

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380053

ชื่อโครงการ: แผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

และการระบุตำแหน่งยีน *hsp70* และ *sxl* บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำ (Diptera: Simuliidae)

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
รองศาสตราจารย์ ดร.เจสียว กุวังคะดิลก มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address: pairot.p@msu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (15 มิถุนายน 2553 – 14 มิถุนายน 2555)

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* และ *sxl* บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำในประเทศไทย และเพื่อสร้างแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำในประเทศไทย เก็บตัวอย่างแมลงวันดำจากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและเซลล์พันธุศาสตร์โดยเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซม สกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีน *hsp70*, *sxl*, 18S rRNA และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD นำมาสังเคราะห์ DNA probe โดยกระบวนการ nick translation เพื่อใช้สำหรับระบุตำแหน่งยีนและการจัดทำแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรมบนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำด้วยเทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) ผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *sxl* ได้ ยีน *hsp70*, 18S rRNA และเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD สามารถระบุตำแหน่งของบนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำและหนอนแดง *Chironomus circumdatus* ได้ โดยยีน *hsp70* มีตำแหน่งบนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำ *S. aureohirtum* แท่งที่ 2 แขนข้างยาว (IIL) และบนโครโมโซมแขน A ของหนอนแดง *C. circumdatus* ตำแหน่งของยีน 18S rRNA อยู่บน nucleolar organizer (NOR) ของโพลีทีนโครโมโซมของ *S. aureohirtum* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแขนข้างยาวแท่งที่ 1 (IL) และ *C. circumdatus* ซึ่งอยู่บนโครโมโซม G การสร้างแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม RAPD สามารถระบุตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD 2 ตำแหน่ง คือ เครื่องหมาย RAPD ขนาด 400 bp และขนาด 900 bp โดยเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD ขนาด 400 bp มีตำแหน่งบนโครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างยาว (IL) ของ *S. aureohirtum* สำหรับโพลีทีนโครโมโซมของ *S. fenestratum* พบว่า DNA probe hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแต่ไม่มากระบุตำแหน่งได้ เนื่องจากการกระจายของโพลีทีนโครโมโซมไม่ดี เช่นเดียวกับ RAPD ขนาด 900 bp การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงวันดำ *S. angulistylum* พบว่าเป็นสปีชีส์ซับซ้อนประกอบด้วย 3 cytoforms ได้แก่ cytoform A, B และ C โดยแต่ละ cytoform มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยา

ของแหล่งอาศัยและความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับอนุพันธุศาสตร์ จากการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I (COI)

คำหลัก: fluorescence *in situ* hybridization, *hsp70*, 18S rRNA, RAPD, *Simulium*

Abstract

Project Code : MRG5380053

Project Title : Physical mapping of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

markers and localizations of *hsp70* and *sxl* genes on polytene chromosomes of black flies (Diptera: Simuliidae)

Investigator : Assistant Professor Pairot Pramual, Ph.D.

Associate Professor Chaliow Kuvangkadilok, Ph.D.

E-mail Address : pairot.p@msu.ac.th

Project Period : 2 years (15 June 2010 – 14 June 2012)

The objectives of this project are to localize *hsp70* and *sxl* genes and to construct the RAPD genetic markers map on the polytene chromosome of the black fly using fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. Black fly samples were collected from the natural habitats. Species were identified based on both morphology and cytology using the polytene chromosome banding patterns. DNA was extracted from the larva and the *hsp70*, *sxl*, and 18S rRNA genes and the RAPD marker were amplified. PCR products were used to synthesis DNA probe for FISH using the nick translation method. The *hsp70* and 18S rRNA genes were successfully amplified but the *sxl* gene was unable to amplify. The *hsp70*, 18S rRNA and RAPD markers were successfully localized on the polytene chromosomes of black flies, *Simulium aureohirtum* and *S. fenestratum* and the chironomid, *Chironomus circumdatus*. The *hsp70* gene was located on the long arm of chromosome II (IIL) of *S. aureohirtum* and the chromosome arm A of *C. circumdatus*. Gene 18S rRNA was located on the nucleolar organizer (NOR) region of the chromosome of both *S. aureohirtum* which present on the long arm of chromosome I (IL) and *C. circumdatus* which present on the chromosome arm G. Two RAPD markers (400 bp and 900 bp) were successfully located on the polytene chromosome of *S. aureohirtum* and *S. fenestratum*. The 400 bp RAPD marker was located on the long arm of chromosome I (IL) of *S. aureohirtum* but the chromosome arm that this marker hybridized was unable to identified on the polytene chromosome of *S. fenestratum*. The 900 bp RAPD marker was hybridized on the polytene chromosome of *S. fenestratum* but the chromosome arm was unable to identify. Cytogenetic study of *S. angulistylum* revealed that this species was a species complex composed of three cytoforms (A, B, C). The cytoforms were also differing ecologically and molecularly based on COI barcoding sequences.

Keywords : fluorescence *in situ* hybridization, *hsp70*, 18S rRNA, RAPD, *Simulium*