



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ แผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และการระบุตำแหน่งยีน *hsp70* และ *sx1* บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำ (Diptera: Simuliidae)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล และคณะ

มิถุนายน 2555

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

**โครงการ** แผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และการระบุตำแหน่งยีน *hsp70* และ *sx1* บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำ (Diptera: Simuliidae)

### คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.ไพโรจน์ ประมวล

รศ.ดร.เจลิยว กุวังคะติลิก

### สังกัด

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เจสียว กุวังคะติลภ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย (mentor) ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ และความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี Professor Peter Adler, Clemson University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้คำแนะนำในการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ และช่วยเหลือในการอ่านต้นฉบับบทความทางวิชาการ และ Dr. Jolyon Dodgson ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้คำแนะนำในการเขียนบทความทางวิชาการ คุณณพนธ์ ปิ่นประดับ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์ในการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์

## 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.เจสียา กุวังคะติลิก 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*

## Executive summary

แมลงรืนดำเป็นแมลงที่มีความสำคัญทั้งด้านการแพทย์และเศรษฐกิจ และมีการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์อย่างกว้างขวาง แต่ในระดับอณูเซลล์พันธุศาสตร์ (molecular cytogenetic) โดยใช้เทคนิค FISH ในแมลงรืนดำมีรายงานการศึกษาเพียง 2 สปีชีส์และระบุตำแหน่งของยีนเพียง 5 ยีนเท่านั้น Boakye *et al.* (2000) ประยุกต์ใช้เทคนิค FISH ระบุตำแหน่งของยีน aspartate amino transferase, DNA polymerase และ cytochrome P450 บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำ *Simulium sanctipauli* Procunier *et al.* (2005) ระบุตำแหน่งของยีนที่สร้างโปรตีน Simulidin และ erthyma protein ในแมลงรืนดำ *S. vittatum* แม้ว่าแบบแผนการเรียงตัวของโพลีทีนโครโมโซมในแมลงรืนดำจะมีการศึกษาอย่างกว้างขวางและสามารถสร้างแผนที่มาตรฐานของโครโมโซมรวมถึงการระบุตำแหน่งของอินเวอร์ชันบนโครโมโซมของแมลงรืนดำหลายสปีชีส์ แต่ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในระดับเซลล์พันธุศาสตร์ ไม่สามารถนำไปศึกษาในเชิงลึกต่อได้ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดที่ไม่สามารถสร้างแผนที่ของยีนบนโครโมโซมได้ ดังนั้นการสร้างแผนที่ของยีนบนโครโมโซม และแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรมโดยใช้ RAPD marker จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาในเชิงลึก เนื่องจาก RAPD marker สามารถใช้เป็นตำแหน่งอ้างอิงของลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการศึกษาในอนาคต

ในประเทศไทยมีรายงานการพบแมลงรืนดำทั้งหมด 88 สปีชีส์ และมีการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์และสร้างแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำทั้งหมด 17 สปีชีส์ แผนที่มาตรฐานของโครโมโซมของแมลงรืนดำที่มีการศึกษาแล้วเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาการระบุตำแหน่งของเครื่องหมายทางพันธุกรรม และตำแหน่งของยีนที่สนใจบนโครโมโซม นอกจากนี้แมลงรืนดำในประเทศไทยยังมีการศึกษาด้านอื่นๆ เช่น วิวัฒนาการชาติพันธุ์ นิเวศวิทยา พันธุศาสตร์เชิงประชากร ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาการระบุตำแหน่งของยีน และการศึกษาวิวัฒนาการของยีน และโครโมโซมของแมลงรืนดำในประเทศไทย

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* และ *sxl* บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำในประเทศไทย และเพื่อสร้างแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำในประเทศไทย เก็บตัวอย่างแมลงรืนดำจากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและเซลล์พันธุศาสตร์โดยเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซม จากนั้นสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีน *hsp70*, *sxl*, 18S rRNA และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD นำมาสังเคราะห์ DNA probe โดยกระบวนการ nick translation เพื่อใช้สำหรับระบุตำแหน่งยีนและการจัดทำแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรมบนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำด้วยเทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) ผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถเพิ่ม

ปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *sxI* ได้ สำหรับยีนอื่นสามารถระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* ยีน 18S rRNA และเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำ และหนอนแดง *C. 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 บนโพลีทีนโครโมโซมแต่ไม่มาระบุตำแหน่งได้ เนื่องจากการกระจายของโพลีทีนโครโมโซมไม่ดี เช่นเดียวกับ RAPD ขนาด 900 bp การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงวันดำ *S. angulistylum* พบว่าเป็นสปีชีส์ซับซ้อนประกอบด้วย 3 cytoforms ได้แก่ cytoform A, B และ C โดยแต่ละ cytoform มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยและความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับอนุพันธุศาสตร์ จากการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I (COI)

ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 2 เรื่อง และสามารถสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ จำนวน 8 คน ซึ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาตรีที่ทำโครงการทางชีววิทยาเรื่อง เซลล์พันธุศาสตร์ของหนอนแดง เซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงวันดำ *Simulium angulistylum* และการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD เพื่อระบุชนิดของแมลงวันดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium multistriatum* ในประเทศไทย

## สารบัญ

หน้า

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| กิตติกรรมประกาศ                                                                                                                           | ก  |
| บทคัดย่อ                                                                                                                                  | ข  |
| Executive summary                                                                                                                         | จ  |
| <br>                                                                                                                                      |    |
| 1. วัตถุประสงค์                                                                                                                           | 1  |
| 2. วิธีการศึกษา                                                                                                                           | 1  |
| 2.1 การเก็บตัวอย่างแมลงรืนดำ                                                                                                              | 1  |
| 2.2 การจำแนกชนิด                                                                                                                          | 1  |
| 2.3 การเตรียมโพลีทีนโครโมโซม                                                                                                              | 1  |
| 2.4 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่<br>(Polymerase Chian Reaction, PCR) และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์      | 2  |
| 2.5 การเตรียม DNA probe                                                                                                                   | 3  |
| 2.6 In situ hybridization                                                                                                                 | 3  |
| 2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล                                                                                                                    | 4  |
| <br>                                                                                                                                      |    |
| 3. ผลการศึกษา                                                                                                                             | 4  |
| 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hsp70</i> และ 18S rRNA                                                                                     | 4  |
| 3.2 การระบุตำแหน่งของยีน <i>hsp70</i> และ 18S rRNA บนโพลีทีนโครโมโซม                                                                      | 11 |
| 3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค Random Amplified Polymorphic<br>DNA (RAPD)                                                            | 21 |
| 3.4 ตำแหน่งของ RAPD markers บนโพลีทีนโครโมโซมของ<br><i>Simulium aureohirtum</i> และ <i>S. fenestratum</i>                                 | 23 |
| 3.5 เซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ <i>Simulium angulistylum</i>                                                                             | 27 |
| 3.6 ความแปรผันทางพันธุกรรมของ <i>Simulium angulistylum</i><br>ในระดับอนุพันธุศาสตร์และวิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ (phylogeography) | 34 |
| <br>                                                                                                                                      |    |
| 4. สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา                                                                                                               | 38 |
| 4.1 การระบุตำแหน่งของยีน <i>hsp70</i> บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำ<br>และหนอนแดง                                                         | 38 |
| 4.2 การระบุตำแหน่งของยีน 18S rRNA บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำ<br>และหนอนแดง                                                             | 39 |

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3 แผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม RAPD บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรืนดำ                                     | 39        |
| 4.4 เซลล์พันธุศาสตร์และวิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ของแมลงรืนดำ<br><i>Simulium angulistylum</i> | 40        |
| 4.5 สรุปผลการศึกษา                                                                                    | 41        |
| 4.6 ข้อเสนอแนะ                                                                                        | 42        |
| <b>เอกสารอ้างอิง</b>                                                                                  | <b>43</b> |
| <b>Output จากโครงการวิจัย</b>                                                                         | <b>46</b> |
| <b>ภาคผนวก</b>                                                                                        | <b>48</b> |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่   |                                                                                                                         | หน้า |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 1 | ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR ของยีน <i>hsp70</i> , <i>sxl</i> , 18S rRNA และ RAPD             | 2    |
| ตารางที่ 2 | ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hsp70</i> ของหนอนแดง <i>Chironomus circumdatus</i> เปรียบเทียบกับแมลงชนิดต่างๆ | 7    |
| ตารางที่ 3 | ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>hsp70</i> ในหนอนแดง <i>Chironomus circumdatus</i> เปรียบเทียบกับแมลงชนิดอื่นๆ     | 9    |
| ตารางที่ 4 | รายละเอียดของประชากรที่ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ <i>Simulium angulistylum</i> ในประเทศไทย                       | 33   |
| ตารางที่ 5 | ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงรืนดำ <i>Simulium angulistylum</i> ในประเทศไทย                                           | 34   |
| ตารางที่ 6 | ค่า $F_{ST}$ ระหว่างประชากรของ <i>Simulium angulistylum</i> ในประเทศไทย                                                 | 37   |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | หน้า |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 1  | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hsp70</i> ในหนอนแดง <i>Chironomus circumdatus</i> ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ DNA probe ในการทำ Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization ในแมลงรึ้นดำ และหนอนแดง                                                                                                                                                  | 5    |
| ภาพที่ 2  | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hsp70</i> ในหนอนแดง <i>Chironomus circumdatus</i> ที่ใช้สำหรับการทำ DNA probe ในการศึกษา Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงชนิดอื่นๆ                                                                                                                               | 6    |
| ภาพที่ 3  | ลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>hsp70</i> ในหนอนแดง <i>Chironomus circumdatus</i> เปรียบเทียบกับแมลงชนิดอื่นๆ                                                                                                                                                                                                                                       | 8    |
| ภาพที่ 4  | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i> และ <i>S. fenestratum</i>                                                                                                                                                                                                                   | 10   |
| ภาพที่ 5  | โพลีทีนโครโมโซมของแมลงหนอนแดง <i>Chironomus circumdatus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 11   |
| ภาพที่ 6  | โพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium aureohirtum</i><br>(NO, nucleolar organizer; BR, Balbiani Ring)                                                                                                                                                                                                                                    | 12   |
| ภาพที่ 7  | โพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium siamense</i><br>(NO, nucleolar organizer; BR, Balbiani Ring)                                                                                                                                                                                                                                       | 13   |
| ภาพที่ 8  | โพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium fenestratum</i><br>(NO, nucleolar organizer; BR, Balbiani Ring)                                                                                                                                                                                                                                    | 14   |
| ภาพที่ 9  | โพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium angulistylum</i><br>(NO, nucleolar organizer; BR, Balbiani Ring)                                                                                                                                                                                                                                   | 15   |
| ภาพที่ 10 | Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของ หนอนแดง <i>C. circumdatus</i> (A) โครโมโซมแขน A และแขน E ที่ย้อมด้วยสี DAPI (B) ตำแหน่งของ DNA probe ของยีน <i>hsp70</i> บนโครโมโซมแขน A ของ <i>C. circumdatus</i> (C) ตำแหน่งของ DNA probe ของยีน <i>hsp70</i> บนโครโมโซมแขน A ของ <i>C. riparius</i> (Morales et al. 2011) | 17   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่    |                                                                                                                                                                                                                             | หน้า |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 11 | Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำ <i>Simulium aureohirtum</i> DNA probe ของยีน <i>hsp70</i> hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแท่งที่ 2 แขนข้างยาว (IIL)                                   | 18   |
| ภาพที่ 12 | Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำ <i>Simulium aureohirtum</i> DNA probe ของยีน 18S rRNA hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างยาว (IL) บริเวณตำแหน่ง nucleolar organizer (NO) | 19   |
| ภาพที่ 13 | Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของหนอนแดง <i>Chironomus circumdatus</i> DNA probe ของยีน 18S rRNA hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแท่ง G บริเวณตำแหน่ง nucleolar organizer (NO)                     | 20   |
| ภาพที่ 14 | ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 (TK, <i>Simulium takense</i> ; FN, <i>Simulium fenestratum</i> ; AG, <i>Simulium angulistylum</i> ; SM, <i>Simulium siamense</i> ; M, 100 bp DNA ladder)                    | 21   |
| ภาพที่ 15 | ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA03 (TK, <i>Simulium takense</i> ; FN, <i>Simulium fenestratum</i> ; AG, <i>Simulium angulistylum</i> ; SM, <i>Simulium siamense</i> ; M, 100 bp DNA ladder)                    | 21   |
| ภาพที่ 16 | ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA04 (TK, <i>Simulium takense</i> ; FN, <i>Simulium fenestratum</i> ; AG, <i>Simulium angulistylum</i> ; SM, <i>Simulium siamense</i> ; M, 100 bp DNA ladder)                    | 22   |
| ภาพที่ 17 | ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA07 (TK, <i>Simulium takense</i> ; FN, <i>Simulium fenestratum</i> ; AG, <i>Simulium angulistylum</i> ; SM, <i>Simulium siamense</i> ; M, 100 bp DNA ladder)                    | 22   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | หน้า |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 18 | ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPN03 (TK, <i>Simulium takense</i> ; FN, <i>Simulium fenestratum</i> ; AG, <i>Simulium angulistylum</i> ; SM, <i>Simulium siamense</i> ; M, 100 bp DNA ladder)                                                                                                                         | 23   |
| ภาพที่ 19 | Fluorescence In Situ Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium aureohirtum</i> DNA probe สังเคราะห์จาก RAPD ขนาด 400 bp ของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium angulistylum</i> ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ OPA02 DNA probe hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างยาว (IL)                                       | 24   |
| ภาพที่ 20 | Fluorescence In Situ Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium fenestratum</i> DNA probe สังเคราะห์จาก RAPD ขนาด 400 bp ของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium angulistylum</i> ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ OPA02                                                                                                       | 25   |
| ภาพที่ 21 | Fluorescence In Situ Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium fenestratum</i> DNA probe สังเคราะห์จาก RAPD ขนาด 900 bp ของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium takense</i> ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ OPA02                                                                                                            | 26   |
| ภาพที่ 22 | โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างสั้น (IS) ของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium angulistylum</i> ในประเทศไทย การแบ่งส่วนโครโมโซมแบ่งตามแผนที่มาตรฐานของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ <i>S. ceylonicum</i> (Jitklang et al. 2008) NO, nucleolar organizer                                                                                                   | 27   |
| ภาพที่ 23 | โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างยาว (IL) ของแมลงรึ้นดำ <i>Simulium angulistylum</i> ในประเทศไทย ตำแหน่งของอินเวอร์ชัน IL- <i>ceylonicum</i> และ IL- <i>ceylonicum,siamense</i> แสดงบนโครโมโซมคือตำแหน่งของอินเวอร์ชันที่แตกต่างระหว่าง <i>S. angulistylum</i> กับกลุ่มสปีชีส์ <i>S. ceylonicum</i> และ <i>S. siamense</i> C, centromere | 28   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | หน้า |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 24 | โครโมโซมแท่งที่ 2 ของแมลงรืนดำ <i>Simulium angulistylum</i> ในประเทศไทย ตำแหน่งของอินเวอร์ชันแสดงบนโครโมโซม อินเวอร์ชันที่มีความถี่คงที่ขีดเส้นใต้ชื่อ อินเวอร์ชันที่มีความถี่ไม่คงที่ไม่ขีดเส้นใต้ชื่อ อินเวอร์ชัน IIS-ceyloanicum, siamense และ IIL-ceyloanicum, siamense เป็นอินเวอร์ชันซับซ้อนที่แตกต่างระหว่าง <i>S. angulistylum</i> เปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานโครโมโซมของ <i>S. siamense</i> และกลุ่มสปีชีส์ <i>S. ceyloanicum</i> BR, ring of Balbiani; db, double bubble; jg, jagged group; PB, parabalbiani | 30   |
| ภาพที่ 25 | โครโมโซมแท่งที่ 3 ของแมลงรืนดำ <i>Simulium angulistylum</i> ตำแหน่งของอินเวอร์ชันแสดงบนโครโมโซม อินเวอร์ชันที่มีความถี่คงที่ขีดเส้นใต้ชื่อ อินเวอร์ชันที่มีความถี่ไม่คงที่ไม่ขีดเส้นใต้ชื่อ อินเวอร์ชัน IIIS-asakoe, IIIL-asakoe เป็นอินเวอร์ชันซับซ้อนที่แตกต่างระหว่าง <i>S. angulistylum</i> เปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานโครโมโซมของ <i>S. asakoe</i> และ IILL- siamense เป็นอินเวอร์ชันซับซ้อนที่แตกต่างระหว่าง <i>S. angulistylum</i> เปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานโครโมโซมของ <i>S. siamense</i> BI, blister marker | 31   |
| ภาพที่ 26 | การกระจายทางภูมิศาสตร์ของ cytoforms ของ <i>Simulium angulistylum</i> ในประเทศไทย รายละเอียดของแต่ละประชากรแสดงในตารางที่ 4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 32   |
| ภาพที่ 27 | สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ของแมลงรืนดำ <i>Simulium angulistylum</i> ในประเทศไทย จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Median Joining network โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 586 bp จำนวน 42 ตัวอย่าง (a) การกำหนดสัญลักษณ์ตาม cytoform (b) กำหนดสัญลักษณ์ตามภูมิภาคของประชากร วงกลมหมายถึง แอฟโฟลไทป์ ขนาดของวงกลมสัมพันธ์กับจำนวนตัวอย่างของ แอฟโฟลไทป์                                                                                                                                                    | 36   |

## 1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* และ *sxl* บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำในประเทศไทย

1.2 เพื่อสร้างแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำในประเทศไทย

## 2. วิธีการศึกษา

### 2.1 การเก็บตัวอย่างแมลงวันดำ

สำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ของวันดำตามแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ จับตัวอ่อนโดยใช้ปากคีบเล็กคีบตัวอ่อนที่เกาะตามก้อนหิน เศษวัตถุต่างๆรวมทั้งพืชและใบไม้ที่ลอยในน้ำไหล วางตัวอ่อนในจานที่รองด้วยกระดาษทิชชูเพื่อซับน้ำให้แห้ง แบ่งตัวอ่อนที่ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ตัวอ่อนกลุ่มที่หนึ่งดองใน Carnoy's fixative (3 ส่วน absolute ethanol: 1 ส่วน glacial acetic acid) สำหรับศึกษาโพลีทีนโครโมโซม ส่วนตัวอ่อนกลุ่มที่ 2 ใส่ลงใน 80% ethanol สำหรับศึกษาสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ยังเก็บตัวดักแด้ที่เกาะบนใบและลำต้นของพืชน้ำและเศษวัสดุต่างๆด้วย สำหรับตัวดักแด้นั้นจะแยกแต่ละตัวใส่ในหลอดแก้วที่กั้นหลอดด้วยสาลิซูปน้ำให้ซึมและปิดด้วยผ้าโปร่งบาง เพื่อให้ตัวดักแด้ฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัยสำหรับการศึกษาสัณฐานวิทยาต่อไป

### 2.2 การจำแนกชนิด

จำแนกชนิดของแมลงวันดำโดยใช้ keys ของ Takaoka (1979) Takaoka and Suzuki (1984) Takaoka and Davies (1995) Takaoka and Saito (1996) และ Takaoka and Choochote (2004) นอกจากนี้อาจใช้การจำแนกโดยใช้เซลล์พันธุศาสตร์โดยการเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมกับแผนที่มาตรฐานของแมลงวันดำแต่ละสปีชีส์

### 2.3 การเตรียมโพลีทีนโครโมโซม

เตรียมโครโมโซมสำหรับการศึกษา In situ hybridization ตามวิธีการของ Boakye et al. (2000) เลือกตัวอ่อนแมลงวันดำที่ดองในน้ำยารักษาสภาพ Carnoy's fixative (3:1, 95% ethanol: glacial acetic acid) ระยะ penultimate larva ซึ่งสังเกตจากการมี gill histoblast สีขาวเพื่อใช้ในการเตรียมโพลีทีนโครโมโซม ผ่าส่วน abdomen โดยใช้เข็มเขี่ยเพื่อนำต่อมน้ำลาย (salivary gland) ออกมาวางบนสไลด์จากนั้นหยด 50% propionic acid ลงบนต่อมน้ำลาย ทิ้งไว้นาน 5 นาที ใช้กระจกปิดสไลด์ที่เคลือบซิลิโคน (siliconized cover slip) ปิดทับและ squash

อุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 1-2 นาที เก็บสไลด์ที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำสไลด์แช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นแกะกระจกปิดสไลด์ออก แช่สไลด์ใน 50% ethanol ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง และ 70% ethanol ที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แช่สไลด์ใน 90% ethanol นาน 5 นาที และ 100% ethanol นาน 5 นาที ทั้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้ในการทำ in situ hybridization

## 2.4 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chian Reaction, PCR) และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนซึ่งเก็บรักษาใน Carnoy's fixative ตามวิธีการของ Pramual et al., (2005) จากตัวอย่างแมลงวันดำ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Simulium aureohirrtum*, *S. angulistylum*, *S. fenestratum* และ *S. siamense* และ แมลงชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Chironomus circumdatus*, *Bombyx mori* และ *Drosophila melanogaster* โดยใช้ Genomic DNA extraction mini kit (RBC BioScience, Taiwan) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ของยีน *hsp70*, *sxl*, 18S rRNA และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแต่ละยีนดังแสดงในตารางที่ 1 ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยใช้ 1.5% Agarose gel ซึ่งย้อมด้วย Ethidium bromide และตรวจสอบภายใต้แสง UV เปรียบเทียบขนาดของผลผลิต PCR โดยใช้ 100 bp ladder (Invitrogen) ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC BIOSCIENCE, ประเทศไทย) วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen Inc. (กรุงโซล ประเทศเกาหลีใต้) โดยใช้ไพรเมอร์เดียวกับที่ใช้ในกระบวนการ PCR

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR ของยีน *hsp70*, *sxl*, 18S rRNA และ RAPD

| Gene     | Primer                   | Sequence (5'→3')                                | Annealing temperature (°C) | Reference             |
|----------|--------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| HSP70    | HSP70Chi-F<br>HSP70Chi-R | AAGAATCAAATTCATGATGTCGTTCTTGCTTGCATGGAATT CGAG  | 56                         | Yoshimi et al. (2009) |
| Sxl      | Sxl-1<br>Sxl-2           | AAYTAYYTICCCICARGAYATG<br>DATIGCYTCYTGIGCYTCYTC | 55                         | Niimi et al. (2006)   |
| 18S rRNA | 18s/sd50<br>5.8s/sd30    | TGGTGCATGGCCGTTCTTAG<br>GTCGATGTTTCATGTGTCCTGC  | 60                         | Simon et al. (1994)   |

| Gene | Primer | Sequence (5'→3') | Annealing temperature (°C) | Reference |
|------|--------|------------------|----------------------------|-----------|
| RAPD | OPA02  | TGCCGAGCTG       | 37                         | -         |
| RAPD | OPA03  | AGTCAGCCAC       | 37                         | -         |
| RAPD | OPA04  | AATCGGGCTG       | 37                         | -         |
| RAPD | OPA07  | GAAACGGGTG       | 37                         | -         |
| RAPD | OPN03  | GGTACTCCCC       | 37                         | -         |

## 2.5 การเตรียม DNA probe

ผลผลิต PCR ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC BIOSCIENCE, Taiwan) นำมาเตรียม DNA probe ด้วยกระบวนการ Nick Translation โดยใช้ FISH Tag DNA Kit (Invitrogen, UK) ตามวิธีการที่แนะนำในคู่มือโดยบริษัท Invitrogen

## 2.6 *In situ* hybridization

เตรียมสไลด์โพลีทีนโครโมโซมตามวิธีการของ Phillips et al. (1994) แยกส่วนตอม น้ำลายของตัวอ่อนรีนดำและหยอดลงในน้ำยารักษาสภาพ (1: 2: 3, lactic acid: distilled water: glacial acetic acid) ย้ายตอมน้ำลายที่มีโพลีทีนโครโมโซมใส่ลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ ที่มีน้ำยารักษาสภาพประมาณ 1 – 2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 2 – 3 นาที จากนั้นใช้สไลด์ที่สะอาด ปิดทับลงบนกระจกปิดสไลด์ที่มีตอมน้ำลาย กลับด้าน แล้วใช้นิ้วกดเพื่อให้โครโมโซมกระจาย ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าโครโมโซมกระจายไม่ดี ใช้ปลายของเข็มเขี่ยชุดเบาๆ บนกระจกปิดสไลด์เพื่อช่วยให้โครโมโซมกระจายดีขึ้น นำสไลด์แช่ในไนโตรเจนเหลวประมาณ 2 – 3 วินาที จากนั้นใช้ใบมีดโกนแกะกระจกปิดสไลด์ออก นำสไลด์ไปใช้ในกระบวนการ hybridization ตามวิธีการของ Procunier et al. (2005) และตามวิธีการที่แนะนำในคู่มือการ hybridization DNA probe โดยบริษัท Invitrogen ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้ สไลด์โพลีทีนโครโมโซมแช่ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 30 นาที ตามด้วยการ dehydration ด้วย 70% ethanol และ 90% ethanol ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แช่สไลด์ใน 0.5 M NaOH/2X SSC นาน 4 นาทีเพื่อทำให้ดีเอ็นเอในโพลีทีนโครโมโซมเสียสภาพ (denature) ล้างสไลด์ใน 2X SSC ตามด้วยกระบวนการ dehydration ใน 70% ethanol และ 90% ethanol ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หยด DNA probe ปริมาตร 20 µl บนสไลด์โพลีทีนโครโมโซมที่เตรียมไว้ นำสไลด์ใส่ใน petri dish ที่รองด้วยกระดาษกรองที่ชุ่มน้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มืด นาน 12 ชั่วโมง แช่สไลด์ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 นาที และใน 0.4x SSC ที่อุณหภูมิ 73 °C นาน 2 – 3 วินาที แช่สไลด์ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที จุ่มสไลด์ใน

น้ำกลั่นทันที แล้วนำไปตากให้แห้งในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้อมสไลด์โดยใช้สี DAPI ความเข้มข้น 20 ng/ml โดยหยดสี DAPI ลงบนสไลด์บริเวณที่มีโครโมโซมแล้วทิ้งไว้ให้ 5 นาที จากนั้นหยด SlowFade Gold 1 หยด ลงบนสไลด์ ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วนำโครโมโซมไปตรวจสอบตำแหน่งของ DNA probe บนโพลีทีนโครโมโซม โดยเปรียบเทียบตำแหน่งของ DNA probe กับแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมที่จัดทำไว้แล้ว ถ่ายภาพและระบุตำแหน่งของยีนและตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำแต่ละสปีชีส์

## 2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบตำแหน่งของยีน *hsp70*, 18S rRNA และตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD ในแมลงวันดำแต่ละชนิดบนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซม วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครโมโซมจากแต่ละสปีชีส์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตำแหน่งของยีนและตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD กับการเกิดอินเวอร์ชันที่ระบุไว้บนแผนที่มาตรฐานโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำแต่ละสปีชีส์

## 3. ผลการศึกษา

### 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70*, และ 18S rRNA

ยีน *hsp70* สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ผลผลิต PCR ขนาด 244 bp โดยใช้ไพรเมอร์ HSP70Chi-F และ HSP70Chi-R ซึ่งไพรเมอร์นี้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้เฉพาะในตัวอย่างของแมลงหนอนแดง (Chi1, Chi2) เท่านั้น ไพรเมอร์อื่นๆ แม้จะสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอื่นที่ไม่ใช่ยีน *hsp70* เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ในแมลงหนอนแดง *C. circumdatus* มาทำการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดมหาสารคามมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกตำแหน่ง (ภาพที่ 1)

|               |                                                               |     |
|---------------|---------------------------------------------------------------|-----|
| Chi2-HSPChi-F | TCCAAAGATCCAAAAAATGCTTCAAGATTCTTCTGTGGCAAGAGTTTGAACCTTCTCAAT  | 60  |
| Chi1-HSPChi-F | TCCAAAGATCCAAAAAATGCTTCAAGATTCTTCTGTGGCAAGAGTTTGAACCTTCTCAAT  | 60  |
| Chi2-HSPChi-F | TAATCCAGATGAAGCAGTTGCATATGGTGCAGCAGTTCAAGCAGCCATTCTTACTGGTGA  | 120 |
| Chi1-HSPChi-F | TAATCCAGATGAAGCAGTTGCATATGGTGCAGCAGTTCAAGCAGCCATTCTTACTGGTGA  | 120 |
| Chi2-HSPChi-F | TAGCAGCTCAACAATCCAAGATGTCTTACTTGTGATGTTACACCATTATCATTGGGTAT   | 180 |
| Chi1-HSPChi-F | TAGCAGCTCAACAATCCAAGATGTCTTACTTGTGATGTTACACCATTATCATTGGGTAT   | 180 |
| Chi2-HSPChi-F | TGAAACAGCTGGTGGTGTAAATGACAAAACCTATTGAAAGAAATACTCGAATTCCATGCAA | 240 |
| Chi1-HSPChi-F | TGAAACAGCTGGTGGTGTAAATGACAAAACCTATTGAAAGAAATACTCGAATTCCATGCAA | 240 |
| Chi2-HSPChi-F | GCAA                                                          | 244 |
| Chi1-HSPChi-F | GCAA                                                          | 244 |

**ภาพที่ 1** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ในหนอนแดง *Chironomus circumdatus* ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ DNA probe ในการทำ Fluorescence *In Situ* Hybridization ในแมลงรึ้นดำและหนอนแดง

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ของ *C. circumdatus* กับแมลงชนิดอื่นๆ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ของ *C. circumdatus* มีความคล้ายคลึงกับ *C. yoshimatsui* มากที่สุด โดยมีความแตกต่างกัน 3.3% และมีความแตกต่างจาก *Ades aegypti* มากที่สุดคือ 26.6% (ภาพที่ 2 และตารางที่ 2)

```

Chironomus circumdatus1  TCCAAAGATCCAAAAATGCTTCAAGATTTCTTCTGTGGCAAGAGTTTGAACCTTCTCAAT 60
Chironomus circumdatus2  TCCAAAGATCCAAAAATGCTTCAAGATTTCTTCTGTGGCAAGAGTTTGAACCTTCTCAAT 60
Chironomus yoshimatsui   TCCAAAGATTCAAAAAATGCTTCAAGATTTCTTCTGTGGCAAAAGTTTGAATTTGTCAAT 60
Chironomus riparius      TCCAAAGATTCAAAAAATGCTTCAAGATTTCTTCTGTGGCAAAAGCTTGAACCTTTTCAAT 60
Chironomus tentans       CCCAAAGATCCAGAAAAATGCTTCAAGATTTCTTCTGTGGCAAGAGCTTGAATTTCTCAAT 60
Apis mellifera            TCCTAAGATTCAAAAACTTCTGCAAGACTTCTTCAATGGAAAGGAATTGAATAAATCTAT 60
Bactrocera oleae          TCCAAAGATTGAGAGTCTACTACAGTCGTTCTTCTGTGGCAAAAGTCTGAATCTTTCAAT 60
Ades aegypti              TCCAAAGTACAAACTCTGCTGCAGAACTTCTTCTGTGGAAATCGCTGAATCTATCAAT 60
                          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Chironomus circumdatus1  TAATCCAGATGAAGCAGTTGCATATGGTGCAGCAGTTCAAGCAGCCATTCTTACTGGTGA 120
Chironomus circumdatus2  TAATCCAGATGAAGCAGTTGCATATGGTGCAGCAGTTCAAGCAGCCATTCTTACTGGTGA 120
Chironomus yoshimatsui   TAATCCAGATGAAGCAGTTGCATATGGTGCAGCAGTACAAGCAGCAATTCTTACTGGTGA 120
Chironomus riparius      TAATCCAGATGAAGCAGTTGCATATGGAGCGGCAGTTCAAGCAGCTATTCTAACCGGTGA 120
Chironomus tentans       TAATCCAGATGAGGCAGTTGCCTATGGAGCAGCAGTTCAAGCAGCTATTCTCACTGGTGA 120
Apis mellifera            CAATCCTGATGAGGCTGTGGCATATGGAGCTGCTGTGCAAGCTGCCATTCTTCATGGTGA 120
Bactrocera oleae          CAATCCGGATGAGGCAGTGGCATATGGTGCAGCCGTCGAAGCTGCTATTCTAAGTGGTGA 120
Ades aegypti              CAACCCAGATGAAGCAGTGGCATACGGTGCAGCAATTCAAGCGGCCCTCACTGAGCGAGA 120
                          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Chironomus circumdatus1  TAGCAGCTCAACAATCCAAGATGTCTTACTTGTGATGTTACACCATTATCATTGGGTAT 180
Chironomus circumdatus2  TAGCAGCTCAACAATCCAAGATGTCTTACTTGTGATGTTACACCATTATCATTGGGTAT 180
Chironomus yoshimatsui   TAGCAGCTCAACAATCCAAGATGTCTTACTTGTGATGTTACACCATTATCATTGGGTAT 180
Chironomus riparius      TAGTAGCTCAACAATCCAAGATGTTTACTTGTGATGTGACGCCATTATCATTGGGAAT 180
Chironomus tentans       TAGCAGCTCAACAATCCAAGATGTTTACTTGTGGATGTTACTCCATTATCATTGGGCAT 180
Apis mellifera            TAAATCTGAAGAAGTACAAGATCTATTACTTCTTGATGTAACACCTCTATCTCTGGTAT 180
Bactrocera oleae          CAAGAGCAGTGAAATTCAAGATGTGCTATTGGTGCAGCTAGCACCATTGTCCTTAGGTAT 180
Ades aegypti              CAAGGACGAGAAGATTCAAGACGTTCTACTGGTTGATGTGGCTCCACTCTCACTGGGCAT 180
                          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Chironomus circumdatus1  TGAAACAGCTGGTGGTGAATGACAAAACTTATTGAAAGAAATACTCGAATTCATGCAA 240
Chironomus circumdatus2  TGAAACAGCTGGTGGTGAATGACAAAACTTATTGAAAGAAATACTCGAATTCATGCAA 240
Chironomus yoshimatsui   TGAAACAGCTGGTGGTGCATGACAAAACTTATTGAAAGAAATTCTCGAATTCATGCAA 240
Chironomus riparius      TGAAACAGCTGGTGGAGTCATGACAAAACTTATTGAAAGAAATGCTCGAATTCATGCAA 240
Chironomus tentans       TGAAACAGCTGGTGGTGCATGACAAAACTCATCGAGAGAAATGCTCGAATTCCTTGCAA 240
Apis mellifera            TGAAACTGCTGGTGGTGTATGACTGCTCTTATTAAGAGAAATACTACCATTCACACAAA 240
Bactrocera oleae          CGAAACAGCTGGTGGTGTATGGCGAAAATTGTTGAACGAAATTGCCGAATTCATGCAA 240
Ades aegypti              TGAGACAGCTGGAGGAGTCATGACCAAACTGATTGACCGCAATACCAGAATCCCGTGCAA 240
                          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Chi2-HSPChi-F           GCAA 244
Chironomus circumdatus2  GCAA 244
Chironomus yoshimatsui   GCAA 244
Chironomus riparius      GCAA 244
Chironomus tentans       GCAA 244
Apis mellifera            GCAA 244
Bactrocera oleae          ACAA 244
Ades aegypti              GCAA 244
                          ***

```

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ในหนอนแดง *Chironomus circumdatus* ที่ใช้สำหรับการทำ DNA probe ในการศึกษา Fluorescence In Situ Hybridization เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 2 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ของหนอนแดง *Chironomus circumdatus* เปรียบเทียบกับแมลงชนิดต่างๆ

| Species                 | <i>C. circumdatus</i> 1 | <i>C. circumdatus</i> 2 | <i>C. yoshimatsui</i> | <i>C. riparius</i> | <i>C. tentans</i> | <i>Apis mellifera</i> | <i>Bactocera oleae</i> | <i>Ades aegypti</i> |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|
| <i>C. circumdatus</i> 1 |                         |                         |                       |                    |                   |                       |                        |                     |
| <i>C. circumdatus</i> 2 | 0.000                   |                         |                       |                    |                   |                       |                        |                     |
| <i>C. yoshimatsui</i>   | 0.033                   | 0.033                   |                       |                    |                   |                       |                        |                     |
| <i>C. riparius</i>      | 0.078                   | 0.078                   | 0.074                 |                    |                   |                       |                        |                     |
| <i>C. tentans</i>       | 0.082                   | 0.082                   | 0.090                 | 0.090              |                   |                       |                        |                     |
| <i>Apis mellifera</i>   | 0.258                   | 0.258                   | 0.262                 | 0.287              | 0.291             |                       |                        |                     |
| <i>Bactocera oleae</i>  | 0.246                   | 0.246                   | 0.230                 | 0.254              | 0.266             | 0.336                 |                        |                     |
| <i>Ades aegypti</i>     | 0.266                   | 0.266                   | 0.266                 | 0.266              | 0.275             | 0.336                 | 0.266                  |                     |

การแปลรหัสกรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ *C. circumdatus* มีความคล้ายคลึงกับแมลงหนอนแดง *C. tentans* มากที่สุด โดยมีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน 1% และลำดับกรดอะมิโนของ *C. circumdatus* มีความแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของ *Apis mellifera* มากที่สุดเท่ากับ 18.5% (ภาพที่ 3 และตารางที่ 3)

|                        |            |             |            |            |            |            |
|------------------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| Chironomus circumdatus | PKIQKMLQDF | FCGKSLNFSI  | NPDEAVAYGA | AVQAAILTGD | SSSTIQDVLL | VDVTPLSLGI |
| Chironomus circumdatus | PKIQKMLQDF | FCGKSLNFSI  | NPDEAVAYGA | AVQAAILTGD | SSSTIQDVLL | VDVTPLSLGI |
| Chironomus yoshimatsui | PKIQKMLQDF | FCGKSLNLSI  | NPDEAVAYGA | AVQAAILTGD | SSSTIQDVLL | VDVTPLSLGI |
| Chironomus riparius    | PKIQKMLQDF | FSGKSLNFSI  | NPDEAVAYGA | AVQAAILTGD | SSSTIQDVLL | VDVTPLSLGI |
| Chironomus tentans     | PKIQKMLQDF | FCGKSLNFSI  | NPDEAVAYGA | AVQAAILTGD | SSSTIQDVLL | VDVTPLSLGI |
| Apis mellifera         | PKIQKLLQDF | FNGKELNLSI  | NPDEAVAYGA | AVQAAILHGD | KSEEVQDILL | LDVTPLSLGI |
| Bactrocera oleae       | PKVQSLQSF  | FCGKSLNLSI  | NPDEAVAYGA | AVQAAILSGD | KSEIQDVLL  | VDVAPLSLGI |
| Ades aegypti           | PKVQTLLQNF | FCGKSLNLSI  | NPDEAVAYGA | AIQAAILSGD | KDEKIQDVLL | VDVAPLSLGI |
|                        | ** *       | ** *        | ** *       | ** *       | ** *       | ** *       |
| Chironomus circumdatus | ETAGGVMTKL | IERNTRIPCK  | Q          |            |            |            |
| Chironomus circumdatus | ETAGGVMTKL | IERNTRIPCK  | Q          |            |            |            |
| Chironomus yoshimatsui | ETAGGVMTKL | IERNTRIPCK  | Q          |            |            |            |
| Chironomus riparius    | ETAGGVMTKL | IERNTRIPCK  | Q          |            |            |            |
| Chironomus tentans     | ETAGGVMTKL | IERNTRIPCK  | Q          |            |            |            |
| Apis mellifera         | ETAGGVMTAL | IKRNTTIPTK  | Q          |            |            |            |
| Bactrocera oleae       | ETAGGVMAKI | VERNCRIPCK  | Q          |            |            |            |
| Ades aegypti           | ETAGGVMTKL | IDRNTTRIPCK | Q          |            |            |            |
|                        | *****      | ** *        | ** *       |            |            |            |

ภาพที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ในหนอนแดง *Chironomus circumdatus* เปรียบเทียบกับแมลงชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 3 ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ในหนอนแดง *Chironomus circumdatus* เปรียบเทียบกับแมลงชนิดอื่นๆ

| Species                 | <i>C. circumdatus</i> 1 | <i>C. circumdatus</i> 2 | <i>C. yoshimatsui</i> | <i>C. riparius</i> | <i>C. tentans</i> | <i>Apis mellifera</i> | <i>Bactocera oleae</i> | <i>Ades aegypti</i> |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|
| <i>C. circumdatus</i> 1 |                         |                         |                       |                    |                   |                       |                        |                     |
| <i>C. circumdatus</i> 2 | 0.000                   |                         |                       |                    |                   |                       |                        |                     |
| <i>C. yoshimatsui</i>   | 0.025                   | 0.025                   |                       |                    |                   |                       |                        |                     |
| <i>C. riparius</i>      | 0.025                   | 0.025                   | 0.037                 |                    |                   |                       |                        |                     |
| <i>C. tentans</i>       | 0.012                   | 0.012                   | 0.025                 | 0.012              |                   |                       |                        |                     |
| <i>Apis mellifera</i>   | 0.185                   | 0.185                   | 0.198                 | 0.198              | 0.198             |                       |                        |                     |
| <i>Bactocera oleae</i>  | 0.160                   | 0.160                   | 0.148                 | 0.173              | 0.160             | 0.247                 |                        |                     |
| <i>Ades aegypti</i>     | 0.160                   | 0.160                   | 0.160                 | 0.185              | 0.173             | 0.222                 | 0.136                  |                     |

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *sx/* ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ได้ในแมลงทุกชนิดที่ทำการศึกษานี้ อาจเกิดจากความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ ในส่วนของ ยีน 18S rRNA พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ในแมลงวันดำทั้ง 3 สปีชีส์ โดยยีน 18S rRNA ส่วนที่ทำการศึกษามีความยาวประมาณ 589 bp (ภาพที่ 4)

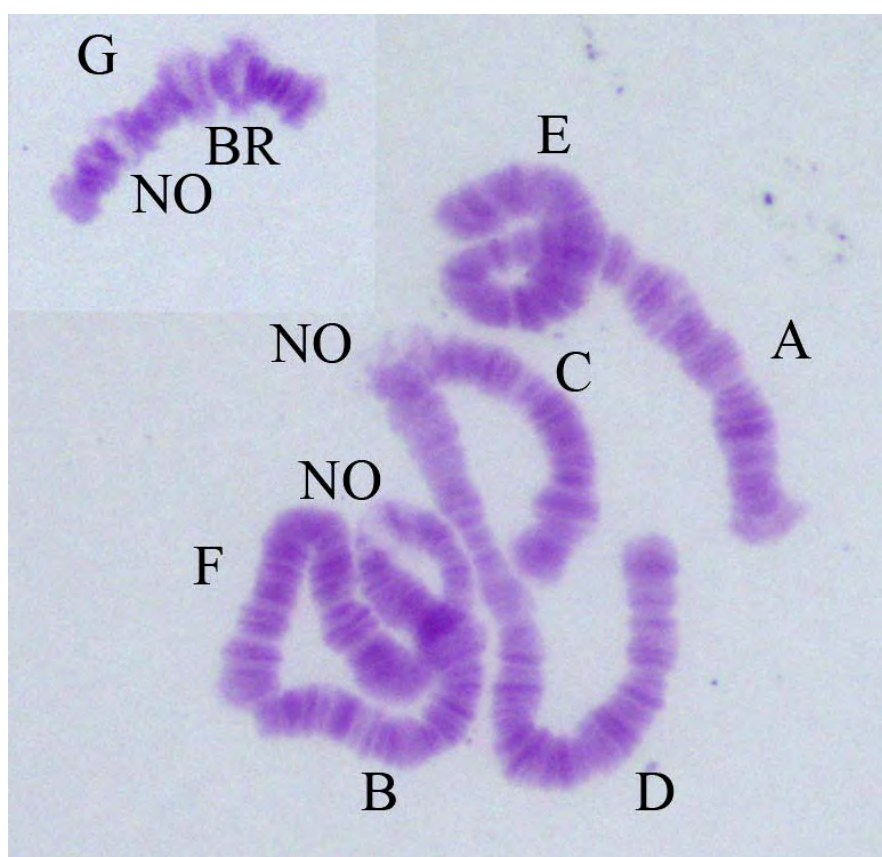
|                       |                                                                |     |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------|-----|
| <i>S. aureohirtum</i> | CGTTACGAACGTGACTCAATACATTAAGATTCTATCAGATAAGTAAACTGTTGATG       | 60  |
| <i>S. siamense</i>    | CGTTACGAACGTGACTCAATACATTAAGATTCTATCAGATAAGTAAACTGTTGATG       | 60  |
| <i>S. fenestratum</i> | CGTTACGAACGTGACTCAATACATTAAGATTCTATCAGATAAGTAAACTGTTGATG       | 60  |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | CTTGCCATATGGCTTGCCTTCGGGTTTGTCAATTGGGTGAGTGGAAGTTTACCTGATAGTTT | 120 |
| <i>S. siamense</i>    | CTTGCCATATGGCTTGCCTTCGGGTAGGTCAATTGGGTGAGTGGAAGTTTACCTGATAGTTT | 120 |
| <i>S. fenestratum</i> | CTTGCCATATGGATGCTTTCGGGTGTGTCATTGGGTGAGTGGAAGTTTACCTGATAGTTT   | 120 |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | GTCAGCTGTAAAAGGTTGACTTTGATCTGCTTAATGAGACAAATTGTGTTTAGCAAAATG   | 180 |
| <i>S. siamense</i>    | GTCAGCTGTAAAAGGTTGACTTTGATCTGCTTAATGAGACAAATTGTGTTTAGCAAAATG   | 180 |
| <i>S. fenestratum</i> | GTCAGCTGTAAAAGGTTGACTTTGATCTGCTTAATGAGACAAATTGTGTTTAGCAAAATG   | 180 |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | AGATTGAGCAATAACAGGTCCGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGTTGCACGCGCGCTACA   | 240 |
| <i>S. siamense</i>    | AGATTGAGCAATAACAGGTCCGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGTTGCACGCGCGCTACA   | 240 |
| <i>S. fenestratum</i> | AGATTGAGCAATAACAGGTCCGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGTTGCACGCGCGCTACA   | 240 |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | ATGAGACCATCAACGTGATACCTGATCTGAAAGGATTGGGAAATCACTTAAATGTGCTCT   | 300 |
| <i>S. siamense</i>    | ATGAGACCATCAACGTGATACCTGATCTGAAAGGATTGGGAAATCACTTAAATGTGCTCT   | 300 |
| <i>S. fenestratum</i> | ATGAGACCATCAACGTGATACCTGATCTGAAAGGATTGGGAAATCACTTAAATGTGCTCT   | 300 |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | TAGTTGGGATTGTGGATTGTAATTATTCACATGAACCTGGAATCCCAGTAAATGCTAGT    | 360 |
| <i>S. siamense</i>    | TAGTTGGGATTGTGGATTGTAATTATTCACATGAACCTGGAATCCCAGTAAATGCTAGT    | 360 |
| <i>S. fenestratum</i> | TAGTTGGGATTGTGGATTGTAATTATTCACATGAACCTGGAATCCCAGTAAATGCTAGT    | 360 |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | CATCAGCTAGCGTTGACTAAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTATTACCGA   | 420 |
| <i>S. siamense</i>    | CATCAGCTAGCGTTGACTAAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTATTACCGA   | 420 |
| <i>S. fenestratum</i> | CATCAGCTAGCGTTGACTAAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTATTACCGA   | 420 |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | TTGGTTATTTAGTGAGGTCTCCGGAGGTAATCGCCGAAGATAGTTAGGTATCACTAGGTT   | 480 |
| <i>S. siamense</i>    | TTGGTTATTTAGTGAGGTCTCCGGAGGTAATCGCCGAAGATAGTTAGGTATCACTAGGTT   | 480 |
| <i>S. fenestratum</i> | TTGGTTATTTAGTGAGGTCTCCGGAGGTAATCGCCGAAGATATTTAGGTATCACTAGGTT   | 480 |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | GTTTTGCCAAAGTTGACCGAACTTGATGATTGAGAGGAAATAAAAGTCGTAACAAGGTTT   | 540 |
| <i>S. siamense</i>    | GTTTTGCCAAAGTTGACCGAACTTGATGATTGAGAGGAAATAAAAGTCGTAACAAGGTTT   | 540 |
| <i>S. fenestratum</i> | GTTTTGCCAAAGTTGACCGAACTTGATGATTGAGAGGAAATAAAAGTCGTAACAAGGTTT   | 540 |
| *****                 |                                                                |     |
| <i>S. aureohirtum</i> | CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTATA---TTATTTCC-ACAAAAT          | 589 |
| <i>S. siamense</i>    | CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTATA---TTATTTCC-ACAAAAT          | 589 |
| <i>S. fenestratum</i> | CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTATA---TTTATTTCC-ACAAA-T         | 589 |
| *****                 |                                                                |     |

ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของแมลงวันดำ *Simulium aureohirtum*, *S. siamense* และ *S. fenestratum*

### 3.2 การระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* และ 18S rRNA บนโพลีทีนโครโมโซม

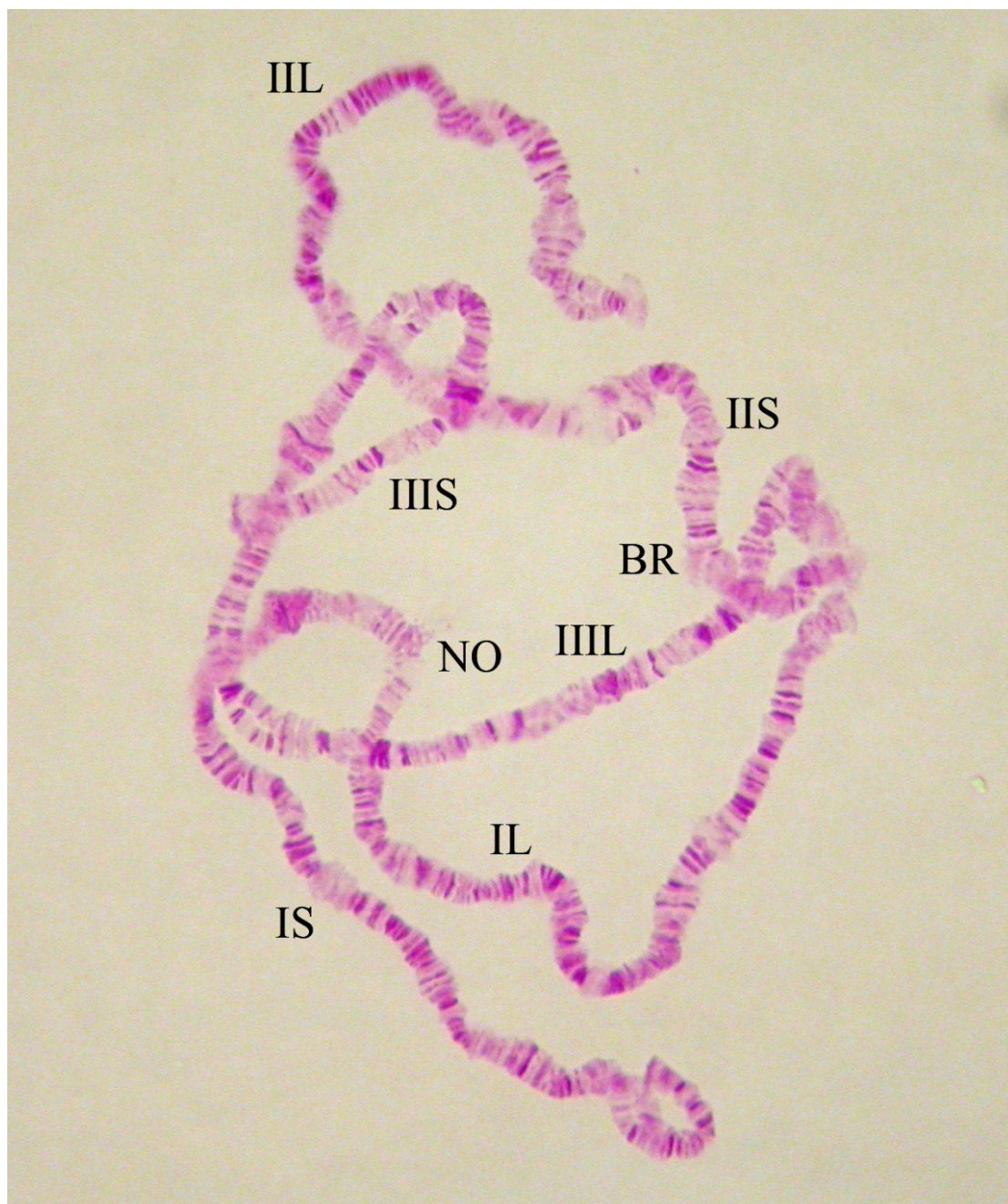
#### 3.2.1 ตำแหน่งของยีน *hsp70* บนโพลีทีนโครโมโซมของ *Chironomus circumdatus* และ *Simulium aureohirtum*

เตรียมโพลีทีนโครโมโซมของหนอนแดง *C. circumdatus* และแมลงริ้นดำ *S. aureohirtum*, *S. siamense* และ *S. fenestratum* จากต่อมน้ำลาย (salivary glands) ตามวิธีการของ Rothfels and Dunbar (1953) โดยการย้อมสี Feulgen เพื่อใช้สำหรับการสร้างแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซม แมลงหนอนแดง *C. circumdatus* มีโพลีทีนโครโมโซม 4 แท่ง แท่งที่ 1 ประกอบด้วยแขน B และ F และพบตำแหน่ง nucleolar organizer (NO) บนแขน B แท่งที่ 2 ประกอบด้วยแขน C และ D พบตำแหน่ง NO บนแขน C แท่งที่ 3 ประกอบด้วยแขน A และ E และแท่งที่ 4 แขน G พบตำแหน่ง NO และ Balbiani Ring (BR) (ภาพที่ 5)



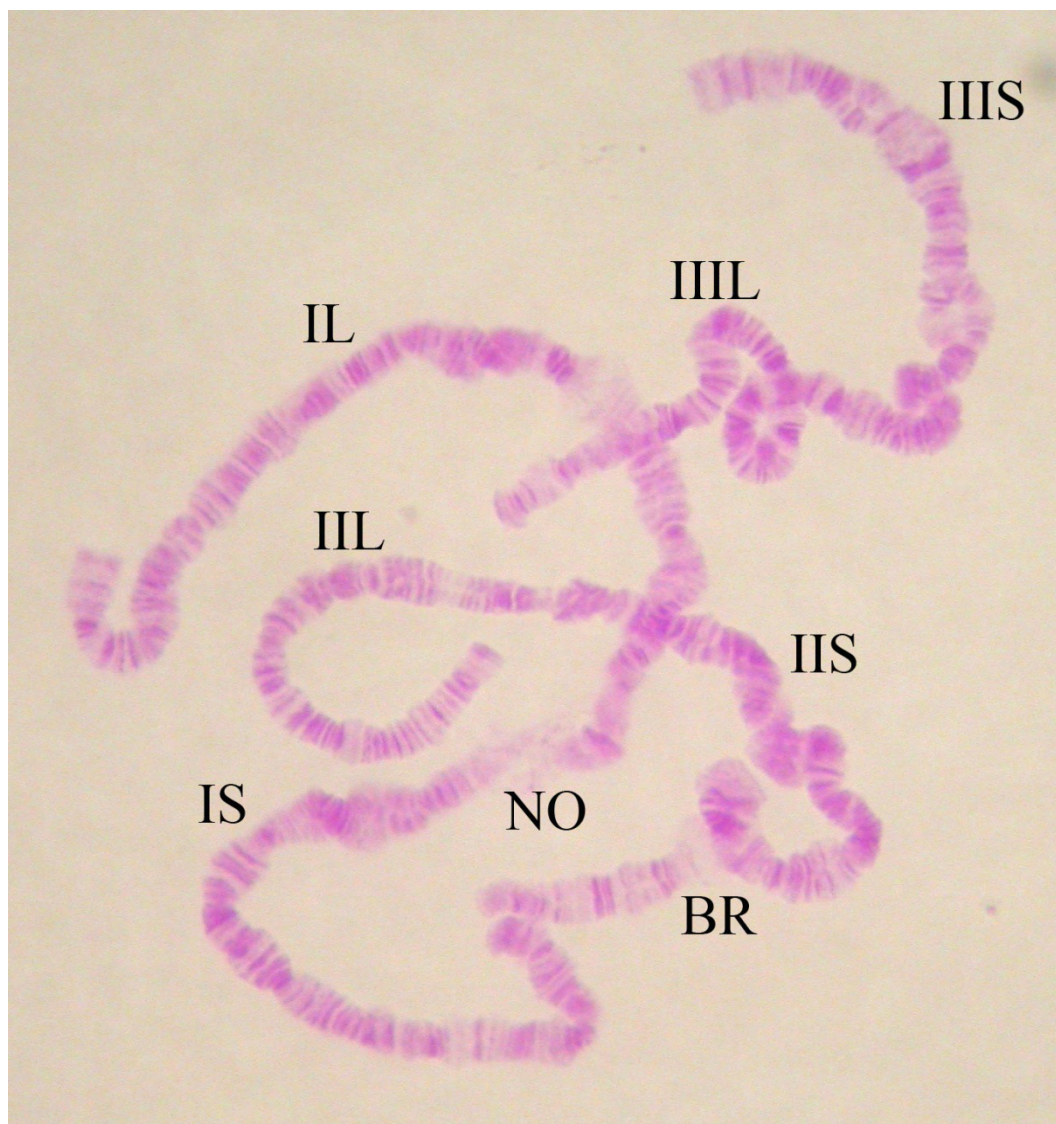
ภาพที่ 5 โพลีทีนโครโมโซมของหนอนแดง *Chironomus circumdatus*

โพลีทีนโครโมโซมของแมลงร้นดำ *S. aureohirtum* มี 3 แท่ง (ภาพที่ 6) แท่งที่ 1 มีลักษณะเป็นแบบ metacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IS) และแขนข้างยาว (IL) โดยพบ NO อยู่บนแขน IL โครโมโซมแท่งที่ 2 เป็นแบบ metacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIS) และแขนข้างยาว (IIL) พบ Balbiani Ring บนแขนข้างสั้น (IIS) โครโมโซมแท่งที่ 3 เป็นแบบ submetacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIIS) และแขนข้างยาว (IIIL)



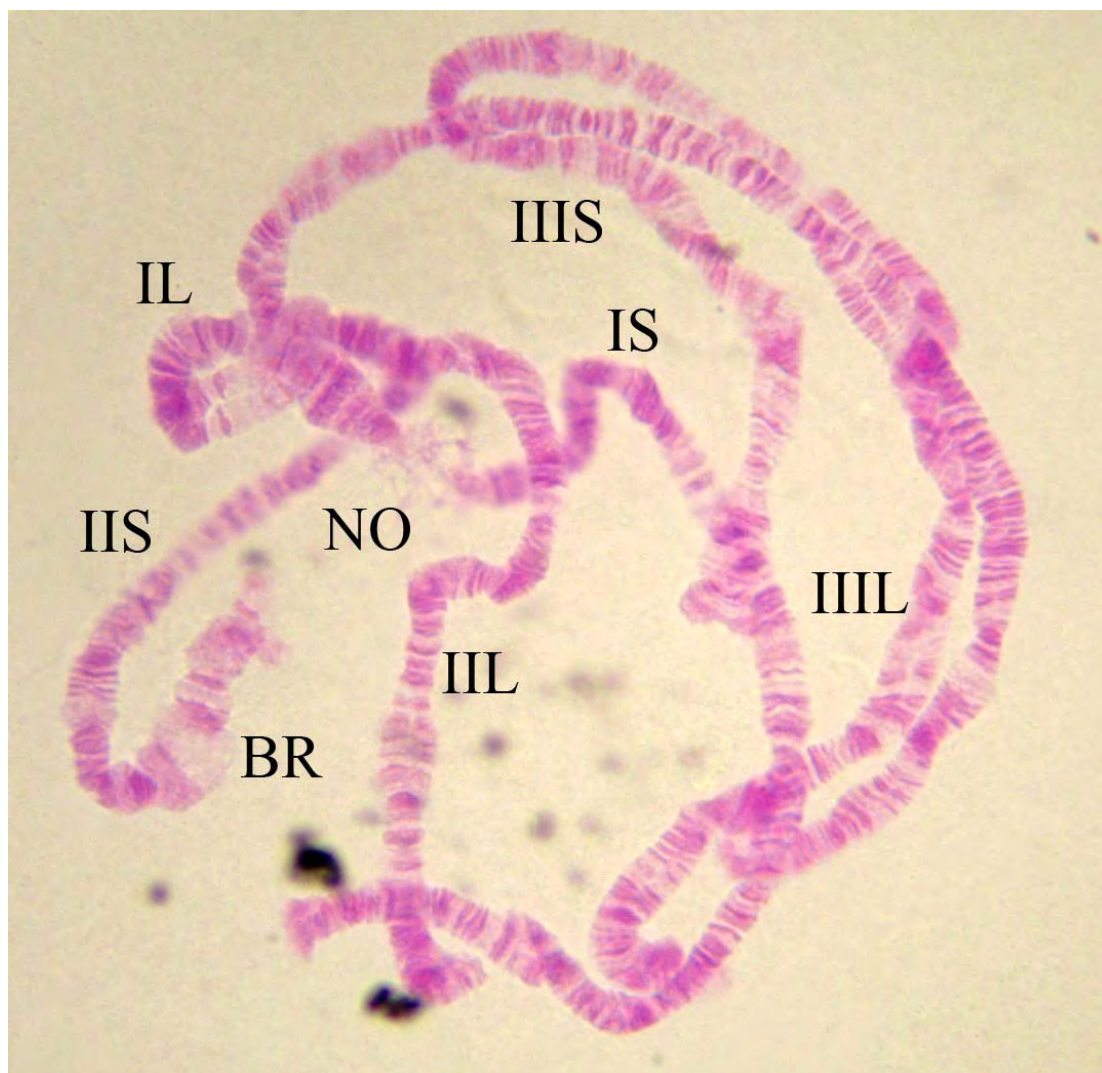
ภาพที่ 6 โพลีทีนโครโมโซมของแมลงร้นดำ *Simulium aureohirtum* (NO, nucleolar organizer; BR, Balbiani Ring)

โพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำ *S. siamense* มี 3 แท่ง (ภาพที่ 7) แท่งที่ 1 มีลักษณะเป็นแบบ metacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IS) และแขนข้างยาว (IL) โดยพบ NO อยู่บนแขน IL โครโมโซมแท่งที่ 2 เป็นแบบ metacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIS) และแขนข้างยาว (IIL) พบ Balbiani Ring บนแขนข้างสั้น (IIS) โครโมโซมแท่งที่ 3 เป็นแบบ submetacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIIS) และแขนข้างยาว (IIIL)



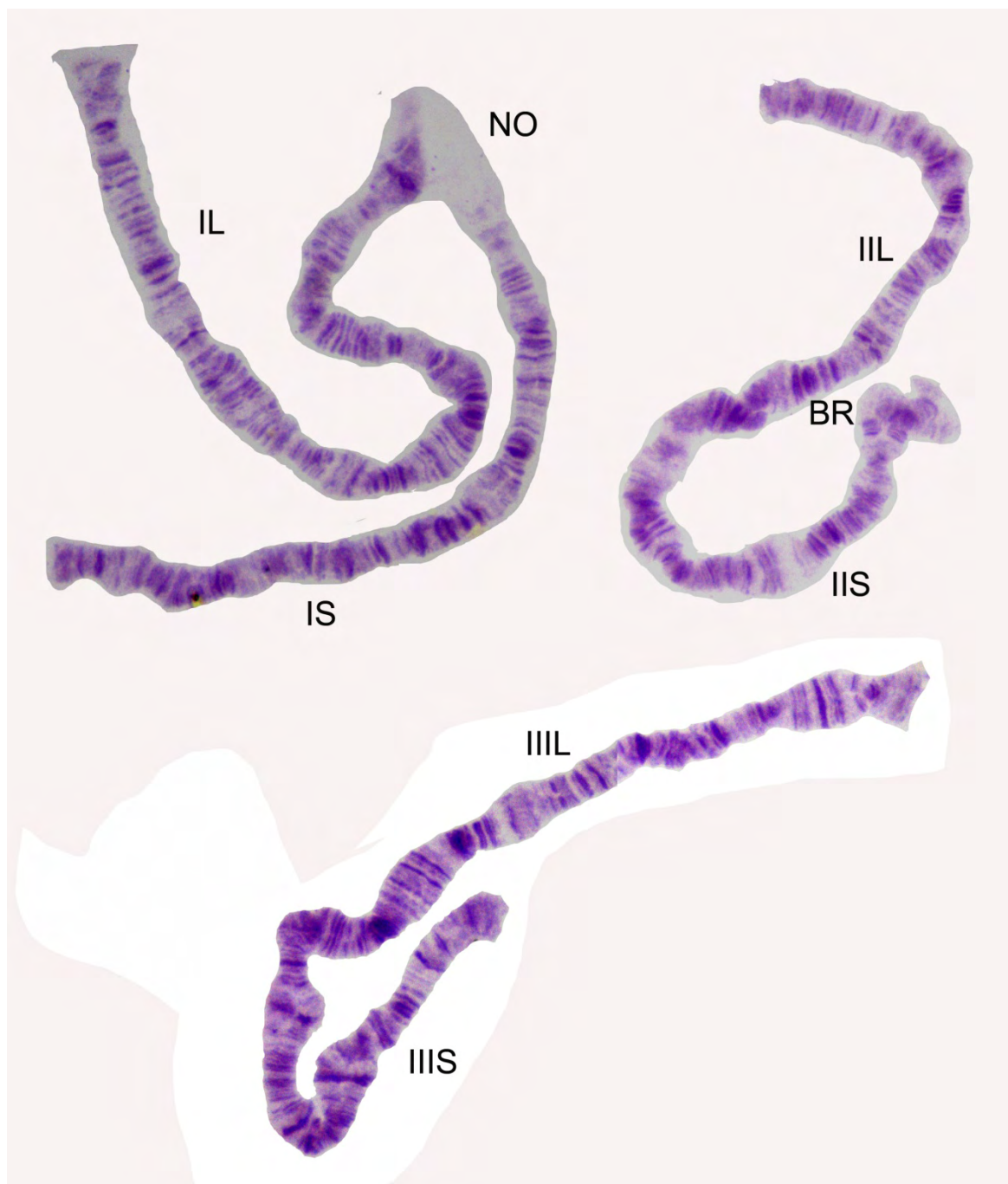
ภาพที่ 7 โพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำ *Simulium siamense* (NO, nucleolar organizer; BR, Balbiani Ring)

โพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำ *S. fenestratum* มี 3 แท่ง (ภาพที่ 8) แท่งที่ 1 มีลักษณะเป็นแบบ metacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IS) และแขนข้างยาว (IL) โดยพบ NO อยู่บนแขน IL โครโมโซมแท่งที่ 2 เป็นแบบ metacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIS) และแขนข้างยาว (IIL) พบ Balbiani Ring บนแขนข้างสั้น (IIS) โครโมโซมแท่งที่ 3 เป็นแบบ submetacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIIS) และแขนข้างยาว (IIIL)



ภาพที่ 8 โพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำ *Simulium fenestratum* (NO, nucleolar organizer; BR, Balbiani Ring)

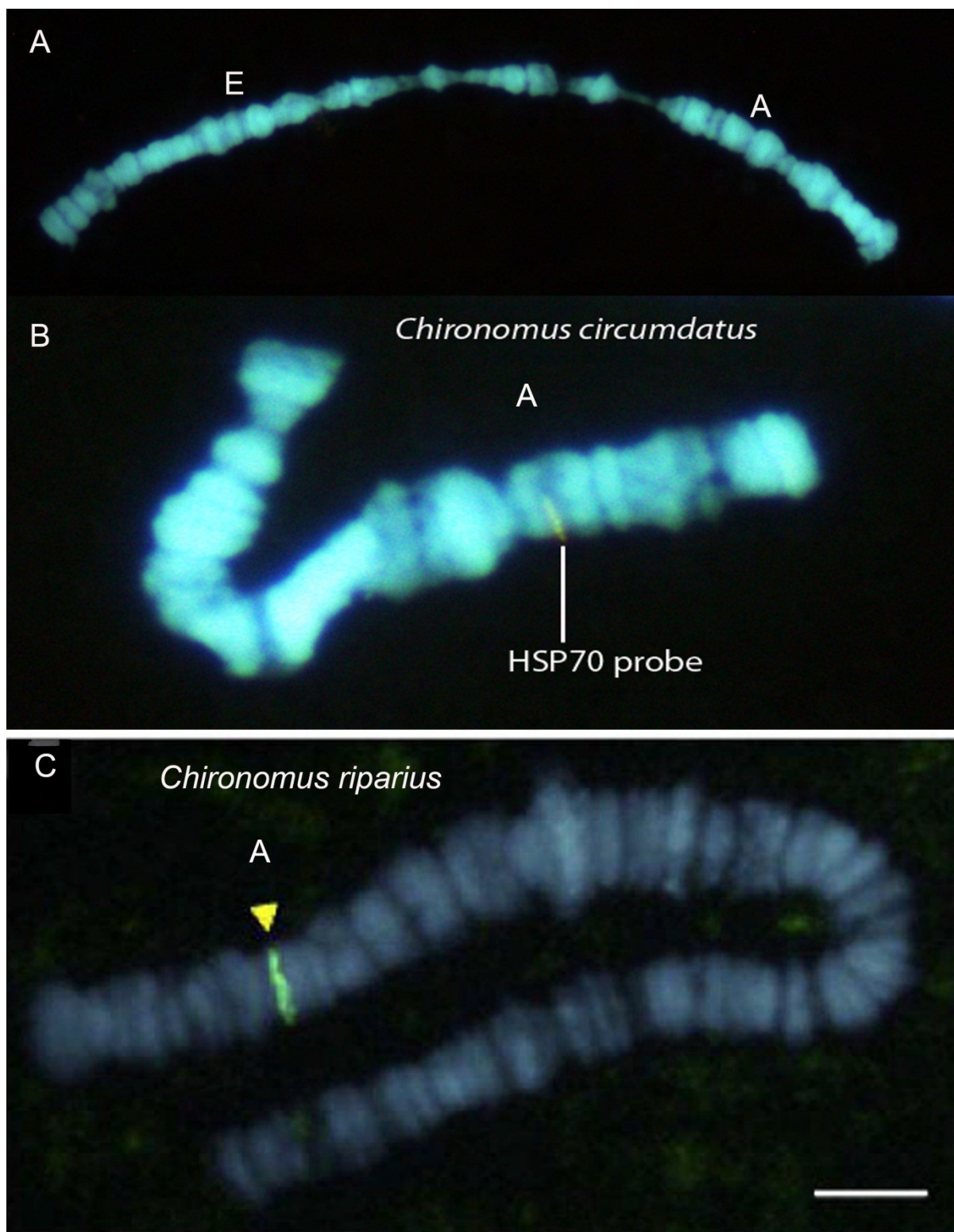
โพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ *S. angulistylum* มี 3 แท่ง (ภาพที่ 8) แท่งที่ 1 มีลักษณะเป็นแบบ metacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IS) และแขนข้างยาว (IL) โดยพบ NO อยู่บนแขน IL โครโมโซมแท่งที่ 2 เป็นแบบ metacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIS) และแขนข้างยาว (IIL) พบ Balbiani Ring บนแขนข้างสั้น (IIS) โครโมโซมแท่งที่ 3 เป็นแบบ submetacentric ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIIS) และแขนข้างยาว (IIIL) (ภาพที่ 9)



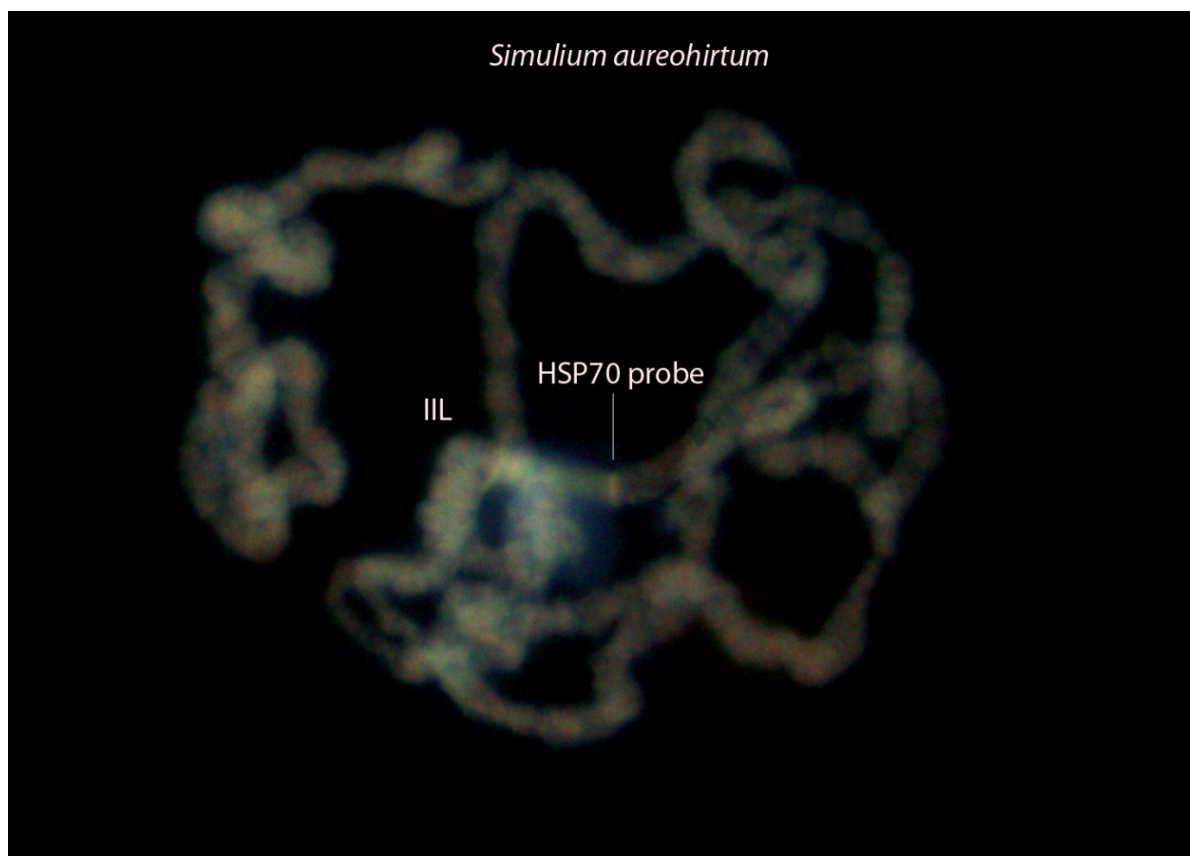
**ภาพที่ 9** โพลีทีนโครโมโซมของแมลงร้นดำ *Simulium angulistylum* (NO, nucleolar organizer; BR, Balbiani Ring)

สังเคราะห์ DNA probe จากผลผลิต PCR ของยีน *hsp70* จากแมลงหนองแดง *C. circumdatus* โดยใช้กระบวนการ Nick Translation ด้วย FISH Tag<sup>TM</sup> DNA Kit (Invitrogen) จากนั้นนำ DNA probe ที่ได้ไปทำ hybridization กับโพลีทีนโครโมโซมของแมลงหนองแดง *C. circumdatus* และ แมลงร้นดำ *S. fenestratum* และ *S. aureohirtum* ผลการ hybridization พบว่า DNA probe ของยีน *hsp70* เกาะบน แขน A ของโพลีทีนโครโมโซมของ *C. circumdatus* (ภาพที่ 10) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาใน แมลงหนองแดง *C. riparius* ที่พบว่ายีน *hsp70* อยู่ในตำแหน่งเดียวกันใน (Morales et al. 2011)

ตำแหน่งของยีน HSP70 บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงร้นดำพบว่า DNA probe สามารถยึด เกาะบนโครโมโซมของ *Simulium aureohirtum* บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 2 (IIL) แต่ไม่สามารถระบุตำแหน่งของยีนดังกล่าวบนโครโมโซมของแมลงร้นดำชนิดอื่น (ภาพที่ 11)



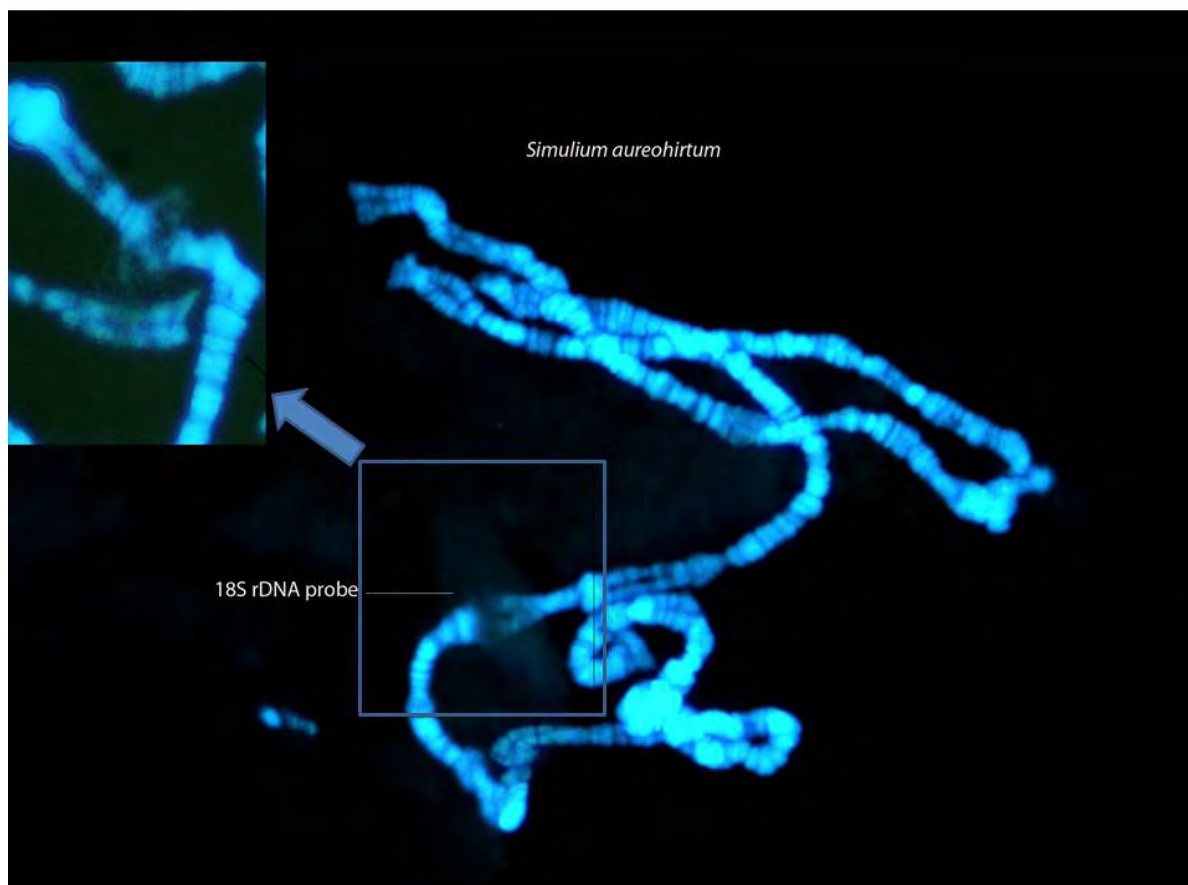
ภาพที่ 10 Fluorescence *In Situ* Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของหนอนแดง *C. circumdatus* (A) โครโมโซมแขน A และแขน E ที่ย้อมด้วยสี DAPI (B) ตำแหน่งของ DNA probe ของยีน *hsp70* บนโครโมโซมแขน A ของ *C. circumdatus* (C) ตำแหน่งของ DNA probe ของยีน *hsp70* บนโครโมโซมแขน A ของ *C. riparius* (Morales et al. 2011)



ภาพที่ 11 Fluorescence In Situ Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำ *Simulium aureohirtum* DNA probe ของยีน *hsp70* hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแท่งที่ 2 แขนข้างยาว (IIL)

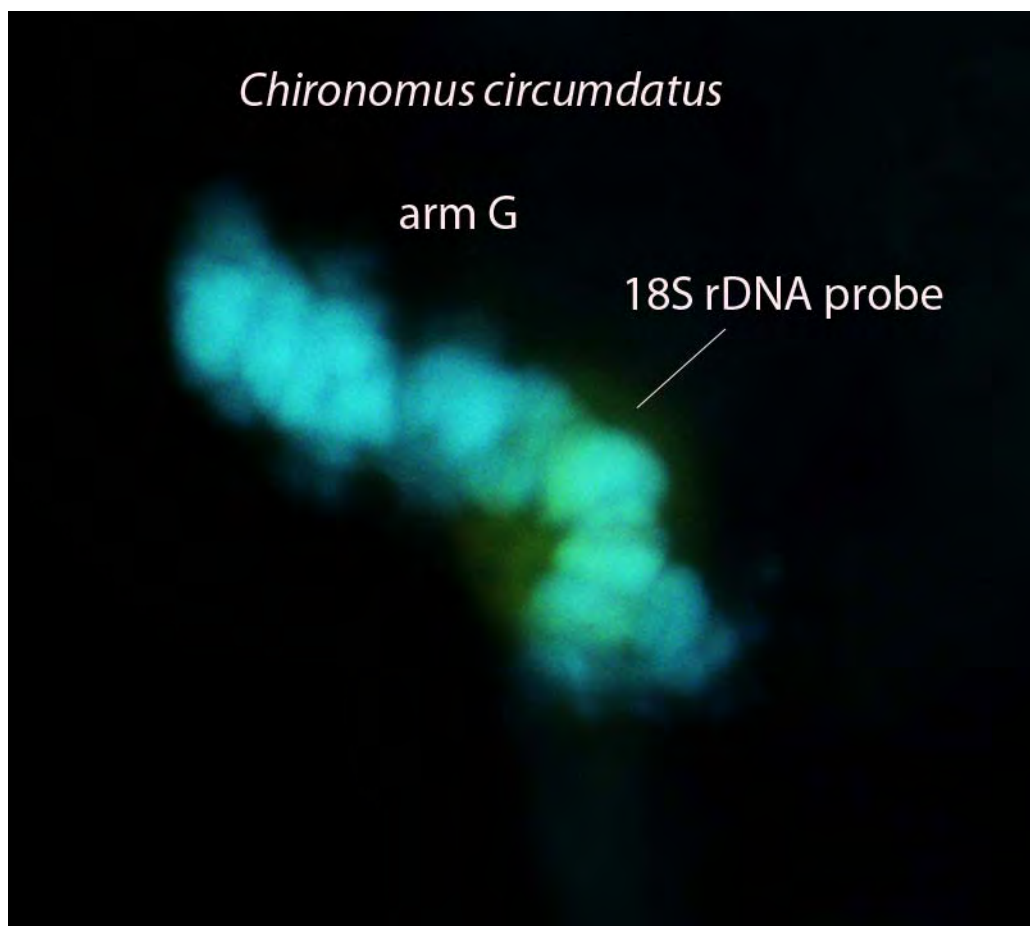
### 3.2.2 ตำแหน่งของยีน 18S rRNA บนโพลีทีนโครโมโซมของ *Chironomus circumdatus* และ *Simulium aureohirtum*

การระบุตำแหน่งของยีน 18S rDNA พบว่ายีนดังกล่าวอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 (IL) บริเวณ nucleolar organizer (NO) ในแมลงริ้นดำ *S. aureohirtum* (ภาพที่ 12) และอยู่บนแขน G ในตำแหน่ง NO ของแมลงหนองแดง *C. Circumdatus* โดยพบว่า DNA probe ที่ยัดเกาะบนโพลีทีนโครโมโซมมีการกระจาย (ภาพที่ 13) เนื่องจากโครโมโซมตำแหน่งดังกล่าวมีการคลายตัวของเส้น DNA



ภาพที่ 12 Fluorescence *In Situ* Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ *Simulium aureohirtum* DNA probe ของยีน 18S rRNA hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างยาว (IL) บริเวณตำแหน่ง nucleolar organizer (NO)

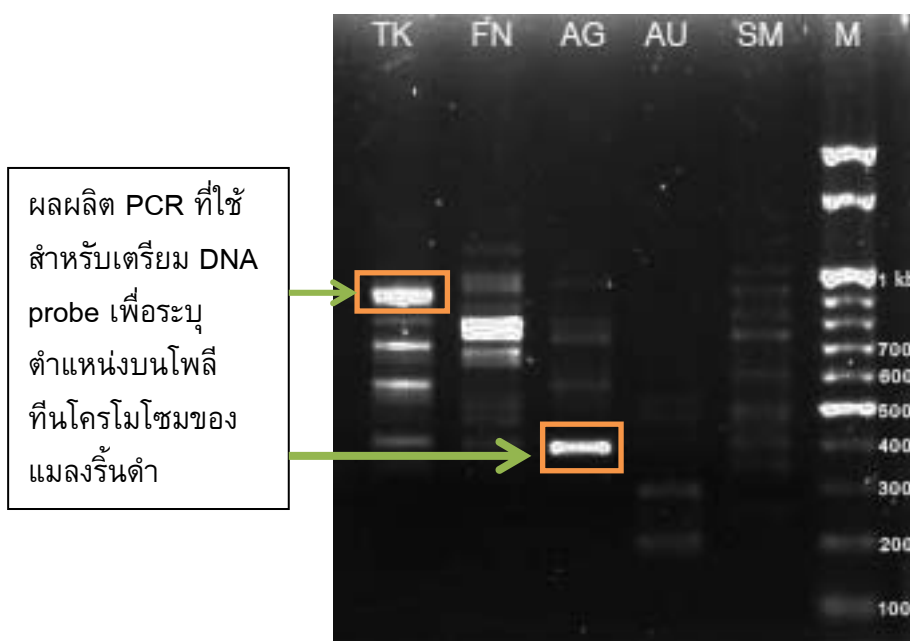
การระบุตำแหน่งของยีน 18S rDNA พบว่ายีนดังกล่าวอยู่บนแขน G ในตำแหน่ง NO ของหนอนแดง *C. Circumdatus* โดยพบว่า DNA probe ที่ยัดเกาะบนโพลีทีนโครโมโซมมีการกระจายเนื่องจากโครโมโซมตำแหน่งดังกล่าวมีการคลายตัวของเส้น DNA (ภาพที่ 13)



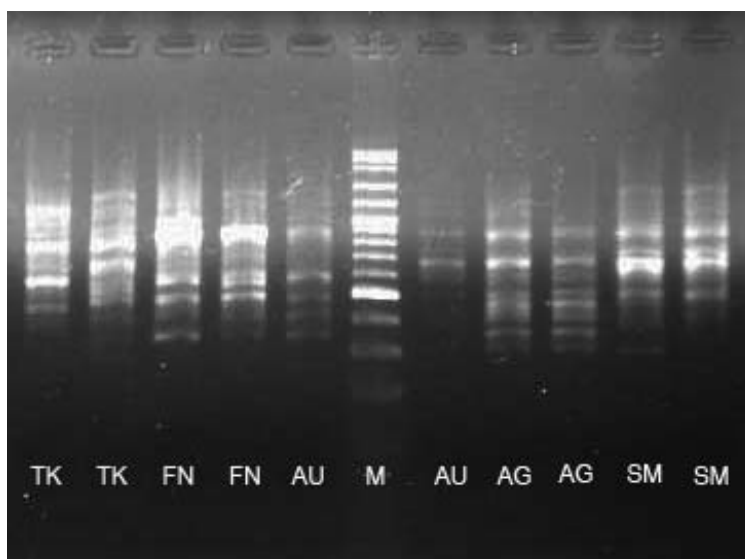
ภาพที่ 13 Fluorescence *In Situ* Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของหนอนแดง *Chironomus circumdatus* DNA probe ของยีน 18S rRNA hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแท่ง G บริเวณตำแหน่ง nucleolar organizer (NO)

### 3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

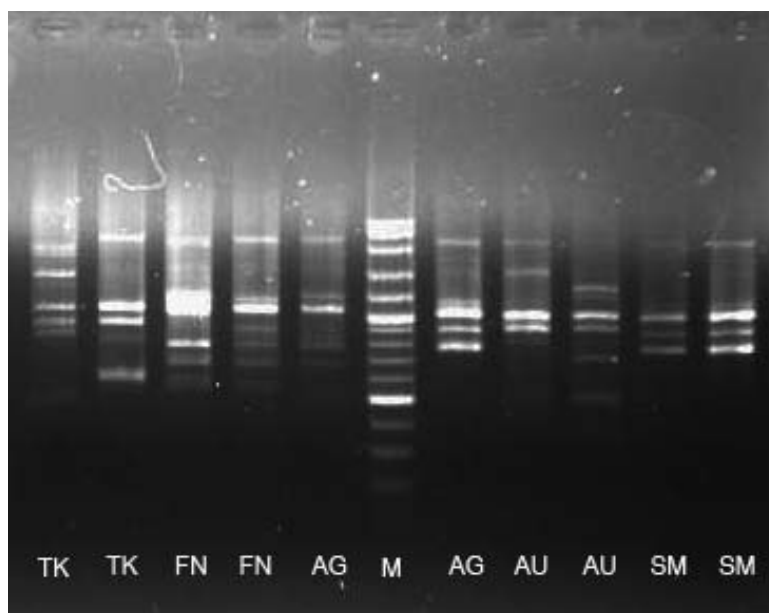
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ 5 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) พบว่าแต่ละไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยมีแบนด์ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน (ภาพที่ 14 – 18)



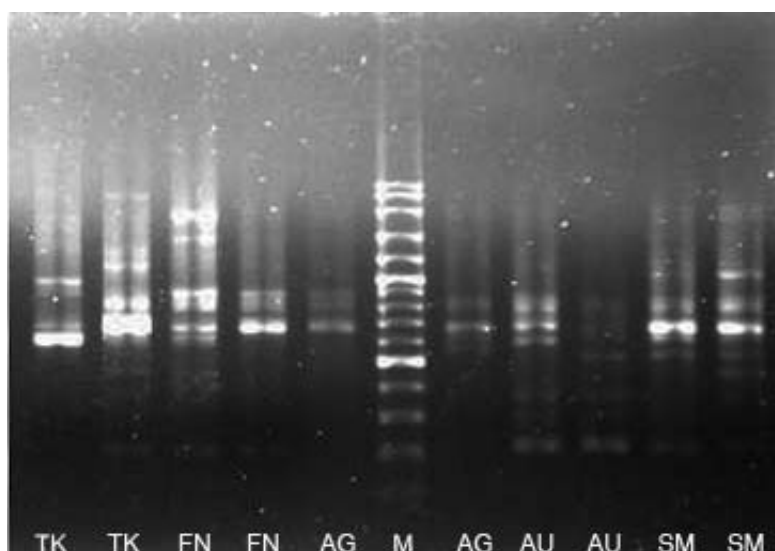
ภาพที่ 14 ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 (TK, *Simulium takense*; FN, *Simulium fenestratum*; AG, *Simulium angulistylum*; SM, *Simulium siamense*; M, 100 bp DNA ladder)



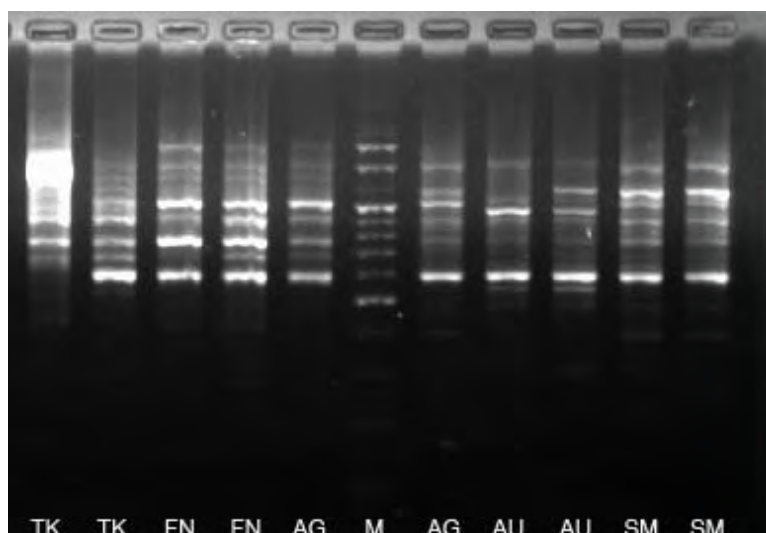
ภาพที่ 15 ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA03 (TK, *Simulium takense*; FN, *Simulium fenestratum*; AG, *Simulium angulistylum*; SM, *Simulium siamense*; M, 100 bp DNA ladder)



ภาพที่ 16 ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA04 (TK, *Simulium takense*; FN, *Simulium fenestratum*; AG, *Simulium angulistylum*; SM, *Simulium siamense*; M, 100 bp DNA ladder)



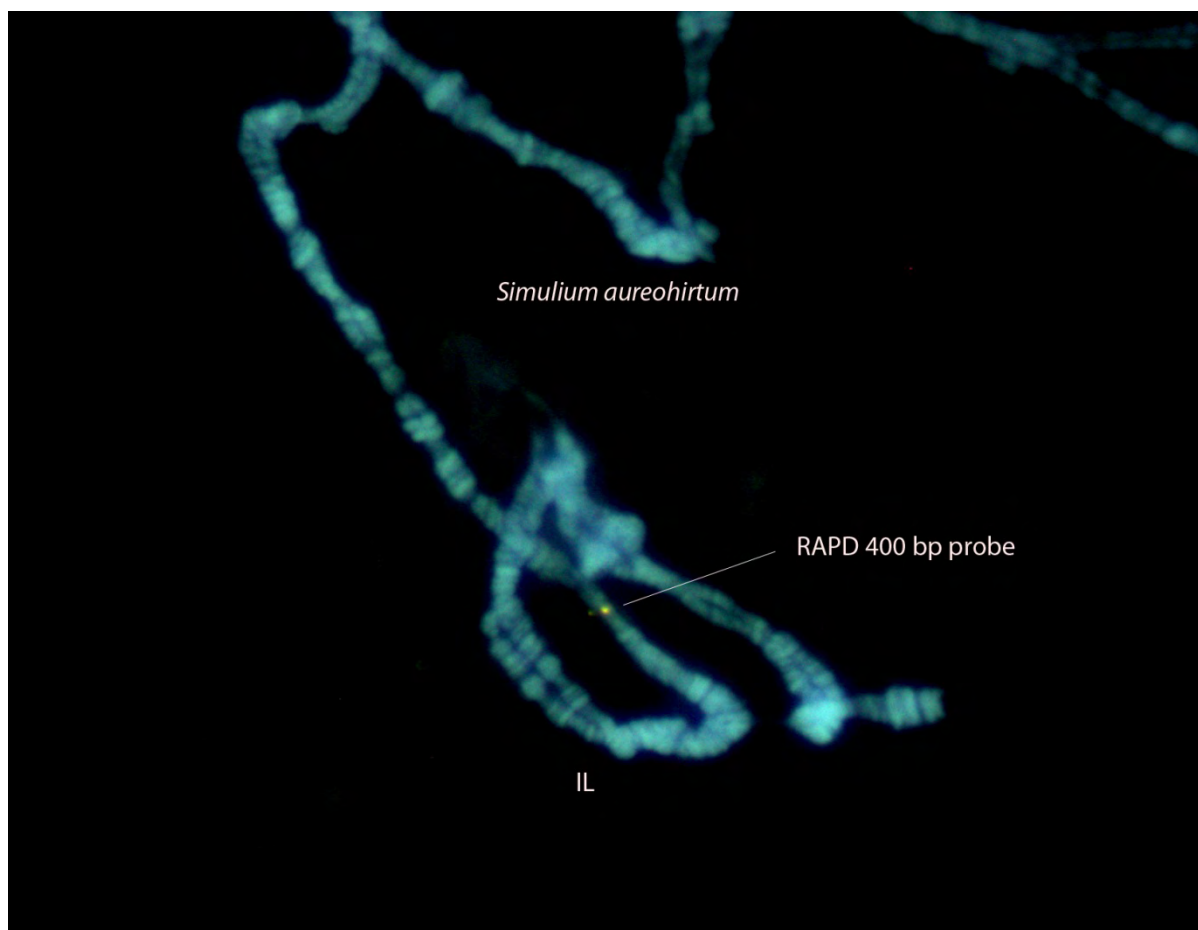
ภาพที่ 17 ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA07 (TK, *Simulium takense*; FN, *Simulium fenestratum*; AG, *Simulium angulistylum*; SM, *Simulium siamense*; M, 100 bp DNA ladder)



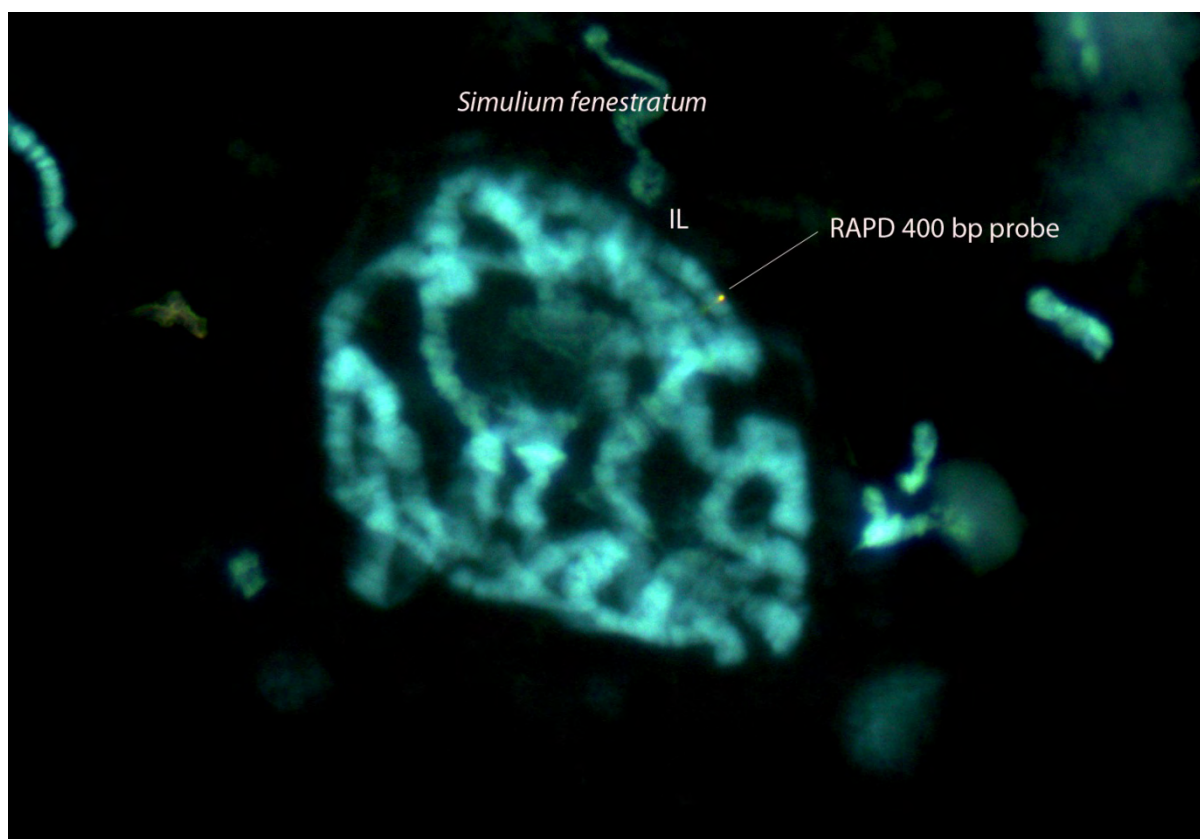
ภาพที่ 18 ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPN03 (TK, *Simulium takense*; FN, *Simulium fenestratum*; AG, *Simulium angulistylum*; SM, *Simulium siamense*; M, 100 bp DNA ladder)

### 3.4 ตำแหน่งของ RAPD markers บนโพลีทีนโครโมโซมของ *Simulium aureohirtum* และ *S. fenestratum*

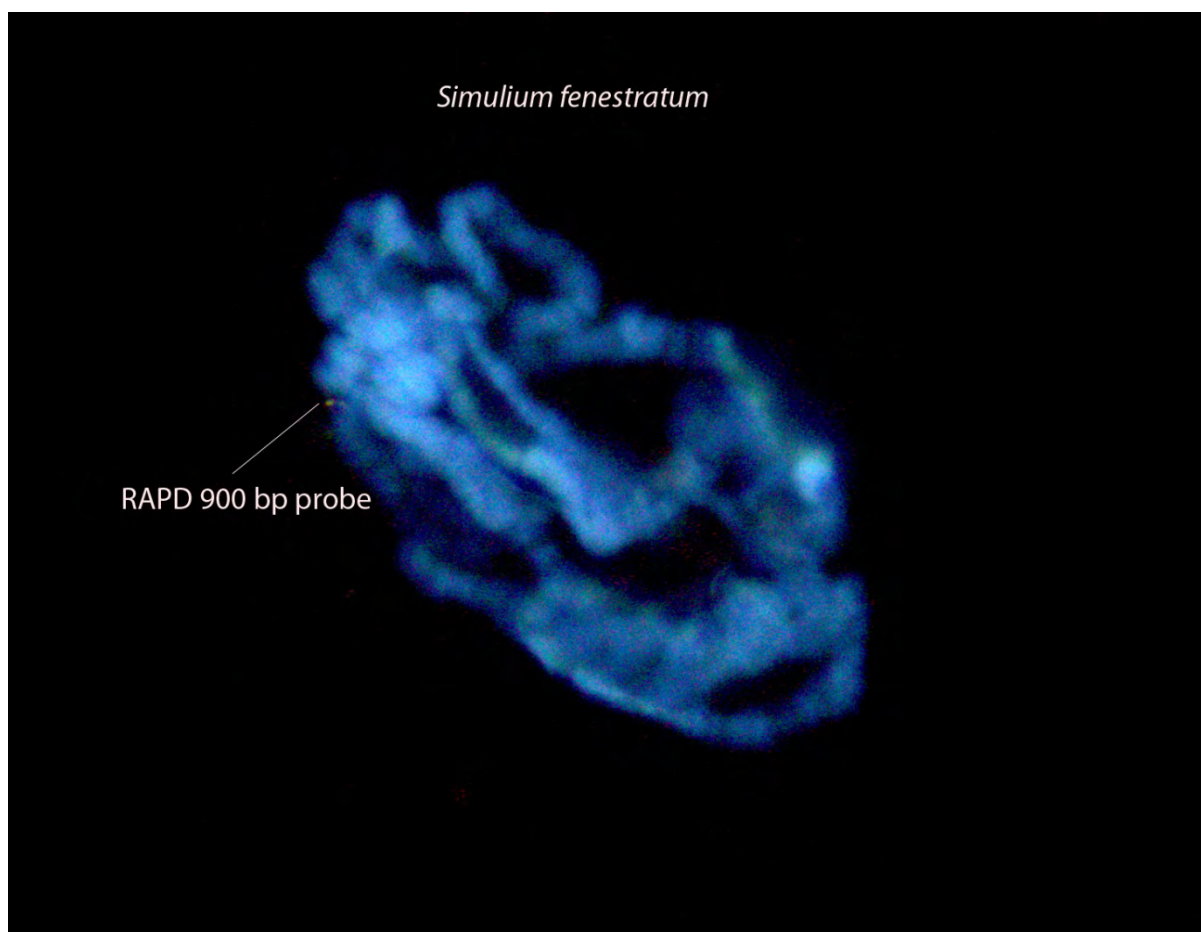
การระบุตำแหน่งของ DNA probe ที่ได้จากเทคนิค PCR-RAPD พบว่าสามารถระบุตำแหน่งบนโครโมโซมของ *S. aureohirtum* และ *S. fenestratum* ได้ โดย DNA probe ขนาด 400 bp มีตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างยาว (IL) (ภาพที่ 19 – 20) สำหรับ DNA probe ขนาด 900 bp พบยัดเกาะบนโครโมโซมของ *S. fenestratum* (ภาพที่ 21) แต่ไม่สามารถระบุตำแหน่งของโครโมโซมได้เนื่องจากคุณภาพของโพลีทีนโครโมโซมไม่ดี



ภาพที่ 19 Fluorescence *In Situ* Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงร้นดำ *Simulium aureohirtum* DNA probe สกัดได้จาก RAPD ขนาด 400 bp ของแมลงร้นดำ *Simulium angulistylum* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ OPA02 DNA probe hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างยาว (IL)



ภาพที่ 20 Fluorescence *In Situ* Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงร้นดำ *Simulium fenestratum* DNA probe สกัดได้จาก RAPD ขนาด 400 bp ของแมลงร้นดำ *Simulium angulistylum* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ OPA02 DNA

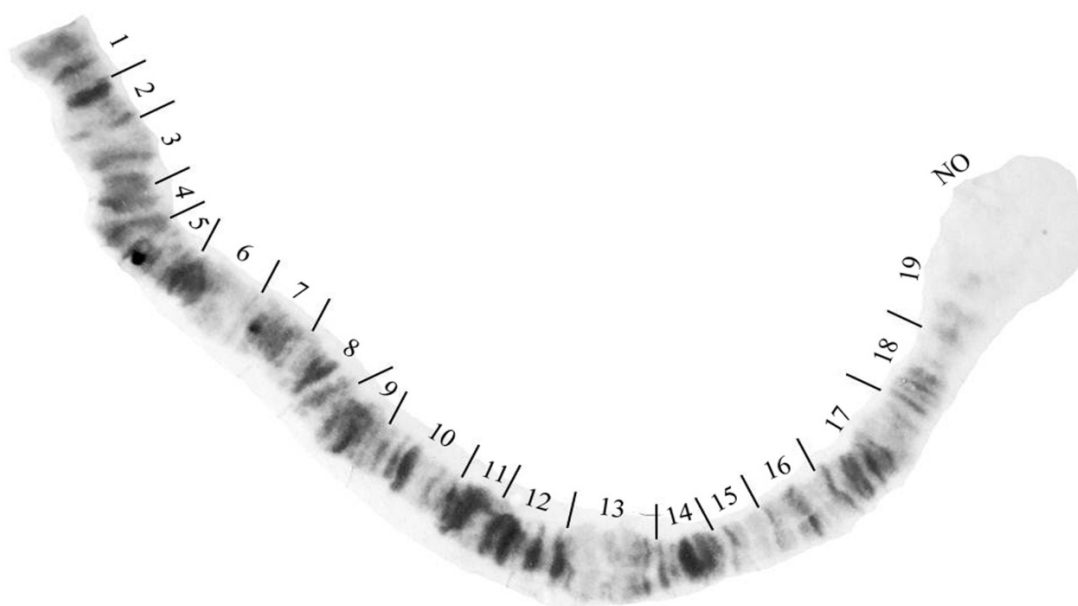


ภาพที่ 21 Fluorescence *In Situ* Hybridization บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงรึ้นดำ *Simulium fenestratum* DNA probe สั้เคราะห์จาก RAPD ขนาด 900 bp ของแมลงรึ้นดำ *Simulium takense* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ OPA02

### 3.5 เซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ *Simulium angulistylum*

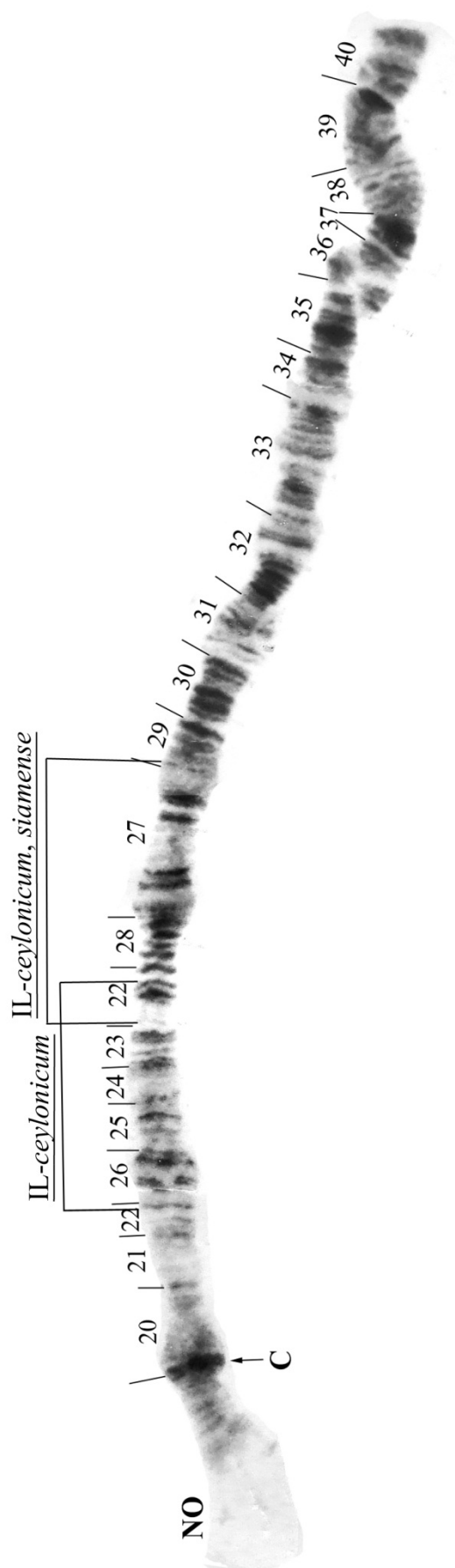
ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์โดยเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมจากต่อมน้ำลาย (salivary gland) ของแมลงรืนดำ *S. angulistylum* จำนวน 172 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า *S. angulistylum* ประกอบด้วยโพลีทีนโครโมโซม 3 แท่ง ( $2n = 6$ )

โครโมโซมแท่งที่ 1 ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IS) (ภาพที่ 22) และแขนข้างยาว (IL) (ภาพที่ 23) มีเครื่องหมายโครโมโซมที่สำคัญคือ nucleolar organizer (NO) ในตำแหน่งโครโมโซมส่วนที่ 19 ติดกับเซนโทรเมียร์ (centromere) เปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมพบว่า มีแบบแผนของแบนด์เหมือนกับแผนที่มาตรฐานของ *S. siamense* (Kuvangkadilok et al. 2008) และแผนที่มาตรฐานของกลุ่มสปีชีส์ *S. ceylonicum* (Jitklang et al. 2008)



ภาพที่ 22 โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างสั้น (IS) ของแมลงรืนดำ *Simulium angulistylum* ในประเทศไทย การแบ่งส่วนโครโมโซมแบ่งตามแผนที่มาตรฐานของแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *S. ceylonicum* (Jitklang et al. 2008) NO, nucleolar organizer





ภาพที่ 23 โครโมโซม  
แท่งที่ 1 แขนข้างยาว  
(IL) ของแมลงรึ้นดำ

*Simulium*

*angulistylum* ใน  
ประเทศไทย ตำแหน่ง  
ของอินเวอร์ชัน IL-  
ceylonicum และ IL-  
ceylonicum, siamense  
แสดงบนโครโมโซมคือ  
ตำแหน่งของอิน  
เวอร์ชันที่แตกต่าง  
ระหว่าง S.

*angulistylum* กับกลุ่มส  
ปีชีส์ *S. ceylonicum*  
และ *S. siamense* C,  
centromere

โครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพที่ 24) ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIS) และแขนข้างยาว (IIL) แขนข้างสั้นมีเครื่องหมายโครโมโซมที่สำคัญคือ ring of Balbiani (BR) บริเวณตำแหน่งที่ 43 และ double bubble (db) บริเวณตำแหน่งที่ 44 โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนข้างยาวมีเครื่องหมายโครโมโซมที่สำคัญคือ jagged group (jg) บริเวณตำแหน่งที่ 59 และ parabalbiani ring (PB) บริเวณตำแหน่งที่ 60 พบอินเวอร์ชันภายในสปีชีส์ 3 รูปแบบ ทั้งหมดพบบนโครโมโซมแขนข้างยาว ได้แก่ IIL-1, IIL-2 และ IIL-3 โดยอินเวอร์ชัน IIL-2 เป็นอินเวอร์ชันความถี่คงที่ (fixed inversion) และอินเวอร์ชัน IIL-1 และ IIL-3 เป็นอินเวอร์ชันความถี่ไม่คงที่ (floating inversion) โดยมีความถี่ต่ำ (<4%) เมื่อเปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของกลุ่มสปีชีส์ *S. ceylonicum* และ *S. siamense* พบว่าโครโมโซมของ *S. angulistylum* แตกต่างจากโครโมโซมของกลุ่มสปีชีส์ *S. ceylonicum* และ *S. siamense* โดยอินเวอร์ชันซับซ้อน 2 รูปแบบ ได้แก่ IIS-ceylonicum, siamense และ IIL-ceylonicum, siamense

โครโมโซมแท่งที่ 3 (ภาพที่ 25) ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (IIIS) และแขนข้างยาว (IIIL) แขนข้างสั้นมีเครื่องหมายโครโมโซมที่สำคัญคือ blister marker (BI) อยู่บริเวณโครโมโซมส่วนที่ 75 พบอินเวอร์ชันภายในสปีชีส์ 2 รูปแบบ ทั้งหมดพบบนโครโมโซมแขนข้างยาว ได้แก่ IIIS-1 และ IIIL-1 โดยอินเวอร์ชัน IIIS-1 เป็นอินเวอร์ชันความถี่คงที่ (fixed inversion) และอินเวอร์ชัน IIIL-1 เป็นอินเวอร์ชันความถี่ไม่คงที่ (floating inversion) มีความถี่ต่ำ (<4%) เมื่อเปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของกลุ่มสปีชีส์ *S. ceylonicum* และ *S. siamense* พบว่าโครโมโซมของ *S. angulistylum* แตกต่างจากโครโมโซมของกลุ่มสปีชีส์ *S. ceylonicum* โดยอินเวอร์ชันความถี่คงที่ IIIS-asakoe และ IIIL-asakoe โครโมโซมของ *S. angulistylum* แตกต่างจากโครโมโซมของ *S. siamense* โดยอินเวอร์ชันความถี่คงที่ IIIL-siamense

จากรูปแบบของการเกิดอินเวอร์ชันของโครโมโซมสามารถจัดแบ่งประชากรของ *S. angulistylum* ในประเทศไทยออกเป็น 3 cytoforms (ภาพที่ 26) ดังนี้

#### *Simulium angulistylum* cytoform A

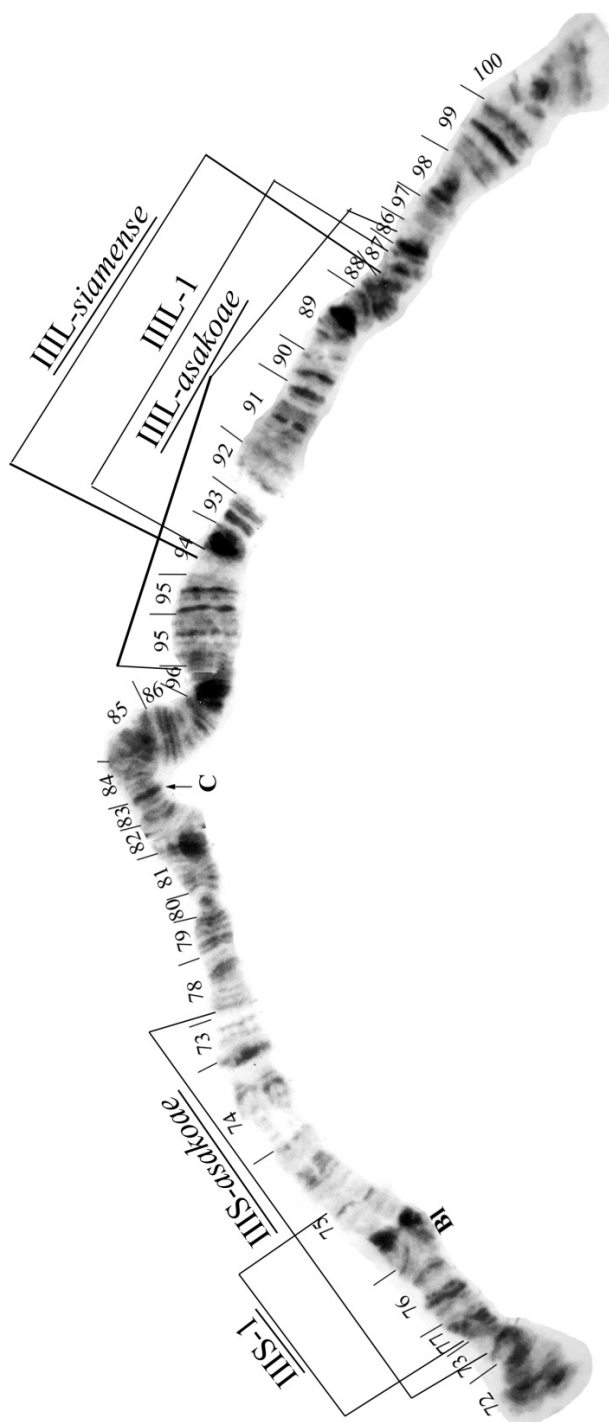
มีรูปแบบโครโมโซมมาตรฐาน และโครโมโซมเพศไม่มีการแบ่งแยก จากการศึกษาตัวอย่างทั้งสิ้น 95 ตัวอย่างจาก 3 ประชากรในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ประกอบด้วยบ้านดงสว่าง อำเภอนิคมน้ำอุ่น จังหวัดสงขลา น้ำตกเขาพระนารายณ์ และน้ำตกโดนเพชร จังหวัดระนอง (ภาพที่ 24)

#### *Simulium angulistylum* cytoform B

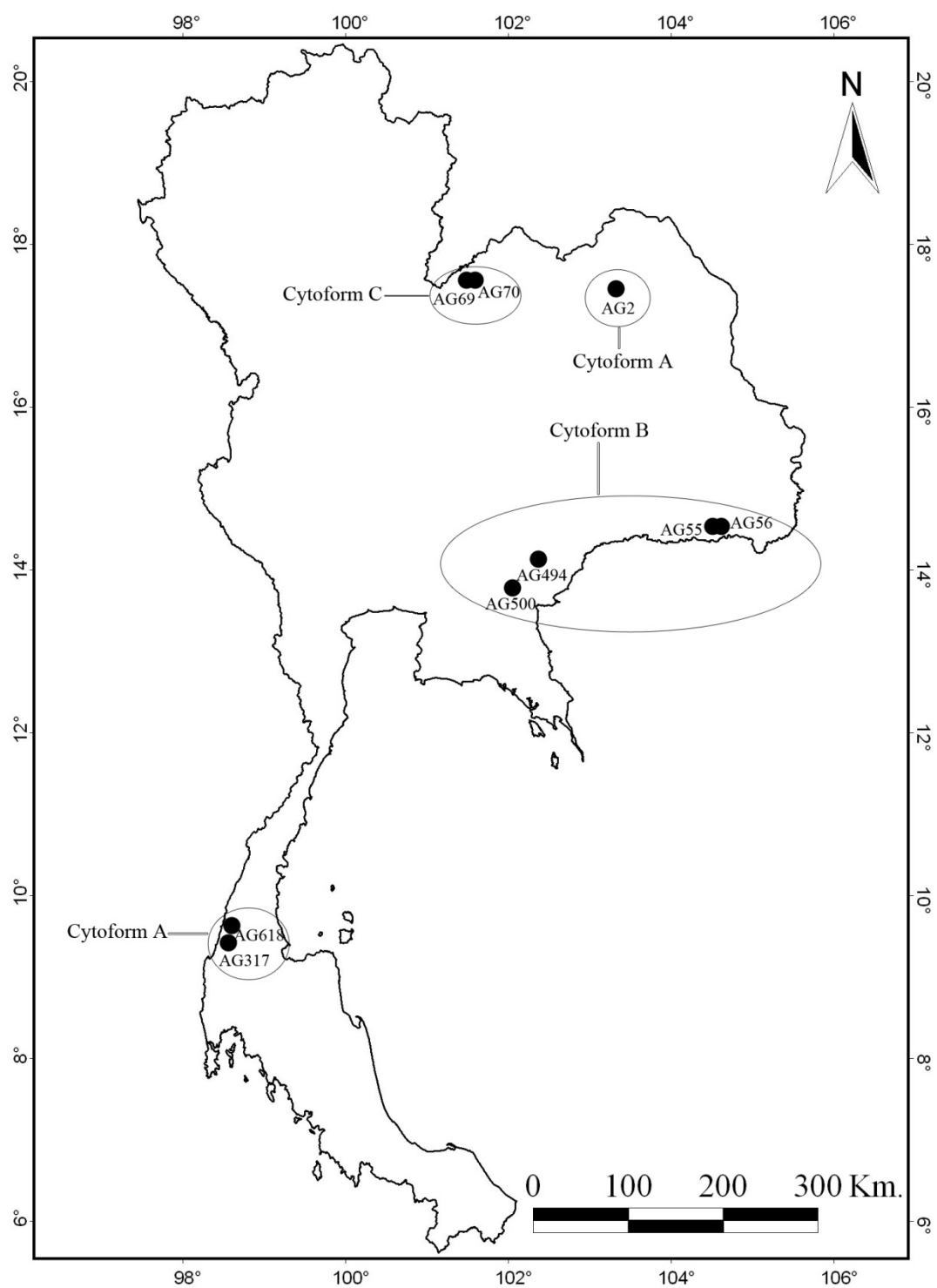
แบ่งแยกจาก cytoform อื่นๆ โดยอินเวอร์ชันความถี่คงที่ IIL-2 โครโมโซมเพศไม่มีการแบ่งแยก จากการศึกษาตัวอย่างทั้งสิ้น 38 ตัวอย่าง จาก 4 ประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ น้ำตกวังใหญ่ และลำธารทางเข้าน้ำตกวังใหญ่ จังหวัดศรีสะเกษ น้ำตกเหวสุวัต อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา และน้ำตกปางสีดา จังหวัดสระแก้ว (ภาพที่ 26)

*Simulium angulistylum* cytoform C แบ่งแยกจาก cytoform อื่นๆ โดยอินเวอร์ชันความถี่คงที่ IIL-2 และ IIIS-1 โครโมโซมเพศไม่มีการแบ่งแยก จากการศึกษาตัวอย่าง 12 ตัวอย่าง จาก 2 ประชากร ได้แก่ น้ำตกหินสามชั้น และน้ำตกห้วยเตย อุทยานแห่งชาติภูเรือ จังหวัดเลย (ภาพที่ 26)





ภาพที่ 25 โครโมโซมแท่งที่ 3 ของแมลงรึ้นดำ *Simulium angulistylum* ตำแหน่งของอินเวอร์ชันแสดงบนโครโมโซม อินเวอร์ชันที่มีความถี่สูงที่ขีดเส้นใต้ชื่อ อินเวอร์ชันที่มีความถี่ไม่คงที่ไม่ขีดเส้นใต้ชื่อ อินเวอร์ชัน IIS-asakoe, IIIL-asakoe เป็นอินเวอร์ชันซ้ำซ้อนที่แตกต่างระหว่าง *S. angulistylum* เปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานโครโมโซมของ *S. asakoe* และ IIIL-siamense เป็นอินเวอร์ชันซ้ำซ้อนที่แตกต่างระหว่าง *S. angulistylum* เปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานโครโมโซมของ *S. siamense* BI, blister marker



ภาพที่ 26 การกระจายทางภูมิศาสตร์ของ cytoforms ของ *Simulium angulistylum* ในประเทศไทย  
รายละเอียดของแต่ละประชากรแสดงในตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** รายละเอียดของประชากรที่ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงร้นดำ *Simulium angulistylum* ในประเทศไทย

| ประชากร                                                    | สัญลักษณ์ | ละติจูด/<br>ลองจิจูด  | ความสูงจาก<br>ระดับน้ำทะเล (เมตร) | Cytoform |
|------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|----------|
| 1. บ้านดงสว่าง<br>อ.นิคมน้ำอุ่น จ.สงขลา                    | AG2       | 17°07' N<br>103°38' E | 330                               | A        |
| 2. น้ำตกเขาพระนารายณ์<br>จ.ระนอง                           | AG317     | 09°36' N<br>98°35' E  | 110                               | A        |
| 3. น้ำตกโตนเพชร จ.ระนอง                                    | AG618     | 09°43' N<br>98°36' E  | 117                               | A        |
| 4. น้ำตกเหวสุวัต อุทยาน<br>แห่งชาติเขาใหญ่<br>จ.นครราชสีมา | AG494     | 14°19' N<br>101°21' E | 600                               | B        |
| 5. น้ำตกปางสีดา<br>จ.สระแก้ว                               | AG500     | 13°58' N<br>102°15' E | 250                               | B        |
| 6. น้ำตกวังใหญ่ อ.ขุนหาญ<br>จ.ศรีสะเกษ                     | AG55      | 14°29' N<br>104°32' E | 202                               | B        |
| 7. ทางเข้าน้ำตกวังใหญ่ อ.<br>ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ             | AG56      | 14°26' N<br>104°29' E | 200                               | B        |
| 8. น้ำตกหินสามชั้น อุทยาน<br>แห่งชาติภูเรือ จ.เลย          | AG69      | 17°30' N<br>104°49' E | 1,153                             | C        |
| 9. น้ำตกห้วยเตย อุทยาน<br>แห่งชาติภูเรือ จ.เลย             | AG70      | 17°30' N<br>104°49' E | 1,153                             | C        |

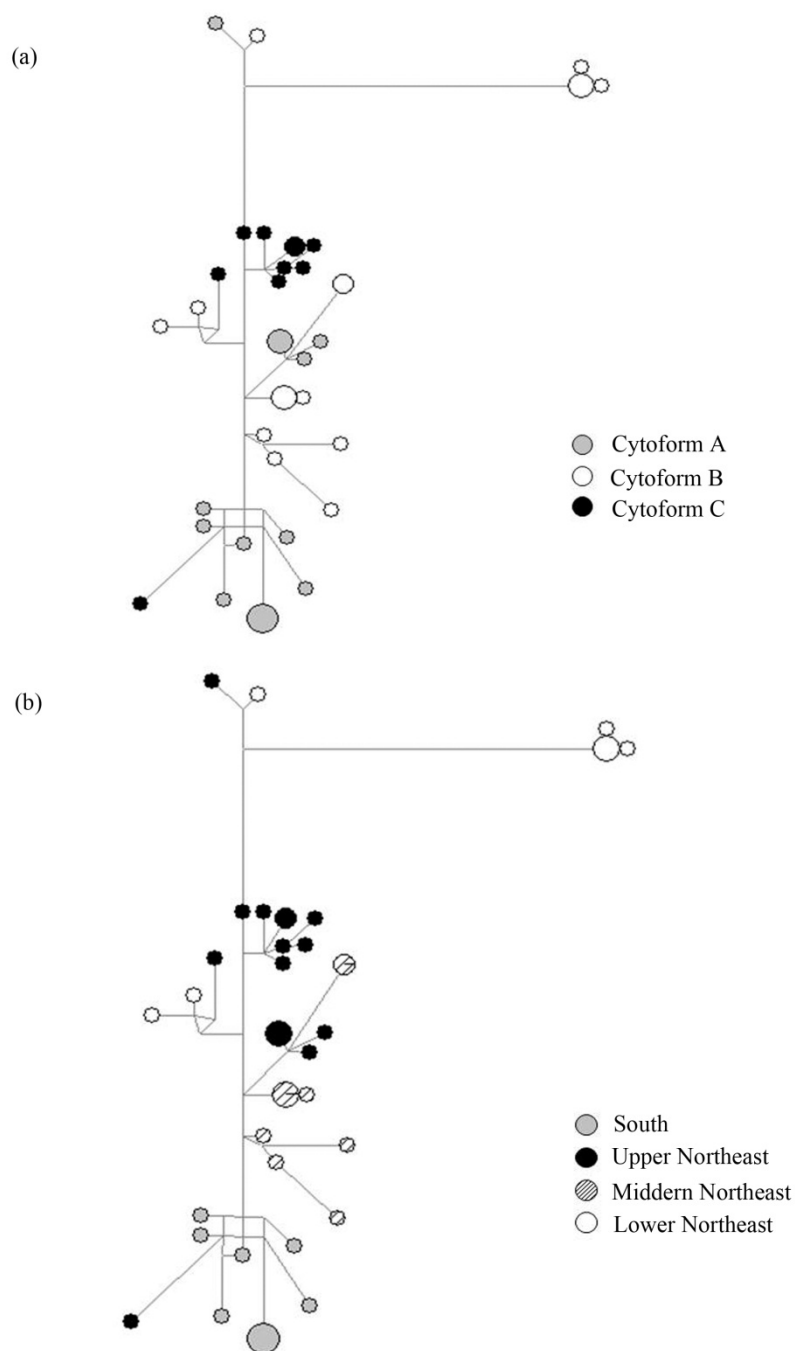
### 3.6 ความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Simulium angulistylum* ในระดับอนุพันธุศาสตร์และ วิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ (phylogeography)

ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรของ *S. angulistylum* ในระดับอนุพันธุศาสตร์ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I (COI) ซึ่งเป็นยีนในไมโทคอนเดรีย จำนวน 42 ตัวอย่าง จาก 9 ประชากร (ตารางที่ 2) ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทำการศึกษา 586 bp พบการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบส (base substitution) จำนวน 72 ตำแหน่ง ซึ่งในจำนวนนี้ 50 ตำแหน่ง เป็นการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสแบบ parsimony informative จากตัวอย่างทั้งหมด 42 ตัวอย่าง แยกออกเป็น 33 แฮพโลไทป์ (haplotype) การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์โดยใช้โมเดลการเปลี่ยนแปลงแทนที่ TrN (Tamura and Nei 1993) พบว่ามีค่าระหว่าง 0% - 5.80% โดยมีค่าเฉลี่ย 2.49% ค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (haplotype diversity) มีค่าระหว่าง 0.400 – 1.000 และมีค่าเฉลี่ย 0.9849 ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่าระหว่าง 0.0017 – 0.0334 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงร้นดำ *Simulium angulistylum* ในประเทศไทย

| Cytoform | ประชากร | จำนวน<br>ตัวอย่าง | Haplotype diversity | Nucleotide<br>diversity ( $\pi$ ) |
|----------|---------|-------------------|---------------------|-----------------------------------|
| A        | AG2     | 5                 | 0.7000±0.2184       | 0.0031±0.0025                     |
|          | AG317   | 5                 | 1.0000±0.1265       | 0.0092±0.0062                     |
|          | AG618   | 5                 | 0.4000±0.2373       | 0.0055±0.0039                     |
|          | All     | 15                | 0.9143±0.0559       | 0.0134±0.0074                     |
| B        | AG494   | 5                 | 0.9000±0.1610       | 0.0150±0.0098                     |
|          | AG500   | 5                 | 0.9000±0.1610       | 0.0096±0.0065                     |
|          | AG55    | 2                 | 1.0000±0.5000       | 0.0017±0.0024                     |
|          | AG56    | 5                 | 0.9000±0.1610       | 0.0334±0.0209                     |
|          | All     | 17                | 0.9779±0.0267       | 0.0260±0.0137                     |
| C        | AG69    | 5                 | 0.9000±0.1610       | 0.0048±0.0035                     |
|          | AG70    | 5                 | 1.0000±0.1265       | 0.0198±0.0127                     |
|          | All     | 10                | 0.9778±0.0540       | 0.0129±0.0075                     |
|          | รวม     | 42                | 0.9849±0.0096       | 0.0249±0.0126                     |

การวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์โดยใช้วิธี Median Joining network (MJ network) ด้วยโปรแกรม NETWORK ver. 4.6.1.0 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) (ภาพที่ 25) พบว่าไม่มีการแบ่งแยกของสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ที่เด่นชัด แต่พบว่าแฮพโลไทป์ 3 แฮพโลไทป์ของ cytoform B จากจังหวัดศรีสะเกษแตกต่างจากแฮพโลไทป์อื่นๆมาก โดยเชื่อมต่อกับสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ด้วยความแตกต่างจำนวน 21 ลำดับขั้นการกลาย (mutation step) สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์แสดงให้เห็นการเกาะกลุ่มของแฮพโลไทป์จาก cytoform เดียวกัน เช่น แฮพโลไทป์ของ cytoform C เกาะกลุ่มด้วยกันเกือบทั้งหมดยกเว้นเพียง 2 แฮพโลไทป์ที่เกาะกลุ่มกับ cytoform อื่น แต่อย่างไรก็ตามแฮพโลไทป์ของ cytoform A และ B กระจายทั่วไปไม่เกาะกลุ่มตาม cytoform โดยแฮพโลไทป์เหล่านี้เกาะกลุ่มสัมพันธ์กับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของประชากรมากกว่า แสดงให้เห็นว่ามีการจำกัดถิ่นโพลระหว่างประชากร



ภาพที่ 27 สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ของแมลงร้นดำ *Simulium angulistylum* ในประเทศไทย จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Median Joining network โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 586 bp จำนวน 42 ตัวอย่าง (a) การกำหนดสัญลักษณ์ตาม cytoform (b) กำหนดสัญลักษณ์ตามภูมิภาคของประชากร วงกลมหมายถึงแอฟโพลไทป์ ขนาดของวงกลมสัมพันธ์กับจำนวนตัวอย่างของแอฟโพลไทป์

การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร (ตารางที่ 6) พบว่า ประชากรส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ที่แสดงให้เห็นการเกาะกลุ่มของแฮพโลไทป์จากภูมิภาคเดียวกัน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $r = 0.517$ ,  $P < 0.001$ ) บ่งชี้ว่าระดับการเกยยีนโฟลระหว่างประชากรถูกจำกัดด้วยระยะห่างทางภูมิศาสตร์

ตารางที่ 6 ค่า  $F_{ST}$  ระหว่างประชากรของ *Simulium angulistylum* ในประเทศไทย

| Cytoform |            | A      |        |        | B      |        |        |        | C       |      |
|----------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|------|
|          | Population | AG2    | AG618  | AG317  | AG494  | AG500  | AG55   | AG56   | AG69    | AG70 |
| A        | AG2        |        |        |        |        |        |        |        |         |      |
|          | AG618      | 0.7412 |        |        |        |        |        |        |         |      |
|          | AG317      | 0.6820 | 0.4578 |        |        |        |        |        |         |      |
| B        | AG494      | 0.2818 | 0.4966 | 0.4333 |        |        |        |        |         |      |
|          | AG500      | 0.5401 | 0.5924 | 0.4606 | 0.0148 |        |        |        |         |      |
|          | AG55       | 0.9415 | 0.9085 | 0.8473 | 0.7271 | 0.8321 |        |        |         |      |
| C        | AG56       | 0.4038 | 0.4391 | 0.3920 | 0.1872 | 0.2775 | 0.1473 |        |         |      |
|          | AG69       | 0.8369 | 0.8177 | 0.7508 | 0.5950 | 0.6648 | 0.9193 | 0.4019 |         |      |
|          | AG70       | 0.5089 | 0.5182 | 0.4335 | 0.2932 | 0.3170 | 0.6887 | 0.1634 | 0.08554 |      |

หมายเหตุ: อักษรตัวหนาหมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$

#### 4. สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

##### 4.1 การระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำและหนอนแดง

ยีน *hsp* มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่ออุณหภูมิ การควบคุมการเจริญพัฒนาของเซลล์ การสื่อสารภายในเซลล์ (Feder and Hofmann 1999; Gabai and Sherman 2002) การศึกษาในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* พบว่า *hsp* gene อยู่ภายในอินเวอร์ชันซึ่งมีบทบาทสำคัญสำหรับการปรับตัวของแมลงต่อสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกัน (Anderson *et al.* 2003; Frydenberg *et al.* 2003) เนื่องจากยีน *hsp* มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการระบุตำแหน่งของยีนดังกล่าวบนโพลีทีนโครโมโซมจะทำให้สามารถศึกษาในเชิงลึกเพิ่มเติมได้ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาตำแหน่งของ *hsp* gene ในแมลงวันดำยังเป็นประโยชน์ในการศึกษาเปรียบเทียบการวิวัฒนาการของยีนดังกล่าวกับแมลงกลุ่มอื่น ที่มีการศึกษา *hsp* gene แล้ว เช่น แมลงหวี่ หนอนแดง ยุง เป็นต้น

ผลจากการศึกษาพบว่ายีน *hsp70* ในแมลงหนอนแดง *C. circumdatus* ที่ใช้ในการสังเคราะห์ DNA probe พบว่ามีความยาว 244 bp และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับยีนดังกล่าวในแมลงหนอนแดง 3 สปีชีส์ ได้แก่ *C. yoshimatsui*, *C. riparius* และ *C. tentans* พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 90% โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ของ *Ch. circumdatus* มีความคล้ายคลึงกับ *C. yoshimatsui* มากที่สุด โดยมีความแตกต่างกัน 3.3% และมีความแตกต่างจาก *Ades aegypti* มากที่สุดคือ 26.6% การแปลรหัสกรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ *C. circumdatus* มีความคล้ายคลึงกับแมลงหนอนแดง *C. tentans* มากที่สุด โดยมีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน 1% และลำดับกรดอะมิโนของ *C. circumdatus* มีความแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของ *Apis mellifera* มากที่สุดเท่ากับ 18.5% ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Morales *et al.* (2011) ที่พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* มีความคล้ายคลึงกันมากในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งเป็นผลจากการอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์เนื่องจากยีน *hsp70* มีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ในเซลล์

การระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* ในแมลงวันดำพบว่ายีนดังกล่าวพบว่ามีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 แขนข้างยาว บริเวณใกล้กับเซนโทรเมียร์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดอินเวอร์ชันน้อยมาก ทั้งนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการป้องกันไม่ให้ยีน *hsp70* เปลี่ยนแปลงจากการเกิดอินเวอร์ชันของโครโมโซมเนื่องจากยีนดังกล่าวมีบทบาทสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต

ตำแหน่งของยีน *hsp70* ในหนอนแดง *C. circumdatus* พบว่าอยู่ในตำแหน่งเดียวกับที่รายงานในหนอนแดง *C. riparius* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนนี้มีการเคลื่อนย้ายตำแหน่งน้อยมาก อาจเป็นผลจากความสำคัญของยีนนี้ต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากผลผลิตของยีน *hsp70* มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ในเซลล์

#### 4.2 การระบุตำแหน่งของยีน 18S rRNA บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำและหนอนแดง

ยีน 18S rRNA เป็นยีนที่สร้าง ribosomal RNA เพื่อเป็นองค์ประกอบของไรโบโซม ยีนนี้มีความอนุรักษ์สูง โดยพบความแปรผันต่ำมากในแมลงวันดำ รวมถึงแมลงชนิดอื่นๆ แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาในแมลงอันดับดิบเทอร่าหลายชนิด เช่น ยุงสกุล *Anopheles* (Marchi and Pili 1994) และสกุล *Aedes* (Kumar and Rai 1990) ในแมลงวันดำยังไม่มีรายงานการระบุตำแหน่งของยีน 18S rRNA บนโพลีทีนโครโมโซม แต่มีข้อสันนิษฐานว่ายีน 18S rRNA อยู่บริเวณ nucleolar organizer (NOR) บนโพลีทีนโครโมโซมซึ่งสังเกตได้ชัดเจนจากการคลายตัวของสายดีเอ็นเอในระยะที่ตัวอ่อนระยะรองสุดท้าย (penultimate larva) หรือระยะสุดท้าย (mature larva) ก่อนเปลี่ยนแปลงเป็นดักแด้ (pupa) (Adler et al. 2004) ผลการศึกษาการระบุตำแหน่งของยีน 18S rRNA พบว่ามีตำแหน่งบริเวณ nucleolar organizer (NOR) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่พบว่าตำแหน่งของยีน rRNA เช่น 18S rRNA, 28S rRNA มีตำแหน่งบริเวณ NOR หรือใกล้กับ NOR (Ramirez and Sincliar 1975; Karpen et al. 1988) ตำแหน่งของ 18S rRNA บนโพลีทีนโครโมโซมของ *C. circumdatus* อยู่บน NOR เช่นเดียวกับที่พบในแมลงวันดำ โดยมีตำแหน่งอยู่โครโมโซม G ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในแมลงวันดำ *S. aureohirtum* และแมลงชนิดอื่นๆ ในอันดับดิบเทอร่า ที่พบว่ายีน 18S rRNA มีตำแหน่งอยู่บน NOR

#### 4.3 แผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม RAPD บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำ

ข้อมูลจากการศึกษาการระบุตำแหน่งของยีนและตำแหน่งของเครื่องหมายทางพันธุกรรมระดับอนุพันธุศาสตร์บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาต่าง ๆ เช่น การคัดเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากร โดยเลือกจากตำแหน่งของเครื่องหมายทางพันธุกรรมบนโพลีทีนโครโมโซม ตัวอย่างเช่น Sharakhov et al. (2004) ใช้เทคนิค FISH ในการระบุตำแหน่งของ microsatellite marker บนแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของยุง *Anopheles funestus* เพื่อใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการคัดเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรที่เหมาะสม ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันบนโครโมโซมได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่าง เช่น การคัดเลือกโดยธรรมชาติ แตกต่างกัน Laayouni et al. (2003) ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาด้วยการระบุตำแหน่งของเครื่องหมายทางพันธุกรรมบนโพลีทีนโครโมโซมโดยใช้ RAPD marker ที่อยู่ภายในอินเวอร์ชัน 2j ในแมลงหวี่ *Drosophila buzzatii* ซึ่งเป็นอินเวอร์ชันที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญพัฒนาและขนาดของตัวเต็มวัยของแมลงหวี่ชนิดดังกล่าว จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมภายในอินเวอร์ชันพบว่าสามารถระบุอายุของอินเวอร์ชัน และอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถเชื่อมโยงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดอินเวอร์ชันกับการปรับตัว และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ Frydenberg et al. (2003) ศึกษาความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน heat shock gene (*hsp*) ในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* ซึ่งการศึกษาระบุ

ตำแหน่งของยีนโดยเทคนิค FISH พบว่าอยู่ภายในอินเวอร์ชัน In(3L)P (Wesley and Eanes 1994) ซึ่งเป็นอินเวอร์ชันที่มีความถี่สัมพันธ์กับละติจูด (Latitudinal cline) ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *hsp26* และ *hsp27* ที่อยู่ภายในอินเวอร์ชันเป็นผลมาจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติ

ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถระบุตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD 2 ตำแหน่ง คือ DNA probe ขนาด 400 bp และ 900 bp โดยเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD ขนาด 400 bp สามารถระบุตำแหน่งบนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำ 2 สปีชีส์ คือ *S. aureohirtum* และ *S. fenestratum* โดยพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 แขนข้างยาวของ *S. aureohirtum* ขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรมขนาด 900 bp สามารถระบุตำแหน่งได้บนโครโมโซมของ *S. aureohirtum* เท่านั้น จากการเปรียบเทียบตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมขนาด 400 bp บนโพลีทีนโครโมโซมของ *S. aureohirtum* กับแผนที่มาตรฐานโพลีทีนโครโมโซมของสปีชีส์ (Pramual et al. 2008) พบว่าตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมขนาด 400 bp ไม่อยู่ในอินเวอร์ชัน ดังนั้นควรศึกษาเปรียบเทียบกับแมลงวันดำสปีชีส์อื่นๆ เพิ่มเติม

#### 4.4 เชลล์พันธุศาสตร์และวิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ของแมลงวันดำ *Simulium angulistylum*

แมลงวันดำที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์กว้างขวาง และพบในแหล่งอาศัยที่มีความหลากหลายทางนิเวศวิทยามีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นสปีชีส์ซับซ้อน (species complex) (Adler and McCreadie 1997) การศึกษาเชลล์พันธุศาสตร์ของแมลงวันดำ *S. angulistylum* ก่อนหน้าไม่พบว่า *S. angulistylum* เป็นสปีชีส์ซับซ้อน (Kuvangkadilok et al. 2003) ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนประชากรที่ศึกษาน้อยเพียง 3 ประชากรเท่านั้น ผลการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งเก็บตัวอย่างจากทั่วประเทศไทยพบว่า *S. angulistylum* ประกอบด้วย 3 cytoforms ได้แก่ *S. angulistylum* cytoform A, B และ C โดย cytoforms มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ cytoform B พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง cytoform C พบในจังหวัดเลยเท่านั้น ขณะที่ cytoform A พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ นอกจากนี้ยังพบว่า cytoforms ของ *S. angulistylum* มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย โดย cytoform C พบในแหล่งอาศัยที่ระดับความสูงเกินกว่า 1000 เมตร จากระดับน้ำทะเล ขณะที่ cytoform A และ B พบในแหล่งอาศัยที่ระดับความสูงต่ำกว่า 600 เมตร จากระดับน้ำทะเล ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความสูงจากระดับน้ำทะเลของแหล่งอาศัยเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรของแมลงวันดำในประเทศไทย (Pramual and Nanork 2012) ผลการศึกษาที่พบว่า *S. angulistylum* เป็นสปีชีส์ซับซ้อนสอดคล้องกับระดับความแปรผันทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม DNA barcode ที่พบว่ามีค่าสูงสุด 5.8% (Pramual et al. 2011) ซึ่งเป็นค่าความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบในแมลงวันดำกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนในภูมิภาคอเมริกาเหนือ (Rivera and Currie 2009)

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สนับสนุนการแบ่งแยกของ cytoforms โดยระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง cytoforms มีค่าระหว่าง 2.6% -

3.1% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม DNA barcode ที่ระดับ 3% (Hebert et al. 2003) โดย cytoform C มีความแตกต่างจาก cytoform อื่นๆ มากที่สุด เนื่องจากแตกต่างจาก cytoform A จากการเกิดอินเวอร์ชันความถี่ครั้งที่ 2 รูปแบบ และแตกต่างจาก cytoform B โดยอินเวอร์ชันความถี่ครั้งที่ 1 รูปแบบ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของ cytoform C กับ cytoforms อื่นๆ พบว่ามีค่า  $F_{ST}$  สูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเกือบทุกคู่ประชากร นอกจากนี้การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ ยังพบว่าแฮพโลไทป์ของ cytoform C เกือบทั้งหมดเกาะกลุ่มด้วยกัน บ่งชี้ว่ามีการเกิดยีนโฟลวระหว่าง cytoform C กับ cytoform อื่นๆ ในอัตราที่ต่ำมาก

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง cytoform C กับ cytoform อื่นๆ อาจเป็นผลจากความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย แม้ว่าประชากรของ cytoform C จะไม่แบ่งแยกจากประชากรอื่นๆ อย่างชัดเจนแต่ประชากรของ cytoform C แตกต่างทางนิเวศวิทยาจากประชากรอื่นๆ อย่างมาก โดยประชากรของ cytoform C อาศัยในแหล่งน้ำไหลที่ระดับความสูงมากกว่า 1000 เมตรจากระดับน้ำทะเล ขณะที่ประชากรของ cytoform อื่นๆ พบในแหล่งอาศัยที่ระดับความสูงน้อยกว่า 600 เมตร จากระดับน้ำทะเล ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในแมลงวันตำชนิดอื่นๆ ที่พบว่าความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรและอาจนำไปสู่การแตกแขนงของสปีชีส์ในแมลงวันตำ (Joy et al. 2007; Pramual et al. 2005; Pramual and Nanork 2012)

#### 4.5 สรุปผลการศึกษา

การศึกษาดังนี้สามารถระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* ยีน 18S rRNA และเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD โดยวิธีการ Fluorescence In situ Hybridization (FISH) บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันตำและหนอนแดง *C. circumdatus* ได้ โดยยีน *hsp70* มีตำแหน่งบนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันตำ *S. aureohirtum* แห่งที่ 2 แขนข้างยาว (IIL) และบริเวณแขน A ของหนอนแดง *C. circumdatus* ตำแหน่งของยีน 18S rRNA อยู่บน nucleolar organizer (NO) ของโพลีทีนโครโมโซมของ *S. aureohirtum* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแขนข้างยาวแห่งที่ 1 (IL) และ *C. circumdatus* ซึ่งอยู่บนโครโมโซม G การสร้างแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม RAPD สามารถระบุตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD 2 ตำแหน่ง คือเครื่องหมาย RAPD ขนาด 400 bp และขนาด 900 bp โดยเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD ขนาด 400 bp มีตำแหน่งบนโครโมโซมแห่งที่ 1 แขนข้างยาว (IL) ของ *S. aureohirtum* สำหรับโพลีทีนโครโมโซมของ *S. fenestratum* พบว่า DNA probe hybridized บนโพลีทีนโครโมโซมแต่ไม่สามารถระบุตำแหน่งได้ เนื่องจากการกระจายของโพลีทีนโครโมโซมไม่ดี เช่นเดียวกับ RAPD ขนาด 900 bp การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงวันตำ *S. angulistylum* พบว่าเป็นสปีชีส์ซับซ้อนประกอบด้วย 3 cytoforms ได้แก่ cytoform A, B และ C โดยแต่ละ cytoform มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยและความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับอนุพันธุศาสตร์ จากการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I (COI)

#### 4.6 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* เพิ่มเติมในแมลงรืนดำสปีชีส์อื่นๆ โดยเฉพาะสปีชีส์ที่พบในแหล่งอาศัยที่มีปัจจัยทางนิเวศวิทยาแตกต่างจาก *S. aureohirtum*
2. ควรศึกษายีน *hsp70* ในหนอนแดงสปีชีส์อื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบกับยีน *hsp70* ใน *C. circumdatus*
3. ควรศึกษาแผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม RAPD เพิ่มเติมในแมลงรืนดำ *S. aureohirtum* และ *S. angulistylum* เนื่องจากแมลงรืนดำทั้ง 2 สปีชีส์ มีความแปรผันทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมสูง แผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม RAPD จะสามารถนำไปศึกษาเปรียบเทียบบทบาทและความสำคัญของความแปรผันของโครโมโซมต่อการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำ

## เอกสารอ้างอิง

- Adler PH, Currie DC, Wood DM (2004) *The Black Flies (Simuliidae) of North America*. Cornell University Press, USA.
- Adler PH, McCreadie JW (1997) The hidden ecology of black flies; sibling species and ecological scale. *American Entomology* 43: 153 – 162.
- Anderson AR, Collinge JE, Hoffmann AA, Kellett M, McKechnie SW (2003) Thermal tolerance tradeoffs associated with the right arm of chromosome 3 and marked by the *Hsr-omega* gene in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 90:195 – 202.
- Boakye DA, Cornel AJ, Meredith SE, Brakefield PM, Collins FH (2000) DNA in situ hybridization on polytene chromosome of *Simulium sanctipauli* at loci relevant to insecticide resistance. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 217 – 222.
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Reviews of Physiology*, 61: 243 – 282.
- Frydenberg J, Hoffmann AA, Loeschcke V (2003) DNA sequence variation and latitudinal associations in hsp23, hsp26 and hsp27 from natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 12: 2025 – 2032.
- Gabai VL, Sherman MY (2002) Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *Journal of Applied Physiology* 92:1743 – 1748.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1512): 313 – 321.
- Jitklang S, Kuvangkadilok C, Baimai V, Takaoka H, Adler PH (2008) Cytogenetics and morphotaxonomy of the *Simulium (Gomphostilbia) ceylonicum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa* 1971: 1 – 28.
- Joy DA, Craig DA, Conn JE (2007) Genetic variation tracks ecological segregation in Pacific island black flies. *Heredity* 99: 452 – 459.
- Karpen GH, Schaefer JE, Laird CD (1988) A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes & Development* 2: 1754 – 1763.
- Kumar A, Rai K (1990) Chromosomal localization and copy number of 18S + 28S ribosomal RNA genes in evolutionary diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Hereditas* 113: 277 – 289.

- Kuvangkadilok C, Boonkemtong C, Phayuhasena S, Baimai V (2003) Larval polytene chromosome of black flies (*Simulium*) of Thailand. I. Comparison among five species in the subgenus *Gomphostilbia* Enderlein. *Genetica* 118: 69 – 81.
- Kuvangkadilok C, Lualon U, Baimai V. (2008) Cytotaxonomy of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Genome* 51: 972 – 987.
- Laayouni H, Hasson E, Santos M, Fontdevila A (2003) The evolutionary history of *Drosophila buzatii*. XXXV. Inversion polymorphism and nucleotide variability in different regions of the second chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 20: 931-944.
- Marchi A, Pili E (1994) Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Heredity* 72: 599 – 605.
- Morales M, Planelló Martínez-Paz P, Herrero O, Cortés E, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2011) Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 153: 150 – 158.
- Niimi T, Sahara K, Oshima H, Yasukoshi Y, Ikeo K, Traut W (2006) Molecular cloning and chromosomal localization of the Bombyx Sex-lethal gene. *Genome* 49: 263 – 268.
- Philips MA, Martin J, Bedo DG (1994) In situ hybridisation to polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* and other dipteran species. *In: Methods in Molecular Biology: In Situ Hybridisation Protocols* (ed Darby IA). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Pramual P, Kuvangkadilok C, Baimai V, Walton C (2005) Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology* 14, 3989 – 4001.
- Pramual P, Nanork P (2012) Phylogenetic analysis based on multiple gene sequences revealing cryptic biodiversity in *Simulium multistriatum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomological Science* 15: 202 – 213.
- Pramual P, Wongpakam K, Adler PH (2011) Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). *Genome* 54: 1 – 9.
- Pramual P, Wongpakam K, Kuvangkadilok C (2008) Cytogenetics of black fly *Simulium aureohirtum* Brunetti from Thailand. *Cytologia* 73: 293 – 304.
- Ramirez SA, Sinclair JH (1975) Ribosomal gene localization and distribution (arrangement) within the nucleolar organizer region of *Zea mays*. *Genetics* 80: 505 – 518.
- Rivera J, Currie DC (2009) Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources* 9: 224 – 236.

- Rothfels KH, Dunbar RW (1953) The salivary gland chromosomes of the black fly *Simulium vittatum* Zett. *Canadian Journal of Zoology* 31(3): 226 – 241.
- Sharakhov I, Braginets GO, Cohuet A, Guelbeogo WM, Boccolini D, Weill M, Costantini C, Sagnon N’F, Fontenille D, Yan G, Besansky NJ (2004) A microsatellite map of the African human malaria vector *Anopheles funestus*. *Journal of Heredity* 95: 29 – 34.
- 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.
- Takaoka H (1979) The blackflies of Taiwan (Diptera: Simuliidae). *Pacific Insects* 20: 365 – 403.
- Takaoka H, Choochote W (2004) A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Tropical Medicine and Health* 32: 189 – 197.
- Takaoka H, Davies DM (1995) *The blackflies (Diptera:Simuliidae) of west Malaysia*. Kyushu University Press, Fukuoka, Japan.
- Takaoka H, Saito K (1996) A new species and new records of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27: 189 – 194.
- Takaoka H, Suzuki H (1984) The black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Sanitary Zoology* 35: 7 – 45.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512 – 526.
- Wesley CS, Eanes WF (1994) Isolation and analysis of the breakpoint sequences of chromosome inversion In(3L)Payne in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3132 – 3136.
- Yoshimi T, Odagiri K, Hiroshige Y, Yokobori S, Takahashi Y, Sugaya Y, Miura T (2009) Induction profile of HSP70-cognate genes by environmental pollutants in Chironomidae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28: 294 – 301.

## Output จากโครงการวิจัย

### 1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ผลจากการดำเนินงานโครงการวิจัยเรื่อง แผนที่เครื่องหมายพันธุกรรม Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และการระบุตำแหน่งยีน *hsp70* และ *sx1* บนโพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง ได้แก่

1. **Pairot Pramual**, Chaliow Kuvangkadilok (2012) Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium (Gomphostilbia) angulistylum* Takaoka & Suzuki (Diptera: Simuliidae). **Genome**. DOI: 10.1139/g2012-031  
วารสารระดับนานาชาติในฐานข้อมูล ISI มีค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2010 = 1.662
2. **Pairot Pramual**, Chaliow Kuvangkadilok, Sanae Jitklang, Ubon Tangkawanit, Peter H. Adler (2012) Geographical versus ecological isolation of closely related black flies (Diptera: Simuliidae) inferred from phylogeny, geography, and ecology. **Organisms Diversity and Evolution**. DOI: 10.1007/s13127-012-0092-4  
วารสารระดับนานาชาติในฐานข้อมูล ISI มีค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2010 = 1.581

## 2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการดำเนินงานโครงการนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงวิชาการ ได้แก่ การพัฒนาการเรียนการสอน โดยนำองค์ความรู้จากการวิจัยไปใช้ในการเรียนการสอนรายวิชาพันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์ประชากร และวิวัฒนาการ ให้แก่นิสิตระดับปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม นอกจากนี้ยังสามารถสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ จำนวน 8 คน ซึ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาตรีที่ทำโครงการทางชีววิทยาเรื่อง เซลล์พันธุศาสตร์ของหนอนแดง เซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงวันดำ *Simulium angulistylum* และการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD เพื่อระบุชนิดของแมลงวันดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium multistriatum* ในประเทศไทย

## 3. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

-

## ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 2 เรื่อง

1. **Pairot Pramual**, Chaliow Kuvangkadilok (2012) Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium (Gomphostilbia) angulistylum* Takaoka & Suzuki (Diptera: Simuliidae). **Genome**. DOI: 10.1139/g2012-031  
วารสารระดับนานาชาติในฐานข้อมูล ISI มีค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2010 = 1.662
2. **Pairot Pramual**, Chaliow Kuvangkadilok, Sanae Jitklang, Ubon Tangkawanit, Peter H. Adler (2012) Geographical versus ecological isolation of closely related black flies (Diptera: Simuliidae) inferred from phylogeny, geography, and ecology. **Organisms Diversity and Evolution**. DOI: 10.1007/s13127-012-0092-4  
วารสารระดับนานาชาติในฐานข้อมูล ISI มีค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2010 = 1.581

## บทความสำหรับการเผยแพร่

### ยีน *hsp70* กับการพัฒนาเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อตรวจสอบ การปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำ

ระยะตัวอ่อนของแมลงวันดำและหนอนแดงซึ่งเป็นระยะตัวอ่อนของรึ้นน้ำจืดอาศัยในแหล่งน้ำที่หลากหลาย แมลงทั้ง 2 กลุ่มจัดเป็นแมลงน้ำที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศแหล่งน้ำจืดเนื่องจากมีจำนวนมากในแหล่งอาศัยแต่ละแห่ง ตัวอ่อนแมลงวันดำและหนอนแดงจึงเป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืด ระยะตัวอ่อนของแมลงน้ำทั้ง 2 กลุ่มสามารถพบได้ในแหล่งน้ำที่มีความหลากหลายทางนิเวศวิทยา ดังนั้นแมลงกลุ่มนี้จึงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแหล่งน้ำได้

ปัจจุบันการประยุกต์ใช้สิ่งมีชีวิตเพื่อเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพของแหล่งน้ำมีการศึกษาในเชิงลึกมากขึ้น นอกเหนือจากการใช้ความหลากหลายของสปีชีส์ปัจจุบันยังมีการศึกษาในระดับเซลล์พันธุศาสตร์ อนุพันธุศาสตร์ และอณูชีววิทยา เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาคุณภาพของแหล่งน้ำ เช่น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม การแสดงออกของยีน รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานวิทยา ของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำจากการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี หรือการปนเปื้อนสารพิษ และโลหะหนักในแหล่งน้ำ

ยีน *hsp70* เป็นยีนที่สร้างโปรตีนซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตในสภาวะกดดัน เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ การปนเปื้อนโลหะหนัก สารปราบศัตรูพืช ยาฆ่าแมลง การศึกษาวิจัยพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* มีความสัมพันธ์กับระดับการปนเปื้อนของสารเคมีในแหล่งน้ำ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้ระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* เป็นดัชนีชี้วัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแหล่งน้ำ หรือการปนเปื้อนสารพิษต่างๆในแหล่งน้ำ

แมลงวันดำ *Simulium aureohirtum* และหนอนแดง *Chironomus circumdatus* มีการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางในประเทศไทย สามารถพบในแหล่งน้ำที่มีปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่หลากหลาย การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในแมลงทั้ง 2 ชนิดพบว่าการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมซึ่งสัมพันธ์กับค่าปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย ดังนั้นการที่สามารถระบุตำแหน่งของยีน *hsp70* บนโครโมโซมของแมลงทั้ง 2 ชนิด จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยในอนาคตเพื่อประยุกต์ใช้กลไกการตอบสนองของยีน *hsp70* ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม การปนเปื้อนสารพิษ หรือโลหะหนักในแหล่งน้ำ

# Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium (Gomphostilbia) angulistylum* (Diptera: Simuliidae)

Pairot Pramual and Chaliow Kuvangkadilok

**Abstract:** An integrated approach based on cytogenetics, molecular genetics, and ecology was used to examine diversity in the black fly *Simulium angulistylum* Takaoka & Davies in Thailand. Cytological analysis revealed three cytoforms (A, B, and C) of *S. angulistylum* differentiated by fixed chromosome inversions. Distributions of these cytoforms were associated with ecology. Cytoforms A and B were found in low-altitude habitats (<600 m above sea level), whereas cytoform C occurred at high altitudes (>1000 m above sea level). Mitochondrial DNA sequences of the cytochrome oxidase subunit I barcoding region revealed significant genetic differentiation among the cytoforms. The mitochondrial DNA haplotype network revealed divergent lineages within cytoforms, indicating additional hidden diversity. Therefore, integrated approaches are necessary for fully understanding black fly biodiversity. Population genetic analysis revealed high genetic structuring that could be due to the habitat preferences of *S. angulistylum*. Phylogeographic analyses indicated population demographic expansion at the mid-Pleistocene (900 000 years ago), which is older than for other black flies and insects in the Southeast Asian mainland. The high level of genetic structure and diversity, therefore, could also be due to the long demographic history of *S. angulistylum*.

**Key words:** black fly, cytogenetic, phylogeography, *Simulium*, species complex.

**Résumé :** Une approche intégrée faisant appel à la cytogénétique, la génétique moléculaire et l'écologie a été employée pour examiner la diversité chez la mouche noire *Simulium angulistylum* Takaoka & Davies en Thaïlande. Les analyses cytologiques ont révélé l'existence de trois cytoformes (A, B ou C) du *S. angulistylum* se distinguant par trois inversions chromosomiques fixées. La distribution de ces cytoformes était liée à l'écologie. Les cytoformes A et B étaient retrouvées dans des habitats de faible altitude (<600 m au-dessus de la mer), tandis que la cytoforme C était présente en altitude élevée (>1000 m au-dessus de la mer). Les séquences d'ADN mitochondrial au sein de la sous-unité I de la cytochrome oxydase, une région utilisée comme code-barre, a révélé une différenciation génétique significative entre les cytoformes. Le réseau formé par les différents haplotypes d'ADN mitochondrial révélait des lignages divergents au sein des cytoformes, indiquant une diversité additionnelle cachée. Ainsi, des approches intégrées s'avèrent nécessaires pour pleinement caractériser la biodiversité chez les mouches noires. Des analyses de génétique des populations ont révélé une forte structuration qui pourrait découler des préférences du *S. angulistylum* en matière d'habitat. Des analyses phylogéographiques ont indiqué une expansion démographique au milieu du pléistocène (il y a 900 000 ans), ce qui est plus ancien que ce qui a été observé pour d'autres mouches noires ou insectes en Asie du Sud-Est. Les hauts niveaux de structuration et de diversité génétiques pourraient également découler de la longue histoire démographique du *S. angulistylum*.

**Mots-clés :** mouche noire, cytogénétique, phylogéographie, *Simulium*, complexe d'espèces.

[Traduit par la Rédaction]

## Introduction

Black flies are difficult to identify morphologically because of their structural homogeneity (Crosskey 1990). Cytogenetic study using the banding patterns of the polytene chromosomes has long been used in the taxonomy of black

flies (Rothfels 1979). Cytological sibling species can be recognized using three criteria: (i) fixed-chromosome inversion differences, (ii) differences in sex chromosome, and (iii) differences in autosomal inversion frequencies (Rothfels 1979). The major limitations of cytogenetic study are that it requires skilled people and typically is workable only for the larval

Received 13 February 2012. Accepted 10 May 2012. Published at www.nrcresearchpress.com/gen on xx May 2012.

Paper handled by Associate Editor A. Civetta.

**P. Pramual.** Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150 Thailand.

**C. Kuvangkadilok.** Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Phayathai, Bangkok 10400 Thailand.

**Corresponding author:** Pairot Pramual (e-mail: pairot.p@msu.ac.th).

stage. Recently, DNA sequences (i.e., DNA barcodes) have been incorporated into black fly taxonomy. For example, Rivera and Currie (2009) used DNA barcoding to differentiate North American black fly morphospecies. Pramual et al. (2011b) reported DNA barcoding in the Oriental black fly subgenus *Gomphostilbia*. Although DNA barcodes have successfully delineated morphological species (Day et al. 2008; Rivera and Currie 2009), the success rate was low for species complexes (Pramual et al. 2011a). Therefore, integrated approaches (e.g., Ilmonen et al. 2009) are needed for fully understanding black fly biodiversity (Adler and Huang 2011).

There are 88 morphologically described species of black flies in Thailand (Adler and Crosskey 2011). Cytogenetic study is useful in distinguishing morphologically closely related species (Phasuk et al. 2005; Jitklang et al. 2008; Tangkawanit et al. 2009). Some morphological species are composed of several cytological sibling species. For example, *Simulium tani* and *S. doipuiense* are composed of 10 and 2 cytoforms, respectively, (Tangkawanit et al. 2009) and *S. siamense* is composed of 7 cytoforms (Kuvangkadilok et al. 2008; Pramual and Wongpakam 2011). Although these studies indicate the importance of cytogenetics for black fly taxonomy, only 18 of 88 species in Thailand have been cytologically examined. DNA barcodes have been used to differentiate morphological species of black flies in Thailand. The results indicate that this method could be used successfully to differentiate morphologically distinct species and to reveal cryptic diversity (Pramual et al. 2011b; Pramual and Nanork 2012), but it can fail to delineate cytological sibling species (Pramual et al. 2011a).

*Simulium angulistylum* Takaoka & Davies was morphologically assigned to the *Simulium batoense* species group of the subgenus *Gomphostilbia* (Takaoka and Davies 1995). This species is geographically widespread throughout Thailand and Malaysia (Adler and Crosskey 2011). A previous cytogenetic study presented polytene chromosome maps for this species (Kuvangkadilok et al. 2003). In addition, a previous DNA barcoding study found high intraspecific genetic divergence (maximum value 5.2% based on Kimura's 2-parameter model), suggesting that this morphospecies could be a species complex (Pramual et al. 2011b). We used an integrated approach, based on cytogenetic, molecular genetics, and ecology, to examine the diversity of *S. angulistylum* in Thailand.

## Materials and methods

### Sample collections and species identification

Black fly larvae were collected from nine locations throughout Thailand (Table 1; Fig. 1). Samples were randomly collected from multiple substrates along each stream, with only one or two larvae being taken from the same substrate to avoid potential sampling of sibling individuals. Samples were fixed in Carnoy's solution (95% ethanol – glacial acetic mixture of 3:1 (v/v)) and were used for both cytogenetic and molecular analyses, as described by Pramual et al. (2005, 2011b). Stream variables including altitude, stream width, depth, velocity, pH, water conductivity, streambed particle sizes, canopy cover, and riparian vegetation were recorded. *Simulium angulistylum* was morphologically identified using the description of Takaoka and Davies (1995). Polytene chromosomes were prepared from penulti-

mate instar larvae, following the Feulgen method of Rothfels and Dunbar (1953).

Because a standard polytene chromosome map for the entire subgenus *Gomphostilbia* was not available, chromosome sections were numbered following the standard map for the closely related *Simulium ceylonicum* species group (Jitklang et al. 2008). We also compared the chromosome banding sequences with the standard map for *S. siamense*, a closely related species in the *Simulium batoense* group. The polytene chromosome map for *S. angulistylum* presented by Kuvangkadilok et al. (2003) was arbitrarily chosen as the standard map for the species.

### DNA extraction, amplification, and sequencing

DNA was extracted from the anterior portion of each larva, following the method described by Pramual et al. (2011b). A fragment of the cytochrome oxidase subunit I (COI) barcoding region was amplified using the primer LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Hebert et al. 2003). PCR conditions described by Rivera and Currie (2009) were used. PCR products were checked on a 1% agarose gel and cleaned using HiYield Gel/PCR fragment Extraction Kit (RBC BioScience, Xindian City, Taiwan). Cleaned PCR products were sequenced using the same primers as in the PCR by Macrogen sequencing service (Seoul, Korea).

### Data analysis

DNA sequences were trimmed to a final length of 586 bp. Sequences were aligned using Clustal X (Thompson et al. 1997). Haplotypes were identified by DnaSP (Rozas et al. 2003) and were deposited in GenBank under accession numbers HM775234–HM775241 and JQ619907–JQ619931. Haplotype diversity ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were estimated in Arlequin ver. 3.5 (Excoffier and Lischer 2010), using the best fit model (TrN (Tamura and Nei 1993)), with proportion of invariant site (I) of 0.830 selected by jModel-test ver. 0.1.1 (Posada 2008). Intraspecific sequence divergences, based on the best fit model, were calculated for unique COI sequences by MEGA 4 (Tamura et al. 2007). A median joining (MJ) network was calculated using NETWORK ver. 4.6.1.0 (www.fluxus-engineering.com).

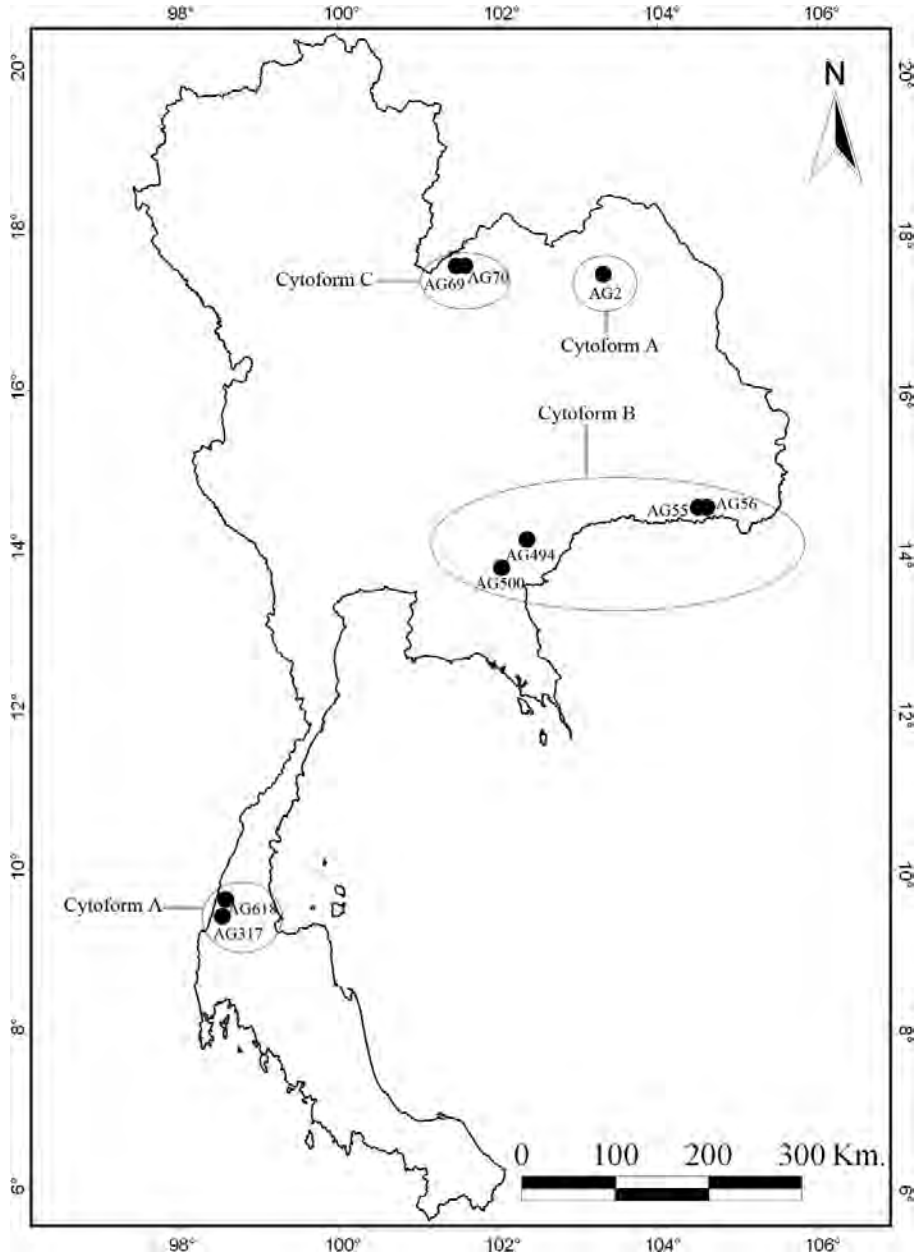
Genetic structure was estimated by means of population pairwise  $F_{ST}$  and AMOVA analysis. Populations were grouped according to cytoforms and geographic origins. The significance of test statistics was obtained by 1000 permutations. Both population pairwise  $F_{ST}$  and AMOVA analyses were performed in Arlequin. The program SAMOVA (Dupanloup et al. 2002) was also used to find grouping structure based on the level of genetic differentiation. SAMOVA uses a simulated annealing procedure to find the best grouping structure (highest  $F_{CT}$  value), based on a priori number of groups ( $k$ ). SAMOVA was run using 100 simulated annealing processes for  $k = 2$  to 6, and the grouping structure that achieved the highest  $F_{CT}$  was retained as the best grouping structure. Relationships between genetic distance ( $F_{ST}$  from AREQUIN) and geographic distance (log km) (i.e., isolation by distance model) were assessed using the Mantel (1967) test. The Mantel test was implemented in IBD ver. 1.52 (Bonhok 2002), using 1000 randomizations.

Mismatch distribution was used to test the signature of

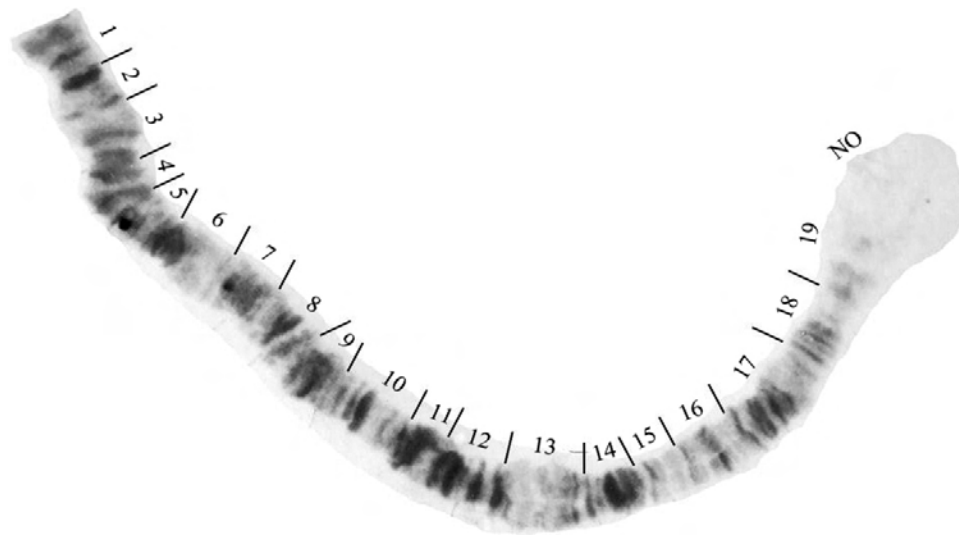
**Table 1.** Collection sites and number of sequences for *Simulium angulistylum* from Thailand.

| Location                              | Code  | Geographic region | Latitude, longitude | Altitude (m) | N | Collection date | Cytoform |
|---------------------------------------|-------|-------------------|---------------------|--------------|---|-----------------|----------|
| Ban Dong Sawang, Sakon Nakhon         | AG2   | Northeast         | 17°07'N, 103°38'E   | 330          | 5 | 11 Nov. 2006    | A        |
| Khao Pra Na Rai waterfall, Ranong     | AG317 | South             | 09°36'N, 98°35'E    | 110          | 5 | 15 Jul. 2003    | A        |
| Ton Phet waterfall, Ranong            | AG618 | South             | 09°43'N, 98°36'E    | 117          | 5 | 13 Dec. 2006    | A        |
| Hewsuwat waterfall, Nakhon Ratchasima | AG494 | Northeast         | 14°19'N, 101°21'E   | 600          | 5 | 20 Nov. 2004    | B        |
| Pangsida waterfall, Srakeaw           | AG500 | Central           | 13°58'N, 102°15'E   | 250          | 5 | 21 Dec. 2004    | B        |
| Wang Yai waterfall 1, Sisaket         | AG55  | Northeast         | 14°29'N, 104°32'E   | 202          | 2 | 29 Sep. 2007    | B        |
| Wang Yai waterfall 2, Sisaket         | AG56  | Northeast         | 14°26'N, 104°29'E   | 200          | 5 | 29 Sep. 2007    | B        |
| Hinsamchan waterfall, Loei            | AG69  | Northeast         | 17°30'N, 104°49'E   | 1153         | 5 | 14 Oct. 2007    | C        |
| Huai Toei waterfall, Loei             | AG70  | Northeast         | 17°30'N, 104°49'E   | 1153         | 5 | 14 Oct. 2007    | C        |

**Fig. 1.** Collection sites of nine populations of *Simulium angulistylum* from Thailand. Circumscribed areas indicate approximate known geographic distributions of the cytoforms. Details of the sampling locations are given in Table 1.



**Fig. 2.** Chromosome arm IS of *Simulium angulistylum* showing the standard sequence which is identical to *S. siamense* (Kuvangkadilok et al. 2008) and the *S. ceylonicum* group (Jitklang et al. 2008). Sections are numbered according to the *S. ceylonicum* standard map of Jitklang et al. (2008). C, centromere; NO, nucleolar organizer.



population expansion. Populations that had undergone recent past demographic expansion were shown by a unimodal mismatch distribution (Rogers and Harpending 1992). The sum-of-squares deviation and Harpending's raggedness index (Harpending 1994) were used to test deviation from the sudden expansion model. Mismatch distribution was estimated using Arlequin. Fu's  $F_s$  test (Fu 1997) and Tajima's  $D$  (Tajima 1989) statistics were used to test population equilibrium. Large negative values from these tests were expected for the demographics of population expansion.

One-way analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis tests were used to detect mean differences in stream variables among cytoforms. ANOVA was used on continuous variables (altitude, stream width, depth, velocity, discharge, pH, and water conductivity) and the Kruskal-Wallis test was used on the ordinal data (streambed particle sizes, canopy cover, and riparian vegetation).

## Results

### Cytotaxonomic comparisons

A total of 172 larvae were cytologically examined. The polytene chromosomes of our samples were identical to the chromosome map of *S. angulistylum* reported by Kuvangkadilok et al. (2003), although chromosomes II and III in that paper were reversed. The chromosome landmarks (double bubble and ring of Balbiani) on the short arm of chromosome II were also in the same positions as previously reported by Phasuk et al. (2005).

### Chromosome IS

Chromosome IS of *S. angulistylum* (Fig. 2) was identical to the banding sequences of *S. siamense* and the *S. ceylonicum* group.

### Chromosome IL

All individuals of *S. angulistylum* have identical IL banding sequences. Chromosome IL of *S. angulistylum* (Fig. 3) differed from *S. siamense* by fixed inversion IL-*ceylonicum*,

*siamense* and from the *S. ceylonicum* group by fixed inversions IL-*ceylonicum*, *siamense* and IL-*ceylonicum*.

### Chromosome IIS

All members of *S. angulistylum* have identical IIS banding sequences. Chromosome IIS of *S. angulistylum* (Fig. 4) differed from *S. siamense* and *S. ceylonicum* by a complex inversion (IIS-*ceylonicum*, *siamense*) that required several inversions to derive.

### Chromosome IIL

Chromosome IIL of *S. angulistylum* (Fig. 4) differed from *S. ceylonicum* and *S. siamense* standard maps by a complex inversion that required several inversions to derive. There are three additional inversions (IIL-1, IIL-2, and IIL-3) that occurred within populations of *S. angulistylum* on this chromosome arm. IIL-1 reported by Kuvangkadilok et al. (2003) and IIL-3 found in the present study at low frequency (4%) were floating inversions. IIL-2 was a fixed inversion.

### Chromosome IIIS

Chromosome IIIS of *S. angulistylum* (Fig. 5) had identical banding sequences to *S. siamense* but differed from *S. ceylonicum* by one fixed inversion (IIIS-*asakoe*). One fixed inversion (IIIS-1) was found on this chromosome in the populations of *S. angulistylum*.

### Chromosome IIIL

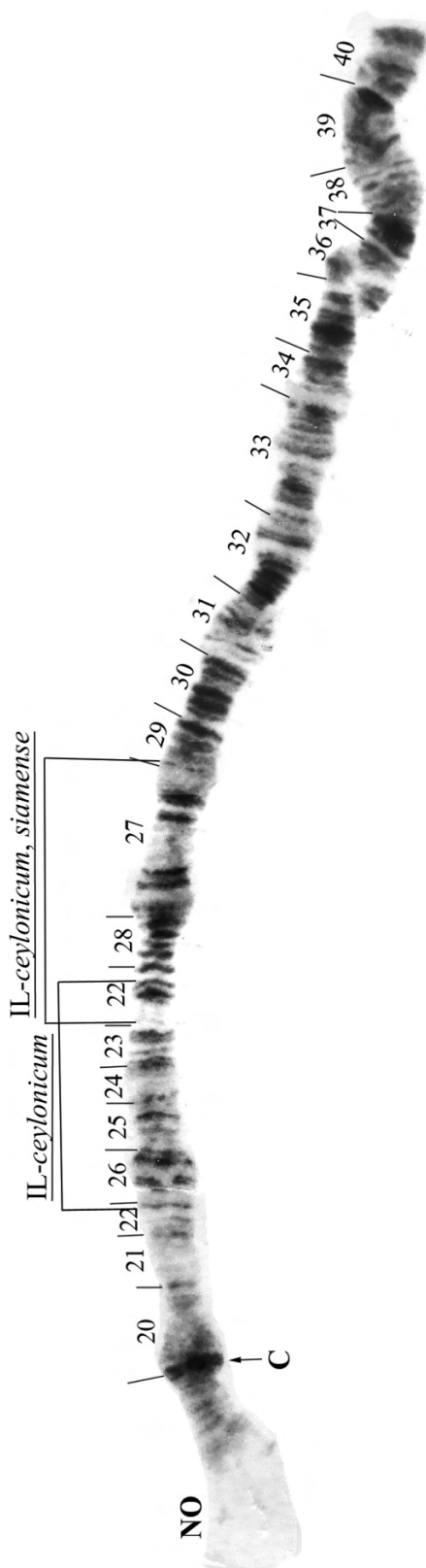
Chromosome IIIL of *S. angulistylum* (Fig. 5) differed by one fixed inversion (IIIL-*siamense*) from *S. siamense* and one fixed inversion from *S. ceylonicum* (IIIL-*asakoe*). A floating inversion (IIIL-1) was reported on this chromosome arm by Kuvangkadilok et al. (2003).

## Characterization of cytoforms of *Simulium angulistylum*

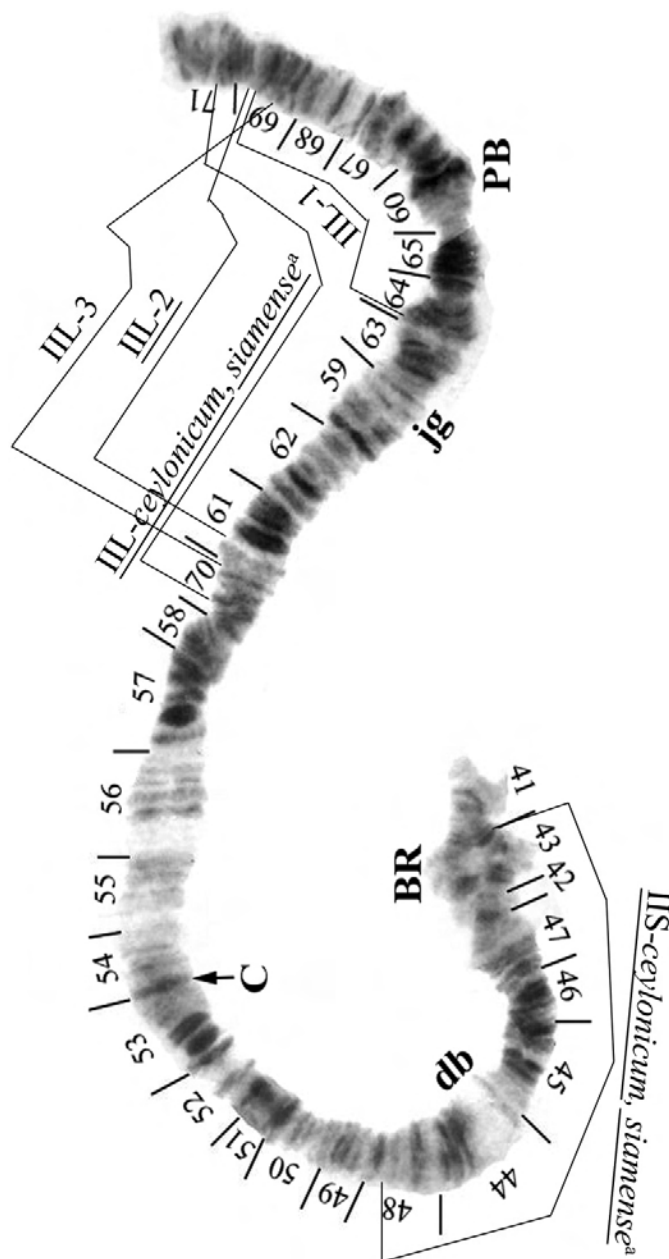
### *S. angulistylum* cytoform A

Cytoform A was characterized by the standard chromosome type and undifferentiated sex chromosomes. Larvae

**Fig. 3.** Chromosome arm IL of *Simulium angulistylum*. Sections are numbered according to the *S. ceylonicum* standard map of Jitklang et al. (2008). Limits of the inversions IL-*ceylonicum* and IL-*ceylonicum*, *siamense* that are fixed between *S. angulistylum* and *S. ceylonicum* and *S. siamense* are indicated by brackets. C, centromere; NO, nucleolar organizer.

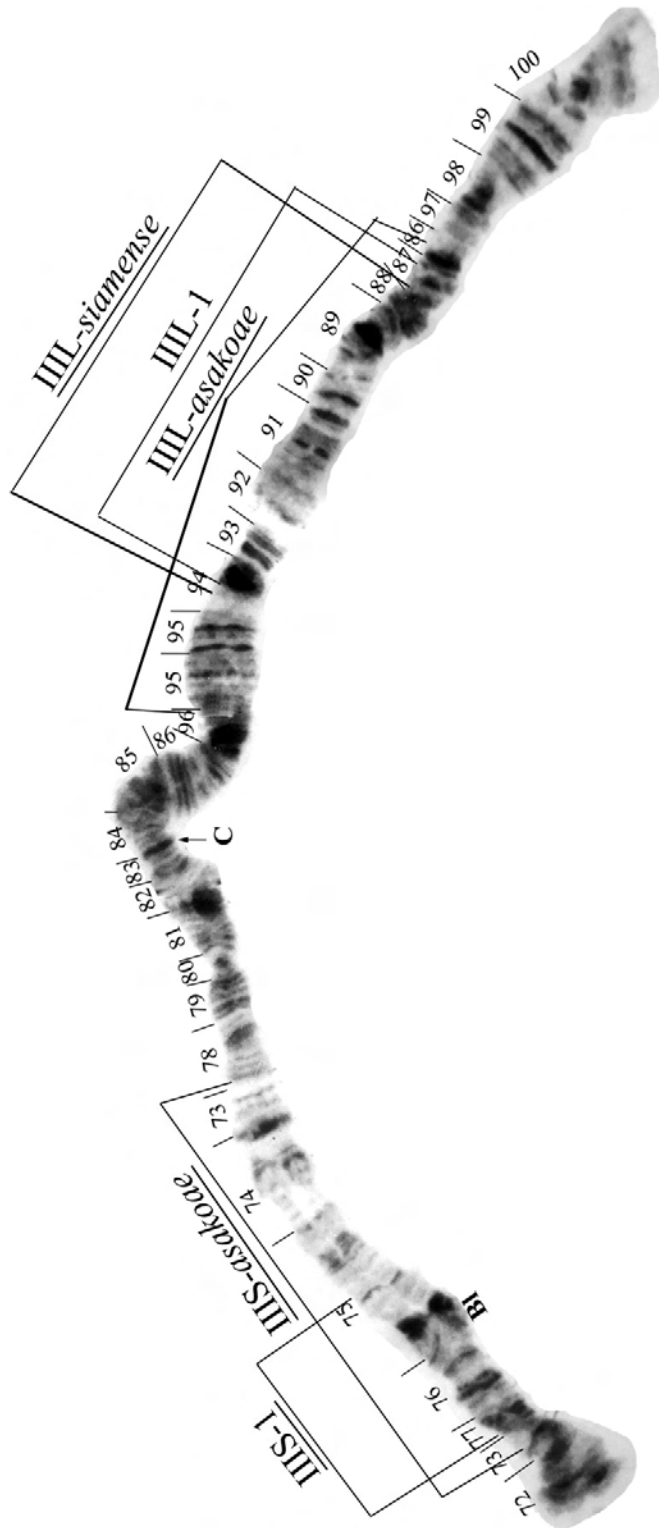


**Fig. 4.** Chromosome II of *Simulium angulistylum*. Sections are numbered according to the *S. ceylonicum* standard map of Jitklang et al. (2008). Fixed inversions are underlined; floating inversions are not. Limits of the inversion IIS-*ceylonicum*, *siamense* that is fixed between *S. angulistylum* and *S. siamense* and *S. ceylonicum* are indicated. Breakpoints of fixed inversion IIL-2 and floating inversions IIL-1 and IIL-3 are indicated by brackets. C, centromere; BR, ring of Balbiani; db, double bubble; jg, jagged group; PB, parabalbiani marker. <sup>a</sup> Represents that the inversion is complexly rearranged.



( $n = 95$ ) were examined from three populations in southern and northeastern areas. We also included two populations from the South (one from Muang Tuad waterfall, Suratthani province, and one from the same location as AG317) reported by Kuvangkadilok et al. (2003), and identified here as cytoform A.

**Fig. 5.** Chromosome III of *Simulium angulistylum*. Sections are numbered according to the *S. asakoe* standard map of Jitklang et al. (2008). Fixed inversions are underlined; floating inversions are not. Limits of the inversions IIS-*asakoe* and IIL-*asakoe* that are fixed between *S. angulistylum* and *S. asakoe* are indicated by brackets. Limits of inversion IIL-*siamense* that is fixed between *S. angulistylum* and *S. siamense* is indicated by the bracket. Break-points of the IIS-1 fixed inversion and IIL-1 floating inversion are indicated by brackets. C, centromere; BI, blister marker.



### *S. angulistylum* cytoform B

Cytoform B was characterized by a fixed inversion on the long arm of chromosome II (IIL-2) (Fig. 4) and undifferentiated sex chromosomes. Larvae ( $n = 38$ ) were examined from four populations from the northeastern area of Thailand.

### *S. angulistylum* cytoform C

Cytoform C was characterized by two fixed inversions, one on the long arm of chromosome II (IIL-2) (Fig. 4) and one on the short arm of chromosome III (IIS-1) (Fig. 5), and undifferentiated sex chromosomes. Larvae ( $n = 12$ ) were examined from two populations in Loei Province in northeastern Thailand. One floating inversion (IIL-3) (Fig. 4) was found in this cytoform at low frequency (4%).

### Ecological conditions of the larval habitats

*Simulium angulistylum* was geographically and ecologically widespread (Table 2). It was found at altitudes from 110 to 1153 m above sea level. *Simulium angulistylum* also occupied habitats that had a wide range of stream sizes and current velocities. However, larvae were found only in streams where the streambed was composed of boulders or bedrock and mostly in forested areas. Comparisons of the stream variables among cytoforms revealed significant differences in altitude (Table 2). Cytoform C was found at the highest altitude (>1000 m above sea level) habitats, whereas cytoforms A and B were found at lower altitudes (<600 m above sea level). Other stream variables did not differ significantly among cytoforms (Table 2).

### DNA sequence variation

For the COI sequences, 586 bp were obtained from 42 sequences of *S. angulistylum*. There were 72 base substitutions, of which 50 were parsimony informative. A total of 33 haplotypes were identified. Sequence divergence between samples based on the Tamura and Nei model ranged from 0% to 5.80%, with a mean of 2.49%. The overall haplotype diversity was 0.9849, with a range in the populations of 0.4000 in AG618 and 1.000 in AG317, AG55, and AG70. Nucleotide diversity in the populations ranged from 0.0017 in AG55 to 0.0334 in AG56 (Table 3).

### Mitochondrial genealogy

MJ network (Fig. 6) showed no major phylogeographic breaks in *S. angulistylum* from Thailand, but one long divergent lineage was revealed. Three haplotypes of cytoform B from Sisaket Province in the lower North were clustered with the network by 21 mutation steps. There was some indication of clustering in the cytoforms. With only two exceptions, all individuals of cytoform C were clustered together. Individuals of cytoforms A and B, however, were distributed throughout the network. The haplotype network showed more association with geographic origin than to cytoform, suggesting that there were limitations to ongoing gene flow among geographic regions.

### Population genetic structure

Population pairwise  $F_{ST}$  (Table 4) revealed that most populations were genetically significantly different. SAMOVA analysis revealed that the  $F_{CT}$  value was highest at  $k = 4$  ( $F_{CT} = 0.404$ ,  $P < 0.001$ ) (Table 5). The grouping structure

**Table 2.** Ecological conditions of the larval habitats of three cytoforms of *Simulium angulistylum* in Thailand.

| Stream variable/ Cytoform     | Min.–max. (mean $\pm$ SD)          |                                    |                                    |                                    | Test statistics       |
|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
|                               | A                                  | B                                  | C                                  | All                                |                       |
| Altitude (m)                  | 110–330<br>(272.29 $\pm$ 121.08)   | 200–600<br>(366.40 $\pm$ 214.74)   | 1153<br>(1153)                     | 110–1153<br>(431.50 $\pm$ 340.57)  | 24.943 <sup>*,a</sup> |
| Width (m)                     | 0.13–8.00<br>(1.64 $\pm$ 2.84)     | 1.00–25.00<br>(8.00 $\pm$ 10.20)   | 1.70–2.00<br>(1.85 $\pm$ 0.21)     | 0.13–25.00<br>(3.94 $\pm$ 6.75)    | 1.515 <sup>a</sup>    |
| Depth (m)                     | 0.01–0.21<br>(0.061 $\pm$ 0.07)    | 0.05–0.16<br>(0.09 $\pm$ 0.04)     | 0.12–0.15<br>(0.14 $\pm$ 0.02)     | 0.01–0.21<br>(0.08 $\pm$ 0.06)     | 1.299 <sup>a</sup>    |
| Velocity (m)                  | 0.36–0.92<br>(0.63 $\pm$ 0.19)     | 0.38–1.53<br>(0.81 $\pm$ 0.47)     | 0.92–1.60<br>(1.26 $\pm$ 0.48)     | 0.36–1.60<br>(0.79 $\pm$ 0.39)     | 2.557 <sup>a</sup>    |
| Discharge (m <sup>3</sup> /s) | 0.001–0.823<br>(0.142 $\pm$ 0.304) | 0.027–3.060<br>(0.771 $\pm$ 1.290) | 0.239–0.384<br>(0.312 $\pm$ 0.102) | 0.001–3.060<br>(0.390 $\pm$ 0.803) | 0.890 <sup>a</sup>    |
| pH                            | 5.18–7.25<br>(6.59 $\pm$ 0.73)     | 5.50–7.20<br>(6.36 $\pm$ 0.83)     | 5.50–6.00<br>(5.75 $\pm$ 0.35)     | 5.18–7.25<br>(6.39 $\pm$ 0.74)     | 0.988 <sup>a</sup>    |
| Conductivity ( $\mu$ S/cm)    | 6.00–52.00<br>(30.40 $\pm$ 16.01)  | 14.00–62.40<br>(29.14 $\pm$ 21.61) | 6.00–8.00<br>(7.00 $\pm$ 1.41)     | 6.00–62.40<br>(26.61 $\pm$ 18.20)  | 1.455 <sup>a</sup>    |
| Stream-bed particles          | Boulder–bedrock<br>Boulder         | Boulder–bedrock<br>Boulder         | Boulder<br>Boulder                 | Boulder–bedrock<br>Boulder         | 0.505 <sup>b</sup>    |
| Canopy cover                  | Partial–complete<br>Complete       | None–complete<br>Partial           | Complete<br>Complete               | None–complete<br>Complete          | 5.386 <sup>b</sup>    |
| Riparian vegetation           | Brush–forest<br>Forest             | Open–forest<br>Forest              | Forest<br>Forest                   | Open–forest<br>Forest              | 1.560 <sup>b</sup>    |

Note: \*,  $P < 0.001$ .

<sup>a</sup>F values for ANOVA analysis.

<sup>b</sup>H values for Kruskal–Wallis test.

**Table 3.** Estimates of haplotype diversity, nucleotide diversity, Tajima's  $D$  test and Fu's  $F_s$  tests of selective neutrality in nine populations of *Simulium angulistylum* in Thailand.

| Cytoform | Sample site ( $n$ ) | No. of sample | Haplotype diversity ( $h$ ) | Nucleotide diversity ( $\pi$ ) | Tajima's $D$ test | Fu's $F_s$ test       |
|----------|---------------------|---------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------|
| A        | AG2                 | 5             | 0.7000 $\pm$ 0.2184         | 0.0031 $\pm$ 0.0025            | –0.410            | –3.304 <sup>**</sup>  |
|          | AG317               | 5             | 1.0000 $\pm$ 0.1265         | 0.0092 $\pm$ 0.0062            | –0.452            | –1.223                |
|          | AG618               | 5             | 0.4000 $\pm$ 0.2373         | 0.0055 $\pm$ 0.0039            | –1.174            | –2.116 <sup>*</sup>   |
|          | All                 | 15            | 0.9143 $\pm$ 0.0559         | 0.0134 $\pm$ 0.0074            | –0.239            | –0.708                |
| B        | AG494               | 5             | 0.9000 $\pm$ 0.1610         | 0.0150 $\pm$ 0.0098            | 0.576             | –0.510                |
|          | AG500               | 5             | 0.9000 $\pm$ 0.1610         | 0.0096 $\pm$ 0.0065            | 0.436             | –1.167                |
|          | AG55                | 2             | 1.0000 $\pm$ 0.5000         | 0.0017 $\pm$ 0.0024            | 0                 | 0                     |
|          | AG56                | 5             | 0.9000 $\pm$ 0.1610         | 0.0334 $\pm$ 0.0209            | 1.250             | 0.497                 |
|          | All                 | 17            | 0.9779 $\pm$ 0.0267         | 0.0260 $\pm$ 0.0137            | 0.304             | –1.683                |
| C        | AG69                | 5             | 0.9000 $\pm$ 0.1610         | 0.0048 $\pm$ 0.0035            | –0.191            | –2.370 <sup>*</sup>   |
|          | AG70                | 5             | 1.0000 $\pm$ 0.1265         | 0.0198 $\pm$ 0.0127            | –0.525            | –0.145                |
|          | All                 | 10            | 0.9778 $\pm$ 0.0540         | 0.0129 $\pm$ 0.0075            | –1.371            | –2.334                |
| Total    |                     | 42            | 0.9849 $\pm$ 0.0096         | 0.0249 $\pm$ 0.0126            | –0.525            | –11.620 <sup>**</sup> |

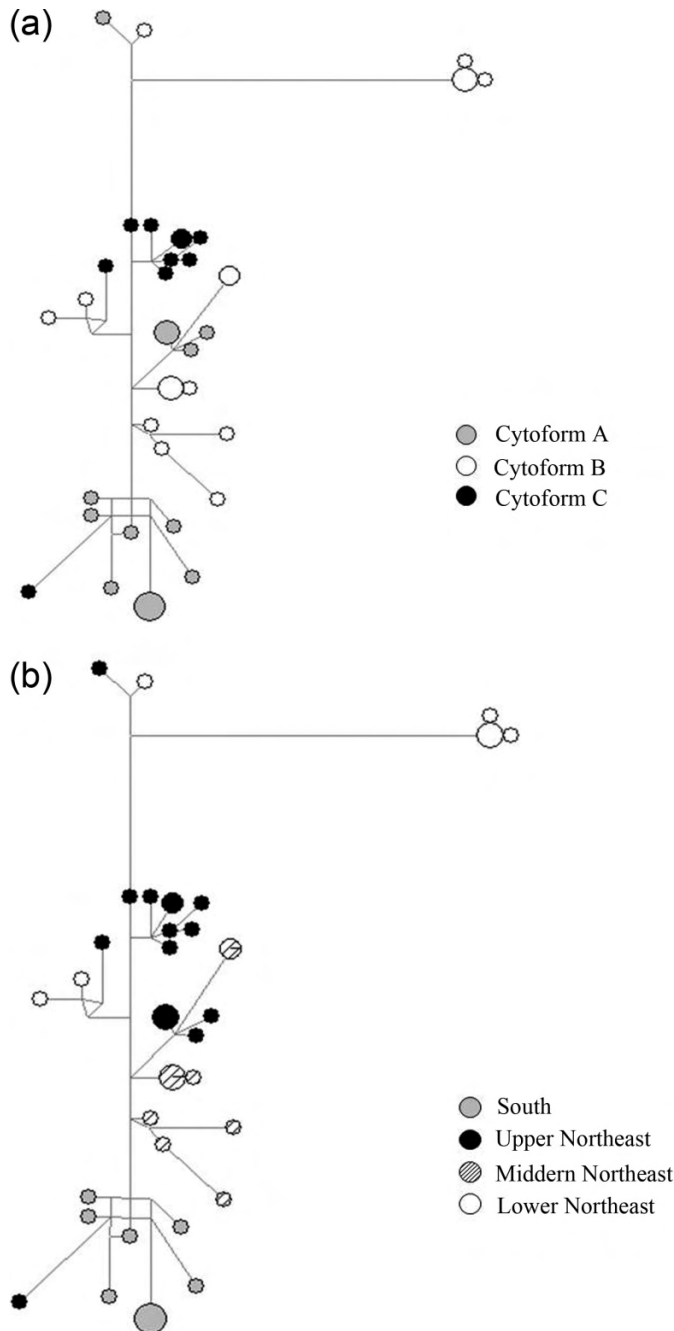
Note: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

defined by SAMOVA corresponded well with the geographic origin. AMOVA analysis by grouping populations according to cytoform also showed significant genetic differentiation, but the  $F_{CT}$  value ( $F_{CT} = 0.214$ ,  $P = 0.011$ ) was lower than the value obtained from the grouping structure defined by SAMOVA. The test of associations between levels of genetic distance ( $F_{ST}$  values derived from Arlequin) and geographic distance (log km) was significant ( $r = 0.517$ ,  $P < 0.001$ ), suggesting that gene flow was limited by geographic distance.

### Historical dispersal

Maximum-likelihood estimates of the historical dispersal rates for four population groups defined by SAMOVA indicated asymmetric rates (Table 6). Dispersal from southern areas to middle northeastern and upper northeastern areas was high, compared with the negligible dispersal in the opposite directions. Dispersal from middle Northeast to lower Northeast was high but to upper Northeast was very low. Dispersals from upper Northeast and lower Northeast to other areas were negligible.

**Fig. 6.** Median joining network of 42 mtDNA COI sequences of *Simulium angulistylum* from nine populations in Thailand. (a) Haplotypes labeled according to cytoforms; (b) haplotypes labeled according to geographic origin. Circles represent haplotypes and sizes are relative to the number of individuals sharing the specific haplotype.



### Demographic history

Both Tajima's  $D$  and Fu's  $F_s$  tests revealed negative values, but only the Fu's  $F_s$  was statistically significant ( $D = -0.525$ ,  $P = 0.363$ ,  $F_s = -11.620$ ,  $P < 0.001$ ) (Table 3). This could be due to a more powerful Fu's  $F_s$  than Tajima's  $D$  tests to detect population expansion (Fu 1997). Mismatch distribution analysis revealed that populations were consistent with the sudden population expansion model (Fig. 7). Both sum-of-square deviation (SSD = 0.0028,  $P = 0.6800$ )

and Harpending's raggedness index (0.0073,  $P = 0.6100$ ) were not significantly different from the simulated data under the sudden population expansion model (Fig. 7). The expansion time calculated from  $\tau = 2ut$  (where  $u = mT\mu$  and  $mT$  is the length of nucleotide sequences under study,  $\mu$  is the mutation rate per nucleotide, and  $t$  is the generation time; Rogers and Harpending 1992), assuming 12 generations a year for tropical black fly species (Pramual et al. 2005) and a divergence rate of 2.3% per 1 000 000 years for insect mtDNA (Brower 1994), was estimated to be approximately 930 000 years ago.

### Discussion

#### Cytotaxonomy and genetic differentiation among cytoforms

Previous phylogenetic study indicated that morphological placement of species in the *S. batoense* species group needs to be re-examined (Pramual et al. 2011b). The polytene chromosome banding sequences of *S. angulistylum* are more similar to those of *S. siamense* than to the *S. ceylonicum* species group, thus supporting morphological placement of these species in the same species group. However, several species in this group have not yet been cytologically examined.

Black fly species that occupy diverse habitats and are geographically widespread suggest the possibility of a species complex (Adler and McCreadie 1997). Previous cytogenetic study found no evidence of a species complex in *S. angulistylum* (Kuvangkadilok et al. 2003). This could be due to limitations in the geographical sampling, which was limited to three populations. Our cytological analysis revealed that *S. angulistylum* was composed of three cytoforms differentiated by fixed-chromosome inversions. Distributions of the three cytoforms were associated with the geographic origins, except for cytoform A, which was found in the South and the Northeast. However, the northeastern and southern populations of cytoform A could be different lineages because molecular data indicated they were divergent. Cytoform B was found in the middle northeastern and lower northeastern areas, and cytoform C was found in the upper northeastern area. The cytoforms also differed ecologically. Cytoform C was found at high altitudes (>1000 m above sea level), whereas the other two cytoforms were found <600 m above sea level. The result is consistent with previous findings that altitude could be an important ecological factor driving population divergence of black flies in Thailand (Pramual and Nanork 2012).

Cytogenetic analysis indicating that *S. angulistylum* is a species complex is consistent with DNA barcode analysis, which found high levels of intraspecific genetic divergence (Pramual et al. 2011b). The COI barcoding sequence in the present study supports a previous finding of high levels of intraspecific genetic divergence, with a maximum value of 5.8%. This level of intraspecific genetic divergence falls in the range of sequence divergence for black fly species complexes (Rivera and Currie 2009).

Mitochondrial DNA sequences support the differentiation among cytoforms. Sequence divergence between cytoforms was relatively high (2.8% between A and B, 2.6% between A and C, and 3.1% between B and C). The values were close to 3.0%, the threshold value for differentiating species based

**Table 4.** Population pairwise  $F_{ST}$  between nine populations of *Simulium angulistylum* in Thailand.

| Cytoform | Population | A             |               |               | B             |               |        |               | C              |      |
|----------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------|---------------|----------------|------|
|          |            | AG2           | AG618         | AG317         | AG494         | AG500         | AG55   | AG56          | AG69           | AG70 |
| A        | AG2        |               |               |               |               |               |        |               |                |      |
|          | AG618      | <b>0.7412</b> |               |               |               |               |        |               |                |      |
|          | AG317      | <b>0.6820</b> | <b>0.4578</b> |               |               |               |        |               |                |      |
| B        | AG494      | <b>0.2818</b> | <b>0.4966</b> | <b>0.4333</b> |               |               |        |               |                |      |
|          | AG500      | <b>0.5401</b> | <b>0.5924</b> | <b>0.4606</b> | 0.0148        |               |        |               |                |      |
|          | AG55       | <b>0.9415</b> | <b>0.9085</b> | 0.8473        | <b>0.7271</b> | 0.8321        |        |               |                |      |
|          | AG56       | <b>0.4038</b> | <b>0.4391</b> | <b>0.3920</b> | <b>0.1872</b> | <b>0.2775</b> | 0.1473 |               |                |      |
| C        | AG69       | <b>0.8369</b> | <b>0.8177</b> | <b>0.7508</b> | <b>0.5950</b> | <b>0.6648</b> | 0.9193 | <b>0.4019</b> |                |      |
|          | AG70       | <b>0.5089</b> | <b>0.5182</b> | <b>0.4335</b> | <b>0.2932</b> | <b>0.3170</b> | 0.6887 | 0.1634        | <b>0.08554</b> |      |

Note: Bold indicates significance at  $P < 0.05$ .

**Table 5.** Results of the hierarchical AMOVA analyses of nine populations of *Simulium angulistylum* in Thailand, with grouping according to cytoform and group structure defined by SAMOVA.

| Source of Variation            | Percentage of variation | F statistic           |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <b>Cytoform</b>                |                         |                       |
| Among groups                   | 21.44                   | $F_{CT} = 0.214^*$    |
| Among populations within group | 33.29                   | $F_{ST} = 0.547^{**}$ |
| Within population              | 45.27                   | $F_{SC} = 0.424^{**}$ |
| <b>SAMOVA defined group</b>    |                         |                       |
| Among groups                   | 40.44                   | $F_{CT} = 0.404^{**}$ |
| Among populations within group | 14.62                   | $F_{ST} = 0.550^{**}$ |
| Within population              | 44.95                   | $F_{SC} = 0.245^{**}$ |

Note: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ .

**Table 6.** Maximum-likelihood estimates of the population sizes ( $\theta = 2N\mu$ ) and dispersal rates ( $M = m/\mu$ ) for four population groups defined by SAMOVA of *Simulium angulistylum* in Thailand.

| Population group (i) | Population size | Dispersal rates        |                       |                        |                       |
|----------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                      |                 | S→i                    | MNE→i                 | UNE→i                  | LNE→i                 |
| South                | 0.0156          |                        | $1.63 \times 10^{-9}$ | $3.10 \times 10^{-9}$  | $4.36 \times 10^{-9}$ |
| MNE                  | 0.0203          | 75.78                  |                       | $5.46 \times 10^{-10}$ | $2.09 \times 10^{-9}$ |
| UNE                  | 0.0217          | 31.27                  | $3.59 \times 10^{-9}$ |                        | $3.75 \times 10^{-9}$ |
| LNE                  | 0.0168          | $8.49 \times 10^{-11}$ | 111.25                | $3.64 \times 10^{-8}$  |                       |

Note: MNE, middle Northeast; UNE, upper Northeast; LNE, lower Northeast.

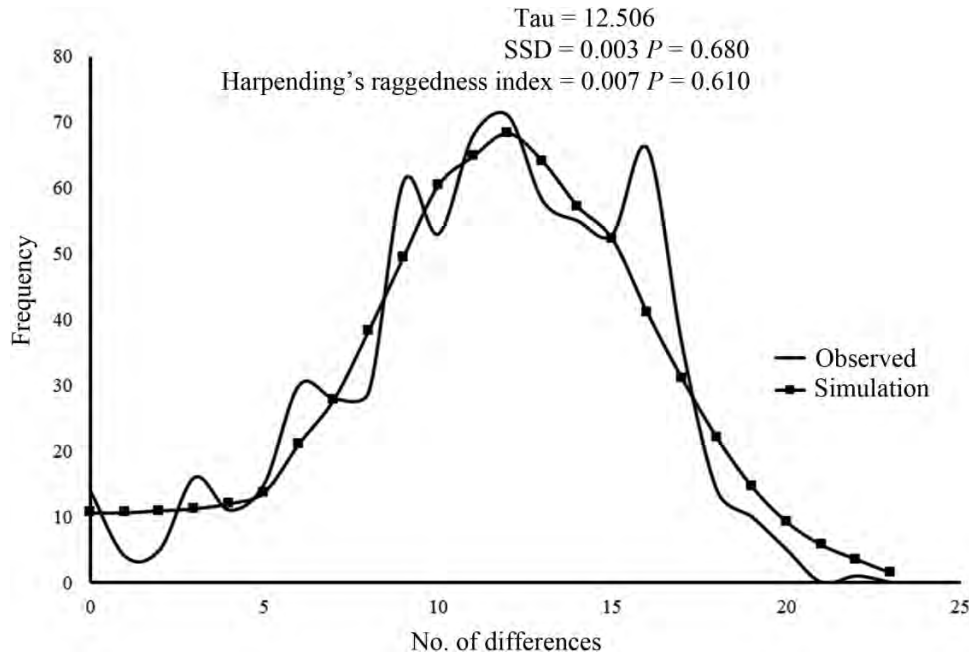
on the COI barcode sequence (Hebert et al. 2003). AMOVA analysis revealed significant genetic differentiation among cytoforms; although the mitochondrial genealogy did not show major phylogeographic break there were apparent associations between the haplotypes and the cytoforms, which suggests recent limitation of genetic connections between the cytoforms.

Cytoform C is the most distinct among the three cytoforms. This cytoform possess two fixed inversions that differentiate it from cytoform A and one fixed inversion that differentiates it from cytoform B. With a few exceptions, pairwise  $F_{ST}$  also showed significant genetic differentiation between this cytoform and the others. SAMOVA analysis also supports the differentiation of cytoform C. Two populations (AG69 and AG70) of this cytoform formed a group separated from the other populations. Mitochondrial genealogy revealed that haplotypes of this cytoform, with two exceptions, were clustered together and separated from the other cytoforms. Although cytoform C is not geographically distinctly isolated from the other cytoforms, it is ecologically

separated. All other populations of *S. angulistylum* were found at altitudes <600 m above sea level, while two populations of cytoform C were found at 1135 m above sea level. Differentiation in the ecological conditions could be a major barrier to gene flow between populations of this cytoform and the others. The results highlight the importance of ecological conditions in driving population differentiation. Several previous studies have shown that ecological conditions of the larval habitat probably played a role in black fly species divergence (Joy et al. 2007; Pramual et al. 2005; Pramual and Nanork 2012). We have found in the *S. multistriatum* species group that altitude is one of the most important ecological factors driving genetic divergence (Pramual and Nanork 2012).

Both cytogenetic and molecular data indicate genetic differentiation among cytoforms, but the lack of sympatric populations precludes us from making a definitive statement as to whether the cytoforms represent full species. The nearest geographic populations of cytoforms A and B are separated by approximately 300 km and of cytoforms A and C by ap-

**Fig. 7.** Mismatch distribution of 42 COI sequences of *Simulium angulistylum*, representing the observed and expected pairwise differences under the sudden population expansion model. Mismatch distribution of *S. angulistylum* is consistent with the sudden population expansion model, as the sum-of-square deviation (SSD) and Harpending's raggedness index are not significantly different between the observed and the expected from the simulation.



proximately 200 km. These distances exceed the typical flight ranges of forest black fly species (Crosskey 1990). Therefore, more extensive sampling in the geographic gaps is needed to clarify the species status of the cytoforms.

Genetic differentiation within cytoforms also is seen. Population pairwise  $F_{ST}$  values are highly significant between the three populations of cytoform A. With only one exception, these populations separated into two lineages in the mtDNA network, corresponding to their geographic origins. Populations of cytoform B also showed high levels of genetic differentiation. With the exception of population AG55, which has a small sample size ( $n = 2$ ), and populations AG500 and AG494, which are geographically proximity, comparisons between populations of this cytoform revealed significant genetic differentiations. There is one long divergence lineage of this cytoform from Sisaket Province in the lower north-eastern area. Thus, there is still hidden diversity within these cytoforms that can be revealed using DNA barcoding sequences.

#### Population genetic structure and population history

High levels of genetic differentiations among populations of *S. angulistylum* exist. This is consistent with the geographic association of the haplotypes on the MJ haplotype network. The high genetic structuring in populations of *S. angulistylum* contrasts with the low level of genetic differentiation in *S. siamense*, a closely related geographically co-distributed species (Pramual et al. 2011a). Different levels of genetic structure were related to habitat associations of these species. *Simulium angulistylum* is associated with habitats in forested areas, whereas *S. siamense* can be found in both forested and open areas (Pramual and Kuvangkadi-  
lok 2009). Perhaps because of the patchy distribution of forested habitat, isolated populations of *S. angulistylum* developed. Habitats of *S. siamense* are more continuous be-

cause this species inhabits both forested and nonforested habitats. High genetic structuring also is found in *S. tani*, another black fly species in Thailand associated with forested habitat (Pramual et al. 2005). The effect of habitat specificity on genetic structure has been reported in the alpine stream black fly *Prosimulium neomacropyga* (Finn et al. 2006).

The high level of genetic structuring in *S. angulistylum* could also be due to the long population history. Mismatch distribution and Fu's  $F_s$  tests indicate population demographic expansion in *S. angulistylum*. The expansion time is estimated at about 930 000 years ago, an ancient demographic expansion, compared with other black fly species. Demographic expansion in *S. tani* was estimated at about 500 000 years and in *S. siamense* at 120 000 years. It is also older than other insects of the Southeast Asian mainland, such as *Anopheles* mosquitoes, which were estimated at 300 000 – 100 000 years ago (Morgan et al. 2011).

In *S. tani* (Pramual et al. 2005) and *Anopheles* mosquitoes (Morgan et al. 2011), low genetic diversity in southern populations was attributed to recent colonizations from the North. The common pattern in black flies and mosquitoes was thought to be due to the sharing of historical climatic and environmental changes during the Pleistocene (Pramual et al. 2005; Morgan et al. 2011). Our results reveal relatively high genetic variation in southern populations of *S. angulistylum*. Furthermore, maximum-likelihood estimates of the historical dispersal indicate unidirectional movements of the flies from the South to the North, suggesting that the effect of Pleistocene climatic and environmental change could affect species differently. The two southern populations included in the present study were from the mountainous area along the Thai–Myanmar border. This area could also have been a refugium site for black flies during the Pleistocene.

In conclusion, our results demonstrate the importance of cytological study for black fly taxonomy. The results also highlight the value of DNA barcodes for revealing cryptic biodiversity. Therefore, integrating the approaches was necessary for fully understanding black fly biodiversity. The results also strengthen the previous view of the role of ecology in black fly species divergence.

## Acknowledgements

This work was supported financially by the Thailand Research Fund, Commission on Higher Education, and Mahasarakham University (MRG5380053). We thank P. Adler (Clemson University, USA) and J. Dodgson (Mahasarakham University, Thailand) for comments on an earlier version of the manuscript.

## References

- Adler, P.H., and Crosskey, R.W. 2011. World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory 2011. [Online.] Available from <http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf> [accessed 27 August 2011].
- Adler, P.H., and Huang, Y.T. 2011. Integrated systematics of the Simuliidae (Diptera): evolutionary relationships of the little-known Palearctic black fly *Simulium acrotrichum*. *Can. Entomol.* **143**(6): 612–628. doi:10.4039/n11-035.
- Adler, P.H., and McCreadie, J.W. 1997. The hidden ecology of black flies: sibling species and ecological scale. *Am. Entomol.* **43**(3): 153–162.
- Bohonak, A.J. 2002. IBD (Isolation by Distance): a programme for analysis of isolation by distance. *J. Hered.* **93**(2): 153–154. doi:10.1093/jhered/93.2.153. PMID:12140277.
- Brower, A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato*, inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**(14): 6491–6495. doi:10.1073/pnas.91.14.6491. PMID:8022810.
- Crosskey, R.W. 1990. The natural history of blackflies. John Wiley & Sons, London.
- Day, J.C., Goodall, T.I., and Post, R.J. 2008. Confirmation of the species status of the blackfly *Simulium galeratum* in Britain using molecular taxonomy. *Med. Vet. Entomol.* **22**(1): 55–61. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00719.x. PMID:18380654.
- Dupanloup, I., Schneider, S., and Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* **11**(12): 2571–2581. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x. PMID:12453240.
- Excoffier, L., and Lischer, H. 2010. Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* **10**(3): 564–567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x. PMID:21565059.
- Finn, D.S., Theobald, D.M., Black, W.C., IV, and Poff, N.L. 2006. Spatial population genetic structure and limited dispersal in a Rocky Mountain alpine stream insect. *Mol. Ecol.* **15**(12): 3553–3566. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03034.x. PMID:17032257.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**(2): 915–925. PMID:9335623.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* **66**(4): 591–600. PMID:8088750.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., and deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **270**(1512): 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218. PMID:12614582.
- Ilmonen, J., Adler, P.H., Malmqvist, B., and Cywinska, A. 2009. The *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae) in Europe: multiple character sets for assessing species status. *Zool. J. Linn. Soc.* **156**(4): 847–863. doi:10.1111/j.1096-3642.2009.00500.x.
- Jitklang, S., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., Takaoka, H., and Adler, P.H. 2008. Cytogenetics and morphotaxonomy of the *Simulium* (*Gomphostilbia*) *ceylonicum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, **1917**: 1–28.
- Joy, D.A., Craig, D.A., and Conn, J.E. 2007. Genetic variation tracks ecological segregation in Pacific island black flies. *Heredity*, **99**(4): 452–459. doi:10.1038/sj.hdy.6801023. PMID:17611492.
- Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C., Phayusasena, S., and Baimai, V. 2003. Larval polytene chromosomes of black flies (*Simulium*) from Thailand. I. Comparison among five species in the subgenus *Gomphostilbia* Enderlein. *Genetica*, **118**(1): 69–81. doi:10.1023/A:1022909018987. PMID:12733666.
- Kuvangkadilok, C., Lualon, U., and Baimai, V. 2008. Cytotaxonomy of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Genome*, **51**(12): 972–987. doi:10.1139/G08-082. PMID:19088811.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**(2): 209–220. PMID:6018555.
- Morgan, K., O'Loughlin, S.M., Chen, B., Linton, Y., Thongwat, D., Somboon, P., et al. 2011. Comparative phylogeography reveals a shared impact of Pleistocene environmental change in shaping genetic diversity within nine *Anopheles* mosquito species across the Indo-Burma biodiversity hotspot. *Mol. Ecol.* **20**(21): 4533–4549. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05268.x. PMID:21981746.
- Phasuk, J., Chanpaisaeng, J., Adler, P.H., and Courtney, G.W. 2005. Chromosomal and morphological taxonomy of larvae of *Simulium* (*Gomphostilbia*) (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, **1052**: 49–60.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**(7): 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083. PMID:18397919.
- Pramual, P., and Kuvangkadilok, C. 2009. Agricultural land use and black fly (Diptera: Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand. *Hydrobiologia*, **625**(1): 173–184. doi:10.1007/s10750-009-9706-z.
- Pramual, P., and Nanork, P. 2012. Phylogenetic analysis based on multiple gene sequences revealing cryptic biodiversity in *Simulium multistriatum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomol. Sci.* **15**(2): 202–213. doi:10.1111/j.1479-8298.2011.00491.x.
- Pramual, P., and Wongpakam, K. 2011. Cytogenetics of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki, 1984 (Diptera: Simuliidae) in northeastern Thailand. *Aquat. Insects*, **33**(2): 171–184. doi:10.1080/01650424.2011.597407.
- Pramual, P., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., and Walton, C. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* **14**(13): 3989–4001. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02639.x. PMID:16262854.
- Pramual, P., Kongim, B., and Nanork, P. 2011a. Phylogeography of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki complex (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomol. Sci.* **14**(4): 428–436. doi:10.1111/j.1479-8298.2011.00465.x.
- Pramual, P., Wongpakam, K., and Adler, P.H. 2011b. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). *Genome*, **54**(1): 1–9. doi:10.1139/G10-100. PMID:21217800.

- Rivera, J., and Currie, D.C. 2009. Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Mol. Ecol. Resour.* **9**(Suppl. s1): 224–236. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02648.x. PMID:21564982.
- Rogers, A.R., and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**(3): 552–569. PMID:1316531.
- Rothfels, K.H. 1979. Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). *Annu. Rev. Entomol.* **24**(1): 507–539. doi:10.1146/annurev.en.24.010179.002451.
- Rothfels, K.H., and Dunbar, R.W. 1953. The salivary gland chromosomes of the black fly *Simulium vittatum* Zett. *Can. J. Zool.* **31**(3): 226–241. doi:10.1139/z53-020.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**(18): 2496–2497. doi:10.1093/bioinformatics/btg359. PMID:14668244.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**(3): 585–595. PMID:2513255.
- Takaoka, H., and Davies, D.M. 1995. The black flies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia. Kyushu University Press, Fukuoka.
- Tamura, K., and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**(3): 512–526. PMID:8336541.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**(8): 1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092. PMID:17488738.
- Tangkawanit, U., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., and Adler, P.H. 2009. Cytosystematics of the *Simulium tuberosum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zool. J. Linn. Soc.* **155**(2): 289–315. doi:10.1111/j.1096-3642.2008.00433.x.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**(24): 4876–4882. doi:10.1093/nar/25.24.4876. PMID:9396791.

# Geographical versus ecological isolation of closely related black flies (Diptera: Simuliidae) inferred from phylogeny, geography, and ecology

Pairot Pramual · Chaliow Kuvangkadilok ·  
Sanae Jitklang · Ubon Tangkawanit · Peter H. Adler

Received: 23 January 2012 / Accepted: 30 April 2012  
© Gesellschaft für Biologische Systematik 2012

**Abstract** To investigate patterns of geographical and ecological separation among morphologically similar, closely related species of black flies, we integrated ecological, geographical, and phylogenetic information, based on multiple gene sequences, for 12 species in the subgenus *Gomphostilbia* in Thailand. Molecular characters supported the monophyly of the *Simulium ceylonicum* species group, but not of the *Simulium batoense* species group, suggesting that revisionary work is

needed for the latter. Both ecological and geographical isolation of similar taxa were revealed. Stream velocity and altitude were among the principal ecological factors differing between closely related species. Most closely related species in the subgenus *Gomphostilbia* overlap geographically, suggesting the possibility of sympatric speciation driven by ecological divergence. Geographical isolation via dispersal also might have contributed to species divergence, while Pleistocene climate changes possibly influenced population genetic structure, demographic history, and speciation of some members of the subgenus.

P. Pramual (✉)  
Department of Biology, Faculty of Science,  
Mahasarakham University,  
Maha Sarakham 44150, Thailand  
e-mail: pairot.p@msu.ac.th

C. Kuvangkadilok  
Department of Biology, Faculty of Science,  
Mahidol University,  
Rama VI Road,  
Phayathai, Bangkok 10400, Thailand  
e-mail: scckv@mahidol.ac.th

S. Jitklang  
Conservation Biology Program, Division of Biological and  
Natural Resource Sciences, Mahidol University,  
Saiyok, Kanchanaburi Campus,  
Kanchanaburi 71150, Thailand  
e-mail: kasjk@mahidol.ac.th

U. Tangkawanit  
Department of Plant Science and Agricultural Resources,  
Faculty of Agriculture, Khonkaen University,  
Khonkaen 40002, Thailand  
e-mail: ubonta@kku.ac.th

P. H. Adler  
Entomology Program, School of Agricultural, Forest,  
and Environmental Sciences, Clemson University,  
Clemson, SC 29634-0310, USA  
e-mail: padler@clemson.edu

**Keywords** *Gomphostilbia* · Phylogeny · *Simulium* · Speciation

## Introduction

Geographical isolation and ecological divergence contribute to species diversification. Ecological divergence has been suggested as an important factor promoting speciation (Orr and Smith 1998; Schluter 1998, 2001). Populations in different environments are under different selection regimes, which could result in genetic divergence leading to reproductive isolation (Mayr 1963). Alternatively, reproductive isolation could result from processes not linked directly to ecological divergence, such as genetic drift (Coyne and Orr 2004).

Integrating phylogenetic information with environmental factors and geographical distributions of closely related species can be used to indicate the relative evolutionary importance of ecological divergence and geographical isolation. For example, Graham et al. (2004) combined geographical distribution data, environmental geographic information system layers, environmental

niche models, and phylogenetic information to investigate speciation processes in dendrobatid frogs. They concluded that ecological niche played a significant role in speciation because sister taxa typically differ ecologically regardless of their geographical distributions. Peterson et al. (1999) used ecological niche modeling to compare geographical distributions of sister taxa of birds, mammals, and butterflies in southern Mexico. Their results indicated that geographic isolation was the primary factor driving speciation, whereas ecological divergence evolved later.

Distributions of closely related species of black flies often are related to different ecologies (Adler 1988; Adler and McCreadie 1997; McCreadie and Adler 1998). For example, sibling species in the *S. vittatum* complex occupy streams with different thermal profiles (Adler and Kim 1984), and those in the African *S. damnosum* complex are associated with different forest types (Boakye et al. 1998), suggesting that ecological conditions play a significant role in the evolution of black flies. Ecological divergence, for example, has been suggested as a driving force in the speciation of black flies (Joy and Conn 2001; Joy et al. 2007; Rothfels 1989).

The species-rich subgenus *Gomphostilbia* contains nearly 10 % of all nominal black flies worldwide (Adler and Crosskey 2012), including more than 30 species in Thailand, one of which is a complex of seven cytoforms (Kuvangkadilok et al. 2008; Pramual and Wongpakam 2011). *Gomphostilbia* has been investigated morphologically (Takaoka and Choochote 2004), cytologically (Jitklang et al. 2008; Kuvangkadilok et al. 2008; Phasuk et al. 2005; Pramual and Wongpakam 2011), molecularly (Pramual et al. 2011a; b), and ecologically (Pramual and Kuvangkadilok 2009; Pramual and Wongpakam 2010). Previous phylogenetic studies indicate that this subgenus is monophyletic (Phayuhasena et al. 2010; Pramual et al. 2011a; Thanwisai et al. 2006), making it an ideal candidate for investigating the importance of ecology in black fly evolution.

Closely related species of the subgenus *Gomphostilbia* in Thailand are difficult to distinguish morphologically and often require chromosomal or molecular identification (Jitklang et al. 2008; Pramual et al. 2011a), raising the question of how these similar species occupy available habitat. Our objective, therefore, was to examine ecological divergence and geographical isolation by integrating phylogenetic information, based on multiple gene sequences, with geographical distributions and ecological conditions of the larval habitats of a set of closely related, nearly isomorphic species in the subgenus *Gomphostilbia* in Thailand.

## Materials and methods

### Samples, identifications, and ecological measurements

Larval black flies were collected throughout Thailand (Table 1) and fixed in Carnoy's solution (3:1, 95 % ethanol: glacial acetic acid) for cytogenetic and molecular analysis (Pramual et al. 2011a). Samples were identified morphologically (Takaoka and Choochote 2004), and cytologically (Jitklang et al. 2008; Kuvangkadilok et al. 2008). Ecological data for larval habitats, including altitude, conductivity, depth, pH, velocity, and width, were obtained from previous publications (Pramual and Kuvangkadilok 2009; Pramual and Wongpakam 2010) and unpublished data (C. Kuvangkadilok, P. Pramual, S. Jitklang, U. Tangkawanit).

### DNA extraction, polymerase chain reaction, and sequencing

Treatment of larvae for molecular and cytogenetic studies followed the protocol of Pramual et al. (2005, 2011a). DNA was extracted from larval heads using a Genomic DNA extraction kit (RBC BioScience, Taiwan) and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Polymerase chain reaction (PCR) was conducted for cytochrome oxidase II (COII), using primers TL2-J-3034 (5'-ATTATGGCAGAT TAGTGCA-3') and TK-N-3785 (5'-GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3'), and 18 S/ITS1, using primers 18 s/sd5' (5'-TGGTGCATGGCCGTTCTTAG-3') and 5.8 s/sd3' (5'-GTCGATGTTTCATGTGTCCTGC-3') (Simon et al. 1994). We used the PCR conditions of Conflitti et al. (2010). PCR products were checked with 1 % agarose gel electrophoresis and cleaned using a HiYield<sup>TM</sup> Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC BioScience, Taiwan). Sequencing was performed at Macrogen sequencing service (Seoul, Korea), using the same primers as in the PCR. A total of 38 samples representing 12 species of the subgenus *Gomphostilbia* were sequenced for mitochondrial (COII) and nuclear genes (18 S/ITS1). Representative haplotypes were deposited with GenBank (Table 1). Previously published COI barcoding sequences (Pramual et al. 2011a) were also included in phylogenetic analyses. The final alignment and trees obtained have been deposited with TreeBASE (<http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S12315>).

### Data analysis

DNA sequences were aligned using CLUSTAL X (Thompson et al. 1997), with a final visual inspection. Phylogenetic analyses were conducted for the combined data set (COI, COII, and 18 S/ITS1), with sequences from *S. fenestratum*

**Table 1** Black fly species, collection sites, and GenBank accession numbers for COI, COII, and 18 S/ITS1 sequences

| Species                                         | Locality                                 | Collection date  | GenBank accession number |          |           |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------|--------------------------|----------|-----------|
|                                                 |                                          |                  | COI                      | COII     | 18 S/ITS1 |
| <i>batoense</i> species group                   |                                          |                  |                          |          |           |
| <i>S. angulistylum</i> Takaoka and Davies 1995  | Hinsamchan waterfall, Loei               | 14 October 2007  | HM775239                 | JN547760 | JN547775  |
|                                                 | Khaopranarai waterfall, Ranong           | 13 December 2006 | HM775236                 | JN547761 | JN547775  |
|                                                 | Pangsida waterfall, Srakeaw              | 27 November 2004 | HM775237                 | JN547762 | JN547775  |
| <i>S. decuplum</i> Takaoka and Davies 1995      | Huai Sai luaeng waterfall, Chiangmai     | 14 December 2004 | HM775286                 | JN547758 | JF505387  |
|                                                 | Maetho, Chiangrai                        | 9 January 2007   | HM775284                 | JN547759 | JF505387  |
| <i>S. gombakense</i> Takaoka and Davies 1995    | Mae klang waterfall, Chiangmai           | 9 July 2006      | HM775247                 | JN547755 | JN547773  |
|                                                 | Mae klang waterfall, Chiangmai           | 9 July 2006      | HM775250                 | JN547757 | JN547773  |
|                                                 | Ban Pha Mon, Chiangmai                   | 14 December 2004 | HM775249                 | JN547756 | JN547772  |
| <i>S. siamense</i> Takaoka & Suzuki, 1984       | Huai Kaew Pang, Amnatchareon             | 23 February 2008 | HM775226                 | JF916872 | JF505387  |
|                                                 | Huai Kayeng, Kanchanaburi                | 29 February 2004 | HM775229                 | JN547751 | JF505387  |
|                                                 | Khaoyai National Park, Nakhon Ratchasima | 25 July 2004     | HM775230                 | JN547752 | JF505387  |
|                                                 | Mae La Noi, Mae Hong Son                 | 11 December 2004 | HM775231                 | JN547753 | JF505387  |
|                                                 | Huai Lao waterfall, Loei                 | 9 February 2008  | HM775225                 | JN547748 | JF505387  |
|                                                 | Ban Krangcamp, Petchaburi                | 16 August 2003   | HQ738668                 | JN547750 | JN547774  |
|                                                 | Ban Kamkeaw, Amnatchareon                | 23 February 2008 | HM775228                 | JN547749 | JF505387  |
| <i>ceylonicum</i> species group                 |                                          |                  |                          |          |           |
| <i>S. asakoeae</i> Takaoka and Davies 1995      | Ban Pha Mon, Chiangmai                   | 14 February 2004 | HM775266                 | JN547730 | JF505387  |
|                                                 | Ban Nam Kad, Mae Hong Son                | 13 December 2004 | HM775265                 | JN547729 | JF505387  |
|                                                 | Ban Na Ngew, Mae Hong Son                | 13 December 2004 | HM775264                 | JN547728 | JN547767  |
|                                                 | Huai Toei waterfall, Loei                | 10 February 2008 | HM775261                 | JN547727 | JF505387  |
|                                                 | Huai Toei waterfall, Loei                | 6 April 2008     | HM775262                 | JN547731 | JN547765  |
|                                                 | Khaoyai National Park, Nakhon Ratchasima | 8 August 2003    | HM775263                 | JN547732 | JN547766  |
| <i>S. inthanonense</i> Takaoka and Suzuki, 1984 | Huai Sai Leaug waterfall, Chiangmai      | 14 December 2004 | HM775255                 | JN547741 | JF505387  |
|                                                 | Huai Sai Leaug waterfall, Chiangmai      | 14 December 2004 | HM775256                 | JN547742 | JF505387  |
|                                                 | Huai Sai Leaug waterfall, Chiangmai      | 14 December 2004 | HM775257                 | JN547743 | JF505387  |
| <i>S. curtatum</i> Jitklang et al. 2008         | Siri Phum waterfall, Chiangmai           | 13 December 2002 | HM775242                 | JN547744 | JF505387  |
|                                                 | Siri Phum waterfall, Chiangmai           | 13 December 2002 | HM775243                 | JN547745 | JF505387  |
|                                                 | Siri Phum waterfall, Chiangmai           | 13 December 2002 | HM775244                 | JN547746 | JF505387  |
|                                                 | Ban Khun Huai Hang, Chiangmai            | 14 December 2004 | HM775246                 | JN547747 | JN547771  |

**Table 1** (continued)

| Species                                                  | Locality                                   | Collection date  | GenBank accession number |          |          |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------|--------------------------|----------|----------|
|                                                          |                                            |                  | COI                      | COII     | 18S/ITS1 |
| <i>S. doisaketense</i> Jitklang et al. 2008              | Khun Korn waterfall, Chiangrai             | 8 December 1998  | HM775267                 | JN547733 | JF505387 |
|                                                          | Khun Korn waterfall, Chiangrai             | 8 December 1998  | HM775269                 | JN547734 | JF505387 |
| <i>S. trangense</i> Jitklang et al. 2008                 | Kham Toei waterfall, Kalasin               | 22 December 2007 | HM775258                 | JN547739 | JN547768 |
|                                                          | Phu Pha Kham, Mukdahan                     | 25 November 2009 | HM775260                 | JN547740 | JN547768 |
| <i>S. sheilae</i> Takaoka and Davies 1995                | Ngaw waterfall, Ranong                     | 13 December 2006 | HM775274                 | JN547738 | JN547769 |
|                                                          | Chong Sa Ngam, Sisaket                     | 9 December 2007  | HM775270                 | JN547735 | JN547770 |
|                                                          | Huai Yang waterfall, Prachuapkhirikhun     | 4 June 1999      | HM775272                 | JN547737 | JN547769 |
|                                                          | Ban Sang Keaw, Sakonnakhon                 | 22 December 2007 | HM775271                 | JN547736 | JN547770 |
| <i>varicorne</i> species group                           |                                            |                  |                          |          |          |
| <i>S. chumpornense</i><br>Kuvangkadilok and Takaoka 2000 | Kapo waterfall, Chumporn                   | 6 November 1999  | HM775279                 | JN547763 | JN547777 |
| <i>S. kuvangkadilokae</i> Pramual and Tangkawanit 2008   | Pha Chom Tawan waterfall, Nakhonratchasima | 30 June 2007     | HM775276                 | JN547764 | JN547776 |

(accession number JF916884) and *S. takense* (accession number JF916877) as outgroups. Congruence between separate genes was tested using the partition homogeneity test (Farris et al. 1995) with 1,000 replicates implemented in PAUP\* v. 4.10b (Swofford 2002). The results indicated no significant differences between the separate gene regions ( $P=0.970$ ). To select the best-fit DNA substitution model for phylogenetic analysis, we used the program jModeltest v.0.1.1 (Posada 2008), based on the Akaike information criterion (AIC) algorithm. The best-fit model for combined sequences was the TIM2+I+G (Tamura and Nei 1993) with gamma shape parameter (G) of 0.7650 and proportion of invariable sites (I) of 0.6540.

The neighbor-joining (NJ) tree was calculated in PAUP\*, based on the best-fit selected model. Bootstrap support was estimated using 1,000 replicates. Maximum parsimony analyses were performed in PAUP\* (Swofford 2002), using a heuristic search with 1,000 random addition sequence replicates, TBR branch swapping, and MulTrees effect. Bootstrap support was estimated for 1,000 replicates. Phylogenetic relationships were analyzed by Bayesian methods using MRBAYES 3.04b (Huelsenbeck and Ronquist 2001). The best-fit model for Bayesian analysis was selected by hierarchical likelihood ratio tests implemented in MrModeltest (Nylander 2004). The general time-reversible (GTR) model (Rodriguez et al. 1990) with gamma distribution shape parameter of 0.8406 and proportion of invariable sites of 0.6625 was selected. Bayesian analysis was run for 2,000,000 generations, with a sampling

frequency of 100 generations. Tracer version 1.5 (Rambaut and Drummond 2004) was used for visual inspection of the point where the log likelihood is stationary. Trees sampled before this point were discarded as burn-in. The remaining trees of two simultaneous runs were included in posterior probability calculations.

To determine ecological divergence among closely related taxa, we used principal components analysis (PCA), reducing the number of stream variables into groups of independent components (PCs). PCs with eigenvalues greater than 1.0 were retained as variables. To interpret PCs, Spearman rank correlations were used to detect relationships between stream variables and PC scores (McCreadie et al. 2006). To determine if species differed significantly along environmental space, multivariate analysis of variance (MANOVA) was used in which species were assigned as a fixed factor and the PC score for each axis was the dependent variable (Graham et al. 2004).

## Results

### DNA sequence variation and phylogenetic relationships

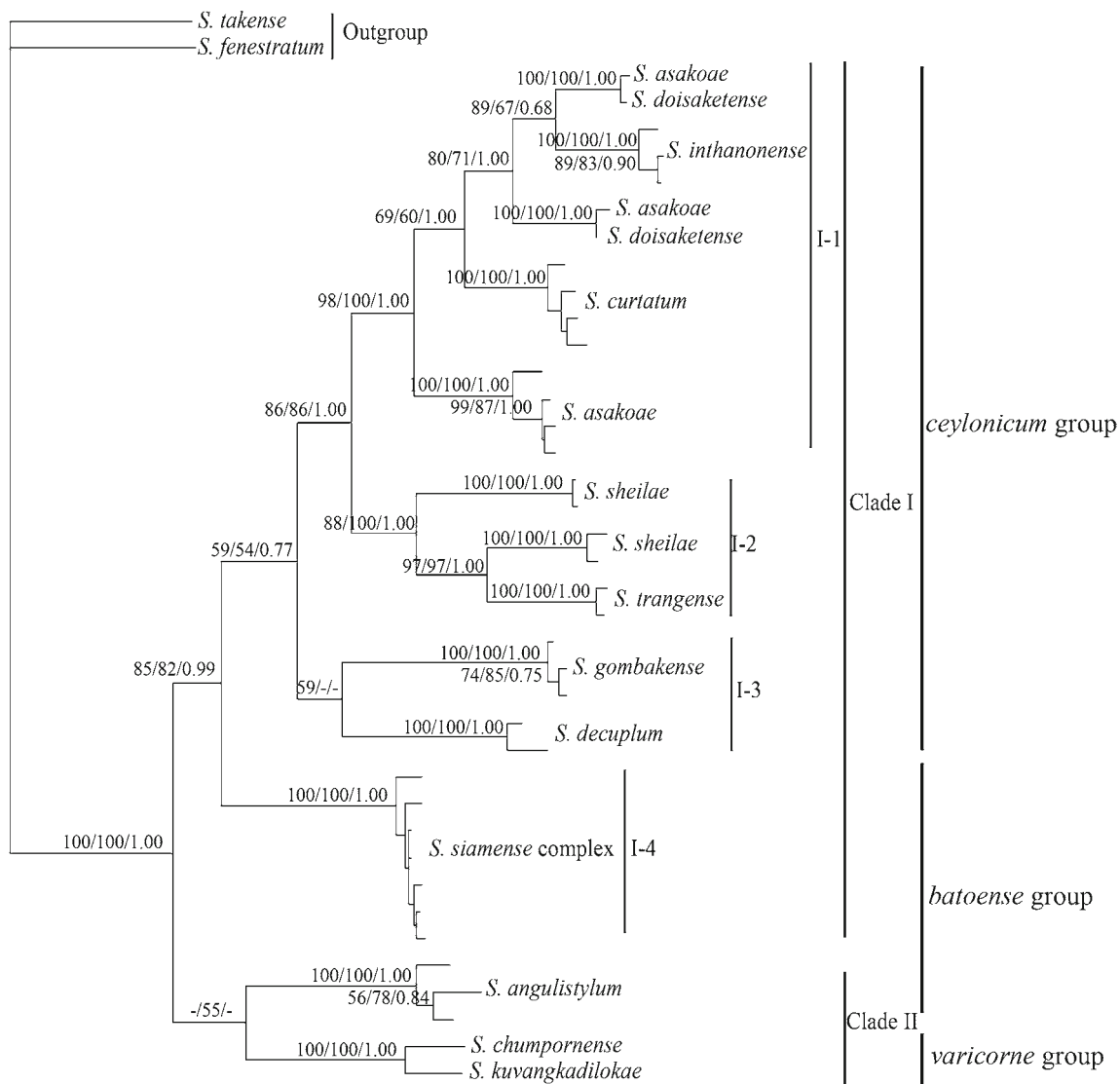
The combined dataset was 1,875 bp (586 bp for COI, 697 bp for COII, and 592 bp for 18 S/ITS1), with 460 variable positions, of which 408 were parsimony informative. All three phylogenetic analyses revealed similar tree topologies; thus, only one of the ten maximum parsimony (MP) trees is

shown (Fig. 1), with tree length of 1,246 steps and consistency index (CI) of 0.491. The MP tree revealed two main clades (I and II) among the 12 species. Clade I comprised nine species in four subclades: *S. asakoe*, *S. doisaketense*, *S. inthanonense*, *S. curtatum* (subclade I-1), *S. sheilae*, *S. trangense* (subclade I-2), *S. gombakense*, *S. decuplum* (subclade I-3), and *S. siamense* (subclade I-4). Clade II consisted of *S. angulistylum*, *S. chumpornense*, and *S. kuvangkadilokae*.

The monophyletic *ceylonicum* group was derived within the subgenus. The *batoense* group was polyphyletic; one species was clustered with the *S. varicornae* group in Clade II, and three species belonged to Clade I, which included members of the *ceylonicum* group. Two species of the

*varicornae* group (*S. chumpornense* and *S. kuvangkadilokae*) formed a monophyletic clade and were clustered with *S. angulistylum*, which currently is recognized as a member of the *batoense* group.

Three of the six species of the *ceylonicum* group were monophyletic. Four samples of *S. asakoe* formed a clade with strong bootstrap support (100 %) but two samples clustered with *S. doisaketense*. The clade of *S. asakoe* was sister to the remaining members of Clade I-1. *Simulium inthanonense* was monophyletic and sister to the clade comprised of individuals of *S. asakoe* and *S. doisaketense*. *Simulium curtatum* was monophyletic and sister to the clade that comprised *S. asakoe*, *S. doisaketense*, and *S. inthanonense*. *Simulium trangense* was monophyletic but in



**Fig. 1** Maximum parsimony tree for *Gomphostilbia* in Thailand, based on combined dataset of the cytochrome oxidase I, cytochrome oxidase II, and 18 S rRNA/ITS1 sequences. Bootstrap values for

maximum parsimony/neighbor joining and posterior probability for the Bayesian analysis are shown above or near the branch. Bar Ten changes

the clade of *S. sheilae*, making the latter paraphyletic. *Simulium doisaketense* was not monophyletic; one individual clustered with an individual of *S. asakoe* sister to the clade of *S. inthanonense*. Another individual clustered with an individual of *S. asakoe* and was sister to the *S. inthanonense* and *S. asakoe*+*S. doisaketense* clades.

All members of the *batoense* group were monophyletic. *Simulium angulistylum* was monophyletic, with strong bootstrap support, but clustered with *S. chumpornense* and *S. kuvangkadilokae* of the *varicorne* group. *Simulium siamense* was monophyletic and the sister group of all other members of Clade I, which consisted of members of the *batoense* group (in part) and *ceylonicum* group. *Simulium gombakense* and *S. decuplum* were monophyletic sister species in MP analysis, albeit with low bootstrap support (59 %). This cluster was not resolved in NJ and Bayesian analyses.

#### Geographical and ecological patterns

##### *Clade I-1: S. asakoe, S. curtatum, S. doisaketense, and S. inthanonense*

This clade was represented by members of the *ceylonicum* group. Among the 37 sampling sites with at least one member of this clade, *S. asakoe* was found at 64.9 % (24 sites), *S. curtatum* at 21.6 % (8 sites), *S. doisaketense* at 16.2 % (6 sites), and *S. inthanonense* at 13.5 % (5 sites). Although their geographical ranges overlapped, these species rarely co-occurred. *Simulium asakoe* was found with *S. inthanonense* at two sites and with *S. curtatum* at one site. *Simulium doisaketense* was found with *S. asakoe* at one site. *Simulium asakoe* occurred over a wide range of altitudes, from 395 m to 1,615 m above sea level (a.s.l.) (Table 2). *Simulium doisaketense* also was found over a range of altitudes, but at lower elevations (304–870 m.a.s.l.).

*Simulium curtatum* and *S. inthanonense* were restricted to high-altitude streams (>1,100 m.a.s.l.) (Table 2).

PCA revealed two principal components (PCs) with eigenvalues >1.0. These components explained 60.51 % of the total environmental variation among species (Table 3). PC-1 explained 33.75 % of the variation and was related significantly positively to stream width, depth, velocity, pH, and conductivity, and negatively to altitude. PC-2 explained 26.76 % of the variation and was related significantly positively to stream width and depth and negatively to pH and conductivity (Fig. 2). MANOVA analysis revealed significant separation of the species along both PCs (PC-1,  $F_{3, 37}=6.389$ ,  $P=0.001$ ; PC-2,  $F_{3, 37}=4.325$ ,  $P=0.010$ ).

##### *Clade I-2: S. sheilae and S. trangense*

*Simulium sheilae* was restricted to southern Thailand, whereas *S. trangense* was distributed widely in southern, central, and northeastern Thailand. Both species occupied a wide range of stream conditions (Table 2) but were not found above 600 m. Among the 13 sampling sites where at least one member of this clade was found, *S. trangense* occurred at 84.6 % (11 sites), *S. sheilae* at 38.5 % (5 sites), and both species at 23.1 % (3 sites).

PCA revealed three components that explained 91 % of the total variation in stream variables. PC-1 explained 49.49 % of the variation (Table 3), and was significantly positively related to pH and conductivity. PC-2 accounted for 24.80 % of the variation, and was related significantly positively to stream depth and negatively to altitude (Fig. 3). PC-3 accounted for 16.71 % of the variation but was not significantly related to stream variables. MANOVA analysis indicated that the species were not significantly different along PC-1 and PC-2 (PC-1,  $F_{1, 14}=0.430$ ,  $P=0.525$ ; PC-2,  $F_{1, 14}=0.050$ ,  $P=0.827$ ; PC-3,  $F_{1, 14}=1.142$ ,  $P=0.258$ ).

**Table 2** Stream variables for larval habitats of 12 species in the black fly subgenus *Gomphostilbia* in Thailand

| Species group     | Species (n) <sup>a</sup>       | Width (m)<br>(min–max) | Depth (m)<br>(min–max) | Velocity (m/s)<br>(min–max) | pH (min–max)     | Conductivity (µS/cm)<br>(min–max) | Altitude (m)<br>(min–max)    |
|-------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <i>ceylonicum</i> | <i>S. asakoe</i> (23)          | 1.17 (0.13–5.00)       | 0.11 (0.01–0.67)       | 0.42 (0.10–0.80)            | 7.60 (6.30–8.57) | 79.35 (8.00–259.00)               | 900.82 (395.00–1,615.00)     |
|                   | <i>S. curtatum</i> (7)         | 0.97 (0.20–2.50)       | 0.16 (0.03–0.53)       | 0.49 (0.20–0.76)            | 7.19 (6.43–8.20) | 25.87 (10.10–50.00)               | 1,402.86 (1,250.00–1,615.00) |
|                   | <i>S. doisaketense</i> (6)     | 2.79 (1.50–3.75)       | 0.18 (0.05–0.30)       | 0.53 (0.23–0.96)            | 7.59 (7.20–8.40) | 47.32 (27.20–130.00)              | 684.00 (304.00–870.00)       |
|                   | <i>S. inthanonense</i> (5)     | 0.36 (0.20–0.87)       | 0.04 (0.02–0.05)       | 0.23 (0.03–0.50)            | 7.71 (7.36–8.20) | 29.36 (10.10–50.00)               | 1,342.00 (1,125.00–1,615.00) |
|                   | <i>S. sheilae</i> (5)          | 1.69 (0.40–5.00)       | 0.10 (0.06–0.17)       | 0.64 (0.22–1.37)            | 6.51 (6.10–7.00) | 26.29 (15.30–44.40)               | 162.40 (55.00–314.00)        |
|                   | <i>S. trangense</i> (9)        | 2.24 (0.30–6.50)       | 0.17 (0.03–0.57)       | 0.49 (0.20–1.00)            | 6.90 (5.01–7.47) | 33.02 (8.00–62.40)                | 221.44 (50.00–600.00)        |
| <i>batoense</i>   | <i>S. gombakense</i> (8)       | 2.55 (0.20–10.00)      | 0.12 (0.01–0.30)       | 0.48 (0.20–1.00)            | 7.53 (6.30–8.07) | 64.20 (19.70–295.70)              | 618.63 (120.00–1,302.00)     |
|                   | <i>S. decuplum</i> (19)        | 2.49 (0.30–5.33)       | 0.13 (0.01–0.28)       | 0.48 (0.29–1.10)            | 7.93 (7.20–8.80) | 112.03 (7.80–280.33)              | 628.21 (50.00–1,261.00)      |
|                   | <i>S. siamense</i> (13)        | 3.57 (0.37–15.00)      | 0.13 (0.02–0.30)       | 0.53 (0.30–0.80)            | 7.21 (5.70–8.13) | 107.05 (15.00–324.93)             | 363.31 (156.00–700.00)       |
|                   | <i>S. angulistylum</i> (11)    | 4.49 (0.40–25.00)      | 0.09 (0.01–0.21)       | 0.95 (0.38–1.60)            | 6.38 (5.50–7.25) | 31.89 (6.00–184.00)               | 449.36 (110.00–1,153.00)     |
| <i>varicorne</i>  | <i>S. chumpornense</i> (4)     | 6.25 (3.00–15.00)      | 0.14 (0.06–0.20)       | 0.37 (0.24–0.50)            | 7.97 (7.20–8.40) | 226.45 (20.00–495.50)             | 44.00 (40.00–48.00)          |
|                   | <i>S. kuvangkadilokae</i> (10) | 3.50 (0.32–20.00)      | 0.16 (0.04–0.33)       | 0.70 (0.33–1.02)            | 6.16 (5.50–7.49) | 21.78 (1.00–43.70)                | 226.70 (132.00–415.00)       |

<sup>a</sup> n represents number of sampling sites

**Table 3** Results of principle complement ananlysis (PCA) and Spearman's rank correlations between stream variables and principal components (PCs) for phylogenetically derived clades

| Variable                               | Min    | Max     | Mean ± SE     | Principal components |         |        |
|----------------------------------------|--------|---------|---------------|----------------------|---------|--------|
|                                        |        |         |               | PC-1                 | PC-2    | PC-3   |
| Clade I-1 ( <i>n</i> =41) <sup>a</sup> |        |         |               |                      |         |        |
| Width                                  | 0.13   | 5.00    | 1.27±0.19     | 0.589*               | 0.628*  | -      |
| Depth                                  | 0.01   | 0.67    | 0.12±0.02     | 0.309                | 0.683*  | -      |
| Velocity                               | 0.03   | 0.96    | 0.42±0.03     | 0.448*               | 0.456*  | -      |
| Altitude                               | 304.00 | 1615.00 | 1008.61±61.07 | -0.772*              | 0.004   | -      |
| pH                                     | 6.30   | 8.57    | 7.54±0.08     | 0.506*               | -0.568* | -      |
| Conductivity                           | 8.00   | 259.00  | 59.44±8.91    | 0.708*               | -0.428* | -      |
| % Variation explained in PCA           |        |         |               |                      |         |        |
| Proportion                             |        |         |               | 33.75                | 26.76   | -      |
| Cumulative                             |        |         |               | 33.75                | 60.51   | -      |
| Clade I-2 ( <i>n</i> =14)              |        |         |               |                      |         |        |
| Width                                  | 0.30   | 6.50    | 2.04±0.53     | 0.463                | 0.620   | 0.412  |
| Depth                                  | 0.03   | 0.57    | 0.14±0.03     | 0.101                | 0.831*  | 0.388  |
| Velocity                               | 0.20   | 1.37    | 0.53±0.09     | -0.637               | -0.168  | 0.165  |
| Altitude                               | 50.00  | 600.00  | 200.36±42.27  | -0.097               | -0.670* | 0.595  |
| pH                                     | 5.01   | 7.47    | 6.76±0.17     | 0.783*               | -0.040  | 0.135  |
| Conductivity                           | 8.00   | 62.40   | 30.62±4.51    | 0.841*               | -0.132  | 0.392  |
| % Variation explained in PCA           |        |         |               |                      |         |        |
| Proportion                             |        |         |               | 49.49                | 24.80   | 16.71  |
| Cumulative                             |        |         |               | 49.49                | 74.29   | 91.00  |
| Clade I-3 ( <i>n</i> =27)              |        |         |               |                      |         |        |
| Width                                  | 0.20   | 10.00   | 2.51±0.44     | 0.799*               | -0.213  | -      |
| Depth                                  | 0.01   | 0.30    | 0.13±0.02     | 0.758*               | -0.418  | -      |
| Velocity                               | 0.20   | 1.10    | 0.48±0.04     | 0.745*               | -0.124  | -      |
| Altitude                               | 50.00  | 1302.00 | 625.37±69.42  | -0.372               | -0.419  | -      |
| pH                                     | 6.30   | 8.80    | 7.81±0.10     | 0.222                | 0.838*  | -      |
| Conductivity                           | 7.80   | 295.70  | 30.62±4.51    | 0.517*               | 0.681*  |        |
| % Variation explained in PCA           |        |         |               |                      |         |        |
| Proportion                             |        |         |               | 38.36                | 29.41   |        |
| Cumulative                             |        |         |               | 38.36                | 67.77   |        |
| Clade II ( <i>n</i> =25)               |        |         |               |                      |         |        |
| Width                                  | 0.32   | 25.00   | 4.37±1.28     | 0.293                | 0.480   | -0.263 |
| Depth                                  | 0.01   | 0.33    | 0.13±0.02     | 0.313                | -0.689* | -0.439 |
| Velocity                               | 0.24   | 1.60    | 0.76±0.07     | -0.806*              | 0.025   | 0.335  |
| Altitude                               | 40.00  | 1153.00 | 295.44±58.12  | -0.802*              | -0.180  | 0.356  |
| pH                                     | 5.50   | 8.40    | 6.55±0.18     | 0.662*               | 0.333   | 0.425  |
| Conductivity                           | 1.00   | 495.50  | 58.97±23.58   | 0.635*               | 0.018   | 0.228  |
| % Variation explained in PCA           |        |         |               |                      |         |        |
| Proportion                             |        |         |               | 39.01                | 19.64   | 18.26  |
| Cumulative                             |        |         |               | 39.01                | 58.65   | 76.91  |

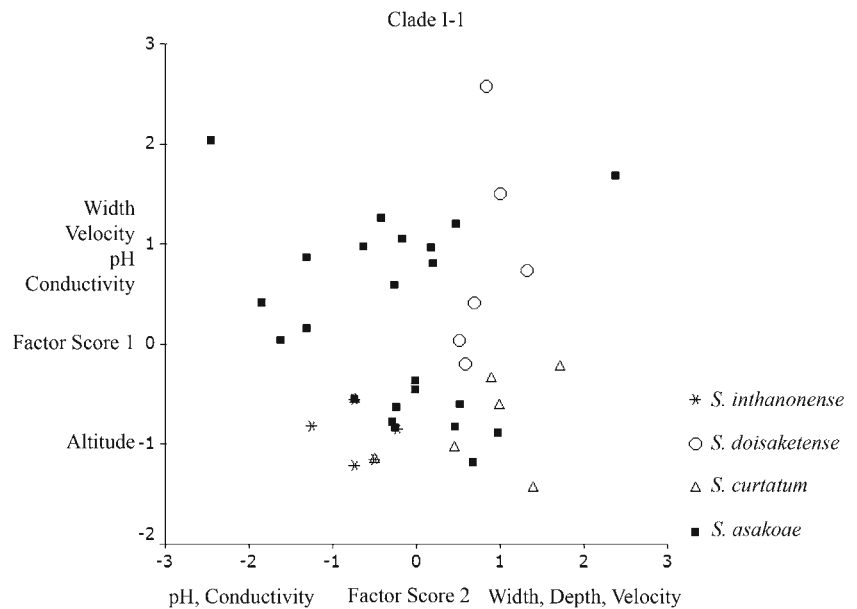
\* $P<0.01$ <sup>a</sup> n represents number of sampling sites*Clade I-3: S. decuplum and S. gombakense*

*Simulium decuplum* and *S. gombakense* were geographically widespread in Thailand over a broad range of stream conditions, and were among the few species inhabiting a wide range of altitudes (50–1,302 ma.s.l.) (Table 2). Of 27 sites where they were recorded, *S. decuplum* was found at 70.4 %

(19 sites) and *S. gombakense* at 29.6 % (8 sites). Although these species overlapped geographically, they never occurred together.

PCA extracted two PCs with eigenvalues  $>1.00$ , which explained 67.77 % of the total variation in stream conditions (Table 3). PC-1 accounted for 38.36 % of the variation and was related significantly positively to stream width, depth,

**Fig. 2** Principal components analysis (PCA) of stream variables for four species in Clade I-1 of subgenus *Gomphostilbia* in Thailand. Factor score 1 (PC-1) explained 33.75 % of the total variation and was related positively to stream width, depth, velocity, pH, and conductivity and negatively to altitude. Factor score 2 (PC-2) explained 26.76 % of the total variation and was positively related to stream width, depth, and velocity and negatively to pH and conductivity. The four taxa of Clade I-1 were separated in environmental space along the two axes



velocity, and conductivity. PC-2 accounted for 29.41 % of the variation, which largely explained the chemical conditions of the streams, as this component was related significantly positively to pH and conductivity (Fig. 4). MANOVA analysis revealed no significant differences along PC axes (PC-1,  $F_{1, 27}=0.267$ ,  $P=0.610$ ; PC-2,  $F_{1, 27}=1.568$ ,  $P=0.222$ ).

**Clade II:** *S. angulistylum*, *S. chumpornense*, and *S. kuvangkadilokae*

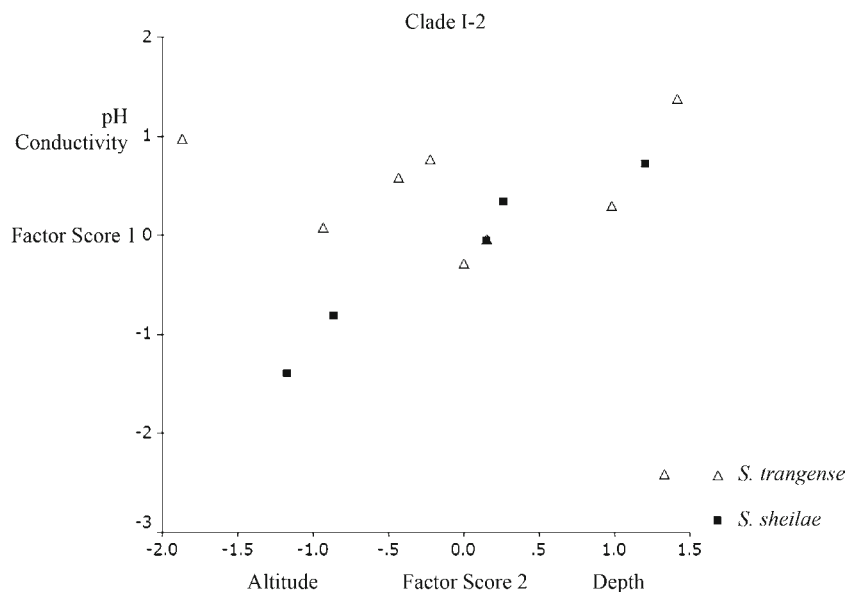
*Simulium chumpornense* was restricted to southern and western Thailand, whereas *S. kuvangkadilokae* was found only in northeastern Thailand. *Simulium angulistylum* was widespread throughout the country. Among 25 sites with at

least one member of this clade, *S. angulistylum* was found at 48 % (12 sites), *S. kuvangkadilokae* at 40 % (10 sites), and *S. chumpornense* at 16 % (4 sites). *Simulium angulistylum* and *S. kuvangkadilokae* co-occurred at one site, but no stream had all three species.

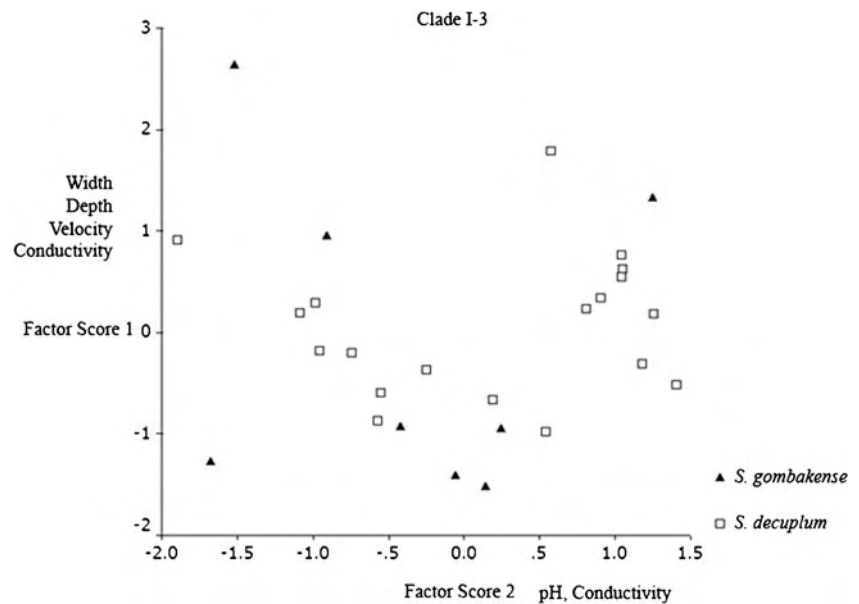
*Simulium chumpornense* and *S. kuvangkadilokae* inhabited streams of similar size, depth, velocity, and pH, but different conductivity and altitude (Table 2). *Simulium chumpornense* occurred at higher conductivity and lower altitude, whereas *S. kuvangkadilokae* was found in streams with lower conductivity but higher altitude (Table 2). *Simulium angulistylum* occupied a wide range of stream conditions from 110 m to 1,153 m.a.s.l.

PCA revealed three PCs with eigenvalues >1.00 (Table 3). These PCs accounted for 76.91 % of the total variation in

**Fig. 3** PCA of stream variables for two species in Clade I-2 of subgenus *Gomphostilbia* in Thailand. Factor score 1 (PC-1) explained 49.49 % of the total variation and was positively related to water conductivity and pH. Factor score 2 (PC-2) explained 24.80 % of the total variation and was positively related to stream depth and negatively to altitude. The two taxa of this clade were not separated in environmental space



**Fig. 4** PCA of stream variables for two species in Clade I-3 of subgenus *Gomphostilbia* in Thailand. Factor score 1 (PC-1) explained 38.36 % of the total variation and was related positively to stream width, depth, velocity, and conductivity. Factor score 2 (PC-2) explained 29.41 % of the total variation and was related positively to water conductivity and pH. The two taxa of this clade were not separated in environmental space



stream conditions among species. PC-1 accounted for 39.01 % and was related positively to stream chemistry (pH, conductivity) and negatively to physical conditions (velocity, altitude). PC-2 accounted for 19.64 % of the total variation and was related significantly negatively to stream depth (Fig. 5). PC-3 accounted for 18.26 % of the variation but showed no significant relationship with stream conditions. MANOVA indicated significant differences along PC-1 ( $F_{1,25}=13.381$ ,  $P<0.001$ ) but not PC-2 ( $F_{1,25}=0.992$ ,  $P=0.387$ ) or PC-3 ( $F_{1,25}=3.226$ ,  $P=0.059$ ).

When *S. angulistylum* was omitted from analysis, PCA revealed three PCs that explained 81.68 % of the total variation in stream conditions. PC-1 accounted for 41.93 % of the variation and was positively related to stream width and significantly negatively related to stream velocity

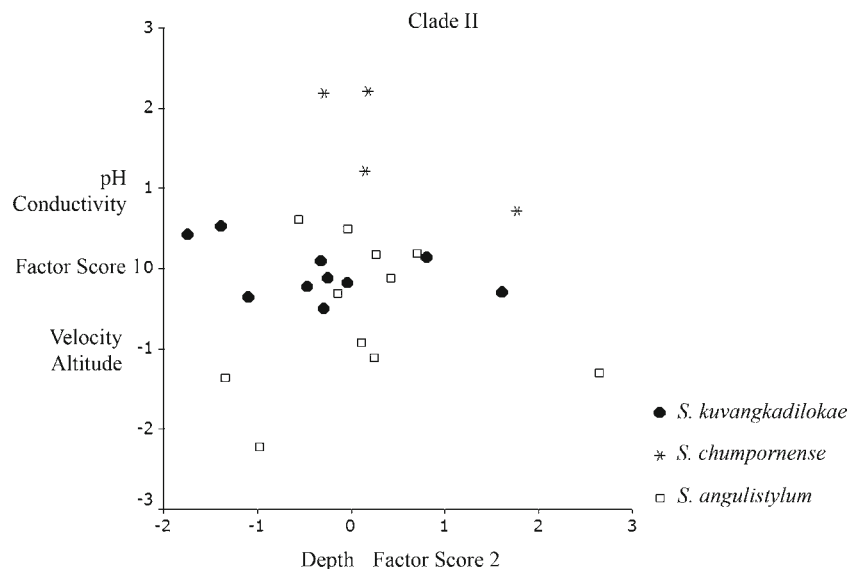
and altitude. PC-2 accounted for 21.44 % of the variation and was related significantly positively to stream depth. PC-3 accounted for 18.31 % of the variation but was not significantly related to the stream variables. MANOVA revealed significant differences along PC-1 ( $F_{1,14}=48.128$ ,  $P<0.001$ ) but not PC-2 ( $F_{1,14}=0.128$ ,  $P=0.727$ ) or PC-3 ( $F_{1,14}=0.393$ ,  $P=0.543$ ).

## Discussion

Phylogenetic relationships of *Gomphostilbia* in Thailand

Previous phylogenetic analyses have shown that *Gomphostilbia* in Thailand is a monophyletic group but placement of the species into species groups needs revision (Phayahasena et al.

**Fig. 5** PCA of stream variables for three species in Clade II of subgenus *Gomphostilbia* in Thailand. Factor score 1 (PC-1) explained 39.01 % of the total variation and was related positively to stream width and related negatively to velocity and altitude. Factor score 2 (PC-2) explained 19.64 % of the total variation and was related positively to stream depth. *Simulium chumpornense* was distributed separately from other taxa of the clade along the PC-1 axis



2010; Pramual et al. 2011a; Thanwisai et al. 2006). Our results confirm the monophyly of the *ceylonicum* group, in accord with previous morphological (Takaoka and Choochote 2004), chromosomal (Jitklang et al. 2008), and molecular studies (Phayuhasena et al. 2010; Pramual et al. 2011a; Thanwisai et al. 2006). As with previous studies (Phayuhasena et al. 2010; Pramual et al. 2011a; Thanwisai et al. 2006), we also found that the *batoense* group is not monophyletic. Four species of the *batoense* group in our study formed three clades. *Simulium decuplum* and *S. gombakense* were the sister clade to the *ceylonicum* clade, in agreement with the phylogeny based on the COI barcode gene (Pramual et al. 2011a). Morphologically, females of *S. gombakense* and *S. decuplum* have an enlarged sensory vesicle (Takaoka and Davies 1995; Takaoka et al. 2010), which also is found in four species of the *ceylonicum* group (*S. curtatum*, *S. inthanonense*, *S. sheilae*, and *S. trangense*) and one species of the *batoense* group (*S. parahiyangum*). Although our analysis did not include *S. parahiyangum*, Phayuhasena et al. (2010) found that this species is sister to *S. gombakense* and that these two species are the sister clade of the *ceylonicum* group. We therefore suggest a transfer of *S. decuplum* and *S. gombakense* to the *ceylonicum* species group, in which case the principal morphological criteria currently used to define the species groups of *Gomphostilbia* (Takaoka et al. 2011) would no longer apply universally.

*Simulium angulistylum* was clustered with the *varicorne* group, in agreement with analyses based on ITS2 (Thanwisai et al. 2006) and COI (Pramual et al. 2011a). However, a close relation between *S. angulistylum* and the *varicorne* group was not observed in the multiple gene analysis of Phayuhasena et al. (2010). Given the different phylogenetic analyses and lack of shared morphological characters between *S. angulistylum* and the *varicorne* group, placement of this species in a group needs further study.

#### Patterns of geographical isolation and ecological divergence among closely related species

Our results revealed three patterns of geographical isolation and ecological divergence for closely related, nearly isomorphic taxa: (1) species overlap geographically but are isolated by habitat and are ecologically divergent (Clade I-1), (2) species overlap geographically but are isolated by habitat while having similar larval ecologies (Clades I-2 and I-3), and (3) species are geographically isolated and ecologically divergent (Clade II).

PCA indicated that five stream variables (altitude, stream conductivity, depth, width, and velocity) differ among the members of clade I-1, and combinations of altitude and stream velocity reveal ecological distinction of the species. *Simulium curtatum* and *S. inthanonense* are found at high altitudes (>1,000 m.a.s.l.) but occupy streams of different velocity, averaging about twofold greater for *S. curtatum*

(0.49 m/s) than for *S. inthanonense* (0.23 m/s). Species distributions of black flies often are related to stream velocity (Palmer and Craig 2000; Zhang and Malmqvist 1996). Morphological adaptation to different stream velocities could drive adaptive radiation (Zhang 2006). Thus, habitat isolation between *S. inthanonense* and *S. curtatum* might be a result of adaptation to exploit different stream velocities. Further morphological analyses could be used to test this hypothesis. *Simulium doisaketense* inhabits lower altitudes, relative to other members of Clade I-1, and is not found above 900 m. *Simulium inthanonense* and *S. curtatum* are found at high elevations, whereas *S. asakoae* occurs over a wide range of altitudes (304–1,615 m.a.s.l.). The results are consistent with previous studies showing that elevation is associated with species distributions (Jitklang et al. 2008; Kuvangkadilok et al. 1999).

The second pattern that emerged from our analyses is that closely related species overlap geographically but are isolated by habitat and have similar ecologies. Similar ecological niches among closely related species have been attributed to historical constraints, with species tending to retain their ancestral niche (Weins 2004). Four factors prevent ecological niche divergence of closely related species, viz., natural selection, pleiotropy, gene flow, and lack of variability (Weins 2004), but identifying the responsible factor(s) can be difficult. *Simulium gombakense* and *S. decuplum* (Clade I-3) overlap geographically, but do not co-occur in streams. *Simulium sheilae* and *S. trangense* (Clade I-2) also geographically overlap; although they are not isolated at the habitat scale, they rarely coexist. These two species are nearly identical morphologically, and *S. trangense* was confirmed and described as a distinct species only after chromosomal study revealed fixed-banding differences (Jitklang et al. 2008). What prevents similar species from coexisting if they overlap geographically and prefer the same ecological niche? One possibility is interspecific competition. Species that use the same ecological niche potentially compete for resources (Morin 1999). Given that competition decreases fitness, natural selection should favor traits that reduce interspecific competitive interactions. We hypothesize that habitat separation of these species is related to oviposition preferences. If a female lays eggs in the same stream as that of another species with a similar ecological niche, its fitness might be compromised by larval competition. Natural selection, therefore, should favor females that lay eggs in streams without competitors.

The third pattern involves closely related species that are geographically isolated and ecologically divergent. *Simulium kuvangkadilokae* and *S. chumpornense*, which have nearly identical larvae, are possible sister species (Pramual and Tangkawanit 2008), but *S. kuvangkadilokae* is found in northeastern Thailand, whereas *S. chumpornense* is found in southern and western Thailand. Both physical

and chemical factors of the streams differ significantly between these species. Geographical isolation of the species could be due to vicariance or dispersal. However, no vicariance event is apparent that could result in separation of *S. chumpornense* from *S. kuvangkadilokae*. Although a sea-way putatively existed during the Neogene period (Woodruff 2003), it was located at a latitude lower than the current distribution of these species. Geographic isolation of *S. chumpornense* and *S. kuvangkadilokae* is therefore more likely the result of dispersal. Phylogeographic study of another group of black flies, the *S. tani* complex, indicated colonization of the eastern and southern areas from northern populations through the western forest corridor (Pramual et al. 2005). *Simulium chumpornense* is found in the western and southern regions, and we hypothesize that the ancestral population colonized these regions by dispersal. A phylogeographic approach could be used to test this hypothesis. Among the stream variables that differ significantly between *S. kuvangkadilokae* and *S. chumpornense*, altitude, conductivity, and stream velocity are markedly divergent. This situation resembles that of Clade I-1, suggesting that these factors could have played an important role in population isolation leading to species divergence.

A model of black fly speciation driven by chromosomal rearrangements, coupled with biological divergence, was proposed by Rothfels (1989). According to this model, closely related species differ in chromosomal inversions, and speciation results from different co-adapted gene systems leading to divergence in life cycle, host choice, or niche preference. Our results support this model; closely related species occupy different ecological niches. Previous studies have shown extensive chromosomal polymorphisms in many species of *Gomphostilbia*, which could be partitioned into distinct cytoforms (Jitklang et al. 2008; Kuvangkadilok et al. 2008). Ecological differentiation among cytoforms also has been demonstrated (Jitklang et al. 2008; Kuvangkadilok et al. 2008; Pramual and Wongpakam 2011), suggesting that chromosome inversions play a role in ecological preference. The Rothfels (1989) model also suggests that sympatric speciation is probable, based on empirical evidence that sibling species tend to be sympatric. In our study, 8 of the 12 species overlap geographically. These species are ecologically divergent, suggesting that adaptation to different ecological niches could have promoted speciation.

Pleistocene climate and environmental changes also could have facilitated population divergence leading to speciation or perhaps aiding chromosome-mediated speciation of some members of *Gomphostilbia*. These Pleistocene changes promoted population fragmentation and speciation in a number of different organisms (e.g., Carstens and Knowles 2007; Johnson and Cicero 2004; Knowles 2001). Although the effects of Pleistocene glaciations might have

been less severe in the tropics than in the temperate regions, the environmental changes promoted speciation (Haffer 1969; Mayr and O'Hara 1986) and in several Southeast Asian mainland species, influenced genetic structure and diversity (e.g., Cannon and Manos 2003; Morgan et al. 2010; O'Loughlin et al. 2008). The dry conditions produced during glaciations reduced running-water habitats, although streams persisted in high mountainous areas (Gathorne-Hardy et al. 2002). Pleistocene glaciations, thus, could have driven population fragmentation of black flies, as demonstrated by the phylogeographic study of the *S. tani* complex (Pramual et al. 2005). Climate changes during the Pleistocene also played a significant role in the demographic history of simuliids. Recent population expansions, for example, have been found in the *S. tani* (Pramual et al. 2005) and *S. siamense* complexes (Pramual et al. 2011b). Geographical isolation of *S. chumpornense* and *S. kuvangkadilokae* also might have been a result of Pleistocene effects, the geographic distributions of these species reflecting the historical dispersal route of the *S. tani* complex (Pramual et al. 2005).

Integrating information on geographical distributions, larval ecology, and phylogeny enabled us to infer factors contributing to habitat exploitation of black flies. Both geographical isolation and ecological divergence are found among similar *Gomphostilbia* species. Most closely related species overlap geographically but are ecologically divergent, suggesting that ecological shifts could have been involved in species divergence in *Gomphostilbia*, although allopatric speciation driven by Pleistocene climate changes also could have contributed to speciation. If further evidence, such as broader phylogenetic study, supports the finding that some of the species pairs in our study (e.g., *S. kuvangkadilokae* and *S. chumpornense*) are true sister species, speciation driven by adaptation to different ecological niches might have been a prevalent mode in the subgenus *Gomphostilbia*.

**Acknowledgments** This work was supported financially by the Thailand Research Fund, Commission on Higher Education and Mahasarakham University (MRG5380053). We thank J. Dodgson (Mahasarakham University, Thailand) for comments on an earlier version of the manuscript.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Adler, P. H. (1988). Ecology of black fly sibling species. In K. C. Kim & R. W. Merritt (Eds.), *Black flies: ecology, population management, and annotated world list* (pp. 63–76). University Park: Pennsylvania State University Press.

- Adler, P. H., & Crosskey, R. W. (2012). World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory [2012]. <http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf> Accessed 25 April 2012.
- Adler, P. H., & Kim, K. C. (1984). Ecological characterization of two sibling species, IIL-1 and IS-7, in the *Simulium vittatum* complex (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 62, 1308–1315.
- Adler, P. H., & McCreadie, J. W. (1997). The hidden ecology of black flies: Sibling species and ecological scale. *American Entomologist*, 43, 153–161.
- Boakye, D. A., Back, C., Fiasorgbor, G. K., Sib, A. P. P., & Coulibaly, Y. (1998). Sibling species distributions of the *Simulium damnosum* complex in the West African Onchocerciasis Control Programme area during the decade 1984–93, following intensive larviciding since 1974. *Medical Veterinary and Entomology*, 12, 345–358.
- Cannon, C. H., & Manos, P. S. (2003). Phylogeography of the South-east Asian stone oaks (*Lithocarpus*). *Journal of Biogeography*, 30, 211–226.
- Carstens, B. C., & Knowles, L. L. (2007). Shifting distributions and speciation: Species divergence during rapid climatic change. *Molecular Ecology*, 16, 619–627.
- Conflitti, I. M., Kratochvil, M. J., Spironello, M., Shields, G. F., & Currie, D. C. (2010). Good species behaving badly: non-monophyly of black fly sibling species in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 245–257.
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Sunderland: Sinauer.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G., & Bult, C. (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10, 315–319.
- Gathorne-Hardy, F. J., Syaukani, Davies, R. G., Eggleton, P., & Jones, D. T. (2002). Quaternary rainforest refugia in South-East Asia: Using termites (Isoptera) as indicators. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75, 453–466.
- Graham, C. H., Ron, S. R., Santos, J. C., & Schneider, C. J. (2004). Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution*, 58, 1781–1793.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165, 131–137.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. R. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Jitklang, S., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., Takaoka, H., & Adler, P. H. (2008). Cytogenetics and morphotaxonomy of the *Simulium* (*Gomphostilbia*) *ceylonicum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, 1917, 1–28.
- Johnson, N. K., & Cicero, C. (2004). New mitochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in North American birds. *Evolution*, 58, 1122–1130.
- Joy, D. A., & Conn, J. E. (2001). Molecular and morphological phylogenetic analysis of an insular radiation in Pacific black flies (*Simulium*). *Systematic Biology*, 50, 18–38.
- Joy, D. A., Craig, D. A., & Conn, J. E. (2007). Genetic variation tracks ecological segregation in Pacific island black flies. *Heredity*, 99, 452–459.
- Knowles, L. L. (2001). Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology*, 10, 691–701.
- Kuvangkadilok, C., & Takaoka, H. (2000). Taxonomic notes on Simuliidae (Diptera) from Thailand: description of a new species and new distributional records of nine known species. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28, 167–175.
- Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C., & Phayahasena, S. (1999). Distribution of the larvae of blackflies (Diptera: Simuliidae) at Doi Inthanon National Park, northern Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 30, 328–337.
- Kuvangkadilok, C., Lualon, U., & Baimai, V. (2008). Cytotaxonomy of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Genome*, 51, 972–987.
- Mayr, E. (1963). *Animal species and evolution*. Cambridge: Harvard University Press.
- Mayr, E., & O'Hara, R. J. (1986). The biogeographic evidence supporting the Pleistocene forest refuge hypothesis. *Evolution*, 40, 55–67.
- McCreadie, J. W., & Adler, P. H. (1998). Scale, time, space, and predictability: species distributions of preimaginal black flies (Diptera: Simuliidae). *Oecologia*, 114, 79–92.
- McCreadie, J. W., Adler, P. H., Grillet, M. E., & Hamada, N. (2006). Sampling statistics in understanding distributions of black fly larvae (Diptera: Simuliidae). *Acta Entomologica Serbica Supplement*, 89–96.
- Morgan, K., Linton, Y., Somboon, P., Saikia, P., Dev, V., Socheat, D., & Walton, C. (2010). Inter-specific gene flow dynamics during the Pleistocene-dated speciation of forest-dependent mosquitoes in Southeast Asia. *Molecular Ecology*, 19, 2269–2285.
- Morin, P. J. (1999). *Community ecology*. Malden: Blackwell Science.
- Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- O'Loughlin, S., Okabayashi, T., Honda, M., Kitazoe, Y., Kishino, H., Somboon, P., Sochantha, T., Nambanya, S., Saikia, P. K., Dev, V., & Walton, C. (2008). Complex population history of two *Anopheles dirus* mosquito species in South Asia suggests the influence of Pleistocene climate change rather than human-mediated effects. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 1555–1569.
- Orr, M. R., & Smith, T. B. (1998). Ecology and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 502–505.
- Palmer, R. W., & Craig, D. A. (2000). An ecological classification of primary labral fans of filter feeding black fly (Diptera: Simuliidae) larvae. *Canadian Journal of Zoology*, 78, 199–218.
- Peterson, A. T., Soberón, J., & Sánchez-Cordero, V. (1999). Conservation of ecological niches in evolutionary time. *Science*, 285, 1265–1267.
- Phasuk, J., Chanpaisaeng, P., Adler, P. H., & Courtney, G. W. (2005). Chromosomal and morphological taxonomy of larvae of *Simulium* (*Gomphostilbia*) (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, 1052, 49–60.
- Phayuhasena, S., Colgan, D. J., Kuvangkadilok, C., Pramual, P., & Baimai, V. (2010). Phylogenetic relationships among the black fly species (Diptera: Simuliidae) of Thailand based on multiple gene sequences. *Genetica*, 138, 633–648.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253–1256.
- Pramual, P., & Kuvangkadilok, C. (2009). Agricultural land use and black fly (Diptera: Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand. *Hydrobiologia*, 625, 173–184.
- Pramual, P., & Tangkawanit, U. (2008). A new species of *Simulium* (*Gomphostilbia*) (Diptera: Simuliidae) from northeastern Thailand. *Medical Entomology and Zoology*, 59, 297–303.
- Pramual, P., & Wongpakam, K. (2010). Seasonal variation of black fly (Diptera: Simuliidae) species diversity and community structure in tropical streams of Thailand. *Entomological Science*, 13, 17–28.
- Pramual, P., & Wongpakam, K. (2011). Cytogenetics of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki, 1984 (Diptera: Simuliidae) in northeastern Thailand. *Aquatic Insects*, 33, 171–184.
- Pramual, P., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., & Walton, C. (2005). Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae)

- from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*, 14, 3989–4001.
- Pramual, P., Wongpakam, K., & Adler, P. H. (2011a). Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 54, 1–10.
- Pramual, P., Kongim, B., & Nanork, P. (2011b). Phylogeography of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki complex (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomological Science*, 14, 428–436.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2004). Tracer 1.3. <http://beastbioedacuk/Tracer>. Accessed 27 May 2010.
- Rodriguez, R., Oliver, J. L., Marin, A., & Medina, J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142, 485–501.
- Rothfels, K. (1989). Speciation in black flies. *Genome*, 32, 500–509.
- Schluter, D. (1998). Ecological causes of speciation. In D. Howard & S. Berlocher (Eds.), *Endless forms: Species and speciation* (pp. 114–129). New York: Oxford University Press.
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 372–380.
- 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.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.b.10*. Sunderland: Sinauer.
- Takaoka, H., & Choochote, W. (2004). A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Tropical Medicine and Health*, 32, 189–197.
- Takaoka, H., & Davies, D. M. (1995). *The black flies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia*. Fukuoka: Kyushu University Press.
- Takaoka, H., & Suzuki, H. (1984). The blackflies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 36, 7–45.
- Takaoka, H., Srisuka, W., & Saeung, A. (2010). Description of the female of *Simulium (Gomphostilbia) gombakense* (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Medical Entomology and Zoology*, 61, 111–114.
- Takaoka, H., Sofian-Azirun, M., Hashim, R., & Ya'cob, Z. (2011). Two new species of *Simulium (Gomphostilbia)* (Diptera: Simuliidae) from Peninsular Malaysia, with keys to Peninsular Malaysian members of the *Simulium ceylonicum* species-group. *ZooKeys*, 118, 53–74.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512–526.
- Thanwisai, A., Kuvangkadilok, C., & Baimai, V. (2006). Molecular phylogeny of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. *Genetica*, 128, 177–204.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876–4882.
- Weins, J. J. (2004). Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*, 58, 193–197.
- Woodruff, D. S. (2003). Neogene marine transgressions, palaeogeography and biogeographic transitions on the Thai-Malay Peninsula. *Journal of Biogeography*, 30, 551–567.
- Zhang, Y. (2006). Balancing food availability and hydrodynamic constraint: Phenotypic plasticity and growth in *Simulium noelleri* blackfly larvae. *Oecologia*, 147, 39–46.
- Zhang, Y., & Malmqvist, B. (1996). Relationships between labral fan morphology, body size and habitat in North Swedish blackfly larvae (Diptera: Simuliidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 59, 261–280.