รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย

โครงการ
การสร้างกุญแจเพื่อวินิจฉัยยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles aconitus* ที่มีคาริโอไทป์สามรูปแบบและการหารูปแบบที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย

โดย รองศาสตราจารย์เวช ชูโชติ และคณะ

เมษายน พ.ศ. 2549

สัญญาเลขที่ BRG/14/2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสร้างกุญแจเพื่อวินิจฉัยยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles aconitus* ที่มีคาริโอไทป์สามรูปแบบและการหารูปแบบที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย

คณะผู้วิจัย	**สังกัด**
1. รศ.เวช ชูโชติ	**ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**
2. รศ.ดร.นฤมล โกมลมิศร์	**ภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล**
3. รศ.ดร.อัจฉรียา จิตต์ภักดี	**ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**
4. ผศ.ดร.นริศรา จริยะพันธุ์	**ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทุนวิจัยในเรื่องนี้ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. นิพนธุ์ ตุวานนท์ อดีตอธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รศ.นพ. ปิยะ เนตรวิเชียร อดีตคณะบดีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศ.นพ. สุพจน์ วุฒิการณ์ คณบดีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ รศ.ดร. อุดม ชัยทอง หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุญาตและสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ Prof. Dr. Julian M Crampton และ Prof. Dr. Paul A Bates, Liverpool School of Tropical Medicine ที่ช่วยให้คำปรึกษาแนะนำการทำวิจัยอย่างดียิ่ง

Abstract

ภาษาไทย:

ได้จับยุง *Anopheles aconitus* จากจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และ เพชรบุรี มาเลี้ยงแบบ iso-female lines (isolines) เพื่อวินิจฉัยรูปแบบคาริโอไทป์ จากการวินิจฉัยยุงทั้งหมด 96 isolines พบคาริโอไทป์รูปแบบ C จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน 5 isolines รูปแบบ B จากจังหวัดเพชรบุรี 4 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ 48 isolines และรูปแบบ C จากจังหวัดเชียงใหม่ 41 isolines

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบขนาดของไข่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ และผิวของไข่ยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน เพชรบุรี และเชียงใหม่ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกวาด พบว่ามี intraspecific variations ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบและ/หรือ strains ของยุง คือ float width [36.77 $\pm$ 2.30 μm (Form C: Chiang Mai strain) = 38.49 $\pm$ 2.78 μm (Form B: Chiang Mai strain) = 39.06 $\pm$ 2.37 μm (Form B: Phet Buri strain) > 32.40 $\pm$ 3.52 μm (Form C: Mae Hong Son strain) ($F = 11.73$, $P < 0.05$)] และ number of posterior tubercles on deck [2.40 $\pm$ 0.52 (Form B: Phet Buri strain) = 2.70 $\pm$ 0.82 (Form B: Chiang Mai strain) < 3.10 $\pm$ 0.32 (Form C: Chiang Mai strain) = 3.20 $\pm$ 0.42 (Form C: Mae Hong Son strain) ($H = 11.43$, $P < 0.05$)] สำหรับผิวของไข่ซึ่งได้แก่ contour of entire egg, float ribs, large-lobed tubercles on deck, small tubercles on deck and in the area covered by floats, inner and outer surface of frill, micropylar orifice, and outer chorionic tubercles on entire eggs พบว่าไม่มีความแตกต่างที่จะใช้แยก form-specific หรือ strain-specific characteristics ได้

ผลการศึกษาเปรียบเทียบ band to band ของแขน chromosomes (X, 2R, 2L, 3R, 3L) เดียวกันของ ovarian nurse cell polytene chromosomes ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B จากจังหวัดเพชรบุรี 4 isolines และรูปแบบ C จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 isolines และจากจังหวัดเชียงใหม่ 20 isolines กับ standard map ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B จากจังหวัดเชียงใหม่ ไม่พบความแตกต่างของ chromosomal rearrangements ที่มีความสัมพันธ์กับ karyotype variations การศึกษาเพื่อหาความแตกต่างทางไอโซเอ็นไซม์ของยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวอ่อนระยะที่ 4 ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จากทั้งสามจังหวัด ด้วยไอโซเอ็นไซม์ทั้งหมด 19 ชนิด พบไอโซเอ็นไซม์ที่สามารถอ่านและวิเคราะห์ผลได้ 16 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบผลของ allelic frequencies ของไอโซเอ็นไซม์ 10 ชนิด 16 loci ของตัวอ่อนระยะที่ 4 และไอโซเอ็นไซม์ 11 ชนิด 13 loci ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ไม่พบไอโซเอ็นไซม์ที่มี fixed different loci ที่สามารถใช้เป็น enzyme marker ในการแยกยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C ได้ ได้ทดลองผสมข้ามพันธุ์ระหว่างยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จากทั้งสามจังหวัด พบว่ามีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ดี และให้ F_1-hybrids ที่มี synaptic salivary gland polytene chromosomes จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ของ DNA ที่ตำแหน่งต่างๆ ของ rDNA (ITS1, ITS2), mt DNA (COI, COII) และ D3 regions ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาในยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จากทั้งสามจังหวัด พบว่ามีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ต่ำมาก คือ 0.15-0.8% ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาวิจัยแบบสหวิทยาการในส่วนนี้ ทำให้ได้ข้อสรุปว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C เป็น conspecific cytological races

ได้นำ mixed colony ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี และแม่ฮ่องสอน มาศึกษาการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* โดยเปรียบเทียบกับยุงพาหะหลัก *An. dirus* B และ *An. minimus* A และ C จากการวิเคราะห์ผลของ oocyst และ sporozoite rates ในวันที่ 8 และ 12 หลังจากยุงกินเลือดที่มีระยะ gametocyte ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* พบว่ายุง *An. aconitus* มีความสามารถในการยอมรับเชื้อไม่แตกต่างจากยุงพาหะหลัก *An. minimus* A และ C ผลเพิ่มเติมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C มี sporozoite-like crystals ใน median lobe ของ salivary glands ที่อาจเป็นสาเหตุให้วินิจฉัยผิดพลาดเป็น true sporozoites ได้ และเป็นข้อควรระวังในการวินิจฉัย sporozoites ใน salivary glands ทั้งของยุงที่ทดสอบการติดเชื้อในห้องทดลองและยุงที่ติดเชื้อในภาคสนาม

ได้ศึกษาความชุกชุมและนิสัยในการเข้ากัดกินเลือดของยุง *An. aconitus* ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2548 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549 พบว่ามียุง *An. aconitus* ชุกชุมระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายน และมีความชุกชุมสูงสุด (peak) ในเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงเดือนที่มีการเปลี่ยนจากฤดูฝนเป็นฤดูหนาว และความชุกชุมของยุงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณน้ำฝน จากการวิเคราะห์ข้อมูลของการเข้ากัดคนและกระบือในแต่ละชั่วโมง พบว่ายุง *An. aconitus* มีนิสัยในการเข้ากัดคนและกระบือเฉพาะตอนหัวค่ำเท่านั้น และชอบกัดกระบือมากกว่าคน โดยมีช่วงเวลาในการเข้ากัดตั้งแต่หกโมงเย็นถึงสองทุ่ม และไม่พบ หรือพบน้อยมากที่ยุง *An. aconitus* จะเข้ากัดคนและกระบือในช่วงเวลาอื่น ๆ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า รูปแบบของการเข้ากัดคนและสัตว์เป็นแบบ unimodal pattern เท่านั้น จากการผ่ารังไข่ของยุงทั้งหมด 1,139 ตัว เพื่อศึกษา parity พบว่ายุง *An. aconitus* มี parous rate เท่ากับ 51.19% มีพิสัยของ parous rate ระหว่าง 35.85% ถึง 75% สำหรับ parous rate ของยุงในเดือนที่มีประชากรชุกชุม คือ เดือนสิงหาคม กันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน พบว่ามี parous rates เท่ากับ 56.69%, 42.86%, 56.10% และ 61.57% ตามลำดับ จากการผ่ายุงทั้งหมด 1,198 ตัว เพื่อตรวจหา oocyst จากกระเพาะอาหาร และ sporozoite จากต่อมน้ำลาย พบว่ามียุงที่กัดกระบือเพียง 2 ตัว (0.17%; 2/1,198) เท่านั้น ที่พบ oocysts บริเวณผนังด้านนอกของกระเพาะอาหาร สำหรับต่อมน้ำลายที่ผ่าได้จากยุงทั้งหมด 1,198 ตัว ไม่พบ sporozoite ในต่อมน้ำลายเลย

ภาษาอังกฤษ:

Iso-female lines (isolines) of *Anopheles aconitus* collected from Mae Hong Son, Phet Buri and Chiang Mai Province were successfully identified to karyotypic forms. The results of identification revealed that *An. aconitus* Form B (X_1, X_2, Y_2) was obtained from 4 and 48 isolines in Phet Buri and Chiang Mai Province, respectively, and Form C (X_1, X_2, Y_3) was recovered from 3 and 41 isolines in Mae Hong Son and Chiang Mai Province, respectively.

Comparative morphometric and morphological studies of eggs under scanning electron microscope (SEM) were undertaken in the three strains of two karyotypic forms of *Anopheles aconitus*, i.e., Form B (Chiang Mai and Phet Buri strains) and Form C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains). Morphometric examination revealed the intraspecific variation with respect to the float width [36.77 ± 2.30 μm (Form C: Chiang Mai strain) = 38.49 ± 2.78 μm (Form B: Chiang Mai strain) = 39.06 ± 2.37 μm (Form B: Phet Buri strain) > 32.40 ± 3.52 μm (Form C: Mae Hong Son strain)] and number of posterior tubercles on deck [2.40 ± 0.52 (Form B: Phet Buri strain) = 2.70 ± 0.82 (Form B: Chiang Mai strain) < 3.10 ± 0.32 (Form C: Chiang Mai strain) = 3.20 ± 0.42 (Form C: Mae Hong Son strain)], whereas the surface topography of eggs among the three strains of two karyotypic forms were morphologically similar.

Comparing band to band on the same arm of ovarian nurse cell polytene chromosomes of *An. aconitus* Form B (Phet Buri: 4 isolines) and C (Mae Hong Son: 3 isolines, Chiang Mai: 20 isolines) to the standard chromosome mapping of *An. aconitus* Form B (Chiang Mai: 20 isolines), no major chromosomal rearrangements that related to the karyotype variations were demonstrated. The investigations on allelic frequencies of 4th stage larvae and adult females of 3 (Form C: Mae Hong Son), 4 (Form B: Phet Buri), 41 (Form C: Chiang Mai) and 48 (Form B: Chiang Mai) isolines suggested that *An. aconitus* Form B and C of all strains have similar allelic frequencies. This was observed at 10 isoenzymes 16 loci in 4th stage larvae, and 11 isoenzymes 13 loci in adult females. Hybridization tests among the four laboratory-raised isolines of *An. aconitus* Form B (Chiang Mai and Phet Buri) and C (Chiang Mai and Mae Hong Son) employed by induced copulation. The results of crosses indicated that they were genetically compatible, providing viable progeny and completely synaptic salivary gland polytene

chromosomes. The complete sequences of rDNA internal-transcribed spacer 1 and 2 (ITS1, ITS2), and partial sequences of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I and II (COI and COII), and D3 regions from genomic DNA of *An. aconitus* Form B and C were identified. The results show that the consensus sequences of the five loci of the two forms are consistent with those of mosquitoes in the genus *Anopheles*. No intraindividual variation was detected, but intrapopulation variation was present with polymorphic sequences in some forms for each gene examined. The variation rates were approximately 0.15 to 0.8%. Based on evidence of no pre- and post-mating isolations, and nearly identical of DNA sequences of ITS1, ITS2, COI and COII, and D3 regions between *An. aconitus* Form B and C, we conclude that they are conspecific cytological races in the Thai population.

Four laboratory-raised colonies of two karyotypic forms of *Anopheles aconitus*, i.e., Form B (Chiang Mai and Phet Buri strains) and C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains), were experimentally infected with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* using an artificial membrane feeding technique and dissected 8 and 12 days after feeding for oocyst and sporozoite rates, respectively. The results revealed that *An. aconitus* Form B and C were susceptible to *P. falciparum* and *P. vivax*, i.e., Form B (Chiang Mai and Phet Buri strains/*P. falciparum* and *P. vivax*) and Form C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains/*P. vivax*). Comparative statistical analyses of the oocyst rates, average number of oocysts per infected midgut and sporozoite rates among all strains of *An. aconitus* Form B and C to the ingroup control vectors, *An. minimus* A and C, exhibited mostly no significant differences, confirming the high potential vector of the two *Plasmodium* species. The sporozoite-like crystals found in the median lobe of the salivary glands, which could be a misleading factor in the identification of true sporozoites in salivary glands were found in both *An. aconitus* Form B and C.

The seasonal abundance and nocturnal biting activity of *Anopheles aconitus*, the secondary vector of malaria in Thailand, were investigated during January 2005 to February 2006. Seasonal changes in abundance were mainly influenced by monthly rainfall, with a major peak occurring from August to November. This species preferred to bite on animals rather than humans, and favored biting humans outdoors more than indoors. The biting activity on both humans and animals exhibited high

densities at dusk and/or evening, but there were very low and erratic bitings throughout the remaining night-hours. Thus, a unique unimodal pattern, with a peak occuring during 1800-2000 hours was clearly seen in *An. aconitus*. Overall, the parous rate was 51.19% (35.85-75.00%). During the major peak of abundance (August to November), a high parous rate that ranged from 42.86-61.57 was observed. Out of 1,198 dissected stomaches, only 0.17% (2/1,198) were found infected with oocysts. There were no sporozoites detected in any of the 1,198 mosquito-dissected salivary glands.

Executive summary:

ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles aconitus* ซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ในประเทศไทย พบว่ามีรูปแบบของเมตาเฟสคาริโอไทป์ 3 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (X_1, X_2, Y_1), B (X_1, X_2, Y_2) และ C (X_1, X_2, Y_3) จากการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของยุงก้นปล่องชนิดอื่น ๆ ที่มีเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้หลายรูปแบบ พบว่ายุงก้นปล่องบางชนิดเป็นยุงกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน (species complex) และในแต่ละกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน จะประกอบด้วยสปีชีส์ที่เป็นพี่น้องกันหรือซิบลิงส์สปีชีส์ (sibling species) ที่แตกแขนงมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน มีลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ที่คล้ายคลึงกันมากจนยากแก่การจำแนกซิบลิงส์สปีชีส์ด้วยวิธีอนุกรมวิธาน (morphotaxonomy) ความสำคัญของซิบลิงส์สปีชีส์ คือ ในยุงกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนแต่ละกลุ่ม ซิบลิงส์สปีชีส์อาจมีความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคแตกต่างกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างในการกระจายของยุงในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค พฤติกรรมในการเข้ากัดกินเลือดคน พัฒนาการต่อการดื้อยาฆ่าแมลง การยอมรับเชื้อมาลาเรีย ฯลฯ

เนื่องจากยุง *An. aconitus* มีรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ได้หลายรูปแบบ ดังนั้นจุดประสงค์หลักของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ คือ การศึกษาถึงรูปแบบคาริโอไทป์ต่าง ๆ ของยุง *An. aconitus* มีผลต่อการเกิด 1) ความแปรปรวนของลักษณะสัณฐานวิทยาของยุงระยะต่าง ๆ โดยการศึกษา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกวาด 2) pre-mating barriers โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของโพลีทีนโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายและรังไข่ และด้วยวิธีการทางไอโซเอ็นไซม์ 3) post-mating barriers โดยวิธีการผสมข้ามพันธุ์และ/หรือข้ามสายพันธุ์ 4) ความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่ตำแหน่งต่างๆ ของ rDNA และ mtDNA ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา 5) ระดับความสามารถในการยอมรับเชื้อ *P. vivax* ในห้องปฏิบัติการ และ 6) นิสัยในการเข้ากัดกินเลือดคนและสัตว์ ซึ่งผลคาดหวังที่จะได้จากการศึกษาวิจัยแบบสหวิทยาการในครั้งนี้ จะนำไปสู่การสร้างกุญแจที่เป็นระบบ เพื่อที่จะใช้หารูปแบบคาริโอไทป์ของยุง *An. aconitus* ที่เป็นพาหะในการนำเชื้อ *P. vivax*

เนื้อหางานวิจัย:

1. สรุปงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาเสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.1 ได้วินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ของยุง *An. aconitus* สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 isolines เพชรบุรี 4 isolines และเชียงใหม่ 89 isolines

1.2 ได้ศึกษาเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัย และขนาดของไข่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ และผิวของไข่ยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน เพชรบุรี และเชียงใหม่ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกวาด เสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.3 ได้ศึกษาเปรียบเทียบ band ของแขน ovarian nurse cell polytene chromosomes ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C ทั้งสามสายพันธุ์ เสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.4 ได้ศึกษาเปรียบเทียบทางไอโซเอ็นไซม์ของตัวเต็มวัยและตัวอ่อนระยะที่ 4 ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C ทั้งสามสายพันธุ์ โดยใช้จำนวนเอ็นไซม์ทั้งหมด 19 ชนิด เสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.5 ได้ทำ hybridization test ระหว่างยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C ทั้งสามสายพันธุ์ เสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.6 ได้ศึกษาเปรียบเทียบ DNA sequences ของ ITS1, ITS2, D3, COI, COII, AT-rich และ *gua* (intron) ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และC ทั้งสามสายพันธุ์ เสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.7 ได้ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C ทั้งสามสายพันธุ์ ในการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* เสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.8 ได้ศึกษาความชุกชุมและนิสัยในการเข้ากัดกินเลือดของยุง *An. aconitus* โดยใช้คนเป็นเหยื่อล่อในบ้านและนอกบ้าน และใช้กระบือเป็นเหยื่อล่อห่างจากคนที่เป็นเหยื่อล่อนอกบ้าน 10 เมตร ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2548 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549 โดยทำการศึกษาเดือนละสองวันติดต่อกันเป็นเวลา 14 เดือน เสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.9 การศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาเพิ่มเติมนอกเหนือจากส่วนของงานวิจัยที่ระบุไว้ในโครงการ

1.9.1 ได้ศึกษาเปรียบเทียบ salivary gland protein patterns ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C เสร็จสมบูรณ์แล้ว

1.9.2 ได้ศึกษาเปรียบเทียบ DNA sequences เพื่อจำแนกยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C โดยวิธีการ conversion of RAPD markers into sequence characterized amplified region (SCARs) เสร็จสมบูรณ์แล้ว

2. วิธีการและผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย

2.1 การวินิจฉัยรูปแบบคาริโอไทป์

ได้จับยุง *An. aconitus* ที่บ้านปางไม้แดง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ บ้านโป่งกาน อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน และบ้านท่าเสลา อำเภอหนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี มาเพื่อวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ด้วยวิธีของ Choochote *et al*. (2001) จำนวน isolines ของยุงก้นปล่องชนิด *An. aconitus* ที่ได้ทำการวินิจฉัย รวมทั้งหมด 96 isolines เป็นรูปแบบ C 3 isolines จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน รูปแบบ B 4 isolines จากจังหวัดเพชรบุรี รูปแบบ B 48 และรูปแบบ C 41 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่

ลักษณะของ metaphase chromosomes ที่เตรียมได้จากรังไข่ (ovary) และอัณฑะ (testis) ที่ใช้แยกรูปแบบ B และ C ตามกุญแจของ Baimai *et al*. (1996) ได้แสดงไว้ใน Fig 1

2.2 การศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเพศเมียและตัวอ่อนระยะที่ 4 ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C ดังรายละเอียดของผลการศึกษาที่ได้แสดงไว้ใน Table 1, 2, 3 และ 4

วิธีการศึกษานั้นทำโดยการ mount ตัวอ่อนระยะที่ 4 บนสไลด์ด้วยน้ำยา Hoyer จากนั้นทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ผลจากการศึกษาขน 2-C, 3-C, 4-C, 3-T, O-IV, OV และ O-VI พบว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C มีพิสัยของ setal branching อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของยุง *An. aconitus* ตามกุญแจของ Harrison (1980)

สำหรับตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง นำมา pinned และศึกษาด้วย dissecting microscope ผลการศึกษาในตัวเต็มวัยพบว่า ยุง *An. aconitus* รูปแบบ B มีความแปรปรวนของสัณฐานวิทยาที่ มี proboscis ดำ 10.52% (4/38) มี presector pale spot ที่ปีกทั้งสองข้าง 10.52% (4/38) และไม่มี Median pale spot บน vein R_2 ที่ปีกทั้งสองข้าง 5.26% (2/38) ที่มีลักษณะเหมือนยุง *An. minimus* A ตามกุญแจของ Harrison (1980) ส่วนยุง *An. aconitus* รูปแบบ C ไม่มีความแปรปรวนของสัณฐานวิทยาดังกล่าวเลย จำนวน coeloconic sensillae บน antenna แต่ละปล้อง, palp ratios และ wing dimensions ของยุง *An. aconitus* ทั้งสองรูปแบบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อนำจำนวน coeloconic sensillae บน antenna แต่ละปล้องมาแสดงกราฟอย่างมีความสัมพันธ์กับ palp ratios (Fig 2) พบว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B สามารถแยกจากรูปแบบ C ได้ 23.68% (9/38)

การศึกษาเปรียบเทียบขนาดของไข่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ และผิวของไข่ยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน เพชรบุรี และจังหวัดเชียงใหม่ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกวาด

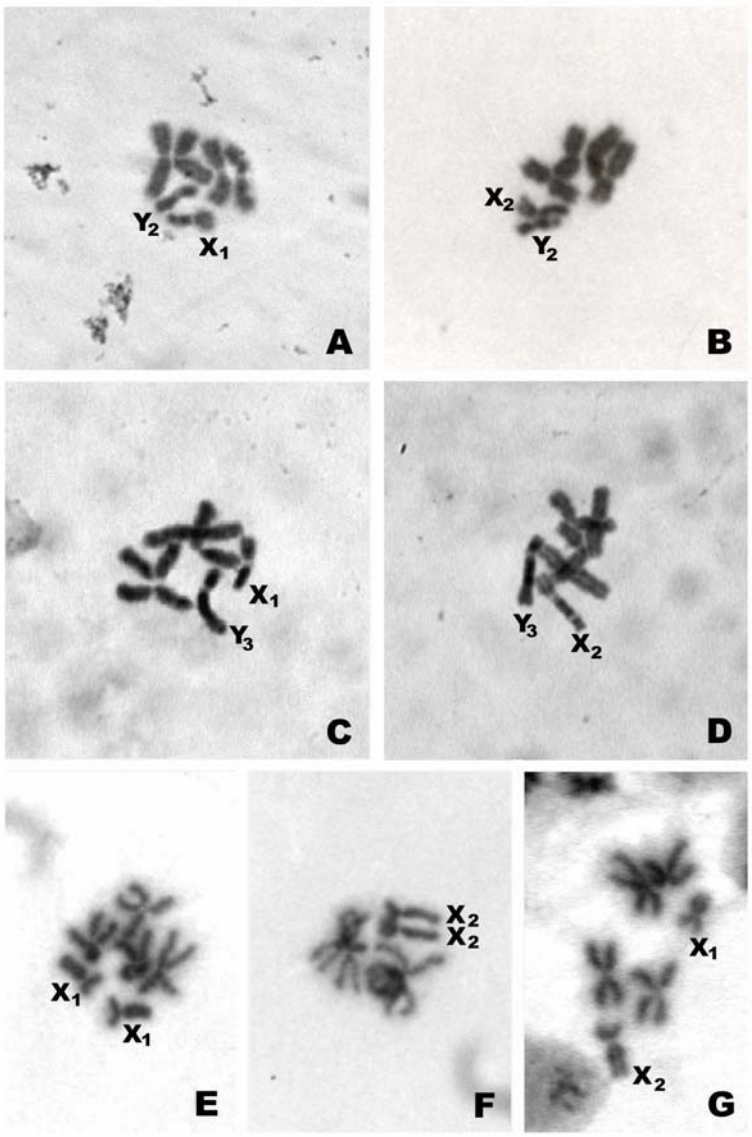


Fig 1 Metaphase karyotypes of *An. aconitus* Form B and C (Giemsa staining).Testis chromosomes; Form B: (A) Chiang Mai strain, showing X1, Y2-chromosomes; (B) Phet Buri strain, showing X2, Y2-chromosomes; Form C: (C) Chiang Mai strain, showing X1, Y3-chromosomes; (D) Mae Hong Son strain, showing X2, Y3-chromosomes. Ovary chromosomes: (E) showing homozygous X1, X1-chromosomes, (F) showing homozygous X2, X2-chromosomes, (G) showing heterozygous X1, X2-chromosomes. Note, all types of X-chromosomes were found in all forms and strains of *An. aconitus.*

Table 1 Comparative adult characters of *An. aconitus* Form B and C

Characters	Form B*	**Form C****
	No. (%)	**No. (%)**
Palpus		
Subapical dark band present (both)	25 (65.79)	23 (71.88)
Subapical dark band absent (one)	5 (13.16)	6 (18.75)
Subapical dark band absent (both)	8 (21.05)	3 (9.38)
Proboscis		
Entirely pale on distal 0.3-0.5	23 (60.53)	20 (62.50)
Partially pale on distal 0.3	11 (28.95)	12 (37.50)
Entirely dark	4 (10.52)	0 (0)
Wing		
Humeral pale spot absent (both)	36 (94.74)	31 (96.88)
Humeral pale spot present (one)	1 (2.63)	1 (3.12)
Humeral pale spot present (both)	1 (2.63)	0 (0)
Presector pale spot absent (both)	33 (86.84)	32 (100)
Presector pale spot present (one)	1 (2.63)	0 (0)
Presector pale spot present (both)	4 (10.52)	0 (0)
Median pale spot on vein R_2 present (both)	34 (89.47)	30 (93.75)
Median pale spot on vein R_2 absent (one)	2 (5.26)	2 (6.25)
Median pale spot on vein R_2 absent (both)	2 (5.26)	0 (0)
R base without dark scales (both)	38 (100)	32 (100)
Vein 1A with 3 dark spots (both)	35 (92.11)	30 (93.75)
Vein 1A with 2 dark spots (one)	1 (2.63)	1 (3.12)
Vein 1A with 2 dark spots (both)	2 (5.26)	1 (3.12)
Vein 1A with pale fringe (both)	30 (78.95)	24 (75.00)
Vein 1A with dark fringe (one)	5 (13.16)	4 (12.50)
Vein 1A with dark fringe (both)	3 (7.89)	4 (12.50)
Leg		
Fore tarsi with pale band at joints (both)	38 (100)	32 (100)

* 38 specimens examined, ** 32 specimens examined

Table 2 Mean distribution of coeloconic sensillae on antennal segments of *An. aconitus* Form B (n = 38), and C (n = 32).

Antennal Segment	*An. aconitus* Form		t
	B	C	
	$\overline{X} \pm$ SD (range)	$\overline{X} \pm$ SD (range)	
1	4.26 ± 1.06 (3-6)	4.25 ± 1.34 (2-6)	0.050*
2	4.76 ± 1.02 (3-7)	4.94 ± 0.98 (3-8)	0.266*
3	4.87 ± 0.81 (3-6)	5.13 ± 0.91 (3-7)	0.636*
4	4.76 ± 0.71 (3-6)	4.47 ± 0.76 (3-6)	0.417*
5	4.08 ± 0.85 (2-6)	4.09 ± 0.82 (2-6)	0.643*
6	3.61 ± 1.00 (2-6)	3.69 ± 0.78 (2-5)	0.075*
7	2.74 ± 0.83 (1-4)	2.19 ± 1.09 (0-4)	0.092*
8	0.71 ± 0.65 (0-2)	0.94 ± 0.72 (0-2)	0.727*
9	0.24 ± 0.49 (0-2)	0.16 ± 0.37 (0-1)	0.112*
10	0.03 ± 0.16 (0-1)	0 (0)	0.064*
11	0.05 ± 0.23 (0-1)	0 (0)	0.007**
12	0.03 ± 0.16 (0-1)	0.03 ± 0.18 (0-1)	0.808*
13	0 (0)	0 (0)	0

*P > 0.05, **P < 0.05

Table 3 Comparative mean numbers of coeloconic sensillae per antenna, palp ratios, and wing dimensions of *An. aconitus* Form B (n = 38) and C (n = 32)

An. aconitus Form	Average coeloconic sensillae per antenna (range)*	Average palp ratio (range)**	Wing dimension (range)	
			Length (mm)***	Width (mm)****
B	30.13 ± 4.95 (20-39)	0.74 ± 0.05 (0.56-0.83)	1.31 ± 0.04 (1.19-1.37)	0.49 ± 0.02 (0.43-0.52)
C	29.88 ± 4.26 (21-39)	0.75 ± 0.04 (0.64-0.85)	1.30 ± 0.06 (1.54-1.37)	0.48 ± 0.02 (0.43-0.50)

*t = 0.541, P> 0.05

**t = 0.421, P > 0.05

***t = 0.177, P> 0.05

****t = 0.499, P> 0.05

Table 4 Setal branching on larvae of *An. aconitus* Form B and C

Characters	**Form B***	Form C**
	$\overline{X} \pm$ SD (range)	$\overline{X} \pm$ SD (range)
2-C		
L	7.58 ± 3.49 (0-15)	9.16 ± 3.29 (1-14)
R	7.68 ± 3.42 (0-15)	8.84 ± 3.08 (0-14)
3-C		
L	3.66 ± 2.13 (0-7)	3.28 ± 1.67 (0-8)
R	3.13 ± 1.95 (0-7)	4.12 ± 1.86 (1-9)
4-C		
L	3.00 ± 0.99 (1-6)	3.03 ± 1.00 (1-5)
R	3.03 ± 0.79 (1-5)	3.25 ± 0.72 (2-5)
3-T		
L	11.82 ± 2.66 (8-18)	11.84 ± 2.10 (8-15)
R	11.82 ± 2.67 (6-18)	12.00 ± 2.30 (8-16)
O-IV		
L	1.24 ± 0.49 (1-3)	1.41 ± 0.50 (1-2)
R	1.32 ± 0.53 (1-3)	1.22 ± 0.42 (1-2)
O-V		
L	1.42 ± 0.50 (1-2)	1.50 ± 0.51 (1-2)
R	1.45 ± 0.50 (1-2)	1.47 ± 0.51 (1-2)
O-VI		
L	1.34 ± 0.48 (1-2)	1.50 ± 0.51 (1-2)
R	1.61 ± 0.64 (1-3)	1.53 ± 0.51 (1-2)

* 38 specimens examined

** 32 specimens examined

L = Left, R = Right

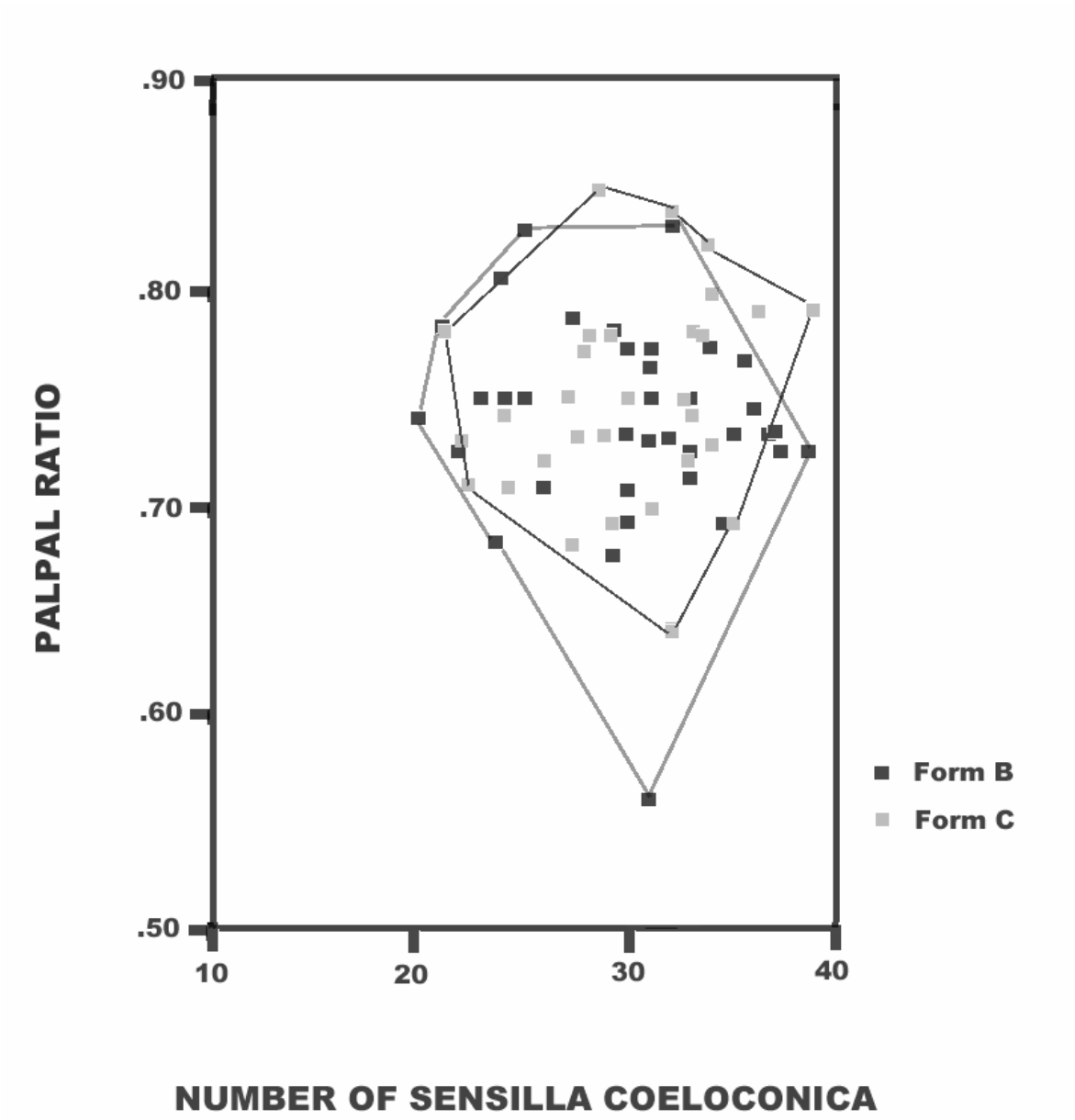


Fig 2 Scatter diagram of coeloconic sensilla and palp ratios in *An. aconitus* Form B (■) and C (□)

รายละเอียดการเปรียบเทียบขนาดของไข่ได้แสดงไว้ใน Table 5 รายละเอียดของผิวไข่ได้แสดงไว้ใน Fig 3-20

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบขนาดของไข่พบว่ามี intraspecific variations ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบและ/หรือ strains ของยุง คือ float width [36.77 ± 2.30 μm (Form C: Chiang Mai strain) = 38.49 ± 2.78 μm (Form B: Chiang Mai strain) = 39.06 ± 2.37 μm (Form B: Phet Buri strain) > 32.40 ± 3.52 μm (Form C: Mae Hong Son strain) ($F = 11.73$, $P < 0.05$)] และ number of posterior tubercles on deck [2.40 ± 0.52 (Form B: Phet Buri strain) = 2.70 ± 0.82 (Form B: Chiang Mai strain) < 3.10 ± 0.32 (Form C: Chiang Mai strain) = 3.20 ± 0.42 (Form C: Mae Hong Son strain) ($H = 11.43$, $P < 0.05$)]

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบผิวของไข่ซึ่งได้แก่ contour of entire egg, float ribs, large-lobed tubercles on deck, small tubercles on deck and in the area covered by floats, inner and outer surface of frill, micropylar orifice, and outer chorionic tubercles on entire eggs พบว่าไม่มีความแตกต่างที่จะใช้แยก form-specific หรือ strain-specific characteristics ได้

2.3 การศึกษาเปรียบเทียบ band ของ ovarian nurse cell polytene chromosomes

ยุงตัวเต็มวัยเพศเมียที่ได้จาก F_1 และ/หรือ F_2 ของแต่ละ isoline บางส่วนได้ให้กินเลือดหนูแฮมสเตอร์เพื่อนำ ovary ที่ได้จาก half gravid female มาเตรียม ovarian nurse cell polytene chromosomes ตามวิธีของ Green (1971) และ Green และ Hunt (1980)

ใช้ ovarian nurse cell polytene chromosomes ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B เป็น standard map ซึ่งได้แสดงไว้ใน Fig 21 ในการแบ่ง zone ในแต่ละแขน (arm) ของโครโมโซมได้แบ่งตาม Sharma *et al*. (1980) ซึ่งเป็นคณะนักวิจัยกลุ่มแรกที่ได้รายงาน standard map ของ salivary gland polytene chromosome ของยุง *An. aconitus* ซึ่งแขน X แบ่งได้ 6 zones (1-6) แขน 2R (2) แบ่งได้ 13 zones (7-19) แขน 2L (3) แบ่งได้ 9 zones (20-28) แขน 3R (4) แบ่งได้ 9 zones (29-37) และ แขน 3L (5) แบ่งได้ 9 zones (38-46)

ได้ศึกษาเปรียบเทียบ band to band ของแขน Chromosomes (X, 2R, 2L, 3R, 3L) เดียวกันของ ovarian nurse cell polytene chromosomes ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B จากจังหวัดเพชรบุรี 4 isolines และรูปแบบ C จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 isolines และจากจังหวัดเชียงใหม่ 20 isolines กับ standard map ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B จากจังหวัดเชียงใหม่ ไม่พบความแตกต่างของ chromosomal rearrangements ที่มีความสัมพันธ์กับ karyotype variations

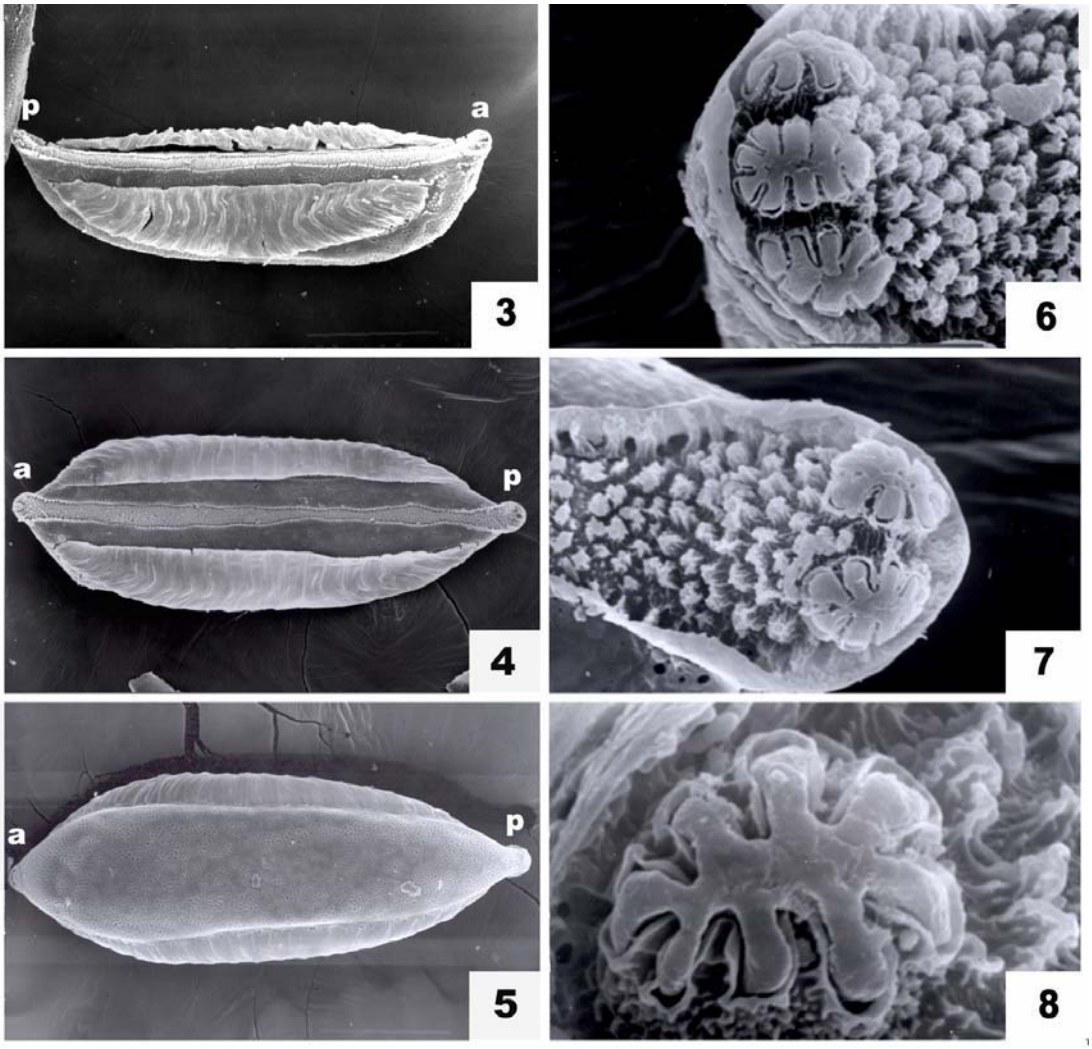
Table 5 Morphometric measurements and counts of float ribs and tubercles of eggs of *An. aconitus* Form B (Chiang Mai and Phet Buri strains) and C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains).

Experiments	Eggs of *An. aconitus* Form*			
	B		C	
	CM	PB	CM	MS
Measurements				
Entire length	361.99 ± 24.38	367.32 ± 19.22	359.61 ± 25.24	370.03 ± 21.66
	(334.80-404.20)	(337.53-395.87)	(329.19-400.03)	(312.52-389.61)
Width included floats	141.10 ± 14.90	137.93 ± 16.58	142.51 ± 4.30	136.68 ± 5.57
	(126.09-179.18)	(112.51-166.68)	(137.51-150.01)	(129.18-145.85)
Float length	309.05 ± 15.39	322.11 ± 9.63	316.48 ± 19.31	313.57 ± 18.77
	(280.45-331.28)	(302.11-331.28)	(279.19-337.53)	(270.85-335.44)
Float width	38.49 ± 2.78	39.06 ± 2.37	36.77 ± 2.30	32.40 ± 3.52
	(34.78-43.75)	(35.42-43.75)	(33.34-39.59)	(25.00-37.50)
Counts				
No. float ribs	16.90 ± 1.37	15.50 ± 1.51	16.40 ± 1.78	15.60 ± 1.26
	(15-19)	(13-18)	(13-19)	(14-17)
No. anterior tubercles	2.40 ± 0.52	2.70 ± 0.48	3.00 ± 0.47	2.90 ± 0.32
	(2-3)	(2-3)	(2-4)	(2-3)
No. posterior tubercles	2.70 ± 0.82	2.40 ± 0.52	3.10 ± 0.32	3.20 ± 0.42
	(2-4)	(2-3)	(3-4)	(3-4)

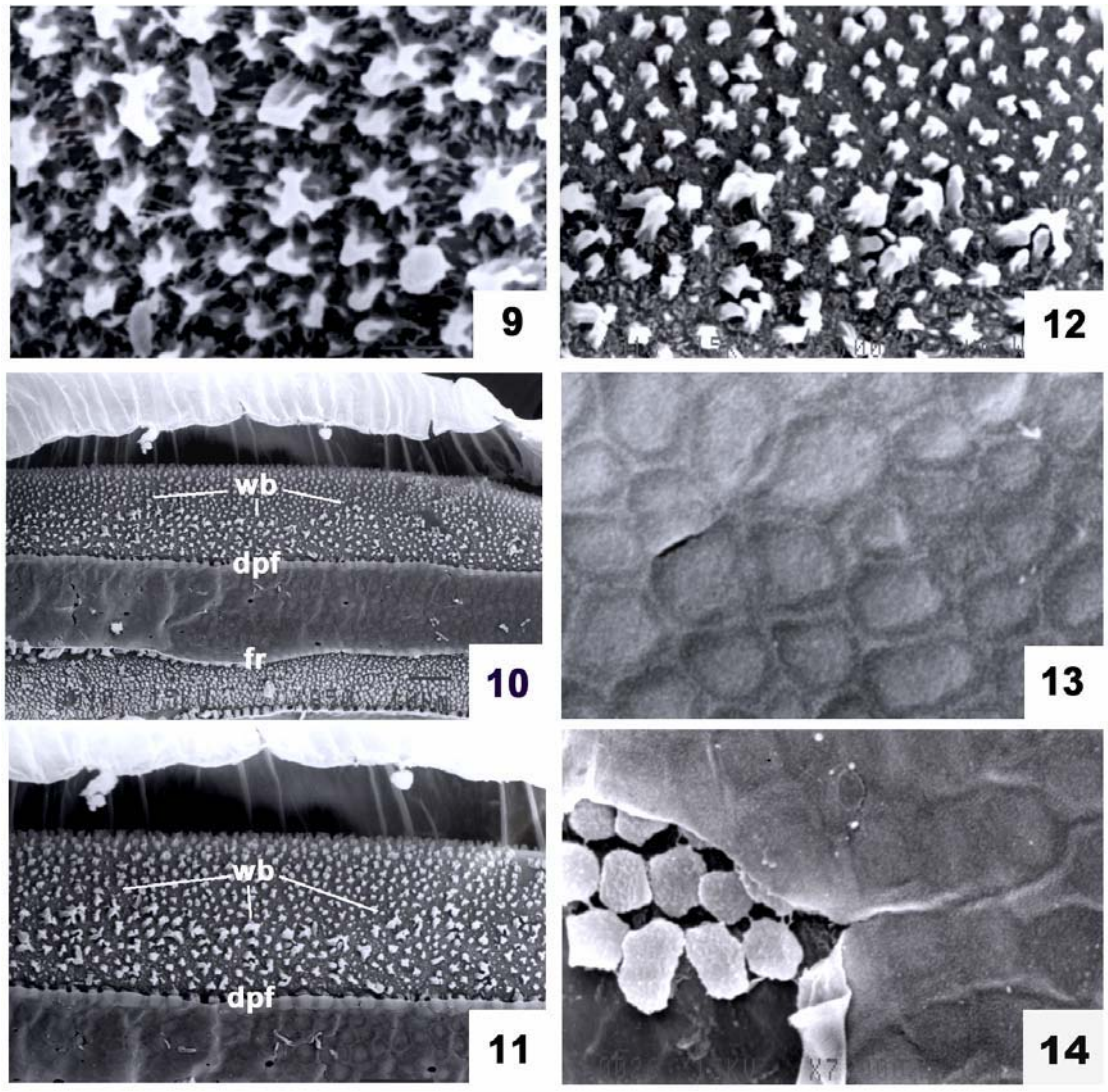
Mosquito strain; CM: Chiang Mai, MS: Mae Hong Son, PB: Phet buri.

*Ten samples for each strain.

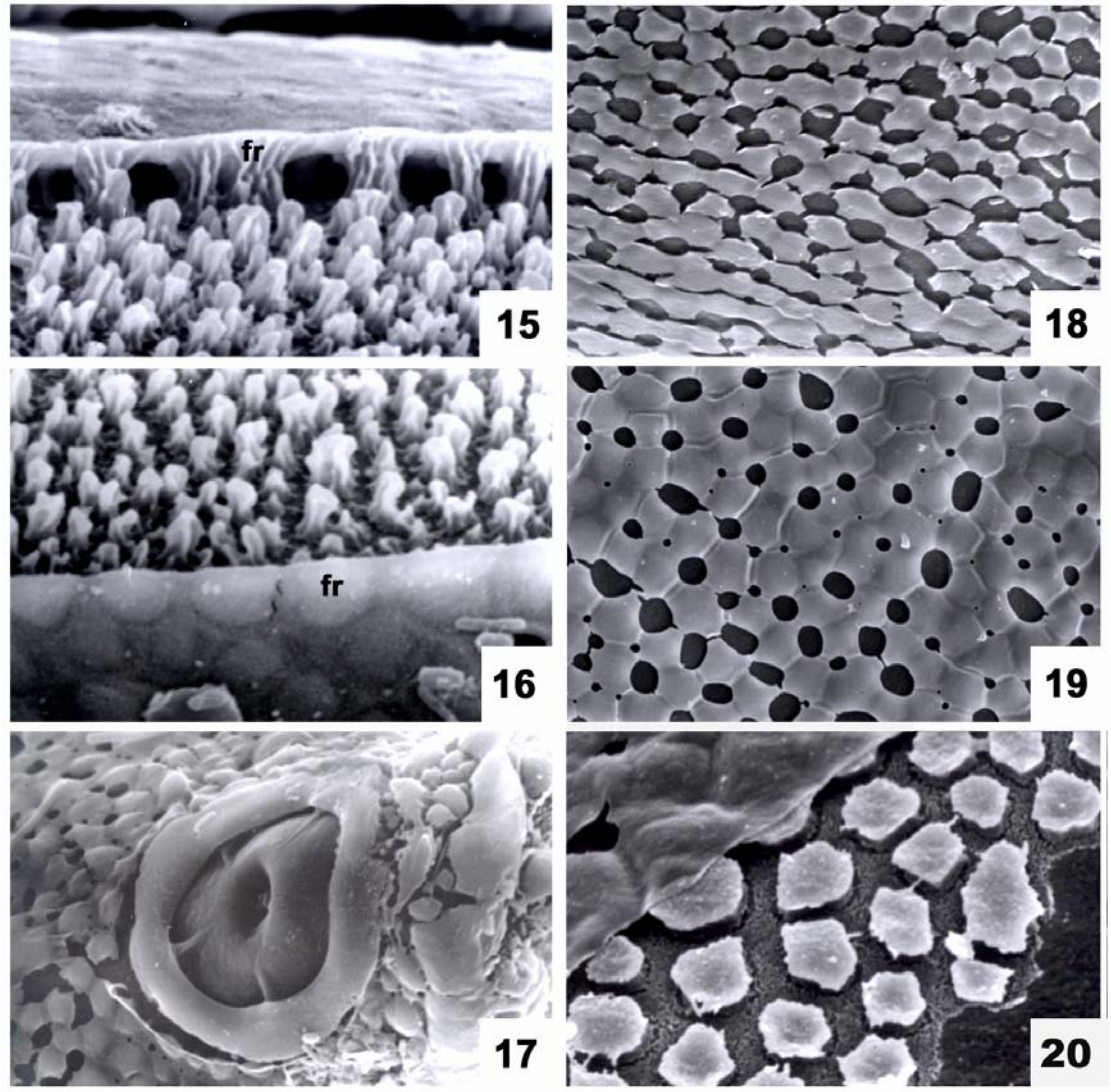
Measurements in μm ± SD, range in parenthesis.



Figs 3-8 Whole eggs: (3) Lateral aspect, anterior end (a), posterior end (p)(x 270), (4) ventral aspect, anterior end (a), posterior end (p)(x 270), (5) Dorsal aspect, anterior end (a), posterior end (p)(x 270). (6) Anterior end, showing irregularly jagged tubercles on the deck and three large, rosette-shaped tubercles (x 3,500). (7) Posterior end, showing irregularly jagged tubercles on the deck and two large, rosette-shape tubercles (x 3,500). (8) A higher magnification of the large, rosette-shaped tubercle, surrounded by a sclerotized ridge and raised border (x 10,000).



Figs 9-14 (9) A higher magnification of the irregularly jagged tubercles on the deck (x 12,000). (10) Irregularly jagged tubercles on the deck and area covered by the float, and outer chorionic tubercles covered with a membrane-like sheet between the frill (fr) and detachment point of the float (dpf). Note, that the cluster of tubercles adjacent to the detachment point of the float more or less form a wavy border (wb) (x 850). (11) A higher magnification of the irregularly jagged tubercles on the area covered by the float, and outer chorionic tubercles covered with a membrane-like sheet between the frill and detachment point of the float (x 1,500). (12) A higher magnification of the irregularly jagged tubercles on the area covered by the float (x 5,000). (13) A higher magnification of the outer chorionic tubercles covered with a membrane-like sheet between the frill and detachment point of the float (x 8,000). (14) Outer chorionic tubercles from the torn membrane-like sheet between the frill and detachment point of the float (x 540).



Figs 15-20 (15) The inner surface of the frill (fr), showing its sclerotized, ridge-like texture with picket-like ribs (x 8,000). (16) The outer surface of the frill (fr), showing its smooth surface and parallel brick-like texture along its entire length (x 8,000). (17) The anterior end, showing the micropylar orifice surrounded by a smooth collar with an irregular outer margin (x 3,700). (18) Outer chorionic tubercles at the anterior third of the egg, showing irregular bases partially covered with a membrane-like sheet (x 3,500). (19) Outer chorionic tubercles in the middle of the egg, showing irregular bases that were almost completely covered with a membrane-like sheet (x 3,500). (20) Outer chorionic tubercles from the torn membrane-like sheet in the middle of the egg, showing irregular bases and flattened-surface (x 7,000).

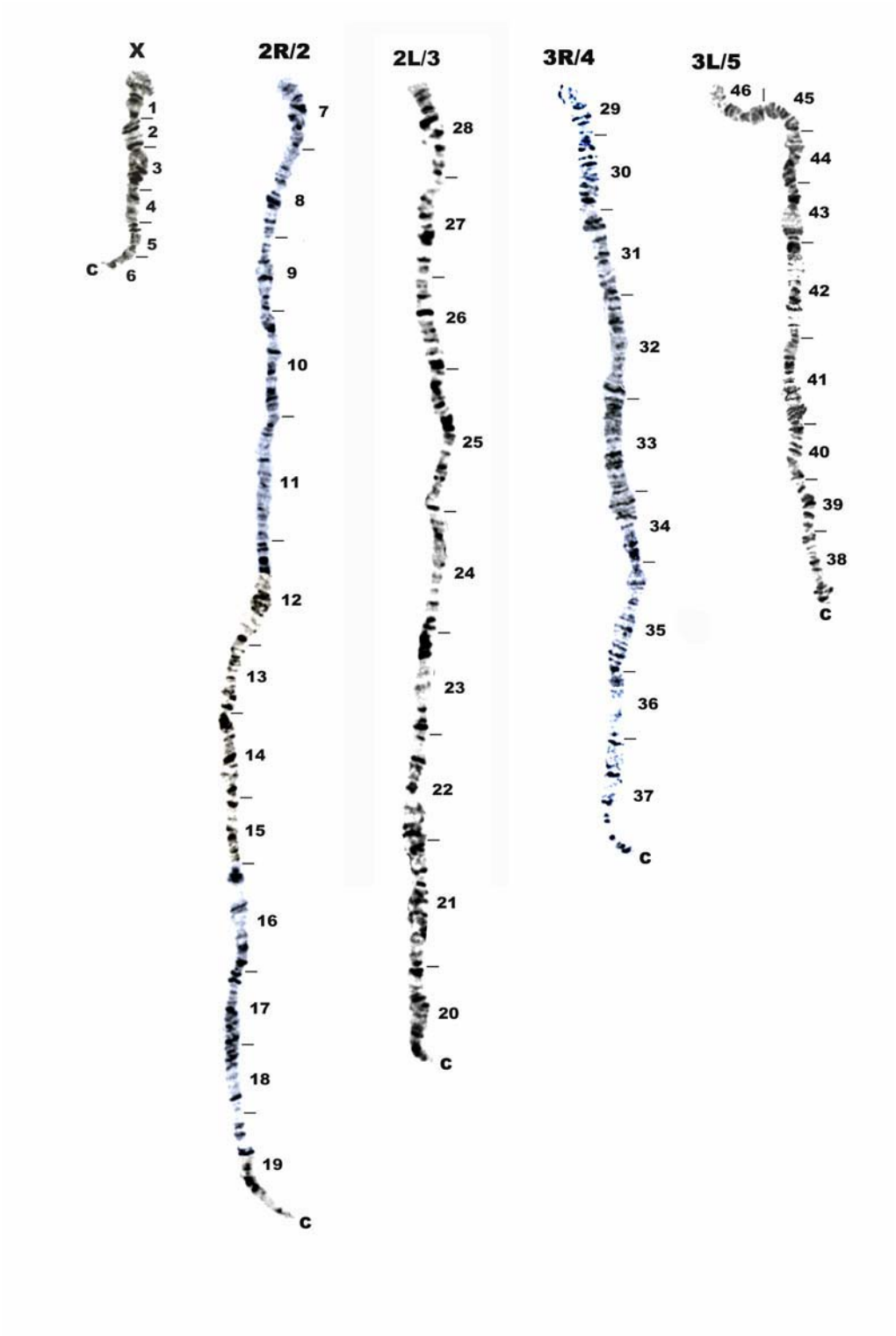


Fig 21 Standard map of ovarian nurse cell polytene chromosomes of *An. aconitus* Form B (Chiang Mai strain).

2.4 การศึกษาเปรียบเทียบทางไอโซเอ็นไซม์

การเตรียม Buffer และ gel: การทำอิเลคโตรโฟริซีส เป็นชนิดแนวตั้ง (Vertical slab gel electrophoresis) และตัวกลางค้ำจุนเป็นชนิด polyacrylamide gel ประกอบด้วย gel 2 ชั้น ชั้นล่าง คือ separating gel (7.5%) และชั้นบนคือ stacking gel (5%) Electrode buffer ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ (1) 0.005M Tris-0.038M glycine pH 8.3 และ gel buffer คือ Tris-HCl pH 8.9 และ 6.8 (2) 67.5mM Tris – 22.0 mM citric acid pH 7.1

การเตรียมตัวอย่างยุง: นำยุงตัวอย่างที่แช่เย็นไว้ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว หยด สารละลายน้ำตาล 20% หลอดละ 40 ไมโครลิตร ใช้แท่งบดพลาสติกบดยุงจนละเอียด นำไปปั่นตกตะกอน ดูดสารละลายส่วนใส จำนวน 15 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่างไปหยอดในช่องบน gel ที่เตรียมไว้

การทำอิเลคโตรโฟริซีส: นำ gel mold ที่ได้หยอดสารละลายตัวอย่างยุงไว้แล้ว ไปติดตั้งบนเครื่องทำอิเลคโตรโฟริซีส เปิดเครื่องทำอิเลคโตรโฟริซีส โดยตั้งความต่างศักย์คงที่ที่ 300 โวลท์ และทำในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เมื่อทำอิเลคโตรโฟริซีสเสร็จแล้ว จึงนำแผ่น gel ออกจาก gel mold เพื่อนำไปแช่ในสารละลายผสม ซึ่งประกอบด้วย buffer, substrate ที่จะทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ที่ต้องการศึกษาบน gel และสี เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลง จะได้แถบสีที่แสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของเอ็นไซม์ของตัวอย่างยุงที่ต้องการศึกษา

การศึกษาเพื่อหาความแตกต่างทางไอโซเอ็นไซม์ของยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวอ่อนระยะที่ 4 *An. aconitus* รูปแบบ B และ C จำนวนเอ็นไซม์ที่ศึกษาทั้งหมด 19 ชนิด ดังแสดงใน Table 6 จำนวน ไอโซเอ็นไซม์ที่สามารถอ่านและวิเคราะห์ผลได้มี 16 ชนิด (Fig 22 และ 23) มี 3 เอ็นไซม์ที่ไม่สามารถอ่านผลได้ ได้แก่ hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH), octanol dehydrogenase (ODH), และ 6 -phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) การแสดงออกของไอโซเอ็นไซม์ส่วนมากจะคล้ายคลึงกันทั้งในตัวอ่อนระยะที่ 4 และตัวเต็มวัย แต่บางเอ็นไซม์จะแตกต่างกันในระยะที่ต่างกัน เอ็นไซม์บางชนิดพบมากในตัวอ่อนระยะที่ 4 เช่น LAP, EST เป็นต้น บางชนิดพบได้ในระยะตัวเต็มวัย เช่น FUM

ลักษณะของไอโซเอ็นไซม์ต่างๆ :

1. Acid phosphatase (ACPH) มี 1 locus จัดเป็น weak enzyme activity
2. Alkaline phosphatase (ALP) มี 1 locus จัดเป็น weak enzyme activity
3. Aldehyde oxidase (ALDOX) มี 2 loci ALDOX-1 และ ALDOX-2 และเป็น monomer ALDOX-1 แสดงตำแหน่งของ band แตกต่างกันในระหว่างตัวอย่างยุง แสดงว่ามี allele 2 ชนิด

Table 6 Enzyme and buffer systems used for isozyme studied of *An. aconitus* Form B and C.

Enzyme Classification number	Enzyme	Buffer system	Stage
1.2.3.1	Aldehyde oxidase (ALDOX)	I	A
3.1.1.1	Esterase (EST)	I	A, L
4.2.1.2	Fumarate hydratase (FUM)	I	A
5.3.1.2	Glucosephosphate isomerase (GPI)	I	A, L
2.7.1.1	Hexokinase (HK)	II	A, L
1.1.1.42	Isocitate dehydrogenase (IDH)	II	A, L
1.1.1.27	Lactate dehydrogenase (LDH)	I, II	A, L
1.1.1.40	Malic enzyme (ME)	I	A, L
1.1.1.8	a-Glycerophosphate dehydrogenase (a-GPD)	II	L
5.4.2.2	Glucosephosphomutase* (GPM)	I	A
1.2.1.37	Xanthine dehydrogenase (XDH)	I	A
1.1.1.37	Malate dehydrogenase (MDH)	I	A
3.1.3.2	Acid phosphatase* (ACPH)	I	L, A
3.1.3.1	Alkaline phosphatase* (ALP)	I	L
3.4.11	Peptidase (PEP)	I	L
1.1.1.44	6-phosphogluconate dehydrogenase** (6-PGD)	I, II	A
1.1.1.30	Hydroxybutyrate dehydrogenase** (HBDH)	I	A
1.1.1.73	Octanol dehydrogenase** (ODH)	I	A
3.4.1.1	Leucine aminopeptidae (LAP)	I	L

Buffer system I = 0.005M Tris-0.0384 M, Glycine pH 8.3; II = 0.067 M Tris-0.022 M citric acid pH 7.1 (one-fourth dilution before use), L = larva, A = adult

* very faint band ** no band

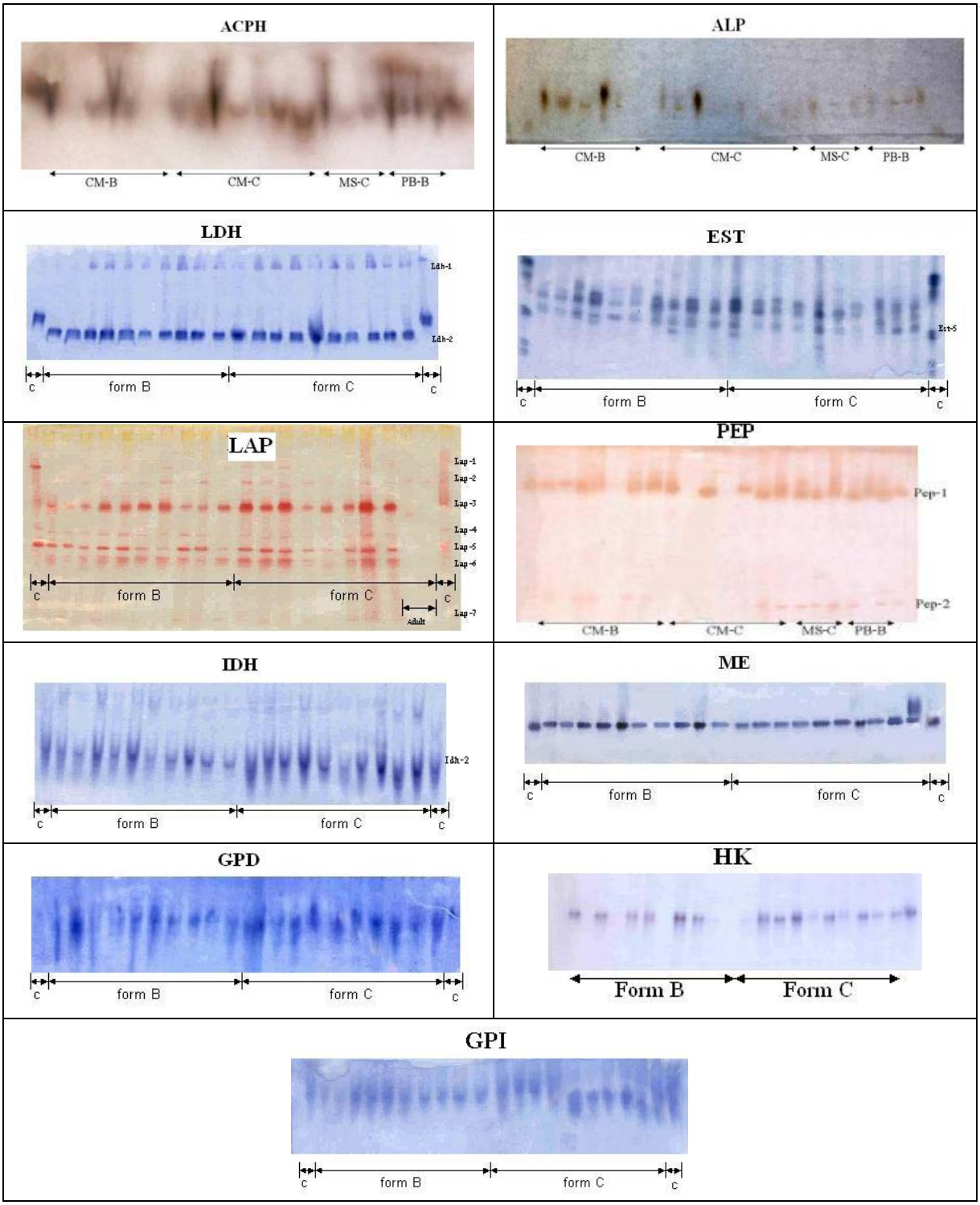


Fig 22 Isoenzyme pattern of ACPH, ALP, EST, GPD, GPI, HK, IDH, LAP, LDH, ME, and PEP of 4th stage larva *An. aconitus* Form B and C from Chiang Mai (CM), Mae Hong Son (MS) and Phet Buri (PB).

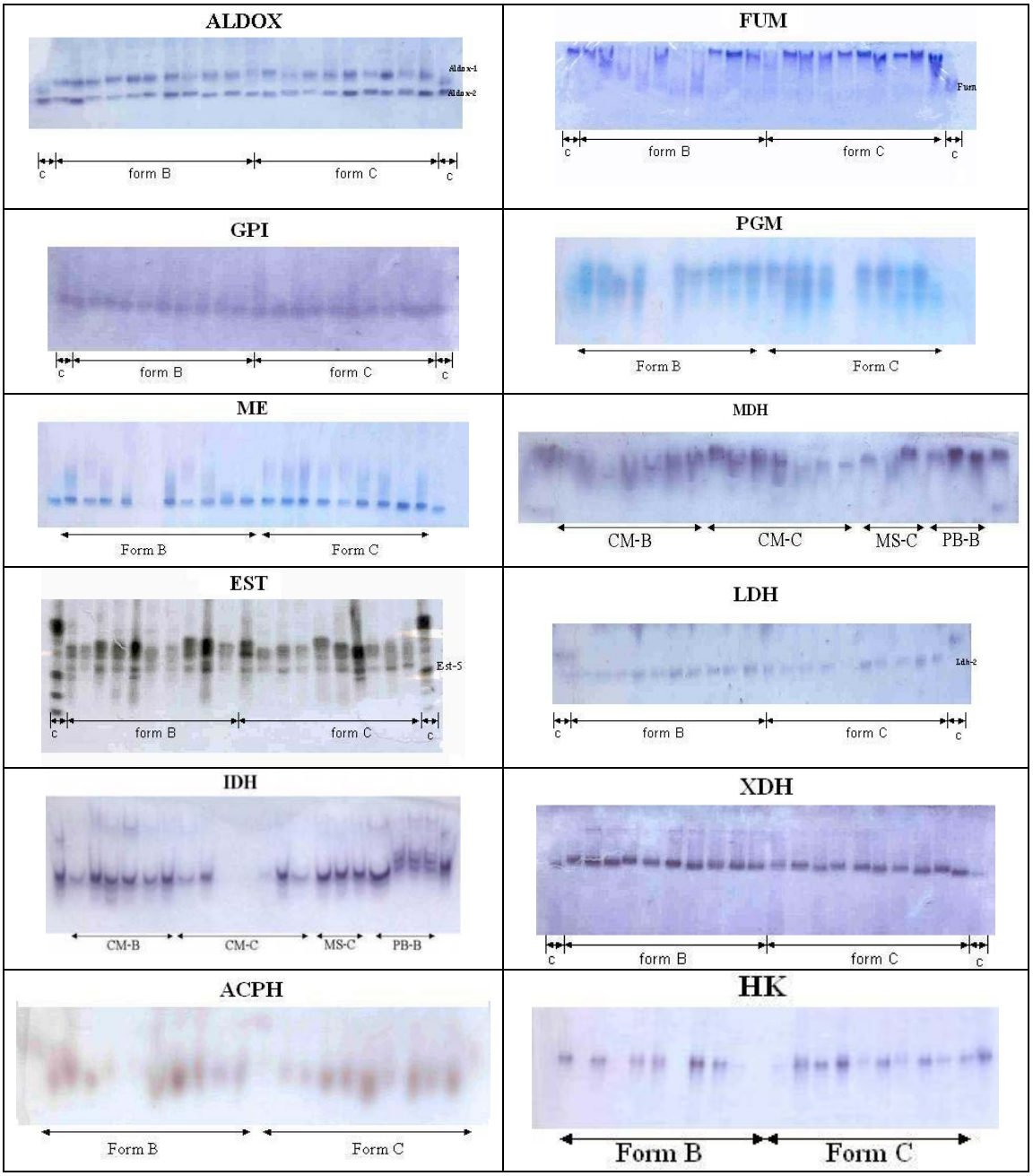


Fig 23 Isoenzyme pattern of ACPH, ALDOX, EST, FUM, GPI, GPM, HK, IDH, LDH, MDH, ME and XDH of adult *An. aconitus* Form B and C from Chiang Mai (CM), Mae Hong Son (MS) and Phet Buri (PB).

หรือมากกว่าใน locus นี้ ส่วน ALDOX-2 มี 1 band และไม่มีความแตกต่างในระหว่างตัวอย่างยุง

4. Esterase (EST) มี 5 loci แต่มีเพียง 1 locus ที่นำมาศึกษาวิเคราะห์ได้ เอ็นไซม์เป็นแบบ monomer ซึ่งตัวอย่างยุงที่เป็น homozygote จะแสดงแถบสีเพียง 1 แถบ (band) ขณะที่ heterozygote แสดงแถบสี 2 แถบ
5. Fumarase (FUM) มี 1 locus จัดเป็น weak enzyme activity พบในตัวยุงเต็มวัย
6. Glucose phosphate isomerase (GPI) มี 1 locus เอ็นไซม์เป็นแบบ dimer ตัวอย่างยุงที่เป็น homozygote จะแสดงแถบสีเพียง 1 แถบ (band) ขณะที่ heterozygote แสดงแถบสี 3 แถบ พบได้ทั้งในตัวอ่อนระยะที่ 4 และตัวยุงเต็มวัย
7. Glucose phosphomutase (GPM) มี 1 locus และมีสีจาง เอ็นไซม์เป็นแบบ dimer ตัวอย่างยุงที่เป็น homozygote จะแสดงแถบสีเพียง 1 แถบ (band) ขณะที่ heterozygote แสดงแถบสี 3 แถบ
8. Glycerophosphate dehydrogenase (GPD) มี 1 locus พบมากในตัวอ่อนระยะที่ 4
9. Hexokinase (HK) มี 1 locus ที่มี 1 band และมีสีจาง จัดเป็น weak enzyme activity แสดงถึงปริมาณเอ็นไซม์ที่น้อย หรือมี low activity และไม่มีความแตกต่างในระหว่างตัวอย่างยุง
10. Isocitate dehydrogenase (IDH) มี 2 loci IDH-1 มี 1 band มีสีจาง IDH-2 มีactivity สูงกว่ามี ลักษณะเป็น dimer
11. Lactate dehydrogenase (LDH) มี 2 loci ที่มี 1 band ไม่มีความแตกต่างในระหว่างตัวอย่างยุง
12. Leucine aminopeptidase (LAP) มีหลาย loci เป็นเอ็นไซม์ที่พบมากในตัวอ่อนระยะที่ 4
13. Malic dehydrogenase (MDH) มี 2 loci แต่ละ locus มี 1 band ไม่มีความแตกต่างในระหว่างตัวอย่างยุง
14. Malic enzyme (ME) มี 1 locus ที่มี 1 แถบสี
15. Peptidase (PEP) มี 2 loci คือ PEP-1, PEP-2 locus PEP-2 มี 1 band ไม่มีความแตกต่างในระหว่างตัวอย่างยุง แต่ PEP-1 มี 2 alleles
16. Xanthine dehydrogenase (XDH) มี 1 locus ที่มี 1 แถบสี

เมื่อเปรียบเทียบผลของ allele frequencies ของ ไอโซเอ็นไซม์ต่าง ๆ ในตัวอ่อนระยะที่ 4 และยุงตัวเต็มวัยระหว่างรูปแบบ B กับ C จากจังหวัดต่าง ๆ กัน (Table 7 และ 8) พบว่าในบางเอ็นไซม์มี variation เล็กน้อย แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งสองรูปแบบต่างมี allele frequency ของ common allele ของ loci ต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน และไม่พบไอโซเอ็นไซม์ที่มี fix different loci ที่สามารถใช้เป็น enzyme marker ในการแยกแยะรูปแบบ B และ C ของยุง *An. aconitus* ได้

Table 7 Allele frequencies (allele numbers) observed at 10 isozymes 16 loci in 4th stage larva *An. aconitus* Form B and C from Chiang Mai, Mae Hon Son and Phet Buri.

No.	Loci	Allele	Chiang Mai Form B	Mae Hong Son Form B	Chiang Mai Form C	Phet Buri Form C
1	Est-5	100	0.78 (56)	0.33 (2)	0.89 (52)	1.00 (6)
		104	0.22 (16)	0.67 (4)	0.11 (6)	0 (0)
2	*Idh-2*	100	0.80 (16)	1.00 (6)	0.83 (15)	1.00 (0)
		105	0.15 (3)	0 (0)	0.11 (2)	0 (0)
		108	0.05 (1)	0 (0)	0.06 (1)	0 (0)
3	*Lap-2*	100	0.92 (22)	1.00 (6)	0.83 (10)	1.00 (6)
		102	0.08 (2)	0 (0)	0.17 (2)	0 (0)
4	*Lap-3*	100	1.00 (44)	1.00 (6)	1.00 (26)	1.00 (6)
5	*Lap-4*	100	1.00 (44)	1.00 (6)	1.00 (26)	1.00 (6)
6	*Lap-5*	100	1.00 (44)	1.00 (6)	1.00 (26)	1.00 (6)
7	*Lap-6*	100	0.73 (32)	1.00 (6)	0.83 (20)	1.00 (6)
		102	0.27 (12)	0 (0)	0.17 (4)	0 (0)
8	*Ldh-1*	100	1.00 (16)	1.00 (6)	1.00 (20)	1.00 (6)
9	*Ldh-2*	98	0.11 (6)	1.00 (6)	0.04 (2)	1.00 (6)
		100	0.89 (48)	0 (0)	0.96 (46)	0 (0)
10	*Me*	100	1.00 (24)	1.00 (6)	1.00 (12)	1.00 (6)
11	*Gpi*	100	0.82 (18)	1.00 (6)	0.78 (14)	1.00 (6)
		105	0.18 (4)	0 (0)	0.22 (4)	0 (0)
12	*Gpd*	100	0.96 (25)	1.00 (6)	1.00 (14)	1.00 (6)
		102	0.04 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
13	*Acp*	95	0.25 (2)	0.67 (4)	0.29 (4)	0.75 (6)
		100	0.75 (6)	0.33 (2)	0.43 (6)	0.25 (2)
		102	0 (0)	0 (0)	0.28 (4)	0 (0)
14	*Alp*	98	0.40 (4)	0 (0)	0.14 (2)	0.50 (2)
		100	0.60 (6)	1.00 (4)	0.86 (12)	0.50 (2)
15	*Pep-1*	100	0.86 (12)	0 (0)	0.40 (4)	0.33 (2)
		102	0.14 (2)	1.00 (6)	0.60 (6)	0.67 (4)
16	*Pep-2*	100	1.00 (10)	1.00 (6)	1.00 (4)	1.00 (4)

Table 8 Allele frequencies observed at 11 isozymes 13 loci in adult *An. aconitus* Form B and C from Chiamg Mai, Mae Hon Son and Phet Buri.

No.	Loci	Allele	Chiang Mai Form B	Mae Hong Son Form B	Chiang Mai Form C	Phet Buri Form C
1	*A*ldox-1	98	0.07 (4)	0 (0)	0.11 (6)	0 (0)
		100	0.78 (42)	1.00 (6)	0.78 (42)	0.67 (4)
		102	0.15 (8)	0 (0)	0.11 (6)	0.33 (2)
2	*Aldox-2*	98	0 (0)	0.67 (4)	0.10 (4)	0.33 (2)
		100	1.00 (54)	0.33 (2)	0.90 (40)	0.67 (4)
3	*Est-5*	100	0.81 (63)	0.33 (2)	0.83 (43)	1.00 (6)
		104	0.19 (15)	0.67 (4)	0.17 (9)	0 (0)
4	*Fum*	95	0.60 (6)	0.33 (2)	0.33 (6)	0 (0)
		100	0.40 (4)	0.67 (4)	0.67 (12)	1.00 (6)
5	*Hk*	100	1.00 (28)	1.00 (6)	1.00 (12)	1.00 (6)
6	*Ldh-2*	100	1.00 (44)	1.00 (6)	1.00 (42)	1.00 (8)
7	*Mdh-1*	100	1.00 (4)	1.00 (4)	0.75 (3)	1.00 (4)
		105	0 (0)	0 (0)	0.25 (1)	0 (0)
8	*Mdh-2*	100	1.00 (4)	1.00 (4)	1.00 (4)	1.00 (4)
9	*Me*	100	1.00 (4)	1.00 (4)	1.00 (4)	1.00 (4)
10	*Gpm*	95	0 (0)	0 (0)	0.04 (1)	0 (0)
		100	0.85 (34)	1.00 (6)	0.88 (23)	1.00 (6)
		105	0.15 (6)	0 (0)	0.08 (2)	0 (0)
11	*Gpi*	100	0.80 (40)	1.00 (6)	0.86 (48)	1.00 (6)
		105	0.20 (10)	0 (0)	0.14 (8)	0 (0)
12	*Xdh*	99	0.10 (2)	0 (0)	0.60 (12)	0 (0)
		100	0.90 (18)	1.00 (6)	0.40 (8)	1.00 (6)
13	*Idh*	95	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.37 (3)
		100	1.00 (12)	1.00 (6)	1.00 (10)	0.63 (5)

2.5 การทำ hybridization tests

ได้ทำ hybridization tests ระหว่างยุง *An. aconitus* รูปแบบ B จากจังหวัดเชียงใหม่และยุง *An. aconitus* รูปแบบ B จากจังหวัดเพชรบุรีและรูปแบบ C จากจังหวัดเชียงใหม่และแม่ฮ่องสอน ตามวิธีของ Choochote *et al*. (1998) ผล fertile hybrids (Table 9) และ complete synapsis of salivary gland polytene chromosomes (Fig 24) ที่ได้จาก reciprocal และ back crosses แสดงให้เห็นว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C ไม่มี post-mating isolation ทั้ง sympatric และ allopatric strains

2.6 การศึกษาเปรียบเทียบ DNA sequences

Cellular DNA isolation: ได้ทำการสกัด Cellular DNAs (genomic DNAs and mitochondial DNAs) ของยุง *An. aconitus* ตัวเมียที่มีอายุ 3-7 วัน ซึ่งยังไม่เคยกินเลือดมาก่อน และยุงตัวผู้ โดยใช้ DNeasy® Tissue Kit (Qiagen) ดังแสดงไว้ใน Table 10 Cellular DNAs ของยุง *An. minimus* A ใช้เป็น in group control และ ยุง *An. sinensis* ใช้เป็น out group control Cellular DNAs ที่สกัดได้ทั้งหมดได้เก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

Determination of ribosomal DNA (rDNA) ITS2 sequences. ทำการ amplify ส่วน rDNA ITS2 จาก gDNA ของยุงที่สกัดได้ข้างต้นโดยวิธี PCR ดังนี้ PCR reaction mix (50 μl) ประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 20nM dNTPs, 50ng each primer (ITS2A 5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3' and ITS2B 5'-TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3'), platinum Tag DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) and DNA sample ประมาณ 0.1 ส่วนที่สกัดได้ PCR condition ที่ใช้คือ ขั้นที่ 1 Denaturation at 95°C , 5 mins ขั้นที่ 2 Denaturation at 94°C, 1 min ขั้นที่ 3 Annealing at 51°C, 1 min ขั้นที่ 4 Extension at 72°C, 2 mins (ซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5 Extension at 72°C, 10 mins

หลังจากเปรียบเทียบขนาดของ ITS2 PCR products ของยุงแต่ละตัว บน 1% agarose gels พบว่า ขนาดของ ITS2 PCR products ของกลุ่ม *An. aconitus* Form B และ Form C ทั้งตัวผู้และตัวเมีย ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงใน Fig 25 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของลำดับเบสที่แสดงไว้ใน Fig 26

Table 9 Cross mating among isolines of *An. aconitus* Form B and C.

cross	Total egg (No.)*	Embryonation rate**	No. hatched (%)	No. pupation (%)	No. emergence (%)	No. females and males from total emergence (%)		Sex ratio Female/male
Female x Male						Female	Male	
Parental crosses								
BC x BC	151 (62, 89)	90	131 (86.75)	107 (81.68)	101 (94.39)	59 (58.42)	42 (41.58)	1.40
BP x BP	197 (92, 105)	88	166 (84.26)	148 (89.16)	144 (97.30)	66 (45.83)	78 (54.17)	0.85
CC x CC	184 (86, 98)	72	123 (66.85)	113 (91.87)	109 (96.46)	59 (54.13)	50 (45.87)	1.18
CM x CM	170 (79, 91)	89	138 (81.18)	112 (81.16)	108 (96.43)	47 (43.52)	61 (56.48)	0.77
Reciprocal crosses								
BC x BP	169 (55, 114)	89	139 (82.25)	128 (92.09)	111 (86.72)	46 (41.44)	65 (58.56)	0.71
BP x BC	217 (65, 152)	90	189 (87.10)	166 (87.83)	151 (90.96)	77 (50.99)	74 (49.01)	1.04
BC x CC	159 (77, 82)	80	121 (76.10)	110 (90.91)	107 (97.27)	51 (47.66)	56 (52.34)	0.91
CC x BC	162 (67, 95)	89	135 (83.33)	112 (82.96)	112 (100)	45 (40.18)	67 (59.82)	0.67
BC x CM	158 (61, 97)	75	112 (70.89)	104 (92.86)	104 (100)	43 (41.35)	61 (58.65)	0.70
CM x BC	164 (81, 83)	86	136 (82.93)	125 (91.91)	120 (96.00)	69 (57.50)	51 (42.50)	1.35
Back crosses								
(BC x BP)F_1 x BP	156 (57, 99)	94	142 (91.03)	139 (97.89)	136 (97.84)	81 (59.56)	55 (40.44)	1.47
BC x (BC x BP)F_1	186 (88, 98)	88	151 (81.18)	128 (84.77)	126 (98.44)	76 (60.32)	50 (39.68)	1.52
(BP x BC)F_1 x BC	189 (94, 95)	76	134 (70.90)	121 (90.30)	121 (100)	52 (42.98)	69 (57.02)	0.75
BP x (BP x BC)F_1	162 (67, 95)	88	133 (82.10)	124 (93.23)	119 (95.97)	44 (36.97)	75 (63.03)	0.59

Table 9 Cross mating among isolines of *An. aconitus* Form B and C. (Continue)

cross	Total egg (No.)*	Embryonation rate**	No. hatched (%)	No. pupation (%)	No. emergence (%)	No. females and males from total emergence (%)		Sex ratio Female/male
Female x Male						Female	Male	
(BC x CC)F_1 x CC	170 (79, 91)	79	122 (71.76)	115 (94.26)	113 (98.26)	68 (60.18)	45 (39.82)	1.51
BC x (BC x CC)F_1	181 (83, 98)	89	147 (81.22)	137 (93.20)	137 (100)	71 (51.82)	66 (48.18)	1.08
(CC x BC)F_1 x BC	210 (65, 145)	92	181 (86.19)	157 (86.74)	157 (100)	88 (56.05)	69 (43.95)	1.28
CC x (CC x BC)F_1	160 (58, 102)	87	131 (81.88)	102 (77.86)	102 (100)	53 (51.96)	49 (48.04)	1.08
(BC x CM)F_1 x CM	165 (79, 86)	91	144 (87.27)	128 (88.89)	128 (100)	62 (48.44)	66 (51.56)	0.94
BC x (BC x CM)F_1	256 (84, 172)	88	220 (85.94)	205 (93.18)	191 (93.17)	84 (43.98)	107 (56.02)	0.79
(CM x BC)F_1 x BC	163 (67, 96)	74	116 (71.17)	91 (78.45)	89 (97.80)	40 (44.94)	49 (55.06)	0.82
CM x (CM x BC)F_1	169 (76, 93)	81	135 (79.88)	127 (94.07)	122 (96.06)	59 (48.36)	63 (51.64)	0.94

BC: *An. aconitus* Form B (Chiang Mai strain), BP: *An. aconitus* Form B (Phet Buri strain), CC: *An. aconitus* Form C (Chiang Mai strain), CM: *An. aconitus* Form C (Mae Hong Son strain)

*Two selective egg-batches of inseminated females from each cross.

**Dissection from one hundred eggs.

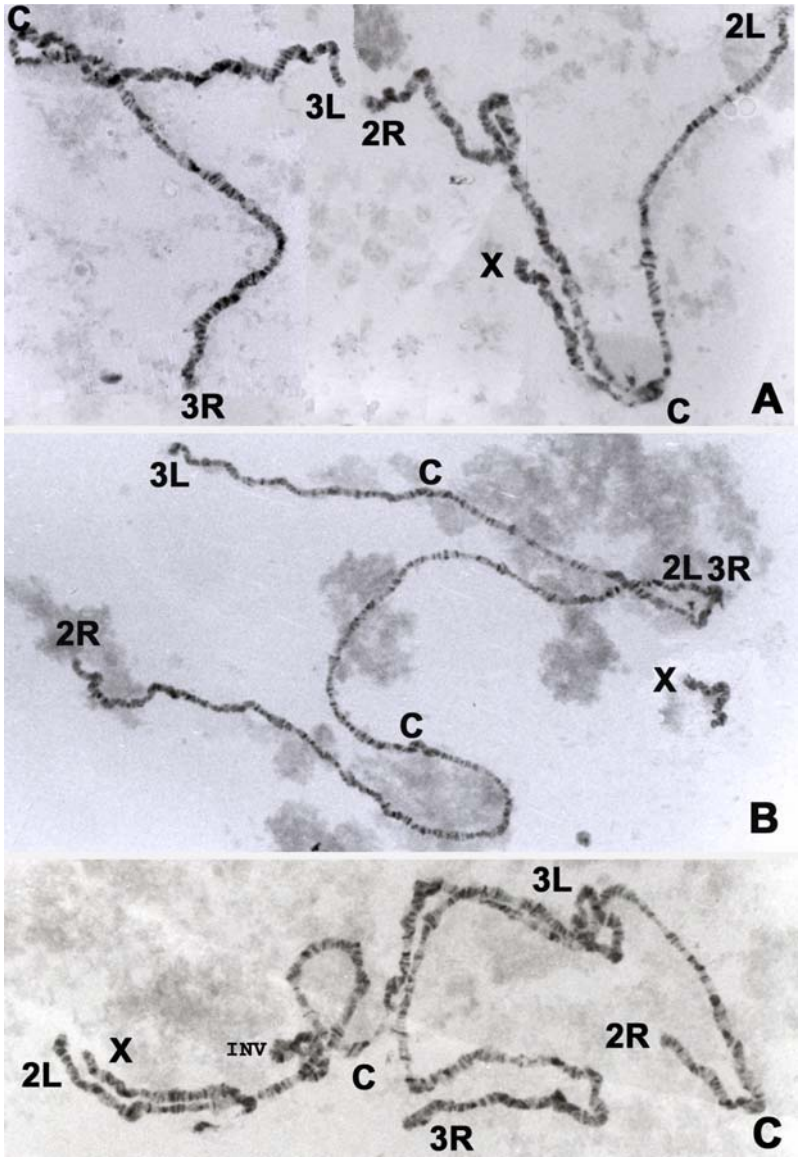


Fig 24 Salivary gland polytene chromosome of F1-hybrid 4th stage larvae of *An. aconitus*:(A) Form B female (Chiang Mai strain) x Form B male (Phet Buri strain), (B) Form B female(Chiang Mai strain) x Form C male (Chaing Mai strain), (C) Form B female (Chiang Mai strain) x Form C male (Mae Hong Son strain). All the crosses yielded complete synapsis in all arms, except floating, heterozygous inversion (INV) on 2L (C), which was found in only one preparation from the F1-hybrid 4th stage larvae of Form B female (Chiang Mai strain) x Form C male (Mae Hong Son strain).

Table 10 Number of isolated cellular DNAs and DNA sequences of *An. aconitus* Form B and Form C

Isolines	**Isolated gDNAs**		DNA sequences[4]			
	Female[1]	Male[2]	ITS2	ITS1	D3	COII
Form B						
Aa001B	1	-	✓	-	✓	-
Aa016B	1	-	✓	-	-	-
Aa024B	1	-	✓	-	-	-
Aa031B	1	-	✓	-	✓	-
Aa039B	1	-	✓	-	✓	-
Aa077B	1[3]	1[3]	✓	✓	✓	✓
Aa079B	1[3]	1[3]	-	-	✓	-
Aa084B	1[3]	1[3]	✓	-	✓	✓
Aa090B	1[3]	-	✓	-	-	-
Aa095B	1[3]	-	✓	-	-	-
Form C						
Aa032C	1	-	✓	-	-	-
Aa033C	1	-	✓	-	-	-
Aa035C	1	-	-	-	-	-
Aa037C	1	-	-	-	-	-
Aa075C	1[3]	1[3]	-	✓	✓	✓
Aa083C	1[3]	1[3]	✓	-	✓	✓
Aa088C	1[3]	1[3]	-	-	✓	-

[1] Number of isolated gDNA females. [2] Number of isolated gDNA males. [3] Genomic DNAs extracted in this time. [4] Obtained DNA sequences from 5' → 3'. A dash (-) indicates no data available.

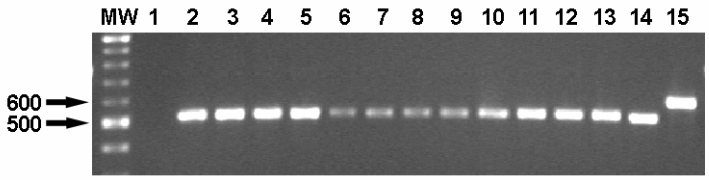


Fig 25 ITS2 PCR products of *An. aconitus* Form B and Form C on a 1% agarose gel. Lanes are 1, control; 2, female Aa077B; 3, female Aa079B, 4, female Aa084B; 5, male Aa077B; 6, male Aa079B; 7, male Aa084B; 8, female Aa075C; 9, female Aa083C; 10, female Aa088C; 11, male Aa075C; 12, male Aa083C; 13, male Aa088C; 14, *An. minimus* A; and 15, *An. sinensis*. Molecular masses (MW) are in kilodalton on the left.

```
Aa001B ............................-............-.....................  64
Aa016B ............................-............-.....................  64
Aa024B ............................-............-.....................  64
Aa031B ............................-............-.....................  64
Aa039B ............................-............-.....................  64
Aa077B ............................-............-.....................  64
Aa084B ............................C............-..T..................  65
Aa090B ............................C............T.....................  66
Aa095B ............................C............-.....................  65
Aa032C ............................-............-.....................  64
Aa033C ............................-............-.....................  64
Aa083C ............................-............-.....................  64
con    TGTGAACTGCAGGACACATGAACACCGAC ACGTTGAACGCAT ATgGCGCATCGGACGTTTAAAC

Aa001B ......-...........-.................-..................... 127
Aa016B ......-...........-.................-..................... 127
Aa024B ......-...........-.................-..................... 127
Aa031B ......-...........-.................-..................... 127
Aa039B ......-...........-.................-..................... 127
Aa077B ......-...........-.................-..................... 127
Aa084B ......C...........T.................-..................... 130
Aa090B ......C.........T..-.................C..................... 131
Aa095B ......C...........T.................-..................... 130
Aa032C ......-...........-.................-..................... 127
Aa033C ......-...........-.................-..................... 127
Aa083C ......-...........-.................-..................... 127
con    CCGACC GATGTACACaTT CTTGAGTGCCTACCAAATCC TTGTTACACAAATACATAACTACAG


Aa001B ..................-..................................... 192
Aa016B ..................-..................................... 192
Aa024B ..................-..................................... 192
Aa031B ..................-..................................... 192
Aa039B ..................-..................................... 192
Aa077B ..................-..................................... 192
Aa084B ..................C..................................... 196
Aa090B ..................-..................................... 196
Aa095B ..................C..................................... 196
Aa032C ..................-..................................... 192
Aa033C ..................-..................................... 192
Aa083C ..................-..................................... 192
con    GACGGGCGTGCTACACAGTC AAGTGAAACATTCCGGGCGAGCAGCCCGCCACGGAAGTCACTGGA


Aa001B ..................................................... 258
Aa016B ..................................................... 258
```

```
Aa024B ..................................................................... 258
Aa031B ..................................................................... 258
Aa039B ..................................................................... 258
Aa077B ..................................................................... 258
Aa084B ..................................................................... 262
Aa090B .....................................................................A.. 262
Aa095B ..................................................................... 262
Aa032C ..................................................................... 258
Aa033C ..................................................................... 258
Aa083C ..................................................................... 258
con    CGTACACGCTGTCGGACTGTGCATCTTGGCGTGCTTGGTTCCACACCCAGAGCGGGGTGAACCtCG

Aa001B .....................AG.............-..........---..... 320
Aa016B .....................AG.............-..........---..... 320
Aa024B .....................AG.............-..........---..... 320
Aa031B .....................AG.............-..........---..... 320
Aa039B .....................AG.............-..........---..... 320
Aa077B .....................AG.............-..........---..... 320
Aa084B .....................AG.............-..........---..... 324
Aa090B .....................--.............-..........---..... 322
Aa095B .....................--.............-..........AGC..... 325
Aa032C .....................--.............C..........---..... 319
Aa033C .....................AG.............-..........---..... 320
Aa083C .....................--.............C..........---..... 319
con    GGCGCTGAAAAGGTAAGGCAG  TACAATCTTGTACACC AGGGTACAGC   GTCAAGTCGCACG

Aa001B ..................................................................... 386
Aa016B ..................................................................... 386
Aa024B ..................................................................... 386
Aa031B ..................................................................... 386
Aa039B ..................................................................... 386
Aa077B ............................T........................................ 386
Aa084B ..................................................................... 390
Aa090B ..................................................................... 388
Aa095B ..................................................................... 391
Aa032C ..................................................................... 385
Aa033C ..................................................................... 386
Aa083C ..................................................................... 385
con    GGTCGAACTTCGGCTATGGACGACCTGAGAAcCCCGGCAGCCTACTAACACCAGGCTAGCCGATCC

Aa001B ............................-........................................ 451
Aa016B ............................-........................................ 451
Aa024B ............................-........................................ 451
Aa031B ............................-.....................T.............. 451
Aa039B ............................-........................................ 451
Aa077B ............................A........................................ 452
Aa084B ............................-........................................ 455
Aa090B ............................-.............T...C.G.............. 453
Aa095B ............................-........................................ 456
Aa032C ............................-........................................ 450
Aa033C ............................-.....................C.............. 451
Aa083C ............................-........................................ 450
con    GGGTCCAGGGGTTACGCATCATCCGGCCGA GTCGTGTAACACGTGcAAC CaTACGCATGGACCC

Aa001B ..................................................................... 517
Aa016B ..................................................................... 517
Aa024B ..................................................................... 517
Aa031B ..................................................................... 517
Aa039B .........-............................................................... 516
Aa077B ..................................................................... 518
Aa084B ..................................................................... 521
Aa090B ..................................................................... 519
Aa095B ..................................................................... 522
Aa032C ..................................................................... 516
Aa033C ..................................................................... 517
Aa083C ..................................................................... 516
con    TACTTGCTTtCCTTTCGCATATGTAGGCCTCAAGTGATGTGTGACAACCCCCTGAATTTAAGCATA
```

Fig 26 Alignment of the ITS2 DNA sequences of *An. aconitus* Form B (Aa001B, Aa016B, Aa024B, Aa031B, Aa039B, Aa077B, Aa084B, Aa090B, and Aa095B) and Form C (Aa032C, Aa033C, and Aa083C). Each dot in the alignment indicates that the sequence is identical with that of the consensus sequence (con), and a dash denotes a deletion with respect to the other sequences. Numbering refers to the nucleotide sequences.

Determination of rDNA ITS1 sequences: ทำการ amplify ส่วน rDNA ITS1 จาก gDNA ของยุงที่สกัดได้ข้างต้นโดยวิธี PCR ดังนี้ PCR reaction mix (50 μl) ประกอบด้วย 1.5 mM$MgCl_2$, 20nM dNTPs, 50ng each primer (ITS1-18S 5'-CCTTTGTACACACCGCCCGT-3' and ITS1-6S 5'-GTTCATGTGTCCTGCAGTTCAC-3'), platinum Tag DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) and DNA sample ประมาณ 0.1 ส่วนที่สกัดได้ PCR condition ที่ใช้คือ ขั้นที่ 1 Denaturation at 95°C , 5 mins ขั้นที่ 2 Denaturation at 94°C, 1 min ขั้นที่ 3 Annealing at 53°C, 1 min ขั้นที่ 4 Extension at 72°C, 2 mins (ซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5 Extension at 72°C, 10 mins

ได้เปรียบเทียบขนาดของ ITS1 PCR products ของยุงแต่ละตัว บน 1% agarose gels พบว่า ขนาดของ ITS1 PCR products ของกลุ่ม *An. aconitus* Form B และ Form C ทั้งตัวผู้และตัวเมีย ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงไว้ใน Fig 27 สำหรับผลการ alignment ของส่วน ITS1 sequences แสดงไว้ใน Fig 28

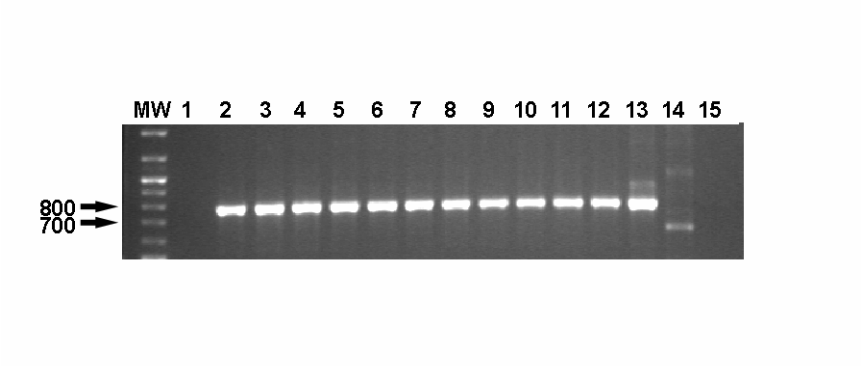


Fig 27 ITS1 PCR products of *An. aconitus* Form B and Form C on a 1% agarose gel. Lanes are 1, control; 2, female Aa077B; 3, female Aa079B, 4, female Aa084B; 5, male Aa077B; 6, male Aa079B; 7, male Aa084B; 8, female Aa075C; 9, female Aa083C; 10, female Aa088C; 11, male Aa075C; 12, male Aa083C; 13, male Aa088C; 14, *An. minimus* A; and 15, *An. sinensis*. Molecular masses (MW) are in kilodalton on the left.

```
Aa077B .................................T.............................  66
Aa075C .................................G.............................  66
con    GTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATTCAGACGCGCG TTAGCTGCGGTCTTCATCGATCCATGAGCC

Aa077B ..................................................................  132
Aa075C ..................................................................  132
con    GAGTGATCCCCTGCCTAGGGTTTCAACAATTGTGTACAAGTCCTCAGGAATTGCTTCCATCGGACA

Aa077B ..................................................................  198
Aa075C ..................................................................  198
con    CCTCTCTCTCCCAGATCGCATCGACTAAGTTGCCTTTGCCGTGCGCGATCGACCTTTGGACACCTC

Aa077B ..................................................................  264
Aa075C ..................................................................  264
con    CTCTTCTTGTTAGAACTGGGGCTGAGTTCACGGTTTTTACACTCGGAACGGACAGCAAGACCATGC

Aa077B ..................................................................  330
Aa075C ..................................................................  330
con    ACTTCCTTGCTGCCGACCGACTCGCAACGTTTTGTGTGAAGGAAAAAGCCGACGTGCGTCACCACC

Aa077B ..................................................................  396
Aa075C ..................................................................  396
con    CATCTCCAGGGGTTTGTGTTAGAGTTTTTTTTTAACTCTATTAATGGCCACATCGTTTGATTAACT

Aa077B ............................................A.....................  462
Aa075C ............................................G.....................  462
con    TGTCAACTCGATTGGTCTTTCTCTTATACGGTGATCTGGGACTAGCC GAAACCTTGCTACCGTTC

Aa077B ..................................................................  528
Aa075C ..................................................................  528
con    TGTT CGCGTTGCTAGGAATAGCCGACTTCAGCAACCGTAACCCATATAGTTCGTGCACGAAGCGA

Aa077B ..................................................................  594
Aa075C ..................................................................  594
con    ACAACTTTGCCTCGGTGCTTTTTACACCGTAGTGTAATACTCTCTCCGGTTTTGTGATCGGTAATG

Aa077B ..................................................................  660
Aa075C ..................................................................  660
con    ATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAATCATCAAGTTC

Aa077B .................................G............................  726
Aa075C .................................A............................  726
con    GGTCAACTTCGGCCATGCCTACTGCAGCTCACGGA GAACCGCGGCAGGTGTGCCTCCAGAGACCT

Aa077B ..........................................  772
Aa075C ..........................................  772
con    CACTAAATAATCCATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGG
```

Fig 28 Alignment of the ITS1 DNA sequences of *An. aconitus* Form B (Aa077B) and Form C (Aa075C). Each dot in the alignment indicates that the sequence is identical with that of the consensus sequence (con), and a dash denotes a deletion with respect to the other sequences. Numbering refers to the nucleotide sequences.

Determination of rDNA D3 sequences: ทำการ amplify ส่วน rDNA D3 จาก gDNA ของยุงที่สกัดได้ข้างต้นโดยวิธี PCR ดังนี้ PCR reaction mix (50 μl) ประกอบด้วย 1.5 mM$MgCl_2$, 20nM dNTPs, 50ng each primer (D3a 5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3' and D3b 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'), platinum Tag DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) and DNA sample ประมาณ 0.1 ส่วนที่สกัดได้ PCR condition ที่ใช้คือ ขั้นที่ 1 Denaturation at 95°C , 5 mins ขั้นที่ 2 Denaturation at 94°C, 1 min ขั้นที่ 3 Annealing at 55°C, 1 min ขั้นที่ 4 Extension at 72°C, 2 mins (ซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5 Extension at 72°C, 10 mins

หลังจากเปรียบเทียบขนาดของ D3 PCR products ของยุงแต่ละตัว บน 1% agarose gels พบว่า ขนาดของ D3 PCR products ของกลุ่ม *An. aconitus* Form B และ Form C ทั้งตัวผู้และตัวเมียไม่แตกต่างกัน ดังแสดงไว้ใน Fig 29 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของลำดับเบสที่แสดงไว้ใน Fig 30

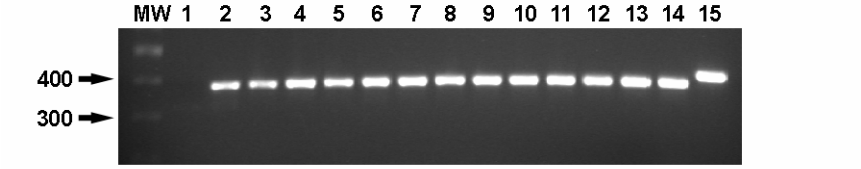


Fig 29 D3 PCR products of *An. aconitus* Form B and Form C on a 1% agarose gel. Lanes are 1, control; 2, female Aa077B; 3, female Aa079B, 4, female Aa084B; 5, male Aa077B; 6, male Aa079B; 7, male Aa084B; 8, female Aa075C; 9, female Aa083C; 10, female Aa088C; 11, male Aa075C; 12, male Aa083C; 13, male Aa088C; 14, *An. minimus* A; and 15, *An. sinensis*. Molecular masses (MW) are in kilodalton on the left.

```
Aa001B ..............................................................  66
Aa031B ..............................................................  66
Aa039B ..............................................................  66
Aa077B ..............................................................  66
Aa079B ..............................................................  66
Aa084B ..............................................................  66
Aa075C ..............................................................  66
Aa083C ..............................................................  66
Aa088C ..............................................................  66
con    GACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGAAGTCTATCTTGCGCGCAAGCCAATGGGTATTGGGCGGTAC

Aa001B .............................................................. 132
Aa031B .............................................................. 132
```

```
Aa039B ..................................................................... 132
Aa077B ..................................................................... 132
Aa079B .....C............................................................... 132
Aa084B ..................................................................... 132
Aa075C ..................................................................... 132
Aa083C ..................................................................... 132
Aa088C ..................................................................... 132
con    GCCGCtTCGAACTGGTAACCCACAGGCGAAGACAAATCGAGTGTTGCGGGATTACGGGTTCGGCCG

Aa001B ..................................................................... 198
Aa031B ..................................................................... 198
Aa039B ..................................................................... 198
Aa077B ..................................................................... 198
Aa079B ..................................................................... 198
Aa084B ..................................................................... 198
Aa075C ..................................................................... 198
Aa083C ..................................................................... 198
Aa088C ..................................................................... 198
con    ATGGCGCAAGCCTTCGTCGGGCCCCTCCATCCCAGGGTGTTCCGTTACGGGTGCTTGCACCCAGTG

Aa001B ..................................................................... 264
Aa031B ..................................................................... 264
Aa039B ..................................................................... 264
Aa077B ..................................................................... 264
Aa079B ..................................................................... 264
Aa084B ..................................................................... 264
Aa075C ..................................................................... 264
Aa083C ..................................................................... 264
Aa088C ..................................................................... 264
con    GACATCCCCGGAGTGCGTATGATGTGACCCGAAAGATGGTGAACTATGCCTGATCAGGTCGAAGTC

Aa001B ..................................................................... 330
Aa031B ..................................................................... 330
Aa039B ..................................................................... 330
Aa077B ..................................................................... 330
Aa079B ..................................................................... 330
Aa084B ..................................................................... 330
Aa075C ..................................................................... 330
Aa083C ..................................................................... 330
Aa088C ..................................................................... 330
con    AGGGGAAACCCTGATGGAGGACCGAAGCAATTCTGACGTGCAAATCGATTGTCAGAGTTGGGCATA

Aa001B ..................................................... 375
Aa031B ..................................................... 375
Aa039B ..................................................... 375
Aa077B ..................................................... 375
Aa079B ..................................................... 375
Aa084B ..................................................... 375
Aa075C ..................................................... 375
Aa083C ..................................................... 375
Aa088C ..................................................... 375
con    GGGGCGAAAGACCAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTTCCGA
```

Fig 30 Alignment of the D3 DNA sequences of *An. aconitus* Form B (Aa001B, Aa031B, Aa039B, Aa077B, and Aa084B) and Form C (Aa075C, Aa083C, and Aa088C). Each dot in the alignment indicates that the sequence is identical with that of the consensus sequence (con), and a dash denotes a deletion with respect to the other sequences. Numbering refers to the nucleotide sequences.

Determination of mitochondrial DNA (mtDNA) COII sequences: ทำการ amplify ส่วน COII จาก mtDNA ของยุงที่สกัดได้ข้างต้นโดยวิธี PCR ดังนี้ PCR reaction mix (50 μl)

ประกอบด้วย 1.5 mM$MgCl_2$, 20nM dNTPs, 50ng each primer (LEU-COII 5'-TCTAATATGGCAGATTAGTGCA-3' and LYS-COII 5'-ACTTGCTTTCAGTCATCTAATG-3'), platinum Tag DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) and DNA sample ประมาณ 0.1 ส่วนที่สกัดได้ PCR condition ที่ใช้คือ ขั้นที่ 1 Denaturation at 95°C , 5 mins ขั้นที่ 2 Denaturation at 94°C, 1 min ขั้นที่ 3 Annealing at 42°C, 1 min ขั้นที่ 4 Extension at 72°C, 2 mins (ซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5 Extension at 72°C, 10 mins

จากการเปรียบเทียบขนาดของ COII PCR products ของยุงแต่ละตัว บน 1% agarose gels พบว่า ขนาดของ COII PCR products ของกลุ่ม *An. aconitus* Form B และ Form C ทั้งตัวผู้และตัวเมีย เท่ากัน และไม่แตกต่างกับ PCR products ของ *An. minimus* A และ *An. sinensis* ดังแสดงไว้ใน Fig 31 ซึ่งผลที่ได้ตรงกับ ผลของจำนวนและลำดับเบสที่แสดงไว้ใน Fig 32

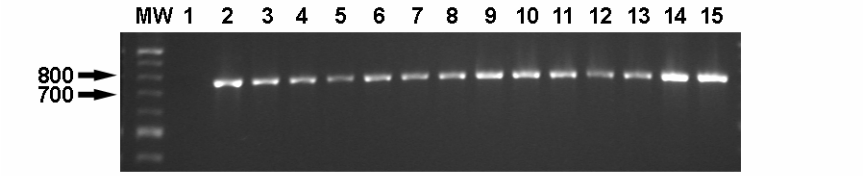


Fig 31 COII PCR products of *An. aconitus* Form B and Form C on a 1% agarose gel. Lanes are 1, control; 2, female Aa077B; 3, female Aa079B, 4, female Aa084B; 5, male Aa077B; 6, male Aa079B; 7, male Aa084B; 8, female Aa075C; 9, female Aa083C; 10, female Aa088C; 11, male Aa075C; 12, male Aa083C; 13, male Aa088C; 14, *An. minimus* A; and 15, *An. sinensis*. Molecular masses (MW) are in kilodalton on the left.

```
Aa077B  ----.....................................................T.....  61
Aa084B  ........................................................................  65
Aa075C  ......................G.................................................  65
Aa083C  ........................................................................  65
con     tctaATATGGCAGATTAGTGCAAtGAATTTAAGCTTCATATATAAAGATTTTATCTTTgGTTAGA

Aa077B  .....................................C.......................... 126
Aa084B  ........................................................................ 130
Aa075C  ........................................................................ 130
Aa083C  ........................................................................ 130
con     AAATGGCAACATGAGCAAATTTAGGACTACAAGATAGAtCATCTCCTTTAATAGAACAATTAAAT

Aa077B  ........................................................................ 191
Aa084B  ........................................................................ 195
```

```
Aa075C  ..............................................................  195
Aa083C  ..............................................................  195
con     TTTTTTCATGATCATACATTATTAATTTTAACAATAATTACAATTTTAGTTGGATATATTATAGG

Aa077B  ..............................................................  256
Aa084B  ..............................................................  260
Aa075C  ..............................................................  260
Aa083C  ..............................................................  260
con     AATATTAATATTTAATAAATTTACTAACCGATATTTATTACACGGACAAACTATTGAAATTATTT

Aa077B  ..............................................................  321
Aa084B  ..............................................................  325
Aa075C  ..............................................................  325
Aa083C  ..............................................................  325
con     GAACTGTATTACCAGCAATTATTTTAATATTTATTGCATTCCCTTCTCTACGACTTTTATATTTA

Aa077B  ..............................................................  386
Aa084B  ..............................................................  390
Aa075C  ..............................................................  390
Aa083C  ..............................................................  390
con     ATAGACGAAATTAATACTCCTTCTATTACTTTAAAATCAATTGGACATCAATGATATTGAAGTTA

Aa077B  ..............................................................  451
Aa084B  ..............................................................  455
Aa075C  ..............................................................  455
Aa083C  ..............................................................  455
con     TGAATATTCTGATTTTTTAAATTTAGAATTTGATTCTTATATAATTCCAACAAATGAATTAGAAA

Aa077B  ..............................................................  516
Aa084B  ..............................................................  520
Aa075C  ..............................................................  520
Aa083C  ..............................................................  520
con     TAAACGGATTTCGTTTATTAGATGTAGATAATCGAATTGTTTTACCTATAAATAATCAAATTCGA

Aa077B  ..............................................................  581
Aa084B  ..............................................................  585
Aa075C  ..............................................................  585
Aa083C  ..............................................................  585
con     ATTTTAGTTACTGCAACTGATGTTTTACATTCATGAACAGTTCCTTCCTTAGGAGTAAAAGTAGA

Aa077B  ..............................................................  646
Aa084B  ..............................................................  650
Aa075C  ..............................................................  650
Aa083C  ..............................................................  650
con     TGCAACTCCTGGACGTTTAAATCAAATTAATTTTTTAATTAATCGACCAGGTTTATTTTTTGGAC

Aa077B  ..............................................................  711
Aa084B  ..............................................................  715
Aa075C  ..............................................................  715
Aa083C  ..............................................................  715
con     AATGTTCAGAAATTTGTGGAGCAAATCATAGATTTATACCAATTGTAATTGAAAGAATTCCTATA

Aa077B  ..........................................................  770
Aa084B  ..........................................................  774
Aa075C  ..........................................................  774
Aa083C  ..............................................G...........  774
con     AATTATTTTATTAAATGAATTACTTCTATAACTAATTCATTAGATGACtGAAAGCAAGT
```

Fig 32 Alignment of the COII DNA sequences of *An. aconitus* Form B (Aa077B and Aa084B) and Form C (Aa075C and Aa083C). Each dot in the alignment indicates that the sequence is identical with that of the consensus sequence (con), and a dash denotes a

deletion with respect to the other sequences. Numbering refers to the nucleotide sequences.

Determination of mtDNA AT-rich sequences: ทำการ amplify ส่วน AT-rich จาก mtDNA ของยุงที่สกัดได้ข้างต้นโดยวิธี PCR ดังนี้ PCR reaction mix (50 μl) ประกอบด้วย 1.5 mMMgCl$_2$, 20nM dNTPs, 50ng each primer (TM-N-193 5'-TGGGGTATGAACCCAGTAGC-3' and SR-J-14233 5'-AAGAGCGACGGGCGATGTGT-3'), platinum Tag DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) and DNA sample ประมาณ 0.1 ส่วนที่สกัดได้ PCR condition ที่ใช้คือ ขั้นที่ 1 Denaturation at 95°C , 5 mins ขั้นที่ 2 Denaturation at 94°C, 1 min ขั้นที่ 3 Annealing at 60°C, 1 min ขั้นที่ 4 Extension at 72°C, 2 mins (ซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5 Extension at 72°C, 10 mins

หลังจากเปรียบเทียบขนาดของ AT-rich PCR products ของยุงแต่ละตัว บน 1% agarose gels พบว่า ขนาดของ AT-rich PCR products ของกลุ่ม *An. aconitus* Form B และ Form C ทั้งตัวผู้และตัวเมีย ไม่แตกต่างกัน และมีขนาดใกล้เคียงกันมากกับ PCR products ของ *An. minimus* A และ *An. sinensis* ดังแสดงไว้ใน Fig 33

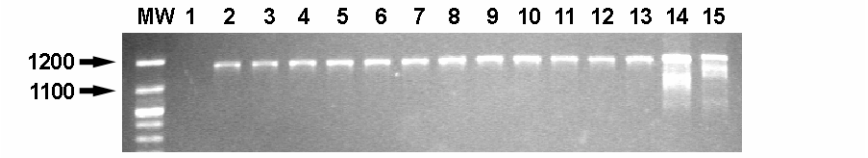


Fig 33 AT-rich PCR products of *An. aconitus* Form B and Form C on a 1% agarose gel. Lanes are 1, control; 2, female Aa077B; 3, female Aa079B, 4, female Aa084B; 5, male Aa077B; 6, male Aa079B; 7, male Aa084B; 8, female Aa075C; 9, female Aa083C; 10, female Aa088C; 11, male Aa075C; 12, male Aa083C; 13, male Aa088C; 14, *An. minimus* A; and 15, *An. sinensis*. Molecular masses (MW) are in kilodalton on the left.

TAACCGCAGTAGCTGGCACAAATTTTACCAATACTATATATTATTACTAATTCAAAATTTCTTTTATAATTAATATTAATTACTGC
GAATAAATAAAAAATAATTAATTTTTAAAATTAAAAATAATTCACACAAAAATTTACATGTAAAATAAAATAATAATAAAATATTT
AACTAGAAGTAGAAATAATATTATAATTAATTCAAAAACATAANNNTTTTTTTNTTATATAATATATTATTAAANNTATATTTTAA
TAATTTATATNAAAAATTAANNTNNATATAATTTATTAATTTATTTANNNATAAATTTTTATANNNGTNACAATTCTTCTAATNAA
TTTNCCCCTATTTTTTTTTTTTTTTNNNNNTTTAAAATCAAANANATTTAATTTTAANNNNTTAAATNTGATTNATTATTGNNNTAA
AAGTTTAATNNTAATTTAATTTTNNNNNNNNNNTATAATTATTTATTTTAAGTAAATTATTCTAATAGTTAATTAAANNNNNNNNN
TTTTCCAGTATATATATATAGATATATTTATATTATATATAATNNATTTANNNTATATATGTATATTTTTAATATAAATTTATTAA
TTATTAATAAATACTTTTTTTTTTTCAAATATAAGACTAATAGGTTTATAAATAATATTACCCATTTTATATAAATATATTATCTAA
TAAATGTTTATATAAATATATAAATCATTTATATAATAATTAATAATTTTGTTCCGTTTTTTTTAATTTTTATTTTAAATATTAAA
ATTAAAAAAAATAAAAAAAAATGAATTGCCTGATAAAAAGGATTACCTTGATAGGGTAAATCATGAAAT

Fig 34 AT-rich region; incomplete sequence.

Determination of guanylate cyclase intron (*gua*) sequences: ทำการ amplify ส่วน *gua* จาก gDNA ของยุงที่สกัดได้ข้างต้นโดยวิธี PCR ดังนี้ PCR reaction mix (50 μl) ประกอบด้วย 1.5 mMMgCl_2, 20nM dNTPs, 50ng each primer (GUA1 5'-TATGGCGAAGAACGTCATGATGGG-3' and GUA2 5'-CGAACAGGCAGTAGCGCGGCAT-3'), platinum Tag DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) and DNA sample ประมาณ 0.1 ส่วนที่สกัดได้ PCR condition ที่ใช้คือ ขั้นที่ 1 Denaturation at 95°C , 5 mins ขั้นที่ 2 Denaturation at 94°C, 40 sec ขั้นที่ 3 Annealing at 60°C, 1 min ขั้นที่ 4 Extension at 72°C, 1.15 mins (ซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5 Extension at 72°C, 10 mins

หลังจากเปรียบเทียบขนาดของ *gua* PCR products ของยุงแต่ละตัวบน 1% agarose gels พบว่า ขนาดของ *gua* PCR products ของกลุ่ม *An. aconitus* Form B และ Form C ทั้งตัวผู้และตัวเมีย ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงไว้ใน Fig 35

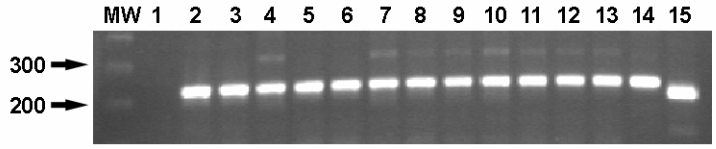


Fig 35 *Gua* PCR products of *An. aconitus* Form B and Form C on a 1% agarose gel. Lanes are 1, control; 2, female Aa077B; 3, female Aa079B, 4, female Aa084B; 5, male Aa077B; 6, male Aa079B; 7, male Aa084B; 8, female Aa075C; 9, female Aa083C; 10, female Aa088C; 11, male Aa075C; 12, male Aa083C; 13, male Aa088C; 14, *An. minimus* A; and 15, *An. sinensis*. Molecular masses (MW) are in kilodalton on the left.

CACGGAAGCGATGAAAATTACCATCGGAATCCGGCGTGACGGGNCTCCATNTCATCCATTCGAGGCTCCATTCGACGGGTGTCATC
GGTAACCGNNNGNNNNNGAAGTAAAATTACCTTCGTAGGCGTGAATCGGAA

Fig 36 *gua* intron region; incomplete sequence.

Analysis of ITS2, ITS1, D3, COII DNA sequences: เมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดของ PCR products ในแต่ละส่วนของ genetic markers ทั้ง 6 markers คือ ITS2, ITS1, D3, COII, AT-rich และ *gua* จะเห็นว่า ทุกส่วนให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน ในยุงทั้งสองรูปแบบ และเมื่อเปรียบเทียบ DNA sequences พบว่าส่วน ITS2 มีความแตกต่างของ DNA sequences หลายแบบ ในทั้งสองรูปแบบ ทำให้ไม่สามารถสรุป ความแตกต่างที่จำเพาะของแต่ละรูปแบบ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการสร้างกุญแจในการแยกยุงทั้งสองรูปแบบ ได้ สำหรับส่วน D3 และ COII นั้น DNA sequences ของทั้งสองรูปแบบเหมือนกัน (100% identity) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ส่วน D3 และ COII ไม่เหมาะสมในการใช้เป็นเครื่องมือในการแยกรูปแบบ ของยุง *An. aconitus* สำหรับการ sequence ในส่วน AT-rich และ *gua* (intron) ได้ผลไม่ดี ดังแสดงไว้ใน Fig 34 และ 36 จึงยุติการ sequence ของทั้งสองส่วนนี้

2.7 การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถ ในการยอมรับเชื้อมาลาเรีย

ได้นำ mixed colony ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี และแม่ฮ่องสอน มาศึกษาการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* ตามวิธีของ Chomcharn *et al*. (1980) โดยเปรียบเทียบกับยุงพาหะหลัก *An. dirus* B และ *An. minimus* A และ C จากการวิเคราะห์ผลของ oocyst และ sporozoite rates ในวันที่ 8 และ 12 หลังจากยุงกินเลือดที่มีระยะ gametocyte ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* พบว่ายุง *An. aconitus* มีความสามารถในการยอมรับเชื้อไม่แตกต่างจากยุงพาหะหลัก *An. minimus* A และ C รายละเอียดของ oocyst และ sporozoite rates ได้แสดงไว้ใน Table 11 และ 12 รูปของ sporozoite ได้แสดงไว้ใน Fig 37 ผลเพิ่มเติมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C มี sporozoite-like crystal ใน median lobe ของ salivary glands ที่อาจเป็นสาเหตุให้วินิจฉัยผิดพลาดเป็น true sporozoite ได้ และเป็นข้อควรระวังในการวินิจฉัย sporozoite ใน salivary glands ทั้งของยุงที่ทดสอบการติดเชื้อในห้องทดลองและยุงที่ติดเชื้อในภาคสนาม

2.8 การศึกษาความชุกชุมและนิสัยในการเข้ากัดกินเลือดของยุง *An. aconitus*

ได้ศึกษาความชุกชุมและนิสัยในการเข้ากัดกินเลือดของยุง *An. aconitus* โดยใช้คนเป็นเหยื่อล่อในบ้านและนอกบ้าน และใช้กระบือเป็นเหยื่อล่อห่างจากคนที่เป็นเหยื่อล่อนอกบ้าน 10 เมตร ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2548 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549 โดยทำการศึกษาเดือนละสอง

Table 11 The oocyst rates of *An. dirus* B, *An. minimus* A and C and *An. aconitus* Form B and C after feeding on blood containing gametocyte of *P. falciparum* and *P. vivax*, all dissected 8 days after feeding.

Malaria species	Mosquito species						
	An. dirus B	*An. minimus*		*An. aconitus* Form			
		A	C	B		C	
				CM	PB	CM	MS
P. falciparum							
Oocyst rate (No.)	100 (20/20)	91.67 (11/12)	ND	62.50 (5/8) NS	80.00 (8/10) NS	ND	ND
Average No. oocysts per	84.75 ± 45.53	18.64 ± 22.61	ND	31.40 ± 21.85 NS	19.63 ± 25.14 NS		
Infected midgut (range)	(19-182)	(1-81)		(2-35)	(1-79)		
P. vivax							
Experiment 1							
Oocyst rate (No.)	100 (7/7)	100 (5/5)	ND	100 (5/5)	ND	60.00 (3/5) NS	ND
Average No. oocysts per	69.71 ± 26.82	18.00 ± 6.93	ND	10.00 ± 6.04	ND	4.33 ± 4.93 *	ND
Infected midgut (range)	(39-118)	(11-27)		(4-19)		(1-10)	
Experiment 2							
Oocyst rate (No.)	90.00 (9/10)	83.33 (5/6)	ND	66.67 (4/6) NS	ND	ND	66.67 (4/6) NS
Average No. oocysts per	5.22 ± 3.73	2.00 ± 1.41	ND	1.00 ± 0.00	ND	ND	6.00 ± 3.46 *
Infected midgut (range)	(1-11)	(1-4)		(1)			(3-9)
Experiment 3							
Oocyst rate (No.)	100 (11/11)	81.82 (9/11)	50.00 (5/10) NS	ND	50.00 (2/4) NS	ND	ND
Average No. oocysts per	126.18 ± 55.92	22.78 ± 15.18	7.80 ± 8.23 NS	ND	19.50 ± 12.02 NS	ND	ND
Infected midgut (range)	(34-223)	(2-54)	(1-22)		(11-28)		

Mosquito strain; CM: Chiang Mai, MS: Mae Hong Son, PB: Phet Buri.

Oocyst rate: NS, $P > 0.05$, * , $P < 0.05$ (Fisher exact test).

Average No. oocysts per infected midgut: NS, $P > 0.05$, * , $P < 0.05$ (t-test, two-sided). ND: not done.

Table 12 The oocyst and sporozoite rates of *An. dirus* B, *An. minimus* A and C and *An. aconitus* Form B and C after feeding on blood containing gametocyte of *P. falciparum* and *P. vivax*, all dissected 12 days after feeding.

Malaria species	Mosquito species						
	An. dirus B	*An. minimus*		*An. aconitus* Form			
		A	C	B		C	
				CM	PB	CM	MS
P. falciparum							
Oocyst rate (No.)	100 (23/23)	100 (11/11)	ND	96.30 (26/27)	95.00 (19/20)	ND	ND
Average No. oocysts per	85.00 ± 26.41 (39-145)	5.45 ± 3.86 (1-15)	ND	13.35 ± 15.60 (1-54)	28.58 ± 28.42 (2-90)	ND	ND
Infected midgut (range)							
Sporozoite rate (No.)	95.65 (22/23)	100 (11/11)	ND	70.37 (19/27) NS	45.00 (9/20) *	ND	ND
P. vivax							
Experiment 1							
Oocyst rate (No.)	100 (4/4)	100 (2/2)	ND	ND	ND	100 (4/4)	ND
Average No. oocysts per	28.00 ± 25.07 (6-64)	5.50 ± 4.95 (2-9)	ND	ND	ND	9.75 ± 4.03 (5-14)	ND
Infected midgut (range)							
Sporozoite rate (No.)	100 (4/4)	100 (2/2)	ND	ND	ND	100 (4/4)	ND
Experiment 2							
Oocyst rate (No.)	15.79 (3/19)	11.11 (1/9)	ND	16.67 (2/12)	ND	ND	14.28 (2/14)
Average No. oocysts	1.33 ± 0.58	1.00 ± 0.00	ND	2.00 ± 1.41	ND	ND	1.00 ± 0.00

per	(1-2)	(1)		(1-3)			(1)
Infected midgut (range)							
Sporozoite rate (No.)	80.00 (16/20)	33.33 (3/9)	ND	16.67 (2/12) NS	ND	ND	14.28 (2/14) NS
Oocyst rate (No.)	100 (17/17)	66.67 (12/18)	39.13 (9/23)	ND	75.00 (9/12)	ND	ND
Average No. oocysts	33.53 ± 20.12	2.92 ± 1.24	2.89 ± 1.83	ND	2.89 ± 2.15	ND	ND
per	(7-77)	(1-5)	(1-6)		(1-7)		
Infected midgut (range)							
Sporozoite rate (No.)	100 (17/17)	77.78 (14/18)	52.17 (12/23) NS	ND	66.67 (8/12) NS	ND	ND

Mosquito strain; CM: Chiang Mai, MS: Mae Hong Son, PB: Phet Buri.

Sporozoite rate: NS, $P > 0.05$, *, $P < 0.05$ (Fisher exact test, χ^2-test for only experiment 3). ND: not done.

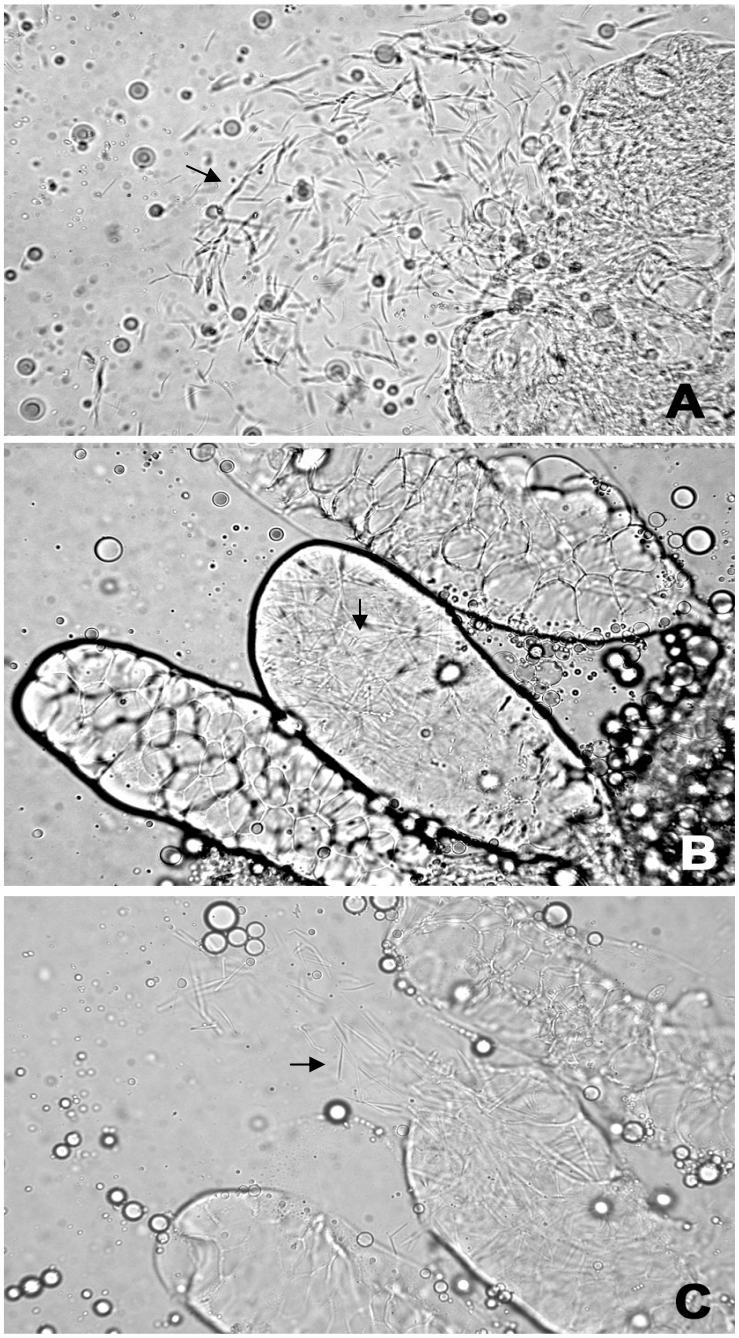


Fig 37 Salivary glands of *An. aconitus* Form B. (A) Showing free flow *P. vivax* sporozoites from the squashed salivary glands. Note, the regular spindle-shaped sporozoites (small arrow). (B) Showing sporozoite-like crystals inside the median lobe of salivary glands (small arrow). (C) Showing free flow sporozoite-like crystals from the squashed salivary glands. Note, the irregular, long or short, crystals with blunt or tapered end(s) (small arrow).