รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อใช้จัดจำแนกชนิดของยุงกลุ่ม *Mansonia* ที่พบในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล

โดย

ดร. จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย

เมษายน 2555

สัญญาเลขที่ MRG5280206

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อใช้จัดจำแนกชนิดของยุงกลุ่ม *Mansonia* ที่พบในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล

ดร. จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย

ภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อใช้จัดจำแนกชนิดของยุงกลุ่ม *Mansonia* ที่พบในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เสร็จสมบูรณ์ได้โดยโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ระยะเวลาดำเนินโครงการ 2 ปี ตั้งแต่มีนาคม 2552 ถึง มีนาคม 2554 รายงานการวิจัยฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิชาการในการศึกษาการจำแนกชนิดของยุงพาหะนำโรคเท้าช้าง โดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุล ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อประยุกต์ใช้ในการการศึกษาความสามารถในการเป็นแมลงพาหะและควบคุมการแพร่กระจายโรคได้

นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจาก รศ.ดร.ชำนาญ อภิวัฒนศร นักวิจัยที่ปรึกษาและคุณยุทธนา สามัง ในการให้คำปรึกษางานวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ทุกท่าน รวมทั้ง Prof. Jean Pierre Dujardin จาก UMR IRD – CNRS ประเทศฝรั่งเศส ที่ช่วยสนับสนุนโอกาสในการทำงานวิจัยร่วมกันและคำแนะนำต่างๆ ส่งผลให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณทุกท่าน

(จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย)
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5280206

ชื่อโครงการ : การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อใช้จัดจำแนกชนิดของยุงกลุ่ม *Mansonia* ที่พบในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล

ชื่อนักวิจัย: ดร. จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย

ภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

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

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (มีนาคม 2552 - มีนาคม 2554)

ยุงกลุ่ม *Mansonia* เป็นยุงพาหะที่สำคัญของโรคเท้าช้าง การจำแนกยุงกลุ่มนี้ออกจากยุงกลุ่มอื่นจึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคเท้าช้าง ยุงกลุ่ม *Mansonia* ในไทยมีทั้งหมด 6 ชนิด ในจำนวนนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ *Mansonia bonneae* และ *Mansonia dives* แยกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาได้ยาก การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเทคนิคใหม่ๆ ในการจำแนกชนิดของยุงกลุ่มนี้ ซึ่งได้แก่ DNA barcoding, PCR-RAPD และ Morphometrics สำหรับเทคนิค DNA barcoding ยีนที่ใช้เป็น marker ได้แก่ Cytochrome oxidase subunit I (COI) ภายหลังการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ COI ด้วย multiple alignment และ phylogenetics สามารถแยกยุงกลุ่ม *Mansonia* ได้เป็น 6 กลุ่มตามชนิดของยุงเหล่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าได้ค่าที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบยุงแต่ละชนิด ถึงแม้ว่าเทคนิคนี้สามารถใช้แยกยุงกลุ่มนี้ได้ แต่ยังพบว่าในการวิจัยต้องใช้ระยะเวลาพอสมควรกว่าจะได้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์และต้องใช้เงินทุนพอสมควร ดังนั้นจึงค้นหาเทคนิคอื่น เพื่อประหยัดเวลาและเงินทุน ซึ่งได้แก่เทคนิค Morphometrics ซึ่งใช้การประเมินและวิเคราะห์ความหลากหลายของรูปร่างและขนาดของปีกยุงและคำนวณหาค่า discriminant ด้วยโปรแกรม CLIC ในเบื้องต้นใช้เทคนิคนี้สามารถจำแนกยุงชนิด *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ออกจากกันได้ อีกเทคนิคหนึ่งซึ่งใช้หลักการของอณูชีวโมเลกุล ได้แก่ PCR-RAPD ซึ่งวิเคราะห์หาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายส่วนดีเอ็นเอด้วย random primers ทำให้ได้แถบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับยุงแต่ละชนิด เทคนิคนี้สามารถแยกยุงกลุ่ม *Mansonia* ยกเว้น *Ma. dives* อย่างไรก็ตามการนำเทคนิค PCR-RAPD มาใช้ต้องคำนึงการความแม่นยำของผลการวิจัยที่ได้ในแต่ละครั้ง เพื่อให้ได้ผลการวิจัยที่เสถียรทุกครั้ง

ดังนั้นจะเห็นว่าเทคนิคที่ให้ในการจำแนกชนิดของยุงมีอยู่หลายเทคนิค การวิจัยนี้เป็นการวิจัยแรกที่ทำการแยกชนิดของยุงพาหะของโรคเท้าช้าง ในการศึกษานอกสถานที่ การจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยายังคงเป็นวิธีมาตรฐาน ง่ายและประหยัด อย่างไรก็ตามเทคนิคอื่นๆ ที่พัฒนาต่อมามีประโยชน์ในการยืนยันชนิดในกรณีที่ไม่สามารถแยกด้วยวิธีมาตรฐานได้

คำหลัก : ยุง Mansonia, โรคเท้าช้าง, ลักษณะสัณฐานวิทยา, Morphometrics, DNA barcode, PCR-RAPD

Abstract

Project Code : MRG5280206

Project Title : Study of genetic variation for identification of *Mansonia* mosquitoes in Thailand by molecular techniques

Investigator : Dr. Jiraporn Ruangsittichai

Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

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

Project Period : 2 years (March 2009 – March 2011)

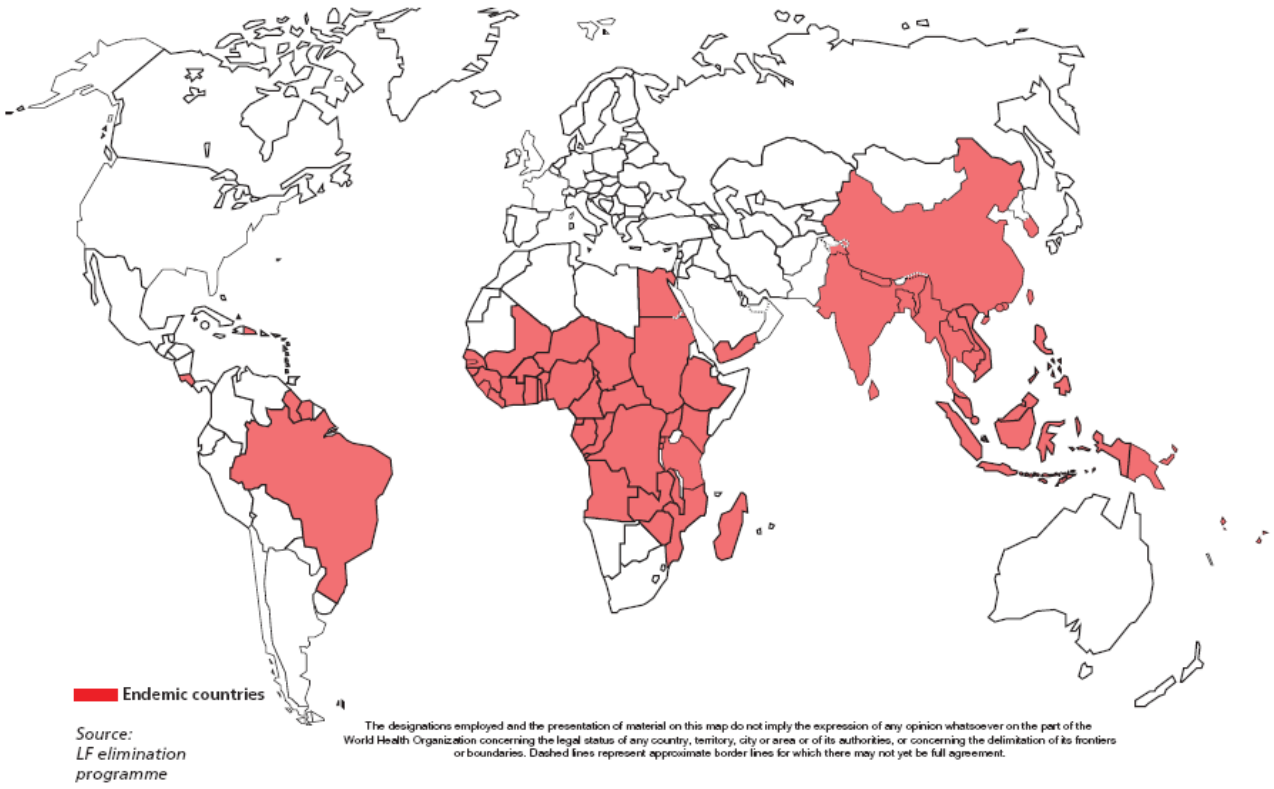
Mansonia mosquitoes are important natural vectors of lymphatic filariasis. Classification of six *Mansonia* species was importance for vector control and epidemiological study of disease. Two from six species, *Mansonia bonneae* and *Ma. dives*, are classified as closely related species and distributed in the same breeding places swamp forest. Morphological identification of these two closely related species is poorly reliable. The aim of this study is to find new methods for classification. DNA barcoding, PCR-RAPD and Morphometrics were used as new tools for confirming species. Because of the unclear morphology, DNA barcoding is the first technique for solving this problem. Cytochrome oxidase subunit I (COI) was a marker gene used for identification. After phylogenetic analysis, *Mansonia* mosquitoes could separate as each species and show high sequence divergence between species. Although this technique could identify *Mansonia* species, however it has time-consuming and costly, so Morphometrics was applied in doubtful specimens especially *Ma. bonneae* and *Ma. dives*. Its statistic result showed that morphometrics could separate these closely related species by evaluating wing shape variation using anatomical landmarks. While PCR-RAPD could separate some *Mansonia* species except *Ma.dives*. It has still developed and made precise and reproducibility.

In conclusion, there are many techniques to use for identification of *Mansonia* mosquitoes. This is the first study to classify the vectors of filariasis in many techniques. For field study, the first and easy technique to identify is classical identification by morphology. However other techniques should be done to confirm species in case of closely related species and cannot differentiate by morphology.

Keywords : Mansonia, filariasis, morphology, morphometrics, DNA barcode, PCR-RAPD

บทนำ

โรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis หรือ elephantiasis) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากพยาธิตัวกลม ชนิด *Wucheria bancrofti*, *Brugia malayi* และ *Brugia. timori* ที่นำโดยยุงพาหะกลุ่ม *Mansonia* และ *Culex* โรคนี้มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุข พบว่ามีประชากรกว่า 1,100 ล้านคนอาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ ประมาณว่า 120 ล้านคนป่วยเป็นโรคเท้าช้าง โดย 107 ล้านคนติดเชื้อ *W. bancrofti* และอีก 13 ล้านคนติดเชื้อชนิด *B. malayi* ประเทศที่พบโรคเท้าช้างมีอยู่ทั้งสิ้น 83 ประเทศ (WHO 2007) โดยพบผู้ป่วยใน ประเทศแถบเอเชียตะวันออกและเอเชียใต้สูงที่สุดถึง 64 % ตามด้วยประเทศแถบแอฟริกา 32 % สถานการณ์ของโรคนี้ในเอเชียตะวันออกและเอเชียใต้ พบว่า มีถึง 8 ประเทศที่มีผู้ป่วยด้วยโรคนี้ ประเทศเหล่านั้นได้แก่ บังคลาเทศ อินเดีย อินโดนีเซีย มัลดีฟ เมียนมาร์ เนปาล ศรีลังกา และไทย



รูปที่ 1 เขตพื้นที่และประเทศที่เป็นแหล่งเสี่ยงต่อการเป็นโรค Lymphatic filariasis (WHO, 2001a)

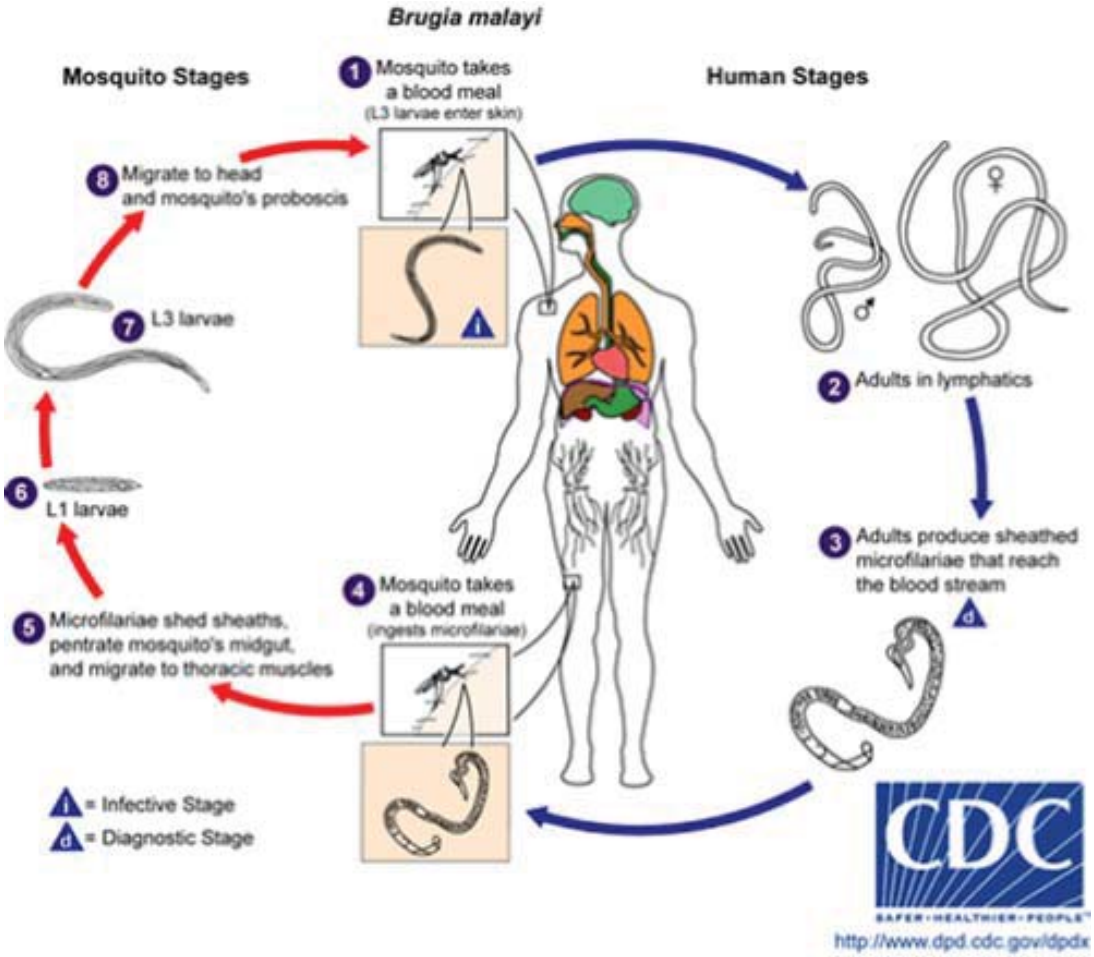
ตารางที่ 1 ยุงพาหะและเชื้อก่อโรคของ Lymphatic filariasis แบ่งตามพื้นที่ (Zagaria and Savioli, 2002)

Filaria	**Zone**	**Major vector**	***Minor vector***
Wuchereria bancrofti (Nocturnal periodic)	America	*Culex quinquefasciatus*	*Anopheles albomanus* *Anopheles aquasalis* *Anopheles darlingi* *Mansonia titillans* *Ochlerotatus scapularis* *Ochlerotatus taeniorhynchus*
	Africa	*Anopheles funestus* *Anopheles gambiae* *Culex quinquefasciatus*	*Anopheles arabiensis* *Anopheles hancocki* *Anopheles melas* *Anopheles merus* *Anopheles nili* *Anopheles pauliani* *Anopheles wellcomei* *Culex antennatus* *Mansonia uniformis*
	Middle East	*Culex pipiens molestus* *Culex quinquefasciatus*	*Culex antennatus*

Filaria	**Zone**	**Major vector**	***Minor vector***
	Papuan	*Anopheles farauti* *Anopheles koliensis* *Anopheles punctulatus*	*Culex annulirostris* *Culex bitaeniorhynchus* *Culex pipiens pallens* *Mansonia uniformis* *Ochlerotatus kochi*
Wuchereria bancrofti (Nocturnal subperiodic)	Nicobar, Thailand	*Ochlerotatus niveus* *Ochlerotatus harinasutai*	*Aedes annandalei* *Aedes desmotes* *Aedes imitator*
Wuchereria bancrofti (Diurnal subperiodic)	American Samoa	*Aedes polynesiensis*	*Aedes samoanus* *Ochlerotatus oceanicus*
	Samoa	*Aedes polynesiensis*	*Aedes updensis* *Aedes samoanus* *Ochlerotatus tutuilae* *Ochlerotatus oceanicus*
	Tonga	*Aedes tongae* *Aedes tabu* *Aedes kesseli*	*Ochlerotatus oceanicus*
	Fiji	*Aedes polynesiensis*	*Ochlerotatus vigilax* *Aedes psudoscutellaris* *Aedes horrescens* *Aedes rotumae* *Ochlerotatus fijiensis*

Filaria	**Zone**	**Major vector**	***Minor vector***
	Micronesia, Marshall Islands	*Culex quinquefasciatus*	
	Cook Islands, Tuvalu, Pitcairn, French Polynesia	*Aedes polynesiensis*	
Brugia malayi (Nocturnal periodic)	Fiji	*Aedes polynesiensis*	*Ochlerotatus vigilax* *Aedes psudoscutellaris* *Aedes horrescens* *Aedes rotumae* *Ochlerotatus fijiensis*
Brugia malayi (Nocturnal subperiodic)	South Asia	*Mansonia annulata* *Mansonia bonneae* *Mansonia dives*	*Coquillettidia crassipes* *Mansonia uniformis*
Brugia malayi (Diurnal subperiodic)	Thailand	*Coquillettidia crassipes*	
Brugia timori (Nocturnal periodic)	Indonesia (Timor)	*Anopheles barbirostris*	

ในประเทศไทยพบโรคนี้ในเขตชนบท การสำรวจครั้งแรกเกิดขึ้นเมื่อ พ.ศ.2499 โดย Dr. M.O.T. Lyengar และคณะในท้องที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง และปัตตานี โรคนี้ในประเทศไทยเกิดจากพยาธิ *W. bancrofti* ซึ่งพบแพร่กระจายตามแถบชายแกนไทยและเมียนมาร์ และโรคเท้าช้างที่เกิดจากเชื้อ *B. malayi* มีความชุกชุมสูงพบเฉพาะในจังหวัดภาคใต้ฝั่งตะวันออก ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ปัตตานี และนราธิวาส



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของ *B. malayi* (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

วงจรชีวิตของพยาธิชนิดนี้เกี่ยวข้องกับยุงพาหะที่สำคัญ คือยุง *Mansonia* โดยยุงจะถูกทำให้ติดเชื้อโดยกัดผู้ป่วยด้วยโรคนี้ซึ่งมี microfilaria อยู่ในกระแสเลือด ต่อมา microfilaria พัฒนาเป็น พยาธิตัวอ่อนระยะ L1, L2 และ L3 ซึ่งเป็นระยะที่ติดต่อไปยังคน โดยมันจะเดินทางไปที่หัวและปากยุงเพื่อรอเวลาให้ยุงกัดและเข้าสู่คนด้วยวิธีนี้ จากนั้นพยาธิ L3 จะพัฒนาต่อเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเมียอยู่ในระบบน้ำเหลือง สืบพันธุ์ และเจริญต่อเป็นระยะตัวอ่อน microfilaria อยู่ในกระแสเลือด จากวงจรชีวิตจะเห็นว่าโรคนี้มีการแพร่กระจายได้ต้องมียุงเป็นพาหะนำโรค โดยยุงที่เป็นพาหะที่สำคัญในการนำโรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ได้แก่ ยุงในสกุล *Mansonia* ที่พบเป็นพาหะ มีอยู่ 6 ชนิด ได้แก่ *Mansonia bonneae,*

Mansonia dives, Mansonia uniformis, Mansonia indiana, Mansonia annulata และ *Mansonia annulifera* ยุงในกลุ่มนี้ชอบอาศัยในพื้นที่แบบน้ำขังและมีพืชน้ำที่มีรากเช่น หญ้า กก อ้อ ขึ้นอยู่เป็นจำนวนมากโดยแผ่ปกคลุมบนผิวน้ำซึ่งเป็นลักษณะแบบป่าพรุ โดยพบว่า *Ma. bonneae* เป็นพาหะหลักในพื้นที่ที่มีสิ่งแวดล้อมแบบพรุปิด (swamp forest) และ *Ma. uniformis* เป็นพาหะหลักในพื้นที่ที่มีสิ่งแวดล้อมแบบพรุเปิด ส่วนยุงที่เหลือเป็นพาหะรอง (Apiwathnasorn et al, 2006a, 2006b, 2006c; Rattanarithikul et al, 2006; Samung et al, 2006) ดังนั้นการจัดจำแนกชนิดของยุงในสกุล *Mansonia* ให้ถูกต้องถือว่ามีความสำคัญ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยด้านอื่นๆ ต่อไป ได้แก่ การศึกษาความสัมพันธ์ของยุงแต่ละชนิดในแต่ละพื้นที่ในแง่ของการระบาดวิทยา, การควบคุมยุง, การนำโรคและความสามารถในการเป็นพาหะ

การจำแนกยุงกลุ่ม *Mansonia* ในเริ่มแรกใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นกุญแจในการจำแนก มีการใช้ลักษณะของ scale บนปีก ส่วนอกและส่วนท้อง เพื่อช่วยในการจำแนก โดยใช้กุญแจของ Rattanarithikul et al, 2006 ได้ดังนี้

PLATE 9

KEY TO THE SPECIES OF *MANSONIA* SUBGENUS *MANSONIOIDES* ADULT FEMALES

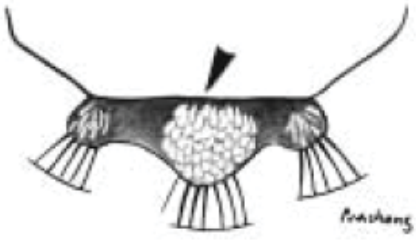
Characters: Wing with vein 1A reaching margin well beyond base of crossvein mcu; prespiracular setae absent; postpiracular setae present; wing veins with dorsal scales broad and strongly asymmetrical, dark and white scales mixed

Scutum with white scales forming distinct round white spots

Scutum with white scales not forming distinct round white spots

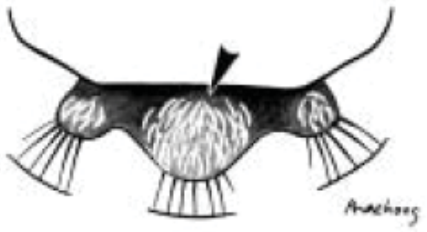
→ To PLATE 10

Scutellum with broad white scales on median lobe



Ma. annulifera

Scutellum with narrow white scales on median lobe



→ To PLATE 11

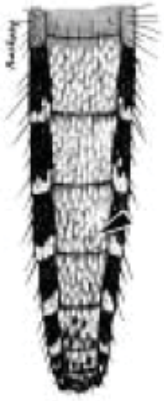
PLATE 10

From PLATE 9: Scutum with white scales not forming distinct round white spots

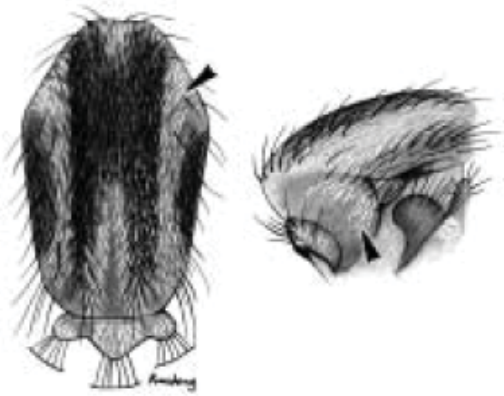
Abdominal sterna III-VIII with many apical dark scales

Ma. annulata

Abdominal sterna III-VII pale-scaled, infrequently with dark scales

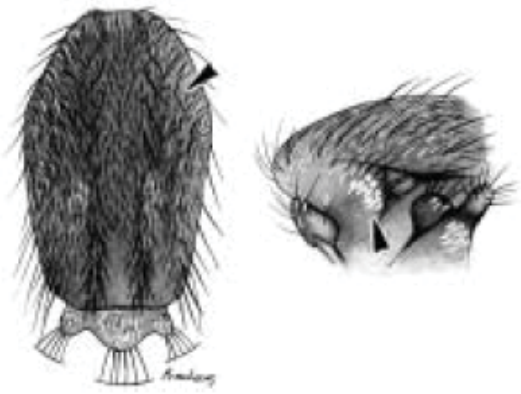


1. Scutum with pair of lateral longitudinal stripes of pale scales
2. Postpronotum with narrow pale scales



Ma. uniformis

1. Scutum without pair of lateral longitudinal stripes of pale scales
2. Postpronotum with broad pale scales



Ma. indiana

PLATE 11

From PLATE 9: Scutellum with narrow white scales on median lobe

1. Supraalar area with patch of narrow white scales
2. Foretibia with complete basal white band

Ma. dives

1. Supraalar area without patch of narrow white scales
2. Foretibia without complete basal white band

Ma. bonneae

เนื่องจากการจัดจำแนกชนิดของแมลงมักใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งการจำแนกด้วยวิธีดังกล่าวใช้เวลานานในการจำแนกและจำเป็นต้องพึ่งพานักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านสัณฐานวิทยาเฉพาะด้านที่มีจำนวนน้อยมากในปัจจุบันซึ่งทำให้เกิดปัญหาการพัฒนางานวิจัยเป็นไปได้อย่างล่าช้า นอกจากนี้มียุงบางชนิดมีลักษณะจำเพาะที่มีความซับซ้อน ที่เรียกว่า species complex ลักษณะดังกล่าว ไม่สามารถแยกชนิดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นวิธีทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะใช้จำแนกชนิดของยุงในกลุ่มนี้ จึงมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกชนิดโดยใช้หลายๆ วิธี ซึ่งวิธีเหล่านั้นไม่จำเป็นต้องได้ยุงที่สมบูรณ์ การจำแนกชนิดด้วยวิธีเหล่านั้นแต่เดิมใช้การศึกษาการย้อมสีระดับเซลล์ (Cytogenetics) ใช้ความแตกต่างของแถบสีในโครโมโซมของยุง *Anopheles sundaicus* (Sukowati and Baimai., 1996) *Anopheles barbirostris* (Saeung et al, 2007) แต่เทคนิคดังกล่าวต้องใช้ความชำนาญสูงในการวิเคราะห์แถบสีที่เกิดขึ้นหลังการย้อมโครโมโซม ต่อมาได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ทางชีวเคมีจากลักษณะของ Isozyme โดยดูความแตกต่างของลักษณะแถบโปรตีนของ Isozyme ที่เกิดขึ้นภายหลังการแยกแถบโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Protein electrophoresis) ของยุง *An. sundaicus* (Sukowati et al., 1999) *Aedes aegypti* (Nayar et al., 2002; Failloux et al., 2002) อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องเป็นตัวอย่างที่เก็บสดโปรตีนที่ยังคงสภาพอยู่และควรที่จะแช่ในตู้แช่แข็ง รวมทั้งต้องใช้ปริมาณตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ในปริมาณมาก

ดังนั้นเทคนิคที่ได้กล่าวไปยังมีข้อจำกัด จึงได้มีการพัฒนาการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอโดยใช้ PCR-based method ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างยุงที่ไม่สมบูรณ์หรือมีปริมาณน้อยได้ ได้แก่ การศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย การเพิ่มขยายยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ในเทคนิค DNA barcoding ในกลุ่มยุงประเทศอินเดีย (Kumar et al., 2007) และกลุ่มยุงในประเทศแคนาดา (Cywinska et al., 2006), การเพิ่มขยายยีนและวิเคราะห์ความแตกต่างของยีน COII, ND5, ND6 และ Cyt-b ของยุงกลุ่ม *Anopheles* (Ma et al., 2006; Dusfour et al., 2007; Ali et al., 2007; Morgan et al., 2009; Takenaka et al., 2010; Bourke et al., 2010) หรือ Nuclear DNA ในส่วนของ ribosomal DNA เช่น Internal transcribed spacer I (ITSI), Internal transcribed spacer I (ITSII) , Domain 3 (D3) ของ 28S rDNA ของยุง *An. sundaicus* (Linton et al., 2005; Alam et al., 2006) ยุงกลุ่ม *Anopheles* (Coetzee and Fontenille., 2004; Marrelli et al., 2005; Marrelli et al., 2006; Mohanty et al., 2009; Swain et al., 2010) ITS II ใน rDNA ในการจำแนกชนิด *Anopheles dirus* complex (Walton et al.,1999) intergenic spacer ใน rDNA เพื่อใช้ในการจำแนก *Anopheles gambiae* complex (Collins and Paskewitz., 1996) การใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกชนิดของยุง *Anopheles stephensi* (Djadid et al., 2006) *Anopheles*

albitarsis (Lehr et al., 2005) การใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการจำแนกชนิดของยุง *Anopheles culicifacies* (Goswami et al., 2005), ยุงกลุ่ม *Anopheles* (Matson et al., 2008) *Anopheles annularis* (Alam et al., 2007a; Alam et al., 2007b), นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ใช้ในการจำแนกยุง *Anopheles funestus* (Temu et al., 2007) *Anopheles annularis* (Swain et al., 2009) เทคนิค Real-time PCR ในการจำแนกยุง *Aedes albopictus*, *Aedes scutellaris* และ *Aedes aegypti* (Hill et al., 2008) รวมทั้งการศึกษาหา species-specific primers เพื่อใช้ในการเพิ่มขยายลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับยุงแต่ละชนิด *Anopheles dirus* (Walton et al., 1999; Huong et al.,2001) *Anopheles maculipennis* (Oshaghi et al., 2003) *Anopheles albitarsis* (Brochero et al., 2007) *Culex vishnui* (Toma et al. 2000) จนกระทั่งปัจจุบันได้มีการศึกษาใช้ยีนชนิดอื่นๆมาใช้ในการศึกษาการจำแนกชนิด ดังเช่น ยีนของ NADPH-cytochrome P450 reductase ในการจำแนกยุง *Anopheles cruzii* (Rona et al., 2010) ยีนของ acetylcholinesterase-2 (ace-2) ในการจำแนกยุง *Culex pipiens* (Smith et al.,2004; Bahnck et al., 2006; Kasai et al., 2008)

ในการแยกชนิดของแมลงยังมีอีกเทคนิคหนึ่งซึ่งยังคงใช้เทคนิค PCR แต่ primers ที่ใช้มีลักษณะเฉพาะที่เรียกว่า universal primers ซึ่งสามารถใช้ในการแยกชนิดของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดยใช้ primers เพียงคู่เดียว เทคนิคนี้มีชื่อเรียกว่า DNA barcoding เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นมาเนื่องจากในช่วงเวลาที่ผ่านมากลุ่มของนักอนุกรมวิธาน (taxonomist) โดยเฉพาะกลุ่ม morphology taxonomist ต้องใช้เวลานานมากในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตให้เป็นหมวดหมู่ รวมทั้งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านที่มีความชำนาญโดยเฉพาะในการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และงานดังกล่าวเป็นงานที่ละเอียดอ่อนต้องมีความมานะอุตสาหะสูง ดังนั้นเพื่อที่จะช่วยในงานด้านการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตให้เร็วขึ้น จึงมีนักวิจัยกลุ่มหนึ่งจากมหา วิทยาลัยเกลฟ (University of Guelph) แห่งประเทศแคนาดา ได้คิดค้นและริเริ่มงานวิจัยด้าน DNA barcode ครั้งแรกในปี 2003 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DNA barcode มีการจัดทำเป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการเก็บข้อมูลของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ในรูปแบบของความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) โดยอาศัยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วย PCR-based method ของ mitochondrial gene ชนิด Cytochrome oxidase subunit I (COI), DNA sequencing, nucleotide analysis โดยใช้ bioinformatics เทคนิค DNA barcode นี้กำลังได้รับความสนใจเป็นพิเศษในกลุ่มที่เป็น morphology taxonomist และ molecular taxonomist ในขณะนี้งานวิจัยทางด้าน DNA barcode สามารถรวบรวมและจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของยีน COI ไปได้แล้วมากกว่า 1,500,000 สปีชีส์ (updated มกราคม 2555) จากสิ่งมีชีวิตที่เป็น eukaryote ทั้งหมด ประมาณ 10,000,000 สปีชีส์ นอกจากนี้ DNA barcode ได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA

sequencing) ให้ง่ายขึ้น รวดเร็วและชัดเจน เพื่อพัฒนาให้สามารถนำไปใช้ได้ในงานออกภาคสนาม (field) ต่อไป งานวิจัยทางด้านดีเอ็นเอบาร์โคดที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติมีอยู่มากกว่า 40 เรื่อง ตั้งแต่ปี 2005 ดังเช่น การแยกชนิดในกลุ่มของแมงมุม นก ผีเสื้อ ยุง เป็นต้น (Hebert et al., 2003a, 2003b, 2004a, 2004b; Hajibabaei et al., 2006; Cywinska et al., 2006; Kumar et al.,2007)

นอกจากนี้ ได้เพิ่มเติมเทคนิคในการจำแนกชนิด ได้แก่ เทคนิค Morphometrics ซึ่งเป็นวิธีการทางด้านกายภาพ เป็นการวัดระยะจุดตัด (Landmark) ของเส้น vein บนปีกยุงและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLIC พัฒนาโดย Prof. Jean Pierre Dujardin ซึ่งใช้พื้นฐานทางด้านสถิติมาใช้ เพื่อสร้างเป็นรูปร่างและขนาดแบบจำลองซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาการจำแนกชนิดของยุง งานวิจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ การจำแนกกลุ่มยุง *Ae aegypti* (Jirakanjanakit et al., 2007, 2008), แมลงกลุ่ม Triatomine (Schofielda and Galvão, 2009; Pires et al., 2011) งานวิจัยทบทวนในการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์แมลงทางการแพทย์ (Dujardin, 2008)

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยุง *Mansonia* โดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา ได้แก่ PCR method ร่วมกับการทำ DNA sequence analysis ซึ่งจะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ผลของ DNA sequence ร่วมกับผลของ RFLP และ RAPD รวมทั้งมีการนำเทคนิค Morphometrics มาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดควบคู่ไปกับเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาและวิธีทางลักษณะสัณฐานวิทยา เพื่อนำไปสู่การอธิบายถึงภาวะการเป็นพาหะนำโรค การควบคุมยุง การควบคุมและระบาดวิทยาของโรคเท้าช้าง

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความแตกต่างในลำดับดีเอ็นเอของนิวเคลียส และไมโตคอนเดรียในยุง *Mansonia* ชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุล
2. เพื่อศึกษาและวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (Molecular phylogeny) ของยุง *Mansonia*
3. เพื่อวิเคราะห์หาเทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ สำหรับใช้ในการจำแนกชนิดของยุง *Mansonia*
4. เพื่อวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค Morphometrics มาใช้ในการจำแนกชนิดของยุง *Mansonia*
5. เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์หรือแนวโน้มในการเป็นพาหะนำโรคของยุงกลุ่ม *Mansonia*

วิธีการทดลอง

1 การเก็บตัวอย่างยุง

ทำการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยและลูกน้ำของยุง *Mansonia* ทั้ง 6 ชนิด ได่แก่ *Ma. bonneae, Ma. dives, Ma. uniformis, Ma. Indiana, Ma. annulata* และ *Ma. annulifera* โดยการเก็บรวบรวมจากการออกภาคสนามตามแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติตามป่าพรุ ในจังหวัดต่าง ๆของประเทศไทย จากนั้นนำมาแยกชนิดในเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยในตู้ deep freezer -80°C สำหรับลูกน้ำที่เก็บมาจากภาคสนามนำมาเลี้ยงต่อให้เจริญเป็นยุงตัวเต็มวัย นำมาแยกชนิดแล้วจึงนำไปเก็บที่ตู้ deep freezer -80°C ต่อไป

2. วิธีการวิจัย

ทำการศึกษาที่ภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล

2.1 การจำแนกชนิดของยุงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำตัวอย่างยุงมาทำการแยกและจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยกุญแจของผู้วิจัยในกลุ่มต่าง ๆที่ได้มีการรวบรวมเอาไว้โดยใช้รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันอยู่รวมเป็นชนิดเดียวกัน โดยใช้กุญแจของ Rattanarithikul *et al*, 2006

2.2 การสกัดสารพันธุกรรม (genomic DNA)

วิธีการสกัด DNA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ อ้างอิงตาม QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)

สารเคมี 1. QIAamp® DNA Mini Kit

2. Ethanol (96-100%)

ขั้นตอนการสกัด DNA

1. นำตัวอย่างยุง ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และนำมาบดให้ละเอียดด้วย Teflon pestle ในสารละลาย Buffer ALT (kit) ปริมาณ 180 µl

2. เติม Proteinase K (kit) ปริมาณ 20 µl เพื่อย่อยส่วนของโปรตีนจากแมลง โดยเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานร่วมกับ Buffer ALT จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex ประมาณ 15 วินาที และนำไปใส่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ overnight โดยให้นำตัวอย่างในแต่ละหลอดมาปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 15 วินาที เป็นระยะ ๆ

3. เมื่อครบเวลาให้นำตัวอย่างแต่ละหลอดมาปั่นตกตะกอนอย่างเร็ว (fast speed) โดยใช้เครื่อง Microcentrifuge เพื่อกำจัดหยดน้ำที่ติดอยู่ที่ฝาหลอด

4. เติม Buffer AL (kit) ปริมาณ 200 μl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 15 วินาที และนำไปใส่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนอย่างเร็ว (fast speed) ด้วยเครื่อง Microcentrifuge ในขั้นตอนนี้พบตะกอนขาวเกิดขึ้นหลังจากใส่ Buffer AL แต่ตะกอนนี้จะละลายที่อุณหภูมิ 70°C

5. เติม 96-100% Ethanol ปริมาณ 200 μl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ประมาณ 15 วินาทีและปั่นตกตะกอนอย่างเร็วอีกครั้ง

6. ใส่ตัวอย่างส่วนของเหลว ลงใน QIAamp Spin column (ที่มี collection tube ขนาด 2 ml) อย่างระมัดระวังโดยไม่ให้เปียกขอบของ QIAamp Spin column จากนั้นปิดฝาให้แน่นและนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่มีความเร็ว 8,000 rpm ประมาณ 1 นาที เมื่อครบเวลานำ QIAamp Spin column วางลงใน collection tube ใหม่ และทิ้งส่วนของเหลวเดิมที่ได้จากการปั่นตกตะกอน (filtrate) ในขั้นตอนนี้ DNA ของแมลงได้จับอยู่กับ QIAamp silica-gel membrane ใน QIAamp Spin column แล้ว

7. เติม Washing buffer, Buffer AW1 (kit) ปริมาณ 500 μl และปิดฝา QIAamp Spin column ให้แน่นแล้วจึงนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่มีความเร็ว 14,000 rpm ประมาณ 1 นาที เมื่อครบเวลานำ QIAamp Spin column วางลงใน collection tube ใหม่ และทิ้งส่วนของเหลวเดิมที่ได้จากการปั่นตกตะกอน (filtrate)

8. เติม Washing buffer, Buffer AW2 (kit) ปริมาณ 500 μl และปิดฝา QIAamp Spin column ให้แน่นแล้วจึงนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่มีความเร็ว 14,000 rpm ประมาณ 1 นาที เมื่อครบเวลานำ QIAamp Spin column ปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 rpm เพื่อกำจัด Buffer AW2 ออกให้หมด และทิ้งส่วนของเหลวเดิมที่ได้จากการปั่นตกตะกอน (filtrate)

9. นำ QIAamp Spin column ลงใน collection tube ใหม่ และเติม elution buffer, Buffer AE (kit) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้งจึงนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาให้ดูดส่วนของ DNA ที่ถูกปั่นตกลงมาใน collection tube ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่สะอาด จากนั้นจึงเก็บ DNA ที่ได้ใน -70°C freezer (สำหรับ long term storage ควรเก็บใน liquid nitrogen หรือทำการ concentrate ด้วยเครื่อง concentrator)

10. ทำซ้ำในข้อ 10 เพื่อเก็บ DNA elution 2 แต่เพิ่มเวลาหลังจากใส่ Buffer AE จาก 1 นาทีเป็น 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปปั่นตกตะกอน

2.3 Agarose gel electrophoresis

สารเคมี 1. Agarose

2. λDNA (300 ng/μl)

3. 10X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer

4. dH_2O

5. Ethidium Bromide

วิธีทำ

1. เตรียม 1X TBE bufferโดยทำการเจือจางจาก 10X TBE buffer ด้วย dH_2O

2. เตรียม 1% agarose gel โดยชั่ง agarose ปริมาณ 0.28 g แล้วนำไปละลายใน 1X TBE จำนวน 40 ml ด้วย microwave ที่ high temperature ประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นแล้วจึงนำไปเทลงใน gel casting tray และทำ well โดยใช้ comb ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่ง agarose gel แข็งตัวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

3. นำ agarose gel ที่แข็งแล้วใส่ลงใน Gel electrophoresis chamber โดยมี 1X TBE buffer เป็น running buffer

4. นำ DNA ของแมลง ปริมาณ 18 μl ผสมกับ 10X Loading dye ปริมาณ 2 μl และนำไป load ลงไปในแต่ละ well ของ agarose gel โดยที่ DNAของยุง เคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้ volt ที่ 100 volt เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

5. เมื่อครบเวลา นำ agarose gel ไปแช่ใน 0.5X TBE buffer ที่ผสมด้วย Ethidium bromide 0.5 μg/ml final concentration เป็นเวลา 10 นาทีแล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 10 -15 นาที จากนั้นจึงนำ agarose gel ไปส่องภายใต้เครื่อง UV Transilluminator

2.4 การเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

ในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรม (DNA) ในโครงการวิจัยครั้งนี้ ใช้ genomic DNA ของยุง *Mansonia* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ส่วนดีเอ็นเอตั้งต้น (forward and reverse primer) ในการวิจัยนี้ออกแบบมาจากยีน Cytochrome oxidase I (COI) จากไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็น universal primers สามารถใช้เป็น primers ในการเพิ่มขยายยีนได้ในยุงทุกชนิด ในที่นี้ได้ใช้ 2 primers โดย LepF1 และ LepR1 primers ใช้สำหรับเพิ่มขยายยีนของยุง *Ma. bonneae, Ma. dives, Ma. uniformis, Ma. Indiana, Ma. annulata* และ *Ma. annulifera* ส่วน C1J-1718 และ C1N-2191 primers ใช้สำหรับเพิ่มขยายยีนของยุง *Ma. dives*

ชื่อ primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'……3')
LepF1	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG
LepR1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA
C1J-1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC
C1N-2191	CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC

ตารางที่ 2 Primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน COI

จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ, ดีเอ็นเอตั้งต้น, dNTPs, PCR buffer, $MgCl_2$ และ น้ำกลั่น โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ดังต่อไปนี้

Reagent	Final concentration	Reaction mixture (total 50 μl)
Sterile deionized water	-	Variable
10x PCR buffer	1x	5 μl
2 mM dNTP	0.2 mM of each	5 μl
Forward primer	0.1-1 μM	Variable
Reverse primer	0.1-1 μM	Variable
Taq DNA polymerase	1.25-2.5 u	Variable
25 mM MgCl2	1.5 mM	3 μl
Template DNA	10 pg-1 μg	Variable

ตารางที่ 3 Master mix ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน COI

เมื่อได้สัดส่วนของ reaction mixture แล้ว จึงนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) ที่ใช้อุณหภูมิต่างๆ ดังตารางที่ 4

	LepF1 และ LepR1 primers (35 cycles)		C1J-1718 และ C1N-2191 primers (30 cycles)	
	Temp. $^{\circ}$C	Time sec	Temp. $^{\circ}$C	Time sec
Denaturation	95	30	94	60
Annealing	55	40	55	60
extension	72	60	72	60

ตารางที่ 4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน COI

Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1-2 นาที ทำซ้ำจำนวน 25-30 รอบ รอบสุดท้ายทำ final extension 72°C ประมาณ 5-10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็ง

2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product (DNA sequencing) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้ มาเทียบหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และนำมาวิเคราะห์ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal X และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละชนิดมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการวิเคราะห์ molecular phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม MEGA4.1

2.6 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR

การศึกษา RAPD-PCR มีการใช้ random primers จาก R e a d y To Go™ RAPD Analysis Beads, Amersham Biosciences ดังนี้

RAPD Analysis Primer 1 - (5'-d[GGTGCGGGAA]-3')

RAPD Analysis Primer 2 - (5'-d[GTTTCGCTCC]-3')†

RAPD Analysis Primer 3 - (5'-d[GTAGACCCGT]-3')

RAPD Analysis Primer 4 - (5'-d[AAGAGCCCGT]-3')*

RAPD Analysis Primer 5 - (5'-d[AACGCGCAAC]-3')*

RAPD Analysis Primer 6 - (5'-d[CCCGTCAGCA]-3')*

Positive control ได้แก่ *Escherichia coli* DNAs

วิธีทำ

1. ใส่ส่วนผสมจาก RAPD Analysis Beads และ ดีเอ็นเอของยุงลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube ดังนี้

25 pmol of a single RAPD primer	X µl
5-50 ng template DNA	Y µl
Distilled water to total of	25 µl

2. ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในข้อ 1 ให้เข้ากันด้วย vortexing นำไปปั่นอย่างเร็วเพื่อให้สารทั้งหมดตกลงมาที่ส่วนล่างของหลอดทดลอง 1.5 ml
3. ทำการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermocycler โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ 45 cycles ของ 95°C เป็นเวลา 1 นาที, 36°C เป็นเวลา 1 นาที และ 72°C เป็นเวลา 2 นาที
4. ตรวจสอบลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 2% agarose gel โดยทำการผสม RAPD-PCR product 5 µl และ 6x loading dye 1 µl แล้วจึงนำไปโหลดใน agarose gel

2.7 เทคนิค Morphometrics

เนื่องจากยุง Mansonia ทั้ง 6 ชนิด มี 2 ชนิดที่ยุงตัวเต็มวัยจำแนกออกจากกันได้ยากด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งได้แก่ *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ดังนั้นจึงนำเทคนิคนี้มาใช้ในการจำแนกเพื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาโดยเปรียบเทียบกับผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ COI ในการเปรียบเทียบครั้งนี้ได้ตัวอย่างยุง *Ma. dives* เพิ่มเติมจากประเทศพม่า จำนวน 16 ตัว ดังตารางดังต่อไปนี้

Specimens	Number of specimens (Gender)	Method of capture	Date of sampling (No.)	Place of collection
Ma. bonneae	28 (Female)	Biting collection (aspirator)	April. 2005 (28)	Surat Thani, Thailand
	24 (Male)	Biting collection (aspirator)	April 2005 (24)	Surat Thani, Thailand
Ma. dives	15 (Female)	Biting collection (aspirator)	Feb. 2005 (3), Aug. 2009(12)	Narathiwat, Thailand Surat Thani, Thailand
	5 (Male)	Biting collection (aspirator)	Feb. 2005 (5)	Narathiwat, Thailand
	37 (Female)	Biting collection (aspirator)	Dec. 2009	Dawei, Myanmar

ตารางที่ 5 ตัวอย่างยุง *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ที่เก็บได้จากแหล่งเพาะพันธุ์ในที่ต่างๆ

เทคนิค Morphometrics มีขั้นตอนดังนี้

1. ถ่ายรูปปีกยุงของ *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* และทำการกำหนดจุด landmark ที่ปีกยุง บริเวณที่มีเส้น vein ตัดกัน ได้ทั้งหมด 13 จุด จากนั้นคำนวณ size means และ variances ด้วย ANOVA
2. การคำนวณหาค่า Generalized Procrustes Algorithm (GPA), mean shapes ระหว่างยุง 2 ชนิดProcrustes superimposition และการวิเคราะห์ การแยกชนิดด้วย discriminant analysis ด้วยโปรแกรม CLIC package (http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/clic/index.html)

ผลการทดลอง

ชีววิทยาของยุง Mansonia

ยุงที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้แก่ ยุงกลุ่ม *Mansonia* จัดอยู่ใน subfamily Culicinae, subgenera Mansonioides เป็นยุงพาหะนำโรคเท้าช้าง ยุงกลุ่มนี้ มี 6 ชนิด ได้แก่ *Ma. annulata*, *Ma. annulifera*, *Ma. bonneae*, *Ma. dives*, *Ma. indiana* และ *Ma. uniformis* โดยพบว่า แหล่งเพาะพันธุ์ที่พบยุงกลุ่มนี้แตกต่างกัน

Ma. annulata, *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* อาศัยอยู่ในป่าพรุ (swamp forest) ซึ่งมีพืชยืนต้นเช่น เสม็ดขาว และวัชพืชน้ำประเภทหญ้าขึ้นหนาแน่น มีร่มครึ้มตลอดเวลา

Ma. annulifera, *Ma. indiana* และ *Ma. uniformis* อาศัยอยู่ในพรุเปิด (open swamp) มีพืชน้ำประเภท จอก ผักตบชวา และแสงแดดส่องถึง

จะเห็นว่ายุงกลุ่มนี้มีพบตามแหล่งที่มีพืชน้ำขึ้น ยุงตัวเมียเลือกวางไข่เกาะกันเป็นกลุ่มใต้ใบพืชน้ำ ไข่มีลักษณะปลายแหลม ลูกน้ำและดักแด้ต้องอาศัยรากพืชและลำต้นของพืชที่ขึ้นในป่าพรุเพื่อช่วยในการหายใจ โดยมันฝังท่อหายใจที่มีปลายแหลมเข้าไปในรากหรือลำต้นพืช ไม่ล่องลอยสู่ผิวน้ำเพื่อหายใจเหมือนลูกน้ำของยุงกลุ่มอื่นๆ ยุงกลุ่ม *Mansonia* มีสีตั้งแต่สีเหลืองอ่อนได้แก่ *Ma. annulifera* สีน้ำตาลได้แก่ *Ma. indiana* และ *Ma. uniformis* ไปจนถึงน้ำตาลเข้มได้แก่ *Ma. annulata*, *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* นอกจากนี้ ยุงกลุ่มนี้มีลวดลายที่เกิดจากเกล็ดขาวปกคลุมตามตัวและปีก ส่วนขาเห็นเป็นแถบขาวคาด ปีกมีเกล็ดกว้างสีขาวและสีน้ำตาลคล้ายหัวใจเรียงตัวสลับกันไม่เป็นระเบียบกระจายอยู่บนเส้นปีก ยุงกลุ่มนี้ชอบออกหากินเวลากลางคืน อย่างไรก็ตามยุงกลุ่มนี้ที่อยู่ในป่าพรุ สามารถกัดในเวลากลางวันได้เช่นกัน เนื่องจากเป็นที่ร่มครึ้มและชื้นตลอดทั้งวัน

ยุง *Mansonia* สามารถแยกชนิดโดยใช้ลักษณะรูปร่างโดยดูความแตกต่างของสีบนร่างกายของยุงตัวเต็มวัย ลักษณะของแถบขา เกล็ดที่แตกต่างกันบนส่วนอกและส่วนท้อง เป็นต้น ภายหลังจากใช้กุญแจจำแนกชนิดจากลักษณะรูปร่างพบว่า ยุงในกลุ่มนี้ มีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ที่การจำแนกยุงทั้งสองชนิดโดยใช้ลักษณะรูปร่างทำได้ยาก เนื่องจากมีลักษณะภายนอกที่เหมือนกันอย่างมาก สามารถจะแยกได้เพียงอย่างเดียวคือดูจากไข่ที่ตัวเมียนำไปวาง ซึ่งสังเกตได้ยากถ้าเราเก็บตัวอย่างยุงจากในพื้นที่สำรวจมา ดังนั้นจึงมีการใช้เทคนิคอื่นๆมาใช้ในการแยกชนิดยุงในกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการจับตัวอย่างยุงจากพื้นที่สำรวจมา ขั้นตอนแรกที่ต้องทำคือการจำแนกชนิดด้วยลักษณะรูปร่าง รวมทั้งการบันทึกแหล่งที่เก็บและการจัดเก็บตัวอย่างยุงโดยใช้รหัส

การเพิ่มขยายยีน COI และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของยุง *Mansonia*

1. ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence divergence) ของยุงชนิด *Ma. bonneae* และ *Ma.dives*

เมื่อจำแนกชนิดของยุงโดยใช้ลักษณะรูปร่างแล้ว ยุง *Mansonia* ชนิด *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* นำมาศึกษาต่อไปทางอณูชีวโมเลกุล เนื่องจากเป็นชนิดที่ความคล้ายกันมากเมื่อแยกด้วยลักษณะรูปร่างขั้นตอนต่อมาได้แก่ การศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเริ่มจาการสกัด genomic DNA ของยุง *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* และทำการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ใน Mitochondria โดยใช้เทคนิค PCR สำหรับเพิ่มขยายยีน COI ของยุง *Ma. bonneae* ด้วย LepF1 และ LepR1 primers สำหรับ *Ma. dives* ใช้ C1J-1718 และ C1N-2191 primers ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่ง sequencing นำไปวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยใช้โปรแกรม Bioinformatics ดังนี้ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเทียบและหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Chromas MFC Application ทำการวิเคราะห์ multiple sequence alignment โดย Clustal x และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละชนิดมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้ MEGA 4.1

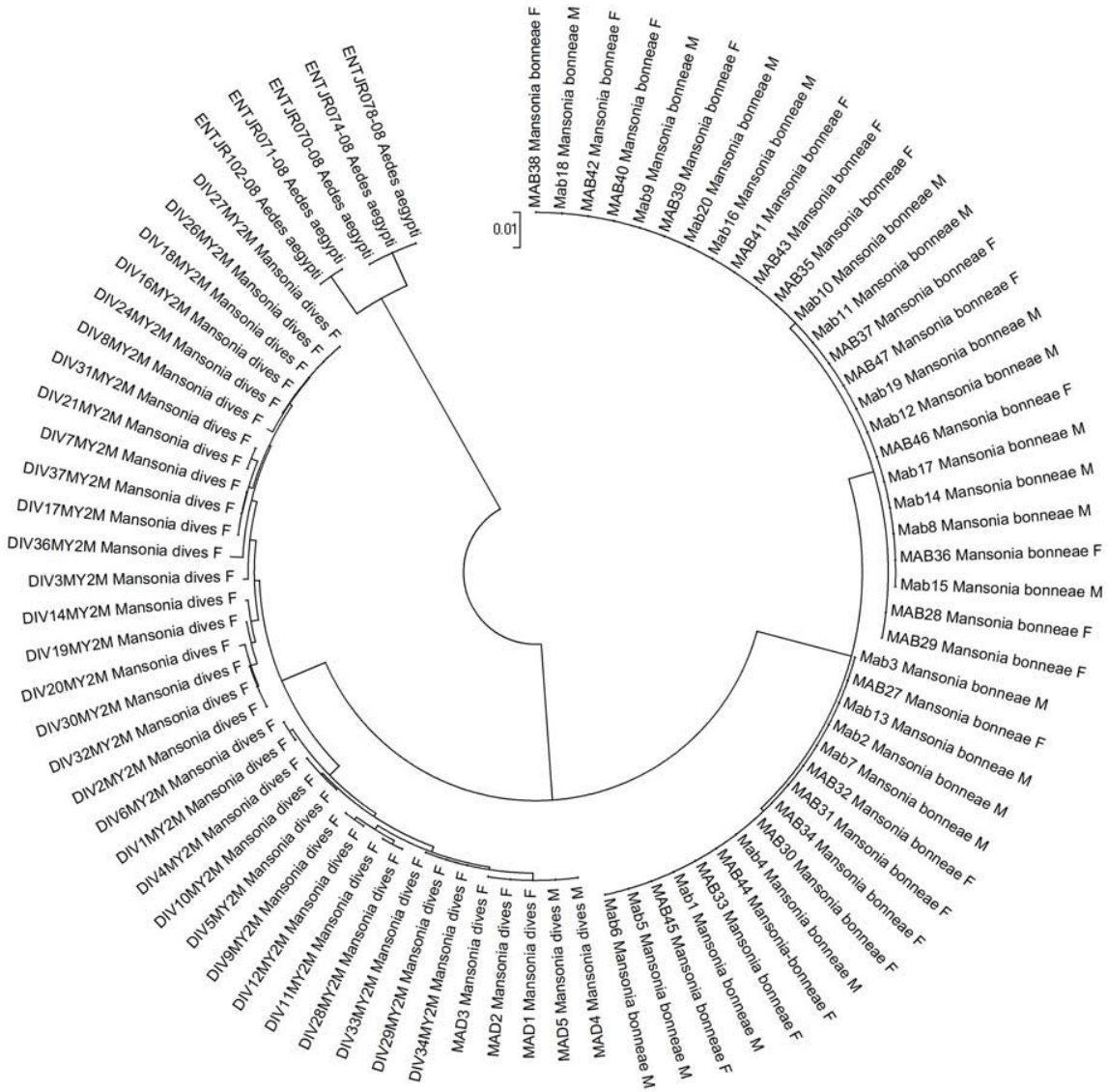
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI ขนาด 650 bp ที่ได้จากยุง *Ma. bonneae* มี 41 ลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ 480 bp ที่ได้จากยุง *Ma. dives* มี 36 ลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI มีลักษณะพิเศษที่สำคัญที่เห็นได้ชัดประการหนึ่งได้แก่ พบว่าลำดับเบส A+T สูงมาก (AT rich) เมื่อเทียบกับลำดับเบสทั้งหมด โดยพบค่าเฉลี่ยของ A+T rich 67.4% และ 66.5% ใน *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าตำแหน่งของ codon ที่มี AT rich มักอยู่ที่ตำแหน่งที่ 3 เฉลี่ย 93.4% และ 91.3% ใน *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ตามลำดับ

การคำนวณค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดของ *Ma. bonneae* กับ *Ma. dives* (คำนวณโดยใช้โปรแกรม Mega 4.1 ด้วย K2P model) พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 5.3% (range 4.8-6.0%) ส่วนค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกันของ *Ma. bonneae* มีค่าอยู่ที่ 0.5% (range 0-1%) สำหรับ *Ma. dives* พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกัน อยู่ที่ 1.0% (range 0-1.5%)

	% Mean sequence divergence (range)		
	Ma. bonneae	*Ma. dives*	*Ae. aegypti* (outgroup)
Ma. bonneae	0.5 (0-1.0)		
Ma. dives	5.3 (4.8-6.0)	1.0 (0-1.5)	
Ae. aegypti (outgroup)	15.7 (15.0-16.3)	14.2 (13.8-15.0)	1.4 (0-2.3)

ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เมื่อเปรียบเทียบภายในและระหว่างชนิดของยุง 3 ชนิด *Ma. bonneae, Ma. dives* และ *Ae. aegypti* (outgroup)

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมซึ่งเป็นการศึกษาหาความสัมพันธ์การจัดจำแนกกลุ่มของยุงกลุ่ม Mansonia โดยสร้างเป็น phylogenetic tree (Neighbor-joining (NJ) tree พร้อมกับ bootstrapping 1,000 replications) อาศัยโปรแกรม MEGA 4.1 พบว่าสามารถจำแนกยุงชนิด *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ออกมาเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน ในการวิเคราะห์นี้ ใช้ *Aedes aegypti* เป็น outgroup



รูปที่ 3 การวิเคราะห์ Neighbour-joining tree โดยใช้ค่า K2P ของยีน COI จากตัวอย่างยุงชนิด *Ma. bonneae, Ma. dives* และ *Ae. aegypti* (วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 4.1)

2. ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence divergence) ของยุงกลุ่ม *Mansonia*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ COI ของยุงกลุ่ม *Mansonia* ทั้ง 6 ชนิดทั้งหมด 55 ลำดับ นำมาเปรียบเทียบกับยุง Family Culicidae อีก 37 ชนิด นำมาคำนวณหาค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม MAGA 4.1 (K2P model) พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด เฉลี่ยอยู่ที่ 14%

เมื่อเปรียบเทียบกับยุงกลุ่ม Mansonia เฉพาะในไทยพบค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดเฉพาะยุง *Mansonia* เฉลี่ยอยู่ที่ 10% อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบยุง *Mansonia* ในไทยและใน online database พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด เฉลี่ยอยู่ที่ 10.4% (range 8-12.48%) ในขณะที่ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิด เฉลี่ยอยู่ที่ 0.67% (range 1-1.0%)

Species	*Ma. annulata*	*Ma. annulifera*	*Ma. bonneae*	*Ma. dives*	*Ma. indiana*	*Ma. uniformis*
Ma. annulata						
Ma.annulifera	0.15					
Ma. bonneae	0.14	0.13				
Ma. dives	0.14	0.15	0.06			
Ma. indiana	0.15	0.14	0.11	0.13		
Ma. uniformis	0.13	0.13	0.09	0.10	0.11	

ตารางที่ 7 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ระหว่างชนิดของยุงกลุ่ม *Mansonia* คำนวณโดยใช้โปรแกรม MAGA4.1

The nucleotide divergence value on average	percent
Variation within species	0.6
Variation among species	11.5

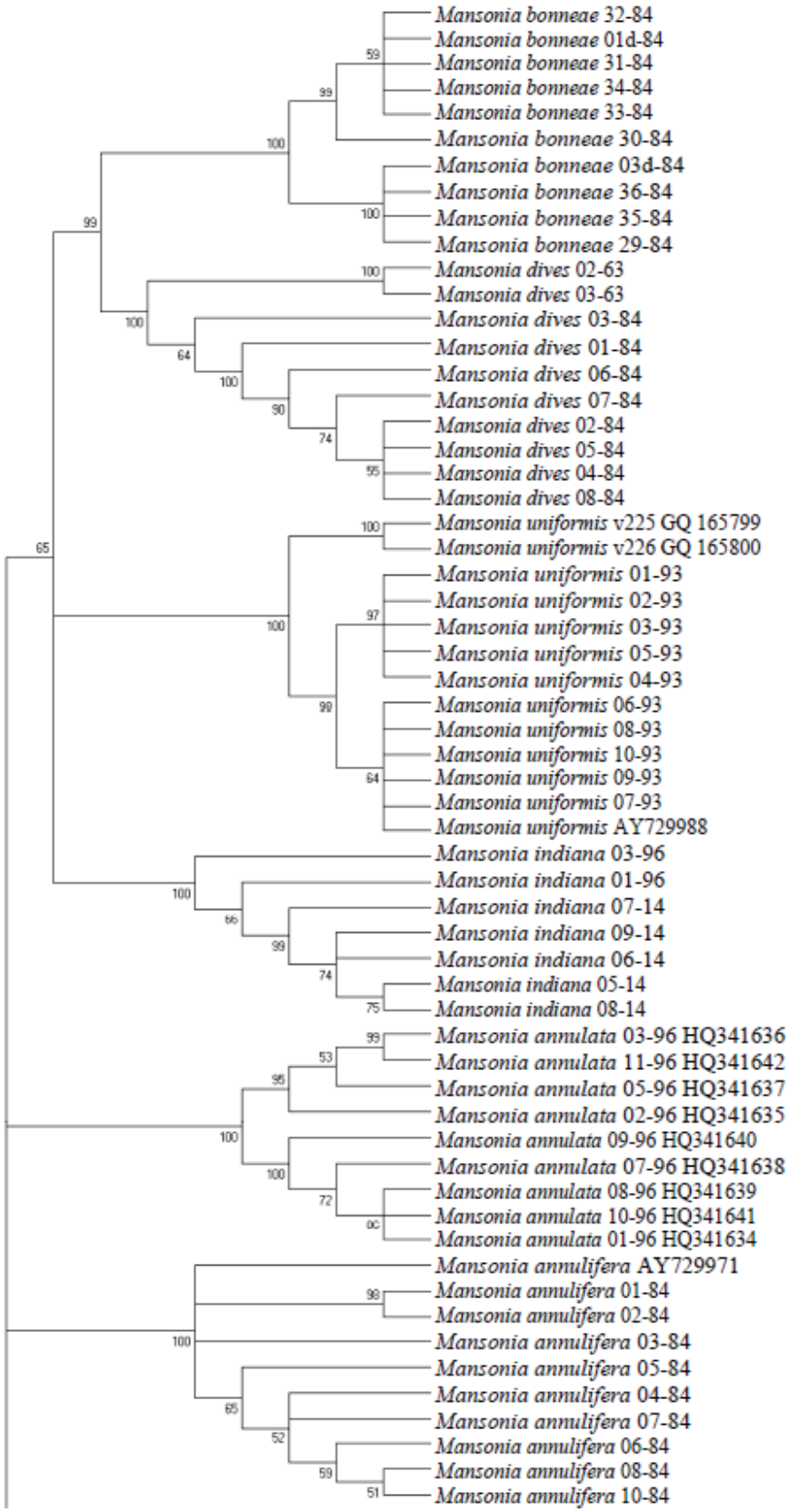
ตารางที่ 8 เปอร์เซนต์เฉลี่ยของค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุง *Mansonia* ภายในชนิดเดียวกันและระหว่างชนิด

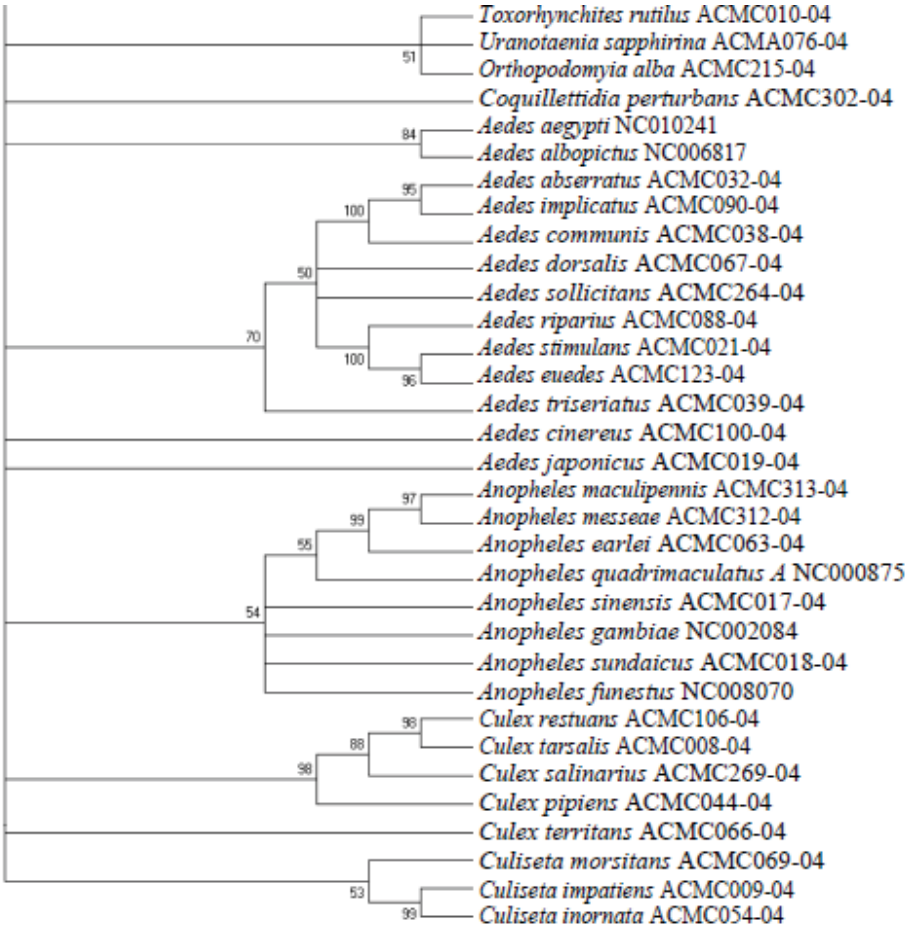
การวิเคราะห์และการสร้าง Phylogenetic tree ระหว่างยุงกลุ่ม Mansonia และยุงชนิดอื่นๆ ซึ่งอ้างอิงมาจาก GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) และ BOLD system (www.boldsystem.org) รวมทั้งสิ้น 92 sequences โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.1 ในการวิเคราะห์ Phylogenetic tree วิธีต่างๆ ได้แก่ Neighbor-Joining method พร้อมกับ bootstrapping 1,000 replications จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่า ยุงกลุ่ม *Mansonia* สามารถจำแนกแยกได้เป็น 6 กลุ่มตามชนิด ซึ่งได้แก่ *Ma.bonneae, Ma. dives*, *Ma. uniformis, Ma. Indiana, Ma. annulata* และ *Ma. annulifera* ในการวิเคราะห์นี้ พบว่า *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* แสดงความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ โดยยุงทั้งสองชนิดนี้อยู่ในสายวิวัฒนาเดียวกัน แต่อยู่คนละ clade แยกตามชนิด

ตารางที่ 9 ชนิดของยุงต่างๆ ที่ได้จาก GenBank Database (www.ncbi.nlm.nih.gov) และ BOLD system (www.boldsystem.org)

No.	Species	Accesstion number	Online database
1	*Aedes aegypti*	NC010241	GenBank
2	*Aedes albopictus*	NC006817	GenBank
3	*Aedes abserratus*	ACMC032-04	www.boldsystem.org
4	*Aedes cinereus*	ACMC100-04	www.boldsystem.org
5	*Aedes communis*	ACMC038-04	www.boldsystem.org
6	*Aedes dorsalis*	ACMC067-04	www.boldsystem.org
7	*Aedes euedes*	ACMC123-04	www.boldsystem.org
8	*Aedes implicatus*	ACMC090-04	www.boldsystem.org
9	*Aedes japonicus*	ACMC019-04	www.boldsystem.org
10	*Aedes riparius*	ACMC088-04	www.boldsystem.org
11	*Aedes sollicitans*	ACMC264-04	www.boldsystem.org
12	*Aedes stimulans*	ACMC021-04	www.boldsystem.org
13	*Aedes triseriatus*	ACMC039-04	www.boldsystem.org
14	*Anopheles funestus*	NC008070	GenBank
15	*Anopheles gambiae*	NC002084	GenBank

No.	Species	Accesstion number	Online database
16	*Anopheles quadrimaculatus A*	NC000875	GenBank
17	*Anopheles earlei*	ACMC063-04	www.boldsystem.org
18	*Anopheles maculipennis*	ACMC313-04	www.boldsystem.org
19	*Anopheles messeae*	ACMC312-04	www.boldsystem.org
20	*Anopheles sinensis*	ACMC017-04	www.boldsystem.org
21	*Anopheles sundaicus*	ACMC018-04	www.boldsystem.org
22	*Coquillettidia perturbans*	ACMC302-04	www.boldsystem.org
23	*Culex pipiens*	ACMC044-04	www.boldsystem.org
24	*Culex restuans*	ACMC106-04	www.boldsystem.org
25	*Culex salinarius*	ACMC269-04	www.boldsystem.org
26	*Culex tarsalis*	ACMC008-04	www.boldsystem.org
27	*Culex territans*	ACMC066-04	www.boldsystem.org
28	*Culiseta impatiens*	ACMC009-04	www.boldsystem.org
29	*Culiseta inornata*	ACMC054-04	www.boldsystem.org
30	*Culiseta morsitans*	ACMC069-04	www.boldsystem.org
31	*Mansonia uniformis*	AY729988	GenBank
32	*Mansonia uniformis V225*	GQ165799	GenBank
33	*Mansonia uniformis V226*	GQ165800	GenBank
34	*Mansonia annulifera*	AY729971	GenBank
35	*Orthopodomyia alba*	ACMC215-04	www.boldsystem.org
34	*Toxorhynchites rutilus*	ACMC010-04	www.boldsystem.org
35	*Uranotaenia sapphirina*	ACMC076-04	www.boldsystem.org


Mansonia bonneae 32-84
Mansonia bonneae 01d-84
Mansonia bonneae 31-84
Mansonia bonneae 34-84
Mansonia bonneae 33-84
Mansonia bonneae 30-84
Mansonia bonneae 03d-84
Mansonia bonneae 36-84
Mansonia bonneae 35-84
Mansonia bonneae 29-84
Mansonia dives 02-63
Mansonia dives 03-63
Mansonia dives 03-84
Mansonia dives 01-84
Mansonia dives 06-84
Mansonia dives 07-84
Mansonia dives 02-84
Mansonia dives 05-84
Mansonia dives 04-84
Mansonia dives 08-84
Mansonia uniformis v225 GQ 165799
Mansonia uniformis v226 GQ 165800
Mansonia uniformis 01-93
Mansonia uniformis 02-93
Mansonia uniformis 03-93
Mansonia uniformis 05-93
Mansonia uniformis 04-93
Mansonia uniformis 06-93
Mansonia uniformis 08-93
Mansonia uniformis 10-93
Mansonia uniformis 09-93
Mansonia uniformis 07-93
Mansonia uniformis AY729988
Mansonia indiana 03-96
Mansonia indiana 01-96
Mansonia indiana 07-14
Mansonia indiana 09-14
Mansonia indiana 06-14
Mansonia indiana 05-14
Mansonia indiana 08-14
Mansonia annulata 03-96 HQ341636
Mansonia annulata 11-96 HQ341642
Mansonia annulata 05-96 HQ341637
Mansonia annulata 02-96 HQ341635
Mansonia annulata 09-96 HQ341640
Mansonia annulata 07-96 HQ341638
Mansonia annulata 08-96 HQ341639
Mansonia annulata 10-96 HQ341641
Mansonia annulata 01-96 HQ341634
Mansonia annulifera AY729971
Mansonia annulifera 01-84
Mansonia annulifera 02-84
Mansonia annulifera 03-84
Mansonia annulifera 05-84
Mansonia annulifera 04-84
Mansonia annulifera 07-84
Mansonia annulifera 06-84
Mansonia annulifera 08-84
Mansonia annulifera 10-84

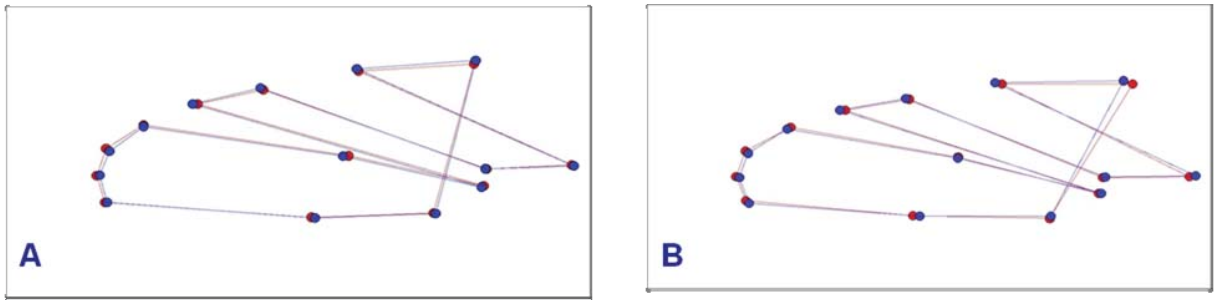


รูปที่ 4 การวิเคราะห์ Neighbour-joining tree โดยใช้ค่า K2P ของยีน COI จากตัวอย่างยุงกลุ่ม *Mansonia* และยุงชนิดอื่นๆ ซึ่งอ้างอิงมาจาก GenBank Database (www.ncbi.nlm.nih.gov) และ BOLD system (www.boldsystem.org) (วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4.1)

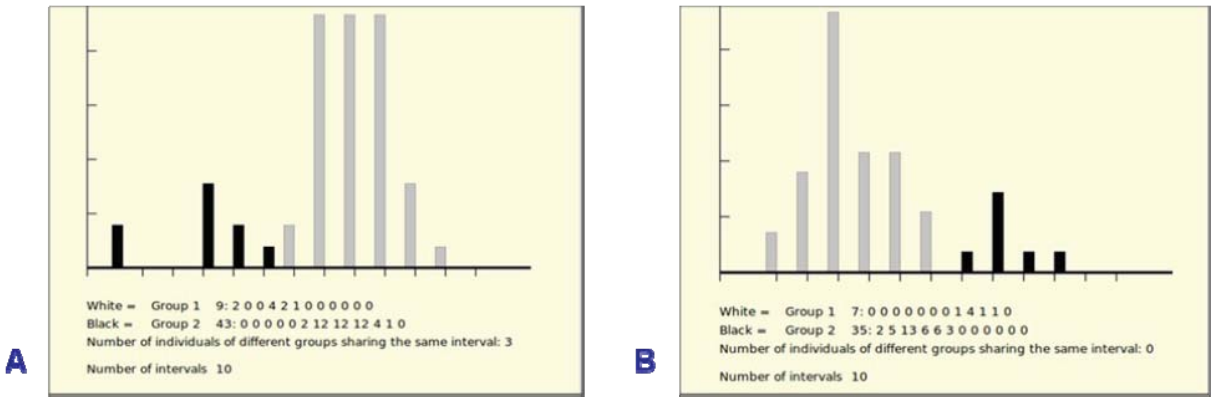
การจำแนกชนิดของยุงกลุ่ม *Mansonia* ด้วย Morphometrics

การจำแนกชนิดด้วย Morphometrics เป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพและวิธีทางสถิติ ในกรณีของยุง ใช้รูปร่างลักษณะปีกยุง โดยทำการกำหนดจุดตัดของเส้น vein บนปีกยุง จำนวน 13 จุดตัด จากตัวอย่างยุงทั้งหมดและนำผลจากจุดตัดนี้มาคำนวณหาขนาด และรูปร่างเฉลี่ยของตัวอย่างยุงแต่ละชนิด ด้วยวิธีการทางสถิติผ่านโปรแกรม CLIC Package รวมทั้งวิเคราะห์การแยกชนิด (discriminant analysis)

จากการวิเคราะห์ด้วย Morphometrics พบว่าความแตกต่างของรูปร่างปีกยุงของยุง *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* มีความแตกต่างกัน โดยพบว่าจุด anatomical landmark ที่แตกต่างอยู่ที่ตำแหน่งที่ 1, 2,และ 13 เป็นตำแหน่งที่ไม่มีการซ้อนทับกันทั้งในยุงเพศผู้และยุงเพศเมีย เมื่อวิเคราะห์การแยกชนิด (discriminant analysis) พบว่า ยุง *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* แยกออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน ตามรูปที่ 5 และ 6 เมื่อพิจารณาเรื่องของเพศยุงที่ใช้ในการวิเคราะห์ Sexual dimorphism พบว่ายุงทั้งเพศผู้และเพศเมียของยุง *Ma. bonneae* และยุง *Ma. dives* มีความแตกต่างอย่างชัดเจนทั้งรูปร่างและขนาด เมื่อพิจารณารูปร่างปีกยุงโดยอาศัยจุดตัดของเส้น vein พบว่ายุงทั้งสองชนิดมีรูปร่างปีกยุงของเพศผู้และเพศ เมียแตกต่างชัดเจน ในหลายตำแหน่งของจุดตัดบนเส้นปีก เมื่อพิจารณาที่ขนาดของปีกยุง พบว่ายุงเพศผู้ของทั้งสองชนิดมีขนาดของปีกยุงที่เล็กกว่ายุงเพศเมียอย่างชัดเจน



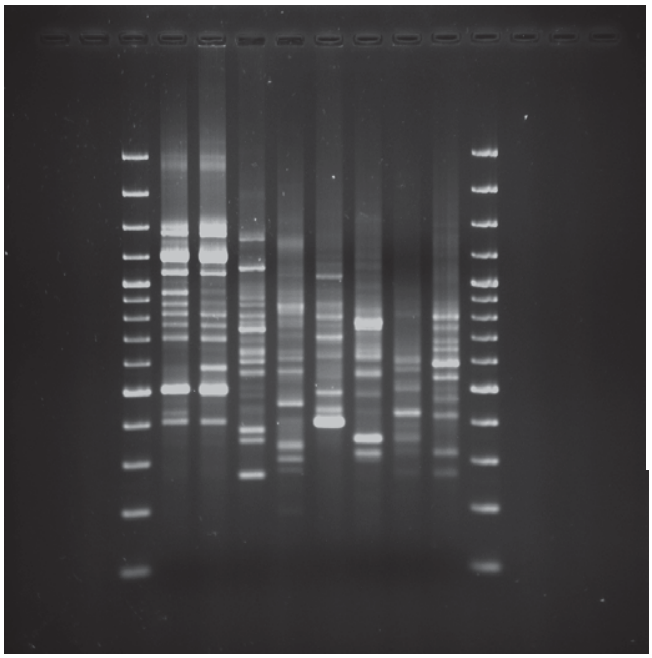
รูปที่ 5 การวิเคราะห์ Shape variation ของปีกยุงกลุ่ม Mansonia 2 ชนิด *Ma. bonneae* (วงกลมแดง) และ *Ma. dives* (วงกลมน้ำเงิน) เพศเมีย (A) และ *Ma. bonneae* (วงกลมแดง) และ *Ma. dives* (วงกลมน้ำเงิน) เพศผู้ (B)



รูปที่ 6 การวิเคราะห์ Discriminant analysis ของยุงเพศเมียของ *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* (A) และยุงเพศผู้ของ *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* (B) Group 1 แทน *Ma. bonneae*, Group 2 แทน *Ma. dives*

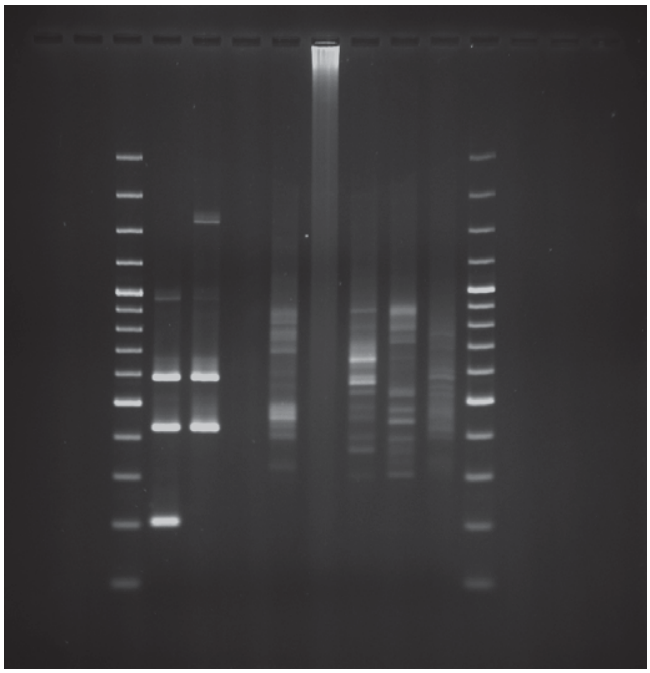
การจำแนกชนิดของยุงกลุ่ม *Mansonia* ด้วยเทคนิค RAPD

การจำแนกชนิดด้วยเทคนิค RAPD อาศัยหลักการความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอ RAPD-PCR product ที่แตกต่างกัน ภายหลังจากการเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ random primers ทั้งหมด 6 คู่ จากผลของ RAPD ที่ได้พบขนาดของ PCR product หลายขนาดในตัวอย่างยุงชนิดเดียวกัน และมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของยุง โดยยุงแต่ละชนิดจะได้ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเฉพาะ นอกจากนี้ยังพบอีกว่ายุง *Ma. bonneae* สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอได้เมื่อใช้ random primer คู่ที่ 1 แต่ไม่สามารถเพิ่มขยายเมื่อใช้ random primer คู่อื่นๆ



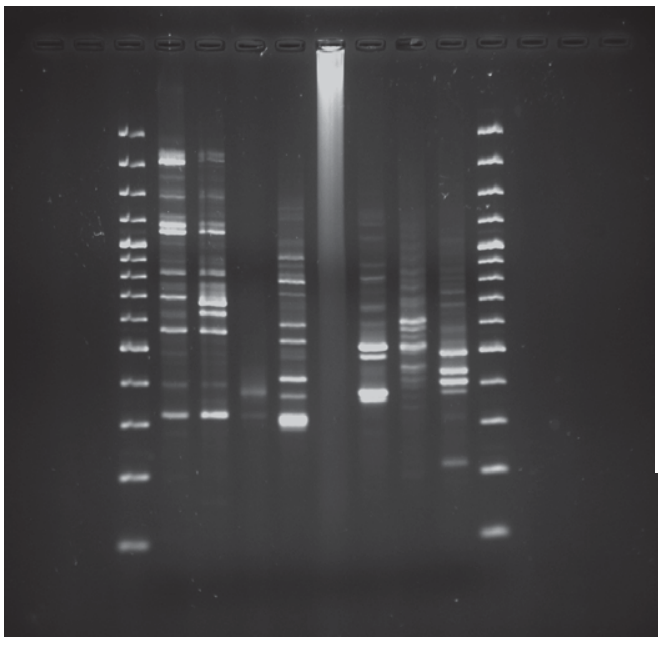
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

รูปที่ 7 การวิเคราะห์ผล RAPD โดยใช้ primer คู่ที่ 1จาก Agarose gel electrophoresis ของยุง *Mansonia* 6 ชนิด แถว M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada), แถว 1 และ 2: positive control (*Escherichia coli*) แถว 3: *Ma. annulata* แถว 4: *Ma. annulifera* แถว 5: *Ma. bonneae* แถว 6: *Ma. dives* แถว 7: *Ma. indiana* แถว 8: *Ma. uniformis*



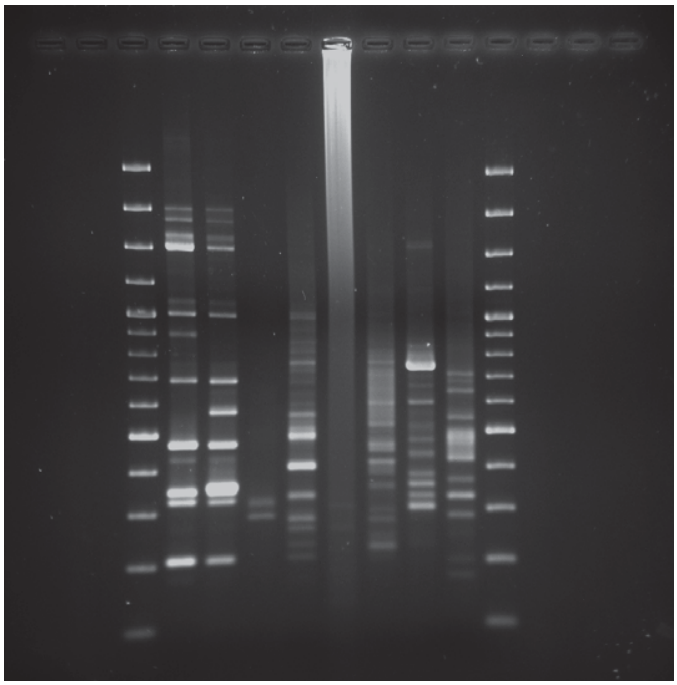
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

รูปที่ 8 การวิเคราะห์ผล RAPD โดยใช้ primer คู่ที่ 2จาก Agarose gel electrophoresis ของยุง *Mansonia* 6 ชนิด แถว M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada), แถว 1 และ 2: positive control (*Escherichia coli*) แถว 3: *Ma. annulata* แถว 4: *Ma. annulifera* แถว 5: *Ma. bonneae* แถว 6: *Ma. dives* แถว 7: *Ma. indiana* แถว 8: *Ma. uniformis*



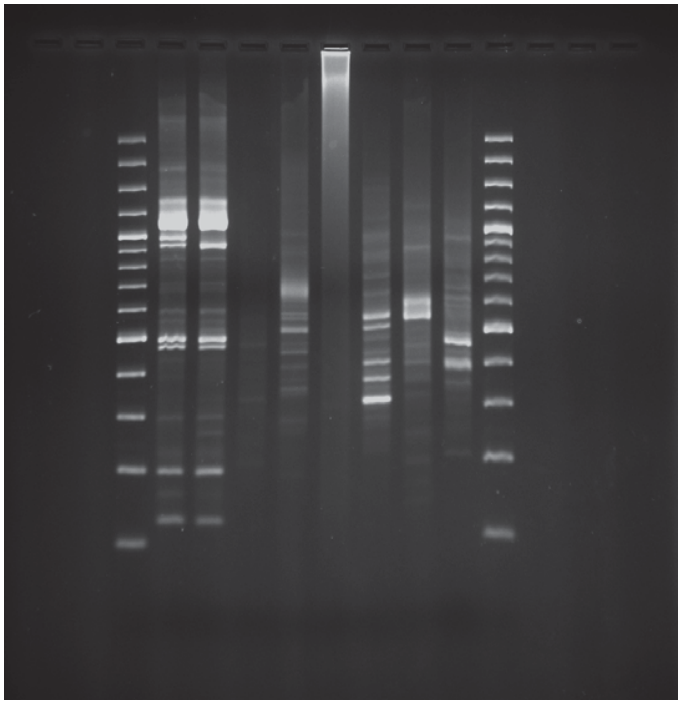
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

รูปที่ 9 การวิเคราะห์ผล RAPD โดยใช้ primer คู่ที่ 3จาก Agarose gel electrophoresis ของยุง *Mansonia* 6 ชนิด แถว M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada), แถว 1 และ 2: positive control (*Escherichia coli*) แถว 3: *Ma. annulata* แถว 4: *Ma. annulifera* แถว 5: *Ma. bonneae* แถว 6: *Ma. dives* แถว 7: *Ma. indiana* แถว 8: *Ma. uniformis*



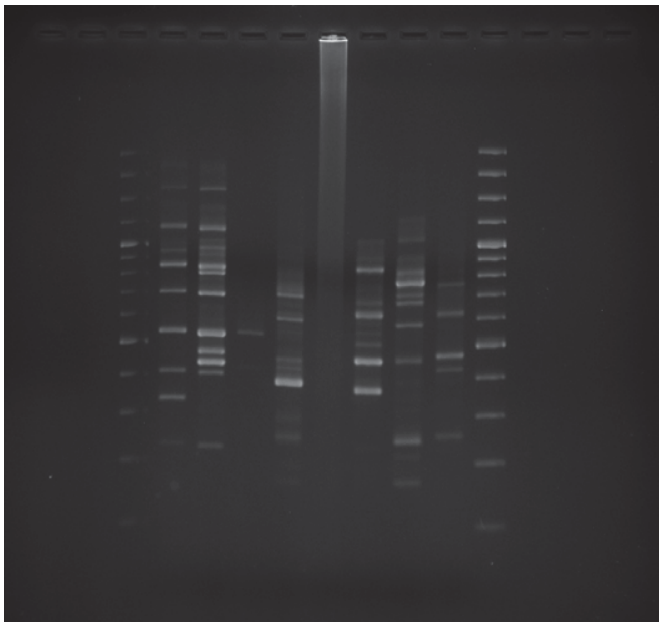
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

รูปที่ 10 การวิเคราะห์ผล RAPD โดยใช้ primer คู่ที่ 4จาก Agarose gel electrophoresis ของยุง *Mansonia* 6 ชนิด แถว M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada), แถว 1 และ 2: positive control (*Escherichia coli*) แถว 3: *Ma. annulata* แถว 4: *Ma. annulifera* แถว 5: *Ma. bonneae* แถว 6: *Ma. dives* แถว 7: *Ma. indiana* แถว 8: *Ma. uniformis*



M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

รูปที่ 11 การวิเคราะห์ผล RAPD โดยใช้ primer คู่ที่ 5จาก Agarose gel electrophoresis ของยุง *Mansonia* 6 ชนิด แถว M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada), แถว 1 และ 2: positive control (*Escherichia coli*) แถว 3: *Ma. annulata* แถว 4: *Ma. annulifera* แถว 5: *Ma. bonneae* แถว 6: *Ma. dives* แถว 7: *Ma. indiana* แถว 8: *Ma. uniformis*



M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

รูปที่ 12 การวิเคราะห์ผล RAPD โดยใช้ primer คู่ที่ 6จาก Agarose gel electrophoresis ของยุง *Mansonia* 6 ชนิด แถว M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada), แถว 1 และ 2: positive control (*Escherichia coli*) แถว 3: *Ma. annulata* แถว 4: *Ma. annulifera* แถว 5: *Ma. bonneae* แถว 6: *Ma. dives* แถว 7: *Ma. indiana* แถว 8: *Ma. uniformis*

บทวิจารณ์

ยุงกลุ่ม *Mansonia* ทั้ง 6 ชนิด เป็นยุงพาหะที่สำคัญของโรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis) มีแหล่งเพาะพันธุ์อยู่ตามป่าพรุ (Apiwathnasorn et al, 2006a, 2006b, 2006c) เนื่องจากยุงกลุ่มนี้ชอบเพาะพันธุ์บริเวณที่มีพืชน้ำขึ้นและตามแถบป่าเขาโดยเฉพาะแถบชายแดน ทำให้โรคเท้าช้างเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญตามแถบชายแดนด้วย โรคเท้าช้าก่อให้เกิดปัญหาการอุดตันของท่อน้ำเหลืองและทำให้เกิดอาการขาบวมได้เมื่อครวจพบพยาธิจำนวนมากอยู่ใจต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยในกรณีเรื้อรัง ดังนั้นการป้องกันไม่ให้ยุงกัดและการรักษาด้วยยากำจัดพยาธิจึงน่าจะเป็นวิธีการที่สามารถป้องกันโรคนี้ได้

การแยกชนิดของยุงพาหะให้ถูกต้องเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้ การจำแนกชนิดของยุงกลุ่ม *Mansonia* ใช้ลักษณะทางสันฐานวิทยาเป็นหลัก ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะที่สุดสำหรับใช้ในการออกภาคสนาม เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด แต่ต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์ในการจำแนกชนิด ดังนั้นวิธีนี้ถึงแม้จะเหมาะในการจำแนกชนิดจากตัวอย่างยุงในภาคสนาม แต่ไม่สามารถใช้ได้ดีในกรณีของยุงต่างชนิดกันแต่มีรูปร่างลักษณะที่คล้ายกันมากไม่สามารถแยกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการศึกษายุงกลุ่ม *Mansonia* ครั้งนี้มียุงอยู่ 2 ชนิดที่แยกด้วยลักษณะทางสันฐานวิทยาได้ยาก ได้แก่ *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ เพื่อใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ เทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุลด้วย DNA Barcode และ RAPD รวมทั้งเทคนิค Morphometrics ที่ใช้ Physiological characteristic จากจุดตัดของเส้น vein ของปีกยุง ซึ่งเทคนิคเหล่านี้นำมาใช้ศึกษาเพื่อหาวิธีที่ใช้ในการยืนยันชนิดภายหลังจากการจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

เนื่องจากยุงชนิด *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* เป็นยุงที่แยกชนิดได้ยากด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิค DNA barcode มาใช้ในการช่วยยืนยันชนิดซึ่งมาส่วนช่วยในการจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้อง DNA barcode เป็นวิธีการที่ใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ด้วยการเพิ่มขยายยีน COI แล้วจึงนำ COI sequences ที่ได้มาใช้เป็น Reference sequences เพื่อใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงในการศึกษาทางด้าน Biodiversity หรือนำไปใช้ในการหา unknown species เทคนิค DNA barcode เริ่มศึกษาตั้งแต่ปี 2003 Prof, Paul DN Hebert ได้ทำการศึกษายีนที่เหมาะสมในการจำแนกชนิดแมลงกลุ่ม Lepidoptera และต่อมาจึงมีการพัฒนาการจำแนกชนิดด้วย DNA barcode ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้แก่ แมงมุม นก ยุง (Paquin and Hedin, 2004; Barrett and Hebert, 2004; Hebert et al., 2004b; Hajibabaei et al., 2006; Cywinska et al., 2006; Kumar et al.,2007)

จากการศึกษาครั้งนี้ DNA barcode สามารถใช้เป็นเทคนิคหนึ่งในการยืนยันชนิดภายหลังจากการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยอาศัยความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในส่วนของ DNA barcode ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในเรื่องของความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบภายในชนิดเดียวกันพบว่ามีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า นอกจากนี้ ยีน COI มี high copy number ทำให้สามารถได้ปริมาณดีเอ็นเอมากเพียงพอภายหลังจากการเพิ่มขยายดีเอ็นเอ และยีน COI ไม่มีส่วนของ intron (ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้แปลรหัสเป็นสายเปปไทด์) จากคุณสมบัติดังกล่าว ยีน COI จึงเหมาะที่จะใช้เป็น gene target ที่ใช้ในการจำแนกชนิด (Hebert et al., 2003a, 2003b,2004a)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ส่วนของ DNA barcode ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความยาวไม่เกิน 700 bp ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้พบลำดับเบส A+T ที่สูงมาก ได้แก่ 67.4% และ 66.5% ใน *Ma. bonneae*และ *Ma.dives* ตามลำดับ ซึ่งลักษณะเช่นนี้เป็นลักษณะจำเพาะที่พบในยีน COI สามารถพบลักษณะเฉพาะเช่นนี้ได้ในยุงจากประเทศแคนาดา และอินเดีย (Cywinska et al., 2006; Kumar et al., 2007)

เมื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence divergence) ในยุงกลุ่ม *Mansonia* ต่างชนิดกัน พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สูง เฉลี่ยอยู่ที่ 10.4% ในขณะเดียวกัน ยุงชนิดเดียวกันพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มาก เฉลี่ยอยู่ที่ 0.67% แสดงให้เห็นว่า ยีน COI มีลักษณะจำเพาะสามารถใช้ในการจำแนกชนิด โดยยุงต่างชนิดกันให้ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันมากซึ่งหมายถึงภายในลำดับนิวคลีโอไทด์มีความหลากหลายเพียงพอในการใช้แยกชนิด แต่ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้จะน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบภายในยุงชนิดเดียวกันยังคงความเป็นเอกลักษณ์ของภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus) ของยีน COI ดังนั้นจะเห็นว่าจากค่าความแตกต่างที่ได้จากการศึกษานี้ ยีน COI สามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ เช่นเดียวกับการศึกษาส่วนของ DNA barcode ผลจากการคำนวณหาค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยุง *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ก็ให้ผลเช่นเดียวกับผลการศึกษาของยุงกลุ่ม *Mansonia* ทั้งหมด โดยพบค่าความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดมีค่าเฉลี่ย 5.3 % และภายในชนิดเดียวกันมีค่าเฉลี่ย 1.0%

จากผลของ Phylogenetic tree ก็ให้ผลสอดคล้องกับค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพบว่า ยุงกลุ่ม *Mansonia* สามารถแยกกลุ่มของยุง *Mansonia* ตามแต่ละชนิดได้ ยุงชนิดเดียวกันอยู่ในสายวิวัฒนาการ (clade) เดียวกัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์มางวิวัฒนาการในยุงกลุ่ม *Mansonia* พบว่ายุงชนิด *Ma. bonneae* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Ma. dives* และกลุ่ม

ของยุง *Ma.bonneae* และ *Ma. dives* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Ma. uniformis* และ *Ma. indiana* จากการศึกษานี้สังเกตได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน DNA barcode ยุง *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน ส่งผลมาถึงลักษณะทางกายภาพ ยุงทั้งสองชนิดจึงมีรูปร่างลักษณะที่คล้ายกันมาก เช่นเดียวกับยุง *Ma. uniformis* และ *Ma. indiana* ที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ และมีรูปร่างที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจะเห็นว่าความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมส่งผลไม่มากก็น้อยต่อลักษณะทางกายภาพ

สำหรับเทคนิค Morphometrics เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ให้ในการจำแนกชนิดของยุง *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ได้ เทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากในการจำแนกชนิดจากตัวอย่างยุงจากภาคสนามเพราะเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และใช้เครื่องมือไม่มาก แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้อาจจะใช้ไม่ได้ในกรณีที่การเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น สภาพภูมิอากาศ การขาดแคลนแหล่งอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างเพศของยุงทั้งสองชนิดได้ด้วย

การจำแนกชนิดด้วยเทคนิค RAPD เป็นอีกเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาที่มีการใช้ในการแยกชนิด เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Random primers ซึ่ง primers เหล่านี้สามารถไปจับที่บริเวณใดก็ได้บน genomic DNA ดังนั้นเมื่อมีการทำการทดลองซ้ำ อาจเกิดปัญหาได้ผลการทดลองที่ไม่เหมือนเดิม อย่างไรก็ตามในการแก้ปัญหาสามารถทำได้โดยทำการทดลองซ้ำหลายครั้งเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ

ในการจำแนกชนิดของยุง วิธีที่ยังมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่การจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัด ใช้เพียงกล้อง stereomicroscope ซึ่งเหมาะที่ใช้ในงานออกสนาม อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยามักจะมีข้อจำกัดหลายประการ ประการแรกได้แก่ ตัวอย่างยุงบางชนิด ไม่สามารถแยกด้วยรูปร่างได้ เป็นผลมาจากการเกิดเป็น species complex ประการที่สองตัวอย่างยุงที่ได้จากภาคสนามบางครั้งเกิดการเสียหาย ทำให้ได้ตัวยุงที่ไม่สมบูรณ์ ลักษณะรูปร่างบางอย่างเกิดแตกหัก ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดได้ อีกประการหนึ่งการแยกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้องใช้ผู้ชำนาญการที่สั่งสมประสบการณ์ให้มากเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อสังเกตต่างๆ เพื่อใช้ในการแยกชนิด ผู้เชี่ยวชาญดังกล่าวมีจำนวนน้อยลงมาก และการให้ได้มาซึ่งประสบการณ์ต้องใช้ระยะเวลา ดังนั้นด้วยเหตุผลหลายประการข้างต้นทำให้จึงต้องมีการคิดค้นเทคนิคใหม่ๆ ในการจำแนกชนิด ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ไม่ได้มาทดแทนวิธีดั้งเดิมซึ่งใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่เทคนิคเหล่านี้จะนำมาใช้ในการยืนยันชนิดในกรณีที่ไม่สามารถแยกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อให้งานทางด้านการจำแนกชนิดหรือ Taxonomy ดำเนินต่อไปได้จำเป็นต้องอาศัยหลักการทางวิชา

การหลายสาขามาส่งเสริมให้เกิดการประยุกต์ใช้ อย่างเช่นในกรณีใช้เป็นตัวบ่งชี้การเป็นพาหะนำโรค เพื่อป้องกันการระบาดของเชื้อโรคและโรคที่นำโดยแมลงพาหะ เป็นต้น

หนังสืออ้างอิง

Alam MT, Das MK, Ansari MA, Sharma YD. Molecular identification of *Anopheles (Cellia) sundaicus* from the Andaman and Nicobar islands of India. Acta Trop. 2006; 97: 10-18.

Alam MT, Das MK, Dev V, Ansari MA, Sharma YD. PCR-RFLP method for the identification of four members of the *Anopheles annularis* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae). T Roy Soc Trop Med Hyg. 2007a; 101: 239-244.

Alam MT., Das MK., Dev V.,Ansari MA., Sharma YD. Identification of two cryptic species in the *Anopheles (Cillia) annularis* complex using ribosomal DNA PCR-RFLP. Parasitol Res. 2007b; 100: 943-948.

Ali N., Hume JCC., Dadzie SK. and Donnelly MJ. Molecular genetic studies of *Anopheles stephensi* in Pakistan. Med Vet Entomol. 2007; 21: 265-269.

Apiwathnasorn C, Samung Y, Prummongkol S, Asavanich A, Komalamisra N, McCall P. Bionomic studies of *Mansonia* mosquitoes inhabiting the pest swamp forest. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006a; 37(2): 272-278.

Apiwathnasorn C, Samung Y, Prummongkol S, Asavanich A, Komalamisra N. Surveys for natural host plants of *Mansonia* mosquitoes inhabiting Toh Daeng pest swamp forest, Narathiwat province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006b; 37(2): 279-282.

Apiwathnasorn C, Asavanich A, et al. The relationship between the abundance of *Mansonia* mosquitoes inhabiting a peat swamp forest and remotely sensed data. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006c; 37(2): 463-467.

Bahnck CM. and Fonseca DM. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. Am J Trop Med Hyg. 2006; 75: 251-255.

Bourke BP., Foster PG., Bergo ES., Calado DC., et al. Phylogenetic relationships among species of Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera, Culicidae) based on nuclear and mitochondrial gene sequences. Acta Trop. 2010; 114: 88-96.

Brochero H., Li C. and Wilkerson R. A newly recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera:Culicidae) from Puerto Carreno, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76: 1113-1117.

Coetzee M. and Fontenille D. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. Insect Biochem Mol Biol. 2004; 34: 599-605.

Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. Insect Mol Biol. 1996; 5(1):1-9.

Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDN. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med Vet Entomol. 2006; 20: 413-424.

Djadid ND, Gholizadeh S, Aghajari M, Zehi AH, Raeisi A, Zakeri S. Genetic analysis of rDNA-ITS2 and RAPD loci in field populations of the malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): Implications for the control program in Iran. Acta Trop. 2006; 97: 65-74.

Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol. 2008; 8(6): 875-90.

Dusfour I, Michaux JR, Habach RE, Manguin S. Speciation and phylogeography of the Southeast Asian *Anopheles sundaicus* complex. Infect Genetic Evolution. 2007; 7: 484-493.

Failloux AB.,Fouque F., Vazille M. and Rodhain F. Isozyme differentiation of *Aedes aegypti* populations in French Guiana. Med Vet Entomol. 2002; 16: 456-460.

Goswami G., Raghavendra K., Nanda N., Gakhar., et al. PCR-RFLP of mitochondrial cytochrome oxidase subunit II and ITS2 of ribosomal DNA: markers for the identification of members of the *Anopheles culicifacies* complex (Diptera: Culicidae). Acta Trop. 2005;95:92-99.

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PD. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(4): 968-971.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 2003a; 270(1512): 313-321.

Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. Proc Biol Sci. 2003b; 270 Suppl 1: S96-99.

Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc Natl Acad Sci USA. 2004a; 101(41): 14812-14817.

Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of Birds through DNA Barcodes. PLoS Biol. 2004b; 2(10): e312.

Hill LA., Davis JB., Hapgood G., Whelan PI., et al. Rapid identification of *Aedes albopictus*, *Aedes scutellaris*, and *Aedes aegypti* life stages using Real-time polymerase chain reaction assays. Am J Trop Med Hyg. 2008; 79: 866-875.

Huong NT., Sonthayanon P., Ketterman AL. and Panyim S. A rapid polymerase chain reaction based method for identification of the *Anopheles dirus* sibling species. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2001; 32: 615-620.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungkiat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, Dujardin JP. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Trop Med Int Health. 2007; 12(11): 1354-60.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. Infect Genet Evol. 2008; 8(4): 414-21.

Kasai S., Komagata O., Tomita T., Sawabe K., et al. PCR- based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. Jpn J Infect Dis. 2008; 61: 184-191.

Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingum P. DNA Barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). Morphology Systematics Evolution. 2007; 44(1): 1-7.

Lehr MA., Kilpatrick CW., Wilkerson RC. and Conn JE. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence between random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. Ann Entomol Soc Am. 2005; 98: 908-917.

Linton YM, Dusfour I, Howard TM, Ruiz LF, Duc Mann N, Ho Dinh T, et al. *Anopheles (Cellia) epiroticus* (Diptera: Culicidae), a new malaria vector species in the Southeast Asian Sundaicus complex. Bull Entomol Res. 2005; 95(4): 329-339.

Ma Y, Li S, Xu J. Molecular identification and phylogeny of the Maculatus group of *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae) besed on nuclear and mitochondrial DNA sequences. Acta Trop. 2006; 99: 272-280.

Marrelli MT., Floeter-Winter LM., Malafronte RS., Tadei WP., et al. Amazonian malaria vector Anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. Med Vet Entomol. 2005; 19: 208-218.

Marrelli MT., Sallum M. and Marinotti O. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American Anopheline taxonomy- a critical review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101: 817-832.

Matson R., Rios CT., Chavez CB., Gilman RH., et al. Improved molecular technique for the differentiation of Neotropical Anopheline species. Am J Trop Med Hyg. 2008; 78: 492-498.

Mohanty A., Swan S., Kar SK. and Hazra RK. Analysis of the phylogenetic relationship of *Anopheles* species, subgenus Cellia (Diptera: Culicidae) and using it to define the relationship of morphologically similar species. Infect Genet Evol. 2009; 9: 1204-1224.

Morgan K., O'Loughlin SM., Mun-Yik F., Linton Y., et al. Molecular phylogenetics and biogeography of the Neocellia series of Anopheles mosquitoes in the oriental region. Mol Phylogenet Evol. 2009; 52: 588-601.

Nayar JK. and Knight JW. Isozyme variation in *Aedes aegypti* correlated with Dirofilaria immitis infectability. Med Vet Entomol. 2002; 16: 424-429.

Oshaghi MA., Sedaghat MM. and Vatandoost H. Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex in the Islamic Republic of Iran. Eastern Mediterranean Health L. 2003; 9: 659-666.

Pires HH, Barbosa SE, Borges EC, Silva JA, Siqueira AM, Diotaiuti L. Head morphometry and isoenzymatic profile of two Triatoma infestans, (Hemiptera, Reduviidae) populations. Acta Trop. 2011; 118(3): 190-5.

Rattanarithikul R, Harrison BA, Panthusiri P, Peyton EL, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand III. Genera *Aedeomyia*, *Ficalbia*, *Mimomyia*, *Hodgesia*, *Coquillettidia*, *Mansonia*, and *Uranotaenia*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006; 37 Suppl 1: 1-85.

Rona L., Carcalho-Pinto C. and Peixoto A. Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in south-east Brazil. Malaria J. 2010; 9: 33.

Saeung A, Otsuka Y, Baimai V, Somboon A. et al. Cytogenetic and molecular evidence for two species in the *Anopheles barbirostris* (Diptera: Culicidae) in Thailand. Parasitol Res. 2007; 101: 1337-1344.

Samung Y, Palakul K, Apiwathnasorn C, Prummongkol S, Asavanich A, Leemingsawat S. Laboratory colonization of *Mansonia* mosquitoes with an emphasis on *Ma. annulata* and *Ma. bonneae*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006; 37(4): 656-661.

Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop. 2009; 110(2-3): 88-100.

Smith JL. and Fonseca DM. Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera:Culicidae). Am J Trop Med Hyg. 2004; 7: 339-345.

Sukowati S, Baimai V. A standard cytogenetic map for *Anopheles sundaicus* (Diptera: Culicidae) and evidence for chromosomal differentiation in populations from Thailand and Indonesia. Genome. 1996; 39: 165-173.

Sukowati S, Baimai V, Harun S, Dassuki Y, Andris H, Efriwati M. Isozyme evidence for three sibling species in the *Anopheles sundaicus* complex from Indonesia. Med Vet Entomol. 1999; 13: 408-414.

Swain S., Mohanty A., Mahapatra N., Parida SK. The development and evaluation of a single step multiplex PCR for simultaneous detection of *Anopheles annularis* group mosquitoes, human host preference and *Plasmodium falciparum* sporozoite presence. Trans Roy Soc Trop Med H. 2009; 103: 1146-1152.

Swain S., Mohanty A., Tripathy HK., Mahapatra N., et al. Molecular identification and phylogeny of Myzomyia and Neocellia series of Anopheles subgenus Cellia (Diptera: Culicidae). Infect Genet Evol. 2010; 9: 931-939.

Takenaka K., Nguyen N., Nguyen B., Sunahara T., et al. Partial mitochondrial DNA sequences suggest the existence of a cryptic species within the Leucosphyrus group of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae), forest malaria vectors, in northern Vietnam. Parasite Vector. 2010; 3: 41.

Temu EA., Minjas., Tuno N., Kawada H., Takagi M. Identification of four members the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicide) group and their role in *Plasmodium falciparum* transmission in Bagamoyo coastal Tanzania. Acta Trop. 2007; 102: 119-125.

Toma T, Miyagi I, Crabtree MB, Miller BR. Identification of *Culex vishnui* subgroup (Diptera: Culicidae) mosquitoes from the Ryukyu Archipelago, Japan: Development of a species-

World Health Organization. Lymphatic filariasis. Weekly Epidemiol Rec. 2001b; 76(20):149-154.

World Health Organization. Global prgramme to eliminate lymphatic filariasis. Weekly Epidemiol Rec. 2007; 82: 361-380.

Zagaria N, Savioli L. Elimination of lymphatic filariasis: a public-health challenge. Ann Trop Med Parasitol. 2002; 96 Suppl 2: S3-13.

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx

http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/clic/index.html

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

    1. **Ruangsittichai J**, Apiwathnasorn C and Dujardin JP. Interspecific and sexual shape variation in the filariasis vectors *Mansonia dives* and *Ma. bonneae*. Infection, Genetics and Evolution. 2011; 11(8) Dec: 2089-94. (Impact factor = 3.086)
    2. Rueanghiran C, Apiwathnasorn C, Sangthong P, Samung Y and **Ruangsittichai J**. Utility of a set of conserved mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene primers for *Mansonia annulata* identification. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2011; 42(6) Nov: 1381-7.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

    - เชิงวิชาการ

      ได้มีการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาเอก ได้แก่ นางสาวชลาลัย เรืองหิรัญ ซึ่งได้รับอนุมัติจากสภามหาวิทยาลัยให้จบการศึกษาเมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม พ.ศ. 2554

3. อื่นๆ

    การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

    1. Dujardin JP, Morales Vagras RE, Sungvornyothin S, **Ruangsittichai J**, Apiwathnasorn C. The sexual dimorphism of wing shape in three genera of mosquitoes. Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld, Bangkok, Thailand. 1-3 December 2010 (poster presentation)
    2. **Ruangsittichai J**, Rueanghiran C, Apiwathnasorn C, Samung Y, Dujardin JP. Differentiation of *Mansonia* mosquitoes, Filarial vectors, by morphometrics and DNA barcode analysis. Joint International Tropical Medicine Meeting 2009, Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld, Bangkok, Thailand. 3-4 December 2009 (poster presentation)

ภาคผนวก

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Ruangsittichai J, Apiwathnasorn C and Dujardin JP. Interspecific and sexual shape variation in the filariasis vectors *Mansonia dives* and *Ma. bonneae*. Infection, Genetics and Evolution. 2011; 11(8) Dec: 2089-94. (เอกสารแนบหมายเลข 1)

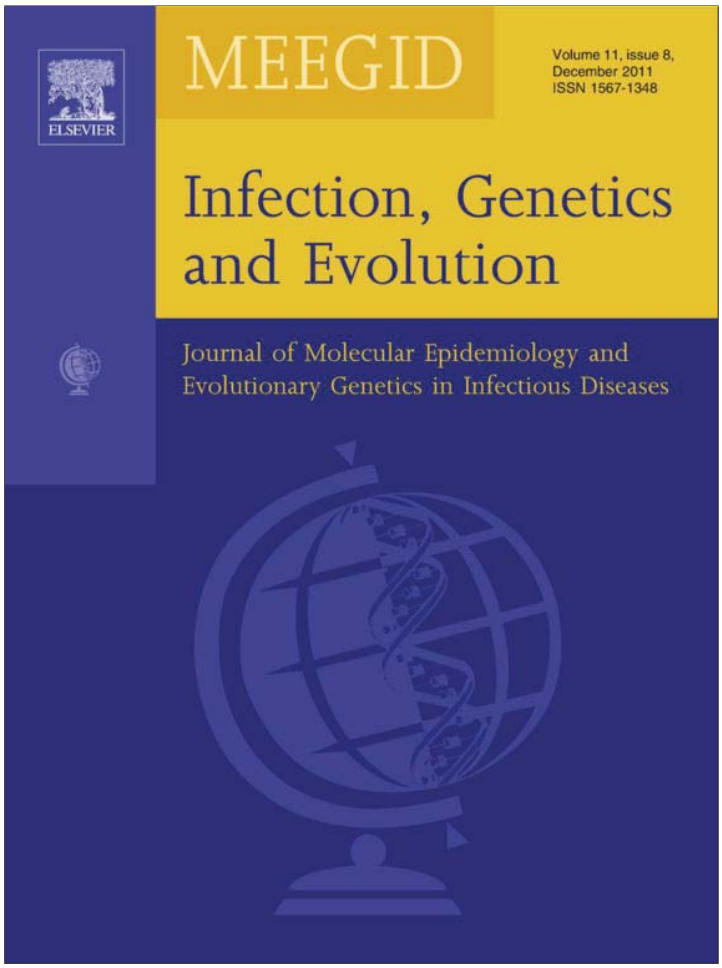
Rueanghiran C, Apiwathnasorn C, Sangthong P, Samung Y and **Ruangsittichai J**. Utility of a set of conserved mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene primers for *Mansonia annulata* identification. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2011; 42(6) Nov: 1381-7. (เอกสารแนบหมายเลข 2)

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

Dujardin JP, Morales Vagras RE, Sungvornyothin S, **Ruangsittichai J**, Apiwathnasorn C. The sexual dimorphism of wing shape in three genera of mosquitoes. Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld, Bangkok, Thailand. 1-3 December 2010 (poster presentation) (เอกสารแนบหมายเลข 3)

Ruangsittichai J, Rueanghiran C, Apiwathnasorn C, Samung Y, Dujardin JP. Differentiation of *Mansonia* mosquitoes, Filarial vectors, by morphometrics and DNA barcode analysis. Joint International Tropical Medicine Meeting 2009, Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld, Bangkok, Thailand. 3-4 December 2009 (poster presentation) (เอกสารแนบหมายเลข 4)

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

Infection, Genetics and Evolution 11 (2011) 2089–2094

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Interspecific and sexual shape variation in the filariasis vectors *Mansonia dives* and *Ma. bonneae*

Jiraporn Ruangsittichai [a], Chamnarn Apiwathnasorn [a], Jean-Pierre Dujardin [b,*]

[a] Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand
[b] UMR IRD – CNRS 2724, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 June 2011
Received in revised form 27 September 2011
Accepted 5 October 2011
Available online 14 October 2011

Keywords:
DNA barcoding
Geometric morphometry
Sexual dimorphism
Mansonia
Filariasis

ABSTRACT

In the South of Thailand, six *Mansonia* species are recorded as filariasis vectors, among which *Ma. bonneae* and *Ma. dives*. These two species are distributed in the same breeding place, mainly the swamp forest, but appear to be of problematic identification using traditional morphological characters. Because of the risk of wrong identification during epidemiological or biological studies, complementary techniques are needed to distinguish the two species.

We used on the same field collected specimens both genetic (DNA barcoding) and phenetic (geometric morphometrics) techniques. Both methods converged to identify two separate entities in accordance with morphological differences and geographic origins. Shape divergence between species was more pronounced in males than in females. Notably, the amount of within species sexual shape dimorphism was much larger than shape divergence as recorded between species.

In spite of these two species of *Mansonia* being evolutionary very close, simple DNA barcoding was resolutive. Geometric morphometrics, because it is a fast and low-cost procedure, appeared as an interesting complement to modern diagnostic techniques applied in medical entomology. It also was able to provide information relevant to the ecology of the two species.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Filariasis in South East Asia is an important public health problem. Most species in the subgenus Mansonioides of the genus *Mansonia* Blanchard, 1901 (i.e. *Mansonia annulata* Leicester, 1908, *Ma. annulifera* (Theobald, 1901), *Ma. bonneae* Edwards, 1930, *Ma. dives* (Schiner, 1868), *Ma. indiana* Edwards, 1930 and *Ma. uniformis* (Theobald) 1901) are vectors of Brugian filariasis in Thailand, some of which are difficult to distinguish by morphological features. Traditional morphological identification of adult specimens relies on scales and body patterns. Up to now, it has been used to differentiate the *Mansonia* species.

Some pairs of species like *Ma. indiana* and *Ma. uniformis* or *Ma. bonneae* and *Ma. dives*, do not readily separate and may represent a taxonomic problem. Our study focused on the *bonneae – dives* pair. These morphologically very close species exhibit differences in ecology and possibly in their response to control measures. For instance, *Ma. bonneae* is common in peat swamp forest while *Ma. uniformis* is common in open swamp (Apiwathnasorn et al., 2006). Alternative methods for accurate identification are then required to either implement or evaluate control program.

The barcoding technique based on the sequence of the cytochrome oxidase subunit I (COI) has become a popular technique for species identification, although not always satisfactory for very close species (Meier et al., 2006; Elias et al., 2007; Kumar et al., 2007). To evaluate the interest of another potentially diagnostic approach in the case of the two close species *Ma. dives* and *Ma. bonneae*, we submitted the specimens also to geometric morphometry (Dujardin and Slice, 2007; Dujardin, 2008). This technique has not been applied before on species of this genus. Thus, on the field collected specimens from Thailand and Myanmar, we compared on the same individuals the species diagnostic provided by the cytochrome oxidase subunit I (COI) sequence and the one obtained by the morphometric technique.

2. Materials and methods

2.1. Specimen collection

Mosquitoes were collected from the south of Thailand (Surat Thani and Narathiwat) and Myanmar (Dawei) by biting collection and aspirator. From the more than 2000 mosquitoes classified as *Mansonia*, 109 specimens had well preserved diagnostic characters (Rattanarithikul et al., 2005, 2006) and were unequivocally identified as *Ma. bonneae* and *Ma. dives*. These specimens were 28 female

* Corresponding author. Address: MIVEGEC, IRD, Montpellier, Av. Agropolis, 911, BP 64501, 34394 Montpellier, France.
E-mail address: dujardinbe@gmail.com (J.-P. Dujardin).

1567-1348/$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.meegid.2011.10.002

Author's personal copy

Table 1
Origin and date of capture of the specimens under study. *n*, number of mosquitoes.

Species	*n* (Gender)	Date	Place
Mansonia bonneae	28 (Female)	April 2005	Surat Thani, Thailand
	22 (Male)	April 2005	Surat Thani, Thailand
Mansonia dives	15 (Female)	February 2005 (3)	Narathiwat, Thailand
		August 2009 (12)	Surat Thani, Thailand
	5 (Male)	February 2005	Narathiwat, Thailand
	16 (Female)	December 2009	Dawei, Myanmar

Ma. bonneae, 24 male *Ma. bonneae*, 52 female *Ma. dives* and 5 male *Ma. dives* (Table 1). Each specimen was analyzed by DNA barcoding and morphometrics.

2.2. DNA extraction

All 109 *Mansonia* specimens were selected for DNA extraction by the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) following manufacturers instructions. Only legs of mosquitoes were used. The DNA elution was stored at −20 °C.

2.3. COI amplification

For *Ma. bonneae*, Cytochrome oxidase subunit I (COI) was amplified by PCR using primer pairs, LepF1 forward (5′-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3′) and LepR1 reverse (5′-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3′) primers (Hajibabaei et al., 2006). Each PCR reaction contained 5 μL 10× PCR buffer (20 mM Tris–HCl, pH 8.4, and 500 mM KCl), 2.5 mM $MgCl_2$, 50 μM dNTPs, 0.5 U Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA), 0.1 μM of each primer, 5 μl of DNA template and the remaining volume of ddH_2O up to 50 μl. The PCR thermal consisted of 1 min at 94 °C followed by 5 cycles of 30 s at 94 °C, 40 s at 45 °C, 1 min at 72 °C, then 35 cycles of 30 s at 95 °C, 40 s at 55 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension step of 10 min at 72 °C. For *Ma. dives*, C1J-1718 primer (5′-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3′) and C1N-2191 primer (5′-CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3′) (Simon et al., 1994) were used to amplify COI. The PCR thermal consisted of 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 1 min at 72 °C and a final extension step of 10 min at 72 °C. All PCR products were submitted for sequencing.

2.4. DNA sequencing and analysis

COI amplification was sequenced by Fluorescent dye-terminator sequencing (ABI3730xl DNA sequencers). DNA sequencing was performed by using forward and reverse primers as in COI amplification. Nucleotide sequences were multiple aligned using the Clustal X version 2.0.12 (Thompson et al., 1997). Intraspecific and interspecific sequence divergences were calculated using the Kimura 2-parameter (K2P) model (Kimura, 1980). Neighbor-joining (NJ) tree was built using MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) with bootstrapping (1000 replications).

2.5. Morphometrics

Wings of *Ma. bonneae* and *Ma. dives* were digitized by one of us (JK) at 13 anatomical landmarks (Fig. 2). The centroid size (CS) of

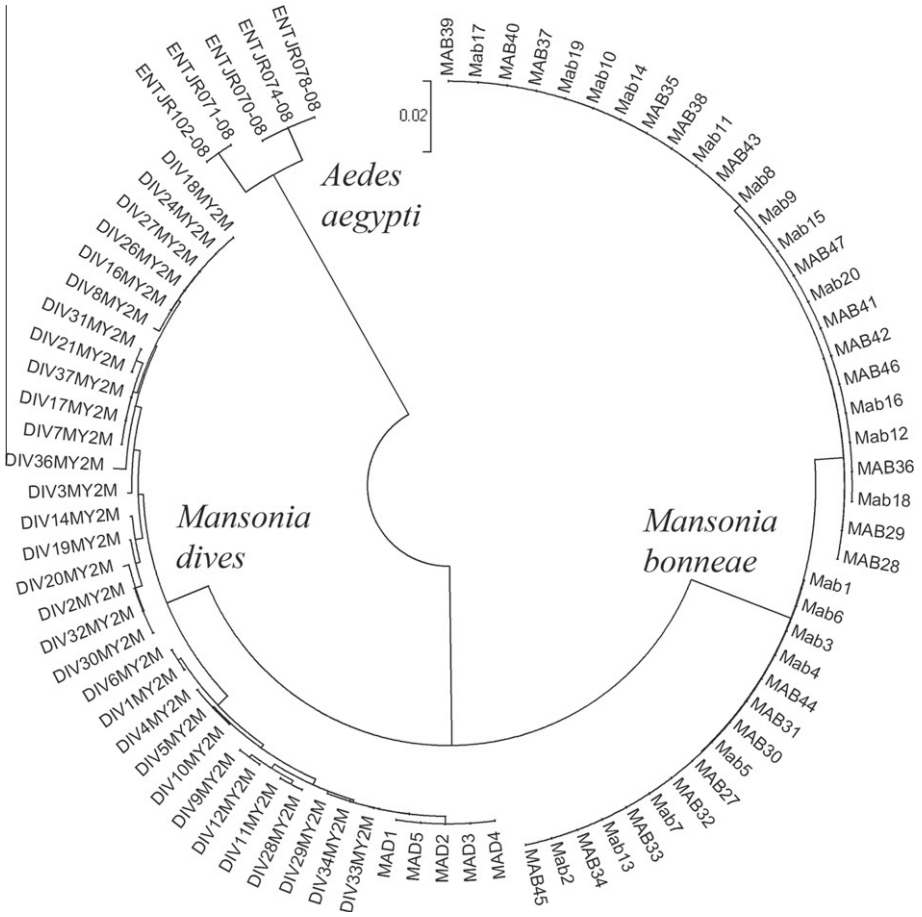


Fig. 1. Neighbor Joining tree built from intraspecific and interspecific sequence divergences using the Kimura 2-parameter (K2P) model. ENT, entomology; JR, Jiraporn Ruangsittichai; MAB, *Mansonia bonneae* from Thailand; MAD, *Mansonia dives* from Thailand; DIVMY2M, *Mansonia dives* (DIV) from Myanmar (MY2M).

Author's personal copy

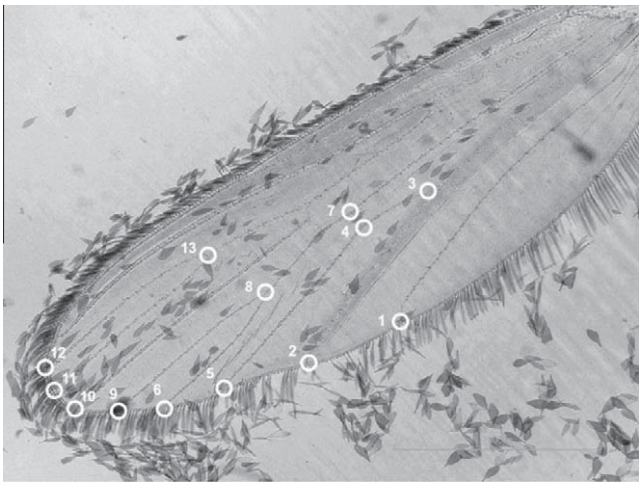


Fig. 2. Wing of *Mansonia* sp. showing the 13 landmarks whose coordinates were used in morphometric analyses. Each landmark is the junction of two different veins, as required by "Type I" landmarks (Bookstein, 1991).

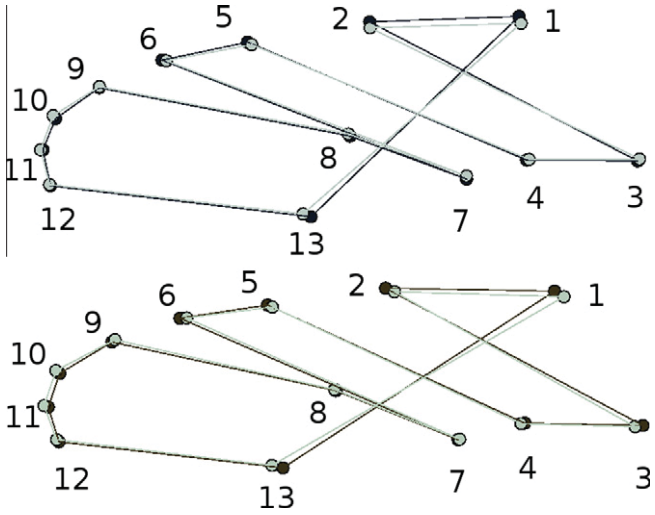


Fig. 3. Polygons are the 13 anatomical landmarks, numbered as in Fig. 2, and connected by a straight line after Procrustes superposition (residual coordinates) of the two species, in females (top) and in males (bottom). Interspecific differences are visually similar in both sexes, slightly more pronounced in males.

each mosquito was computed from the 13 LM configuration: CS is the square root of the summation of the squared distances between the center of the configuration and each landmark (Bookstein, 1991). Size means and variances were analyzed using non-parametric ANOVA (Caro-Riaño et al., 2009).

Each configuration of landmarks was superimposed on the total consensus using the Generalized Procrustes Algorithm (GPA) (Rohlf, 1990). The residual coordinates of the 13 anatomical landmarks provided polygons allowing visual comparisons of mean shapes between species (Fig. 3) and between sexes (Fig. 6). Thus, after size removal through the Procrustes superimposition on the consensus of the total sample (GPA), the residual coordinates were converted into "partial warps" (PW) to allow their processing by standard multivariate analyses.

The principal components of the PW (i.e., the relative warps, or RW) were computed to show the morphospace for both species in females (Fig. 4, left) and in males (Fig. 4, right), separately.

The classification of the wings, or of the individuals (left and right wing averaged), was evaluated using as reference the DNA classification. It was performed through a discriminant analysis (Table 3). For females, the complete set of PW was used as input. For species assignation of male individuals, to take into account some small sample sizes in this sex relative to the number of variables, a reduced set of the RW was used: the nine first RW for the wing classification, representing 81% of the total variation, and the five first RW for the individual classification, representing 93% of the total variation. Classification was based on the shortest Mahalanobis distance, and was validated by a Jack-Knife procedure (VR, see Table 3).

2.5.1. Software

Nucleotide sequences were aligned using the Clustal_X software (Thompson et al., 1997). Neighbor joining (NJ) tree was obtained using MEGA 4.0 software (Tamura et al., 2007) with bootstrapping (1000 runs). All the analyses related to the morphometric study used the CLIC package (http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/clic/index.html) (Dujardin, 2008; Dujardin et al., 2010).

3. Results

3.1. DNA

The COI DNA barcodes of *Mansonia* mosquitoes showed 650 basepairs in agarose gel electrophoresis. Thirty-six sequences for 480 basepairs of COI coding regions of *Ma. dives* (GenBank Accession Nos.: from JF811352 to JF811392) were compared with 41 sequences of *Ma. bonneae* (GenBank Accession Nos.: from JF811393 to JF811428). These sequences had high A+T content, the average ranging from 66.5% (*Ma. dives*) to 67.4% (*Ma. bonneae*). The average A+T content at the third position of the codon was 91.3% and 93.4% in *Ma. dives* and *Ma. bonneae*, respectively. This high content of A+T

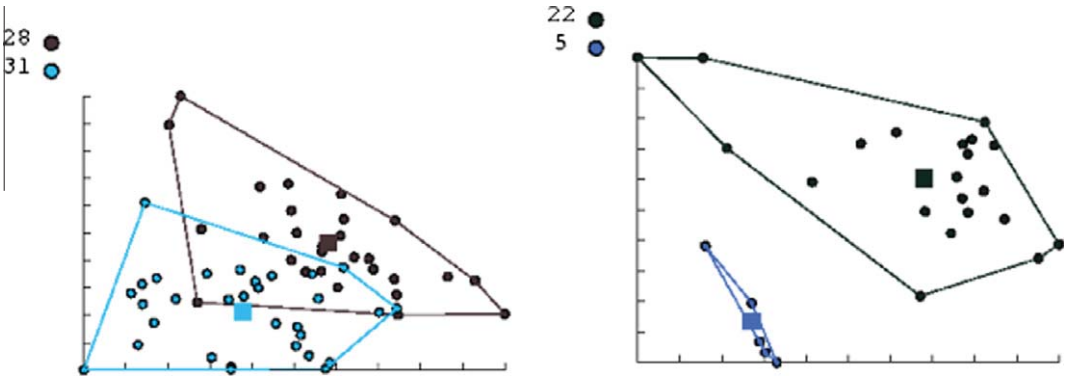


Fig. 4. The two species, *Mansonia dives* and *Ma. bonneae*, are represented by convex hulls in the morphospaces of females (28 *Ma. bonneae* and 31 *Ma. dives*, left hand) and males (22 *Ma. bonneae* and 5 *Ma. dives*, right hand). In each morphospace, the horizontal axis is the first relative warp (RW1), the vertical axis is the second one (RW2). For females, the morphospace represents 51% of the total variation, for males it represents 55%. For species classification using the totality or part of the RW, please see Table 3.

Author's personal copy

was closely resembling values found in Canadian mosquitoes (average 67%) and Indian mosquitoes (Cywinska et al., 2006; Kumar et al., 2007).

3.1.1. Species classification

The phylogenetic relationships among the 82 COI sequences of *Ma. bonneae*, *Ma. dives* and *Ae. aegypti* (as an outgroup), are illustrated by the neighbor-joining (NJ) tree (Fig. 1). The NJ analysis of the COI sequences showed a clearcut separation between two main *Mansonia* clusters. When computing nucleotide sequence divergence using the K2P model, inter-cluster sequence divergence averaged 5.3% (range 5.0–6.4%), whereas sequence divergence within cluster ranged from 0.5% (0–1.0%) to 1.0% (0–1.5%) (Table 2).

Table 2
Percentage interspecific and intraspecific pairwise sequence divergence for the COI DNA barcodes of *Mansonia bonneae*, *Ma. dives* and *Aedes aegypti* using K2P model.

	% Mean sequence Divergence (range)		
	Mansonia bonneae	*Mansonia dives*	*Aedes aegypti* (outgroup)
Mansonia bonneae	0.5 (0–1.0)		
Mansonia dives	5.3 (4.8–6.0)	1.0 (0–1.5)	
Aedes aegypti (outgroup)	15.7 (15.0–16.3)	14.2 (13.8–15.0)	1.4 (0–2.3)

Table 3
Classification scores based on shape variation (size was not considered in this classification). %, percent of correct assignations. RC, reclassification after discriminant analyses. VR, validated reclassification, where each wing or individual (average of two wings) is used as a supplementary data. Input variables for discriminant analyses were the total (22) of relative warps for females, it was five first relative warps (5RW) for male individuals (representing 81% of the total variance) and nine (9RW) for wings (93% of the total variance).

	Classification	*Ma. bonneae*	%	*Ma. dives*	%
Female Mansonia					
Wings		43		53	
	RC	42	97	52	98
	VR	42	97	50	94
Individuals		28		31	
	RC	28	100	30	96
	VR	27	96	30	96
Male Mansonia					
Wings (9RW, 93%)		38		9	
	RC	38	100	9	100
	VR	36	94	9	100
Individuals (5RW, 81%)		22		5	
	RC	21	95	5	100
	VR	20	90	5	100

These two clusters were attributed to *Ma. bonneae* and *Ma. dives* according to morphological and geographic criteria, and were used as references for the subsequent morphometric study.

3.2. Morphometrics

The centroid size of the wing was significantly different between males of the two species, not between females (detailed results not shown). The interspecific changes in the relative positions of anatomical landmarks, i.e. in shape, were apparently similar in males and females (Fig. 3).

3.2.1. Species classification

The relative warps (RW, i.e. the principal components of the partial warps) allowed a complete separation of the two species in males but no such good distinction was observed in females (Fig. 4). The discriminant analysis (using RW as input) allowed however a satisfactory reclassification of both males and females (Table 3). The scores of simple reclassification were generally excellent, ranging between 95 and 100%. Validated reclassification provided very similar scores, except for male individuals where it dropped from 95% to 90% (Table 3).

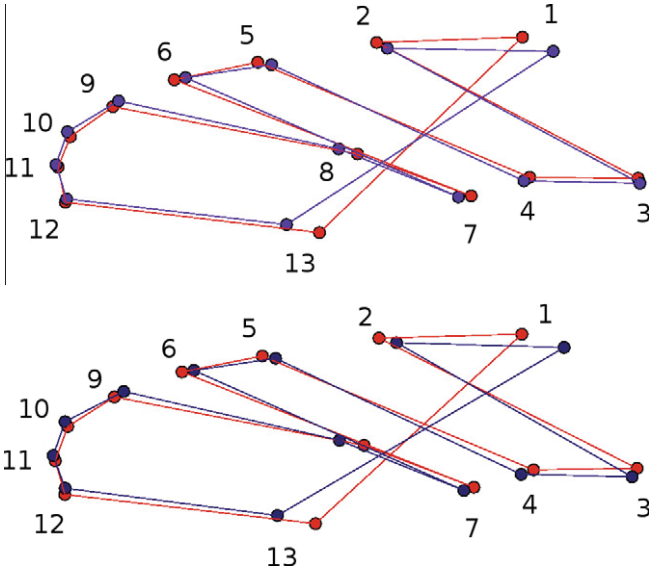


Fig. 6. Shape variation between sexes after Procrustes superposition of 13 landmarks. Lines are connecting landmarks (numbers) as shown Fig. 2. From top to bottom: males and females of *Ma. bonneae*, males and females of female *Ma. dives*.

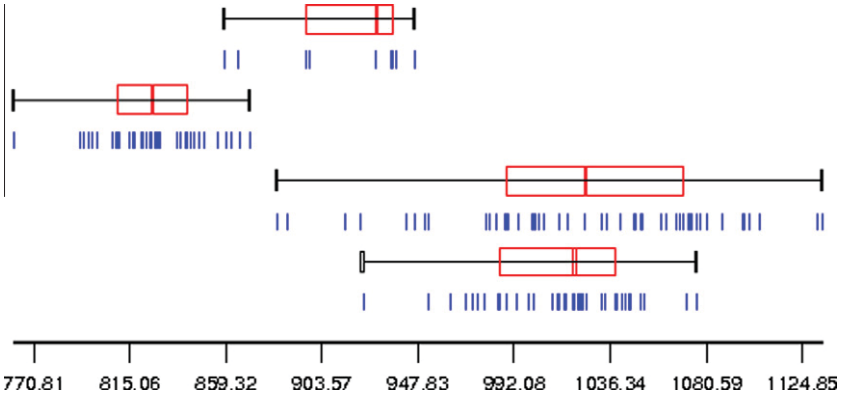


Fig. 5. Size variation of the wings between species and sexes, shown as quantile boxes. From top to bottom: male *Ma. dives* and male *Ma. bonneae*, female *Ma. dives* and female *Ma. bonneae*. Each box shows the group median separating the 25th and 75th quartiles. Vertical bars under the boxes represent the wings. Units are pixels.

Author's personal copy

3.2.2. Sexual dimorphism

There was an important sexual dimorphism at both size (Fig. 5) and shape (Fig. 6) levels. The Procrustes distances between sexes within species (0.082 in *Ma. bonneae*, 0.096 in *Ma. dives*) were three times larger than interspecific distances (0.021 for females, 0.032 for males).

4. Discussion

Two modern identification techniques, DNA barcode analysis and geometric morphometrics, were efficient in the differentiation of the closely related *Mansonia* species, *Ma. bonneae* and *Ma. dives*.

4.1. Species determination

The DNA bar-code analysis (650 bp fragment of COI) showed two clearly separate populations showing genetic distances compatible with two species. The two species as defined by the DNA analysis were used as reference populations to evaluate the morphometric tool. The latter produced satisfactory classification scores, but unequal results according to the sex of the mosquito. At both the principal component (PCA, Fig. 4) and the discriminant (DA, Table 3) analyses, males were completely separated. Females however could be separated only by the DA, with still some overlapping (DA, Table 3). Thus, any intent of morphometric identification of female specimens should not be performed without a group of reference material, i.e. specimens confirmed by DNA analyzes. As explained by Dujardin et al. (2010), the geometric morphometric approach for species identification requires an existing, free-access bank of reference images. Female (and male) images of both species analyzed in the present study will be uploaded to the CLIC bank (http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/clic/index.html).

In summary, we showed that two alternative or complementary techniques, the DNA bar-code analysis (650 bp fragment of COI) and the geometric morphometrics, could help distinguish the two morphologically close *Mansonia* species. The fast and low cost geometric morphometrics could be used as a first choice approach. If necessary, DNA bar-code analysis could be applied for doubtful specimens only.

4.2. Sexual dimorphism

The morphometric study of these two species was conducted separately in males and females, allowing to compare sexes within each species. As in other mosquito genera recently investigated (Vidal et al., 2011; Devicari et al., 2011), we disclosed in both species a strong sexual dimorphism, both for size (SSD) and for shape (SShD).

SSD is common in many organisms. In insects, the SSD is considered as a genetic difference, but it also can be produced by males and females exhibiting different responses to environmental changes like temperature (Blanckenhorn, 1997; Morin et al., 1999; Fischer and Fiedler, 2000, 2001) and/or food quality/quantity (Mackauer, 1996; Blanckenhorn, 1997; Morin et al., 1999). The SSD was important and more pronounced in *Ma. bonneae* which, on the contrary, showed less sexual shape dimorphism (SShD).

In different organisms, SShD is often considered as a passive consequence of SSD (allometry). For instance, it has been attributed to allometry (i.e. SSD) in primates (Gould, 1975; Leigh, 2006) and in *Drosophila* (Gidaszewski et al., 2009; Baylac and Penin, 1998; Gilchrist et al., 2000; Debat et al., 2003). However, SShD in our data could not be satisfactorily interpreted as an allometric effect, since the most important SShD was observed for the species having the less important SSD. As a consequence, non-allometric components were probably playing a role in the SShD of these two *Mansonia* species. Studies in other organisms also admitted non-allometric components for SShD (OHiggins and Collard, 2002; Schaefer et al., 2004; Leigh, 2006; Gidaszewski et al., 2009), and they were shown to be different, or more active, according to the sexual behavior of the organism (Briceño et al., 2005).

The other sex-related observation in our sample was that the mean shape divergence between species was higher among males (Procrustes distance 0.032) than among females (Procrustes distance 0.021, $P < 0.001$). The reason why interspecific differences in shape could be higher in one sex than in another were probably linked with the clear-cut sexual dimorphism in shape. The reason why more interspecific difference could occur among males rather than among females has been discussed in terms of sexual selection (Marsteller et al., 2009). Males of some Diptera – including mosquitoes species (Cator et al., 2009) or sandflies (Ward et al., 1988) – use the wings as vibratory and/or visual displays during courtship (Andersson, 1994). If wing shape affects courtship displays, it should differ between species, and especially between males.

5. Conclusions

The bar coding technique could accurately distinguish the two morphologically close species *Ma. bonneae* and *Ma. dives*. The geometric approach was tested as both a classification and a characterization technique on separated sexes of the two species.

Although the bar coding technique is relatively fast and inexpensive, and although here it was the most efficient diagnostic alternative, it cannot compete with the geometric technique in terms of speed and cost. As long as the morphometric technique provides satisfactory scores of species classification, we recommend its use as a first approach, preferably on the base of reference images as recommended in Dujardin et al. (2010). The bar coding technique would then be applied for doubtful specimens only.

Our observation about sexual dimorphism could indicate that sexual selection play a significant role in the speciation of some members of the *Mansonia* genus.

Acknowledgments

We thank Dr. Sungsit Sungvornyothin and Mr. Yudthana Samung for providing specimens from Myanmar and Thailand. This research was supported by the Thailand Research Fund, Grant No. MRG5280206, as well as by the IRD Grants HC3165-3R165-GABI-ENT2 and HC3165-3R165-NV00-THA1.

References

Andersson, M., 1994. Sexual Selection. Princeton University Press, Princeton, New Jersay.

Apiwathnasorn, C., Samung, Y., Prummongkol, S., Asavanich, A., Komalamisra, N., 2006. Surveys for natural host plants of *Mansonia* mosquitoes inhabiting Toh Daeng peat swamp forest, Narathiwat province, Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 37 (2), 252–279.

Baylac, M., Penin, X., 1998. Wing static allometry in *Drosophila simulans* males (Diptera, Drosophilidae) and its relationships with developmental compartments. Acta Zoology 44 (1), 97–112.

Blanckenhorn, W.U., 1997. Altitudinal life history variation in the dung flies *Scathophaga stercoraria* and *Sepsis cynipsea*. Oecologia 109, 342–352.

Bookstein, F.L., 1991. Morphometric tools for landmark data. Geometry and Biology. Cambridge University Press, NY.

Briceño, R.D., Eberhard, W.G., Quilici, S., 2005. Comparative allometry and sexual behavior of four fruit fly species in the tribe ceratitidini (Diptera: Tephritidae). Journal of the Kansas Entomological Society 78 (1), 20–33.

Caro-Riaño, H., Jaramillo, N., Dujardin, J.P., 2009. Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions. Infection, Genetics and Evolution 9 (2), 162–168.

Cator, L.J., Arthur, B.J., Harrington, L.C., Hoy, R.R., 2009. Harmonic convergence in the love songs of the dengue vector mosquito. Science 323 (5917), 1077–1079.

Author's personal copy

Cywinska, A., Hunter, F.F., Hebert, P.D.N., 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Medical and Veterinary Entomology 20 (4), 413–424.

Debat, V., Begin, M., Legout, H., David, J.R., 2003. Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. Evolution 57 (12), 2773–2784.

Devicari, M., Lopes, A.R., Suesdek, L., 2011. Dimorfismo sexual alar em *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae). Biota Neotropic 11 (2), 1–5.

Dujardin, J.P., 2008. Morphometrics applied to medical entomology. Infection, Genetics and Evolution 8, 875–890.

Dujardin, J.P., Kaba, D., Henry, A.B., 2010. The exchangeability of shape. BMC Research Notes 3, 266. doi:10.1186/1756-0500-3-266.

Dujardin, J.P., Slice, D., 2007. Geometric morphometrics. Contributions to medical entomology. In: Tibayrenc M. (Ed.), Encyclopedia of Infectious Diseases. Modern Methodologies, Wiley & Sons, pp. 435–447 (Chapter 25).

Elias, M., Hill, R.I., Willmott, K.R., Dasmahapatra, K.K., Brower, A.V., Mallet, J., Jiggins, C.D., 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. Proceedings. Biological Sciences 274, 2881–2889.

Fischer, K., Fiedler, K., 2000. Sex-related differences in reaction norms in the butterfly *Lycaena tityrus* (Lepidoptera: Lycaenidae). Oikos 90, 372–380.

Fischer, K., Fiedler, K., 2001. Dimorphic growth patterns and sex-specific reaction norms in the butterfly *Lycaena hippothoe sumadiensis*. Journal of Evolutionary Biology 14, 210–218.

Gidaszewski, N.A., Baylac, M., Klingenberg, C.P., 2009. Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* subgroup. BMC Evolutionary Biology 9, 110.

Gilchrist, A.S., Azevedo, R.B., Patridge, L., OHiggins, P., 2000. Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster*. Evolution & Development 2, 114–124.

Gould, S.J., 1975. Allometry in Primates, with emphasis on scaling and the evolution of the brain. Szalay, Basel, Karger.

Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Physical Sciences 103 (4), 968–971.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16, 11–120.

Kumar, N.P., Rajavel, A.R., Natarajan, R., Jambulingam, P., 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 44 (1), 1–7.

Leigh, S.R., 2006. Cranial ontogeny of *Papio* baboons (*Papio hamadryas*). American Journal of Physiological Anthropology 130, 71–84.

Mackauer, M., 1996. Sexual size dimorphism in solitary parasitoid wasps: influence of host quality. Oikos 76, 265–272.

Marsteller, S., Adams, D.C., Collyer, M.L., Condon, M., 2009. Six cryptic species on a single species of host plant: morphometric evidence for possible reproductive character displacement. Ecological Entomology 34, 66–73.

Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., Ng, P.K., 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. Systematic Biology 55 (5), 715–728.

Morin, J.P., Moreteau, B., Petavy, G., David, J.R., 1999. Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. Journal of Evolutionary Biology 12, 329–339.

OHiggins, P., Collard, M., 2002. Sexual dimorphism and facial growth in papionin monkeys. Journal of Zoology 257, 255–272.

Rattanarithikul, R., Harrison, B.A., Panthusiri, P., Coleman, R.E., 2005. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand I. Background; geographic distribution; lists of genera, subgenera, and species; and a key to the genera. Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health 36 (Suppl. 1), 1–80.

Rattanarithikul, R., Harrison, B.A., Panthusiri, P., Peyton, E.L., Coleman, R.E., 2006. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand III. Genera Aedeomyia, Ficalbia, Mimomyia, Hodgesia, Coquillettidia, Mansonia, and Uranotaenia. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 37 (Suppl. 1), 1–85.

Rohlf, F.J., 1990. Rotational fit (Procrustes) methods. In: Rohlf, F., Bookstein, F. (Eds.), Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop. Special Publication Number 2. The University of Michigan Museum of Zoology. Ann Arbor, MI, pp. 380. University of Michigan Museums, Ann Arbor, pp. 227–236.

Schaefer, K., Mitteroecker, P., Gunz, P., Bernhard, M., Bookstein, F.L., 2004. Craniofacial sexual dimorphism patterns and allometry among extant hominids. Annals of Anatomy 186, 471–478.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America 87, 651–701.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24 (8), 1596–1599.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D., 1997. The clustal_x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25 (24), : 4876–4882.

Vidal, P.O., Peruzin, M.C., Suesdek, L., 2011. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). Revista Brasileira de Medicina Tropical 55 (1), 134–137.

Ward, R.D., Phillips, A., Burnet, B., Marcondes, C.B., 1988. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. Biosystematics of haematophagous Insects. Systematics Association Special special volume 37, 257–269 (ed. M.W. Service).

JITMM2010 & IMC2010

Joint International Tropical Medicine Meeting 2010 (JITMM2010)

"Tropical Diseases: future threats and new paradigms"

and

International Malaria Colloquium 2010 (IMC2010)

"Malaria: new hopes, new challenges"

Abstracts

1-3 December 2010

Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld

Bangkok, Thailand

POSTER No. 24

SEXUAL DIMORPHISM OF WING SHAPE IN THREE GENERA OF MOSQUITOES

Jean-Pierre Dujardin, Ronald Morales Vargas, Sungsit Sungvornyothin, Jiraporn Ruangsittichai, Chamnarn Apiwathnasorn

The wings are devoted to active dispersion, and between sexes having different sizes, it is expected to find wings of different sizes. The SEXUAL SIZE DIMORPHISM (SSD) is frequently observed in insects. The SEXUAL SHAPE DIMORPHISM (SShD) has been less studied, and told to be the passive consequence of size variation between sexes (allometry).

However, recent studies have demonstrated the existence of a non-allometric component of SShD, which suggests the wing can also be a secondary sexual character. Males of some Diptera - including mosquitoes or sandflies - use the wings as vibratory and/or visual displays during courtship.

We studied the sexual dimorphism in three mosquito genera from two different subfamilies: Anophelinae and Culicinae. In each genus, *Anopheles*, *Aedes* and *Mansonia*, we examined close pair(s) of species living in sympatry in some parts of Thailand.

OBSERVATIONS

1. On average, males were smaller than females (SSD). Within each species, the landmarks displacements due to size variation (allometry) and to sex occurred at different parts of the wings.

2. Between the small males and the larger females, the different species showed similar shape changes (SShD).

3. Between species, males most frequently showed more shape divergence than females.

CONCLUSIONS

1. The shape change between sexes (SShD) contained a significant non-allometric component.

2. In spite of millions years of separate evolution, the different species showed similar SShD, suggesting strong biomechanical constraints on the same parts of the wings.

3. The interspecific divergence of wing shape was larger in males probably because the courtship display is performed by males. ✻

POSTER No. 25

DECLINE IN THE EFFICACY OF A 3-DAY ARTESUNATE-MEFLOQUINE COMBINATION IN THE TREATMENT OF UNCOMPLICATED FALCIPARUM MALARIA ALONG THE THAI-MYANMAR BORDER OF THAILAND IN 2009

Kanungnit Congpuong[a], Suteera Poolthin[a], Wichai Satimai[a], Arunya Pinyorattanachote[b], Kalaya Tunchan[c], Sawad Cholaphol[d], Chutatip Chompoonuch[e]

[a] *Bureau of Vector-borne Disease, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand;*
[b] *Office of Disease Prevention and Control No. 11, Nakorn Si Thammarat province;*
[c] *Vector-borne Disease Center 9.3, Mae Sot district, Tak province;*
[d] *Office of Disease Prevention and Control No. 10, Chiangmai province, Thailand,*
[e] *Office of Disease Prevention No. 4, Ratchaburi province, Thailand*

Objective - To study the efficacy and safety of a 3-day combination of artesunate-mefloquine (MAS3) in the treatment of uncomplicated falciparum malaria along the Thai-Myanmar border provinces.

Methods - The studies were conducted at 4 sentinel sites situated in Mae Hong Son and Tak provinces (northwestern bordered to Myanmar), Kanchanaburi province (central western border) and Ranong (southwestern border) where malaria transmission is seasonal. Malaria patients were both Thai and Non-Thai. Subjects received a total dose of 12 mg/kg artesunate in 3 daily doses (4 mg/ kg/day on day 0, 1 and 2) and a total dose of 25 mg/ kg mefloquine in 2 doses (15 mg/kg on day 0 and 10 mg/ kg on day 1). Primaquine 0.6 mg/kg was given on day 2 (maximum 30 mg). All doses were directly observed. Treatment efficacy was determined based on the WHO classification of treatment outcome [WHO, 2005].

Results - Per protocol analysis included 183 patients. There were no early treatment failures. Nine cases were classified as late clinical failures, 10 as late parasitological failures and 164 as adequate clinical and parasitological response. Drug failure was observed in 89.6 % of the patients. The geometric mean asexual parasite density at admission was 15,900 / µl blood. Average asexual parasite clearance time was 44.2 hours. There were no serious adverse reactions to the drugs and the treatment was well tolerated. Response to treatment did not show significant differences between the study provinces. Chronological data analysis indicated a successive prolongation of the parasite clearance time between 2006 and 2009, indicating a reduction of the efficacy of the MAS3 regimen, usually the first sign of threatening drug resistance.

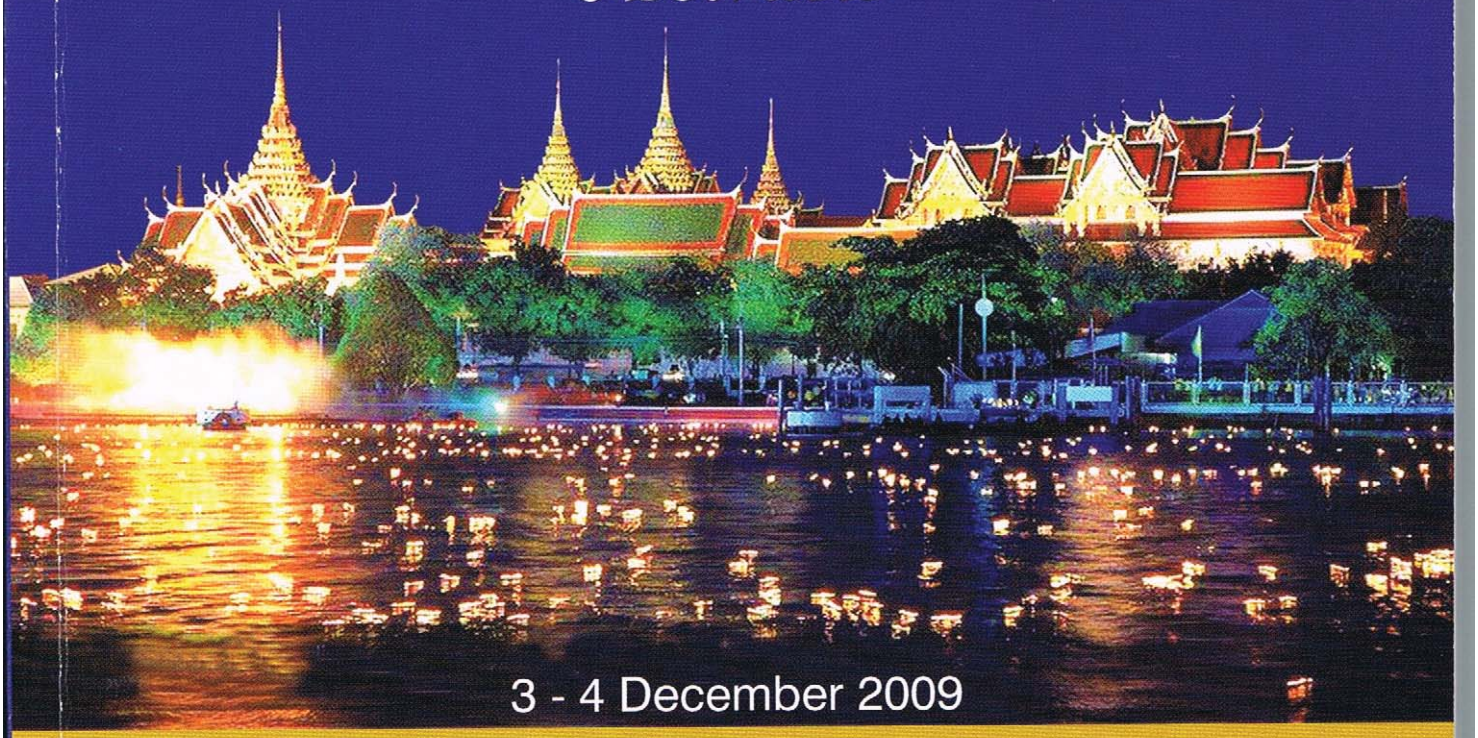
Keywords: uncomplicated falciparum malaria, artesunate-mefloquine combination, Thai-Myanmar border

Joint International Tropical Medicine Meeting

(JITMM2009)

"Tropical Health in a Time of Economic Crisis"

Abstracts



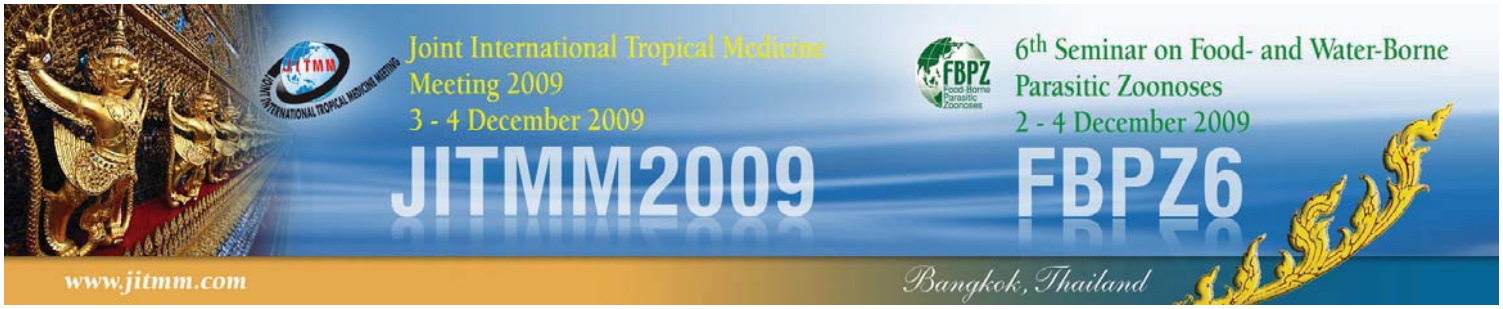
3 - 4 December 2009

Centara Grand & Bangkok Convention Centre

at CentralWorld

Bangkok, Thailand

JITMM2009



No. JITMM2009 & FBPZ6/SC 166

22 October 2009

Dr. Jiraporn Ruangsittichai
Department of Medical Entomology
Faculty of Tropical Meidicne
Mahidol University

Acceptance of abstract for poster presentation, JITMM2009

Dear Dr. Jiraporn,

I am pleased to inform you that your abstract entitled **"Differentiation of *Mansonia* mosquitoes, filarial vectors, by Morphometrics and DNA barcode analysis"** has been accepted for poster presentation in the JITMM2009, 3-4 December 2009, Bangkok, Thailand.

Abstract ID#: 0094

Poster presentations will take place in the foyer of the meeting hall. The rectangular poster-board surface area for each presenter is 90 cm wide x 180 cm high. An appropriate poster size, therefore, is 85 cm wide x 150 cm high.

All poster presentation at JITMM2009 will be considered for the Poster Presentation Award. Please visit our website http://www.jitmm.com for more information.

The papers presented at the Meeting will be accepted for publication (according to the editor's decision) as a supplement of the Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, an official publication of the SEAMEO TROPMED Network, at a rate 30$ US per page. Presenters are requested to bring the full paper (printed out on A4 paper) and saved on a diskette (Microsoft Word) to the JITMM. The Instructions to Authors can be downloaded at http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/instructions/Instruction.pdf.

As the presenting author, we thank you very much for your registration.

Thanks again for your interest in the Meeting.

Looking forward to welcoming you to JITMM2009.

Yours sincerely,

Pongrama Ramasoota

Assist.Prof. Pongrama Ramasoota
Chairperson, Scientific Committee JITMM2009
E-mail: jitmm@mahidol.ac.th
Phone/Fax: 66 (0) 2306 9125-6
http://www.jitmm.com

Poster No. 32

GENETIC STRUCTURE OF NATURAL POPULATION OF *AEDES ALBOPICTUS*; URBAN, RURAL AND SYLVATIC STRAIN

Rutcharin Potiwat[a], Yudthana Samung[a], Samrerng Prummongkol[a], Chamnarn Apiwathnasorn[a]

[a]Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 420/6 Ratchawithi road, Ratchatewi, Bangkok, 10400, Thailand

Objective - To identify the genetic structure of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5(ND5) in *Aedes albopictus* (Skuse); urban, rural and sylvatic strain

Method - *Aedes albopictus* (Skuse) has been a major vector of dengue in Asia and plays an important role to transmission of arboviruses. To identify the genetic variation of these vectors we collected the adults' mosquitoes and larva stage from urban, rural and sylvatic area in many part of Thailand. The nucleotide and consensus sequence were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and examined the variation by DNA sequencing of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5(ND5). The multiple sequence alignment was analyzed by ClustalW program and similarity searching on NCBI database by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Results - the urban strain contained point mutation with different to rural and sylvatics strain, indicating no genetic exchange between rural and sylvatic strain. In contrast, both of rural and sylvatic strains were shared ancestral origin. A comparison of point mutation with urban and sylvatic population indicated genetic marker to apply for identifies urban population. The results of ND5 gene were present low variable and we should compare with other locus. ❖

Keywords: *Aedes albopictus* (Skuse), mitochondrial NADH dehydrogenase, ND5 gene, genetic variation

Poster No. 33

DIFFERENTIATION OF *MANSONIA* MOSQUITOES, FILARIAL VECTORS, BY MORPHOMETRICS AND DNA BARCODE ANALYSIS

Jiraporn Ruangsittichai[1], Chalalai Rueanghiran[1], Chamnarn Apiwathnasorn[1], Yudthana Samung[1], Jean Pierre Dujardin[1,2]

[1]Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand
[2]UMR IRD – CNRS 2724, Agropolis, 911, BP 64501, 34394, Montpellier, France

Mansonia mosquitoes are natural vectors of lymphatic filariasis in the South of Thailand. *Mansonia bonneae* and *Mansonia dives* are classified as closely related species and distributed in the same breeding place, swamp forest. Morphology identification of these two *Mansonia* species is undescribed. So the correct differentiation is important to determine vector capacity and vector control. In this study, 35 *Mansonia* mosquitoes were used to distinguish by geometric morphometrics and DNA barcode analysis. Morphometrics were used as a tool for evaluating physical variation. Variation of size and shape were analyzed from landmarks on digital picture of mosquito wing. DNA barcode using cytochrome oxidase subunit I (COI) were applied to differentiation *Mansonia* species. LepF1 and LepR1 primer were used to amplify the 650 bp COI gene and compared the relationship of these two *Mansonia* species by construction of phylogenetic tree. Comparing with two methods, morphometrics and DNA barcode analysis, it demonstrated that these methods could differentiate into two species groups and could used as a tool for identification *Mansonia bonneae* and *Mansonia dives*. ❖

Keywords: *Mansonia*, Geometric morphometrics, DNA barcode, Cytochrome oxidase subunit I