
montanus Stanton and Hacker, *Anopheles barbirostris* Van 52
der Wulp, *Anopheles campestris* Reid, *Anopheles donaldi* 53
Reid, *Anopheles hodgkini* Reid, *Anopheles pollicaris* Reid, 54
and *Anopheles barbumbrosus* Strickland and Chowdhury 55
(Reid 1962, 1968; Harrison and Scanlon 1975; Harbach 56
2004; Rattanaarithikul et al. 2006). Among these species, *A.* 57

barbirostris was formerly considered a suspected vector of malaria and/or filariasis in Thailand (Iyengar 1953; Griffith 1955), while it has been incriminated as a natural vector of *Plasmodium vivax* and *Brugia malayi*, the causative agent of filariasis in Indonesia (Atomosoedjono et al. 1976; Kimnowardoyo 1985). Recently, mosquitoes of the anthropophilic *A. barbirostris/campestris* complex were incriminated as potentially natural vectors of *P. vivax* in the Aranyaprathet district, Sa Keao province (Limrat et al. 2001). Mosquitoes of this complex have played an important role in increasing cases of *P. vivax* infection in Thailand (Sattabongkot et al. 2004). However, based on the identification of pupal skins, Apiwathnasorn et al. (2002) subsequently incriminated *A. campestris* as a potentially natural vector of *P. vivax* in Sa Keao province.

Cytologically, three karyotypic forms of *A. barbirostris*, i.e., Form A (X_2, X_3, Y_1), Form B (X_1, X_2, X_3, Y_2), and Form C (X_2, X_3, Y_3), have been reported in both sympatric and/or allopatric populations in Thailand, whereas a fourth form, Form D (X_2, Y_4) has been detected only in Java, Indonesia (Baimai et al. 1995). Only one karyotypic form has been observed in *A. campestris*. Morphologically, Harrison and Scanlon (1975) reported different features of the branch summation of seta 2-VI of pupal skins between *A. barbirostris* and *A. campestris*. Although differences in chromosomes and morphology are obvious in the *A. barbirostris/campestris* complex, little is known about the genetic similarities among these species.

In this paper, we describe a new karyotypic form and morphological differences in pupal skins of *A. barbirostris* s. l. The results of hybridization experiments and comparative DNA sequencing of internal transcribed spacer 2 (ITS2) and mitochondrial cytochrome c oxidase subunits I and II (COI and COII) of these karyotypic forms are also presented.

Materials and methods

Field collection and establishment of iso-female lines

Wild-caught, fully engorged female mosquitoes of *A. barbirostris* were collected from human-baited and buffalo-baited traps at four localities: Ban Pang Mai Daeng, Maetang district, and Ban Nong Chom, San Sai district, Chiang Mai province, northern Thailand; Ban Kang Ruang, Na Chaluai district, Ubon Ratchathani province, northeastern Thailand; and Ban Pu Nam Ron, Nong Ya Plong district, Phetchaburi province, southwest Thailand (Fig. 1). The live female mosquitoes were brought to the insectary at Chiang Mai University. The female mosquitoes were allowed to individually oviposit eggs in isolated ovipots to establish iso-female lines (isolines). The larvae were colonized further using the

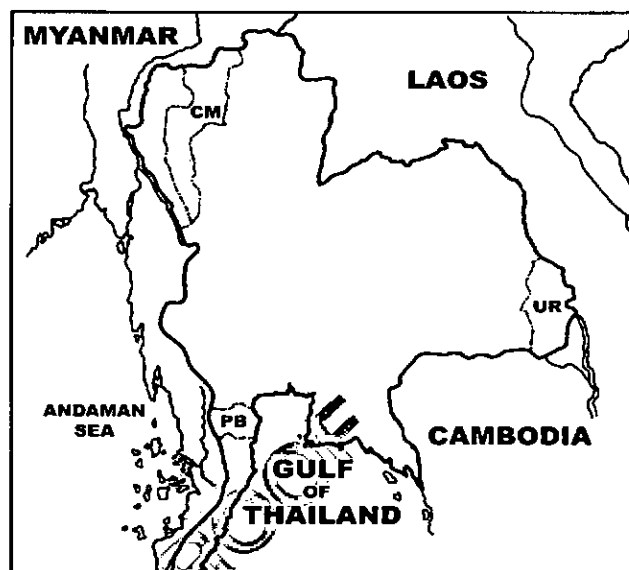


Fig. 1 Map of Thailand showing Chiang Mai (CM, 18°47'N, 98°59'E), Ubon Ratchathani (UR, 15°15'N, 104°52'E), and Phetchaburi (PB, 13°09'N, 100°04'E) provinces where mosquito collections were made

techniques described by Choochote et al. (1983) and Kim et al. (2003).

Metaphase karyotype

Metaphase chromosomes were prepared from early fourth-instar larval brains of F_1 - and/or F_2 -progenies of each isolate using modified methods of Baimai (1977) and Choochote et al. (2001). The excised heads of fourth-instar larvae were incubated with a 0.5 ml filtrate of 0.5% solution of dried *Gloriosa superba* seed powder (prepared by soaking 0.05 g of seed powder in 10 ml of 0.85% sodium chloride solution for 6 h at 27±2°C) in a 1-ml microcentrifuge tube (Effendorf®) for two h at room temperature. The incubated heads were left in 1% hypotonic sodium citrate solution on a siliconized slide for 10 min, and then the brains were removed and transferred to a small drop of Carnoy's fixative (one part of glacial acetic acid and three parts of absolute ethanol) on a siliconized slide for at least 2 min. Then, a drop of 60% acetic acid was added, and the organs were torn and mixed well with dissecting needles. A drop of cell suspension was placed on a clean microscopic slide on a warming plate at about 45–50°C. Droplets of cells were released slowly from the Pasteur pipette to form a circular trail of monolayer cells. The dried slides were stained with 10% Giemsa in phosphate buffer pH 6.8 for 30 min, rinsed with deionized water, air-dried at room temperature, and mounted in Permount® (Fisher, Fairlawn, NJ, USA). Identification of karyotypic forms followed the method of Baimai et al. (1995).

135 Hybridization experiments

136 Hybridization experiments were conducted among the four
137 representative karyotypic forms of six laboratory-raised
138 isolines of three strains (Chiang Mai, Ubon Ratchathani,
139 and Phetchaburi) of *A. barbirostris/campestris*-like mos-
140 quitoes. Cross mating followed the method reported by
141 Junkum et al. (2005). Low viability of the crosses
142 (hatchability, survival, pupation, and emergence) was the
143 criterion used to establish postmating reproductive isolation.

144 DNA extraction, amplification and sequencing

145 Genomic DNA was extracted from a whole adult mosquito
146 using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen) according to the
147 manufacturer's instructions. The rDNA ITS2, COI, and
148 COII regions were amplified by polymerase chain reaction
149 (PCR) using the following primers: ITS2A, 5'-
150 TGTGAACTGCAGGACACAT-3' and ITS2B, 5'-
151 TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3' for rDNA ITS2 (Beebe
152 and Saul 1995), LCO1490 (f), 5'-GGTCAACAAATCA
153 TAAAGATATTGG-3' and HCO2198 (r), 5'-TAAACTT
154 CAGGGTGACCAAAAAATCA-3' for COI (Folmer et al.
155 1994), and LEU (f), 5'-TCTAATATGGCAGATTAGTGCA-
156 3' and LYS (r), 5'-ACTTGCTTTCAGTCATCTAATG-3'

for COII (Sharpe et al. 2000). PCR was carried out using
20 µl volumes containing 0.5 units of *Ex Taq* (Takara), 1X
Ex Taq buffer, 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP,
0.25 µM of each primer, and 1 µl of the extracted DNA.
The amplification profile comprised initial denaturation at
95°C for 1 min, 30 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 30 s,
and 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for
10 min. PCR products of ITS2 were gel purified with the
QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) and cloned into
pCR2.1⁺TOPO (Invitrogen). Sequences of several clones
from each isolate were determined. PCR products of COI
and COII were purified with the QIAquick PCR purification
kit (Qiagen) and directly sequenced. Sequencing reactions
were performed using the BigDye Terminator Cycle Sequencing
Kit and run on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
(Applied Biosystems). The sequence data of this paper have
been deposited in the GenBank nucleotide sequence database
under accession numbers XXX-XXX (Table 3).

Sequence and phylogenetic analysis

Sequences of ITS2 were aligned using the CLUSTALW
multiple alignment program (Thompson et al. 1994). Gap
sites were excluded from the following analysis. Genetic
distances were estimated with the Kimura two-parameter

Fig. 2 Metaphase karyotypes of *A. barbirostris* Forms A, B, and C (a–d) and *A. campestris*-like Forms B and E (Chiang Mai strains; e–g). **a** Form A X₂Y₁, Phetchaburi; **b** Form B X₁Y₂, Chiang Mai; **c** Form B X₃Y₂, Ubon Ratchathani; **d** Form C X₂Y₃, Phetchaburi; **e** Form B X₂Y₂, Chiang Mai; **f** Form E X₂Y₅, Chiang Mai; **g** Form B X₂X₂, Chiang Mai; **h** Diagrammatic presentation of metaphase karyotype of *A. campestris*-like Form E

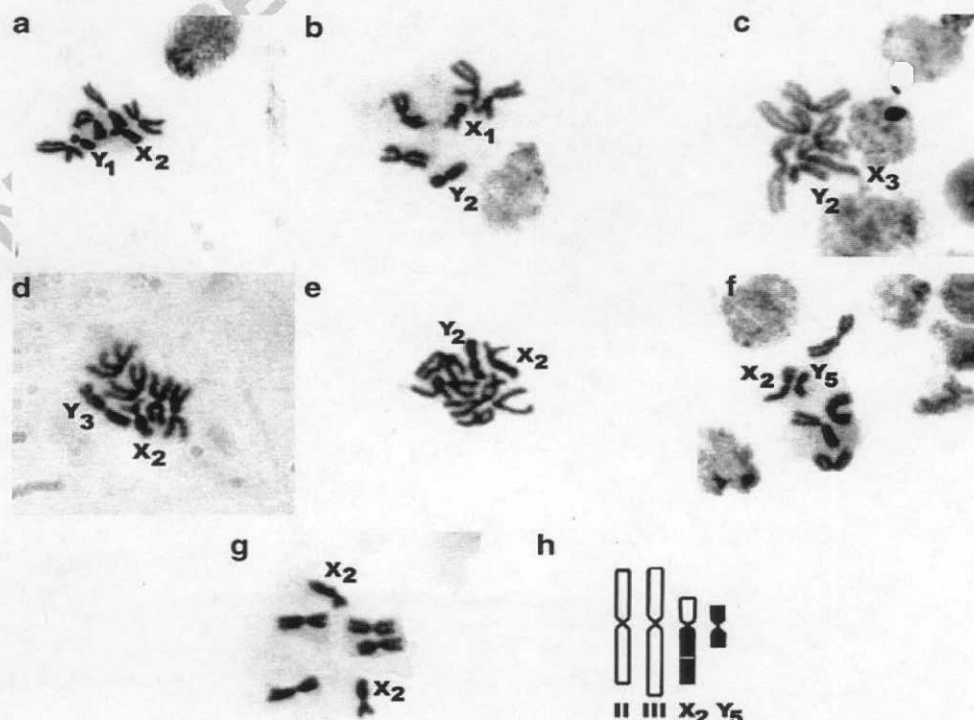


Table 1 Branch summation of seta 2-VI pupal skins of *A. barbirostris* Forms A, B, and C collected from animal baits and *A. campestris*-like Forms B and E collected from human baits

t1.2	Karyotypic forms (province)	Code of strains	No of isolines ^a								Mean (range)
t1.3			1	2	3	4	5	6	7	8	
t1.4	<i>A. barbirostris</i> (animal bait)										
t1.5	Form A (Phetchaburi)	APA	14.0	11.4	13.0	14.0	10.6	—	—	—	12.6 (9–17)
t1.6	Form B (Chiang Mai)	ACB	14.0	11.5	10.8	—	—	—	—	—	12.1 (10–16)
t1.7	Form B (Ubon Ratchathani)	AUB	12.5	9.6	13.6	12.4	11.8	13.4	14.0	15.0	12.8 (8–17)
t1.8	Form C (Phetchaburi)	APC	13.0	—	—	—	—	—	—	—	13.0 (10–19)
t1.9	<i>A. campestris</i> -like (human bait)										
t1.10	Form B (Chiang Mai)	HCB	25.4	21.4	21.0	28.6	26.0	—	—	—	24.5 (19–32)
t1.11	Form E (Chiang Mai)	HCE	23.6	20.6	20.8	27.4	23.6	19.6	21.2	—	22.4 (18–30)

^a Average from five progeny specimens of each isolate

method (Kimura 1980). Construction of neighbor-joining trees (Saitou and Nei 1987) and the bootstrap test with 1,000 replications were conducted with the MEGA version 3.1 program (Kumar et al. 2004). For the phylogenetic trees of COI and COII, *Anopheles gambiae* and *Anopheles pullus* were used as an outgroup (AF417706, AY444349, NC_002084, AY444350). The phylogenetic tree of ITS2 was constructed as an unrooted tree because an outgroup with easily aligned ITS2 was not available.

Results

Metaphase karyotypes and pupal skin characters

A total of 17 isolines of *A. barbirostris* derived from animal-biting female mosquitoes was established in the insectary: three from Chiang Mai (ACB), six from Phetchaburi (APA and APC), and eight from Ubon Ratchathani (AUB). Twelve isolines were recovered from

Table 2 Cross-mating among isolines of *A. campestris*-like Forms B and E and *A. barbirostris* Forms A, B, and C

Crosses (female mosquito × male mosquito)	Total eggs (number) ^a	Embryonation rate ^b	Number hatched (%)	Number of pupations (%)	Number of emergence (%)	Number from total emergence (%)	
						Female mosquito	Male mosquito
APA × APA	398 (166, 232)	82	346 (86.9)	325 (93.9)	283 (87.1)	119 (42.0)	164 (58.0)
ACB × ACB	411 (196, 215)	78	341 (83.0)	280 (82.1)	261 (93.2)	105 (40.2)	156 (59.8)
AUB × AUB	395 (128, 267)	84	308 (78.0)	289 (93.8)	243 (84.1)	117 (48.1)	126 (51.9)
APC × APC	383 (173, 210)	79	287 (74.9)	281 (97.9)	251 (89.3)	108 (43.0)	143 (57.0)
HCB × HCB	486 (227, 259)	91	452 (93.0)	397 (87.8)	349 (87.9)	147 (42.1)	202 (57.9)
HCE × HCE	455 (212, 243)	85	391 (85.9)	356 (91.0)	306 (86.0)	144 (47.1)	162 (52.9)
HCB × HCE	462 (142, 320)	88	364 (78.8)	323 (88.7)	294 (91.0)	132 (44.9)	162 (55.1)
HCE × HCB	415 (198, 217)	76	336 (81.0)	292 (86.9)	251 (86.0)	103 (41.0)	148 (59.0)
HCB × APA	379 (121, 258)	80	—	—	—	—	—
APA × HCB	487 (156, 331)	91	15 (3.1)	—	—	—	—
HCB × ACB	422 (208, 214)	10	—	—	—	—	—
ACB × HCB	469 (182, 287)	64	3 (0.6)	—	—	—	—
HCB × AUB	371 (179, 192)	75	19 (5.1)	—	—	—	—
AUB × HCB	433 (211, 222)	87	—	—	—	—	—
HCB × APC	384 (153, 231)	85	—	—	—	—	—
APC × HCB	359 (134, 225)	74	—	—	—	—	—
(HCB × HCE)F ₁ × HCE	404 (111, 293)	87	358 (88.6)	302 (84.4)	272 (90.1)	119 (43.8)	153 (56.2)
HCE × (HCB × HCE)F ₁	426 (149, 277)	91	417 (97.9)	371 (89.0)	349 (94.1)	150 (43.0)	199 (57.0)
(HCE × HCB)F ₁ × HCB	399 (164, 235)	89	319 (79.9)	283 (88.7)	238 (84.1)	110 (46.2)	128 (53.8)
HCB × (HCE × HCB)F ₁	442 (186, 256)	83	335 (75.8)	314 (93.7)	273 (86.9)	121 (44.3)	152 (55.7)

^a Two selected egg-batches of inseminated female mosquitoes from each cross

^b Dissection from 100 eggs

Table 3 Karyotypic forms of *A. barbirostris* Forms A, B, and C, and *A. campestris*-like Forms B and E, and their GenBank accession numbers

t3.2	Karyotypic forms	Group	Isoline No.	Length of ITS2 (bp)	Region	Genbank accession number			Reference
t3.3						ITS2	COI	COII	
t3.4	<i>A. barbirostris</i>								
t3.5	Form A	AB2	APA13	1,717	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.6			APA14	1,717	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.7			APA18	1,717	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.8			APA33	1,717	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.9	Form B	AB1	ACB1	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.10			ACB2	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.11			ACB3	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.12			AUB2	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.13			AUB6	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.14			AUB10	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.15			AUB11	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.16	Form C		APC28	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.17	<i>A. campestris</i> -like								
t3.18	Form B	HB	HCB9	1,651	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.19			HCB10	1,651	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.20			HCB13	1,651	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.21	Form E		HCE6	1,651	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.22			HCE7	1,651	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.23			HCE8	1,651	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.24			HCE16	1,651	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
t3.25	<i>A. barbirostris</i> ^a				COI		AF116836	Oshaghi et al. (unpublished data)	
t3.26					COI		AY729982	Oshaghi et al. (unpublished data)	

^a Karyotypic forms were not determined

196 female mosquitoes collected from human baits in Chiang
 197 Mai (HCB and HCE). Cytological observations of F₁- and/
 198 or F₂-progenies of the 17 isolines (ACB, APA, APC, AUB)
 199 have revealed three forms of metaphase karyotype, i.e.,
 200 Form A (X₂, Y₁), Form B (X₁, X₃, Y₂), and Form C (X₂,
 201 Y₃) (Fig. 2). Form A was observed in five isolines from
 202 Phetchaburi (APA). Form B was detected in three and eight
 203 isolines from Chiang Mai (ACB) and Ubon Ratchathani
 204 (AUB), respectively, and Form C was found in one isolate
 205 from Phetchaburi (APC; Table 1). Morphologically, the
 206 average branch summation of seta 2-VI pupal skins was
 207 observed as follows: 12.6 (9–17) branches in five isolines
 208 of Form A from Phetchaburi (APA); 12.1 (10–16) branches
 209 in three isolines of Form B from Chiang Mai (ACB); 12.8
 210 (8–17) branches in the eight isolines of Form B from Ubon
 211 Ratchathani (AUB), and 13.0 (10–19) branches in one
 212 isolate of Form C from Phetchaburi (APC). Such pupal skin
 213 characters were in the range of topotypic *A. barbirostris* (6–
 214 18 branches; Table 1).

215 The F₁-and/or F₂-progenies of 12 isolines of human-
 216 biting strains from Chiang Mai showed two forms of
 217 metaphase karyotypes: five isolines (HCB) exhibited Form
 218 B (X₂, Y₂), while seven isolines (HCE) showed X₂, Y₅ sex
 219 chromosomes. The X₂ had a submetacentric shape resem-

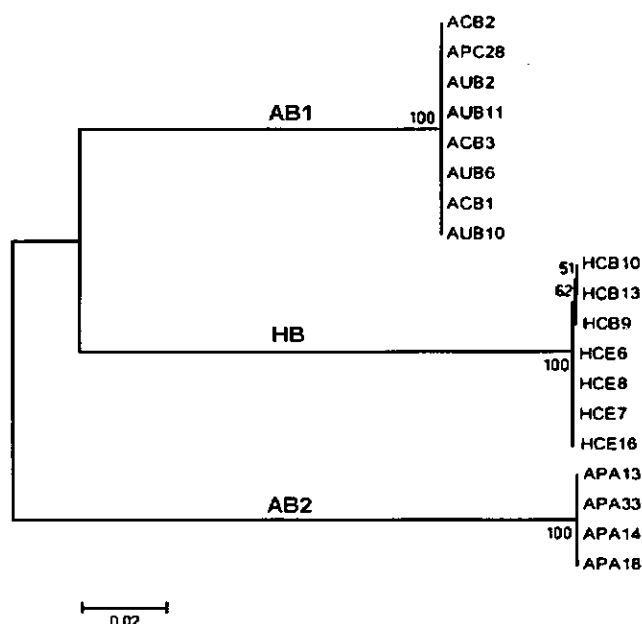


Fig. 3 Phylogeny of the *A. barbirostris* Forms A, B, and C, and *A. campestris*-like Forms B and E based on ITS2. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar)

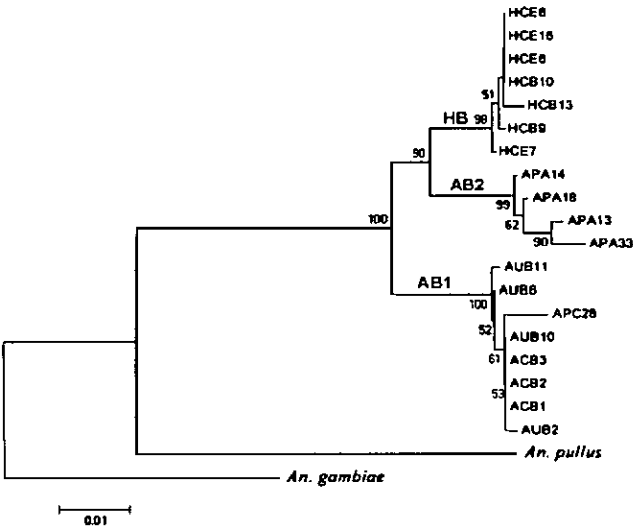


Fig. 4 Phylogeny of the *A. barbirostris* Forms A, B, and C, and *A. campestris*-like Forms B and E based on COI. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar)

bling that of *A. barbirostris*. The Y_5 had, however, a small metacentric heterochromatin. Thus, the X_2 and Y_5 sex chromosomes represent a new karyotype, tentatively designated as Form E (Fig. 2f,h). Morphological observations of

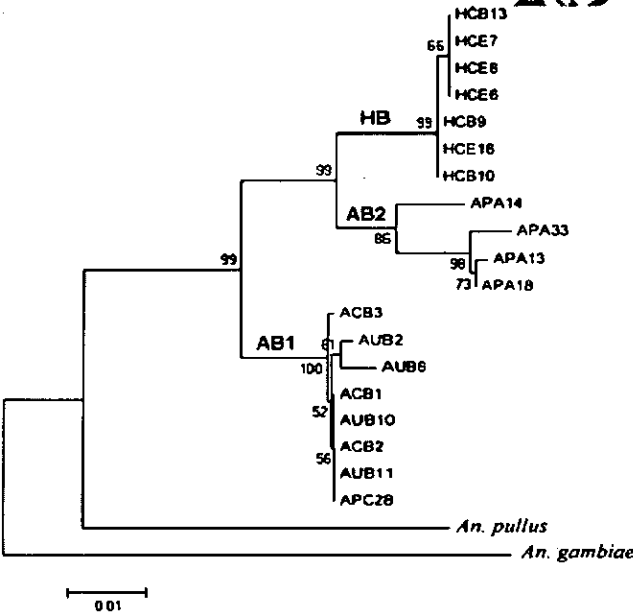


Fig. 5 Phylogeny of the *A. barbirostris* Forms A, B, and C, and *A. campestris*-like Forms B and E based on COII. The tree shown was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar)

the 12 isolines showed the average branch summation of seta 2-VI pupal skins as follows: 24.5 (19–32) branches of five isolines of Form B and 22.4 (18–30) branches of seven isolines of Form E. These pupal skin characters were in the range of *A. campestris* (17–58 branches; Table 1). Based on the branch summation of seta 2-VI pupal skins and the specific characteristics of X and Y chromosomes, the five and seven isolines were tentatively designated as *A. campestris*-like Forms B and E, respectively.

Crossing study

Details of hatchability, pupation, and emergence of all crosses among laboratory-raised isolines of *A. campestris*-like and *A. barbirostris* are presented in Table 2. All intra-isoline crosses were fully fertile, yielding high percentage emergence. Likewise, the crosses between the HCB and HCE gave high percentage emergence. Back crosses between the F_1 offsprings and the respective parental strains also yielded fertile F_2 progenies. On the other hand, crosses between HCB $\times$ APA, HCB $\times$ ACB, HCB $\times$ AUB and HCB $\times$ APC failed to yield F_1 hybrids (Table 2).

Sequence and phylogenetic analysis

DNA sequences were determined for the rDNA ITS2, COI, and COII regions from the 12 isolines of the animal-biting *A. barbirostris* and seven isolines of the human-biting *A. campestris*-like mosquitoes. All isolines showed the same length for the COI (658 bp) and COII (685 bp) regions, but they varied for the ITS2 region. Three different lengths of the ITS2 region were observed; two types in the animal-bait isolines and one type in the human-bait isolines. These are: group AB1 (1,861 bp), in seven isolines of Form B (ACB1, 2, 3 and AUB2, 6, 10, 11) and one isolate of Form C (APC28); group AB2 (1,717 bp), in four isolines of Form A (APA13, 14, 18, 33); group HB (1,651 bp), in three isolines of Form B (HCB9, 10, 13) and four isolines of Form E (HCE6, 7, 8, 16; Table 3). To ascertain the relationships of

Table 4 Average genetic distances within and between groups AB1, AB2, and HB for the ITS2, COI, and COII regions

	ITS2	COI	COII
Within group			
AB1	0.000	0.007	0.013
AB2	0.000	0.003	0.002
HB	0.001	0.002	0.001
Between groups			
AB1-AB2	0.236	0.037	0.044
AB1-HB	0.203	0.032	0.038
AB2-HB	0.268	0.026	0.030

the isolines, phylogenetic trees were constructed based on the rDNA ITS2, COI, and COII sequences (Figs. 3, 4, and 5). The isolines belonging to each of the three groups (AB1, AB2, and HB) were clustered in each monophyletic lineage. Average genetic distances within and between the groups are given in Table 4. For ITS2, although the three groups were well separated from one another (0.203–0.268), little difference (0.000–0.001) was found within each group. For COI and COII, little differences were observed within groups (0.001–0.013), while between groups showed considerable separation (0.026–0.044; Table 4). The phylogenetic trees showed that the group AB2 was more closely related to the group HB than to the group AB1 (Figs. 4 and 5). This is in contrast to the ITS2 phylogenetic tree which showed group HB close to group AB1 rather than to group AB2 (Fig. 3).

Discussion

Analysis of the metaphase chromosomes of the *A. barbirostris/campestris* group in Thailand has revealed at least three karyotypic forms of *A. barbirostris*, (Form A: X₂, X₃, Y₁; Form B: X₁, X₂, X₃, Y₂; and Form C: X₂, X₃, Y₃) and one karyotypic form of *A. campestris* (X, Y; Baimai et al. 1995). It has been suggested that the acquisition of extra heterochromatin played an important role in the chromosomal evolution of Oriental *Anopheles* (Baimai 1998). Hence the medium submetacentric X₂ and large submetacentric X₃ chromosomes of *A. barbirostris* Forms A, B, and C presumably arose from the ancestral small metacentric X₁ chromosome via a gradual increase in heterochromatin. On the other hand, a large submetacentric Y₂ and large submetacentric or metacentric Y₃ chromosomes could also have arisen from the presumed ancestral subtelocentric Y₁ chromosome. In the case of *A. campestris*, the metacentric X and the telocentric Y chromosomes are quite different from those of *A. barbirostris* (Baimai et al. 1995), although the adults of the two species are morphologically indistinguishable based on the branch summation of seta 2-VI pupal skins (*A. barbirostris*: 6–18 branches; *A. campestris*: 17–58 branches; Harrison and Scanlon 1975). Anthropophilic *A. barbirostris* Form B (X₂, Y₂) and a new karyotypic form, Form E (X₂, Y₃), have a branch summation of 24.5 (19–32) and 22.4 (18–30) branches, respectively, of seta 2-VI pupal skins, which falls within the range of *A. campestris* (Harrison and Scanlon 1975). Moreover, the small metacentric Y₃ chromosome in Form E found in this study is obviously different from chromosomes Y₁, Y₂, Y₃, and Y₄ chromosomes of *A. barbirostris* and a telocentric Y chromosome of *A. campestris* (Baimai et al. 1995). The crossing experiments between isolines of *A. campestris*-like Forms B and E showed no postmating barriers. In the light of our findings,

Form E of the Chiang Mai strain (HCE) could not be designated neither to *A. barbirostris* nor *A. campestris*. We, therefore, propose to designate these two karyotypic forms as *A. campestris*-like Forms B and E.

In addition, comparative studies of the nucleotide sequences of the ITS2, COI, and COII regions among the isolines of *A. campestris*-like Forms B and E from Chiang Mai revealed nearly identical and/or very low intraspecific variation (genetic distance <0.005). Thus, molecular data support the cytogenetic and morphological evidence suggesting the conspecific relationships of Forms B and E of *A. campestris*-like mosquitoes. Similar results have been reported in *Anopheles sinensis* Forms A and B (Choochote et al. 1998; Min et al. 2002), *A. pullus* Forms A and B (Park et al. 2003), and *Anopheles aconitus* Forms B and C (Junkum et al. 2005).

The reproductive isolation resulting from crosses among isolines of *A. campestris*-like Form B (HCB) and *A. barbirostris* Form A (APA), Form B (ACB and AUB), and Form C (APC), strongly suggest the existence of these two genetic species. Additionally, the ITS2, COI, and COII sequences of *A. campestris*-like Forms B and E were compared with that of *A. barbirostris* Forms A, B, and C showing a large ITS2, COI, and COII sequence divergence of 0.203–0.268, 0.026–0.032, and 0.030–0.038, respectively (Table 4). Based on COI and COII, the phylogenetic trees showed that group AB2 was more closely related to group HB than to group AB1. On the contrary, the phylogenetic tree constructed from the ITS2 sequence showed that group AB1 was more closely related to group HB than to group AB2. COI and COII are more reliable genetic markers than ITS2 for *Anopheles* species complexes (Parkewitz et al. 1993; Norris 2002). However, the present results clearly suggest a species complex within the taxon *A. barbirostris* occurring in Thailand.

Further detailed investigations relating to morphology, cytogenetics, and molecular biology among the sympatric and allopatric populations of the *A. barbirostris/campestris* complex are needed to solve their taxonomic problems.

Acknowledgments The authors sincerely thank the Biodiversity Research and Training Program (Grant No. BRT_249004) and the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D Program (Grant No. PHD/0052/2548) for financially supporting this research project. We also thank Dr. Niwes Nantachit, Dean of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for his interest in this research.

References

- Apiwatnasorn C, Prommongkol S, Samung Y, Limrat D, Rojruthai B (2002) Potential for *Anopheles campestris* (Diptera: Culicidae) to transmit malaria parasites in Pa Rai subdistrict (Aranyaprathet, Sa Kaeo province), Thailand. *J Med Entomol* 39:583–586

- 361 Atomosoedjono S, van Peenen PF, Putrali J (1976) *Anopheles*
362 *barbirostris* (Van der Wulp) still an efficient vector of *Brugia*
363 *malayi* in Central Sulawesi (Celebes), Indonesia. Trans R Soc
364 Trop Med Hyg 70:259
- 365 Baimai V (1977) Chromosomal polymorphisms of constitutive hetero-
366 chromatin and inversions in *Drosophila*. Genetics 85:85–93
- 367 Baimai V (1998) Heterochromatin accumulation and karyotypic
368 evolution in some Dipteran insects. Zool Stud 32:75–88
- 369 Baimai V, Rattanarithikul R, Kijchalao U (1995) Metaphase karyo-
370 types of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: IV. The
371 *barbirostris* and umbrosus species groups, subgenus *Anopheles*
372 (Diptera: Culicidae). J Am Mosq Control Assoc 11:323–328
- 373 Beebe NW, Saul A (1995) Discrimination of all members of the
374 *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-
375 restriction fragment length polymorphism analysis. Am J Trop
376 Med Hyg 53:478–481
- 377 Choochote W, Sucharit S, Abeywickreme W (1983) Experiments in
378 crossing two strains of *Anopheles barbirostris* Van der Wulp
379 1884 (Diptera: Culicidae) in Thailand. Southeast Asian J Trop
380 Med Public Health 14:204–209
- 381 Choochote W, Jitpakdi A, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Pitasawat
382 B, Palakul K (1998) Isoenzyme study and hybridization of two
383 forms of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in northern
384 Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 29:841–848
- 385 Choochote W, Pitasawat B, Jitpakdi A, Rattanachanpichai E, Riyong
386 D, Leemingsawat S, Wongkamchai S (2001) The application of
387 ethanol-extracted *Gloriosa superba* for metaphase chromosome
388 preparation in mosquitoes. Southeast Asian J Trop Med Public
389 Health 32:76–82
- 390 Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA
391 primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase
392 subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol
393 Biotechnol 3:294–299
- 394 Griffith ME (1955) A note on *Anopheles minimus* Theobald as a
395 malaria vector in Thailand. VI Int Congr Microbiol 5:565–567
- 396 Harbach RE (2004) The classification of genus *Anopheles* (Diptera:
397 Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships.
398 Bull Entomol Res 94:537–553
- 399 Harrison BA, Scanlon JE (1975) Medical entomology studies. II. The
400 subgenus *Anopheles* in Thailand (Diptera: Culicidae). Contrib
401 Am Entomol Inst 12:78
- 402 Iyengar MOT (1953) Filariasis in Thailand. Bull W H O 9:731–766
- 403 Junkum A, Komalamisra N, Jitpakdi A, Jariyapan N, Min GS, Park
404 MH, Cho KH, Somboon P, Bates PA, Choochote W (2005)
405 Evidence to support two conspecific cytological races of
406 *Anopheles aconitus* in Thailand. J Vector Ecol 30:213–224
- Kim SJ, Choochote W, Jitpakdi A, Junkum A, Park SJ, Min GS 407
(2003) Establishment of a self-mating mosquito colony of 408
Anopheles sinensis from Korea. Korean J Entomol 33:267–271 409
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates 410
of base substitution through comparative studies of nucleotide 411
sequences. J Mol Evol 16:111–120 412
- Kirnowardoyo S (1985) Status of *Anopheles* malaria vectors in 413
Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 16:129–132 414
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA 3: Integrated Software for 415
Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence align- 416
ment. Brief Bioinform 5: 150–163 417
- Limrat D, Rojruthai B, Apiwathnasorn C, Samung Y, Prommongkol S 418
(2001) *Anopheles barbirostris/campestris* as a probable vector of 419
malaria in Aranyaprathet, Sa Kaeo province. Southeast Asian J 420
Trop Med Public Health 32:739–744 421
- Min GS, Choochote W, Jitpakdi A, Kim SJ, Jung J, Junkum A (2002) 422
Intraspecific hybridization of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) 423
strains from Thailand and Korea. Mol Cells 14:198–204 424
- Norris DE (2002) Genetic markers for study of the anopheline vectors 425
of human malaria. Int J Parasitol 32:1607–1615 426
- Park SJ, Choochote W, Jitpakdi A, Junkum A, Kim SJ, Jariyapan N, 427
Park JW, Min GS (2003) Evidence for a conspecific relationship 428
between two morphologically and cytologically different forms 429
of Korean *Anopheles pullus* mosquito. Mol Cells 14:354–360 430
- Parkewitz SM, Wesson DM, Collins FH (1993) The internal 431
transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the 432
Anopheles gambiae species complex. Insect Mol Biol 2:247–257 433
- Rattanarithikul R, Harrison BA, Harbach RE, Panthusiri P, Coleman RE 434
(2006) Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand IV. *Anopheles*. 435
Southeast Asian J Trop Med Public Health 37(Suppl 2):1–128 436
- Reid JA (1962) The *Anopheles barbirostris* group (Diptera: Culici- 437
dae). Bull Entomol Res 53:1 438
- Reid JA (1968) Anopheline mosquitoes of Malaya and Borneo. Stud 439
Inst Med Res Malaya 31:1–520 440
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method 441
for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406–425 442
- Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L (2004) 443
Plasmodium vivax transmission: chances for control? Trends 444
Parasitol 20:192–198 445
- Sharpe RG, Harbach RE, Butlin RK (2000) Molecular variation and 446
phylogeny of members of the Minimus group of *Anopheles* 447
subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). Syst Entomol 25:263–272 448
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving 449
the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through 450
sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight 451
matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680 452

Post-mating reproductive isolation among three allopatric strains of *Anopheles barbirostris* Form A (Diptera: Culicidae) in Thailand

**Atiporn Saeung¹, Yasushi Otsuka², Visut Baimai^{3,4}, Rampa
Rattanarithikul⁵, Pradya Somboon¹, Anuluck Junkum¹, Benjawan
Tuetun¹, Hiroyuki Takaoka⁴ & Wej Choochote^{1*}**

¹Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand. ²Department of Infectious Disease Control, Faculty of Medicine, Oita University, Hasama, Oita, 879-5593, Japan. ³Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, 10400, Thailand.

⁴Center for Vectors and Vector-Borne Diseases, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, 10400, Thailand. ⁵Department of Entomology, U.S. Army Medical Component, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), Bangkok, Thailand.

***Correspondence to:** Wej Choochote, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand. Fax: + 66-53-217144. E-mail: wchoocho@mail.med.cmu.ac.th

ABSTRACT

Crossing experiments among the three strains of laboratory-raised isolines of *Anopheles barbirostris* Form A (Chiang Mai, Kanchanaburi, Phetchaburi) were employed by induced copulation in order to determine their genetic relationship. The results of reproductive isolation from each other by providing low embryonation, low- and/or non-hatched eggs, inviable progenies, asynapsis of F₁-hybrid salivary gland polytene chromosomes, abnormal development of ovarian follicles, atrophied of accessory glands and testes, and sex distortion of adults, strongly indicated the existence of species complex in the taxon of *An. barbirostris*. In addition, the large sequence divergence of ITS2 (0.240-0.627), COI (0.036-0.056) and COII (0.042-0.051) from genomic DNA of three strains of *An. barbirostris* Form A clearly support their post-mating reproductive isolation.

Key words: *Anopheles barbirostris* Form A, crossing experiments, ITS2, COI and COII

INTRODUCTION

Anopheles (Anopheles) barbirostris belongs to the Barbirostris Subgroup of the Myzorhynchus Series (Harbach, 2004; Rattanaarithikul *et al.*, 2006). It is one of the most abundant anophelines distributed throughout Thailand (Reid, 1968; Harrison, 1980; Scanlon *et al.*, 1968). It was incriminated as a natural vector of *Plasmodium vivax* and Brugian filariasis, due to *Brugia malayi* in Indonesia (Atomosoedjono *et al.*, 1976; Kirnowardoyo, 1985), whereas it has also been considered formerly as a suspected vector of malaria and/or Brugian filariasis in Thailand (Iyengar, 1953; Griffith, 1955). However, *An. barbirostris/campestris* has been reported recently as a probable vector of malaria in Pa Rai subdistrict, Aranyaprathet district, Sa Kaeo province, southeastern Thailand (Limrat *et al.*, 2001). Based on the identification of pupal skins, Apiwathnasorn *et al.* (2002) subsequently incriminated *An. campestris* as a potentially natural vector of *P. vivax* in this locality. The increase in population, high biting density, anthropophilicity, high susceptibility to *P. vivax* and detection of circumsporozoite protein (Pv 247) (Somboon *et al.*, 1994; Frances *et al.*, 1996; Limrat *et al.*, 2001; Apiwathnasorn *et al.*, 2002), have caused this species group to be considered as a possible, important vector corresponding to the increase of *P. vivax* prevalence in Thailand (Sattabongkot *et al.*, 2004).

Three karyotypic forms of *An. barbirostris*, *i.e.*, Form A (X_2, X_3, Y_1), Form B (X_1, X_2, X_3, Y_2), and Form C (X_2, X_3, Y_3) have been reported in both sympatric and/or allopatric populations in Thailand, whereas Form D (X_2, Y_4) has been reported from only Java, Indonesia (Baimai *et al.*, 1995). In view of the *An. barbirostris* Form A being found sympatrically and/or allopatrically throughout Thailand, one might expect some degree of genetic incompatibility. Thus, the crossing experiments and comparative DNA sequencing of internal transcribed spacer 2 (ITS2), and mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I and II (COI and COII) of three strains of *An. barbirostris* Form A from Thailand are presented herein.

MATERIALS AND METHODS

Metaphase karyotype identification

Wild-caught, fully engorged females of *An. barbirostris* were collected from Ban Pang Mai Daeng, Maetang district, Chiang Mai province, northern Thailand; Ban Tha Lam Yai, Si Sawat district, Kanchanaburi province, southwestern Thailand; and Ban Pu Nam Ron, Nong Ya Plong district, Phetchaburi province, southwest Thailand (Fig. 1), by using buffalo-baited traps. They were allowed to individually oviposit eggs in isolated oviposits to establish isolines. The larvae were colonized further using the techniques described by Choochote *et al.* (1983) and Kim *et al.* (2003). Metaphase chromosomes were prepared from the early 4th-instar larval brains of F₁-and/or F₂-progenies of each isolate using the modification methods of Baimai (1977) and Choochote *et al.* (2001). The excised heads of 4th-instar larvae were incubated with 0.5 ml filtrate of 1% solution of dried *Gloriosa superba* rhizome powder (by soaking 0.1 g of rhizome powder in 10 ml of 0.85% sodium chloride solution for 6 hours at 27 ± 2 °C) in a 1 ml microcentrifuge tube (Eppendorf®) for two hours at room temperature. The incubated heads were left in 1% hypotonic sodium citrate solution on a siliconized slide for 10 minutes, and then the removed brains were transferred to a small drop of Carnoy's fixative (1 part of glacial acetic acid and 3 parts of absolute ethanol) on a siliconized slide for at least 2 minutes. A drop of 60% acetic acid was added and the organs torn and mixed well with dissecting needles. Then, a drop of cell suspension was placed on a clean microscopic slide on a warming plate at about 45-50 °C. The droplet of cells was released slowly from a Pasteur pipette to form a circular trail of monolayer cells. The dried slides were stained with 10% Giemsa in phosphate buffer pH 6.8 for 30 minutes, rinsed with deionized water, air-dried at room temperature and mounted in Permount® (Fisher, Fairlawn, NJ, USA). Identification of karyotypic forms followed the cytotaxonomic key of Baimai *et al.* (1995).

Crossing study

Crossing experiments were conducted among the three laboratory-raised isolines of three strains of *An. barbirostris* Form A. In order to rule out the difference of X-chromosomes, isolines having Y₁, X₂-chromosomes and heterozygous X₁, X₂-chromosomes were selected for crossing, i.e., Chiang Mai: ACA6, Kanchanaburi:

AKA5, and Phetchaburi: APA13 (Fig. 2). Crossing followed the method reported by Junkum *et al.* (2005). The salivary gland polytene chromosome of 4th instar larvae from the crosses was prepared using the techniques described by Kanda (1979). Identification of salivary gland polytene chromosome arms was based on previous reports of *An. barbirostris* (Chowdaiah *et al.* 1970). Low viability of the crosses (hatchability, survival, pupation and emergence), adult sex-distortion, abnormal morphology of the reproductive system, and asynapsis of polytene chromosomes were the criteria used to establish post-mating reproductive isolation.

DNA extraction, amplification and sequencing

Genomic DNA was extracted from a whole adult mosquito of each isoline (Chiang Mai: ACA4, ACA6, ACA8; Kanchanaburi: AKA2, AKA3, AKA5; Phetchaburi: APA13, APA18, APA33) using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The rDNA ITS2, COI, and COII regions were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers: ITS2A, 5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3' and ITS2B, 5'-TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3' for rDNA ITS2 (Beebe and Saul 1995), LCO1490 (f), 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' and HCO2198 (r), 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' for COI (Folmer *et al.* 1994), and LEU (f), 5'-TCTAATATGGCAGATTAGTGCA-3' and LYS (r), 5'-ACTTGCTTTCAGTCATCTAATG-3' for COII (Sharpe *et al.* 2000). PCR was carried out using 20 µl volumes containing 0.5 units of *Ex Taq* (Takara), 1X *Ex Taq* buffer, 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.25 µM of each primer, and 1 µl of the extracted DNA. The amplification profile comprised initial denaturation at 95 °C for 1 min, 30 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products of ITS2 were gel purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and cloned into pCR2.1 TOPO (Invitrogen). Sequences of several clones from each isoline were determined. PCR products of COI and COII were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and directly sequenced. Sequencing reactions were performed using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit and run on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequence data of this paper have been deposited in the GenBank nucleotide sequence database under accession numbers XXX-XXX (Table 2).

Sequence and phylogenetic analysis

Sequences of ITS2 were aligned using the CLUSTALW multiple alignment program (Thompson *et al.* 1994). Gap sites were excluded from the following analysis. Genetic distances were estimated using the Kimura two-parameter method (Kimura 1980). Construction of neighbor-joining trees (Saitou and Nei 1987) and the bootstrap test with 1,000 replications were conducted with the MEGA version 3.1 program (Kumar *et al.* 2004). For the phylogenetic trees of COI and COII, *An. gambiae* and *An. pullus* were used as an outgroup (AF417706, AY444349, NC_002084, AY444350). The phylogenetic tree of ITS2 was constructed as an unrooted tree, because an outgroup with easily aligned ITS2 was not available.

RESULTS

Metaphase karyotype identification

The investigation results of F₁- and/or F₂- progenies of 3, 5 and 3 isolines of *An. barbirostris* strains from Kanchanaburi, Phetchaburi and Chiang Mai provinces revealed that Form A (X₁, X₂, Y₁) was obtained from isoline number AKA2, AKA3, AKA5; APA13, APA14, APA18, APA33, APA34; and ACA4, ACA6, ACA8 in Kanchanaburi; Phetchaburi; and Chiang Mai provinces, respectively. The average summation of branches of seta 2-VI 11.9, 12.6 and 12.1 of Form A strains from Kanchanaburi, Phetchaburi and Chiang Mai provinces, respectively, were in the limit of topotypic *An. barbirostris* (6-18 branches), thus confirming the metaphase karyotype identification. The isoline number ACA6, AKA5 and APA13 were selected for the establishment of colonies, and used for crossing throughout the experiments.

Crossing study

Details of hatchability, pupation and emergence of parental, reciprocal and back-crosses among various strains of laboratory-raised isolines of *An. barbirostris* Form A are demonstrated in Table 1. All intra-isoline crosses, i.e., ACA x AKA, AKA x ACA, ACA x APA, APA x ACA, AKA x APA and APA x AKA, were fully infertile yielding inviable progenies with asynapsis of F₁-hybrid salivary gland polytene chromosomes, abnormal development of ovarian follicles, atrophied of accessory glands and testes, and sex distortion of adults. (Table 1, Fig. 3).

Sequence and phylogenetic analysis

ITS2, COI, and COII regions were sequences from 9 isolines of the three allopatric strains of *An. barbirostris*. The ITS2, COI and COII PCR- products are shown in Figs. 4 and 5. No length variation was detected for the COI (658 bp) and COII (685 bp) regions, but they varied for the ITS2 region. The results exhibited three clearly different sizes of PCR- product in the ITS2 region. On the basis of sequences and referring to different sizes of PCR products, we divided all isolines of *An. barbirostris* Form A of three allopatric strains into three groups, i.e., group A1 (1,861 bp) in 3 isolines (ACA4, ACA6 and ACA8) from Chiang Mai; group A2 (1,717 bp) in 3 isolines (APA13, APA18 and APA33) from Phetchaburi and group A3 (1,070 bp) in 3 isolines (AKA2, AKA3 and AKA5) from Kanchanaburi. The average percentages of base composition for the ITS2 sequence of all isolines were (range in parentheses): A, 18.4% (17.3- 19.7%); T, 27.2% (26.1-27.5%); G, 31.3% (30.9-31.8%) and C, 23.2% (22.4-24.3%). To find out the relationships of isolines, phylogenetic trees were constructed based on the rDNA ITS2, COI, and COII sequences (Figs. 6-8). The isolines belonging to each of the 3 groups (A1, A2 and A3) were clustered in each monophyletic lineage. Average genetic distances within and between the groups are in Table 3. For ITS2, although the 3 groups were well separated from one another (0.240-0.627), no sequence variation was found within each group and the tree showed that group A1 was more closely related to group A2 than to group A3 (Fig. 6). For COI and COII, few differences were observed within the groups (0.001-0.007), while significant separation (0.036-0.056) was shown between the groups (Table 3). Unlike ITS2, the COI and COII phylogenetic trees showed group A1 and group A2 were not closely related. The COI phylogenetic trees revealed that group A1 was more closely related to group A3 than group A2 (Fig. 7) and the COII phylogenetic tree revealed that group A2 was closed to group A3 rather than group A1 (Fig. 8).

DISCUSSION

Several intra-taxa of the Asian anopheline species, which had doubtful status of sibling species and/or subspecies, were subsequently confirmed by crossing experiments, e.g., *An. dirus* complex (Kanda *et al.*, 1981; Baimai *et al.*, 1987; Sawadipanich *et al.*, 1990), *An. minimus* complex (Somboon *et al.*, 2001, 2005;

Choochote *et al.*, 2002), *An. maculatus* complex (Takai *et al.*, 1987; Chabpunnarat, 1988), cytological races of *An. sinensis* Form A and B (Choochote *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2002), *An. pullus* Form A and B (Park *et al.*, 2003), and *An. aconitus* Form B and C (Junkum *et al.*, 2005). Given the wide-range distribution of *An. barbirostris* Form A (X_1 , X_2 , Y_1) in both sympatric and allopatric populations in Thailand, we performed crossing experiments among three allopatric strains of *An. barbirostris* Form A (Chiang Mai, Kanchanaburi, Phetchaburi) to determine the degree of genetic proximity. Additionally, the comparative DNA sequences of ITS2, COI and COII among them were included in this study.

The evidence of various degrees of reproductive isolations from the crossing studies among the three allopatric *An. barbirostris* Form A strains from Chiang Mai , Kanchanaburi and Phetchaburi strongly indicated the existence of at least three sibling species in the taxon of *An. barbirostris* by providing low embryonation, low- and/or non-hatched eggs, inviable progenies, asynapsis of F_1 -hybrid salivary gland polytene chromosomes, abnormal development of ovarian follicles, atrophied of accessory glands and testes , and sex distortion of adults. The large sequence divergences of ITS2 (0.240-0.627), COI (0.036-0.056) and COII (0.042-0.051) among the three strains of *An. barbirostris* Form A provided good supportive evidence. Based on the PCR product size of the ITS2 region (long to short), *An. barbirostris* Form A strains from Chiang Mai (1,861 bp), Phetchaburi (1,717 bp) and Kanchanaburi (1,070 bp) were tentatively designated as species A_1 , A_2 and A_3 , respectively.

Apart from the above results, the identical characteristics of metaphase karyotypes cannot be used robustly to differentiate the sibling species and/or subspecies status of *An. barbirostris* forms in Thai populations until additional tools of hybridization and/or molecular investigation are intensively used.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors sincerely thank the Biodiversity Research and Training Program (Grant No. BRT_249004) and the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D Program (Grant No. PHD/0052/2548) for financially supporting this research project, Dr. Niwes Nantachit, Dean of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for his interest in this research.

REFERENCES

- Apiwathnasorn C, Prommongkol S, Samung Y, Limrat D, Rojruthai B (2002) Potential for *Anopheles campestris* (Diptera: Culicidae) to transmit malaria parasites in Pa Rai subdistrict (Aranyaprathet, Sa Kaeo province), Thailand. J Med Entomol 39:583-586
- Atomosoedjono S, van Peenen PF, Putrali J (1976) *Anopheles barbirostris* (Van der Wulp) still an efficient vector of *Brugia malayi* in Central Sulawesi (Celebes), Indonesia. Trans R Soc Trop Med Hyg 70:259
- Baimai V (1977) Chromosomal polymorphisms of constitutive heterochromatin and inversions in *Drosophila*. Genetics 85:85-93
- Baimai V (1998) Heterochromatin accumulation and karyotypic evolution in some Dipteran insects. Zool Stud 32: 75-88
- Baimai V, Rattanaarithikul R, Kijchalao U (1995) Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: IV. The barbirostris and umbrosus species groups, subgenus *Anopheles* (Diptera: Culicidae). J Am Mosq Control Assoc 11:323-328
- Beebe NW, Saul A (1995) Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. Am J Trop Med Hyg 53:478-481
- Choochote W, Jitpakdi A, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Pitasawat B, Palakul K (1998) Isoenzyme study and hybridization of two forms of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 29:841-848

- Choochote W, Pitasawat B, Jitpakdi A, Rattanachanpichai E, Riyong D, Leemingsawat S, Wongkamchai S (2001) The application of ethanol-extracted *Gloriosa superba* for metaphase chromosome preparation in mosquitoes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 32:76-82
- Choochote W, Sucharit S, Abeywickreme W (1983) Experiments in crossing two strains of *Anopheles barbirostris* Van der Wulp 1884 (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 14:204-209
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-299
- Griffith ME (1955) A note on *Anopheles minimus* Theobald as a malaria vector in Thailand. *VI Intern Congr Microbiol* 5:565-567
- Harbach RE (2004) The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res* 94:537-553
- Harrison BA, Scanlon JE (1975) Medical entomology studies. II. The subgenus *Anopheles* in Thailand (Diptera: Culicidae). *Contrib Am Entomol Inst* 12:78
- Iyengar MOT (1953) Filariasis in Thailand. *Bull WHO* 9:731-766
- Junkum A, Komalamisra N, Jitpakdi A, Jariyapan N, Min GS, Park MH, Cho KH, Somboon P, Bates PA, Choochote W (2005) Evidence to support two conspecific cytological races of *Anopheles aconitus* in Thailand. *J Vector Ecol* 30:213-224
- Kim SJ, Choochote W, Jitpakdi A, Junkum A, Park SJ, Min GS (2003) Establishment of a self-mating mosquito colony of *Anopheles sinensis* from Korea. *Korean J Entomol* 33:267-271
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120
- Kirnowardoyo S (1985) Status of *Anopheles* malaria vectors in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 16:129-132
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163
- Limrat D, Rojruthai B, Apiwathnasorn C, Samung Y, Prommongkol S (2001) *Anopheles barbirostris/campestris* as a probable vector of malaria in

- Aranyapraphet, Sa Kaeo province. Southeast Asian J Trop Med Public Health 32:739-744
- Min GS, Choochote W, Jitpakdi A, Kim SJ, Jung J, Junkum A (2002) Intraspecific hybridization of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) strains from Thailand and Korea. Mol Cells 14:198-204
- Norris DE (2002) Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. Int J Parasitol 32: 1607-1615
- Park SJ, Choochote W, Jitpakdi A, Junkum A, Kim SJ, Jariyapan N, Park JW, Min GS (2003) Evidence for a conspecific relationship between two morphologically and cytologically different Forms of Korean *Anopheles pullus* mosquito. Mol Cells 14:354-360
- Parkewitz SM, Wesson DM, Collins FH (1993) The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. Insect Mol Biol 2:247-257
- Rattanakrithikul R, Harrison BA, Harbach RE, Panthusiri P, Coleman RE (2006) Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand IV. *Anopheles*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 37(Suppl 2):1-128
- Reid JA (1962) The *Anopheles barbirostris* group (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res 53:1
- Reid JA (1968) Anopheline mosquitoes of Malaya and Borneo. Stud Inst Med Res Malaya 31:1-520
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406-425
- Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L (2004) *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? Trends Parasitol 20:192-198
- Sharpe RG, Harbach RE, Butlin RK (2000) Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). Syst Entomol 25:263-272
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673-4680

Table 1 Cross-mating among three isolines of *An. barbirostris* Form A.

Crosses (Female x Male)	Total eggs (No.) ^a	Embryonation rate ^b	No.hatched (%)	No.pupation (%)	No.emergence (%)	No. from total emergence (%)	
						Female	Male
ACA x ACA	374 (159, 215)	78	276 (73.80)	207 (75.00)	203 (98.07)	95 (46.80)	108 (53.20)
AKA x AKA	413 (176, 237)	75	335 (81.11)	322 (96.12)	306 (95.03)	144 (47.06)	162 (52.94)
APA x APA	477 (172, 305)	84	385 (80.71)	326 (84.68)	267 (81.90)	112 (41.95)	155 (58.05)
ACA x AKA	364 (152, 212)	32	26 (7.14)	-	-	-	-
AKA x ACA	377 (182, 195)	10	-	-	-	-	-
ACA x APA	400 (141, 259)	76	312 (78.00)	190 (60.90)	85 (44.74)	54 (63.53)	31 (36.47)
APA x ACA	523 (251, 272)	71	214 (40.92)	118 (55.14)	72 (61.02)	64 (88.89)	8 (11.11)
AKA x APA	411 (117, 294)	49	2 (0.49)	-	-	-	-
APA x AKA	299 (98, 201)	91	209 (69.90)	1 (0.48)	-	-	-

^a Two selected egg-batches of inseminated females from each cross

^b Dissection from 100 eggs.

Table 2 Karyotypic forms of *An. barbirostris* Forms A, and their GenBank accession numbers.

Strain	Group	Isoline No.	Length of ITS2 (bp)	Region	Genbank accession number			Reference
					ITS2	COI	COII	
<i>An. barbirostris</i> Chiang Mai	A1	ACA4	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		ACA6	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		ACA8	1,861	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
Phetchaburi	A2	APA13	1,717	ITS2, COI, COII	AB331551	AB331570	AB331589	This study
		APA18	1,717	ITS2, COI, COII	AB331553	AB331572	AB331591	This study
		APA33	1,717	ITS2, COI, COII	AB331554	AB331573	AB331592	This study
Kanchanaburi	A3	AKA2	1,070	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		AKA3	1,070	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
		AKA5	1,070	ITS2, COI, COII	XXX-XXX	XXX-XXX	XXX-XXX	This study
<i>An. barbirostris</i> *				COI		AF116836		Oshaghi et al. (unpublished data)
				COI		AY729982		Pradeep et al. (unpublished data)

* Karyotypic forms were not determined.

Table 3 Average genetic distances within and between groups A1, A2 and A3, for the ITS2, COI, and COII regions.

	ITS2	COI	COII
Within group			
A1	0.000	0.001	0.001
A2	0.000	0.001	0.001
A3	0.000	0.007	0.005
Between groups			
A1-A2	0.240	0.038	0.051
A1-A3	0.610	0.036	0.048
A2-A3	0.627	0.056	0.042

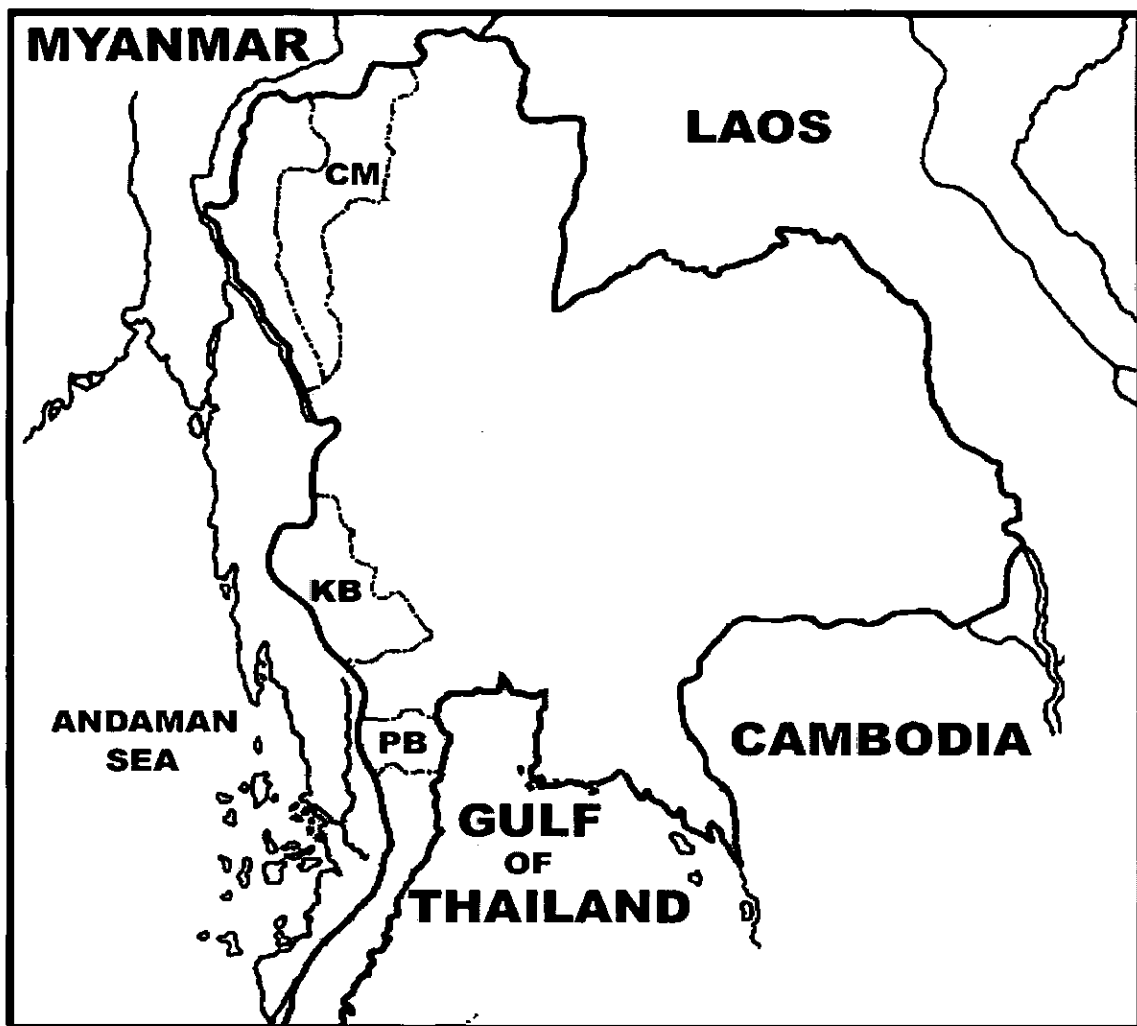


Fig. 1 Map of Thailand showing Chiang Mai (CM), Kanchanaburi (KB), and Phetchaburi (PB) where mosquito collections were performed. Chiang Mai province is situated on latitude $18^{\circ} 47' N$ and longitude $98^{\circ} 59' E$ in northern Thailand. Kanchanaburi province is situated on latitude $14^{\circ} 01' N$ and longitude $99^{\circ} 32' E$ in southwestern Thailand. Phetchaburi province is situated on latitude $13^{\circ} 09' N$ and longitude $100^{\circ} 04' E$ in southwest Thailand.

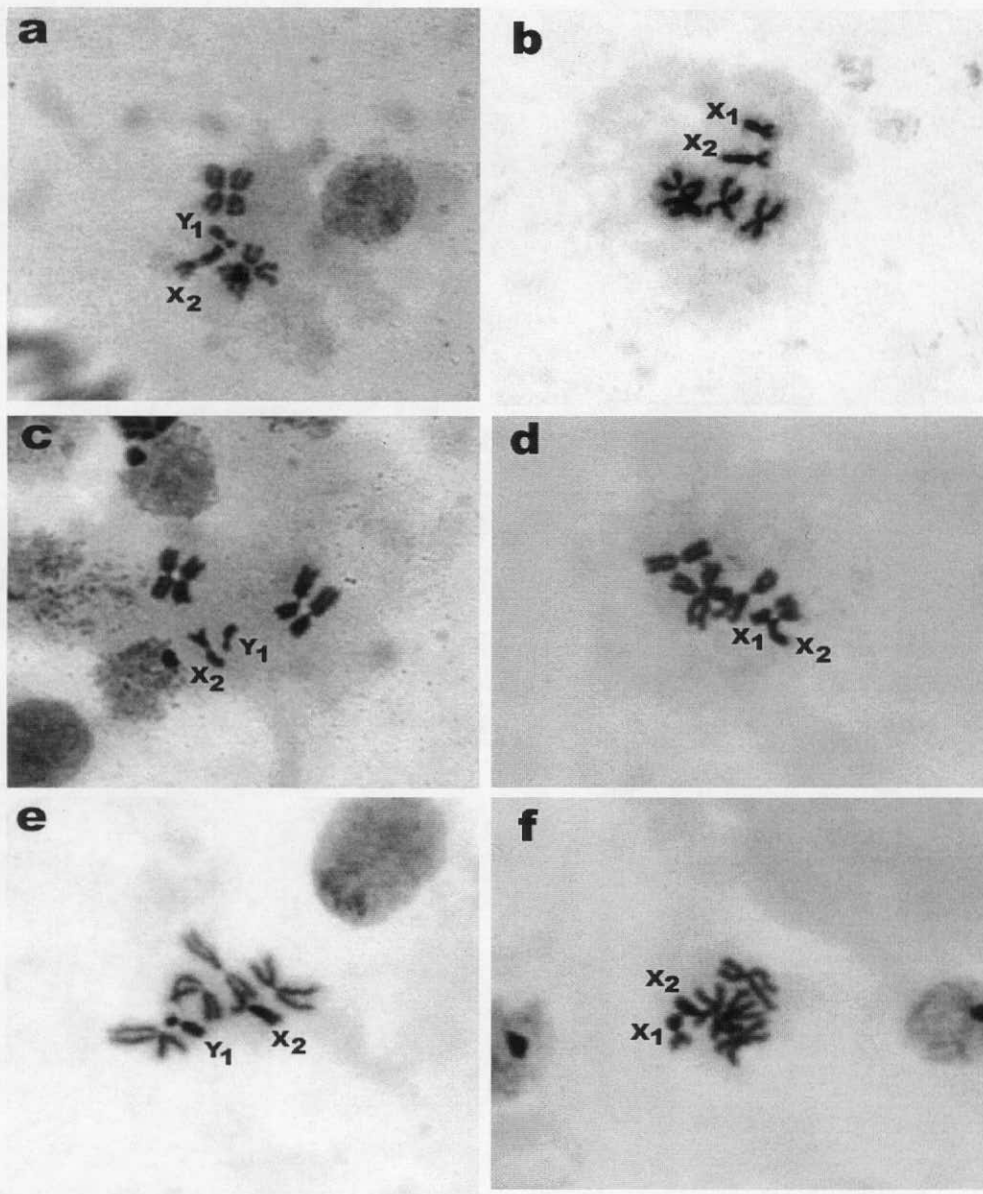


Fig. 2 Metaphase karyotypes of *An. barbirostris* Form A. Male larval chromosomes: (a) X_2Y_1 (Chiang Mai); (c) X_2Y_1 (Kanchanaburi); (e) X_2Y_1 (Phetchaburi). Female larval chromosomes: (b) heterozygous X_1X_2 (Chiang Mai); (d) heterozygous X_1X_2 (Kanchanaburi); (f) heterozygous X_1X_2 (Phetchaburi).

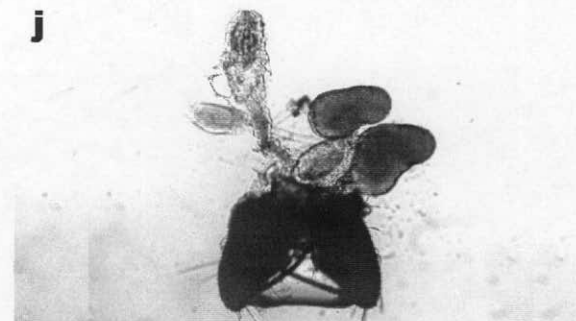
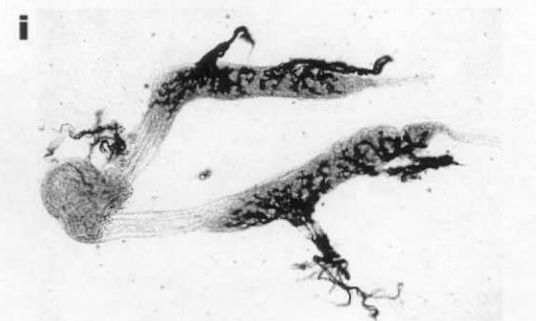
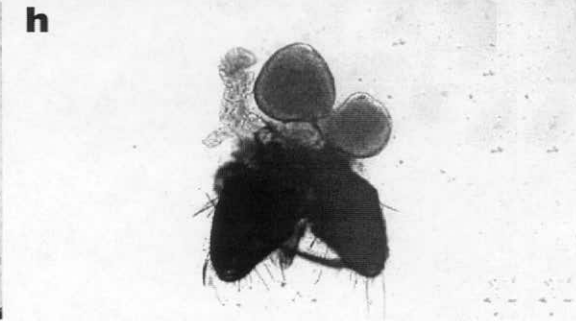
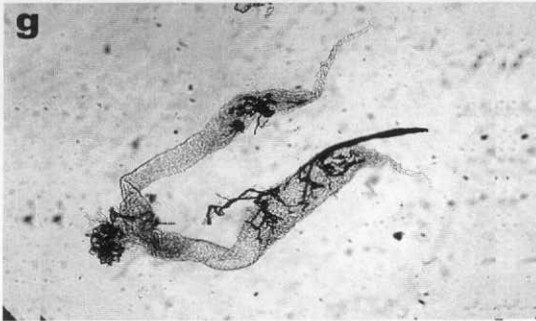
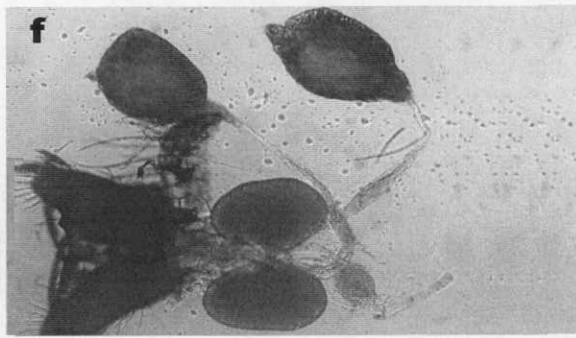
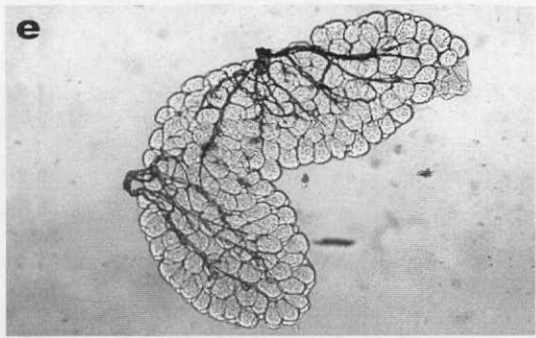
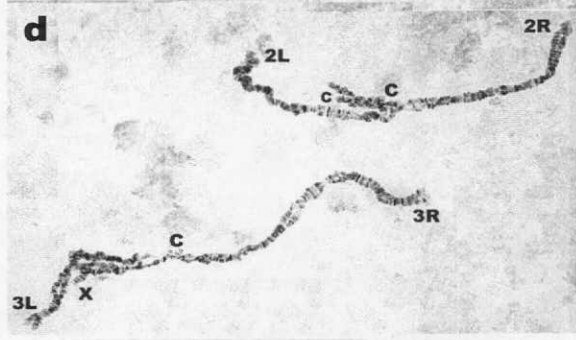
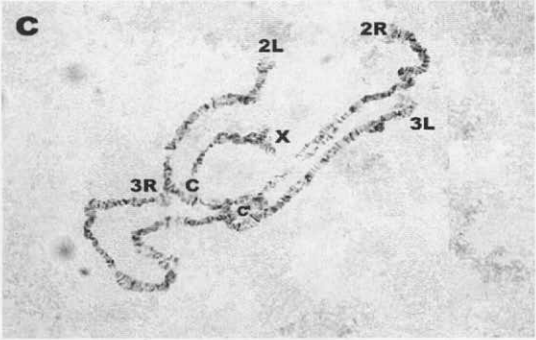
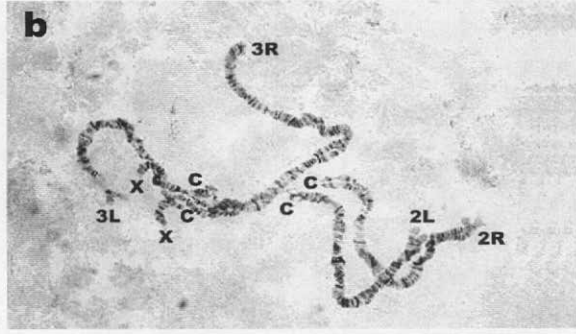
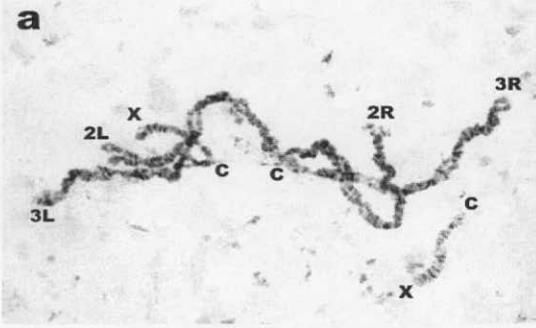


Fig. 3 Salivary gland polytene chromosomes of 4th larvae, ovaries and testes of parental and F₁-hybrids from crosses among three strains *An. barbirostris* Form A. (a) Asynaptic salivary gland polytene chromosome from female Form A (Chiang Mai) x male Form A (Kanchanaburi). (b) Asynaptic salivary gland polytene chromosome from female Form A (Chiang Mai) x male Form A (Phetchaburi). (c) Asynaptic salivary gland polytene chromosome from female Form A (Phetchaburi) x male Form A (Chiang Mai). (d) Asynaptic salivary gland polytene chromosome from female Form A (Phetchaburi) x male Form A (Kanchanaburi). (e) Normal development of ovarian follicles of female Form A (Chiang Mai). (f) Normal development of accessory glands and testes of male Form A (Phetchaburi). (g) Abnormal development of ovarian follicles from female Form A (Chiang Mai) x male Form A (Phetchaburi). (h) Atrophy of accessory glands and testes from female Form A (Chiang Mai) x male Form A (Phetchaburi). (i) Abnormal development of ovarian follicles from female Form A (Phetchaburi) x male Form A (Chiang Mai). (j) Atrophy of accessory glands and testes from female Form A (Phetchaburi) x male Form A (Chiang Mai). Note: Testes are absent because vasa deferentia were fragile, causing the testes to detach during preparation.

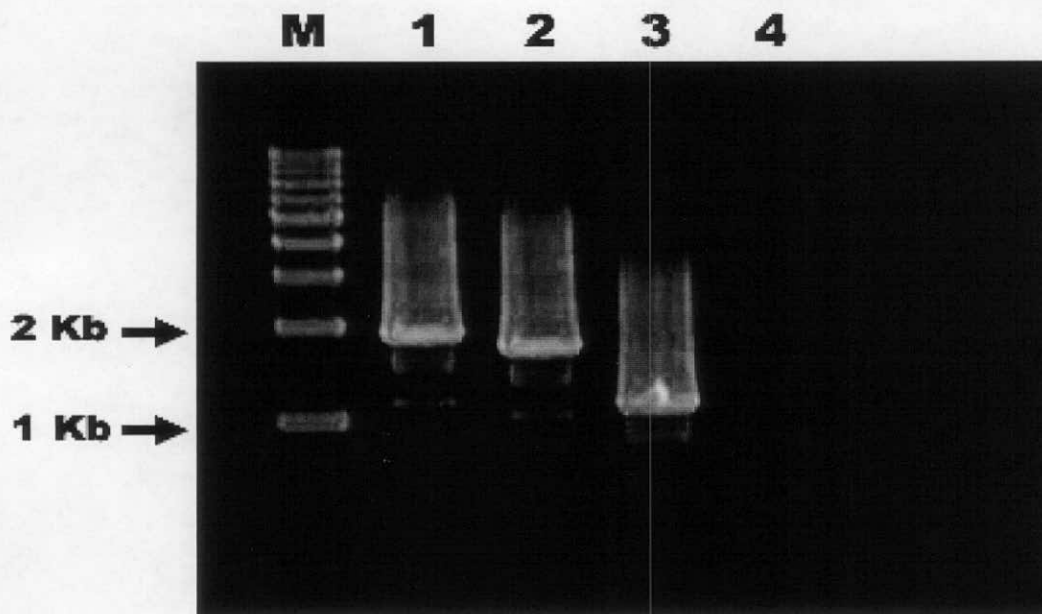


Fig. 4 Amplification of the entire internal transcribed spacer 2 (ITS2) for three allopatric strains of *An. barbirostris* Form A on a 1% agarose gel. Lane 1, Form A (Chiang Mai strain); lane 2, Form A (Phetchaburi strain); lane 3, Form A (Kanchanaburi strain); lane 4, negative control. DNA molecular weight markers (Kb) were loaded in lane M.

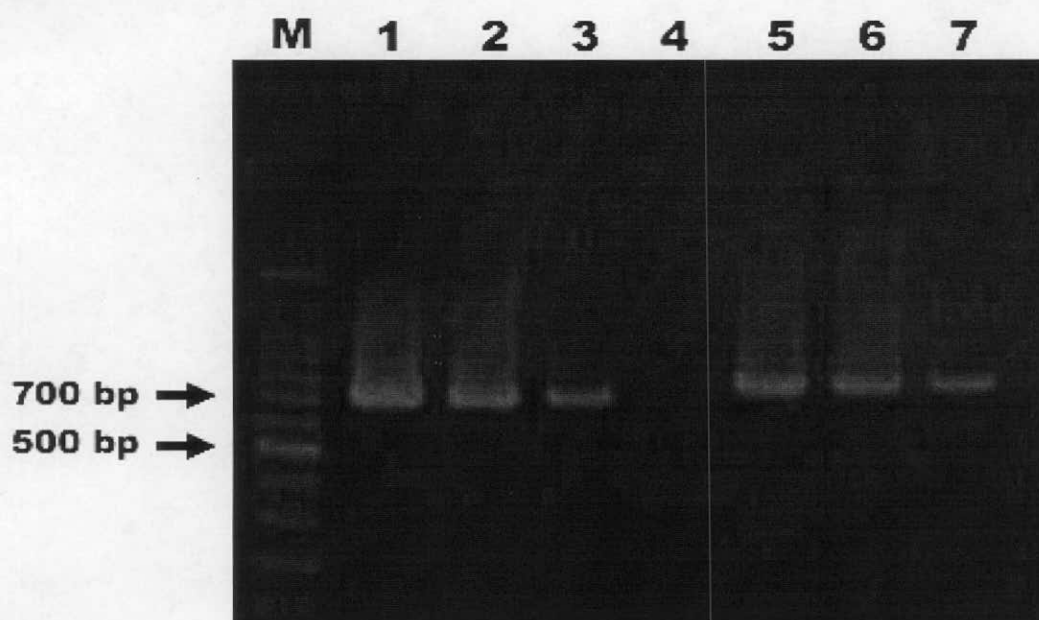


Fig. 5 Amplification of the COI and COII PCR products for three allopatric strains of *An. barbirostris* Form A on a 1% agarose gel. COI (lane 1-3): lane 1, Form A (Chiang Mai strain); lane 2, Form A (Phetchaburi strain); lane 3, Form A (Kanchanaburi strain); lane 4, negative control. COII (lane 5-7): lane 5, Form A (Chiang Mai strain); lane 6, Form A (Phetchaburi strain); lane 7, Form A (Kanchanaburi strain); DNA molecular weight markers (bp) were loaded in lane M.

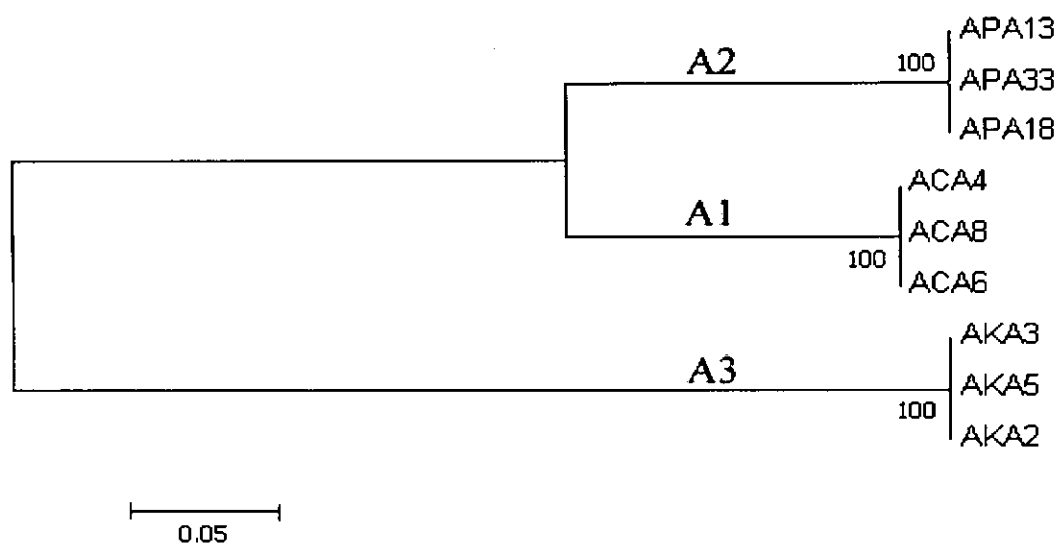


Fig. 6 Phylogeny of the three allopatric strains of *An. barbirostris* Forms A (Chiang Mai: ACA4, ACA6, ACA8; Kanchanaburi: AKA2, AKA3, AKA5; Phetchaburi: APA13, APA18, APA33) based on ITS2. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).

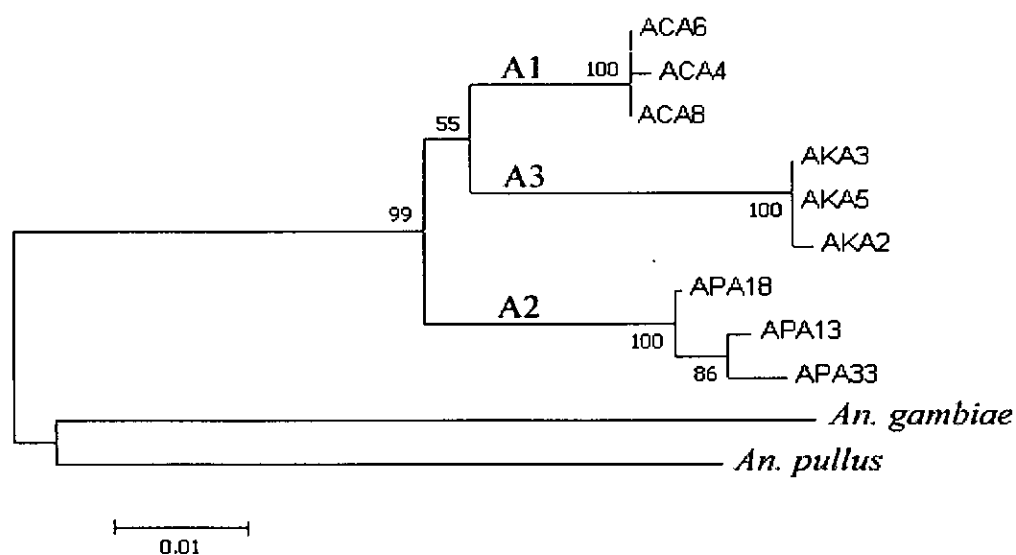


Fig. 7 Phylogeny of the three allopatric strains of *An. barbirostris* Forms A (Chiang Mai: ACA4, ACA6, ACA8; Kanchanaburi: AKA2, AKA3, AKA5; Phetchaburi: APA13, APA18, APA33) based on COI. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).

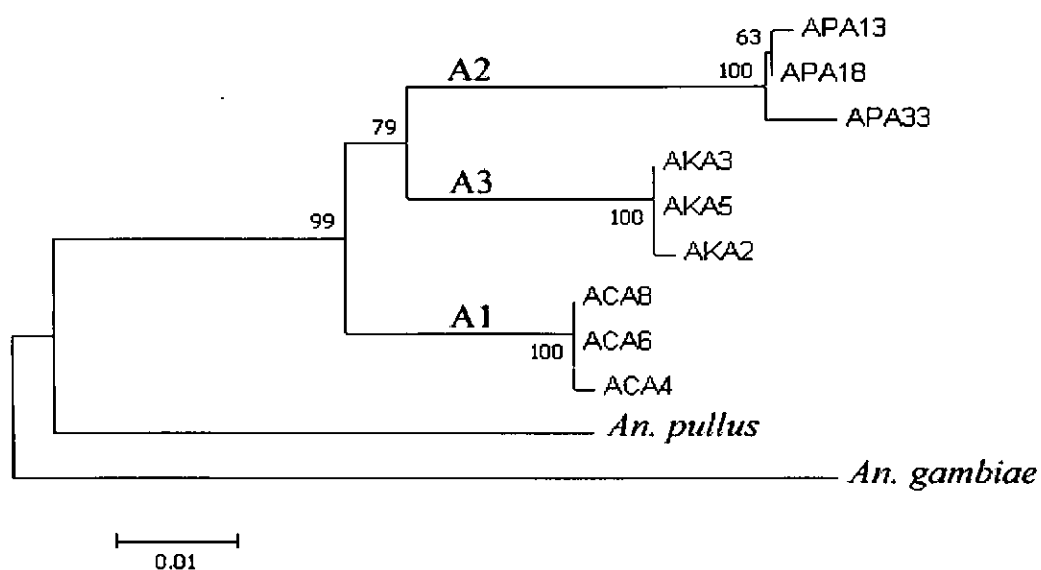


Fig. 8 Phylogeny of the three allopatric strains of *An. barbirostris* Forms A (Chiang Mai: ACA4, ACA6, ACA8; Kanchanaburi: AKA2, AKA3, AKA5; Phetchaburi: APA13, APA18, APA33) based on COII. The tree shown was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).