



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาอนุพันธุศาสตร์และนิเวศวิทยาของพาหะกับเชื้อก่อโรค
(Molecular genetics and ecology of vectors and their pathogens)

โดย

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.วิสุทธิ ไบไม้ และคณะ

ธันวาคม 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาอนุพันธุศาสตร์และนิเวศวิทยาของพาหะกับเชื้อก่อโรค (Molecular genetics and ecology of vectors and their pathogens)

คณะผู้วิจัย

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. วิสุทธิ ไบไม้
รองศาสตราจารย์ ดร. เฉลียว กุวั่งคะดิลก
รองศาสตราจารย์ ดร. ปัทมาภรณ์ กฤตยพงศ์
ดร. วันวิสาข์ จำนงค์ลักษณ์
ดร. นพมณี เชื้อวัชรินทร์
ดร. จอห์น มิดล์

ภาควิชาชีววิทยา

ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ : หน่วยพาหะและโรคที่นำโดยเฉพาะ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานเป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณาจารย์และผู้ร่วมวิจัยในโครงการนี้ทุกท่านที่มีส่วนร่วมสร้างสรรค์บรรยากาศการวิจัยชีววิทยาพื้นฐานและผลิตผลงานวิชาการพื้นฐานด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากรของริ้นดำ ไรอ่อนและนิเวศวิทยาของพาหะกับเชื้อก่อโรคอย่างจริงจังและต่อเนื่อง รวมทั้งนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกคนที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยวิทยานิพนธ์ตลอดจนกิจกรรมทางวิชาการในส่วนต่าง ๆ ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีตามเป้าประสงค์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ พอ.หญิง ดร. จริยาณัฐ เกวี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารบก ศาสตราจารย์ ดร.อังศุมาลย์ จันทราบัตย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, Professor Peter Adler มหาวิทยาลัยเคมสัน รัฐโคโรไลน์ใต้ ประเทศสหรัฐอเมริกา และ Dr. Catherine Walton มหาวิทยาลัยแมนเชสเตอร์ ประเทศอังกฤษ, Professor Scott O'Neill มหาวิทยาลัยควีนสแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย และ Professor Didier Bouchon มหาวิทยาลัยปารีส ประเทศฝรั่งเศส, Dr. Jean Paul Gonzalez, Institut de Recherche pour le Developpement (IRD) in thailand,

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (RDG4530034) โดยได้ดำเนินการระหว่างเดือนกันยายน 2545 ถึงเดือนธันวาคม 2548

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RDG4530034

ชื่อโครงการ: การศึกษาอนุพันธุศาสตร์และนิเวศวิทยาของพาหะกับเชื้อก่อโรค

ชื่อนักวิจัย: วิสุทธิ์ ไบไม^{1,2}, เฉลียว กุวังคะดิลก¹, ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์^{1,2}, จอนห์ มิลน์¹, วันวิสาข์ จ้างนค์ลักษณ์^{1,2}, นพมณี เชื้อวัชรินทร์^{1,2}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ

²ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: หน่วยพาหะและโรคที่นำโดยพาหะ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ

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

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย: 1 กันยายน 2545 ถึง 31 ธันวาคม 2548

วัตถุประสงค์: ศึกษาเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงพาหะและสัตว์ขาปล้อง แบคทีเรีย Eubacteria และการแพร่กระจายของไรอ่อนกลุ่ม Trombiculid, นิเวศวิทยาและวิวัฒนาการของประชากรธรรมชาติของแมลงรบกวนในประเทศไทย

สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรีย *Wolbachia* และเดนโซไวรัส: การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเดนโซไวรัสในยุง 53 ชนิด จำนวน 416 ตัว จากประชากรธรรมชาติในจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR พบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงจิ้งหรีด *Aedes* จำนวน 7 ชนิด ในขณะที่พบการติดเชื้อเดนโซไวรัส ในยุง 3 ชนิด คือ *Aedes aegypti*, *Anopheles dirus* A และ *Anopheles minimus* การทดลองศึกษาความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยเทคนิค Quantitative Real-time PCR ในแต่ละช่วงการเจริญของยุง *Ae. albopictus* โดย *Ae. aegypti* ที่ได้รับการถ่ายฝากเชื้อ *Wolbachia* wAlbA และ wAlbB จากยุง *Ae. albopictus* พบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะพัก แสดงให้เห็นถึงการอาศัยอยู่แบบเกื้อกูลกัน (symbiosis) ระหว่างโฮสต์กับแบคทีเรีย *Wolbachia* นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วย โดยความหนาแน่นลดลงในยุงที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับการตรวจสอบความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแต่ละระยะของการเจริญในยุง *Ae. aegypti* ที่ได้รับการถ่ายฝากเชื้อ *Wolbachia* จากยุง *Ae. albopictus* สายพันธุ์ KLPP พบว่าความหนาแน่นของ *Wolbachia* ในยุง *Ae. aegypti* เพิ่มขึ้นน้อยกว่าในยุง *Ae. albopictus* แสดงให้เห็นว่ายุง *Ae. aegypti* มีความต้านทานการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ดีกว่ายุง *Ae. albopictus*

ไรอ่อน: ศึกษาสายพันธุ์ของตัวอย่างไรอ่อนกลุ่ม Trombiculids โดยการจำแนกลักษณะเฉพาะด้าน สัณฐานวิทยา ร่วมกับด้านอนุพันธุศาสตร์โดยใช้ยีน rRNA ในส่วน 18S rRNA พบไร 7 สปีชีส์ ใน 4 จินัส คือ *Ascoschoengastia globola*, *Walchia lupella*, *Walchia kalrata*, *Trombicula (Blankaartia) gracilis*, *Trombicula (Blankaartia) niloticum*, *Trombicula (letotrombidium) sp.* และ *Helenicula sp.* เมื่อสร้าง Phylogenetic tree พบว่า ไรอ่อนประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม 1 (*Ascoschoengastia sp.* กับ *Walchia sp.*) และกลุ่ม 2 (*Trombicula sp.* กับ *Helenicula sp.*) โดยทั้ง 2 กลุ่มนี้มีค่าเฉลี่ย Genetic distance เท่ากับ 18.9% ในขณะที่ค่าเฉลี่ย Genetic distance ระหว่างจินัสภายในกลุ่มที่ 1 เท่ากับ 6.74% และภายในกลุ่มที่ 2 เท่ากับ 3.1% อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ย Genetic distance ระหว่างสายพันธุ์ภายใน *Ascoschoengastia sp.* เท่ากับ 0.4% สำหรับการตรวจหาเชื้อ Eubacteria ในตัวไรอ่อนด้วยเทคนิคทาง โมเลกุลพบ Eubacteria กลุ่ม γ -proteobacteria ในตัวอย่างไรอ่อน 2 ตัวโดยแบคทีเรียในตัวหนึ่งคล้ายกับ *Pantoea agglomerans* ที่สามารถก่อโรค cotton fever และในอีกตัวหนึ่งคล้ายกับ *Photorhabdus luminescens* ซึ่งเป็นศัตรูของแมลง แบคทีเรียที่พบในไรอ่อนนี้อาจมีความสัมพันธ์กับความสามารถของ ไรอ่อนในการเป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคในคนหรือในแมลง

แมลงวันตำ: การศึกษาในโครงการนี้พบแมลงวันตำจำนวน 45 ชนิด รันตำที่กระจายในภาคเหนือมี ประมาณ 27 ชนิด และมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์ เช่น ขนาดของลำธาร ความสูงเหนือระดับ น้ำทะเล และความเร็วของกระแส น้ำ การศึกษาแบบแผนการเรียงลำดับของโพลีทีน-โครโมโซมแบนด์ของตัวอ่อนพบว่าประชากรของแมลงวันตำชนิด *Simulium siamense* และ *Simulium tani* แบ่งออกเป็น cytoforms ต่างๆที่มีรูปร่างคล้ายคลึงกัน การศึกษานิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (COI) แสดงให้เห็นว่าประชากรของแมลงวันตำ 3 ชนิดจากภาคเหนือมีความหลากหลายและโครงสร้างทาง พันธุกรรมสูงกว่าประชากรจากภาคอื่นๆ นอกจากนี้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอทำให้ทราบสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของรันตำกลุ่มต่างๆ อย่างชัดเจน ข้อมูลจากการศึกษานี้อาจเป็น ประโยชน์ในการพัฒนาหามาตรการควบคุมประชากรธรรมชาติของแมลงวันตำในอนาคต

Abstract

Project Code: RDG4530034

Project Title: Molecular genetics and ecology of vectors and their pathogens

Investigators: Visut Baimai¹, Chaliow Kuvangkadilok¹, Pattamaporn Kittayapong¹, John Milne¹,
Wanwisa Jamnongluk^{1,2}, Nopmanee Chauvatcharin

¹Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road,
Bangkok, ² Center for Vectors and Vector-Borne Diseases, Faculty of Science,
Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok,

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

Project Period: 1 September 2002 - 31 December 2005

Objectives: To study densovirus and *Wolbachia* bacteria in mosquito vectors and arthropods, Eubacteria in and distribution of chiggers (Trombiculids), and ecology and evolution in natural populations of black fly in Thailand.

Methodology and Results:

Wolbachia bacteria and densovirus: A total of 416 individual samples of 53 species of mosquitoes collected from natural populations throughout Thailand were tested for *Wolbachia* and densovirus infection using PCR method. Only 7 species of mosquitoes in genus *Aedes* were infected with *Wolbachia*, while 3 species, i.e., *Aedes aegypti*, *Anopheles dirus* A and *Anopheles minimus* were infected with densovirus. Quantitative Real-time PCR was performed to study *Wolbachia* density at different developmental stages of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* transinfected with *Wolbachia* wAlbA and wAlbB from *Ae. albopictus*. The results showed that *Wolbachia* density was decreased at diapause stage indicating symbiosis of *Wolbachia* and the host. Moreover, culture temperature also affected *Wolbachia* density: lower density was detected in mosquito cultured at 37°C compared to those at 25°C. Examination of *Wolbachia* density in different developmental stages of *Ae. aegypti* transinfected from the KLPP strain of *Ae. albopictus* revealed that *Wolbachia* density in *Ae. aegypti* increased at a lower rate than that of *Ae. albopictus*. The results seem to suggest that *Ae. aegypti* may have a better resistance to multiplication of *Wolbachia* than *Ae. albopictus*.

Chigger: The chiggers (Trombiculids) were identified to genus and species by morphology and molecular genetic techniques using 18S rRNA gene. We were able to identify 7 species of chiggers belonging to 4 genera, i.e., *Ascoschoengastia globosa*, *Walchia lupella*, *Walchia kalrata*, *Trombicula (Blankaartia) gracilis*, *Trombicula (Blankaartia) niloticum*, *Trombicula (Ietotrombidium) sp.* and *Helenicula sp.* The phylogenetic tree showed two groups of chiggers: group 1 (*Ascoschoengastia sp.* and *Walchia sp.*) and group 2 (*Trombicula sp.* and *Helenicula sp.*). The average Genetic distance between the two groups was 18.9%, between the genera within group 1 was 6.74%, and within group 2 was 3.1%. However, the average Genetic distance among strains of *Ascoschoengastia sp.* was 0.4%. Exploring for possible medically related eubacteria in chiggers by molecular techniques has revealed positive results for γ -proteobacteria in 2 specimens: one was related to *Pantoea agglomerans*, causative of cotton fever, and the other was related to *Photorhabdus luminescens*, entomopathogenic bacteria. These eubacteria may be related to vectorial capability of chiggers for human or insect pathogens.

Black fly: Forty five known species of black fly were found in Thailand during this study. The distribution of 27 larval black fly species from northern Thailand was related to some physical parameters of the breeding sites such as stream size, altitude and water velocity. Study of larval polytene chromosomes has revealed the existence of different cytoforms with morphological uniforms in the populations of *Simulium siamense* and *Simulium tani*. Based on the mitochondrial DNA (COI) sequence, the populations of three black fly species from the northern region showed greater diversity and highly genetic structure within the region as well as genetic differentiation from populations in the other regions. Moreover, molecular sequence of ITS2 rDNA clarified phylogenetic relationships among 40 black fly species. This fundamental knowledge may be useful for developing control measures for black fly populations in Thailand in the future.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

แบคทีเรีย *Wolbachia* กลุ่ม A และ B ซึ่งพบติดเชื้อในแมลง สามารถแพร่กระจายในประชากรของแมลงเจ้าบ้านได้อย่างรวดเร็วโดยการเปลี่ยนแปลงกลไกการสืบพันธุ์ของแมลงเจ้าบ้านด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ Cytoplasmic incompatibility, male killing, parthenogenesis และ feminization ลักษณะดังกล่าวทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างประชากรแมลงในธรรมชาติได้ การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงสปีชีส์ต่างๆ ในธรรมชาติ และความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแต่ละช่วงของการเจริญ รวมถึงผลกระทบของอุณหภูมิและสารกำจัดแมลงต่อความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ทำให้เข้าใจชีววิทยาของ *Wolbachia* ในสัตว์ขาปล้องและแมลงต่างๆ โดยเฉพาะในแมลงพาหะได้ดีขึ้น รวมทั้งปฏิสัมพันธ์และวิวัฒนาการร่วมกันระหว่าง *Wolbachia* และแมลงเจ้าบ้านหรือโฮสต์ โดยข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะมีประโยชน์สำหรับการพัฒนาหามาตรการควบคุมโรคและยุงพาหะได้

การสำรวจเบื้องต้นของไรอ่อน (chigger) ในกลุ่ม Trombiculids โดยการเก็บตัวอย่างไรอ่อนที่เป็นปรสิตอยู่บนตัวสัตว์ฟันแทะขนาดเล็ก ที่จับได้จากการวางกับดักในพื้นที่ 5 จังหวัดในภาคเหนือ ภาคกลาง และตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การจำแนกชนิดของไรอ่อนโดยใช้ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา ร่วมกับด้านอณูพันธุศาสตร์ที่ได้พัฒนาเทคนิคขึ้นมาใหม่ โดยเริ่มจากการพัฒนาเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอ การคัดเลือกยีนที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นดัชนีในการจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ การจำลองยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) การถอดรหัสพันธุกรรม สร้าง Phylogenetic tree จากค่า Genetic distance และ Genetic identity พร้อมทั้งตรวจสอบหา Eubacteria ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่อาจมีอยู่ในตัวไรอ่อน

การพัฒนาเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากไรอ่อนเพียงหนึ่งตัวที่มีขนาดเล็กมากจนได้ผลดีและมีคุณภาพที่สามารถนำไปใช้ศึกษาลักษณะเฉพาะด้านอณูพันธุศาสตร์ โดยทดลองศึกษาในยีน CO1 ที่อยู่ใน Mitochondria และ RNA gene ในส่วน ITS1, ITS2 และ 18S rRNA พบว่า ยีน 18S rRNA มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นดัชนีในการตรวจสอบสายพันธุ์ของไรอ่อนในกลุ่มนี้ เนื่องจากมีขนาดใหญ่ประมาณ 1,800 คู่เบส ทำให้ได้รายละเอียดด้านพันธุกรรมมากเพียงพอเพื่อการแยกชนิดหรือสายพันธุ์ได้ การสำรวจไรอ่อนในภาคสนามที่เก็บได้จากสัตว์ฟันแทะชนิดต่างๆ เช่น หนูป่า (*Berylmys berdmorei*), หนูท้องขาว (*Rattus rattus*), หนูพุกใหญ่ (*Bandicota indica*), กระรอก (*Beromys menetus*) และ กระแต (*Tupaia glis*) การจำแนกไรอ่อนโดยใช้ลักษณะเฉพาะด้านสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกได้ 7 สปีชีส์ที่จัดอยู่ใน 4 จีนัส คือ *Ascoschoengastia globosa*, *Walchia lupella*, *Walchia kalrata*, *Trombicula (Blankaartia) gracilis*, *Trombicula (Blankaartia) niloticum*, *Trombicula (Letotrombidium) sp.* และ *Helenicula sp.* การจำแนกโดยใช้ลักษณะเฉพาะด้านอณูพันธุศาสตร์ของไรอ่อนจำนวน 23 ตัวอย่างจากทั้ง 4 จีนัส พบว่าชิ้นส่วนยีน 18S rRNA ของไรอ่อนขนาด 562 คู่เบส มีองค์ประกอบของเบสชนิดต่างๆ คือ A=28.67%, C=20.40%, G= 25.67% และ T=25.26% เมื่อสร้าง Phylogenetic tree จากค่าเฉลี่ย Genetic identity และ Genetic

distance พบว่า ตัวอย่างไรอ่อนประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม 1 (*Ascoschoengastia* sp. กับ *Walchia* sp.) และกลุ่ม 2 (*Trombicula* sp. กับ *Helenicula* sp.) โดยมีค่าเฉลี่ย Genetic distance ระหว่าง 2 กลุ่มนี้เท่ากับ 18.9%, ระหว่างจีโนมภายในกลุ่มที่ 1 เท่ากับ 6.74%, และภายในกลุ่มที่ 2 เท่ากับ 3.1% อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ย Genetic distance ระหว่างสายพันธุ์ภายใน *Ascoschoengastia* sp. เท่ากับ 0.4% สำหรับการตรวจหาเชื้อ Eubacteria ในตัวไรอ่อนด้วยเทคนิคทางโมเลกุลพบว่ามี Eubacteria กลุ่ม γ -proteobacteria ในตัวอย่างไรอ่อน 2 ตัว คือแบคทีเรียในตัวหนึ่งคล้ายกับ *Pantoea agglomerans* ที่สามารถก่อโรค cotton fever และในอีกตัวหนึ่งที่คล้ายกับ *Photorhabdus luminescens* ที่เป็นศัตรูของแมลง แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มนี้อาจมีความสัมพันธ์กับความสามารถของไรอ่อนในการเป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคในคนหรือในแมลง

ผลจากการศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานด้านสัณฐานวิทยา อนุพันธุศาสตร์ และ Eubacteria ของไรอ่อนชนิดต่างๆ ที่เป็นปรสิตของ host ชนิดต่างๆ ในประเทศไทย ข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์ในการทำภูมิสารสนเทศ (GIS) ข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ของไรอ่อนดังกล่าวนอกจากจะเป็นประโยชน์ในการช่วยจำแนกชนิดของไรอ่อนแล้วยังเป็นองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับวิวัฒนาการของไรอ่อนกลุ่มนี้ นอกจากนั้นเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่ในการศึกษานี้จะได้นำเอาไปรวบรวมเป็นคู่มือการจำแนกชนิดของไรอ่อนในประเทศไทยต่อไป

เป็นที่ทราบกันดีว่าแมลงวันดำเพศเมียเป็นพาหะสำคัญของพยาธิและเชื้อโรคหลายชนิด เช่น พยาธิ *Onchocerca* ในคนและสัตว์ และถ่ายทอดโปรโตซัวสกุล *Leucocytozoon* ระหว่างพวกสัตว์ปีก การศึกษาแบบแผนของโพลีทีนโครโมโซมแบนด์ของตัวอ่อนของวันดำมีความสำคัญอย่างมากในด้านอนุกรมวิธานของแมลงวันวงศ์ Simuliidae ความแตกต่างของโพลีทีนโครโมโซมแบนด์ยังนำไปสู่การศึกษาสืบลิ้งสปีชีส์ของแมลงวันดำที่มีรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาคลายคลึงกันและการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ในโครงการวิจัยนี้ได้ค้นพบแมลงวันดำที่มีชื่อวิทยาศาสตร์แล้วจำนวน 45 ชนิด แต่มีเพียง 18 ชนิดที่ได้ศึกษาโพลีทีนโครโมโซม จากการศึกษาความแตกต่างของอินเวอร์ชันที่คงที่ ความแตกต่างของโครโมโซมเพศและความถี่ของอินเวอร์ชันบนออโตโซมที่ต่างกัน ทำให้สามารถแยกแมลงวันดำชนิด *Simulium siamense* ออกเป็น 6 cytoforms (A - F) และชนิด *Simulium tani* แบ่งออกเป็น 8 cytoforms (A - H) ตัวอ่อนของ cytoforms ของแต่ละสปีชีส์มีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถแยกออกจากกันได้ บาง cytoforms อาศัยในแหล่งเพาะพันธุ์เดียวกันแบบซิมพาทริก นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความหลากหลายและการกระจายของแมลงวันดำที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบริเวณ 10 จังหวัดภาคเหนือในช่วงฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน เป็นเวลา 1 ปี จากการศึกษารูปร่างสัณฐานวิทยาภายนอกได้พบวันดำจำนวน 27 ชนิด การแพร่กระจายของวันดำเหล่านี้ไม่เป็นอิสระ บางชนิดมีการกระจายทางภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวาง ในขณะที่มีแมลงวันดำ 2-3 ชนิดอาศัยในแหล่งเพาะพันธุ์จำเพาะ จากการวิเคราะห์ผลโดยวิธี PCA ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการกระจายของสปีชีส์กับปัจจัยทางเคมีและกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์ เช่น ขนาดลำธาร อุณหภูมิ น้ำ ความเร็วของกระแสน้ำ และการนำไฟฟ้าของน้ำ

โครงการวิจัยนี้ยังได้ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงวันดำ 3 ชนิดได้แก่ *Simulium tani*, *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestriatum* ซึ่งมีการกระจายทางภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวาง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรียสดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม แมลงวันดำเหล่านี้มีแบบแผนการกระจายทางภูมิศาสตร์และโครงสร้างทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจเป็นผลจากอิทธิพลของเหตุการณ์ประวัติศาสตร์ (เช่นการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในยุคไพลโทซีน (Pleistocene)) และ/หรือเป็นอิทธิพลจากสภาพนิเวศวิทยา ประชากรจากภาคเหนือมีความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงซึ่งแตกต่างจากประชากรภาคอื่นๆ สภาพทางภูมิศาสตร์ (เช่น แนวเทือกเขา) และปัจจัยทางนิเวศวิทยาดูเหมือนจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อการจำกัดการถ่ายยีน ซึ่งมีผลทำให้ประชากรจากภาคเหนือมีความแตกต่างทางพันธุกรรม การที่ประชากรภาคเหนือมีความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมสูงกว่าประชากรภาคอื่นอาจเนื่องมาจากประชากรภาคเหนือมีประวัติศาสตร์ที่ยาวนานกว่าประชากรภาคอื่น ในทางตรงข้ามประชากรจากภาคใต้เกิดจากการรวมตัวของประชากรบางส่วนจากประชากรภาคเหนือตอนล่างหรือจากประชากรภาคกลางเมื่อประมาณ 100,000 ถึง 200,000 ปี แล้วจึงเกิดการขยายตัวของประชากร การที่ประชากรภาคใต้ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจเนื่องมาจากประวัติศาสตร์ของประชากรที่เพิ่งเกิดขึ้นไม่นานมากกว่าเกิดจากการถ่ายทอดยีนระหว่างประชากร

นอกจากนี้นักวิจัยยังได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำ 40 ชนิด โดยการศึกษา นิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ความยาวของ ITS2 ของวันดำเหล่านี้อยู่ระหว่าง 247 – 308 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยเบส AT เป็นเปอร์เซ็นต์สูงระหว่าง 71% – 83.8% นอกจากนี้ยังพบการแปรผันของ ITS2 ภายในตัวแมลงวันดำ (intra-individual variation or clonal variation) ของวันดำจำนวน 13 ชนิด ซึ่งมีค่าระหว่าง 0.3% – 1.1% อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังพบความแตกต่างแปรผันของ ITS2 ภายในประชากร และระหว่างประชากรของแมลงวันดำชนิด *Simulium feuerborni* ที่เก็บจากแหล่งเพาะพันธุ์เดียวกันและต่างกันในบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำ 40 ชนิดโดยวิธี maximum parsimony และ neighbor joining (โปรแกรม PAUP, version 4.0b10) และวิธี maximum likelihood (โปรแกรม MrBAYES, version 3.0B4) ผลการวิเคราะห์แสดงการแยกสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำออกเป็น 2 แขนงใหญ่ (monophyletic clades) แขนงแรกประกอบด้วยกลุ่มวันดำในสกุลย่อย *Simulium* และ *Simulium baimaii* (ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลย่อยใด) ในขณะที่แขนงที่สองประกอบด้วยวันดำในสกุลย่อย *Nevermannia* และ *Montisimulium* ที่รวมอยู่ในแขนงเดียวกัน และจัดเป็น sister group ของวันดำสกุลย่อย *Gomphostilbia* จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า *Simulium baimaii* ควรจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ *malyschevi* species - group หรือ *variegatum* species - group ของสกุลย่อย *Simulium* นอกจากนี้สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของวันดำโดยการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุลยังสอดคล้องกับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ศึกษาโดยรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาด้วย

Executive Summary

Wide varieties of insect species were infected by *Wolbachia* clade A and B. Reproductive alteration of the insect host caused by *Wolbachia* includes cytoplasmic incompatibility, male killing, parthenogenesis and feminization are responsible for rapid spread of *Wolbachia* in host populations. These mechanisms provide an opportunity to alter the population structure of insect host in natural populations. Techniques in molecular genetics were used to detect *Wolbachia* in natural populations of arthropods and insects particularly mosquito vectors and also its density in different developmental stages including effect of culture temperatures and insecticides. These results provide fundamental knowledge in *Wolbachia* biology that could be useful for development of control measures of diseases and mosquito vectors.

A preliminary survey of Trombiculid mites was carried out by collecting chiggers parasitized on small rodents trapped in 5 locations in northern, central and northeastern Thailand. The chiggers were identified to genus and species by morphology and molecular genetic techniques being developed in this study. We initially performed chigger DNA purification technique, exploration of appropriate genes for identification index, polymerase chain reaction (PCR) optimization, and DNA sequencing techniques. The phylogenetic tree was constructed from Genetic distance and Genetic identity. In addition, possible medically related eubacteria in chiggers were examined.

Single chigger DNA purification technique for qualified DNA was successfully developed. Application of the technique on CO1 mitochondrial gene, ITS1, ITS2, and 18S rRNA gene was carried out. The 18S rRNA gene of about 1,800 base pairs length was suitable for this study. It was selected for an identification index because it was sufficiently long with adequate genetic details. Field survey of chiggers was made by collecting specimens from different species of rodents, e.g. *Berylmys berdmorei*, *Rattus rattus*, *Bandicota indica*, *Peromyscus neneus* and *Tupaia glis*. The chigger samples were then morphologically identified and separated into 7 species belonging to 4 genera: *Ascoschoengastia globosa*, *Walchia lupella*, *Walchia kalrata*, *Trombicula (Blankaartia) gracilis*, *Trombicula (Blankaartia) niloticum*, *Trombicula (Letotrombidium) sp.* and *Helenicula sp.*. Samples of 23 individual chiggers from these 4 genera were analysed genetically. DNA portions of 18S rRNA gene of 562 base pairs were composed of A = 28.67%, C = 20.40%, G = 25.67% and T = 25.26%. The phylogenetic tree of these chiggers constructed from Genetic distance and Genetic identity has revealed two groups: 1) *Ascoschoengastia sp.* and *Walchia sp.*,

and 2) *Trombicula (Blankaartia) sp.* and *Helenicular sp.* The average Genetic distance between the 2 groups was 18.9%, between the genera within group 1 was 6.74% and within group 2 was 3.1%. However, the average Genetic distance among strains of *Ascoschoengastia sp.* was 0.4%. Exploring for possible medically related eubacteria in chiggers by molecular techniques has revealed positive results for γ -proteobacteria in 2 specimens: one was related to *Pantoea agglomerans*, causative of cotton fever, and the other was related to *Photorhabdus luminescens*, entomopathogenic bacteria. These eubacteria may be related to vectorial capability of chiggers for human or insect pathogens.

The results of this study provides basic knowledge on morphology, molecular genetics and eubacteria in different species of chiggers parasitized on various hosts in Thailand. These data are useful for developing Geographical Information Systems (GIS). Molecular genetic information of these chiggers provides not only for an accurate species identification, but also for new body of knowledge on evolution of this group of Trombiculids. Moreover, the techniques of molecular genetics developed in this study will be incorporated into a guide book for species identification of chiggers in Thailand.

Female adults of black flies have been well known as important vectors of some parasites and pathogens, such as *Onchocerca* species in humans and cattles and *Leucocytozoon* species in birds. Study of larval salivary gland chromosomes is important in cytotaxonomy of the family Simuliidae. The differences in chromosome banding patterns lead to the recognition of sibling species in this group of insects which are useful to establish species identity and phylogenetic relationships. Of a total of 45 known species of black flies found in this study, only 18 species of were studied cytogenetically. Based on analysis of fixed inversions, sex chromosome differentiation and a number of polymorphic autosomal inversions, the populations of *Simulium siamense* and *S. tani* collected from different localities throughout Thailand could be divided into 6 (A-F) and 8 (A-H) cytoforms, respectively. Cytoforms of each species are morphologically indistinguishable. Some cytoforms occurred sympatrically. Moreover, species diversity and species distribution of black flies collected from 10 northern provinces during rainy season, winter and summer were also investigated. On the basis of external morphological characters, 27 black fly species in northern Thailand were identified. The distributions of larval black fly were not random. Some species were geographically widespread while a few species were restricted to certain localities. Principal component analysis (PCA) indicated the correlation of species distribution and some physico-chemical parameters such as stream size, water temperature, water velocity and

conductivity. The population genetic structure of three black fly species, namely, *S. tani*, *S. nakhonense* and *S. quinquestriatum*, inferred from mitochondrial DNA sequences was also investigated. These species showed a common phylogeographic patterns. The results seem to suggest that their similar patterns of genetic structure and diversity were influenced by the historical events (e.g. Pleistocene climatic change) and/or contemporary ecological conditions. Populations from northern region exhibited greater diversity and highly genetic structure within the region as well as genetic differentiation from populations in other regions. Both geographical (e.g. mountain ranges) and ecological conditions of the habitat seem to be important factors that limited gene flow leading to genetic differentiation of the populations. Greater diversity and highly genetic structure of northern populations are likely due to longer history of populations in this region. In contrast, populations from the south were recently colonized from a subset of the haplotypes from lower north or central approximately 100,000 to 200,000 years ago followed by population expansion. Absence of genetic diversity and genetic structure in the southern populations are likely due to recent history of populations in this region rather than high level of gene flow between the populations.

Moreover, the phylogenetic relationships among 40 black fly species inferred from ITS2 rDNA were investigated in the study. The ITS2 length ranged from 247 to 308 bp. All black fly species showed high AT content ranging from 71% to 83.8%. Intraindividual variation (clonal variation) occurred in 13 species ranging from 0.3% to 1.1%. The large degree of intrapopulation and interpopulation heterogeneities occurred in *S. feuerboni* collected from the same and different locations at Doi Inthanon National Park, northern Thailand. Phylogenetic relationships among 40 black fly species were examined using maximum parsimony and neighbor joining (PAUP, version 4.0b10) and maximum likelihood (MrBAYES, version 3.0B4). The topology of the trees generated in the present study revealed two major monophyletic clades. The subgenus *Simulium* and *Simulium baimaii* were placed together in the first monophyletic clade whereas the subgenera *Nevermannia* and *Montisimulium* were placed as the sister group to the subgenus *Gomphostilbia* in the second monophyletic clade. Our results suggest that *S. baimaii* may belong to the *malyschevi* species-group or *variegatum* species-group within the subgenus *Simulium*. The molecular phylogeny in the present study generally agrees with the existing morphology-based phylogeny.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(ก)
บทคัดย่อ	(ข)
Abstract	(ง)
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	(จ)
Executive Summary	(ฉ)
สารบัญตาราง	(ฐ)
สารบัญภาพ	(ด)
1 บทนำ : ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยในภาพรวม	1
2 วัตถุประสงค์โครงการ	3
3 การศึกษาอนุพันธุศาสตร์และนิเวศวิทยาของพาหะกับเชื้อก่อโรค	4
4 การศึกษาสัณฐานวิทยาและอนุพันธุศาสตร์ของไร่อ่อน	35
5 อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย เซลล์พันธุศาสตร์ นิเวศวิทยา และพันธุศาสตร์เชิง โมเลกุลของแมลงรบกวนในประเทศไทย	77
6 รายชื่อคณะผู้ร่วมวิจัย	288
7 ผลงานตีพิมพ์และเสนอผลงานวิจัย	290
8 ภาคผนวก 1, 2	298

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดง Real - Time PCR Probes ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i>	9
3.2	แสดง Real - Time PCR Primers ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i>	9
3.3	แสดงผลการตรวจหาการติดเชื้อร่วมระหว่างเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ในยุงชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย	13
3.4	แสดงค่า Log Transformed Means ของ จำนวนเชื้อแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ในไข่ยุงลาย <i>Aedes albopictus</i>	17
3.5	แสดงผลการชักนำเชื้อเดนโซไวรัสโดยใช้เชื้อปริมาณต่างๆ ในยุง <i>Ae. aegypti</i>	21
3.6	แสดงผลการตรวจหาการติดเชื้อเดนโซไวรัสหลังถูกชักนำในยุง <i>Ae. aegypti</i> โดยใช้เทคนิค PCR	21
3.7	Genome Equivalent ของเดนโซไวรัสต่อไมโครลิตร ที่หาได้จากวิธี Real-time PCR	22
3.8	แสดงค่าเฉลี่ยขนาดปีก (mm $\pm$ SE) ของยุงลายตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมีย ที่ตัวอ่อนเจริญขึ้นมาจากการเลี้ยงในสภาวะและ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	24
3.9	แสดงค่าเฉลี่ยขนาดปีก (mm $\pm$ SE) ของยุงลายตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมีย ที่ตัวอ่อนเจริญขึ้นมาจากการเลี้ยงในสภาวะและ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	25
3.10	พฤติกรรมผสมพันธุ์ของตัวผู้และตัวเมียของยุงลายสวนบราซิล เวลาที่ใช้ในการสัมผัสกันในแต่ละคู่	29
3.11	การตอบสนองต่อ hay infusion น้ำเลี้ยงลูกน้ำยุง และ 4-methylphenol	29
3.12	พฤติกรรมการหาโฮสต์	29
4.1	ตารางที่ 4.1 แสดงชนิดของหนู และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ที่เป็นแหล่งอาศัยของไรอ่อนชนิดของไรอ่อน และพื้นที่เก็บตัวอย่าง	42
4.2	แสดงลักษณะที่สำคัญพบจากตัวอย่างและใช้ในการจำแนกใน Genus <i>Ascoschoengastia</i> (<i>As. globosa</i> , Nadchatram and Domrow,1964.) และ Genus <i>Helenicula</i> (<i>Helenicula</i> sp.) ทั้งสอง Genus มีลักษณะเฉพาะ คือ ขน Sensila มีลักษณะเป็นพู่ ที่ส่วนปลาย ข้อแตกต่างที่ชัดเจนระหว่าง 2 Genus คือ <i>Helenicula</i> sp. ขน Sensilae ชิดกันมาก ส่วน <i>Ascoschoengastia</i> sp.จะมีระยะห่างระหว่างขน Sensilae มากกว่าอย่างชัดเจน	52
4.3	แสดงลักษณะที่สำคัญที่พบจากตัวอย่างและใช้ในการจำแนกใน Genus <i>Walchia</i> (<i>Walchia lupella</i> , Traub and Evans,1957 และ <i>Walchia kalrata</i>)	53
4.4	แสดงลักษณะที่สำคัญที่พบจากตัวอย่างและใช้ในการจำแนกใน Genus <i>Trombicula</i> จากการศึกษาพบตัวอย่างที่อยู่ใน Subgenus <i>Leptotrombidium</i> และ Subgenus <i>Blankaartia</i> ซึ่งจะมีลักษณะส่วนใหญ่คล้ายกัน อย่างไรก็ตามใน 2 Genus นี้จะมีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ Subgenus <i>Blankaartia</i> จะมี Scutum เป็นทรงห้าเหลี่ยม ในขณะที่ Subgenus	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
<i>Leptotrombidium</i> จะมี Scutum เป็นทรงสี่เหลี่ยม พบตัวอย่างใน Subgenus <i>Blankaartia</i> 2 species; <i>Blankaartia niloticum</i> , Tragardh, 1904 กับ <i>Blankaartia gracillis</i> V-G, 1960 ซึ่งแตกต่างกันที่มุมด้านล่างของแผ่นหลัง (ลักษณะโค้งมนกับแหลมเป็นมุม)	
4.5 ค่าในส่วนล่างซ้ายของตารางแสดง Nei's(1978) unbiased genetic Identities และ ค่าในส่วนบนขวาของตารางแสดง Nei's(1978) unbiased genetic distance ระหว่าง ลำดับเบสของยีน 18S rRNA ^{''} ของไร	62
4.6 ค่าในส่วนล่างซ้ายของตารางแสดง genetic Identities และ ค่าในส่วนบนขวาของตารางแสดง genetic distance ระหว่าง ลำดับเบสของยีน 16S ของแบคทีเรีย	72
5.1ก แหล่งน้ำไหลธรรมชาติในเขตภาคเหนือของประเทศไทยที่ทำการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงร้นดำในช่วงฤดูฝนจำนวน 61 แห่ง (พฤษภาคม-มิถุนายน 2546) ฤดูหนาวจำนวน 58 แห่ง (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546) และฤดูร้อนจำนวน 39 แห่ง (เมษายน 2547)	94
5.1ข แหล่งน้ำไหลธรรมชาติจำนวน 4 แห่งในเขตภาคเหนือที่ทำการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงร้นดำเพิ่มในฤดูหนาว (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546) และฤดูร้อน (เมษายน 2547)	99
5.2 แสดงผลการวิเคราะห์ Principal component analysis และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง Principle components และค่าปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำในแต่ละฤดู	119
5.3 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation analysis) ระหว่าง Principle components ของค่าตัวแปรและชนิดแมลงร้นดำที่พบในแต่ละฤดู	122
5.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำ จำนวนชนิดและจำนวนตัวของแมลงร้นดำที่พบในแหล่งน้ำไหลแต่ละฤดูและผลการเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ของฤดูเรียงจากค่ามากไปน้อย (LSD ที่ $P < 0.05$)	124
5.5 แหล่งเก็บตัวอย่างแมลงร้นดำชนิด <i>Simulium siamense</i> ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย เพื่อศึกษาโพลีทินโครโมโซม	135
5.6 ความถี่โครโมโซมอินเวอร์ชัน ของแมลงร้นดำชนิด <i>Simulium siamense</i> ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย	151
5.7 ลักษณะโครโมโซมของ 6 cytoforms ของแมลงร้นดำชนิด <i>Simulium siamense</i> ในประเทศไทย	161
5.8 จำนวนของอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแท่งที่ 1 ในเพศผู้และเพศเมียของ <i>Simulium siamense</i> cytoform B, C, D, E และ F ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย	166
5.9 แหล่งเก็บตัวอย่างแมลงร้นดำชนิด <i>Simulium tani</i> ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยเพื่อศึกษาโพลีทินโครโมโซม	173
5.10 ความถี่ของโครโมโซมอินเวอร์ชัน ของแมลงร้นดำชนิด <i>Simulium tani</i> จากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย	180

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
5.11 จำนวนอินเวอร์ชันในเพศผู้และเพศเมียของ <i>Simulium tani</i> บนโครโมโซมแท่งที่ 3 ในประชากรที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ ภูมิภาคต่างๆ	186
5.12 รายละเอียดของประชากรของ <i>Simulium tani</i> , <i>Simulium nakhonense</i> และ <i>Simulium quinquestriatum</i> ที่ทำการศึกษา	216
5.13 Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D and Fs ของ 16 ประชากร และ 3 กลุ่มประชากรของ <i>Simulium tani</i>	220
5.14 ค่า Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D และ Fs ของ 13 ประชากรของ <i>Simulium nakhonense</i>	221
5.15 ค่า Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D และ Fs ของ 11 ประชากรของ <i>Simulium quinquestriatum</i>	222
5.16 F_{ST} ระหว่าง 3 กลุ่มประชากรของ <i>S. tani</i> ที่จัดโดย SAMOVA	227
5.17 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) ภายในสปีชีส์ และระหว่างสปีชีส์ของ <i>S. nakhonense</i> and <i>S. quinquestriatum</i>	230
5.18 Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของ <i>Simulium nakhonense</i>	231
5.19 Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของ <i>Simulium quinquestriatum</i>	232
5.20 ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion ของ <i>Simulium tani</i>	237
5.21 การวิเคราะห์ด้วย Maximum likelihood เพื่อหาขนาดประชากร ($\theta = 2N_i\mu$), growth rates (g) และ migration rates ($M=m/\mu$) ของ 3 กลุ่มประชากรของ <i>S. tani</i>	237
5.22 ค่า growth rate ที่คำนวณโดย maximum likelihood ภายใต้เงื่อนไขของ exponential growth model ของ <i>S. nakhonense</i> และ <i>S. quinquestriatum</i>	240
5.23 ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion ของ <i>S. nakhonense</i> และ <i>S. quinquestriatum</i> คำนวณโดย stepwise expansion model	240
5.24 ขนาดประชากร ($\theta = 2N_i\mu$), exponential growth rates (g) และ migration rates ($M=m/\mu$) คำนวณโดย maximum likelihood ของ <i>S. nakhonense</i> ของกลุ่มประชากรของ <i>S. nakhonense</i> และ <i>S. quinquestriatum</i>	242
5.25 ชนิดและจำนวนตัวอ่อนตัวดักแด้และตัวเต็มวัยของริ้นดำที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภูมิภาคต่างๆของประเทศ ที่นำมาศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ	248
5.26 ข้อมูลของลักษณะตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงริ้นดำที่ใช้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม PAUP (version 4.0b10) (ลำดับที่ของลักษณะสอดคล้องกับลักษณะในรายงาน)	249
5.27 ตัวอย่างแมลงริ้นดำในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> , <i>Nevermannia</i> , <i>Montisimulium</i> , <i>Simulium</i> และแมลงที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลใดจำนวน 1 สปีชีส์จากแหล่งต่างๆ ในภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย ที่ใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโบโซมดีเอ็นเอ	252

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
5.28	แสดงความยาวและเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำในกลุ่ม สกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> , <i>Nevermannia</i> , <i>Montisimulium</i> , <i>Simulium</i> และแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลจำนวน 1 สปีชีส์	257
5.29	การเปรียบเทียบ Pairwise sequence ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำ 40 สปีชีส์ ซึ่งจัดอยู่ในสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> , <i>Nevermannia</i> , <i>Simulium</i> , <i>Montisimulium</i> และ unknown subgenus โดยใช้วิธี Kimura two-parameter ด้านบนเป็น Pairwise distance ด้านล่างเป็น Nucleotide sequence differences	265

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	การเปลี่ยนแปลงแปรผันทางพันธุกรรมที่นำไปสู่ความหลากหลายทางชีวภาพตามกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นตามกาลเทศะ	1
1.2	แผนภาพกระบวนการวิวัฒนาการ	2
3.1	แสดงผลการตรวจเชื้อแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ในยุงชนิดต่างๆ ในประเทศไทย	15
3.2	แสดงผลการตรวจหาเชื้อเดนิโซไวรัสในยุงชนิดต่างๆ ในประเทศไทย	16
3.3	แสดงค่าความหนาแน่นของไข่ยุงลาย <i>Aedes albopictus</i> ที่อยู่ระหว่างระยะพักตัว โดยมีอายุ 9-37 วัน จากโคลนยุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> สายพันธุ์เดียว (ภาพ 3a) และไข่ยุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรียสองสายพันธุ์ (ภาพ 3b) แต่ละจุดในรูปแสดงค่าของตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างประกอบด้วยไข่ยุงลาย 10 ใบ	18
3.4	ระดับปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ระหว่างยุงผู้รับ (wAeg) กับยุงผู้ให้ (KLPP) ซึ่งแสดง ในกราฟแท่ง และระดับการแสดงออกของ CI โดยดูอัตราการตายของลูก ซึ่งแสดง ในกราฟเส้น	19
3.5	กราฟแสดงระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> ในระยะการเจริญต่างๆ ของยุงผู้รับ (wAeg) และยุงผู้ให้ (KLPP)	20
3.6	Real-time PCR Amplification Plot ของเดนิโซไวรัสทั้ง 4 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ standard	22
3.7	กราฟแสดงผลของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อการเจริญของยุงลาย <i>Ae. albopictus</i> ของยุงลายพาหะที่ติดเชื้อ (I) และไม่ติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> (U) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (1a) และ 37 องศาเซลเซียส (1b)	23
3.8	กราฟแสดงผลของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อการรอดชีวิตของยุงลาย <i>Ae. albopictus</i> ของยุงลายพาหะที่ติดเชื้อ(I) และไม่ติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> (U) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (2a) และ 37 องศาเซลเซียส (2b)	24
3.9	กราฟแสดงผลของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อปริมาณแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> สายพันธุ์ A ของยุงลาย <i>Ae. albopictus</i> ของยุงลายพาหะที่ติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (3a) และ 37 องศาเซลเซียส (3b)	25
3.10	กราฟแสดงผลของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อปริมาณแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i> สายพันธุ์ B ของยุงลาย <i>Ae. albopictus</i> ของยุงลายพาหะที่ติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (4a) และ 37 องศาเซลเซียส (4b)	26
3.11	การตรวจสอบการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ในยุงสายพันธุ์ HOU ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน <i>wsp</i> เป็น marker	27
3.12	การตรวจสอบการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ในยุงสายพันธุ์ GNV ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน <i>wsp</i> เป็น marker	27
3.13	การตรวจสอบการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ในยุงสายพันธุ์ HT1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน <i>wsp</i> เป็น marker	27

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.1	ไรอ่อน (2 ชนิด) ขณะเกาะ กินอาหาร ภายในช่องหูส่วนนอกของหนู	35
4.2	แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาโดยสังเขป	39
4.3	แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาโดยสังเขป	40
4.4	แสดงโครงสร้างของตัวไร	45
4.5	แสดงส่วนต่างๆ ของ Gnathosome	45
4.6	แสดงส่วนขนชนิดต่างๆ บน Scutum	45
4.7	แสดงขาซึ่งประกอบด้วย 6-7 ปล้อง	46
4.8	แสดงส่วนขนในตำแหน่งต่างๆบน Gnagthosoma	46
4.9	แสดงการกระจายของไรชนิดต่างๆ ตามแหล่งที่สำรวจ สามารถจำแนกชนิดของไรด้วยรูปทรง และ เส้นขนของ Scutum	51
4.10	แสดงผลผลิต PCR เป็น DNA จากยีน 18S ขนาด ~1500 bpจากตัวอย่าง DNA ที่สกัดโดยวิธีที่ พัฒนาสำหรับไรอ่อน	56
4.11	แสดงตำแหน่งของยีนต่างๆ บนส่วนของ rDNA (Hillis et al.1996)	57
4.12	แสดงตำแหน่งของยีน 16S และ COI mitochondrial DNA (Hartwell et al. 2000)	57
4.13	แสดงผลผลิต PCR ได้ DNA จากยีน COI ขนาดโมเลกุลประมาณ 400 bp จากปฏิกิริยา PCR ของ ตัวไร (1)= DNA จากตัวไร (2) = DNA จากตัวเห็บ	57
4.14	แผนภาพแสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง การสกัด DNA การหาลำดับเบส และการวิเคราะห์ลำดับ เบส	60
4.15	Bootstrap Neighbour Joining tree ที่สร้างขึ้นจาก software package “CLAUTALX” version 1.83 แสดง phylogenetics relationships ระหว่างไรจากที่ต่างๆ * = Theileria sp.(Tick) ? = ไม่ ได้จำแนกชนิด	61
4.16	แสดงลำดับเบสจากยีน 18s RNA ของไร จากแหล่งต่าง “ - ” หมายถึง gap “ . ” หมายถึง ตำแหน่งดังกล่าวมีเบสเป็นชนิดเดียวกันกับตำแหน่งที่อยู่ตรงกันในแถวด้านบน	63
4.17	แสดงตำแหน่งของลำดับเบสบนส่วนของยีน 16S RNA ของ eubacteria (Eu1,Eu2) ที่ตรวจพบใน ตัวไรโดยเปรียบเทียบกับยีน 16S RNA ของ <i>E. coli</i> strain K12 [gi:48994873]	69
4.18	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ eubacteria ที่พบในไรตัวที่1(Eu1) กับ ลำดับเบสของ <i>Pantoea agglomerans</i> (<i>P.a.ChDC YP1</i>) จาก Gen Bank เทียบได้กับลำดับเบสที่ 749-1174 ของ gene 16S RNA มีความคล้ายกัน(Identities) 98% <u>ขีดเส้นใต้</u> = เบสคู่เหมือนกัน	70
4.19	Bootstrap Neighbour Joining tree ที่สร้างขึ้นจาก software package “CLAUTALX” version 1.83 แสดง phylogenetics relationships ระหว่างแบคทีเรียจากตัวไร (Eu2) จากกับ Enterobacter อื่น ๆ	71
5.1	แสดงจังหวัดที่ศึกษาแมลงร้นดำสัญลักษณ์จังหวัดดูในเนื้อหา	85
5.2	แสดงตำแหน่งแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงร้นดำบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย	99
5.3	เปอร์เซ็นต์การกระจายของแมลงร้นดำแต่ละชนิดที่พบในแหล่งน้ำไหลที่การศึกษาในฤดูฝนจำนวน 61 แห่ง ฤดูหนาวจำนวน 58 แห่ง และฤดูร้อนจำนวน 39 แห่ง	101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
5.4	ชนิดของแมลงรึ้นดำที่มีการแพร่กระจายสูงในบริเวณ 10 จังหวัด ภาคเหนือของประเทศไทย	102
5.5	แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 56 แห่งในช่วงฤดูฝน (พฤษภาคม-มิถุนายน 2546) สามารถจัดกลุ่มเป็น 7 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วย UPGMA ในโปรแกรม PATN	105
5.6	ก) แสดงการจัดเรียงอันดับแหล่งน้ำไหลจำนวน 56 แห่งในช่วงฤดูฝนโดยใช้ SSH (Stress=0.16) ข) ชนิดของรึ้นดำจำนวน 8 ชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 ในการแบ่งกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 7 กลุ่ม	106
5.7	แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 57 แห่งในช่วงฤดูหนาว(พฤศจิกายน-ธันวาคม2546) สามารถจัดกลุ่มเป็น 8 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วย UPGMA ในโปรแกรม PATN	109
5.8	ก) แสดงการจัดเรียงอันดับแหล่งน้ำไหลจำนวน 57 แห่งในช่วงฤดูหนาว โดยใช้ SSH (Stress=0.17) ข) ชนิดของรึ้นดำจำนวน 4 ชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 ในการแบ่งกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 8 กลุ่ม	110
5.9	แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 39 แห่งในช่วงฤดูร้อน (เมษายน 2547) สามารถจัดกลุ่มเป็น 6 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วย UPGMA ในโปรแกรม PATN	112
5.10	ก) แสดงการจัดเรียงอันดับแหล่งน้ำไหลจำนวน 39 แห่งในช่วงฤดูร้อนโดยใช้ SSH (Stress=0.15) ข) ชนิดของรึ้นดำจำนวน 5 ชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 ในการแบ่งกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 6 กลุ่ม	113
5.11	แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างจำนวนตัวและจำนวนชนิดของแมลงรึ้นดำ (สมการเชิงถดถอยคือ $y = 0.0103x + 3.5669$, $r = 0.344$, $P = 0.000$)	125
5.12	จำนวนชนิดของแมลงรึ้นดำที่พบในแต่ละแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในแต่ละฤดู (ก) ฤดูฝน (ข) ฤดูหนาว และ (ค) ฤดูร้อน	126
5.13	ผลการจัดเรียงอันดับของ PC-1 และ PC-2 ของแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในฤดูฝนที่สัมพันธ์กับระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรและสูงกว่า 500 เมตร	127
5.14	แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงรึ้นดำที่พบในฤดูฝน (สมการเชิงถดถอยคือ $y = 0.0021x + 2.8548$, $r = 0.32$, $P = 0.017$)	128
5.15	ผลการจัดเรียงอันดับของ PC-1 และ PC-2 ของแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในฤดูหนาวที่สัมพันธ์กับระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรและสูงกว่า 500 เมตร	128
5.16	แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงรึ้นดำที่พบในฤดูหนาว (สมการเชิงถดถอยคือ $y = 0.0027x + 3.9038$, $r = 0.31$, $P = 0.019$)	129
5.17	ผลการจัดเรียงอันดับของ PC-1 และ PC-2 ของแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในฤดูร้อนที่สัมพันธ์กับระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรและสูงกว่า 500 เมตร	129
5.18	แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงรึ้นดำที่พบในฤดูร้อน (สมการเชิงถดถอยคือ $y = 0.0028x + 2.6477$, $r = 0.33$, $P = 0.038$)	130
5.19	ปรสิตที่พบในระยะตัวอ่อนของแมลงรึ้นดำจำนวน 3 กลุ่ม ก) หนอนพยาธิตัวกลม วงศ์ Mermithidae ข) microsporidia ค) เชื้อราชนิด <i>Coelomycidium simulii</i>	131

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
5.20	standard map ของโพลีทีนโครโมโซมของ <i>Simulium siamense</i> A: Chromosome IS, B : Chromosome IL, C: Chromosome IIS, D: Chromosome IIL, E: Chromosome III. Fixed inversion แสดงโดยการขีดเส้นใต้, Floating inversion แสดงโดยการไม่ขีดเส้นใต้, Sex-linked inversion แสดงโดยเส้นประ, C= เซนโทรเมียร์, NO= นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์, db= double bubble, RB= Ring of Balbiani, T= trapezoid, Pb= parabalbiani, gB= gray band, Bl= blister	141
5.21	เฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแท่งที่ 1 ของแมลงวันดำชนิด <i>Simulium siamense</i> (a) IS-st/1, (b) IS-st/2,3, (c) IS-st/4, (d) IS-st/5, (e) IS-st/6, (f) IS-st/7, (g) IS-st/8, (h) IS-st/9, (i) IL-st/1, (j) IL-st/2 ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์	142
5.22	เฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแท่งที่ 2 ของแมลงวันดำชนิด <i>Simulium siamense</i> (a) IIS-st/1, (b) IIL-st/1, (c) IIL-st/2, (d) IIL-st/3, (e) IIL-st/4, (f) IIL-st/5, (g) IIL-st/6, (h) IIL-st/7 ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์	143
5.23	เฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแท่งที่ 3 ของแมลงวันดำชนิด <i>Simulium siamense</i> (a) IIIS-st/1, (b) IIIL-st/1, (c) IIIL-st/2, (d) IIIL-st/3, (e) IIIL-st/4 ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์	144
5.24	Chromosomal idiograms ของ <i>Simulium siamense</i> 6 cytoforms: (a), <i>S. siamense</i> cytoform A, (b) <i>S. siamense</i> cytoform B, (c), <i>S. siamense</i> cytoform C, (d), <i>S. siamense</i> cytoform D, (e), <i>S. siamense</i> cytoform E และ (f), <i>S. siamense</i> cytoform F IS, โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนสั้น; IL, โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนยาว; IIS, โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนสั้น; IIL โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนยาว; IIIS, โครโมโซมแท่งที่ 3 แขนสั้น; IIIL, โครโมโซมแท่งที่ 3 แขนยาว; C, เซนโทรเมียร์; NO, nucleolar organizer; db, double bubble; Ss, shoe string; RB, Ring of Balbiani; Pb, parabalbiani; gB, gray band; B, blister, เส้นทึบซึ่งแสดงอยู่ด้านซ้ายใช้แสดง fixed inversion, เส้นทึบซึ่งอยู่ด้านขวาใช้แสดง Floating inversion และเส้นประใช้แสดง sex-linked inversion	146
5.25	แสดงการกระจายของ <i>Simulium siamense</i> ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย (อักษรย่อของแหล่งที่เก็บดูจากตารางที่ 5.5)	147
5.26	แผนที่แสดงการกระจายของ <i>Simulium tani</i> cytoforms ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศ (หมายเลขแสดงแหล่งที่เก็บแต่ละ cytoform ดูจากตารางที่ 3.9)	192
5.27	เฮเทโรไซกัสบนโครโมโซมแท่งที่ 1 ของแมลงวันดำชนิด <i>Simulium tani</i> . (a) IS-st/2, (b) IS-st/3, (c) IS-st/5, (d) IS-st/6, (e) IS-st/8, (f) IS-st/10, (g) IL-st/3, (h) IL-st/4	197
5.28	เฮเทโรไซกัสบนโครโมโซมแท่งที่ 2 ของแมลงวันดำชนิด <i>Simulium tani</i> (a) IIS-st/1, (b) IIS-st/3, (c) IIP-st/1, (d) IIL-st/1, (e) IIL-st/2, (f) IIL-st/3, (g) IIL-st/4	198
5.29	เฮเทโรไซกัสบนโครโมโซมแท่งที่ 3 ของแมลงวันดำชนิด <i>Simulium tani</i> . (a) IIIL-st/5, (b) IIIL-st/9, (c) IIIL-st/18, (d) IIIL-st/19, (e) IIIL-st/20, (f) IIIL-st/21, (g) IIIL-st/5,6, (h) IIIL-5/5,6	199
5.30	แผนภาพโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำชนิด <i>S. sp. nr. Chamlongi</i> C= centromere; NO= nucleolar organizer; db= double bubble; BR= Ring of Balbiani	212

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
5.31	แผนภาพโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำชนิด <i>S. sp. nr. feuerborni</i> 1 แสดงตำแหน่งการเกิดอินเวอร์ชันแบบ IIL-1 และ IIL-2 บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 2 และตำแหน่งการเกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-complex บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 C= centromere; NO= nucleolar organizer; db= double bubble; BR= Ring of Balbiani	213
5.32	Median-joining network ของ 147 ตัวอย่างของ <i>S. tani</i> โดยแต่ละวงกลมคือ 1 haplotype และสีของวงกลมหมายถึงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของ haplotype (เหลือง คือภาคเหนือ ชมพูคือภาคตะวันออก เขียวคือภาคกลาง และน้ำเงินคือภาคใต้)	224
5.33	Median-joining network คำนวณโดยโปรแกรม NETWORK ของ 207 ตัวอย่างของ <i>S. nakhonense</i> (123 ตัวอย่าง) และ <i>S. quinquestriatum</i> (84 ตัวอย่าง) ภาพวงกลมแสดงแต่ละแฮพโลไทป์โดยขนาดของวงกลมเป็นสัดส่วนกับจำนวนตัวอย่างของแต่ละแฮพโลไทป์ สีของวงกลมแสดงถึงสปีชีส์และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของแฮพโลไทป์ (สีเหลือง = <i>S. nakhonense</i> ภาคเหนือ, สีฟ้า = <i>S. nakhonense</i> ภาคกลาง, สีนํ้าเงิน = <i>S. nakhonense</i> ภาคใต้, สีนํ้าตาล = <i>S. quinquestriatum</i> ภาคเหนือ, สีม่วง = <i>S. quinquestriatum</i> ภาคกลางและสีเขียว = <i>S. quinquestriatum</i> ภาคใต้)	225
5.34	UPGMA tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 ของ <i>S. nakhonense</i> และ <i>S. quinquestriatum</i> โดยใช้ <i>Simulium fenestratum</i> เป็น outgroup	226
5.35	กลุ่มประชากรแมลงวันดำชนิด <i>Simulium tani</i> ซึ่งจัดกลุ่มโดยใช้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของโปรแกรม SAMOVA	228
5.36	UPGMA tree คำนวณโดยใช้ค่า pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของ <i>S. nakhonense</i> and <i>S. quinquestriatum</i> . NK หมายถึงประชากรของ <i>S. nakhonense</i> และ QT หมายถึงประชากรของ <i>S. quinquestriatum</i> .	233
5.37	Mismatch distribution ของกลุ่มประชากรภาคเหนือ (a) ภาคตะวันออก (b) และภาคกลาง/ใต้ (c)	236
5.38	Mismatch distributions ของ (a) ทุกประชากร (b) ภาคเหนือ (c) ภาคใต้ของ <i>S. nakhonense</i> โดยกราฟไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการ simulation ภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion	238
5.39	Mismatch distributions ของ (a) ทุกประชากร (b) ภาคเหนือ (c) ภาคใต้ของ <i>S. quinquestriatum</i> โดยกราฟไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการ simulation ภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion	239
3.40	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำสกุลย่อย <i>Simulium</i> , <i>Gomphostilbia</i> และ <i>Nevermannia</i> วิเคราะห์จากข้อมูลรูปร่างลักษณะทางปริมาณของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยโดยวิธี Neighbor joining ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b10) (1000 bootstraps replication) โดยมี <i>S. pahangense</i> เป็น outgroup species	250
5.41	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำชนิด <i>Simulium</i> (<i>Nevermannia</i> .) <i>feuerborni</i> จำนวน 5 ตัว (10 โคลน) ที่เก็บจากโครงการหลวง อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	261

สารบัญภาพ (ต่อ)

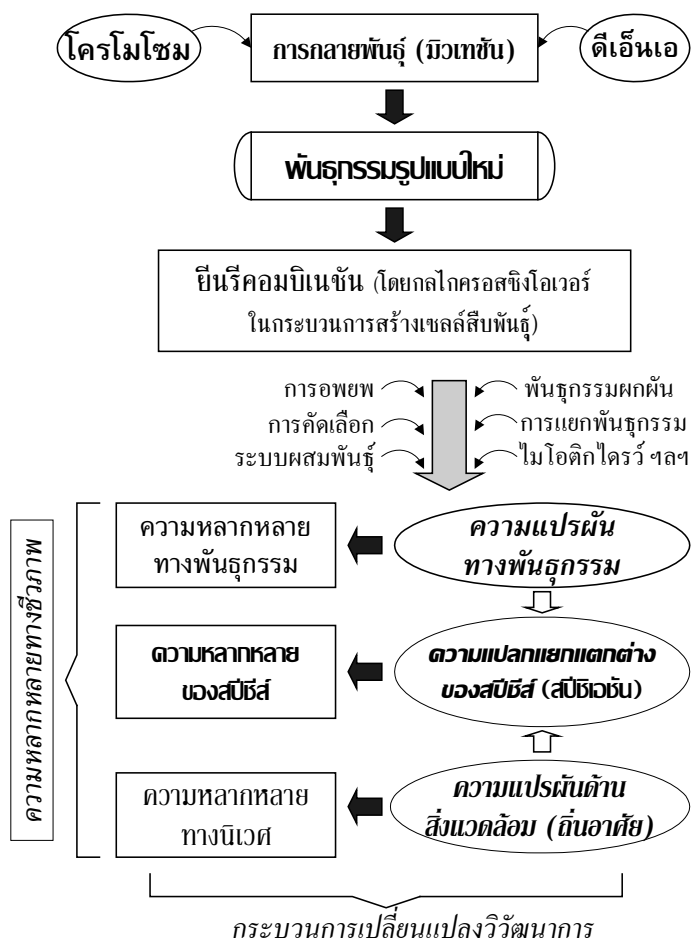
ภาพที่		หน้า
5.42	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium</i> (<i>Nevermannia</i>) <i>feuerborni</i> จำนวน 5 ตัว (10 โคลน) ที่เก็บจากโครงการหลวง และจำนวน 1 ตัว (2 โคลน) ที่เก็บจากน้ำตกห้วยทรายเหลือง อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่	262
5.43	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันค้ำจำนวน 40 ชนิด แบ่งเป็น 4 สกุลย่อย ได้แก่ กลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> , <i>Nevermannia</i> , <i>Simulium</i> , <i>Montisimulium</i> และริ้นค้ำที่ยังไม่ทราบว่าอยู่ในสกุลใดอีก 1 ชนิด	267
5.44	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันค้ำในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> , <i>Nevermannia</i> , <i>Montisimulium</i> , <i>Simulium</i> และแมลงวันค้ำที่ยังไม่ทราบว่าอยู่ในสกุลใดอีกหนึ่งชนิด วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 โดยใช้โปรแกรม PAUP (version 4.01b) ด้วยวิธี Maximum parsimony (1,000 bootstrap replications) โดยมี <i>Phlebotomus perniciosus</i> (AF 205526; Muccio <i>et al.</i> , 2000), <i>Chironomus annularius</i> (AJ296770; Koepf <i>et al.</i> , Unpublished data)	273
5.45	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันค้ำในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> , <i>Nevermannia</i> , <i>Montisimulium</i> , <i>Simulium</i> และแมลงวันค้ำที่ยังไม่ทราบว่าอยู่ในสกุลใดอีกหนึ่งชนิด วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 โดยใช้โปรแกรม PAUP (version 4.01b) ด้วยวิธี neighbor joining (1,000 bootstrap replications) โดยมี <i>Phlebotomus perniciosus</i> (AF 205526; Muccio <i>et al.</i> , 2000), <i>Chironomus annularius</i> (AJ296770; Koepf <i>et al.</i> , Unpublished data) and <i>Drosophila yakuba</i> (Z28416; SchiÖetterer <i>et al.</i> , 1994) เป็น outgroup	274
5.46	แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันค้ำในกลุ่มสกุลย่อย <i>Gomphostilbia</i> , <i>Nevermannia</i> , <i>Montisimulium</i> , <i>simulium</i> และแมลงวันค้ำที่ยังไม่ทราบว่าอยู่ในสกุลใดอีกหนึ่งชนิด วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 โดยใช้โปรแกรม MrBays (v3.0B4) ด้วยวิธี maximum likelihood (100 generations) โดยมี <i>Phlebotomus perniciosus</i> (AF 205526; Muccio <i>et al.</i> , 2000) เป็น outgroup	275

1. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัยในภาพรวม

กระบวนการวิวัฒนาการ (evolutionary process) ของสิ่งมีชีวิตอยู่บนพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงแปรผันทางพันธุกรรมและการปรับตัวทางพันธุกรรมทำให้เกิดพันธุกรรมรูปแบบใหม่ๆ ในประชากรต่างๆ ที่มีระบบนิเวศที่แตกต่างกันจนอาจนำไปสู่การแปลกแยกแตกต่างของสปีชีส์หรือชนิดของสิ่งมีชีวิตมากมายและหลากหลายรูปแบบ ซึ่งเรียกโดยรวมว่า ความหลากหลายทางชีวภาพ (biological diversity) (ภาพที่ 1.1) กระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการที่ยังผลให้เกิดสปีชีส์ใหม่ๆ นั้นใช้เวลานานมากซึ่งยากที่จะศึกษาหาหลักฐานเกี่ยวกับกลไกวิวัฒนาการได้ชัดเจน อย่างไรก็ตามวิทยาการก้าวหน้าทางวิชาการพันธุศาสตร์เชิงประชากร เซลล์พันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์เชิงโมเลกุลและนิเวศวิทยามีบทบาทสำคัญในการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับกระบวนการแปลกแยกแตกต่างของสปีชีส์ที่เรียกว่า สปีชีเอชัน (speciation)

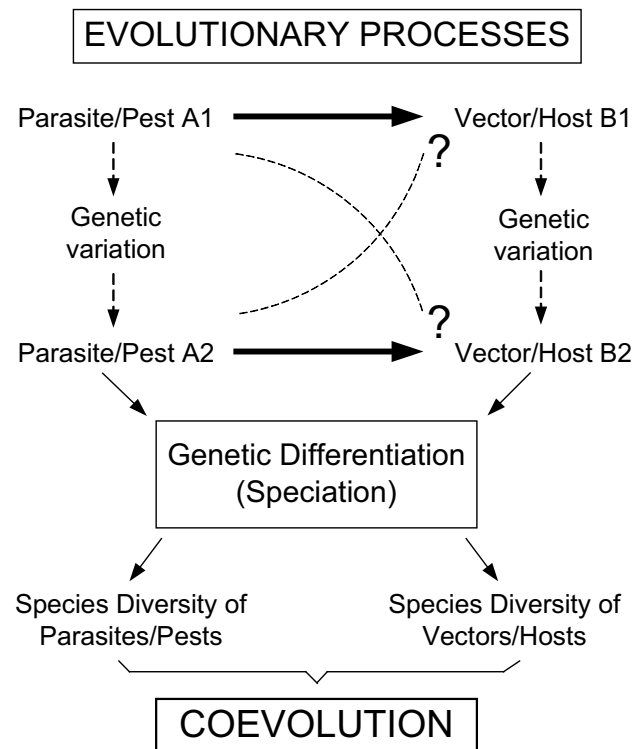
สิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดจะมีปฏิสัมพันธ์กับชนิดอื่นๆ ทั้งที่อยู่ภายในร่างกายและที่อยู่ภายนอกร่างกายซึ่งสิ่งมีชีวิตนั้นมากบ้างน้อยบ้างเพื่อการอยู่รอดของเผ่าพันธุ์ตามกลไกวิวัฒนาการร่วม (co-evolution) โดยทั่วไปแล้วสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมักได้รับประโยชน์จากชนิดอื่นในสภาพผู้ล่า (predator) กับเหยื่อ (prey), ปรสิต (parasite) กับโฮสต์ (host) หรือเชื้อก่อโรค (pathogen) กับโฮสต์ (host) ในขณะที่สิ่งมีชีวิตบางชนิดมีปฏิสัมพันธ์กันและมีวิธีการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิส (symbiosis) ดังกรณีตัวอย่าง ไลเคน เป็นสภาพการอยู่ร่วมกันตลอดเวลาระหว่างเห็ดรากับสาหร่ายซึ่งต่างก็ได้รับประโยชน์ระหว่างกันและกัน ในทำนองเดียวกันสภาพการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิสของแบคทีเรียกลุ่ม *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของแมลงหลายกลุ่มและ



ภาพที่ 1.1 การเปลี่ยนแปลงแปรผันทางพันธุกรรมที่นำไปสู่ความหลากหลายทางชีวภาพตามกระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นตามกาลเทศะ

ถ่ายทอดสู่รุ่นถัดไปโดยผ่านทางไข่ของแมลง รวมทั้งไวรัสกลุ่มเดโนโซไวรัส (densovirus) ที่อาศัยอยู่ในยุงลายแบบซิมไบโอซิสด้วย จะเห็นได้ว่าทั้งแบคทีเรียกับแมลงและไวรัสกับยุงลายต่างก็ได้รับประโยชน์ซึ่งกันและกัน กระบวนการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการร่วมดังกล่าวนี้ทำให้เกิดการแปลกแยกแตกต่างของสปีชีส์ที่เรียกว่าสปีชีเอชัน (speciation) จนเกิดมีความหลากหลายของชนิดหรือสปีชีส์ (species diversity) มากมาย (ภาพที่ 1.2) โดยเฉพาะในพื้นที่ป่าเขตร้อนรวมทั้งในประเทศไทย

การวิวัฒนาการร่วมระหว่างเชื้อก่อโรค เช่น พวกไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต แมลงพาหะ จะมีการปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันในการสร้างสารเคมีเพื่อต่อต้านหรือต่อสู้ (chemical defense) ระหว่างกันจนถึงจุดสมดุลอย่างลงตัว การวิเคราะห์ศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานด้านปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวในระดับโมเลกุลโดยเฉพาะหน่วยพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่สัตว์ใช้ป้องกันตัวเองและสภาพทางนิเวศวิทยาของแมลงพาหะจะทำให้ให้นักวิทยาศาสตร์ได้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการปรับตัวของแมลงพาหะกับเชื้อก่อโรคต่างๆ ที่มีวิถีชีวิตอยู่ร่วมกันในกระบวนการวิวัฒนาการร่วมของสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องกันและมีปฏิสัมพันธ์กันทางชีววิทยาที่อาจนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการควบคุมการระบาดของเชื้อก่อโรคในทางการแพทย์และในทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผล



ภาพที่ 1.2 แผนภาพกระบวนการวิวัฒนาการร่วม

โครงการวิจัยนี้จะเน้นการศึกษาเจาะลึกถึงในระดับโมเลกุลและหารายละเอียดในแนวกว้างทางด้านนิเวศวิทยาของแมลงพาหะกับเชื้อก่อโรคที่เกี่ยวข้องที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของชาวไทยทั้งในชนบทและในเมือง ได้แก่ ไข้เลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever) ที่มียุงลาย *Ae. aegypti* เป็นพาหะซึ่งส่วนใหญ่จะแพร่ระบาดในเมือง ไข้มาลาเรีย (Malaria) ที่มียุงก้นปล่อง (*Anopheles*) หลายชนิดเป็นพาหะซึ่งส่วนมากแพร่ระบาดในชนบทใกล้ป่า และโรค scrub typhus ที่มีไรอ่อน (chigger) เป็นพาหะซึ่งแพร่ระบาดตามหมู่บ้านในชนบท ตลอดจนอาการป่วยตาบอดที่เกิดจากพยาธิตัวกลมทำลายเนื้อเยื่อและประสาทตา (Onchocerciasis หรือ River Blindness) ที่ยังไม่มีในประเทศไทยแต่อาจเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขได้ในอนาคตจากการเคลื่อนย้ายของมนุษย์ตามกระแสโลกาภิวัตน์

2. วัตถุประสงค์โครงการ

1. เพื่อหาการแพร่กระจายร่วมของเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงพาหะที่พบในธรรมชาติ
2. เพื่อหาความหนาแน่นของเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงพาหะ
3. เพื่อศึกษาการถ่ายโอนเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงพาหะที่ไม่มีการติดเชื้อ
4. เพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเดนโซไวรัสสู่ยุงพาหะโดยแบคทีเรีย *Wolbachia*
5. เพื่อศึกษาจำนวนและการแพร่กระจายของไรอ่อนกลุ่ม Trombiculid ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ที่พบในประเทศไทย
6. เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์และรูปแบบการกระจายของไรอ่อนกลุ่ม Trombiculid ที่พบในประเทศไทย
7. เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* และสปิชีส์ของไรอ่อนกลุ่ม Trombiculid
8. เพื่อศึกษาหาจุลินทรีย์ Eubacteria ชนิดอื่นๆ ในไรอ่อนกลุ่ม Trombiculid ซึ่งอาจเป็นสาเหตุร่วมที่ทำให้เกิดโรค scrub typhus ในพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย
9. ศึกษาอนุกรมวิธานของไรินดำโดยใช้ลักษณะรูปร่างของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยโดยวิธี morphometric ควบคู่กับการศึกษารูปแบบของโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนและอนุพันธุศาสตร์
10. ศึกษาตัวแปรทางนิเวศวิทยาที่มีผลต่อการแพร่กระจายและความหนาแน่นของตัวอ่อน และปัจจัยที่มีผลต่อโครงสร้างชุมชนของประชากรไรินดำในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติต่างๆ
11. ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรไรินดำบางชนิดรวมทั้งความแตกต่างและความเหมือนกันทางพันธุกรรมของประชากรไรินดำภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันในระดับความสูงเท่ากันและความสูงต่างกัน โดยเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

3. การศึกษาอนุพันธุศาสตร์และ นิเวศวิทยาของพาหะกับเชื้อก่อโรค

3.1 บทนำ

โรคที่เกิดจากแมลงพาหะนั้นนับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญในด้านการแพทย์ทั้งของมนุษย์และสัตว์ ก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งด้านสังคมและเศรษฐกิจ แมลงพาหะที่สำคัญอันได้แก่ ยุง ไร้น้ำ รวมทั้งสัตว์ขาปล้องอื่นๆ ที่เป็นพาหะ เช่น เห็บ ไร เป็นต้น ในประเทศไทยโรคที่เกิดจากยุงพาหะและเป็นปัญหาที่สำคัญยิ่ง คือ โรคมาลาเรียซึ่งพบผู้ป่วยโรคนี้มากในชนบท บริเวณที่อยู่ติดกับป่า และโรคไข้เลือดออกซึ่งมีการแพร่กระจายมากขึ้นเมื่อมีการกระจายของชุมชนเมืองมากขึ้น โรคเท้าช้างเป็นอีกโรคที่นำโดยยุงและพบการแพร่กระจายของโรคเป็นจำนวนมากในบริเวณชายแดนซึ่งมีผู้อพยพมาจากประเทศเพื่อนบ้าน

ในประเทศไทยเชื้อโรคมาลาเรีย (*Plasmodium* spp.) นำโดยยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) คือ *Anopheles dirus* และ *Anopheles minimus* องค์การอนามัยโลกได้จัดอันดับให้โรคมาลาเรียเป็นหนึ่งในโรคที่มีความสำคัญ เนื่องจากในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตโดยโรคนี้เป็นจำนวนอย่างน้อย 2.6 ล้านคนทั่วโลก จากการสำรวจโดยองค์การอนามัยโลกพบว่าจำนวนผู้ป่วยด้วยเชื้อมาลาเรียมีอัตราสูงขึ้นในบริเวณที่มีอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย และพบว่า 61% จากประชากรทั้งหมดที่อาศัยในบริเวณที่มีรายงานการติดเชื้อมาลาเรียอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคมาลาเรีย และในแต่ละปีได้มีรายงานของผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรีย 210 – 220 ล้านราย (WHO, 1992)

เชื้อโรคไข้เลือดออกนำโดยยุงลาย *Aedes* spp. และมีอัตราการระบาดที่มีสัดส่วนตรงกันข้ามกับการระบาดของเชื้อโรคมาลาเรีย ไข้เลือดออกจัดเป็นโรคที่มีความสำคัญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อการขยายตัวของประชากรเพิ่มขึ้นและความเจริญเติบโตทางด้านสาธารณสุขโลกเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายที่เป็นพาหะที่สำคัญ 2 ชนิด คือ *Aedes albopictus* และ *Aedes aegypti*

โรคไข้เลือดออกเกิดจากเชื้อไวรัส Dengue โดยแบ่งตามอาการ ได้แก่ โรคไข้เลือดออกธรรมดา และโรค Dengue Hemorrhagic fever ผู้ป่วยที่เป็นโรค Dengue Hemorrhagic fever จะมีอาการ Hemorrhage และช็อค (Thongcharoen & Jatanasen, 1993) ในประเทศไทยจากการสำรวจพบว่าจำนวนผู้ป่วยและผู้ติดเชื้อโรคไข้เลือดออกเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในชุมชนเมือง เช่น ในกรุงเทพฯ การระบาดของโรคไข้เลือดออกมีมากที่สุดในปี 1987 โดยมีรายงานผู้ป่วยจำนวน 174,280 ราย (Division of General Communicable Diseases, Department of Communicable Disease Control, 1993) และพบว่า การระบาดของโรคไข้เลือดออกจะเพิ่มมากขึ้นในฤดูฝน (Wongroongsarb, 1997)

การควบคุมแมลงพาหะนั้นนับว่าเป็นกระบวนการที่สำคัญและจำเป็นประการหนึ่งในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ปัจจุบันได้มีการนำวิธีการต่างๆ เข้ามาใช้ในการควบคุมแมลงพาหะ เช่น การใช้

ยาฆ่าแมลง และการควบคุมโดยชีววิธี การควบคุมแมลงพาหะโดยใช้ยาฆ่าแมลงนั้นได้พบภาวะดื้อต่อยาฆ่าแมลงในแมลงพาหะในกรณีที่มีการใช้ยาฆ่าแมลงต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน ในการควบคุมยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรียด้วยยาฆ่าแมลงนั้น พบว่าในระยะแรกที่ทำควบคุมด้วยยาฆ่าแมลงนั้นจำนวนยุงก้นปล่องและผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียได้ลดจำนวนลง อย่างไรก็ตามก็ได้พบภาวะดื้อต่อยาฆ่าแมลงในยุงก้นปล่อง จากการสำรวจโดยองค์การอนามัยโลกพบว่าจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคนี้ไม่ลดจำนวนลง (WHO, 1992) อีกทั้งยาฆ่าแมลงยังมีฤทธิ์ตกค้างในธรรมชาติและสามารถทำลายแมลงอื่นๆ ที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ ก่อให้เกิดการสูญเสียสมดุลทางธรรมชาติอีกด้วย ดังนั้นการควบคุมแมลงโดยชีววิธีจึงได้รับความสนใจและได้รับการพัฒนาเป็นอย่างมากในปัจจุบัน การควบคุมแมลงโดยชีววิธีนั้นสามารถกระทำได้หลายวิธี โดยอาจใช้แมลงห้ำหรือแมลงเบียนในการควบคุมแมลงซึ่งเป็นที่ยอมรับใช้ในการควบคุมแมลงทางการเกษตร ในการควบคุมแมลงพาหะโดยเฉพาะอย่างยิ่งยุงพาหะนั้น พบว่าได้มีการนำสารสกัดจาก *Bacillus thuringiensis* มาใช้ในการควบคุมประชากรลูกน้ำในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการควบคุมประชากรลูกน้ำโดยใช้สารสกัดจาก *Bacillus thuringiensis* นั้นต้องกระทำอย่างสม่ำเสมอ จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาวิธีใหม่ในการควบคุมแมลงพาหะนำโรค

การควบคุมแมลงโดยชีววิธีอีกแขนงหนึ่งที่กำลังเป็นที่สนใจในขณะนี้คือการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมประชากรของแมลงพาหะ ในปัจจุบันได้มีการนำไวรัสชนิด Baculovirus มาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชจำพวกผีเสื้อ (Moscardi, 1999) ไวรัสอีกชนิดหนึ่งที่ได้มีการนำมาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชจำพวกผีเสื้อได้ประสบความสำเร็จคือไวรัสชนิด Densovirus (Tal & Attathom, 1993) ซึ่งจัดเป็นไวรัสที่อยู่ในกลุ่ม Parvovirus ที่พบในแมลงและสัตว์จำพวก Crustacea และมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตให้อาศัย (host) เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ได้มีการศึกษาด้านชีวโมเลกุลของไวรัสในกลุ่มนี้อาจละเอียดจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไวรัสกลุ่มนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Densovirus ที่พบในยุงมาทำการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวโมเลกุลและใช้ไวรัสที่ได้ในการเป็น Transducing agent นำยีนที่สนใจถ่ายทอดลงในประชากรยุงในธรรมชาติ

เดนโซไวรัส (Densovirus) จัดอยู่ใน Family Parvoviridae ซึ่งแบ่งเป็นสกุล 3 คือ Parvovirus Dependovirus และ Densovirus โดยไวรัสที่จัดอยู่ในสกุล Densovirus นั้นทำให้เกิดโรคเฉพาะในแมลงและมีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงเจ้าบ้าน (host) ในปัจจุบันได้มีการค้นพบสายพันธุ์เดนโซไวรัสในยุงอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ด้วยกัน ได้แก่ AeDNV ซึ่งพบในรัสเซียโดยแยกได้จากลูกน้ำของยุง *Aedes aegypti* (Buchatsky, 1989) AaPV ซึ่งพบโดยกลุ่มนักวิจัยจากประเทศฝรั่งเศส โดยแยกได้จาก cell line ของยุง *Aedes albopictus* (Jousset et al., 1993) และสายพันธุ์เดนโซไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่พบในประเทศไทย (AthDNV) ในยุง *Aedes aegypti* (Kittayapong et al., 1999) ซึ่งจากการศึกษาวิจัยพบว่าลูกน้ำที่มีการติดเชื้อเดนโซไวรัสจะตายในระยะที่ 3 และ 4 อีกทั้งยังพบว่าสายพันธุ์เดนโซไวรัสที่พบในประเทศไทยนั้นมีความสามารถในการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกโดยผ่านทางไข่ได้ (Transovarial transmission) มากกว่าสายพันธุ์อื่น (Kittayapong et al., 1999) ซึ่งความสามารถในการถ่ายทอดเดนโซไวรัสผ่านทางไข่ของแมลงให้อาศัย

ที่ติดเชื่อทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เดนโซไวรัสสายพันธุ์ไทยในการถ่ายทอดยีนที่ต้องการไปในประชากรของแมลงพาหะได้

ในการศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเดนโซไวรัสในอวัยวะต่างๆ ของยุงทั้งในระยะลูกน้ำ ตัวโม่งและตัวเต็มวัย พบเดนโซไวรัสทั้งในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์เช่น รังไข่ และอวัยวะของยุง และส่วนอื่นๆ เช่น กล้ามเนื้อ Fat body และ Malpighian tubules (Buchatsky, 1989) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวเนื่องกับการถ่ายทอดเดนโซไวรัสไปสู่รุ่นถัดไปจะทำให้เราเข้าใจถึงปัจจัยที่จำเป็นในการถ่ายทอดเดนโซไวรัสไปสู่รุ่นถัดไป อีกทั้งยังมีประโยชน์ในการใช้เดนโซไวรัสเพื่อควบคุมประชากรของแมลงพาหะในการศึกษาเบื้องต้นต่อไป

นอกเหนือจากการใช้ไวรัสในการควบคุมแมลงพาหะแล้วยังสามารถใช้แบคทีเรียในการควบคุมแมลงพาหะอีกด้วย แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจเป็นอันมากในเวลานี้เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูกโดยผ่านทางไข่ (Hoffmann & Turelli, 1997) และสามารถถ่ายทอดข้ามสปีชีส์ของแมลงให้อาศัย (Werren et al., 1995) แบคทีเรีย *Wolbachia* จัดอยู่ในกลุ่ม alpha-proteobacteria พบอาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์สืบพันธุ์แมลงหลายชนิด (Werren & O'Neill, 1997) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางการสืบพันธุ์ในแมลงเจ้าบ้าน (Reproductive alteration) และมักจะเกี่ยวข้องกับการปรากฏการณ์เข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึมของแมลงเจ้าบ้าน (Cytoplasmic incompatibility) (Hoffmann & Turelli, 1997) รวมทั้งปรากฏการณ์ที่แมลงเจ้าบ้านจำพวกต่อแตนสามารถมีลูกเพศเมียได้โดยไม่ต้องมีการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเพศผู้และเพศเมีย (Parthenogenesis) (Stouthamer, 1997) ปรากฏการณ์ที่สิ่งมีชีวิตจำพวก Isopod มีลูกเพศเมียมากกว่าเพศผู้ (Feminization) (Rigaud, 1997) และยังพบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ยังมีความสัมพันธ์แบบอิงอาศัย (Mutualistic) กับพยาธิหนอนตัวกลมอีกด้วย (Bourtzis & O'Neill, 1998)

ปรากฏการณ์ที่เกิดจากความผิดปกติที่เกิดจากความผิดปกติในการผสมพันธุ์ของแมลงและมีผลให้ลูกผสมที่ได้ไม่สามารถเจริญตามปกติซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้นจัดเป็นการแยกผสมพันธุ์แบบหนึ่งโดยไม่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดหน่วยพันธุกรรม ในกรณีการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเจ้าบ้านที่เพศผู้มีแบคทีเรียแต่เพศเมียไม่มีแบคทีเรียจะมีผลให้ได้ไข่ที่ไม่สามารถเจริญตามปกติ แต่ในทางกลับกันถ้าเพศผู้ไม่มีแบคทีเรียแต่เพศเมียมีแบคทีเรีย เมื่อผสมพันธุ์กันจะได้ไข่ที่มีแบคทีเรียอยู่และสามารถเจริญตามปกติ (Hoffmann & Turelli, 1997) ดังนั้นแมลงเจ้าบ้านที่มีแบคทีเรียอยู่ในเซลล์สืบพันธุ์จะได้เปรียบในการถ่ายทอดหน่วยพันธุกรรมไปยังรุ่นต่อไป จนในที่สุดประชากรแมลงเจ้าบ้านที่มีแบคทีเรียอยู่ซึ่งมีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะเข้าแทนที่ประชากรแมลงเจ้าบ้านที่ไม่มีแบคทีเรียในสภาพธรรมชาติ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะศึกษาความเป็นไปได้ของการนำความก้าวหน้าทางอณูชีววิทยาใช้ในการควบคุมแมลงพาหะนำโรค และมีเป้าหมายระยะยาวในการสร้างภูมิคุ้มกันเชื้อให้แก่วาหะนำโรค เพื่อไม่ให้นำเชื้อโรคมาสู่คน ในการดำเนินการเพื่อให้บรรลุเป้าหมายดังกล่าวนี้จะต้องพัฒนายีนที่จะสร้างภูมิคุ้มกันต้านเชื้อและพัฒนาระบบถ่ายทอดยีนดังกล่าวไปในกลุ่มประชากรของแมลง

พาหะนำโรค โดยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะเน้นระบบการถ่ายทอดยีนโดยอาศัยเดนโซไวรัสของยุงลายสายพันธุ์ที่ค้นพบในประเทศไทยร่วมกับแบคทีเรีย *Wolbachia* จากยุงลาย เพื่อพัฒนาให้สามารถถ่ายทอดยีนไปในแมลงพาหะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยุงพาหะตามธรรมชาติ นอกจากนี้จากข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นโดยกลุ่มวิจัยนี้พบว่าอัตราการติดเชื้อไขเลือดออกลดลงในยุงลายที่มีเดนโซไวรัส ดังนั้นการแพร่กระจายและการถ่ายทอดเดนโซไวรัสไปในประชากรยุงลายอาจจะช่วยลดอัตราการติดเชื้อไขเลือดออกได้ดี อีกทั้งการศึกษานี้จะได้ทำการสำรวจหาสายพันธุ์ใหม่ๆของทั้งเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงพาหะที่พบในธรรมชาติซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมแมลงพาหะเบื้องต้นต่อไปในอนาคต

3.2 วัตถุประสงค์

3.2.1 เพื่อหาการแพร่กระจายร่วมของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเชื้อเดนโซไวรัสในยุงพาหะที่พบในธรรมชาติ

3.2.2 เพื่อหาความหนาแน่นและความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเชื้อเดนโซไวรัสในยุงพาหะ

3.2.3 เพื่อหาปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากได้รับสารฆ่าแมลงในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

3.2.4 ศึกษาผลกระทบของสารฆ่าแมลงที่มีต่อการติดเชื้อ *Wolbachia* ทั้งในยุงและโคฟีพอด ในแง่ของอัตราการอยู่รอด อัตราการเจริญเติบโต และขนาดปีกของยุง

3.2.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหลังได้รับสารฆ่าแมลงที่มีต่อการติดเชื้อ *Wolbachia* ทั้งในยุงและโคฟีพอด ในแง่ของอัตราการอยู่รอด อัตราการเจริญเติบโต และขนาดปีกของยุง

3.2.6 การศึกษาเปรียบเทียบพฤติกรรมการผสมพันธุ์ การวางไข่ และการหาโฮสต์ของยุงลายสวน *A. albopictus* ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่างยุงพาหะที่พบอยู่ตามธรรมชาติจากทั่วทุกภาคของประเทศไทย

ได้ทำการเก็บตัวอย่างยุงพาหะจากทุกภาคของประเทศไทย จากนั้นจึงทำการจำแนกชนิดของยุงพาหะ โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการ และสกัดดีเอ็นเอของยุงพาหะโดยใช้สารละลาย STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0; O'Neill et al., 1992) ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเชื้อเดนโซไวรัส โดยเทคนิค PCR ต่อไป

3.3.2 การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยุงพาหะตามวิธีข้างต้นถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ซึ่งจำเพาะต่อยีน *wsp* ของ *Wolbachia* (81F 5'-TCG TCC

AAT AAG TGA TGA AGA AAC-3', 691R 5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3'; Zhou et al., 1998) ผลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยจะให้ชั้นดีเอ็นเอขนาด 606 bp

3.3.3 การตรวจสอบการติดเชื้อเดนโซไวรัส

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยุงพาหะตามวิธีข้างต้นถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อเดนโซไวรัส ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ AaPVF และ AaPVR primers ซึ่งจำเพาะต่อเดนโซไวรัสในยุง (AaPVF 5'- AGA CA (AG) (AC)G(AG) TGC TAA C-3', AaPVR 5'- GAT TTT GTA TAT ACT CCT TC-3'; O'Neill et al., 1995) ผลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยจะให้ชั้นดีเอ็นเอขนาด 350 bp

3.3.4 การตรวจหาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเชื้อเดนโซไวรัส

ยุงพาหะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในโฮสต์คือ ยุงลายชนิด *Ae. albopictus* เนื่องจากเป็นยุงลายที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ถึงสองสายพันธุ์ในธรรมชาติ ยุงลาย *Ae. albopictus* ที่ใช้ในการทดลองจะมีทั้งชนิดที่มีสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สองสายพันธุ์ (wAlbA และ wAlbB) และชนิดที่มีสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเพียงสายพันธุ์เดียว (wAlbA) ยุงลายทั้งสองโคลนนี้จะถูกเลี้ยงใน Insectary ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 27°C และความชื้น 72% ยุงลายตัวเต็มวัยจะถูกเลี้ยงด้วยน้ำหวานซึ่งมีน้ำตาล 10% ประมาณ 2 สัปดาห์ก่อนจะให้กินเลือดหนู hamster ยุงลายที่กินเลือดแล้วจะวางไข่บน filter paper ซึ่งบออยู่ภายในถ้วยสีดำที่มีน้ำอยู่ประมาณ 1 ใน 3 ของถ้วย ไข่ยุงจะถูกปล่อยให้อยู่บน filter paper ที่ขึ้น 3 วันจึงปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ไข่ยุงที่แห้งอยู่ระหว่าง 5-37 วันจะถูกเก็บมาตรวจหาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

ในการตรวจหาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยเทคนิค Real – Time PCR จะต้องนำไข่ยุงมาสกัด DNA โดยใช้ไข่ 10 ใบต่อปริมาณของ Buffer 50 ul สารละลาย DNA จะถูกนำมาปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้เซลล์แตกตะกอน แล้วจึงนำส่วนที่เป็น supernatant จำนวน 25 ul มาใส่ในหลอดใหม่เพื่อทำการปั่นให้เข้ากันก่อนจะนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR

การหาความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยวิธี Real - Time PCR จะทำโดยใช้ยีนที่มีเพียงชุดเดียว (single - copy gene) คือ ยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มแบคทีเรีย *Wolbachia* (wsp) โดยวิธีการเดียวกับ McGraw et al. (2001) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน DNA คือ 42°C โดยใช้สารละลายในอัตราส่วนดังนี้ : 50 mM KCl, 10 mM Tris HCL (pH 9.0) , 0.1% Triton – x100, 0.25 mM dNTPs, 0.5 μ M primers, 2.0 mM MgCl₂, 0.3 μ g/ μ L BSA และ 0.625 M Beacon ผลผลิต PCR ที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทำ PCR 3 ครั้ง (ตารางที่ 3.1 และ 3.2)

ข้อมูลที่ทำการศึกษาจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่อยู่ในระยะก่อนการพักตัว (pre - diapause) และกลุ่มที่อยู่ในระยะพักตัว (diapause) โดยเราจะใช้เกณฑ์ประมาณ 9 วันเป็นตัวบ่งชี้ว่าไข่เข้าระยะพักตัว ซึ่งโดยปกติที่อุณหภูมิ 30°C การพัฒนาของตัวอ่อนภายในไข่ (embryonic development) จะสมบูรณ์ในช่วงเวลาระหว่าง 3 - 7 วัน ในกรณีที่อุณหภูมิลดลงเป็น 27°C ระยะเวลาในการพัฒนาของตัวอ่อนภายในไข่จะนานกว่าเล็กน้อย ค่าความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ได้จะผ่านวิธีการ log –

transformed ก่อนที่จะเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของแบคทีเรียระหว่างไขก่อนระยะพักตัว (pre - diapause) และไขในระยะพักตัว (diapause) โดยใช้ standard t - test (Statview 5.01) ค่าจำนวนความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* จะถูกนำมาทำ regression line กับค่าของอายุไขyoung เพื่อดูความเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียในระหว่างการพักตัว (diapause)

วิธีการออกแบบ Probe เพื่อใช้ในการตรวจสอบปริมาณ ของ Densovirus ทำได้ดังนี้ 1) เลือกบริเวณของ nucleotides ที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกับโมเลกุลต้นแบบให้มากที่สุด ให้มีความยาวอย่างน้อย 13 nucleotides ในทิศทาง 5' ไป 3' ของโมเลกุลต้นแบบ 2) กำหนดให้มีค่า Tm อยู่ระหว่าง 65-67°C และให้มีอุณหภูมิสูงกว่าค่า Tm ของ Primers ที่ใช้ใน PCR ประมาณ 10°C 3) หลีกเลี่ยง G ในส่วนปลาย 5' ของ probe แต่ให้มีปริมาณ GC รวมประมาณ 30-80% 4) หลีกเลี่ยงการใช้ nucleotides ที่ซ้ำกันในตำแหน่งที่อยู่ติดๆ กัน 5) หลีกเลี่ยงการซ้อนทับกันระหว่าง Probe และ Primers 6) ในการ label จะใช้สีย้อม 6-FAM และ TAMRA-Q เพื่อการตรวจวัดปริมาณของโมเลกุลของ DNA

ตารางที่ 3.1. แสดง Real - Time PCR Probes ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia*

Sample Type	Sequence Name	Sequence from 5' to 3'	Reference
Densovirus	5 DNV3247PR	[6~FAM]ATGTCGGAAGGAGTATAT ACAACAACA[Tamra~Q]	This Study
<i>Wolbachia</i>	wsp beacon	5'~FAM CGGAGCGTTATTTTCGGTTCTTWT GGTGCTCCG-DABCYL	McGraw et al. (2001)

ตารางที่ 3.2. แสดง Real - Time PCR Primers ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia*

Sample Type	Sequence Name	Sequence from 5' to 3'	Reference
Densovirus	5TDNV3219	CAAGGGAAATCGACTTCCA	This study
Densovirus	3TDNV3383	CTGAATTTTGTCTGTTAGTTCT	This study
<i>Wolbachia</i>	440F	CTGGTGTTAGTTATGATGTAAC	McGraw et al. (2001)
<i>Wolbachia</i>	691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA	McGraw et al. (2001)

3.3.5 การสกัดแยกแบคทีเรีย *Wolbachia* และการชักนำแบคทีเรีย *Wolbachia* เข้าสู่ยุงเจ้าบ้าน

แบคทีเรีย *Wolbachia* จะถูกสกัดจากรังไข่ของยุง *Ae. albopictus* (KLPP) เพศเมีย ซึ่งอายุ 3-7 วัน โดยการบดรังไข่จากยุง 50 ตัว ใน Homogenization buffer (9ml ของ 1M KCl, 5.5 ml ของ 1M CaCl₂, 1.5 ml ของ 1 M MgSO₄, 8.56 ml ของซูโครส, 600 µl ของ 5 Mn₂Cl) สารละลายที่ได้หลังการบดรังไข่อยู่

จะถูกกรอง 2 ครั้งด้วยเยื่อบางๆ ขนาดช่อง 95 μm และปั่นตกตะกอนที่ 200 x g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บแบคทีเรีย *Wolbachia* ไปใช้ในการทำ microinjection โดยฉีดแบคทีเรียผ่านบริเวณอกของยุง *Culex quinquefasciatus* ยุงที่ผ่านการทำ microinjection แล้ว จะถูกแยกให้ผสมพันธุ์กับยุงเพศผู้ที่ไม่ได้ผ่านการชักนำ *Wolbachia* จากนั้นจะทำตรวจหา *Wolbachia* จากรุ่นถัดไปโดยใช้เทคนิคทาง PCR

3.3.6 การชักนำเชื้อเดนโซไวรัสเข้าสู่ยุงเจ้าบ้าน

ในการทดลองนี้ลูกน้ำยุงที่ติดเชื้อเดนโซไวรัส 50 ตัวถูกมาบดในน้ำ 10 ml ใส่ในภาชนะที่มีลูกน้ำยุง *Ae. aegypti* หรือ *Ae. albopictus* อายุ 1 วัน ภาชนะละ 50 ตัวในน้ำ 1 ลิตร โดยใส่ภาชนะละ 500, 400, 300, 200, 100 และ 50 ml และภาชนะที่ไม่ได้ใส่เชื้อเดนโซไวรัสเป็น control จากนั้นลูกน้ำจะถูกเลี้ยงใน insectary ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 26-28°C และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 70-80% ลูกน้ำจะกินอาหารปลาจนกระทั่งถึงระยะสุดท้าย ลูกน้ำที่ตายในระหว่างการทดลองจะถูกแยกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาตรวจหาการติดเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิคทาง PCR ต่อไป

3.3.7 ปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายสวน *Ae. albopictus* ที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากได้รับสารฆ่าแมลงในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

สัตว์ให้อาหารที่ใช้ในการทดลองเพื่อการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในสัตว์ให้อาหารในครั้งนี้คือ ยุงลายชนิด *Ae. albopictus* เนื่องจากเป็นสัตว์ให้อาหารที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ถึงสองสายพันธุ์ในธรรมชาติคือ A และ B (Double infection) โคโลนีของทั้งยุงลายสวนและโคฟีพอด *M. aspericornis* ทั้งสายพันธุ์ที่ติดเชื้อและสายพันธุ์ที่ไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* ถูกเลี้ยงให้เติบโตในห้องแมลงของหน่วยวิจัยพาหะฯ ซึ่งจะถูกเลี้ยงตั้งแต่ระยะไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยในห้องเลี้ยงแมลง ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้น 72% ยกเว้นในการทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ จะมีการใช้ Incubator และตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่ลูกน้ำยุงลาย 20 ตัวในบีกเกอร์ 5 ใบที่เติมน้ำ 150 ml ไว้ จะได้รับอาหาร (commercial fish food) จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย จากนั้นตัวเต็มวัยจะถูกเลี้ยงด้วยน้ำหวานซึ่งมีน้ำตาล 10%ประมาณ 3 วันก่อนถูกเก็บตัวอย่าง ซึ่งส่วนหนึ่งจะถูกนำมาวัดขนาดของปีกเพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโต โคฟีพอดระยะนอเพลียส 30 ตัวถูกเติมลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำตมฟาง 100 ml และให้อาหาร (paramecium sp.) ทุกวัน เตรียมสารละลาย Temephos 1% SG ใน 5 ความเข้มข้นคือ 0.0017, 0.0033, 0.0067, 0.0133 และ 0.0167 mg/l สำหรับปัจจัยควบคุมจะใช้น้ำแทนสารฆ่าแมลง อุณหภูมิของการทดลองถูกแบ่งออกเป็น 2 ระดับคือที่ 25 องศาเซลเซียสและ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระยะเวลาการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตและขนาดของปีก ถูกบันทึกในแต่ละการทดลอง เทคนิค PCR ถูกใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในยุงและโคฟีพอด

3.3.8 การศึกษาเปรียบเทียบพฤติกรรมการผสมพันธุ์ การวางไข่ และการหาโฮสต์ของ ยุงลายสวน *Ae. albopictus* ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

สัตว์ให้อาหารที่ใช้ในการทดลองเพื่อการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในสัตว์ให้อาหารในครั้งนี้คือ

ยุงลายชนิด *Ae. albopictus* เนื่องจากเป็นสัตว์ให้อาศัยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ถึงสองสายพันธุ์ในธรรมชาติคือ A และ B (Double infection) โคโลนีของทั้งยุงลายสวนและโคฟีพอด *M. aspericornis* ทั้งสายพันธุ์ที่ติดเชื้อและสายพันธุ์ที่ไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* ถูกเลี้ยงให้เติบโตในห้องแมลงของหน่วยวิจัยพาหะฯ ซึ่งจะถูกเลี้ยงตั้งแต่ระยะไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยในห้องเลี้ยงแมลง ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้น 72% ยกเว้นในการทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ จะมีการใช้ Incubator และตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่ลูกน้ำยุงลาย 20 ตัวในบีกเกอร์ 5 ใบที่เติมน้ำ 150 ml ไว้ จะได้รับอาหาร (commercial fish food) จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย จากนั้นตัวเต็มวัยจะถูกเลี้ยงด้วยน้ำหวานซึ่งมีน้ำตาล 10% ประมาณ 3 วันก่อนถูกเก็บตัวอย่าง ซึ่งส่วนหนึ่งจะถูกนำมาวัดขนาดของปีกเพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโต โคฟีพอดระยะนอเพลียส 30 ตัวถูกเติมลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำต้มฟาง 100 ml และให้อาหาร (paramecium sp.) ทุกวัน เตรียมสารละลาย Temephos 1% SG ใน 5 ความเข้มข้นคือ 0.0017, 0.0033, 0.0067, 0.0133 และ 0.0167 mg/l สำหรับปัจจัยควบคุมจะใช้น้ำแทนสารฆ่าแมลง อุณหภูมิของการทดลองถูกแบ่งออกเป็น 2 ระดับคือที่ 25 องศาเซลเซียสและ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระยะเวลาการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตและขนาดของปีก ถูกบันทึกในแต่ละการทดลอง เทคนิค PCR ถูกใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในยุงและโคฟีพอด โดยใช้ยีน *wsp* ของ *Wolbachia* เป็นตัวตรวจสอบ การสกัด DNA ใช้สารละลาย STE ตามวิธีการของ O'Neill et al (1992) โดยใช้ตัวอย่างยุงและโคฟีพอด 1 ตัวอย่างต่อปริมาณของ STE Buffer 100 µl สารละลาย DNA จะถูกนำมาปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน แล้วจึงนำส่วนที่เป็น supernatant จำนวน 25 µl มาใส่ในหลอดใหม่เพื่อทำการปั่นให้เข้ากัน ก่อนจะนำไปเพิ่มปริมาณ DNA และทำการตรวจหา และยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ยีนที่มีเพียงชุดเดียว (single-copy gene) คือ ยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มแบคทีเรีย *Wolbachia* (*wsp*) เป็น marker PCR reaction 20 µl ประกอบด้วย 13.5 µl H₂O, 10 X buffer 2 µl, MgCl₂ 25 mM, dNTP 10 mM, *wsp* primers 20 µM Taq polymerase 1 unit อุณหภูมิที่ใช้คือ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที รวม 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ ถูกตรวจสอบความถูกต้องของชิ้น DNA โดยใช้ gel electrophoresis เทคนิค Real Time quantitative PCR ใช้เพื่อที่จะตรวจสอบปริมาณความหนาแน่นของ *Wolbachia* ในยุงโดยใช้เครื่องมือ ABI Prism 7000 Sequence Detection System ในการศึกษานี้มีการออกแบบ Primers ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *wsp* ของ *Wolbachia* ทั้งสองสายพันธุ์ (293 GF และ 449 AR สำหรับสายพันธุ์ A และ 293 GF และ 444 BR สำหรับสายพันธุ์ B) ลำดับเบสมีดังนี้

293GF: 5'-GGTTTTGCTGGTCAAGTAA-3'

449AR: 5'-GCATCTTTGGTAAGTACTTTT-3'

444BR: 5'-GCTGTAAAGAACGTTGATC-3'

Probe ที่ใช้เฉพาะเจาะจงกับยีน *wsp* มีลำดับเบสดังนี้ 5'-TGTTAGTTATGATGTAAGTCCAGAA-3' DNA มาตรฐานถูกใช้เป็นตัววัดมาตรฐานของปริมาณความหนาแน่นของ *Wolbachia*

3.4 ผลการทดลอง

3.4.1 การตรวจสอบการแพร่กระจายร่วมของเชื้อเดโนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในธรรมชาติจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย

3.4.1.1 การเก็บตัวอย่างยุงพาหะและจำแนกชนิดของยุงพาหะโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างยุงถูกเก็บรวบรวมจาก 20 จังหวัดในทุกภาคของประเทศไทย

ภาคเหนือ 4 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่, เชียงราย, สุโขทัย, นครสวรรค์

ภาคกลาง 2 จังหวัด ได้แก่ นนทบุรี, ปทุมธานี

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด ได้แก่ นครราชสีมา, อุบลราชธานี, ขอนแก่น, สุรินทร์, ชัยภูมิ

ภาคตะวันออก 3 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา, ระยอง, จันทบุรี

ภาคตะวันตก 2 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี, ประจวบคีรีขันธ์

และภาคใต้ 4 จังหวัด ได้แก่ ปัตตานี, สุราษฎร์ธานี, สตูล, สงขลา

3.4.1.2 การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเชื้อเดโนโซไวรัส ในยุงตัวอย่างจากธรรมชาติ

ยุงพาหะจำนวนทั้งสิ้น 416 ตัว จาก 53 สปีชีส์ จากจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *wspF* และ *wspR* ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* พบยุง 7 สปีชีส์จากจิ้งนัส *Aedes* ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยยุงลายสปีชีส์ *Ae. albopictus* ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มากที่สุด คือ 71.78% (ตารางที่ 3.3) แต่ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงก้นปล่องจิ้งนัส *Anopheles* ที่ทำการตรวจสอบ (ภาพที่ 3.1)

การตรวจสอบการติดเชื้อเดโนโซไวรัสด้วยไพรเมอร์ *AaPV F* และ *AaPV R* ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อเดโนโซไวรัสที่พบในยุง พบยุงเพียง 3 สปีชีส์ที่ติดเชื้อเดโนโซไวรัส ได้แก่ ยุงลาย *Ae. aegypti* ยุงก้นปล่อง *An. dirus* A และยุงก้นปล่อง *An. minimus* โดยยุงก้นปล่อง *An. minimus* มีการติดเชื้อเดโนโซไวรัสมากที่สุด คือ 35% (14/40) และยุงลาย *Ae. aegypti* มีการติดเชื้อเดโนโซไวรัสน้อยที่สุด คือ 12.24% (6/49) (ตารางที่ 3.3 และ ภาพที่ 3.2)

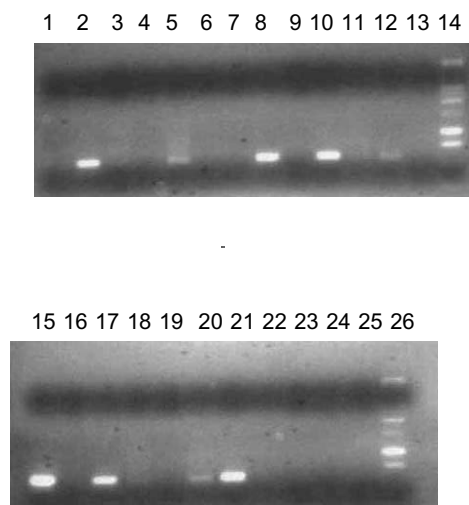
จากการตรวจสอบเพิ่มเติมในยุงจำนวนทั้งสิ้น 422 ตัว จาก 37 สปีชีส์ ที่เก็บมาจากจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทยพบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุง 16 สปีชีส์ และยุงเพียง 3 สปีชีส์ ที่พบว่ามีการติดเชื้อเดโนโซไวรัส ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.3 และภาพที่ 3.1 และ 3.2

ตารางที่ 3.3 แสดงผลการตรวจหาการติดเชื้อร่วมระหว่างเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงชนิดต่างๆ ในประเทศไทย

Species	Province	Total	PCR Positive Densovirus	%	Total	PCR Positive <i>Wolbachia</i>	%
<i>Ar. kesseli</i>	กาญจนบุรี	3	0	-	3	3	100
	เชียงราย	1	0	-	1	0	-
<i>Ar. subalbatus</i>	ระยอง	10	0	-	10	6	60
	กาญจนบุรี	4	0	-	4	4	100
	ปัตตานี	1	0	-	1	0	-
<i>Ar. annulitarsis</i>	กาญจนบุรี	3	0	-	3	0	-
<i>Ar. dolichocephalus</i>	กาญจนบุรี	2	0	-	2	0	-
<i>Ar. flavus</i>	ระยอง	2	0	-	2	0	-
	กาญจนบุรี	5	0	-	5	2	40
<i>Ar. omissus</i>	กาญจนบุรี	5	0	-	5	0	-
<i>Cq. Crassipes</i>	กาญจนบุรี	3	0	-	3	2	67
<i>Cx. fuscocephala</i>	เชียงราย	4	0	-	4	2	50
	สุรินทร์	2	0	-	2	0	-
	อุบลราชธานี	2	0	-	2	2	100
	ชัยภูมิ	2	0	-	2	1	50
	เชียงใหม่	2	0	-	2	2	100
<i>Cx. gelidus</i>	นครราชสีมา	2	0	-	2	1	50
	สุโขทัย	2	0	-	2	0	-
	ประจวบคีรีขันธ์	4	0	-	4	2	-
	กาญจนบุรี	2	0	-	2	0	-
<i>Cx. mimulus</i>	กาญจนบุรี	3	0	-	3	0	-
<i>Cx. pseudovishnui</i>	กาญจนบุรี	3	0	-	3	0	-
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	ระยอง	1	0	-	1	0	-
	สุโขทัย	5	0	-	5	2	40
	นนทบุรี	5	0	-	5	1	20
	ประจวบคีรีขันธ์	40	14	35	40	22	55
	นครสวรรค์	1	0	-	1	0	-
	กาญจนบุรี	81	8	10	81	43	53
	กาญจนบุรี	2	0	-	2	0	-
	สตูล	2	0	-	2	1	50
<i>Cx. sinensis</i>	สุราษฎร์ธานี	2	0	-	2	1	50
	สงขลา	4	0	-	4	2	50
	นครสวรรค์	5	0	-	5	0	-
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	สกลนคร	5	0	-	5	0	-

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

Species	Province	Total	PCR Positive Densovirus	%	Total	PCR Positive Wolbachia	%
<i>Cx. vishnui</i>	ระยอง	1	0	-	1	0	-
	นครสวรรค์	16	0	-	16	5	31
	เชียงราย	3	0	-	3	1	33
<i>Cx. whitmorei</i>	ปัตตานี	3	0	-	3	0	-
<i>Cx. culiciomyia</i>	กาญจนบุรี	2	0	-	2	0	-
<i>Cx. nigropunctatus</i>	กาญจนบุรี	12	0	-	12	0	-
<i>Cx. pallidothorar</i>	กาญจนบุรี	12	0	-	12	0	-
<i>Cx. brevipalpis</i>	นครราชสีมา	2	0	-	2	0	-
	ประจวบคีรีขันธ์	3	0	-	3	1	33
<i>Cx. eumelanomyia</i>	กาญจนบุรี	2	0	-	2	1	50
<i>Cx. lophoceraomyia</i>	กาญจนบุรี	5	0	-	5	2	40
<i>Cx. fuscus</i>	นครสวรรค์	3	0	-	3	0	-
	กาญจนบุรี	5	0	-	5	0	-
<i>Mn. annulifera</i>	ขอนแก่น	2	0	-	2	0	-
<i>Mn. Dives</i>	จันทบุรี	3	0	-	3	0	-
<i>Mn. indiana</i>	ปทุมธานี	2	0	-	2	1	50
	นครสวรรค์	3	0	-	3	1	33
	นครราชสีมา	3	0	-	3	1	33
<i>Mn. Uniformis</i>	ปทุมธานี	1	0	-	1	1	100
	สุรินทร์	1	0	-	1	0	-
	ประจวบคีรีขันธ์	8	0	-	8	3	38
<i>Or. andamanensis</i>	กาญจนบุรี	1	0	-	1	0	-
<i>Or. anopheloides</i>	กาญจนบุรี	2	0	-	2	0	-
<i>Tp. topomyia</i>	กาญจนบุรี	3	0	-	3	0	-
<i>Tp. powelli</i>	กาญจนบุรี	2	0	-	2	0	-
<i>Tp. aranoioides</i>	กาญจนบุรี	12	0	-	12	5	42
<i>Ur. patriciae</i>	กาญจนบุรี	2	0	-	2	2	100
<i>Ur. lateralis</i>	กาญจนบุรี	2	0	-	2	0	-
<i>Ae. aegypti</i>	ฉะเชิงเทรา	49	6	12	49	0	-
<i>An. minimus</i>	กาญจนบุรี	40	14	35	40	0	-



ภาพที่ 3.1 แสดงผลการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงชนิดต่างๆ ในประเทศไทย

lane 1 : <i>Ar. annulitarsis</i>	lane 14 : 1 kb molecular weight marker
lane 2 : <i>Ar. subalbatus</i>	lane 15 : <i>Mn. uniformis</i>
lane 3 : <i>Cx. pseudovishnui</i>	lane 16 : <i>Or. anopheloides</i>
lane 4 : <i>Cx. whitmorei</i>	lane 17 : <i>Ip. aranoi</i>
lane 5 : <i>Cx. lophoceraomyia</i>	lane 18 : <i>Ip. powelli</i>
lane 6 : <i>Cx. nigropunctatus</i>	lane 19 : <i>Mr. lateralis</i>
lane 7 : <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	lane 20 : <i>Mr. patriciae</i>
lane 8 : <i>Cq. crassipes</i>	lane 21 : positive control <i>Ae. albopictus</i>
lane 9 : <i>Cx. mimulus</i>	lane 22 : <i>Mn. annulifera</i>
lane 10 : <i>Cx. quinquefasciatus</i>	lane 23 : <i>Ip. topomyia</i>
lane 11 : <i>Cx. sinensis</i>	lane 24 : <i>Ur. lateralis</i>
lane 12 : <i>Mn. indiana</i>	lane 25 : negative control
lane 13 : <i>Mn. dives</i>	lane 26 : 1 kb molecular weight marker



ภาพที่ 3.2 แสดงผลการตรวจหาเชื้อเดงกีไวรัสในยุงชนิดต่างๆ ในประเทศไทย

lane 1 : positive control <i>Ae. aegypti</i> (ฉะเชิงเทรา)	lane 11 : <i>Or. anopheloides</i>
lane 2 : negative control	lane 12 : <i>Tp. powelli</i>
lane 3 : <i>Ae. aegypti</i> (ฉะเชิงเทรา)	lane 13 : <i>Tp. aranoioides</i>
lane 4 : <i>An. minimus</i> (กาญจนบุรี)	lane 14 : <i>Ur. patriciae</i>
lane 5 : <i>Cx. gelidus</i>	lane 15 : <i>Cx. quinquefasciatus</i> (กาญจนบุรี)
lane 6 : <i>Cx. whitmorei</i>	lane 16 : <i>Cx. quinquefasciatus</i> (ประจวบคีรีขันธ์)
lane 7 : <i>Cx. eumelanomyia</i>	lane 17 : <i>Cx. quinquefasciatus</i> (ประจวบคีรีขันธ์)
lane 8 : <i>Mn. indiana</i>	lane 18 : <i>Cx. sitiens</i>
lane 9 : <i>Mn. uniformis</i>	lane 19 : <i>Cx. lophoceraomyia</i>
lane 10 : 1 kb molecular weight marker	lane 20 : 1 kb molecular weight marker

3.4.2 การหาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเชื้อเดงกีไวรัสในยุงพาหะ

ได้ทำการเลี้ยงยุงลาย *Ae. albopictus* ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* 2 ชนิด คือ โคโลนีที่มี *Wolbachia* สองสายพันธุ์อยู่ด้วยกัน และโคโลนีที่มี *Wolbachia* เพียงสายพันธุ์เดียว นอกจากนี้ยังมีโคโลนีที่ปลอดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยทำการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ด้วยยาปฏิชีวนะชนิด tetracycline โคโลนีของยุงลาย *Ae. albopictus* ทั้งสามโคโลนีจะถูกนำมาใช้เป็น model ในการทดลองต่อไป

ได้ทำการหาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลาย *Ae. albopictus* ในระยะที่เป็นไข่ด้วยเทคนิค Real - Time PCR โดยใช้วิธีการเดียวกับ McGraw et al. (2001) ในการทดลองใช้โคโลนีของยุงลายที่มี *Wolbachia* สายพันธุ์เดียวและโคโลนีของยุงลายที่มี *Wolbachia* สองสายพันธุ์ เพื่อ

เปรียบเทียบความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในไข่ของยุงลายทั้งสองโคโลนี สรุปได้ว่ายุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์เดียว มีค่าความหนาแน่นของ *Wolbachia* เท่ากับ 5.80 ± 0.43 ในขณะที่ยุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรียสองสายพันธุ์จะมีค่าความหนาแน่นของ *Wolbachia* เท่ากับ 5.71 ± 0.38 เมื่อทำการวัดค่าความหนาแน่นในขณะที่ไข่ยุงมีอายุได้ 5 - 7 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่ยังไม่ได้เข้าระยะพักตัว (pre-diapause) ค่าความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียในไข่ของยุงลายทั้งสองโคโลนีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับค่าความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* หลังจากไข่ยุงเข้าระยะพักตัว (diapause) คือในช่วงระยะเวลา 9 - 37 วัน พบว่าความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จะลดต่ำกว่าช่วงที่ยังไม่ได้เข้าระยะพักตัว (pre-diapause) เล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ค่าความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในโคโลนีของยุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวจะเท่ากับ 5.09 ± 0.35 ในขณะที่ยุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรียสองสายพันธุ์จะมีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 5.05 ± 0.38 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างโคโลนีทั้งสอง (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 แสดงค่า Log Transformed Means ของ จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในไข่ยุงลาย *Aedes albopictus*

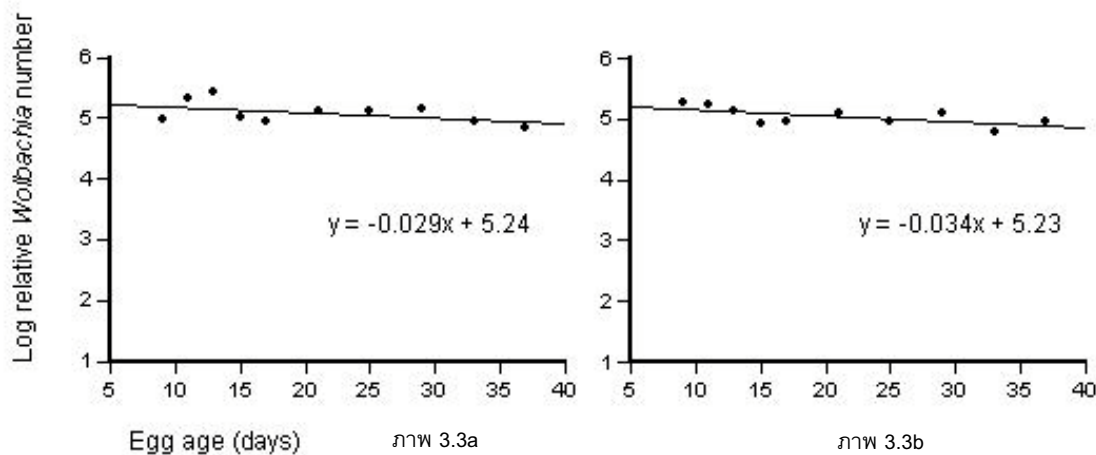
Mosquito Strain	Pre-embryonation (Prediapause) Days 5 & 7 N = 20	Post-embryonation (Diapause) Days 9 – 37 N = 100	Statistical Comparison (Pre-embryonation vs. post-embryonation)
Single-infected (AlbA)	5.80 ± 0.43	5.09 ± 0.35	$P < 0.01^*$
Double-infected (AlbA & AlbB)	5.71 ± 0.39	5.05 ± 0.38	$P < 0.01^*$

* Significant difference at $P < 0.01$

จากการหาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในไข่ยุงลาย *Ae. albopictus* โดยเทคนิค Real - Time PCR แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียและยุงลายที่เป็นโฮสต์ ซึ่งเป็นแบบพัฒนาการร่วมกัน โดยที่เชื้อแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณ เมื่อเซลล์ของยุงลายที่เป็น

โฮสต์มีการเจริญและแบ่งตัว แต่เมื่อเซลล์ของโฮสต์หยุดการเจริญในช่วงที่มีการพักตัว (diapause) เชื้อแบคทีเรียจะหยุดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเช่นเดียวกัน และมีการตายของเชื้อแบคทีเรียบางส่วน จึงทำให้จำนวนของแบคทีเรียลดลงเล็กน้อย แสดงว่าทั้งเชื้อแบคทีเรียและยุงลายที่เป็นโฮสต์มีความสัมพันธ์แบบเป็นบวกและมีการวิวัฒนาการร่วม เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ด้วยกันได้ การเจริญและแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรียในไขยุงลายได้แสดงในภาพที่ 1 โดยมีการเปรียบเทียบระหว่างไขยุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์เดียว (ภาพที่ 3.3 a) และไขยุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรียสองสายพันธุ์ (ภาพที่ 3.3 b) จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเจริญและแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีความสัมพันธ์และขึ้นอยู่กับยุงลายที่เป็นโฮสต์โดยตรง ซึ่งเป็นลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบเกื้อกูล (symbiosis)

จากการพัฒนาวิธีการตรวจหาความหนาแน่นของเชื้อเดนโซไวรัสในยุงพาหะ ได้วิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาโดยพัฒนาได้ Probe และ Primer สำหรับปฏิกิริยา Real-Time PCR ดังตารางที่ 3.2 และ 3.3 ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 3.3 แสดงค่าความหนาแน่นของไขยุงลาย *Aedes albopictus* ที่อยู่ระหว่างระยะพักตัว โดยมีอายุ 9-37 วัน จากโคโลนียุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์เดียว (ภาพ 3.3a) และไขยุงลายที่มีเชื้อแบคทีเรียสองสายพันธุ์ (ภาพ 3.3b) แต่ละจุดในรูปแสดงค่าของตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างประกอบด้วยไขยุงลาย 10 ใบ

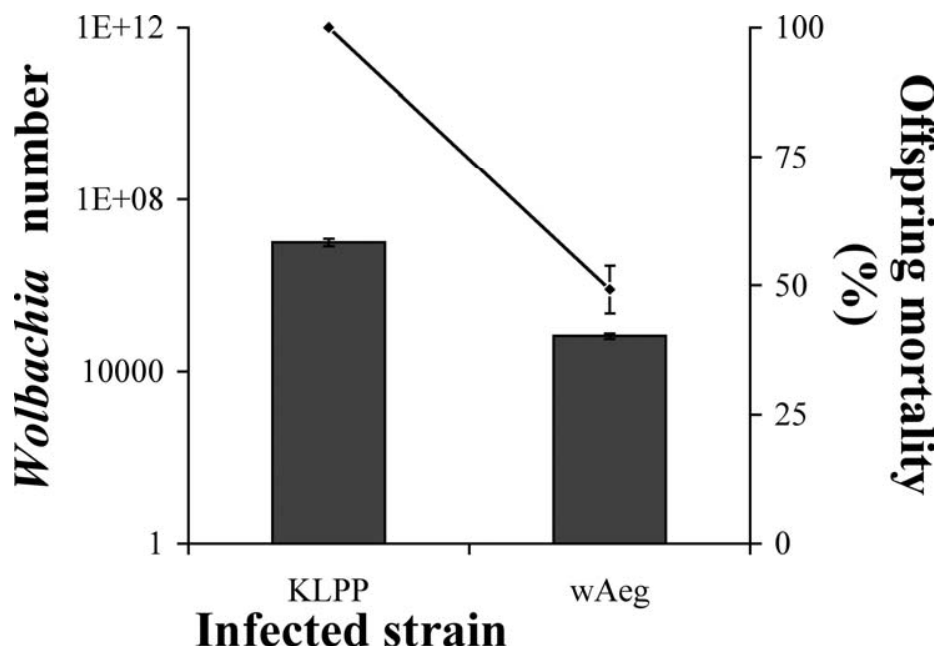
3.4.3 ศึกษาหาวิธีการถ่ายโอนแบคทีเรีย *Wolbachia* และ เดนโซไวรัสในยุงพาหะ

3.4.3.1 การชักนำแบคทีเรีย *Wolbachia* เข้าสู่ยุงเจ้าบ้าน

ได้ทดลองใช้วิธี microinjection ในการชักนำแบคทีเรีย *Wolbachia* กลุ่ม A และกลุ่ม B จากยุง superinfected *Aedes albopictus* (wAlbA + wAlbB) (Kittayapong et al., 2002) เข้าสู่ยุง *Culex quinquefasciatus* ซึ่งถูกใช้เป็น Host พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดของยุงหลังจากทำ microinjection

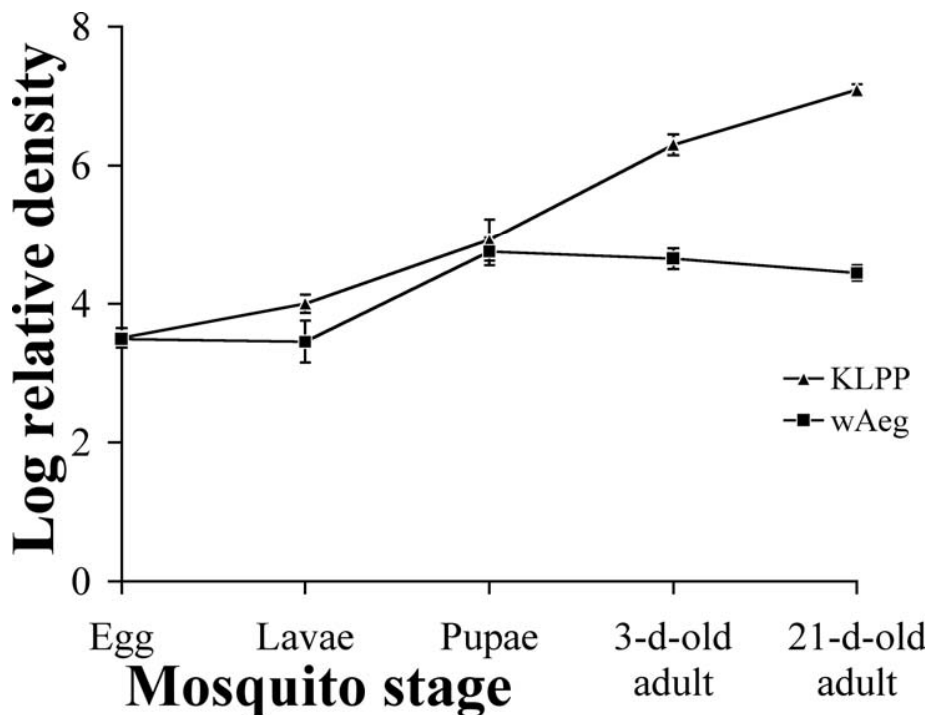
ประมาณ 60-70% ซึ่งเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตยังถือว่าต่ำอยู่ และผลทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยวิธี PCR นั้นยังคงเป็น negative ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุต่างๆ เช่น ปริมาณแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ใส่เข้าไปอาจไม่เพียงพอ หรือ อาจมีกลไกการต่อต้านแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่แปลกปลอมจากตัวยุง *Culex quinquefasciatus* ซึ่งตามธรรมชาติพบว่ามี *Wolbachia* กลุ่ม B อยู่แล้ว

ได้ทำการหาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลาย *Aedes albopictus* (KLPP; ยุงผู้ให้) ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ wAlbA และ wAlbB เปรียบเทียบกับ ยุงลาย *Aedes aegypti* (wAeg; ยุงผู้รับ) ที่มีการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์เดียวกันกับยุงผู้ให้เข้าไป โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการวัดหาความหนาแน่นของปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความหนาแน่นของ *Wolbachia* ในยุงตัวเต็มวัยกับระดับการเข้ากันไม่ได้ของไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic Incompatibility หรือ CI) ระหว่างยุงผู้ให้และ ยุงผู้รับดังกราฟภาพที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่ายุงผู้รับมีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* น้อยกว่ายุงผู้ให้ อย่างมีนัยสำคัญที่ 153 เท่า ($U, P < 0.001$) และปริมาณดังกล่าวก็สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของ CI นั่นคือ ยุงผู้รับมีระดับ CI เท่ากับ 49.16 ± 4.61 ($n = 59$) ในขณะที่ยุงผู้ให้มีระดับของ CI อยู่ที่ 100 ± 0.0 ($n = 58$) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($U, P < 0.001$) ปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ต่ำกว่าน่าจะมีผลทำให้มีการสร้าง cytotblast ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เกิดขึ้น เป็นผลให้ spermatid มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ไม่เพียงพอในการก่อให้เกิด CI



ภาพที่ 3.4 ระดับปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ระหว่างยุงผู้รับ (wAeg) กับยุงผู้ให้ (KLPP) ซึ่งแสดง ในกราฟแท่ง และระดับการแสดงออกของ CI โดยดูอัตราการตายของลูก ซึ่งแสดงในกราฟเส้น

ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในระยะต่าง ๆ ของยุงผู้รับ และยุงผู้ให้ ระดับปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงทั้งสองชนิดมีการเพิ่มขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไป สอดคล้องกับระยะการเจริญของยุงที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3.5) และพบว่าปริมาณของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงทั้งสองนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในระยะไข่ ($t = 0.095$, $df = 6$, $P = 0.927$) ระยะลูกน้ำ ($t = 0.692$, $df = 15.151$, $P = 0.111$) และระยะตัวไม่ ($t = 0.426$, $df = 6$, $P = 0.685$) แต่กลับพบว่าปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงผู้ให้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วถึง 47 เท่าของยุงผู้รับอย่างมีนัยสำคัญ ($t = 7.757$, $df = 19$, $P < 0.001$) เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยอายุ 3 วัน และเพิ่มขึ้นมากกว่ายุงผู้รับอย่างมีนัยสำคัญถึง 420 เท่า เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยอายุ 21 วัน ($t = 19.637$, $df = 22$, $P < 0.001$) จากการที่ปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในระยะไข่ ลูกน้ำ และตัวไม่ในยุงทั้งสองชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า ปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่แตกต่างกันในระยะตัวเต็มวัย ไม่ได้มีผลมาจากการที่ยุงผู้รับมี ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่น้อยกว่า แต่น่าจะเป็นผลมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียเองไม่สามารถเพิ่มจำนวน ตัวเองได้เต็มที่ เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย หรืออาจเกิดจากการที่ยุงผู้รับเองมีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย ไม่เพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย



ภาพที่ 3.5 กราฟแสดงระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในระยะการเจริญต่างๆ ของยุงผู้รับ (wAeg) และยุงผู้ให้ (KLPP)

3.4.3.2 การชักนำเชื้อเดนโซไวรัสเข้าสู่ยุง

ในการชักนำเชื้อเดนโซไวรัสเข้าสู่ยุง ใช้ลูกน้ำยุง *Aedes aegypti* อายุ 1 วันในการทดลอง พบว่า ลูกน้ำมีอัตราการตายสูงสุดที่ 14-15 วันหลังถูกเชื้อเดนโซไวรัส และพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของลูกน้ำที่ถูกเชื้อเดนโซไวรัสที่ระดับความเข้มข้น 50 ml คือ 38% ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับที่ระดับความเข้มข้น 500, 400, 300, 200, 100ml (ตารางที่ 3.5) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในระดับต่ำมาก และเมื่อนำมาตรวจหาการติดเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิคทาง PCR หลังจากลูกน้ำเป็นยุงแล้วพบว่าการติดเชื้อไวรัสที่ระดับต่างๆ กัน (ตารางที่ 3.6)

ตารางที่ 3.5 แสดงผลการชักนำเชื้อเดนโซไวรัสโดยใช้เชื้อปริมาณต่างๆ ในยุง *Ae. aegypti*

ปริมาณของเชื้อเดนโซไวรัส	อัตราการรอด (%)
500 ml	26 (เพศเมีย 57.7 ,เพศผู้ 42.3)
400 ml	12 (เพศเมีย 50.0 ,เพศผู้ 50.0)
300 ml	17 (เพศเมีย 41.2 ,เพศผู้ 58.8)
200 ml	18 (เพศเมีย 44.4 ,เพศผู้ 55.6)
100 ml	27 (เพศเมีย 63.0 ,เพศผู้ 37.0)
50 ml	38 (เพศเมีย 68.4 ,เพศผู้ 31.6)
ไม่มีเชื้อเดนโซไวรัส (ควบคุม)	97 (เพศเมีย 54.6 ,เพศผู้ 45.4)

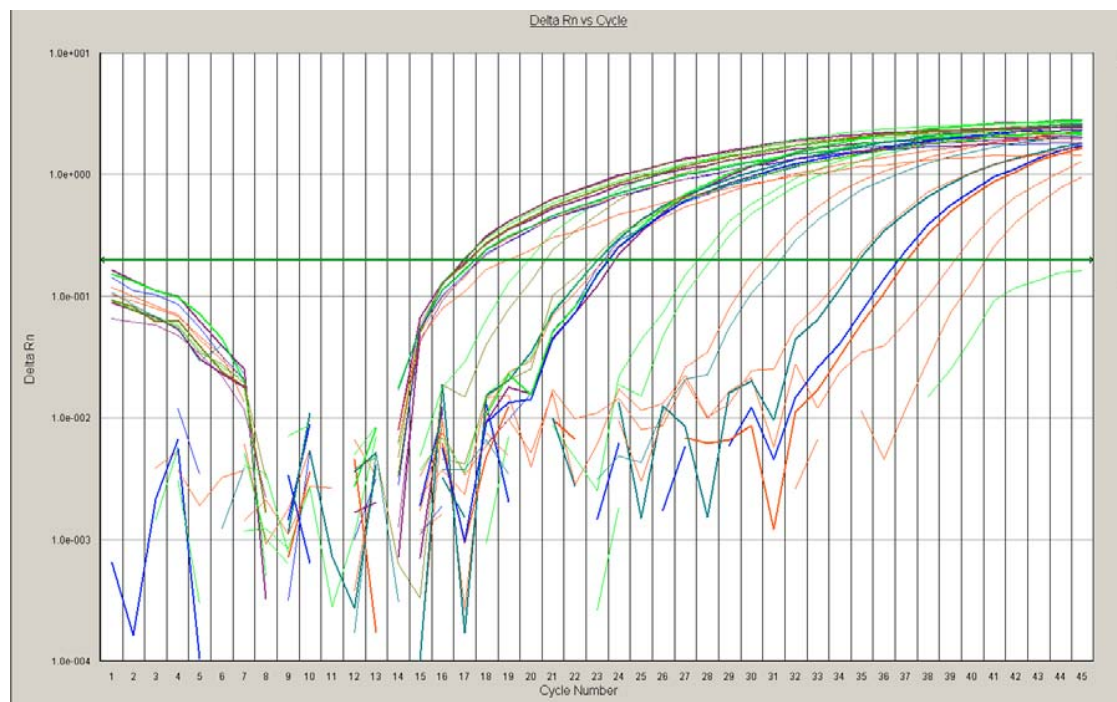
ตารางที่ 3.6 แสดงผลการตรวจหาการติดเชื้อเดนโซไวรัสหลังถูกชักนำในยุง *Ae. aegypti* โดยใช้เทคนิค PCR

ปริมาณของเชื้อเดนโซไวรัส	เปอร์เซ็นต์ positive ของเพศผู้ (%)	เปอร์เซ็นต์ positive ของเพศเมีย (%)
500 ml	18 (2/11)	33 (5/15)
400 ml	16 (1/6)	33 (2/6)
300 ml	10 (1/10)	28.6 (2/7)
200 ml	10 (1/10)	12.5 (1/8)
100 ml	10 (1/10)	11.8 (2/17)
50 ml	0 (0/12)	11.5 (3/26)
ไม่มีเชื้อเดนโซไวรัส (ควบคุม)	0 (0/10)	0 (0/10)

สามารถตรวจหาความหนาแน่นของเชื้อเดนโซไวรัสได้โดยวิธี Real-time PCR ซึ่งได้พัฒนาไพรเมอร์และโพรบที่สามารถตรวจหาความหนาแน่นของไวรัสที่ผลิตจากการนำไวรัสเข้าสู่เซลล์ C6/36 ได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ AThDNV, AeDNV, APeDNV และ AaPV (ตารางที่ 3.7 และภาพที่ 3.6)

ตารางที่ 3.7 Genome Equivalent ของเดนโซไวรัสต่อไมโครลิตร ที่หาได้จากวิธี Real-time PCR

Mosquito Densovirus Strains	Genome Equivalents/ml
1. AeDNV	1.4×10^9
2. AThDNV	5.2×10^7
3. APeDNV	2.9×10^9
4. AaPV	3.8×10^9



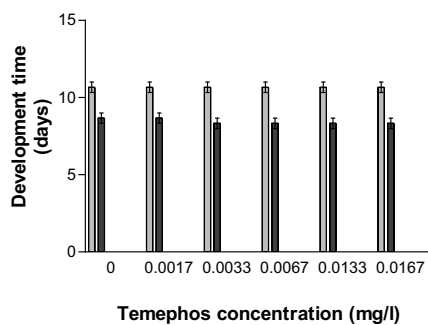
ภาพที่ 3.6 Real-time PCR Amplification Plot ของเดนโซไวรัสทั้ง 4 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ standard

3.4.4 ปริมาณความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายสวน *Ae. albopictus* ที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากได้รับสารฆ่าแมลงในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

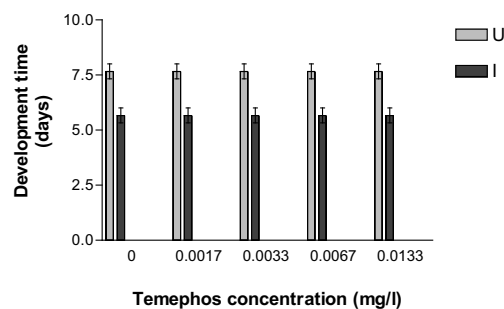
ได้ทำการเลี้ยงยุงลาย *Ae. albopictus* และโคฟีพอด ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ A และ B (Double infection) โดยควบคุมปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิของแหล่งที่อยู่ให้แตกต่างกัน ในสัตว์ให้อาตัยทั้งสองชนิด โคโลนีของยุงลายและโคฟีพอด ที่ได้รับจะถูกนำมาใช้เป็น model ในการทดลองต่อไป

ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากตัวอย่างสัตว์ที่เก็บ และทำการตรวจหาและยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR และใช้ยีน *wsp* เป็น marker ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ให้ผลบวก จะถูกเก็บและเตรียมไว้สำหรับใช้ในปฏิกิริยา Real-Time PCR เพื่อตรวจหาปริมาณความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่อไป

ไม่มีผลกระทบใดๆ ของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของโคฟิพอด ซึ่งเป็นผู้ล่าของลูกน้ำยุงระยะเวลาการเจริญเติบโตในสัตว์ให้อาศัยทั้งสองชนิด วัดจากค่าเฉลี่ยของวันที่เริ่มฟักจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัย *Temephos* ไม่มีผลกระทบใดๆต่อระยะเวลาการเจริญเติบโตของทั้งยุงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ โดยที่ยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรีย จะมีระยะการเจริญช้ำกว่ายุงที่ไม่ติดเชื้อเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีสารฆ่าแมลง และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสและ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3.7 และ 3.8) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่ายุงทั้งสองชนิด เติบโตได้เร็วกว่ายุงเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง นั่นคือระยะการเจริญจะลดลงเมื่ออุณหภูมิที่เลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยทั้งอุณหภูมิและปริมาณความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงต่างก็มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของยุง โดยเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องจะอยู่รอดได้สูงสุดแต่จะอยู่รอดได้น้อยคือส่วนใหญ่จะตายเมื่อเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส การอยู่รอดจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงเพิ่มขึ้นและเมื่อเพิ่มขึ้นจนถึง 0.0133 mg/l ปรากฏว่ายุงตัวผู้ตายหมดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิทั้งสองแบบ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการอยู่รอดของยุงที่ติดเชื้อสูงกว่ายุงที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อเลี้ยงยุงด้วยสารฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้น 0.0167 mg/l ที่ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่ายุงตายหมดทั้งยุงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ

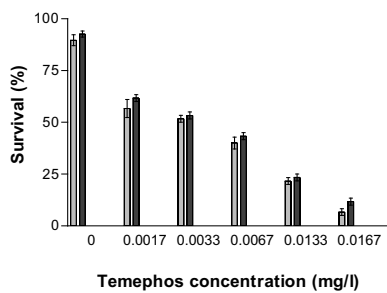


ภาพ 3.7a

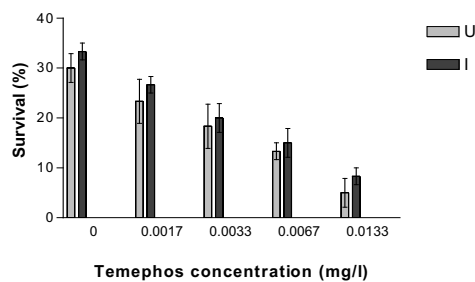


ภาพ 3.7b

ภาพที่ 3.7 กราฟแสดงผลของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อระยะการเจริญของยุงลาย *Ae. albopictus* ของยุงลายพาหะที่ติดเชื้อ (I) และไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* (U) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (3.7a) และ 37 องศาเซลเซียส (3.7b)



ภาพ 3.8a



ภาพ 3.8b

ภาพที่ 3.8 กราฟแสดงผลของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อการรอดชีวิตของยุงลาย *Ae. albopictus* ของยุงลายพาหะที่ติดเชื้อ(I) และไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* (U) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (3.8a) และ 37 องศาเซลเซียส (3.8b)

ขนาดของปีกยุงตัวเต็มวัยของทั้ง 2 เพศทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย ถูกวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 3.8 และ 3.9) พบว่ายุงที่ไม่ติดเชื้อ ขนาดของปีกยุงตัวเมียจากการทดลองในทุกกรณีมีความยาวกว่าตัวผู้อย่างมีนัยสำคัญ ในกรณีส่วนใหญ่ความยาวของปีกยุงจากทั้งสองเพศจะเล็กลงเมื่อความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าสารฆ่าแมลงมีผลต่อการเจริญเติบโตของยุง ขนาดของปีกยุงทั้งสองเพศของยุงที่ไม่ติดเชื้อเมื่อเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสและให้สารฆ่าแมลงที่ 0.0033 mg/l (ตารางที่ 3.8) พบว่ายาวกว่าขนาดของปีกยุงเมื่อให้สารฆ่าแมลงที่ความเข้มข้นอื่นๆ

ตารางที่ 3.8 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดปีก (mm $\pm$ SE) ของยุงลายตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมีย ที่ตัวอ่อนเจริญขึ้นมาจากการเลี้ยงในสภาวะและ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

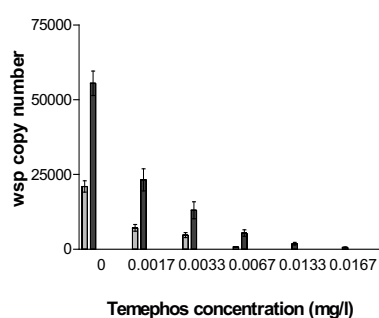
Temephos concentration (mg/l)	Male (U)	Female (U)	Male (I)	Female (I)
0	2.467 $\pm$ 0.07	3.164 $\pm$ 0.05	2.526 $\pm$ 0.02	3.168 $\pm$ 0.03
0.0017	2.454 $\pm$ 0.09	3.146 $\pm$ 0.05	2.488 $\pm$ 0.09	3.146 $\pm$ 0.02
0.0033	2.442 $\pm$ 0.06	3.132 $\pm$ 0.04	2.460 $\pm$ 0.09	3.127 $\pm$ 0.07
0.0067	2.415 $\pm$ 0.02	3.115 $\pm$ 0.04	2.442 $\pm$ 0.05	3.106 $\pm$ 0.04
0.0133	-	3.096 $\pm$ 0.06	-	3.087 $\pm$ 0.05
0.0167	-	3.086 $\pm$ 0.00	-	3.072 $\pm$ 0.05

ตารางที่ 3.9 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดปีก (mm $\pm$ SE) ของยุงลายตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมีย ที่ตัวอ่อนเจริญขึ้นมาจากการเลี้ยงในสภาวะและ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

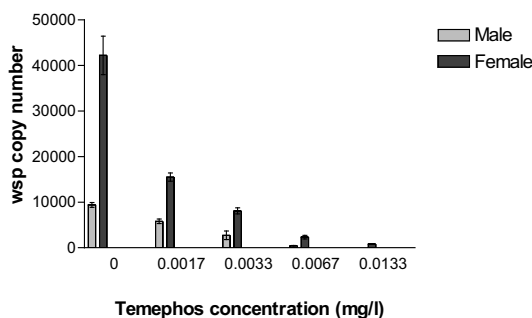
Temephos concentration (mg/l)	Male (U)	Female (U)	Male (I)	Female (I)
0	2.264 $\pm$ 0.01	3.102 $\pm$ 0.06	2.285 $\pm$ 0.01	3.134 $\pm$ 0.08
0.0017	2.244 $\pm$ 0.01	3.085 $\pm$ 0.06	2.262 $\pm$ 0.05	3.114 $\pm$ 0.09
0.0033	2.227 $\pm$ 0.01	3.072 $\pm$ 0.01	2.247 $\pm$ 0.01	3.096 $\pm$ 0.01
0.0067	2.205 $\pm$ 0.00	3.052 $\pm$ 0.01	2.238 $\pm$ 0.06	3.081 $\pm$ 0.02
0.0133	-	3.025 $\pm$ 0.06	-	3.066 $\pm$ 0.01
0.0167	-	-	-	-

ยีน *wsp* ของ *Wolbachia* ถูกใช้ในการตรวจหาความหนาแน่นของแบคทีเรียที่มีในยุง ผลปรากฏว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียสายพันธุ์ B จากทั้งยุงตัวผู้และตัวเมียของทั้งยุงไม่ติดเชื้อและยุงที่ติดเชื้อ จากการทดลองในทุกๆกรณีมีปริมาณที่สูงกว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ A อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้น ปริมาณความหนาแน่นของแบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ A และ B ในตัวยุงตัวผู้มีย่อยกว่ายุงตัวเมียอย่างมีนัยสำคัญในทุกๆ กรณี (ภาพที่ 3.3 และ 3.4) จากการตรวจสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อความหนาแน่นของแบคทีเรียในยุงทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อซึ่งเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่ามีความหนาแน่นที่ต่ำกว่ายุงที่เลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ โดยสรุปคือความหนาแน่นของแบคทีเรียจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงต่อจำนวนของยุงมีผลต่อขนาดตัวและขนาดปีกของยุงพาหะ โดยยุงพาหะที่ทำการเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิที่ 27 องศาเซลเซียสที่จะมีขนาดปีกเล็กกว่ายุงที่ทำการเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทั้งในตัวผู้และตัวเมีย นั่นคือยุงที่เลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส จะมีขนาดตัวใหญ่กว่า ยุงที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 3.8 และ 3.9

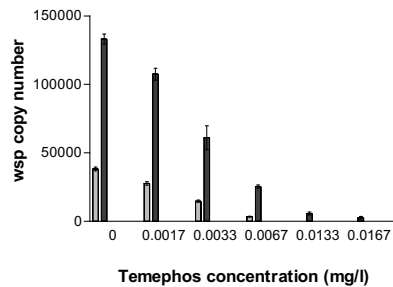


ภาพ 3.9a

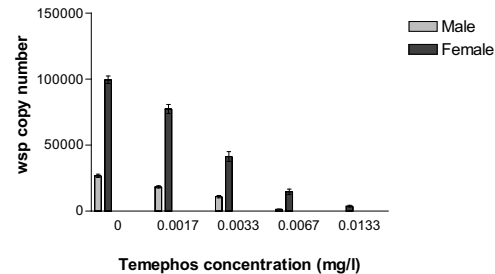


ภาพ 3.9b

ภาพที่ 3.9 กราฟแสดงผลของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อปริมาณแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ A ของยุงลาย *Ae. albopictus* ของยุงลายพาหะที่ติดเชื้อ *Wolbachia* เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (3.9a) และ 37 องศาเซลเซียส (3.9b)



ภาพ 3.10a



ภาพ 3.10b

ภาพที่ 3.10 กราฟแสดงผลของสารฆ่าแมลงและอุณหภูมิต่อปริมาณแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ B ของยุงลาย *Ae. albopictus* ของยุงลายพาหะที่ติดเชื้อ *Wolbachia* เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (3.10a) และ 37 องศาเซลเซียส (3.10b)

ได้ทำการหาความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายโดยเทคนิค Real-Time PCR ความหนาแน่นของ *Wolbachia* สายพันธุ์ wAlbB ของยุงพาหะ ระยะตัวเต็มวัย (ทั้งตัวผู้และตัวเมีย) ในทุกสภาวะการเลี้ยง จะมีค่ามากกว่า *Wolbachia* สายพันธุ์ wAlbA ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนของ *Wolbachia* สายพันธุ์ wAlbA มีอัตราต่ำกว่าการเพิ่มจำนวนของ *Wolbachia* สายพันธุ์ wAlbB และการเพิ่มจำนวนของทั้งสองสายพันธุ์ อาจจะเป็นอิสระต่อกัน นอกจากนี้ค่าความหนาแน่นของ *Wolbachia* ทั้งสองสายพันธุ์ ในตัวเต็มวัยตัวผู้ในทุกสภาวะการเลี้ยงจะมีค่าต่ำกว่าตัวเต็มวัยตัวเมีย ดังกราฟภาพที่ 3.3 และ 3.4 ในระหว่างการเจริญเติบโตของ *Ae. albopictus* ค่าความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 25°C มีค่าสูงกว่ายุงพาหะที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงยุงมีผลต่อความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia*

3.4.5 การศึกษาเปรียบเทียบพฤติกรรมการผสมพันธุ์ การวางไข่ และการหาโฮสต์ของยุงลายสวน *Ae. albopictus* ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

ได้ทำการเลี้ยงยุงลาย *Ae. albopictus* ที่ติดและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ HOU, GNV และ HT1 โดยควบคุมอุณหภูมิของแหล่งที่อยู่ให้เหมือนกัน โคลนของยุงลายที่ได้รับจะถูกนำมาใช้เป็น model ในการทดลองต่อไป

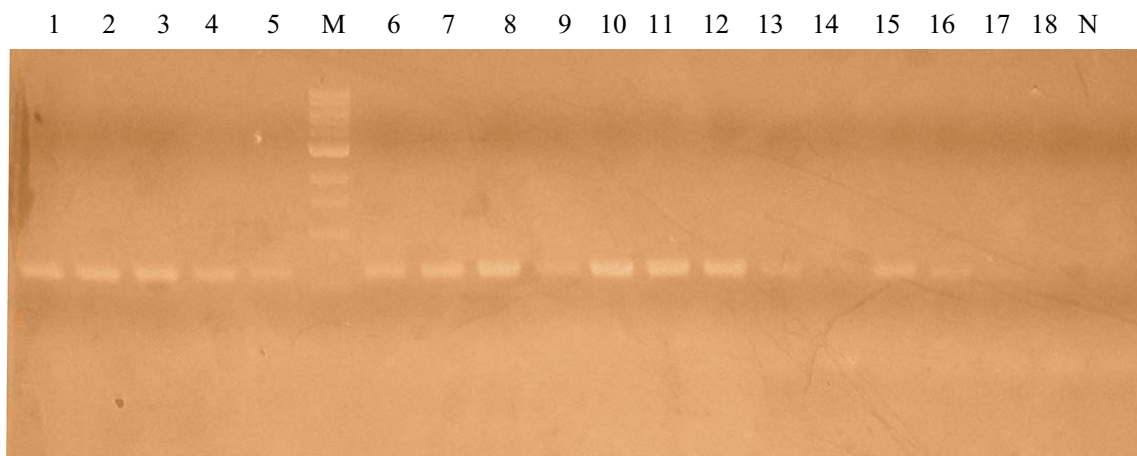
ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากยุงที่เก็บ และทำการตรวจหาและยืนยันการติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR และใช้ยีน *wsp* เป็น marker

ผลการทดลองเพื่อพิสูจน์การปรากฏและไม่ปรากฏของ *Wolbachia* พบว่าในแต่ละสายพันธุ์ HOU และ GNV ซึ่งติดเชื้อแบคทีเรียให้ผลบวกที่เด่นชัดเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 3.11 และ 3.12) จะมีบางกรณีที่แถบ DNA จางมากแต่ก็ถือว่ายังปรากฏผลบวกมาให้เห็น ส่วนสายพันธุ์ HT1 ที่ไม่ติดเชื้อ *Wolbachia*

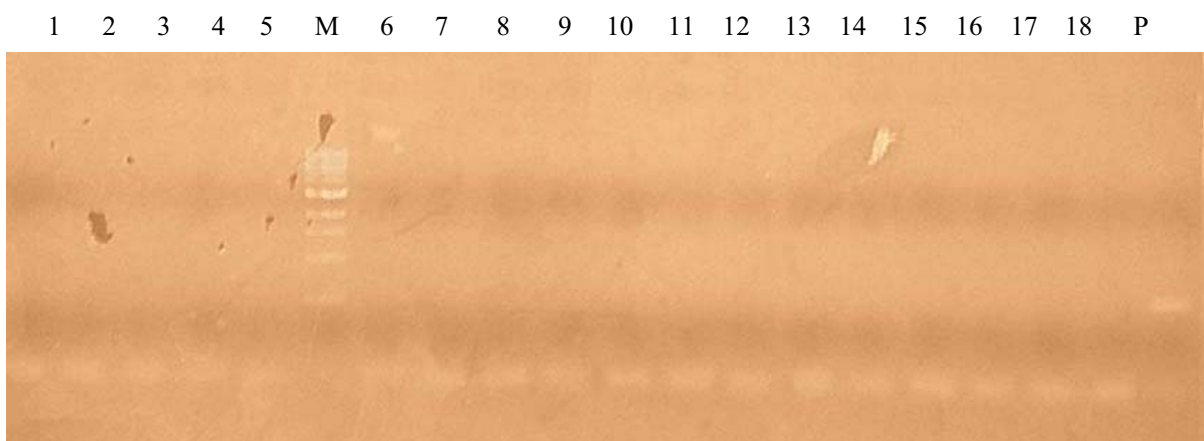
ผลปรากฏว่าเป็นลบ (คือไม่มี *Wolbachia*) ทั้งหมด (ภาพที่ 3.13) ซึ่งผลทั้งหมดนี้เป็นการยืนยันได้ว่าการติดเชื้อ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ HOU และ GNV และไม่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ HT1 จริง



ภาพที่ 3.11 การตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ HOU ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน *wsp* เป็น marker



ภาพที่ 3.12 การตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ GNV ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน *wsp* เป็น marker



ภาพที่ 3.13 การตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ HT1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน *wsp* เป็น marker

ตารางที่ 3.10 แสดงการเปรียบเทียบในหลายตัวแปรของพฤติกรรมผสมพันธุ์ของตัวผู้และตัวเมียของยุงลายสวนบริสุทธิ เวลาที่ใช้ในการสัมผัสกันในแต่ละคู่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เวลาที่ตัวเมียสัมผัสยุงตัวผู้เป็นครั้งแรกมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 4 คู่ผสมระหว่างยุงตัวผู้ติดเชื้อ 3 ตัว กับยุงตัวเมียไม่ติดเชื้อ 1 ตัว โดยยุงตัวผู้สายพันธุ์ HOU ใช้เวลาในการผสมพันธุ์กับยุงตัวเมียสายพันธุ์ HT1 น้อยกว่ายุงตัวผู้สายพันธุ์ HT1 กับยุงตัวเมีย HOU ช่วงเวลาของการสัมผัสจึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันในแต่ละการทดลอง ซึ่งในการทดลองที่ 1 เป็นการผสมกันระหว่างยุงตัวผู้ HOU กับยุงตัวเมีย HOU ในบางครั้ง ยุงตัวผู้ 2-3 ตัวจะมาเกาะเกี่ยวกับยุงตัวเมีย ยุงตัวเมียส่วนใหญ่จะมี sperm อยู่ใน spermathecae (95%) ในการทดลองคู่ผสมที่ 2 นี้ ตัวผู้ใช้เวลาน้อยที่สุดในการหาตัวเมีย แต่มีระยะเวลาที่สัมผัสกันนานที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ถึงแม้ว่าจะสัมผัสกันน้อยครั้งในเวลา 5 นาที ยุงตัวเมียทุกตัวมี sperm อยู่ใน spermathecae นั้นแสดงให้เห็นว่าประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์ ในการผสมแบบที่ 3 เป็นการผสมระหว่าง ตัวผู้ไม่ติดเชื้อ HT1 กับตัวเมียติดเชื้อ HOU ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการทดลองที่ผ่านมาอย่างเห็นได้ชัด บ่อยครั้งที่ตัวผู้สัมผัสกับตัวเมียแต่จากนั้นก็ผลออกจากกันภายในไม่กี่วินาที และพบว่าภายใน 5 นาทีตัวผู้ส่วนใหญ่ไม่ผสมกับตัวเมีย จึงมีการเพิ่มจำนวนยุงตัวผู้มากถึง 10 ตัว และเพิ่มเวลาจนถึง 15-20 นาที แต่ก็ยังไม่ผสมพันธุ์กัน จึงถือว่าไม่ประสบผลสำเร็จในการสืบพันธุ์ ในการทดลองแบบที่ 4 ผลลัพธ์ที่ได้คล้ายกับในการผสมแบบที่ 3 (ตารางที่ 3.10)

ยุงลายทั้ง 3 สายพันธุ์ ตอบสนองต่อ hay infusion น้ำเลี้ยงลูกน้ำยุง และ 4-methylphenol โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างแต่ละการทดลองและตัวควบคุม (ตารางที่ 3.11) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสายพันธุ์ในการตอบสนองต่อ 10% น้ำเลี้ยงลูกน้ำยุง 10% และ 20% hay infusion แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตอบสนองต่อ 20% น้ำเลี้ยงลูกน้ำยุงและ 4-methylphenol มีการตอบสนองและวางไข่มากที่สุดต่อ 20% hay infusion และ น้อยที่สุดต่อ 4-methylphenol ยุงลายผสมสายพันธุ์ GNV ตอบสนอง 10% hay infusion น้อยกว่า 20 % hay infusion แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสายพันธุ์ HOU และ HT1 การตอบสนองของยุงสายพันธุ์ GNV และ HT1 ต่อ 10% และ 20% น้ำเลี้ยงลูกน้ำยุง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3.11)

สำหรับพฤติกรรมการหาโฮสต์ พบว่ายุงน้อยกว่า 5.3% เท่านั้น ที่พบใน port ควบคุม การตอบสนองต่อมือมนุษย์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในยุงแต่ละสายพันธุ์โดยเฉพาะ มีการตอบสนองสูงที่สุดในยุงที่ไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* (HT1) (ตารางที่ 3.12) ซึ่งสายพันธุ์ HT1 นี้ตอบสนอง Acetone มากที่สุดเช่นกัน อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างยุงแต่ละสายพันธุ์ ในการตอบสนองต่อ dimethyl disulfide แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในแต่ละสายพันธุ์ในการตอบสนองต่อ dichloromethane โดยเฉพาะสายพันธุ์ HOU สามารถตอบสนองได้มากกว่าสายพันธุ์ GNV ในแต่ละสายพันธุ์ มีการตอบสนองต่อ CO₂ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสรุปยุงลายสายพันธุ์ HT1 ที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรียสามารถตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่างๆ ได้รวดเร็วและสูงที่สุด และ ยุงลายสายพันธุ์ GNV ตอบสนอง ต่อสิ่งเร้าได้ช้าที่สุด (ตารางที่ 3.12)

ตารางที่ 3.10 พฤติกรรมผสมพันธุ์ของตัวผู้และตัวเมียของยุงลายสวนบริสุทธิ เวลาที่ใช้ในการสัมผัสกันในแต่ละคู่

	HOU male		HT1 male		<i>P</i>
	HOU female	HT1 female	HOU female	HT1 female	
Time to first contact (sec)	65.0 ± 8.6a,b	43.4 ± 6.9a	105.2 ± 11.5b,c	83.1 ± 12.5b	0.00
Duration of contact (sec)	72.4 ± 7.8a	73.9 ± 7.7a	25.0 ± 5.5b	20.6 ± 4.7b	< 0.01
No. contact/5 min	2.5 ± 0.3a	2.4 ± 0.4a	1.7 ± 0.2b	2.8 ± 0.3c	0.08
N	20	20	20	20	
% mated	95	100	20	25	
Female wing length (mm)	3.08±0.05	3.06±0.04	3.10±0.03	3.06±0.04	
Male wing length (mm)	2.51±0.05	2.73±0.04	2.67±0.04	2.62±0.03	

Means in a row followed by the same letter are not significantly different (Student-Neuman Keul's test)

ตารางที่ 3.11 การตอบสนองต่อ hay infusion น้ำเลี้ยงลูกน้ำยุง และ 4-methylphenol

Treatment	GNV	HOU	HT1	<i>P</i>
Larval water - 10%	69.5 ± 3.0a	67.4 ± 4.0a	67.1 ± 3.6a	0.86
- 20%	64.8 ± 1.4a	72.4 ± 4.7b	63.0 ± 3.7a	0.01
Hay infusion - 10%	70.3 ± 3.1a	69.7 ± 3.5a	76.6 ± 3.5a	0.22
- 20%	79.2 ± 1.5a	74.4 ± 3.9a	77.9 ± 3.4a	0.89
4-Methylphenol	40.3 ± 2.4a	39.2 ± 3.4a	57.0 ± 3.1b	0.0007

Means in a row followed by the same letter are not significantly different (Student-Neuman Keul's test)

ตารางที่ 3.12 พฤติกรรมการหาโฮสต์

Treatments	N	GNV	HOU	HT1	<i>P</i>
Arm	20	33.3 ± 4.1a	22.3 ± 1.2b	48.3 ± 6.8b	0.01
Acetone	20	8.0 ± 0.9a	12.1 ± 2.0b	15.1 ± 1.7c	0.00
Dimethyl disulfide	20	8.0 ± 1.1a	9.5 ± 0.5a	11.2 ± 1.6a	0.19
Dichloromethane	20	9.6 ± 1.2a	24.1 ± 2.7b	29.4 ± 4.5c	< 0.01
CO ₂	20	7.2 ± 1.7a	14.2 ± 1.4b	34.0 ± 2.9c	< 0.01

Means in a row followed by the same letter are not significantly different (Student-Neuman Keul's test)

3.5 บทสรุป

การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเดโนโซไวรัสในยุงจากจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR พบการติดเชื้อในยุงหลายสปีชีส์ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแต่ละระยะของการเจริญของยุงยืนยันถึงการอยู่ร่วมกันแบบ symbiosis ของแบคทีเรียและยุงเจ้าบ้าน นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นถึงความต้านทานของยุงลาย *Aedes aegypti* ที่ได้รับการถ่ายฝากเชื้อแบคทีเรียต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยความหนาแน่นของแบคทีเรียนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงยุงพาหะ

3.6 ข้อเสนอแนะ

แบคทีเรียกลุ่ม *Wolbachia* ที่พบในยุงพาหะและสัตว์ขาปล้องอื่นๆ ในป่าเขตร้อนและเดโนโซไวรัสเป็นเอนโดซิมไบออนต์ (endosymbiont) มีความสำคัญในการผลักดันให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของโฮสต์พวกสัตว์ขาปล้องที่มันอาศัยอยู่จนเกิดความหลากหลายของชนิด (species diversity) ของสัตว์ขาปล้องรวมทั้งยุงในพื้นที่เขตร้อน การศึกษาวิจัยชีววิทยาพื้นฐานด้านวิวัฒนาการร่วม (coevolution) นิเวศวิทยา พันธุศาสตร์ และการแพร่กระจายของโฮสต์และผู้อาศัยในกลุ่มดังกล่าวในเชิงลึกต่อไปจะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในเชิงวิชาการด้านวิวัฒนาการและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรครวมทั้งแบคทีเรียและไวรัสชนิดที่เป็นมิตรที่คอยปกป้องโฮสต์ไม่ให้ติดเชื้อมีโรคหรือลดความหนาแน่นของเชื้อก่อโรคในโฮสต์

3.7 เอกสารอ้างอิง

- Afanasiev, B.N., Galyov, E.E., Buchatsky, L. P. and Kozlov, Y.V. 1991. Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes densovirus*. Virology. 185(1):323-336.
- Barreau, C., Jousset, F.X. and Cornet, M. 1994. An efficient and easy method of infection of mosquito larvae from virus-contaminated cell cultures. J. Virol. Method. 94: 153-156.
- Barreau, C., Jousset, F.X. and Bergoin, M. 1996. Pathogenicity of the *Aedes albopictus* parvovirus (AaPV), a denso-like virus, for *Aedes aegypti* mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 68: 299-309.
- Bergoin, M. and Tijssen, P. 2000. Molecular Biology of Densovirinae: in Faisst S, Rommelaere J (eds): Parvoviruses. From Molecular Biology to Pathology and Therapeutic Uses. Contrib Microbiol. Basel. Karger vol 4 pp.12-32.
- Berns K.I., Bergoin, M., Bloom, M., Lederman, M., Muzyczka, N., Siegl, G., Tal, J. and Tattersall, P. 1995. Parvoviridae. VIth report of International Committee on Taxonomy of viruses. Arch. Virol. Suppl. 10:169-178.

- Boublik, Y., Jousset, F.X. and Bergoin, M. 1994. Complete nucleotide sequence and genomic organization of the *Aedes albopictus* parvovirus (AaPV) pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. *Virology* 200:752-763.
- Bouchon, D., Rigaud, T. and Juchault, P. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustacean: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. Lond Ser. B.* 265:1081-1090.
- Boyle, L., O'Neill, S. L., Robertson, H. M. and Karr, T. L. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-9.
- Braig, H. R., Guzman, H., Tesh, R. B. and O'Neill, S. L. 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature* 367: 453-455.
- Buchatsky, L.P. 1989. Densonucleosis of bloodsucking mosquitoes. *Diseases Aqua. Org.* 6:145-150.
- Clark, M.E., Veneti, Z., Bourtzis, K. and Karr, T.L. 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. *Mech. Dev.* 120: 185-198.
- Dobson, S.L., Bourtzis, K., Braig, H.R, Jones, B.F., Zhou, W., Rousset, F. and O'Neill, S.L. 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:153-160
- Dobson, S. L., Marsland, E. J. and Rattanadechakul, W. 2002. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* 160: 1087-1094.
- Dumas, B., Jourdan, M., Pascaud, A.M., and Bergoin, M. 1992. Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* densovirus reveals an organization unique among parvoviruses. *Virology* 191:202-222.
- Dutton, T.J., and Sinkins, S.P. 2004. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Insect Mol. Biol.* 13(3): 317-322.
- Hawley, W.A. 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* (Supplement) 4:1-39
- Holmes, D. S. and Bonner, J. 1973. Preparation, molecular weight, base composition and secondary structure of giant nuclear ribonucleic acid. *Biochemistry* 12; 2230-2338
- Hurst, G.D.D., Johnson, A.P., Von der Schulenburg, J.H.G. and Fuyama, Y. 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: A temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics*. 156: 699-709.

- Ikeda, T., Ishikawa, H. and Sasaki, T. 2003a. Regulation of *Wolbachia* density in the Mediterranean Flour Moth, *Ephestia kuehniella*, and the Almond Moth, *Cadra cautella*. Zool. Sci. 20: 153-157.
- Ikeda, T., Ishikawa, H. and Sasaki, T. 2003b. Infection density of *Wolbachia* and level of cytoplasmic incompatibility in the Mediterranean Flour Moth, *Ephestia kuehniella*. J. Invertebr. Pathol. 84: 1-5.
- Jeyaprakash, A., and Hoy, M.A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Mol. Biol. 9:393-405
- Jousset, F.X., Barreau, C., Boublik, Y. and Cornet, M. 1993. A parvo-like virus persistently infecting a C6/36 clone of *Aedes albopictus* mosquito cell line and pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. Virus Res. 29:99-114.
- Kang, L. et al. 2003. Superinfection of *Laodelphax striatellus* with *Wolbachia* from *Drosophila simulans*. Heredity 90: 71-76.
- Kittayapong, P., Baisley, K.J. and O'Neill, S.L. 1999. A mosquito densovirus infecting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61:612-617.
- Kittayapong, P., Baisley, K. J., Baimai, V. and O'Neill, S. L. 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae.) J. Med. Entomol. 37: 340-345.
- Kittayapong, P., Baisley, K.J., Sharpe, R.G., Baimai, V. and O'Neill, S.L. 2002. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. Am. J. Trop. Med. Hygiene. 66: 103-107.
- McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N., and O'Neill, S.L. 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. Proc. R. Soc. Lond. B. 268:2565-2570
- McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N. and O'Neill, S.L. 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 2918-2923.
- Min, K.T., and Benzer, S. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10792-10796
- O'Neill, S.L., Kittayapong, P., Braig, H.R., Andrealis, T.G., Gonzalez, J.P. and Tesh, R.B. 1995. Insect densovirus may be widespread in mosquito cell lines. J. Gen. Virol. 76: 2067-2074.

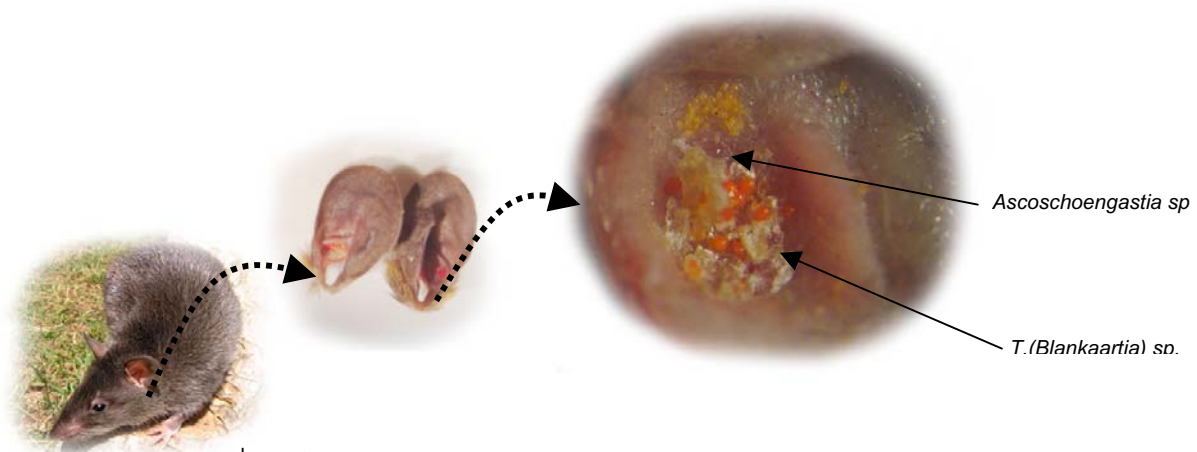
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M.E., Karr, T.L. and Robertson, H.M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2699-2702
- O'Neill, S.L., Pettigrew, M., Sinkins, S.P., Braig, H.R., Andreadis, T.G. and Tesh, R.B. 1997. *In vitro* cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol. Biol.* 6: 33-39.
- Reigler, M., Charlat, S., Stauffer, C. and Mercot, H. 2004. *Wolbachia* transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: investigating the outcomes of host-symbiont coevolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 273-279.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. and Solignac, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 250: 91
- Sasaki, T., and Ishikawa, H. 1999. *Wolbachia* infections and cytoplasmic incompatibility in the almond moth and the Mediterranean flour moth. *Zool. Sci.* 16: 739-744.
- Sasaki, T. and Ishikawa, H. 2000. Transinfection of *Wolbachia* in the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. *Heredity* 85: 130-135.
- Sinkins, S.P., Braig, H.R. and O'Neill, S.L. 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 261: 325-330.
- Sinkins, S. P. 2004. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 723-729.
- Tal, J. and Attathom, T. 1993. Insecticidal potential of the insect parvovirus GmDNV. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 22:345-356.
- Van Meer, M. M. and Stouthamer, R. 1999. Cross-order transfer of *Wolbachia* from *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) to *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae). *Heredity* 82: 163-169.
- Werren, J.H., Windsor, D., and Guo, L.R. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 262:197-204
- Werren, J.H., and Windsor, D.M. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium? *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 1277-1285.
- Zhou, W., Rousset, F. and O'Neill, S.L. 1998. Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. Royal Soc. Lond. B. Bio.* 265: 509-515.

- Bergoin, M. and Tijssen, P. 1998. Biological and molecular properties of densoviruses and their use in protein expression and biological control: in Miller LK, Ball A (eds): The Insect Viruses. New York Plenum Press.
- Hoffmann, A.A., and M. Turelli. 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. In Influential passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction (O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A. and Werren, J.H., eds), pp. 42-80. Oxford University Press, Oxford.
- O'Neill, S. L., Hoffmann, A. A. and Werren, J. H. 1997. Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction. Oxford University Press, Oxford.
- Cook, J.M., and Rokas, A. 2000. Influential passengers come of age. 1st International *Wolbachia* Conference, Orthodox Academy, Kolymbari, Crete, Greece, 7-12 June 2000. Trends Genet 16: 378-379.

4. การศึกษาสัณฐานวิทยาและอนุพันธุศาสตร์ของไรอ่อน

4.1 บทนำ

ไรเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ใน Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, Class Arachnida Subclass Acari ซึ่งมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากแมลง คือ ร่างกายประกอบด้วยส่วนหัวที่ไม่ได้แยกออกจากส่วนลำตัว และมีอวัยวะที่ใช้จับอาหารที่เรียกว่า Chelicerae ไม่มีหนวด (antenna) และไม่มีกราม (mandible) พบอยู่ทั่วไปทั้งในน้ำ ที่ชื้นแฉะ บนบก ใ้หายใจโดยใช้ book lung book gill หรือท่อลม (อังศุมาลย์ จันทราปัทย์ 2535) ไรเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายสูงที่สุดในพวก Arthropod แต่ยังมีการศึกษาในระดับเบื้องต้นและมีอยู่จำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น (Walter and Proctor 1999) Wharton (1952) ได้นิยาม ไร (chigger) ที่ศึกษาไว้ว่าเป็นไรในระยะตัวอ่อน (larva) ที่จัดอยู่ใน Family Trombiculidae, Suborder Trombidiformes, Order Acarina ที่โดยทั่วไปมักจะนิยมเรียกไรในกลุ่มนี้ว่า trombiculid mite ซึ่งเป็นไรที่มีขนาดเล็กมาก ขณะที่ยังไม่กินอาหารจะมีความยาวลำตัวประมาณ $\frac{1}{4}$ ถึง $\frac{1}{2}$ มม. สีเหลืองครีมจนถึงสีแดง มี 6 ขา มีระยะการเจริญเติบโตที่ซับซ้อน ตัวเต็มวัยจะมีขนาดลำตัวยาว 3-4 มม. มี 8 ขา ในระยะตัวอ่อนเท่านั้นที่จะเป็นปรสิตของสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยจะกินของเหลวในเนื้อเยื่อของร่างกาย (tissue fluid) ของ host เป็นอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (ภาพที่ 4.1) มีบางชนิดและเป็นส่วนน้อยที่เป็นปรสิตของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ในขณะที่ตัวเต็มวัยจะมีชีวิตเป็นพวกหากินอิสระอยู่ในดิน (Sasa, 1961) จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับไรกลุ่มนี้ในช่วงระยะตัวอ่อนอย่างกว้างขวาง ดังนั้นข้อมูลต่างๆ ตลอดจนศักยภาพในการจำแนกชนิดก็จะเป็นที่ยึดเฉพาะในระยะตัวอ่อนเท่านั้น



ภาพที่ 4.1 ไรอ่อน (2 ชนิด) ขณะเกาะ กินอาหาร ภายในช่องหูส่วนนอกของหนูจาก จ. ฉะเชิงเทรา

ความสำคัญของไรในกลุ่มนี้ เนื่องจากในช่วงระยะตัวอ่อนไรจะต้องกัด และดูดกินของเหลวในร่างกายของ host เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตในระยะต่อไป โดย host ส่วนหนึ่งจะเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีขนาดเล็ก เช่น หนู กระรอก ค้างคาว หรือแม้กระทั่งสัตว์ปีกจำพวก เป็ดหรือไก่ ซึ่งมีที่อาศัยและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมนุษย์เรา เหตุนี้เองไรอ่อนจึงเข้ามาเกี่ยวข้องกับมนุษย์ซึ่งเป็น accidental

host ที่จะได้รับผลกระทบ เช่น ผู้ที่ถูกไรกัดก็จะเกิดอาการคัน ผิวน้ำอักเสบ (dermatitis) ซึ่งมีชื่อเรียกเฉพาะของอาการนี้ว่า trombidiosis โดยที่ผิวหนังตรงจุดที่ถูกกัดจะพองเป็นตุ่มใส ตรงช่องทางที่ส่วนปากของตัวไรแทงทะลุผิวหนังลงไปและส่วนของเนื้อเยื่อผิวหนังจะก่อตัวเป็นท่อที่เรียกว่า stylosome และเมื่อของเหลวจากปากของไรพ่นเข้าไปจะทำให้เกิดอาการคันอาจนานเป็นสัปดาห์ Misumi et al. (2003) ได้ศึกษา histopathology ของผิวหนังของคนจากการถูกตัวไรกัดและได้อธิบายโครงสร้างของ stylosome ซึ่งเกิดขึ้นที่ชั้นผิวหนังส่วนนอก (epidermis) เหนือระดับชั้น basal layer ขึ้นมาและได้สรุปว่า อาการตอบสนองต่อการถูกกัดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไรและบุคคลที่ถูกกัด นอกจากนี้ไรอ่อนยังเป็นแหล่งโรค scrub typhus และสามารถนำเชื้อมาสู่คนโดยทำให้ผู้ที่ถูกตัวไรอ่อนที่มีเชื้อกัดก็จะเกิดอาการป่วยเป็นโรค Scrub typhus หรือ โรค Tsutsugamushi มีสาเหตุมาจากจากเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* (เดิมจัดอยู่ใน Genus *Rickettsia*) จัดอยู่ในจำพวก rickettsia ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคอื่นๆ กับคนเช่น typhus และ spot fever แต่เนื่องจาก *O. tsutsugamushi* มีความแตกต่างทางโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกประกอบกับการวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน 16S RNA (Tamura et al. 1995) จึงได้จัดแยกออกจาก Genus *Rickettsia* กำหนดให้เป็น Genus *Orientia* ซึ่งมีความหมายสอดคล้องกับพื้นที่ทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีการระบาดของโรค มีหลักฐานบันทึกทางการแพทย์ของจีนเกี่ยวกับโรคนี้ในคริสต์ศตวรรษที่ 16 ถือเป็นโรคประจำถิ่นที่ระบาดในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ตั้งแต่อินเดีย พม่า ไทย มาเลเซีย หมู่เกาะสุมาตรา ฟิลิปปินส์ เกาหลี จีนตอนใต้ และ ญี่ปุ่น ได้มีการศึกษาสาเหตุของโรคอย่างจริงจังในญี่ปุ่นในช่วงหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 เนื่องจากทหารฝ่ายพันธมิตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งทหารอเมริกัน ได้ประสบปัญหาโรค scrub typhus และเกิดการสูญเสียจากโรครุนแรงกว่าการสูญเสียจากการสู้รบ เมื่อสงครามสงบจึงได้ทุ่มงบประมาณทำการวิจัยเกี่ยวกับโรค scrub typhus งานวิจัยเกี่ยวกับโรค scrub typhus จึงได้พัฒนาก้าวหน้ามาเป็นลำดับตั้งแต่นั้นมา (Kawamura et al. 1995)

โรค scrub typhus เป็นโรคติดเชื้อเฉียบพลันในคนที่ถูกไรตัวอ่อนจำพวก trombiculid ที่มีเชื้อ *O. tsutsugamushi* กัด อาการโดยทั่วไปผู้ป่วยจะมีอาการไข้ ปวดศีรษะ มีผื่น หรือแผลรอยกัด ที่เรียกว่า “eschar” และมีอาการต่อมน้ำเหลืองโต ส่วนมากแพทย์มักจะวินิจฉัยเป็นไข้ที่ไม่ทราบสาเหตุ ยกเว้นกรณีที่ให้ข้อมูลว่าผู้ป่วยมีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรค scrub typhus เช่น มีประวัติเข้าไปในพื้นที่ป่า หรือทุ่งหญ้าที่เป็นแหล่งอาศัยของไร หรือหนู และได้รับการตรวจเลือดเพื่อยืนยันการติดโรค ความผิดพลาดจากการวินิจฉัยมักจะเป็นสาเหตุที่นำไปสู่ความรุนแรงของโรคซึ่งทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตได้ (Watt and Strickman 1994; Pavithran et al. 2004)

ไรที่เป็นพาหะนำเชื้อโรค scrub typhus นอกจากไรใน Genus *Leptotrombidium* แล้วยังมีการตรวจพบเชื้อ *O. tsutsugamushi* ในไรชนิดอื่นๆอีก ซึ่งน่าจะเป็นพาหะนำโรคนี้ เช่น *Neotrombicula* sp., *Cheladonta* sp., *Helenicula* sp., *Gahriepia* sp., *Walchia* sp., *Euschoengastia* sp., *Ascoschoengastia* sp., *Eutrombicula* sp., *Machiena* sp., *Shunsennia* sp., และ *Blankaartia* sp. (Kawamura et al. 1995 ; Tanskul et al. 1994.) นอกจากนั้นเชื้อยังสามารถถ่ายทอดผ่านตัวไรจากแม่ไปยังลูกในรุ่นต่อๆ ไปได้ (Transovarian transmission) (Roberts and Robinson 1977 ; Frances et al. 2001) ทำให้ไรเป็นแหล่ง(reservoir) ของโรค scrub typhus ได้มีการทดลองหาอัตราการถ่ายทอดเชื้อจากรุ่นแม่สู่รุ่นลูก (Transovarian infection rates : TIR) และอัตราการการติดเชื้อของลูกจากแม่ที่

ติดเชื้อ (Filial infection rates : FIR) ในประชากรของไรในแต่ละ species มีการศึกษาเพื่อหาอัตราการถ่ายทอดเชื้อจากรุ่นแม่สู่รุ่นลูก และอัตราการการติดเชื้อของลูกจากแม่ที่ติดเชื้อ สำหรับไร *Leptotrombidium deliense* มี TIR เท่ากับ 100% และ FIR เฉลี่ย 6 รุ่นเท่ากับ 98% (Rai and Bandopadhyay 1978) ไร *L. fletcheri* มี TIR เท่ากับ 98% และ FIR เฉลี่ย 5 รุ่นเท่ากับ 94% (Rapmund et al. 1969) สำหรับ *L. aranicola* มี TIR เท่ากับ 100% และ FIR เฉลี่ย 4 รุ่นเท่ากับ 97% (Roberts and Robinson 1977) นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อจะถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกที่เป็นตัวเมียเป็นส่วนใหญ่ ไรรุ่นพ่อ-แม่ที่ติดเชื้อจะให้กำเนิดลูกเพศเมียเกือบทั้งหมดในขณะที่รุ่นลูกตัวผู้จะปราศจากเชื้อ Robert et al. (1977) ได้รายงานผลการทดลองเลี้ยงไร *L. fletcheri* ที่ติดเชื้อทั้งสิ้น 13 รุ่นจำนวน 2,938 ตัว พบว่าอัตราการเกิดเพศเมียสูงกว่าเพศผู้ คือเป็นตัวเมีย 2,911 ตัว และตัวผู้ 27 ตัว ตัวเมียส่วนใหญ่จะติดเชื้อซึ่งถ่ายทอดมาจากแม่ ส่วนตัวผู้ทั้งหมดจะปลอดเชื้อ และทดลองเลี้ยงไร *L. aranicola* ที่ติดเชื้อจำนวน 4 รุ่น พบว่ามีตัวผู้เพียงตัวเดียวจากไรทั้งหมด 906 ตัว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียมีความผิดปกติ Takahashi et al. 1993 นั่นคือเชื้อนี้มีผลทำให้สัดส่วนการเกิดเพศของรุ่นลูกเปลี่ยนแปลงไป โดยทดลองให้ไรตัวเมียที่ติดเชื้อกัดกินของเหลวในร่างกายของหนูที่ได้รับยาฆ่าเชื้อ พบว่าในรุ่นลูกที่เกิดขึ้นมีตัวผู้ที่ปราศจากเชื้อเป็นจำนวนมาก อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเริ่มกลับเข้าสู่ปกติเมื่อเชื้อนี้ถูกทำลาย ในการตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของตัวไรอ่อนที่ติดเชื้อ ได้ผลยืนยันว่ากลไกการถ่ายเชื้อจากรุ่นพ่อ-แม่ไปสู่รุ่นลูกนั้นเกิดขึ้นได้เฉพาะจากแม่ไปสู่ลูก เนื่องจากได้ตรวจพบเชื้ออยู่ในเซลล์ไซโทพลาสซึมในทุกๆระยะการพัฒนาก่อนกระทั่งออกสู่ภายนอก ในขณะที่ในสเปิร์มนั้นในระหว่างพัฒนาก่อนของ spermatid เซลล์สืบพันธุ์จะแยกตัวออกไปจากเซลล์ของเชื้อ ทำให้ spermatophore ที่สร้างขึ้นปราศจากเชื้อ (Urakami et al.1994a, b) แสดงให้เห็นว่าไรอ่อนมีบทบาทสำคัญเป็นแหล่งโรค Scrub typhus

การศึกษาเกี่ยวกับไรอ่อนและโรค Scrub typhus ในประเทศไทยในระยะแรก ได้เริ่มกันอย่างจริงจังในปี ค.ศ. 1962 ซึ่งได้ทำการสำรวจชนิดของตัวไรใน 30 จังหวัดของไทย (Lakshana, 1973) จากการตรวจสอบผลงานที่เกี่ยวข้องกับ scrub typhus ในประเทศไทยตั้งแต่ปี 1964 ถึงปัจจุบัน จำนวนทั้งสิ้น 71 ฉบับ พบว่า เป็นงานที่ศึกษาด้านการแพทย์กับผู้ป่วยมากที่สุดคิดเป็น 58% งานศึกษาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน 15% งานศึกษาเกี่ยวกับตัวไร และหนู อย่างละ 10% และอื่นๆ อีก 7% เป็นที่น่าสังเกตว่างานศึกษาวิจัยเกี่ยวกับตัวไรที่ดีพิมพ์เผยแพร่เกือบทั้งหมดมาจากหน่วยงานของ AFRIMS ซึ่งเป็นงานที่สนองตอบต่อวัตถุประสงค์ที่มีการจำกัดขอบเขต ซึ่งในความเป็นจริงงานวิจัยระดับวิทยาของโรคนี้ในประเทศไทยน่าจะกระจายอย่างกว้างขวาง และลงในแนวลึกยิ่งกว่านี้ เพราะยังถือว่าโรค Scrub typhus ยังเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุข และจัดว่าเป็นโรคที่ต้องมีการเฝ้าระวัง อย่างไรก็ตามปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการ การจำแนกชนิด การตรวจสอบสายพันธุ์ของไรอ่อนซึ่งเป็นพาหะและแหล่งโรคที่สำคัญ ทำให้งานวิจัยในเรื่องนี้ขาดความต่อเนื่อง และเมื่อได้ตรวจสอบสถานการณ์โรค Scrub typhus จากข้อมูลในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา (2539-2548) พบว่ามีผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตด้วยโรคนี้โดยเฉลี่ยปีละ 3,065 คน และ 5.8 คน ตามลำดับ และในปี 2547 โรคนี้ได้ถูกจัดระดับความรุนแรงอยู่ในลำดับที่ 21 ใน 47 โรคในระบบเฝ้าระวัง (กระทรวงสาธารณสุข, 2547,2548) ด้วยเหตุนี้งานวิจัยพื้นฐานที่จะเชื่อมต่อให้เกิดความต่อเนื่องและกระจายอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับโรคนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

4.2 วัตถุประสงค์

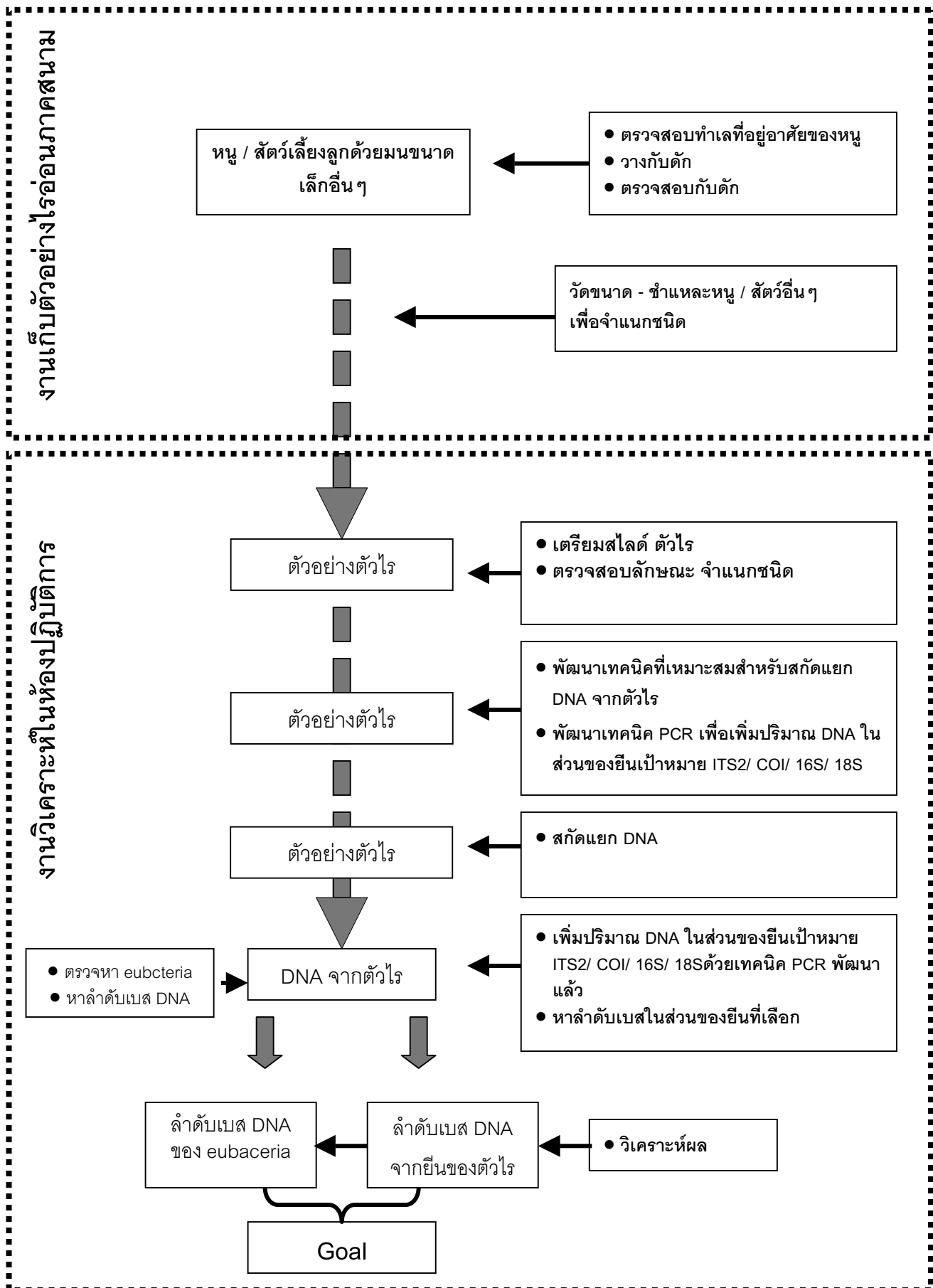
- 4.2.1 เพื่อสำรวจเบื้องต้น ชนิดของไรอ่อนในพื้นที่กลุ่ม 7 แห่งในประเทศไทย
- 4.2.2 รวบรวมลักษณะสัณฐานวิทยาเพื่อจัดอนุกรมวิธานของไร
- 4.2.3 เพื่อหาพัฒนาเทคนิคพื้นฐาน ในการศึกษาเกี่ยวกับไรที่จะเป็นแนวทางในการวิจัยพื้นฐานและการควบคุมโรคโรคที่เกิดจากตัวไร เช่น โรค scrub typhus ที่มีตัวไรที่เป็นทั้งพาหะนำโรค และเป็นแหล่งของโรคในขณะเดียวกัน
- 4.2.4 เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ทางด้านอนุพันธุศาสตร์ของไร
- 4.2.5 เพื่อตรวจหา Eubacteria อื่นๆ ที่อาจพบในตัวไร ที่อาจจะบ่งชี้ว่าเป็นพาหะหรือแหล่งโรคอื่นๆ หรือใช้เป็นแนวทางในการใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวในการควบคุมประชากรของตัวไร

4.3 วงชีวิตของไรอ่อน (Chigger Life Cycle)

ไรเป็นสัตว์มีขั้นตอนของพัฒนาการในวงจรชีวิตที่ซับซ้อน และมีขั้นตอนปลีกย่อยมากกว่าแมลง โดยทั่วไป ประกอบด้วยระยะต่างๆ 7 ระยะดังนี้ ระยะไข่ ระยะ Deutovum ระยะ Larva ระยะ Nymphochrysalis (prenymph) ระยะ Nymph ระยะ Imagochrysalis(pre-adult) และ ระยะ Imago (ตัวเต็มวัย) (ภาพที่ 4.2) ไข่ของไรอ่อนซึ่งมีรูปร่างทรงกลมตัวอ่อนที่อยู่ภายในจะพัฒนาสู่ระยะ Deutovum โดยใช้เวลารวม 5-6 วันในการฟักเป็นตัวอ่อนที่เคลื่อนที่ได้และสามารถดูดอาหารได้หลายวันเพื่อรอเยื่อ โดยตัวอ่อนจะต้องกินอาหารจากเยื่อซึ่งเป็นสัตว์ชนิดอื่นก่อนจึงจะสามารถพัฒนาสู่ระยะต่อไปได้ ไรจะกัดเยื่อโดยแทงเขี้ยวที่ส่วนปากเข้าไปใต้ผิวหนังของเหยื่อและเกาะติดแน่นจนกว่าจะหลุดไปเอง ตัวอ่อนจะกินอาหารเพียงครั้งเดียว ไรจะดูดกินของเหลวจากเหยื่ออย่างช้าๆ กินเวลา 1-3 วันจึงจะอิ่มและหลุดออกจากตัวเหยื่อ พักตัวอยู่ประมาณ 1-2 วัน ระหว่างการพักตัวนั้นตัวอ่อนที่อยู่ภายในก็จะพัฒนาเป็น Nymphochrysalis ระยะนี้ตัวไรจะพักตัวอยู่นิ่งไม่เคลื่อนไหว ประมาณ 1 สัปดาห์ถึง 10 วัน ตัวอ่อนซึ่งมี 8 ขาก็จะลอกคราบออกมา ระยะนี้เรียกว่า Nymph ซึ่งจะมีรูปร่างเหมือนกับตัวเต็มวัยทุกประการ แต่จะมีขนาดเล็กกว่า ช่องเปิดอวัยวะเพศยังพัฒนายังไม่สมบูรณ์ หากินแบบอิสระในดินโดยกินไข่ของแมลงอื่นๆ เป็นอาหาร เมื่อกินจนอิ่มซึ่งใช้เวลาประมาณ 4 วันก็จะเข้าสู่การพักตัวอีกครั้งหนึ่ง ระหว่างนี้ตัวอ่อนที่อยู่ด้านในก็จะมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ Imagochrysalis ระยะต่อมาในทำนองเดียวกัน ตัวเต็มวัยที่เรียกว่า Imago ก็จะพัฒนาอยู่ด้านใน Imagochrysalis ประมาณ 1 สัปดาห์ ก็ลอกคราบออกมาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ไรตัวผู้จะสร้าง Spermatophore ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนขาติดติดกับพื้นและส่วนปลายเป็นกระเปาะซึ่งภายในจะมี Sperm บรรจุอยู่ ส่วนไรตัวเมียก็จะมารับเอา sperm ก่อนจึงจะวางไข่ไว้ตามพื้นดินที่อาศัยอยู่ในเวลาต่อมา



ภาพที่ 4.2 แสดงวงจรชีวิตของไรอ่อน



ภาพที่ 4.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาโดยสังเขป

4.4 การเก็บตัวอย่างไรในภาคสนาม (Sample Collecting)

การเก็บตัวอย่างไรอ่อนที่เป็น extoparasite ของหนูหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็กอื่นๆ เช่น กระรอก กระแต โดยใช้กรงดักหนูที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติใน 7 พื้นที่ใน 6 จังหวัดของประเทศไทย คือ เลย สกลนคร ตาก กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และ ฉะเชิงเทรา (ตารางที่ 4.1) โดยเริ่มจากการสำรวจพื้นที่ที่เหมาะสมที่เป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์เป้าหมายเพื่อที่จะวางกับดัก การวางกับดักจะวางในตอนเย็น และตรวจเก็บในตอนรุ่งเช้า ในบางพื้นที่ เช่น ที่กาญจนบุรี และ เลย ก็จะช่วยหาความช่วยเหลือจากชาวบ้านในพื้นที่ซึ่งมีความชำนาญ เนื่องจากผู้ที่ไม่คุ้นเคยกับพื้นที่ที่จะจับสัตว์ได้น้อยกว่า หรือไม่ได้เลย จนกว่าจะคุ้นเคยกับพื้นที่ซึ่งต้องใช้เวลาตรวจสอบอยู่นาน สัตว์ที่จับได้จะถูกนำมาตรวจสอบชนิดและเก็บตัวอย่างไรอ่อนตามตอต่อไปนี้

1. วางยาสลบ โดยให้สัตว์ที่จับได้ดม Chloroform จนสลบไม่เคลื่อนไหว
2. ใช้เข็ญ็ดยาเจาะหัวใจ ผ่านผิวหนังบริเวณช่องอก แล้วดูดเอาเลือดออกมาจนหมด แล้วเก็บเลือดในหลอดที่สะอาด หนูแต่ละตัวจะมีเลือดประมาณ 0.5-2 ml. ขึ้นอยู่กับขนาดของตัวหนู
3. เมื่อไม่มีเลือดในร่างกายหนูก็จะไม่เคลื่อนไหวและตายไปในที่สุด ในการจำแนกชนิดของหนูอาศัยขนาดของร่างกาย โดยวัดและบันทึกความยาวลำตัว กะโหลก ศีรษะ ใบหู เท้าหลัง แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน พร้อมกับลักษณะอื่นๆ เช่น สีขน ด้านหลัง-ด้านท้อง ลักษณะของหาง ขนที่หลังเท้า ตลอดจนสภาพที่อยู่อาศัยของหนู
4. ตรวจสอบไรอ่อน ในหูส่วนนอก ด้วยตาเปล่า หนูที่มีไรอ่อนจะสังเกตเห็น หย่อมสีจางในช่องหูมีขนาดขึ้นอยู่กับจำนวนตัวไร จากนั้นตัดใบหูที่มีไรอ่อนเพื่อเก็บตัวไรในภายหลัง
5. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะภายใน โดยตัดและเปิดช่องท้องของหนู และตัวเอาเนื้อเยื่อ ปอด ตับ ม้าม และไต และแซ่แซ่ เพื่อการตรวจสอบหาเชื้อโรคในภายหลัง
6. การเก็บตัวไรทำในห้องปฏิบัติการเพราะจะโดยใช้กล้อง stereo microscope เนื่องจากไม่สามารถมองเห็นตัวไรด้วยตาเปล่า และใช้เวลานาน ซึ่งจะดูดเอาเนื้อเยื่อหนูแยกเอาตัวไรออกมา หรือใช้ฟู่กันชุบน้ำแตะเอาตัวไรมาวางบนผิวน้ำและนำมาเก็บใน 70% ethanol เพื่อการจำแนกชนิด และเก็บใน absolute ethanol ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อสกัด DNA

ตารางที่ 4.1 แสดงชนิดของหนู และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ที่เป็นแหล่งอาศัยของไรอ่อน ชนิดของไรอ่อน และพื้นที่เก็บตัวอย่าง

Ba = *Bandicota indica* / หนูพุกใหญ่

T = *Tupaia glis*

Be = *Berylmys berdmorei*

Bm = *Beromes menetus*

Rr = *Rattus rattus* / หนูท้องขาว

Rs = *Rattus susifer*

Chiggers	Hosts	Localities		Coordinates	Collect Date
<i>Ascosehoenastia globosa</i> <i>Leptotrombidium</i> sp. <i>Helenicula</i> sp.	Ba	ต.สิบเอ็ดตอก อ.บ้านโพธิ์	ฉะเชิงเทรา	N 13° 36.318' E 101° 06.967'	มีค. 2545
<i>Ascosehoenastia globosa</i> <i>Blankaartia gracilis</i> <i>Blankaartia niloticum</i>	Ba	อ.เมือง		N 10° 44.071' E 101° 04.721'	กพ.2546
<i>Ascosehoenastia globosa</i> <i>Walchia kalrata</i>	Ba	ต.พระธาตุผาแดง อ.แม่สอด	ตาก	N 16° 40.186' E 98° 36.031'	พย. 2545
<i>Leptotrombidium</i> sp. <i>Walchia lupella</i> <i>Ascoschoengastia globosa</i> <i>Helenicula</i> sp.	Rr Rs T Bm	ต.หนองลู อ.สังขละบุรี	กาญจนบุรี	N 16° 40.186' E 98° 36.131'	พย.2545 กพ. 2546 มีค.2546
<i>Walchia lupella</i>	Be	ต.น้ำหมาน อ.เมือง	เลย	N 17° 28.851' E 101° 40.758'	กค. 2545
<i>Ascosehoenastia globosa</i> .	Rr	อ.โคกศรีสุพรรณ	สกลนคร	N 16° 59.154' E 104° 27.272'	กค. 2545
<i>Ascosehoenastia globosa</i> <i>Walchia lupella</i>	Ba	ต.ทุ่งคอก อ.สองพี่น้อง	สุพรรณบุรี	N 14° 10.103' E 99° 56.039'	ตค.. 2546

4.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาของไรอ่อน (Chigger Morphology)

ไรในกลุ่ม Trombiculidae เป็นไรที่จะเป็นปรสิตเฉพาะที่อยู่ในระยะตัวอ่อน (larva) ในขณะที่อยู่ในระยะ Nymphs และ adults จะหากินอย่างอิสระเป็นผู้ล่าอยู่ในดิน ในระยะตัวเต็มวัยมีการศึกษาน้อยมาก ดังนั้นการจัดจำแนกชนิดของไรจึงอาศัยลักษณะ โครงสร้างภายนอกร่างกายของไรในระยะตัวอ่อนเป็นหลัก ตัวอ่อนของไรแบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆตลอดแนวหัวท้ายตามเส้นแกนกลางลำตัวซึ่งแตกต่างจากแมลงโดยสิ้นเชิง ประกอบด้วยส่วนแรก คือ ส่วนปาก (Gnathosoma) ซึ่งดูคล้ายกับว่าเป็นส่วนหัวของไร แต่ที่จริงแล้วไม่ใช่ส่วนหัว เนื่องจากไม่มีสมองและตา ส่วนที่ 2 คือ ส่วนลำตัว (Idiosoma) เป็นการรวมของส่วนอกกับส่วนท้องเข้าด้วยกัน เป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ มีระบบทางเดินอาหาร ระบบไหลเวียน ระบบประสาท และมีขา 6 ขาค่อยๆเปลี่ยน แต่เมื่อเติบโตเป็นตัวเต็มวัยจะมีขาเพิ่มขึ้นเป็น 8 ขา นอกจากนั้นยังมีการแบ่งและกำหนดชื่อของลำตัวปลีกย่อยลงไปอีก เช่น (4.4) แบ่งส่วนปากและส่วนอก (Prosoma) ซึ่งรวมขาทั้ง 3 คู่ ออกจากส่วนท้อง (Opisthosoma) หรือบางครั้งก็แบ่งส่วนหน้า (Proterosoma) ออกจากส่วนหลัง (Hysterosoma) โดยใช้แนวเส้นแบ่งระหว่างขาคู่ที่ 2 กับขาคู่ที่ 3 เป็นเส้นแบ่ง ซึ่งเป็นการรวมเอาส่วนของขาคู่ที่ 3 เข้ากับส่วนท้องเข้าด้วยกัน นอกจากนั้นยังกำหนดส่วนต่างๆของตัวไรดังนี้ ส่วนของ Idiosoma ประกอบด้วย 4 ส่วนคือ Propodosoma Metapodosoma

Gastrosoma และ Pygosoma โดยกำหนดให้ Propodosoma คือ ลำตัวส่วนบนรวมขาคู่ที่ 1 กับคู่ที่ 2 Metapodosoma คือ ส่วนลำตัวเฉพาะในช่วงของขาคู่ที่ 3 Gastrosoma คือ ส่วนลำตัวที่อยู่ระหว่างขาคู่ที่ 3 กับช่องขับถ่าย(anus) Pygosoma คือส่วนปลายสุดของลำตัวซึ่งอยู่ถัดจากช่องขับถ่ายไปจนสุดลำตัว เมื่อรวมส่วน Propodosoma กับ Metapodosoma เข้าด้วยกันเรียกว่า Podosoma

ในที่นี้จะแยกตัวไรออกเป็น 2 ส่วน คือ Gnathosoma กับ Idiosoma ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. **Gnathosoma** เป็นส่วนปากของไรที่อยู่หน้าสุดของร่างกายเป็นส่วนที่ช่วยในการกินอาหาร ช่วยในการยึดเกาะขณะกินอาหาร ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Pedipalp กับ Chelicerae ดังนี้

- 1.1 **Pedipalp** มีลักษณะเป็นข้อปล้อง ประกอบด้วยส่วนพื้นฐาน 6 ปล้อง เรียงจากส่วนโคนขาไปยังส่วนปลายสุด คือ Coxa, Trochanter, Femur, Genu, Tibia และ Tarsus (ภาพที่ 4.5) ในส่วนปล้องที่ 1 (Coxa) ทั้งสองข้างจะหลอมรวมกันเป็นส่วนฐานของ Gnathosoma ส่วนนี้ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ มีชื่อเรียกเฉพาะว่า Gnathobase ซึ่งเป็นส่วน แข็งแรง และที่มีขนาดใหญ่ เป็นที่ยึดติดกับ Podosoma ที่ด้านข้างของ Gnathobase จะมีขนที่เรียกว่า Gnathobasala มีลักษณะแตกแขนงแบบขนนก(feathered seta) อยู่ทั้งสองข้าง เป็นที่สังเกตเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4.5) ปล้องที่ 2 มีชื่อเรียกเฉพาะว่า Palpotrochanter เป็นปล้องสั้นๆยึดอยู่กับ Gnathobase เคลื่อนไหวไม่ได้เช่นกัน ปล้องที่เริ่มมีการเคลื่อนไหวได้ คือ Palpofemur ซึ่งอยู่ถัดมาปล้องนี้จะมีขนทางด้านหลัง 1 เส้นซึ่งอาจเป็น ขนแบบขนนก ขนแบบแตกแขนง(branched seta) หรือขนแบบไม่แตกแขนง(nude seta) ปล้องที่ 3 คือ Palpogenu เป็นปล้องสั้น ที่มีขนาดเล็กและมีขนอยู่ทางด้านหลัง 1 เส้นเช่นเดียวกับ Palpofemur ปล้องที่ 4 คือ Palpotibia เป็นปล้องที่อยู่ปลายสุดมีขน 3 เส้นอยู่ทางด้านบน ด้านล่าง และด้านหลัง และยังมีกรงเล็บ(Papal claw) อยู่ในส่วนปลายสุด อาจมีลักษณะ ปลายแหลม หรือเป็นแฉก 2-3 แฉก (Prongs) ซึ่งประกอบด้วยแฉกหลัก(Major prong) ซึ่งมีขนาดใหญ่และหนากว่ากับแฉกรอง (Minor prong)ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า ทั้งจำนวนแฉก และการจัดตำแหน่งของแฉกที่เป็นแกนหลักอยู่ทางด้านนอก (external) หรือด้านใน (internal) เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด ปล้องสุดท้ายคือ Palpotarsus มีลักษณะเป็นแขนงแตกออกจากปล้อง Palpotibia มีขนอยู่หลายเส้น จำนวน และชนิดเส้น ขนบนปล้องนี้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกชนิดของไรอ่อนในหลายกลุ่ม ซึ่งในการ จำแนกชนิดนั้นได้กำหนดเป็นรูปแบบไว้เป็นสูตรที่เรียกว่า Palpotarsal formula (fT) เช่น $fT=7B$ แสดงว่า มีขนชนิดที่มีเงี่ยงหนาม (Barb) อยู่ที่ palpotibia จำนวน 7 เส้น

- 1.2 **Chelicerae** เป็นเขี้ยวที่ใช้ในการเจาะแทงทะลุผิวหนังของสัตว์อื่นเพื่อดูดกินอาหาร ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนฐานซึ่งมีลักษณะเป็นกล้ำมเนื้อยืดหยุ่น ส่วนนี้จะมีขนที่เรียกว่า Galeala หรือ Galeal seta อยู่ข้างละเส้นลักษณะของขนอาจเป็นแบบขนนก หรือเป็น เส้นเรียวกับส่วนปลายจะมีลักษณะเป็นเขี้ยวยาวปลายแหลม (Cheliceral blade / Chelostyle) ที่สวมอยู่ในส่วนฐานซึ่งจะยึดเขี้ยวเอาไว้อย่างแข็งแรงด้วยกล้ำมเนื้อ ส่วน

ปลายแหลมของเขี้ยวอาจมี tricuspid cap หุ้มอยู่ หรือมีลักษณะเป็นฟันเลื่อย เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดเช่นกัน

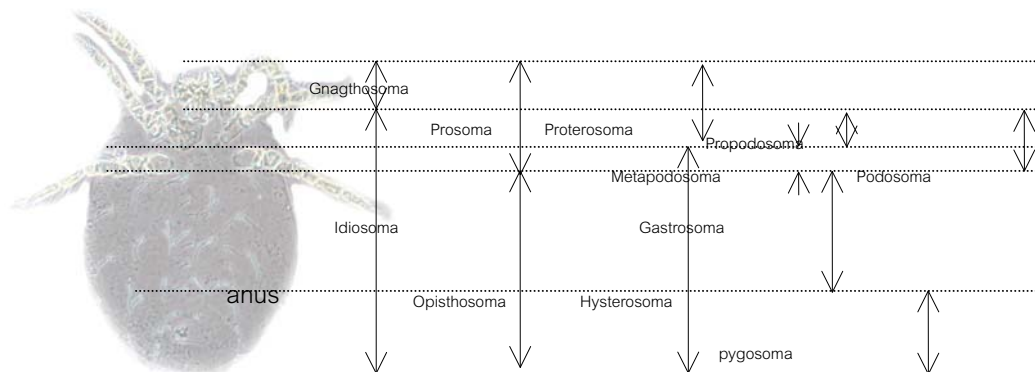
2. Idiosoma เป็นส่วนของลำตัวทั้งหมดประกอบด้วยเป็นส่วนใหญ่หลายส่วน ดังนี้ คือ แผ่นหลัง ขาคู่ที่มี 3 คู่ ติดอยู่ด้านท้องใกล้กับส่วนปากเรียงเป็นคู่ คู่ที่ 1 2 และ 3 เรียงกันไปตามลำดับ และส่วนท้องที่มีความสามารถยืดขยายออกได้เมื่อกินอาหาร นอกจากรูปร่างซึ่งมีการพัฒนาของส่วนต่างๆ ตามหน้าที่เพื่อตอบสนองต่อความเป็นอยู่แล้ว เส้นขนซึ่งมีอยู่หลายรูปแบบ ซึ่งอยู่ในตำแหน่งต่างๆ กันก็มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้เป็นลักษณะในการจำแนกหมวดหมู่ของไร บนส่วนลำตัวซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนดังนี้

2.1 แผ่นหลัง (scutum) มี 1 แผ่นมีลักษณะเป็นแผ่นแข็งติดอยู่กับด้านหลังใกล้กับส่วนปาก ทำหน้าที่ปกป้องระบบประสาทส่วนกลางของไร และเป็นโครงสร้างที่เสริมความแข็งแรงกับอวัยวะอื่นๆ ตามแนวขอบและบนแผ่นหลังนี้จะมีขนที่ทำหน้าที่รับความรู้สึก แผ่นหลังนี้เป็นอวัยวะที่ใช้จำแนกชนิดของไรได้เป็นอย่างดี ลักษณะที่สำคัญ เช่น รูปทรง ขนาด จำนวนเส้นขน ลักษณะของเส้นขน ความยาวและตำแหน่งของเส้นขน ในการนิยามชนิดของไรในกลุ่มต่างๆ ความกว้างความยาวของแผ่นหลัง ระยะห่างระหว่างเส้นขน และยังมีการใช้ความยาว รูปทรง ของเส้นขนตามตำแหน่งที่อยู่บนแผ่นหลัง เช่น ขน sensila ซึ่งมี 2 เส้นบนซีกด้านซ้ายและขวาบนแผ่นหลัง มีรูปร่างต่างๆ กัน อาจเป็นเส้นเรียวและแตกแขนงที่ส่วนปลาย หรือ มีลักษณะเป็นพู่ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดกลุ่มทำให้สะดวกและรวดเร็วในการจำแนกชนิด สำหรับไรอ่อนบางชนิดที่มีตำแหน่งของตาจะขนานอยู่ด้านข้างของแผ่นหลัง

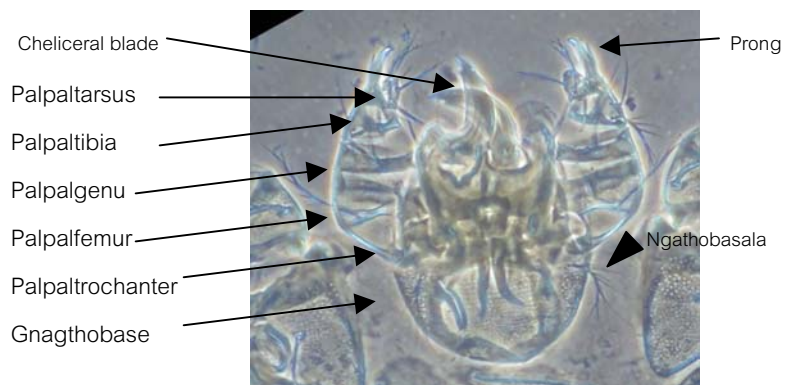
2.2 ขา (Legs) มีลักษณะเป็นข้อปล้อง จำนวน 6 หรือ 7 ปล้อง แต่ละปล้องเรียงตามลำดับจากส่วนโคนขาไปยังส่วนปลายสุด ดังนี้ Coxa Trochanter Femur Genu Tibia และ Tarsus (ภาพที่ 4.7) ในกรณีที่มี 7 ปล้องจะมีส่วน femur เพิ่มขึ้นอีก 1 ปล้อง ดังนั้น femur จึงแยกเป็น 2 ส่วน คือ Basifemur กับ Telofemur ตามลำดับ ทั้ง 3 คู่จะติดอยู่ด้านท้องของ Podosoma ได้มีการจำแนกกลุ่มตามจำนวนปล้องขาในรูปแบบต่างๆ ในการจำแนกกลุ่มของไรในระดับ Subfamily เช่น 666 766 และ 777 เป็นรูปแบบจำนวนปล้องขาของไรนับจากขาคู่ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ปล้องปลายสุด (Tarsus) จะมีกรงเล็บ (Empodium) ที่ใช้สำหรับการยึดเกาะซึ่งอาจมีรูปร่าง โค้งงอ (claw-like) หรือ เป็นแผ่นแบน (caruncle) นอกจากนั้นที่ขายังมีขนชนิดต่างๆ อยู่ตามปล้องของขาแต่ละคู่ซึ่งเป็นลักษณะที่จะนำมาจำแนกและกำหนดชนิดของไรได้ด้วย เช่น Selenidion (ขนแข็ง)

2.3 ส่วนท้อง ได้แก่ส่วนที่เรียกว่า Ophitosoma ในส่วนนี้จะพบว่ามีช่องเปิดทวารหนัก (anus) แผ่นแข็งที่ส่วนหาง (Caudal plate) และมีขนกระจายอยู่ทั่วไปทั้งด้านหลังและด้านท้อง จำนวนขนและรูปแบบการกระจายของเส้นขนซึ่งจะเรียงตัวเป็นแถวๆ จนถึงส่วนปลายสุดของลำตัว จำนวนเส้นขนแต่ละแถวเรียงกันไปก็สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ใน

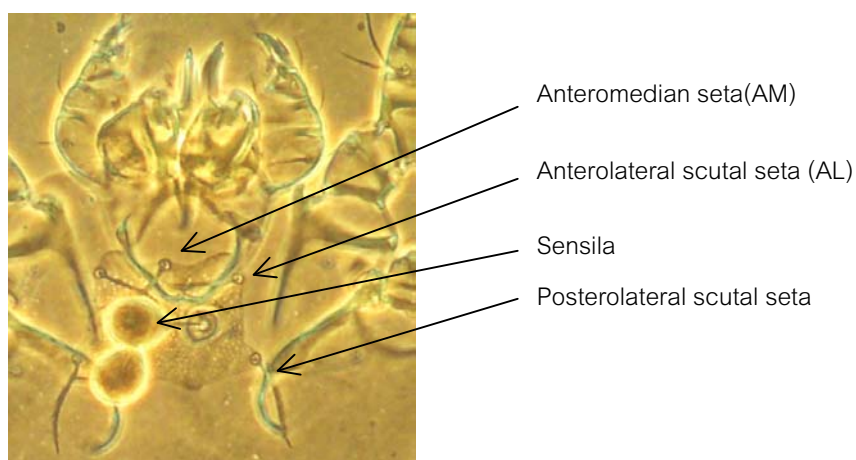
การจำแนกชนิดของไรได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน Genus *Leptotrombidium* ซึ่งแต่ละสปีชีส์ จะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากจนอาจสับสนที่จะระบุชนิดในระดับ subgenus species และ subspecies ได้



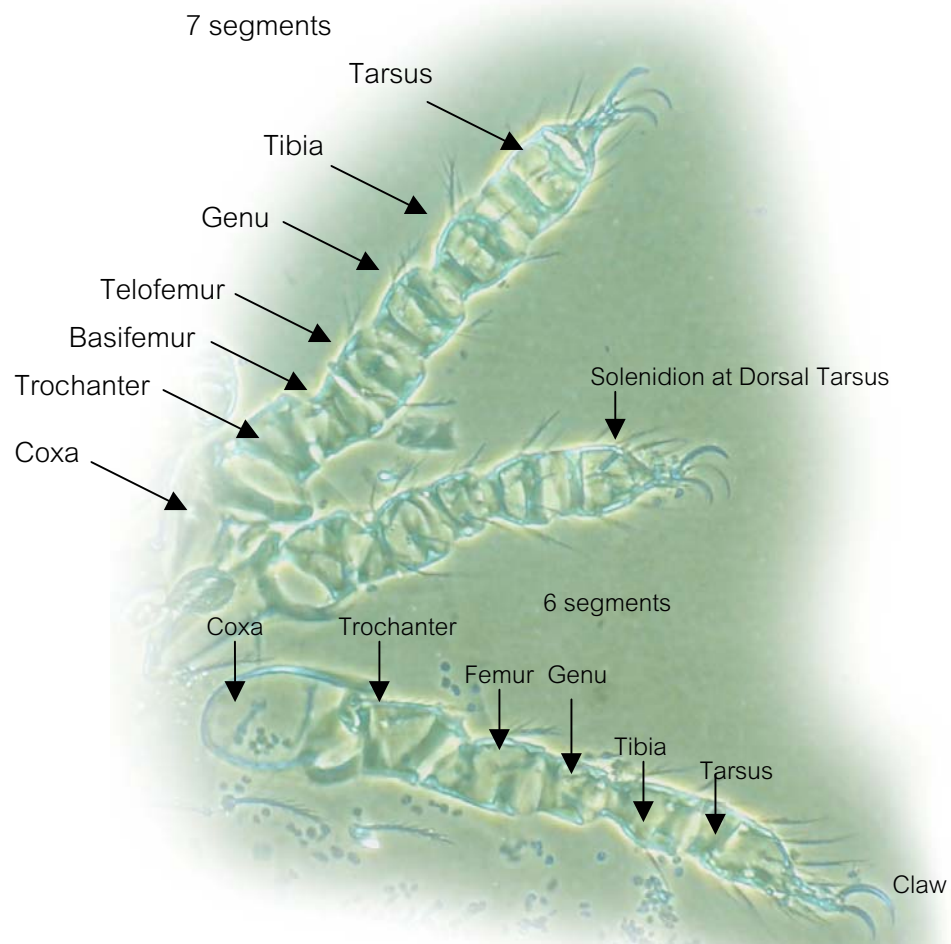
ภาพที่ 4.4 แสดงโครงสร้างของตัวไร



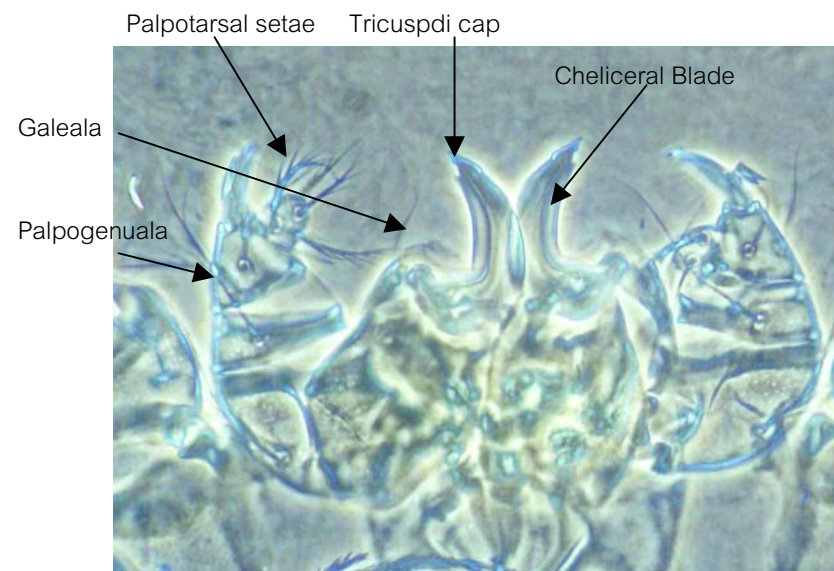
ภาพที่ 4.5 แสดงส่วนต่างๆของ Gnathosome



ภาพที่ 4.6 แสดงส่วนขนชนิดต่างๆ บน Scutum



ภาพที่ 4.7 แสดงขาซึ่งประกอบด้วย 6-7 ปล้อง



ภาพที่ 4.8 แสดงส่วนขนในตำแหน่งต่างๆบน Gnathosoma

4.6 การจำแนกชนิดของไรอ่อนด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

ในการจำแนกชนิดของไรอ่อนอาศัย Key แบบ Wharton and Fuller (1952) และ แบบ Vercammen-GrandJean(1968) ร่วมกันในการตรวจสอบตัวอย่างไรอ่อน ดังนี้

4.6.1 แบบ Wharton and Fuller (1952) ได้จำแนกชนิดของไรใน Family Trombiculidae โดยจัดกลุ่มในระดับ Subfamily ด้วยการใช้จำนวนปล้องของขาคู่ที่ 1 2 และ 3 จำนวนเส้นขน ที่ ข้อขา ที่ 1 (Coxa) จำนวนขนที่ Submedian anterior scutum และ รูปร่างของแผ่นหลังเป็นดัชนีในการ จำแนกออกเป็น 4 Subfamily คือ Subfamily Leeuwenhoekinae Subfamily Walchiinae Subfamily Apoloniinae และ Subfamily Trombiculinae ซึ่งแต่ละ Subfamily มีลักษณะเฉพาะดังต่อไปนี้

1. Subfamily Leeuwenhoekinae จะมีจำนวนปล้องขาที่คู่ที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 6 6 6 และมีขนบน Coxa ของขาคู่ที่ 1 จำนวน 2 เส้น
2. Subfamily Walchiinae จะมีจำนวนปล้องขาที่คู่ที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 7 6 6
3. Subfamily Apoloniinae จะมีจำนวนปล้องขาที่คู่ที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 7 7 7 และมีขน Submedian anterior scutal seta จำนวน 2 เส้น และ ส่วนยื่นที่ขอบบนของแผ่นหลัง (anterior median projection)
4. Subfamily Trombiculinae จะมีจำนวนปล้องขาที่คู่ที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 7 7 7 เช่นเดียวกันกับ Subfamily Apoloniinae แต่ไม่มีขน Submedian anterior scutal setae และไม่มี anterior median projection

สำหรับในระดับ Genus นั้นได้ใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนก คือ กรงเล็บที่ขา(Empodium claw) กรงเล็บที่ปาก (Palpal claw) เส้นขนบนแผ่นหลัง ลักษณะของเส้นขน sensillae ตา แผ่น caudal plate จำนวนเส้นขนที่ปล้องแรกของขาคู่ที่ 2 (Coxa II seta) ลักษณะของเขี้ยว การจำแนกตามแบบของ Wharton และ Fuller ได้จำแนกชนิดต่างๆ ไว้ดังนี้

Family	Subfamily	Genus	Subgenus
Trombiculidae	-Leeuwenhoekinae	-Leeuwenhoekia-----	-Leeuwenhoekia
		-Chatia	-Comatacarus
		-Odontacarus	
		-Whartonia	
		-Acomatacarus	
	-Walchiinae	-Hannemania	
		-Walchiella	
		-Walchia	
		-Schoengastia	
		-Gahrlepiea	
	-Apoloniinae	-Womersia	
		ปล้องขา(7 7 7)	-Apolonia
		แผ่นหลัง	-Sauracarella
		-มีขน AM 2 เส้น	
	-Trombiculinae	-Riedlinia	
		ปล้องขา(7 7 7)	-Mackiena
		แผ่นหลัง	

Family	Subfamily	Genus	Subgenus
		- <i>Oenoschoengastia</i>	
		- <i>Myotrombicula</i>	
		- <i>Heaslipia</i>	
		- <i>Guntherana</i>	
		- <i>Neoschoengastia</i>	
		- <i>Doloisia</i>	- <i>Crotiscella</i>
		- <i>Euschoengastia</i>	- <i>Fonsecsia</i>
		- <i>Ascoschoengastia</i>	- <i>Trombiculindus</i>
		- <i>Schoengastia</i>	- <i>Eutrombicula</i>
		- <i>Endotrombicula</i>	- <i>Leptotrombidium</i>
		- <i>Novotrombicula</i>	- <i>Trombicula</i>
		- <i>Tecomatlana</i>	- <i>Blankaartia</i>
		- <i>Trombicula</i> -----	- <i>Neotrombicula</i>

4.6.2 แบบ Vercammen-GrandJean(1968) ได้รวบรวมจัดทำ key ประกอบภาพแสดงลักษณะเฉพาะของไรที่ใช้ในการจำแนกหมวดหมู่ โดยได้รวบรวมไรชนิดต่างๆที่พบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงเริ่มจำแนกจากในระดับ Family ได้ใช้ลักษณะของแผ่นหลังเป็นหลักในการจำแนก คือ Family Trombiculidae จะไม่มีเส้นขน Anteromedian seta(AM) หรือ มีเพียง 1 เส้น และมีแผ่นหลังที่ไม่มี Nasus (ติ่งยื่นที่กึ่งกลางขอบด้านบน) และ Family Leuwenhoekidae จะมีเส้นขน Anteromedian seta 2 เส้น หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง หรือทั้งสองลักษณะ

Family Trombiculidae ได้ใช้ลักษณะการมีขน AM เป็นหลักในการจำแนก ในระดับ Subfamily คือ Subfamily Trombiculinae มีขน AM 1 เส้น ในขณะที่ Subfamily Gahrlepiinae ไม่มีขน AM

สำหรับ Subfamily Trombiculinae จะแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม โดยใช้ลักษณะเส้นขน Sensilla เป็นหลักในการจำแนก คือ

- Tribe Trombiculini จะมีลักษณะเส้นขน Sensilla เป็นเส้นเรียว
- Tribe Schoengastiini จะมีลักษณะเส้นขน Sensilla แผ่นแบนแตกเป็นพู่ทรงกลม

Family Leeuwenhoekidae ได้ใช้จำนวนปล้องขา เป็นหลักในการจำแนก คือ Subfamily Leewenhoekiinae จะมีจำนวนปล้องขา เท่ากับ 6 6 6 (คู่ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ) ส่วน Subfamily Apoloniinae จะมีจำนวนปล้องขา เป็น 7 7 7

สำหรับ Subfamily Leewenhoekiinae จะแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม โดยใช้ลักษณะของเขี้ยว (chericeral blade) เป็นหลักในการจำแนก คือ

- Tribe Leewenhoekiini จะมีส่วนแนวหยักเป็นฟันเลื่อยบนเขี้ยวยาวเกินกว่าครึ่งของความยาวแท่งเขี้ยว
- Tribe Whartoniini จะมีส่วนแนวหยักเป็นฟันเลื่อยบนเขี้ยวยาวเกินกว่าครึ่งของความยาวเขี้ยวยาวประมาณ 1 ใน 4 ของความยาวแท่งเขี้ยว

สำหรับ Subfamily Apoloniinae จะแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม โดยใช้ลักษณะของเส้นขน Sensilla เป็นหลักในการจำแนก คือ

- Tribe Apoloniini จะมีลักษณะเส้นขน Sensilla เป็นเส้นเรียวยาว
- Tribe Sauracarellini จะมีลักษณะเส้นขน Sensilla แตกเป็นพู่ทรงกลม

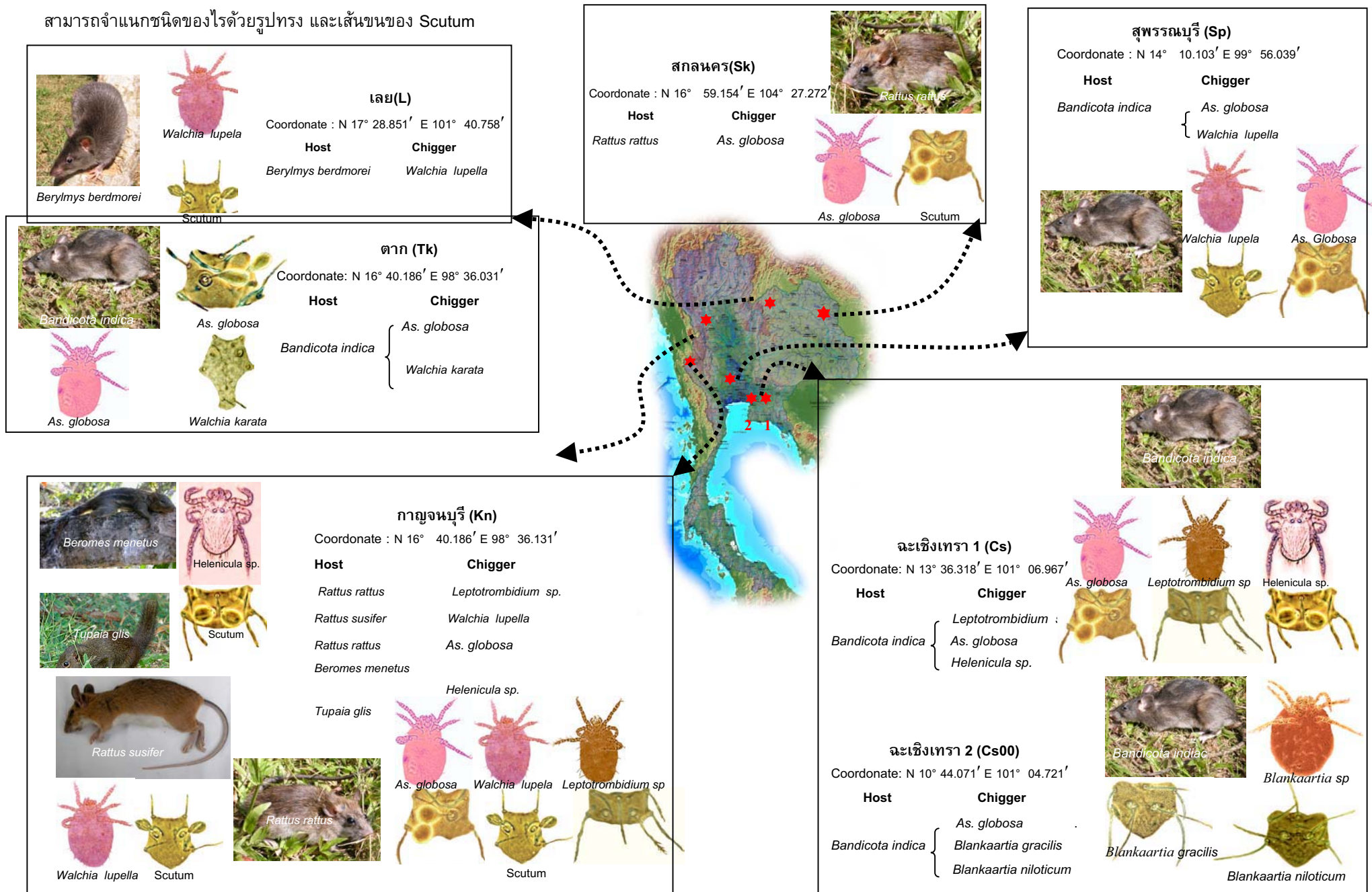
การจำแนกตามแบบของ Vercammen – Grand Jean ได้จำแนกชนิดต่างๆ ไว้ดังนี้

Family	Subfamily	Tribe	Complex	Genus	Subgenus
Trombiculidae -ไม่มีเส้นขน Anteromedian seta(AM) หรือ มีเพียง 1 เส้น -มีแผ่นหลังที่ไม่มี Nasus ส่วนตรงกลางขอบด้านบนยื่นเป็นติ่งออกไป	-Trombiculinae	-Trombiculidae	-Trombicula Complex	-Tecomatalana -Trombicula	-Cotrombicula -Dipletria -Trombicula
			-Blankaartia Complex	-Blankaartia	-Blankaartia -Megaciella
				-Miyatrombicula	-Miyatrombicula -Miyacarus
				-Vercammenia	
			-Eutrombicula Complex	-Eutrombicula	-Eutrombicula -Sieeca
				-Babiangia	-Babiangia -Vatacarus -Iguanacarus
				-Fonsecia	-Fonsecia
				-Eltonella	-Eltonella
				Microtrombicula	
			-Helslipia Complex	-Helslipia	-Helslipia
				-Croticus	
			-Leptotrombidium	-Leptotrombidium	-Ericotrombidium -Letotrombidium -Trombiculindus -Hypotrombidium
				-Toritrombicula	-Toritrombicula -Cotrombicula -Whatonacarus
				-Myotrombicula	-Myotrombicula
			-Neotrombicula Complex	-Neotrombicula	-Neotrombicula
				-Hexidionis	
		-Schoengastiini	-Schoengastia Complex	-Schoengastia	
				-Walchiella	
				-Herpetacarus	-Abonnencia -Cricacarus
				-Ascoschoengastia	-Paraschoengastia -Ascoschoengastia
			-Dolosisia Complex	-Euschoengastia	
				-Schoutedenichia	
				-Dolosisia	-Dolosisia -Trisetosisia
				-Cheladonta	
			-Guntherana Complex	-Cordiseta	
				-Helenicula	
				-Guntherana	-Guntherana -Susa
			-Neoschoengastia	-Neoschoengastia	- -Neoschoengastia -Hypogastia
				-Mackiena	-Mackiena
				-Tinpinna	
			-Riedlinia Complex	-Riedlinia	-Riedlinia

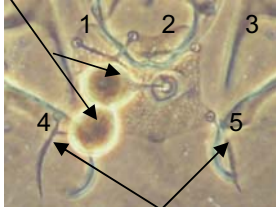
Family	Subfamily	Tribe	Complex	Genus	Subgenus
					- <i>Trombigastia</i>
				- <i>Trisectica</i>	
	- <i>Gahrlepiinae</i>			- <i>Walchia</i>	- <i>Walchia</i> - <i>Ripiaspichia</i> - <i>Evansichia</i>
	ไม่มีขน AM			- <i>Schoengastiella</i>	-
				- <i>Gahrlepiea</i>	- <i>Colocynthiella</i> - <i>Gahrlepiea</i> - <i>Gateria</i> - <i>Scrobiculata</i> - <i>Lecythaspida</i>
Leewenhoekiidae	-Leewenhoekiinae	-Leewenhoekiini		- <i>Odontacarus</i>	- <i>Tarsalacarus</i>
-มีเส้นขน AM 2 เส้น -หรือแผ่นหลังมี Nasus อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือทั้งสอง ลักษณะ	จะมีจำนวนปล้องขา เท่ากับ 6 6 6	ส่วนแนวหยักเป็นฟันเลื่อยบนเขี้ยวยาวเกินกว่าครึ่ง ของความยาวเขี้ยว			- <i>Leogonius</i> - <i>Acomatacarus</i> - <i>Orochlorus</i> - <i>Sasacarus</i> - <i>Chatia</i> - <i>Shunsennia</i> - <i>Parashunsennia</i>
		-Whartoniini ส่วนแนวหยักฟันเลื่อยยาวประมาณ 1 ใน 4 ของ ความยาวเขี้ยว		- <i>Batracarus</i> - <i>Whartonia</i>	- <i>Whartonia</i> - <i>Asolentria</i>
	-Apoloniinae มีจำนวนปล้องขา เท่ากับ 7 7 7	-Apoloniini เส้นขน Sensilla เป็นเส้นเรียว			
		Sauracarellini เส้นขน Sensillaแผ่ เป็นพู่			

ผลการจำแนกชนิดของไรอ่อนด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาจากแหล่งใน 5 จังหวัดของประเทศไทย จากสัตว์ฟันแทะ หนูป่า (*Berylmys berdmorei*); หนูท้องขาว (*Rattus rattus*), หนูพุกใหญ่ (*Bandicota indica*), กระรอก (*Beromys menetus*) และ กระจ๊วน (*Tupaia glis*) พบว่ามี 7 สปีชีส์ คือ *Ascoschoengastia globola*, *Walchia lupella*, *Walchia kalrata*, *Trombicula* (*Blankaartia*) *gracilis*, *Trombicula* (*Blankaartia*) *niloticum*, *Letotrombidium* sp. และ *Helenicula* sp. ใน 4 จินัส ดังนี้ *Ascoschoengastia* sp., *Walchia* sp., *Trombicula* sp. และ *Helenicula* sp. โดยที่ *Trombicula* sp. พบตัวอย่างใน 2 subgenus คือ Subgenus *Blankaartia* กับ Subgenus *Leptotrombidium* (ตารางที่ 4.1) และยังพบอีกว่า *Ascoschoengastia globosa* เป็นชนิดที่มีการกระจายมากที่สุด คือ พบในทุกพื้นที่ยกเว้นที่ จ. เลย และพบ *Walchia kalrata* ซึ่งเป็นไรอ่อนในกลุ่ม *Walchia* sp. ที่พบที่จังหวัดตากเท่านั้น และได้สรุปรายละเอียดชนิดของ Host, สถานที่เก็บตัวอย่าง, ชนิดของไรอ่อนที่พบและลักษณะสัณฐานวิทยาที่เป็นเครื่องบ่งชี้ชนิดของไรดังกล่าวที่ 4.9

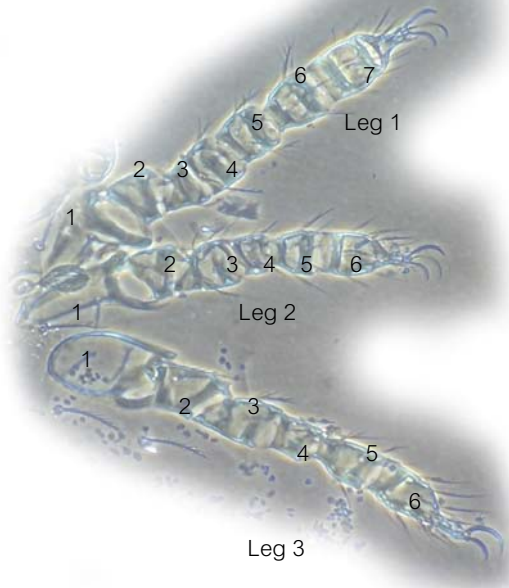
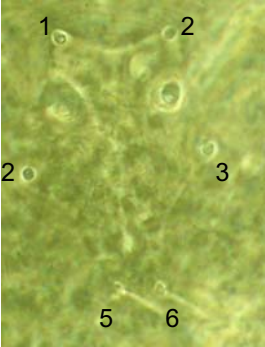
ภาพที่ 4.9 แสดงการกระจายของไรชนิดต่างๆ ตามแหล่งที่สำรวจ สามารถจำแนกชนิดของไรด้วยรูปทรง และเส้นขนของ Scutum



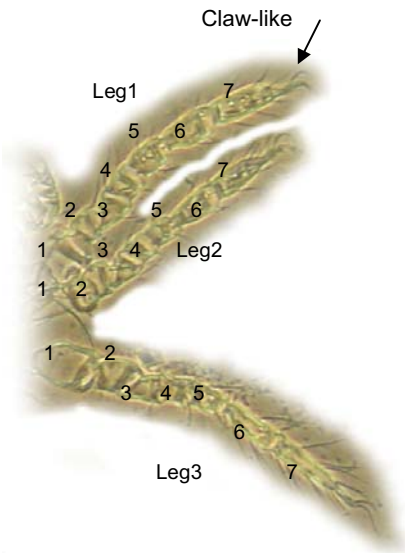
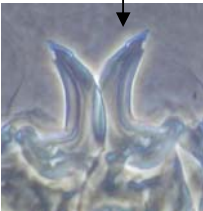
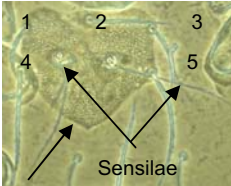
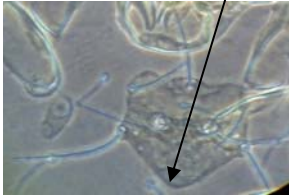
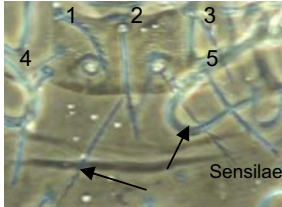
ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะที่สำคัญพบจากตัวอย่างและใช้ในการจำแนกใน Genus *Ascoschoengastia* (*As. globosa*, Nadchatram and Domrow, 1964.) และ Genus *Helenicula* (*Helenicula* sp.) ทั้งสอง Genus มีลักษณะเฉพาะ คือ ขน Sensila มีลักษณะเป็นพู่ ที่ส่วนปลาย ข้อแตกต่างที่ชัดเจนระหว่าง 2 Genus คือ *Helenicula* sp. ขน Sensilae ชิดกันมาก ส่วน *Ascoschoengastia* sp. จะมีระยะห่างระหว่างขน Sensilae มากกว่าอย่างชัดเจน

-จำนวนปล้องขาที่ 1 2 และ 3 7 7 7 -Claw-like empodium	- Sword-like chelicera ส่วนปลายมี หยักเว้า 1 แห่ง	Scutum -ไม่มี Anterior median projection - มีขน scutal setae 5 เส้น -(AL) อยู่นอกขอบแผ่นหลัง - Sensilae(s) ที่ส่วนปลายแตกเป็น พุ่ม (Globose) -แผ่นหลังลอยอยู่เหนือชั้นผิวหนัง(เห็นเส้นขอบหลังชัดเจน)	เปรียบเทียบScutum ของทั้งสองGenus ระยะห่างระหว่างขน Sensilae	-Coxa ขาคู่ที่ 2 มีขน Coxa II seta จำนวน 1 เส้น
	Sword-like chelicera 	<i>Ascoschoengastia globosa</i> ๗ S เป็นรูปทรงกลม 	<i>Ascoschoengastia</i> sp.  Sensila อยู่ห่างกัน ชัดเจน <i>Helenicula</i> sp.  Sensila อยู่ชิดกัน	Coxa II seta 

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะที่สำคัญที่พบจากตัวอย่างและใช้ในการจำแนกใน Genus *Walchia* (*Walchia lupella*, Traub and Evans, 1957 และ *Walchia kalrata*)

จำนวนปล้องขาที่ 1 2 และ 3 : 7 6 6	Sword-like Chelicera ส่วนปลายมีหยักเว้า 1 แห่ง	Scutum -ไม่มี Anterior median projection -ไม่มี Anteromedian scutal seta (AM) -มีขน scutal setae 4 เส้น -Sensila ที่ส่วนปลายแตกเป็นพุ่ม	Scutum ขอบล่างยื่นยาว มีsetae 6 เส้น
	Sword-like Chelicera 	Sensilae  <i>Walchia lupella</i>	 <i>Walchia kalrata</i>

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะที่สำคัญที่พบจากตัวอย่างและใช้ในการจำแนกใน Genus *Trombicula* จากการศึกษารูปตัวอย่างที่อยู่ใน Subgenus *Leptotrombidium* และ Subgenus *Blankaartia* ซึ่งจะมีลักษณะส่วนใหญ่คล้ายกัน อย่างไรก็ตามใน 2 Genus นี้จะมีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ Subgenus *Blankaartia* จะมี Scutum เป็นทรงห้าเหลี่ยม ในขณะที่ Subgenus *Leptotrombidium* จะมี Scutum เป็นทรงสี่เหลี่ยม พบตัวอย่างใน Subgenus *Blankaartia* 2 species; *Blankaartia niloticum*, Tragardh, 1904 กับ *Blankaartia gracillis* V-G, 1960 ซึ่งแตกต่างกันที่มุมด้านล่างของแผ่นหลัง (ลักษณะโค้งมน กับ แแหลมเป็นมุม)

-จำนวนปล้องขาคู่ที่ 1 2 และ 3 : 7 7 7 - Claw-like empodium	Sword-like Chelicera	Scutum -ไม่มี Anterior median projection - มีขน scutal setae 5 เส้น - Sensillae เป็นเส้นเรียว(Flageliform)	-Coxa I,II มี seta 1 เส้น	- Palpal Claw bifurcate-axial prongอยู่ด้านใน หรือ trifurcate -Galeal setae แตกแขนงคล้ายขนนก (Subgenus <i>Leptotrombidium</i>)
	Sword-like Chelicera 	<i>Blankaartia niloticum</i>  ส่วนยอดเป็นมุมแหลม ส่วนยอดกลมมน <i>Blankaartia gracilli</i>  <i>Leptotrombidium</i> sp 	 Coxa I Coxa II Coxa III	 axial prongอยู่ด้านใน  Galeal setae(Feathered)

4.7 พัฒนาเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของไร

การศึกษาไรอ่อนที่เกี่ยวข้องกับการแพทย์ได้เริ่มในช่วงปี 2505-2512 โดยองค์การสนธิสัญญาป้องกันเอเชียอาคเนย์ (SEATO) ซึ่งได้สำรวจชนิดของไรอ่อน(chigger : Trombiculidae) นั้นเป็นการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับชีววิทยา นิเวศวิทยา โดยได้เน้นหนักไปในทางการสำรวจและวิเคราะห์ชนิดของไรอ่อนเป็นหลัก (อังศุมาลย์ จันทราปัติย์ 2535) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาการประยุกต์ใช้สารเคมีเพื่อควบคุมไรอ่อน ตลอดจนการศึกษาระบาดวิทยาของโรค scrub typhus ในประชากรของไร อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับไรที่เป็นพาหะนำโรคเหล่านี้ในประเทศไทยยังอยู่ในวงจำกัดเนื่องมาจากความยุ่งยากในการศึกษา การจำแนกชนิดของไรซึ่งอาศัย รูปร่าง จำนวน ขนาด ของเส้นขน ตามส่วนต่างๆของไร (Wharton and Fuller 1952 ; Vercammen-GrandJean 1968) อีกทั้งนักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านมีน้อย นอกจากนั้นความคลาดเคลื่อนในการจำแนกลักษณะด้วยสายตาตลอดจนคุณภาพของกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ และความลำเอียงในการตัดสินลักษณะที่เห็นในแต่ละขณะ อารมณ์ของนักอนุกรมวิธานเองยังเป็นอุปสรรคในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไรที่มีความสำคัญทางการแพทย์ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคทางด้านอนุพันธุศาสตร์ของไรอ่อน

4.7.1 พัฒนาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับสกัดแยก DNA จากตัวไร

การสกัดแยก DNA จากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตมีหลักการและขั้นตอน ดังนี้ คือ การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออกเพื่อให้ DNA ไหลออกสู่สารละลายภายนอกเซลล์ จากนั้นก็ทำการแยก DNA ออกจากสารเจือปนอื่นๆ แล้วตกตะกอนแยก DNA บริสุทธิ์ออกด้วยอัลกอฮอล์ และ เก็บ DNA ที่บริสุทธิ์ไว้ในขั้นตอนต่อไป (Sambrook and Russell 2001) การสกัด DNA โดยทั่วไปอาจทำได้โดยไม่ยุ่งยากนัก สามารถสกัดจากส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น จากส่วนขาของยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* (Walton et al. 1999) สำหรับไรในกลุ่ม Trombiculidae นี้มีขนาดลำตัวยาว 150-300 ไมครอน ถ้ามองด้วยตาเปล่าจะเห็นเท่ากับเม็ดละอองฝุ่น เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ DNA ที่มาจากไรหลายชนิด การศึกษานี้จึงต้องใช้ไร 1 ตัวต่อ 1 ตัวอย่าง ดังนั้น DNA ที่ได้จะมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับการสกัด DNA จากสิ่งมีชีวิตอื่นโดยทั่วไป วิธีที่เหมาะสมควรจะมีการสูญเสียของ DNA น้อยระหว่างขั้นตอนการสกัด มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน และได้ DNA ที่มีคุณภาพที่สามารถนำไปใช้กับเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกวิธี Salting-out methods โดยได้ปรับปริมาณสารสกัดต่างๆ ให้เหมาะสมกับขนาดของตัวไร โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ทำความสะอาดผิวนอกตัวไร

ทำความสะอาดตัวไรโดยแช่ตัวไรในสารละลาย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 3% โดยมวลต่อปริมาตร เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลายเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆที่ติดอยู่ภายนอกตัวไร จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างสารฟอกขาวออก

ขั้นตอนที่ 2 สลายเยื่อหุ้มเซลล์

โดยใช้ lysis buffer ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท detergent ที่มีสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกและปลดปล่อย DNA ออกสู่สารละลายภายนอก ใส่ไธออน 1 ตัวลงในหลอด microfuge tube ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วที่มีสารละลาย lysis buffer* อยู่ 20 μ l แล้วนำไปบ่มที่ 55°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วเติมสารละลาย lysis buffer อีก 20 μ l กับ proteinase K (5 mg/ml) ปริมาตร 0.8 μ l (final conc = 100 μ g/ml) และผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 55°C เพื่อให้ DNA แตกออกจากเซลล์ให้มากที่สุด เมื่อตรวจดูจะเห็นเฉพาะเปลือกนอกของตัวไรในสารละลาย เมื่อสารละลายเย็นลงให้เติม 0.4 mg/ml RNase ปริมาตร 1 μ l แล้วบ่มที่ 55°C เป็นเวลา 30 นาที

ขั้นตอนที่ 3 แยกโปรตีนออกโดยการตกตะกอนกับสารละลายเกลือ

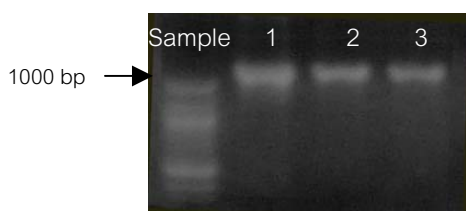
เติมสารละลาย Potassium acetate** ปริมาตร 10 μ l แล้วผสมให้เข้ากันอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex 20 วินาที แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำหลอดไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 10 นาที สังเกตเห็นตะกอนสีขาวที่ก้นหลอด ดูดสารละลายด้านบนใส่หลอดอันใหม่

ขั้นตอนที่ 4 ตกตะกอนแยก DNA บริสุทธิ์

เติมสารละลาย glycogen (0.2 mg/ml) ปริมาตร 0.3 μ l และ isopropanol ปริมาตร 40 μ l ลงในหลอด DNA ที่แยกตะกอนโปรตีนออกแล้วบ่มที่ -20°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดสารละลายทิ้ง จะเหลือ DNA ติดที่ก้นหลอดซึ่งมองไม่เห็น จากนั้นล้างตะกอน DNA โดยเติม 70% ethanol ที่แช่เย็น ผสมโดยพลิกหลอดไปมาเบาๆ แล้วนำไปปั่นที่ 4°C ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 3 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งไป และปล่อยให้ตะกอน DNA แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที และเติมสารละลาย TE (pH 7.6) ปริมาตร 20 μ l แล้วบ่มที่ 65°C เวลา 1 ชม. ก็สามารถนำ DNA ไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้ หรือเก็บที่ -20°C

ผลตรวจสอบปริมาณ DNA จาก 16 ตัวอย่าง ด้วยชุดทดสอบ “DNA Dipstick” (Invitrogen) พบว่า ได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น DNA = 0.8 ng/ μ l ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) = 0.37 นั่นคือปริมาณ DNA ต่อไร 1 ตัว = 16 ng

การตรวจสอบคุณภาพของ DNA โดยนำไปใช้ทำ PCR (nested) โดยใช้ DNA Template ปริมาตร 2 μ l ในปฏิกิริยา 25 μ l และนำมาตรวจสอบผลด้วย gel electrophoresis ปริมาตร 5 μ l ได้ผลดังภาพ 4.10 นอกจากนั้นยังสามารถนำผลผลิตดังกล่าวไปวิเคราะห์หาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไปได้



ภาพ 4.10 แสดงผลผลิต PCR เป็น DNA จากยีน 18S ขนาด ~1500 bp จากตัวอย่าง DNA ที่สกัดโดยวิธีที่พัฒนาสำหรับไธออน

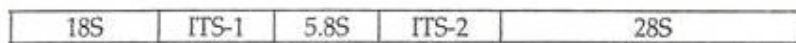
* lysis buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0) และ 0.1% (w/v) SDS

** Potassium acetate solution ประกอบด้วย 60 ml of 5 M potassium acetate 11.5 ml of glacial acetic acid และ 28.5 ml of H₂O

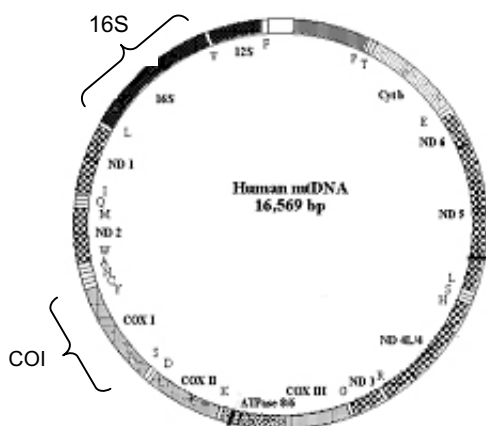
(Sambrook and Russell 2001)

4.7.2 การพัฒนาเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของยีนที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ ลักษณะของไร่อ่อน

ในการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตซึ่งอาศัยลำดับเบสในสาย DNA เป็นตัวบ่งชี้จะต้องเลือกยีนที่จะใช้เป็นดัชนีให้เหมาะสมก่อนอื่นเป็นลำดับแรก เนื่องจากในแต่ยีนซึ่งอยู่ในตำแหน่งต่างๆ กันบนแท่งโครโมโซมจะทำหน้าที่เฉพาะของตนเอง ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเชิงวิวัฒนาการที่ความแตกต่างกันตามแต่บทบาทหน้าที่ของยีนนั้นๆ นั่นคือยีนต่างๆ จะอยู่ภายใต้อำนาจการคัดเลือก (selective force) ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (closely related taxa) ควรเลือกยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงเชิงวิวัฒนาการที่สูง ในทางตรงข้ามในกรณีของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ห่างกันมาก (distantly related taxa) ควรเลือกยีนที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงเชิงวิวัฒนาการต่ำ (highly conserved gene) (Hwang and KIM 1999 ; Navajas and Fenton 2000) ในการศึกษาจึงเลือกพัฒนาเทคนิคโดยเลือก ribosomal RNA gene และ mitochondrial gene เป็นหลัก ribosomal RNA gene ประกอบด้วยยีนสำหรับ ribosomal sub unit 18S 5.8S และ 28S โดยที่จะมี ITS1(intertranscribed spacer 1) กั้นอยู่ระหว่างกลางระหว่างยีน 18S กับ ยีน 5.8S และมี ITS2(intertranscribed spacer 2) กั้นอยู่ระหว่างกลางระหว่างยีน 5.8S กับ 28S ดังภาพที่ 4.10 ในส่วนของ mitochondrial gene นั้นเป็นประกอบด้วย DNA ที่มีรูปร่างเป็นวงกลมประกอบด้วยยีนหลายชนิด เช่น 16S RNA 12S RNA Cytochrome oxidase I-III(CO I-III) ATPsynthetase ฯลฯ แต่ที่เหมาะสมกับการศึกษาเชิงวิวัฒนาการของไร่อ่อนคือ 16S กับ COI มีตำแหน่งดังภาพที่ 4.12 ทั้ง ribosomal RNA gene และ mitochondrial gene ระหว่างกลุ่มของไร่อ่อนในระดับ family ลงไปจนถึงระดับสปีชีส์และประชากร และเนื่องจากทั้ง ribosomal RNA gene และ mitochondrial gene มีลำดับเบสซ้ำกันหลายชุดบนโครโมโซมทำให้ง่ายต่อการตรวจหา



ภาพที่ 4.11 แสดงตำแหน่งของยีนต่างๆ บนส่วนของ rDNA (Hillis et al.1996)



ภาพที่ 4.12 แสดงตำแหน่งของยีน 16S และ COI mitochondrial DNA (Hartwell et al. 2000)



ภาพที่ 4.13 แสดงผลผลิต PCR ได้ DNA จากยีน COI ขนาดโมเลกุลประมาณ 400 bp จากปฏิกิริยา PCR ของตัวไร (1)= DNA จากตัวไร (2) = DNA จากตัวเห็บ

จากการทดสอบในเบื้องต้นพบความเป็นไปได้ที่จะใช้ยีน 18S (ภาพที่ 4.10) ITS2 และ COI เป็นดัชนีในศึกษาและการตรวจสอบสายพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 4.13)

จะเห็นได้ว่าเทคนิค PCR ที่พัฒนาได้สามารถนำไปใช้ศึกษาตัวไรในระดับโมเลกุลได้โดยใช้ยีน 18S RNA ยีน COI และ ITS2 ได้ แต่สำหรับยีน ITS2 นั้นมีขนาดประมาณ 100 bp อาจได้ข้อมูลไม่เพียงพอและยังให้ผลผลิต DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน 2 ขนาดเป็นอย่างน้อยในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต้องอาศัยวิธี Gel electrophoresis ที่มีการสูญเสียปริมาณ DNA มากและยุ่งยากกว่า ในส่วนของยีน COI จะให้ผลผลิต DNA ที่มีขนาดประมาณ 400 bp และทำปฏิกิริยาเพียงรอบเดียวซึ่งจะต้องใช้ DNA template ปริมาณมากเพื่อที่จะได้ผลผลิต PCR ที่เพียงพอในการดำเนินการในขั้นตอนต่อไป ในขณะที่ยีน 18S RNA มีขนาดประมาณ 1500 bp และสามารถทำ Nested PCR ได้ดังนั้นใช้ยีน 18S RNA น่าจะเหมาะสมที่สุด

4.7.3 การสำรวจข้อมูลระดับโมเลกุลของไรในเบื้องต้นโดยเลือกยีน 18S RNA

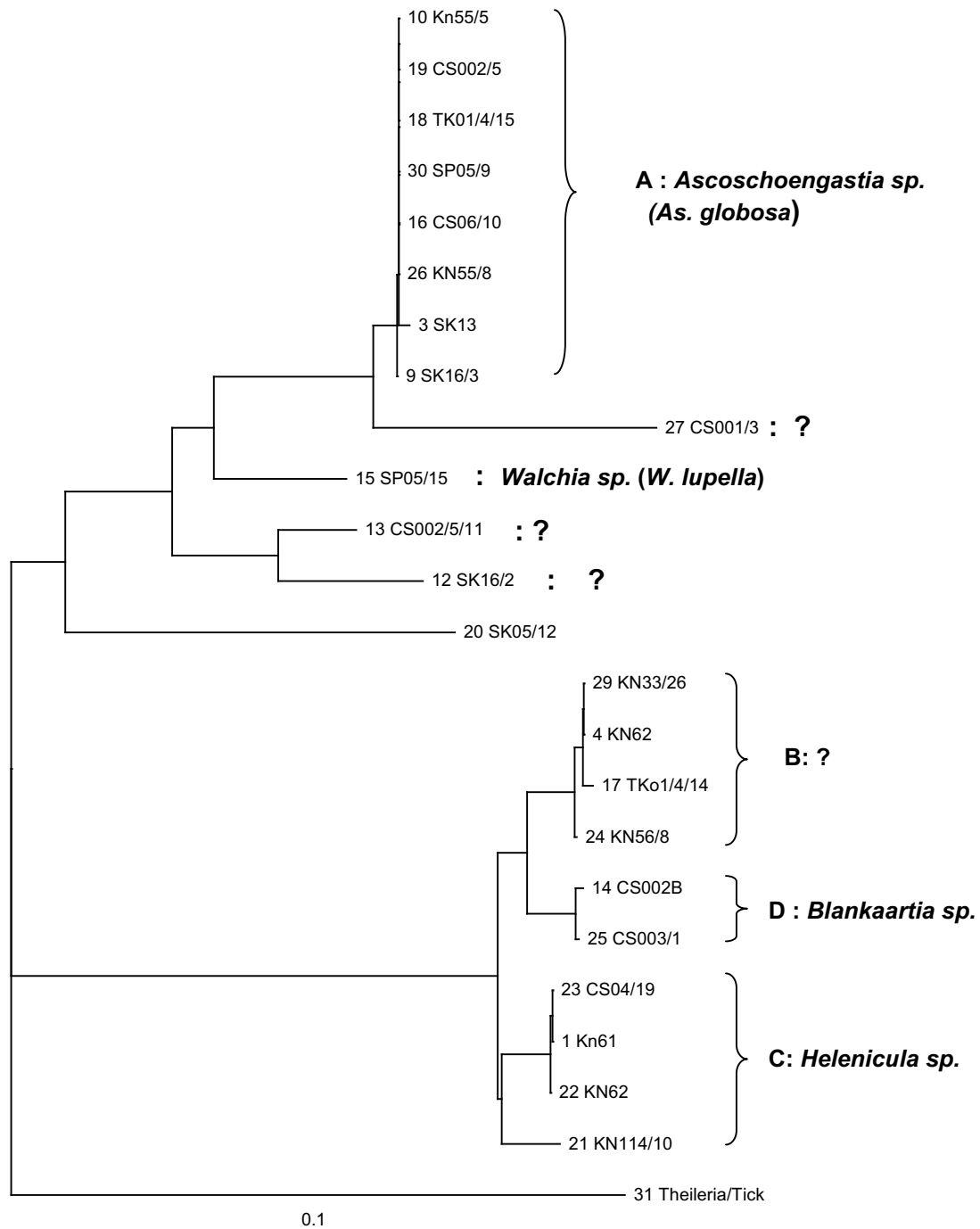
ดำเนินการตามขั้นตอน (ภาพที่ 4.14) โดยได้ใช้ nested PCR ด้วย primer ดังนี้ คือ NS1/forward (Black et al. 1997) กับ 28S/reverse (Navajas et al.1999) สำหรับปฏิกิริยา PCR ในรอบแรก ส่วนในรอบที่สอง สำหรับยีน 18S ในปฏิกิริยา PCR รอบที่ 2 ใช้ primer NS1/forward กับ NS8/reverse (Black et al.1997) นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปหาลำดับเบสจากส่วนของยีน 18S RNA โดยใช้ Forward primer ตามวิธีของ ABI PrismDye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit ด้วยเครื่อง ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)

จากความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ และได้นำมาใช้ในการศึกษากับไรตัวอย่าง โดยการตรวจหาลำดับเบสของยีน 18SrRNA เมื่อนำผล chromatograph ที่ได้จากการหาลำดับเบสไปตรวจสอบด้วย software Bioedit version 7.0.5.2 (Hall, 1999) แล้วนำลำดับเบสของแต่ละสายไปทำ multiple alignment ด้วย software ClustalX version1.83 จากนั้นนำไปหาค่า Genetic identity และหาค่า Genetic distance ด้วย software DNADIST version 3.5c (ตารางที่ 4.5) และสร้าง phylogenetic tree (ภาพที่ 4.16) ลำดับเบสที่ใช้ในการวิเคราะห์มีขนาดประมาณ 585 เบส อยู่ระหว่างตำแหน่งลำดับเบสที่ 61-614 เทียบกับ 18s RNA complete sequence ของเห็บ (*Theileria sp.*) จากการวิเคราะห์พบว่าส่วนของยีน 18S RNA จากตัวไรเหล่านี้มีค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบเบส คือ A = 29% C = 20% G = 26% และ T = 25% และพบว่ามี sequence variation ของเบสในช่วงระหว่างตำแหน่งที่ 5 ถึง 60 110 ถึง 235 และ 428 ถึง 447 (ภาพที่ 4.15) และสามารถแบ่งแยกได้จากที่ต่างๆ ออกเป็น 4 กลุ่มอย่างชัดเจนคือ กลุ่ม A B C และ D โดยที่ภายในแต่ละกลุ่มจะมีระดับ genetic identity > 99% (ตารางที่ 4.5) น่าจะถือได้ว่าจัดอยู่ในระดับ species เดียวกัน ผลการวิเคราะห์ พบว่าลำดับเบสเหล่านี้เป็นส่วนของ 18s RNA gene มีขนาดโดยเฉลี่ย 562 เบสและเป็นเบสลำดับที่อยู่ระหว่าง 74 ถึง 614 เมื่อเทียบกับลำดับเบสของ 18s RNA gene ของตัวเห็บในวงศ์ *Theileria sp* และมีองค์ประกอบจากเบสชนิดต่างๆ คือ A = 28.67 % C = 20.40 % G = 25.67% และ T = 25.26% จากการอาศัยส่วนลำดับเบสของ 18s RNA gene สามารถจำแนกตัวไรออกเป็น 2 กลุ่ม มีค่า Genetic Distance เฉลี่ย = 0.186 (18.6%) กลุ่มแรกประกอบด้วยตัวอย่างหมายเลข 22,

23, 1, 21, 14, 25, 4, 24, 17, 29 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างหมายเลข 20, 13, 12, 15, 27, 9, 3, 26, 16, 18, 10, 19, 30 จากภาพที่ 4.15 และตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่มีค่า Genetic Distance ระหว่างกันน้อยมาก <0.005 (0.5%) สอดคล้องกับข้อเสนอของ Rojas et al. (2002) อาจถือว่าเป็นกลุ่มเดียวกันในระดับสปีชีส์ คือ กลุ่ม A (*As. globosa*) ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 9, 3, 26, 16., 18, 10, 19, 30 กลุ่ม B ได้แก่ ตัวอย่างหมายเลข 24, 29, 17, 4 กลุ่ม C ได้แก่ ตัวอย่างหมายเลข 22, 23, 1 และกลุ่ม D (*T. Blankaartia* sp.) ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 14, 25 ส่วนค่าเฉลี่ย Genetic Distance เฉลี่ยระหว่างกลุ่ม B กับ D เท่ากับ 0.018 (1.8%) ระหว่างกลุ่ม B กับ C (*Helenicula* sp.) เท่ากับ 0.022 (2.2%) ระหว่างกลุ่ม C กับ D เท่ากับ 0.026 (2.6%) ไม่อาจจะระบุได้ว่าเป็นกลุ่มเดียวกัน รวมถึงตัวอย่างอื่นๆที่อยู่ในตำแหน่งที่มี branch length (ภาพที่ 4.15) ชัดเจนได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 12, 13, 15, 20, 21, 27 แสดงว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ ในระดับสปีชีส์อย่างชัดเจน ข้อมูลที่ได้มานี้น้อยก็นำมาทำให้ได้ทราบถึงลำดับเบสที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ที่มีความแม่นยำสูงกว่าวิธีอื่นๆ และยังสามารถพัฒนาต่อไปเพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ที่จะช่วยให้เข้าใจถึงวิวัฒนาการของไรอ่อน ในระดับโมเลกุลที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เพราะในธรรมชาติไรมีระดับความหลากหลายสูงกว่าแมลงใน class Insecta ซึ่งจะเห็นได้จากการจัดอนุกรมวิธานของไร มีความซับซ้อนสูงมาก ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกคือ ลักษณะ จำนวน และตำแหน่งของเส้นขนเป็นหลัก โอกาสเกิดข้อผิดพลาดสูงมาก มีการเพิ่มเติมชื่อทั้งในระดับ Subgenus และ Subspecies อย่างหลากหลาย อีกทั้งการศึกษาวิจัยที่ไม่ต่อเนื่องและครอบคลุม ทำให้ผลงานบางอย่างที่เป็นข้อมูลพื้นฐาน กลุ่มไรมีความน่าสนใจ หรือแง่มุมอื่นๆ ที่มีแตกต่างจากแมลง เนื่องจากไรมีพัฒนาการของวงจรชีวิตที่ซับซ้อนหลายระดับยิ่งกว่าในแมลงโดยทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งความรู้ด้านชีววิทยาของไรในระยะตัวเต็มวัยยังคงเป็นปริศนาที่ไม่มีผู้ศึกษา เนื่องจากเป็นช่วงที่ตัวไรหากินแบบอิสระในธรรมชาติ การศึกษานี้น้อยก็น่าจะเป็นจุดเริ่มต้นในการเปิดทางให้มีการวิจัยเกี่ยวกับตัวไรในแง่มุมอื่นๆ ที่จะเกิดขึ้นอย่างแพร่หลายต่อไป



ภาพที่ 4.14 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง การสกัด DNA การหาลำดับเบส และการวิเคราะห์ลำดับเบส



ภาพที่ 4.15 Bootstrap Neighbour Joining tree ที่สร้างขึ้นจาก software package “CLAUTALX” version 1.83 แสดง phylogenetics relationships ระหว่างไรจากที่ต่างๆ * = Theileria sp.(Tick) ? = ไม่ได้จำแนกชนิด

ตารางที่ 4.5 ค่าในส่วนล่างซ้ายของตารางแสดง Nei's(1978) unbiased genetic Identities และ ค่าในส่วนบนขวาของตารางแสดง Nei's(1978) unbiased genetic distance ระหว่าง ลำดับเบสของยีน 18S rRNA** ของไร * = Tick (*Theiler sp.*)

Seq. No.	9	10	16	18	19	26	30	3	27	15	13	12	20	22	1	23	21	14	25	24	29	4	17
9	ID	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.053	0.053	0.070	0.087	0.134	0.177	0.178	0.179	0.179	0.181	0.181	0.183	0.186	0.186	0.188
10	0.990	ID	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.053	0.055	0.071	0.086	0.136	0.177	0.179	0.179	0.180	0.182	0.182	0.184	0.186	0.186	0.189
16	0.992	0.998	ID	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.053	0.055	0.070	0.085	0.136	0.177	0.179	0.179	0.179	0.181	0.181	0.183	0.186	0.186	0.188
18	0.992	0.998	1.000	ID	0.000	0.000	0.000	0.002	0.053	0.055	0.070	0.085	0.136	0.177	0.179	0.179	0.179	0.181	0.181	0.183	0.186	0.186	0.188
19	0.992	0.998	1.000	1.000	ID	0.000	0.000	0.002	0.053	0.055	0.070	0.085	0.136	0.177	0.179	0.179	0.179	0.181	0.181	0.183	0.186	0.186	0.188
26	0.992	0.998	1.000	1.000	1.000	ID	0.000	0.002	0.053	0.055	0.070	0.085	0.136	0.177	0.179	0.179	0.179	0.181	0.181	0.183	0.186	0.186	0.188
30	0.992	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	ID	0.002	0.053	0.055	0.070	0.085	0.136	0.177	0.179	0.179	0.179	0.181	0.181	0.183	0.186	0.186	0.188
3	0.991	0.992	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	ID	0.055	0.057	0.072	0.087	0.138	0.181	0.183	0.183	0.184	0.186	0.186	0.188	0.190	0.190	0.193
27	0.930	0.931	0.933	0.933	0.933	0.933	0.933	0.932	ID	0.105	0.127	0.132	0.188	0.214	0.219	0.216	0.210	0.217	0.216	0.221	0.221	0.221	0.224
15	0.932	0.932	0.933	0.933	0.933	0.933	0.933	0.932	0.879	ID	0.066	0.072	0.121	0.164	0.164	0.164	0.171	0.178	0.178	0.166	0.168	0.168	0.171
13	0.908	0.906	0.908	0.908	0.908	0.908	0.908	0.906	0.850	0.908	ID	0.038	0.118	0.172	0.171	0.171	0.179	0.189	0.189	0.181	0.184	0.184	0.181
12	0.897	0.890	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.890	0.843	0.900	0.956	ID	0.125	0.181	0.181	0.181	0.189	0.194	0.194	0.186	0.191	0.191	0.193
20	0.850	0.849	0.851	0.851	0.851	0.851	0.851	0.853	0.802	0.873	0.858	0.849	ID	0.201	0.200	0.201	0.206	0.208	0.208	0.200	0.203	0.203	0.205
22	0.815	0.816	0.818	0.818	0.818	0.818	0.818	0.815	0.784	0.836	0.808	0.801	0.796	ID	0.000	0.000	0.018	0.027	0.025	0.022	0.022	0.022	0.023
1_	0.817	0.818	0.820	0.820	0.820	0.820	0.820	0.817	0.784	0.840	0.811	0.801	0.800	0.996	ID	0.000	0.018	0.027	0.025	0.022	0.022	0.022	0.023
23	0.815	0.816	0.818	0.818	0.818	0.818	0.818	0.815	0.784	0.838	0.809	0.800	0.798	0.998	0.998	ID	0.018	0.027	0.025	0.022	0.022	0.022	0.023
21	0.815	0.816	0.818	0.818	0.818	0.818	0.818	0.815	0.787	0.833	0.804	0.794	0.794	0.977	0.977	0.978	ID	0.025	0.023	0.023	0.022	0.022	0.023
14	0.814	0.815	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.813	0.781	0.827	0.797	0.791	0.793	0.968	0.968	0.970	0.975	ID	0.002	0.020	0.018	0.018	0.020
25	0.814	0.815	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.813	0.781	0.827	0.797	0.791	0.793	0.970	0.970	0.971	0.977	0.998	ID	0.018	0.016	0.016	0.018
24	0.812	0.813	0.815	0.815	0.815	0.815	0.815	0.811	0.778	0.836	0.802	0.796	0.798	0.970	0.973	0.971	0.973	0.977	0.978	ID	0.002	0.002	0.004
29	0.810	0.811	0.813	0.813	0.813	0.813	0.813	0.810	0.778	0.834	0.801	0.792	0.796	0.973	0.973	0.975	0.978	0.982	0.984	0.994	ID	0.000	0.002
4	0.809	0.810	0.811	0.811	0.811	0.811	0.811	0.808	0.777	0.833	0.799	0.791	0.795	0.971	0.971	0.973	0.977	0.980	0.982	0.992	0.998	ID	0.002
17	0.808	0.809	0.811	0.811	0.811	0.811	0.811	0.808	0.776	0.833	0.802	0.791	0.794	0.971	0.971	0.973	0.977	0.980	0.982	0.992	0.998	0.996	ID

```

Chigger                10          20          30          40          50
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
22_KN62                ----AGTGAACCGCGAATGG-CTCATTAAATCAGTTACGGTTCCT----
23_CS04/19            ----.....-
1_Kn61                 ----.....G.....-
21_KN114/10           ----AG.....-
14_CS002B              ----AG.....-
25_CS003/1             ----AG.....-
29_KN33/26             ----AG.....-
4_KN62                 ----AG.....-
17_TK01/4/14          ----AG.....-
24_KN56/8              ----GG.....G.....-
13_CS002/5/11         ----CT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
12_SK16/2              --TCGT.AT..C.T..-G.AT.G...C...C.....TA..TA.---
10_Kn55/5              ----CT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
3_SK13                 ----CT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
26_KN55/8              ----CT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
19_CS002/5             ----CT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
18_TK01/4/15          ----CT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
16_CS06/10             ----CT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
30_SP05/9              ----CT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
9_SK16/3               --TACT.....T..-G.AT.G.....TA..TA.---
27_CS001/3             -----AGTCATAT-GC.T.T...GGG.G..T.TGCGT.TC..G.GGA
15_SP05/15             ----CT.....T.TCG.AT.G.....TA..TA.---
20_SK05/12             ----C.....T.....G.....TC...TA.---
Clustal Consensus      *  ***  *      *      *      *      *

```

```

Chigger                60          70          80          90         100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
22_KN62                --TAGATGTTTAATAATCTACATGG-ATAACTGTGG-TAATTCTAGAGCT
23_CS04/19            --.....-
1_Kn61                 --.....-
21_KN114/10           --.....C..-.....-
14_CS002B              --.....A....T..-.....-
25_CS003/1             --.....A....T..-.....-
29_KN33/26             --.....A....C..-.....-
4_KN62                 --.....A....C..-.....-
17_TK01/4/14          --.....A....C..-.....-
24_KN56/8              --.....A....C..-.....-
13_CS002/5/11         --.T...G...T--TTG.....-
12_SK16/2              --.T...G...T--TTG.....-
10_Kn55/5              --.T...G.AC--TTG.....-
3_SK13                 --.T...G.AC--TTG.....-
26_KN55/8              --.T...G.AC--TTG.....-
19_CS002/5             --.T...G.AC--TTG.....-
18_TK01/4/15          --.T...G.AC--TTG.....-
16_CS06/10             --.T...G.AC--TTG.....-
30_SP05/9              --.T...G.AC--TTG.....-
9_SK16/3               --.T...G.AC--TTG.....-
27_CS001/3            TA....G.GC--TTG.....-
15_SP05/15             --.T...G.ACC-TTG.....-
20_SK05/12             --.T...AG..CC.TTA.....G....C....G.....
Clustal Consensus      *  ***  *      *      *      *      *

```

ภาพที่ 4.16 แสดงลำดับเบสจากยีน 18s RNA ของไร จากแหล่งต่าง

“ - ” หมายถึง gap

“ . ” หมายถึง ตำแหน่งดังกล่าวมีเบสเป็นชนิดเดียวกันกับตำแหน่งที่อยู่ตรงกันในแถวด้านบน

Chigger	110	120	130	140	150
22_KN62					
23_CS04/19	AATACATGCAATTAAGCCTCGACTTTTCGGGAAGAGGTGCATTTATTAG-C				
1_Kn61					
21_KN114/10					
14_CS002B					
25_CS003/1					
29_KN33/26					
4_KN62					
17_TK01/4/14					
24_KN56/8					
13_CS002/5/11					
12_SK16/2					
10_Kn55/5					
3_SK13					
26_KN55/8					
19_CS002/5					
18_TK01/4/15					
16_CS06/10					
30_SP05/9					
9_SK16/3					
27_CS001/3					
15_SP05/15					
20_SK05/12					
Clustal Consensus	** *****	* ***	**	* *	* ****

Chigger	160	170	180	190	200
22_KN62					
23_CS04/19	-CAAGACCAACGGGGTTTTCGGACTCCTTGTCATGGTGACTCTGGATAAC				
1_Kn61					
21_KN114/10					
14_CS002B					
25_CS003/1					
29_KN33/26					
4_KN62					
17_TK01/4/14					
24_KN56/8					
13_CS002/5/11	-A..A.T...-ACTG-----T.....A..AT.....				
12_SK16/2	-A..A.T...-T.TG-----T.....A..ATA.....				
10_Kn55/5	-A..A....T-CCC..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
3_SK13	-A..A....T-CCC..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
26_KN55/8	-A..A....T-CCC..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
19_CS002/5	-A..A....T-CCC..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
18_TK01/4/15	-A..A....T-CCC..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
16_CS06/10	-A..A....T-CCC..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
30_SP05/9	-A..A....T-CCC..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
9_SK16/3	-A..A....T-CC-..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
27_CS001/3	-A..A....T-C.C..CGG..T.C-----T.....A..AT..C.TT				
15_SP05/15	AA..A....C...CG.C.CTC.A-----T.....T..ATA.....				
20_SK05/12	AA..A.T...T---C.....A-----A...T..ATA.....				
Clustal Consensus	* * ***		* *** **	* *	

ภาพที่ 4.16 (ต่อ)

Chigger	210	220	230	240	250
					
22_KN62	TTAGCTAATCGCACGGCCTATGCGCCGGCGATGAATCTTTCAAGTGTCTG				
23_CS04/19					
1_Kn61					
21_KN114/10	.G.....GA.....				
14_CS002B	.G.....A.T.....G.....				
25_CS003/1	.G.....A.T.....G.....				
29_KN33/26	.G.....G.....				
4_KN62	.G.....G.....				
17_TK01/4/14	.G.....G.....				
24_KN56/8	.G.....G.....				
13_CS002/5/11	..CT.GG.....T.....-..T..T.....ACT..A....GA.A....				
12_SK16/2	..CT.GG.C.....T.....-C.T..T....G..CT..A....A.A....				
10_Kn55/5	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
3_SK13	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
26_KN55/8	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
19_CS002/5	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
18_TK01/4/15	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
16_CS06/10	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
30_SP05/9	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
9_SK16/3	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
27_CS001/3	..CT.G.....T.....-A.T.....CT..A....A.A....				
15_SP05/15	..CT.G.....T.....-..T.....CT..A....A.A....				
20_SK05/12	C.TT.G..G.T..T...T.-.TT..T..A.C..GT..A....A.T....				

Chigger	260	270	280	290	300
					
22_KN62	CCTTATCAACTGTCGATGGTAGGTTATATGCTTACCATGGTTGTAACGGG				
23_CS04/19					
1_Kn61					
21_KN114/10					
14_CS002B					
25_CS003/1					
29_KN33/26					
4_KN62					
17_TK01/4/14					
24_KN56/8					
13_CS002/5/11	..C.....A..G.G..C.....C.....				
12_SK16/2	..C.....A..G.G..C.....C.....				
10_Kn55/5	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
3_SK13	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
26_KN55/8	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
19_CS002/5	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
18_TK01/4/15	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
16_CS06/10	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
30_SP05/9	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
9_SK16/3	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
27_CS001/3	..C.....T.....A..G.G..C.....C.....				
15_SP05/15	..C.....T.....A..G.G..C.....TC.....				
20_SK05/12	..C.....T.....A..GTG..C.....T.C.....				
Clustal Consensus	* ***** ** * ** ***** ** ** ***** ** *****				

ภาพที่ 4.16 (ต่อ)

Chigger	310	320	330	340	350
22_KN62					
23_CS04/19	TAACGGGGAATCAGGGTTCGGTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTA				
1_Kn61					
21_KN114/10					
14_CS002B					
25_CS003/1					
29_KN33/26					
4_KN62					
17_TK01/4/14					
24_KN56/8					
13_CS002/5/11	A.....A.....				
12_SK16/2	A.....A.....				
10_Kn55/5	A.....A.....				
3_SK13	A.....A.....				
26_KN55/8	A.....A.....				
19_CS002/5	A.....A.....				
18_TK01/4/15	A.....A.....				
16_CS06/10	A.....A.....				
30_SP05/9	A.....A.....				
9_SK16/3	A.....A.....				
27_CS001/3	A.....A.....				
15_SP05/15	A.....A.....				
20_SK05/12	A.....A.....				
Clustal Consensus	*****				

Chigger	360	370	380	390	400
22_KN62					
23_CS04/19	CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCACGCAAATTACCCACTCCCGGCACGG				
1_Kn61					
21_KN114/10					
14_CS002B					
25_CS003/1					
29_KN33/26					
4_KN62					
17_TK01/4/14					
24_KN56/8					
13_CS002/5/11	G.....A.....A.....				
12_SK16/2	G.....A.....AA.....				
10_Kn55/5	G.....A.....A.....				
3_SK13	G.....A.....A.....				
26_KN55/8	G.....A.....A.....				
19_CS002/5	G.....A.....A.....				
18_TK01/4/15	G.....A.....A.....				
16_CS06/10	G.....A.....A.....				
30_SP05/9	G.....A.....A.....				
9_SK16/3	G.....A.....A.....				
27_CS001/3	G.....A.....A.....				
15_SP05/15	G.....A.....A.....				
20_SK05/12	G.....A.....TAATT.A.				
Clustal Consensus	*****				

ภาพที่ 4.16 (ต่อ)

```

Chigger          410          420          430          440          450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
22_KN62          GGAGGTAAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTCATGAGGCCCGTAA
23_CS04/19      .....
1_Kn61          .....
21_KN114/10     .....T.....
14_CS002B       .....T.....
25_CS003/1      .....T.....
29_KN33/26      .....T.....
4_KN62          .....T.....
17_TK01/4/14    .....T.T.....
24_KN56/8       .....T.....
13_CS002/5/11   .....A.T.TG.....TAC.G.-T.T.-C.T.GTA...
12_SK16/2       .....A.T.TG.....TAC.G.-T.T.-C.T.GTA...
10_Kn55/5       .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
3_SK13          .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
26_KN55/8       .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
19_CS002/5      .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
18_TK01/4/15    .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
16_CS06/10      .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
30_SP05/9       .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
9_SK16/3        .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
27_CS001/3      .....A.T.....TA..G.-TTC-...T.TTA...
15_SP05/15      .....A.T.....T..G..TTC-G..T.T.A...
20_SK05/12      .....A.T.T.....G...A..G.C..TT.-G..T.TT....
Clustal Consensus ***** * * **** * * * * * * *

```

```

Chigger          460          470          480          490          500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
22_KN62          TTGGAATGAGTACAATCTAAATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAA
23_CS04/19      .....
1_Kn61          .....
21_KN114/10     .....
14_CS002B       .....
25_CS003/1      .....
29_KN33/26      .....
4_KN62          .....
17_TK01/4/14    .....
24_KN56/8       .....
13_CS002/5/11   .....T.....C.....A.A.....
12_SK16/2       .....T.....C.....A.A.....
10_Kn55/5       .....T.....C.....A.A.....
3_SK13          .....T.....C.....A.A.....
26_KN55/8       .....T.....C.....A.A.....
19_CS002/5      .....T.....C.....A.A.....
18_TK01/4/15    .....T.....C.....A.A.....
16_CS06/10      .....T.....C.....A.A.....
30_SP05/9       .....T.....C.....A.A.....
9_SK16/3        .....T.....C.....A.A.....
27_CS001/3      .....T.....C.....A.A.....
15_SP05/15      .....T.....C.....A.A.....
20_SK05/12      ...A.....G.....A.C.....A.A.....

```

ภาพที่ 4.16 (ต่อ)

```

Chigger          510          520          530          540          550
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
22_KN62          -GTCTGGTGCCAGCAGCCGC-GGTAATTCCAGCTCCAATA-GCGTATATT
23_CS04/19      -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
1_Kn61          -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
21_KN114/10     -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
14_CS002B       -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
25_CS003/1      -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
29_KN33/26      -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
4_KN62          -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
17_TK01/4/14    -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
24_KN56/8       -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
13_CS002/5/11   -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
12_SK16/2       -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
10_Kn55/5       -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
3_SK13          A.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
26_KN55/8       -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
19_CS002/5      -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
18_TK01/4/15    -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
16_CS06/10      -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
30_SP05/9       -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
9_SK16/3        -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
27_CS001/3      -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
15_SP05/15      -.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
20_SK05/12      A.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
Clustal Consensus *****

```

```

Chigger          560          570          580
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
22_KN62          AAAGTT-GTTGCGGTTAAAAA-GCTCGTAGTTGGA
23_CS04/19      .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
1_Kn61          .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
21_KN114/10     .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
14_CS002B       .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
25_CS003/1      .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
29_KN33/26      .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
4_KN62          .....T.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
17_TK01/4/14    .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
24_KN56/8       .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
13_CS002/5/11   .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
12_SK16/2       .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
10_Kn55/5       .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
3_SK13          .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
26_KN55/8       .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
19_CS002/5      .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
18_TK01/4/15    .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
16_CS06/10      .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
30_SP05/9       .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
9_SK16/3        .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
27_CS001/3      .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
15_SP05/15      .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
20_SK05/12      ...A...-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-
Clustal Consensus *** ** ***** ***** ***** ***** *** *

```

ภาพที่ 4.16 (ต่อ)

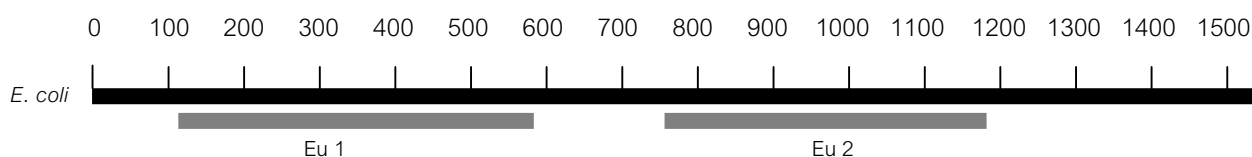
4.8 ตรวจหา Eubacteria ในตัวไร

จากการตรวจสอบ Eubacteria ที่อาจมีอยู่ในตัวของไร (*Ascoschoengastia* sp.) ที่เก็บจากตัวหนูพุกใหญ่ (*Bandicota indica*) จากจังหวัดสุพรรณบุรี ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล โดยใช้ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S RNA เป็นตัวบ่งชี้ พบว่าใน 2 ใน 30 ตัวมี Eubacteria อยู่ในร่างกาย เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสโดยนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในระบบฐานข้อมูลของ Gen Bank แล้วพบว่าลำดับเบสของ Eubacteria ที่พบอยู่ในตัวไรทั้งสองตัวนี้ (Eu1 และ Eu2) Eu1 เป็นลำดับเบสในตำแหน่งที่ 758 ถึง 1183 และ Eu2 เป็นลำดับเบสในตำแหน่งที่ 115 ถึง 585 (ภาพที่ 4.17) ของยีน 16S RNA ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Pantoea agglomerans* (ภาพที่ 1.18) กับ *Photorhabdus luminescens* (ภาพที่ 1.19) ตามลำดับ ซึ่ง Eubacteria ทั้งสองจัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae ในกลุ่ม gramma proteobacteria เนื่องจากลำดับเบส จากแบคทีเรียทั้งสองสายนี้อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน คืออยู่คนละส่วนของยีน 16S RNA จึงต้องแยกกันวิเคราะห์

ในกรณีของแบคทีเรียตัวที่ 1 (Eu1) พบว่ามีลำดับเบสคล้ายกับ *Pantoea agglomerans* (เดิมคือ *Enterobacter agglomerans*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ พบประจำอยู่ในพืช อาจก่อให้เกิดโรคข้ออักเสบ (arthritis) ในคนที่ได้รับเชื้อนี้เข้าสู่ร่างกาย (Kratz et al. 2003) อย่างไรก็ตาม อาจพบได้ในระบบทางเดินอาหารของแมลง (Straif et al. 1998) การอาศัยอยู่ของแบคทีเรียในร่างกายของแมลง อาจมีผลต่อความสามารถในการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมที่ควบคุมความสามารถในการนำโรคของแมลงก็ได้ (Pidiyar et al. 2004)

ในกรณีของแบคทีเรียในตัวที่ 2 (Eu2) พบว่า มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *E. coli* มากที่สุดโดยมีค่า genetic identity 98.09% (ตารางที่ 4.6) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียดังกล่าวยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ การที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติอื่นๆ จึงไม่สามารถทำได้ แต่จากแหล่งที่พบแล้ว Eu2 น่าจะมีความสัมพันธ์กับ *Photorhabdus luminescens* มากกว่า *E. coli* หรือ *Shigella boydii* สำหรับ *Photorhabdus spp.* นั้นเป็นแบคทีเรียที่เป็น symbiont อาศัยอยู่ในลำไส้ของตัวหนอน nematode ใน genus *Heterorhabditis* แต่จะทำอันตรายกับแมลงเมื่อเข้าสู่ระบบไหลเวียน (haemolymph) ของแมลง (Boemare et al. 1997)

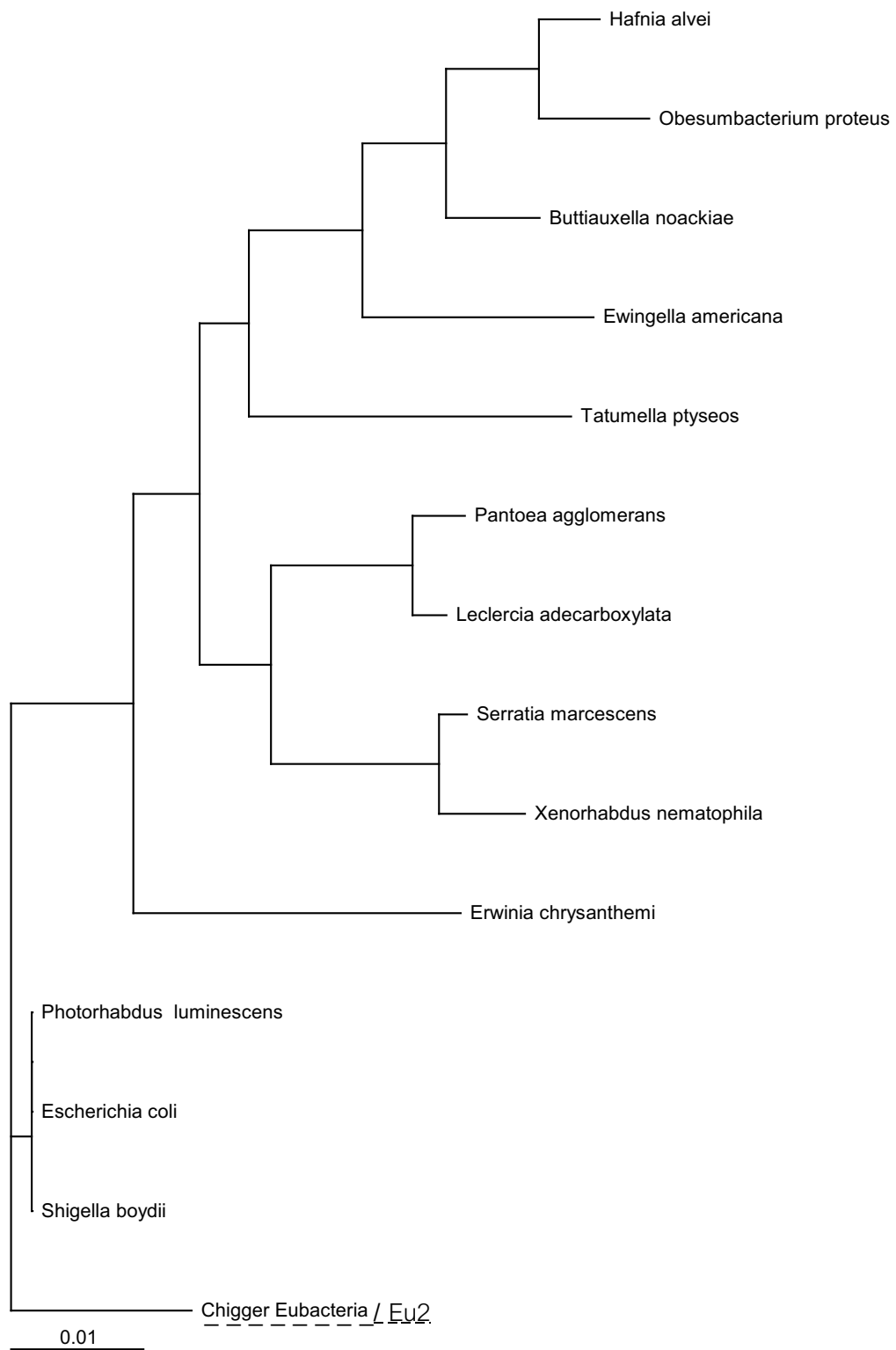
การศึกษา Eubacteria ในตัวไรนอกจากจะเป็นการตรวจหาเชื้อที่อาจก่อโรคกับคนเราแล้ว Eubacteria ที่พบนี้อาจมีผลต่อความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อ scrub typhus ของไรอ่อนซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอยู่ในปัจจุบันเพราะความเป็นอยู่ของคนเรากับไรอ่อนยังคงมีส่วนเกี่ยวข้องกันอยู่เนื่องจากการทับซ้อนของแหล่งที่อยู่อาศัยระหว่างกันอยู่



ภาพที่ 4.17 แสดงตำแหน่งของลำดับเบสส่วนของยีน 16S RNA ของ eubacteria (Eu1, Eu2) ที่ตรวจพบในตัวไรโดยเปรียบเทียบกับยีน 16S RNA ของ *E. coli* strain K12 [gi:48994873]

710	720	730	740	750	
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	701	GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA	750
<i>Eu1_16s</i>			1	-----CA	2
			760	770	780
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	751	GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG	800
<i>Eu1_16s</i>			3	GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG	52
			810	820	830
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	801	CCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGG	850
<i>Eu1_16s</i>			53	CCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGG	102
			860	870	880
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	851	AGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA	900
<i>Eu1_16s</i>			103	AGTTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA	152
			910	920	930
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	901	CTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA	950
<i>Eu1_16s</i>			153	CTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA	202
			960	970	980
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	951	TTCGATGCAACGCGAAGACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTA	1000
<i>Eu1_16s</i>			203	TTCGATGCAACGCGAAGACCTTACCTGCTCTTGCCATCCAGAGAACTTA	252
			1010	1020	1030
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	1001	GCAGAGATGCTTTGGTGCCCTTCGCGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGC	1050
<i>Eu1_16s</i>			253	CCAGAGATGCTTTGGTGCCCTTCGCGAACTGTGAGACAGGTGCTCCATGGC	302
			1060	1070	1080
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	1051	TGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC	1100
<i>Eu1_16s</i>			303	TGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC	352
			1110	1120	1130
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	1101	AACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGCGCGGGAACCTCAAAGGAGACT	1150
<i>Eu1_16s</i>			353	AACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGCGCGGGAACCTCAAAGGAGACT	402
			1160	1170	1180
<i>P.a.ChDC</i>	<i>YP1</i>	<i>16S</i>	1151	GCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC	1200
<i>Eu1_16s</i>			403	GCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGT-----	426

ภาพที่ 4.18 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ eubacteria ที่พบในไรต์วี่1(Eu1) กับ ลำดับเบสของ *Pantoea agglomerans*(*P.a.ChDC YP1*) จาก Gen Bank เทียบได้กับลำดับเบสที่ 749-1174 ของ gene 16S RNA มีความคล้ายกัน(Identities) 98% ขีดเส้นใต้ = เบสคู่เหมือนกัน



ภาพที่ 4.19 Bootstrap Neighbour Joining tree ที่สร้างขึ้นจาก software package “CLAUTALX” version 1.83 แสดง phylogenetics relationships ระหว่างแบคทีเรียจากตัวไร (Eu2) จากกับ Enterobacter อื่น ๆ

ตารางที่ 4.6 ค่าในส่วนล่างซ้ายของตารางแสดง genetic Identities และ ค่าในส่วนบนขวาของตารางแสดง genetic distance ระหว่าง ลำดับเบสของยีน 16S ของแบคทีเรีย

Seq->	Eu2	Photorhabdus_luminescens	Escherichia_coli	Shigella_boydii	Pantoea_agglomerans	Leclercia_adecarboxylata	Erwinia_chrysanthemi	Serratia_marcescens	Xenorhabdus_nematophila	Ewingella_americana	Hafnia_alvei	Tatumella_ptyseos	Buttiauxella_noackiae	Obesumbacterium_proteus
Eu2	0	0.015	0.015	0.015	0.044	0.045	0.049	0.051	0.051	0.051	0.054	0.054	0.056	0.065
Photorhabdus_luminescens	0.98	0	0	0	0.035	0.036	0.035	0.039	0.039	0.046	0.044	0.042	0.046	0.058
Escherichia_coli	0.98	1	0	0	0.035	0.036	0.035	0.039	0.039	0.046	0.044	0.042	0.046	0.058
Shigella_boydii	0.98	1	1	0	0.035	0.036	0.035	0.039	0.039	0.046	0.044	0.042	0.046	0.058
Pantoea_agglomerans	0.953	0.965	0.965	0.965	0	0.007	0.056	0.028	0.037	0.051	0.049	0.051	0.028	0.042
Leclercia_adecarboxylata	0.934	0.946	0.946	0.946	0.974	0	0.055	0.024	0.034	0.047	0.045	0.048	0.027	0.036
Erwinia_chrysanthemi	0.949	0.965	0.965	0.965	0.946	0.929	0	0.042	0.044	0.063	0.053	0.061	0.051	0.063
Serratia_marcescens	0.946	0.961	0.961	0.961	0.972	0.957	0.959	0	0.009	0.044	0.051	0.056	0.04	0.051
Xenorhabdus_nematophila	0.946	0.961	0.961	0.961	0.963	0.948	0.957	0.991	0	0.053	0.058	0.06	0.046	0.058
Ewingella_americana	0.946	0.955	0.955	0.955	0.951	0.936	0.94	0.957	0.948	0	0.026	0.049	0.037	0.035
Hafnia_alvei	0.944	0.957	0.957	0.957	0.953	0.938	0.948	0.951	0.944	0.974	0	0.056	0.024	0.013
Tatumella_ptyseos	0.944	0.959	0.959	0.959	0.951	0.936	0.942	0.946	0.942	0.953	0.946	0	0.049	0.051
Buttiauxella_noackiae	0.942	0.955	0.955	0.955	0.972	0.955	0.951	0.961	0.955	0.963	0.976	0.953	0	0.017
Obesumbacterium_proteus	0.934	0.944	0.944	0.944	0.959	0.946	0.94	0.951	0.944	0.965	0.987	0.951	0.982	0

4.9 บทสรุป

การศึกษาหาข้อมูลเบื้องต้นของไรอ่อนในประชากรธรรมชาติพบทั้งหมด 7 ชนิดที่อาศัยอยู่บนผิวหนังของสัตว์ฟันแทะพวกหนูและกระรอกจำนวน 5 ชนิดที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในบริเวณหมู่บ้านชายป่าทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และได้พัฒนาเทคนิคสกัดดีเอ็นเอจากไรอ่อนหนึ่งตัวจนมีคุณภาพดีที่สามารถนำไปวิเคราะห์ทางอนุพันธุศาสตร์ได้โดยใช้ยีน 18S rRNA เพื่อจำแนกไรอ่อนทั้ง 7 ชนิดนี้ได้แม่นยำ และสามารถหาความสัมพันธ์ตามสายวิวัฒนาการของไรอ่อนชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษานี้โดยใช้ค่าเฉลี่ย Genetic distance การศึกษานี้ยังพบ Eubacteria กลุ่ม γ -proteobacteria ในตัวอย่างไรอ่อน 2 ตัว ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่น่าสนใจและควรขยายการศึกษาให้กว้างขวางมากขึ้นต่อไป

4.10 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาไรอ่อนที่เป็นพาหะของแบคทีเรียชนิดก่อโรคและชนิดที่เป็นมิตรกับโฮสต์และปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันให้กว้างขวางมากขึ้นในทุกภาคของประเทศไทยในเชิงลึกยิ่งขึ้น จะทำให้ได้ความรู้ความเข้าใจในวิวัฒนาการร่วม (coevolution) ระหว่างโฮสต์กับผู้อาศัย การศึกษานเวศวิทยา การแพร่กระจาย และโครงสร้างของประชากรในระดับโมเลกุลของไรอ่อนจะเป็นประโยชน์ในการหามาตรการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่อาศัยอยู่ในไรอ่อนซึ่งคาดว่าจะเกิดขึ้นในอนาคตตามสภาพการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศโลกและสิ่งแวดล้อมท้องถิ่นที่เกิดจากการบุกรุกทำลายป่าโดยกิจกรรมของมนุษย์

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. 2547. รายงานเฝ้าระวังโรค สำนักโรคบาตวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.
- กระทรวงสาธารณสุข. 2548. รายงานเฝ้าระวังโรค สำนักโรคบาตวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.
- อังศุมาลย์ จันทราปัติย์. 2535. วิทยาเห็บไร(Acarology). ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Amrine, J.W.Jr. and Manson D.C.M. 1996. Preparation, Mounting and Descriptive Study of Eriophyoid Mites. In Eriophyoid Mites-Their Biology, Natural Enemies and control. E.E. Lindquist, M.W. Sabelis and J.Bruin (Editors), Elsevier Science B.V., p 396.
- Black, W.C., Klompen, J.S.H., and Keirans, J.E. 1997. Phylogenetic relationships among tick subfamilies based on the 18S nuclear rDNA gene. Molecular Phylogenetics and Evolution, 7, 129-144.
- Boemare, N. E., Givaudan, A., Brehe! lin, M. & Laumond, C. (1997).Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. Symbiosis, 22, 21-45.

- Frances S.P., Watcharapichat P., Phulsuksombati D. 2001. Vertical transmission of *Orientia tsutsugamushi* in two lines of naturally infected *Leptotrombidium deliense* (Acari: Trombiculidae). J Med Entomol. 38(1): 17-21
- Hall, T.A. 1999. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hartwell, L. H., Hood L., Goldberg M. L., Reynolds A. E., Silver L. M., and Veres, R. C. 2000. Genetics : From Genes to Genome. McGraw-Hill Companies. New York.
- Hillis D .M., Moritz C., Mable B. K. 1996. Molecular Systematics, 2nd edition., Sinauer, Massachusetts, 205-247.
- Hwang, U and Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. The Korean Journal of Parasitology 37: 215-228.
- Kawamura, A., Tanaka, H., Tamura, A. 1995. Tsutsugamushi Disease. University of Tokyo Press. Tokyo.
- Kratz, A., Greenberg D., Barki Y., Cohen E., Lifshitz M.. 2003. *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. Arch Dis Child, 88: 542–544.
- Lakshana, P. 1973. A Checklist of the trombiculid mites Of Thailand (Prostigmata: Trombiculidae). U.S.Army Medical Component, South East Asia Treaty Organization, Bangkok, Thailand.
- Misumi,H., Takahashi M., Kadosaka T., Urakami H., Takahama M., Lerdthusnee K., Misumi M., and Matsumoto I. 2003. Comparative study of human dermatitis caused by the bites of unfed larval trombiculid mites, *Leptotrombidium pallidum* and *L. scutellare* (Acari: Trombiculidae). Med. Entomol. Zool.,54(1) : 51 -64.
- Navajas, M., Lagnel J., Fauvel G., Moraes G. D. 1999. Sequence Variation of Ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in Commercially Important Phytoseiidae Mites. Experimental and Applied Acarology, 23 : 851-859
- Navajas, M. and Fenton, B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. Experimental and Applied Acarology, 24: 751-774.
- Pavithran, S., Mathai, E., Moses, P.D. 2004. Scrub Typhus. Indian Pediatrics, 41 : 1254-1257.
- Pidiyar V.J., Jangid K., Patole M.S., Shouche Y.S. 2004. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild culex quinquefasciatus mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. Am J Trop Med Hyg., 70(6):597-603.
- Rai, J. and Bandopadhyay, D. 1978. Vertical transmission in chigger-borne rickettiosis. Indian J. ,fled. Res., 68: 31-38.

- Rapmund, G., Upham, R.W. Jr., Kundin, W.D., Manikumar, C. and Chan, T.C. 1969. Transovarial development of scrub typhus rickettsiae in a colony of vector mites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63: 251-258.
- Roberts, L.W., Rapmund, G. and Cadigan, F.C. Jr. 1977. Sex ratios in *Rickettsia tsutsugamushi*-infected and noninfected colonies of *Leptotrombidium* (Acari: Trombiculidae). *J. Med. Entomol.*, 14: 89-92.
- Roberts, L.W. and Robinson, D.M. 1977. Efficiency of transovarial transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium arenicola* (Acari: Trombiculidae). *J. Med. Entomol.*, 13: 493-496.
- Sambrook, J. and Russell, D. 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasa, M. 1961. Biology of the chiggers. *Ann. Ent. Rev. Palo Alto*, 6 : 221-244.
- Shirai A, Ram S, Gan E, Lewis GE Jr, Kanda T, Chiang GL, and Groves MG. 1984. Comparative studies on karyotypes of *Leptotrombidium diliense*, *L. fletcheri* and *L. arenicola* (Acari : Trombiculidae). *J. Med. Entomol.*, 22(5) : 616-617.
- Straif, S.C., Mbogo, C.N., Toure, A.M., Walker, E.D., Kaufman, M., Toure Y.T., Beier J.C. 1998. Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *J Med Entomol.* , 35(3):222-6.
- Takahashi, M., Urakami, H., Murata, M., Misumi, H., Tsuji, O., Morita, K. and Hori, E. 1993. Sex ratio of *Rickettsia tsutsugamushi* uninfected colony and infected colony of *Leptotrombidium fletcheri* treated with minocycline. *Jpn. J. Sanit. Zool.*, 44: 91-96.
- Takahashi M., Murata M., Misumi H., Hori E., Kawamura A. Jr., Tanaka H. 1994. Failed vertical transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) acquired from rickettsemic mice by *Leptotrombidium pallidum* (Acari: trombiculidae). *J Med Entomol.*, 31(2):212-6.
- Tamura A., Ohashi, N., Urakami, H., and Miyamura, S. 1995. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen.nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. 45 (3): 589–591.
- Tanskul, P., Strickman, D., Eamsila, C., Kelly, D.J. 1994. *Rickettsia tsutsugamushi* in chiggers (Acari: Trombiculidae) associated with rodents in central Thailand. *J. Med. Entomol.* 31(2): 225-230.
- Urakami, H., Takahashi, M., Hori, E., Tamura, A. 1994a. An Ultrastructural Study of Vertical Transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* During Oogenesis and spermatogenesis in *Leptotrombidium pallidum*. *American J. Trop. Med. Hyg.*, 50(2):219-228.

- Urakami, H., Takahashi M., Murata M., Tamura A. 1994b. Electron Microscopic Study of the distribution of *Rickettsia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium pallidum*. Japan. J. Med. Sci. Biol., 47(3):127-139.
- Vercammen-GrandJean, P. H. 1968. The Chigger mites of the Far East. U.S. Army Medical Research and Development Command Washington, D.C. 20315, U.S. Government Printing Office : Washington.
- Walton, C., Handley, J.M., Kuvangkadilok, C, Collins, F.H., Harbach ,R.E., Baimai ,V., Butlin R.K.1999. Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. Medical and Veterinary Entomology 13: 24–32.
- Water, D.E. and Proctor, H.C. 1999. Mites : Ecology, Evolution and Behavior. Everbest Printing, Hong Kong.
- Wharton, G. W. and Fuller, H. S. 1952. A Manual of the Chiggers. Entomological Society of Washington, No 4.
- Watt G., and Strickman D. 1994. Life-threatening scrub typhus in a traveler returning from Thailand. Clin Infect Dis.,18(4):624-6.

5. อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย เซลล์พันธุศาสตร์ นิเวศวิทยา และพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุล ของแมลงรืนดำในประเทศไทย

5.1 บทนำ

รืนดำ (Black flies) จัดอยู่ในอันดับ (Order) Diptera วงศ์ (Family) Simuliidae ปัจจุบันมีรืนดำทั้งหมดจำนวน 1,809 ชนิด (species) ซึ่งจัดจำแนกอยู่ใน 32 สกุล (Genus) และพบเฉพาะฟอสซิลจำนวน 11 ชนิด ในสกุล *Cretoceosimulium* และ *Mesasimulium* (Crosskey และ Howard, 2004) รืนดำตัวเมียที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจในหลายประเทศตามแถบภูมิภาคต่างๆ ของโลกมี 4 สกุล คือ สกุล *Simulium* (มี 1,400 ชนิด) *Austrosimulium* (มี 25 ชนิด) *Prosimulium* (มี 103 ชนิด) และ *Cnephia* (มี 10 ชนิด) สกุล *Simulium* เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดและมีความสำคัญมากที่สุด ซึ่งประกอบด้วยรืนดำจำนวน 1,400 ชนิดที่จัดจำแนกอยู่ใน 41 สกุลย่อย (Crosskey และ Howard, 2004) แมลงรืนดำที่พบในภูมิภาคเอเชียรวมทั้งประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นรืนดำในสกุล *Simulium* ในอดีตมีรายงานเกี่ยวกับรืนดำในประเทศไทยน้อยมาก Summer (1911) ได้รายงานรืนดำชนิด *Simulium nigrogilvum* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ต่อมา Edwards (1928) ได้รายงานเพิ่มอีก 2 ชนิด คือ *S. hackeri* และ *S. diagrammicum* หลังจากนั้นไม่พบผู้ใดศึกษารืนดำในประเทศไทยอีกจนกระทั่ง Takaoka and Suzuki (1984) ได้รายงานการศึกษารืนดำที่เก็บจากบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยเป็นครั้งแรกจำนวน 19 สปีชีส์ ต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มขึ้นอีก 7 ชนิด รวมเป็น 26 ชนิด (Takaoka and Saito, 1996; Takaoka and Adler, 1997) ในระหว่างปี พ.ศ. 2539 – 2542 ภายใต้การสนับสนุนของโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT) ได้มีการศึกษาความหลากหลายของชนิดและการแพร่กระจายของตัวอ่อนรืนดำในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย โดยใช้หลักอนุกรมวิธาน รูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาและตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของรืนดำที่มีชื่อวิทยาศาสตร์แล้วและยังไม่ได้ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์จำนวน 42 ชนิด (เจลีเยว และคณะ 2544a; Kuvangkadilok et al. 1999a) ในจำนวนรืนดำที่พบนี้เป็นชนิดใหม่ 6 ชนิด (Takaoka and Kuvangkadilok, 1999; Kuvangkadilok and Takaoka 2000) ต่อมาได้มีรายงานการพบรืนดำสกุลย่อยใหม่ 1 สกุลย่อย (*Asiosimulium*) และรืนดำชนิดใหม่อีก 23 ชนิด (Takaoka, 2001; Takaoka and Choochote, 2002; Takaoka and Choochote, 2004a, b, c; Takaoka and Choochote 2005a, b, c, d, e, f, g, h; Takaoka and Choochote unpublished data) ปัจจุบันจำนวนรืนดำในประเทศไทยที่มีรายงานการพบและตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แล้วมีทั้งหมดประมาณ 66 ชนิด ซึ่งจัดจำแนกอยู่ใน 6 สกุลย่อย (subgenus) ได้แก่ สกุลย่อย *Asiosimulium* (2 ชนิด) *Davisellum* (2 ชนิด) *Gomphostilbia* (14 ชนิด) *Montisimulium* (4 ชนิด) *Nevermannia* (5 ชนิด) *Simulium* (38 ชนิด) และอีก 1 ชนิด คือ *S. baimaii* พบที่อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย ยังไม่ทราบว่าจะจัดอยู่ในสกุลย่อยใด เนื่องจากยังขาดตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่จะศึกษา รืนดำเหล่านี้แพร่กระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศโดยเฉพาะภาคเหนือและภาคใต้ (เจลีเยวและคณะ, 2544a; เจลีเยวและคณะ, unpublished

data; Kuvangkadilok et al., 1999a; Kuvangkadilok et al., unpublished data; Takaoka and Choochote, unpublished data)

แมลงวันดำเพชเมียมีความสำคัญทางด้านการแพทย์และเศรษฐกิจ ทางด้านการแพทย์แมลงวันดำเพชเมียเป็นพาหะสำคัญของพยาธิ *Onchocerca volvulus* ตัวอ่อนพยาธิชนิดนี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Onchocerciasis (หรือโรค river blindness) ของคนที่อาศัยในทวีปอาฟริกา อเมริกากลาง อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ คาดว่าประชาชนมากกว่า 100 ล้านคนเสี่ยงต่อการเป็นโรค Onchocerciasis นอกจากนี้ประชากรประมาณ 18 ล้านคนมีพยาธินี้อยู่ในร่างกาย (Richards et al., 2000) และประชากรประมาณ 800,000 คน มีสายตาสี และ 270,000 คน ตาบอด ซึ่งเป็นผลมาจากการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณตาโดยตัวอ่อนของพยาธิ ตัวอ่อนของพยาธิยังมีผลทำให้ต่อมน้ำเหลืองบวมอักเสบ อุดตัน และอาจเกิดเป็นโรคเท้าช้างประเภทหนึ่ง ถ้าตัวอ่อนของพยาธิตายจะมีผลทำให้เกิดพิษบริเวณผิวหนัง โดยเกิดอาการคันมากและรังควันที่ผิวหนังจะลดลงควบคู่กับการขาดวิตามินเอ ผิวหนังสูญเสียการยืดหยุ่นทำให้มีลักษณะคล้ายโรคเรื้อน คนที่ถูกวันดำกัดมากๆ จะเกิดอาการแพ้ เป็นไข้ ปวดหัว คลื่นไส้ และมีอาการหอบหืดเรียกว่า “ไข้วันดำ” (black fly fever) ซึ่งพบในทหารอากาศซึ่งประจำอยู่ที่สถานีเรดาร์บนยอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนี้ผิวหนังของคนที่ถูกวันดำกัดจะมีลักษณะบวมแดง อักเสบ และคันมาก ในรายของคนที่มีอาการแพ้วันดำ ผิวหนังจะบวมแดงและอักเสบมากต้องไปพบแพทย์ทำการรักษา ดังนั้นวันดำจึงเป็นแมลงที่เป็นอันตรายต่อนักท่องเที่ยวที่นิยมกางเต็นท์และดูนกที่ภู ดอยและในอุทยานแห่งชาติเป็นอย่างมาก แหล่งที่พบวันดำเป็นจำนวนมากที่ก่อความรำคาญและเป็นอันตรายต่อนักท่องเที่ยว คือ บริเวณช่องเย็น อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร-นครสวรรค์ ภูสอยดาว จังหวัดอุดรดิตถ์ และอ่างกา บริเวณยอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนี้ชาวบ้านและสัตว์เลี้ยงที่บ้านปางแฟน อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ถูกรบกวนโดยฝูงวันดำเช่นกัน

แมลงวันดำยังถ่ายทอดพยาธิ *Onchocerca* ชนิดอื่นๆ ไปสู่สัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า เช่น วัว ควาย เป็ด ไก่ เก้ง กวาง และหมูป่า และถ่ายทอดโปรโตซัวสกุล *Trypanosoma* และ *Leucocytozoon* ระหว่างพวกสัตว์ปีก เช่น นก และไก่ ทำให้เกิดโรค Leucocytozoonosis ในพวกสัตว์ปีก และเป็นตัวถ่ายทอดไวรัสและอะโบไวรัส (aboviruses) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ในสัตว์หลายชนิด เช่น โรค myxomatosis ในกระต่าย (Kettle, 1990)

แม้ไม่มีรายงานการเกิดโรค Onchocerciasis ในประเทศไทยเนื่องจากไม่มีพยาธิชนิด *Onchocerca volvulus* แต่เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีรายงานการพบตัวอ่อนพยาธิ *Onchocerca* ที่ไม่ทราบชนิดในเพชเมียของวันดำชนิด *S. nodosum* ที่เก็บมาจากกระบือที่บ้านปางแฟน ตำบลป่าเมี่ยง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ (Takaoka et al., 2003) และพบตัวอ่อนของพยาธิ *Onchocerca* ที่ไม่ทราบชนิดเช่นกันในตัวเมียของวันดำชนิด *S. nigrogilvum* ที่ดูดเลือดคนที่บ้านสบหาด ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ (Fukuda et al.; 2003) ดังนั้นแมลงวันดำในบ้านเราเป็นพาหะของพยาธิ *Onchocerca* ซึ่งอาจทำให้เกิดโรคชนิดใดชนิดหนึ่งในธรรมชาติ

ความสำคัญของแมลงวันดำด้านเศรษฐกิจ ได้มีรายงานการโจมตีสัตว์เลี้ยงโดยฝูงวันดำในภูมิภาคต่างๆ ของโลกก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก เช่น ไก่กวง และเป็ดเกิดเป็นโรค

leucocytozoonosis ล้มตายเป็นจำนวนมากในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา (Adler et al, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานเมื่อปี 1974 ในประเทศออสเตรเลียที่การโจมตีของแมลงวันดำมีผลทำให้น้ำหนักวัวและการผลิตน้ำนมลดลง 15% (Kettle, 1990)

ในการแยกชนิดของแมลงวันดำ ส่วนใหญ่จะแยกโดยหลักอนุกรมวิธานทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย (morphotaxonomy) (เช่น Crosskey 1973; Peterson 1984; Takaoka and Davies 1995) แต่การแยกชนิดโดยการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาอย่างเดียวมักมีปัญหาในกรณีที่ 1) เกิดการแปรผันของรูปร่างลักษณะภายนอกระหว่างประชากรของสปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่งที่เก็บมาจากแหล่งเพาะพันธุ์ต่างกัน อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมของแหล่งเพาะพันธุ์ต่างกัน เช่นลักษณะสีของตัวอ่อนของวันดำชนิด *S. nakhonense* ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติต่างๆจะมีสีน้ำตาลและสีค่อนข้างดำต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากสภาพและชนิดของแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย เช่น substrate 2) สปีชีส์ต่างกันแต่ประชากรของสองสปีชีส์มีรูปร่างคล้ายคลึงกัน อาจทำให้เข้าใจผิดว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน เช่นลักษณะตัวอ่อนของ *S. sheilae* และ *S. angulistylum* ที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกันมาก 3) ซิบลิงสปีชีส์ของกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน (species complex) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถแยกได้โดยอาศัยหลักอนุกรมวิธานทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

การศึกษาเชิงปริมาณการวัดและวิเคราะห์รูปร่างทางสัณฐานวิทยา (morphometric) ของวันดำโดยใช้วิธีการทางสถิติ คณิตศาสตร์ และเทคโนโลยีทางคอมพิวเตอร์จะทำให้การจำแนกชนิดของวันดำทำได้ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ข้อมูลเชิงปริมาณเหล่านี้ยังสามารถนำมาศึกษาทางด้านวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของวันดำชนิดต่างๆ ได้ นอกจากนี้การศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมควบคู่กับการศึกษารูปร่างสัณฐานวิทยาภายนอก จะช่วยให้การศึกษานุกรมวิธานของแมลงวันดำมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์โดยการศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมที่มาจากต่อมน้ำลายของตัวอ่อนซึ่งมีขนาดใหญ่และย้อมติดสีสวยจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อประโยชน์ในการแยกชนิดของแมลงต่างๆ (cytospecies) เช่น แมลงวันดำ ยุง และหนอนแดง การศึกษาโพลีทีนโครโมโซมสามารถวินิจฉัยสปีชีส์และซิบลิงสปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนได้เนื่องจากเหตุผลดังต่อไปนี้คือ (Rothfels, 1981) 1) โพลีทีนโครโมโซมมีแบบแผนการเรียงตัวที่ละเอียดและจำเพาะ 2) ซิบลิงสปีชีส์แตกต่างกันโดยการเกิดอินเวอร์ชัน เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม และการจัดเรียงแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ใหม่บนโพลีทีนหนึ่งแท่งหรือมากกว่าหนึ่งแท่ง ซึ่งทราบได้จากการเปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซม หลักการที่แสดงให้เห็นว่าซิบลิงสปีชีส์มีโครโมโซมต่างกันคือ a) มีการเรียงของแบนด์ที่จำเพาะ (fixed inversion) ในแต่ละซิบลิงสปีชีส์ b) มีระบบโครโมโซมเพศต่างกันโดยศึกษาจากความสัมพันธ์ระหว่างอินเวอร์ชันกับเพศ (sex-linked inversion) c) มีความถี่ของ inversion polymorphisms ต่างกัน นอกจากนี้แบบแผนการเรียงของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมที่ต่างกันสามารถนำมาศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสปีชีส์ต่างๆ

ในประเทศไทยปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาโพลีทีนโครโมโซมเพื่อแยกชนิดของแมลงน้อยมาก อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมในวันดำ 18 สปีชีส์ ที่มีลักษณะแบบแผนการเรียงของแบนด์ที่จำเพาะในแต่ละสปีชีส์ซึ่งเป็นประโยชน์มากในการ

จำแนกชนิดของริ้นดำที่มีรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนคล้ายคลึงกัน เช่น *S. asakoe* และ *S. sp. nr sheilae* (เจเลียวและคณะ 2544a; Kuvangkadilok et al., 1999b,c; Kuvangkadilok et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ cytotypes และซิบลิงสปีชีส์ของแมลงริ้นดำที่เป็นพาหะของโรค Onchocerciasis จำนวนมากในทวีปอาฟริกา อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ เช่นกลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อน *S. damnosum* ในทวีปอาฟริกาที่มีผู้รายงานการพบซิบลิงสปีชีส์เพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 25 cytotypes ในอดีต (เช่น Dunbar, 1976; Vajime and Dunbar, 1975) เพิ่มมาเป็นอย่างน้อยที่สุด 40 cytotypes ในปัจจุบัน (เช่น Mafuyai et al., 1996; Vajime et al., 2000) กลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อน *S. ochraceum* ในเม็กซิโก มี 3 cytotypes A, B และ C (Millest, 1992; Hirai et al., 1994) กลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อน *S. guianense* ในบราซิลมี 4 cytotypes คือ A, B, C และ D (Charalambous et al., 1996) กลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อน *S. exiguum* ในอีควาดอร์มี 4 cytotypes (Charalambous et al., 1993) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อนในทวีปอเมริกาเหนือ แคนาดา และออสเตรเลีย ในอเมริกาเหนือและแคนาดามีกลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อนหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อน *S. pictipes* ประกอบด้วย 3 ซิบลิงสปีชีส์คือ *S. longistylatum*, *S. pictipes* A และ *S. pictipes* B สปีชีส์เหล่านี้มีโครโมโซม Y ต่างกัน (Bedo, 1975) กลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อน *S. vittatum* มีสปีชีส์ IIL-1 และ IS-7 ซึ่งอยู่ในสภาพซิม แพทริก แยกออกจากกันโดยอินเวอร์ชันบนโครโมโซม Y และอินเวอร์ชันบนโครโมโซม X (Rothfels and Feathersen, 1981) ในประเทศออสเตรเลียมีกลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อน *S. ornatipes* (species A และ B) และ *S. neomatipes* (species 1 และ 2) (Bedo, 1977) นอกจากนี้ในประเทศยุโรปตะวันออกมีกลุ่มสปีชีส์ซิบซ็อน *S. noelleri* ที่ประกอบด้วย cytotypes A, B และ C (Adler and Kachvorian, 2001)

แมลงริ้นดำมีวงจรชีวิตสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ซึ่งมีระยะไข่ ตัวอ่อนและตัวดักแด้ อาศัยอยู่ในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหล (lotic environment) เนื่องจากตัวอ่อนของแมลงริ้นดำสามารถปรับตัวได้ดีกับแหล่งน้ำไหลจึงพบเป็นจำนวนมาก และมีการกระจายค่อนข้างหนาแน่นมากกว่าแมลงน้ำกลุ่มอื่นๆ ดังนั้นตัวอ่อนแมลงริ้นดำจึงเหมาะสำหรับการศึกษาด้านความหลากหลายและนิเวศวิทยาในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหลเป็นอย่างยิ่ง โดยทั่วไปปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพมีผลต่อการกระจายของแมลงทุกชนิดที่อาศัยในแหล่งน้ำ (Allan, 1995) โดยอาศัยหลักการทางนิเวศวิทยาพบว่า สิ่งมีชีวิตมักอาศัยได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ดังนั้นเมื่อสภาวะแวดล้อมเกิดการเปลี่ยนแปลงจะส่งผลกระทบต่อความหลากหลาย และรูปแบบกระจายของสิ่งมีชีวิตอย่างชัดเจน แมลงริ้นดำแต่ละชนิดมักมีการกระจายในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน บางชนิดมีการกระจายในทุกสภาพแวดล้อม แต่บางชนิดมีการกระจายจำกัดในสภาพแวดล้อมใดสภาพแวดล้อมหนึ่งเท่านั้น ซึ่งแสดงถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีความเหมาะสมและความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับการกระจายตัวของแมลงริ้นดำ ตัวอย่างปัจจัยต่างๆ เช่น ขนาดของแหล่งน้ำ (stream size) อัตราความเร็วของกระแส (water velocity) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) ค่าความขุ่นของน้ำ (turbidity) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) แหล่งอาศัยย่อย (microhabitats) อุณหภูมิ (water temperature) ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล (altitude) ค่าระยะห่างจากบริเวณที่ไหลลงสู่แม่น้ำ (lake outlets) และการมีลักษณะบ่อน้ำขัง (impoundment) เป็นต้น (Corkum and Currie, 1987; McCreadie et al., 1995) มีรายงานการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium perflavum* ในประเทศบราซิล พบว่าการ

กระจายของแมลงรึ้นดำชนิดนี้สัมพันธ์กับบริเวณที่เป็นบ่อน้ำขัง (Hamada and McCreadie, 1999) ใน รายงานต่อมาได้มีการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงรึ้นดำจำนวน 11 ชนิดในแหล่งน้ำ 58 แห่งใน ประเทศบราซิล พบว่าการกระจายของแมลงรึ้นดำเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับขนาดแหล่งน้ำ การมีบ่อน้ำ ขังและลักษณะการปกคลุมของเรือนยอด (canopy cover) (Hamada et al, 2002)

รายงานการศึกษาด้านนิเวศวิทยาของแมลงรึ้นดำในประเทศไทยมีน้อยมาก Kuvangkadilok et al. (1999a) ได้รายงานการศึกษาการกระจายของตัวอ่อนแมลงรึ้นดำในเขตอุทยานแห่งชาติดอยอิน ทยนทร์ ภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าการกระจายของแมลงรึ้นดำมีความสัมพันธ์กับความสูงเหนือ ระดับน้ำทะเล และปัจจัยบางชนิด เช่น อุณหภูมิและความเร็วน้ำ เป็นต้น จากการศึกษาความ สัมพันธ์ของการแพร่กระจายของตัวอ่อนรึ้นดำในเขตภาคใต้พบความสัมพันธ์ของการกระจายของตัว อ่อนรึ้นดำบางชนิดกับอุณหภูมิของน้ำ ความกระด้าง และระดับความสูงของแหล่งน้ำ (เจลิเยวและคณะ, 2544b) นอกจากนี้ยังมีรึ้นดำบางชนิดที่มีการแพร่กระจายเฉพาะบริเวณที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล ค่อนข้างมาก ได้แก่ รึ้นดำชนิด *S. caudisclerum*, *S. merga*, *S. inthanonense*, *S. feuerborni*, และ *S. rufibasis* รึ้นดำเหล่านี้ดูดกินเลือดคนและสัตว์ปีกและพบเฉพาะในแหล่งน้ำไหลที่มีความสูงตั้งแต่ ระดับ 700 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลขึ้นไป อย่างไรก็ตามยังมีรึ้นดำหลายชนิดที่มีการแพร่กระจายอย่าง กว้างขวางทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยโดยไม่จำกัดความสูงและต่ำเหนือระดับน้ำทะเล ได้แก่ รึ้นดำ ชนิด *S. tani*, *S. nakhonense* และ *S. quinquestratum* ดังนั้นรึ้นดำเหล่านี้จึงเหมาะที่จะเป็นโมเดลใน การศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่เก็บมาจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติที่ กระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆ รวมทั้งศึกษาอิทธิพลและปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทาง พันธุกรรมของประชากรซึ่งจะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมและการ เปลี่ยนแปลงสภาวะภูมิอากาศของโลกในอดีตต่อความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมี ชีวิตในประเทศไทย ผลของการศึกษานี้ยังเกี่ยวเนื่องกับการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมของประเทศ ไทยด้วย เนื่องจากแมลงรึ้นดำส่วนใหญ่จะอาศัยในแหล่งอาศัยที่มีความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติ เช่น ในป่าที่สมบูรณ์ เป็นต้น ดังนั้นรูปแบบการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของโครงสร้างทางพันธุกรรมของ รึ้นดำอาจบ่งชี้ถึงแบบแผนการกระจายตัวของโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ต้องการ แหล่งอาศัยที่คล้ายคลึงกันกับรึ้นดำ ดังนั้นการตรวจพบบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง อาจมีบทบาทสำคัญในการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

โครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นอาจได้รับอิทธิพลจากเหตุการณ์ปัจจุบัน เช่น สภาพ นิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย หรือเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในอดีต เช่น การเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม รวมทั้งเกิดจากการผสมผสานของอิทธิพลจากปัจจัยดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของ สิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้ด้วย ปัจจัยในอดีตที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่สำคัญที่สุดปัจจัย หนึ่งคือการเปลี่ยนแปลงสภาวะภูมิอากาศของโลกในยุคไพลโทซีน (Pleistocene) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลง ของสภาพภูมิอากาศสลับกันระหว่างอากาศร้อนขึ้นกับหนาวและแห้งแล้งโดยมีช่วงเวลาของแต่ละยุค ประมาณ 100,000 ปี การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดในยุโรปและอเมริกา เหนือพบว่าการเปลี่ยนแปลงของสภาวะภูมิอากาศดังกล่าวมีผลอย่างยิ่งต่อความหลากหลายและ โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรสิ่งมีชีวิต (Hewitt, 1996) ถึงแม้ว่าประเทศไทยไม่ได้รับอิทธิพล

โดยตรงจากการปกคลุมของแผ่นน้ำแข็งในยุคน้ำแข็งในช่วงไพลโซซีน แต่ก็ได้รับอิทธิพลจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะภูมิอากาศที่แห้งแล้งรวมทั้งปริมาณน้ำฝนที่ลดลงอย่างมากในช่วงเวลาดังกล่าว (Penny, 1999; Voris, 2000; Woodruff, 2003) ซึ่งเชื่อว่ามีผลต่อสิ่งมีชีวิตในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เกิด fragmentation ของป่าฝนเขตร้อน (Brandon-Jones, 1998) เป็นต้น ปัจจุบันการศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมรวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ใกล้ชิดในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต นิยมศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากร เนื่องจากมีความแปรผันสูงและไม่มีรีคอมบิเนชัน (Avise et al., 1987) ได้มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Fleischer et al., 2001) ปลา (Gerber et al., 2001) สัตว์ครึ่งน้ำครึ่งบก (Crawford, 2003) รวมถึงแมลงหลายชนิด (Donnelly et al., 2004; Lunt et al., 1998; Walton et al., 2000) นอกจากนี้ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังเหมาะสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในแมลงต่างๆ เช่น แมลงหวี่ (O' Grady, 1999; Spicer and Pitnick, 1996) ยุง (Conn et al., 1997; Caccone et al., 1996) และแมลงวัน (Bernasconi et al., 2000; Well and Sperling, 1999) และการศึกษาในโฟลว์ในยุง (Behansky et al., 1997)

โครงสร้างนิวเคลียร์ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแมลงประกอบด้วยหน่วยที่มีการเรียงตัวของยีนซ้ำกันเป็นจำนวนหลายหน่วย ไรโบโซมัลดีเอ็นเอแต่ละหน่วยประกอบด้วยยีน 18S, 5.8S และ 28S ซึ่งเป็นยีนที่มีการถอดรหัส และมีการเรียงลำดับเบสค่อนข้างคงที่ไม่แปรผันมาก (conserved regions) นอกจากนี้ยังมีช่องว่าง (Internal transcribed spacer) ระหว่างยีน 18S และ 18S เรียกว่า ITS1 และช่องว่างระหว่างยีน 18S และ 28S เรียกว่า ITS2 (Gerbi, 1985; Hillis and Dixon, 1991) สำหรับช่องว่างที่อยู่นอกยีนตรงบริเวณปลาย 5' ของยีน 18S คือ External transcribed spacer (ETS) ไรโบโซมัลดีเอ็นเอแต่ละหน่วยจะเชื่อมต่อกันด้วยช่องว่างเรียกว่า Nontranscribed intergenic spacers (IGS) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสและความยาวแปรผันมากทั้งภายในตัวเดียวกันและต่างกันเพราะมีความแตกต่างของจำนวนหน่วยที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน (Beach et al., 1989; Collins et al., 1989; Gale and Crampton, 1989) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ ITS2 มีอัตราการแปรผันค่อนข้างสูง จึงนิยมนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกัน (Baldwin, 1992; Wesson et al., 1992; Miller et al., 1996; Xu and Qu, 1997; Weeker et al., 2001; Young and Coleman, 2004) และการจำแนกชนิดในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน ตัวอย่างเช่น กลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนของยุงก้นปล่อง *Anopheles maculipennis* (Porter and Collins, 1991) และกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *An. gambiae* (Collins et al., 1989) นอกจากนี้ยังใช้ในการศึกษาดีเฟนเดนทิกเอนไซม์ของประชากร (Schlotterer et al., 1994; Vogler and De Salle, 1994) ในทางตรงข้ามยีน 28SD2 มีความแปรผันน้อยมาก จึงนิยมนำมาศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ห่างไกลกันทางสายวิวัฒนาการ (Porter and Collins, 1996).

เนื่องจากการศึกษาการแพร่กระจาย เซลล์พันธุศาสตร์ นิเวศวิทยา และพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุลของแมลงรึ้นดำในประเทศไทยมีน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาด้านต่าง ๆ เหล่านี้ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการกำจัด ควบคุมแมลงรึ้นดำที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์และเศรษฐกิจในอนาคต นอกจากนี้ยังเป็นตัวอย่างการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการวิวัฒนาการของแมลงแบบเป็นขั้นตอน จากการศึกษาภาคสนามมาถึงการศึกษาวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ ในภาคสนามได้ศึกษานิเวศวิทยาของแหล่งเพาะพันธุ์ของรึ้นดำรวมทั้งความแปรผันตามฤดูกาล สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการได้ทำการศึกษารูปร่างลักษณะภายนอกของรึ้นดำแต่ละชนิดและโพลีทีนโครโมโซมเพื่อจำแนกชนิด ศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรเพื่อดูแนวโน้มการเกิดชิปลิงสปีชีส์ ศึกษาพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรและความสัมพันธ์ตามสายวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำในระดับสปีชีส์ กลุ่มสปีชีส์ และสกุลย่อย โดยศึกษานิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

5.2 วัตถุประสงค์

5.2.1 ศึกษาอนุกรมวิธานแยกชนิดของรึ้นดำโดยศึกษาลักษณะรูปร่างของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย ควบคู่กับการศึกษารูปแบบของโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อน

5.2.2 ศึกษาผลของตัวแปรทางนิเวศวิทยาต่อการแพร่กระจายและความหนาแน่นของตัวอ่อน และปัจจัยที่มีผลต่อโครงสร้างชุมชนของประชากรรึ้นดำในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติต่างๆ

5.2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่กระจายของชนิดแมลงรึ้นดำแต่ละฤดูกาลกับนิเวศวิทยาของแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย

5.2.4 ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับปรสิตที่พบในตัวอ่อนของแมลงรึ้นดำแต่ละชนิด

5.2.5 ศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงรึ้นดำชนิดต่างๆ โดยการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซม

5.2.6 ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรรึ้นดำแต่ละชนิดรวมทั้งความแตกต่างและความเหมือนกันทางพันธุกรรมของประชากรรึ้นดำภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันที่อาศัยในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศ โดยการศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

5.2.7 ศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำในระดับสปีชีส์ กลุ่มของสปีชีส์ และสกุลย่อย โดยการศึกษารูปร่างลักษณะเชิงปริมาณและความแตกต่างของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

5.3 ขอบเขตและวิธีการวิจัย

ทำการเก็บตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของรึ้นดำในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบริเวณ 35 จังหวัดของประเทศไทย นำตัวอย่างรึ้นดำมาแยกชนิดโดยการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เนื่องจากตัวอ่อนรึ้นดำบางชนิดมีรูปร่างคล้ายคลึงกันมากยากที่จะแยกโดยการศึกษารูปร่างลักษณะอย่างเดียว ต้องทำการศึกษา

เปรียบเทียบแบนด์โพลีทีนโครโมโซมด้วยเพื่อจะได้ทราบว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ หลังจากนั้นนำตัวอย่างตัวอ่อนรีนด้าบางชนิดที่มีการแปรผันของรูปร่างลักษณะและมีการกระจายกว้างขวางมาศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรโดยการศึกษาเปรียบเทียบแบนด์โพลีทีนโครโมโซมที่มีการเรียงตัวผิดปกติ เช่น เกิดอินเวอร์ชันรูปแบบต่างๆ เพื่อศึกษาแนวโน้มการเกิดซิงลิงสปีสส์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรรีนด้าชนิดที่มีการกระจายอย่างกว้างขวางในทุกภูมิภาคของประเทศโดยการศึกษาการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรีนด้าในระดับสปีสส์ กลุ่มของสปีสส์ และสกุลย่อย โดยใช้ข้อมูลการศึกษารูปร่างลักษณะเชิงปริมาณและการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ในรายงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษานิเวศวิทยาของแหล่งเพาะพันธุ์รีนด้าในบริเวณ 10 จังหวัดภาคเหนือพร้อมทั้งศึกษาปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความลึกและความกว้างของแหล่งเพาะพันธุ์ ความเร็วของกระแส น้ำ อุณหภูมิของน้ำ การนำไฟฟ้าของน้ำ ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจนละลาย ฯลฯ ที่มีผลต่อการแพร่กระจายและความหนาแน่นของตัวอ่อนและตัวดักแด่ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความแปรผันตามฤดูกาลของตัวอ่อนรีนด้า และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่กระจายของชนิดของแมลงรีนด้ากับแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย (microhabitat)

5.4 การศึกษาภาคสนาม

5.4.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

แหล่งน้ำไหลธรรมชาติที่ไหลมาจากน้ำตกและภูเขา อาจเป็นร่องน้ำไหลเล็กๆ หรือลำธารที่มีขนาดความกว้างต่างกันในทุกภาคของประเทศไทย (ภาพที่ 5.1) ดังนี้

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย (CR) แม่ฮ่องสอน (MS) เชียงใหม่ (CM) พะเยา (PY) ลำพูน (LP) ลำปาง (LA) แพร่ (PR) น่าน (NN) อุตรดิตถ์ (UT) สุโขทัย (ST) ตาก (TK) กำแพงเพชร (KP) เพชรบูรณ์ (PB) และพิษณุโลก (PS)

ภาคตะวันออก ได้แก่ จันทบุรี (CB) และระยอง (RY)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ กาฬสินธุ์ (KS) สกลนคร (SN) ศรีสะเกษ (SS) ชัยภูมิ (CH) นครราชสีมา (NM) และเลย (LE)

ภาคกลาง ได้แก่ เพชรบุรี (PE) กาญจนบุรี (KB) นครนายก (NY) และสระแก้ว (SK)

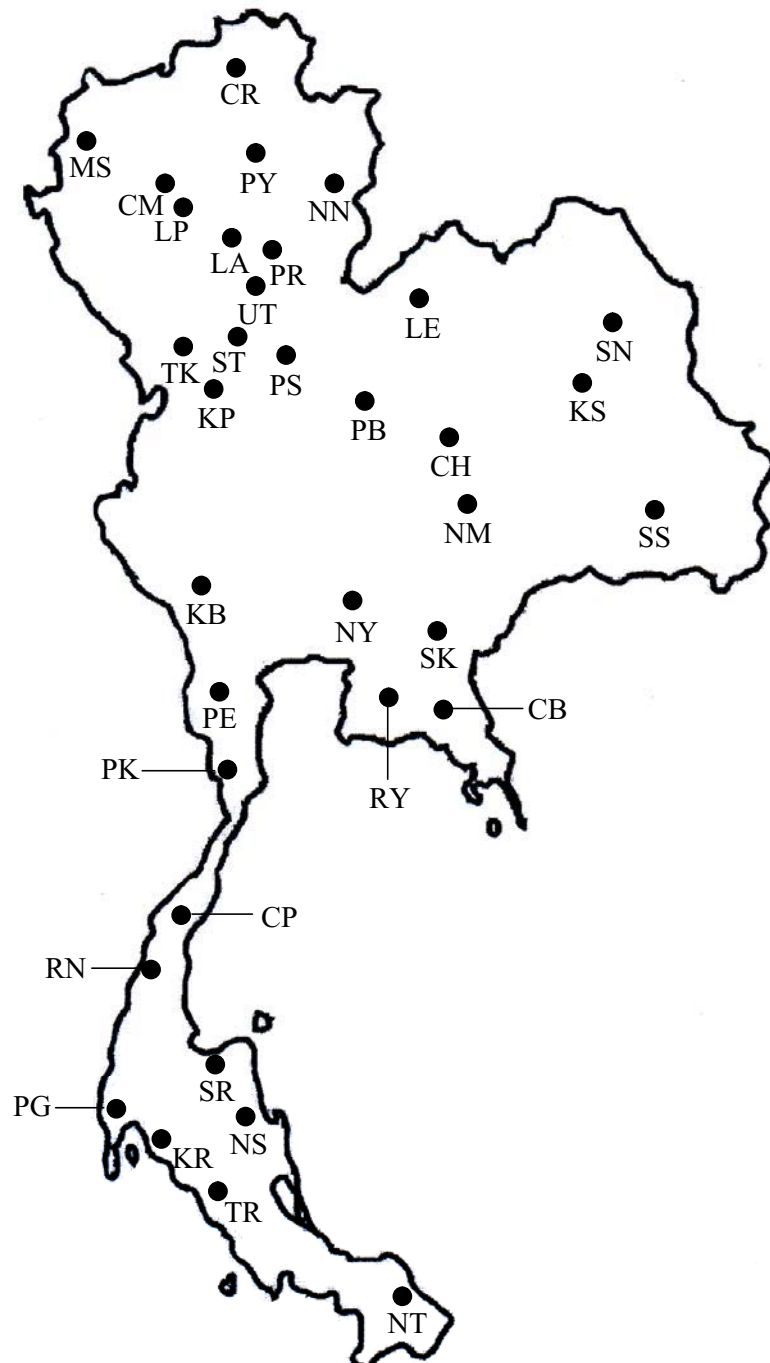
ภาคใต้ ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ (PK) ชุมพร (CP) ระนอง (RN) นครศรีธรรมราช (NS) สุราษฎร์ธานี (SR) ตรัง (TR) กระบี่ (KR) พังงา (PG) และนราธิวาส (NT)

แหล่งน้ำเพาะพันธุ์รีนด้ามีระดับความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่างกัน โดยมีระดับความสูงต่ำสุดตั้งแต่ 50 เมตรถึงระดับสูงสุดประมาณ 2400 เมตร

5.4.2 วิธีการเก็บ

เก็บตัวอย่างโดยใช้ปากคีบปลายแหลมคีบตัวอ่อนที่เกาะบนหิน ต้นหญ้า ใบไม้สดและเศษวัสดุต่างๆ ที่ลอยในน้ำไหล แบ่งตัวอ่อนที่จับได้เป็น 3 ส่วน ตัวอ่อนส่วนที่หนึ่งดองใน Carnoy's fixative (2 ส่วน absolute ethanol: 1 ส่วน glacial acetic acid) สำหรับศึกษาโพลีทีนโครโมโซม ตัวอ่อนส่วนที่สอง

เก็บไว้ใน 80% ethanol เพื่อศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยา ตัวอ่อนส่วนที่สามเก็บใน absolute ethanol เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุล การเก็บรักษาต่อมน้ำลายและโพลีทีนโครโมโซมให้อยู่ในสภาพดีต้องเปลี่ยนน้ำยา fixative หลังจากใส่ตัวอ่อนประมาณ 2 นาที 10 นาที และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ และต้องแช่หลอดเก็บตัวอย่างในน้ำแข็งตลอดเวลา



ภาพที่ 5.1 แสดงจังหวัดที่ศึกษาแมลงวันดำสัญลักษณ์จังหวัดดูในเนื้อหา

สำหรับตัวดักแต่ต้องบางส่วนใน 80% ethanol แต่ส่วนใหญ่จะเลี้ยงในหลอดให้เจริญเป็นตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยบางส่วนได้จากการจับโดยใช้สวิงและบางส่วนได้จากการใช้คนเป็นเหยื่อล่อ ดองตัวเต็มวัยบางส่วนใน 80% ethanol และ absolute ethanol และเก็บบางส่วนของตัวเต็มวัยเป็นตัวอย่างแห้ง

5.4.3 วิธีศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ

ในการศึกษาภาคสนามได้ทำการวัดค่าตัวแปรคุณภาพของน้ำที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของรินดำ และจดบันทึกลักษณะทั่วไปของแหล่งเพาะพันธุ์ ดังนี้ บันทึกวันที่ (collection date) วัดความสูงจากระดับน้ำทะเล (altitude) วัดความกว้างของแหล่งน้ำ (stream width) โดยใช้ตลับเมตรหรือเชือก วัดความลึกของแหล่งน้ำ (stream depth) โดยใช้ไม้เมตร วัดอัตราความเร็วกระแส น้ำ (water velocity) โดยใช้ Global Flow Probe FP201 วัดอุณหภูมิ น้ำ (water temperature) และค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (total dissolved oxygen) โดยใช้เครื่องมือ YSI (Yellow Springs Instrument, Co., model 55) วัดค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ (conductivity) ค่าการนำไฟฟ้าจำเพาะ (specific conductance) และค่าความเค็มของน้ำ (salinity) โดยใช้เครื่องมือ YSI (Model 30) ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH-meter แบบปากกา วัดความชื้นของอากาศและอุณหภูมิอากาศ บริเวณที่ทำการศึกษภาคสนามในแต่ละแห่งจะมีระยะทางประมาณ 25 เมตร ค่าตัวแปรทางกายภาพของแหล่งน้ำได้ทำการวัด 3 ครั้งในแต่ละแห่งเพื่อหาค่าเฉลี่ย นอกจากนี้ยังทำการบันทึกสภาพนิเวศวิทยาทั่วไปของแหล่งน้ำไหลที่สามารถสังเกตได้

5.5 การศึกษาการแพร่กระจายและชนิดของแมลงรินดำในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

ในช่วงระหว่างปี พ.ศ.2545 – 2548 ได้ทำการศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของตัวอ่อนรินดำในบริเวณ 35 จังหวัดในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ (ภาพที่ 5.1) ได้ทำการแยกชนิดตัวอ่อน ตัวดักแต่ และตัวเต็มวัยโดยการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตัวอ่อนรินดำบางชนิดมีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกันมากทำให้ไม่แน่ใจว่าจะเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของโพสทีนโครโมโซมควบคู่ไปด้วยซึ่งจะกล่าวในตอนต่อไป

5.5.1 การจำแนกชนิดแมลงรินดำโดยการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยา

ทำการจำแนกชนิดของแมลงรินดำในระยะตัวอ่อน ตัวดักแต่และตัวเต็มวัย โดยการเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวอ่อน ตัวดักแต่และตัวเต็มวัยที่ได้มีรายงานการศึกษาจากประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย ดังนี้ ประเทศไทย (Takaoka and Suzuki, 1984; Takaoka and Saito, 1996; Takaoka and Adler, 1997; Takaoka and Kuvangkadilok, 1999; Kuvangkadilok and Takaoka, 2000; Takaoka, 2001) มาเลเซีย (Takaoka and Davies, 1995) อินเดีย (Datta, 1974) ไต้หวัน (Takaoka, 1979) และญี่ปุ่น (Takaoka, 1977) ลักษณะสำคัญของตัวอ่อนที่ใช้แยกชนิด คือ สีของลำตัว การมีหรือไม่มี ventral papillae และลักษณะของ postgenal cleft สำหรับตัวดักแต่ลักษณะ

สำคัญที่ใช้แยกคือ ลักษณะของปลอกหุ้มดักแด่ (cocoon) และจำนวนและแบบแผนการเรียงตัวของ gill filaments สำหรับตัวเต็มวัยคือ ลักษณะเส้นปีก ลักษณะและสีของขาและลักษณะของ genitalia ของ เพศผู้และเพศเมีย

5.5.2 ผลการศึกษาการแพร่กระจายและชนิดของแมลงรืนดำ

งานวิจัยนี้ได้พบรืนดำที่มีผู้รายงานการพบและตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แล้วจำนวน 45 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นรืนดำที่มีชื่อวิทยาศาสตร์แล้วแต่เพิ่งรายงานการพบในประเทศไทยเป็นครั้งแรก 3 ชนิด (*Simulium tahanense*, *Simulium whartoni* และ *Simulium hirtinervis*) รืนดำทั้งหมดอยู่ในสกุล (Genus) *Simulium* และถูกจัดจำแนกอยู่ใน 5 สกุลย่อย (Subgenus) และมีแมลงรืนดำ 1 ชนิด คือ *Simulium baimaii* ที่ยังไม่สามารถจำแนกอยู่ในสกุลย่อยใดเนื่องจากขาดตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมียที่จะศึกษา รืนดำเหล่านี้มีการแพร่กระจายในจังหวัดต่างๆ ต่อไปนี้

1. สกุลย่อย *Asiosimulium* Takaoka and Choochote พบ 1 ชนิดได้แก่

1. *Simulium oblongum* พบใน 3 จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ และสกลนคร

2. สกุลย่อย *Gomphostilbia* Enderlein พบจำนวน 15 ชนิด ซึ่งจำแนกอยู่ใน 3 กลุ่มสปีชีส์ (species-group) ดังนี้

A. *batoense* – group

2. *Simulium angulistylum* พบใน 14 จังหวัดของภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออกเฉียง ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ ระยอง จันทบุรี นครราชสีมา สกลนคร สระแก้ว กาญจนบุรี เพชรบุรี ระนอง สุราษฎร์ธานี และนราธิวาส

3. *Simulium decuplum* พบใน 13 จังหวัดของภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ตาก กำแพงเพชร พิษณุโลก จันทบุรี นครราชสีมา สระแก้ว กาญจนบุรี เพชรบุรี ระนอง และนราธิวาส

4. *Simulium dentistylum* พบใน 1 จังหวัดภาคเหนือ คือ จังหวัดตาก และ จังหวัดกาญจนบุรีในภาคกลาง

5. *Simulium duolongum* พบใน 5 จังหวัดของภาคกลางและภาคใต้ ได้แก่ กาญจนบุรี เพชรบุรี ระนอง สุราษฎร์ธานี และพังงา

6. *Simulium gombakense* พบใน 6 จังหวัดภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ได้แก่ กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครราชสีมา สระแก้ว และกาญจนบุรี

7. *Simulium parahiyangum* พบใน 18 จังหวัดภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง พะเยา ตาก กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ จันทบุรี ชัยภูมิ กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง สุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ พังงา และนราธิวาส

8. *Simulium siamense* พบใน 22 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน พะเยา น่าน สุโขทัย ตาก

กำแพงเพชร ระยอง จันทบุรี ศรีสะเกษ ชัยภูมิ สกลนคร กาฬสินธุ์ นครราชสีมา นครนายก สระแก้ว กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ พังงา และนราธิวาส

9. *Simulium tahanense* พบใน 3 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ กำแพงเพชร เพชรบุรี และนราธิวาส

10. *Simulium whartoni* พบที่จังหวัดนครราชสีมา

B. *ceyonicum* - group

11. *Simulium asakoe* พบใน 19 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ตาก สุโขทัยแพร่ อุดรดิตถ์ กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ระยอง จันทบุรี เลย สกลนคร ชัยภูมิ นครราชสีมา สระแก้ว และกาญจนบุรี

12. *Simulium inthanonense* พบใน 6 จังหวัด ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน อุดรดิตถ์ กำแพงเพชร พิษณุโลก และเลย

13. *Simulium sheilae* (S. sp. g) พบใน 7 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ แม่ฮ่องสอน จันทบุรี ชัยภูมิ สระแก้ว กาญจนบุรี ตรัง และนราธิวาส

14. *Simulium* sp. nr. *sheilae* (S. sp. g) พบใน 9 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน จันทบุรี นครราชสีมา ชัยภูมิ ระนอง สุราษฎร์ธานี กระบี่ และนราธิวาส

C. *varicorne* – group

15. *Simulium burtoni* พบใน 21 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำปาง ตาก กำแพงเพชร อุดรดิตถ์ เพชรบูรณ์ จันทบุรี เลย ชัยภูมิ สกลนคร กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง พังงา และนราธิวาส

16. *Simulium chumpornense* พบใน 3 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงใหม่ กาญจนบุรี และนครศรีธรรมราช

3. สกุลย่อย *Montisimulium* Rubtsov พบเพียง 1 ชนิด คือ

17. *Simulium merga* (S. sp. G) พบเฉพาะที่จังหวัดเชียงใหม่

4. สกุลย่อย *Nevermannia* Enderlein พบ 4 ชนิด ซึ่งจำแนกอยู่ใน 3 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่

A. *feuerborni* – group

18. *Simulium feuerborni* พบใน 6 จังหวัดภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน อุดรดิตถ์ กำแพงเพชร ชัยภูมิ และเลย

19. *Simulium* sp. nr. *feuerborni* พบใน 1 จังหวัด ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน และในจังหวัดเลย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

B. *ruficorne* – group

20. *Simulium aureochirtum* พบใน 13 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง กำแพงเพชร พิษณุโลก จันทบุรี เลย ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ สกลนคร สระแก้ว และระนอง

C. *vernum* – group

21. *Simulium caudisclerum* พบเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่

5. สกุลย่อย *Simulium Latreille s. str.* พบ 22 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ใน 7 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่

A. *griseifrons* – group

22. *Simulium diagramicum* พบเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่

23. *Simulium choochotei* พบเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่

24. *Simulium grossifilum* พบใน 2 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ได้แก่ จันทบุรี และระนอง

25. *Simulium nigrogilvum* พบเฉพาะภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง และอุตรดิตถ์

26. *Simulium phayaoense* พบเฉพาะภาคเหนือ ได้แก่ พะเยาและกำแพงเพชร

27. *Simulium rudniki* พบใน 9 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง แพร่ ตาก กำแพงเพชร เลย ระนอง และสุราษฎร์ธานี

B. *malyschevi* – group

28. *Simulium siriphoomense* พบเฉพาะในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน

C. *multistriatum* – group

29. *Simulium chaliowae* พบเฉพาะในจังหวัดแพร่

30. *Simulium fenestratum* พบใน 17 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก-เฉียงเหนือ และภาคใต้ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง แพร่ อุตรดิตถ์ ตาก สุโขทัย กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ระยอง จันทบุรี นครราชสีมา เลย ระนอง และสุราษฎร์ธานี

31. *Simulium hirtinervis* พบที่จังหวัดจันทบุรี

32. *Simulium takense* พบที่จังหวัดกาญจนบุรี

33. *Simulium triglobus* พบที่จังหวัดตาก

D. *nobile* – group

34. *Simulium nobile* พบเฉพาะในภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช และพังงา

35. *Simulium nodosum* พบเฉพาะภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง แพร่ ตาก และกาญจนบุรี

E. *striatum* – group

36. *Simulium Chiangmaiense* พบเฉพาะในภาคเหนือ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ตาก และกำแพงเพชร

37. *Simulium nakhonense* พบใน 20 จังหวัดภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง แพร่ น่าน ตาก กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ จันทบุรี สระแก้ว เพชรบุรี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา และนราธิวาส

38. *Simulium quinquestriatum* พบใน 16 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ตาก แพร่ กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา และนราธิวาส

F. tuberosum – group

39. *Simulium brevipar* พบใน ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน อุตรดิตถ์ กำแพงเพชร เพชรบุรี พิษณุโลก และเลย

40. *Simulium doipuiense* (S. sp. E) พบเฉพาะที่เชียงใหม่

41. *Simulium rufibasis* พบในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน พิษณุโลก และเลย

42. *Simulium tani* พบใน 22 จังหวัด ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง อุตรดิตถ์ ตาก กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ระยอง จันทบุรี นครราชสีมา เลย กาญจนบุรี ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง กระบี่ พังงา และนราธิวาส

43. *Simulium weji* พบในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ลำปาง ตาก กาญจนบุรี และเลย

G. variegatum – group

44. *Simulium chamlongi* พบเฉพาะในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และแพร่

6. Unknown subgenus พบ 1 ชนิดคือ

45. *Simulium baimaii* พบเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ จังหวัดเลย

5.5.3 สรุปผล

ในการศึกษาการแพร่กระจายและชนิดของแมลงรบกวนในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศ ได้พบ รินดำที่ได้ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แล้วทั้งหมดจำนวน 45 ชนิด ในจำนวนนี้ เป็นรินดำที่เพิ่งรายงานการพบ ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก 3 ชนิด ได้แก่ *S. tahanense*, *S. whartoni* และ *S. hertinervis* รินดำเหล่านี้ มีการแพร่กระจายต่างกัน บางชนิดมีการแพร่กระจายจำกัดเฉพาะจังหวัดใดจังหวัดหนึ่ง หรือภาคใด ภาคหนึ่งเท่านั้น เช่น *S. merga*, *S. caudisclerum*, *S. choochotei*, *S. diagramicum* พบเฉพาะที่ จังหวัดเชียงใหม่ *S. chaliowae* พบเฉพาะที่จังหวัดแพร่ และ *S. baimaii* พบเฉพาะที่อุทยานแห่งชาติ ภูกระดึง จังหวัดเลย *S. nigrogilvum*, *S. siripoomemense* และ *S. Chiangmaiense* พบเฉพาะใน จังหวัดภาคเหนือ แต่ *S. oblongum* พบเฉพาะจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในทางตรงกันข้ามมี รินดำหลายชนิดที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทุกภูมิภาคของประเทศ เช่น *S. angulistylum*, *S. decuplum*, *S. asakoe*, *S. siamense*, *S. tani* และ *S. nakhonense* ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ารินดำ

แต่ละชนิดมีแหล่งที่อยู่อาศัยต่างกัน นอกจากนี้รันด้าบางชนิดอาจมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่อาศัยย่อยบางชนิดซึ่งจะได้กล่าวในตอนต่อไป

5.6 การศึกษานิเวศวิทยาและความแปรผันตามฤดูกาลของแมลงรันด้า

ระยะตัวอ่อนและตัวดักแด้ของแมลงรันด้าเป็นระยะที่ใช้ชีวิตอยู่ในน้ำไหล ตัวเมียรันด้าวางไข่ประมาณ 150-600 ฟองบนวัชพืช ก้อนหิน และเศษวัสดุต่างๆ ที่ลอยอยู่ในน้ำไหล จึงพบตัวอ่อนและตัวดักแด้เป็นจำนวนมากที่เกาะบนแหล่งอาศัยย่อยในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ ดังนั้นแมลงรันด้าจึงเหมาะสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของชนิดกับนิเวศวิทยาของแหล่งเพาะพันธุ์ โดยทั่วไปปัจจัยทางกายภาพมีผลต่อความหนาแน่นและการกระจายของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำ แมลงรันด้าแต่ละชนิดมีการกระจายในสภาพแวดล้อมต่างกัน ดังนั้นการศึกษากาสนามอันดับแรกของแมลงรันด้าจึงควรจะศึกษาปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เช่น ขนาดของแหล่งน้ำ ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล และอุณหภูมิของน้ำ ที่มีผลต่อการกระจายและความหนาแน่นของรันด้า ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพกับการกระจายตัวของแมลงรันด้าเป็นจำนวนมาก การศึกษานี้จะทำให้รู้ว่ารันด้าแต่ละชนิดชอบอาศัยในแหล่งเพาะพันธุ์แบบใด และสามารถคาดคะเนชนิดของรันด้าในแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีสภาพแวดล้อมต่างกัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมและกำจัดรันด้าที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ในอนาคต นอกจากนี้ผลการศึกษายังชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างชิปลิงสปีชีส์ของกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนกับแหล่งอาศัยย่อยจำเพาะ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการเกิดวิวัฒนาการของการแตกแขนงเป็นชิปลิงสปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนของแมลงรันด้า

5.6.1 ตัวอย่างและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ศึกษาเก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติใน 6-10 จังหวัดภาคเหนือ โดยเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 1 ปี ในช่วงฤดูฝน หนาว และร้อน (ตารางที่ 5.1 ก, ข และ ภาพที่ 5.2)

ฤดูฝน (พฤษภาคม-มิถุนายน 2546) ศึกษาแหล่งน้ำไหลจำนวน 61 แห่ง บริเวณ 10 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย 4 แห่ง แม่ฮ่องสอน 21 แห่ง เชียงใหม่ 23 แห่ง ลำพูน 1 แห่ง ลำปาง 3 แห่ง แพร่ 1 แห่ง อุดรดิตถ์ 1 แห่ง สุโขทัย 1 แห่ง ตาก 3 แห่ง และกำแพงเพชร 3 แห่ง

ฤดูหนาว (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546) ศึกษาแหล่งน้ำไหลจำนวน 58 แห่ง บริเวณ 8 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย 4 แห่ง แม่ฮ่องสอน 21 แห่ง เชียงใหม่ 21 แห่ง ลำปาง 3 แห่ง แพร่ 2 แห่ง สุโขทัย 1 แห่ง ตาก 3 แห่ง และกำแพงเพชร 3 แห่ง ซึ่งเป็นสถานที่ศึกษาเดิมจำนวน 54 แห่งและได้เลือกสถานที่ศึกษาเพิ่มอีก 4 แห่ง

ฤดูร้อน (เมษายน 2547) ศึกษาแหล่งน้ำไหลจำนวน 39 แห่ง บริเวณ 6 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย 4 แห่ง แม่ฮ่องสอน 14 แห่ง เชียงใหม่ 15 แห่ง ลำปาง 2 แห่ง แพร่ 2 แห่ง และตาก 2 แห่ง ซึ่งเป็นสถานที่เดิมซ้ำกับฤดูฝนและฤดูหนาว แต่จำนวนแหล่งน้ำลดลง เนื่องจากแหล่งน้ำหลายแห่งไม่มีน้ำในฤดูนี้

แหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาทั้งหมดเท่ากับ 65 แห่ง ซึ่งสามารถแบ่งตามความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 2 ระดับ ได้แก่ ความสูงต่ำกว่า 500 เมตร (lowland) 37 แห่ง และความสูงมากกว่า 500 เมตร (highland) 28 แห่ง มีความกว้างตั้งแต่ 0.22-12.67 เมตร และมีความสูงอยู่ระหว่าง 200-1500 เมตร

2. วิธีการเก็บและวิธีบันทึกตัวแปรทางกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างและดักแมลงวันดำในทุกแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย เช่น พืช หิน และพลาสติก โดยเดินเป็นแนวทะแยงเพื่อเก็บตัวอย่างจากชายฝั่งด้านหนึ่งไปยังชายฝั่งตรงข้ามแบบไป-กลับเป็นระยะทางประมาณ 25 เมตร จำแนกตัวอย่างที่เก็บได้จากแหล่งที่อยู่อาศัยย่อยแต่ละชนิดในหลอดเก็บตัวอย่าง ดองตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดในน้ำยา carnoy's fixative (2 ส่วน absolute ethanol: 1 ส่วน glacial acetic acid) เปลี่ยนน้ำยาหลังจากดองตัวอย่างประมาณ 2 นาที่ 10 นาที่ และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และต้องแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งตลอดเวลา หลังจากนั้นจะเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C

ในการศึกษาภาคสนามนอกจากจะทำการจดปัจจัยทางกายภาพทั่วๆ ไป ของแหล่งเพาะพันธุ์ดังกล่าวมาแล้ว ยังต้องทำการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติม โดยทำการบันทึกเวลาเริ่มต้น เวลาทั้งหมดที่เก็บตัวอย่าง ฤดูกาล ประมาณค่าเปอร์เซ็นต์การปกคลุมของเรือนยอด ความชื้นของน้ำ จำแนกชนิดของป่าบริเวณชายฝั่งของแหล่งน้ำไหล จำแนกชนิดของที่อยู่อาศัยย่อยของแหล่งน้ำ เช่น โคลน ทราบ กรวด ก้อนหินขนาดต่างๆ และลานหิน

3. วิธีวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม PATN และ PCA

วิเคราะห์ข้อมูลตัวแปรทางกายภาพของแหล่งน้ำ จำนวนตัว จำนวนชนิด ที่พบในแต่ละแหล่งน้ำ ทำการทดสอบการกระจายของข้อมูลทั้งหมดว่ามีการกระจายที่ปกติ (normal distribution) หรือไม่ ถ้าข้อมูลมีการกระจายไม่ปกติจะต้องทำการแปลงฐานข้อมูล (transform) โดยใช้ $\log(X)$ หรือ $\log(X+1)$ (ในกรณีที่ข้อมูลมีค่า 0) เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายที่ปกติก่อนนำไปวิเคราะห์ข้อมูล ทำการวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis) เพื่อวิเคราะห์แบบแผนการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหล (cluster analysis) โดยใช้ UPGMA (Unweighted Pair Group arithMetic Averaging) และการจัดอันดับ (Ordination) โดยใช้ SSH (semi-strong Hybrid MultiDimentional Scaling) ด้วยข้อมูลทางชีวภาพ (ชนิดของตัวอ่อนแมลงวันดำ) ในแต่ละฤดู แมลงวันดำชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 (ผลจากการวิเคราะห์ PCC analysis) จะถูกจัดอันดับเพื่อหาความสัมพันธ์กับการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหล ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PATN (Pattern Analysis Package) (Belbin, 1995) เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม PATN มีความน่าเชื่อถือและง่ายต่อการประมวลผล ผู้วิจัยได้เลือกชนิดแมลงวันดำที่พบมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งน้ำไหลทั้งหมดและเลือกแหล่งน้ำไหลที่พบวันดำเท่ากับหรือมากกว่า 25 ตัวขึ้นไปมาวิเคราะห์ข้อมูล ทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลการจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม PATN ข้างต้น โดยทำการวิเคราะห์ Hierarchical Cluster Analysis ด้วยข้อมูลความคล้ายคลึงกันของชนิดแมลงวันดำโดยใช้การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์แบบ Pearson correlation ในการวัดค่าความแตกต่างระหว่างแหล่งน้ำไหล โดยใช้โปรแกรม SPSS 9.0 for Windows (Statistical Package for Social Science)

Principal component analysis เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในการลดค่าปัจจัยต่างๆ เป็นค่าตัวแปรที่สามารถแปรผลต่างๆ ได้ง่ายยิ่งขึ้น ซึ่งเรียกว่า Principal components (PCs) พิจารณาค่า eigenvalues มากกว่า 1.0 ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ (correlation analysis) ระหว่างปัจจัยต่างๆ ของแหล่งน้ำและ principal components โดยทำการพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95% และ 99% ด้วยโปรแกรม SPSS 9.0 for

Windows นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการปรากฏของชนิดแมลงรบกวนแต่ละแหล่งน้ำไหล (ปรากฏ=1, ไม่ปรากฏ=0) กับค่าตัวแปรของแต่ละ principle components

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) ปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำ จำนวนตัวและจำนวนชนิดของแมลงรบกวนที่พบในแหล่งน้ำไหลแต่ละฤดู พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ด้วยโปรแกรม SPSS 9.0 for Windows

ตารางที่ 5.1ก แหล่งน้ำไหลธรรมชาติในเขตภาคเหนือของประเทศไทยที่ทำการศึกษานเวศวิทยาของแมลงรึ้นดำในช่วงฤดูฝนจำนวน 61 แห่ง (พฤษภาคม-มิถุนายน 2546) ฤดูหนาวจำนวน 58 แห่ง (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546) และฤดูร้อนจำนวน 39 แห่ง (เมษายน 2547)

ลำดับที่	แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
1	บ้านโป่งปาดอง (โป่งน้ำร้อน) ต. แม่เจดีย์ใหม่ อ. เวียงป่าเป้า จ. เชียงราย	CHR01	9 พ.ค. 2546 12 พ.ย. 2546 11 เม.ย. 2547	N19°06'45 E99°21'51	663
2	บ้านทุ่งยาว ต. แม่เจดีย์ อ. เวียงป่าเป้า จ. เชียงราย	CHR02	10 พ.ค. 2546 12 พ.ย. 2546 11 เม.ย. 2547	N19°11'54 E99°27'26	654
3	น้ำตกขุนกรณ์ ต. ปางริมกรณ์ อ. เมือง จ. เชียงราย	CHR03	3 มิ.ย. 2546 12 พ.ย. 2546 11 เม.ย. 2547	N19°50'52 E99°40'05	500
4	ด่านตรวจแม่ไถ่ ต. แม่เจดีย์ อ. เวียงป่าเป้า จ. เชียงราย	CHR04	12 พ.ค. 2546 11 พ.ย. 2546 11 เม.ย. 2547	N19°05'05 E99°24'45	480
5**	วนอุทยานทุ่งบัวตอง ต. แม่ฮอด อ. ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน	MHS01	5 มิ.ย. 2546 1 ธ.ค. 2546	N18°53'15 E98°05'38	1500
6	บ้านแม่เหาะ ต. แม่เหาะ อ. แม่สะเรียง จ. แม่ฮ่องสอน	MHS02	4 มิ.ย. 2546 30 พ.ย. 2546 14 เม.ย. 2547	N18°07'45 E98°04'36	1080
7	สวนแม่ฮอด ต. แม่ฮอด อ. ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน	MHS03	5 มิ.ย. 2546 1 ธ.ค. 2546 14 เม.ย. 2547	N18°49'52 E98°02'54	1000
8	บ้านปางเปก ต. แม่เนาเต็ง อ. ปาย จ. แม่ฮ่องสอน	MHS04	6 มิ.ย. 2546 2 ธ.ค. 2546 16 เม.ย. 2547	N19°02'25 E99°20'24	840
9	บ้านนาจิว ต. แม่ขมน้อย อ. ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน	MHS05	5 มิ.ย. 2546 1 ธ.ค. 2546 15 เม.ย. 2547	N18°49'34 E98°02'31	814
10**	สถานีควบคุมไฟป่าปางมะผ้า อ. ปางมะผ้า จ. แม่ฮ่องสอน	MHS06	6 มิ.ย. 2546 2 ธ.ค. 2546	N19°28'56 E98°17'48	727
11	บ้านใหม่พัฒนา ต. แม่ฮอด อ. ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน	MHS07	5 มิ.ย. 2546 1 ธ.ค. 2546 15 เม.ย. 2547	N18°50'22 E98°00'37	688
12	แยกวัดจันทร์ อบต. แม่ฮั่ว ต. แม่ฮั่ว อ. ปาย จ. แม่ฮ่องสอน	MHS08	6 มิ.ย. 2546 2 ธ.ค. 2546 16 เม.ย. 2547	N19°17'06 E98°29'02	525

ตารางที่ 5.1ก (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
13	อุทยานแห่งชาติถ้ำปลา-น้ำตกผาเสื่อ ต. ห้วยผา อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน	MHS09	6 มิ.ย. 2546 2 ธ.ค. 2546 16 เม.ย. 2547	N19°25'30 E97°59'24	500
14**	บ้านน้ำกาด ต. ห้วยผา อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน	MHS10	6 มิ.ย. 2546 2 ธ.ค. 2546	N19°29'19 E98°03'11	500
15	บ้านหนองแห้ง อ. แม่ลาน้อย จ. แม่ฮ่องสอน	MHS11	4 มิ.ย. 2546 30 พ.ย. 2546 14 เม.ย. 2547	N18°38'35 E97°56'41	462
16**	ห้วยแม่จ่า ต. ห้วยโป่ง อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน	MHS12	5 มิ.ย. 2546 1 ธ.ค. 2546	N19°00'07 E97°58'40	447
17	ห้วยชะจอย 2 (โรงเรียนขุนงูเหนือ) ต. แม่เหาะ อ. แม่สะเรียง จ. แม่ฮ่องสอน	MHS13	4 มิ.ย. 2546 30 พ.ย. 2546 14 เม.ย. 2547	N18°08'08 E98°00'12	430
18**	บ้านแม่โถ ต. แม่โถ อ. แม่ลาน้อย จ. แม่ฮ่องสอน	MHS14	4 มิ.ย. 2546 30 พ.ย. 2546	N18°34'37 E97°56'43	417
19	สวนป่าจุฬาภรณ์ วัดป่าถ้ำวัว บ้านแม่สุยะ อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน	MHS15	6 มิ.ย. 2546 2 ธ.ค. 2546 16 เม.ย. 2547	N19°31'14 E98°05'44	400
20***	ห้วยห้วยก ต. แม่ลาหลวง อ. แม่ลาน้อย จ. แม่ฮ่องสอน	MHS16	4 มิ.ย. 2546	N18°33'44 E97°55'46	388
21***	วัดแม่ปาง1 ต. สันติ อ. แม่ลาน้อย จ. แม่ฮ่องสอน	MHS17	4 มิ.ย. 2546	N18°27'04 E97°56'31	323
22**	วัดแม่ปาง2 ต. สันติ อ. แม่ลาน้อย จ. แม่ฮ่องสอน	MHS18	4 มิ.ย. 2546 30 พ.ย. 2546	N18°27'04 E97°56'31	323
23**	ก่อนถึงรพ. แม่ลาน้อย อ. แม่ลาน้อย จ. แม่ฮ่องสอน	MHS19	4 มิ.ย. 2546 30 พ.ย. 2546	N18°22'37 E97°56'43	307
24***	แม่น้ำแม่สะงา ต. หมอกจำแป๋ อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน	MHS20	5 มิ.ย. 2546	N19°27'32 E97°58'11	247
25	ตรงข้ามภูโคลนคันทรี่คลับ ต. หมอกจำแป๋ อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน	MHS21	5 มิ.ย. 2546 1 ธ.ค. 2546 15 เม.ย. 2547	N19°25'27 E97°57'18	242

ตารางที่ 5.1ก (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
26**	แม่น้ำวางอุทยานแห่งชาติขุนวาง อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่	CHM01	11 พ.ค. 2546	N18°37'53 E98°30'35	1362
27	น้ำตกสิริภูมิ อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่	CHM02	11 พ.ค. 2546 14 พ.ย. 2546 9 เม.ย. 2547	N18°32'44 E98°31'10	1300
28	แม่น้ำกว่ง บ้านปางน้ำถุ1 ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM03	10 พ.ค. 2546 11 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N19°03'19 E99°21'33	870
29	แม่น้ำกว่ง บ้านปางน้ำถุ2 ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM04	10 พ.ค. 2546 11 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N19°03'19 E99°21'33	850
30	บ้านห้วยหม้อ ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM05	3 มิ.ย. 2546 11 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N19°02'25 E99°20'24	800
31**	ห้วยแม่ลาก บ้านปางลัน ต. ป่าแป๋ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่	CHM06	6 มิ.ย. 2546 2 ธ.ค. 2546	N19°09'22 E98°41'42	750
32	น้ำตกหมอกฟ้า อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	CHM07	7 มิ.ย. 2546 13 พ.ย. 2546 10 เม.ย. 2547	N19°06'34 E98°46'40	545
33	บ้านแม่เตาดิน ต. ห้วยแก้ว กิ่ง อ. แม่ออน จ. เชียงใหม่	CHM08	10 พ.ค. 2546 15 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N18°53'23 E99°15'57	507
34	บ้านผาหมอน อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่	CHM09	11 พ.ค. 2546 14 พ.ย. 2546 9 เม.ย. 2547	N18°32'42 E98°34'23	500
35**	บ้านโป่งสามัคคี1 ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM10	10 พ.ค. 2546 15 พ.ย. 2546	N18°53'50 E99°15'45	495
36**	บ้านโป่งสามัคคี2 ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM11	10 พ.ค. 2546 15 พ.ย. 2546	N18°54'24 E99°14'43	484
37	แม่น้ำกว่ง1 บ้านแม่หวาน ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM12	9 พ.ค. 2546 11 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N18°58'36 E99°15'31	473
38	แม่น้ำกว่ง2 บ้านแม่หวาน ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM13	9 พ.ค. 2546 11 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N18°58'36 E99°15'31	472

ตารางที่ 5.1ก (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
39	แม่น้ำวง3 บ้านแม่หวาน ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM14	9 พ.ค. 2546 11 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N18°56'38 E99°14'12	471
40	บ้านแม่แรมน้อย ต. แม่แรม อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	CHM15	7 มิ.ย. 2546 13 พ.ย. 2546 10 เม.ย. 2547	N18°57'06 E98°52'14	460
41	แม่น้ำลาย (ติดปางช้าง) บ้านแม่หวาน ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM16	9 พ.ค. 2546 11 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N18°56'38 E99°14'12	456
42	แม่น้ำวอง บ้านโป่งดิน ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM17	9 พ.ค. 2546 11 พ.ย. 2546 12 เม.ย. 2547	N18°56'04 E99°14'29	454
43**	บ้านศาลาปางสัก ต. เจริญดอย อ.ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	CHM18	10 พ.ค. 2546 15 พ.ย. 2546	N18°53'56 E99°11'59	450
44	น้ำตกแม่สา อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	CHM19	6 มิ.ย. 2546 13 พ.ย. 2546 13 เม.ย. 2547	N18°54'17 E98°54'10	400
45***	บ้านแม่มะ (ร้านสวัสดิการ ดันน้ำปลาเผา) ต. แม่แรม อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	CHM20	7 มิ.ย. 2546	N19°02'25 E99°20'24	400
46	บ้านแม่มะ (ร้านสวัสดิการ ดันน้ำปลาเผา) ต. แม่แรม อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	CHM21	7 มิ.ย. 2546 13 พ.ย. 2546 13 เม.ย. 2547	N18°53'55 E98°52'25	400
47	บ้านปางแหว ต. แม่แรม อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	CHM22	7 มิ.ย. 2546 13 พ.ย. 2546 10 เม.ย. 2547	N18°56'15 E98°53'46	360
48**	ด่านเก็บเงินก่อนขึ้นอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่	CHM23	11 พ.ค. 2546 14 พ.ย. 2546	N18°29'38 E98°40'25	350
49***	อุทยานแห่งชาติแม่ปิง ต. ลี้ อ. ลี้ จ. ลำพูน	LPH01	12 พ.ค. 2546	N17°43'08 E98°55'12	406
50	น้ำตกธารทอง อ. วังเหนือ จ. ลำปาง	LPA01	3 มิ.ย. 2546 12 พ.ย. 2546 11 เม.ย. 2547	N19°04'07 E99°43'57	700
51	ก่อนถึงอุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน บ้านทุ่ง ต. แจ้ซ้อน อ. เมืองปาน จ. ลำปาง	LPA02	12 พ.ค. 2546 15 พ.ย. 2546 11 เม.ย. 2547	N18°49'52 E99°29'14	400
52**	ห้วยแม่ปาน ต. เมืองปาน อ. เมืองปาน จ. ลำปาง	LPA03	12 พ.ค. 2546 15 พ.ย. 2546	N18°49'52 E99°29'14	350

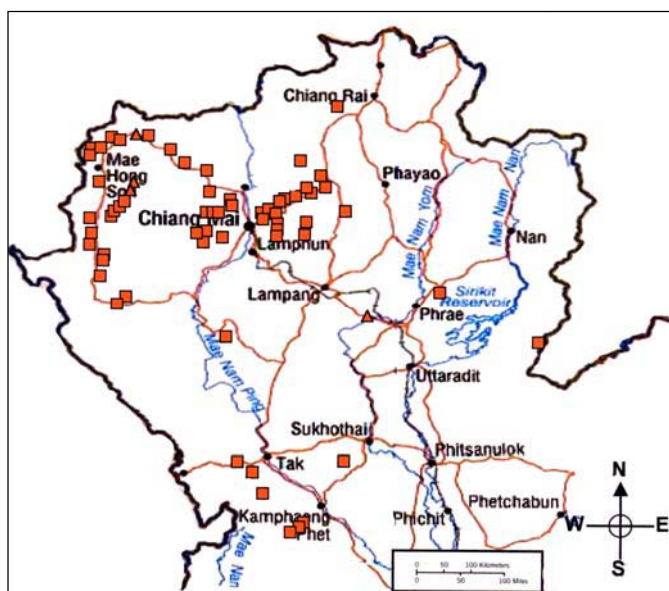
ตารางที่ 5.1ก (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
53	น้ำตกนาคูหา ต. สวนเขื่อน อ. เมือง จ. แพร่	PHR01	8 มิ.ย. 2546 3 ธ.ค. 2546 8 เม.ย. 2547	N18°06'59 E100°18'08	550
54***	น้ำตกกุสอยดาว อุทยานแห่งชาติกุสอยดาว ต. ห้วยมุ่น อ. น้ำปาด จ. อุตรดิตถ์	UTD01	8 มิ.ย. 2546	N17°42'14 E100°57'20	650
55**	อุทยานแห่งชาติรามคำแหง ต. นาเชิงคีรี อ. ศรีมศ จ. สุโขทัย	SKT01	29 มิ.ย. 2546 21 ธ.ค. 2546	N16°48'30 E98°59'27	270
56	น้ำตกลานเลี้ยวม้า อุทยานแห่งชาติลานสาง อ. เมือง จ. ตาก	TAK01	29 มิ.ย. 2546 21 ธ.ค. 2546 24 เม.ย. 2547	N16°46'43 E99°01'07	260
57	น้ำตกคลองวังเจ้า กิ่ง อ. วังเจ้า จ. ตาก	TAK02	29 มิ.ย. 2546 20 ธ.ค. 2546 24 เม.ย. 2547	N16°30'07 E99°09'45	250
58**	สะพาน กม. ที่ 16 อุทยานแห่งชาติลานสาง อ. เมือง จ. ตาก	TAK03	29 มิ.ย. 2546 21 ธ.ค. 2546	N16°46'43 E99°01'07	250
59**	น้ำตกคลองน้ำไหล อุทยานแห่งชาติคลองลาน อ. คลองลาน จ. กำแพงเพชร	KPP01	28 มิ.ย. 2546 20 ธ.ค. 2546	N16°11'33 E99°15'51	300
60**	น้ำตกคลองลาน อุทยานแห่งชาติคลองลาน อ. คลองลาน จ. กำแพงเพชร	KPP02	28 มิ.ย. 2546 20 ธ.ค. 2546	N16°07'43 E99°16'52	250
61**	หน่วยพิทักษ์คลองน้ำไหลอุทยานแห่งชาติคลองลาน อ. คลองลาน จ. กำแพงเพชร	KPP03	28 มิ.ย. 2546 20 ธ.ค. 2546	N16°12'25 E99°16'20	200

หมายเหตุ : * เป็นแหล่งน้ำไหลที่ไม่สามารถทำการศึกษาในฤดูหนาวจำนวน 7 แห่ง
 ** เป็นแหล่งน้ำไหลที่ไม่สามารถทำการศึกษาในฤดูร้อนจำนวน 22 แห่ง
 *** เป็นแหล่งน้ำไหลที่ไม่สามารถทำการศึกษาทั้งฤดูหนาวและฤดูร้อนจำนวน 7 แห่ง

ตารางที่ 5.1ข แหล่งน้ำไหลธรรมชาติจำนวน 4 แห่งในเขตภาคเหนือที่ทำการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงริ้นดำเพิ่มในฤดูหนาว (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546) และฤดูร้อน (เมษายน 2547)

ลำดับที่	แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
1	บ้านหัวแม่สุรินทร์ ต. แม่ฮอด อ. ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน	MHS22	1 ธ.ค. 2546 14 เม.ย. 2547	N18°55'02 E98°05'24	1261
2	สะพานกอน้ำตกแม่สุรินทร์ ต. แม่ฮอด อ. ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน	MHS23	1 ธ.ค. 2546 14 เม.ย. 2547	N18°55'59 E98°04'37	1185
3	ปางมะผ้า กม. 138 และ 139 อ. ปางมะผ้า จ. แม่ฮ่องสอน	MHS24	2 ธ.ค. 2546 16 เม.ย. 2547	N19°30'08 E98°16'49	660
4	น้ำตกแม่แก้งหลวงอุทยานแห่งชาติเวียงโกศัย อ. วังชิ้น จ.แพร่	PHR02	4 ธ.ค. 2546 17 เม.ย. 2547	N17°58'08 E98°35'32	300

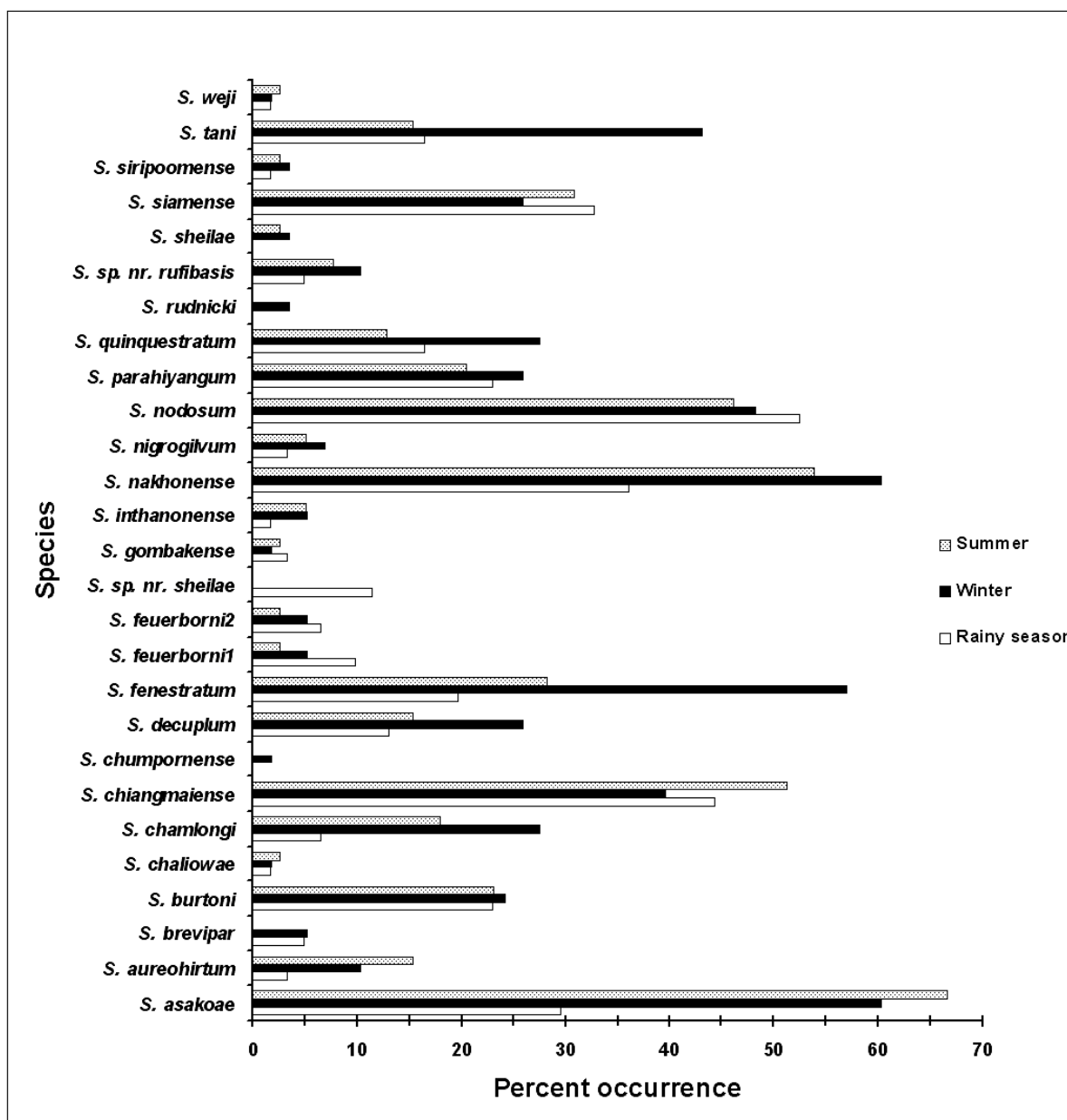


ภาพที่ 5.2 แสดงตำแหน่งแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงริ้นดำบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย

5.6.2 ผลการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงร้นดำ

1. ชนิดของแมลงร้นดำและเปอร์เซ็นต์การกระจายในแต่ละฤดู

จากการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงร้นดำบริเวณ 10 จังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย โดยทำการศึกษาภาคสนามเป็นระยะเวลา 1 ปีจำนวน 3 ฤดูกาล ได้แก่ ฤดูฝน (พฤษภาคม–มิถุนายน 2546) จำนวน 61 แห่งในเขต 10 จังหวัด (เชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ อุตรดิตถ์ สุโขทัย ตากและกำแพงเพชร) ฤดูหนาว (พฤศจิกายน–ธันวาคม 2546) จำนวน 58 แห่งในเขต 8 จังหวัด (เชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำปาง แพร่ สุโขทัย ตากและกำแพงเพชร) และฤดูร้อน (เมษายน 2547) จำนวน 39 แห่งในเขต 6 จังหวัด (เชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำปาง แพร่ และ ตาก) ผู้วิจัยได้ทำการจำแนกชนิด ร้นดำเสร็จสมบูรณ์แล้ว พบแมลงร้นดำทั้งหมด 27 ชนิด ได้แก่ *Simulium asakoe*, *S. aureochirtum*, *S. brevipar*, *S. burtoni*, *S. chaliowae*, *S. chamlongi*, *S. Chiangmaiense*, *S. chumpornense*, *S. decuplum*, *S. fenestratum*, *S. feuerborni*¹, *S. feuerborni*², *S. sp. nr. sheilae*, *S. gombakense*, *S. inthanonense*, *S. nakhonense*, *S. nigrogilvum*, *S. nodosum*, *S. parahiyangum*, *S. quinquestratum*, *S. rudnicki*, *S. sp. nr. rufibasis*, *S. sheilae*, *S. siamense*, *S. siripoomense*, *S. tani* และ *S. weji* ฤดูฝนพบ 24 ชนิดไม่พบชนิด *S. chumpornense*, *S. rudnicki* และ *S. sheilae* ฤดูหนาวพบ 26 ชนิดไม่พบชนิด *S. sp. nr. sheilae* และฤดูร้อนพบเพียง 23 ชนิดไม่พบชนิด *S. brevipar*, *S. chumpornense*, *S. sp. nr. sheilae* และ *S. rudnicki* แมลงร้นดำที่พบทั้งสามฤดูมีจำนวน 22 ชนิด แมลงร้นดำแต่ละชนิดมีเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายแตกต่างกัน บางชนิดมีเปอร์เซ็นต์การกระจายสูงมากกว่า 50% เฉพาะในบางฤดู ยกตัวอย่างเช่น ชนิด *S. asakoe* พบเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจาย 60.34% และ 66.67% ในฤดูหนาว และฤดูร้อนตามลำดับ เช่นเดียวกับชนิด *S. nakhonense* มีเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายสูงเท่ากับ 60.35% และ 53.85% ในฤดูหนาวและฤดูร้อนตามลำดับ แต่ชนิด *S. Chiangmaiense* พบเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายสูงถึง 51.28% ในฤดูร้อนเท่านั้น ในขณะที่ *S. fenestratum* มีเปอร์เซ็นต์สูง 56.89% ในฤดูหนาวเท่านั้นและชนิด *S. nodosum* มีเปอร์เซ็นต์สูงเท่ากับ 52.46% ในฤดูฝน แมลงร้นดำบางชนิดพบเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายต่ำและพบเฉพาะในบางฤดูเท่านั้น ได้แก่ ชนิด *S. sp. nr. sheilae* (11.48%) พบในฤดูฝนเท่านั้น และ *S. chumpornense* (1.72%) และ *S. rudnicki* (3.45%) พบเฉพาะฤดูหนาวเท่านั้น (ภาพที่ 5.3)

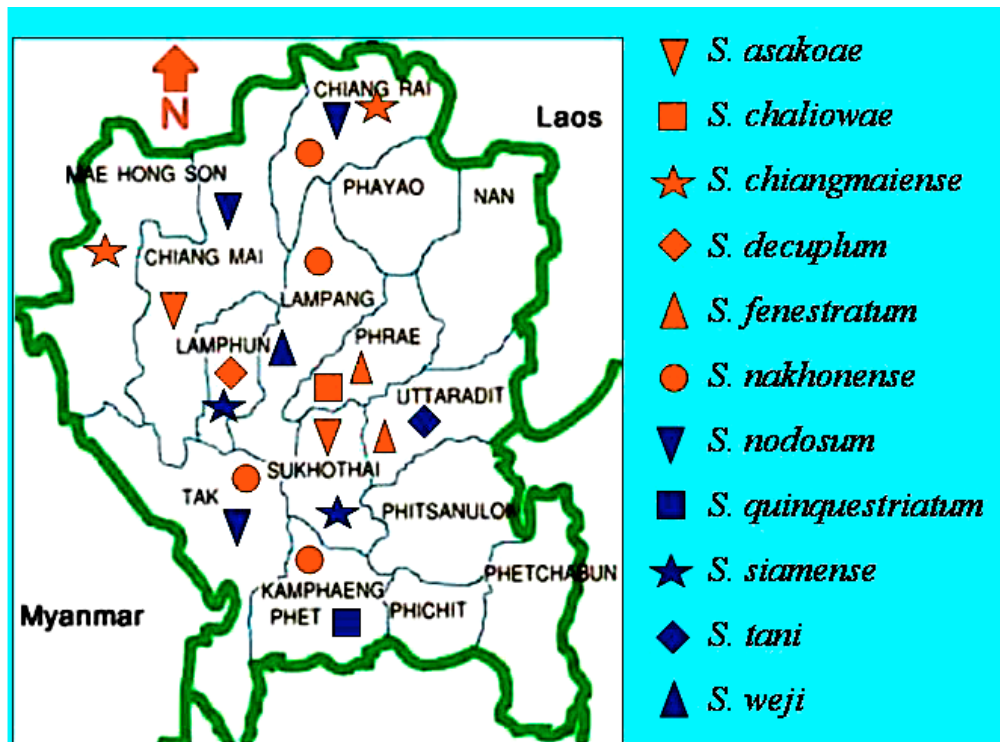


ภาพที่ 5.3 เปอร์เซนต์การกระจายของแมลงวันดำแต่ละชนิดที่พบในแหล่งน้ำไหลที่การศึกษาในฤดูฝนจำนวน 61 แห่งฤดูหนาวจำนวน 58 แห่ง และฤดูร้อนจำนวน 39 แห่ง

2. เปอร์เซนต์การกระจายของแมลงวันดำในแหล่งน้ำไหลบริเวณ 10 จังหวัดภาคเหนือ

ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การกระจายของแมลงวันดำในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบริเวณ 10 จังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย สามารถระบุชนิดที่มีการแพร่กระจายเด่นในแต่ละจังหวัด ดังนี้ จังหวัดเชียงราย ได้แก่ *S. nakhonense* (22.98%), *S. Chiangmaiense* (18.62%) และ *S. nodosum* (15.93%) แม่ฮ่องสอน ได้แก่ *S. Chiangmaiense* (25.36%) เชียงใหม่ ได้แก่ *S. nodosum* (21.94%) และ *S. asakoe* (21.75%) ลำพูน ได้แก่ *S. siamense* (88.89%) และ *S. decuplum* (11.21%) ลำปาง ได้แก่ *S. weji* (42.31%) และ *S. nakhonense* (26.69%)แพร่ ได้แก่ *S. Chaliowae* (69.23%) และ *S. fenestratum* (16.75%) อุตรดิตถ์ ได้แก่ *S. fenestratum* (76.47%) และ *S. tani* (19.61%) สุโขทัย ได้แก่ *S. siamense* (69.51%) และ *S. asakoe* (28.05%) ตาก ได้แก่ *S. nakhonense* (45.51%) และ

S. nodosum (17.81%) และกำแพงเพชร ได้แก่ *S. quinquestriatum* (36.58%) และ *S. nakhonense* (22.53%) จากการศึกษาพบว่าแมลงรึ้นดำชนิด *S. nakhonense* มีการกระจายในหลายจังหวัด ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ตากและกำแพงเพชร แต่บางชนิดมีการกระจายที่จำกัดเฉพาะบางจังหวัด ได้แก่ ชนิด *S. chaliowae* พบเฉพาะในจังหวัดแพร่และ *S. weji* พบที่ลำปางเท่านั้น (ภาพที่ 5.4)



ภาพที่ 5.4 ชนิดของแมลงรึ้นดำที่มีการแพร่กระจายสูงในบริเวณ 10 จังหวัด ภาคเหนือของประเทศไทย

3. การจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษา

จากการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชนิดและเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละแห่งที่ทำการศึกษา ได้ทดสอบหาความสัมพันธ์ Pearson correlation จากการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) เท่ากับ -0.167 ที่ระดับความเชื่อมั่น (p -value) เท่ากับ 0.1 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.01 หรือ 0.05 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีความสัมพันธ์กัน และการเก็บตัวอย่างในแต่ละแห่งที่ทำการศึกษาเป็นแบบสุ่ม กล่าวคือไม่มีความลำเอียงในการเก็บตัวอย่าง

ได้ทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในแต่ละฤดู คือ ฤดูฝน ฤดูหนาวและฤดูร้อน จัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจากความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของชนิดแมลงรึ้นดำที่พบในแต่ละแห่ง ด้วย Bray & Curtis แล้วทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลด้วย UPGMA และนำแหล่งน้ำไหลมาจัดเรียงอันดับบน Ordination Space ด้วย SSH ซึ่งมีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วย UPGMA แหล่งน้ำไหลที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีความคล้ายคลึงกันของชนิดแมลงรึ้นดำที่พบ ผลการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลในแต่ละฤดูมีดังนี้

ถดถวน

ทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาจำนวน 56 แห่ง ด้วยข้อมูลความคล้ายคลึงกันของชนิดแมลงริ้นดำ สามารถจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลออกเป็น 7 กลุ่ม (ภาพที่ 5.5) และนำแหล่งน้ำไหลมาจัดเรียงอันดับบน Ordination Space ด้วย SSH (ภาพที่ 5.6) จากภาพที่ 5.6 แสดงการจัดเรียงอันดับบน Ordination Space พบริ้นดำจำนวน 8 ชนิดที่มีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 (ผลจาก PCC Analysis ใน PATN) ได้แก่ *S. asakoe*, *S. burtoni*, *S. Chiangmaiense*, *S. fenestratum*, *S. nakhonense*, *S. nodosum*, *S. quinquestratum* และ *S. siamense* ทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของชนิดริ้นดำที่สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 7 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 11 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR01) แม่ฮ่องสอน 9 แห่ง (MHS03, MHS06, MHS08, MHS10, MHS12, MHS16, MHS17, MHS18 และ MHS21) และสุโขทัย 1 แห่ง (SKT01) ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำไหลที่พื้นลำธารประกอบด้วยกรวดและทราย มีค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของน้ำสูงมาก มีค่าความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำกว่า 800 เมตรยกเว้นแหล่งน้ำ 1 แห่งในจังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS03) ซึ่งมีความสูง 1000 เมตร ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. siamense* และพบ *S. fenestratum* ด้วยแต่จำนวนไม่มากนัก

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 11 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR02) แม่ฮ่องสอน 3 แห่ง (MHS09, MHS19 และ MHS20) และเชียงใหม่ 7 แห่ง (CHM08, CHM10, CHM11, CHM12, CHM14, CHM16 และ CHM17) ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำไหลที่พื้นลำธารประกอบด้วยก้อนหินขนาดต่างๆ มีความกว้างและความลึกมาก ความเร็วน้ำสูง อุณหภูมิน้ำสูง แต่ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและค่าความเค็มของน้ำต่ำ มีค่าความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างต่ำ (247-654 เมตร) ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. Chiangmaiense* นอกจากนี้ยังพบชนิด *S. nakhonense*, *S. nodosum* และ *S. quinquestratum* ด้วย

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 16 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR03) แม่ฮ่องสอน 5 แห่ง (MHS07, MHS11, MHS13, MHS14 และ MHS15) เชียงใหม่ 4 แห่ง (CHM07, CHM15, CHM19 และ CHM22) ลำปาง 1 แห่ง (LPA02) แพร่ 1 แห่ง (PHR01) ตาก 3 แห่ง (TAK01, TAK02 และ TAK03) และกำแพงเพชร 1 แห่ง (KPP03) ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับแหล่งน้ำในกลุ่มที่ 2 ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. nakhonense*, *S. nodosum* และ *S. quinquestratum*

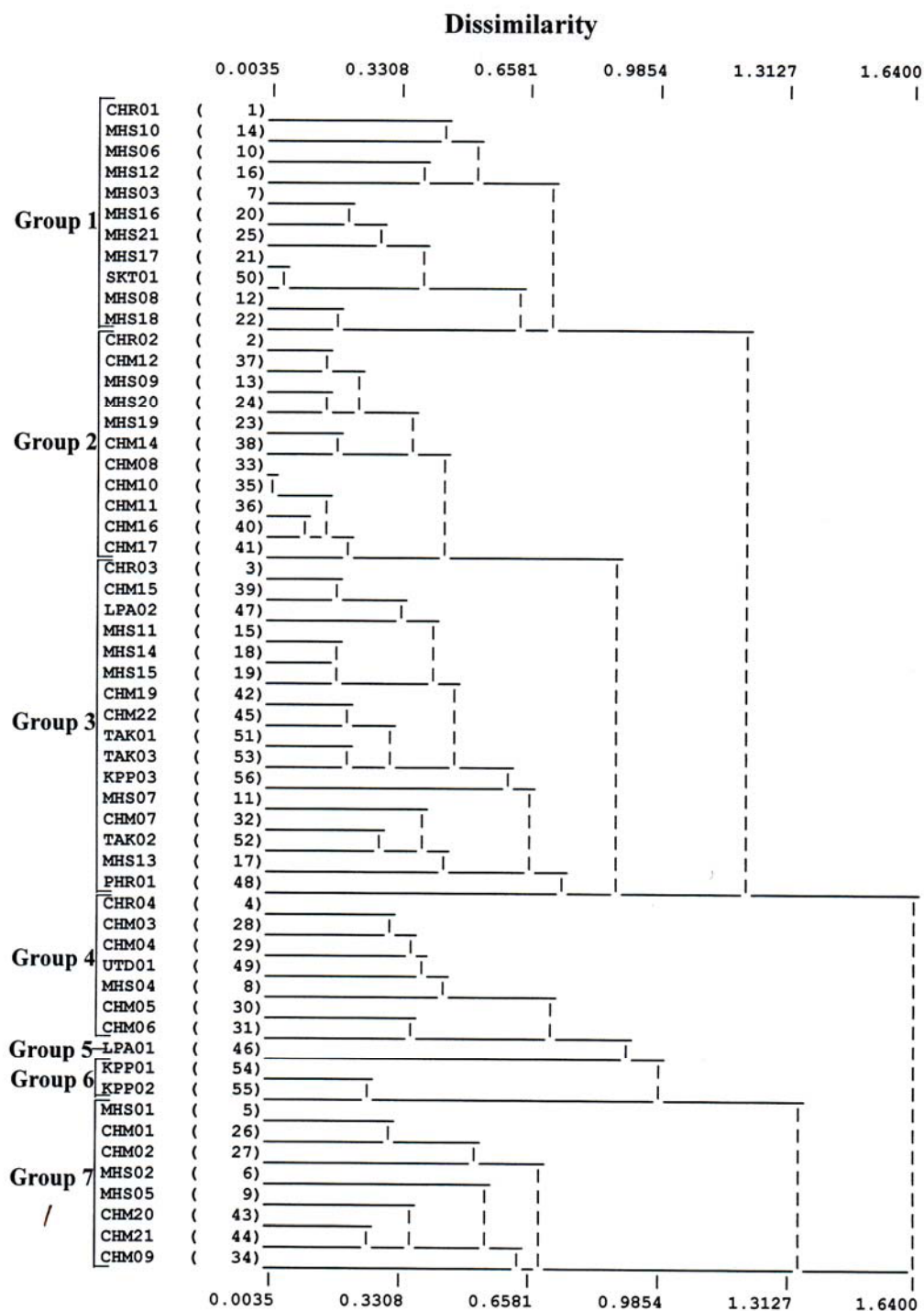
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 7 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR04) แม่ฮ่องสอน 1 แห่ง (MHS04) เชียงใหม่ 4 แห่ง (CHM03, CHM04, CHM05 และ CHM06) และอุดรดิตถ์ 1 แห่ง (UTD01) ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิน้ำและค่าการนำไฟฟ้าของน้ำต่ำ มีค่าความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 480-870 เมตร ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. fenestratum*

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดลำปาง (LPA01) เป็นแหล่งน้ำที่มีความเร็วน้ำค่อนข้างต่ำ แต่มีค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและค่าความเค็มของน้ำสูง มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 700 เมตร ชนิดที่พบมาก ได้แก่ *S. fenestratum* และ *S. weiji* (ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกน)

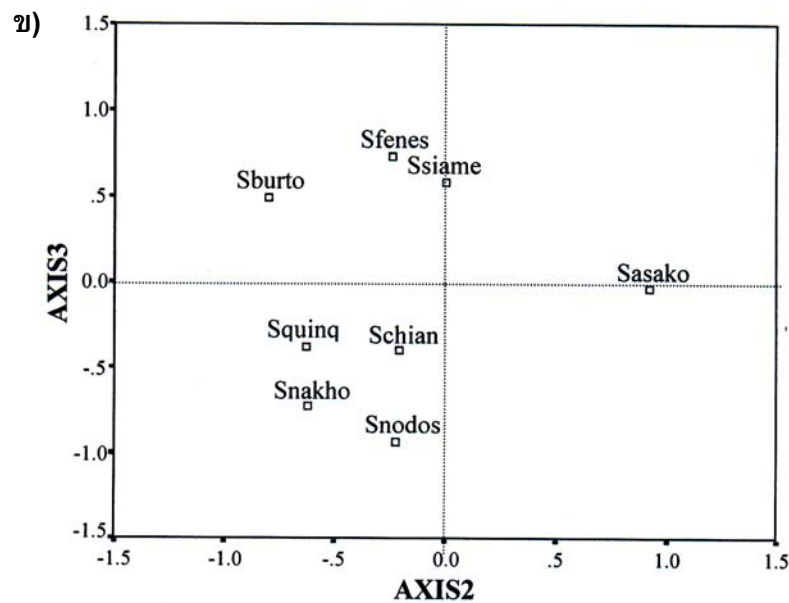
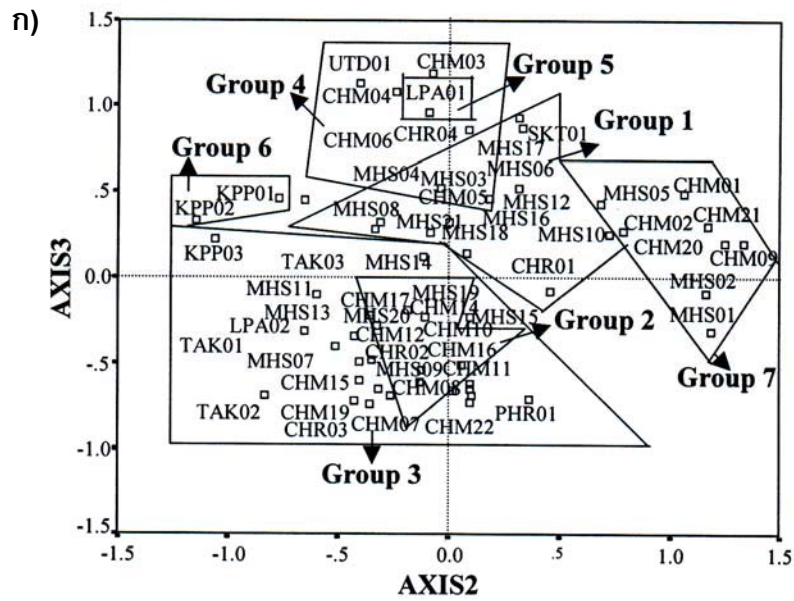
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 2 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดกำแพงเพชร (KPP01 และ KPP02) เป็นแหล่งน้ำไหลที่มีความกว้างและค่าการนำไฟฟ้าของน้ำค่อนข้างสูง มีค่าความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำมาก (250-300 เมตร) ชนิดที่พบมาก ได้แก่ *S. burtoni* และ *S. quinquestratum*

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 8 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 แห่ง (MHS01, MHS02 และ MHS05) และเชียงใหม่ 5 แห่ง (CHM01, CHM02, CHM09, CHM20 และ CHM21) ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำที่พื้นลำธารเป็นทรายและกรวด มีความกว้างและอุณหภูมิน้ำต่ำมาก แต่มีค่าความชื้นอากาศสูง ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลสูงมาก (814-1500 เมตร) ยกเว้นแหล่งน้ำ 2 แห่งในเขตจังหวัดเชียงใหม่ (CHM20 และ CHM21) ซึ่งมีความสูงเพียง 400 เมตร ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. asakoe*

เมื่อทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของชนิดริ้นดำที่สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 7 กลุ่ม สามารถสรุปได้ว่า *S. siamense* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 1 *S. Chiangmaiense*, *S. nakhonense*, *S. nodosum* และ *S. quinquestratum* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 2 และ 3 *S. fenestratum* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 4 และ 5 ชนิด *S. burtoni* สัมพันธ์กับกลุ่มที่ 6 และ *S. asakoe* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 7 เนื่องจากกลุ่มที่ 2 และ 3 มีชนิดที่พบเป็นจำนวนมากคล้ายคลึงกัน ได้แก่ *S. Chiangmaiense*, *S. nakhonense*, *S. nodosum* และ *S. quinquestratum* จึงไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน กลุ่มที่ 1 และ 4 พบชนิดที่คล้ายคลึงกัน ได้แก่ *S. fenestratum* และ *S. siamense* แต่เนื่องจากชนิด *S. siamense* พบเป็นจำนวนมากในกลุ่มที่ 1 และ *S. fenestratum* พบมากในกลุ่มที่ 4 ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน เนื่องจากกลุ่มที่ 5 พบชนิด *S. fenestratum* และ *S. weji* (ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60) ดังนั้นกลุ่มที่ 5 จึงถูกจัดให้อยู่ภายในกลุ่มที่ 4 นอกจากนี้พบชนิด *S. burtoni* และ *S. asakoe* เป็นจำนวนมากในกลุ่มที่ 6 และ 7 ตามลำดับ ดังนั้นทั้งสองกลุ่มนี้จึงถูกแยกออกจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน



ภาพที่ 5.5 แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 56 แห่งในช่วงฤดูฝน (พฤษภาคม-มิถุนายน 2546) สามารถจัดกลุ่มเป็น 7 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วย UPGMA ในโปรแกรม PATN



ภาพที่ 5.6 ก) แสดงการจัดเรียงอันดับแหล่งน้ำไหลจำนวน 56 แห่งในช่วงฤดูฝนโดยใช้ SSH (Stress=0.16)

ข) ชนิดของริ้นดำจำนวน 8 ชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 ในการแบ่งกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 7 กลุ่ม

หมายเหตุ Sasako=*S. asakoe*, Sburto=*S. burtoni*, Schian=*S. chiangmaiense*, Sfenes=*S. fenestratum*, Snakho=*S. nakhonense*, Snodos=*S. nodosum*, Squinq=*S. quinquestriatum*, Ssiame=*S. siamense*

ฤดูกาล

ทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาจำนวน 57 แห่ง ด้วยข้อมูลความคล้ายคลึงกันของชนิดที่พบ สามารถจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลออกเป็น 8 กลุ่ม (ภาพที่ 5.7) และนำแหล่งน้ำไหลมาจัดเรียงอันดับบน Ordination Space ด้วย SSH (ภาพที่ 5.8ก) จากภาพที่ 5.8ข แสดงการจัดกลุ่มบน Ordination Space พบมีจำนวน 4 ชนิดที่มีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 (ผลจาก PCC Analysis ใน PATN) ได้แก่ *S. asakoe*, *S. chiangmaiense*, *S. fenestratum* และ *S. nakhonense* ทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของชนิดที่สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 8 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 19 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 2 แห่ง (CHR01 และ CHR02) แม่ฮ่องสอน 5 แห่ง (MHS08, MHS09, MHS11, MHS15 และ MHS19) เชียงใหม่ 9 แห่ง (CHM08, CHM10, CHM11, CHM12, CHM15, CHM16, CHM17, CHM19 และ CHM23) ลำปาง 1 แห่ง (LPA03) ตาก 1 แห่ง (TAK02) และกำแพงเพชร 1 แห่ง (KPP03) ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำที่พื้นลำธารเป็นก้อนหินขนาดต่างๆ มีความกว้างและความลึกมาก ความเร็วน้ำสูง เป็นแหล่งน้ำไหลที่อยู่ในความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างต่ำ (200-663 เมตร) ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. nakhonense* และ *S. fenestratum*

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 3 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน 2 แห่ง (MHS12 และ MHS18) และเชียงใหม่ 1 แห่ง (CHM13) เป็นแหล่งน้ำที่มีความกว้างปานกลางและมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำกว่า 500 เมตร ชนิดที่พบมาก ได้แก่ *S. chiangmaiense*

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 19 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 2 แห่ง (CHR03 และ CHR04) แม่ฮ่องสอน 7 แห่ง (MHS03, MHS04, MHS06, MHS07, MHS13, MHS23 และ MHS24) เชียงใหม่ 5 แห่ง (CHM03, CHM04, CHM05, CHM06 และ CHM07) ลำปาง 1 แห่ง (LPA02) ตาก 2 แห่ง (TAK01 และ TAK03) และกำแพงเพชร 2 แห่ง (KPP01 และ KPP02) ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำที่มีความกว้างปานกลางและอุณหภูมิน้ำต่ำมาก มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำกว่า 900 เมตร ยกเว้นแหล่งน้ำ 2 แห่งในจังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS03 และ MHS23) ที่สูงกว่า 1000 เมตร ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. nakhonense* และ *S. fenestratum*

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 2 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแพร่ (PHR01 และ PHR02) เป็นแหล่งน้ำที่มีค่าการนำไฟฟ้าของน้ำและความชื้นอากาศสูงมาก มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำกว่า 700 เมตร ชนิดที่พบมาก ได้แก่ *S. fenestratum* และพบ *S. nakhonense* ด้วยแต่จำนวนไม่มากนัก

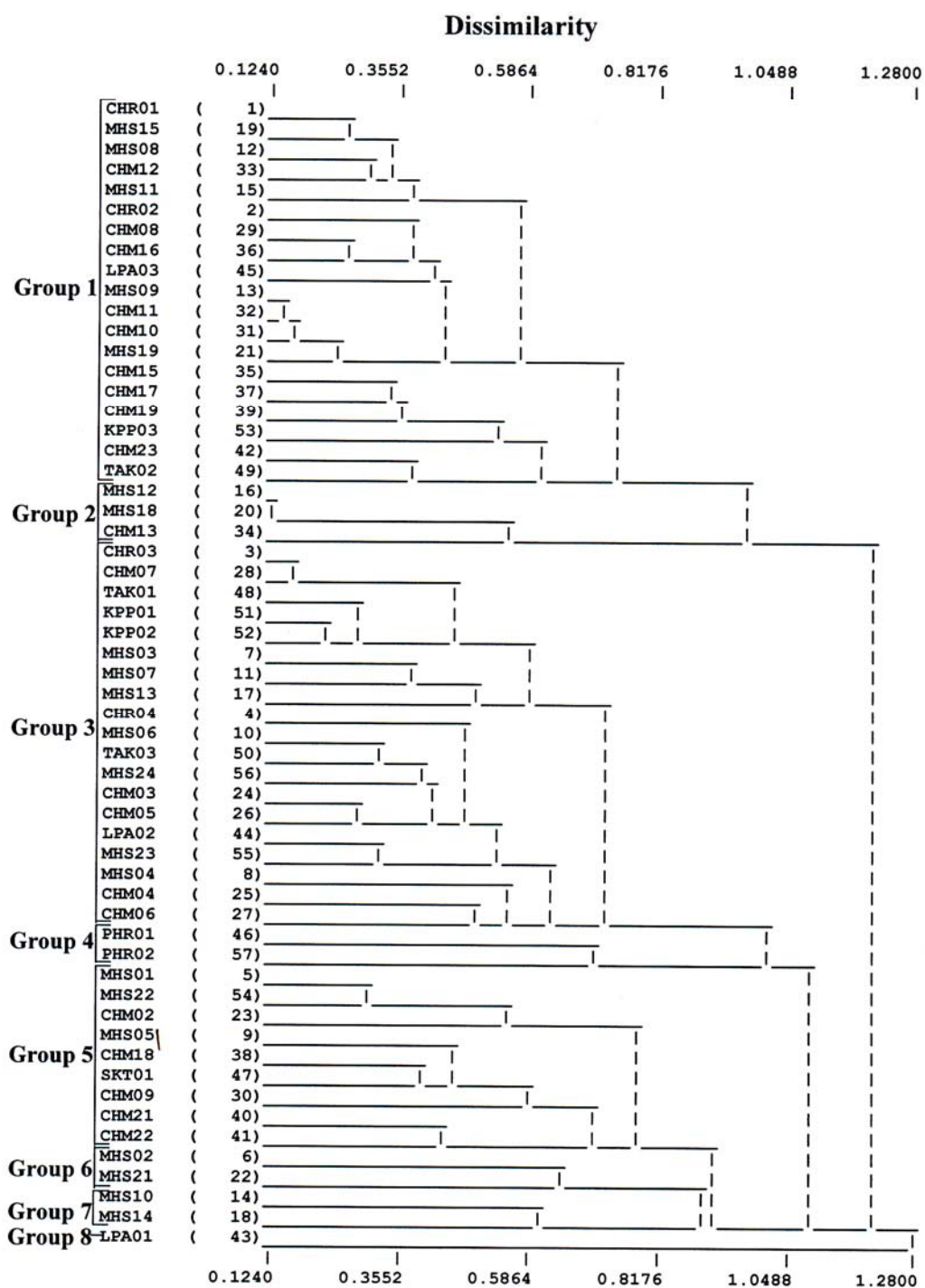
กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 9 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 แห่ง (MHS01, MHS05 และ MHS22) เชียงใหม่ 5 แห่ง (CHM02, CHM09, CHM18, CHM21 และ CHM22) และสุโขทัย 1 แห่ง (SKT01) ส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำที่มีความกว้างต่ำ มีค่าความสูงเหนือระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 270-1500 เมตร ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. asakoe*

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 2 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS02 และ MHS21) เป็นแหล่งน้ำที่มีความกว้างต่ำและมีความเร็วน้ำต่ำ มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 242-1080 เมตร ชนิดที่พบมาก ได้แก่ *S. asakoe*

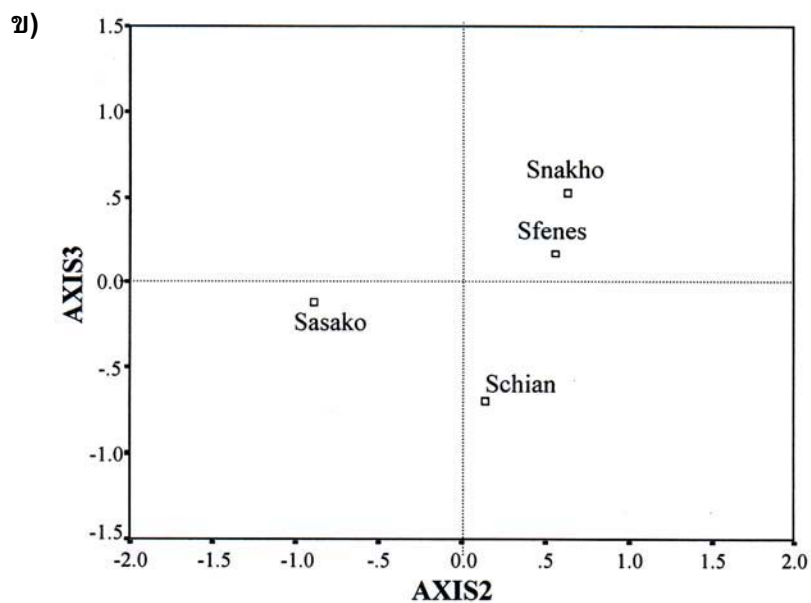
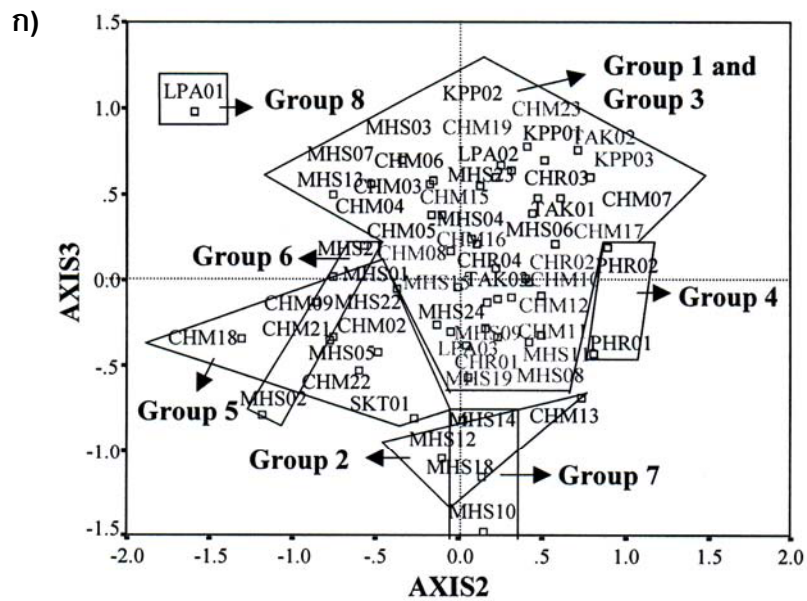
กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 2 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS10 และ MHS14) มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 417-500 เมตร ชนิดที่พบมาก ได้แก่ *S. chiangmaiense*

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดลำปาง (LPA01) สภาพแหล่งน้ำมีความเร็วน้ำสูง ค่าความเค็มของน้ำสูง แต่มีค่าการนำไฟฟ้าของน้ำต่ำ มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 700 เมตร ชนิดที่พบมาก ได้แก่ *S. weji* (ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกน)

เมื่อทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของชนิดริ้นดำที่สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 8 กลุ่ม สามารถสรุปได้ว่า ชนิด *S. nakhonense* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 1 และ 3 ชนิด *S. fenestratum* สัมพันธ์กับกลุ่มที่ 4 ชนิด *S. asakoe* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 5 และ 6 ชนิด *S. chiangmaiense* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 2 และ 7 และไม่มีแมลงริ้นดำชนิดใดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 8 เนื่องจากกลุ่มที่ 1 และ 3 พบชนิด *S. nakhonense* เป็นจำนวนมากเหมือนกัน จึงไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม แหล่งน้ำบางแห่งที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 3 พบ *S. fenestratum* ด้วย ดังนั้นกลุ่มที่ 1 และ 3 จึงถูกจัดให้อยู่ใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 4 ส่วนกลุ่มที่ 5 และ 6 ไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน เนื่องจากพบชนิด *S. asakoe* เป็นจำนวนมากเหมือนกัน สำหรับกลุ่มที่ 2 และ 7 พบชนิด *S. chiangmaiense* เป็นจำนวนมากเหมือนกันจึงถูกจัดเหลื่อมซ้อนกัน ไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน



ภาพที่ 5.7 แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 57 แห่งในช่วงฤดูหนาว(พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546) สามารถจัดกลุ่มเป็น 8 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วย UPGMA ในโปรแกรม PATN



ภาพที่ 5.8 ก) แสดงการจัดเรียงอันดับแหล่งน้ำไหลจำนวน 57 แห่งในช่วงฤดูหนาว โดยใช้ SSH (Stress=0.17)

ข) ชนิดของรื้นดำจำนวน 4 ชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 ในการแบ่งกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 8 กลุ่ม

หมายเหตุ Sasako=*S. asakoe*, Schian=*S. chiangmaiense*, Sfenes=*S. fenestratum*, Snakho=*S. nakhonense*

ฤดูร้อน

ทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาจำนวน 39 แห่ง ด้วยข้อมูลความคล้ายคลึงกันของชนิดที่พบ สามารถจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลออกเป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 5.9) และนำแหล่งน้ำไหลมาจัดเรียงอันดับบน Ordination Space ด้วย SSH (ภาพที่ 5.10ก) จากภาพที่ 5.10ข แสดงการจัดกลุ่มบน Ordination Space พบมีจำนวน 5 ชนิดที่มีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 (ผลจาก PCC Analysis ใน PATN) ได้แก่ *S. asakoe*, *S. aureohirtum*, *S. chiangmaiense*, *S. nakhonense* และ *S. nodosum* ทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของชนิดที่สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 4 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR01) แม่ฮ่องสอน 1 แห่ง (MHS08) และเชียงใหม่ 2 แห่ง (CHM13 และ CHM22) เป็นแหล่งน้ำไหลที่มีอุณหภูมิสูงมาก มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 360-663 เมตร ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. aureohirtum*

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ (CHM09) เป็นแหล่งน้ำไหลที่มีความเร็ว น้ำ อุณหภูมิ และค่าการนำไฟฟ้าของน้ำต่ำมาก ไม่พบแมลงริ้นดำชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มแหล่งน้ำไหลนี้

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดลำปาง (LPA01) เป็นแหล่งน้ำไหลที่มีความเร็ว น้ำ ค่าการนำไฟฟ้าและความเค็มของน้ำสูง มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 700 เมตร ไม่พบแมลงริ้นดำชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มแหล่งน้ำไหลนี้

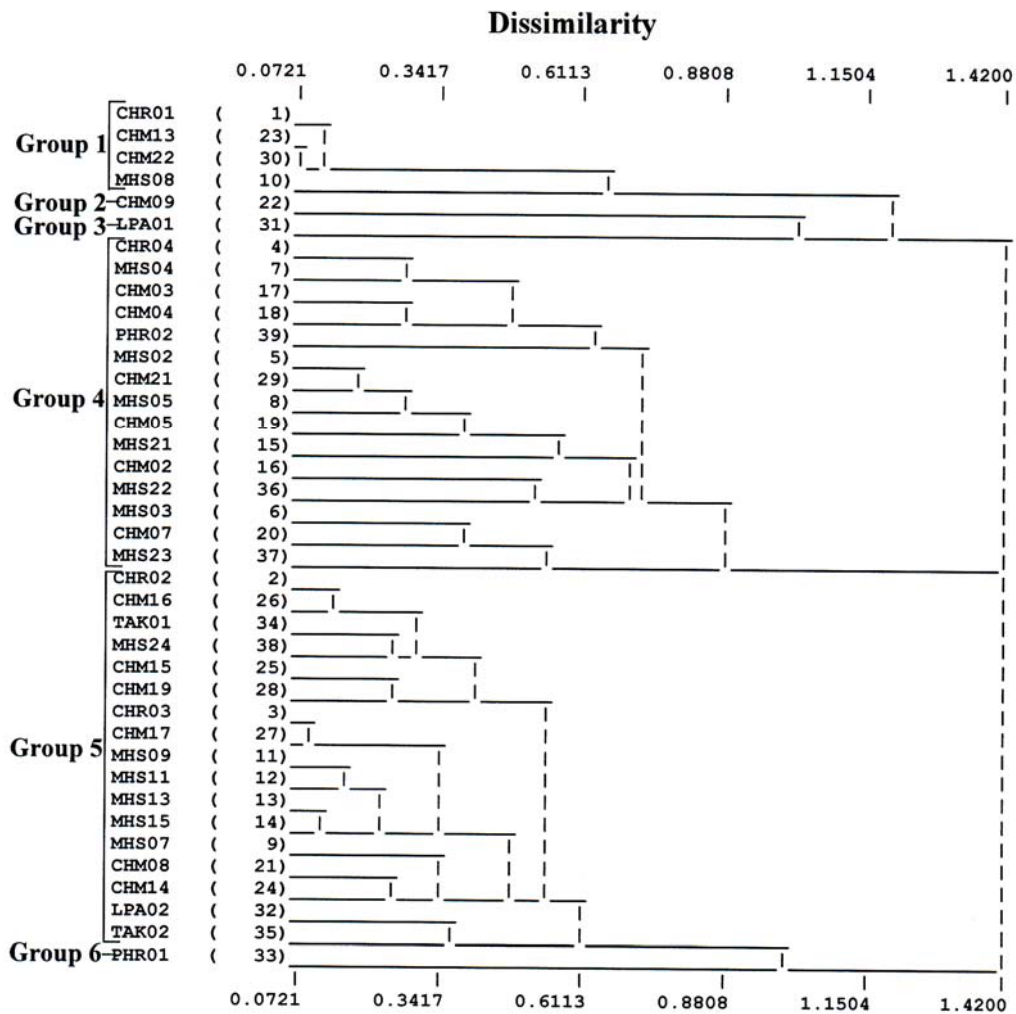
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 15 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR04) แม่ฮ่องสอน 7 แห่ง (MHS02, MHS03, MHS04, MHS05, MHS21, MHS22 และ MHS23) เชียงใหม่ 6 แห่ง (CHM02, CHM03, CHM04, CHM05, CHM07 และ CHM21) และแพร่ 1 แห่ง (PHR02) เป็นแหล่งน้ำไหลที่มีความเร็ว น้ำต่ำ มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 242-1300 เมตร ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. asakoe*

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 17 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 2 แห่ง (CHR02 และ CHR03) แม่ฮ่องสอน 6 แห่ง (MHS07, MHS09, MHS11, MHS13, MHS15 และ MHS24) เชียงใหม่ 6 แห่ง (CHM08, CHM14, CHM15, CHM16, CHM17 และ CHM19) ลำปาง 1 แห่ง (LPA02) และตาก 2 แห่ง (TAK01 และ TAK02) เป็นแหล่งน้ำที่มีความกว้าง ความเร็ว น้ำ และอุณหภูมิค่อนข้างสูง มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 250-688 เมตร ชนิดที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. chiangmaiense*, *S. nakhonense* และ *S. nodosum*

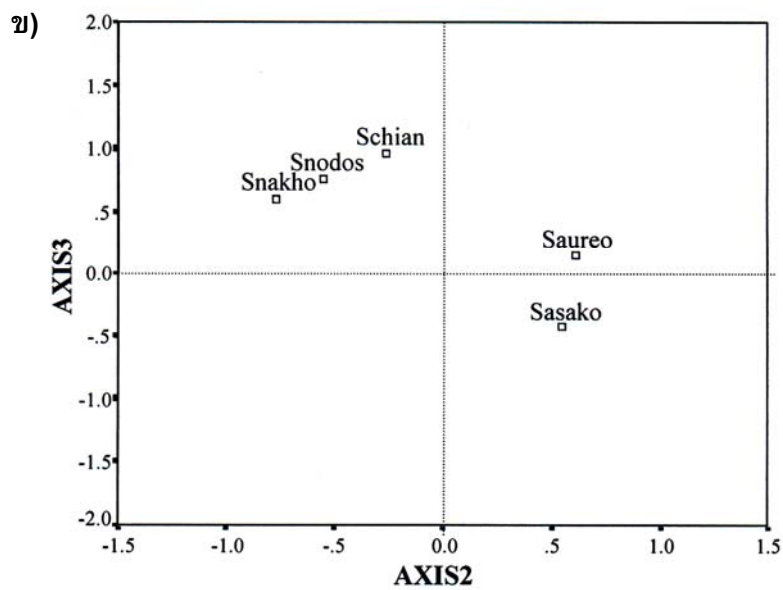
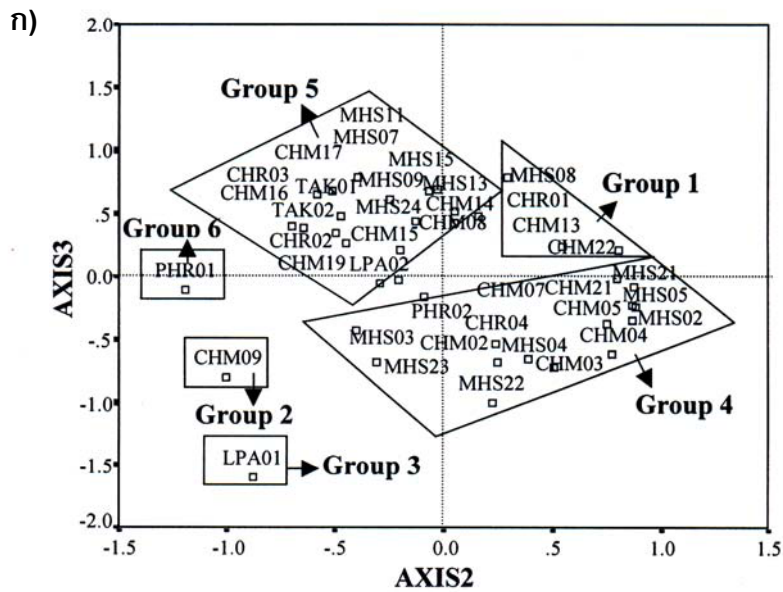
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแพร่ (PHR01) เป็นแหล่งน้ำไหลที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงมาก มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 650 เมตร ไม่พบแมลงริ้นดำชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มแหล่งน้ำไหลนี้

เมื่อทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของชนิดที่สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 6 กลุ่ม สามารถสรุปได้ว่า ชนิด *S. aureohirtum* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 1 ชนิด *S. asakoe* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 4 ชนิด *S. chiangmaiense*, *S. nakhonense* และ

S. nodosum มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 5 และไม่มีแมลงวันดำชนิดใดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 2, 3 และ 6



ภาพที่ 5.9 แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 39 แห่งในช่วงฤดูร้อน (เมษายน 2547) สามารถจัดกลุ่มเป็น 6 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วย UPGMA ในโปรแกรม PATN



ภาพที่ 5.10 ก) แสดงการจัดเรียงอันดับแหล่งน้ำไหลจำนวน 39 แห่งในช่วงฤดูร้อนโดยใช้ SSH (Stress=0.15)

ข) ชนิดของรึ้นดำจำนวน 5 ชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60 ในการแบ่งกลุ่มแหล่งน้ำไหลทั้ง 6 กลุ่ม

หมายเหตุ Sasako=*S. asakoe*, Saureo=*S. aureohirtum*, Schian=*S. chiangmaiense*, Snakho=*S. nakhonense*, Snodos=*S. nodosum*

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษากับข้อมูลความคล้ายคลึงกันของชนิดแมลงริ้นดำที่พบในแต่ละแหล่งน้ำในแต่ละฤดู โดยทำการวิเคราะห์ Hierarchical Cluster Analysis แบบ Pearson correlation เพื่อทำการยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PATN ผลการวิเคราะห์ในแต่ละฤดูดังนี้

ฤดูฝน แหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษา 56 แห่ง สามารถจัดเป็น 7 กลุ่ม (ภาพที่ A-1 ในภาคผนวก 1) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 11 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR01) แม่ฮ่องสอน 9 แห่ง (MHS03, MHS06, MHS08, MHS10, MHS12, MHS16, MHS17, MHS18 และ MHS21) และสุโขทัย 1 แห่ง (SKT01)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 26 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 2 แห่ง (CHR02 และ CHR03) แม่ฮ่องสอน 8 แห่ง (MHS09, MHS19, MHS20, MHS07, MHS11, MHS13, MHS14 และ MHS15) และเชียงใหม่ 11 แห่ง (CHM08, CHM10, CHM11, CHM12, CHM14, CHM16, CHM17, CHM07, CHM15, CHM19 และ CHM22) ลำปาง 1 แห่ง (LPA02) ตาก 3 แห่ง (TAK01, TAK02 และ TAK03) และกำแพงเพชร 1 แห่ง (KPP03)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลเพียง 1 แห่ง อยู่ในเขตจังหวัดแพร่ 1 แห่ง (PHR01)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 2 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดกำแพงเพชร (KPP01 และ KPP02)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 7 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR04) แม่ฮ่องสอน 1 แห่ง (MHS04) เชียงใหม่ 4 แห่ง (CHM03, CHM04, CHM05 และ CHM06) และอุดรธานี 1 แห่ง (UTD01)

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดลำปาง (LPA01)

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 8 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 แห่ง (MHS01, MHS02 และ MHS05) และเชียงใหม่ 5 แห่ง (CHM01, CHM02, CHM09, CHM20 และ CHM21)

ฤดูหนาว แหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษา 57 แห่ง สามารถจัดเป็น 8 กลุ่ม (ภาพที่ A-2 ในภาคผนวก 1) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 22 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 2 แห่ง (CHR01 และ CHR02) แม่ฮ่องสอน 7 แห่ง (MHS08, MHS09, MHS11, MHS15, MHS12, MHS18 และ MHS19) เชียงใหม่ 10 แห่ง (CHM08, CHM10, CHM11, CHM12, CHM13, CHM15, CHM16, CHM17, CHM19 และ CHM23) ลำปาง 1 แห่ง (LPA03) ตาก 1 แห่ง (TAK02) และกำแพงเพชร 1 แห่ง (KPP03)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 19 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 2 แห่ง (CHR03 และ CHR04) แม่ฮ่องสอน 7 แห่ง (MHS03, MHS04, MHS06, MHS07, MHS13, MHS23

และ MHS24) เชียงใหม่ 5 แห่ง (CHM03, CHM04, CHM05, CHM06 และ CHM07) ลำปาง 1 แห่ง (LPA02) ตาก 2 แห่ง (TAK01 และ TAK03) และกำแพงเพชร 2 แห่ง (KPP01 และ KPP02)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 2 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแพร่ (PHR01 และ PHR02)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 3 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน 2 แห่ง (MHS10 และ MHS14) และสุโขทัย 1 แห่ง (SKT01)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 3 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS02 และ MHS21) และเชียงใหม่ 1 แห่ง (CHM02)

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 2 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS01 และ MHS22)

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 5 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน 1 แห่ง (MHS05) และเชียงใหม่ 4 แห่ง (CHM09, CHM18, CHM21 และ CHM22)

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดลำปาง (LPA01)

ฤดูร้อน แหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาคือ 39 แห่ง สามารถจัดเป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ A-3 ในภาคผนวก 1) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 4 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR01) แม่ฮ่องสอน 1 แห่ง (MHS08) และเชียงใหม่ 2 แห่ง (CHM13 และ CHM22)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 19 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 2 แห่ง (CHR02 และ CHR03) แม่ฮ่องสอน 7 แห่ง (MHS03, MHS07, MHS09, MHS11, MHS13, MHS15 และ MHS24) เชียงใหม่ 7 แห่ง (CHM07, CHM08, CHM14, CHM15, CHM16, CHM17 และ CHM19) ลำปาง 1 แห่ง (LPA02) และตาก 2 แห่ง (TAK01 และ TAK02)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดแพร่ (PHR01)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 13 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย 1 แห่ง (CHR04) แม่ฮ่องสอน 6 แห่ง (MHS02, MHS04, MHS05, MHS21, MHS22 และ MHS23) เชียงใหม่ 5 แห่ง (CHM02, CHM03, CHM04, CHM05 และ CHM21) และแพร่ 1 แห่ง (PHR02)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ (CHM09)

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแหล่งน้ำไหลจำนวน 1 แห่ง ซึ่งอยู่ในเขตจังหวัดลำปาง (LPA01)

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลโดยใช้โปรแกรม PATN และ Hierarchical Cluster Analysis พบว่าการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลโดยใช้ความคล้ายคลึงกันของชนิดแมลงร้นดำที่พบในแต่ละฤดู มีความคล้ายคลึงกัน ดังนี้ ฤดูฝน สามารถจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลได้ 7 กลุ่ม ฤดูหนาว 8 กลุ่มและฤดูร้อน สามารถจัดกลุ่มเป็น 6 กลุ่ม จากการวิเคราะห์ Hierarchical Cluster Analysis พบว่าแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยแหล่งน้ำที่ค่อนข้างเหมือนกันกับการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลโดยใช้โปรแกรม PATN

4. ผลการวิเคราะห์ Principal component analysis ของปัจจัยต่างๆ ของแหล่งน้ำ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ของแหล่งน้ำที่ทำการศึกษาในแต่ละฤดู พบว่าบางปัจจัยมีความสัมพันธ์กันมาก ยกตัวอย่าง เช่น ฤดูหนาว ความกว้างของแหล่งน้ำสัมพันธ์มากกับค่าอัตราการไหลของน้ำ ($r=0.772$, $df=57$, $P=0.000$) และความลึกของแหล่งน้ำมีความสัมพันธ์มากกับค่าอัตราการไหลของน้ำ ($r=0.812$, $df=57$, $P=0.000$) ดังนั้น Principal component analysis จึงถูกใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อให้ง่ายต่อการแปลผลและมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

ฤดูฝน

ความแปรผันทั้งหมดของค่าตัวแปรต่างๆ สามารถใช้ในแปรผลได้ในฤดูนี้เท่ากับ 73.77% ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 5 Principal components (PC) (ตารางที่ 5.2) ดังนี้

PC-1 มีความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 21.94% ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-1 ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ ค่าความเค็มของน้ำ ความกว้าง ความลึก อัตราการไหลของน้ำ ความชื้นอากาศ และอุณหภูมิอากาศ ค่า PC-1 มีค่าสูงจะสอดคล้องกับลักษณะของแหล่งน้ำที่มีค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ ความเค็มของน้ำและความชื้นอากาศสูง แต่มีความกว้าง ความลึก อัตราการไหลของน้ำและอุณหภูมิอากาศต่ำ อย่างไรก็ตามพบว่าปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-1 มากที่สุด คือ ค่าการนำไฟฟ้าและความเค็มของน้ำ

PC-2 มีความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 20.22% ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-2 ได้แก่ ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล อุณหภูมิน้ำ ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ ค่าความเค็มของน้ำ ความกว้าง ความลึก ความเร็ว น้ำ อัตราการไหลของน้ำ และชนิดของ substrate ที่พื้นลำธาร เมื่อค่า PC-2 สูงจะสอดคล้องกับลักษณะของแหล่งน้ำที่อยู่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำๆ และมีอุณหภูมิ น้ำ ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ ค่าความเค็มของน้ำ ความกว้าง ความลึก ความเร็ว อัตราการไหลของน้ำสูง และพื้นลำธารจะประกอบด้วยก้อนหินขนาดต่างๆ พบว่าค่าความสูงเหนือระดับน้ำทะเลมีความสัมพันธ์กับ PC-2 มากที่สุด

PC-3 มีค่าความแปรผันเท่ากับ 15.30% ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับ PC-3 ได้แก่ ความเร็ว น้ำ ชนิดของป่าบริเวณชายฝั่ง ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ อุณหภูมิ น้ำ อุณหภูมิอากาศ ความชื้นอากาศ และชนิดของ substrate ที่พื้นลำธาร เมื่อค่า PC-3 เพิ่มขึ้นหมายถึงลักษณะของแหล่งน้ำที่มีความเร็ว น้ำ สูง จะมีป่าไม้บริเวณสองฝั่งลำธาร ซึ่งทำให้มีอัตราการปกคลุมของเรือนยอดสูง ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำสูง ความชื้นอากาศสูงและพื้นลำธารจะประกอบด้วยก้อนหินขนาดใหญ่ และมีอุณหภูมิ น้ำและอุณหภูมิอากาศต่ำ อย่างไรก็ตามพบว่าความเร็ว น้ำมีความสัมพันธ์กับ PC-3 มากกว่าปัจจัยอื่น

PC-4 มีค่าความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 8.74% ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-4 ได้แก่ ลักษณะการขุ่นของน้ำ อัตราการปกคลุมของเรือนยอด ความกว้างของลำธารและอัตราการไหลของน้ำ พบว่าลักษณะการขุ่นของน้ำและอัตราการปกคลุมของเรือนยอดสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-4 แต่ความกว้างของลำธารและอัตราการไหลของน้ำมีความสัมพันธ์เชิงลบ ดังนั้นเมื่อค่า PC-4 สูงจะสอดคล้องกับลักษณะลำธารที่มีน้ำค่อนข้างขุ่นและมีอัตราการปกคลุมของเรือนยอดสูง แต่ความกว้างลำธารและค่าอัตราการไหลของน้ำต่ำ พบว่าลักษณะการขุ่นของน้ำมีความสัมพันธ์กับ PC-4 มากกว่าปัจจัยอื่น

PC-5 มีเปอร์เซ็นต์ของความแปรผันเท่ากับ 7.57 ซึ่งมีอัตราการปกคลุมของเรือนยอดและชนิดป่าบริเวณชายฝั่งสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-5 แต่มีลักษณะการชุ่นของน้ำและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-5 ซึ่งเมื่อค่า PC-5 เพิ่มขึ้นจะหมายถึงลักษณะลำธารที่มีแสงแดดสามารถส่องถึงได้มากเพราะมีอัตราการปกคลุมเรือนยอดต่ำ มีค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำสูงและลักษณะน้ำค่อนข้างชุ่น อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการปกคลุมของเรือนยอดและชนิดของป่าบริเวณชายฝั่งเป็นปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-5 มากกว่าปัจจัยอื่น

ถอดหนาว

ความแปรผันทั้งหมดของค่าตัวแปรต่างๆ สามารถใช้ในแปรผลได้ในฤดูนี้เท่ากับ 73.25% ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 5 Principal components (PC) (ตารางที่ 5.2) ดังนี้

PC-1 มีความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 20.58% ปัจจัยที่สัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-1 ได้แก่ ค่าอัตราการไหลของน้ำ ความลึก ความกว้าง ความเร็วน้ำ อุณหภูมิอากาศและลักษณะการชุ่นของน้ำ และปัจจัยที่สัมพันธ์เชิงลบกับ PC-1 ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของน้ำ เมื่อค่า PC-1 เพิ่มขึ้นหมายถึงแหล่งน้ำที่มีความกว้าง ความลึก ความเร็วน้ำ อัตราการไหลของน้ำสูง และมีอุณหภูมิอากาศสูง น้ำค่อนข้างชุ่น แต่มีค่าการนำไฟฟ้าและความเค็มของน้ำต่ำ พบว่าค่าอัตราการไหลของน้ำมีความสัมพันธ์กับ PC-1 มากที่สุด

PC-2 มีความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 19.63% ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-2 ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเค็มของน้ำ ความกว้าง ความเร็วน้ำ อัตราการไหลของน้ำและค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-2 และมีค่าความสูงเหนือระดับน้ำทะเลที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-2 เมื่อค่า PC-2 เพิ่มขึ้น หมายถึงแหล่งน้ำไหลที่อยู่เหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างต่ำ และมีค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเค็มของน้ำ ความกว้าง ความเร็วน้ำ อัตราการไหลของน้ำและค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำสูง ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-2 มากที่สุด คือ ค่าการนำไฟฟ้า

PC-3 มีค่าความแปรผันเท่ากับ 14.02% ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับ PC-3 ได้แก่ ชนิดของ substrate ที่พื้นลำธาร อัตราการปกคลุมของเรือนยอด ชนิดของป่าบริเวณชายฝั่ง ลักษณะการชุ่นของน้ำและอุณหภูมิน้ำ โดยชนิดของ substrate ที่พื้นลำธาร อัตราการปกคลุมของเรือนยอดและชนิดของป่าบริเวณชายฝั่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-3 แต่ลักษณะการชุ่นของน้ำและอุณหภูมิน้ำมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-3 ดังนั้นเมื่อค่า PC-3 เพิ่มขึ้นหมายถึงลักษณะแหล่งน้ำที่พื้นลำธารประกอบด้วยก้อนหินขนาดต่างๆ มีป่าไม้อยู่บริเวณสองฝั่งลำธารและมีอัตราการปกคลุมของเรือนยอดสูง อุณหภูมิ น้ำต่ำและน้ำค่อนข้างใส อย่างไรก็ตามพบว่าชนิดของ substrate ที่พื้นลำธาร อัตราการปกคลุมของเรือนยอดและชนิดของป่าบริเวณชายฝั่งเป็นปัจจัยที่สัมพันธ์มากกับ PC-3

PC-4 มีค่าความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 12.33% ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-4 ได้แก่ อุณหภูมิอากาศ ความชื้นอากาศ อุณหภูมิน้ำ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและชนิดของ substrate ที่พื้นลำธาร โดยพบว่าอุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิน้ำและชนิดของ substrate ที่พื้นลำธารมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-4 แต่ค่าความชื้นอากาศและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-4 ดังนั้นเมื่อค่า PC-4 เพิ่มขึ้น หมายถึงลักษณะของแหล่งน้ำที่พื้นลำธารประกอบด้วยก้อนหินขนาดต่างๆ มี

อุณหภูมิ น้ำ และอากาศสูง มีค่าความชื้นอากาศต่ำและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ พบว่าอุณหภูมิอากาศและความชื้นอากาศมีความสัมพันธ์กับ PC-4 มากกว่าปัจจัยอื่น

PC-5 มีเปอร์เซ็นต์ของความแปรผันเท่ากับ 6.69 พบว่าความชื้นอากาศและความเร็วน้ำมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-5 แต่ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-5 ดังนั้นเมื่อค่า PC-5 เพิ่มขึ้น หมายถึงลักษณะของแหล่งน้ำที่มีความชื้นอากาศและความเร็วน้ำสูง และมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ อย่างไรก็ตามความชื้นอากาศมีความสัมพันธ์กับ PC-5 มากกว่าปัจจัยอื่น

ถอดรื้อ

ความแปรผันทั้งหมดของค่าตัวแปรต่างๆ สามารถใช้ในแปรผลได้ในฤดูนี้เท่ากับ 79.35% ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 6 Principal components (PC) (ตารางที่ 5.2) ดังนี้

PC-1 มีค่าความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 24.19% ปัจจัยที่สัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-1 ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้า ความเค็มของน้ำ ความกว้าง ความลึก ความเร็วน้ำ อัตราการไหลของน้ำ ความชื้นอากาศและลักษณะการขุ่นของน้ำ และปัจจัยที่สัมพันธ์เชิงลบกับ PC-1 ได้แก่ อุณหภูมิอากาศและความสูงเหนือระดับน้ำทะเล ดังนั้นเมื่อค่า PC-1 เพิ่มขึ้นจะหมายถึงแหล่งน้ำที่อยู่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ ค่าการนำไฟฟ้า ความเค็มของน้ำสูง มีความกว้าง ความลึก ความเร็วน้ำ อัตราการไหลของน้ำสูง ความชื้นอากาศสูง และน้ำค่อนข้างขุ่น ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-1 มาก ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเค็มของน้ำและอัตราการไหลของน้ำ

PC-2 มีค่าความแปรผันเท่ากับ 17.59% ปัจจัยที่สัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-2 ได้แก่ ความกว้าง ความลึกและอัตราการไหลของน้ำ ปัจจัยที่สัมพันธ์เชิงลบกับ PC-2 ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของน้ำ ดังนั้นเมื่อค่า PC-2 เพิ่มขึ้น จะหมายถึงลักษณะของแหล่งน้ำที่มีความกว้างและความลึกมาก อัตราการไหลของน้ำสูง และมีค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของน้ำต่ำ ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับ PC-2 มาก คือ ค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของน้ำ

PC-3 มีความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 13.52% ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ PC-3 ได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ อุณหภูมิอากาศ ความชื้นอากาศ อัตราการปกคลุมเรือนยอด และความสูงเหนือระดับน้ำทะเล โดยอุณหภูมิ น้ำและอากาศมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-3 แต่ความชื้นอากาศ อัตราการปกคลุมเรือนยอด และความสูงเหนือระดับน้ำทะเลมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-3 ดังนั้นเมื่อค่า PC-3 เพิ่มขึ้น หมายถึงลักษณะของแหล่งน้ำที่อยู่ในบริเวณที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างต่ำ อัตราการปกคลุมของเรือนยอดต่ำ แสงแดดสามารถส่องถึงได้มาก ทำให้มีความชื้นอากาศต่ำ มีอุณหภูมิ น้ำ และอุณหภูมิอากาศสูง พบว่าอุณหภูมิ น้ำมีความสัมพันธ์กับ PC-3 มากกว่าปัจจัยอื่น

PC-4 มีเปอร์เซ็นต์ของความแปรผันเท่ากับ 10.11 ชนิดของป่าบริเวณชายฝั่งและอัตราการปกคลุมของเรือนยอดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-4 ดังนั้นเมื่อค่า PC-4 เพิ่มขึ้น หมายถึงแหล่งน้ำที่มีป่าไม้บริเวณสองฝั่งของลำธารและมีอัตราการปกคลุมของเรือนยอดสูง

PC-5 มีความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 7.41% ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-5 แต่ชนิดของ substrate ที่พื้นลำธารมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-5 ดังนั้นเมื่อค่า PC-5 สูง หมายถึงแหล่งน้ำที่อยู่ในบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเลสูง และพื้นลำธารประกอบด้วยกรวดหรือทราย

PC-6 มีค่าความแปรผันที่สามารถแปรผลได้เท่ากับ 6.53% ลักษณะการชุ่นของน้ำมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-6 แต่ความกว้างของแหล่งน้ำมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-6 เมื่อค่า PC-6 เพิ่มขึ้น หมายถึงลักษณะแหล่งน้ำที่มีความกว้างต่ำและค่อนข้างชุ่น

ตารางที่ 5.2 แสดงผลการวิเคราะห์ Principal component analysis และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง

Principle components และค่าปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำในแต่ละฤดู

ตัวแปร	ค่าเฉลี่ย	ค่าต่ำสุด-สูงสุด		Principle components					
		Min.	Max.	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5	PC-6
ฤดูฝน (n=61)									
Width (m)	2.56	0.22	9.33	-0.574*	0.540*	-0.032	-0.368*	0.000	-
Depth (m)	0.18	0.02	0.79	-0.452*	0.386*	0.295	0.187	-0.015	-
Velocity (m/sec)	0.39	0.10	0.80	0.029	0.469*	0.647*	-0.241	0.056	-
Discharge (m³/sec)	2.32	0.02	14.75	-0.514*	0.582*	0.300	-0.358*	-0.058	-
Specific conductivity (us/cm)	149.48	21.33	356.83	0.764*	0.526*	-0.224	-0.062	-0.038	-
Conductivity (us/cm)	150.48	20.60	375.20	0.747*	0.539*	-0.258	-0.058	-0.036	-
Salinity (ppt)	0.07	0.00	0.20	0.713*	0.466*	-0.279	0.085	0.023	-
Dissolved oxygen (mg/l)	7.01	4.97	8.68	0.287	0.125	0.533*	0.189	0.498*	-
Humidity (%)	76.21	42.00	98.00	0.619*	0.061	0.470*	-0.157	0.258	-
Water temperature (°C)	25.19	18.87	31.90	-0.243	0.669*	-0.525*	0.063	0.132	-
Air temperature (°C)	28.39	21.80	37.50	-0.565*	0.231	-0.518*	0.302	0.073	-
Altitude (m)	551.27	200.00	1500.00	0.03	-0.806*	0.181	-0.321	0.019	-
Habitat	2.79	0.00	4.00	-0.323	0.400*	0.460*	0.317	-0.211	-
Canopy cover	0.84	0.00	2.00	0.245	-0.193	0.067	0.483*	-0.540*	-
Riparian vegetation	1.14	0.00	2.00	0.188	0.290	0.559*	0.167	-0.517*	-
Water color	0.32	0.00	2.00	-0.130	0.009	0.220	0.638*	0.510*	-
% of variance				21.94	20.22	15.30	8.74	7.57	
Cumulative				21.94	42.16	57.46	66.20	73.77	
ฤดูแล้ง (n=58)									
Width (m)	3.42	0.25	12.67	0.649*	0.460*	0.039	-0.097	-0.234	-
Depth (m)	0.19	0.02	0.45	0.783*	0.294	0.216	-0.117	-0.208	-
Velocity (m/sec)	0.48	0.13	0.96	0.469*	0.477*	0.064	-0.042	0.435*	-
Discharge (m³/sec)	4.47	0.01	19.00	0.817*	0.456*	0.039	0.156	0.066	-
Specific conductivity (us/cm)	131.34	24.07	358.33	-0.525*	0.732*	-0.251	0.025	-0.219	-
Conductivity (us/cm)	120.83	20.00	324.00	-0.507*	0.732*	-0.287	0.088	-0.214	-
Salinity (ppt)	0.06	0.00	0.27	-0.554*	0.621*	-0.176	0.124	0.049	-
Dissolved oxygen (mg/l)	5.97	0.02	7.25	-0.009	0.382*	0.261	-0.375*	-0.354*	-
Humidity (%)	69.95	35.00	92.00	-0.264	0.166	0.172	-0.689*	0.476*	-
Water temperature (°C)	20.53	16.10	28.37	0.138	0.315	-0.413*	0.669*	0.297	-
Air temperature (°C)	24.71	15.30	37.00	0.408*	-0.310	-0.128	0.709*	-0.149	-
Altitude (m)	561.86	200.00	1500.00	-0.055	-0.600*	-0.119	-0.283	-0.163	-
Habitat	3.05	0.00	5.00	0.072	0.232	0.714*	0.361*	0.303	-
Canopy cover	0.79	0.00	2.00	-0.309	0.071	0.710*	0.198	0.068	-
Riparian vegetation	1.32	0.00	2.00	-0.120	0.262	0.704*	0.237	0.200	-
Water color	0.21	0.00	2.00	0.403*	0.305	-0.453*	-0.169	0.240	-
% of variance				20.58	19.63	14.02	12.33	6.69	
Cumulative				20.58	40.21	54.23	66.56	73.25	

ตารางที่ 5.2 (ต่อ)

ตัวแปร	ค่าเฉลี่ย	ค่าต่ำสุด-สูงสุด		Principle components					
		Min.	Max.	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5	PC-6
ฤดูร้อน (n=39)									
Width (m)	2.23	0.25	11.33	0.529*	0.597*	-0.045	-0.164	0.197	-0.414*
Depth (m)	0.12	0.01	0.34	0.449*	0.566*	-0.103	-0.363	0.011	0.175
Velocity (m/sec)	0.54	0.00	1.56	0.640*	0.374	0.049	0.070	0.241	0.253
Discharge (m ³ /sec)	2.51	0.00	23.51	0.623*	0.555*	-0.098	-0.098	0.376	0.258
Specific conductivity (us/cm)	171.85	20.70	501.33	0.694*	-0.610*	0.282	0.111	0.155	-0.093
Conductivity (us/cm)	166.56	19.30	495.93	0.615*	-0.614*	0.344	0.048	0.132	-0.232
Salinity (ppt)	0.08	0.00	0.27	0.675*	-0.615*	0.242	0.073	0.056	0.059
Dissolved oxygen (mg/l)	7.12	2.93	10.86	0.351	0.194	0.116	0.405	-0.195	0.075
Humidity (%)	44.97	22.00	78.00	0.548*	-0.280	-0.546*	-0.339	-0.381	-0.056
Water temperature (°C)	24.77	20.03	31.47	-0.089	0.046	0.837*	-0.347	0.045	-0.009
Air temperature (°C)	33.24	22.70	46.00	-0.511*	0.276	0.643*	0.307	0.168	0.042
Altitude (m)	607.33	242.00	1300.00	-0.412*	-0.121	-0.423*	0.251	0.599*	-0.055
Habitat	2.87	0.00	4.00	0.273	0.371	0.139	0.405	-0.541*	-0.151
Canopy cover	0.85	0.00	2.00	0.114	-0.244	-0.496*	0.553*	0.125	0.017
Riparian vegetation	1.23	0.00	2.00	0.359	0.394	0.097	0.630*	-0.084	-0.002
Water color	0.18	0.00	2.00	0.445*	0.059	0.002	-0.037	0.119	0.780*
% of variance				24.19	17.59	13.52	10.11	7.41	6.53
Cumulative				24.19	41.78	55.30	65.41	72.82	79.35

หมายเหตุ * = มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 99%

5. ผลการวิเคราะห์ Correlation analysis ระหว่างการปรากฏชนิดของแมลงรืนดำและPrincipal components

ฤดูฝน

ชนิดของแมลงรืนดำที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-1 ได้แก่ *S. decuplum* และ *S. fenestratum* ชนิดที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-1 ได้แก่ *S. Chiangmaiense*, *S. nodosum* และ *S. siamense* ดังนั้นเมื่อค่า PC-1 เพิ่มขึ้น จะพบแมลงรืนดำชนิด *S. decuplum* และ *S. fenestratum* เพิ่มขึ้น (ภาพที่ A-4 ในภาคผนวก 1) แต่พบ *S. Chiangmaiense*, *S. nodosum* และ *S. siamense* ลดลง (ภาพที่ A-5 ในภาคผนวก 1) ดังนั้นเมื่อค่า PC-1 เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะแหล่งน้ำที่มีค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของน้ำสูงมาก อุณหภูมิอากาศต่ำ ความชื้นอากาศสูง มีความกว้าง ความลึกและอัตราการไหลของน้ำต่ำ จะพบแมลงรืนดำชนิด *S. decuplum* และ *S. fenestratum* เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามแมลงรืนดำบางชนิดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-2 ได้แก่ *S. Chiangmaiense*, *S. decuplum* และ *S. nodosum* ดังนั้นเมื่อค่า PC-2 เพิ่มขึ้น แสดงว่าแหล่งน้ำที่อยู่ในความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำมาก แหล่งน้ำมีความกว้างมาก มีความลึก ความเร็วและอัตราการไหลของน้ำสูง และอุณหภูมิน้ำสูง จะพบแมลงรืนดำชนิด *S. Chiangmaiense* (ภาพที่ A-6 ในภาคผนวก 1), *S. decuplum* และ *S. nodosum* เพิ่มขึ้น สำหรับ PC-3 พบว่าไม่มีแมลงรืนดำที่สัมพันธ์กับ PC-3 อย่างชัดเจน ซึ่งมีเพียงชนิดเดียวที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-3 ได้แก่ *S. quinquestratum* นอกจากนี้พบแมลงรืนดำเพียงชนิดเดียว ได้แก่ *S. Chiangmaiense* ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-4 และมีแมลงรืนดำ 2

ชนิด ได้แก่ *S. fenestratum* และ *S. tani* ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-5 จากตารางที่ 5.3 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างแมลงวันดำแต่ละชนิดกับค่าตัวแปร PC-2, PC-3, PC-4 และ PC-5 มีค่าไม่สูงมาก ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95% ดังนั้นแสดงว่าแมลงวันดำแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำกับ PC-2, PC-3, PC-4 และ PC-5

อุทยาน

ชนิดของแมลงวันดำที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-1 ได้แก่ *S. chamlongi* ชนิดที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-1 ได้แก่ *S. siamense* ดังนั้นเมื่อค่า PC-1 เพิ่มขึ้น จะพบ *S. chamlongi* เพิ่มขึ้น (ภาพที่ A-7 ในภาคผนวก 1) แต่พบ *S. siamense* ลดลง แสดงว่า *S. chamlongi* มักอาศัยในแหล่งน้ำที่มีความกว้างค่อนข้างสูง ความลึก ความเร็วและอัตราการไหลของน้ำสูง น้ำค่อนข้างขุ่น ค่าการนำไฟฟ้าและความเค็มของน้ำต่ำ พบว่าแมลงวันดำบางชนิดที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-2 ได้แก่ *S. chamlongi* และ *S. sp. nr. rufibasis* ซึ่งมักอาศัยในแหล่งน้ำที่อยู่ในความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างต่ำ ความกว้างมาก ความเร็วและอัตราการไหลของน้ำสูง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ค่าการนำไฟฟ้าและความเค็มของน้ำสูง อย่างไรก็ตามชนิด *S. sp. nr. rufibasis* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-3 เช่นกันและมีค่ามากกว่า PC-2 ดังนั้นชนิดที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-3 จะเป็นชนิดที่มักอาศัยในแหล่งน้ำที่มีอัตราการปกคลุมของเรือนยอดสูง เนื่องจากมีป่าไม้อยู่บริเวณสองฝั่งของแหล่งน้ำ อุณหภูมิน้ำต่ำและน้ำค่อนข้างใสด้วย (ภาพที่ A-8 ในภาคผนวก 1) สำหรับ PC-4 มีแมลงวันดำ 2 ชนิดที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-4 ได้แก่ *S. nodosum* และ *S. siamense* เมื่อค่า PC-4 เพิ่มขึ้น จะสอดคล้องกับลักษณะแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิและอากาศสูง ความชื้นอากาศต่ำ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ จะพบ *S. nodosum* (ภาพที่ A-9 ในภาคผนวก 1) และ *S. siamense* เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่า *S. fenestratum* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-5 แต่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่สูงที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะแหล่งน้ำที่มีความชื้นอากาศสูงและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ

อุทยาน

ชนิดของแมลงวันดำที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-1 ได้แก่ *S. nakhonense* นอกจากนี้ยังมี *S. nodosum* ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-1 และ *S. decuplum* สัมพันธ์เชิงลบกับ PC-1 เช่นกัน แต่มีค่าไม่สูงมาก เมื่อค่า PC-1 เพิ่มขึ้น จะพบ *S. nakhonense* (ภาพที่ A-10 ในภาคผนวก 1) และ *S. nodosum* เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งน้ำที่อยู่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ ค่าการนำไฟฟ้า ความเค็มของน้ำสูง มีความกว้าง ความลึก ความเร็วน้ำ อัตราการไหลของน้ำสูง สำหรับ PC-2 มีแมลงวันดำ 3 ชนิดที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-2 ได้แก่ *S. Chiangmaiense*, *S. nakhonense* และ *S. nodosum* แต่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่สูง นอกจากนี้ชนิด *S. Chiangmaiense* และ *S. quinquestriatum* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-3 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะแหล่งน้ำที่อยู่ในบริเวณที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างต่ำ อัตราการปกคลุมของเรือนยอดต่ำ แสงแดดสามารถส่องถึงได้มาก ทำให้มีความชื้นอากาศต่ำ มีอุณหภูมิและอุณหภูมิอากาศสูง (ภาพที่ A-11 ในภาคผนวก 1) สำหรับ PC-4 มีแมลงวันดำ 2 ชนิดที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-4 อย่างเด่นชัด ได้แก่ *S. nodosum* และ *S. siamense* เมื่อค่า PC-4 เพิ่มขึ้นซึ่งหมายถึงแหล่งน้ำที่มีป่าไม้บริเวณสองฝั่งของลำธารและมี

อัตราการปกคลุมของเรือนยอดสูง จะพบ *S. nodosum* และ *S. siamense* เพิ่มขึ้น (ภาพที่ A-12 ใน ภาคผนวก 1) นอกจากนี้พบว่าชนิด *S. parahiyangum* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ PC-5 แต่ชนิด *S. nakhonense* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ PC-5 แต่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่สูง สำหรับ PC-6 แผลงรันทำแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์น้อยมาก จากตารางที่ 5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างแผลงรันทำแต่ละ ชนิดกับค่าตัวแปร พบว่าชนิดของแผลงรันทำที่สัมพันธ์กับ PC-2, PC-3, PC-5 และ PC-6 มีค่าไม่ สูงมากที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 5.3 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation analysis) ระหว่าง Principle components ของค่าตัว แปรและชนิดแผลงรันทำที่พบในแต่ละฤดู

ชนิด	Principle components					
	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5	PC-6
ฤดูฝน (n=61)						
<i>S. asakoe</i>	0.126	0.125	-0.070	-0.106	0.094	-
<i>S. burtoni</i>	0.132	-0.168	-0.028	-0.102	-0.090	-
<i>S. chiangmaiense</i>	-0.450**	0.212	-0.104	0.200	-0.019	-
<i>S. decuplum</i>	0.298*	0.214	-0.073	-0.019	0.003	-
<i>S. fenestratum</i>	0.362**	0.034	-0.093	-0.134	0.209	-
<i>S. sp. nr. sheilae</i>	0.078	0.115	0.158	-0.077	-0.133	-
<i>S. nakhonense</i>	-0.056	-0.053	-0.027	-0.123	0.082	-
<i>S. nodosum</i>	-0.287*	0.194	0.088	-0.018	0.049	-
<i>S. parahiyangum</i>	0.260	-0.029	0.089	0.094	0.031	-
<i>S. quinquestriatum</i>	0.241	-0.134	-0.196	0.066	0.159	-
<i>S. siamense</i>	-0.429**	-0.057	-0.090	0.033	0.001	-
<i>S. tani</i>	0.226	0.062	-0.040	-0.021	0.249	-
ฤดูหนาว (n=58)						
<i>S. asakoe</i>	0.146	-0.155	-0.023	-0.149	-0.095	-
<i>S. aureohirtum</i>	0.155	0.061	0.075	-0.031	-0.006	-
<i>S. burtoni</i>	-0.065	-0.112	-0.102	-0.127	-0.103	-
<i>S. chamlongi</i>	0.287*	0.201	0.047	0.125	0.163	-
<i>S. chiangmaiense</i>	-0.076	0.017	0.015	0.105	0.056	-
<i>S. decuplum</i>	0.031	0.093	0.201	0.135	-0.054	-
<i>S. fenestratum</i>	0.065	0.023	0.019	0.011	0.196	-
<i>S. nakhonense</i>	0.027	0.044	-0.109	-0.108	-0.055	-
<i>S. nodosum</i>	0.167	0.012	0.192	0.269*	0.048	-
<i>S. parahiyangum</i>	-0.041	0.002	0.074	-0.048	-0.064	-
<i>S. quinquestriatum</i>	-0.106	0.070	-0.106	-0.070	0.023	-
<i>S. sp. nr. rufibasis</i>	0.157	0.206	0.285*	-0.019	-0.141	-
<i>S. siamense</i>	-0.225	-0.069	-0.128	0.247	-0.144	-
<i>S. tani</i>	0.090	-0.115	0.113	0.042	-0.098	-
ฤดูร้อน (n=39)						
<i>S. asakoe</i>	-0.128	-0.058	-0.047	0.309	-0.101	0.106
<i>S. aureohirtum</i>	0.054	-0.022	-0.094	-0.158	0.082	-0.280
<i>S. burtoni</i>	-0.046	0.188	0.183	0.161	-0.156	-0.023
<i>S. chamlongi</i>	-0.159	-0.054	-0.035	-0.042	-0.013	0.091
<i>S. chiangmaiense</i>	-0.039	-0.261	0.289	0.050	-0.043	-0.027
<i>S. decuplum</i>	-0.298	-0.151	0.032	0.056	0.258	0.030

ตารางที่ 5.3 (ต่อ)

ชนิด	Principle components					
	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5	PC-6
<i>S. fenestratum</i>	-0.090	-0.041	0.057	0.058	0.027	0.218
<i>S. nakhonense</i>	0.393*	-0.310	0.165	0.033	-0.278	0.180
<i>S. nodosum</i>	0.229	-0.286	-0.032	0.333*	-0.100	0.053
<i>S. parahiyangum</i>	-0.204	-0.010	0.076	0.141	0.279	0.129
<i>S. quinquestratum</i>	0.050	0.121	0.261	0.082	-0.031	-0.059
<i>S. siamense</i>	-0.189	-0.030	-0.100	0.410**	-0.058	-0.159
<i>S. tani</i>	-0.090	-0.133	0.040	0.103	0.035	0.001

หมายเหตุ *, ** = มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

6. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำ จำนวนชนิดและจำนวนตัวของแมลงริ้นดำที่พบในแหล่งน้ำไหลในแต่ละฤดู

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยทางกายภาพของน้ำ จำนวนชนิดและจำนวนตัวของแมลงริ้นดำที่พบในแหล่งน้ำต่าง ๆ ในแต่ละฤดูโดยใช้ Analysis of variance แบบ one-way ANOVA พบว่าปัจจัยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละฤดู ได้แก่ ความลึกของแหล่งน้ำ ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ความชื้นอากาศ อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ จำนวนชนิดและจำนวนตัวของแมลงริ้นดำ

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละฤดูโดยใช้การเปรียบเทียบแต่ละคู่ของฤดูแบบ LSD พบว่าในฤดูหนาวจะมีค่าความลึกของน้ำมากกว่าฤดูฝนและฤดูร้อนตามลำดับ นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยความลึกของน้ำมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างฤดูหนาวและฤดูร้อน, ฤดูฝนและฤดูร้อน แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างฤดูฝนและฤดูหนาว สำหรับค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ฤดูฝนจะมีค่าสูงกว่าฤดูร้อนและฤดูหนาว เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละคู่ของฤดู พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างฤดูฝนและฤดูร้อน แต่มีความแตกต่างกันระหว่างฤดูฝนและฤดูหนาว และระหว่างฤดูหนาวและฤดูร้อน ความชื้นอากาศมีค่าสูงสุดในฤดูฝน ซึ่งมากกว่าในฤดูหนาวและฤดูร้อนตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ามีค่าความแตกต่างกันระหว่างฤดูฝนและฤดูร้อน และระหว่างฤดูหนาวและฤดูร้อน แต่ไม่มีความแตกต่างกันของค่าความชื้นอากาศระหว่างฤดูฝนและฤดูหนาว สำหรับอุณหภูมิน้ำและอากาศ ฤดูร้อนมีค่าสูงสุด และสูงกว่าในฤดูฝนและฤดูหนาว เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละคู่ของฤดูพบว่าอุณหภูมิน้ำระหว่างฤดูร้อนและฤดูฝนไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างกันระหว่างฤดูฝนและฤดูหนาว และระหว่างฤดูหนาวและฤดูร้อน สำหรับอุณหภูมิอากาศมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกคู่ของฤดู

เมื่อทำการพิจารณาความแปรปรวนของจำนวนชนิดและจำนวนตัวของแมลงริ้นดำเปรียบเทียบสามฤดู พบว่าฤดูหนาวมีค่าจำนวนชนิดและจำนวนตัวสูงสุด รองลงมาคือฤดูฝนและฤดูร้อน เมื่อทำการเปรียบเทียบแต่ละคู่ของฤดูพบว่าจำนวนชนิดและจำนวนตัวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างฤดูหนาวและฤดูฝน และระหว่างฤดูหนาวและฤดูร้อน แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างฤดูฝนและฤดูร้อน (ตารางที่ 5.4) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตัวและจำนวนชนิดของแมลงริ้นดำที่พบในสามฤดู พบว่าจำนวนตัวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนชนิด ($r=0.344$, $P=0.000$) ซึ่งหมายถึงจะมีแนวโน้มพบจำนวนชนิดของแมลงริ้นดำเพิ่มขึ้น เมื่อจำนวนตัวมีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 5.11)

นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนตัวแมลงร้นดำที่พบในแต่ละแหล่งน้ำเปรียบเทียบกับแต่ละฤดู โดยพิจารณาแหล่งน้ำที่สามารถศึกษาเปรียบเทียบได้ครบทั้งสามฤดู ซึ่งมีจำนวน 33 แห่ง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละฤดูของจำนวนแมลงร้นดำที่พบในเกือบทุกแหล่งน้ำที่ทำการศึกษา ยกเว้นแหล่งน้ำหนึ่งแห่ง คือ บริเวณโป่งน้ำร้อน อ. เวียงป่าเป้า จ. เชียงราย (CHR01) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ($F = 5.905$, $df = 2, 30$, $P = 0.007$) โดยพบว่ามีค่าความแตกต่างระหว่างฤดูฝนและฤดูหนาว และระหว่างฤดูหนาวและฤดูร้อน แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างฤดูฝนและฤดูร้อน ฤดูหนาวจะพบจำนวนชนิดและจำนวนตัวมากกว่าฤดูฝนและฤดูร้อน เนื่องจากมีค่าความกว้างของแหล่งน้ำ อัตราการไหลของน้ำ ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ค่าความชื้นอากาศสูง และมีค่าอุณหภูมิน้ำและอากาศต่ำกว่าฤดูอื่นอย่างชัดเจน ซึ่งเหมาะสมต่อการอาศัยของแมลงร้นดำบางชนิด ยกตัวอย่างเช่น *S. fenestratum* ซึ่งเป็นแมลงร้นดำชนิดเดียวที่พบเฉพาะฤดูหนาวในแหล่งน้ำแห่งนี้ และไม่พบชนิดนี้ในฤดูฝนและฤดูร้อน

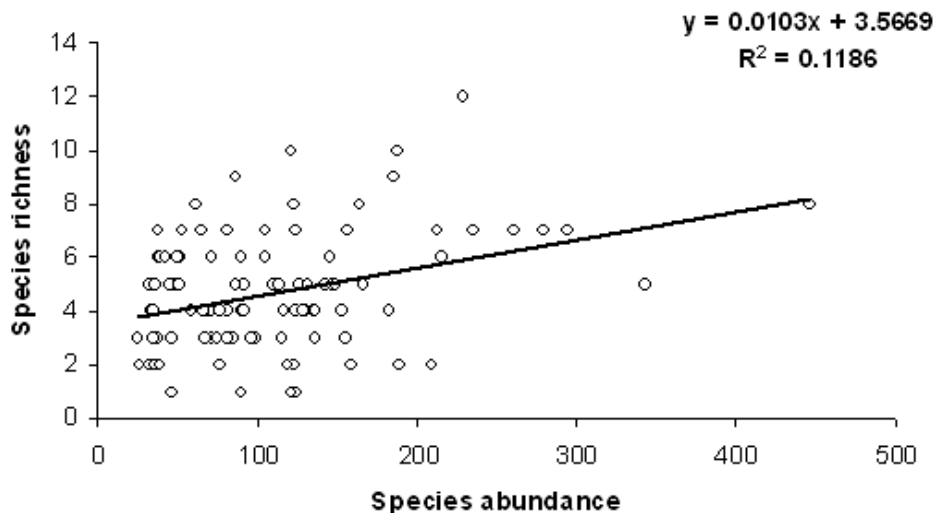
ตารางที่ 5.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำ จำนวนชนิดและจำนวนตัวของแมลงร้นดำที่พบในแหล่งน้ำไหลแต่ละฤดูและผลการเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ของฤดูเรียงจากค่ามากไปน้อย (LSD ที่ $P < 0.05$)

ตัวแปร	F-value	Degree of freedom	P-value	ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ของฤดูเรียงจากค่ามากไปน้อย
Width (m)	1.900	2, 96	0.155	<u>2</u> 1 <u>3</u>
Depth (m)	5.030	2, 96	0.008*	<u>2</u> 1 3
Velocity (m/sec)	2.609	2, 96	0.079	3 <u>2</u> 1
Discharge (m ³ /sec)	2.716	2, 96	0.071	<u>2</u> <u>3</u> <u>1</u>
Specific conductivity (us/cm)	1.781	2, 96	0.174	3 1 <u>2</u>
Conductivity (us/cm)	2.135	2, 96	0.124	3 1 <u>2</u>
Salinity (ppt)	1.151	2, 96	0.321	3 2 1
pH	2.064	2, 96	0.133	<u>2</u> 3 1
Dissolved oxygen (mg/l)	12.930	2, 96	0.000*	<u>1</u> <u>3</u> 2
Humidity (%)	48.026	2, 96	0.000*	<u>1</u> <u>2</u> 3
Water temperature (°C)	39.336	2, 96	0.000*	<u>3</u> 1 2
Air temperature (°C)	24.799	2, 96	0.000*	3 1 2
Habitat	0.199	2, 96	0.820	<u>1</u> 3 <u>2</u>
Canopy cover	0.216	2, 96	0.806	<u>1</u> 3 <u>2</u>
Riparian vegetation	0.803	2, 96	0.451	<u>2</u> 3 1
Impoundment	1.000	2, 96	0.372	<u>1</u> 3 <u>2</u>
Water color	1.297	2, 96	0.278	<u>1</u> 2 3
Species richness	6.517	2, 96	0.002*	2 1 3
Species abundance	12.522	2, 96	0.000*	2 <u>1</u> <u>3</u>

หมายเหตุ 1= ฤดูฝน 2= ฤดูหนาว 3= ฤดูร้อน

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

_ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการเปรียบเทียบแบบ LSD ในแต่ละคู่ของฤดู

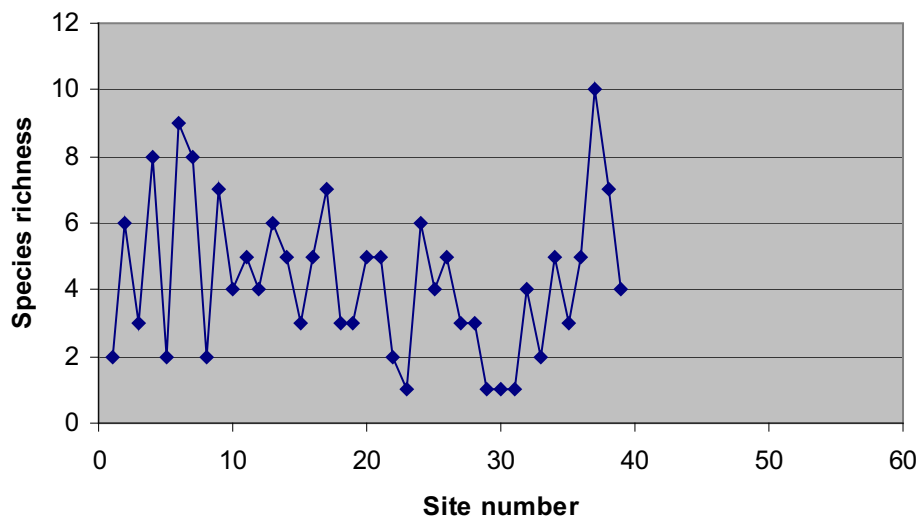
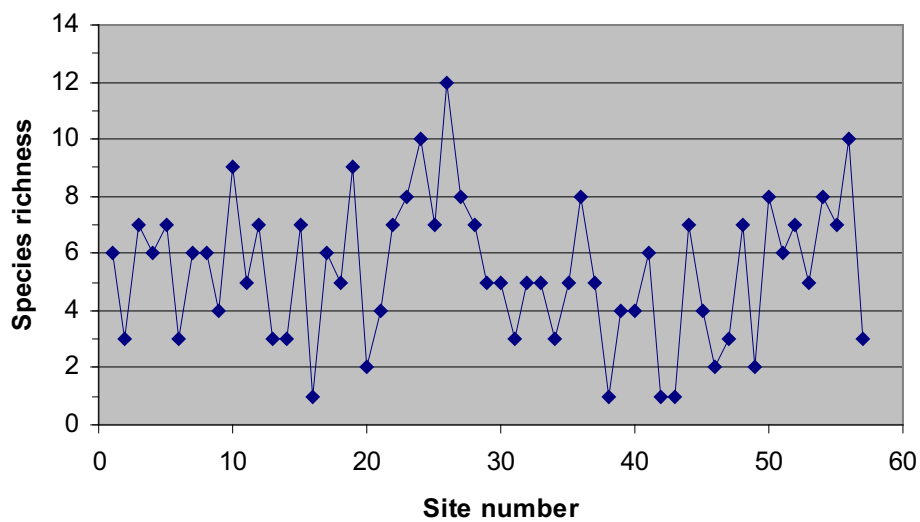
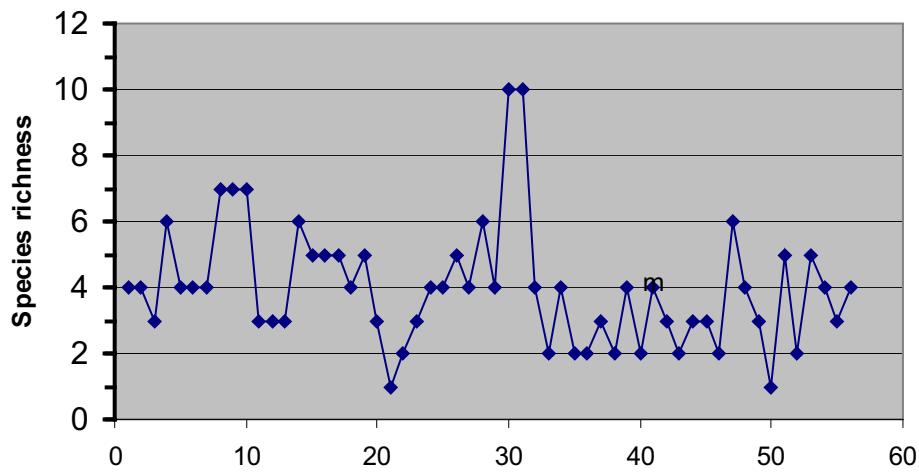


ภาพที่ 5.11 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างจำนวนตัวและจำนวนชนิดของแมลงวันดำ (สมการเชิงถดถอยคือ $y = 0.0103x + 3.5669$, $r = 0.344$, $P = 0.000$)

7. ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงวันดำ

จากการจำแนกชนิดของแมลงวันดำในแต่ละแหล่งน้ำที่ทำการศึกษา พบจำนวนชนิดแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยจำนวนชนิดที่พบในถุหนาว ถุร่อน และถุฝน เท่ากับ 5.40, 4.33 และ 4.00 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยจำนวนชนิดที่พบในถุหนาวมีค่าสูงสุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความหลากหลายชนิดของแมลงวันดำที่พบในถุหนาวมากกว่าถุอื่น นอกจากนี้แหล่งน้ำต่างๆ ที่ทำการศึกษาในถุหนาวพบแมลงวันดำตั้งแต่ 1-12 ชนิด แต่ในถุฝนและถุร่อนพบตั้งแต่ 1-10 ชนิด ดังนั้นแหล่งน้ำบางแห่งที่ทำการศึกษาในแต่ละถุอาจจะพบแมลงวันดำเพียงชนิดเดียว และมีบางแหล่งน้ำที่พบแมลงวันดำมากถึง 12 ชนิด (ภาพที่ 5.12) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลักษณะทางนิเวศวิทยาและปัจจัยต่างๆ ของแหล่งน้ำมีผลต่อการกระจายของแมลงวันดำแต่ละชนิด ในถุหนาวมีค่าเฉลี่ยจำนวนชนิดของแมลงวันดำมากกว่าถุอื่น อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมต่างๆ เอื้อต่อการอาศัยของแมลงวันดำ ยกตัวอย่างเช่น อาหารสมบูรณ์ ที่อยู่อาศัย อุณหภูมิและอากาศต่ำ ความเร็วน้ำค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับถุฝนที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนชนิดน้อยที่สุด อาจเนื่องจากการเกิดสภาวะน้ำไหลพัดนำแหล่งที่อยู่อาศัยย่อยโดยเฉพาะเศษใบไม้ไหลไปตามน้ำและทำให้น้ำมีลักษณะขุ่น ซึ่งลักษณะดังกล่าวไม่เหมาะต่อการอาศัยของแมลงวันดำมากนัก

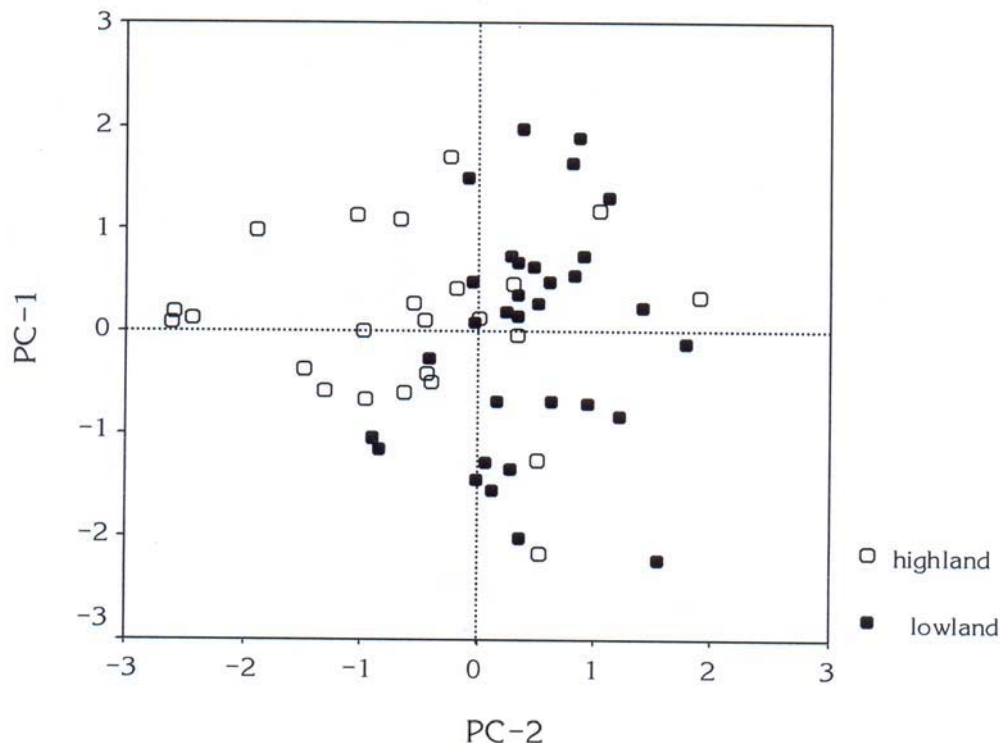
จากตารางที่ 5.2 พบว่าในถุฝนและถุหนาว ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลมีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่า PC-2 (ถุฝน $r = -0.806$ และถุหนาว $r = -0.600$) แต่ในถุร่อนความสูงเหนือระดับน้ำทะเลมีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่า PC-1 ($r = -0.412$) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ principal component analysis และทำการจัดเรียงอันดับระหว่าง PC-1 และ PC-2 ของแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในแต่ละถุ เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแหล่งน้ำไหลที่อยู่บริเวณความสูงน้อยกว่า 500 เมตร และมากกว่า 500 เมตร ถุฝนแหล่งน้ำไหลที่อยู่ในความสูงน้อยกว่า 500 เมตร จะสัมพันธ์กับค่า PC-2 ที่เพิ่มขึ้น และแหล่งน้ำไหลที่มีความสูงมากกว่า 500 เมตรจะสัมพันธ์กับค่า PC-2 ที่ลดลง (ภาพที่ 5.13)



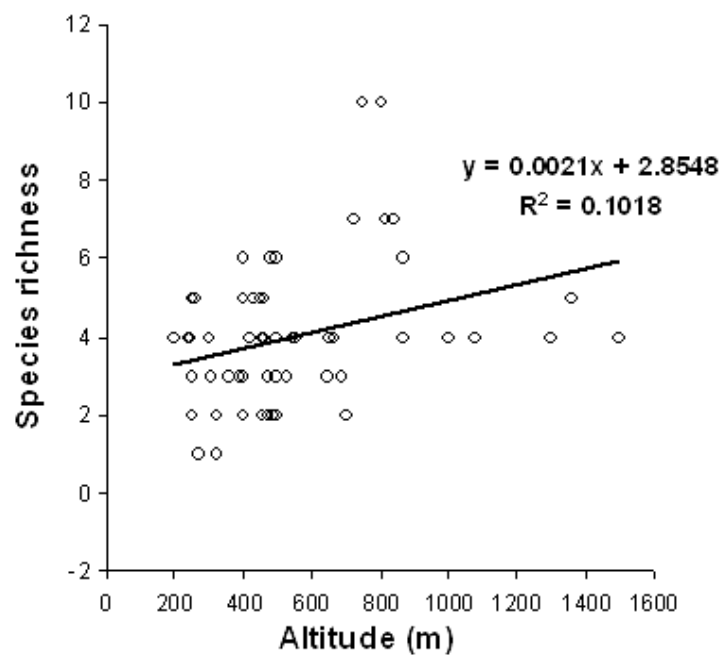
ภาพที่ 5.12 จำนวนชนิดของแมลงวันดำที่พบในแต่ละแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษานในแต่ละฤดู (ก) ฤดูฝน (ข) ฤดูหนาว และ (ค) ฤดูร้อน

เมื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงวันดำ พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวก ($r = 0.32$) ดังนั้นเมื่อความสูงเพิ่มขึ้น จะพบจำนวนชนิดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 5.14) สำหรับฤดูหนาวมีการจัดเรียงอันดับของแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาเหมือนกับในฤดูฝน คือ แหล่งน้ำไหลที่มีความสูงน้อยกว่า 500 เมตร จะสัมพันธ์กับค่า PC-2 ที่เพิ่มขึ้น และแหล่งน้ำไหลที่มีความสูงมากกว่า 500 เมตรจะสัมพันธ์กับค่า PC-2 ที่ลดลง (ภาพที่ 5.15) และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิด พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวก ($r = 0.31$) ซึ่งหมายถึงจะพบจำนวนชนิดของแมลงวันดำเพิ่มขึ้น เมื่อระดับความสูงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 5.16) แต่ในฤดูร้อนการจัดเรียงอันดับของแหล่งน้ำไหลที่มีความสูงน้อยกว่า 500 เมตรจะสัมพันธ์กับค่า PC-1 ที่เพิ่มขึ้น และแหล่งน้ำไหลที่มีความสูงมากกว่า 500 เมตรจะสัมพันธ์กับค่า PC-1 ที่ลดลง (ภาพที่ 5.17) อย่างไรก็ตามผลการจัดเรียงอันดับของแหล่งน้ำไหลในฤดูร้อนที่ระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรและมากกว่า 500 เมตร มีความแตกต่างไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับในฤดูฝนและฤดูหนาว เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงวันดำที่พบในฤดูร้อน พบว่าเมื่อความสูงเพิ่มขึ้น จะพบจำนวนชนิดเพิ่มขึ้น ($r = 0.33$) (ภาพที่ 5.18)

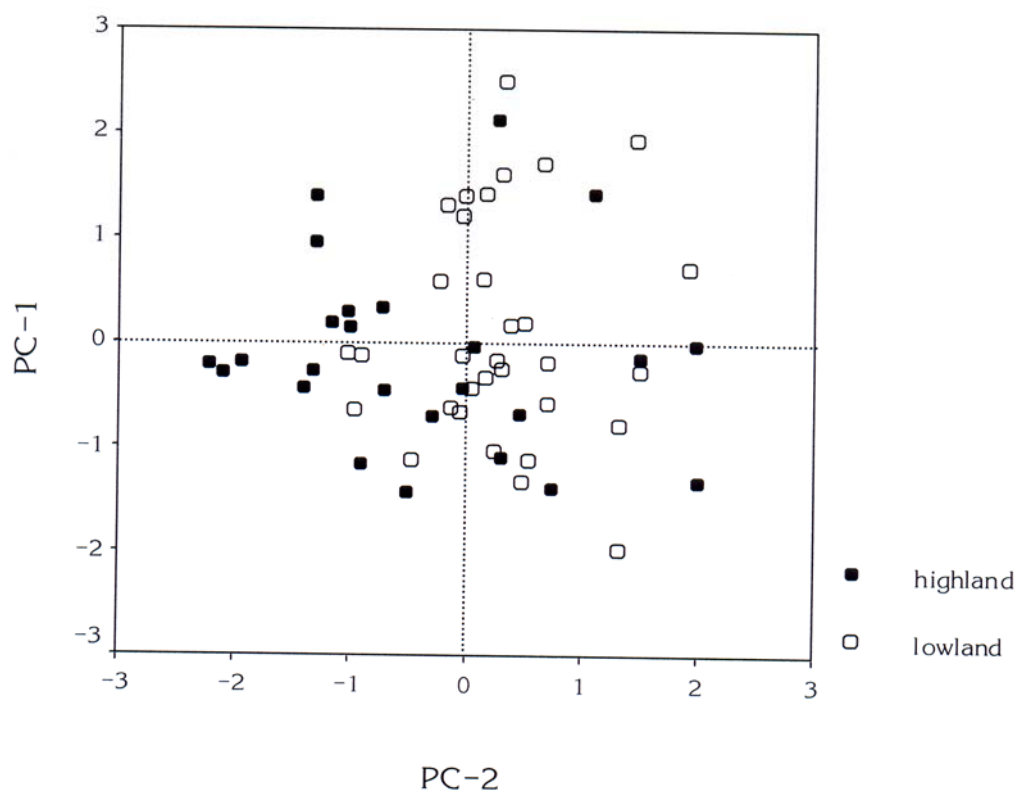
ดังนั้นจากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงวันดำที่พบในแต่ละฤดู สามารถสรุปได้ว่าเมื่อความสูงเหนือระดับน้ำทะเลเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มจะพบจำนวนชนิดของแมลงวันดำเพิ่มขึ้นเช่นกัน



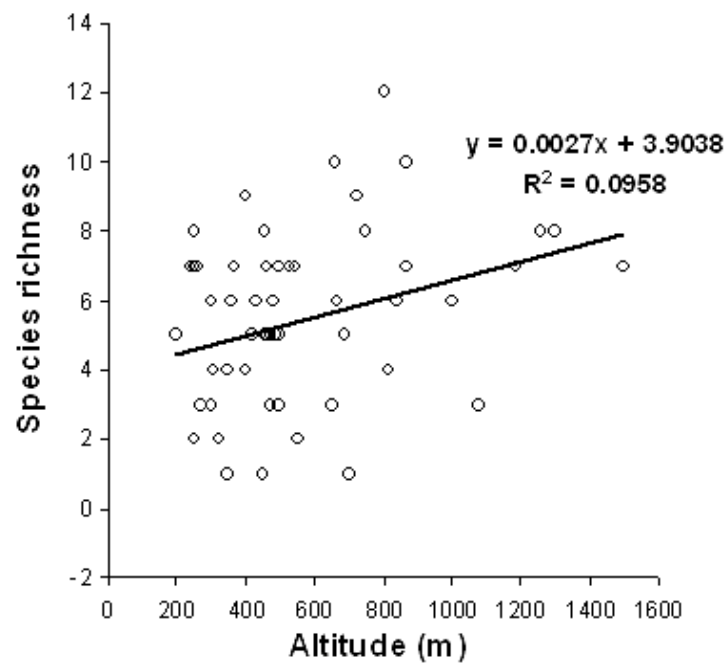
ภาพที่ 5.13 ผลการจัดเรียงอันดับของ PC-1 และ PC-2 ของแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในฤดูฝนที่สัมพันธ์กับระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรและสูงกว่า 500 เมตร



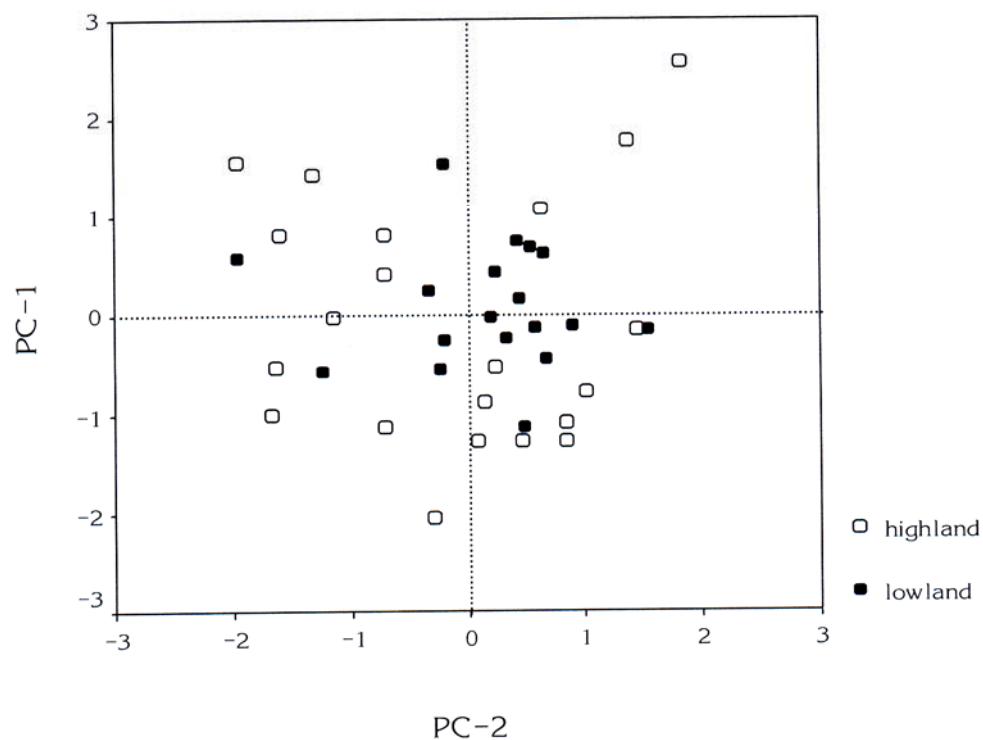
ภาพที่ 5.14 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงร้นดำที่พบในฤดูฝน (สมการเชิงถดถอยคือ $y = 0.0021x + 2.8548$, $r = 0.32$, $P = 0.017$)



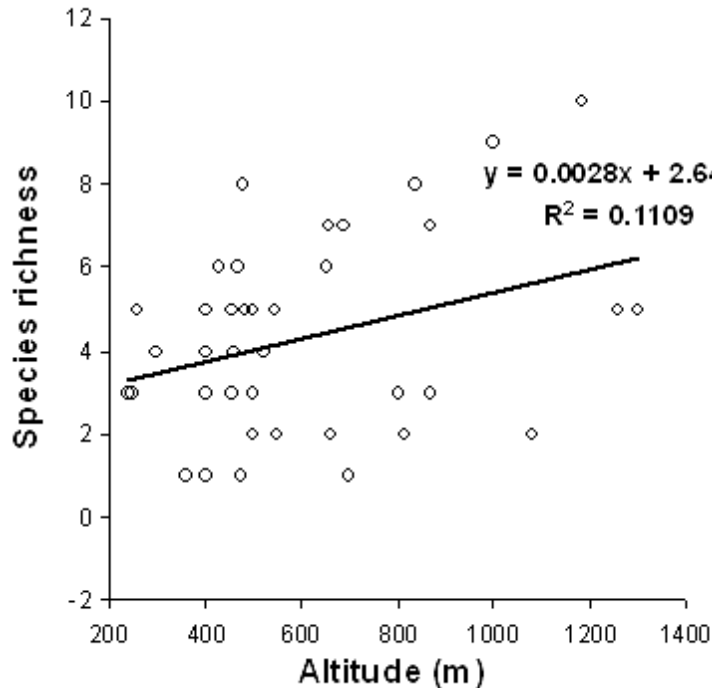
ภาพที่ 5.15 ผลการจัดเรียงอันดับของ PC-1 และ PC-2 ของแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในฤดูหนาวที่สัมพันธ์กับระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรและสูงกว่า 500 เมตร



ภาพที่ 5.16 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงรืนดำที่พบในฤดูหนาว (สมการเชิงถดถอยคือ $y = 0.0027x + 3.9038$, $r = 0.31$, $P = 0.019$)



ภาพที่ 5.17 ผลการจัดเรียงอันดับของ PC-1 และ PC-2 ของแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษานในฤดูร้อนที่สัมพันธ์กับระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรและสูงกว่า 500 เมตร



ภาพที่ 5.18 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความสูงเหนือระดับน้ำทะเลและจำนวนชนิดของแมลงรืนดำที่พบในฤดูร้อน (สมการเชิงถดถอยคือ $y = 0.0028x + 2.6477$, $r = 0.33$, $P = 0.038$)

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายแต่ละชนิดของแมลงรืนดำ

จากการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลที่ทำการศึกษาในแต่ละฤดู ด้วยโปรแกรม PATN และการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายแต่ละชนิดของแมลงรืนดำ ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าตัวแปรแต่ละ principal components และการปรากฏชนิดของแมลงรืนดำ ผลการวิเคราะห์พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายในแต่ละฤดูเหมือนกัน ดังนั้นสามารถสรุปเกี่ยวกับการกระจายของแมลงรืนดำในแต่ละชนิด ดังนี้

1. *S. asakoe* จะอยู่ในแหล่งน้ำที่มีความกว้างต่ำ ความลึก ความเร็วน้ำ อัตราการไหลของน้ำต่ำ พื้นลำธารมักประกอบด้วยทรายและก้อนกรวดขนาดเล็ก และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างสูง
2. *S. aureohirtum* มักอาศัยในแหล่งน้ำที่อยู่บริเวณ outlet ความเร็วน้ำต่ำ
3. *S. burtoni* จะอาศัยในแหล่งน้ำที่พื้นลำธารเป็นก้อนหินขนาดใหญ่
4. *S. chamlongi* อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความกว้างค่อนข้างสูง มีความเร็วน้ำค่อนข้างสูงเช่นกัน และเป็นแหล่งน้ำที่อยู่ในความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างต่ำ
5. *S. Chiangmaiense* อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความกว้างมาก ความลึก ความเร็วและอัตราการไหลของน้ำสูง อุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศสูง ความชื้นอากาศต่ำ และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ
6. *S. decuplum* มักอาศัยในแหล่งน้ำที่มีความกว้างต่ำ ความลึกและความเร็วต่ำ ความชื้นอากาศสูง อุณหภูมิน้ำต่ำ ค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มค่อนข้างต่ำ และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างสูง
7. *S. fenestratum* มักอาศัยในแหล่งน้ำที่มีความเร็วน้ำต่ำ ค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของน้ำสูง ความชื้นอากาศสูง และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลสูง

8. *S. sp. nr. sheilae* อยู่ในแหล่งน้ำที่มีความกว้างต่ำ ความลึกและความเร็วต่ำ อุณหภูมิ น้ำ และอากาศสูง และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ

9. *S. nakhonense* อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความกว้างมาก ความลึก ความเร็วและอัตราการไหล ของน้ำสูง อุณหภูมิ น้ำและอุณหภูมิอากาศสูง ความชื้นอากาศต่ำ และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ

10. *S. nodosum* อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความกว้างมาก ความลึก ความเร็วและอัตราการไหล ของน้ำสูง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ อุณหภูมิ น้ำและอุณหภูมิอากาศสูง ความชื้นอากาศต่ำ และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ

11. *S. parahiyangum* อยู่ในแหล่งน้ำที่มีความกว้างต่ำ ความเร็ว น้ำต่ำ และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ

12. *S. quinquestriatum* อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความกว้างมาก ความลึก ความเร็วและอัตราการไหลของน้ำสูง อุณหภูมิ น้ำและอุณหภูมิอากาศสูง ความชื้นอากาศต่ำ พื้นลำธารประกอบด้วยก้อนหินขนาดใหญ่และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ

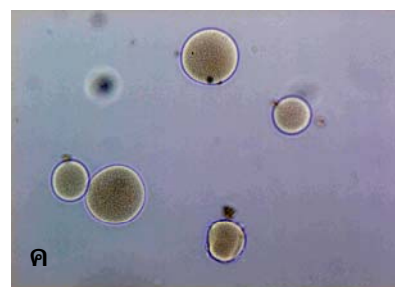
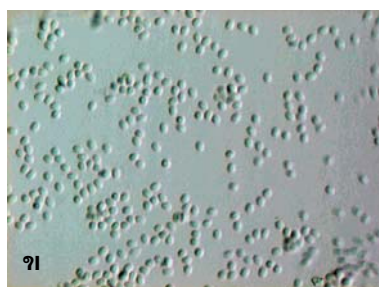
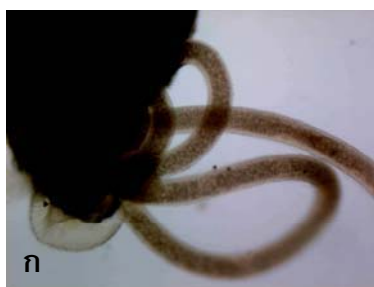
13. *S. sp. nr. rufibasis* อาศัยในแหล่งน้ำที่มีอัตราการปกคลุมเรือนยอดสูง แหล่งน้ำมีความกว้างมาก และอยู่ในความสูงค่อนข้างต่ำ

14. *S. siamense* อาศัยในแหล่งน้ำที่มีค่าการนำไฟฟ้าและความเค็มของน้ำสูง มีอัตราการปกคลุมเรือนยอดสูง ลักษณะน้ำค่อนข้างใส และอยู่ในความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่ำ

15. *S. tani* อยู่ในแหล่งน้ำที่มีค่าการนำไฟฟ้าและความเค็มของน้ำต่ำ อุณหภูมิ น้ำต่ำ ความชื้นอากาศสูง พื้นลำธารประกอบด้วยก้อนหินขนาดต่างๆ และมีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลสูง

9. การศึกษาปรสิตในตัวย่อยแมลงวันดำ

การศึกษาปรสิตในตัวย่อยแมลงวันดำ พบปรสิตจำนวน 3 กลุ่ม ได้แก่ หนอนพยาธิตัวกลม ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Mermithidae, microsporidia และเชื้อราชนิด *Coelomycidium simulii* (ภาพที่ 5.19) (McCreadie and Adler, 1999) ลักษณะของตัวย่อยที่มีปรสิตอาศัยอยู่ สามารถสังเกตได้จากส่วนท้องของตัวย่อย ปรสิตที่เป็นหนอนพยาธิตัวกลมจะขดเป็นรูปรีหรือกลม ซึ่งอาจพบเพียงหนึ่งตัวหรือมากกว่าที่อาศัยอยู่ภายในตัวย่อย ปรสิตที่เป็น microsporidia สังเกตจากการมีลักษณะคล้ายก้อนสีขาวขนาดใหญ่อยู่บริเวณส่วนท้อง และเชื้อราสังเกตจากสีตัวของตัวย่อยมีความแตกต่างจากตัวอื่นๆ โดยจะมีก้อนกลมสีขาวขนาดเล็กเป็นจำนวนมากลอยอยู่ภายในลำตัวและช่องท้อง ตัวย่อยที่มีปรสิตอาศัยอยู่จะมีผลให้เซลล์ต่อมน้ำลายมีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่ โดยเห็นจากขนาดของต่อมน้ำลายจะเล็กลง ซึ่งมีผลต่อการศึกษแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซม



ภาพที่ 5.19 ปรสิตที่พบในระยะตัวย่อยของแมลงวันดำจำนวน 3 กลุ่ม ก) หนอนพยาธิตัวกลม วงศ์ Mermithidae ข) microsporidia ค) เชื้อราชนิด *Coelomycidium simulii*

5.6.3 สรุปผล

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาภาคสนามเพื่อศึกษานิเวศวิทยาของแมลงรึ้นดำในเขตภาคเหนือของประเทศไทยโดยได้ทำการศึกษาทั้งหมด 3 ฤดูกาล เป็นระยะเวลา 1 ปี ได้แก่ ฤดูฝน (พฤษภาคม-มิถุนายน 2546) ฤดูหนาว (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546) และฤดูร้อน (เมษายน 2547) ช่วงฤดูฝนสามารถทำการศึกษาในบริเวณแหล่งน้ำไหลทั้งหมด 61 แห่ง บริเวณ 10 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย 4 แห่ง แม่ฮ่องสอน 21 แห่ง เชียงใหม่ 23 แห่ง ลำพูน 1 แห่ง ลำปาง 3 แห่ง แพร่ 1 แห่ง อุตรดิตถ์ 1 แห่ง สุโขทัย 1 แห่ง ตาก 3 แห่ง และกำแพงเพชร 3 แห่ง ช่วงฤดูหนาวสามารถทำการศึกษาในสถานศึกษาในสถานที่เดิมจำนวน 54 แห่งและเลือกบริเวณศึกษาเพิ่มเติมจำนวน 4 แห่ง ฤดูร้อนสามารถศึกษาภาคสนามได้เพียง 39 แห่งซึ่งเป็นสถานที่เดิมที่ได้ศึกษาในฤดูฝนและฤดูหนาว สถานที่เหล่านี้อยู่บริเวณ 6 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย 4 แห่ง แม่ฮ่องสอน 11 แห่ง เชียงใหม่ 15 แห่ง ลำปาง 2 แห่ง แพร่ 1 แห่งและตาก 2 แห่ง จากการศึกษาความหลากหลายของแมลงรึ้นดำบริเวณแหล่งน้ำไหลในฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน พบแมลงรึ้นดำทั้งหมด 27 ชนิด ฤดูหนาวพบ 26 ชนิด ซึ่งมากกว่าจำนวนชนิดที่พบในฤดูฝนและฤดูร้อนช่วงฤดูฝน ซึ่งพบ 24 ชนิดและ 23 ชนิด ตามลำดับ จากการศึกษาการกระจายของชนิดแมลงรึ้นดำใน 10 จังหวัดภาคเหนือ พบว่าชนิด *S. nakhonense* มีการกระจายในหลายจังหวัด แต่ชนิด *S. chaliowae* พบเฉพาะในจังหวัดแพร่และ *S. weji* พบที่ลำปาง เนื่องจากรึ้นดำส่วนใหญ่มีอาศัยรวมกันมากกว่า 1 ชนิดในแต่ละแหล่งน้ำไหล ซึ่งเรียกว่า “การรวมกลุ่มของชนิด” (species assemblage) (McCreadie and Adler, 1997) และพบว่ารึ้นดำหลายชนิดสามารถอาศัยในแหล่งน้ำไหลที่มีค่าปัจจัยทางกายภาพของน้ำในช่วงกว้าง จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของน้ำกับการกระจายตัวของตัวอ่อนแมลงรึ้นดำแต่ละชนิด พบว่าปัจจัยทางกายภาพของน้ำบางปัจจัยมีผลต่อการกระจายตัวของรึ้นดำแต่ละชนิดแต่มีค่าไม่สูงมาก อาจเนื่องจากการปรับตัวของรึ้นดำให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำไหลที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมของฤดูกาล

งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ตัวแปรหลายตัวแปร เพื่อทำการศึกษาเพื่อจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลและได้ลดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการไม่นำแหล่งน้ำไหลที่พบจำนวนตัวน้อยกว่า 25 ตัว และไม่นำชนิดที่พบน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแหล่งน้ำไหลทั้งหมดมาวิเคราะห์ข้อมูล ได้ทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลในแต่ละฤดูด้วยข้อมูลทางชีวภาพ โดยทำการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลด้วยข้อมูลความคล้ายคลึงกันของชนิดแมลงรึ้นดำ ในช่วงฤดูฝนสามารถจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 56 แห่ง ออกเป็น 7 กลุ่ม แมลงรึ้นดำจำนวน 8 ชนิดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกน ได้แก่ *S. asakoe*, *S. burtoni*, *S. Chiangmaiense*, *S. fenestratum*, *S. nakhonense*, *S. nodosum*, *S. quinquestriatum* และ *S. siamense* ในช่วงฤดูหนาวสามารถจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 57 แห่ง ออกเป็น 8 กลุ่ม แมลงรึ้นดำ 4 ชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกน ได้แก่ *S. asakoe*, *S. Chiangmaiense*, *S. fenestratum* และ *S. nakhonense* และในช่วงฤดูร้อนสามารถจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 39 แห่ง ออกเป็น 6 กลุ่ม แมลงรึ้นดำ 5 ชนิดที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกน ได้แก่ *S. asakoe*, *S. aureohirtum*, *S. Chiangmaiense*, *S. nakhonense* และ *S. nodosum* แมลงรึ้นดำจำนวน 3 ชนิดที่มีความสัมพันธ์กับแกนทั้งสามฤดู ได้แก่ *S. asakoe*, *S. Chiangmaiense* และ *S. nakhonense* ผลการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลในแต่ละฤดูมีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่ม

แหล่งน้ำไหลของน้ำตกธารทอง จังหวัดลำปาง (LPA01) ถูกแยกออกจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน เนื่องจากพบแมลงรืนดำชนิดที่เด่น คือ ชนิด *S. weji* เหมือนกันทั้งสามฤดูและเป็นชนิดที่กระจายจำกัดเฉพาะที่น้ำตกธารทองเท่านั้น อย่างไรก็ตามแมลงรืนดำชนิดนี้ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแกนมากกว่า 0.60

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มและการจัดอันดับในโปรแกรม PATN และ Principal component analysis รวมทั้งการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายของแมลงรืนดำแต่ละชนิด สามารถสรุปได้ดังนี้ ชนิด *S. asakoe* พบมากในแหล่งน้ำที่มีความกว้างน้อยและพื้นลำธารประกอบด้วยกรวดหรือทราย ความลึกและความเร็วน้ำต่ำ ส่วนใหญ่จะพบ *S. asakoe* ในแหล่งน้ำไหลที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างสูง ชนิด *S. aureohirtum* มักพบในแหล่งน้ำไหลที่มีแสงแดดส่องถึงได้มากและเป็นบริเวณแหล่งน้ำไหลที่เรียกว่า outlet ชนิด *S. burtoni* มักพบในแหล่งน้ำที่พื้นลำธารเป็นก้อนหินชนิด rubble และ boulder ชนิด *S. Chiangmaiense*, *S. nakhonense*, *S. nodosum* และ *S. quinquestriatum* มักพบในแหล่งน้ำที่มีความกว้าง ความลึก ความจุน้ำและความเร็วน้ำมาก พื้นลำธารส่วนใหญ่จะประกอบด้วยก้อนหินชนิด rubble และ boulder นอกจากนี้มักพบในแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศสูง ความชื้นอากาศต่ำ และพบในระดับความสูงต่ำ ชนิด *S. fenestratum* พบในแหล่งน้ำไหลที่มีอุณหภูมิน้ำต่ำและอยู่ในความสูงเหนือระดับน้ำทะเลค่อนข้างสูง และชนิด *S. siamense* พบในแหล่งน้ำที่มีค่าการนำไฟฟ้าและความเค็มของน้ำค่อนข้างสูง นอกจากนี้พบว่าการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลด้วยโปรแกรม PATN และ Hierarchical Cluster Analysis โดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพได้ผลที่คล้ายคลึงกัน

สำหรับการจำแนกชนิดแมลงรืนดำโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบชนิดโดยศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์โดยเปรียบเทียบรูปแบบของแบนด์โพลีทินโครโมโซมในตัวอ่อนเพื่อยืนยันชนิดให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น พบว่าชนิด *S. sp. nr. chamlongi* ที่เก็บจากทุ่งบัวตอง จ. แม่ฮ่องสอนเป็นชนิดเดียวกับชนิด *S. chamlongi* ที่เก็บจากน้ำตกสิริภูมิ อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมากและมีรูปแบบของแบนด์โพลีทินโครโมโซมเหมือนกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ตรวจสอบชนิด *S. sp. nr. feuerborni* 1 ที่เก็บจากขุนนาง จ. เชียงใหม่และ *S. sp. nr. feuerborni* 2 ทุ่งบัวตอง จ. แม่ฮ่องสอนว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ พบว่าทั้งสองเป็นชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีรูปแบบของการเกิดอินเวอร์ชันแบบ III-3complex และมี B-chromosome เหมือนกัน การศึกษาปรสิตในตัวอ่อนแมลงรืนดำ พบปรสิตจำนวน 3 กลุ่ม ได้แก่ หนอนพยาธิตัวกลม (mermithid nematodes) microsporidia และเชื้อราชนิด *Coelomycidium simulii* ตัวอ่อนรืนดำที่มีปรสิตอาศัยอยู่จะมีผลให้เซลล์ต่อมน้ำลายมีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่ ซึ่งเป็นอุปสรรคในการศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทินโครโมโซม

5.7 การศึกษาโพลีทินโครโมโซมของตัวอ่อนของแมลงรืนดำ

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงนิยมศึกษาโพลีทินโครโมโซมที่มาจากต่อมน้ำลายของตัวอ่อนเพราะมีขนาดใหญ่และย้อมติดสีสวย นอกจากนี้ยังมีแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทินโครโมโซมที่มีลักษณะจำเพาะในแต่ละสปีชีส์ ดังนั้นการศึกษาโพลีทินโครโมโซมจึงมีประโยชน์ในการแยกชนิดของแมลงรวมทั้งศึกษาสืบพันธุ์ในสปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน นอกจากนี้อินเวอร์ชันรูปแบบต่างๆ

บนโพลีทีนโครโมโซมยังมีประโยชน์ในการศึกษา chromosomal polymorphisms ของประชากร และความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลง งานวิจัยนี้ทำการศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนแมลงวันดำเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยชนิดและแนวโน้มของการแยกเป็นซิบลิงสปีชีส์ รวมทั้งศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงวันดำเพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

5.7.1. ตัวอย่างและวิธีการ

1. ตัวอย่างของตัวอ่อนแมลงวันดำ *Simulium siamense* (ตารางที่ 3.5) และ *Simulium tani* (ตารางที่ 5.9) เก็บมาจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย วิธีการเก็บและรักษาตัวอ่อนทำตามวิธีในหัวข้อ 5.4.2

2. วิธีการศึกษาโพลีทีนโครโมโซมและวิธีแยกเพศ

โพลีทีนโครโมโซมของวันดำเตรียมจากต่อมน้ำลายของตัวอ่อนที่เจริญเติบโตระยะสุดท้าย (สังเกตจาก gill spot สีดำบริเวณด้านข้างของปล้องอก) ทำการย้อมโพลีทีนโครโมโซมตามวิธีของ Rothfels และ Dundar (1953) ดังนี้ เปิดส่วนท้องด้านล่างของตัวอ่อนที่ตอมในน้ำยา Carnoy's fixative ภายใต้กล้องสเตอริโอ แช่ตัวอ่อนในน้ำกลั่น 20 นาทีและแช่ในกรด HCl 1N ที่อุณหภูมิ 62-65°C ประมาณ 10 นาที แล้วแช่ตัวอ่อนในสี Feulgen ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อย้อมโพลีทีนโครโมโซม หลังจากนั้นแช่ตัวอ่อนใน sulfur water ประมาณ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเย็น 2 ครั้ง เชียต่อน้ำลายและวางต่อมน้ำลายใน 50% acetic acid บนแผ่นสไลด์แล้วปิดด้วย coverslip และกด coverslip ด้วยหัวแม่มือเพื่อให้โพลีทีนโครโมโซมกระจาย แล้วหยดสี 2% carmine ที่ขอบของ coverslip เพื่อให้โพลีทีนโครโมโซมติดสีเข้มข้น หลังจากนั้นทำการศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูปโครโมโซมที่เห็นแบนด์ชัดเจนสำหรับทำแผนที่มาตรฐานของโครโมโซม การย้อมโดยวิธีนี้สามารถตรวจเพศของแมลงวันดำได้ภายใต้กล้องสเตอริโอ โดยศึกษาลักษณะรูปร่างอวัยวะเพศที่อยู่ด้านบนของปล้องท้องที่ 6 อันตะของเพศผู้จะมีลักษณะเล็กและกลม ขณะที่รังไข่ของเพศเมียมีลักษณะยาวรี

5.7.2 การศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนวันดำชนิด *Simulium siamense*

1. รูปร่างลักษณะของโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำชนิด *Simulium siamense*

แมลงวันดำชนิด *S. siamense* มีโครโมโซมจำนวน 3 คู่ ($2n=6$) เช่นเดียวกับแมลงวันดำชนิดอื่น โครโมโซมแท่งที่ I, II และ III มีความยาวเรียงตามลำดับ โครโมโซมแท่งที่ I เป็นแท่งที่ยาวที่สุดและแท่งที่สั้นที่สุดคือ แท่งที่ III โครโมโซมแต่ละแท่งประกอบด้วยแขนสั้น (IS) และแขนยาว (IL) ซึ่งความยาวของแขนอาจจะเท่ากันหรือไม่ขึ้นอยู่กับตำแหน่งเซนโทรเมียร์ (ภาพที่ 5.20) รายละเอียดของโพลีทีนโครโมโซมของ *S. siamense* มีดังนี้

ตารางที่ 5.5 แหล่งเก็บตัวอย่างแมลงวันดำชนิด *Simulium siamense* ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยเพื่อศึกษาโพลีทินโครโมโซม

แหล่งที่เก็บ	Code	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอ่อน	Latitude/Longitude	ความสูง (m)
ภาคเหนือ					
จ.แม่ฮ่องสอน					
1. ห้วยห้วยก	HY	4 มิ.ย. 46	107 (57=♂,50=♀)	N 18°33' E 97°55'	388
2. บ้านแม่โถ	BT	30 พ.ย. 46	37 (19=♂,18=♀)	N 18°34' E 97°56'	417
3. บ้านแม่สะงา	BN	5 มิ.ย. 46	46 (26=♂,20=♀)	N 19°25' E 97°57'	242
4. บ้านน้ำกาด				N 19°29' E 98°03'	500
Collection 1	BK1	2 ธ.ค. 46	17 (10=♂,7=♀)		
Collection 2	BK2	13 ธ.ค. 47	9 (6=♂,3=♀)		
5. แยกวัดจันทร์ อบต. แม่ฮี้				N 19°17' E 98°29'	525
Collection 1	MH1	2 ธ.ค. 46	6 (4=♂,2=♀)		
Collection 2	MH2	16 เม.ย. 47	19 (8=♂,11=♀)		
6. ภูโคลน	PK	15 เม.ย. 47	9 (5=♂,4=♀)	N 19°27' E 97°58'	247
จ.ตาก					
7. บ้านลานสาง	BS	21 ธ.ค. 46	11 (4=♂,7=♀)	N 16°46' E 99°01'	250
8. รพ. พบพระ	PP	22 ก.ค. 48	28 (13=♂,15=♀)	N 16°23' E 98°42'	400
จ.สุโขทัย					
9. อุทยานแห่งชาติรามคำแหง	RH	21 ธ.ค. 46	4 (2=♂,2=♀)	N 16°48' E 98°59'	270
จ.พะเยา					
10. ห้วยแม่ตำ	HT	25 ก.ค. 48	57 (29=♂,28=♀)	N 18°56' E 100°04'	558

ตารางที่ 5.5 (ต่อ)

แหล่งที่เก็บ	Code	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอ่อน	Latitude/Longitude	ความสูง (m)
จ.น่าน					
11. ห้วยแม่สาคร	HS	26 ก.ค. 48	38 (24=♂, 14=♀)	N 18°29' E 100°30'	389
12. เวียงสา-ร้องกวาง กม.50	WS	26 ก.ค. 48	31 (10=♂, 21=♀)	N 18°29' E 100°30'	389
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ					
จ.ชัยภูมิ					
13. น้ำตกเทพทองคำ	TK	07 ก.พ. 45	82 (45=♂, 37=♀)	-	300
14. น้ำตกเทพประทาน	TT	07 ก.พ. 45	26 (13=♂, 13=♀)	-	350
15. น้ำตกเทพนา	TN	23 พ.ย. 46	26 (10=♂, 16=♀)	-	200
16. น้ำตกผาเอียง	PE	17 พ.ย. 41	21 (8=♂, 13=♀)	-	300
จ.ศรีสะเกษ					
17. น้ำตกห้วยจันทร์	HC	6 ก.ย. 46	118 (65=♂, 53=♀)	N 14°31' E 104°22'	206
จ.นครราชสีมา					
อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่				N 14°25'33"	
18. ผากล้วยไม้ A	PMA	20 พ.ย. 47	8 (5=♂, 3=♀)	E 101°24'40"	600
19. ผากล้วยไม้ B	PMB	20 พ.ย. 47	17 (11=♂, 6=♀)	N 14°25'38"	600
				E 101°24'44"	
20. ผากล้วยไม้ C	PMC	25 ก.ค. 47	23 (8=♂, 15=♀)	N 13°59' E 99°50'	300
จ.สกลนคร					
21. ทางหลวง 2330 กม. 26-27	SK	10 มิ.ย. 48	24 (14=♂, 10=♀)	N 16°55' E 104°06'	204

ตารางที่ 5.5 (ต่อ)

แหล่งที่เก็บ	Code	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอ่อน	Latitude/Longitude	ความสูง (m)
22 อุทยานแห่งชาติภูพาน	PH	11 มิ. ย. 48	114 (56=♂,58=♀)	N 17°04' E 103°58'	210
ภาคกลาง					
จ.เพชรบุรี					
23. บ้านกร่างแคมป์ อช. แก่งกระจาน				N 12°47' E 99°27'	318
Collection 1	BC1	16 ส.ค. 46	379 (83=♂,296=♀)		
Collection 2	BC2	27 พ.ย. 47	78 (32=♂,46=♀)		
24. เขาพะเนินทุ่ง อช. แก่งกระจาน				N 12°48' E 99°26'	347
Collection 1	KT1	16 ส.ค. 46	84 (39=♂,45=♀)		
Collection 2	KT2	27 พ.ย. 47	7 (1=♂,6=♀)		
จ.สระแก้ว					
25 น้ำตกปางสีดา				N 13°59' E 102°12'	250
Collection 1	PD1	24 ก.ค. 47	15 (10=♂,5=♀)		
Collection 2	PD2	21 พ.ย. 47	10 (4=♂,6=♀)		
จ.นครนายก					
26. น้ำตกวังตะไคร้	WK	26 ก.ค. 47	6 (4=♂,2=♀)	N12°19' E101°18'	240

ตารางที่ 5.5 (ต่อ)

แหล่งที่เก็บ	Code	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอ่อน	Latitude/Longitude	ความสูง (m)
จ.กาญจนบุรี					
บ้านห้วยเขย่ง				N 14°38'15"	
27. ร่องน้ำห้วยเขย่ง	HK(a)	20 ก.พ. 48	60 (29=♂,31=♀)	E 98°34'16"	200
28. พุทธสถานห้วยเขย่ง	HK(b)	20 ก.พ. 48	15 (5=♂,10=♀)	N 14°38'05"	200
				E 98°33'59"	
29. ฝายทดน้ำห้วยเขย่ง	HK(c)	29 ก.พ. 47	4 (1=♂,3=♀)	N 14°37' E 98°31'	202
30. ห้วยองรีห้วยเขย่ง	HK(d)	28 ก.พ. 47	57 (17=♂,40=♀)	N 14°42' E 98°40'	109
ภาคตะวันออก					
จ.ระยอง					
31. น้ำตกเขาชะเมา	KM	5 มิ.ย. 47	20 (10=♂,10=♀)	N 12°54' E 101°43'	200
จ.จันทบุรี					
32. น้ำตกเขาสอยดาว				N 13°06' E 102°11'	320
Collection 1	KD1	20 มิ.ย. 46	40 (20=♂,20=♀)		
Collection 2	KD2	6 มิ.ย. 47	65 (32=♂,33=♀)		
33. บ้านปัทมวิ				N 12°48' E 102°15'	60
Collection 1	PW1	20 มิ.ย. 46	74 (33=♂,41=♀)		
Collection 2	PW2	6 มิ.ย. 46	36 (23=♂,13=♀)		

โครโมโซมแท่งที่ I มีลักษณะเป็นแบบเมทาเซนตริกที่แขนสั้นและแขนยาวมีความยาวเกือบเท่ากัน ลักษณะสำคัญที่พบบนโครโมโซมแท่งที่ I คือ นิวคลีโอไลอาร์อาร์แกในเซอร์ (NOR) ตรงตำแหน่ง 20B ของโครโมโซมแขนสั้น จากการศึกษาของ Kuvangkadilok et al. (2003) พบพาราเซนตริกอินเวอร์ชัน IS-1 และ IL-1 บนโครโมโซมแขนสั้นและแขนยาวตามลำดับ ในการศึกษาพบอินเวอร์ชันเพิ่มอีก 8 อินเวอร์ชัน ดังนั้นจำนวนอินเวอร์ชันที่พบทั้งหมดบนโครโมโซมแท่งที่ I มีทั้งหมด 10 อินเวอร์ชัน (ภาพที่ 5.21) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแขนสั้น 8 อินเวอร์ชัน และแขนยาว 2 อินเวอร์ชัน รายละเอียดของอินเวอร์ชัน มีดังนี้

อินเวอร์ชัน IS-1 เป็นพาราเซนตริก และเป็นทั้ง fixed และ floating inversions ที่มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 4A-8B1 อินเวอร์ชัน IS-1 อยู่ในรูปไฮไมโซไกสอินเวอร์ชัน IS-1/1 และเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IS-st/1 (ภาพที่ 5.21a)

อินเวอร์ชัน IS-2,3 เป็น two overlapping inversions โดยมีอินเวอร์ชัน IS-2,3 สัมพันธ์กับเพศเมีย overlapping inversion เกิดจากอินเวอร์ชัน IS-2 อันดับแรกที่มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 6C-9B ต่อมาจึงเกิดอินเวอร์ชัน IS-3 ที่มีจุดแยกแรกตรงตำแหน่ง 3C และจุดแยกที่สองอยู่บนอินเวอร์ชัน IS-2 ตรงตำแหน่ง 7B จึงเกิดเป็น two overlapping inversions IS-2,3 ที่อยู่ในรูปแบบเฮเทโรไฮไกสแบบ two overlapping inversions IS-st/2,3 (ภาพที่ 5.21b พร้อมภาพวาด)

อินเวอร์ชัน IS-4 เป็นพาราเซนตริก และ floating inversions ที่มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 4B-8B อยู่ในรูปแบบเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IS-st/4 (ภาพที่ 5.21c)

อินเวอร์ชัน IS-5 เป็นพาราเซนตริก และ floating inversions ที่มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 5A-7/8 อยู่ในสภาพเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IS-st/5 (ภาพที่ 5.21d)

อินเวอร์ชัน IS-6 เป็นพาราเซนตริก และเป็น partail sex-linked inversions ที่มีแนวโน้มนำสัมพันธ์กับเพศเมีย มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 15B-17B อยู่ในสภาพเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IS-st/6 (ภาพที่ 5.21e)

อินเวอร์ชัน IS-7 เป็นพาราเซนตริก และ partial sex-linked inversions ที่มีแนวโน้มนำสัมพันธ์กับเพศเมียเช่นเดียวกับ IS-6 มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 12A-17/18 อยู่ในสภาพเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IS-st/7 (ภาพที่ 5.21f)

อินเวอร์ชัน IS-8 เป็นพาราเซนตริก และ floating inversions มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 14/15-19B อยู่ในสภาพเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IS-st/8 (ภาพที่ 5.21g)

อินเวอร์ชัน IS-9 เป็นพาราเซนตริก และ floating inversions ที่มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 12A-13/14 อยู่ในสภาพเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IS-st/9 (ภาพที่ 5.21h)

อินเวอร์ชัน IL-1 เป็นพาราเซนตริก และ floating inversions มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 35B1-39B1 อยู่ในสภาพเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IL-st/1 (ภาพที่ 5.21i)

อินเวอร์ชัน IL-2 เป็นพาราเซนตริก และ floating inversion มีจุดแยกตรงตำแหน่ง 22A-24/25 อยู่ในสภาพเฮเทโรไฮไกสอินเวอร์ชัน IL-st/2 (ภาพที่ 5.21j)

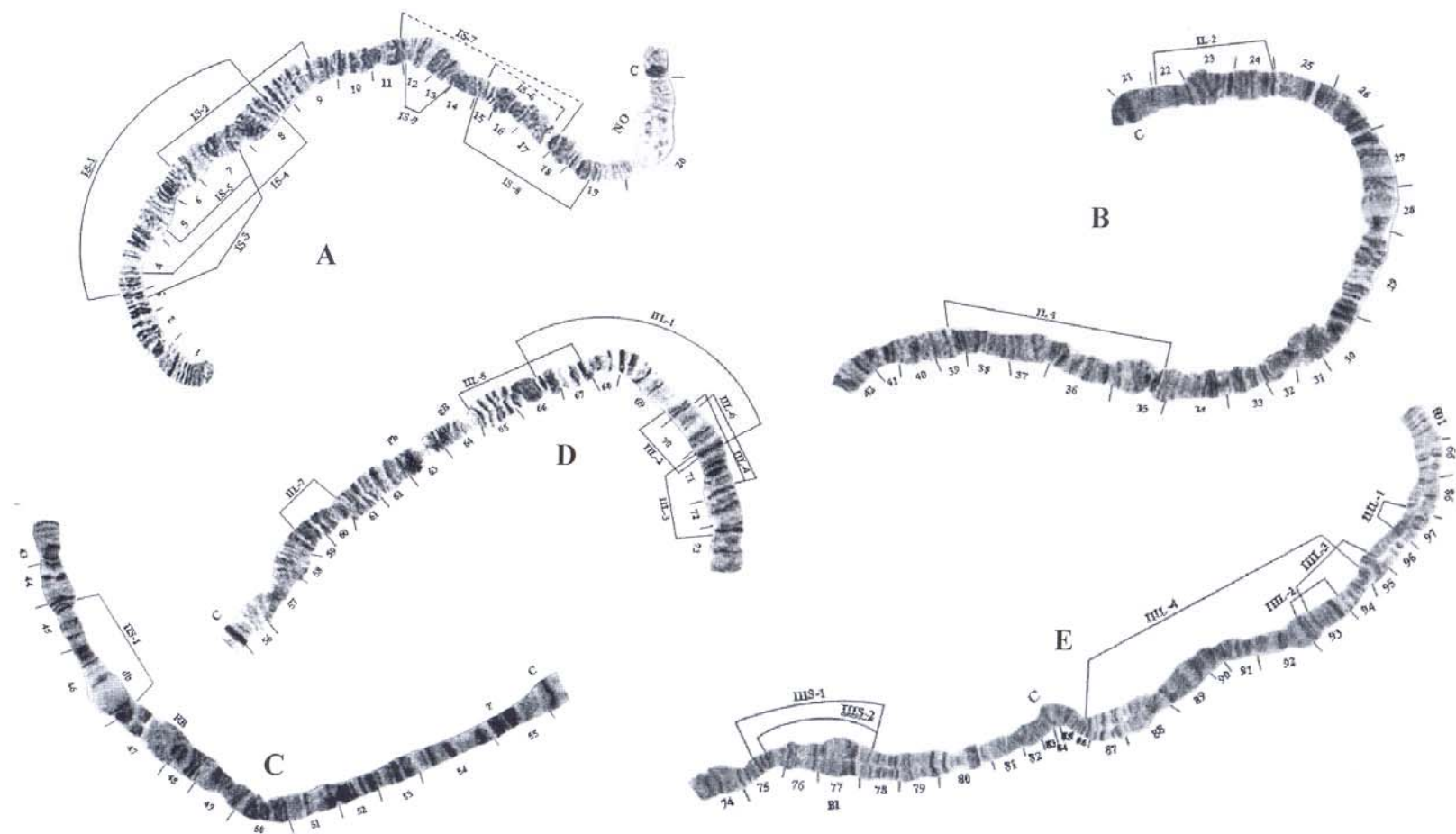
โครโมโซมแท่งที่ II ลักษณะรูปร่างเป็นแบบเมทาเซนตริก ลักษณะสำคัญที่พบบนโครโมโซมแขนสั้น (IIS) คือมี double bubble (db) หรือ Bulge (B) ตรงตำแหน่ง 46AB และอยู่ใกล้กับ Ring of

Balbani (RB) ตรงตำแหน่ง 47B นอกจากนี้โครโมโซมแขนสั้นยังมีแบนด์หนาที่บออยู่เรียงกัน 3 แบนด์ ไกล์เซนโทรเมียร์ เรียกแบนด์เหล่านี้ว่า “trapezoidal” และมี parabalbiani ที่เป็นแบนด์ลักษณะเฉพาะบนโครโมโซมแขนยาว (IIL) จากการศึกษาของ Kuvangkadilok et al. (2003) พบเฉพาะอินเวอร์ชัน IIL-1 บนโครโมโซมแขนยาว ในการศึกษาที่พบพาราเซนทริกอินเวอร์ชันเพิ่มอีก 7 อินเวอร์ชัน รวมทั้งหมดเป็น 8 อินเวอร์ชัน ซึ่งเกิดบนโครโมโซมแขนสั้น 1 อินเวอร์ชัน และแขนยาว 7 อินเวอร์ชัน อินเวอร์ชันทั้งหมดเป็นแบบพาราเซนทริก และ floating inversions ที่มีจุดแยกต่างกัันดังนี้

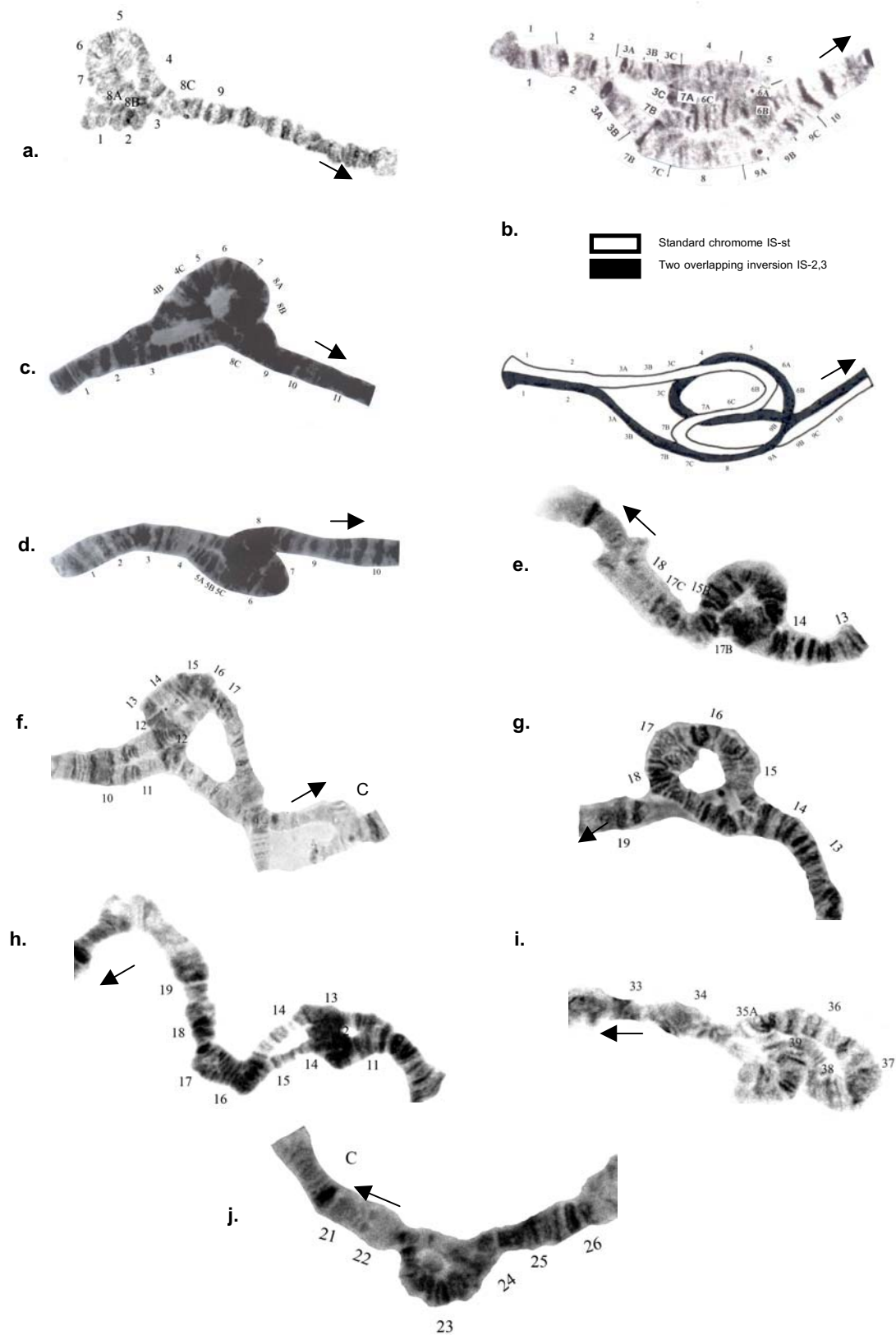
อินเวอร์ชัน IIS-1 (IIS-st/1) มีจุดแยกบริเวณ 45A-46/47 (ภาพที่ 5.22a), อินเวอร์ชัน IIL-1 (IIL-st/1) มีจุดแยกบริเวณ 66B3-71B1 (ภาพที่ 5.22b), อินเวอร์ชัน IIL-2 (IIL-st/2) มีจุดแยกบริเวณ 69C-71A (ภาพที่ 5.22c), อินเวอร์ชัน IIL-3 (IIL-st/3) มีจุดแยกบริเวณ 71A-73A (ภาพที่ 5.22d), อินเวอร์ชัน IIL-4 (IIL-st/4) มีจุดแยกบริเวณ 70A-71/72 (ภาพที่ 5.22e), อินเวอร์ชัน IIL-5 (IIL-st/5) มีจุดแยกบริเวณ 65A-67C (ภาพที่ 5.22f), อินเวอร์ชัน IIL-6 (IIL-st/6) มีจุดแยกบริเวณ 70A-71C (ภาพที่ 5.22g), อินเวอร์ชัน IIL-7 (IIL-st/7) มีจุดแยกบริเวณ 59B-60/61 (ภาพที่ 5.22h)

โครโมโซมแท่งที่ III เป็นแท่งที่สั้นที่สุด ลักษณะแบบซับเมทาเซนทริก ลักษณะสำคัญที่พบบนโครโมโซมนี้คือ มีแบนด์ดำหนา 2-3 แบนด์ที่เรียกว่า “heavy” อยู่ใกล้กับ blister บนโครโมโซมแขนซ้าย อินเวอร์ชันที่เกิดบนโครโมโซมแท่งนี้มีจำนวน 6 อินเวอร์ชัน ซึ่ง 5 อินเวอร์ชันเป็น floating inversions และ 1 อินเวอร์ชัน (IIIS-2) เป็นทั้ง fixed และ floating inversions ได้แก่ อินเวอร์ชัน IIIS-1 (IIIS-st/1) มีจุดแยกบริเวณ 75B-78A (ภาพที่ 5.23a), อินเวอร์ชัน IIIS-2 (IIIS-2/2) มีจุดแยกบริเวณ 75C-78A, อินเวอร์ชัน IIIL-1 (IIIL-st/1) มีจุดแยกบริเวณ 97A-97C (ภาพที่ 5.23b), อินเวอร์ชัน IIIL-2 (IIIL-st/2) มีจุดแยกบริเวณ 93A-93C (ภาพที่ 5.23c), อินเวอร์ชัน IIIL-3 (IIIL-st/3) มีจุดแยกบริเวณ 93B-95/96 (ภาพที่ 5.23d) และอินเวอร์ชัน IIIL-4 (IIIL-st/4) มีจุดแยกบริเวณ 86B-94 (ภาพที่ 5.23e)

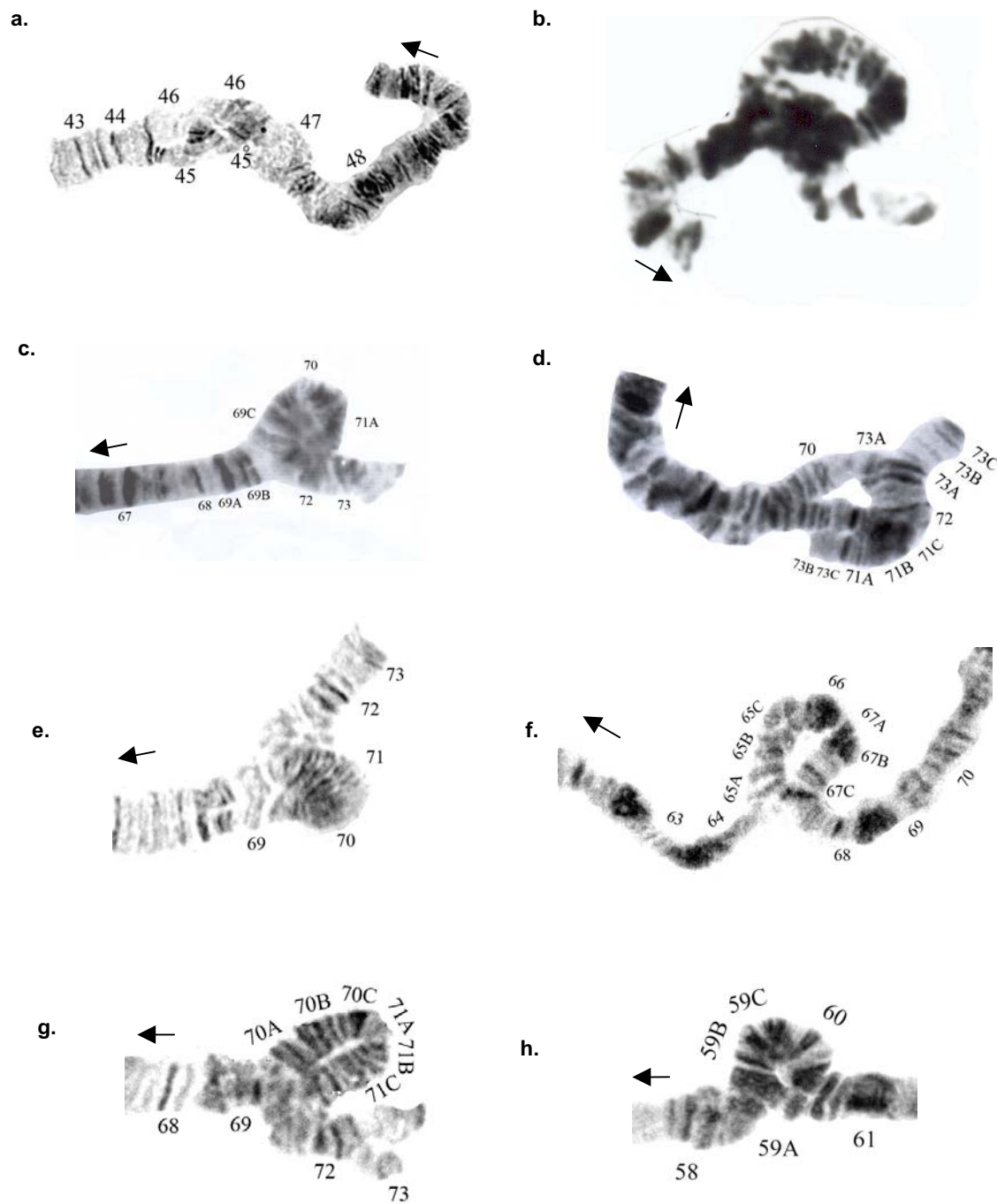
ค่าความถี่ของอินเวอร์ชันต่าง ๆ ในประชากรแมลงวันดำชนิด *S. siamense* แสดงในตารางที่



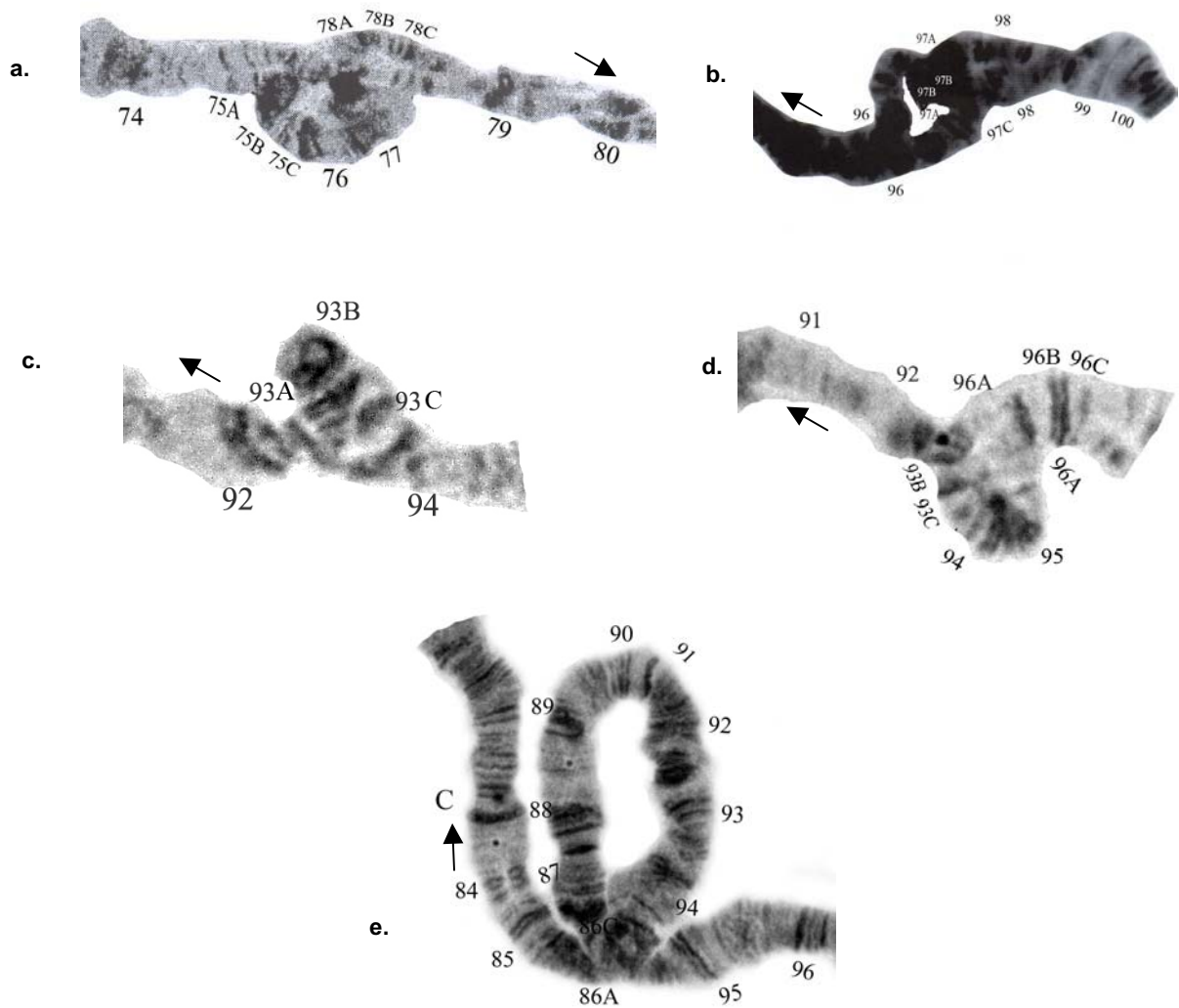
ภาพที่ 5.20 standard map ของโพลีทีนโครโมโซมของ *Simulium siamense* **A**: Chromosome IS, **B** : Chromosome IL, **C**: Chromosome IIS, **D**: Chromosome IIL, **E**: Chromosome III. Fixed inversion แสดงโดยการขีดเส้นใต้, Floating inversion แสดงโดยการไม่ขีดเส้นใต้, Sex-linked inversion แสดงโดยเส้นประ, C= เซนโทรเมอร์, NO= นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์, db= double bubble, RB= Ring of Balbiani, T= trapezoid, Pb= parabalbiani, gB= gray band, Bl= blister



ภาพที่ 5.21 เซเทโรไซกัสอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแท่งที่ 1 ของแมลงวันดำชนิด *Simulium siamense* (a) IS-st/1, (b) IS-st/2,3, (c) IS-st/4, (d) IS-st/5, (e) IS-st/6, (f) IS-st/7, (g) IS-st/8, (h) IS-st/9, (i) IL-st/1, (j) IL-st/2 ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์



ภาพที่ 5.22 เฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแท่งที่ 2 ของแมลงร้นดำชนิด *Simulium siamense* (a) IIS-st/1, (b) IIL-st/1, (c) IIL-st/2, (d) IIL-st/3, (e) IIL-st/4, (f) IIL-st/5, (g) IIL-st/6, (h) IIL-st/7 ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์



ภาพที่ 5.23 เฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแห่งที่ 3 ของแมลงวันตำชนิด *Simulium siamense* (a) IIIS-st/1, (b) IIIL-st/1, (c) IIIL-st/2, (d) IIIL-st/3, (e) IIIL-st/4 ลูกศรแสดงทิศทางของเซนโทรเมียร์

2. การแยกชนิดประชากรแมลงวันตำชนิด *Simulium siamense* โดยการศึกษาเปรียบเทียบแบนด์โพลีทีนโครโมโซม

ทำการศึกษาเปรียบเทียบแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนวันตำชนิด *S. siamense* จำนวน 1,828 ตัว ที่เก็บมาจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ 33 แห่งในภูมิภาคต่างๆของประเทศ จากการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับอินเวอร์ชันแบบสมบูรณ์ (complete sex-linkage) หรือแบบไม่สมบูรณ์ (partial sex-linkage inversion), การเกิด fixed inversion และรูปแบบของ autosomal polymorphisms ที่เกิดบนโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนวันตำทำให้แบ่งประชากรของวันตำชนิด

S. siamense ออกเป็น 6 cytoforms ดังนี้ *S. siamense* cytoform A, cytoform B, cytoform C, cytoform D, cytoform E และ cytoform F (ภาพที่ 5.24) ที่มีการกระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย (ภาพที่ 5.25) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

***S. siamense* cytoform A** ประชากรกลุ่มนี้เป็นประชากรกลุ่มใหญ่ที่กระจายอยู่ตามแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในเขตภาคเหนือ, ตะวันออกเฉียงเหนือ และตะวันออกของประเทศ อินเวอร์ชันทั้งหมดที่เกิดในประชากรกลุ่มนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับเพศและไม่เป็น fixed inversion แต่เป็น floating inversions ซึ่งมีจำนวน 23 อินเวอร์ชัน (รวมทั้งอินเวอร์ชัน IIIS-2 ซึ่งเป็นทั้ง fixed และ floating inversions) ที่มีความถี่ค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 5.6) ประกอบด้วยประชากรที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจำนวน 22 แห่ง แต่มีหนึ่งประชากรที่เก็บจากน้ำตกเทพนา จังหวัดชัยภูมิ ซึ่งมีทั้งหมด 26 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 16 ตัว) มีแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมเป็นแบบ monomorphic คือไม่เกิดอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแท่งใด รายละเอียดของประชากรจำนวน 21 แห่ง มีดังนี้

ภาคเหนือ

จ.แม่ฮ่องสอน

1. ห้วยหยวก

ประชากรที่เก็บจากห้วยหยวก อ.แม่ลาหลวง จ.แม่ฮ่องสอน จำนวน 107 ตัว เพศผู้จำนวน 57 ตัว เพศเมียจำนวน 50 ตัว พบลักษณะของ floating inversions 5 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS – 4 ในสภาพ heterozygous inversion (IS – st/4) พบจำนวน 56 ตัว (เพศผู้จำนวน 30 ตัว และเพศเมีย จำนวน 26 ตัว) ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.26

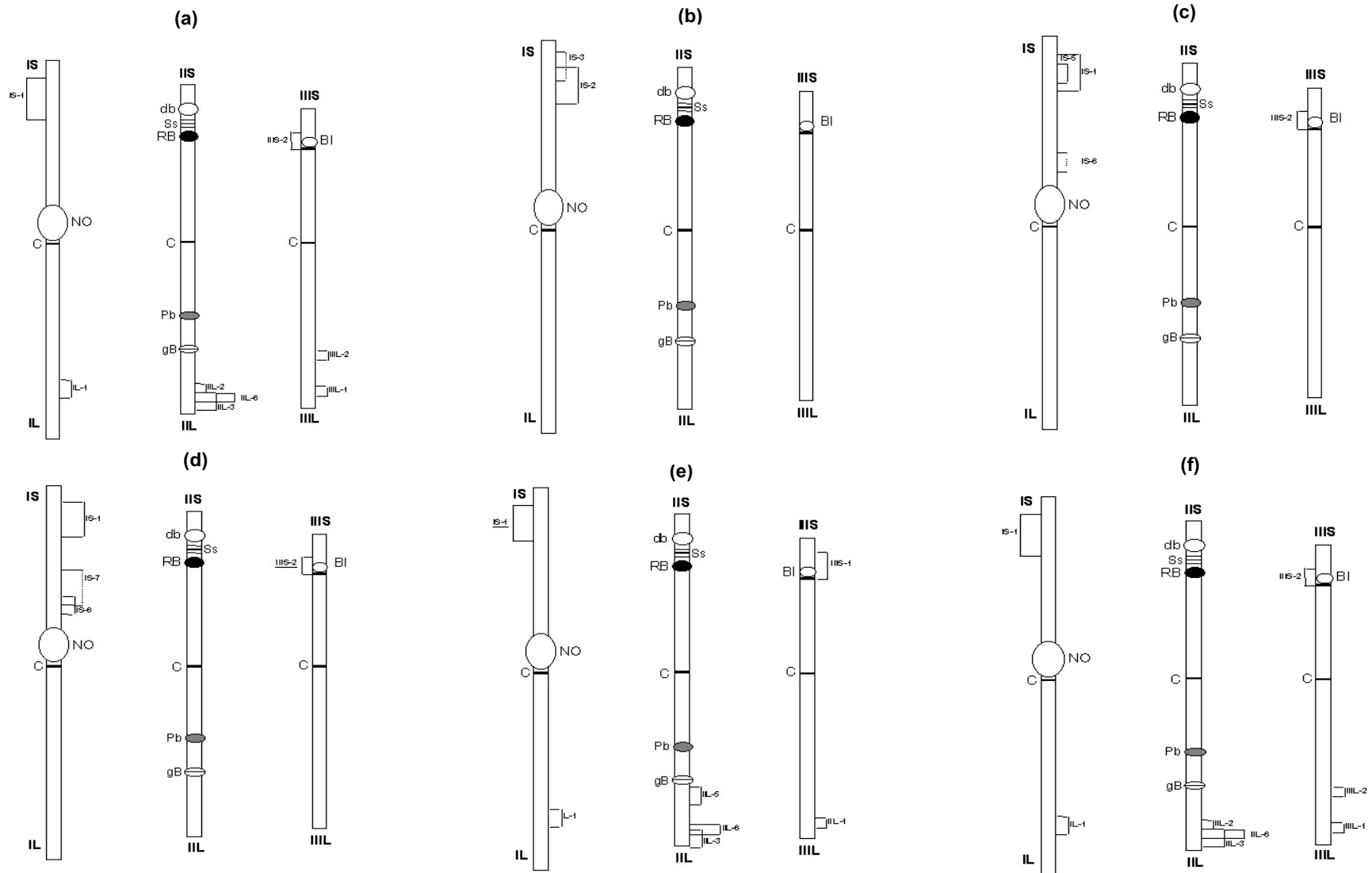
- อินเวอร์ชัน IIL – 2 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL – st/2) พบจำนวน 6 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.06

- อินเวอร์ชัน IIL – 3 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL – st/3) พบจำนวน 12 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.11

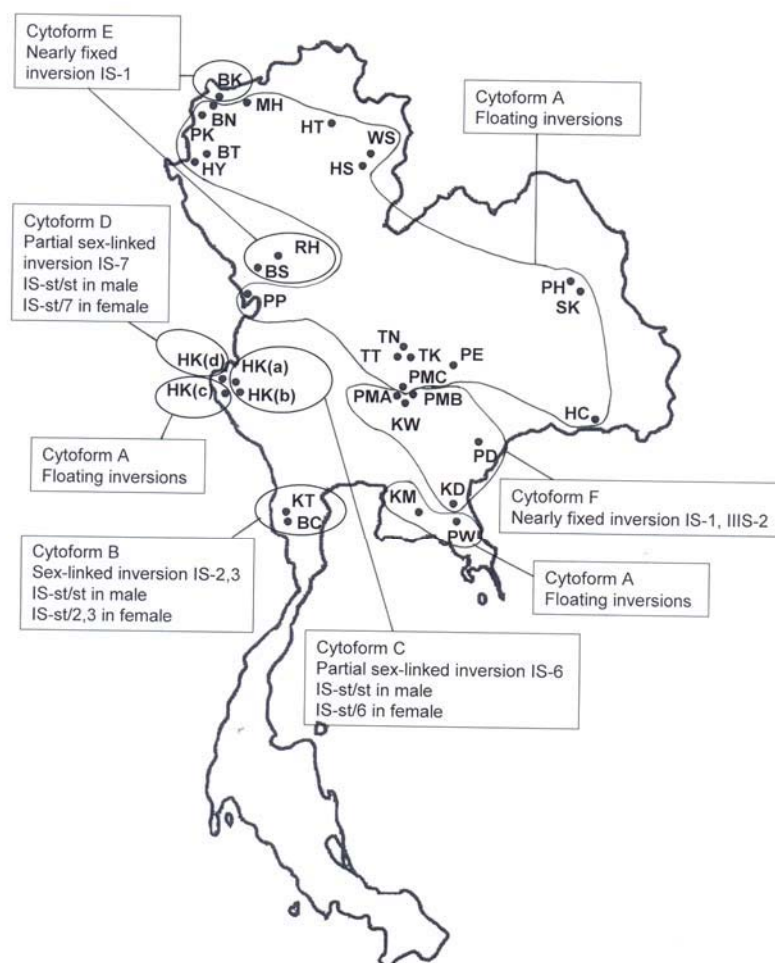
- อินเวอร์ชัน IIIS – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS – st/1) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIIL – 1 อยู่ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL – st/1) พบจำนวน 21 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.10

การทดสอบภาวะสมดุล Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชันทุกรูปแบบที่เกิดในประชากรห้วยหยวกอยู่ภายใต้สมดุล Hardy – Weinberg ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ A-1



ภาพที่ 5.24 Chromosomal idiograms ของ *Simulium siamense* 6 cytoforms: (a), *S. siamense* cytoform A, (b) *S. siamense* cytoform B, (c), *S. siamense* cytoform C, (d), *S. siamense* cytoform D, (e), *S. siamense* cytoform E และ (f), *S. siamense* cytoform F IS, โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนสั้น; IL, โครโมโซมแท่งที่ 1 แขนยาว; IIS, โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนสั้น; IIL โครโมโซมแท่งที่ 2 แขนยาว; IIIS, โครโมโซมแท่งที่ 3 แขนสั้น; IIIIL, โครโมโซมแท่งที่ 3 แขนยาว; C, เซนโทรเมียร์; NO, nucleolar organizer; db, double bubble; Ss, shoe string; RB, Ring of Balbiani; Pb, parabalbiani; gB, gray band; B, blister, เส้นทึบซึ่งแสดงอยู่ด้านซ้ายใช้แสดง fixed inversion, เส้นทึบซึ่งอยู่ด้านขวาใช้แสดง Floating inversion และเส้นประใช้แสดง sex-linked inversion



ภาพที่ 5.25 แสดงการกระจายของ *Simulium siamense* ในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย (อักษรย่อของแหล่งที่เก็บ ดูจากตารางที่ 5.5)

(ในภาคผนวก 2) ยกเว้นอินเวอร์ชัน IS – 4 ที่ไม่อยู่ในสภาวะสมดุล ($P < 0.001$) เนื่องจากการมีรูปแบบของสภาพเฮเทอโรไซโกตจำนวนมากในประชากร การทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G-test พบว่าอินเวอร์ชันที่เกิดในประชากรห้วยหวกนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

2. บ้านแม่โก

ประชากรที่เก็บจากบ้านแม่โก อ.แม่ลาน้อย จ.แม่ฮ่องสอน จำนวน 37 ตัว เพศผู้จำนวน 19 ตัว เพศเมียจำนวน 18 ตัว พบลักษณะของ floating inversions 6 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS – 4 ในสภาพ heterozygous inversion (IS – st/4) พบจำนวน 21 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.27

- อินเวอร์ชัน IS – 5 ในสภาพ heterozygous inversion (IS – st/5) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIL – 2 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL – st/2) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIL – 3 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL – st/3) พบจำนวน 7 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.19

- อินเวอร์ชัน IIIS – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS – st/1) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIIL – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL – st/1) พบจำนวน 3 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.04

การทดสอบภาวะสมดุล Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชันที่เกิดขึ้นในประชากรบ้านแม่โถอยู่ภายใต้สมดุล Hardy – Weinberg (ตารางที่ A -1 ในภาคผนวก 2) การทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G-test พบว่าอินเวอร์ชันทุกรูปแบบที่เกิดขึ้นในประชากรบ้านแม่โถไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

3. บ้านแม่สะงา

ประชากรที่เก็บจากบ้านแม่สะงา อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน จำนวน 46 ตัว เพศผู้ จำนวน 26 ตัว เพศเมีย จำนวน 20 ตัว พบลักษณะของ floating inversions 2 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS – 4 ในสภาพ heterozygous inversion (IS – st/4) พบจำนวน 10 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.12

- อินเวอร์ชัน IIIL – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL – st/1) พบจำนวน 5 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.05

การทดสอบภาวะสมดุล Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชันทุกรูปแบบที่เกิดขึ้นในประชากรบ้านแม่สะงานั้นมีค่าความคาดหวังค่อนข้างต่ำจึงไม่สามารถนำมาทดสอบได้ การทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G-test พบว่าอินเวอร์ชันทุกรูปแบบที่เกิดขึ้นในประชากรบ้านแม่สะงาไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

4. แยกวัดจันทร์ อบต.แม่ธิ

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 2 ประชากร โดยศึกษาประชากรแรก จำนวน 6 ตัว เพศผู้จำนวน 4 ตัว และเพศเมียจำนวน 2 ตัว และประชากรที่สอง จำนวน 19 ตัว เพศผู้จำนวน 8 ตัว และเพศเมียจำนวน 11 ตัว ซึ่งรายละเอียดของแต่ละประชากรและอินเวอร์ชันมีดังนี้

ในประชากรแรกพบ floating inversions 2 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) จำนวน 3 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 3 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.75

- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) จำนวน 2 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.17

ในประชากรที่สองพบ floating inversions 2 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) จำนวน 8 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.63
- อินเวอร์ชัน IS-9 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/9) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05
- อินเวอร์ชัน IL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.08
- อินเวอร์ชัน IIL-3 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/3) โดยพบจำนวน 4 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.10
- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) โดยพบจำนวน 2 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.16
- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05

5. ภูเก็ต

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 9 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 4 ตัว พบ floating inversions 4 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.33
- อินเวอร์ชัน IIL-2 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/2) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05
- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.22
- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05

6. โรงพยาบาลพระ จ.ตาก

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 28 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 13 ตัว และเพศเมียจำนวน 15 ตัว พบ floating inversions 5 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.04
- อินเวอร์ชัน IS-5 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/5) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02
- อินเวอร์ชัน IS-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/6) ในเพศเมีย จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02
- อินเวอร์ชัน IS-7 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/7) ในเพศเมีย จำนวน 5 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.09

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) จำนวน 1 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 19 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.70

การทดสอบภาวะสมดุล Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชัน IIIS-1 ที่เกิดในประชากรจากโรงพยาบาลพบพระ ไม่อยู่ในภาวะสมดุล ($P < 0.001$) เนื่องจากการมีรูปแบบของสภาพโฮโมไซโกตจำนวนมากกว่าค่าที่คาดไว้ในประชากร (ตารางที่ A-1 ในภาคผนวก 2)

7. ห้วยแม่ตำ จ.พะเยา

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 57 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 29 ตัว และเพศเมียจำนวน 28 ตัว พบ floating inversions 8 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) จำนวน 3 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.04

- อินเวอร์ชัน IS-7 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/7) จำนวน 2 ตัว ในเพศเมีย ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) จำนวน 1 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IL-1/1) จำนวน 7 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.008

- อินเวอร์ชัน IIL-3 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/3) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.008

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) จำนวน 6 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) จำนวน 15 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 9 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.29

- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) จำนวน 5 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.04

ตารางที่ 5.6 ความถี่โครโมโซมอินเวอร์ชัน ของแมลงวันตำชนิด *Simulium siamense* ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย

ประชากร	วันที่เก็บ	จำนวน ตัวอ่อน	Frequencies of chromosome inversion																							
			IS-1	IS-4	IS-5	IS-6	IS-7	IS-8	IS-9	IL-1	IL-2	IIS-1	IIL-1	IIL-2	IIL-3	IIL-4	IIL-5	IIL-6	IIL-7	IIIS-1	IIIS-2	IIIL-1	IIIL-2	IIIL-3	IIIL-4	
ภาคเหนือ																										
จ.แม่ฮ่องสอน																										
ห้วยหยวก	4 มิ.ย. 46	107	0	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0.11	0	0	0	0	0.01	0	0.10	0	0	0	
บ้านแม่โถ	30 พ.ย. 46	37	0	0.27	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0.19	0	0	0	0	0.01	0	0.04	0	0	0	
บ้านแม่สะงา	5 มิ.ย. 46	46	0	0.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	
บ้านน้ำกาด 1	2 ธ.ค. 46	17	0.91	0	0	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0	0	0	0.76	0	0	0.74	0	0.11	0	0	0	
บ้านน้ำกาด 2	13 ธ.ค. 47	9	0.78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0.38	0	0	0.55	0	0.17	0	0	0	
แยกวัดจันทร์ 1	2 ธ.ค. 46	6	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.17	0	0	0	
แยกวัดจันทร์ 2	16 เม.ย. 47	19	0.63	0	0	0	0	0	0	0.05	0.08	0	0	0	0	0.10	0	0	0	0	0.16	0	0.05	0	0	
กุโสดน	15 เม.ย.47	9	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0	0	0.22	0	0.05	0	0	0	
จ.ตาก																										
บ้านลานสาง	21 ธ.ค. 46	11	0.82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0	0.36	0	0.04	0	0	0	
รพ.พพระ	22 ก.ค. 48	28	0.04	0	0.02	0.02	0.09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.70	0	0	0	0	0	
จ.สุโขทัย																										
อช.รามคำแหง	21 ธ.ค. 46	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13	0	0.75	0	0	0	0	0	
จ.พะเยา																										
ห้วยแม่ต้า	25 ก.ค. 48	57	0.04	0	0	0	0.02	0	0	0.008	0	0	0	0	0.008	0	0	0.05	0	0.29	0	0.04	0	0	0.008	
จ.น่าน																										
ห้วยแม่สาคร	26 ก.ค. 48	38	0	0.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.21	0	0.03	0	0.17	0	0	0.07	
กม.50 เวียงสา- ร้องกวาง	26 ก.ค. 48	31	0	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0.08	0	0.03	0	0	0	
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ																										
จ.ชัยภูมิ																										
น.เทพทองคำ	7 ก.พ. 45	82	0.01	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
น.เทพประทาน	7 ก.พ. 45	26	0.02	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
น.เทพนา	23 พ.ย. 46	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
น.ผาเอียง	17 พ.ย. 41	21	0.07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0	0	0	0	
จ.ศรีสะเกษ																										
น.ห้วยจันทร์	6 ก.ย. 46	118	0.13	0	0	0	0	0.01	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0.004	0.11	0	0.15	0	0	0	0	0	

ตารางที่ 5.6 (ต่อ)

จ.สกลนคร																										
กม.26-27ทางหลวง 2330	10 มิ.ย. 48	24	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0.17	0	0	0	0	0	
จ.สกลนคร																										
อช.ภูพาน	11 มิ.ย. 48	114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0.13	0	0	0	0	0.004	
อช.เขาใหญ่ จ.นครราชสีมา																										
ผากล้วยไม้ A	20 พ.ย. 47	8	0.69	0	0	0	0	0	0	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.06	0.06	0	0	
ผากล้วยไม้ B	20 พ.ย. 47	17	0.88	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0.82	0	0	0	0	
ผากล้วยไม้ C	25 ก.ค. 47	23	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0.02	0	0	0.26	0.02	0.02	0.02	0	
ภาคกลาง จ.สระแก้ว																										
น.ปางสีดา 1	24 ก.ค. 47	15	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.33	0	0	0	0	0	
น.ปางสีดา 2	21 พ.ย. 47	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.30	0	0	0	0	0	
จ.นครนายก																										
น.วังตะไคร้	26 ก.ค. 47	6	1	0	0	0	0	0	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.83	0	0	0	0	
จ.กาญจนบุรี บ้านห้วยเขย่ง																										
ร่องน้ำห้วยเขย่ง HK(a)	20 ก.พ.48	60	0.02	0	0.03	0.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.98	0	0	0	0	
พุทธรสถาน HK(b)	20 ก.พ. 48	15	0	0	0	0.34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
ฝายทดน้ำ HK(c)	29 ก.พ. 47	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.75	0	0	0	0	
ห้วยองรี HK(d)	28 ก.พ. 47	57	0.03	0	0	0	0.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.96	0	0	0	0	
น.เขาชะเมา	5 มิ.ย. 47	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0.02	0.10	0	0	0	0	0	0	0	0	

ตารางที่ 5.6 (ต่อ)

ประชากร	วันที่เก็บ	จำนวน ตัวอ่อน	IS-1	IS-4	IS-5	IS-6	IS-7	IS-8	IS-9	IL-1	IL-2	IIS-1	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5	III-6	III-7	IIIS-1	IIIS-2	IIIL-1	IIIL-2	IIIL-3	IIIL-4	
ภาคตะวันออก																										
จ.ระยอง																										
จ.จันทบุรี																										
น.เขาสอยดาว 1	20 มิ.ย. 46	40	1	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0.79	0	0	0	0	
น.เขาสอยดาว 2	6 มิ.ย. 46	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0	0	0		
บ้านปัดวี 1	20 มิ.ย. 46	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0.006	0.006	0.05	0	0	0	0	0.06	
บ้านปัดวี 2	6 มิ.ย. 46	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	

- อินเวอร์ชัน IIIL-4 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/4) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.008

การทดสอบสมมติฐาน Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชัน IIIS-1 ที่เกิดในประชากรจากห้วยแม่ตำ ไม่อยู่ในสมมติฐาน Hardy – Weinberg ($P < 0.01$) เนื่องจากการมีรูปแบบของสภาพโฮโมไซโกตจำนวนมากกว่าค่าที่คาดไว้ในประชากร (ตารางที่ A-1 ในภาคผนวก 2) นอกจากนี้อินเวอร์ชัน IIIS-1 ไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

จ.น่าน

8. ห้วยแม่สาคร

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 38 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 24 ตัว และเพศเมียจำนวน 14 ตัว พบ floating inversions 5 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-4 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/4) จำนวน 21 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IS-4/4) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.30

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) จำนวน 16 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IS-4/4) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.21

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.03

- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) จำนวน 13 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.17

- อินเวอร์ชัน IIIL-4 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/4) จำนวน 5 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.07

การทดสอบสมมติฐาน Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชันทุกรูปแบบที่เกิดขึ้นในประชากรห้วยแม่สาครอยู่ภายใต้สมมติฐาน Hardy – Weinberg (ตารางที่ A-1 ในภาคผนวก 2) การทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G-test พบว่าอินเวอร์ชันที่เกิดขึ้นในประชากรห้วยแม่สาครไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

9. กิโลเมตรที่ 50 เวียงสา-ร้องกวาง

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 31 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 10 ตัว และเพศเมียจำนวน 21 ตัว พบ floating inversions 4 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-4 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/4) จำนวน 15 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.24

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) จำนวน 5 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.08

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) จำนวน 1 ตัว และพบอยู่ในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.08

- อินเวอร์ชัน III-L-1 ในสภาพ heterozygous inversion (III-L-st/1) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.03

การทดสอบสมมติฐาน Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชันที่เกิดในประชากรที่เก็บจากกิโลเมตรที่ 50 เวียงสา-ร่องวางอยู่ภายใต้สมมติฐาน Hardy – Weinberg (ตารางที่ A-1 ในภาคผนวก 2) และไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จ.ชัยภูมิ

1. น้ำตกเทพทองคำ

ประชากรที่เก็บจากน้ำตกเทพทองคำ อ. เทพสถิต จ.ชัยภูมิ จำนวน 82 ตัว เพศผู้จำนวน 45 ตัว เพศเมียจำนวน 37 ตัว พบลักษณะของ floating inversions 2 รูปแบบ ซึ่งเป็นอินเวอร์ชันรูปแบบเดียวกันกับอินเวอร์ชันที่ Kuvangkadilok et al. (2003) ได้ศึกษาไว้แล้วในประชากรที่เก็บจากน้ำตกไพรทอง จ.ชัยภูมิ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (IS – st/1) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IL – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (III-L – st/1) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.01

การทดสอบสมมติฐาน Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test ไม่สามารถทำการทดสอบได้เนื่องจากมีค่าความคาดหวังใน heterozygous และ heterozygous classes ต่ำ นอกจากนี้ยังไม่สามารถทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G-test เนื่องจากอินเวอร์ชันที่เกิดในเพศผู้และเพศเมียมีน้อยกว่า 10

2. น้ำตกเทพประทาน

ประชากรที่เก็บจากน้ำตกเทพประทาน อ. เทพสถิต จ.ชัยภูมิ จำนวน 26 ตัว เพศผู้ 13 ตัว เพศเมีย 13 ตัว พบลักษณะของ floating inversions 3 รูปแบบ ซึ่งเป็นอินเวอร์ชันรูปแบบเดียวกันกับอินเวอร์ชันที่ Kuvangkadilok et al. (2003) ได้ศึกษาไว้แล้วในประชากรที่เก็บจากน้ำตกไพรทอง จ.ชัยภูมิ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (IS – st/1) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IL – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL – st/1) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIL – 1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL – st/1) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.02

ไม่สามารถทำการทดสอบสมมติฐาน Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test และไม่สามารถทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G-test ได้เช่นกัน

3. น้ำตกผาเอียง อุทยานแห่งชาติตาดีดโตน

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 21 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 8 ตัว และเพศเมียจำนวน 13 ตัว พบ floating inversions 2 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) พบจำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.07
- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) พบจำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05

4. น้ำตกห้วยจันทร์ จ.ศรีสะเกษ

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 118 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 65 ตัว และเพศเมียจำนวน 53 ตัว พบ floating inversions 6 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 16 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.13
- อินเวอร์ชัน IS-8 ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) พบจำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.01
- อินเวอร์ชัน IL-2 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.01
- อินเวอร์ชัน IIL-5 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/5) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.004
- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) จำนวน 27 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.11
- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) พบจำนวน 1 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 17 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.15

การทดสอบสมมติฐาน Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชันทุกรูปแบบที่เกิดในประชากรน้ำตกห้วยจันทร์อยู่ภายใต้สมมติฐาน Hardy – Weinberg ยกเว้นอินเวอร์ชัน IIIS-1 ไม่อยู่ภายใต้สมมติฐาน Hardy – Weinberg, $P < 0.001$ (ตารางที่ A-1 ในภาคผนวก 2) การทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G- test พบว่าอินเวอร์ชันทุกรูปแบบที่เกิดในประชากรน้ำตกห้วยจันทร์ไม่มีความสัมพันธ์กับเพศของรีนดำ (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

จ.สกลนคร

5. ทางหลวง 2330 กิโลเมตรที่ 26-27

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 24 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 14 ตัว และเพศเมียจำนวน 10 ตัว พบ floating inversions 3 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) พบจำนวน 4 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.08

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) จำนวน 6 ตัว และพบอยู่ในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.17

6. อุทยานแห่งชาติภูพาน

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 114 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 56 ตัว และเพศเมียจำนวน 58 ตัว พบ floating inversions 3 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) พบจำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) พบจำนวน 12 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 9 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.13

- อินเวอร์ชัน IIIL-4 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/4) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.004

การทดสอบภาวะสมดุล Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชัน IIIS-1 ที่เกิดในประชากรที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติภูพาน ไม่อยู่ภายใต้สมดุล Hardy – Weinberg , $P < 0.001$ (ตารางที่ A-1 ในภาคผนวก 2) การทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G- test พบว่าอินเวอร์ชันที่เกิดในประชากรจากอุทยานแห่งชาติภูพานไม่มีความสัมพันธ์กับเพศของร้งดำ (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

7. ผากล้วยไม้ C จ. นครราชสีมา

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 23 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 8 ตัว และเพศเมียจำนวน 15 ตัว พบ floating inversions 7 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 4 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 3 ตัว และเพศเมียจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.17

- อินเวอร์ชัน IIL-2 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/2) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIL-6 พบอยู่ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIIS-2 อยู่ในสภาพ homozygous inversion (IIIS-2/2) จำนวน 6 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.26

- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIIL-2 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/2) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน III-L-3 ในสภาพ heterozygous inversion (III-L-st/3) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

ภาคกลาง

1. น้ำตกปางสีดา จ.สระแก้ว

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 2 ประชากร โดยศึกษาประชากรแรก จำนวน 15 ตัว เพศผู้จำนวน 10 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว และประชากรที่สอง จำนวน 10 ตัว เพศผู้จำนวน 4 ตัว และเพศเมียจำนวน 10 ตัว ซึ่งรายละเอียดของแต่ละประชากรและอินเวอร์ชันมีดังนี้

ในประชากรแรกพบ floating inversions 2 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.03

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 5 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.33

ในประชากรที่สองพบ floating inversions 1 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) พบจำนวน 1 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 4 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.30

2. ฝ่ายตหน้าห้วยเขย่ง จ.กาญจนบุรี

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 4 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 3 ตัว และเพศเมียจำนวน 1 ตัว พบ inversion IIIS-2 (IIIS-2/2) จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.75

ภาคตะวันออก

1. น้ำตกเขาชะเมา จ.ระยอง

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 20 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 10 ตัว และเพศเมียจำนวน 10 ตัว พบ floating inversions 3 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIS-st/1) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIL-4 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/4) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIL-5 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/5) พบจำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.1

2. น้ำตกเขาสอยดาว 2 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว จ.จันทบุรี

ทำการศึกษาทั้งหมด จำนวน 65 ตัว เพศผู้จำนวน 32 ตัว และเพศเมียจำนวน 33 ตัว พบในสภาพ floating inversion IIIS-2 (IIIS-2/2) จำนวน 5 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.08

3. บ้านปัทวิ จ. จันทบุรี

ทำการศึกษาทั้งหมด 2 ประชากร โดยศึกษาประชากรแรก จำนวน 74 ตัว เพศผู้จำนวน 33 ตัว และเพศเมียจำนวน 41 ตัว และประชากรที่สอง จำนวน 36 ตัว เพศผู้จำนวน 23 ตัว และเพศเมียจำนวน 13 ตัว ซึ่งรายละเอียดของแต่ละประชากรและอินเวอร์ชันมีดังนี้

ประชากรแรกพบ floating inversions 5 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IIL-5 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/5) พบจำนวน 7 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.006

- อินเวอร์ชัน IIL-7 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/7) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.006

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05

- อินเวอร์ชัน IIIL-4 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/4) พบจำนวน 9 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.06

ประชากรที่สองพบ floating inversions 1 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IIL-5 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/5) จำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.01

การทดสอบภาวะสมดุล Hardy – Weinberg โดยใช้ χ^2 – test พบว่าอินเวอร์ชันในประชากรบ้านปัทวิอยู่ภายใต้สมดุล Hardy – Weinberg (ตารางที่ A-1 ในภาคผนวก 2)

S. siamense cytoform B ประชากรของ cytoform B อยู่ในสภาพ complete sex- linkage ของ two overlapping inversions IS-2,3 โดยพบ IS-st/st ในเพศผู้ทุกตัว และ IS-st/2,3 ในเพศเมียทุกตัว (ตารางที่ 5.7 และ 3.8) ดังนั้นกลไกการตัดสินใจเพศของ cytoform B เป็น heterogametic female ซึ่งต่างจากริ้นดำชนิดอื่นที่กลไกการตัดสินใจเพศเป็นแบบ heterogametic male พบ cytoform B ในสองประชากรที่เก็บมาจากอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี ได้แก่

1. บ้านกว้างแคมป์

ศึกษาประชากรแรกทั้งหมด 379 ตัว เป็นเพศผู้ที่มีอินเวอร์ชันแบบโฮโมไซกัส IS-st/st จำนวน 83 ตัว และเพศเมียที่มีอินเวอร์ชันแบบเฮเทอโรไซกัส IS-st/2,3 จำนวน 296 ตัว (ตารางที่ 5.8)

ศึกษาประชากรที่สองทั้งหมด 78 ตัว เป็นเพศผู้ที่มีอินเวอร์ชันแบบโฮโมไซกัส IS-st/st จำนวน 32 ตัว และเพศเมียที่มีอินเวอร์ชันแบบเฮเทอโรไซกัส IS-st/2,3 จำนวน 46 ตัว (ตารางที่ 5.9)

2. เขาพะเนินทุ่ง

ประชากรแรก เพศผู้ จำนวน 39 ตัว และเพศเมีย จำนวน 45 ตัวมีอินเวอร์ชันรูปแบบเดียวกับประชากรบ้านกว้างแคมป์ ดังนั้น อินเวอร์ชัน IS-2,3 มีความสัมพันธ์กับริ้นดำเพศเมีย (ตารางที่ 5.9)

ประชากรที่สอง เพศผู้ จำนวน 1 ตัว และเพศเมีย จำนวน 6 ตัวมีอินเวอร์ชันรูปแบบเดียวกับประชากรบ้านกว้างแคมป์ ดังนั้น อินเวอร์ชัน IS-2,3 มีความสัมพันธ์กับริ้นดำเพศเมีย (ตารางที่ 5.9)

S. siamense cytoform C ประชากรกลุ่มนี้อยู่ในสภาพ partial sex- linkage โดยพบประชากรเพศเมียส่วนใหญ่อยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/6 และเพศผู้อยู่ในสภาพโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/st (ตารางที่ 5.7 และ 3.8) นอกจากนี้ยังพบอินเวอร์ชัน IIIS-2 ในรูปของโฮโมไซกัส IIIS-2/2 ในประชากร cytoform C เป็นส่วนใหญ่ cytoform C ประกอบด้วยสองประชากรที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี ดังนี้

ตารางที่ 5.7 ลักษณะโครโมโซมของ 6 cytoforms ของแมลงรืนดำชนิด *Simulium siamense* ในประเทศไทย

Cytoform	Location	Number of larva	IS-1 a	IS-2,3 b	IS-6 b	IS-7 b	IIIS-2 ^a	Autosomal monomorphisms	Autosomal polymorphisms
A	จ.แม่ฮ่องสอน								
	1. ห้วยหยวก	107 (57=♂,50=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-4, IIL-2, IIL-3, IIIS-1, IIIL-1
	2. บ้านแม่โถ	37 (19=♂,18=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-4, IS-5, IIL-2, IIL-3, IIIS-1, IIIL-1
	3. บ้านแม่สะงา	46 (26=♂,20=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-4, IIIL-1
	4. แยกวัดจันทร์ 1	6 (4=♂,2=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IIIL-1
	5. แยกวัดจันทร์ 2	19 (8=♂,11=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IS-9, IL-1, IIL-3, IIIS-1, IIIL-1
	6. ภูโคลน	9 (5=♂,4=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IIL-2, IIIS-1, IIIL-1
	จ.พะเยา								
	7. ห้วยแม่ตำ	57 (29=♂,28=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IL-1, IIL-3, IIL-6, IIIS-1, IIIL-1, IIIL-4
	จ.น่าน								
	8. ห้วยแม่สาคร	38 (24=♂,14=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-4, IIL-6, IIIS-1, IIIL-1, IIIL-4

ตารางที่ 5.7 (ต่อ)

Cytoform	Location	Number of larva	IS-1 a	IS-2,3 b	IS-6 b	IS-7 b	IIIS-2 ^a	Autosomal monomorphisms	Autosomal polymorphisms
A	9. เวียงสา-ร้อง กวาง กม.50 จ.ตาก	31 (10=♂,21=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-4, IIL-6, IIIS-1, IIIL-1
	10. รพ.พพระ จ.ชัยภูมิ	28 (13=♂,15=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IS-5, IS-6, IIIS-1
	11. น้ำตกเทพทอง คำ	82 (45=♂,37=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IL-1
	12. น้ำตกเทพ ประทาน	26 (13=♂,13=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IL-1, IIL-1
	13. น้ำตกผาเอียง	21 (8=♂,13=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IIL-6
	14. น้ำตกเทพนา จ.ศรีสะเกษ	26 (10=♂,16=♀)	-	-	-	-	-	standard (26) ^c	None
	15. น้ำตกห้วย จันทร์	118 (65=♂,53=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IS-8, IL-2, IIL-5, IIL-6, IIIS-1
	จ.สกลนคร	24 (14=♂,10=♀)	-	-	-	-	-	-	IL-1, IIL-6, IIIS-1
	16. ทางหลวง2330 กม.26-27	114 (56=♂,58=♀)	-	-	-	-	-	-	IIL-6, IIIS-1, IIIL-4
	17. อช.ภูพาน								

ตารางที่ 5.7 (ต่อ)

Cytoform	Location	Number of larva	IS-1 ^a	IS-2,3 ^b	IS-6 ^b	IS-7 ^b	IIIS-2 ^a	Autosomal monomorphisms	Autosomal polymorphisms
A	จ.นครราชสีมา 18. น้ำตกผา กล้วยไม้ C	23 (8=♂,15=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IIL-2, IIL-6, IIIL-1, IIIL-2, IIIL-3, IIIS-2
	จ.กาญจนบุรี 19. ฝายทดน้ำห้วย เขียง	4 (1=♂,3=♀)	-	-	-	-	-	-	IIIS-2
	จ.สระแก้ว 20. น้ำตกปางสีดา1	15 (10=♂,5=♀)	-	-	-	-	-	-	IS-1, IIIS-1
	21. น้ำตกปางสีดา 2	10 (4=♂,6=♀)	-	-	-	-	-	-	IIIS-1
	จ.ระยอง 22. น้ำตกเขาชะ เมา	20 (10=♂,10=♀)	-	-	-	-	-	-	IIS-1, IIL-4, IIL-5
	จ.จันทบุรี 23. น้ำตกเขาสอย ดาว 2	65 (32=♂,33=♀)	-	-	-	-	-	-	IIIS-2
	24. บ้านปัทวี 1	74 (33=♂,41=♀)	-	-	-	-	-	-	IIL-5, IIL-6, IIL-7, IIIS-1, IIIL-4
	25. บ้านปัทวี 2	36 (23=♂,13=♀)	-	-	-	-	-	-	IIL-5

ตารางที่ 5.7 (ต่อ)

Cytoform	Location	Number of larva	IS-1 ^a	IS-2,3 ^b	IS-6 ^b	IS-7 ^b	IIIS-2 ^a	Autosomal monomorphisms	Autosomal polymorphisms
B	จ.เพชรบุรี 26. บ้านกร่างแคมป์ 1	379(83=♂,296=♀)	-	♂:IS-st/st (83) ^c ♀:IS-st/2,3 (296)	-	-	-	-	None
	27. บ้านกร่างแคมป์ 2	78 (32=♂,46=♀)	-	♂:IS-st/st (32) ♀:IS-st/2,3 (46)	-	-	-	-	None
	28. เขาพะเนินทุ่ง 1	84 (39=♂,45=♀)	-	♂:IS-st/st (39) ♀:IS-st/2,3 (45)	-	-	-	-	None
	29. เขาพะเนินทุ่ง 2	7 (1=♂,6=♀)	-	♂:IS-st/st (1) ♀:IS-st/2,3 (6)	-	-	-	-	None
C	จ.กาญจนบุรี 30. ร่องน้ำห้วยเขย่ง	60 (29=♂,31=♀)	-	-	♂:IS-st/st (29) ^c ♀:IS-st/st (3) ♀:IS-st/6 (28)	-	IIIS-2 _c (58)	-	IS-1, IS-5
	31. พุทธสถานห้วยเขย่ง	15 (5=♂,10=♀)	-	-	♂:IS-st/st (5) ♀:IS-st/6 (10)	-	IIIS-2 (15)	-	None
D	จ.กาญจนบุรี 32. ห้วยองธิ	57 (17=♂,40=♀)	-	-	-	♂:IS-st/st (16) ^c ♀:IS-st/st (5) ♀:IS-st/7 (35) ♂:IS-st/7 (1)	IIIS-2 _c (54)	-	IS-1

ตารางที่ 5.7 (ต่อ)

Cytoform	Location	Number of larva	IS-1 ^a	IS-2,3 ^b	IS-6 ^b	IS-7 ^b	IIIS-2 ^a	Autosomal monomorphisms	Autosomal polymorphisms
E	จ.แม่ฮ่องสอน								
	33. บ้านน้ำกาด 1	17 (10=♂,7=♀)	<u>IS-1</u> (15) ^c	-	-	-	-	-	III-3, IIL-5, IIIS-1, IIIL-1
	34. บ้านน้ำกาด 2	9 (6=♂,3=♀)	<u>IS-1</u> (6)	-	-	-	-	-	IL-1, IIL-5, IIIS-1, IIIL-1
	จ.สุโขทัย								
	35. อช.รามคำแหง	4 (2=♂,2=♀)	<u>IS-1</u> (4)	-	-	-	-	-	III-6, IIIS-1
	จ.ตาก								
	36.บ้านลานสาง	11 (4=♂,7=♀)	<u>IS-1</u> (4)	-	-	-	-	-	IS-1, IIL-6, IIIS-1, IIIL-1
F	จ.นครนายก								
	37. น้ำตกวังตะไคร้	6 (4=♂,2=♀)	<u>IS-1</u> (4) ^c	-	-	-	<u>IIIS-2</u> (4) ^c	-	IL-1
	จ.จันทบุรี								
	38. น้ำตกเขาสอยดาว	40 (20=♂,20=♀)	<u>IS-1</u> (40)	-	-	-	<u>IIIS-2</u> (31)	-	IL-1, IIL-2, IIL-3
	1								
	จ.นครราชสีมา								
	39. น้ำตกผากล้วยไม้	8 (5=♂,3=♀)	<u>IS-1</u> (5)	-	-	-	<u>IIIS-2</u> (4)	-	IL-1, IIIL-1, IIIL-2
	A								
	40. น้ำตกผากล้วยไม้	17 (11=♂,6=♀)	<u>IS-1</u> (15)	-	-	-	<u>IIIS-2</u> (14)	-	IL-1, IIL-6
	B								

Note: ^a underlined inversion= fixed inversion , ^b sex-linked inversion, ^c number of examined larvae in bracket

ตารางที่ 5.8 จำนวนของอินเวอร์ชันบนโครโมโซมแท่งที่ 1 ในเพศผู้และเพศเมียของ *Simulium siamense* cytoform B, C, D, E และ F ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติจากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย

Population	Sex	IS-1			IS-2			IS-3			IS-6			IS-7			Cytoform
		IS-st/st	IS-st/1	IS-1/1	IS-st/st	IS-st/2	IS-2/2	IS-st/st	IS-st/3	IS-3/3	IS-st/st	IS-st/6	IS-6/6	IS-st/st	IS-st/7	IS-7/7	
บ. กร่างแคมป์ 1 จ.เพชรบุรี	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	83 0	0 296	0 0	0 0	0 296	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
บ. กร่างแคมป์ 2 จ.เพชรบุรี	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	32 0	0 46	0 0	0 0	0 46	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
เขาพะเนินทุ่ง 1 จ.เพชรบุรี	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	39 0	0 45	0 0	0 0	0 45	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
เขาพะเนินทุ่ง 2 จ.เพชรบุรี	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	1 6	0 0	0 0	0 0	0 6	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
ร่องน้ำห้วยเขย่ง จ.กาญจนบุรี	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	29 3	0 28	0 0	0 0	0 0	0 0	C
พุทธสถาน ห้วยเขย่ง จ.กาญจนบุรี	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	5 0	0 10	0 0	0 0	0 0	0 0	C
ห้วยองธิ จ.กาญจนบุรี	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	17 36	0 0	0 0	16 9	1 35	0 0	D
บ. น้ำกืด 1 จ.แม่ฮ่องสอน	♂ ♀	0 1	1 0	9 6	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	E
บ. น้ำกืด 2 จ.แม่ฮ่องสอน	♂ ♀	0 1	2 0	4 2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	E
อช.รามคำแหง จ.สุโขทัย	♂ ♀	0 0	0 0	2 2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	E
บ.ลานสาง จ.ตาก	♂ ♀	0 0	3 1	1 6	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	E
น.วังตะไคร้ จ.นครนายก	♂ ♀	0 0	0 0	4 2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	F*
น.เขาสอยดาว 1 จ.จันทบุรี	♂ ♀	0 0	0 0	20 20	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	F*
น.ผากล้วยไม้ A จ.นครราชสีมา	♂ ♀	1 1	1 0	3 2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	F*
น.ผากล้วยไม้ B จ.นครราชสีมา	♂ ♀	1 1	0 0	10 5	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	F*

หมายเหตุ * cytoform F ยังมี fixed inversion IIIS-2 ร่วมด้วย

1. ร่องน้ำห้วยเขย่ง

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 60 ตัว (เพศผู้ 29 ตัว และเพศเมีย 31 ตัว) พบเฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/6 ในเพศเมียจำนวน 28 ตัว (90.3%) และพบโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/st ในตัวผู้ทุกตัว (100%) และในตัวเมีย จำนวน 3 ตัว (9.7%) (ตารางที่ 5.8) ประชากรกลุ่มนี้ยังมี fixed inversion IIIS-2 ที่อยู่ในรูปแบบโฮโมไซกัส IIIS-2/2 จำนวน 58 ตัว (96.7%) (เป็นเพศผู้ 28 ตัว และเพศเมีย 30 ตัว) จากจำนวนทั้งหมด 60 ตัว และพบตัวอ่อน 2 ตัวที่อยู่ในสภาพเฮเทโรไซกัส IIIS-st/2 (3.3%) ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IIIS-2 ในประชากรกลุ่มนี้มีค่าเท่ากับ 0.98 นอกจากนี้ยังพบ floating inversions 2 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-1 อยู่ในสภาพ IS-st/1 พบในรีนด้า จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IS-1 ในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 0.02
- อินเวอร์ชัน IS-5 พบในสภาพ IS-st/5 ในรีนด้า จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IS-5 ในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 0.03

การทดสอบภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg ไม่สามารถทำได้เนื่องจากค่า expected values ของ heterozygous และ homozygous classes มีค่าต่ำ

การทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชัน IS-6 กับเพศโดยวิธี G-test พบว่าอินเวอร์ชัน IS-6 ที่เกิดในประชากรร่อนน้ำห้วยเขย่งมีความสัมพันธ์กับเพศ ($P < 0.001$) (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

2. พุทธสถานห้วยเขย่ง

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 15 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) พบอินเวอร์ชัน IS-st/st ในเพศผู้ทั้งหมด และเพศเมียทุกตัวมีอินเวอร์ชันแบบ IS-st/6 (ตารางที่ 5.8) นอกจากนี้ตัวอ่อนทุกตัวมี fixed inversion IIIS-2 (IIIS-2/2) ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IIIS-2 ในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 1 และไม่พบ floating inversion ไคบนโครโมโซม

S. siamense cytoform D ประชากรกลุ่มนี้อยู่ในสภาพ partial sex-linkage เพศผู้ส่วนใหญ่มีอินเวอร์ชันแบบโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/st และเพศเมียส่วนมากอยู่ในสภาพของเฮเทอโรไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/7 ดังนั้น IS-7 มีความสัมพันธ์กับเพศเมียแต่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากยังพบเพศผู้บางตัวมีอินเวอร์ชันแบบ IS-st/7 และเพศเมียมีอินเวอร์ชันแบบ IS-st/st นอกจากนี้ประชากรกลุ่มนี้มี fixed inversion IIIS-2 ที่อยู่ในสภาพของโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IIIS-2/2 (ตารางที่ 5.7 และ 5.8) พบประชากรกลุ่มนี้ที่ห้วยองธิ จังหวัดกาญจนบุรี จากจำนวนตัวอ่อนที่ศึกษาทั้งหมด 57 ตัว (เพศผู้ 17 ตัว และเพศเมีย 40 ตัว) พบอินเวอร์ชันแบบ IS-st/7 ในเพศเมีย 31 ตัว (77.5%) และเพศผู้ 1 ตัว (5.9%) และพบอินเวอร์ชันแบบ IS-st/st ในเพศผู้ 16 ตัว (94.1%) และเพศเมีย 9 ตัว (22.5%) นอกจากนี้ตัวอ่อนจำนวน 54 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว และเพศเมีย 39 ตัว) (94.7%) มีอินเวอร์ชันแบบ IIIS-2/2 ซึ่งมีค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIIS-2 ในประชากรเท่ากับ 0.96 ดังนั้นอินเวอร์ชัน IIIS-2 เกือบเป็น fixed inversion และยังพบ floating inversion 2 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-1 ในสภาพ heterozygous inversions (IS-st/1) พบในรีนด้า จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IS-1 ที่พบในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 0.03

ความถี่ของอินเวอร์ชันในประชากรกลุ่มนี้ไม่สามารถทำการทดสอบสมมติฐาน Hardy-Weinberg โดยใช้ χ^2 - test ได้เนื่องจากค่า expected values ของ heterozygous และ homozygous classes มีค่าค่อนข้างต่ำ การทดสอบความสัมพันธ์ของอินเวอร์ชันกับเพศโดยใช้วิธี G-test พบว่าอินเวอร์ชัน IS-7 ที่เกิดในประชากรห้วยองธิมีความสัมพันธ์กับรีนด้าเพศเมีย (ตารางที่ A-2 ในภาคผนวก 2)

S. siamense cytoform E ประชากรกลุ่มนี้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดอินเวอร์ชัน IS-1 ซึ่งอยู่ในรูปของโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IS-1/1 ค่อนข้างสูง (ตารางที่ 5.7 และ 5.8) ดังนั้นอินเวอร์ชัน IS-1 เกือบเป็น fixed inversion ในประชากรกลุ่มนี้ พบประชากร cytoform E ในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบริเวณภาคเหนือของประเทศ ดังนี้

ภาคเหนือ

1. บ้านน้ำกาด จ.แม่ฮ่องสอน

ทำการศึกษาทั้งหมด 2 ประชากร โดยศึกษาประชากรแรก จำนวน 17 ตัว เพศผู้จำนวน 10 ตัว และเพศเมียจำนวน 7 ตัว และประชากรที่สอง จำนวน 9 ตัว เพศผู้จำนวน 6 ตัว และเพศเมียจำนวน 3 ตัว ซึ่งรายละเอียดของแต่ละประชากรและอินเวอร์ชันมีดังนี้

ในประชากรแรกพบ inversion IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 15 ตัว (88.2%) และในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) 1 ตัว (5.9%) ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IS-1 ในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.91 และพบ floating inversions 4 รูปแบบดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) โดยพบจำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.09

- อินเวอร์ชัน IIL-5 ในสภาพ homozygous inversion (IIL-5/5) จำนวน 13 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.76

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/1) จำนวน 1 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 12 ตัว ความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.74

- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) จำนวน 4 ตัว ความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.11

ประชากรที่สองพบ inversion IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 6 ตัว (66.7%) และพบอยู่ในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) จำนวน 2 ตัว (22.2%) ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.78 และพบ floating inversions 4 รูปแบบดังนี้

- อินเวอร์ชัน IIL-3 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/3) โดยพบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.05

- อินเวอร์ชัน IIL-5 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/5) โดยพบจำนวน 1 ตัว และในสภาพ homozygous inversion (IIL-5/5) จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.38

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 5 ตัว ความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.55

- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) จำนวน 3 ตัว ความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.17

2. อุทยานแห่งชาติรามคำแหง จ.สุโขทัย

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 4 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 2 ตัว และเพศเมียจำนวน 2 ตัว พบ fixed inversion IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) ในประชากรทุกตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 1 นอกจากนี้ยังพบ floating inversions 2 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) พบจำนวน 1 ตัว ความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.13

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.75

3. บ้านลานสาง จ.ตาก

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 11 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 4 ตัว และเพศเมียจำนวน 7 ตัว พบ fixed inversions IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 7 ตัว (63.6%) และพบในสภาพ

heterozygous inversion (IS-st/1) จำนวน 4 ตัว (36.4%) ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.82 นอกจากนี้ยังพบ floating inversions 3 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.04

- อินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IIIS-1/1) จำนวน 4 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.36

- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.04

S. siamense cytoform F ประชากรกลุ่มนี้มี อินเวอร์ชัน IS-1 (IS-1/1) และ IIIS-2 (IIIS-2/2) (ตารางที่ 5.7) เป็นเปอร์เซ็นต์สูงใน 4 ประชากรจากภาคกลาง, ภาคตะวันออก, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนี้

ภาคกลาง

1. น้ำตกวังตะไคร้ จ.นครนายก

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 6 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 4 ตัว และเพศเมียจำนวน 2 ตัว อยู่ในสภาพ inversion IS-1 (IS-1/1) โดยพบอินเวอร์ชันนี้ทุกตัวในประชากร ค่าความถี่อินเวอร์ชัน IS-1 ที่พบในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 1 และพบอยู่ในสภาพ inversion IIIS-2 (IIIS-2/2) จำนวน 4 ตัว (66.7%) ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.83 และพบอยู่ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/2) จำนวน 1 ตัว (16.7%) นอกจากนี้พบ floating inversions 1 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) จำนวน 3 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.17

ภาคตะวันออก

1. น้ำตกเขาสอยดาว 1 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว จ.จันทบุรี

ทำการศึกษาทั้งหมด จำนวน 40 ตัว เพศผู้จำนวน 20 ตัว และเพศเมียจำนวน 20 ตัว พบ inversion IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) ในเพศผู้และเพศเมียทุกตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 1 และพบ อินเวอร์ชัน IIIS-2 (IIIS-2/2) จำนวน 31 ตัว (77.5%) (ตารางที่ 5.8) และพบอยู่ในสภาพ heterozygous inversion (IIIS-st/2) จำนวน 1 ตัว (2.5%) ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.79 และนอกจากนี้พบ floating inversions อินเวอร์ชัน 3 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) พบจำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIL-2 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/2) พบจำนวน 2 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIL-3 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/3) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.01

ไม่สามารถทำการทดสอบความสมดุลของความถี่อินเวอร์ชันได้เช่นกัน เนื่องจากค่าความคาดหวังใน heterozygous และ homozygous classes ค่อนข้างต่ำ

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ. นครราชสีมา

1. น้ำตกผากล้วยไม้ A

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 8 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 3 ตัว พบ inversion IS-1 อยู่ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 5 ตัว (62.5%) และพบในสภาพ heterozygous inversion (IS-st/1) จำนวน 1 ตัว (12.5%) ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.69 และพบ inversion IIIS-2 (IIIS-2/2) จำนวน 4 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.5 และยังพบ floating inversions 3 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.06

- อินเวอร์ชัน IIIL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/1) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.06

- อินเวอร์ชัน IIIL-2 ในสภาพ heterozygous inversion (IIIL-st/2) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.06

2. น้ำตกผากล้วยไม้ B

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 17 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 11 ตัว และเพศเมียจำนวน 6 ตัว พบ inversion IS-1 ในสภาพ homozygous inversion (IS-1/1) จำนวน 15 ตัว (88.2%) ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.88 และพบในสภาพ inversion IIIS-2 (IIIS-2/2) จำนวน 14 ตัว (82.4%) ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.82 และยังพบ floating inversions 2 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-1 ในสภาพ heterozygous inversion (IL-st/1) พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.03

- อินเวอร์ชัน IIL-6 ในสภาพ heterozygous inversion (IIL-st/6) จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่อินเวอร์ชันที่พบในประชากรมีค่าเท่ากับ 0.03

5.7.3 สรุปผล

จากการเปรียบเทียบการเรียงตัวของแบนด์โพลีทินโครโมโซมของ *S.siamense* สามารถแบ่ง *S. siamense* ได้เป็น 6 cytoforms ดังต่อไปนี้

S. siamense cytoform A ประชากรกลุ่มนี้มีเพียงหนึ่งประชากรที่เป็น monomorphic ประชากรส่วนใหญ่มี floating inversions ที่มีความถี่ค่อนข้างต่ำ โดยเป็นอินเวอร์ชันที่ไม่มีความสัมพันธ์กับเพศและไม่เป็น fixed inversion ได้แก่อินเวอร์ชัน IS-1, IS-4, IS-5, IS-8, IS-9, IL-1, IL-2, IIS-1, IIL-1, IIL-2, IIL-3, IIL-4, IIL-5, IIL-6, IIL-7, IIIS-1, IIIS-2, IIIL-1, IIIL-2, IIIL-3 และ IIIL-4 ส่วนอินเวอร์ชัน IS-1 และ IIIS-2 เป็นทั้ง floating และ fixed inversions และประชากร cytoform G มีจำนวนมากและแพร่

กระจายอย่างกว้างขวาง ส่วนมากพบในบริเวณภาคเหนือ นอกจากนี้ยังพบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคกลาง

S. siamense cytoform B อยู่ในสภาพ complete sex- linkage ของอินเวอร์ชัน IS-2,3 โดยพบ IS-st/st ในเพศผู้ทุกตัว และ เฮเทอโรไซกัส แบบ two overlapping inversions IS-st/2,3 ในเพศเมียทุกตัว กลไกการตัดสินใจเพศของ cytoform B เป็นแบบ heterogametic female พบ cytoform B ในสองประชากรที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จ.เพชรบุรี

S. siamense cytoform C อยู่ในสภาพ partial sex- linkage โดยพบประชากรเพศเมียส่วนใหญ่ อยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/6 และเพศผู้ที่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/st นอกจากนี้ยังพบ inversion IIIS-2 ในรูปของโฮโมไซกัส IIIS-2/2 ในประชากร cytoform C ส่วนใหญ่ พบ cytoform C ในสองประชากรจากจังหวัดกาญจนบุรี

S. siamense cytoform D อยู่ในสภาพ partial sex-linkage พบในสองประชากรที่เก็บจาก จังหวัดกาญจนบุรี เพศผู้ส่วนใหญ่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/st และเพศเมียส่วนใหญ่อยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัสอินเวอร์ชัน IS-st/7 ดังนั้น IS-7 มีความสัมพันธ์กับเพศเมียแต่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากยังพบเพศผู้บางตัวมีอินเวอร์ชันแบบ IS-st/7 และเพศเมียบางตัวมีอินเวอร์ชันแบบ IS-st/st นอกจากนี้ประชากรกลุ่มนี้มี inversion IIIS-2 ที่อยู่ในสภาพของโฮโมไซกัสอินเวอร์ชัน IIIS-2/2 ซึ่งมีความถี่อินเวอร์ชันค่อนข้างสูง (0.96) ดังนั้น อินเวอร์ชัน IIIS-2 เกือบเป็น fixed inversion ในประชากรกลุ่มนี้ และยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ อินเวอร์ชัน IS-1 ซึ่งมีความถี่อินเวอร์ชันค่อนข้างต่ำ พบ cytoform D ในหนึ่งประชากรที่เก็บมาจากจังหวัดกาญจนบุรี

S. siamense cytoform E อยู่ในสภาพเกือบเป็น fixed inversions IS-1(IS-1/1) เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเกิดอินเวอร์ชัน IS-1 ค่อนข้างสูง พบ cytoform E ในสี่ประชากรที่เก็บมาจากภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน ตาก และสุโขทัย

S. siamense cytoform F ประชากรมี inversions สองแบบ คืออินเวอร์ชัน IS-1(IS-1/1) และ IIIS-2 (IIIS-2/2) เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างสูงพบในประชากรจากภาคกลาง (จังหวัดนครนายก) ภาคตะวันออก (จังหวัดจันทบุรี) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมา)

จากการทดสอบความถี่ของอินเวอร์ชันในประชากรว่าจะอยู่ในสภาวะสมดุลภายใต้กฎ Hardy – Weinberg หรือไม่โดยใช้วิธีทดสอบ χ^2 – test พบว่าบางอินเวอร์ชันไม่อยู่ในสภาวะสมดุลภายใต้กฎ Hardy – Weinberg ได้แก่ อินเวอร์ชัน IS-4 ในประชากรบ้านห้วยหยวก จังหวัดแม่ฮ่องสอน เนื่องจากมีประชากรที่อยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส (IS-st/4) มากกว่าที่คาดไว้ในขณะที่ประชากรที่อยู่ในสภาพโฮโมไซโกต (IS-4/4) มีค่าน้อยกว่าที่คาดไว้ ($P < 0.001$) ในทางตรงข้ามพบอินเวอร์ชัน IIIS-1 ในสภาพเฮเทอโรไซกัส (IIIS-st/1) น้อยกว่าค่าที่คาดไว้ในประชากรจากห้วยแม่ดำ จังหวัดพะเยา ($P < 0.01$), โรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก ($P < 0.01$), น้ำตกห้วยจันทร์ จังหวัดศรีสะเกษ ($P < 0.001$) และอุทยานแห่งชาติภูพาน จังหวัด สกลนคร ($P < 0.001$) ประชากรเหล่านี้ส่วนใหญ่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส IIIS-st/st และ IIIS-1/1 มากกว่าที่คาดไว้ ดังนั้นเป็นไปได้ว่าภายในประชากรเหล่านี้มีการแบ่งแยกกลุ่มประชากรออกเป็นสองกลุ่มย่อยที่มียีนพูลต่างกัน เนื่องจากประชากรสองกลุ่มย่อยไม่ชอบผสมพันธุ์กัน

อาจเนื่องจากมีกลไกการแบ่งแยกเชิงการสืบพันธุ์บางประการเกิดขึ้นภายในประชากรจึงอาจเป็นสาเหตุให้ประชากรสองกลุ่มย่อยมีโอกาสแยกออกจากกันถึงขั้นเป็นคนละสปีชีส์ได้ในอนาคต

5.7.4 การศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนรีนดำนิด *Simulium tani*

การแยกชนิดประชากรแมลงรีนดำนิด *Simulium tani* โดยการศึกษาเปรียบเทียบแบนด์โพลีทีนโครโมโซม

Simulium tani มีจำนวนโครโมโซม 3 คู่ ($2n=6$) และมีการเรียงลำดับของโครโมโซมแท่งที่ 1 ไปถึงแท่งที่ 3 เช่นเดียวกับ *Simulium siamense* แต่แบบแผนการเรียงตัวของโพลีทีนโครโมโซมต่างจากการศึกษาประชากรของ *S. tani* จำนวน 41 ประชากร จากภาคเหนือ ภาคกลาง และ ภาคใต้ (ตารางที่ 5.9) พบอินเวอร์ชันหลายรูปแบบ ซึ่งมีความถี่ของอินเวอร์ชันต่างกัน (ตารางที่ 5.10) และสามารถแบ่งประชากรของ *S. tani* ออกเป็น 8 cytoforms โดยพิจารณาจากการเกิดอินเวอร์ชันบนแท่งที่สามได้แก่ IIII-5 IIII-6 และ IIII-19 (ตารางที่ 5.11) ซึ่ง cytoforms เหล่านี้ กระจายอยู่ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศ (ภาพที่ 5.26)

S. tani cytoform A อยู่ในสภาพ fixed inversion IIII-5,6 (IIII-5,6/5,6) ซึ่งมีจุดแยกบริเวณตำแหน่ง 94-98 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่สาม นอกจากนี้ยังพบ floating inversion จำนวน 2 รูปแบบในประชากรได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS-3 (IL-st/3) มีจุดแยกตำแหน่ง 11-12A บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 (ภาพที่ 5.25b) มีความถี่ 0.01 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IL-2 (IL-st/2, IL-2/2) มีจุดแยกตำแหน่ง 26-32 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 มีความถี่ตั้งแต่ 0.99-1.0 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IIII-18 (IIII-st/18, IIII-18/18) มีจุดแยกตำแหน่ง 89C-88B บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 (ภาพที่ 5.27c) มีความถี่ 0.61 ในประชากร

S. tani cytoform A มีการกระจายในเขตภาคเหนือ ได้แก่ ประชากรจาก สวนอุคค จ. แม่ฮ่องสอน น้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงใหม่ และ บ้านลานสาง จ. ตาก ซึ่งรายละเอียดของแต่ละประชากรมีดังนี้

1. สวนอุคค จ. แม่ฮ่องสอน

ทำการศึกษานับ 75 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 36 ตัว และเพศเมียจำนวน 39 ตัว ผลการศึกษาพบ fixed inversion IIII-5,6 (IIII-5,6/5,6) ทุกตัวในประชากร (100%) นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 2 รูปแบบดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-3 พบในสภาพ IS-st/3 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชันในประชากรเท่ากับ 0.01
- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากรโดยมีความถี่เท่ากับ 1.0
- อินเวอร์ชัน IIII-18 พบในสภาพ IIII-st/18 และ IIII-18/18 พบจำนวน 57 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIII-18 ในประชากรเท่ากับ 0.61

ผลการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IIII-18 ไม่อยู่ในสภาวะสมดุล ($P<0.005$) เนื่องจากมีรูปแบบของเฮเทอโรไซกัสจำนวนน้อย (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) ส่วนอินเวอร์ชัน IS-3 มีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบได้

ตารางที่ 5.9 แหล่งเก็บตัวอย่างแมลงวันดำชนิด *Simulium tani* ในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยเพื่อศึกษาโพลีทินโครโมโซม

แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
ภาคเหนือ					
จ.เชียงราย					
1. น้ำตกขุนกรณ์	1	8 ธ.ค. 41	18 (♂=11, ♀= 7)	-	420
จ.แม่ฮ่องสอน					
2. ปางมะผ้า 1	2	2 ธ.ค. 46	23 (♂=13, ♀= 10)	N 79° 06' E 98° 46'	-
3. ปางมะผ้า 2	3	13 ธ.ค.47	48 (♂=29, ♀= 19)	N 19° 28' E 98° 17'	750
4. บ้านปางแปก	4	16 เม.ย.47	9 (♂=6, ♀= 3)	N 19° 26' E 98° 21'	840
5. น้ำตกแม่สุรินทร์	5	12 ธ.ค.47	35 (♂=20, ♀= 15)	N 18° 55' E 98° 04'	1200
6. บ้านนาจั่ว	6	5 มิ.ย.46	7 (♂=5, ♀= 2)	N 18° 49' E 98° 02'	814
7. สวนอุคค	7	14 เม.ย.47	75 (♂=36, ♀= 39)	N 18° 49' E 98° 02'	1000
จ.เชียงใหม่					
8. น้ำตกวังบัวบาน	8	15 ธ.ค.47	84 (♂=44, ♀= 40)	N 18° 48' E 98° 56'	
9. ด่านตรวจแม่เฒ่า	9			N 19° 05' E 99° 24'	500
Collection 1		11 พ.ย.46	24 (♂=13, ♀= 11)	N 19° 02' E 99° 20'	600
Collection 2		10 ธ.ค.47	29 (♂=18, ♀= 11)		600
10. บ้านห้วยหม้อ	10				
Collection 1		3 มิ.ย.46	19 (♂=11, ♀= 8)		800
Collection 2		11 พ.ย.46	13 (♂=3, ♀= 10)		800

ตารางที่ 5.9 (ต่อ)

แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
Collection 3	11	10 ธ.ค.47	7 (♂=5, ♀= 2)	N 19° 06' E 98° 27'	800
11. บ้านปางน้ำถุ					
Collection 1		10พ.ค.46	24 (♂=11, ♀= 13)		870
Collection 2	12	11พ.ย.46	35 (♂=18, ♀= 17)	N 19° 06' E 98° 46'	850
12. น้ำตกหมอกฟ้า					
Collection 1		13 พ.ย.46	17 (♂=8, ♀= 9)		550
Collection 2	13	10เม.ย.47	34 (♂=20, ♀= 14)	N 18° 31' E 98° 27'	550
Collection 3		10ธ.ค.47	38 (♂=18, ♀= 20)		550
13. น้ำตกห้วยทรายเหลือง จ. เชียงใหม่		11พ.ค.46	25 (♂=12, ♀= 13)		950
จ. ลำปาง	14			-	
14. น้ำตกแจ้ซ้อน		11เม.ย.47	17 (♂=11, ♀= 6)		420
จ. ตาก					
15. บ้านลานสาง	15	21ธ.ค.46	16 (♂=5, ♀= 11)	N 16° 46' E 99° 00'	250
จ. อุตรดิตถ์	16			N 17° 42' E 100° 57'	
16. น้ำตกภูสอยดาว					
Collection 1		1 ต.ค. 41	17 (♂=8, ♀= 9)		620
Collection 2	17	16 ต.ค. 46	28 (♂=16, ♀= 12)	N 14° 30' E 104° 29'	650
17. ทางขึ้นภูสอยดาว		18 ต.ค. 46	80 (♂=37, ♀= 43)		650

ตารางที่ 5.9 (ต่อ)

แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
จ.พิษณุโลก					
18. ห้วยขมิ้นน้อย	18	26 ก.ค.48	17 (♂=9, ♀= 8)	N 16° 59' E 101° 00'	1226
จ.เพชรบูรณ์					
19. น้ำตกตาดหมอก	19	30 ก.ย. 41	18 (♂=13, ♀= 5)	-	500
20. ตาดหมอก 1	20	25 ต.ค. 46	14 (♂=7, ♀= 7)	N 16° 21' E 100° 21'	475
21. ตาดหมอก 2	21	25 ต.ค. 46	23 (♂=15, ♀= 8)	N 16° 21' E 101° 21'	468
ภาคกลาง					
จ. กาญจนบุรี					
22. บ้านพัสดุกกลาง	22	29 ก.พ. 47	72 (♂=38, ♀= 34)	N 14° 33' E 98° 34'	304
23. ถ้ำธารลอด	23	12 ส.ค.46	101 (♂=54, ♀= 47)	N 14° 39' E 99° 18'	282
จ. นครราชสีมา					
24. อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ กิโลเมตรที่ 31	24	25 ก.ค. 47	38 (♂=22, ♀= 16)	N 14° 21' E 101° 21'	700
จ. เพชรบุรี					
25. น้ำตกทอทิพย์	25	16 ส.ค.46	41 (♂=21, ♀= 20)	N 12° 50' E 99° 19'	320
26. เขาพะเนินทุ่ง	26	16 ส.ค.46	11 (♂=4, ♀= 7)	N 12° 48' E 99° 26'	347
ภาคตะวันออก					
จ.ระยอง					
27. น้ำตกเขาชะเมา	27	19 มิ.ย.46	21 (♂=13, ♀= 8)	N 12° 54' E 101° 43'	65

ตารางที่ 5.9 (ต่อ)

แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
จ. จันทบุรี					
28. น้ำตกเขาสอยดาว	28	20 มิ.ย.46	62 (♂=33, ♀= 29)	N 13° 06' E 102° 11'	320
29. น้ำตกคลองนารายณ์	29			N 12° 34' E 102° 10'	
Collection 1		19 มิ.ย.46	34 (♂=20, ♀= 14)		100
Collection 2		05 มิ.ย.47	20 (♂=6, ♀= 14)		100
จ. ระนอง	30			N 10° 22' E 98° 51'	
30. น้ำตกบกกกราย					
Collection 1		15 ก.ค. 46	13 (♂=5, ♀= 8)		70
Collection 2	31	04 ก.ค.42	166 (♂=73, ♀= 93)		65
31. ห้วยรัง	32	14 ก.ค.46	78 (♂=42 , ♀=36)	N 10° 02' E 98° 39'	80
32. เขาพระนารายณ์	33	14 ก.ค.46	30 (♂=17, ♀= 13)		120
33. น้ำตกปฎูญบาล		14 ก.ค.46	7 (♂=4, ♀= 3)		50
จ. สุราษฎร์ธานี	34			N 08° 45' E 99° 26'	
34. น้ำตกเหมืองทวด					
Collection 1		03 พ.ย.43	88 (♂=41, ♀= 47)		100
Collection 2	35	13 ก.ค.46	155 (♂=76, ♀= 79)	N 08° 51' E 99° 28'	120
35. น้ำตกตาดฟ้า					
Collection 1		14 ก.ค.46	122 (♂=68, ♀= 54)		260
Collection 2		04 พ.ย.42	44 (♂=27, ♀= 17)		200

ตารางที่ 5.9 (ต่อ)

แหล่งที่เก็บ	รหัส	วันที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)
จ. นครศรีธรรมราช					
36. น้ำตกสฤษัณฑ์	36	20เม.ย. 42	42 (♂=26, ♀= 16)	-	50
จ. กระบี่					
37. น้ำตกห้วยไต้	37	02 ก.ค.42	8 (♂=6, ♀= 2)	-	90
จ. ตรัง					
38. น้ำตกปากแจ่ม	38	6 มี.ค. 48	62 (♂=26, ♀=36)	-	-
จ. พัทลุง					
39. น้ำตกไพรวัลย์	39	2 มิ.ย. 42	31 (♂=18, ♀=13)	-	50
40. น้ำตกตะโหนด	40	2 มิ.ย. 42	29 (♂=14 , ♀=15)	-	50
จ. สงขลา					
41. น้ำตกโตนงาช้าง	41	1 มิ.ย. 42	8 (♂=5, ♀= 3)	-	70

2. น้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงใหม่

ศึกษาจำนวน 3 ประชากร โดยประชากรแรกศึกษาจำนวน 17 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 8 ตัว และเพศเมียจำนวน 9 ตัว ประชากรที่ 2 ศึกษาจำนวน 34 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 20 ตัว และเพศเมียจำนวน 14 ตัว และประชากรที่ 3 ศึกษาจำนวน 38 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 18 ตัว และเพศเมียจำนวน 20 ตัว ผลการศึกษาพบว่าทั้งสามประชากรเกิด fixed inversion III-L-5,6 (III-L-5,6/5,6) ทุกตัวในประชากร (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion IL-2 ในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 โดยพบในสภาพ IL-2/2 ทุกตัวในประชากรแรกและประชากรที่สอง โดยมีความถี่เท่ากับ 1.0 ส่วนประชากรที่ 3 พบในสภาพ IL-st/2 จำนวน 1 ตัว และ IL-2/2 จำนวน 37 ตัว มีความถี่ในประชากรเท่ากับ 0.99

3. บ้านลานสาง จ. ตาก

ทำการศึกษาจำนวน 16 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 11 ตัว ผลการศึกษาพบ fixed inversion III-L-5,6 (III-L-5,6/5,6) ทุกตัวในประชากร (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion IL-2 เช่นเดียวกับ สวนอุคค จ. แม่ฮ่องสอน และ น้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงใหม่ โดยพบในสภาพ IL-2/2 ทุกตัวในประชากรโดยมีความถี่ในประชากรเท่ากับ 1.0

S. tani cytoform B ไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion จำนวน 6 รูปแบบได้แก่ อินเวอร์ชัน IS-5, IS-6, IL-2, IIP-1, IIL-4 และ III-L-9 ซึ่งรายละเอียดของอินเวอร์ชันมีดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-5 (IS-st/5) มีจุดหักบริเวณ 4A-5C บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 (ภาพที่ 5.25c) มีความถี่ตั้งแต่ 0.02-0.21 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IS-6 (IS-st/6) มีจุดแยกตำแหน่ง 11C-14B บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 (ภาพที่ 5.25d) มีความถี่เท่ากับ 0.01 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IS-7 (IS-st/7, IS-7/7) มีจุดแยกตำแหน่ง 12C-14B บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 มีความถี่เท่ากับ 0.17 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IL-2 (IL-st/2, IL-2/2) มีจุดแยกตำแหน่ง 26-32 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 มีความถี่ตั้งแต่ 0.08-1.0 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IIP-1 (IIP-st/1) มีจุดแยกตำแหน่ง 52B-58C บริเวณที่หักเป็นบริเวณที่คร่อมเซนโทรเมียร์ (pericentric inversion) (ภาพที่ 5.26c) มีความถี่ในประชากรเท่ากับ 0.04
- อินเวอร์ชัน IIL-4 (IIL-st/4) มีจุดแยกตำแหน่ง 58B-59B บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพที่ 5.26g) มีความถี่เท่ากับ 0.003 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน III-L-7 (III-L-st/7) มีจุดแยกตำแหน่ง 89C-95B บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 มีความถี่เท่ากับ 0.17 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน III-L-9 (III-L-st/9) มีจุดแยกตำแหน่ง 99B-100A บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 (ภาพที่ 5.27b) มีความถี่เท่ากับ 0.01 ในประชากร

S. tani cytoform B พบในประชากรจากภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ น้ำตกเขาชะเมา จ.ระยอง น้ำตกเขาสอยดาว จ. จันทบุรี น้ำตกคลองนารายณ์ จ. จันทบุรี น้ำตกทอทิพย์

จ. เพชรบุรี น้ำตกบกกราย จ. ระนอง ห้วยรัฐ จ. ระนอง เขาพระนารายณ์ จ. ระนอง น้ำตกปุญญบาล
จ. ระนอง น้ำตกเหมืองทวด จ. สุราษฎร์ธานี และ น้ำตกห้วยโต้ จ. กระบี่
รายละเอียดของแต่ละประชากรมีดังนี้

ภาคตะวันออก

1. น้ำตกเขาชะเมา จ.ระยอง

ทำการศึกษาจำนวน 21 ตัว เป็นเพศผู้ 13 ตัว และเพศเมีย 8 ตัว จากการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion 2 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-5 พบในสภาพ IS-st/5 จำนวน 9 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-5 ในประชากรในประชากรเท่ากับ 0.21

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากรโดยมีความถี่เท่ากับ 1.0

เนื่องจากจำนวนประชากรที่ทำการศึกษาจากน้ำตกเขาชะเมา มีจำนวนน้อย จึงไม่สามารถทำการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

2. น้ำตกเขาสอยดาว จ. จันทบุรี

ศึกษาจำนวนทั้งหมด 62 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 33 ตัว และเพศเมียจำนวน 29 ตัว จากการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion 3 รูปแบบ ดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-5 พบในสภาพ IS-st/5 จำนวน 8 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-5 ในประชากรในประชากรเท่ากับ 0.06

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากรโดยมีความถี่เท่ากับ 1.0

- อินเวอร์ชัน IIIL-7 พบในสภาพ IIIL-7-st/7 และ IIIL-7/7 จำนวน 16 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIIL-7 ในประชากรในประชากรเท่ากับ 0.17

ผลการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IS-5 อยู่ในสมมติฐานสมมติ แต่อินเวอร์ชัน IIIL-7 ไม่อยู่ในสมมติฐานสมมติ ($P < 0.005$) เนื่องจากมีค่าโฮโมไซกัสจำนวนมากและเฮเทอโรไซกัสจำนวนน้อย (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) ส่วนอินเวอร์ชัน IS-5 มีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบได้

3. น้ำตกคลองนารายณ์ จ. จันทบุรี

ทำการศึกษาจำนวน 2 ประชากร โดยประชากรแรกศึกษาจำนวน 34 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 20 ตัว และเพศเมียจำนวน 14 ตัว ส่วนประชากรที่สอง ศึกษาจำนวน 20 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 6 ตัว และเพศเมียจำนวน 14 ตัว ผลการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สาม แต่พบ floating inversion 3 รูปแบบ ดังนี้

ตารางที่ 5.10 ความถี่ของโครโมโซมอินเวอร์ชัน ของแมลงวันดำชนิด *Simulium tani* จากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย

Cytoform หมายเลขแหล่งเก็บ ตัวอย่าง	สัดส่วน ผู้เมีย	IS-2	IS-3	IS-5	IS-6	IS-7	IS-8	IS-10	IL-2	IL-3	IL-4	IIS-1	IIS-3	IIP-1	IIL-1	IIL-2	IIL-3	IIL-4	IIIL-7	IIIL-9	IIIL-18	IIIL-20	IIIL-21
Cytoform A																							
7	36:39	0	0.01	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.61	0	0
12 (5 มีนาคม 2542)	8:9	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 (10 เมษายน 2547)	20:14	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 (10 ธันวาคม 2547)	18:20	0	0	0	0	0	0	0	0.99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	5:11	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytoform B																							
27	13:8	0	0	0.21	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	33:29	0	0	0.06	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.17	0	0	0	0
29 (19 มิถุนายน 2546)	20:14	0	0	0.02	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29 (05 มิถุนายน 2546)	6:14	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0:3	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 (04 กรกฎาคม 2542)	5:8	0	0	0	0	0.04	0	0	0.99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 (15 กรกฎาคม 2546)	73:93	0	0	0	0	0.27	0	0	0.54	0	0	0	0	0	0	0	0	.003	0	0.01	0	0	0
31	42:36	0	0	0	0	0.31	0	0	0.40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	17:13	0	0	0	0	0.55	0	0	0.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	4:3	0	0	0	0	0.07	0	0	0.64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34 (13 กรกฎาคม 2546)	41:47	0	0	0	0.01	0	0	0	0.90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34 (3 พฤศจิกายน 2543)	6:0	0	0	0	0	0.13	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	6:2	0	0	0	0	0	0	0	0.62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 5.10 (ต่อ)

Cytoform หมายเลขแหล่งเก็บตัวอย่าง	สัดส่วน ผู้เมีย	IS-2	IS-3	IS-5	IS-6	IS-7	IS-8	IS-10	IL-2	IL-3	IL-4	IIS-1	IIS-3	IIP-1	IIL-1	IIL-2	IIL-3	IIL-4	IIIL-7	IIIL-9	IIIL-18	IIIL-20	IIIL-21
Cytoform C																							
1	11:7	0	0	0	0	0	0	0	0.92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.58	0	0
5	14:14	0	0	0	0	0	0	0	0.56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0	0.01
8	37:37	0	0	0	0	0	0	0	0.47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9(11 พฤศจิกายน 2546)	13:9	0	0	0	0	0	0	0	0.46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9(10 ธันวาคม 2546)	17:9	0	0	0	0	0	0	0	0.35	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0.02	0
10 (03 มิถุนายน 2546)	10:6	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0
10(11 พฤศจิกายน 2546)	2:8	0	0	0	0	0	0	0	0.90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10(10 ธันวาคม 2546)	3:0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 (10 พฤษภาคม 2546)	8:12	0	0	0	0	0	0	0	0.77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11(11 พฤศจิกายน 2546)	11:8	0	0	0	0	0	0	0	0.97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13 (11 ธันวาคม 2546)	12:13	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	11:5	0	0	0	0	0	0	0	0.62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 (01 ตุลาคม 2541)	8:9	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 (16 ตุลาคม 2546)	16:12	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	37:44	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	9:8	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	13:5	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	7:7	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	15:8	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	54:48	0	0	0	0	0	0.04	0	1.00	0	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	4:5	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 5.10 (ต่อ)

Cytoform หมายเลขแหล่งเก็บตัวอย่าง	สัดส่วน ผู้เมีย	IS-2	IS-3	IS-5	IS-6	IS-7	IS-8	IS-10	IL-2	IL-3	IL-4	IIS-1	IIS-3	IIP-1	IIL-1	IIL-2	IIL-3	IIL-4	IIIL-7	IIIL-9	IIIL-18	IIIL-20	IIIL-21
Cytoform D																							
34 (13 กรกฎาคม 2546)	9:1	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34 (3 พฤศจิกายน 2543)	76:79	0	0	0	0.01	0	0	0	0.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35 (14 กรกฎาคม 2546)	68:54	0	0	0	0	0	0	0.01	0.95	0.01	0	0.01	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0
35(04 พฤศจิกายน 2542)	27:17	0	0	0	0	0	0	0.01	0.93	0	0	0	0	0	0	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0
36	26:16	0	0	0	0	0	0	0	0.99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	26:36	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	18:13	0	0	0	0	0	0	0	0.98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	14:15	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	5:3	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytoform E																							
24	22:16	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytoform F																							
8	7:3	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	38:34	0	0	0	0	0	0	0	0.76	0	0	0	0	0	0.18	0	0	0	0	0	0	0	0
25	21:17	0	0	0	0	0	0	0	0.91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0:2	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytoform G																							
2	13:10	0.07	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.07	0	0
3	29:19	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6:3	0	0	0	0	0	0	0	0.94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5:2	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9 (11 พฤศจิกายน 2546)	0:2	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 5.10 (ต่อ)

Cytoform หมายเลขแหล่งเก็บตัวอย่าง	สัดส่วน ผู้เมีย	IS-2	IS-3	IS-5	IS-6	IS-7	IS-8	IS-10	IL-2	IL-3	IL-4	IIS-1	IIS-3	IIP-1	IIL-1	IIL-2	IIL-3	IIL-4	IIIL-7	IIIL-9	IIIL-18	IIIL-20	IIIL-21
Cytoform G																							
10 (03 มิถุนายน 2546)	2:1	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10(11 พฤศจิกายน 2546)	0:1	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 (10 พฤษภาคม 2546)	1:0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cytoform H																							
5	6:1	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9 (11พฤศจิกายน 2546)	0:1	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9 (10 ธันวาคม 2547)	1:2	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 (03 มิถุนายน 2546)	1:2	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 (11พฤศจิกายน 2546)	1:2	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 (10 ธันวาคม 2547)	2:2	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 (10 พฤษภาคม 2546)	3:1	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 (11พฤศจิกายน 2546)	7:9	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- อินเวอร์ชัน IS-5 ในประชากรแรกในสภาพ IS-st/5 จำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-5 ในประชากรเท่ากับ 0.02
 - อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 ทุกตัวในประชากรโดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0
 - อินเวอร์ชัน IIP-1 พบในสภาพ IIP-st/1 ในประชากรที่สองจำนวน 1 ตัว โดยมีความถี่ในประชากรเท่ากับ 0.04
- เนื่องจากอินเวอร์ชัน IS-5 และ อินเวอร์ชัน IIP-1 มีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

ภาคกลาง

4. น้ำตกทอทิพย์ จ. เพชรบุรี

ทำการศึกษาทั้งหมดจำนวน 41 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform B จำนวน 3 ตัว และ cytoform F จำนวน 38 ตัว (ซึ่งจะอธิบายในส่วนของ cytoform F) (ตารางที่ 5.12)

Cytoform B พบเพียง 3 ตัว โดยเป็นเพศเมียทั้งหมด ผลการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 ทุกตัวในประชากรโดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

ภาคใต้

5. น้ำตกบกกกราย จ. ระนอง

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร ประชากรแรกศึกษาจำนวน 13 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 8 ตัว ส่วนประชากรที่สอง ศึกษาจำนวน 166 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 73 ตัว และเพศเมียจำนวน 93 ตัว ผลการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion 4 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-7 พบในสภาพ IS-st/7 และ IS-7/7 พบจำนวน 1 ตัว ในประชากรแรกและ 66 ตัวในประชากรที่สอง ความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-7 ในประชากรแรกและประชากรที่สองเท่ากับ 0.04 และ 0.27 ตามลำดับ
- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากรแรก และ 126 ตัวในประชากรที่สอง ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรแรกและประชากรที่สองเท่ากับ 0.99 และ 0.54 ตามลำดับ
- อินเวอร์ชัน IIL-4 พบในสภาพ IIL-st/4 พบจำนวน 1 ตัว ในประชากรที่สอง โดยมีความถี่เท่ากับ 0.003
- อินเวอร์ชัน IIIL-9 พบในสภาพ IIIL-st/9 พบจำนวน 2 ตัว ในประชากรที่สอง โดยมีความถี่เท่ากับ 0.01

ผลการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IS-7 ในประชากรที่สอง ไม่อยู่ในสภาวะสมดุล ($P < 0.001$) เนื่องจากมีรูปแบบของเฮเทอโรไซกัสจำนวนมาก (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) ส่วนอินเวอร์ชัน IL-2 อยู่ในสภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg ($P > 0.25$)

อินเวอร์ชันในประชากรแรกไม่ได้รับการทดสอบเนื่องจากจำนวนตัวอย่างในประชากรแรกมีจำนวนน้อย และ อินเวอร์ชันอื่นๆในประชากรที่สองไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากมีค่าคาดหวังต่ำ

6. ห้วยรู้ง จ. ระนอง

ศึกษาจำนวน 78 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 42 ตัว และเพศเมียจำนวน 36 ตัว ผลการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion 2 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-7 พบในสภาพ IS-st/7 และ IS-7/7 พบจำนวน 34 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-7 ในประชากรเท่ากับ 0.31
- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 36 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.40

ผลการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IS-7 และ IL-2 ไม่อยู่ในสภาวะสมดุล ($P < 0.005$) โดยอินเวอร์ชัน IS-7 มีรูปแบบของโฮโมไซกัสจำนวนมาก (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) ส่วน อินเวอร์ชัน IL-2 มีรูปแบบของเฮเทอโรไซกัสจำนวนน้อย (heterozygous deficiency) ($P < 0.005$)

7. เขาพระนารายณ์ จ. ระนอง

ศึกษาจำนวน 30 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 17 ตัว และเพศเมียจำนวน 13 ตัว ผลการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion 2 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-7 พบในสภาพ IS-st/7 และ IS-7/7 พบจำนวน 21 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-7 ในประชากรเท่ากับ 0.55
- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 3 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.08

ผลการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IS-7 อยู่ในสภาวะสมดุล ($P > 0.05$) (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) ส่วนอินเวอร์ชัน IL-2 มีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบได้

8. น้ำตกปยุตญบาล จ. ระนอง

ศึกษาจำนวน 7 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 4 ตัว และเพศเมียจำนวน 3 ตัว ผลการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion 2 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-7 พบในสภาพ IS-st/7 พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-7 ในประชากรเท่ากับ 0.07
- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 6 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.64

เนื่องจากจำนวนประชากรที่ทำการศึกษาจากน้ำตกปยุตญบาล มีจำนวนน้อย จึงไม่สามารถทำการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

9. น้ำตกเหมืองทวด จ. สุราษฎร์ธานี

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร ประชากรแรกศึกษาจำนวน 98 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 50 ตัว และเพศเมียจำนวน 48 ตัว ส่วนประชากรที่สอง ศึกษาจำนวน 155 ตัว จากการศึกษาสามารถแบ่งประชากรออกเป็น 2 cytoforms ได้แก่ cytoform B (พบจำนวน 88 ตัวในประชากรแรก และพบ 6 ตัวในประชากรที่สอง) และ cytoform D (พบในประชากรแรก 10 ตัว และประชากรที่สอง 149 ตัว ซึ่งจะกล่าวในภายหลัง)

ตารางที่ 5.11 จำนวนอินเวอร์ชันในเพศผู้และเพศเมียของ *Simulium tani* บนโครโมโซมแท่งที่ 3 ในประชากรที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ ภูมิภาคต่างๆ

Site no.	แหล่งที่เก็บ	วันที่	เพศ	IIIL-s/s	IIIL-s/5	IIIL-5/5	IIIL-s/5,6	IIIL-5/5,6	IIIL-5,6/5,6	IIIL-s/19	IIIL-19/19	cytoforms
1	น้ำตกขุนกรณ์ จ.เชียงราย	8 ธ.ค. 41	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	9 1	2 6	0 0	0 0	C ¹
2	ปางมะผ้า 1 จ.แม่ฮ่องสอน	2 ธ.ค. 46	♂ ♀	0 0	0 0	0 10	0 0	13 0	0 0	0 0	0 0	G
3	ปางมะผ้า 2 จ.แม่ฮ่องสอน	13 ธ.ค.47	♂ ♀	0 0	0 0	0 19	0 0	29 0	0 0	0 0	0 0	G
4	บ้านปางเปก จ.แม่ฮ่องสอน	16 เม.ษ.47	♂ ♀	0 0	0 0	0 3	0 0	6 0	0 0	0 0	0 0	G
5	น้ำตกแม่สุรินทร์ จ.แม่ฮ่องสอน	12 ธ.ค.47	♂ ♀	3 1	0 0	0 0	0 0	17 0	0 14	6 1	0 0	C, H
6	บ้านน้ำจืด จ.แม่ฮ่องสอน	5 มิ.ย.46	♂ ♀	0 0	0 0	0 2	0 0	5 0	0 0	0 0	0 0	G
7	สวนอุคค จ. แม่ฮ่องสอน	14 เม.ษ.47	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	36 39	0 0	0 0	A
8	น้ำตกวังบัวบาน จ.เชียงใหม่	15 ธ.ค.47	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	7 3	29 1	8 16	0 0	0 0	C ¹ , F ²

ตารางที่ 5.11 (ต่อ)

Site no.	แหล่งที่เก็บ	วันที่	เพศ	IIIL-s/s	IIIL-s/5	IIIL-5/5	IIIL-s/5,6	IIIL-5/5,6	IIIL-5,6/5,6	IIIL-s/19	IIIL-19/19	cytoforms
9	ด้านตรวจแม่โต จ.เชียงใหม่	11 พ.ย.46	♂ ♀	1 0	0 0	0 2	0 0	11 1	2 8	1 0	0 0	C ¹ , H, G
	ด้านตรวจแม่โต จ.เชียงใหม่	10 ธ.ค.47	♂ ♀	1 2	0 0	0 0	0 0	13 0	4 9	0 0	0 2	C ¹ , H ³
10	บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่	3 มิ.ย.46	♂ ♀	6 7	0 0	2 1	0 0	7 1	1 4	7 1	1 6	C ¹ , H ³ , G ⁴
	บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่	11 พ.ย.46	♂ ♀	1 2	0 0	0 1	0 0	1 1	1 5	1 0	0 2	C ¹ , H, G
	บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่	10 ธ.ค.47	♂ ♀	2 2	0 0	0 0	0 0	2 0	1 0	2 0	0 2	C ¹ , H
11	บ้านปางน้ำถุ จ.เชียงใหม่	10พ.ค.46	♂ ♀	2 1	0 0	1 0	0 0	7 1	0 11	2 1	0 0	C, H ³ , G ⁴
	บ้านปางน้ำถุ จ.เชียงใหม่	11พ.ย.46	♂ ♀	7 9	0 0	0 0	0 0	8 2	3 6	7 0	0 9	C ¹ , H
12	น้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงใหม่	13 พ.ย.46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	8 9	0 0	0 0	A
	น้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงใหม่	10เม.๒.47	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	20 14	0 0	0 0	A

ตารางที่ 5.11 (ต่อ)

Site no.	แหล่งที่เก็บ	วันที่	เพศ	IIIL-s/s	IIIL-s/5	IIIL-5/5	IIIL-s/5,6	IIIL-5/5,6	IIIL-5,6/5,6	IIIL-s/19	IIIL-19/19	cytoforms
	น้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงใหม่	10ธ.ค.47	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	18 20	0 0	0 0	A
13	น้ำตกห้วยทรายเหลือง จ. เชียงใหม่	11พ.ค.46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	11 1	1 12	0 0	0 0	C ¹
14	น้ำตกแจ้ซ้อน จ. ลำปาง	11เม.๒.47	♂ ♀	0 0	0 0	0 1	0 0	10 0	1 5	0 0	0 0	C ¹ , G
15	บ้านลานสาง จ. ตาก	21ธ.ค.46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	5 11	0 0	0 0	A
16	น้ำตกภูสอยดาว จ. อุตรดิตถ์	1 ต.ค. 41	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	7 0	1 9	0 0	0 0	C ¹
	น้ำตกภูสอยดาว จ. อุตรดิตถ์	16 ต.ค. 46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	16 2	0 10	0 0	0 0	C ¹
17	ทางขึ้นภูสอยดาว จ. อุตรดิตถ์	18 ต.ค. 46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	36 1	1 43	0 0	0 0	C ¹
18	ห้วยขมิ้นน้อย จ. พิษณุโลก	26 ก.ค.48	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	8 1	1 7	0 0	0 0	C ¹
19	น้ำตกตาดหมอก จ.เพชรบูรณ์	30 ก.ย. 41	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	12 0	1 5	0 0	0 0	C ¹

ตารางที่ 5.11 (ต่อ)

Site no.	แหล่งที่เก็บ	วันที่	เพศ	IIIL-s/s	IIIL-s/5	IIIL-5/5	IIIL-s/5,6	IIIL-5/5,6	IIIL-5,6/5,6	IIIL-s/19	IIIL-19/19	cytoforms
20	ตาดหมอก 1 จ.เพชรบูรณ์	25 ต.ค. 46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	7 0	0 7	0 0	0 0	C
21	ตาดหมอก 2 จ.เพชรบูรณ์	25 ต.ค. 46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	15 0	0 8	0 0	0 0	C
22	บ้านพัสดุกกลาง จ. กาญจนบุรี	29 ก.พ. 47	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	37 3	0 0	1 31	0 0	0 0	F ²
23	ถ้ำธารลอด จ. กาญจนบุรี	12 ส.ค.46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 0	49 1	5 47	0 0	0 0	C ¹
24	อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ กิโลเมตรที่ 31	25 ก.ค.47	♂ ♀	0 0	0 0	22 16	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	E
25	น้ำตกทอทิพย์ จ. เพชรบุรี	16 ส.ค.46	♂ ♀	0 3	0 0	0 0	13 6	0 0	8 11	0 0	0 0	B, F ²
26	เขาพะเนินทุ่ง จ. เพชรบุรี	16 ส.ค.46	♂ ♀	0 0	0 0	0 0	0 2	1 0	3 5	0 0	0 0	C, F ²
27	น้ำตกเขาชะเมา จ.ระยอง	19 มิ.ย.46	♂ ♀	13 8	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
28	น้ำตกเขาสอยดาว จ. จันทบุรี	20 มิ.ย.46	♂ ♀	33 29	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B

ตารางที่ 5.11 (ต่อ)

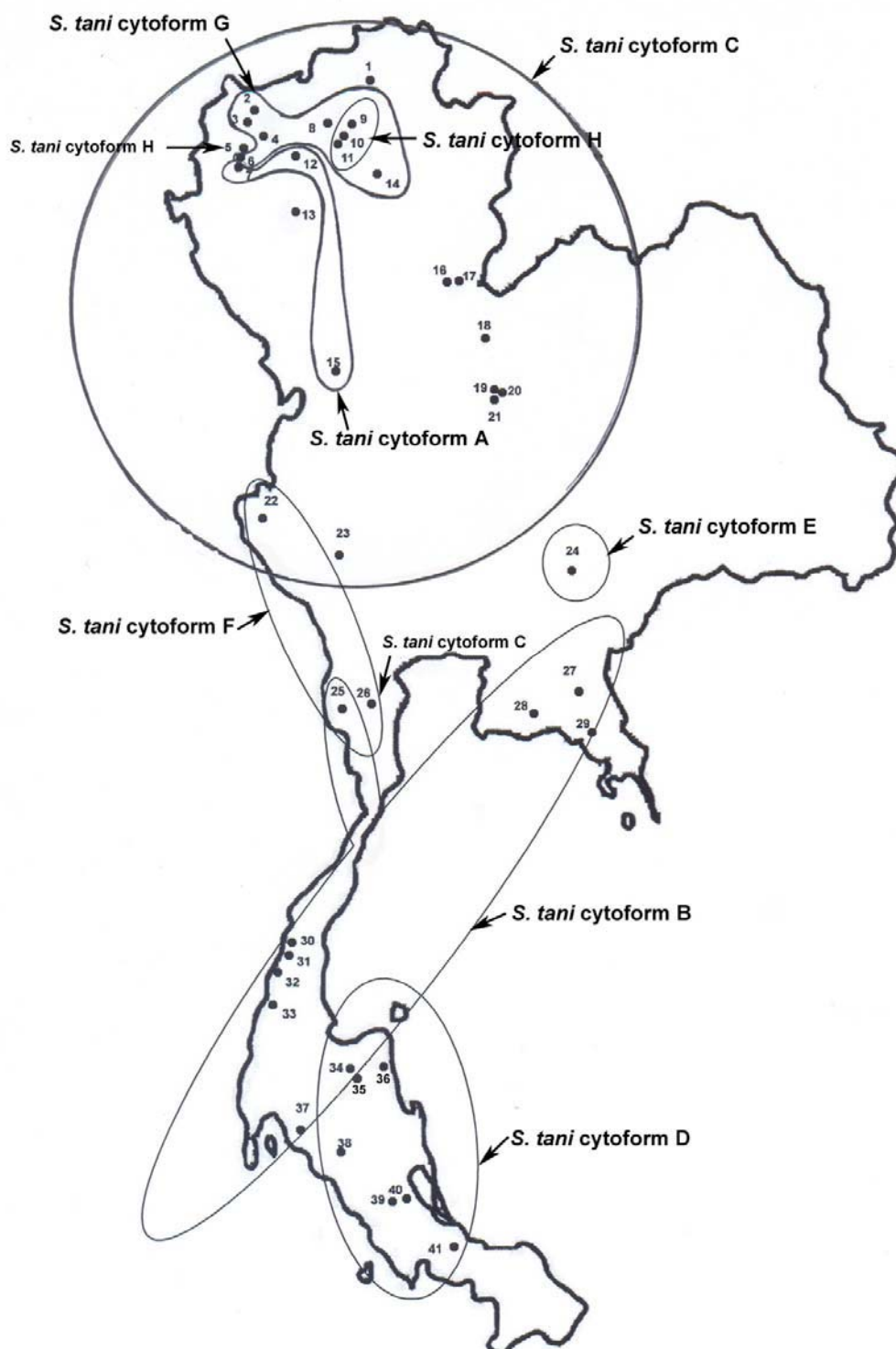
Site no.	แหล่งที่เก็บ	วันที่	เพศ	IIIL-s/s	IIIL-s/5	IIIL-5/5	IIIL-s/5,6	IIIL-5/5,6	IIIL-5,6/5,6	IIIL-s/19	IIIL-19/19	cytoforms
29	น้ำตกคลองนารายณ์ จ. จันทบุรี	19 มิ.ย.46	♂ ♀	20 14	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
	น้ำตกคลองนารายณ์ จ. จันทบุรี	05 มิ.ย.47	♂ ♀	6 14	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
30	น้ำตกบกกทราย จ. ระนอง	15 ก.ค. 46	♂ ♀	73 93	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
	น้ำตกบกกทราย จ. ระนอง	04 ก.ค.42	♂ ♀	5 8	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
31	ห้วยรัง จ. ระนอง	14 ก.ค.46	♂ ♀	42 36	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
32	เขาพระนารายณ์ จ. ระนอง	14 ก.ค.46	♂ ♀	17 13	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
33	น้ำตกปฎูญบาล จ. ระนอง	4 ก.ค.42	♂ ♀	4 3	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
34	น้ำตกเหมืองทวด จ. สุราษฎร์ธานี	13 ก.ค.46	♂ ♀	41 47	9 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B, D ⁵
	น้ำตกเหมืองทวด จ. สุราษฎร์ธานี	03 พ.ย.43	♂ ♀	6 79	70 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B, D

ตารางที่ 5.11 (ต่อ)

Site no.	แหล่งที่เก็บ	วันที่	เพศ	IIIL-s/s	IIIL-s/5	IIIL-5/5	IIIL-s/5,6	IIIL-5/5,6	IIIL-5,6/5,6	IIIL-s/19	IIIL-19/19	cytoforms
35	น้ำตกตาดฟ้า จ. สุราษฎร์ธานี	14 ก.ค.46	♂ ♀	0 54	68 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	D ⁵
	น้ำตกตาดฟ้า จ. สุราษฎร์ธานี	04 พ.ย.42	♂ ♀	1 17	24 0	2 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	D ⁵
36	น้ำตกสუნันทา จ. นครศรีธรรมราช	20 เม.ษ. 42	♂ ♀	0 16	26 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	D
37	น้ำตกห้วยไต้ จ. กระบี่	02 ก.ค.42	♂ ♀	6 2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	B
38	น้ำตกปากแจ่ม จ. ตรัง	6 มี.ค. 48	♂ ♀	3 35	23 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	D ⁵
39	น้ำตกไพรวัลย์ จ. พัทลุง	2 มิ.ย. 42	♂ ♀	1 12	17 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	D ⁵
40	น้ำตกตะโหมด จ. พัทลุง	2 มิ.ย. 42	♂ ♀	2 15	12 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	D ⁵
41	น้ำตกโตนงาช้าง จ. สงขลา	1 มิ.ย. 42	♂ ♀	0 3	5 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	D

¹ เกิดข้อยกเว้นทางเพศ (sex exceptions) (♀ = IIIL-5/5,6, ♂ = IIIL-5,6/5,6), ² เกิดข้อยกเว้นทางเพศ (sex exceptions) (♀ = IIIL-s/5,6, ♂ = IIIL-5,6/5,6), ³ เกิดข้อยกเว้นทางเพศ (sex exceptions) (♀ = IIIL-s/19, ♂ = IIIL-s/s)

⁴ เกิดข้อยกเว้นทางเพศ (sex exceptions) (♂ = IIIL-5/5), ⁵ เกิดข้อยกเว้นทางเพศ (sex exceptions) (♀ = IIIL-s/5 and IIIL-5/5, ♂ = IIIL-5/5)



ภาพที่ 5.26 แผนที่แสดงการกระจายของ *Simulium tani* cytoforms ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศ (หมายเลขแสดงแหล่งที่เก็บแต่ละ cytoform ดูจากตารางที่ 5.9)

Cytoform B ไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร พบส่วนใหญ่ในประชากรแรกจำนวน 88 ตัว (89.8%) (ตารางที่ 5.12) เป็นเพศผู้จำนวน 41 ตัว (82%) และเพศเมียจำนวน 47 ตัว (97.9%) และพบในประชากรที่สอง 6 ตัว (เพศผู้) (8.57%) นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 2 รูปแบบในประชากรแรก คือ

- อินเวอร์ชัน IS-6 พบในสภาพ IS-st/6 พบจำนวน 2 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-6 ในประชากรเท่ากับ 0.01
- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากรแรก (19 ตัว ในสภาพ IL-st/2 และ 69 ตัวในสภาพ IL-2/2) ส่วนประชากรที่สองพบทุกตัวเช่นกันโดยอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.9 และ 1.0 ตามลำดับ

เนื่องจากอินเวอร์ชัน IS-6 มีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

10. ห้วยไต้ จ. กระบี่

ศึกษาจำนวน 8 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 6 ตัว และเพศเมียจำนวน 2 ตัว ผลการศึกษาไม่พบ fixed inversion และ sex linked inversion บนโครโมโซมแท่งที่สามในประชากร แต่พบ floating inversion 2 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-7 พบในสภาพ IS-st/7 และ IS-7/7 พบทุกตัวในประชากร (IS-st/7=2, IL-7/7=6) ความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-7 ในประชากรเท่ากับ 0.13
- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 6 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.62

เนื่องจากจำนวนประชากรที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อย จึงไม่สามารถทำการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

S. tani cytoform C อยู่ในสภาพ sex-linked inversion โดยพบอินเวอร์ชัน IIIL-5/5,6 (ภาพที่ 5.29h) ในเพศผู้ และ IIIL-5,6/5,6 ในเพศเมีย นอกจากนี้ยังพบ floating inversion จำนวน 7 รูปแบบในประชากร ได้แก่ IS-8, IL-2, IL-4, IIL-3, IIIL-18 IIIL-19 และ IIIL-20 ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละอินเวอร์ชันดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-8 (IS-st/8) มีจุดแยกตำแหน่ง 6C-7B บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 (ภาพที่ 5.27e) มีความถี่เท่ากับ 0.04
- อินเวอร์ชัน IL-2 (IL-st/2, IL-2/2) มีจุดแยกตำแหน่ง 26-32 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 มีความถี่ตั้งแต่ 0.28 -1.0 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IL-4 (IL-st/4) มีจุดแยกตำแหน่ง 26-32 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 (ภาพที่ 5.27h) มีความถี่ตั้งแต่ 0.04
- อินเวอร์ชัน IIS-3 (IIS-st/3) มีจุดแยกตำแหน่ง 42-48 บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพที่ 5.28b) มีความถี่ 0.02
- อินเวอร์ชัน IIIL-18 (IIIL-st/18, IIIL-18/18) มีจุดแยกตำแหน่ง 88B-89C บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 มีความถี่ตั้งแต่ 0.02-0.58

- อินเวอร์ชัน IIII-20 (IIIL-st/20) มีจุดแยกตำแหน่ง 90A-92C บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 (ภาพที่ 5.29e) มีความถี่เท่ากับ 0.02
- อินเวอร์ชัน IIII-21 (IIIL-st/21) มีจุดแยกตำแหน่ง 92A-92C บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 (ภาพที่ 5.29f) มีความถี่เท่ากับ 0.02

จากการศึกษาพบ *S. tani* cytoform C ในบางประชากรจากภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ น้ำตกขุนกรณ์ จ.เชียงราย น้ำตกแม่สุรินทร์ จ.แม่ฮ่องสอน น้ำตกวังบัวบาน จ.เชียงใหม่ ด่านตรวจแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่ บ้านปางน้ำถุ จ.เชียงใหม่ น้ำตกห้วยทรายเหลือง จ. เชียงใหม่ น้ำตกแจ้ซ้อน จ. ลำปาง น้ำตกภูสอยดาว จ. อุตรดิตถ์ ทางขึ้นภูสอยดาว จ. อุตรดิตถ์ ห้วยขมิ้นน้อย จ.พิษณุโลก น้ำตกตาดหมอก จ.เพชรบูรณ์ ตาดหมอก 1 จ.เพชรบูรณ์ ตาดหมอก 2 จ.เพชรบูรณ์ ถ้ำธารลอด จ. กาญจนบุรี และ เขาพะเนินทุ่ง จ. เพชรบุรี รายละเอียดของแต่ละประชากรมีดังต่อไปนี้

ภาคเหนือ

1. น้ำตกขุนกรณ์ จ.เชียงราย

ศึกษาจำนวน 18 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 11 ตัว และเพศเมียจำนวน 7 ตัว ผลการศึกษาพบ sex-linked inversion โดยพบอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 9 ตัว (81.81%) และ พบอินเวอร์ชัน IIII-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 6 ตัว (85.71%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ (sex exception) โดยเพศผู้จำนวน 2 ตัว (18.19%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5,6/5,6 และ เพศเมีย 1 ตัว (14.29%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5/5,6 นอกจากนี้ยังพบ Floating inversion 2 รูปแบบได้แก่

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวนทุกตัว ($IL-st/2 = 3$, $IL-2/2 = 9$) ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.92

- อินเวอร์ชัน IIII-18 พบในสภาพ IIII-st/18 และ IIII-18/18 พบจำนวน 12 ตัว ($IIIL-st/18 = 9$, $IIIL-18/18 = 3$) ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIII-18 ในประชากรเท่ากับ 0.58

เนื่องจากจำนวนประชากรที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อย จึงไม่สามารถทำการทดสอบสมภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg ได้

2. น้ำตกแม่สุรินทร์ จ.แม่ฮ่องสอน

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 35 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C จำนวน 28 ตัว และ cytoform H จำนวน 7 ตัว (ซึ่งจะอธิบายในส่วนของ cytoform H)

cytoform C มีจำนวน 28 ตัว เป็นเพศผู้ และเพศเมียจำนวน 14 ตัว โดยพบอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6 ในเพศผู้ทุกตัว (100%) และ IIII-5,6/5,6 ในเพศเมียทุกตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 3 รูปแบบดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 25 ตัว ($IL-st/2 = 14$, $IL-2/2 = 11$) ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.56

- อินเวอร์ชัน IIII-18 พบในสภาพ IIII-st/18 พบจำนวน 2 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIII-18 ในประชากรเท่ากับ 0.06

- อินเวอร์ชัน IIII-21 พบในสภาพ IIII-st/21 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIII-21 ในประชากรเท่ากับ 0.01

ผลการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IL-2 อยู่ในสมมติฐานสมมูล ($P>0.75$) (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) ส่วนอินเวอร์ชัน IL-2 มีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบได้

3. น้ำตกวังบัวบาน จ.เชียงใหม่

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 84 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C จำนวน 74 ตัว และ cytoform F จำนวน 10 ตัว (ซึ่งจะอธิบายในส่วนของ cytoform F) (ตารางที่ 5.19)

cytoform C พบจำนวน 74 ตัว เป็นเพศผู้และเพศเมียจำนวน 37 ตัว โดยพบอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6 ในเพศผู้ 29 ตัว (78.38%) และ IIII-5,6/5,6 ในเพศเมีย 36 ตัว (97.29%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ (sex exception) โดยเพศผู้จำนวน 8 ตัว (21.62%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5,6/5,6 และเพศเมีย 1 ตัว (2.71%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5/5,6 นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 30 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.47

ผลการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IL-2 ไม่อยู่ในสมมติฐานสมมูล ($P<0.005$) โดยอินเวอร์ชัน IL-2 มีรูปแบบของเฮเทโรไซกัสจำนวนน้อย (heterozygous deficiency) ($P<0.005$)

4. ด่านตรวจแม่โถ จ.เชียงใหม่

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร ประชากรแรกประกอบด้วย cytoform C (22 ตัว), cytoform H (1 ตัว) และ cytoform G (2 ตัว) (ตารางที่ 5.12) ส่วนประชากรที่สองประกอบด้วย cytoform C 26 ตัว และ cytoform H 5 ตัว (รายละเอียดของ cytoforms อื่นๆ จะกล่าวในภายหลัง)

Cytoform C พบในประชากรแรกจำนวน 22 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 13 ตัว และเพศเมียจำนวน 9 ตัว โดยพบอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6 ในเพศผู้ 11 ตัว (84.62%) และ IIII-5,6/5,6 ในเพศเมีย 8 ตัว (88.89%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ (sex exception) โดยเพศผู้จำนวน 2 ตัว (15.38%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5,6/5,6 และ เพศเมีย 1 ตัว (11.11%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5/5,6

ส่วนประชากรที่สองศึกษาจำนวน 26 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 17 ตัว และเพศเมียจำนวน 9 ตัว โดยพบอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6 ในเพศผู้ 13 ตัว (76.47%) และ IIII-5,6/5,6 ในเพศเมีย 9 ตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ (sex exception) โดยเพศผู้จำนวน 4 ตัว (23.52%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5,6/5,6

จากการศึกษาพบพบ floating inversion 4 รูปแบบดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 14 ตัว ในประชากรแรกและ 12 ตัว ในประชากรที่สอง ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรแรกและประชากรที่สองเท่ากับ 0.46 และ 0.35

- อินเวอร์ชัน IIS-3 พบในสภาพ IIS-st/3 พบจำนวน 1 ตัว ในประชากรที่สองค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIS-3 ในประชากรเท่ากับ 0.02

- อินเวอร์ชัน IIII-18 พบในสภาพ IIII-st/18 พบจำนวน 3 ตัว ในประชากรที่ส่งค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIII-9 ในประชากรเท่ากับ 0.05

- อินเวอร์ชัน IIII-20 พบในสภาพ IIII-st/20 พบจำนวน 1 ตัว ในประชากรที่ส่งค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIII-20 ในประชากรเท่ากับ 0.02

ผลการทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรที่ส่งอยู่ในสมมติฐาน ($P>0.05$) (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) ส่วนอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรแรกไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากจำนวนที่ศึกษาในประชากรมีค่าน้อย ส่วนอินเวอร์ชันอื่นๆในประชากรที่ส่งไม่สามารถทดสอบได้เช่นกันเนื่องจากมีค่าคาดหวังต่ำ

5. บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่

ทำการศึกษาจำนวน 3 ประชากร ประชากรแรกประกอบด้วย cytoform C 11 ตัว, cytoform H 15 ตัว และ cytoform G 3 ตัว (ตารางที่ 5.12) ประชากรที่สองประกอบด้วย cytoform C 8 ตัว และ cytoform H 3 ตัว และ cytoform G 3 ตัว ส่วนประชากรที่สามประกอบด้วย cytoform C 3 ตัว และ cytoform H 4 ตัว (รายละเอียดของ cytoforms อื่นๆ จะกล่าวในภายหลัง)

Cytoform C พบในประชากรแรกจำนวน 11 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 6 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว โดยพบอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6 ในเพศผู้ 5 ตัว (83.33%) และ IIII-5,6/5,6 ในเพศเมีย 4 ตัว (80%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ (sex exception) โดยเพศผู้จำนวน 1 ตัว (16.67%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5,6/5,6 และ เพศเมีย 1 ตัว (20%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5/5,6

ประชากรที่สองศึกษาจำนวน 8 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 2 ตัว และเพศเมียจำนวน 6 ตัว โดยพบอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6 ในเพศผู้ 1 ตัว (50%) และ IIII-5,6/5,6 ในเพศเมีย 5 ตัว (83.33%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ (sex exception) โดยเพศผู้จำนวน 1 ตัว (50%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5,6/5,6 และ เพศเมีย 1 ตัว (16.67%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5/5,6

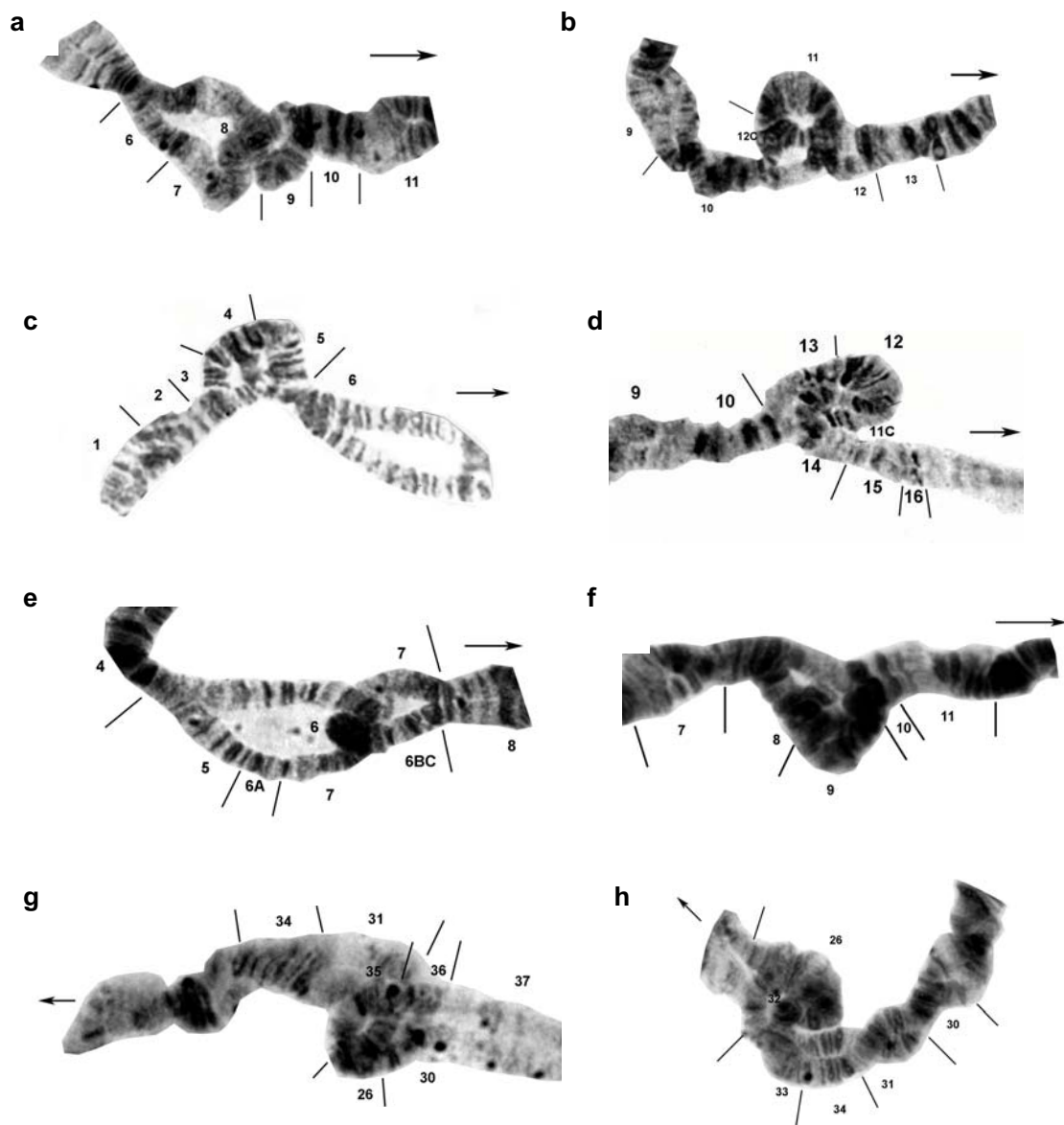
ส่วนประชากรที่สามพบเพียง 3 ตัว เป็นเพศผู้ทั้งหมด โดยพบอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6 ในเพศผู้ 2 ตัว (66.67%) ส่วนอีก 1 ตัว (33.33%) เกิดข้อยกเว้นทางเพศ โดยเกิดอินเวอร์ชันแบบ IIII-5,6/5,6

จากการศึกษาพบพบ floating inversion 2 รูปแบบดังนี้

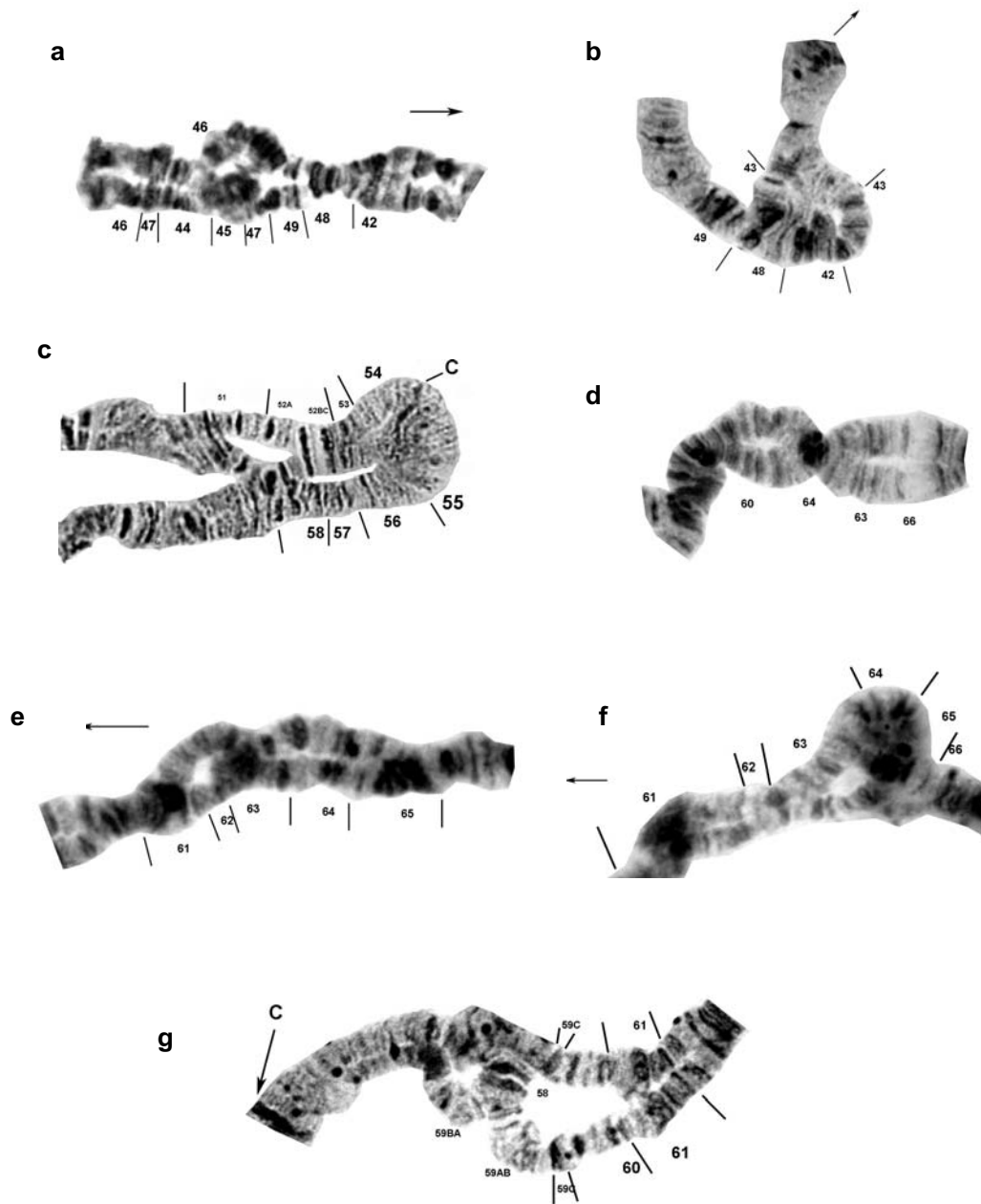
- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบจำนวนทุกตัว ในทุกประชากร ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 1.0, 1.0 และ 0.90 ตามลำดับ

- อินเวอร์ชัน IIII-18 พบในสภาพ IIII-st/18 พบจำนวน 1 ตัว ในประชากรแรกเท่านั้น ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIII-18 ในประชากรเท่ากับ 0.02

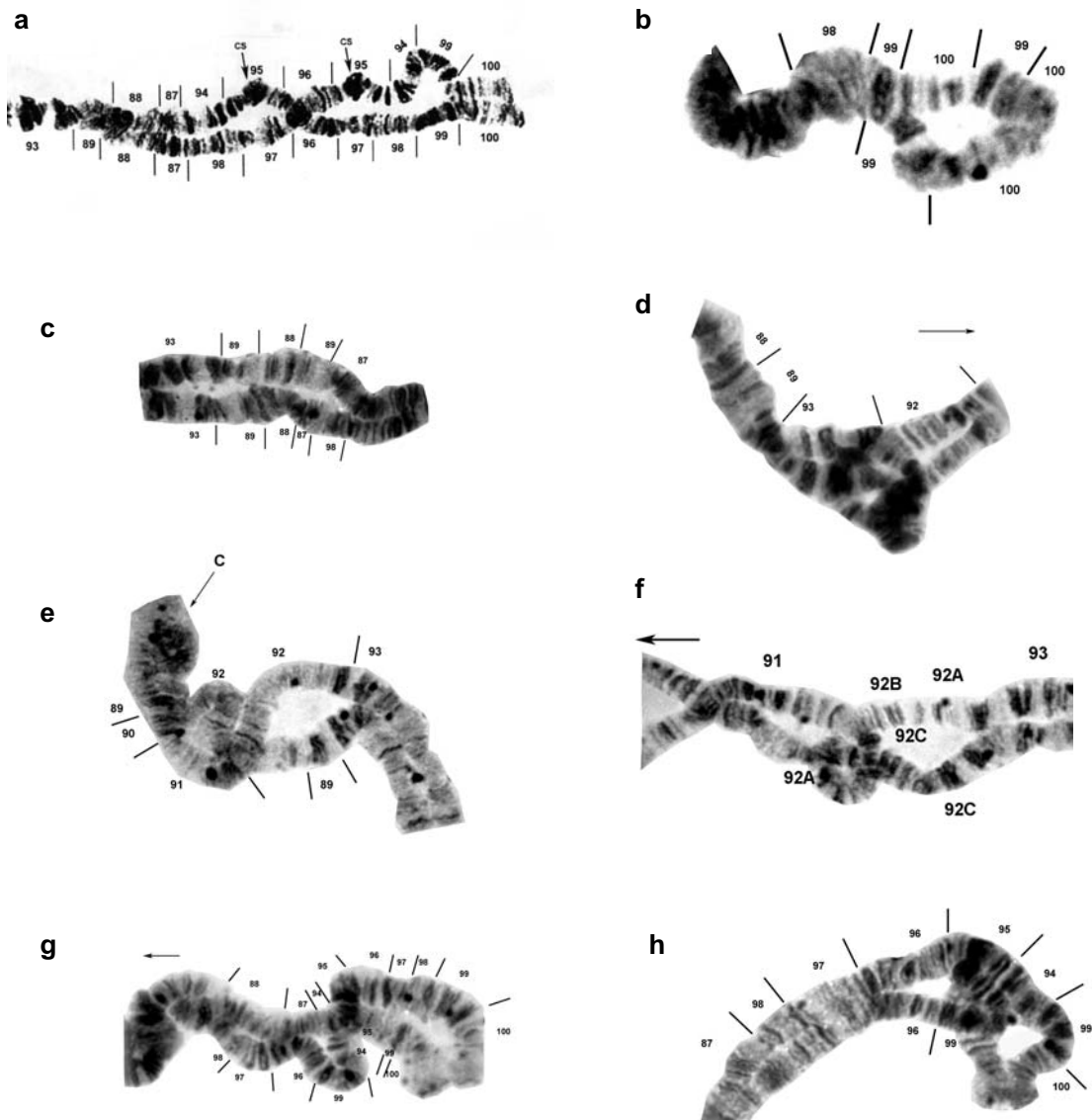
เนื่องจากจำนวนประชากรที่ศึกษาในแต่ละประชากรมีค่าต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้



ภาพที่ 5.27 เซโทไรโซกัสบนโครโมโซมแท่งที่ 1 ของแมลงร้นดำชนิด *Simulium tani*.
 (a) IS-st/2, (b) IS-st/3, (c) IS-st/5, (d) IS-st/6, (e) IS-st/8, (f) IS-st/10,
 (g) IL-st/3, (h) IL-st/4



ภาพที่ 5.28 เซเทโรไซกัสบนโครโมโซมแท่งที่ 2 ของแมลงรึ้นดำชนิด *Simulium tani*
 (a) IIS-st/1, (b) IIS-st/3, (c) IIP-st/1, (d) IIL-st/1, (e) IIL-st/2, (f) IIL-st/3, (g) IIL-st/4



ภาพที่ 5.29 เฮเทโรไซกัสบนโครโมโซมแท่งที่ 3 ของแมลงร้นดำชนิด *Simulium tani*.

(a) IIIL-st/5, (b) IIIL-st/9, (c) IIIL-st/18, (d) IIIL-st/19, (e) IIIL-st/20,
(f) IIIL-st/21, (g) IIIL-st/5,6, (h) IIIL-5/5,6

6. บ้านปางน้ำถุ จ.เชียงใหม่

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร ประชากรแรกประกอบด้วย cytoform C (19 ตัว), cytoform H (3 ตัว) และ cytoform G (1 ตัว) (ตารางที่ 5.12) ส่วนประชากรที่สองประกอบด้วย cytoform C 19 ตัว และ cytoform H 16 ตัว (รายละเอียดของ cytoforms อื่นๆ จะกล่าวในภายหลัง)

Cytoform C พบในประชากรแรกจำนวน 19 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 7 ตัว และเพศเมียจำนวน 12 ตัว โดยพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้ 7 ตัว (100%) และ III-L-5,6/5,6 ในเพศเมีย 11 ตัว (91.67%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ โดยเพศเมีย 1 ตัว (8.33%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5/5,6

ประชากรที่สองศึกษาจำนวน 19 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 11 ตัว และเพศเมียจำนวน 8 ตัว โดยพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้ 8 ตัว (72.73%) และ III-L-5,6/5,6 ในเพศเมีย 6 ตัว (75%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 3 ตัว (27.27%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5,6/5,6 และ เพศเมีย 2 ตัว (25%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5/5,6

จากการศึกษาพบ floating inversion 1 รูปแบบดังนี้

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 ในทุกประชากร พบจำนวน 17 ตัวในประชากรแรก และ ในประชากรที่สอง ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.77 และ 0.97 ตามลำดับ

เนื่องจากจำนวนประชากรที่ศึกษาในแต่ละประชากรมีค่าต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

7. น้ำตกห้วยทรายเหลือง จ. เชียงใหม่

ศึกษาจำนวน 25 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 12 ตัว และเพศเมียจำนวน 13 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 11 ตัว (91.67%) และ พบอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 12 ตัว (92.31%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 1 ตัว (8.33%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5,6/5,6 และ เพศเมีย 1 ตัว (7.69%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5/5,6

นอกจากนี้ยังพบ Floating inversion 1 รูปแบบได้แก่

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 1 ตัว ความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.06

เนื่องจากอินเวอร์ชันที่เกิดขึ้นมีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

8. น้ำตกแจ้ซ้อน จ. ลำปาง

ทำการศึกษาทั้งหมดจำนวน 17 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C จำนวน 16 ตัว และ cytoform G จำนวน 1 ตัว (ซึ่งจะอธิบายในส่วน of cytoform G) (ตารางที่ 5.12)

Cytoform C พบจำนวน 16 ตัว โดยเป็นเพศผู้ 11 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 10 ตัว (90.91%) และ พบอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 5 ตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 1 ตัว (9.09%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5,6/5,6 นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบจำนวน 12 ตัว โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.62

เนื่องจากจำนวนประชากรที่ศึกษาในแต่ละประชากรมีค่าต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg ได้

9. น้ำตกกุสอยดาว จ. อุตรดิตถ์

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร โดยประชากรแรกศึกษาจำนวน 17 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 8 ตัว และเพศเมียจำนวน 9 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 7 ตัว (87.5%) และ พบอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 9 ตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 1 ตัว (12.5%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5,6/5,6

ส่วนประชากรที่สองศึกษาจำนวน 28 ตัว (เป็นเพศผู้จำนวน 16 ตัว และเพศเมียจำนวน 12 ตัว) พบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 16 ตัว (100%) และ พบอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 10 ตัว (83.33%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ โดยเพศเมีย 2 ตัว (16.67%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5/5,6

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

10. ทางขึ้นกุสอยดาว จ. อุตรดิตถ์

ศึกษาจำนวน 80 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 37 ตัว และเพศเมียจำนวน 44 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 36 ตัว (97.29%) และ พบอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 43 ตัว (97.72%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 1 ตัว (2.71%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5,6/5,6 และ เพศเมีย 1 ตัว (2.28%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5/5,6

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

11. ห้วยขมิ้นน้อย จ. พิษณุโลก

ศึกษาจำนวน 17 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 9 ตัว และเพศเมียจำนวน 8 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 8 ตัว (88.89%) และ พบอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 7 ตัว (87.5%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 1 ตัว (11.11%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5,6/5,6 และ เพศเมีย 1 ตัว (12.5%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5/5,6

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบจำนวนทุกตัว โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

12. น้ำตกตาดหมอก จ. เพชรบูรณ์

ศึกษาจำนวน 18 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 13 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 12 ตัว (92.31%) และ พบอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 ในเพศเมีย

จำนวน 5 ตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบข้อบกพร่องทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 1 ตัว (7.69%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-5,6/5,6

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบในประชากร คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

13. ตาดหมอก 1 จ.เพชรบูรณ์

ศึกษาจำนวน 14 ตัว เป็นเพศผู้และเพศเมียจำนวน 7 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-5,6 ในเพศผู้ทุกตัว (100%) และพบอินเวอร์ชัน III-5,6/5,6 ในเพศเมียทุกตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

14. ตาดหมอก 2 จ.เพชรบูรณ์

ศึกษาจำนวน 23 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 15 ตัว และเพศเมียจำนวน 8 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-5,6 ในเพศผู้ทุกตัว (100%) และพบอินเวอร์ชัน III-5,6/5,6 ในเพศเมียทุกตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

ภาคกลาง

15. ถ้ำธารลอด จ.กาญจนบุรี

ทำการศึกษาจำนวน 101 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 54 ตัว และเพศเมียจำนวน 47 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-5,6 ในเพศผู้จำนวน 49 ตัว (90.74%) และ พบอินเวอร์ชัน III-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 47 ตัว (97.91%) นอกจากนี้ยังพบข้อบกพร่องทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 5 ตัว (9.26%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-5,6/5,6 และ เพศเมีย 1 ตัว (2.09%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-5/5,6

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 3 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-8 พบในสภาพ IS-st/8 พบจำนวน 4 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-8 ในประชากรเท่ากับ 0.04

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

- อินเวอร์ชัน IL-4 พบในสภาพ IL-4 พบจำนวน 4 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-4 ในประชากรเท่ากับ 0.04

เนื่องจากจำนวนประชากรที่ศึกษาในแต่ละประชากรมีค่าต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg ได้

16. เขาพะเนินทุ่ง จ. เพชรบุรี

ทำการศึกษาทั้งหมดจำนวน 11 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C จำนวน 9 ตัว และ cytoform F จำนวน 2 ตัว (ซึ่งจะอธิบายในส่วนของ cytoform F) (ตารางที่ 5.12)

Cytoform C พบจำนวน 9 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 4 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 ในเพศผู้จำนวน 1 ตัว (33.33%) และ พบอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 ในเพศเมียจำนวน 5 ตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบข้อบกพร่องทางเพศ โดยเพศผู้จำนวน 3 ตัว (66.66%) เกิดอินเวอร์ชันแบบ III-L-5,6/5,6

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

S. tani cytoform D อยู่ในสภาพ sex-linked inversion โดยพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 (ภาพที่ 5.29a) ในเพศผู้ทุกตัว ในขณะที่เพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-st/st นอกจากนี้ยังพบ floating inversion จำนวน 7 รูปแบบ ในประชากร ซึ่งมีรายละเอียดแต่ละอินเวอร์ชันดังนี้

- อินเวอร์ชัน IS-6 (IS-st/6) มีจุดแยกตำแหน่ง 11C-14B บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 มีความถี่เท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IS-10 (IS-st/10) มีจุดแยกตำแหน่ง 8B-10A บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 (ภาพที่ 5.27f) มีความถี่เท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IL-2 (IL-st/2, IL-2/2) มีจุดแยกตำแหน่ง 26-32 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 มีความถี่ตั้งแต่ 0.93 -1.0 ในประชากร

- อินเวอร์ชัน IL-3 (IL-st/3) มีจุดแยกตำแหน่ง 30-37A บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 (ภาพที่ 5.27g) มีความถี่เท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIS-1 (IIS-st/1) มีจุดแยกตำแหน่ง 46-49A บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพที่ 5.28a) มีความถี่เท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIL-2 (IIL-st/2) มีจุดแยกตำแหน่ง 63A-63C บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพที่ 5.28e) มีความถี่เท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIL-3 (IIL-st/3) มีจุดแยกตำแหน่ง 63-66A บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพที่ 5.28f) มีความถี่เท่ากับ 0.01

จากการศึกษาพบว่า *S. tani* cytoform D มีการกระจายในเขตภาคใต้ ได้แก่ น้ำตกเหมืองหวด จ. สุราษฎร์ธานี น้ำตกตาดฟ้า จ. สุราษฎร์ธานี น้ำตกสุนันทา จ. นครศรีธรรมราช น้ำตกปากแจ่ม จ. ตรัง น้ำตกไพรวัลย์ จ. พัทลุง น้ำตกตะโหมด จ. พัทลุง น้ำตกโตนงาช้าง จ. สงขลา รายละเอียดของแต่ละประชากรมีดังต่อไปนี้

1. น้ำตกเหมืองหวด จ. สุราษฎร์ธานี

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร ประชากรแรกศึกษาจำนวน 98 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 50 ตัว และเพศเมียจำนวน 48 ตัว ส่วนประชากรที่สอง ศึกษาจำนวน 155 ตัว จากการศึกษาสามารถแบ่งประชากรออกเป็น 2 cytoforms ได้แก่ cytoform B (ดังได้อธิบายไปแล้วข้างต้น) และ cytoform D ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

จากการศึกษาในประชากรแรกพบ cytoform D จำนวน 10 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 9 ตัว และเพศเมียจำนวน 1 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 ในเพศผู้ 9 ตัว ในขณะที่เพศเมีย 1 ตัว อยู่ในสภาพ ข้อยกเว้นทางเพศโดยพบในสภาพ III-L-st/5

ส่วนประชากรที่สอง ศึกษาจำนวน 149 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 70 ตัว และเพศเมียจำนวน 79 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 ในเพศผู้ และ III-L-st/st ในเพศเมียทุกตัว (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 2 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-6 พบในสภาพ IS-st/6 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-6 ในประชากรเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 ทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ในประชากรแรกและประชากรที่สองเท่ากับ 1.0 และ 0.96

เนื่องจากอินเวอร์ชัน IS-6 ในประชากรมีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

2. น้ำตกดาดฟ้า จ. สุราษฎร์ธานี

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร โดยประชากรแรกศึกษาจำนวน 122 ตัว (เป็นเพศผู้จำนวน 69 ตัว และเพศเมียจำนวน 54 ตัว) ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 ในเพศผู้ 68 ตัว (98.55%) และ III-L-st/st ในเพศเมียทุกตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศในเพศผู้ ซึ่งพบเพศผู้จำนวน 1 ตัว (1.45%) อยู่ในสภาพ III-L-5/5

ส่วนประชากรที่สองศึกษาจำนวน 45 ตัว (เป็นเพศผู้จำนวน 27 ตัว และเพศเมียจำนวน 18 ตัว) ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 ในเพศผู้ 24 ตัว (88.89%) และ III-L-st/st ในเพศเมีย 17 ตัว (94.44%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ ซึ่งพบเพศผู้จำนวน 1 ตัว (3.70%) อยู่ในสภาพ III-L-st/st และเพศผู้จำนวน 2 ตัว เกิดอินเวอร์ชัน III-L-5/5 (7.41%) ในเพศเมียพบในสภาพ III-L-5/5 จำนวน 1 ตัว (5.56%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 5 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-10 พบในสภาพ IS-st/10 พบจำนวน 1 ตัว ในประชากรที่สองค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-10 ในประชากรเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากรแรก และประชากรที่สองโดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.95 และ 0.93 ตามลำดับ

- อินเวอร์ชัน IL-3 พบในสภาพ IL-st/3 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IL-3 ในประชากรเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIS-1 พบในสภาพ IIS-st/1 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIS-1 ในประชากรเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIL-2 พบในสภาพ IIL-st/2 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIL-2 ในประชากรเท่ากับ 0.01

เนื่องจากอินเวอร์ชันที่ศึกษาในประชากรมีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

3. น้ำตกสันทา จ. นครศรีธรรมราช

ทำการศึกษาน้ำตก 42 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 26 ตัว และเพศเมียจำนวน 16 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 ในเพศผู้ทุกตัว (100%) และ III-L-st/st ในเพศเมียทุกตัว (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 4 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-10 พบในสภาพ IS-st/10 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IS-10 ในประชากรเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบในประชากรแรกทุกตัว โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.99

- อินเวอร์ชัน IIL-2 พบในสภาพ IIS-st/1 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIL-1 ในประชากรเท่ากับ 0.01

- อินเวอร์ชัน IIL-3 พบในสภาพ IIL-st/2 พบจำนวน 1 ตัว ค่าความถี่ของอินเวอร์ชัน IIL-3 ในประชากรเท่ากับ 0.01

เนื่องจากอินเวอร์ชันที่ศึกษาในประชากรมีค่าคาดหวังต่ำจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

4. น้ำตกปากแจ่ม จ. ตรัง

ทำการศึกษาน้ำตก 62 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 26 ตัว และเพศเมียจำนวน 36 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 ในเพศผู้ 23 ตัว (88.46%) และ III-L-st/st ในเพศเมีย 35 ตัว (97.22%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ ซึ่งพบเพศผู้จำนวน 3 ตัว (11.54%) อยู่ในสภาพ III-L-st/st และเพศเมียจำนวน 1 ตัว (2.78%) ในสภาพ III-L-st/5

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

5. น้ำตกไพรวัลย์ จ. พัทลุง

ทำการศึกษาน้ำตก 31 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 18 ตัว และเพศเมียจำนวน 13 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 ในเพศผู้ 17 ตัว (94.44%) และ III-L-st/st ในเพศเมีย 12 ตัว (92.31%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ ซึ่งพบเพศผู้จำนวน 1 ตัว (5.56%) อยู่ในสภาพ III-L-st/st และเพศเมียจำนวน 1 ตัว (7.69%) ในสภาพ III-L-st/5

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 พบ 1 ตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.98

6. น้ำตกตะโหนด จ. พัทลุง

ศึกษาน้ำตก 29 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 14 ตัว และเพศเมียจำนวน 15 ตัว ผลการศึกษาน้ำตกพบอินเวอร์ชัน III-L-st/5 ในเพศผู้ 12 ตัว (85.71%) และ III-L-st/st ในเพศเมีย 15 ตัว (100%) นอกจากนี้ยังพบข้อยกเว้นทางเพศ ซึ่งพบเพศผู้จำนวน 2 ตัว (14.29%) อยู่ในสภาพ III-L-st/st

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

7. น้ำตกโตนงาช้าง จ. สงขลา

ศึกษาจำนวน 8 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 3 ตัว ผลการศึกษาพบอินเวอร์ชัน IIII-st/5 ในเพศผู้ทุกตัว (100%) และ IIII-st/st ในเพศเมียทุกตัว (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

S. tani cytoform E อยู่ในสภาพ fixed inversion IIII-5 (IIII-5/5) ซึ่งเกิดทั้งในเพศผู้และเพศเมีย พบในประชากรจากภาคกลางที่เก็บจาก อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ กิโลเมตรที่ 31 มีรายละเอียดดังนี้
อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ กิโลเมตรที่ 31

ศึกษาจำนวน 38 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 22 ตัว และเพศเมียจำนวน 16 ตัว พบ fixed inversion IIII-5 (IIII-5/5) ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

S. tani cytoform F อยู่ในสภาพ sex-linked inversion โดยเพศผู้อยู่ในสภาพ IIII-st/5,6 (ภาพที่ 5.29g) ในขณะที่เพศเมียอยู่ในสภาพ IIII-5,6/5,6 นอกจากนี้ยังพบ floating inversion จำนวน 2 รูปแบบ ได้แก่

- อินเวอร์ชัน IL-2 (II-st/2, IL-2/2) มีจุดแยกตำแหน่ง 26-32 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 มีความถี่ตั้งแต่ 0.76 -1.0 ในประชากร

- อินเวอร์ชัน III-1 (III-st/1) มีจุดแยกตำแหน่ง 64-65A บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพที่ 5.28d) มีความถี่เท่ากับ 0.18 ในประชากร

จากการศึกษาพบว่า *S. tani* cytoform F มีการกระจายในเขตภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ น้ำตกวังบัวบาน จ. เชียงใหม่ บ้านพัสดุกกลาง จ. กาญจนบุรี น้ำตกทอทิพย์ จ. เพชรบุรี และ เขาพะเนินทุ่ง จ. เพชรบุรี แต่ละประชากรมีรายละเอียดดังนี้

ภาคเหนือ

1. น้ำตกวังบัวบาน จ. เชียงใหม่

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 84 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C จำนวน 74 ตัว (ซึ่งได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น) และ cytoform F จำนวน 10 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 7 ตัว และเพศเมียจำนวน 3 ตัว ผลการศึกษาพบว่าเพศผู้อยู่ในสภาพ IIII-st/5,6 ทุกตัว ส่วนเพศเมียเกิดข้อยกเว้นทางเพศ โดยพบในสภาพอินเวอร์ชัน IIII-st/5,6 ทุกตัว

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบ 4 ตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.35

ภาคกลาง

2. บ้านพัสดกลาง จ. กาญจนบุรี

ศึกษาจำนวน 72 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 38 ตัว และเพศเมียจำนวน 34 ตัว ผลการศึกษาพบว่าเพศผู้อยู่ในสภาพ III-L-st/5,6 จำนวน 37 ตัว (97.37%) และเพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-5,6/5,6 จำนวน 31 ตัว (91.18%) นอกจากนี้ยังพบข้อบกพร่องทางเพศโดยเพศผู้ที่อยู่ในสภาพอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 จำนวน 1 ตัว (2.63%) และเพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-st/5,6 จำนวน 3 ตัว (8.82%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 2 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบ 67 ตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.76

- อินเวอร์ชัน IIL-1 พบในสภาพ IL-st/2 พบ 23 ตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.30

ผลการทดสอบสมภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg พบว่าอินเวอร์ชัน IL-2 และ IIL-1 อยู่ในสมภาวะสมดุล ($P > 0.75$ และ $P > 0.95$) (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) เนื่องจากมีจำนวนประชากรในสภาพเฮเทอโรไซกัสจำนวนมาก ส่วนอินเวอร์ชัน IIL-1 ไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากค่าคาดหวังในประชากรต่ำ

3. น้ำตกทอทิพย์ จ. เพชรบุรี

ทำการศึกษาทั้งหมดจำนวน 41 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform B จำนวน 3 ตัว ซึ่งได้อธิบายไปแล้วในข้างต้น และ cytoform F จำนวน 38 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 21 ตัว และเพศเมียจำนวน 17 ตัว ผลการศึกษาพบว่าเพศผู้ที่อยู่ในสภาพ III-L-st/5,6 จำนวน 13 ตัว (61.90%) และเพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-5,6/5,6 จำนวน 11 ตัว (64.71%) นอกจากนี้ยังพบข้อบกพร่องทางเพศโดยเพศผู้ที่อยู่ในสภาพอินเวอร์ชัน III-L-5,6/5,6 จำนวน 8 ตัว (38.09%) และเพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-st/5,6 จำนวน 6 ตัว (35.29%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/2 และ IL-2/2 พบ 39 ตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.91

4. เขาพะเนินทุ่ง จ. เพชรบุรี

ทำการศึกษาทั้งหมดจำนวน 11 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C จำนวน 9 ตัว (ดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น) และ cytoform F จำนวน 2 ตัว ซึ่งเป็นเพศเมียทั้งหมดและเกิดข้อบกพร่องทางเพศ คืออยู่ในสภาพอินเวอร์ชัน III-L-st/5,6 นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

S. tani cytoform G อยู่ในสภาพ sex-linked inversion โดยเพศผู้ที่อยู่ในสภาพ III-L-5/5,6 ในขณะที่เพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-5/5 นอกจากนี้ยังพบ floating inversion จำนวน 3 รูปแบบ ในประชากรได้แก่

- อินเวอร์ชัน IS-2 (IS-st/2) มีจุดแยกตำแหน่ง 7C-8B บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 (ภาพที่ 5.27a) มีความถี่เท่ากับ 0.07 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IL-2 (IL-st/2, IL-2/2) มีจุดแยกตำแหน่ง 26-32 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 1 มีความถี่ตั้งแต่ 0.94 -1.0 ในประชากร
- อินเวอร์ชัน IIIL-18 (IIIL-st/18) มีจุดแยกตำแหน่ง 26-32 บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 มีความถี่ในประชากรเท่ากับ 0.07

จากการศึกษาพบว่า *S. tani* cytoform G มีการกระจายในเขตภาคเหนือ ในจังหวัดแม่ฮ่องสอน ได้แก่ ปางมะผ้า 1 ปางมะผ้า 2 บ้านปางแปก และ บ้านนาจั่ว โดยมีรายละเอียดของแต่ละประชากรดังนี้

1. ปางมะผ้า 1 จ.แม่ฮ่องสอน

ทำการศึกษานับจำนวน 23 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 13 ตัว และเพศเมียจำนวน 10 ตัว ผลการศึกษพบเพศผู้ทุกตัว อยู่ในสภาพ IIIL-5/5,6 (100%) และเพศเมียทุกตัวอยู่ในสภาพ IIIL-5/5 (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 3 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IS-2 พบในสภาพ IS-st/2 พบ 3 ตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.07

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/1 และ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

- อินเวอร์ชัน IIIL-18 พบในสภาพ IIIL-st/18 พบ 3 ตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.07

เนื่องจากประชากรที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถทดสอบสมมติฐานของ Hardy-Weinberg ได้

2. ปางมะผ้า 2 จ.แม่ฮ่องสอน

ศึกษานับจำนวน 48 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 29 ตัว และเพศเมียจำนวน 19 ตัว ผลการศึกษพบเพศผู้ทุกตัวอยู่ในสภาพ IIIL-5/5,6 (100%) และเพศเมียทุกตัวอยู่ในสภาพ IIIL-5/5 (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

3. บ้านปางแปก จ.แม่ฮ่องสอน

จากการศึกษานับจำนวน 9 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 6 ตัว และเพศเมียจำนวน 3 ตัว ผลการศึกษพบเพศผู้ทุกตัวอยู่ในสภาพ IIIL-5/5,6 (100%) และเพศเมียทุกตัวอยู่ในสภาพ IIIL-5/5 (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-st/1 และ IL-2/2 พบ 8 ตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 0.94

4. บ้านนาจั่ว จ.แม่ฮ่องสอน

ศึกษานับจำนวน 7 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 2 ตัว ผลการศึกษพบเพศผู้ทุกตัวอยู่ในสภาพ IIIL-5/5,6 (100%) และเพศเมียทุกตัวอยู่ในสภาพ IIIL-5/5 (100%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

5. ด้านตรวจแม่โก จ. เชียงใหม่

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 67 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C H และ G โดยพบว่าเป็น cytoform G จำนวน 2 ตัว (เพศเมีย) ซึ่งอยู่ในสภาพ III-L-5/5 และพบอินเวอร์ชัน IL-2 ในสภาพ IL-2/2 ทุกตัวในประชากร

6. บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 70 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C H และ G โดยพบว่าเป็น cytoform G จำนวน 3 ตัว ในประชากรแรก (เพศผู้ 2 ตัว และ เพศเมีย 1 ตัว) และพบในประชากรที่สองจำนวน 1 ตัว (เพศเมีย) โดยเพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-5/5 ส่วนเพศผู้เกิดข้อบกพร่องทางเพศ โดยอยู่ในสภาพ III-L-5/5 เช่นเดียวกับตัวเมีย

7. บ้านปางน้ำถุ จ. เชียงใหม่

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 68 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C, H และ G โดยพบว่าเป็น cytoform G เพียง 1 ตัว ในประชากรแรก โดยเป็นเพศผู้และเกิดข้อบกพร่องทางเพศ โดยอยู่ในสภาพ III-L-5/5

S. tani cytoform H อยู่ในสภาพ sex-linked inversion โดยเพศผู้อยู่ในสภาพ III-L-st/19 ในขณะที่เพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-19/19 (อินเวอร์ชัน III-L-19 มีจุดหักบริเวณ 92C-93B บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3) จากการศึกษาพบอินเวอร์ชัน IL-2 ในทุกประชากร โดยมีความถี่ในประชากรเท่ากับ 1.0

จากการศึกษาพบว่า **S. tani cytoform G** มีการกระจายในเขตภาคเหนือโดยพบในประชากรจาก น้ำตกแม่สุรินทร์ จ.แม่ฮ่องสอน ด้านตรวจแม่โก จ.เชียงใหม่ บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่ บ้านปางน้ำถุ จ.เชียงใหม่ รายละเอียดของแต่ละประชากรมีดังนี้

1. น้ำตกแม่สุรินทร์ จ.แม่ฮ่องสอน

ศึกษาทั้งหมดจำนวน 35 ตัว โดยแบ่งเป็น cytoform C จำนวน 28 ตัว (ได้อธิบายไปแล้วในข้างต้น) และ cytoform H จำนวน 7 ตัว เป็นเพศผู้จำนวน 6 ตัว และเพศเมียจำนวน 1 ตัว โดยเพศผู้ทุกตัวอยู่ในสภาพ III-L-st/19 (100%) ในขณะที่เพศเมียจำนวน 1 ตัว เกิดข้อบกพร่องทางเพศโดยอยู่ในสภาพ III-L-st/19 เช่นเดียวกับเพศผู้ นอกจากนี้ยังพบเพศผู้จำนวน 3 ตัวซึ่งนอกจากจะเกิดอินเวอร์ชัน III-L-st/19 แล้วยังเกิดอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 (50%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

2. ด้านตรวจแม่โก จ.เชียงใหม่

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร ประชากรแรกประกอบด้วย cytoform C (22 ตัว), cytoform H (1 ตัว) และ cytoform G (2 ตัว) (ตารางที่ 5.12) ส่วนประชากรที่สองประกอบด้วย cytoform C 26 ตัว และ cytoform H 5 ตัว ซึ่งในส่วนของ cytoform C ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น

Cytoform H ศึกษาจำนวน 2 ประชากร โดยมีจำนวนรวมทั้งสิ้น 4 ตัว (เป็นเพศผู้จำนวน 1 ตัว และเพศเมียจำนวน 3 ตัว) พบเพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-19/19 แต่พบข้อบกพร่องทางเพศในเพศผู้ประชากรที่สองจำนวน 1 ตัว ซึ่งไม่พบอินเวอร์ชัน III-L-st/19

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

3. บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่

ทำการศึกษาจำนวน 3 ประชากร ประชากรแรกประกอบด้วย cytoform C 11 ตัว, cytoform H 15 ตัว และ cytoform G 3 ตัว (ตารางที่ 5.12) ประชากรที่สองประกอบด้วย cytoform C 8 ตัว และ cytoform H 3 ตัว และ cytoform G 3 ตัว ส่วนประชากรที่สามประกอบด้วย cytoform C 3 ตัว และ cytoform H 4 ตัว (ซึ่งในส่วนของ cytoform C ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น)

Cytoform H ศึกษาจำนวน 3 ประชากร โดยมีจำนวนรวมทั้งสิ้น 22 ตัว (เป็นเพศผู้และเพศเมียจำนวน 11 ตัว) โดยเพศผู้อยู่ในสภาพ III-L-st/19 จำนวน 10 ตัว (90.91%) และเพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-19/19 จำนวน 10 ตัว (90.91%) เช่นกัน แต่พบข้อบกพร่องทางเพศโดยพบเพศผู้จำนวน 1 ตัว (9.09%) อยู่ในสภาพ III-L-19/19 และพบเพศเมียจำนวน 1 ตัว อยู่ในสภาพ III-L-st/19 (9.09%) นอกจากนี้ยังพบเพศผู้จำนวน 2 ตัว ซึ่งนอกจากจะเกิดอินเวอร์ชัน III-L-st/19 แล้วยังเกิดอินเวอร์ชัน III-L-5/5,6 (18.18%)

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

4. บ้านปางน้ำฤ จ. เชียงใหม่

ศึกษาจำนวน 2 ประชากร ประชากรแรกประกอบด้วย cytoform C (19 ตัว), cytoform H (3 ตัว) และ cytoform G (1 ตัว) (ตารางที่ 5.12) ส่วนประชากรที่สองประกอบด้วย cytoform C 19 ตัว และ cytoform H 16 ตัว (ซึ่งในส่วนของ cytoform C ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น)

Cytoform H ศึกษาจำนวน 2 ประชากร ประชากร โดยมีจำนวนรวมทั้งสิ้น 19 ตัว (เป็นเพศผู้จำนวน 9 ตัว และเพศเมียจำนวน 10 ตัว) โดยเพศผู้อยู่ในสภาพ III-L-st/19 จำนวน 9 ตัว (100%) และเพศเมียอยู่ในสภาพ III-L-19/19 จำนวน 9 ตัว (90%) แต่พบข้อบกพร่องทางเพศโดยพบเพศเมียจำนวน 1 ตัว อยู่ในสภาพ III-L-st/19 (10%) ในประชากรแรก

นอกจากนี้ยังพบ floating inversion 1 รูปแบบ คือ

- อินเวอร์ชัน IL-2 พบในสภาพ IL-2/2 พบทุกตัวในประชากร โดยมีความถี่ของอินเวอร์ชันเท่ากับ 1.0

5.7.5 สรุปผล

จากการเปรียบเทียบการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมของ *S. tani* สามารถแบ่ง *S. tani* ได้เป็น 8 cytoforms ดังต่อไปนี้

S. tani cytoform A เกิด fixed inversion IIII-5,6 แบบโฮโมไซกัสในประชากรทั้งหมด

S. tani cytoform B ไม่พบ fixed inversion ในประชากร (เพศผู้และเพศเมียมีการเรียงตัวแบบโฮโมไซกัส IIII-st/st)

S. tani cytoform C เกิด sex linked inversion โดยเกิดอินเวอร์ชัน IIII-5,6 บนโครโมโซม X ทำให้เพศเมียอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส IIII-5,6/5,6 ส่วนเพศผู้อยู่ในสภาพเฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6

S. tani cytoform D เกิด sex linked inversion โดยเกิดอินเวอร์ชัน IIII-5 บนโครโมโซม Y ทำให้เพศผู้อยู่ในสภาพเฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชัน IIII-st/5 ส่วนเพศเมียมีการเรียงตัวแบบโฮโมไซกัส IIII-st/st

S. tani cytoform E เกิด fixed inversion IIII-5 แบบโฮโมไซกัสทั้งหมด

S. tani cytoform F เกิด sex linked inversion โดยเกิดอินเวอร์ชัน IIII-5,6 บนโครโมโซม X ทำให้เพศเมียอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส IIII-5,6/5,6 ส่วนเพศผู้อยู่ในสภาพเฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชัน IIII-st/5,6

S. tani cytoform G เกิด sex linked inversion โดยเกิดอินเวอร์ชัน IIII-5 บนโครโมโซม X ทำให้เพศเมียอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส IIII-5/5 ส่วนเพศผู้อยู่ในสภาพเฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชัน IIII-5/5,6

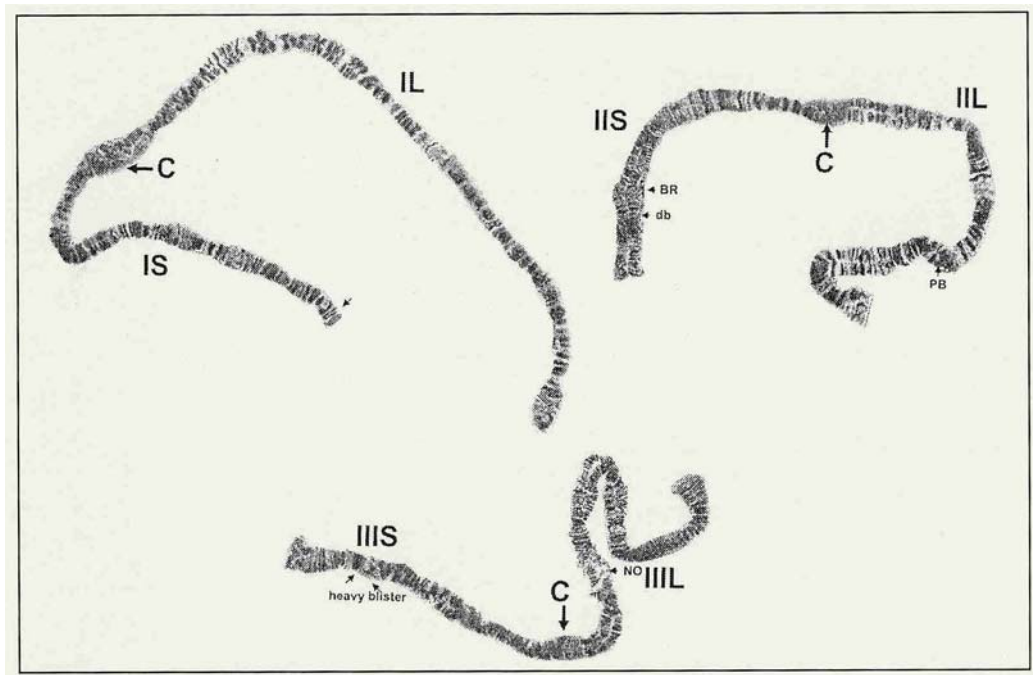
S. tani cytoform H เกิด sex linked inversion โดยเกิดอินเวอร์ชัน IIII-19 บนโครโมโซม X ทำให้เพศเมียอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส IIII-19/19 ส่วนเพศผู้อยู่ในสภาพเฮเทโรไซกัสอินเวอร์ชัน IIII-st/19

จากการทดสอบสมมติฐานของอินเวอร์ชันโดยวิธี χ^2 test พบว่าอินเวอร์ชันส่วนใหญ่อยู่ในสภาวะสมมูลของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($P>0.05$) ยกเว้นอินเวอร์ชัน IS-7 และ IS-2 ในบางประชากรจาก น้ำตกวังบัวบาน จ. เชียงใหม่ ด่านตรวจแม่เฒ่า จ. เชียงใหม่ บ้านพักดุกกลาง จ. กาญจนบุรี น้ำตกบกกราย จ. ระนอง และ ห้วยรู้ จ. ระนอง (ตารางที่ A-3 ในภาคผนวก 2) อาจเป็นไปได้ว่าประชากรในกลุ่มมีการเลือกผสมพันธุ์ซึ่งไม่เป็นแบบสุ่ม (nonrandom mating)

5.7.6 การศึกษาโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนรินดำชนิด *Simulium* sp. nr. *chamlongi* และ *Simulium* sp. nr. *feuerborni*

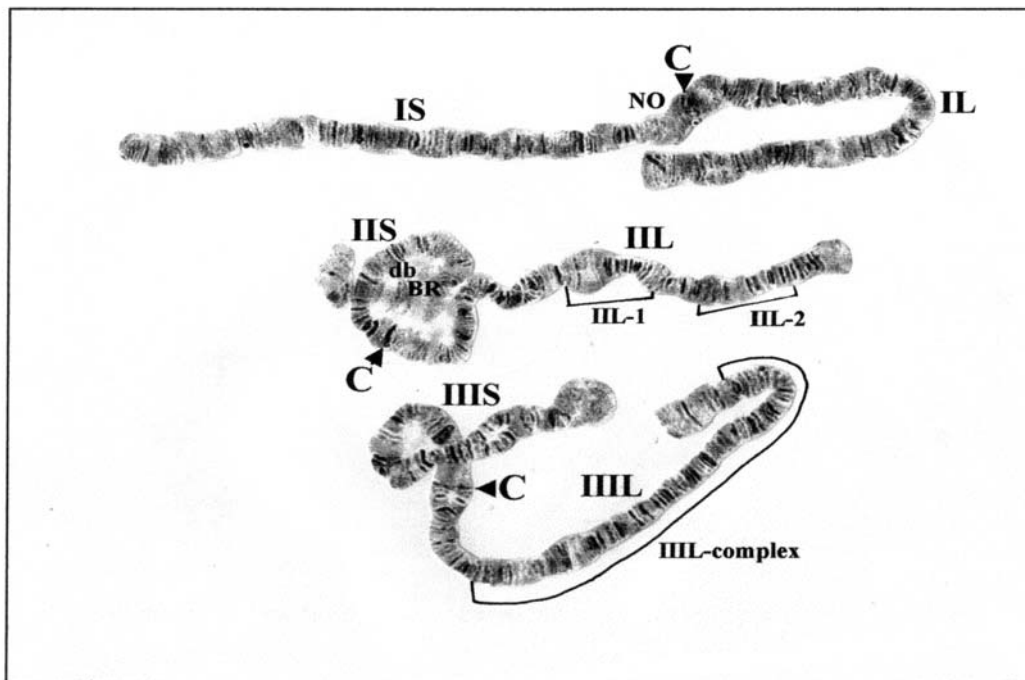
1. *Simulium* sp. nr. *chamlongi*

เนื่องจากตัวอ่อนของ *Simulium* sp. nr. *chamlongi* ที่เก็บมาจากวนอุทยานทุ่งบัวตอง อ. ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน มีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกับ *Simulium chamlongi* จากน้ำตกสิริภูมิ อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่ แต่มีลักษณะบางอย่างต่างกัน จึงไม่แน่ใจว่ารินดำทั้งสองชนิดจะเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ จากการเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซม (ภาพที่ 5.30) ของแมลงรินดำทั้งสองชนิดพบว่ามีความเหมือนกัน ดังนั้นแมลงรินดำทั้งสองจึงเป็นชนิดเดียวกัน



ภาพที่ 5.30 แผนภาพโพลีทีนโครโมโซมของแมลงวันดำชนิด *S. sp. nr. Chamlongi* C= centromere; NO= nucleolar organizer; db= double bubble; BR= Ring of Balbiani

feuerborni จากขุนวางและทุ่งบัวตองเป็นคนละสปีชีส์กับ *S.feuerborni* จากอุทยานแห่งชาติ ดอยอินทนนท์ ซึ่งต้องทำการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมและทำการศึกษาโพลีทีนโครโมโซมให้ละเอียดต่อไป และจากการศึกษารูปแบบการจัดเรียงตัวของแบนด์บนโพลีทีนโครโมโซมของตัวอ่อนของชนิด *S. sp. nr.feuerborni* 1 ที่เก็บมาจากอุทยานแห่งชาติขุนวาง อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ และ *S. sp. nr.feuerborni* 2 ที่เก็บมาจากวนอุทยานทุ่งบัวตอง อ. ขุนยวม จ. แม่ฮ่องสอน พบว่าเป็นชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีรูปแบบการเกิดอินเวอร์ชันรูปแบบ IIII-3complex เหมือนกันทุกตัว นอกจากนี้ยังพบ อินเวอร์ชันแบบ IIL-2 และพบ B- chromosome ในประชากรทั้งสองด้วย (ภาพที่ 5.31)



ภาพที่ 5.31 แผนภาพโพลีทีนโครโมโซมของแมลงริ้นดำชนิด *S. sp. nr. feuerborni*1 แสดงตำแหน่งการเกิดอินเวอร์ชันแบบ IIL-1 และ IIL-2 บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 2 และตำแหน่งการเกิดอินเวอร์ชันแบบ IIL-complex บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 3 C= centromere; NO= nucleolar organizer; db= double bubble; BR= Ring of Balbiani

5.7.7 สรุปผล

การศึกษาโพลีทีนโครโมโซมช่วยทำให้การแยกชนิดของแมลงริ้นดำถูกต้องและแม่นยำมากกว่า การศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะชิปลิงสปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน ที่มีรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาล้ำคล้ายคลึงกันมากจนแยกกันไม่ออก ดังนั้นโพลีทีนโครโมโซมจึงมีประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการของการแตกแขนงเป็นสปีชีส์ใหม่และการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของประชากรธรรมชาติที่เก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

5.8 การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium tani*, *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestriatum* โดยการศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรสิ่งมีชีวิตจะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อกระบวนการวิวัฒนาการและอาจสามารถบ่งชี้ถึงปัจจัยที่นำไปสู่การเกิดสปีชีส์ใหม่นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเข้าใจในรูปแบบการกระจายของความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อรูปแบบดังกล่าวซึ่งจะมีประโยชน์ทั้งทางด้านวิชาการและการอนุรักษ์ ถึงแม้

ประเทศไทยจะมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงแต่องค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับประชากรยังมีน้อยมาก การศึกษาส่วนใหญ่ยังจำกัดในบางพื้นที่ไม่ครอบคลุม แมลงวันดำมีความเหมาะสมในการเป็นต้นแบบสำหรับศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมเพราะมีการกระจายที่กว้างขวางทั่วประเทศ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในด้านอื่นๆ เช่น อนุกรมวิธาน นิเวศวิทยา และเซลล์พันธุศาสตร์ควบคู่ไปด้วยซึ่งจะทำให้ข้อมูลที่ได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงวันดำ 3 ชนิดที่มีการกระจายอย่างกว้างขวางในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ *Simulium tani*, *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestriatum*

5.8.1 ตัวอย่างและวิธีการ

1. ตัวอย่างของแมลงวันดำทั้งสามชนิดเก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ (ตารางที่ 5.12) วิธีการเก็บและการรักษาตัวอย่างได้ทำตามวิธีที่อธิบายแล้วในหัวข้อ 3.4.2

2. วิธีการศึกษาอนุพันธุศาสตร์

สกัดดีเอ็นเอจากส่วนหัวและอกของตัวอ่อนที่ทำการศึกษาโพลีทีนโครโมโซมยีนย่นสปีชีส์แล้วดีเอ็นเอบางส่วนได้จากตัวดักแด้วิธีการสกัดดีเอ็นเอทำตามวิธีของ Collins et al. (1987) แล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ในส่วนของยีน cytochrome oxidase subunit I (COI) โดยใช้ไพรเมอร์ C1-J-2195 (5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3'; Simon et al. 1994) และ UEA10 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'; Lunt et al. 1996) โดยทำ PCR ปริมาตร 50 μ l ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.4 μ M ของไพรเมอร์แต่ละชนิด 2 unit Taq DNA polymerase (Promega) และ 2 μ l ของ DNA (dilute 1:20 ถึง 1:40) โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับ PCR ประกอบด้วย 94°C 5 นาที ตามด้วย 36 รอบของ 95°C 40 วินาที 45°C 50 วินาที และ 72°C 60 วินาที จากนั้นตามด้วย 72°C 5 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่มี ethidium bromide 0.5 μ g/mL และส่องภายใต้แสง UV ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย GENE CLEAN KIT (BIO101) นำผลผลิต PCR ที่บริสุทธิ์แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์เดียวกับที่ใช้ใน PCR หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านโดยเครื่อง ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystem)

3. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณยีน COI

ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมลงวันดำชนิด *Simulium tani* จำนวน 147 ตัวอย่างจาก 16 ประชากร *Simulium nakhonense* จำนวน 123 ตัวอย่างจาก 13 ประชากร และ *Simulium quinquestriatum* จำนวน 84 ตัวอย่างจาก 11 ประชากร โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X (Thompson et al. 1997) และใช้โปรแกรม MODELTEST 3.06 (Posada and Crandall 1998) เพื่อทดสอบหาโมเดลของ DNA substitution ที่เหมาะสมโดยใช้ hierarchical likelihood ratio test พบว่า HKY + I + G (Hasegawa et al. 1985) เป็นโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ *S. tani* ซึ่งมีค่า I = 0.6360 และ G = 0.6365 ค่า transition/transversion = 12.0953 องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์มีสัดส่วนดังนี้ A = 0.319, G = 0.160, C = 0.124 และ T = 0.347 สำหรับ

S. nakhonense และ *S. quinquestriatum* โมเดลของ nucleotide substitution ที่เหมาะสมที่สุดคือ TrN + I + G โดยมีค่า I = 0.7457 และ 0.7886 และค่า G = 1.3022 และ 1.2046 สำหรับ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ตามลำดับ ค่าสัดส่วนองค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ของ *S. nakhonense* คือ A = 0.308, C = 0.174, G = 0.153 และ T = 0.364 และ *S. quinquestriatum* คือ A = 0.308, C = 0.178, G = 0.156 และ T = 0.358

2. การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotype (haplotype network)

วิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotype โดยใช้ median-joining algorithm (Bandelt et al.1999) โดยใช้โปรแกรม NETWORK 3.x (www.fluxus-engineering.com) โดยทำการวิเคราะห์แยกแยะระหว่าง *S. tani* และ *S. nakhonense* กับ *S. quinquestriatum* ทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ D3 haplotypes โดยการสร้าง UPGMA tree โดยใช้โปรแกรม MEGA (Kumar et al. 2004)

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร

คำนวณค่าความหลากหลายของ haplotype (haplotype diversity) ความหลากหลายของ นิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) ค่า $\theta_s = 2Ne\mu$ และค่า F_{ST} ระหว่างประชากรโดยโปรแกรม ARLEQUIN 2.000 (Schneider et al. 2000) โดยใช้ค่า Gamma distribution (G) จาก MODELTEST ทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดย permutation ข้อมูล 1,000 replications ใช้โปรแกรม SAMOVA (Dupanloup et al. 2002) เพื่อจัดกลุ่มประชากรตามระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากร โดยการกำหนดจำนวนกลุ่มของประชากร (k) โปรแกรมจะจัดกลุ่มประชากรโดยให้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม (F_{SC}) มีค่าต่ำที่สุดและค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (F_{CT}) มีค่าสูงที่สุด ทำการ run SAMOVA ด้วย 100 simulated annealing processes โดยกำหนดค่า k = 2 ถึง 10 (2 – 8 สำหรับ *S. quinquestriatum*) กลุ่มประชากรที่จัดได้

ตารางที่ 5.12 รายละเอียดของประชากรของ *Simulium tani*, *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestriatum* ที่ทำการศึกษา

ประชากร	สัญลักษณ์	ภูมิภาค	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (m)	วันเดือนปี
1. น้ำตกวังควาย อช.ดอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่	CM1	เหนือ	18° 30' N/98° 40' E	506	14.11.03
2. น้ำตกหมอกฟ้า อ.แม่วิม จ.เชียงใหม่	CM2	เหนือ	19° 06' N/98° 46' E	545	07.06.46
3. น้ำตกแม่ยะ อช.ดอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่	CM3	เหนือ	18° 20' N/98° 20' E	500	13.12.02
4. บ้านปางน้ำถุ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM4	เหนือ	19° 06' N/99° 27' E	663	11.11.03
5. บ้านห้วยหม้อ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM5	เหนือ	19° 02' N/99° 20' E	850	03.06.46
6. บ้านนาจิว อ.ขุนยวม จ.แม่ฮ่องสอน	MS1	เหนือ	18° 49' N/98° 02' E	814	05.06.46
7. บ้านปางแปก อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน	MS2	เหนือ	19° 26' N/98° 21' E	840	06.06.46
8. อช.ถ้ำปลา-ผาเสื่อ จ.แม่ฮ่องสอน	MS3	เหนือ	19° 25' N/97° 59' E	500	06.06.03
9. บ้านแม่อุคอ อ.ขุนยวม จ.แม่ฮ่องสอน	MS4	เหนือ	18° 49' N/98° 02' E	1,000	05.06.03
10. น้ำตกแม่เงิงหลวง อ.วังชิ้น จ.แพร่	PR	เหนือ	17° 58' N/98° 35' E	300	04.12.46
11. น้ำตกคลองวังเจ้า จ.ตาก	TK1	เหนือ	16° 30' N/99° 09' E	506	14.11.03
12. น้ำตกลานเลี้ยวม้า อช.ลานสาง จ.ตาก	TK2	เหนือ	16° 46' N/99° 01' E	260	29.06.03
13. สะพาน กม.16 อ.เมือง จ.ตาก	TK3	เหนือ	16° 46' N/99° 01' E	250	29.06.46
14. น้ำตกคลองน้ำไหล อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร	KP1	เหนือ	16° 11' N/99° 15' E	300	28.06.03
15. น้ำตกคลองลาน อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร	KP2	เหนือ	16° 07' N/99° 16' E	250	28.06.03
16. น้ำตกภูสอยดาว อ.น้ำปาด จ.อุตรดิตถ์	UT	เหนือ	17° 42' N/100° 57' E	650	18.10.46
17. น้ำตกตาหมอก อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์	PB	เหนือ	16° 21' N/101° 21' E	468	25.10.46

ตารางที่ 5.12 (ต่อ)

ประชากร	สัญลักษณ์	ภูมิภาค	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (m)	วันเดือนปี
18. ถ้ำธารลอด อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี	KB1	กลาง	14° 39'N/99° 18'E	282	12.08.46
19. ห้วยเขย่ง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KB2	กลาง	14° 37' N/98° 31' E	202	29.02.04
20. น้ำตกทอทิพย์ อ.เมือง จ.เพชรบุรี	PE1	กลาง	12° 50'N/99° 19'E	400	16.08.46
21. บ้านกว้างแคมป์ อช.แก่งกระจาน จ.เพชรบุรี	PE2	กลาง	12° 47' N/99° 27' E	318	16.08.03
22. น้ำตกเขาสอยดาว อ.สอยดาว จ.จันทบุรี	CB1	ตะวันออก	13° 06'N/102° 11'E	320	20.06.46
23. น้ำตกคลองนารายณ์ อ.เมือง จ.จันทบุรี	CB2	ตะวันออก	12° 34'N/102° 10'E	70	19.06.46
24. น้ำตกเขาชะเมา อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	RY	ตะวันออก	12° 54'N/101° 43'E	65	19.06.46
25. ห้วยเหมือง อ.เมือง จ.ระนอง	RN1	ใต้	09° 44' N/98° 36' E	46	14.07.03
26. น้ำตกชุมแสง อ.กระบุรี จ.ระนอง	RN2	ใต้	10° 31' N/98° 54' E	35	08.01.04
27. น้ำตกบกกกราย อ.กระบุรี จ.ระนอง	RN3	ใต้	10° 22'N/98° 51'E	65	15.07.46
28. ห้วยรัง อ.เมือง จ.ระนอง	RN4	ใต้	10° 02'N/98° 39'E	80	14.07.46
29. น้ำตกตำหนัก อช.ศรีพังงา จ.พังงา	PG1	ใต้	08° 59' N/98° 27' E	43	07.01.04
30. น้ำตกโดนไพร อ.ท้ายเหมือง จ. พังงา	PG2	ใต้	08° 25' N/98° 18' E	29	07.03.04
31. น้ำตกดาดฟ้า อช.ไทร่มเย็น จ.สุราษฎร์ธานี	SR1	ใต้	08° 51' N/99° 28' E	260	14.07.03
32. น้ำตกเหมืองทวด อ.บ้านนาสาร จ.สุราษฎร์ธานี	SR2	ใต้	08° 45'N/99° 26'E	120	29.07.43
33. บ้านนิมิตรใหม่ กิ่ง อ.ช้างกลาง จ.นครศรีธรรมราช	NS1	ใต้	08° 20' N/99° 40' E	80	13.07.03
34. น้ำตกพรหมโลก อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช	NS2	ใต้	08° 31' N/99° 48' E	50	13.07.03
35. น้ำตกแม่เสร็จฐิ อ.ร่อนพิบูลย์ จ. นครศรีธรรมราช	NS3	ใต้	08° 09' N/99° 49' E	74	06.03.04

มีค่า F_{CT} สูงที่สุดถือว่าการจัดกลุ่มประชากรที่ดีที่สุด ทำการทดสอบ Isolation by distance โดย Mantel (1967) test ด้วยโปรแกรม IBD 1.52 (Bohonak 2002) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางภูมิศาสตร์กับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม

4. ประวัติศาสตร์ประชากร (Population history)

ทำการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรด้วย mismatch distribution ร่วมกับการใช้หลักการ coalescent theory และการวิเคราะห์ด้วย maximum likelihood framework โดยใช้โปรแกรม LAMARC 1.2.2 (Kuhner *et al.* 2004) ทำการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรตามกลุ่มประชากรที่จัดโดยโปรแกรม SAMOVA โดยผลของ mismatch distribution จะได้รูปกราฟที่เป็นรูป unimodal สำหรับประชากรที่เกิด population expansion และกราฟจะเป็นรูป multimodal ในประชากรที่มีขนาดไม่เปลี่ยนแปลง (stable population) (Roger and Harpending 1992) ทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของ mismatch distribution โดย permutation 1000 replications ของชุดข้อมูลและ simulation ข้อมูลภายใต้เงื่อนไขของ stepwise expansion model จากนั้นเปรียบเทียบค่า Sum of Square Deviation (SSD) ระหว่างค่า observed กับ simulation นอกจากนี้ยังทำการคำนวณค่า population expansion parameters ซึ่งประกอบด้วย expansion time ($\tau = 2ut$, โดย $u = m_T\mu$ ซึ่ง m_T คือความยาวของนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทำการศึกษา และ μ คือ mutation rate และ t คือ time in generation) ค่า $\theta_0 = 2\mu N_e$ และ $\theta_1 = 2\mu N_e$ โดย θ_0 คือค่า theta ก่อนเกิด population expansion และ θ_1 คือค่า theta หลังเกิด population expansion โดยค่า θ_1 จะมีค่ามากกว่า θ_0 มากในกรณีที่เกิด population expansion สำหรับการวิเคราะห์ด้วย LAMARC นั้นโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์หาค่า effective population size ($\theta = 2\mu N_e$), ค่า growth rate (g) และ migration rate ($M=m/\mu$ โดย m คือ migration rate ต่อ generation และ μ คือ mutation rate)

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรด้วย Tajima' D (Tajima 1989) และ F_s (Fu 1997) โดยทั้งสองค่านี้จะมีค่าเป็นลบในประชากรที่เกิด population expansion ทดสอบค่าทางสถิติของ Tajima' D และ F_s ด้วย permutation 1000 replications และคำนวณด้วยโปรแกรม ARLEQUIN

5.8.2 ผลการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงวันดำ

1. ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

Simulium tani

จากความยาวนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษา 720 นิวคลีโอไทด์และตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 147 ตัวอย่างพบว่าเกิดความแปรผันของนิวคลีโอไทด์ 127 ตำแหน่งซึ่งทั้งหมดเป็นการแทนที่เบส (base substitution) โดย 110 ตำแหน่งเป็นการแทนที่แบบ transition และ 17 ตำแหน่งเป็นการแทนที่แบบ transversion จำนวน haplotypes ทั้งหมดที่พบคือ 121 haplotypes โดย haplotype ที่มีการกระจายกว้างขวางที่สุดพบใน 4 ประชากรจากภาคเหนือ (TK3) ภาคกลาง (PE1) และภาคใต้ (RN3 และ RN4) ค่าความหลากหลายของ haplotype (ตารางที่ 5.13) มีค่าระหว่าง 0.857 – 1.000 ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่าระหว่าง 0.003 – 0.016 โดยระดับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์นี้มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระยะทาง ($R^2 = 0.3501$, $p=0.016$, ภาพที่ A-13 ในภาคผนวก 1)

Simulium nakhonense

จากความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ทำการศึกษา 720 คู่เบส จากตัวอย่างทั้งหมด 123 ตัวอย่างจาก 13 ประชากร พบว่าเกิดความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 92 ตำแหน่งโดยทั้งหมดเป็นการแทนที่เบส (base substitution) การแทนที่เบสส่วนใหญ่ (87 ตำแหน่ง หรือ 94.57%) เป็นการแทนที่แบบ transition และ 5 ตำแหน่ง (5.43%) เป็นการแทนที่แบบ transversion จำนวนแฮพโลไทป์ (haplotype) ที่พบทั้งหมดคือ 78 แฮพโลไทป์ โดยแฮพโลไทป์ที่มีการกระจายกว้างที่สุดพบใน 3 ประชากรจากภาคเหนือ (CM2) และภาคกลาง (KB2 และ PE2) ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) (ตารางที่ 5.14) มีค่าระหว่าง 0.0005 – 0.017 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.015 ระดับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์นี้มีแนวโน้มลดลงในประชากรภาคใต้ ค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์มีค่าระหว่าง 0.318 – 1.000 (ตารางที่ 5.14)

นอกเหนือจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแล้ว ยังได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S ribosomal DNA ส่วน D3 โดยส่วนที่ทำการศึกษามีความยาวทั้งหมด 251 คู่เบส จากจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด 14 ตัวอย่าง พบว่าเกิดความแปรผันทั้งหมด 3 ตำแหน่ง โดยเป็นการแทนที่เบส 1 ตำแหน่งและเกิด insertion/deletion 2 ตำแหน่ง จำนวนแฮพโลไทป์ทั้งหมด 2 แฮพโลไทป์ แฮพโลไทป์ที่มีการกระจายกว้างที่สุดพบใน 9 ประชากรจากภาคเหนือ (CM2, MS3, PB และ TK2) ภาคกลาง (KB2 และ PE2) และภาคใต้ (RN1, NS2 และ PG1)

Simulium quinquestriatum

จากความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 720 คู่เบส และตัวอย่างทั้งหมด 84 ตัวอย่างจาก 11 ประชากร พบว่าเกิดความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cytochrome oxidase ยีนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ 88 ตำแหน่ง โดยทั้งหมดเป็นการแทนที่เบส ซึ่งส่วนใหญ่ (79 ตำแหน่ง หรือ 89.77%) เป็นการแทนที่แบบ transition และ 9 ตำแหน่ง (10.23%) เป็นการแทนที่แบบ transversion จำนวนแฮพโลไทป์ทั้งหมดที่พบคือ 71 haplotypes ค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์มีค่าระหว่าง 0.000 – 1.000 (ตารางที่ 5.15) โดยประชากรส่วนใหญ่ (7 จาก 11 ประชากร) มีค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์เป็น 1.000 ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ 0.000 – 0.018 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.016 และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีแนวโน้มลดลงในประชากรจากภาคใต้เช่นเดียวกับ *S. nakhonense*

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 ซึ่งได้ทำการศึกษาทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ความยาวทั้งหมดของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทำการศึกษาคือ 251 คู่เบสพบความแปรผันทั้งหมด 4 ตำแหน่ง โดยเป็น insertion/deletion 2 ตำแหน่งและเป็นการแทนที่เบส 2 ตำแหน่ง จำนวนแฮพโลไทป์ที่พบคือ 4 แฮพโลไทป์ โดยแฮพโลไทป์ที่กระจายกว้างที่สุดพบใน 5 ประชากรจากภาคเหนือ (CM3 และ KP2) และภาคใต้ (SR1, NS3 และ PG2)

ในจำนวนแฮพโลไทป์ของ COI ยีนของ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ทั้งหมดพบว่ามี 4 แฮพโลไทป์ที่ในทั้ง 2 สปีชีส์ โดย 3 แฮพโลไทป์พบในประชากรจากภาคใต้และ 1 แฮพโลไทป์ที่เหลือพบที่ภาคกลาง (PE1) เป็นที่น่าสนใจคิดว่าประชากรที่มีแฮพโลไทป์ร่วมกันของสองสปีชีส์นี้มีระดับความแปรผันทางพันธุกรรมที่ต่ำ อย่างไรก็ตามจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 พบว่าแมลงวันดำ 2 ชนิดนี้ไม่มีแฮพโลไทป์ร่วมและยังพบว่ามี fixed nucleotide difference ระหว่าง 2 สปีชีส์นี้ด้วย 1 ตำแหน่ง

ตารางที่ 5.13 Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D and F_s ของ 16 ประชากร และ 3 กลุ่มประชากรของ *Simulium tani*

ประชากร	n	π_n (SD)	θ_s (SD)	π_h (SD)	Tajima' D	F_s
CM2	11	0.010 (0.006)	0.010 (0.005)	1.000 (0.039)	-0.277	-5.485*
CM5	9	0.016 (0.009)	0.020 (0.009)	1.000 (0.052)	-1.189	-2.648*
MS1	6	0.008 (0.005)	0.009 (0.004)	0.933 (0.122)	-0.198	-0.055
MS2	7	0.009 (0.006)	0.010 (0.005)	0.905 (0.103)	-0.662	0.797
PR	9	0.014 (0.008)	0.017 (0.008)	1.000 (0.052)	-1.168	-2.911*
TK3	10	0.012 (0.007)	0.015 (0.007)	1.000 (0.045)	-1.240	-4.116*
UT	10	0.011 (0.006)	0.015 (0.007)	1.000 (0.045)	-1.435	-4.302*
PB	11	0.012 (0.007)	0.013 (0.005)	1.000 (0.039)	-0.609	-4.990*
KB1	10	0.010 (0.006)	0.011 (0.005)	1.000 (0.045)	-0.553	-4.692*
PE1	8	0.009 (0.005)	0.007 (0.004)	0.964 (0.077)	0.499	-1.520
CB1	10	0.010 (0.006)	0.013 (0.006)	1.000 (0.045)	-1.252	-4.738*
CB2	10	0.012 (0.007)	0.013 (0.006)	0.978 (0.054)	-0.606	-2.181
RY	10	0.010 (0.006)	0.010 (0.005)	0.933 (0.077)	-0.368	-1.181
RN3	9	0.006 (0.004)	0.008 (0.004)	0.972 (0.064)	-1.085	-3.176*
RN4	7	0.003 (0.002)	0.003 (0.002)	0.857 (0.137)	-0.734	-1.447
SR2	10	0.009 (0.005)	0.012 (0.005)	1.000 (0.045)	-1.266	-5.051*
เหนือ	73	0.012 (0.006)	0.029 (0.008)	0.995 (0.004)	-2.050*	-24.793**
ตะวันออก	30	0.011 (0.006)	0.015 (0.005)	0.986 (0.013)	-1.105	-14.517**
กลาง/ใต้	44	0.008 (0.004)	0.014 (0.004)	0.981 (0.011)	-1.612*	-25.432**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

ตารางที่ 5.14 ค่า Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima'D และ Fs ของ 13 ประชากรของ *Simulium nakhonense*

Population	n	h	π_n (SD)	π_h (SD)	θ_s (SD)	Tajima' D	Fs
CM1	10	9	0.012 (0.007)	0.978 (0.054)	0.015 (0.007)	-1.025	-1.99
CM2	11	2	0.005 (0.003)	0.327 (0.153)	0.005 (0.002)	-0.176	6.013
MS3	9	9	0.017 (0.010)	1.000 (0.052)	0.015 (0.007)	0.336	-2.423
PB	10	6	0.012 (0.007)	0.778 (0.137)	0.012 (0.005)	-0.159	1.604
TK1	10	8	0.010 (0.006)	0.956 (0.059)	0.012 (0.005)	-0.930	-1.089
TK2	8	8	0.013 (0.007)	1.000 (0.063)	0.014 (0.006)	-0.559	-2.412
KB2	10	6	0.014 (0.008)	0.889 (0.075)	0.011 (0.005)	0.987	1.696
PE2	12	3	0.0005 (0.0006)	0.318 (0.164)	0.001 (0.001)	-1.451*	-1.325*
RN1	8	8	0.006 (0.004)	1.000 (0.063)	0.006 (0.003)	-0.411	-4.414*
RN2	4	4	0.002 (0.002)	1.000 (0.177)	0.002 (0.002)	-0.754	-2.367*
PG1	10	8	0.006 (0.004)	0.956 (0.059)	0.007 (0.003)	-1.093	-2.595
NS1	10	8	0.007 (0.004)	0.933 (0.077)	0.009 (0.004)	-1.182	-1.976
NS2	11	10	0.011 (0.006)	0.982 (0.046)	0.015 (0.006)	-1.415	-3.038
Total	123	78	0.015 (0.008)	0.976 (0.007)	0.024 (0.006)	-1.240	-24.339**

Note: * P < 0.05, ** P<0.001; h = number of haplotypes in the population

ตารางที่ 5.15 ค่า Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D และ F_s ของ 11 ประชากรของ *Simulium quinquestriatum*

Population	n	h*	π_n (SD)	π_h (SD)	θ_s (SD)	Tajima' D	F_s
CM2	10	10	0.018 (0.010)	1.000 (0.045)	0.018 (0.008)	-0.115	-2.890*
CM3	11	10	0.015 (0.008)	0.982 (0.046)	0.016 (0.007)	-0.514	-2.144
CM4	6	3	0.008 (0.005)	0.600 (0.215)	0.009 (0.005)	-1.285	3.056
MS4	9	9	0.016 (0.009)	1.000 (0.052)	0.018 (0.008)	-0.779	-2.605
KP1	5	5	0.012 (0.008)	1.000 (0.126)	0.013 (0.007)	-0.583	-0.574
KP2	9	9	0.016 (0.009)	1.000 (0.052)	0.019 (0.008)	-1.032	-2.618
PE1	4	1	0	0	0	NA	NA
RN3	8	8	0.008 (0.005)	1.000 (0.063)	0.011 (0.005)	-1.422	-3.447*
PG2	10	8	0.008 (0.005)	0.933 (0.077)	0.010 (0.005)	-1.243	-1.749
SR1	6	6	0.007 (0.004)	1.000 (0.096)	0.006 (0.003)	0.576	-2.242*
NS3	6	6	0.006 (0.004)	1.000 (0.096)	0.008 (0.004)	-1.246	-2.358*
Total	84	71	0.016 (0.008)	0.994 (0.003)	0.024 (0.007)	-1.295	-24.444**

Note: *P<0.05, **P<0.001; h = number of haplotypes in the population

2. สายสัมพันธ์ของ mitochondrial DNA haplotypes

Simulium tani

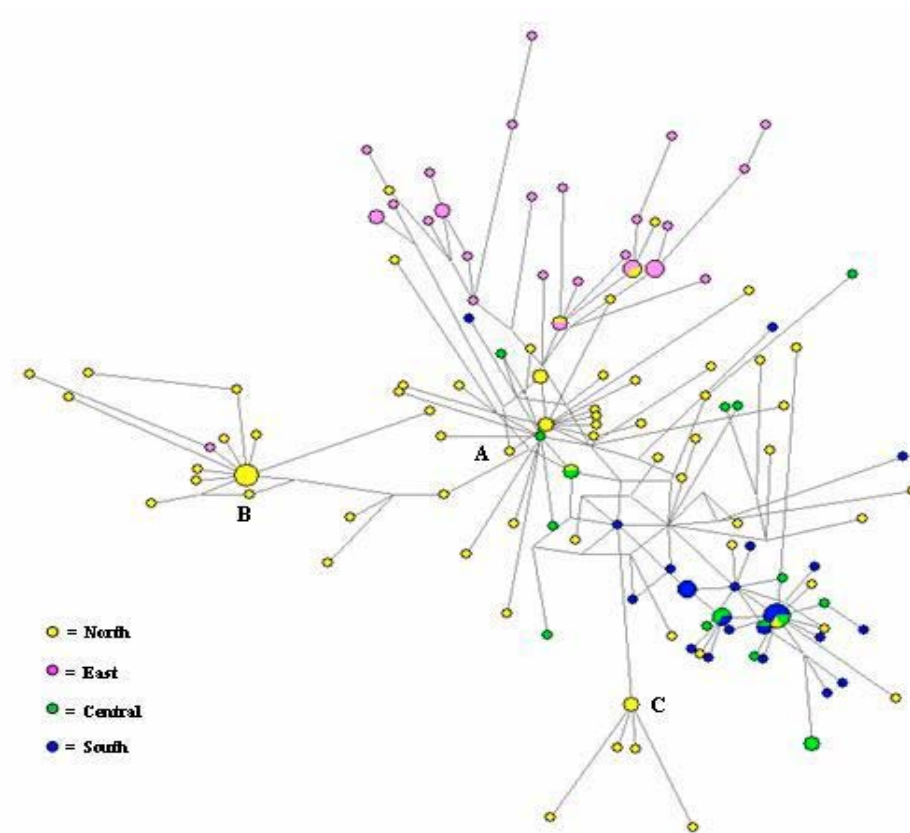
สายสัมพันธ์ของ mitochondrial DNA haplotypes ของ *S. tani* (ภาพที่ 5.32) พบว่าไม่เกิด phylogeographic breaks แต่พบว่าการเกาะกลุ่มของ haplotypes จากภูมิภาคเดียวกัน โดย haplotypes จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือเกาะกลุ่มกันด้วย branch length ที่ยาว ขณะที่ haplotypes จากภาคใต้ เกาะกลุ่มกับ haplotypes ส่วนใหญ่ของภาคกลางด้วย branch length ที่สั้นและมีลักษณะ star-like shape haplotypes จากภาคเหนือแบ่งเป็น 3 lineages (A, B และ C, ภาพที่ 5.32) โดย lineage A เป็นแกนของ network และ subset ของ A เป็นบรรพบุรุษของ haplotypes จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้

Simulium nakhonense และ *Simulium quinquestriatum*

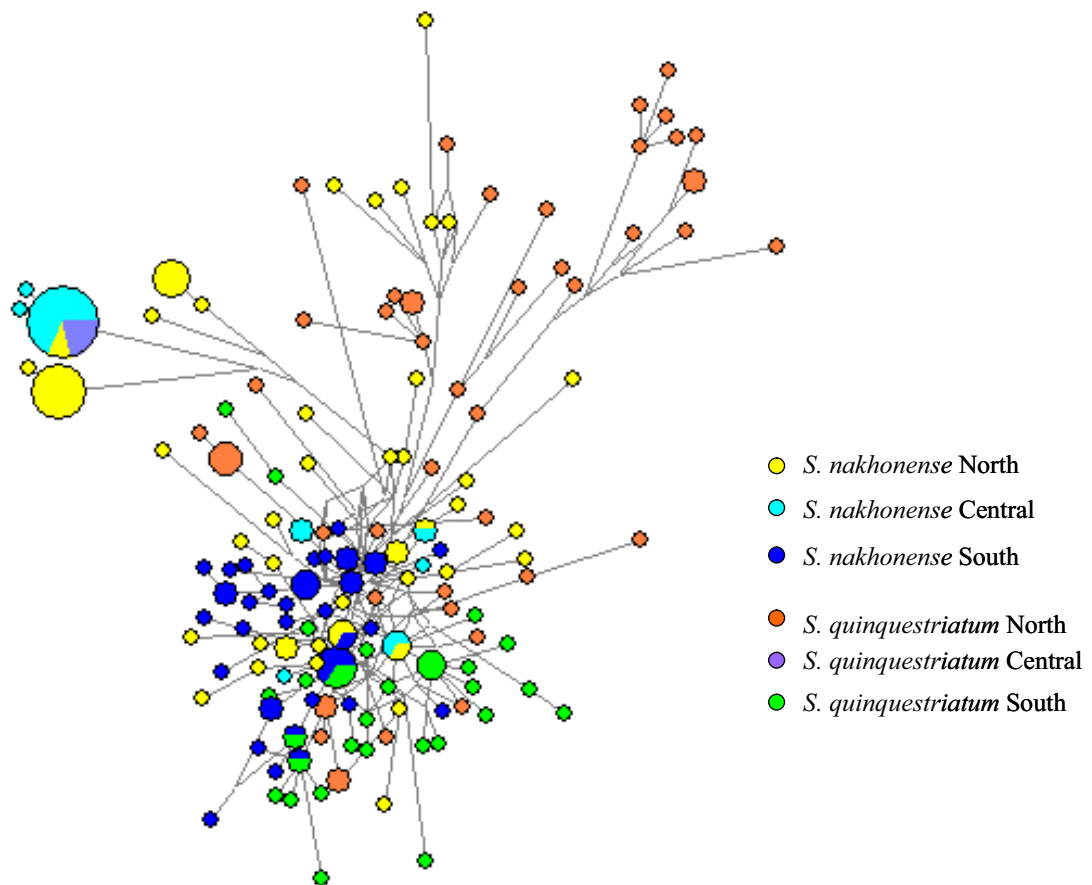
สายสัมพันธ์ของไมโทคอนเดรียลแฮพลไทป์ของ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* (ภาพที่ 5.33) พบว่าแมลงวันดำสองสปีชีส์มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม โดยสายสัมพันธ์ของไมโทคอนเดรียลแฮพลไทป์ไม่สามารถแยกสองสปีชีส์ออกจากกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม แฮพลไทป์จากภาคเหนือมีการแยกกันของ 2 สปีชีส์ โดยแฮพลไทป์จากภูมิภาคนี้แยกเป็น 4 lineages โดย 2 lineages เป็น lineage ของ *S. quinquestriatum* และอีก 1 lineage เป็นของ *S. nakhonense* ยกเว้นแฮพลไทป์เดียวที่เป็นแฮพลไทป์ร่วมระหว่าง 2 สปีชีส์ ในขณะที่อีก 1 lineage ประกอบด้วยแฮพลไทป์ของทั้ง 2 สปีชีส์ แฮพลไทป์จากภาคใต้ของทั้ง 2 สปีชีส์เกาะกลุ่มกันและมีบางแฮพลไทป์จากภาคเหนือร่วมอยู่ด้วย โดยกลุ่มของแฮพลไทป์นี้มีความยาวของ branch สั้น และมีลักษณะ star-like shape ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่เกิดการเพิ่มขนาดอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่สั้น

3. สายสัมพันธ์ของ D3 แฮพลไทป์

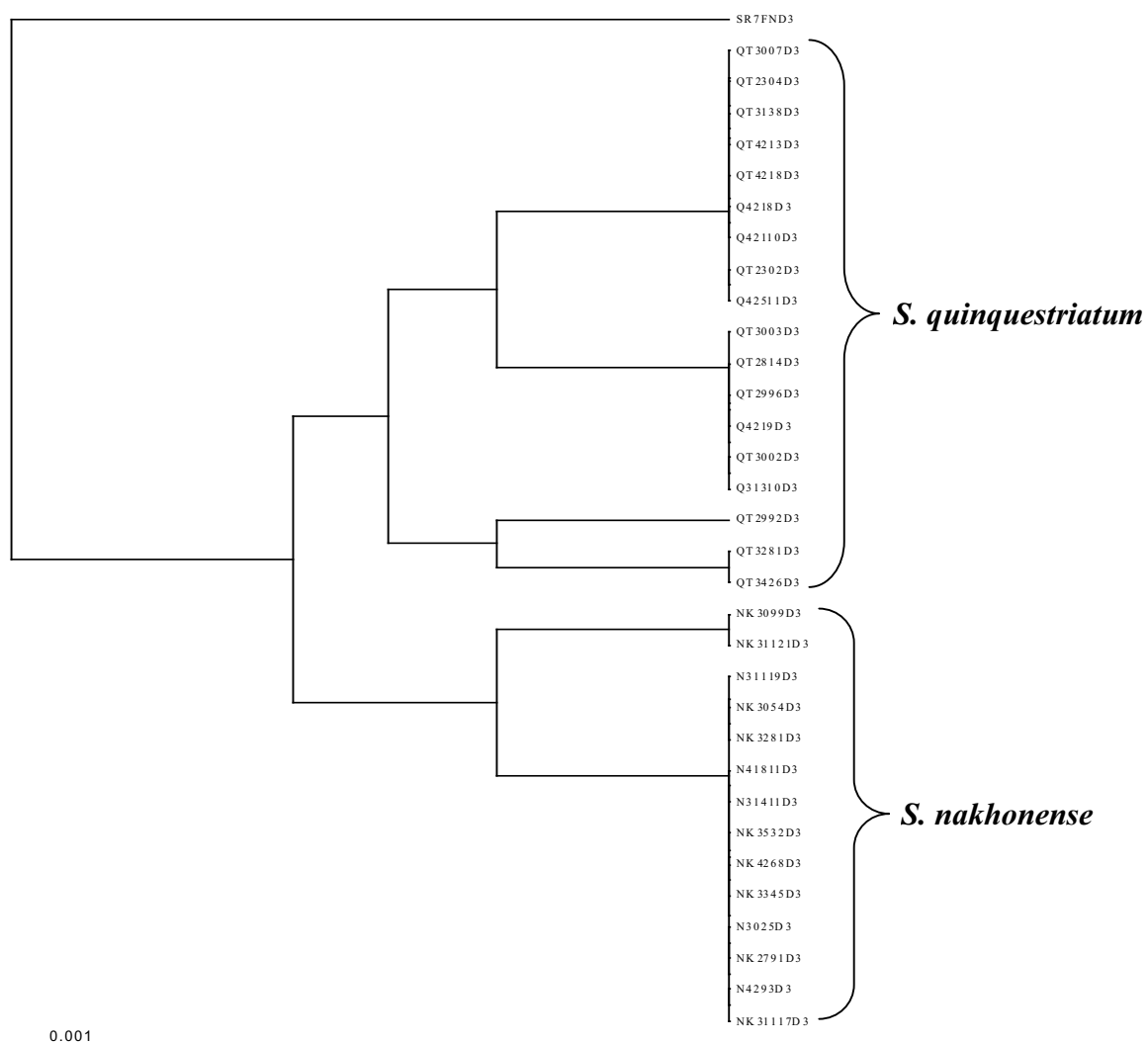
สายสัมพันธ์ของ D3 แฮพลไทป์ที่คำนวณโดย UPGMA (ภาพที่ 5.34) พบว่าสามารถแยกแฮพลไทป์จากทั้ง 2 สปีชีส์ออกจากกันอย่างชัดเจน โดยแฮพลไทป์ของ *S. nakhonense* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยและกลุ่มแฮพลไทป์ของ *S. quinquestriatum* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มย่อยนี้กับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์



ภาพที่ 5.32 Median-joining network ของ 147 ตัวอย่างของ *S. tani* โดยแต่ละวงกลมคือ 1 haplotype และสีของวงกลมหมายถึงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของ haplotype (เหลือง คือ ภาคเหนือ ชมพูคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เขียวคือภาคกลาง และน้ำเงินคือภาคใต้)



ภาพที่ 5.33 Median-joining network คำนวณโดยโปรแกรม NETWORK ของ 207 ตัวอย่างของ *S. nakhonense* (123 ตัวอย่าง) และ *S. quinquestriatum* (84 ตัวอย่าง) ภาพวงกลมแสดงแต่ละแอสไพโรไทป์โดยขนาดของวงกลมเป็นสัดส่วนกับจำนวนตัวอย่างของแต่ละแอสไพโรไทป์ สีของวงกลมแสดงถึงสปีชีส์และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของแอสไพโรไทป์ (สีเหลือง = *S. nakhonense* ภาคเหนือ, สีฟ้า = *S. nakhonense* ภาคกลาง, สีนํ้าเงิน = *S. nakhonense* ภาคใต้, สีนํ้าตาล = *S. quinquestriatum* ภาคเหนือ, สีม่วง = *S. quinquestriatum* ภาคกลางและสีเขียว = *S. quinquestriatum* ภาคใต้)



ภาพที่ 5.34 UPGMA tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 ของ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* โดยใช้ *Simulium fenestriatum* เป็น outgroup

4. โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรภายในสปีชีส์

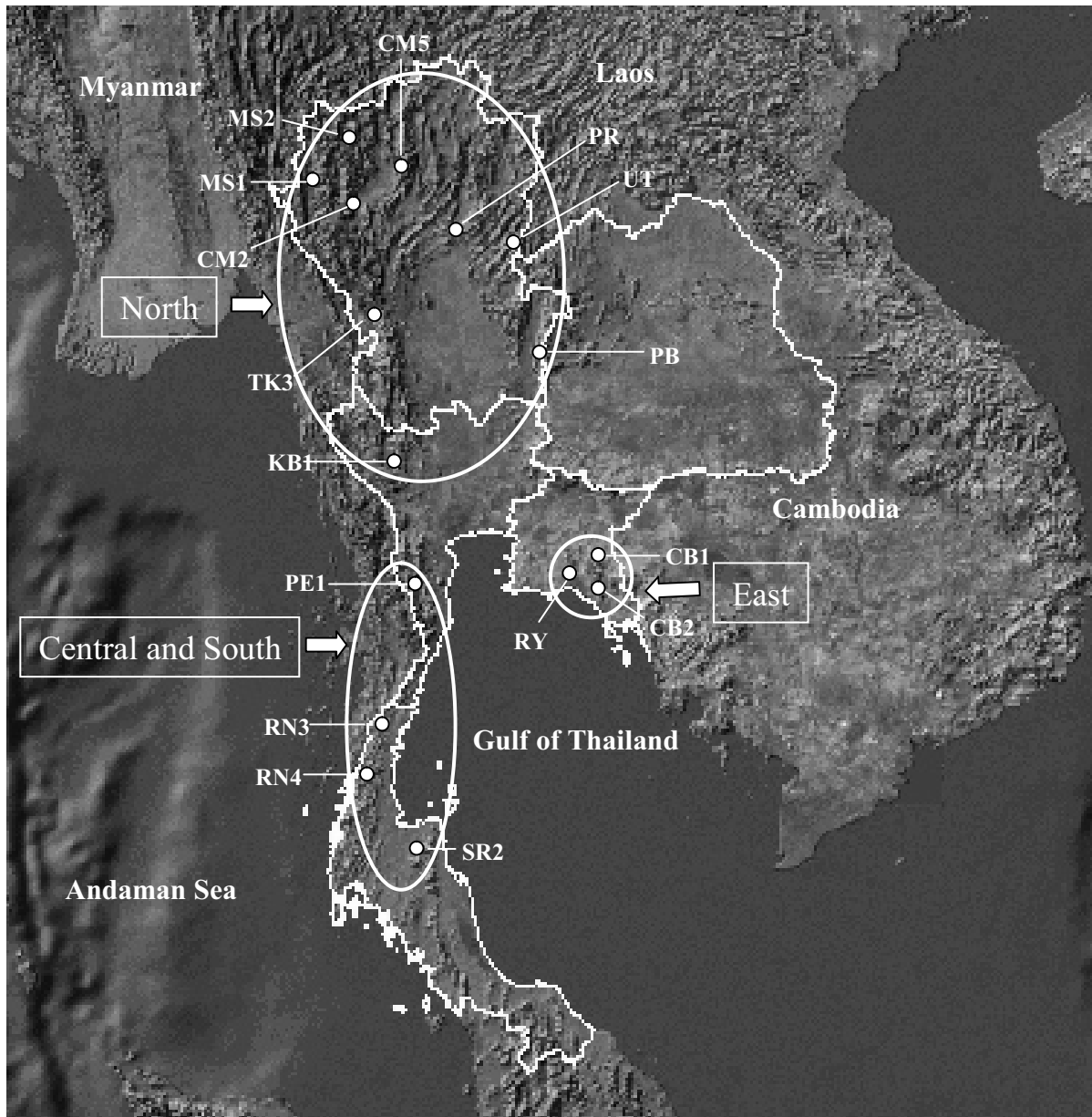
Simulium tani

ผลของ SAMOVA สามารถจัดกลุ่มประชากรได้ 3 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของประชากร (ภาพที่ 5.35 และภาพที่ A-14 ในภาคผนวก 1) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 8 ประชากรจากภาคเหนือ ได้แก่ CM2 CM5 MS1 MS2 TK3 PB UT และ PR กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 ประชากรจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ CB1 CB2 และ RY กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 2 ประชากรจากภาคกลาง และ 3 ประชากรจากภาคใต้ ได้แก่ KB1 PE1 RN3 RN4 และ SR2 ค่า F_{ST} ระหว่าง 3 กลุ่มประชากรนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5.16) ผลการทดสอบ Isolation by distance พบว่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ ($r = 0.5146$, $p < 0.001$, ภาพที่ A-15 ในภาคผนวก 1)

ตารางที่ 5.16 F_{ST} ระหว่าง 3 กลุ่มประชากรของ *S. tani* ที่จัดโดย SAMOVA

	เหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กลาง/ใต้
เหนือ	-		
ตะวันออกเฉียงเหนือ	0.240**	-	
กลาง/ใต้	0.192**	0.449**	-

** $P < 0.001$



ภาพที่ 5.35 กลุ่มประชากรแมลงร้นดำชนิด *Simulium tani* ซึ่งจัดกลุ่มโดยใช้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของโปรแกรม SAMOVA

Simulium nakhonense

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย AMOVA พบว่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอยู่ในระดับที่สูง (ตารางที่ 5.17) โดยค่า F_{ST} มีค่าเฉลี่ย 0.430 ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามความแปรผันที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ (57%) เป็นความแปรผันที่เกิดขึ้นภายในประชากร ค่า pairwise F_{ST} ระหว่างประชากร (ตารางที่ 5.18) มีค่าสูงและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยกเว้นประชากรในภาคใต้ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับที่ต่ำ การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วย SAMOVA พบว่าค่า F_{CT} มีค่าสูงและมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกจำนวนกลุ่มประชากร (k) ที่ทำการวิเคราะห์

(ภาพที่ A-16 ในภาคผนวก 1) บ่งชี้ว่ามียีนพูล (gene pool) หลายยีนพูลในประชากร ซึ่งสอดคล้องกับผลของ pairwise F_{ST} และ AMOVA การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (Isolation by distance) (ภาพที่ A-17 ในภาคผนวก 1) พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.2461$, $p=0.007$)

Simulium quinquestriatum

ผลของ AMOVA (ตารางที่ 5.17) บ่งชี้ว่าประชากรของ *S. quinquestriatum* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า F_{ST} เฉลี่ย 0.273 ($p<0.001$) โดยความแปรผันที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ (73%) เป็นความแปรผันภายในประชากร ผลของ pairwise F_{ST} (ตารางที่ 5.19) สอดคล้องกับผลของ AMOVA โดยที่ค่า F_{ST} ระหว่างประชากรส่วนใหญ่มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย SAMOVA (ภาพที่ A-17 ในภาคผนวก 1) พบว่าค่า F_{CT} ในทุกจำนวนกลุ่มประชากรมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงให้เห็นว่าประชากรของ *S. quinquestriatum* ประกอบด้วยหลายยีนพูล จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.3151$, $p=0.005$) (ภาพที่ A-18 ในภาคผนวก 1)

5. ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *Simulium nakhonense* และ

Simulium quinquestriatum

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย AMOVA โดยการจัดกลุ่มประชากรเป็น 2 กลุ่มตามสปีชีส์ (ตารางที่ 5.17) พบว่า *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{CT} = 0.006$, $p = 0.289$) ผลของ AMOVA นี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดย UPGMA tree โดยใช้ค่า pairwise F_{ST} ระหว่างประชากร (ภาพที่ 5.36) ซึ่งไม่สามารถแยกกลุ่มประชากรจากแต่ละสปีชีส์อย่างชัดเจน โดยประชากรจากภาคใต้ของทั้ง 2 สปีชีส์เกาะกลุ่มกันด้วย branch ที่สั้น บ่งชี้ว่าประชากรเหล่านี้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับประชากรทางด้านตะวันตกของประเทศของทั้งสองสปีชีส์ (MS3, MS4, KP1, KP2 และ CM1) อย่างไรก็ตามประชากรจากภาคเหนือมีการแยกจากกันค่อนข้างชัดเจนด้วย branch ที่ยาว ซึ่งบ่งชี้ถึงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับที่สูง

ตารางที่ 5.17 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) ภายในสปีชีส์ และระหว่างสปีชีส์ของ *S. nakhonense* and *S. quinquestriatum*

Source of variation	Variance components	Percent of total	F_{CT}	F_{ST}	F_{SC}
Within species					
<i>S. nakhonense</i>					
Within population	3.22	57.03			
Among populations	2.42	42.97		0.430**	
<i>S. quinquestriatum</i>					
Within population	4.16	27.31			
Among populations	1.56	72.69		0.273**	
Among species (<i>S. nakhonense</i> and <i>S. quinquestriatum</i>)					
Within population	3.60	62.93			0.367**
Among populations	2.09	36.50		0.371**	
within species					
Among species	0.03	0.57	0.006		

Note: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

ตารางที่ 5.18 Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของ *Simulium nakhonense*

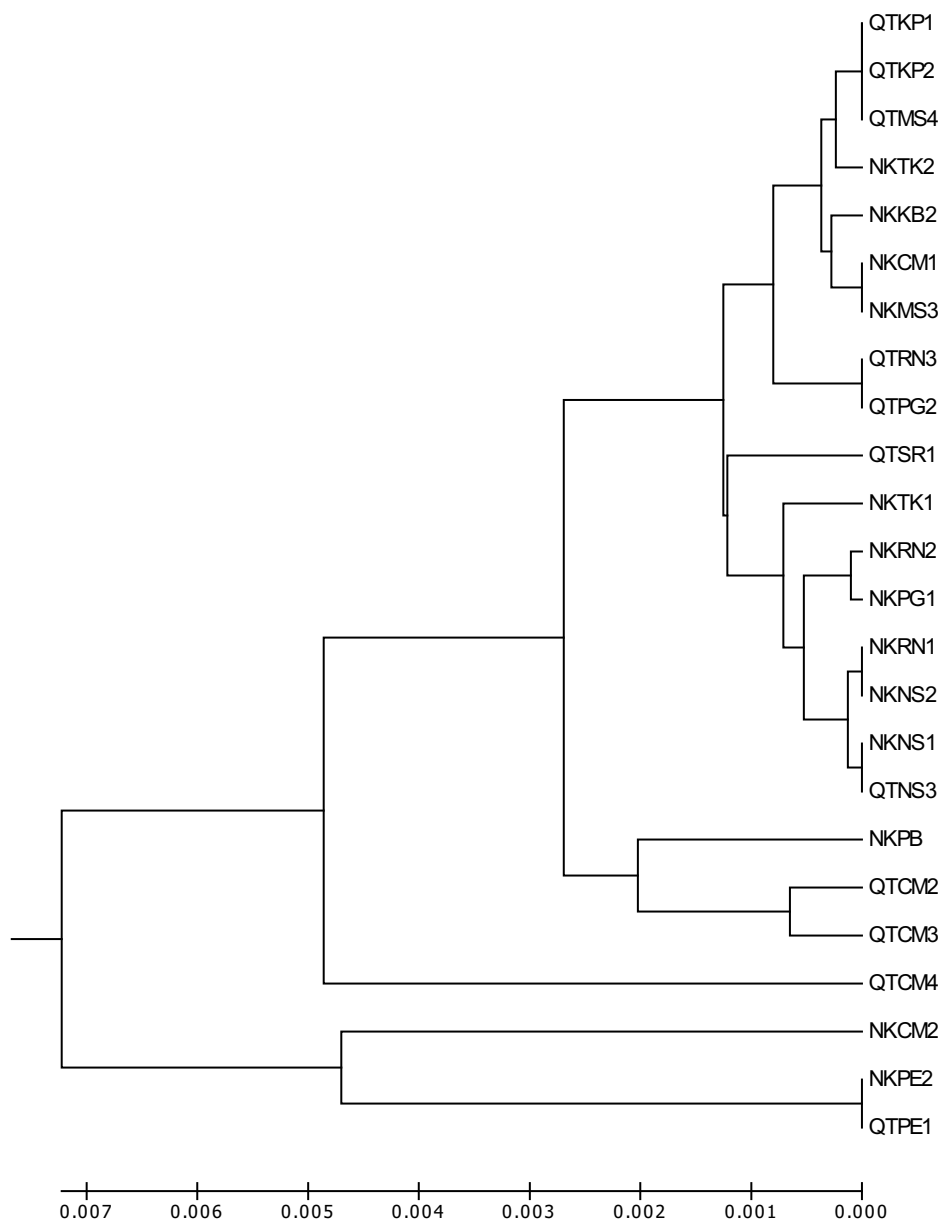
	CM1	CM2	MS3	PB	TK1	TK2	KB2	PE2	RN1	RN2	PG1	NS1	NS2
CM1													
CM2	0.542**												
MS3	-0.006	0.401**											
PB	0.136*	0.488**	0.143*										
TK1	0.231**	0.709**	0.187*	0.428**									
TK2	0.092*	0.651**	0.069	0.339**	0.101*								
KB2	0.045	0.530**	0.035	0.218*	0.126*	0.064							
PE2	0.654**	0.791**	0.566**	0.618**	0.782**	0.755**	0.548**						
RN1	0.299**	0.779**	0.243*	0.512**	0.125*	0.100*	0.193*	0.877**					
RN2	0.314*	0.832**	0.243*	0.516**	0.072	0.112	0.191*	0.962**	0.082				
PG1	0.335**	0.790**	0.293**	0.529**	0.119**	0.137**	0.231**	0.874**	0.047	-0.026			
NS1	0.270**	0.762**	0.242**	0.485**	0.153**	0.078*	0.192*	0.843**	0.022	0.161*	0.108*		
NS2	0.179*	0.681**	0.152*	0.401**	0.072*	0.028	0.109*	0.757**	-0.037	0.017	0.044	-0.023	

Note: $P < 0.05$ ** $P < 0.001$

ตารางที่ 5.19 Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของ *Simulium quinquestriatum*

	CM2	CM3	CM4	MS4	KP1	KP2	PE1	RN3	PG2	SR1	NS3
CM2											
CM3	0.076										
CM4	0.228*	0.350*									
MS4	0.037	0.027	0.292**								
KP1	0.130*	0.141*	0.463*	-0.034							
KP2	0.130*	0.104*	0.335*	-0.024	-0.119						
PE1	0.407**	0.479**	0.694*	0.488**	0.677*	0.516**					
RN3	0.323**	0.291**	0.594**	0.137*	0.038	0.057*	0.713*				
PG2	0.333**	0.279**	0.602**	0.147*	0.068	0.079*	0.705**	-0.033			
SR1	0.323**	0.325**	0.618**	0.193*	0.148*	0.115*	0.801*	0.208*	0.235**		
NS3	0.322**	0.328**	0.654**	0.186*	0.135*	0.130*	0.824**	0.195*	0.216**	0.141	

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$



ภาพที่ 5.36 UPGMA tree คำนวณโดยใช้ค่า pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของ *S. nakhonense* and *S. quinquistriatum*. NK หมายถึงประชากรของ *S. nakhonense* และ QT หมายถึงประชากรของ *S. quinquistriatum*.

6. ประวัติศาสตร์ประชากร (Population history)

Simulium tani

ค่า Tajima' D และ F_s มีค่าเป็นลบและมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากศูนย์ในทั้ง 3 กลุ่มประชากร (ยกเว้น Tajima' D ของกลุ่มประชากรภาคตะวันออก) (ตารางที่ 5.13) กราฟ mismatch distribution ของทั้ง 3 กลุ่มประชากร (ภาพที่ 5.37) สอดคล้องกับกราฟที่ได้จากการ simulated ข้อมูลภายใต้เงื่อนไขของ population expansion ค่า θ_1 มีค่ามากกว่า θ_0 ในทั้ง 3 กลุ่มประชากร (ตารางที่ 5.20) ค่า growth rate (ตารางที่ 5.21) มีค่าเป็นบวกในทั้ง 3 กลุ่มประชากร จากผลของการวิเคราะห์

ข้อมูลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าประชากรทั้ง 3 กลุ่มเกิด population expansion ค่า expansion time ของกลุ่มประชากรภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่าใกล้เคียงกัน ($\tau = 8.884$ และ 8.221 ซึ่งเท่ากับ 540,000 และ 500,000 ปี ตามลำดับ) ในขณะที่กราฟ mismatch distribution ของกลุ่มประชากรภาคกลาง/ใต้เป็นรูป bimodal บ่งชี้ว่าประชากรในกลุ่มนี้เกิด population expansion 2 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดย peak ของกราฟด้านซ้ายมือมีค่า $\tau = 1.774$ (ประมาณ 100,000 ปี) ขณะที่ peak ด้านขวามือมีค่าใกล้เคียงกับค่าของกลุ่มประชากรภาคเหนือกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สำหรับ effective population size (θ) ของกลุ่มประชากรภาคเหนือมีค่า 3.740 กลุ่มประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่า 0.189 และกลุ่มประชากรภาคกลาง/ใต้มีค่า 0.240

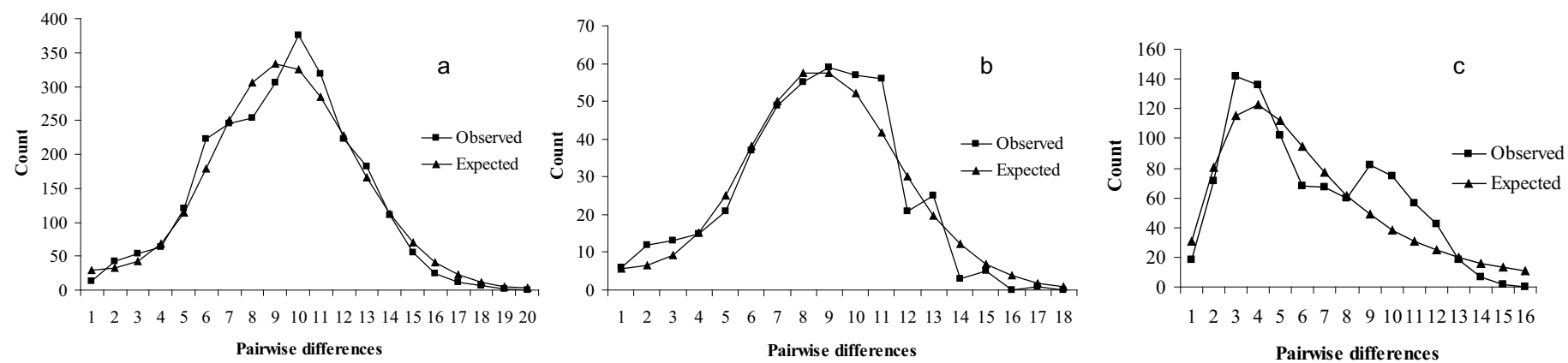
Simulium nakhonnense

ผลของ mismatch distribution บ่งชี้ว่าเกิด population expansion โดยกราฟที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกราฟจากการ simulation ของข้อมูลภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion ($SSD = 0.007$ $p = 0.450$) (ภาพที่ 5.36) ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Tajima' D (-1.240 , $p = 0.105$) และ F_s (-24.339 $p < 0.0001$) (ตารางที่ 5.14) ที่มีค่าเป็นลบ นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วย maximum likelihood ด้วยโปรแกรม FLUCTUATE (ตารางที่ 5.22) ยังบ่งชี้ว่าประชากรมีการเพิ่มขนาดโดยมีค่า growth rate เป็นบวก ($g = 430.99$) และการทดสอบ likelihood ratio test พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าที่ได้จากการ simulation ของข้อมูลภายใต้เงื่อนไขของประชากรที่ขนาดคงที่ ($\chi^2 = 8.054$ $p < 0.005$) จากผลการวิเคราะห์ต่างๆข้างต้นบ่งชี้ว่าประชากรของ *S. nakhonnense* เกิด population expansion โดยช่วงเวลาที่เกิดคำนวณโดยใช้พารามิเตอร์จาก mismatch distribution (ตารางที่ 5.23) คือประมาณ 880,000 ปีที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามจากสายสัมพันธ์ของ haplotypes ที่พบว่าแอฟโฟลไทป์จากภาคใต้ที่เกาะกลุ่มกันด้วย branch ที่สั้นและมีลักษณะ star-like shape น่าจะเป็นผลมาจากการเกิด population expansion ในช่วงเวลาไม่นาน โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของประชากรจากภาคใต้โดย mismatch distribution พบว่าได้กราฟที่เป็นรูป unimodal สอดคล้องกับกราฟที่ได้จากการ simulation ภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion โดยช่วงเวลาที่เกิด population expansion ของประชากรในภาคใต้ประมาณ 280,000 ปีที่ผ่านมา จากผลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าประชากรของ *S. nakhonnense* เกิด population expansion อย่างน้อย 2 ครั้งที่แตกต่างกันทั้งตำแหน่งและช่วงเวลาที่เกิดซึ่งเป็นลักษณะเดียวกันกับที่พบใน *S. tani*

Simulium quinquestriatum

ผลของ mismatch distribution บ่งชี้ว่าเกิด population expansion ในประชากรของ *S. quinquestriatum* โดยกราฟ mismatch distribution ที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion ($SSD = 0.004$ $p = 0.364$) (ภาพที่ 5.39) ซึ่งสอดคล้องกับค่า Tajima' D (-1.295 $p = 0.095$) และ F_s (-24.44 $p < 0.0001$) ที่มีค่าเป็นลบ (ตารางที่ 5.26) การวิเคราะห์ growth rate ด้วย maximum likelihood (ตารางที่ 5.22) พบว่ามีค่าเป็นบวก ($g = 404.625$) และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการ simulation ข้อมูลภายใต้เงื่อนไขของประชากรที่มีขนาดคงที่ ($\chi^2 = 10.007$ $p < 0.005$) จากผลข้างต้นบ่งชี้ว่าประชากรของ *S. quinquestriatum* เกิด population expansion โดยช่วงเวลาที่เกิดคือประมาณ 760,000 ปีที่ผ่านมา อย่างไรก็ตาม

เช่นเดียวกับ *S. nakhonense* ผลของสายสัมพันธ์ของแฮพโลไทป์ที่พบว่าแฮพโลไทป์จากภาคใต้ซึ่งเกาะกลุ่มกันด้วย branch ที่สั้นและมีลักษณะเป็น star-like shape ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่เกิด population expansion ในช่วงเวลาไม่นานที่ผ่านมา จากการวิเคราะห์ด้วย mismatch distribution ของแฮพโล-ไทป์จากภาคใต้พบว่าได้กราฟที่เป็น unimodal สอดคล้องกับการเกิด population expansion โดยช่วงเวลาที่เกิดคือประมาณ 400,000 ปีที่ผ่านมา จากผลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าประชากรของ *S. quinquestriatum* เกิด population expansion อย่างน้อย 2 ครั้งที่มีความแตกต่างทั้งตำแหน่งที่เกิดและช่วงเวลาที่เกิดเช่นเดียวกับ *S. nakhonense*



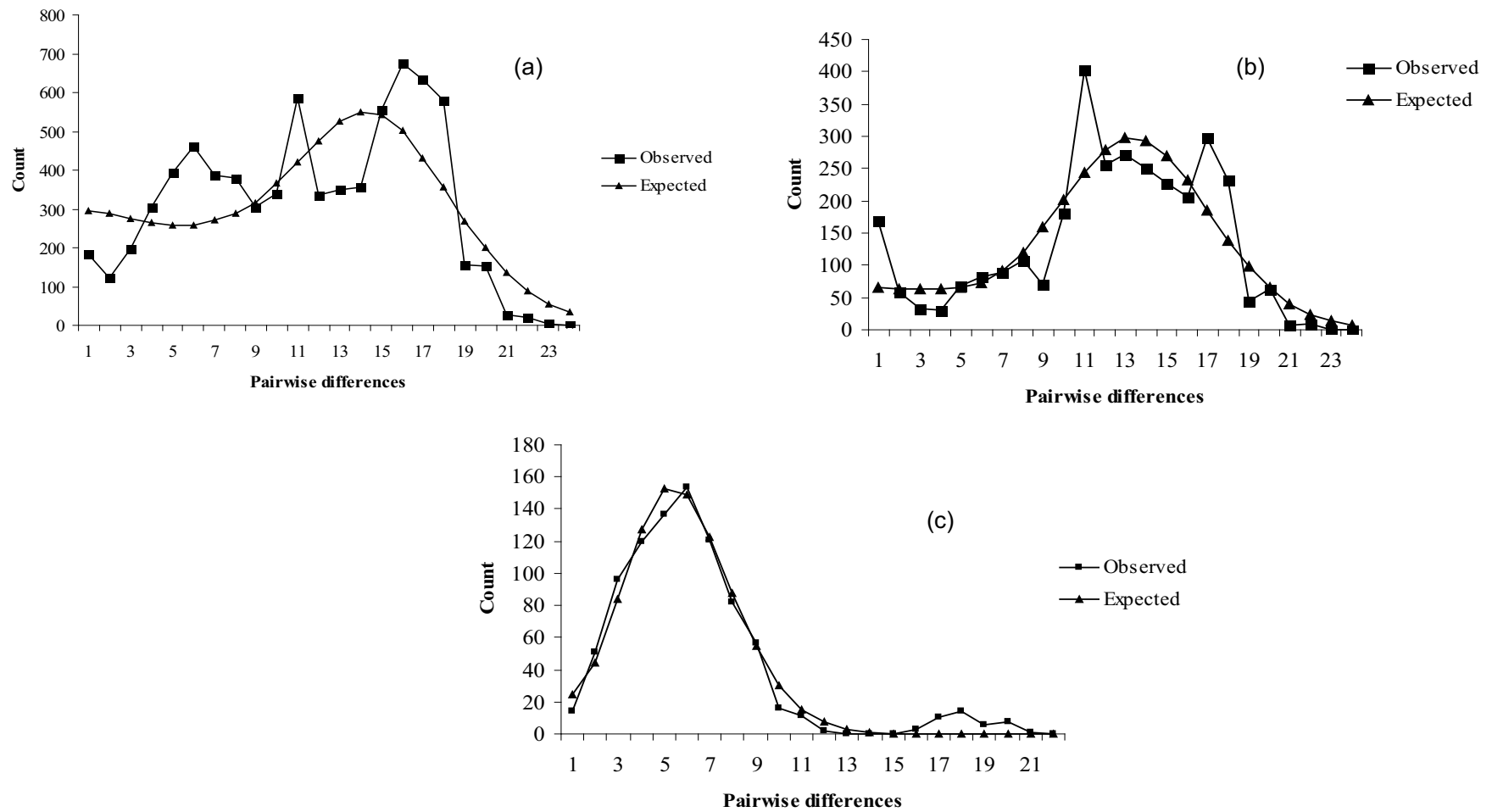
ภาพที่ 5.37 Mismatch distribution ของกลุ่มประชากรภาคเหนือ (a) ภาคตะวันออก (b) และภาคกลาง/ใต้ (c)

ตารางที่ 5.20 ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion ของ *Simulium tani*

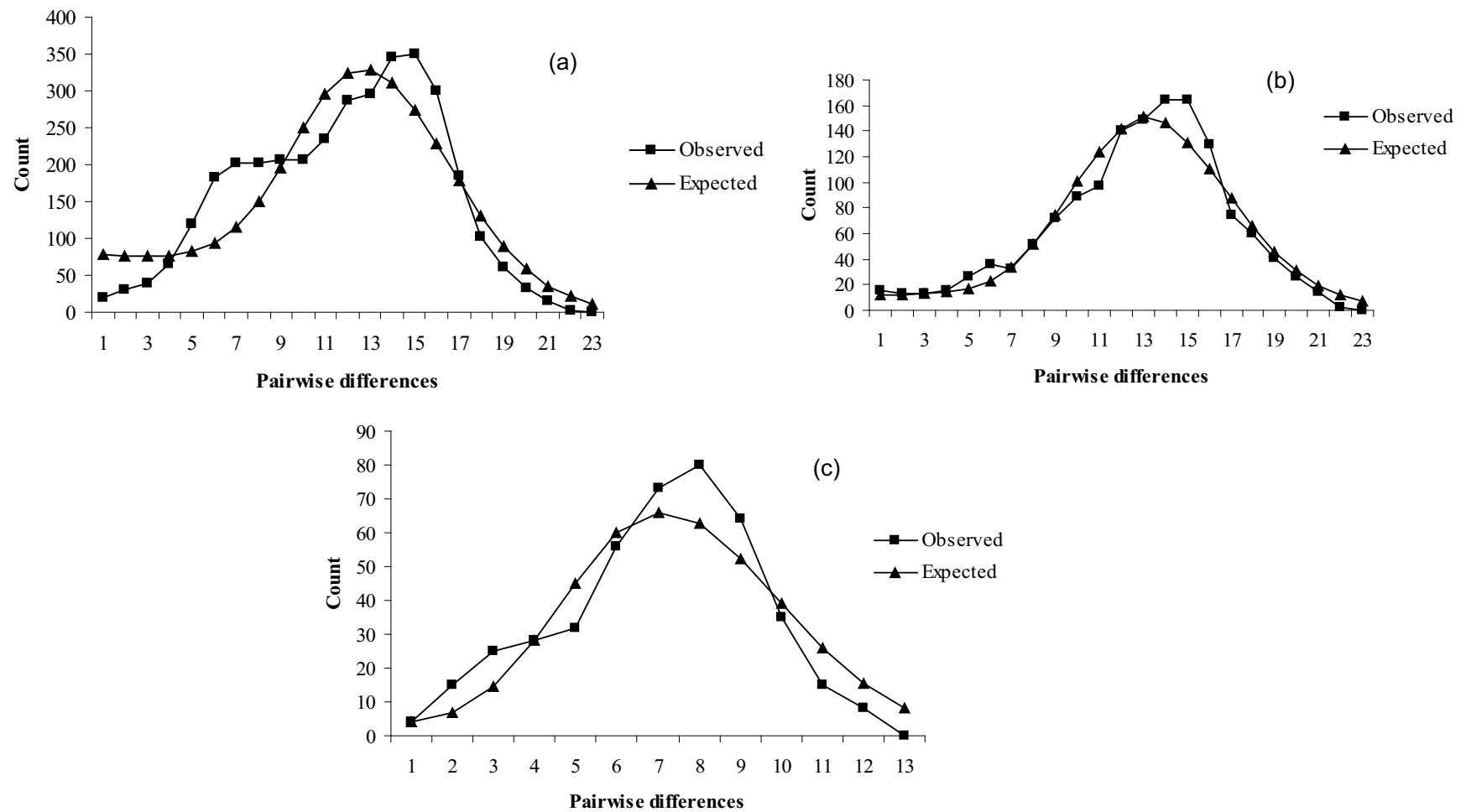
ภูมิภาค	N	$\tau = 2ut$ (95% interval)	$\theta_0 = 2uN_0$ (95% interval)	$\theta_1 = 2uN_1$ (95% interval)
เหนือ	73	8.884 (6.189-10.739)	0.006 (0.000-2.821)	88.242 (45.849-6619.492)
ตะวันออก	30	8.221 (4.912-10.366)	0.000 (0.000-2.762)	75.469 (34.044-6795.469)
กลาง/ใต้	44	1.774 (0.409 – 6.337)	4.225 (0.000-12.032)	6657.500 (32.266-7542.500)

ตารางที่ 5.21 การวิเคราะห์ด้วย Maximum likelihood เพื่อหาขนาดประชากร ($\theta = 2N_f\mu$), growth rates (g) และ migration rates ($M=m/\mu$) ของ 3 กลุ่มประชากรของ *S. tani*.

กลุ่มประชากร (i)	$\theta = 2N_f\mu$	g	M		
			$N \rightarrow i$	$E \rightarrow i$	$CS \rightarrow i$
เหนือ(N)	3.740	1929.776	-	11.08	55.63
ตะวันออก(E)	0.189	1081.865	45.66	-	5.78×10^{-5}
กลาง/ใต้ (CS)	0.240	1435.017	164.36	2.7×10^{-4}	-



ภาพที่ 5.38 Mismatch distributions ของ (a) ทุกประชากร (b) ภาคเหนือ (c) ภาคใต้ของ *S. nakhonense* โดยกราฟไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการ simulation ภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion



ภาพที่ 5.39 Mismatch distributions ของ (a) ทุกประชากร (b) ภาคเหนือ (c) ภาคใต้ของ *S. quinquestriatum* โดยกราฟไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการ simulation ภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion

ตารางที่ 5.22 ค่า growth rate ที่คำนวณโดย maximum likelihood ภายใต้เงื่อนไขของ exponential growth model ของ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum*

	Model	θ	Growth rate (g)	ln L	χ^2
<i>S. nakhonense</i>	stable	0.1252 (0.0960 – 0.1713)	-	0.4048	8.054**
	Growth	0.4925 $\pm$ 0.0362	430.399	4.4320	
<i>S. quinquestriatum</i>	stable	0.1087 (0.0889 – 0.1355)	-	2.2210	10.007**
	Growth	0.2880 $\pm$ 0.0160	404.625	12.2283	

**P<0.005

ตารางที่ 5.23 ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion ของ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* คำนวณโดย stepwise expansion model

Region	N	$\tau = 2ut$ (95% interval)	$\theta_0 = 2uN_0$ (95% interval)	$\theta_1 = 2uN_1$ (95% interval)
<i>Simulium nakhonense</i>				
North	80	13.156 (6.511-18.149)	0.004 (0.000-6.390)	47.697 (24.741-4548.197)
South	43	4.599 (2.006-7.612)	0.373 (0.000-3.126)	45.898 (13.391-7504.648)
All	123	14.618 (4.675-22.618)	0.003 (0.000-8.716)	24.344 (10.008-148.407)
<i>Simulium quinquestriatum</i>				
North	54	12.935 (7.827-16.682)	0.005 (0.000-4.781)	111.016 (45.664-6548.516)
South	30	6.721 (3.449-8.842)	0.003 (0.000-3.082)	123.594 (24.733-8871.094)
All	84	12.616 (5.626-17.561)	0.073 (0.000-6.109)	44.077 (18.743-6634.077)

7. ประวัติการอพยพ

Simulium tani

จากการวิเคราะห์การอพยพของประชากรโดย maximum likelihood (ตารางที่ 5.21) พบว่าการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคอื่นๆมีค่าสูงกว่าการอพยพจากประชากรอื่นมายังภาคเหนือ ในขณะที่การอพยพระหว่างกลุ่มประชากรภาคตะวันออกกับกลุ่มประชากรภาคกลาง/ใต้ มีค่าต่ำมากหรืออาจไม่เกิดขึ้นเลย

Simulium nakhonense

จากการคำนวณค่าการอพยพระหว่างกลุ่มประชากรภาคเหนือ (CM1, CM2, MS3, PB, TK1, TK2, KB2 และ PE2) กับกลุ่มประชากรภาคใต้ (RN1, RN2, PG1, NS1 และ NS2) ด้วย maximum likelihood พบว่าการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคใต้มีค่าสูงกว่าการอพยพในทิศทางตรงกันข้ามมาก (ตารางที่ 5.24) โดยการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคใต้มีค่าประมาณ 5 เท่าของการอพยพจากภาคใต้ไปยังภาคเหนือ

Simulium quinquestriatum

จากการคำนวณค่าการอพยพระหว่างกลุ่มประชากรภาคเหนือ (CM2, CM3, CM4, MS4, KP1, KP2 และ PE1) กับกลุ่มประชากรภาคใต้ (RN3, PG2, SR1 และ NS3) ด้วย maximum likelihood พบว่าการอพยพจากกลุ่มประชากรภาคเหนือไปยังกลุ่มประชากรภาคใต้มีค่าสูงกว่าการอพยพในทิศทางตรงกันข้ามมาก (ตารางที่ 5.24) โดยการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคใต้มีค่าประมาณ 30 เท่าของการอพยพจากภาคใต้ไปยังภาคเหนือ

ตารางที่ 5.24 ขนาดประชากร ($\theta = 2N_i\mu$), exponential growth rates (g) และ migration rates ($M=m/\mu$) คำนวณโดย maximum likelihood ของ *S. nakhonense* ของกลุ่มประชากรของ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum*

Population group (i)	$\theta = 2N_i\mu$	g	M	
			$N \rightarrow i$	$S \rightarrow i$
<i>S. nakhonense</i>				
North (N)	0.087	176.283	83.94	-
South (S)	0.174	1310.280	-	17.17
<i>S. quinquestriatum</i>				
North (N)	0.287	450.386	175.35	-
South (S)	0.145	1200.026	-	6.65

5.8.3 สรุปผล

Simulium tani

ระดับความแปรผันทางพันธุกรรมของริ้นดำชนิด *S. tani* อยู่ในระดับที่สูงบ่งชี้ว่าประชากรของแมลงริ้นดำชนิดนี้มีเสถียรภาพสอดคล้องกับการวิเคราะห์ผลของขนาดประชากร (θ) ที่พบว่าประชากรมีขนาดใหญ่ การเกิด population expansion ในช่วงกลางของยุคไพลโทซีน (Pleistocene) เมื่อประมาณ 500,000 ปีที่แล้วอาจเป็นผลมาจากการที่ประชากรของแมลงริ้นดำชนิดนี้ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในช่วงเวลาดังกล่าวอันเป็นผลสืบเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศของโลก กลุ่มประชากรจากภาคกลาง/ใต้ที่เกิด population expansion ในช่วงปลายของยุคไพลโทซีน (ประมาณ 100,000 ปี) อาจเกิดจากการที่ประชากรดังกล่าวมีการ colonization จากประชากรของภาคเหนือซึ่งสอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์การอพยพที่พบว่าประชากรของ *S. tani* มีการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคอื่นๆ ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงกลางของยุคไพลโทซีน ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับระดับของความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับละติจูด กล่าวคือประชากรภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดและระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ลดลงในทางตอนล่างของประเทศ

ประชากรริ้นดำในแต่ละภูมิภาคนั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติบ่งชี้ว่าระดับการถ่ายยีน (gene flow) อยู่ในระดับต่ำ สอดคล้องกับผลของสายสัมพันธ์ของ haplotype ที่ไม่เกิด phylogeographic break แต่มีการเกาะกลุ่มของ haplotypes จากภูมิภาคเดียวกันซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่การถ่ายยีนจำกัด (Avise et al. 1987) ซึ่งปัจจัยที่จำกัดการถ่ายยีนนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของนิเวศวิทยาแหล่งอาศัยและปัจจัยทางกายภาพ ระหว่างกลุ่มประชากรภาคเหนือกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ราบลุ่มที่กั้นระหว่างกลุ่มประชากรนี้อาจเป็นปัจจัยจำกัดการถ่ายยีนเพราะที่ราบลุ่มดังกล่าวอาจไม่มีแหล่งน้ำไหลที่เหมาะสมเป็นแหล่งอาศัยของแมลงริ้นดำชนิด *S. tani* นอกจากนี้ลักษณะทางนิเวศวิทยาของภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือก็มีความแตกต่างกัน เช่นปริมาณน้ำฝนที่สูงกว่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้ลักษณะของป่ายังมีความแตกต่างกันด้วย ซึ่งความแตกต่างทางนิเวศวิทยานี้ยังอาจเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดการถ่ายยีนระหว่างกลุ่มประชากรภาคเหนือและกลุ่มประชากรภาคใต้ด้วย ในขณะที่กลุ่มประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับกลุ่มประชากรภาคกลาง/ใต้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสูงนอกจากนี้การอพยพระหว่าง 2 กลุ่มประชากรนี้ยังถือว่าไม่เกิดขึ้นเลย สอดคล้องกับการที่ 2 กลุ่มประชากรนี้ไม่มี haplotype ร่วม แสดงว่าการถ่ายยีนระหว่าง 2 กลุ่มประชากรไม่เกิดขึ้น โดยทะเล (อ่าวไทย) ที่กั้นระหว่าง 2 กลุ่มประชากรน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดการถ่ายยีนระหว่าง 2 ประชากรนี้

Simulium nakhonense และ *Simulium quinquestriatum*

ระดับความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงริ้นดำทั้ง *S. nakhonense* (0.015 ± 0.008) และ *S. quinquestriatum* (0.016 ± 0.008) อยู่ในระดับที่สูง ซึ่งมีค่าสูงกว่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของ COI ของยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (*Anopheles dirus* A = 0.0042 ± 0.0002 , *An. dirus* D = 0.0064 ± 0.0002) (Walton et al. 2000) แต่ระดับความหลากหลายนี้มีค่าใกล้เคียงกับที่พบในแมลงวันผลไม้ *Bactrocera depressa* (0.013) (Mun et al. 2003) ระดับความแปรผัน

ทางพันธุกรรมที่สูงบ่งชี้ว่าประชากรมีเสถียรภาพและมี effective population size ขนาดใหญ่ โดยค่า female effective population size ของ *S. nakhonense* มีค่าประมาณ 720,000 และ *S. quinquestriatum* มีค่าประมาณ 1,200,000 อย่างไรก็ตามในระดับภูมิภาคนั้นมีความแตกต่างอย่างชัดเจนในระดับของความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ โดยประชากรในภาคเหนือส่วนใหญ่มีระดับความแปรผันที่สูงกว่าประชากรจากภาคใต้ในรันด้าทั้ง 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับที่พบในแมลงวันด้าชนิด *S. tani* นอกจากนี้แล้วจากการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรยังพบว่าประชากรในภาคใต้นั้นเกิด population expansion ในช่วงเวลาไม่นานที่ผ่านมา (ประมาณ 400,000 – 100,000) ในทั้ง 3 สปีชีส์ รวมทั้งระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรยังอยู่ในระดับต่ำหรือไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการที่แมลงวันด้าทั้ง 3 ชนิดนี้มีรูปแบบของโครงสร้างทางพันธุกรรมและระดับความแปรผันทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันนี้น่าจะเป็นผลมาจากการที่ประชากรของแมลงวันด้าทั้ง 3 ชนิดได้รับอิทธิพลจากปัจจัยเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นปัจจัยจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในอดีต เช่น Pleistocene climatic change หรืออาจเป็นปัจจัยของสภาพนิเวศวิทยาในปัจจุบัน แต่ผลจากการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรข้างต้นที่พบว่ามี การเกิด Population expansion ในช่วงใกล้เคียงกันในยุคไพลโทซีน (Pleistocene) จึงมีความเป็นไปได้ว่าความคล้ายคลึงกันของรูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมนั้นเป็นผลมาจากตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศในยุคไพลโทซีน

ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของแมลงวันด้าทั้ง 2 ชนิดโดยเฉพาะระหว่างประชากรภาคเหนือกับประชากรภาคใต้และภายในประชากรภาคเหนืออยู่ในระดับที่สูงบ่งชี้ว่าระดับการถ่ายยีน (gene flow) ระหว่างประชากรดังกล่าวอยู่ในระดับที่ต่ำซึ่งสอดคล้องกับสายสัมพันธ์ของแฮพโลไทป์ที่พบว่ามี การเกาะกลุ่มกันของแฮพโลไทป์ โดยเฉพาะแฮพโลไทป์ภาคใต้ที่มีการเกาะกลุ่มกัน ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่มีการถ่ายยีนในระดับที่ต่ำแต่ไม่มีการเกิดการแบ่งแยกของประชากรในระยะเวลาที่ยาวนานเพราะไม่พบการเกิด phylogeographic break ในสายสัมพันธ์ของแฮพโลไทป์ อย่างไรก็ตามจากการจัดกลุ่มประชากรโดยใช้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมในแมลงวันด้าชนิด *S. nakhonesne* และ *S. quinquestriatum* นั้นไม่สามารถจัดกลุ่มประชากรได้อย่างชัดเจนทั้งนี้เพราะในทุกจำนวนกลุ่มประชากรมีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับที่สูงมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งบ่งชี้ว่าในประชากรของแมลงวันด้า 2 ชนิดนี้มีหลายยีนพูล การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ที่พบว่ามี ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอาจบ่งชี้ว่าการถ่ายยีนถูกจำกัดด้วยระยะห่างทางภูมิศาสตร์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษานี้ประกอบด้วยประชากรจากหลายภูมิภาคที่มีความแตกต่างกันในด้านนิเวศวิทยา ดังนั้นความแตกต่างของนิเวศวิทยาก็อาจมีผลต่อระดับการถ่ายยีนระหว่างประชากรด้วย

จากสายสัมพันธ์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแฮพโลไทป์ของแมลงวันด้าชนิด *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ที่พบว่าแมลงวันด้า 2 ชนิดนี้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมและไม่สามารถแยกจากกันได้อย่างชัดเจนรวมทั้งผลของ AMOVA ที่บ่งชี้ว่าแมลงวันด้า 2 ชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันด้าในประเทศไทยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ที่พบว่าแมลงวันด้า 2

ชนิดนี้เป็น sister species กัน (Thanwisai 2004) แต่อย่างไรก็ตามการที่แมลงวันดำ 2 ชนิดนี้ไม่มี ความแตกต่างทางพันธุกรรมจากผลของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอนี้อาจเป็นผลจากการเกิด mitochondrial DNA introgression ได้ ทั้งนี้เพราะผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ นิวเคลียร์ดีเอ็นเอส่วนของ D3 พบว่าแมลงวันดำ 2 ชนิดนี้แยกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน นอกจากนี้แล้ว การที่พบ fixed nucleotide difference ระหว่างแมลงวันดำ 2 ชนิดในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 ที่เป็น นิวเคลียร์ดีเอ็นเอซึ่งมี effective population size มากกว่าไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอถึง 4 เท่า นั้นไม่น่าจะ เป็นผลมาจาก incomplete lineage sorting เพราะถ้าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเป็นผลจาก incomplete lineage sorting น่าจะเกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอใน ระดับที่สูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

5.9 การศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันดำในระดับสปีชีส์ กลุ่ม ของสปีชีส์ และสกุลย่อย โดยการศึกษารูปร่างลักษณะเชิงปริมาณและการเรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

ในการจัดหมวดหมู่ตามลำดับชั้น (classification) ของแมลงวันดำ ต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำก่อน เพื่อเป็นพื้นฐานในการแปลผลเกี่ยวกับวิวัฒนาการ และ การแพร่กระจายของชนิดทางภูมิศาสตร์ (biogeography) ของแมลงวันดำ ความรู้เกี่ยวกับความ สัมพันธ์ของแมลงวันดำได้มาจากข้อมูลต่างๆ เช่น รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครโมโซม และ โมเลกุลดีเอ็นเอ เมื่อไม่นานมานี้ข้อมูลทางพฤติกรรมได้ถูกนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของแมลงวันดำ เช่นกัน ในการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณของแมลงวันดำ โดยการวัดลักษณะต่างๆ ของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย จะให้ผลที่แม่นยำและเด่นชัดกว่าการสังเกตรูปร่างลักษณะภายนอกแต่เพียงอย่างเดียว นอกจากข้อมูลการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณจะมีประโยชน์ ในการแยกชนิดของแมลงวันดำแล้วยังมีประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลง รันดำด้วย อย่างไรก็ตามปัจจุบันนิยมใช้ข้อมูลการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ และนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ เช่น ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ มาศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสปีชีส์ ต่างๆ เป็นจำนวนมาก งานวิจัยนี้เลือกศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ซึ่งเป็น noncoding gene เนื่องจากบริเวณนี้มีความแปรผันสูง เหมาะในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของ สิ่งมีชีวิตที่ใกล้ชิดกันเช่น ในระดับสกุล หรือต่ำกว่า ส่วนบริเวณที่เป็น coding gene เช่น 28S เหมาะใน การศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ห่างไกลกันเช่น ในระดับ family หรือสูงกว่า จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันดำโดยใช้ ข้อมูลรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ และ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ เพื่อดูว่าจะให้ผลที่ สอดคล้องหรือขัดแย้งกัน และข้อมูลใดให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือมากกว่ากัน

5.9.1. การศึกษารูปร่างลักษณะเชิงปริมาณ

ตัวอย่างของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย ที่นำมาศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาเชิง ปริมาณมีจำนวน 17 ชนิด (ตารางที่ 5.25) ซึ่งจำแนกอยู่ในสกุลย่อย *Simulium* 11 ชนิด *Nevermannia*

2 ชนิด และ *Gomphostilbia* 4 ชนิด (ชนิดละ 1-10 ตัว) ทำการวัดลักษณะต่างๆ ของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย ตามวิธีของ Coscaron (2001); Kruger and Garms (1999), Snyder and Linton (1984) และ Strieder and Daniel (2002) การศึกษาลักษณะเหล่านี้ได้จากการทำสไลด์ถาวรตามวิธีของ Davies (1968) โดยแช่ชิ้นดำ (ตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย) ใน 5% KOH 2 ชั่วโมงเพื่อให้ตัวอย่างใส จากนั้นตัดส่วนต่างๆ นำมาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำ (dehydration) ทำให้ใส (clearing) และผนึกสไลด์ด้วย permount จากนั้นวัดลักษณะที่ต้องการโดยใช้ ocular micrometer ลักษณะที่ศึกษาทั้งหมดมี 25 ลักษณะ โดยมีลักษณะตัวอ่อนจำนวน 6 ลักษณะ ตัวดักแด้ 9 ลักษณะ และตัวเต็มวัย 8 ลักษณะ ลักษณะดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นข้อมูลตัวเลข (ตารางที่ 5.26) เพื่อนำไปศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (cladistic analysis) โดยวิธี Neighbor joining ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b10) (Swofford, 2002) โดยใช้ 1000 bootstraps replication และ ใช้แมลงริ้นดำชนิด *S. pahangense* ซึ่งอยู่ในสกุลย่อย *Daviesellum* เป็น outgroup ลักษณะต่างๆ ที่นำไปวิเคราะห์ผลมีดังนี้

ตัวอ่อน (6 ลักษณะ)

1. จำนวนแถวของ anal sclerite hook : (0) > 200 ; (1) > 150 ; (2) 1-150;
2. ลักษณะของผนังหุ้มลำตัว : (0) ไม่มีขน; (1) ขนเดี่ยว; (2) ขนรูปหอก หรือ ขนแตกหลายเส้น
3. สัดส่วนของ hypostomial bridge (HIB) และ hypostomium (HIP):
(0) $HIB \geq HIP$; (1) $HIB < HIP$;
4. ventral papillae: (0) ventral papillae 2 คู่ ; (1) ventral papillae 1 คู่; (2) ไม่มี ventral papillae
5. postgenal cleft: (0) anterolateral extensions; (1) ไม่เรียบ; (2) เรียบ
6. lateral serration of hypostomium; (0) ไม่มี; (1) ไม่ชัดเจน; (2) ชัดเจน; (3) ชัดเจนมาก

ดักแด้ (9 ลักษณะ)

7. จำนวนของ branchial filament : (0) 1-6: (1) 7-10
8. ลักษณะหลังท้องปล้องที่ 6-9 : (0) ไม่มี basal spine comb (1) มี basal spine comb (2) มี basal spine comb เฉพาะปล้องที่ 9
9. spine ปล้องสุดท้าย : (0) ลดรูปหรือไม่มี; (1) ชัดเจน
10. ลักษณะผิวหนังนอกของ antennal sheaths: (0) ไม่มี tubercle ; (1) มี tubercle
11. ความสัมพันธ์ระหว่าง tubercle และ trichome: (0) tubercle $<$ trichome; (1) tubercle = trichome; (2) tubercle $>$ trichome
12. รูปร่างของ thoracic trichome: (0) ขนเดี่ยว; (1) แตกมากกว่า 2 แฉก
13. ลักษณะของท้องปล้องที่ I : (0) ไม่มี tubercle ; (1) มี tubercle
14. ลักษณะของปลอกหุ้ม : (0) ไม่มี anteroprospection; (1) มี anteroprospection
15. grapnel-like hooklet: (0) ไม่มี; (1) มี

ตัวเต็มวัย (8 ลักษณะ)

16. claw: (0) small sub-basal tooth; (1) simple; (2) large sub-basal tooth
17. ความยาวปีก : (0) > 2.51 ; (1) 1.8-2.5; (2) 0-1.79

18. radial vein(basal sector: (0)เรียบ; (1) มีขน
19. genital fork arms: (0) ส่วนปลายไม่ขยาย; (1) ส่วนปลายขยาย
20. cibarium: (0) มีพื้นแหลม หรือ มี tubercle; (2) เรียบ
21. จำนวนปล้องของหนวด;(0) 9 หรือ 10 ปล้อง; (1) 11 ปล้อง
22. hind basitarsus: (0) ขนาน; (1) ไม่ขนาน
23. basal protuberance :(0) ไม่มี; (1) มี สั้น; (2) มี ยาว

ตารางที่ 5.25 ชนิดและจำนวนตัวอ่อนตัวดักแด้และตัวเต็มวัยของริ้นดำที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภูมิภาคต่างๆของประเทศ ที่นำมาศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ

ชนิดของริ้นดำ	จำนวนตัวอ่อน	แหล่งที่เก็บ	จำนวนดักแด้	แหล่งที่เก็บ	จำนวนตัวเต็มวัย		แหล่งที่เก็บ
					เพศผู้	เพศเมีย	
<i>S. chamlongi</i>	10	สิริภูมิ (จ. เชียงใหม่)	10	สิริภูมิ (จ. เชียงใหม่)	1	1	สิริภูมิ (จ. เชียงใหม่)
<i>S. Chiangmaiense</i>	10	ทุ่งยาว (จ. เชียงราย)	10	ทุ่งยาว (จ. เชียงราย)	1	1	ทุ่งยาว (จ. เชียงราย)
<i>S. fenestratum</i>	10	สิริภูมิ (จ. เชียงใหม่)	10	ปางแฟน (จ. เชียงใหม่)	1	5	ทุ่งยาว (จ. เชียงราย)
<i>S. nakhonense</i>	10	วังควาย (จ. เชียงใหม่)	10	ทุ่งยาว (จ. เชียงราย)	1	10	วังควาย (จ. เชียงใหม่)
<i>S. nobile</i>	10	กะเปาะ (จ. ชุมพร)	10	กะเปาะ (จ. ชุมพร)	2	10	กะเปาะ (จ. ชุมพร)
<i>S. nodosum</i>	10	สวนแม่อุคค (จ. แม่ฮ่องสอน)	10	สวนแม่อุคค (จ. แม่ฮ่องสอน)	1	1	ปางแฟน (จ. เชียงใหม่)
<i>S. quinquestratum</i>	10	แม่ยะ (จ. เชียงใหม่)	7	แม่ยะ (จ. เชียงใหม่)	1	1	วังควาย (จ. เชียงใหม่)
<i>S. rufibasis</i>	10	กัวแม่ปาน (จ. เชียงใหม่)	10	กัวแม่ปาน (จ. เชียงใหม่)	1	5	กัวแม่ปาน (จ. เชียงใหม่)
<i>S. tani</i>	10	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)	10	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)	10	10	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)
<i>S. weji</i>	10	ธารทอง (จ. ลำปาง)	2	ธารทอง (จ. ลำปาง)	1	1	ธารทอง (จ. ลำปาง)
<i>S. brevipar</i>	10	สายทิพย์ (จ. อุดรดิตถ์)	2	สายทิพย์ (จ. อุดรดิตถ์)	1	1	สายทิพย์ (จ. อุดรดิตถ์)
<i>S. auriohirtum</i>	1	บ้านปัทวี (จ. จันทบุรี)	1	บ้านปัทวี (จ. จันทบุรี)	1	1	บ้านปัทวี (จ. จันทบุรี)
<i>S. feuerborni</i>	4	ห้วยทรายเหลือง (จ. เชียงใหม่)	1	ห้วยทรายเหลือง (จ. เชียงใหม่)	1	1	ห้วยทรายเหลือง (จ. เชียงใหม่)
<i>S. siamense</i>	10	น้ำตกไทรทอง (จ. ชัยภูมิ)	10	น้ำตกไทรทอง (จ. ชัยภูมิ)	1	1	น้ำตกไทรทอง (จ. ชัยภูมิ)
<i>S. angulistylum</i>	1	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)	1	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)	1	1	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)
<i>S. chumpornense</i>	5	กะเปาะ (จ. ชุมพร)	1	กะเปาะ (จ. ชุมพร)	1	1	กะเปาะ (จ. ชุมพร)
<i>S. parahiyangum</i>	10	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)	1	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)	1	1	เหมืองทวด (จ. สุราษฎร์ธานี)

ตารางที่ 5.26 ข้อมูลของลักษณะตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงรึ้นดำที่ใช้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม PAUP (version 4.0b10) (ลำดับที่ของลักษณะ สอดคล้องกับลักษณะในรายงาน)

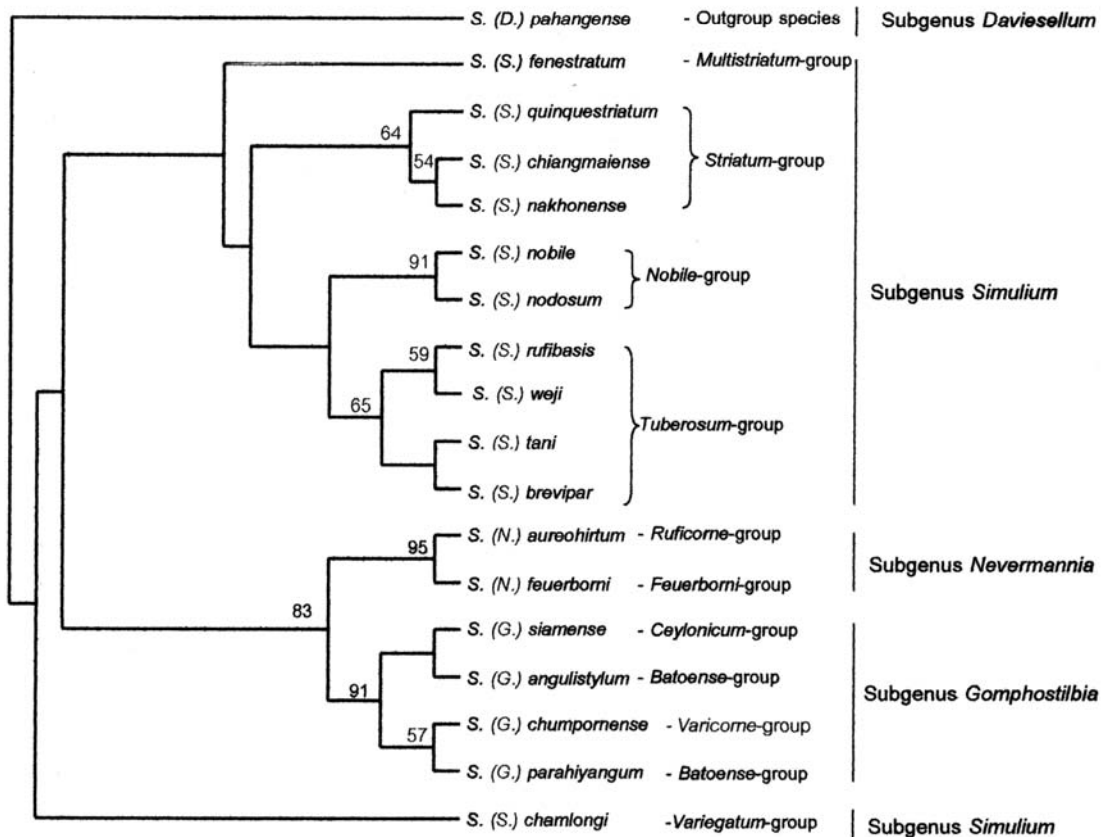
ลักษณะที่ ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>S. chamlongi</i>	2	0	0	2	2	2	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. Chiangmaiense</i>	2	0	0	2	2	2	1	2	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
<i>S. fenestratum</i>	2	0	0	2	2	2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	2
<i>S. nakhonense</i>	2	0	0	2	2	2	1	2	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
<i>S. nobile</i>	2	1	0	2	2	2	0	2	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>S. nodosum</i>	2	1	0	2	2	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>S. quinquestratum</i>	1	0	0	2	2	2	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
<i>S. rufibasis</i>	2	0	0	2	2	2	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
<i>s. tani</i>	2	0	0	2	2	2	0	1	1	0	2	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
<i>S. weji</i>	2	0	0	2	2	2	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>S. brevipar</i>	2	0	0	2	2	2	0	1	0	1	2	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
<i>S. aureohirtum</i>	2	1	1	1	1	3	0	1	1	1	0	0	0	1	0	2	1	1	0	1	0	0	0
<i>S. feuerborni</i>	2	0	1	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	1	0	2	0	1	1	1	0	1	0
<i>S. siamense</i>	2	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	0	0	0
<i>S. angulistylum</i>	2	2	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1	0	0
<i>S. chumpornense</i>	2	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	2	2	1	1	1	0	0	0
<i>S. parahiyangum</i>	2	2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	2	2	1	1	1	0	1	0
<i>S. pahangense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ 0= ลักษณะโบราณ (plesiomorphic), 1, 2 และ 3 = ลักษณะที่พัฒนามาจากบรรพบุรุษ (apomorphic)

5.9.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการโดยศึกษารูปร่างลักษณะเชิง

ปริมาณ

ผลการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำแสดงในภาพ 3.40 จะเห็นว่าแมลงวันดำแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งประกอบด้วยวันดำในสกุลย่อย *Simulium* ซึ่งวันดำที่อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันจะรวมอยู่ในแขนงเดียวกัน เช่น กลุ่มสปิชีส์ *striatum* (ซึ่งประกอบด้วย *S. Chiangmaiense*, *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum*) กลุ่มสปิชีส์ *nobile* (*S. nobile* และ *S. nodosum*) และกลุ่มสปิชีส์ *tuberosum* (*S. brevipar*, *S. rufibasis*, *S. tani* และ *S. weji*) กลุ่มที่สองประกอบด้วยวันดำในสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Nevermannia* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวันดำในสกุลย่อย *Nevermannia* มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับวันดำในสกุลย่อย *Gomphostilbia* มากกว่าสกุลย่อย *Simulium* แต่วันดำในสกุลย่อย *Gomphostilbia* ยังไม่สามารถจัดให้อยู่ในกลุ่มสกุลย่อยเดียวกันได้ รวมทั้ง *S. chamlongi* ซึ่งควรจะอยู่ในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้เช่นกัน นอกจากนี้บางแขนงของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการไม่แสดงค่า bootstrap (bootstrap มีค่าน้อยกว่า 50) ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนชนิดของวันดำที่ทำการศึกษาในกลุ่มย่อยนั้นมีจำนวนไม่มากพอซึ่งบางกลุ่มมีตัวแทนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น จึงต้องหาจำนวนชนิดของวันดำมาศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ผลชัดเจนและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 3.40 แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำสกุลย่อย *Simulium*, *Gomphostilbia* และ *Nevermannia* วิเคราะห์จากข้อมูลรูปร่างลักษณะทางปริมาณของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย โดยวิธี Neighbor joining ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b10) (1000 bootstraps replication) โดยมี *S. pahangense* เป็น outgroup species

5.9.3 ตัวอย่างและวิธีการศึกษา ITS2 ไรโบโซมดีเอ็นเอ

1. ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ศึกษามีทั้งหมดจำนวน 40 ชนิด ซึ่งจัดจำแนกอยู่ใน 5 สกุลย่อยดังนี้ สกุลย่อย *Gomphostilbia* (12 ชนิด) *Nevermannia* (5 ชนิด) *Simulium* (21 ชนิด) และริ้นดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลใด 1 ชนิด (*S. baimaii*) ริ้นดำเหล่านี้เก็บมาจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในทุกภาคของประเทศไทย (ตารางที่ 5.27)

2. วิธีการศึกษาอนุพันธุศาสตร์

นำตัวอย่างตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยมาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Collins et al (1987) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ไรโบโซมดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CP16 (5'- GCGGGTACCATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3') และ CP17 (5'-GCGCCGCGGTGTGAACTGCAGGACACATG-3') (Porter and Collins, 1991) สารละลายที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีปริมาตร 50 µl ประกอบด้วย 1x reaction buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 0.5 µM ของไพรเมอร์แต่ละชนิด 1.25 unit Taq DNA polymerase (Promega) และ 2 µl DNA โปรแกรมอุณหภูมิประกอบด้วย 95°C 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ 94°C 60 วินาที 50°C 120 วินาที และ 72°C 120 วินาที จากนั้นตามด้วย 72°C 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ที่มี ethidium bromide 0.5 µg/ml และส่องภายใต้แสง uv ทำผลผลิตให้บริสุทธิ์ด้วย GENECLAN KIT (BIO 101) แล้วทำ cloning โดยใช้ pGEM-Easy Vector จากนั้นนำดีเอ็นเอของสองหรือสามโคลนของแต่ละสปีชีส์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 จนกว่าจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันอย่างน้อยที่สุดสองโคลน โดยใช้เครื่อง ABI 3100 automated sequence (Applied Biosystem)

3. วิเคราะห์ข้อมูล

ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ บริเวณ ITS2 ไรโบโซมดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.81 สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของริ้นดำชนิดต่างๆ ได้สร้าง phylogenetic trees โดยวิธี Maximum parsimony และ Neighbor joining ของโปรแกรม PAUP version 4.0b10 (Swofford, 2002) และวิธี Maximum likelihood ของโปรแกรม MrBAYES (version 3.0B4) (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) และได้คำนวณความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Kimura two-parameter distance ของโปรแกรม Mega version 2.1 (Kumar et al., 2001)

ตารางที่ 5.27 ตัวอย่างแมลงรึ้นตำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Montisimulium*, *Simulium* และแมลงที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลใดจำนวน 1 สปีชีส์จากแหล่งต่าง ๆ ในภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย ที่ใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโบโซมลติเอ็นเอ

สปีชีส์	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ละติจูด-ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)	วัน เดือน ปี ที่เก็บ
Subgenus <i>Gomphostilbia</i>					
<i>batoense</i>-group					
<i>Simulium angulistylum</i> Takaoka & Davies	ดักแด้	WTK: น้ำตกวังตะไคร้ จังหวัดนครนายก	14° 19' N/101° 18' E	240	มิถุนายน 2541
	ดักแด้	HLU: น้ำตกห้วยหลวง จังหวัดอุบลราชธานี	15° 25' N/105° 30' E	300	พฤศจิกายน 2541
		KHK: น้ำตกขุนกรณ์ จังหวัดเชียงราย	19° 50' N/99° 40' E	500	ธันวาคม 2541
	ตัวเต็มวัยเพศผู้	MTU: น้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี	8° 45' N/99° 26' E	120	มิถุนายน 2542
	ตัวอ่อน	MTU: น้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี	8° 45' N/99° 26' E	120	มิถุนายน 2542
	ตัวดักแด้	NGA: น้ำตกหงาว จังหวัดระนอง	9° 45' N/98° 37' E	50	สิงหาคม 2542
	ตัวดักแด้	NGA: น้ำตกหงาว จังหวัดระนอง	9° 45' N/98° 37' E	50	สิงหาคม 2542
	ตัวอ่อน	BMT: บ้านแม่โต จังหวัดเชียงราย	19° 05' N/99° 24' E	480	มีนาคม 2542
	ตัวอ่อน	MTU: น้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี	8° 45' N/99° 26' E	120	พฤศจิกายน 2542
<i>Simulium decuplum</i> Takaoka & Davies	ตัวอ่อน	MTU: น้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี	8° 45' N/99° 26' E	120	พฤษภาคม 2544
<i>Simulium duolongum</i> Takaoka & Davies	ตัวอ่อน	MTU: น้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี	8° 45' N/99° 26' E	120	พฤษภาคม 2544
<i>Simulium gombakense</i> Takaoka & Davies	ตัวอ่อน	HSL: น้ำตกห้วยทรายเหลือง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 31' N/98° 27' E	950	ธันวาคม 2545
<i>Simulium parahiyangum</i> Takaoka & Sigit	ตัวอ่อน	MFA: น้ำตกหมอกฟ้า จังหวัดเชียงราย	19° 06' N/98° 46' E	545	มีนาคม 2542
<i>Simulium siamense</i> Takaoka & Suzuki	ตัวอ่อน	HSW: น้ำตกเหวสุวัต จังหวัดนครราชสีมา	14° 19' N/101° 21' E	630	มิถุนายน 2541
	ตัวอ่อน	HSW: น้ำตกเหวสุวัต จังหวัดนครราชสีมา	14° 19' N/101° 21' E	630	มิถุนายน 2541
	ตัวเต็มวัยเพศผู้	STH: น้ำตกไทรทอง จังหวัดชัยภูมิ	15° 38' N/101° 23' E	750	พฤศจิกายน 2541
<i>ceylonicum</i>-group					
<i>Simulium asakoeae</i> Takaoka & Davies	ตัวดักแด้	RPJ: โครงการหลวง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 33' N/98° 31' E	1,400	กุมภาพันธ์ 2540
	ตัวอ่อน	HKE: น้ำตกห้วยแก้ว จังหวัดเชียงใหม่	18° 30' N/98° 34' E	250	กุมภาพันธ์ 2541
	ตัวอ่อน	HKE: น้ำตกห้วยแก้ว จังหวัดเชียงใหม่	18° 30' N/98° 34' E	250	กุมภาพันธ์ 2541
	ตัวอ่อน	MSA: น้ำตกแม่สา จังหวัดเชียงใหม่	18° 32' N/98° 34' E	400	กุมภาพันธ์ 2541
<i>Simulium inthanonense</i> Takaoka & Suzuki	ตัวอ่อน	BMT: บ้านแม่โต จังหวัดเชียงราย	18° 34' N/97° 56' E	417	มีนาคม 2542
	ตัวอ่อน	SRP: น้ำตกลีริภูมิ, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 32' N/98° 31' E	1,300	สิงหาคม 2544
	ตัวอ่อน	SRP: น้ำตกลีริภูมิ, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 32' N/98° 31' E	1,300	สิงหาคม 2544
	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	BRP: น้ำตกบรีฟตร จังหวัดสงขลา	6° 17' N/100° 01' E	50	มิถุนายน 2542
<i>Simulium sheilae</i> Takaoka & Davies	ตัวอ่อน	NGA: น้ำตกหงาว จังหวัดระนอง	9° 51' N/98° 37' E	50	มีนาคม 2543
<i>Simulium</i> sp. nr. <i>sheilae</i>	ตัวอ่อน	NGA: น้ำตกหงาว จังหวัดระนอง	9° 51' N/98° 37' E	50	กรกฎาคม 2543
	ตัวเต็มวัยเพศผู้	NGA: น้ำตกหงาว จังหวัดระนอง	9° 51' N/98° 37' E	50	พฤษภาคม 2544
<i>varicorne</i>-group					
<i>Simulium burtoni</i> Takaoka & Davies	ตัวอ่อน	NNA: อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์	16° 21' N/101° 21' E	400	พฤศจิกายน 2543

ตารางที่ 5.27 (ต่อ)

สปีชีส์	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ละติจูด-ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)	วัน เดือน ปี ที่เก็บ
<i>Simulium chumpornense</i> Takaoka & Kuvangkadilok	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	KPO: น้ำตกกะเปาะ จังหวัดชุมพร	10° 44' N/99° 12' E	40	พฤษภาคม 2544
Subgenus <i>Nevermannia</i>					
<i>feuerborni</i>-group					
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	KHW: ขุนวาง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 37' N/98° 30' E	1,362	ตุลาคม 2542
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	THY: น้ำตกถ้ำใหญ่, อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย	16° 52' N/101° 46' E	1,100	ตุลาคม 2544
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	HSL: น้ำตกห้วยทรายเหลือง จังหวัดเชียงใหม่	18° 31' N/98° 27' E	950	ธันวาคม 2545
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	RPJ: โครงการหลวง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 33' N/98° 31' E	1,400	ธันวาคม 2545
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	RPJ: โครงการหลวง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 33' N/98° 31' E	1,400	พฤศจิกายน 2546
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	RPJ: โครงการหลวง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 33' N/98° 31' E	1,400	พฤศจิกายน 2546
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	RPJ: โครงการหลวง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 33' N/98° 31' E	1,400	พฤศจิกายน 2546
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	RPJ: โครงการหลวง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 33' N/98° 31' E	1,400	พฤศจิกายน 2546
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	TSN: น้ำตกถ้ำสอเหนือ, อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย	16° 52' N/100° 44' E	1,246	กุมภาพันธ์ 2547
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	PPM: น้ำตกเพ็ญพบใหม่, อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย	16° 53' N/101° 46' E	1,185	กุมภาพันธ์ 2547
<i>Simulium feuerborni</i> Edwards	ตัวอ่อน	PPM: น้ำตกเพ็ญพบใหม่, อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย	16° 53' N/101° 46' E	1,185	กุมภาพันธ์ 2547
<i>Simulium</i> sp. nr. <i>feuerborni</i> 1	ตัวดักแด้	KHW: ขุนวาง, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 37' N/98° 30' E	1,362	พฤษภาคม 2546
<i>Simulium</i> sp. nr. <i>feuerborni</i> 2	ตัวอ่อน	TBT: วนอุทยานแห่งชาติทุ่งบัวตอง จังหวัดแม่ฮ่องสอน	18° 53' N/98° 05' E	1,500	มิถุนายน 2546
<i>ruficorne</i>-group					
<i>Simulium aureohirtum</i> Brunetti	ตัวอ่อน	NGA: น้ำตกหงาว จังหวัดระนอง	9° 51' N/98° 37' E	50	มีนาคม 2543
<i>vernum</i>-group					
<i>Simulium caudisclerum</i> Takaoka & Davies	ตัวดักแด้	AKH: อ่างกา, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 35' N/98° 28' E	2,400	ธันวาคม 2545
Subgenus <i>Simulium</i>					
<i>griseifrons</i>-group					
<i>Simulium choochotei</i> Takaoka	ตัวอ่อน	MTT: น้ำตกมณฑาธาร จังหวัดเชียงใหม่	18° 48' N/98° 55' E	800	ธันวาคม 2546
	ตัวดักแด้	MTT: น้ำตกมณฑาธาร จังหวัดเชียงใหม่	18° 48' N/98° 55' E	800	ธันวาคม 2546
<i>Simulium grossifilum</i> Takaoka & Davies	ตัวอ่อน	NGA: น้ำตกหงาว, จังหวัดระนอง	9° 51' N/98° 37' E	50	มีนาคม 2543
<i>Simulium nigrogilvum</i> Summers	ตัวอ่อน	WKW: น้ำตกวังควาย, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 30' N/98° 40' E	421	ตุลาคม 2543
<i>Simulium rudnicki</i> Takaoka & Davies	ตัวอ่อน	MYA: น้ำตกแม่ยะ, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 20' N/98° 20' E	500	กุมภาพันธ์ 2541
	ตัวอ่อน	MYA: น้ำตกแม่ยะ, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 20' N/98° 20' E	500	มิถุนายน 2543
<i>malyschevi</i>-group					
<i>Simulium siripoomense</i> Takaoka & Saito	ตัวอ่อน	WKW: น้ำตกวังควาย, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 30' N/98° 40' E	421	ตุลาคม 2543
<i>multistriatum</i>-group					

ตารางที่ 5.27 (ต่อ)

สปีชีส์	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ละติจูด-ลองจิจูด	ความสูง (เมตร)	วัน เดือน ปี ที่เก็บ
<i>Simulium siripoomense</i> Takaoka & Saito	ตัวอ่อน	WKW: น้ำตกวังควาย, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 30' N/98° 40' E	421	ตุลาคม 2543
multistriatum-group					
<i>Simulium chainarongi</i> Kuvangkadilok & Takaoka	ตัวอ่อน	KLD: น้ำตกแก่งลำดวน จังหวัดอุบลราชธานี	15° 10' N/105° 12' E	140	พฤศจิกายน 2541
<i>Simulium chaliowae</i> Takaoka & Boonkemtong	ตัวอ่อน	NKH: น้ำตกนาคูหา จังหวัดแพร่	18° 06' N/100° 18' E	550	มิถุนายน 2546
	ตัวดักแด้	NKH: น้ำตกนาคูหา จังหวัดแพร่	18° 06' N/100° 18' E	550	มิถุนายน 2546
<i>Simulium fenestratum</i> Edwards	ตัวเต็มวัยเพศผู้	PHQ: บ้านพักดอยอินทนนท์, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 30' N/98° 33' E	1,250	กันยายน 2542
	ตัวดักแด้	BPF: บ้านปางแฟน จังหวัดเชียงราย	19° 00' N/99° 18' E	625	ธันวาคม 2545
<i>Simulium triglobus</i> Takaoka & Kuvangkadilok	ตัวอ่อน	TTO: น้ำตกต้นตอง จังหวัดแพร่	18° 29' N/100° 30' E	389	ธันวาคม 2541
nobile-group					
<i>Simulium nobile</i> de Meijere	ตัวอ่อน	BPA: น้ำตกบางแป จังหวัดภูเก็ต	98° 15' N/98° 40' E	30	สิงหาคม 2542
	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	KPO: น้ำตกกะเปาะ จังหวัดชุมพร	10° 44' N/99° 12' E	40	พฤศจิกายน 2543
<i>Simulium nodosum</i> Puri	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	BPF: บ้านปางแฟน จังหวัดเชียงราย	19° 00' N/99° 18' E	625	มีนาคม 2542
striatum-group					
<i>Simulium Chiangmaiense</i> Takaoka & Suzuki	ตัวอ่อน	BTY: บ้านทุ่งยาว จังหวัดเชียงราย	19° 11' N/99° 27' E	654	มีนาคม 2542
<i>Simulium nakhonense</i> Takaoka & Suzuki	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	MTU: น้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี	8° 45' N/99° 26' E	120	ธันวาคม 2543
<i>Simulium quinquistriatum</i> Shiraki	ตัวเต็มวัยเพศผู้	MTU: น้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี	8° 45' N/99° 26' E	120	ธันวาคม 2543
tuberosum-group					
<i>Simulium brevipar</i> Takaoka & Davies	ตัวอ่อน	STI: น้ำตกสายทิพย์ จังหวัดอุดรธานี	17° 44' N/100° 59' E	1,615	ตุลาคม 2541
<i>Simulium rufibasis</i> Brunetti	ตัวเต็มวัยเพศผู้	KMP: น้ำตกกัวแม่ปาน, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 33' N/98° 29' E	2,300	มิถุนายน 2543
<i>Simulium tani</i> Takaoka & Davies	ตัวเต็มวัยเพศผู้	LSA: น้ำตกลานสาง จังหวัดตาก	16° 46' N/99° 01' E	280	มกราคม 2542
	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	MTU: น้ำตกเหมืองทวด จังหวัดสุราษฎร์ธานี	8° 45' N/99° 26' E	120	พฤศจิกายน 2543
<i>Simulium weji</i> Takaoka	ตัวอ่อน	TTH: น้ำตกต้นตอง จังหวัดลำปาง	19° 04' N/99° 43' E	700	ธันวาคม 2545
<i>Simulium doipuiense</i> Takaoka & Choochote	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	AKH: อ่างกา, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 35' N/98° 28' E	2,400	ธันวาคม 2543
<i>Simulium</i> sp. nr. <i>rufibasis</i>	ตัวอ่อน	AKH: อ่างกา, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 35' N/98° 28' E	2,400	ธันวาคม 2543
variegatum-group					
<i>Simulium chamlongi</i> Takaoka & Suzuki	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	SRP: น้ำตกสิริภูมิ, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 32' N/98° 31' E	1,300	กันยายน 2542
Subgenus Montisimulium					
<i>Simulium merga</i> Takaoka & Choochote	ตัวอ่อน	AKH: อ่างกา, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	18° 35' N/98° 28' E	2,400	ธันวาคม 2543
Unknown subgenus					
<i>Simulium baimaii</i> Kuvangkadilok & Takaoka	ตัวดักแด้	THY: น้ำตกถ้ำใหญ่, อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย	16° 52' N/101° 46' E	1,100	ตุลาคม 2545

5.9.4 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS2 ไรบิโอโซมัลดีเอ็นเอ

1. ความยาวและองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ไรบิโอโซมัลดีเอ็นเอ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาแมลงวันดำจำนวน 40 ชนิดที่จัดจำแนกอยู่ใน 5 กลุ่มสกุลย่อย ได้แก่ กลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *S. (G.) angulistylum*, *S. (G.) decuplum*, *S. (G.) duolongum*, *S. (G.) gombakense*, *S. (G.) parahiyangum*, *S. (G.) siamense*, *S. (G.) asakoe*, *S. (G.) inthanonense*, *S. (G.) sheilae*, *S. (G.) sp. nr. sheilae*, *S. (G.) burtoni* และ *S. (G.) chumpornense* กลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* จำนวน 5 ชนิด คือ *S. (N.) feuerborni*, *S. (N.) feuerborni 1*, *S. (N.) feuerborni 2*, *S. (N.) caudisclerum* และ *S. (N.) aureohirtum* กลุ่มสกุลย่อย *Montisimulium* จำนวน 1 ชนิด คือ *S. (M.) merga* กลุ่มสกุลย่อย *Simulium* จำนวน 21 ชนิด ได้แก่ *S. (S.) choochotei*, *S. (S.) grossifilum*, *S. (S.) rudnicki*, *S. (S.) siripoomense*, *S. (S.) chainarongi*, *S. (S.) chaliowae*, *S. (S.) fenestratum*, *S. (S.) triglobus*, *S. (S.) nobile*, *S. (S.) nodosum*, *S. (S.) Chiangmaiense*, *S. (S.) nakhonense*, *S. (S.) quinquestratum*, *S. (S.) brevipar*, *S. (S.) rufibasis*, *S. (S.) sp. nr. rufibasis*, *S. (S.) tani*, *S. (S.) weji* และ *S. (S.) doipuiense*, *S. (S.) chamlongi* และ *S. (S.) nigrogilvum* และแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายอยู่ในสกุลใดจำนวน 1 ชนิด คือ *S. baimaii*

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จำนวน 12 ชนิด กลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* จำนวน 5 ชนิด กลุ่มสกุลย่อย *Montisimulium* จำนวน 1 ชนิด กลุ่มสกุลย่อย *Simulium* จำนวน 21 ชนิด และแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายอยู่ในสกุลใด จำนวน 1 ชนิด พบว่ามีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 247-308 คู่ (ตารางที่ 5.28) โดยแมลงวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ *S. (G.) angulistylum* เท่ากับ 286 คู่, *S. (G.) decuplum* เท่ากับ 294 คู่, *S. (G.) duolongum* เท่ากับ 274 คู่, *S. (G.) gombakense* เท่ากับ 251 คู่, *S. (G.) parahiyangum* เท่ากับ 279 คู่, *S. (G.) siamense* เท่ากับ 256 คู่, *S. (G.) asakoe* เท่ากับ 249 คู่, *S. (G.) inthanonense* เท่ากับ 247 คู่, *S. (G.) sheilae* เท่ากับ 266 คู่, *S. sp. nr. sheilae* เท่ากับ 266 คู่, *S. (G.) burtoni* เท่ากับ 249 คู่, *S. (G.) chumpornense* เท่ากับ 292 คู่ กลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ *S. (N.) feuerborni* เท่ากับ 273-282 คู่, *S. (N.) sp. nr. feuerborni 1* คู่, เท่ากับ 276 คู่, *S. (N.) sp. nr. feuerborni 2* เท่ากับ 286 คู่, *S. (N.) aureohirtum* เท่ากับ 266 คู่ และ *S. (N.) caudisclerum* เท่ากับ 270 คู่ กลุ่มสกุลย่อย *Simulium* มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ *S. (S.) choochotei* เท่ากับ 308 คู่, *S. (S.) grossifilum* เท่ากับ 290 คู่, *S. (S.) nigrogilvum* เท่ากับ 277 คู่, *S. (S.) rudnicki* เท่ากับ 281 คู่, *S. (S.) siripoomense* เท่ากับ 271 คู่, *S. (S.) chainarongi* เท่ากับ 283 คู่, *S. (S.) chaliowae* เท่ากับ 274 คู่, *S. (S.) fenestratum* เท่ากับ 271 คู่, *S. (S.) triglobus* เท่ากับ 278 คู่, *S. (S.) nobile* เท่ากับ 264 คู่, *S. (S.) nodosum* เท่ากับ 278 คู่, *S. (S.) Chiangmaiense* เท่ากับ 262 คู่, *S. (S.) nakhonense* เท่ากับ 267 คู่, *S. (S.) quinquestratum* เท่ากับ 260 คู่, *S. (S.) brevipar* เท่ากับ 269 คู่, *S. (S.) rufibasis* เท่ากับ 261 คู่, *S. (S.) tani* เท่ากับ 271 คู่, *S. (S.) weji* เท่ากับ 287 คู่, *S. (S.) doipuiense* เท่ากับ 259 คู่, *S. (S.) sp. nr. rufibasis* เท่ากับ 261 คู่ และ *S. (S.) chamlongi*

เท่ากับ 281 คู่ กลุ่มสกุลย่อย *Montisimulium* คือ *S. (M.) merga* มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ เท่ากับ 268 คู่ และแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลใดคือ *S. baimaii* มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 291 คู่ องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ A และนิวคลีโอไทด์ T ของแมลงวันดำเหล่านี้มีค่า ระหว่าง 71.0–83.3% โดยมีค่าเฉลี่ยนิวคลีโอไทด์ A เท่ากับ 37.6 (34.5–40.6%) นิวคลีโอไทด์ T เท่ากับ 38.8 (34.1–44.9%) นิวคลีโอไทด์ G เท่ากับ 12.6 (8.3–15.9%) และนิวคลีโอไทด์ C เท่ากับ 11.0 (7.7–14.4%) (ตารางที่ 5.28)

2. การแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific variation)

จากการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างโคลน (intraindividual variation) ของแมลงวันดำจำนวน 13 ชนิด ได้แก่ กลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จำนวน 6 ชนิด (*S. (G.) angulistylum*, *S. (G.) decuplum*, *S. (G.) parahiyangum*, *S. (G.) asakoe*, *S. (G.) sheilae*, และ *S. (G.) sp. nr. sheilae*), *Nevermannia* จำนวน 2 ชนิด (*S. (N.) aureohirtum* และ *S. (N.) feuerborni*) และ *Simulium* จำนวน 5 ชนิด (*S. (S) siripoomense*, *S. (S) fenestratum*, *S. (S) triglobus*, *S. (S) nakhonense* และ *S. (S) tani*)

กลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*

ตัวอ่อนของ *S. (G.) angulistylum* จากน้ำตกขุนกรณ์ จ. เชียงราย โคลน L1 และโคลน L2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 286 คู่ และมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน แต่ โคลน L3 มีความยาวเท่ากับ 287 คู่ และมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่างจาก โคลน L1 และโคลน L2 โดยเกิด transition 1 ตำแหน่ง, insertion 3 ตำแหน่ง และ deletion 2 ตำแหน่ง ความแปรผัน ระหว่างโคลนมีค่าเท่ากับ 0.7% อย่างไรก็ตามโคลน L1 และโคลน L2 มีความยาวและการเรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์เหมือนกับสองโคลนของตัวเต็มวัยตัวผู้ (โคลน M1 และโคลน M2) และสามโคลนของตัว อ่อน (โคลน L1 โคลน L2 และโคลน L3) จากน้ำตกเหมืองทวด จ. สุราษฎร์ธานี และเหมือนกับหนึ่ง โคลน (โคลน L1) ของตัวอ่อนจากน้ำตกห้วยหลวง จ. อุบลราชธานี สองโคลน (โคลน P1 และโคลน P2) ของตัวดักแด้จากน้ำตกวังตะไคร้ จ. นครนายกและสองโคลน (โคลน P1 และโคลน P2) ของตัวดักแด้ จากน้ำตกหงาว ตัวอ่อนของแมลงวันดำชนิด *S. (G.) decuplum* จากน้ำตกเหมืองทวด จ.สุราษฎร์ธานี มีสองโคลนคือ โคลน L1 และโคลน L2 ซึ่งมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 294 คู่ แต่มี ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน โดยเกิด transition 1 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนมีค่าเท่ากับ 0.3% แต่อย่างไรก็ตามโคลน L1 มีความยาวและการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับสองโคลน (โคลน L1 และโคลน L2) ของตัวอ่อนจากบ้านแม่โถ จ. เชียงราย สามโคลนโคลน (L1 โคลน L2 และโคลน L3) ของตัวอ่อนของแมลงวันดำชนิด *S. (G.) parahiyangum* จากน้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงราย มีความยาว ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 279 คู่ โดยโคลน L1 และโคลน L2 มีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ เหมือนกัน แต่ต่างจากโคลน L3 คือเกิด transversion 1 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนมีค่าเท่า กับ 0.4% สองโคลน (โคลน L1 และโคลน L2) ของตัวอ่อนแมลงวันดำชนิด *S. (G.) asakoe* จากน้ำตก แม่สา จ. เชียงใหม่ มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 247 คู่ และมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ เหมือนกัน แต่โคลน L3 ของตัวอ่อนที่เก็บจากน้ำตกแม่สา มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากโคลน

L1 และโคลน L2 โดยมีความยาวเท่ากับ 249 คู่ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากสองโคลนนี้ โดยการเกิด transition 1 ตำแหน่ง และ deletion 2 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนมีค่าเท่ากับ 0.4%

ตารางที่ 5.28 แสดงความยาวและเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำในกลุ่ม สกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Montisimulium*, *Simulium* และแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลจำนวน 1 สปีชีส์

Species	Sequence length	Adenine (%)	Thymine (%)	Guanine (%)	Cytosine (%)	%AT
Subgenus <i>Gomphostilbia</i>						
<i>batoense</i> -group						
1. <i>S. (G.) angulistylum</i>	286	35.7	38.1	15.7	10.5	73.8
2. <i>S. (G.) decuplum</i>	294	38.1	37.1	13.9	10.9	75.2
3. <i>S. (G.) duolongum</i>	274	39.1	34.7	15.0	11.3	73.8
4. <i>S. (G.) gombakense</i>	251	36.7	34.3	15.9	13.1	71.0
5. <i>S. (G.) parahiyangum</i>	279	36.6	38.0	15.1	10.4	74.6
6. <i>S. (G.) siamense</i>	256	36.7	35.9	15.6	11.7	72.6
<i>ceylonicum</i> -group						
1. <i>S. (G.) asakoeae</i>	249	40.6	35.3	12.4	11.6	75.9
2. <i>S. (G.) inthanonense</i>	247	37.7	35.6	14.6	12.1	73.3
3. <i>S. (G.) sheilae</i>	266	40.2	37.2	12.8	9.8	77.4
4. <i>S. sp.nr.sheilae</i>	266	40.2	38.0	12.4	9.4	78.2
<i>varicorne</i> -group						
1. <i>S. (G.) burtoni</i>	249	39.0	35.3	14.5	11.2	74.3
2. <i>S. (G.) chumpornense</i>	292	38.0	36.0	15.1	11.0	74.0
Subgenus <i>Nevermannia</i>						
<i>feuerborni</i> -group						
1. <i>S. (N.) feuerborni</i> (KHW)	282	36.5	36.2	14.5	12.8	72.7
2. <i>S. (N.) feuerborni</i> (HSL)	282	36.5	36.2	14.5	12.8	72.7
3. <i>S. (N.) feuerborni</i> (PPM)	282	36.5	36.2	14.5	12.8	72.7
4. <i>S. (N.) feuerborni</i> (PPM)	282	36.5	36.2	14.5	12.8	72.7
5. <i>S. (N.) feuerborni</i> (THY)	281	37.0	35.6	14.2	13.2	72.6
6. <i>S. (N.) feuerborni</i> 1 (RPJ)	281	37.0	35.6	14.2	13.2	72.6
7. <i>S. (N.) feuerborni</i> 2 (RPJ)	281	37.0	35.6	14.2	13.2	72.6
8. <i>S. (N.) feuerborni</i> (TSN)	282	36.9	36.9	14.2	12.1	73.8
9. <i>S. (N.) feuerborni</i> 4 (RPJ)	281	35.6	37.4	14.6	12.5	73.0
10. <i>S. (N.) feuerborni</i> 5 (RPJ)	281	36.7	35.2	14.6	13.5	71.9
11. <i>S. (N.) feuerborni</i> 3 (RPJ)	273	35.9	35.9	15.0	13.2	71.8
12. <i>S. (N.) sp. nr. feuerborni</i> 1	276	36.6	36.6	14.5	12.3	73.2
13. <i>S. (N.) sp. nr. feuerborni</i> 2	286	37.8	35.7	13.6	12.9	73.5
<i>ruficorne</i> -group						
1. <i>S. (N.) aureohirtum</i>	266	36.1	36.5	14.7	12.8	72.6
<i>vernum</i> -group						
1. <i>S. (N.) caudisclerum</i>	270	37.4	34.1	14.1	14.4	71.5
Subgenus <i>Simulium</i>						
<i>griseifrons</i> -group						
1. <i>S. (S.) choochotei</i>	308	38.3	43.2	9.1	9.4	81.5

ตารางที่ 5.28 (ต่อ)

Species	Sequence length	Adenine (%)	Thymine (%)	Guanine (%)	Cytosine (%)	%AT
2. <i>S. (S.) grossifilum</i>	290	37.2	41.4	11.4	10.0	78.6
3. <i>S. (S.) nigrogilvum</i>	277	37.9	41.5	10.5	10.1	79.4
4. <i>S. (S.) rudnicki</i>	281	37.7	40.9	11.0	10.3	78.6
<i>malyschevi</i> -group						
1. <i>S. (S.) siripoomense</i>	271	38.7	38.4	11.8	11.1	77.1
<i>multistriatum</i> -group						
1. <i>S. (S.) chainarongi</i>	283	38.5	44.9	8.8	7.8	83.4
2. <i>S. (S.) chaliowae</i>	274	39.4	43.8	8.8	8.0	83.2
3. <i>S. (S.) fenestratum</i>	271	40.6	43.2	8.5	7.7	83.8
4. <i>S. (S.) triglobus</i>	278	38.5	45.3	8.3	7.9	83.8
<i>nobile</i> -group						
1. <i>S. (S.) nobile</i>	264	36.4	39.8	12.9	11.0	76.2
2. <i>S. (S.) nodosum</i>	278	36.0	42.4	11.5	10.1	78.4
<i>striatum</i> -group						
1. <i>S. (S.) Chiangmaiense</i>	262	39.7	41.6	9.5	9.2	81.3
2. <i>S. (S.) nakhonense</i>	267	39.7	42.7	9.0	8.6	82.4
<i>tuberosum</i> -group						
1. <i>S. (S.) brevipar</i>	269	39.4	42.4	8.9	9.3	81.8
2. <i>S. (S.) rufibasis</i>	261	36.4	43.7	10.7	9.2	80.1
3. <i>S. (S.) tani</i>	271	36.5	44.6	10.0	8.9	81.1
4. <i>S. (S.) weji</i>	287	36.6	44.3	10.1	9.1	80.9
5. <i>S. (S.) doipuiense</i>	259	34.7	43.6	11.6	10.0	78.3
6. <i>S. (S.) sp.nr.rufibasis</i>	261	34.5	44.4	11.9	9.2	78.9
<i>variegatum</i> -group						
1. <i>S. (S.) Chamlongi</i>	281	39.1	37.0	11.4	12.5	76.1
Subgenus <i>Montisimulium</i>						
1. <i>S. (M.) merga</i>	268	38.8	35.8	12.3	13.1	74.6
Unknown subgenus						
1. <i>S. baimaii</i>	291	38.8	39.5	11.3	10.3	78.3
ค่าเฉลี่ย	274.1	37.6	38.8	12.6	11.0	76.4

อย่างไรก็ตามโคลน L3 มีความยาวและการเรียงลำดับเบสเหมือนกับโคลน (โคลน L1 และ โคลน L2 ของตัวอ่อนที่ 1 และโคลน L1 และ โคลน L2 ของตัวอ่อนที่ 2) ของตัวอ่อนจากน้ำตกห้วยแก้ว จ. เชียงใหม่ และหนึ่งโคลน (โคลน P1) ของดักแด้จากโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ สองโคลน (โคลน L1 และโคลน L2) ของตัวอ่อนรินดำชนิด *S. (G.) sheilae* จากน้ำตกหงาว จ. ระนอง และสองโคลน (โคลน F1 และโคลน F2) ของตัวเต็มวัยจากน้ำตกบริพัตร จ. สงขลา มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 266 คู่ แต่โคลน L2 มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากโคลนอื่นโดยเกิด transversion 1 ตำแหน่ง ในทำนองเดียวกันหกลโคลนของแมลงรินดำชนิด *S. (G.) sp. nr. sheilae* จากน้ำตกหงาว จ. ระนอง (โคลน L1, โคลน L2, โคลน L3, โคลน M1, โคลน M2 และโคลน M3) มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์

เท่ากันคือ 266 คู่ แต่โคลน L3 มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากห้าโคลนโดยเกิด transversion 1 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนของแมลงวันดำทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากันคือ 0.4%

กลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia*

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 พบการแปรผันระหว่างโคลนภายในตัวเดียวกัน (intraindividual variation) ในกลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* จำนวน 2 ชนิด คือ *S. (N.) aureohirtum* และ *S. (N.) feuerborni* นอกจากนี้ยังพบการแปรผันภายในประชากรเดียวกัน (intrapopulation variation) และการแปรผันระหว่างประชากร (interpopulation) ใน *S. (N.) feuerborni* อีกด้วย

สองโคลนของตัวอ่อนแมลงวันดำชนิด *S. (N.) aureohirtum* จากน้ำตกหาว จ. ระนอง โคลน 1 และโคลน 2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 284 คู่ และมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน แต่โคลน 3 มีความยาวเท่ากับ 281 คู่ และมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่างจาก โคลน 1 และโคลน 2 โดยเกิด transition 3 ตำแหน่ง และ deletion 3 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนของแมลงวันดำทั้งสองชนิดมีค่าค่อนข้างสูงคือ 1.1%

สำหรับ *S. (N.) feuerborni* ทำการศึกษาทั้งหมด 6 ประชากร (23 โคลน จากตัวอ่อน 11 ตัว) โดยแบ่งเป็น 2 จังหวัด คือ จาก จ. เชียงใหม่ 3 ประชากร ได้แก่ จากโครงการหลวง (11 โคลน จากตัวอ่อน 5 ตัว) น้ำตกห้วยทรายเหลือง (2 โคลน จากตัวอ่อน 1 ตัว) และขุนวาง (2 โคลน จากตัวอ่อน 1 ตัว) และจากอุทยานแห่งชาติภูกระดึง จ. เลย 3 ประชากร ได้แก่ น้ำตกถ้ำใหญ่ (2 โคลน จากตัวอ่อน 1 ตัว) น้ำตกเพ็ญพบใหม่ (4 โคลน จากตัวอ่อน 1 ตัว) และจากน้ำตกถ้ำสอเหนือ (2 โคลน จากตัวอ่อน 1 ตัว) ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ 23 โคลน อยู่ระหว่าง 273-282 คู่ ในจำนวน 23 โคลนนี้มี 6 โคลน (4 โคลน ของ *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 1 และ 2 จากโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ และ 2 โคลน ของตัวอ่อนหนึ่งตัว จากน้ำตกถ้ำใหญ่ จ. เลย) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน และมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 281 คู่ และมี 8 โคลน (2 โคลน ของตัวอ่อนหนึ่งตัว จากทั้งน้ำตกห้วยทรายเหลือง และขุนวาง จ. เชียงใหม่ และ 4 โคลน ของตัวอ่อน 2 ตัว จากน้ำตกเพ็ญพบใหม่ จ. เลย) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันเช่นกัน และมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 282 คู่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 6 โคลน และ 8 โคลนนี้มีความแตกต่างกัน 5 ตำแหน่ง โดยเกิด transversion 1 ตำแหน่ง, transition 3 ตำแหน่ง และ deletion 1 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองนี้มีค่าเท่ากับ 1.4% สองโคลนของตัวอ่อนจากน้ำตกถ้ำสอเหนือ จ. เลย มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน และมีความยาวเท่ากับ 282 คู่ ซึ่งเท่ากับ 8 โคลน (2 โคลน ของตัวอ่อนหนึ่งตัว จากทั้งน้ำตกห้วยทรายเหลือง และขุนวาง จ. เชียงใหม่ และ 4 โคลน ของตัวอ่อน 2 ตัว จากน้ำตกเพ็ญพบใหม่ จ. เลย) แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 2 ตำแหน่ง โดยเกิด transition และ transversion อย่างละ 1 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองนี้มีค่าเท่ากับ 0.7% นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากถ้ำสอเหนือมีความแตกต่างจาก 6 โคลน (4 โคลน ของ *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 1 และ 2 จากโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ และ 2 โคลน ของตัวอ่อนหนึ่งตัว จากน้ำตกถ้ำใหญ่ จ. เลย) 6 ตำแหน่ง โดยเกิด transversion 2 ตำแหน่ง และ transition 4 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองนี้มีค่าเท่ากับ 1.5%

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของประชากร *S. feuerborni* จากโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในประชากร (intrapopulation variation) โดยได้ทำการศึกษาวัวอ่อนทั้งหมด 5 ตัว (*S. feuerborni* ตัวที่ 1, *S. feuerborni* ตัวที่ 2, *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 3, *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 4 ตัวละ 2 โคลน และ *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 5 จำนวน 3 โคลน) พบว่าได้ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน โดยมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 273 คู่ พบใน *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 3, 281 คู่ พบใน *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 3 และ 4 แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน และ 282 คู่ พบใน *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 1 และ 2 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เกิดขึ้นพบทั้ง transition, transversion, insertion/ deletion และเกิดสองเบสที่ซ้ำกัน ความแปรผันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในประชากรนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 0-2.2% (ภาพที่ 5.39, ตารางที่ A-4 ในภาคผนวก 2) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในตัวเดียวกัน (intraindividual variation) ในประชากรนี้อีกด้วย ซึ่งพบใน *S. (N.) feuerborni* ตัวที่ 5 มีสองโคลนคือ โคลน 1 และ 2 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน และต่างจากโคลน 3 โดยเกิด transition 2 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนมีค่าเท่ากับ 0.7%

นอกจากนี้ยังพบความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสองประชากรของ *S. (N.) feuerborni* ในดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่ คือ โครงการหลวง (10 โคลน จากตัวอ่อน 5 ตัว) และ น้ำตกห้วยทรายเหลือง (2 โคลน จากตัวอ่อน 1 ตัว) มีค่าค่อนข้างสูง คือมีค่าอยู่ระหว่าง 1.5-2.6% โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นพบทั้ง transition, transversion และ insertion/ deletion (ภาพที่ 5.40, ตารางที่ A-5 ในภาคผนวก 2)

กลุ่มสกุลย่อย *Simulium*

สามโคลนของตัวอ่อนแมลงวันดำชนิด *S. (S.) siripoomense* จากน้ำตกวังควาย จ. เชียงใหม่ มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 271 คู่ (โคลน L1 โคลน L2 และโคลน L3) โดยโคลน L1 และโคลน L2 มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน แต่ต่างจากโคลน L3 โดยการเกิด transition 1 ตำแหน่ง และ transversion 1 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนมีค่าเท่ากับ 0.7% สองโคลนของตัวเต็มวัยเพศผู้ของแมลงวันดำชนิด *S. (S.) fenestratum* จากบ้านปางแพน จ. เชียงใหม่ คือ โคลน M1 และโคลน M2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 271 คู่ และมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน โคลน M3 ซึ่งมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 274 คู่ และมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากสองโคลนโดยเกิด transversion 1 ตำแหน่ง และ insertion 3 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนมีค่าเท่ากับ 0.7% อย่างไรก็ตาม โคลน M1 และโคลน M2 มีความยาวและการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับสองโคลน (โคลน P1 และโคลน P2) จากบ้านพักดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่ สามโคลนของตัวอ่อนชนิด *S. (S.) triglobus* จากน้ำตกต้นตอง จ. น่าน มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 278 คู่ (โคลน L1 โคลน L2 และโคลน L3) โดยโคลน L1 และ โคลน L2 มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน แต่ต่างจากโคลน L3 โดยการเกิด transition 2 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนของชนิดนี้ มีค่าเท่ากับ *S. fenestratum* คือ 0.7% สองโคลนของตัวเต็มวัยเพศเมียของแมลงวันดำชนิด *S. (S.) nakhonense* จากน้ำตกเหมืองทวด จ. สุราษฎร์ธานี คือ โคลน F1 และโคลน

F2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 263 คู่ และมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน แต่โคลน F3 มีความยาวเท่ากับ 267 คู่ และมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่างจากโคลน F1 และโคลน F2 โดยเกิด transition 1 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนมีค่าเท่ากับ *S. fenestratum* คือ 0.4% ในทำนองเดียวกัน สองโคลนของแมลงวันดำตัวเมียของ *S. (S.) tani* จากน้ำตกเหมืองทวด จ. สุราษฎร์ธานี คือ โคลน F1 และโคลน F2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากันคือ 271 คู่ และมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน แต่โคลน F3 มีความยาวเท่ากับ 265 คู่ และมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่างจากโคลน F1 และโคลน F2 โดยเกิด transition และ transversion อย่างละ 1 ตำแหน่ง และ deletion 6 ตำแหน่ง ความแปรผันระหว่างโคลนมีค่าเท่ากับ 0.8% อย่างไรก็ตาม โคลน F1 และโคลน F2 มีความยาวและการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับสองโคลนของตัวเต็มวัยตัวผู้ (โคลน M1 และโคลน M2) จากน้ำตกลานสาง จ. ตาก

```

S.feuerborni1_L1 (RPJ)  ATTTATCAATAGAACTGTTCTTTTCATC--GAAAGATGCAAGACGCACGTGTCAACTATAA  58
S.feuerborni1_L2 (RPJ)  .....--.....  58
S.feuerborni2_L1 (RPJ)  .....--.....  58
S.feuerborni2_L2 (RPJ)  .....--.....  58
S.feuerborni3_L1 (RPJ)  .....C..AT-----G.....  52
S.feuerborni3_L2 (RPJ)  .....C..AT-----G.....  52
S.feuerborni4_L1 (RPJ)  .....C....--.....  58
S.feuerborni4_L2 (RPJ)  .....C....--.....  58
S.feuerborni5_L1 (RPJ)  .....TTTA.T....ATT.....  60
S.feuerborni5_L2 (RPJ)  .....TTTA.T....ATT.....  60
***** ** *****

S.feuerborni1_L1 (RPJ)  GACTAGCTTTAATCGGCCAGACTTATATTGATTAAATCAAGAGATGTGAAAAATCAAAT  118
S.feuerborni1_L2 (RPJ)  .....  118
S.feuerborni2_L1 (RPJ)  .....  118
S.feuerborni2_L2 (RPJ)  .....  118
S.feuerborni3_L1 (RPJ)  .....  112
S.feuerborni3_L2 (RPJ)  .....  112
S.feuerborni4_L1 (RPJ)  .....  118
S.feuerborni4_L2 (RPJ)  .....  118
S.feuerborni5_L1 (RPJ)  .....  120
S.feuerborni5_L2 (RPJ)  .....  120
*****

S.feuerborni1_L1 (RPJ)  ACAGTTAACACATATCAATTTGATTGTGAAAGCCTATTTAATATTTTATATGAAACTATC  178
S.feuerborni1_L2 (RPJ)  .....  178
S.feuerborni2_L1 (RPJ)  .....  178
S.feuerborni2_L2 (RPJ)  .....  178
S.feuerborni3_L1 (RPJ)  .....  172
S.feuerborni3_L2 (RPJ)  .....  172
S.feuerborni4_L1 (RPJ)  .....  178
S.feuerborni4_L2 (RPJ)  .....  178
S.feuerborni5_L1 (RPJ)  .....  180
S.feuerborni5_L2 (RPJ)  .....  180
*****

```

ภาพที่ 5.41 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำชนิด *Simulium (Nevermannia.) feuerborni* จำนวน 5 ตัว (10 โคลน) ที่เก็บจากโครงการหลวง อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่

```

S.feuerborni1_L1 (RPJ) ATTTCTTTGTAAATTGTATATGTAGATTATAAAACATAATATTGAATTGGGCGATCGAT 238
S.feuerborni1_L2 (RPJ) ..... 238
S.feuerborni2_L1 (RPJ) ..... 238
S.feuerborni2_L2 (RPJ) ..... 238
S.feuerborni3_L1 (RPJ) .....G.....G. 232
S.feuerborni3_L2 (RPJ) .....G.....G. 232
S.feuerborni4_L1 (RPJ) .....G..... 238
S.feuerborni4_L2 (RPJ) .....G..... 238
S.feuerborni5_L1 (RPJ) .....G.....G. 240
S.feuerborni5_L2 (RPJ) .....G.....G. 240
*****

```

```

S.feuerborni1_L1 (RPJ) CAATTTGATTGCGACTGCATTATTTGGATACTATAAATTATACAT 281
S.feuerborni1_L2 (RPJ) ..... 281
S.feuerborni2_L1 (RPJ) ..... 281
S.feuerborni2_L2 (RPJ) ..... 281
S.feuerborni3_L1 (RPJ) .....--..... 273
S.feuerborni3_L2 (RPJ) .....--..... 273
S.feuerborni4_L1 (RPJ) ..... 281
S.feuerborni4_L2 (RPJ) ..... 281
S.feuerborni5_L1 (RPJ) .....--..... 281
S.feuerborni5_L2 (RPJ) .....--..... 281
*****

```

ภาพที่ 5.42 (ต่อ)

```

S.feuerborni1_L1 (RPJ) ATTTATCAATAGAACTGTTCTTTTCATC--GAAAGATGCAAGACGCACGTGTCAACTATAA 58
S.feuerborni1_L2 (RPJ) .....--..... 58
S.feuerborni2_L1 (RPJ) .....--..... 58
S.feuerborni2_L2 (RPJ) .....--..... 58
S.feuerborni3_L1 (RPJ) .....C..AT-----G..... 52
S.feuerborni3_L2 (RPJ) .....C..AT-----G..... 52
S.feuerborni4_L1 (RPJ) .....C.....--..... 58
S.feuerborni4_L2 (RPJ) .....C.....--..... 58
S.feuerborni5_L1 (RPJ) .....TTTA.T.....ATT..... 60
S.feuerborni5_L2 (RPJ) .....TTTA.T.....ATT..... 60
S.feuerborni_L1 (HSL) .....--.....AT..... 58
S.feuerborni_L2 (HSL) .....--.....AT..... 58
*****

```

```

S.feuerborni1_L1 (RPJ) GACTAGCTTTAATCGGCCAGACTTATATTGATTAAATCAAGAGATGTGAAAAATCAAAT 118
S.feuerborni1_L2 (RPJ) ..... 118
S.feuerborni2_L1 (RPJ) ..... 118
S.feuerborni2_L2 (RPJ) ..... 118
S.feuerborni3_L1 (RPJ) ..... 112
S.feuerborni3_L2 (RPJ) ..... 112
S.feuerborni4_L1 (RPJ) ..... 118
S.feuerborni4_L2 (RPJ) ..... 118
S.feuerborni5_L1 (RPJ) ..... 120
S.feuerborni5_L2 (RPJ) ..... 120
S.feuerborni_L1 (HSL) ..... 118
S.feuerborni_L2 (HSL) ..... 118
*****

```

ภาพที่ 5.42 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันตำชนิด *Simulium (Nevermannia) feuerborni* จำนวน 5 ตัว (10 โคลน) ที่เก็บจากโครงการหลวง และจำนวน 1 ตัว (2 โคลน) ที่เก็บจากน้ำตกห้วยทรายเหลือง อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่

```

S.feuerborni1_L1 (RPJ) ACAGTTAACACATATCAATTTGATTGTGAAAGCCTATTTAATATTTTATATGAAACTATC 178
S.feuerborni1_L2 (RPJ) ..... 178
S.feuerborni2_L1 (RPJ) ..... 178
S.feuerborni2_L2 (RPJ) ..... 178
S.feuerborni3_L1 (RPJ) ..... 172
S.feuerborni3_L2 (RPJ) ..... 172
S.feuerborni4_L1 (RPJ) ..... 178
S.feuerborni4_L2 (RPJ) ..... 178
S.feuerborni5_L1 (RPJ) ..... 180
S.feuerborni5_L2 (RPJ) ..... 180
S.feuerborni_L1 (HSL) ..... 178
S.feuerborni_L2 (HSL) ..... 178
*****

S.feuerborni1_L1 (RPJ) ATTTCTTTGTAAATTGTATATGTAGATTATAAAACATAAATATTGAATTTGGGCGATC-GA 237
S.feuerborni1_L2 (RPJ) .....-.. 237
S.feuerborni2_L1 (RPJ) .....-.. 237
S.feuerborni2_L2 (RPJ) .....-.. 237
S.feuerborni3_L1 (RPJ) .....G.....-..G 231
S.feuerborni3_L2 (RPJ) .....G.....-..G 231
S.feuerborni4_L1 (RPJ) .....G.....-.. 237
S.feuerborni4_L2 (RPJ) .....G.....-.. 237
S.feuerborni5_L1 (RPJ) .....G.....-..G 239

S.feuerborni5_L2 (RPJ) .....G.....-..G 239
S.feuerborni_L1 (HSL) .....G.....A.....T.. 238
S.feuerborni_L2 (HSL) .....G.....A.....T.. 238
*****

```

ภาพที่ 5.42 (ต่อ)

อย่างไรก็ตามมีแมลงริ้นดำจำนวน 36 ชนิดที่ไม่พบความแปรผันทั้งภายในโคลนและภายในประชากรหรือระหว่างประชากร (intraspecific variation) ได้แก่ กลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จำนวน 11 ชนิด (*S. (G) augulistylum*, *S. (G) decuplum*, *S. (G) duolongum*, *S. (G) gombakense*, *S. (G) siamense*, *S. (G) asakoe*, *S. (G) inthanonense*, *S. (G) sheilae*, *S. (G) sp. nr. sheilae*, *S. (G) burtoni* และ *S. (G) chumpornense*) กลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* จำนวน 4 ชนิด (*S. (N) feuerborni*, *S. (N) (N) feuerborni 1*, *S. (N) feuerborni 2* และ *S. (N) caudisclerum*) กลุ่มสกุลย่อย *Simulium* จำนวน 19 ชนิด (*S. (S) choochotei*, *S. (S) grossifilum*, *S. (S) nigrogilvum*, *S. (S) rudnicki*, *S. (S) chainarongi*, *S. (S) chaliowae*, *S. (S) fenestratum*, *S. (S) nobile*, *S. (S) nodosum*, *S. (S) Chiangmaiense*, *S. (S) quinquestriatum*, *S. (S) brevipar*, *S. (S) rufibasis*, *S. (S) tani*, *S. (S) weji*, *S. (S) chamlongi*, *S. (S) douipuiense*, *S. (S) sp. nr. rufibasis*, และ *S. (S) chamlogi*) กลุ่มสกุลย่อย *Montisimulium* จำนวน 1 ชนิด (*S. (M) merga*) และแมลงริ้นดำที่ยังไม่ทราบอยู่ในสกุลจำนวน 1 ชนิด (*S. baimaii*)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า โพลีมอร์ฟิซึมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของริ้นดำเกิดเฉพาะริ้นดำบางชนิด

3. การแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงริ้นดำต่างชนิดกัน (interspecific variation)

จากการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมบริเวณ ITS2 ของแมลงริ้นดำจำนวน 40 ชนิด พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ Pairwise distance เท่ากับ 23 % มีค่าอยู่ระหว่าง 1.0% (*S. (G) sp. nr. sheilae* และ *S. (G) sheilae*; *S. (G) gombakense* และ *S. (G) siamense*, *S. (S) rudnicki* และ *S. (S) grossifilum*, *S. (S) chamlongi* และ *S. (S) siripoomense*) ถึง 35% (*S. (G) asakoe* และ *S. (S) triglobus*,

S. (G) asakoe และ *S. (S) sp. nr. rufibasis*, *S. (G) asakoe* และ *S. (S) rufibasis*) และมีค่ามากถึง 93% เมื่อเปรียบเทียบกับแมลงชนิดอื่นที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบนอกกลุ่มได้แก่ มี *Phelbotomus perniciosus*, *Chironomus annularius* และ *Drosophila yakuba* สำหรับการแปรผันทางพันธุกรรมบริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำภายในแต่ละกลุ่มสกุลย่อย พบว่าค่าเฉลี่ยของ Pairwise distance ภายในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* มีค่าเท่ากับ 1.6% มีค่าอยู่ระหว่าง 1.0% (*S. (G) sp. nr. sheilae* และ *S. (G) sheilae*; *S. (G) gombakense* และ *S. (G) siamense* ถึง 2.5% (*S. (G) asakoe* และ *S. (G) parahiyangum*) ค่าเฉลี่ยของ Pairwise distance ภายในกลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* มีค่าเท่ากับ 8.3% มีค่าอยู่ระหว่าง 2.0% (*S. (N) sp. nr. feuerborni* และ *S. (N) sp. nr. feuerborni 1*, *S. (N) sp. nr. feuerborni* และ *S. (N) sp. nr. feuerborni 2*) ถึง 1.2% (*S. (N) sp. nr. feuerborni 1* และ *S. (N) caudisclerum*) และสำหรับค่าเฉลี่ยของ Pairwise distance ภายในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* มีค่าเท่ากับ 1.2% มีค่าอยู่ระหว่าง 1.0% (*S. (S) chamlongi* และ *S. (S) siripoomense* และ *S. (S) rudnicki* และ *S. (S) grossifilum* ถึง 2.2% (*S. (S) rufibasis* และ *S. (S) nodosum*, *S. (S) tani* และ *S. (S) nodosum*, *S. (S) brevipar* และ *S. (S) nobile*) และสำหรับ *S. baimaii* ซึ่งเป็นวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่สกุลใด เมื่อวิเคราะห์ด้วยการคำนวณค่า Pairwise distance พบว่ามีความใกล้ชิดกับวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* มากที่สุด โดยมีความใกล้ชิดกับ *S. (S.) chamlongi* และ *S. (S.) siripoomense* มากที่สุดซึ่งมีค่า Pairwise distance เท่ากับ 2% (ตารางที่ 5.29)

นอกจากนี้แล้วยังคำนวณค่าเฉลี่ยของ Pairwise nucleotide differences ของวันดำทั้ง 40 ชนิด พบว่ามีค่าเท่ากับ 29.75% มีค่าอยู่ระหว่าง 1% (*S. (G) sp. nr. sheilae* และ *S. (G) sheilae*; *S. (G) gombakense* และ *S. (G) siamense*, *S. (S) rudnicki* และ *S. (S) grossifilum*, *S. (S) chamlongi* และ *S. (S) siripoomense*) ถึง 34% (*S. (G) asakoe* และ *S. (S) triglobus*, *S. (G) asakoe* และ *S. (S) sp. nr. rufibasis*, *S. (G) asakoe* และ *S. (S) rufibasis*) และมีค่ามากถึง 64.96% เมื่อเปรียบเทียบกับแมลงชนิดอื่นที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบนอกกลุ่ม สำหรับการแปรผันทางพันธุกรรมบริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำภายในแต่ละกลุ่มสกุลย่อย พบว่าค่าเฉลี่ยของ Pairwise nucleotide differences ภายในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* มีค่าเท่ากับ 17.77% มีค่าอยู่ระหว่าง 1.0% (*S. (G) sp. nr. sheilae* และ *S. (G) sheilae*; *S. (G) siamense* และ *S. (G) gomphostilbia*) ถึง 26% (*S. (G) asakoe* และ *S. (G) parahiyangum*) ค่าเฉลี่ยของ Pairwise distance ภายในกลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* มีค่าเท่ากับ 9.8% มีค่าอยู่ระหว่าง 3.0% (*S. (N) sp. nr. feuerborni* และ *S. (N) sp. nr. feuerborni 1*, *S. (N) sp. nr. feuerborni* และ *S. (N) sp. nr. feuerborni 2*) ถึง 14% *S. (N) sp. nr. feuerborni 1* และ *S. (N) caudisclerum* และสำหรับค่าเฉลี่ยของ Pairwise distance ภายในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* มีค่าเท่ากับ 13.98% มีค่าอยู่ระหว่าง 1.0% (*S. (S) chamlongi* และ *S. (S) siripoomense* และ *S. (S) rudnicki* และ *S. (S) grossifilum* ถึง 23% (*S. (S) rufibasis* และ *S. (S) nodosum*, *S. (S) tani* และ *S. (S) nodosum*, *S. (S) brevipar* และ *S. (S) nobile*) และสำหรับ *S. baimaii* ซึ่งเป็นวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่สกุลใด เมื่อวิเคราะห์ด้วยการคำนวณค่า Pairwise nucleotide differences พบว่ามีความใกล้ชิดกับวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* มากที่สุดเช่นเดียวกับการคำนวณค่า Pairwise distance โดยมีค่าเท่ากับ 2% เมื่อเปรียบเทียบกับ *S. (S.) siripoomense* และ *S. (S.) chamlongi* (ตารางที่ 5.29)

ตารางที่ 5.29 การเปรียบเทียบ Pairwise sequence ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำ 40 สปีชีส์ ซึ่งจัดอยู่ในสกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Simulium*, *Montisimulium* และ unknown subgenus โดยใช้วิธี Kimura two-parameter ด้านบนเป็น Pairwise distance ด้านล่างเป็น Nucleotide sequence differences

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
1.S. parahiayangum		0.20	0.16	0.18	0.12	0.21	0.16	0.17	0.25	0.24	0.16	0.18	0.24	0.24	0.23	0.23	0.20	0.23	0.26	0.24	0.28	0.25	0.28	0.32	0.25	0.28	0.28	0.24	0.23	0.23	0.23	0.22	0.22	0.23	0.25	0.24	0.25	0.24	0.24	0.24	1.01	1.06	0.96	
2.S. siamense	21		0.19	0.20	0.13	0.01	0.15	0.16	0.20	0.12	0.19	0.10	0.18	0.22	0.17	0.20	0.21	0.22	0.25	0.23	0.27	0.24	0.30	0.32	0.25	0.27	0.24	0.24	0.25	0.26	0.28	0.26	0.28	0.28	0.27	0.25	0.26	0.24	0.23	0.26	1.03	0.92	1.02	
3.S. aungulistylum	18	21		0.05	0.12	0.21	0.22	0.23	0.23	0.22	0.09	0.17	0.16	0.17	0.16	0.15	0.15	0.15	0.23	0.20	0.25	0.20	0.30	0.28	0.19	0.23	0.23	0.25	0.24	0.22	0.22	0.20	0.19	0.20	0.24	0.25	0.26	0.20	0.23	0.26	1.00	0.89	0.81	
4.S. decuplum	20	21	6		0.12	0.21	0.22	0.23	0.22	0.20	0.09	0.17	0.15	0.16	0.16	0.15	0.17	0.13	0.23	0.20	0.25	0.22	0.30	0.28	0.18	0.22	0.22	0.24	0.23	0.24	0.24	0.23	0.22	0.23	0.23	0.24	0.25	0.20	0.22	0.26	1.01	0.90	0.92	
5.S. duolongum	14	14	14	14		0.14	0.15	0.16	0.19	0.17	0.12	0.10	0.18	0.18	0.19	0.20	0.17	0.21	0.24	0.22	0.26	0.23	0.27	0.29	0.24	0.25	0.27	0.23	0.22	0.24	0.24	0.23	0.25	0.24	0.27	0.22	0.23	0.23	0.22	0.25	0.92	0.96	0.95	
6.S. gombakense	22	1	22	22	15		0.16	0.17	0.20	0.12	0.20	0.10	0.20	0.23	0.18	0.21	0.22	0.22	0.26	0.24	0.29	0.25	0.31	0.34	0.26	0.29	0.25	0.25	0.26	0.27	0.29	0.27	0.30	0.29	0.28	0.26	0.27	0.25	0.24	0.27	1.07	0.95	1.06	
7.S. sp.nr. sheilae	18	17	23	23	17	18		0.01	0.20	0.13	0.17	0.11	0.22	0.22	0.19	0.20	0.16	0.18	0.26	0.24	0.28	0.25	0.25	0.27	0.17	0.21	0.20	0.22	0.20	0.27	0.30	0.28	0.27	0.27	0.27	0.22	0.23	0.20	0.22	0.24	0.90	0.92	0.92	
8.S. sheilae	19	18	24	24	18	19	1		0.22	0.14	0.18	0.12	0.23	0.23	0.20	0.21	0.17	0.19	0.27	0.25	0.30	0.26	0.26	0.28	0.18	0.22	0.21	0.23	0.22	0.28	0.31	0.30	0.28	0.28	0.28	0.23	0.24	0.21	0.23	0.25	0.92	0.95	0.92	
9.S. asakoe	26	22	24	23	21	22	22	23		0.15	0.23	0.16	0.26	0.24	0.28	0.24	0.24	0.20	0.32	0.30	0.35	0.31	0.28	0.31	0.28	0.31	0.30	0.26	0.25	0.35	0.35	0.33	0.30	0.30	0.33	0.30	0.31	0.27	0.26	0.28	1.08	0.98	1.07	
10.S. inthanonense	25	14	23	22	19	14	15	16	17		0.17	0.11	0.17	0.20	0.20	0.15	0.15	0.18	0.25	0.23	0.27	0.24	0.26	0.28	0.23	0.26	0.23	0.20	0.22	0.29	0.31	0.30	0.32	0.31	0.30	0.24	0.25	0.24	0.20	0.23	1.07	0.96	1.08	
11.S. chumpornense	18	20	10	10	14	21	19	20	24	19		0.14	0.16	0.17	0.17	0.13	0.12	0.13	0.22	0.19	0.24	0.20	0.25	0.24	0.19	0.20	0.22	0.20	0.19	0.22	0.22	0.20	0.22	0.21	0.26	0.23	0.24	0.19	0.19	0.20	1.04	0.87	0.89	
12.S. burtoni	20	11	19	19	11	12	13	14	18	13	16		0.20	0.20	0.20	0.17	0.16	0.17	0.24	0.22	0.26	0.23	0.30	0.30	0.23	0.25	0.24	0.24	0.23	0.30	0.30	0.28	0.28	0.27	0.31	0.24	0.25	0.23	0.24	0.26	0.96	0.92	1.04	
13.S. feuerborni	25	20	18	17	19	21	23	24	27	19	18	21		0.02	0.02	0.11	0.11	0.15	0.19	0.17	0.22	0.18	0.20	0.24	0.17	0.22	0.19	0.15	0.16	0.20	0.23	0.22	0.22	0.24	0.20	0.18	0.19	0.18	0.14	0.17	1.04	0.99	1.04	
14.S.sp.nr.feuerborni1	25	23	19	18	19	24	23	24	25	21	19	21	3		0.05	0.12	0.11	0.15	0.23	0.20	0.25	0.22	0.22	0.25	0.18	0.23	0.23	0.16	0.15	0.24	0.26	0.25	0.23	0.25	0.24	0.21	0.22	0.20	0.17	0.18	1.05	0.95	1.00	
15.S.sp.nr.feuerborni2	24	19	18	18	20	20	21	22	29	21	19	21	3	6		0.11	0.11	0.14	0.19	0.17	0.22	0.18	0.23	0.26	0.15	0.19	0.17	0.17	0.18	0.18	0.20	0.19	0.19	0.22	0.18	0.18	0.19	0.16	0.16	0.19	0.97	0.92	1.00	
16.S. caudisclerum	24	21	17	16	21	22	21	22	25	17	14	19	12	14	13		0.07	0.10	0.19	0.17	0.22	0.18	0.22	0.25	0.17	0.22	0.19	0.14	0.15	0.22	0.24	0.23	0.20	0.23	0.19	0.16	0.17	0.16	0.14	0.16	1.00	0.81	0.98	
17.S. aureohirtum	22	22	17	19	19	23	18	19	25	17	14	18	13	13	13	8		0.13	0.19	0.17	0.22	0.17	0.20	0.24	0.14	0.16	0.17	0.15	0.14	0.19	0.22	0.20	0.20	0.20	0.22	0.16	0.17	0.16	0.15	0.17	0.92	0.75	0.95	
18.S. merga	24	23	17	15	22	23	20	21	22	20	15	19	17	17	16	12	15		0.20	0.18	0.23	0.17	0.23	0.20	0.13	0.16	0.16	0.19	0.18	0.22	0.22	0.20	0.17	0.18	0.20	0.22	0.23	0.15	0.19	0.22	1.01	0.95	1.01	
19.S. fenestratum	27	26	24	24	25	27	27	28	32	26	23	25	21	24	21	21	22		0.02	0.02	0.04	0.16	0.15	0.12	0.13	0.12	0.12	0.13	0.12	0.10	0.12	0.12	0.12	0.12	0.15	0.10	0.11	0.11	0.09	0.14	0.89	0.90	0.84	
20.S. challowae	25	24	22	22	23	25	25	26	30	24	21	23	19	22	19	19	20	2		0.03	0.02	0.14	0.13	0.10	0.11	0.11	0.10	0.11	0.10	0.12	0.10	0.10	0.12	0.13	0.09	0.10	0.09	0.07	0.12	0.92	0.84	0.84		
21.S. triglobus	29	28	26	26	27	29	29	30	34	28	25	27	23	26	23	23	23	24	2	4		0.06	0.17	0.17	0.14	0.15	0.14	0.14	0.15	0.12	0.10	0.12	0.12	0.12	0.15	0.11	0.12	0.12	0.10	0.16	0.89	0.94	0.84	
22.S. chainarongi	26	25	22	23	24	26	26	27	31	25	22	24	20	23	20	20	19	19	5	3	7		0.13	0.12	0.08	0.09	0.08	0.11	0.12	0.11	0.13	0.10	0.11	0.13	0.14	0.10	0.10	0.10	0.08	0.13	0.94	0.87	0.88	
23.S.nodosum	29	30	30	30	28	31	26	27	29	27	26	30	22	23	24	23	22	24	18	16	19	15		0.10	0.16	0.20	0.18	0.10	0.11	0.17	0.22	0.18	0.18	0.22	0.19	0.11	0.12	0.18	0.10	0.10	1.05	0.90	1.04	
24.S. nobile	32	32	29	29	29	33	28	29	31	29	25	30	25	26	27	26	25	22	17	15	19	14	12		0.17	0.17	0.16	0.13	0.14	0.17	0.19	0.16	0.18	0.19	0.22	0.16	0.17	0.18	0.13	0.13	1.17	1.07	0.95	
25.S. Chiangmaiense	26	26	21	20	25	27	19	20	29	24	21	24	19	20	17	19	16	15	14	12	16	9	18	19		0.03	0.03	0.12	0.11	0.14	0.16	0.15	0.13	0.14	0.16	0.11	0.12	0.07	0.10	0.14	0.02	0.91	0.82	0.96
26.S. nakhonense	29	28	24	23	26	29	22	23	31	27	22	26	23	24	21	23	18	18	15	13	17	10	22	19	4		0.03	0.14	0.13	0.14	0.15	0.14	0.14	0.13	0.18	0.13	0.14	0.10	0.12	0.16	0.89	0.87	0.90	
27.S. quinquestratum	29	25	24	23	27	26	21	22	30	24	23	25	21	24	19	21	19	18	14	12	16	9	20	18	4	4		0.13	0.14	0.14	0.15	0.14	0.15	0.15	0.17	0.12	0.13	0.10	0.11	0.15	0.95	0.92	0.96	
28.S. Chamlongi	25	25	26	25	24	26	23	24	27	22	22	25	17	18	19	16	17	21	14	12	16	13	12	15	14	16	15		0.01	0.16	0.18	0.17	0.16	0.19	0.15	0.06	0.07	0.11	0.03	0.02	0.94	0.84	0.97	
29.S. siripoomense	24	26	25	24	23	27	22	23	26	23	21	24	18	17	20	17	16	20	15	13	17	14	13	16	13	15	16	1		0.17	0.19	0.18	0.15	0.18	0.16	0.07	0.08	0.11	0.04	0.02	0.91	0.82	0.94	
30.S.sp.nr.rufibasis	24	27	23	25	25	28	28	29	34	29	23	30	22	25	20	23	21	23	14	12	14	13	19	19	16	16	16	18	19		0.03	0.02	0.08	0.07	0.08	0.13	0.14	0.14	0.14	0.17	0.89	0.80	0.80	
31.S. rufibasis	24	28	23	25	25	29	30	31	34	31	23	30	24	27	22	25	23	23	12	14	12	15	23	21	18	17	17	20	21	4		0.03	0.08	0.05	0.11	0.17	0.18	0.16	0.16	0.19	0.89	0.91	0.81	
32.S. dolpuiense	23	27	22	24	24	28	29	30	33	30	22	29	23	26	21	24	22	22	14	12	14	12	20	18	17	16	16	19	20	2	4		0.08	0.07	0.10	0.14	0.15	0.15	0.15	0.18	0.92	0.82	0.79	
33.S. weji	23	29	21	23	26	30	28	29	30	32	23	29	23																															

4. ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Montisimulium*, *Simulium* และแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลจำนวน 1 ชนิด

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำจำนวน 40 ชนิดที่จัดจำแนกอยู่ใน 4 สกุลย่อย ได้แก่ กลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* (12 ชนิด), *Nevermannia* (5 ชนิด), *Montisimulium* (1 ชนิด), *Simulium* (21 ชนิด) รวมทั้งแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่สกุลใดจำนวน 1 ชนิด (*S. baimaii*) โดยใช้โปรแกรม ClustalX ซึ่งมี *Phelbotomus perniciosus*, *Chironomus annularius* และ *Drosophila yakuba* เป็น outgroup species จากข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำทั้ง 40 ชนิด (ภาพที่ 5.43) แล้วนำไปสร้าง Phylogenetic trees โดยใช้โปรแกรม PAUP (ด้วยวิธี Maximum parsimony และ Neighbor joining) (ภาพที่ 5.44 และ 5.45) และโดยวิธี Maximum likelihood ของโปรแกรม MrBays โดยการคำนวณ Bayesian posterior probabilities จาก การทำ Phylogenetic trees 100 generations (ภาพที่ 5.46)

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum parsimony และ Neighbor joining ของโปรแกรม PAUP และวิธี Maximum likelihood ของโปรแกรม MrBays แสดงผลคล้ายคลึงกันโดยสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ที่มีลักษณะเป็น monophyly อย่างชัดเจน

กลุ่มแรกประกอบด้วยกลุ่มวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* และ *Simulium baimaii* กลุ่มที่สองประกอบด้วยวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia* และ *Montisimulium* กลุ่มสกุลย่อย *Montisimulium* (*S. merga*) ถูกวางอยู่ในกลุ่มเดียวกับกลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* และเป็น sister group กับกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* ซึ่งมีค่า bootstrap ที่สูง คือเท่ากับ 97%, 95% และ 50% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum likelihood, Maximum parsimony และ Neighbor joining ตามลำดับ ลักษณะสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของวันดำภายในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PAUP กลุ่มแรกเป็นวันดำในกลุ่ม *batoense* (*S. angulistylum*, *S. decuplum*, *S. parahiyangum*, *S. duolongum*, *S. siamense* และ *S. gombakense*) และกลุ่ม *varicorne* (*S. burtoni* และ *S. chumpornense*) และกลุ่มที่สองเป็นวันดำในกลุ่ม *ceyonicum* (*S. sp. nr. sheilae*, *S. sheilae*, *S. asakoe* และ *S. inthanonense*) วันดำทั้งสองกลุ่มเป็น sister group ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 88% และสำหรับผลวิเคราะห์วันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* จากวิธี Maximum likelihood ของโปรแกรม MrBays ไม่สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มชัดเจนเหมือนผลที่วิเคราะห์ได้จากวิธี Maximum parsimony และ Neighbor ของโปรแกรม PAUP

<i>S. (G.) parahiyangum</i>	ATTTATCAATAGAACTGTTCTTTTTTATTACTTTTA-GTAGTAACG--AA	47
<i>S. (G.) siamense</i>	T.....-A..A.....	36
<i>S. (G.) angulistylum</i>	A...A.G...A.TCGGCA..G.GT..	50
<i>S. (G.) decuplum</i>	C...GC.C.AA...AA.TTT.GTGT.....T	46
<i>S. (G.) duolongum</i>	-AC-TC.....	35
<i>S. (G.) gombakense</i>	-A.G.....	33
<i>S. (G.) sp.nr. sheilae</i>	T.....C-----T.C--A--G.....	32
<i>S. (G.) sheilae</i>	T.....C-----T.C--A--G.....	32
<i>S. (G.) asakoe</i>	A..A.T.....	36
<i>S. (G.) inthanonense</i>	-A--G.....	30
<i>S. (G.) chumpornense</i>	A..ATA..T.C...TA..A.G.....	44
<i>S. (G.) burtoni</i>	-AA--GG.....	30
<i>S. (N.) feuerborni</i>	-T.A.CG.AAG.TG.T-----	38
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni1</i>	-T.A.CG.AAG.....	33
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni2</i>	A-----T.A.CG.AAG.TG.T-----	39
<i>S. (N.) caudisclerum</i>	CGCAAG.A-----	32
<i>S. (N.) aureohirtum</i>	CGCAAG.A-----	32
<i>S. (M.) merga</i>	CGCAAG.A-----	32
<i>S. (S.) fenestratum</i>	T.....-T...TAA.T-A.....	34
<i>S. (S.) chaliowae</i>	T.....-T...TAA.TTA.....	35
<i>S. (S.) triglobus</i>	T.....-T---TAA.T---	30
<i>S. (S.) chainarongi</i>	T.....-T---TAA.T---	30
<i>S. (S.) nodosum</i>	T.....C---G.A-----AG.....	32
<i>S. (S.) nobile</i>	T.....C---G.A-----AG.....	32
<i>S. (S.) chiangmaiense</i>	T.A--TTA.T-A.....	34
<i>S. (S.) nakhonense</i>	T.A--TTA.T-A.....	34
<i>S. (S.) quinquestriatum</i>	T---TACT-A-----	30
<i>S. (S.) chamlongi</i>	C---G.A-----AG.....	32
<i>S. (S.) siripoomense</i>	C---G.A-----AG.....	32
<i>S. (S.) sp.nr. rufibasis</i>	C---TG---TAAA.AG.T---T	36
<i>S. (S.) rufibasis</i>	C---TG---TAAA.AG.T---T	36
<i>S. (S.) doipuiense</i>	C---CT---TATGGAA-----	33
<i>S. (S.) weji</i>	T.....C---TTA..ATAA.TAG.....	40
<i>S. (S.) tani</i>	C---T.A--AAA.AG.....	38
<i>S. (S.) brevipar</i>	TT---TGAA.AA-----	33
<i>S. (S.) rudnicki</i>	GTC.....CA.....	34
<i>S. (S.) grossifilum</i>	G.C..-AAA.CA.....	39
<i>S. (S.) choochotei</i>	C.AC---T.G--AAA.TGTT---T	38
<i>S. (S.) nigrogilvum</i>	T.....C---G.A-----AG.....	32
<i>S. baimaii</i>	C---G.A-----AG.....	32
***** *** ***** **		

<i>S. (G.) parahiyangum</i>	GACGTACGTGTCAACTATGAAGCTGATGTAAAAAT-----CAGAAT	88
<i>S. (G.) siamense</i>	C.....G.....A.....T-----T....C	77
<i>S. (G.) angulistylum</i>	A.....	91
<i>S. (G.) decuplum</i>	A.GTTG.....	87
<i>S. (G.) duolongum</i>	A.A.....T-----T....	76
<i>S. (G.) gombakense</i>	C.....A.....T-----C	74
<i>S. (G.) sp.nr. sheilae</i>	A.A.....T-----T..T..	73
<i>S. (G.) sheilae</i>	A.A.....T-----T..T..	73
<i>S. (G.) asakoe</i>	A.....T-----	77
<i>S. (G.) inthanonense</i>	C.....A.....T-----	71
<i>S. (G.) chumpornense</i>	A.....T-----	85
<i>S. (N.) feuerborni</i>	C.....A.GA..AGCT--TT.ATCG---GC...C	81
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni1</i>	---C.....A.GA..CGCT--TT.ATCG---GC...C	74
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni2</i>	C.....A.GA..AGCT--CT.ATCG---GC...C	82
<i>S. (N.) caudisclerum</i>	C.....A...T.TGGGTC.AACC---TT...G	78
<i>S. (N.) aureohirtum</i>	GA..AT--GGT..CAT-----T	71
<i>S. (M.) merga</i>	A.GA.AATCC--TT.ATTG---GAA...C	75
<i>S. (S.) fenestratum</i>	CT...A.T....A.GAAAAT.A--CTT-----TTC	71
<i>S. (S.) chaliowae</i>	CT...A.....A.GAAAAT.A--CTT-----TTC	72
<i>S. (S.) triglobus</i>	CT.T.A.T....A.GAAAA..G--TT.ATTTTGT.TTTC	78
<i>S. (S.) chainarongi</i>	CT...A.....A.GAGAA..T--TT-----TTTTC	70
<i>S. (S.) nodosum</i>	CT.A.....GAA--T..T-----TT--C	67
<i>S. (S.) nobile</i>	CT...A.....A.GAA--T..TT-----TT--C	67
<i>S. (S.) chiangmaiense</i>	A.....A.GAAAAT.A--CTT-----TT--C	71
<i>S. (S.) nakhonense</i>	A.....A.GAAAAT.A--TTT-----TTTC	72
<i>S. (S.) quinquestriatum</i>	C...A.....A.GAAAAT..--TT-----TT--C	67
<i>S. (S.) chamlongi</i>	C...A.....A--AT.C.TTT-----TC--C	69

ภาพที่ 5.43 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำจำนวน 40 ชนิด แบ่งเป็น 4 สกุลย่อย ได้แก่ กลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Simulium*, *Montisimulium* และวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลใดอีก 1 ชนิด

S. (S.) siripoomense A.....GAA--..A.TGCTT.-----TC--- 68
S. (S.) sp.nr. rufibasis CT.T.....ATGTA-----TTG.-----TTT.CA 69
S. (S.) rufibasis C..T...T....ATGTA-----TTG.-----TTT.CA 69
S. (S.) doipuiense CT.T.....ATGTA-----TTG.-----TTT.CA 66
S. (S.) weji T.....ATGT-----TTT.CA 68
S. (S.) tani T...T....ATGTT-----TCG.-----TTA.CA 71
S. (S.) brevipar CT.T.....ATGAAGA.AT...TTT.-----TCT.CA 74
S. (S.) rudnicki CT.A.A.....GAAG-.AA.T..TT.-----TTCT.. 74
S. (S.) grossifilum CT.A.A.....GAAG-.AA.T..TT.-----TTCT.. 79
S. (S.) choochotei A.....A.T.A.AT.AGT..TT.-----TTT.TCA. 81
S. (S.) nigrogilvum C....A.....GAA--..A.T.GTT.-----ATT.C. 71
S. baimaii C....A.....GAA--..A.T.CTT.-----TC--- 68
 ** * * * *

S. (G.) parahiyangum CATATTTGATTAAATCAAGAGATATGAAAA--A-----TCGAATACGATC 131
S. (G.) siamense AG.G 116
S. (G.) angulistylum T.....C.....-T-----AT....TAG.. 134
S. (G.) decuplum T.....-T-----TAG.T 130
S. (G.) duolongum-T-----TAG.G 119
S. (G.) gombakense AG.G 113
S. (G.) sp.nr. sheilae T..A 112
S. (G.) sheilae A.....T..A 112
S. (G.) asakoe TAC.T 116
S. (G.) inthanonense AG.A 110
S. (G.) chumpornense AAAAA.....G.A 133
S. (G.) burtoni AG.G 110
S. (N.) feuerborni T.....G.....ATCAAATACA.TTA..ACAT 131
S. (N.) sp.nr. feuerborni1 T.....G.....ATCAAATACA.TTAG.ACAC 124
S. (N.) sp.nr. feuerborni2 T.....G.....ATCAAATACA.TTA..ACAT 132
S. (N.) caudisclerum ATCAAATACA.TTAC.A.-A 127
S. (N.) aureohirtum C.....ATCAAATACA.TTAT.T-A. 120
S. (M.) merga T.....TCAAATACA.TTAC.A.-A 121
S. (S.) fenestratum T.....A.....T.....-TT-AAA.T-C.A.TATGG 115
S. (S.) chaliowae T.....T.....-TT-AAA.T-C.A.TATGG 116
S. (S.) triglobus T.....A.....T...T.....-TT-AAA.T-C.A.TATGG 122
S. (S.) chainarongi T.....T.....-TTTAAA.T-C.A.TATGG 115
S. (S.) nodosum-TTAAAT..A..A.TTTGG 113
S. (S.) nobile T.....-TT-----A..A--TTGG 106
S. (S.) chiangmaiense T.....T.....-TACAAT.TTC.A.TATGG 117
S. (S.) nakhonense T.....T.....-TACAAT.TTC.A.TATGG 118
S. (S.) quinquestriatum T.....T.....-TACAAT.T-C.A.TATGG 112
S. (S.) chamlongi C-AAT..-..A.AAGGT 113
S. (S.) siripoomense TT-ATTG--..A.AAGGT 111
S. (S.) sp.nr. rufibasis T.....T.....TAAAAA-----T.G.G 110
S. (S.) rufibasis T.....A.....T.....-TAAAAA-----T.G.G 110
S. (S.) doipuiense T.....C.....-TAAAAA-----T.G.G 107
S. (S.) weji T.....T.....-TAAAAA-A...T.G.G 113
S. (S.) tani T.....C.....T.....-TAAAAA-----T.G.- 111
S. (S.) brevipar T.....T.....-GAAAAA-A.-A.TAG.- 117
S. (S.) rudnicki C---.AAAAA.TC..ATATGGT 120
S. (S.) grossifilum C---.AAAAA.TC..ATATGGT 125
S. (S.) choochotei T.....TTTCCAAA.T-C.A.TATGG 130
S. (S.) nigrogilvum-AAT..A...-TGG 112
S. baimaii TT-ATTGCA..A.AAGGT 113
 ***** * **** * *** * ***

S. (G.) parahiyangum ACA--TTTATTGTGTATGCCATTCA--ATACTTT-ATATAA-- 170
S. (G.) siamense ..T.C---.GC..G.-A.A..CTTG....-T..C-.C.-A 155
S. (G.) angulistylum .-----AC..GC.TG.-.A.GCTT.....C..... 171
S. (G.) decuplum T..CAAAC..GC.TG.-.A.GCTT..... 173
S. (G.) duolongum TAT.CA-AC..GC.TG.-AAA.GCTT..... 161
S. (G.) gombakense ..T.C---.GC..G.-A.A..CTTG....-T..C-.C.-A 152
S. (G.) sp.nr. sheilae .TTGCA--..G.AT--A...ACTT.....T.....AT.-A 151
S. (G.) sheilae GTTGCA--..G.AT--A...ACTT.....T.....AT.-A 151
S. (G.) asakoe G-----GCA--A...GCAT.....T..C-.T.T.TA 152
S. (G.) inthanonense ...C---.GC.TG.TA..GCTTG....-TA...T.T.-A 151
S. (G.) chumpornense ..C.TA-T-..A...-G.A.GCTT.....-T..... 173
S. (G.) burtoni ..T.TA-T-..G.ATG.-A.A.GCTT.....T..A-..T.-A 151
S. (N.) feuerborni .TC.ATTTGA.----GTGAA.GC.T...T.----T.....G.-- 171
S. (N.) sp.nr. feuerborni1 .TC.ATTTGA.----GTGAA.GC.T...T.----T.....G.-- 164
S. (N.) sp.nr. feuerborni2 .TC.ATTTGA.G-AT.GTGCA.AC.T...T.----T.....G.-- 175
S. (N.) caudisclerum ..TTGCTTG.-----G.A.GC.T...T.---GC.T...-G.... 163
S. (N.) aureohirtum ..TTGCTTG.-----G...GC.T...T.---C.T...-G.... 157
S. (M.) merga ..TTGCTTG.G-----G.A.AC.T...T.----T...-G.... 157
S. (S.) fenestratum TTT-----A.C--ATA.TG...GC.T...T.---G.T...-152

<i>S. (S.) chaliowae</i>	TTTT---A.C--ATA.TG...GC.T...T---.G.T...-.....--	154
<i>S. (S.) triglobus</i>	TTTT---A.C--ATA.TG...GC.T...T---.G.T...-.....--	160
<i>S. (S.) chainarongi</i>	TTT---A.C--ATA.TG...GC.T...T---.G.T...-.....--	152
<i>S. (S.) nodosum</i>	T..T---ACC---.ATG...GC.T...TTT-T.G.T...-.....--	151
<i>S. (S.) nobile</i>	T..T---ACC---.ATG...GC.T.C.T---.G.T...-A....--	142
<i>S. (S.) Chiangmaiense</i>	TTT---A.C--TA.TG...AC.T...T---.G.T...-.....--	154
<i>S. (S.) nakhonense</i>	TTT---A.C--TA.TG...AC.T...T---.G.T...-.....--	155
<i>S. (S.) quinquestriatum</i>	TTT---A.C--TA.TG...AC.T...T---.G.T...-.....--	149
<i>S. (S.) Chamlongi</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---A.G.T...-.....--	149
<i>S. (S.) siripoomense</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---A.G.T...-.....--	148
<i>S. (S.) sp.nr. rufibasis</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---A.G.T...-.....--	148
<i>S. (S.) rufibasis</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---A.G.T...-.....--	148
<i>S. (S.) doipuiense</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---A.G.T...-.....--	145
<i>S. (S.) weji</i>	TT.T---C.C.CA..GTG...AC.T...T---.G.T...-.....--	153
<i>S. (S.) tani</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---A.G.T...-.....--	149
<i>S. (S.) brevipar</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---A.G.T...-.....--	155
<i>S. (S.) rudnicki</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---A.G.T...-.....--	156
<i>S. (S.) grossifilum</i>	TT.T---C.C---A.AG...GC.T...T---GGT...-.....--	161
<i>S. (S.) choochotei</i>	TTTTTATCA...--TAATG...AC.T...T---.G.T...T.....--	173
<i>S. (S.) nigrogilvum</i>	TTT---TC---.ATG...GC.T...T---.G.T...-.....--	148
<i>S. baimaii</i>	TT.T---C.C---A.TG...GC.A...TTTTA.G.T...-.....--	152

* * *

<i>S. (G.) parahiyangum</i>	TACTATCATTTCTTG-----ATTGTAAGCGATGAATGTG	204
<i>S. (G.) siamense</i>	A-----TTTA-----	181
<i>S. (G.) angulistylum</i>	G.CT..A-----	202
<i>S. (G.) decuplum</i>	TCT.....A..	207
<i>S. (G.) duolongum</i>	A-----T.....ACAT	195
<i>S. (G.) gombakense</i>	A-----TTTA-----	178
<i>S. (G.) sp.nr. sheilae</i>	A-----C..TGA.AATG...A	185
<i>S. (G.) sheilae</i>	A-----C..TGA.AATG...A	185
<i>S. (G.) asakoe</i>	CTA.....A-----TGA-----	178
<i>S. (G.) inthanonense</i>	.T.....A-----C.TGA-----	177
<i>S. (G.) chumpornense</i>	G.CT.....A	207
<i>S. (G.) burtoni</i>	A-----G---A-----	174
<i>S. (N.) feuerborni</i>	A.....T-----ATTG.AT....	200
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni1</i>	A.T.....T-----ATTG.AT....	193
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni2</i>	A.....T-----ATTG.AT...A..	206
<i>S. (N.) caudisclerum</i>	T-----ATT--T....	190
<i>S. (N.) aureohirtum</i>	T-----ATTG.-T....	185
<i>S. (M.) merga</i>	...A.....T-----T...A.A.A...TAA	187
<i>S. (S.) fenestratum</i>	AA-----TTT-AA.T.AT...A.T--A	186
<i>S. (S.) chaliowae</i>	AA-----TTTT.AA.T.AT...A.T--A	190
<i>S. (S.) triglobus</i>	AA-----TTT---T.AT...ATT.CAA	193
<i>S. (S.) chainarongi</i>	...A.....AAATAATT---ATTTTTT..TGT.AT...T..CT-A	198
<i>S. (S.) nodosum</i>	...A.....TTT--T---AATTC.CAC..GAA..G--T.C-A	190
<i>S. (S.) nobile</i>	...A.....ATTATT---CATAAG..CA.T.AT.G--.AT-A	183
<i>S. (S.) Chiangmaiense</i>	...A.....AG-----TAAA-ATTAAAT	183
<i>S. (S.) nakhonense</i>	...A.....C...AT-----T.AAA.CATTAAAT	185
<i>S. (S.) quinquestriatum</i>	...A.....AT-----T.AAA.CATTAAAT	178
<i>S. (S.) Chamlongi</i>	TGATTCGTAAAAAACC.A.T.G.AT...--AC-A	196
<i>S. (S.) siripoomense</i>	ATT-----AAAACC.--T...AT...T...AA-A	187
<i>S. (S.) sp.nr. rufibasis</i>	...A.....A--ATT-----G.AT.G.--..A	176
<i>S. (S.) rufibasis</i>	...A.....A--ATT-----G.AT.G.--..A	176
<i>S. (S.) doipuiense</i>	...A.....A--ATT-----G.AT.G.--..A	173
<i>S. (S.) weji</i>	...A.....ATATATTA---TTAT.A..CG.AT...--T-A	195
<i>S. (S.) tani</i>	...A.....A--TATTT---ATTT...--G.AT.G.--TA--A	186
<i>S. (S.) brevipar</i>	...A.....ATTATG-----TAT...--A	186
<i>S. (S.) rudnicki</i>	TTTGCT---ATCAC.A.T.G.AT...TT.AA-A	199
<i>S. (S.) grossifilum</i>	TTTGCT---ATTAC.A.T.G.AT...TT.AA-A	204
<i>S. (S.) choochotei</i>	AGTTGTAA---AAACCAT---.T.AT...TTAAAA	216
<i>S. (S.) nigrogilvum</i>	CTTTTTTCCAAAAA.AAA.T.AT...--AT-A	193
<i>S. baimaii</i>	ATT-----AAAACC.--T...AT...T...AA-A	191

***** *

<i>S. (G.) parahiyangum</i>	T-TGTTATA---GAGTAAA-TGTAATTGAATGGCGTTGAT---AAA--AAT	245
<i>S. (G.) siamense</i>	--.G...T---T...TG-.TAG....-AT.A.A..GGCAGC.--..	222
<i>S. (G.) angulistylum</i>	.A.A...GAGT.A.TGTACTG...AAGTGTTA.A...GTC..T-TG.-	250
<i>S. (G.) decuplum</i>	.A.A...T.GAGT.A.TGTACTG...AAGTGATA.A...GTT...GTG.A	257
<i>S. (G.) duolongum</i>	G-.....TA--T..AGT.AC.....-AT.A..G.CATTGT.--.G.	239
<i>S. (G.) gombakense</i>	--.G...T---C...TG--G.....-AT.A.A..GCGGC.--..	217
<i>S. (G.) sp.nr. sheilae</i>	--.A.ATAT---TT...AAA.....A.T.A..GA.ACA.C.--.G	229
<i>S. (G.) sheilae</i>	--.A.ATAT---TT...G.AAA.....A.T.A..GA.ACA.C.--.G	229
<i>S. (G.) asakoe</i>	--AAAGTAT---.T.G..T.TG...AA.AGCAAAAA.CAATGC.--T.C	221

<i>S. (G.) inthanonense</i>	--.A.G.AT---.A...A.TG.....-GC.AAGCA..--GC.--... 217
<i>S. (G.) chumpornense</i>	.A.TA..GGG--T.ACGT.A.TG...A.GTG.TACA.AC.AA.TG--C.. 253
<i>S. (G.) burtoni</i>	--..AA.AT---.TA.G...-TG.....TAT.A..GACAACGC.--C. 216
<i>S. (N.) feuerborni</i>	.AGA....AA-ACA.G.-----T...A.--ATTTGG.CGATCTG---. 239
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni1</i>	.AGA....AA-ACA.G.-----T...A.--ATTTGG.CGAT..GCAT.. 235
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni2</i>	.AGA....AA-ACA...-----T...A.--ATTTGG.TGATCTG---. 245
<i>S. (N.) caudisclerum</i>	.A.A....AA..TAACG-----TGCCA.--ATA.G...AAA.C.--G. 230
<i>S. (N.) aureohirtum</i>	.AGA....AAA..AAC-----CG....--ATATG-.TGAATC.--G. 225
<i>S. (M.) merga</i>	.G.A.A..CAT--.TAT.-----TG..CT--ATA.G...AACC.--G. 226
<i>S. (S.) fenestratum</i>	.G.A....TTTAA.A-CT-TATATC..A---AATAG..TGTA.T.TG.TA 231
<i>S. (S.) chaliowae</i>	.G.A....TTTAA.A-CT-TATATC..A---AATAG..TGTA.T.TG.TA 235
<i>S. (S.) triglobus</i>	.G.A....TTTAA.A-CT-TATATC..ATAAAATAG..TGTA.T.TG.TA 241
<i>S. (S.) chainarongi</i>	.G.A....TTTAA.AACT-TATATC..A---AATAG..TGT.T.TG.TA 244
<i>S. (S.) nodosum</i>	ATGA..T.TTAGA.A-.T--..-..A-A---ATTTG..CGT-.T.GG..A 231
<i>S. (S.) nobile</i>	AG.A....CTAAGA-.T--A-.GC..A---A.TAG..CGT-.T.GT.TG 225
<i>S. (S.) Chiangmaiense</i>	GG.A....T-GA.CC.T---AATC..A---CTTAG..TGTA.T.TG.TA 226
<i>S. (S.) nakhonense</i>	GG.A....T-AAGT..T-A.AATC..A--TATAG..TGTA.T.TG.TA 231
<i>S. (S.) quinquestriatum</i>	GG.A....T-AAGT..T---AGTC..A---TCTAG..TGTA.T.TG.TA 221
<i>S. (S.) chamlongi</i>	.G.A....TTTAA-A-CC--.A.GC..A---AATAG..CGTT.TGAGCTA 239
<i>S. (S.) siripoomense</i>	.G.A....TTTAAAGA-..-..CC.GA---AAT.G..CGTA.TGAG.TA 231
<i>S. (S.) sp.nr. rufibasis</i>	GG.A....TTTAA.CATT--.T-TC..A---AATAG..TGT-GT.TTGGG 219
<i>S. (S.) rufibasis</i>	AG.A....TTTAA.CATT--.T-TC..A---AATAGC.TGT-GT.TTGGG 219
<i>S. (S.) doipuiense</i>	AG.A....TTTAA.CATT--.T-TC..A---AATAG..TGT-GT.TTGG 216
<i>S. (S.) weji</i>	AG.A....TTTAA.A.TT--..-TC..A---AATAGC.TGT-.T.TTG.G 238
<i>S. (S.) tani</i>	.G.A....TTTAA.C.TT--..-TC..A---AATAGC.TGT-.T.TTG.G 229
<i>S. (S.) brevipar</i>	AG.A....TTTAA.CATT--.TATC..A---AATAG..TGT-.T.TTG.A 230
<i>S. (S.) rudnicki</i>	.G.A....TTTAA.ACGC--.A.-C..A---AATAGA.TGTAGT.AG.TA 243
<i>S. (S.) grossifilum</i>	.G.A....TTTAA.ACCG--AA.TC..A---AATAG..TGTAGT.AG.TA 249
<i>S. (S.) choochotei</i>	.G.A....TTTAT.C..T.TATATC..A.A.T-T-G..TATATT.TG.TA 265
<i>S. (S.) nigrogilvum</i>	.G.A....TTTAA.A-.T--.A.TC..A---ATAG..CGT-TTTAAG.A 236
<i>S. baimaii</i>	.G.A....TTAAAGA-..-..CT.GA---AATAG..CGTA.TGAG.TA 235
<i>S. (G.) parahiyangum</i>	TCTA---ATT-----GTATTTGAAAT-----ACTAAA 269
<i>S. (G.) siamense</i>	AACGA--...-----..G..CA...-----..A... 246
<i>S. (G.) angulistylum</i>	--.TTTTGC.A-----TA.T.....-.....T. 276
<i>S. (G.) decuplum</i>	AT.TTCA.C.A-----TA...C-.T-.....-..... 284
<i>S. (G.) duolongum</i>	..-A--C.A-----TA...CG..T.C-----..AAT.. 265
<i>S. (G.) gombakense</i>	AACGA--...-----..CA...-----..G-.. 241
<i>S. (G.) sp.nr. sheilae</i>	CA..T--...T-----A.....A.T.C-----TTA... 256
<i>S. (G.) sheilae</i>	CAC.T--...T-----A.....A.T.C-----TTA... 256
<i>S. (G.) asakoe</i>	AA..T--TC-.....T...ACT...-----.. 241
<i>S. (G.) inthanonense</i>	AA-----..-----..CA.T.C-----TTG-.. 239
<i>S. (G.) chumpornense</i>	.T.TGTG.C.G-----TA.T.CG.....-.....T. 282
<i>S. (G.) burtoni</i>	.TA.A--.C-----..A.CA.-.....-..... 239
<i>S. (N.) feuerborni</i>	CAATTTG..-----TCGACTGCATA..TGG..-----..T. 272
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni1</i>	CAATTTG..-----TCGACTGAA--.TGG..-----..T. 266
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni2</i>	CAATTCG..-----TCGACTGAA--.TGG..-----..T. 276
<i>S. (N.) caudisclerum</i>	CAATTTA..-----CCAATTGCA--.TG..-----..T. 260
<i>S. (N.) aureohirtum</i>	ATATTGA.A-----TTGACTGTC--.TGC..-----..T. 256
<i>S. (M.) merga</i>	CAATTGAT.A-----ACGACTGAA--.TGT..-----..T. 258
<i>S. (S.) fenestratum</i>	--A.TAGT.AAAG-----AAT.TAAAA...-----..T. 261
<i>S. (S.) chaliowae</i>	--A.TAGT.AAAG-----AAT.TAAAA...-----..T. 264
<i>S. (S.) triglobus</i>	--A.TA-----AG-----AAT.TAA.A...-----..T. 266
<i>S. (S.) chainarongi</i>	--A.TAT..AAAG-----AAT.TAAAAT..-----..T. 273
<i>S. (S.) nodosum</i>	AGATTGATA-----T...TG...TTTTTTTTTAA.T... 268
<i>S. (S.) nobile</i>	.GACTGTTA-----T.T---G...TTTTT---AT...T. 254
<i>S. (S.) Chiangmaiense</i>	--A.TAA.A.-GA-----AAT.TG..A---.....T. 252
<i>S. (S.) nakhonense</i>	-TACTAA..-GA-----AAT.TG..A---.....T. 257
<i>S. (S.) quinquestriatum</i>	A.A.TAA..AGGA-----AAT.G...A---.....T. 250
<i>S. (S.) chamlongi</i>	AA..ATAGAA-----T.T...TG...T--AT---AT..... 271
<i>S. (S.) siripoomense</i>	AAC.TTAT..-----T...TG...TCAAA-----T...T. 261
<i>S. (S.) sp.nr. rufibasis</i>	AT.TTTTT..-----TACCAAAT.T...-----..T. 251
<i>S. (S.) rufibasis</i>	AT.TTTTT..-----TACCAAAT.T...-----..T. 251
<i>S. (S.) doipuiense</i>	AT.TTTTT..A---TGCCAAAT.T...-----..T. 249
<i>S. (S.) weji</i>	AT.TATTT..AAATTTGCCAATT.T...T...-----..T. 277
<i>S. (S.) tani</i>	ATA.TTTT..-----TTATTT.TA.A...-----..T. 261
<i>S. (S.) brevipar</i>	.AAAATTTT-----ATTT.T.C.T...-----..C.T. 259
<i>S. (S.) rudnicki</i>	AA..TTTGGAA-----T.T...A...-----..T. 271
<i>S. (S.) grossifilum</i>	AA.TTTTTTGAAT-----TT.T...TG...-----..T. 280
<i>S. (S.) choochotei</i>	-AACTCA..GAATT-----TGAT.CAAAA.T...-----..T. 298
<i>S. (S.) nigrogilvum</i>	AAAC-GAT-----T...TG...TTAT-----AT...T. 267
<i>S. baimaii</i>	AGCGTAAT.AATTTTATTTT.T...TG...TCAAA---AT..... 281

*

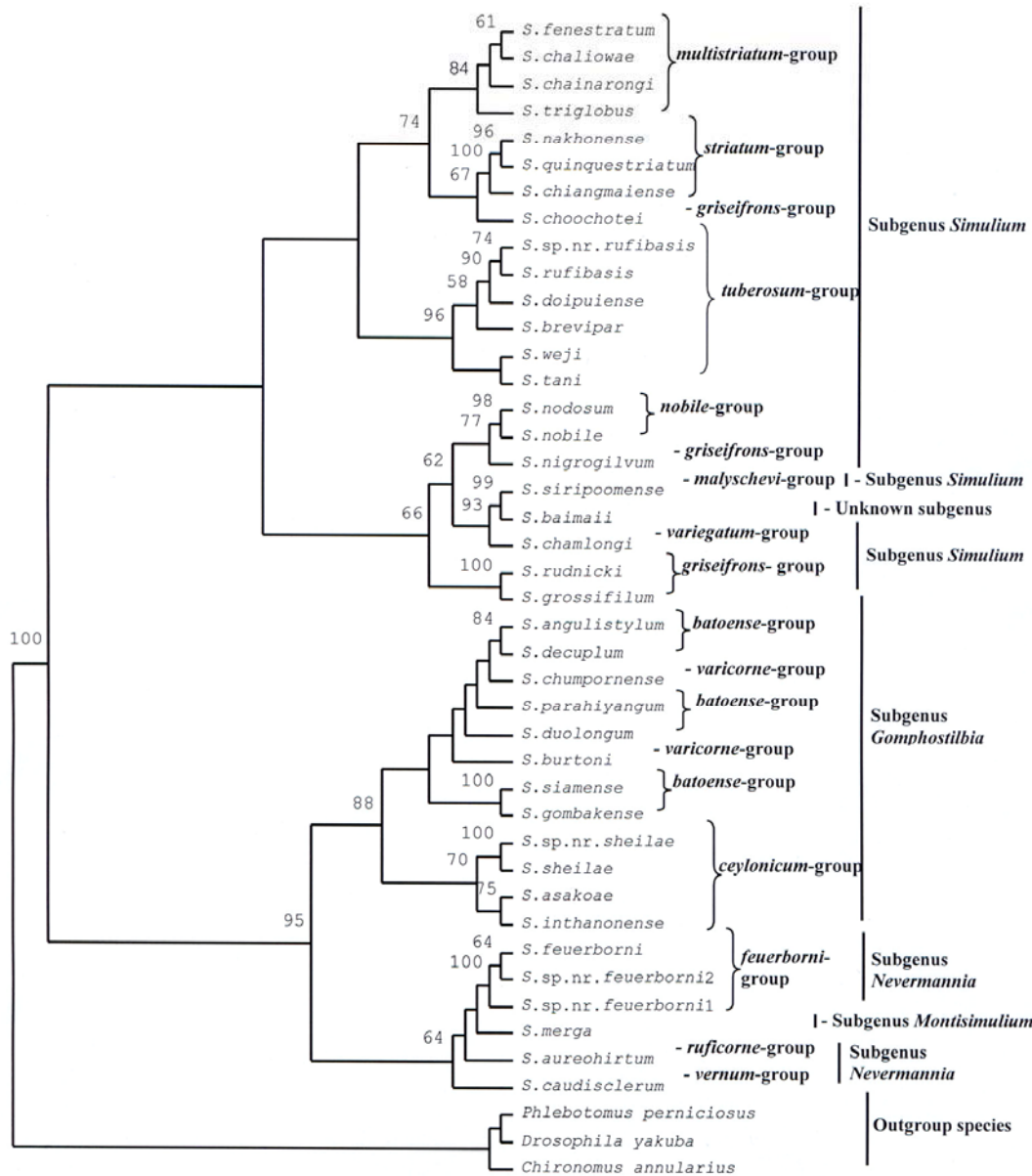
<i>S. (G.) parahiyangum</i>	TTGTATACAT--	279
<i>S. (G.) siamense</i>	A.....--	256
<i>S. (G.) angulistylum</i>	AAT.....--	286
<i>S. (G.) decuplum</i>	GAT.....--	294
<i>S. (G.) duolongum</i>	A.....--	274
<i>S. (G.) gombakense</i>	A.....--	251
<i>S. (G.) sp.nr. sheilae</i>	G.....--	266
<i>S. (G.) sheilae</i>	G.....--	266
<i>S. (G.) asakoe</i>	G.A..C.T----	249
<i>S. (G.) inthanonense</i>	G.A..C.T----	247
<i>S. (G.) chumpornense</i>	AAT.....--	292
<i>S. (G.) burtoni</i>	AA.....--	249
<i>S. (N.) feuerborni</i>	GAT.....--	282
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni1</i>	AAT.....--	276
<i>S. (N.) sp.nr. feuerborni2</i>	AAT.....--	286
<i>S. (N.) caudisclerum</i>	AAT.....--	270
<i>S. (N.) aureohirtum</i>	AAT.....--	266
<i>S. (M.) merga</i>	AAT.....--	268
<i>S. (S.) fenestratum</i>	AAT.....--	271
<i>S. (S.) chaliowae</i>	AAT.....--	274
<i>S. (S.) triglobus</i>	AAT....T.CAT	278
<i>S. (S.) chainarongi</i>	AAT.....--	283
<i>S. (S.) nodosum</i>	..T.T.....--	278
<i>S. (S.) nobile</i>	AAT.....--	264
<i>S. (S.) Chiangmaiense</i>	AAT.....--	262
<i>S. (S.) nakhonense</i>	AAT.....--	267
<i>S. (S.) quinquestriatum</i>	AAT.....--	260
<i>S. (S.) chamlongi</i>	AAT.....--	281
<i>S. (S.) siripoomense</i>	AAT.....--	271
<i>S. (S.) sp.nr. rufibasis</i>	AAT.....--	261
<i>S. (S.) rufibasis</i>	AAT.....--	261
<i>S. (S.) doipuiense</i>	AAT.....--	259
<i>S. (S.) weji</i>	AAT.....--	287
<i>S. (S.) tani</i>	AAT.....--	271
<i>S. (S.) brevipar</i>	AAT.....--	269
<i>S. (S.) rudnicki</i>	AAT.....--	281
<i>S. (S.) grossifilum</i>	AAT.....--	290
<i>S. (S.) choochotei</i>	AAT.....--	308
<i>S. (S.) nigrogilvum</i>	AAT.....--	277
<i>S. baimaii</i>	AAT.....--	291

ภาพที่ 5.43 (ต่อ)

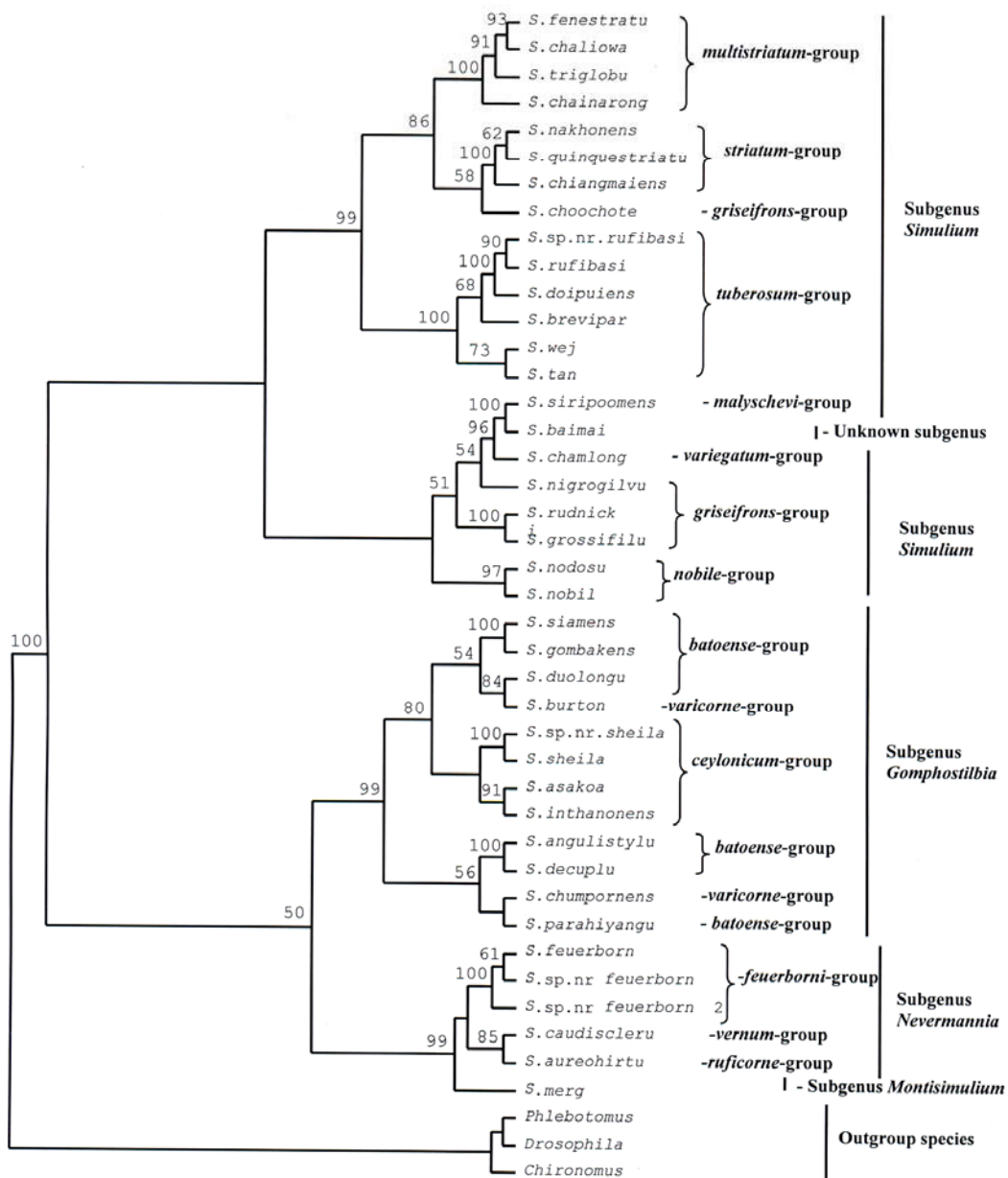
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum parsimony (ภาพที่ 5.44) ลักษณะสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของริ้นดำภายในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* พบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นริ้นดำในกลุ่ม *multistriatum* (*S. fenestratum*, *S. chaliowae*, *S. chainarongi* และ *S. triglobus*), *striatum* (*S. nakhonense*, *S. quinquestriatum* และ *S. Chiangmaiense*), *griseifrons* (*S. choochotei*) และ *tuberosum* และกลุ่มที่สองเป็นริ้นดำในกลุ่ม *nobile* (*S. nobile* และ *S. nodosum*), *malyschevi* (*S. siripoomense*), *variegatum* (*S. chamlongi*), *griseifrons* (*S. nigrogilvum*, *S. rudnicki* และ *S. grossifilum*) และ unknown Subgenus (*S. baimaii*) ทั้งสองกลุ่มเป็น sister group กันด้วยค่า bootstrap ที่ค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่า 50%) ลักษณะสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของริ้นดำกลุ่มแรกพบว่าริ้นดำกลุ่ม *striatum* และ *multistriatum* เป็น sister group กันด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 74% และริ้นดำทั้งสองกลุ่มนี้เป็น sister group กับริ้นดำกลุ่ม *tuberosum* ด้วยค่า bootstrap ที่ค่อนข้างต่ำ นั่นคือน้อยกว่า 50% สำหรับริ้นดำในกลุ่มที่สองพบว่า *S. baimaii* ซึ่งเป็นริ้นดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในกลุ่มสกุลย่อยใด มีความใกล้ชิดกับ *S. siripoomense* และ *S. chamlongi* ด้วยค่า bootstrap ที่สูงมากกว่า 90% สำหรับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum likelihood (ภาพที่ 5.46) ของริ้นดำกลุ่มสองนี้พบว่าริ้นดำในกลุ่ม *striatum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับริ้นดำในกลุ่ม *multistriatum* เช่นเดียวกับผลที่ได้จาก

การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PAUP แต่ได้ผลในทางตรงกันข้ามในริ้นดำกลุ่ม *tuberosum* โดย ริ้นดำกลุ่ม *tuberosum* มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับริ้นดำกลุ่ม *malyschevi*, *variegatum*, *nobile* และ *griseifrons* มากกว่าริ้นดำกลุ่ม *multistriatum* และ *striatum* สำหรับ *S. baimaii* มีความใกล้ชิดกับ *S. siripoomense* และ *S. chamlongi* ด้วยค่า bootstrap ที่สูงเช่นเดียวกับผลที่ได้วิเคราะห์จากวิธี Maximum parsimony

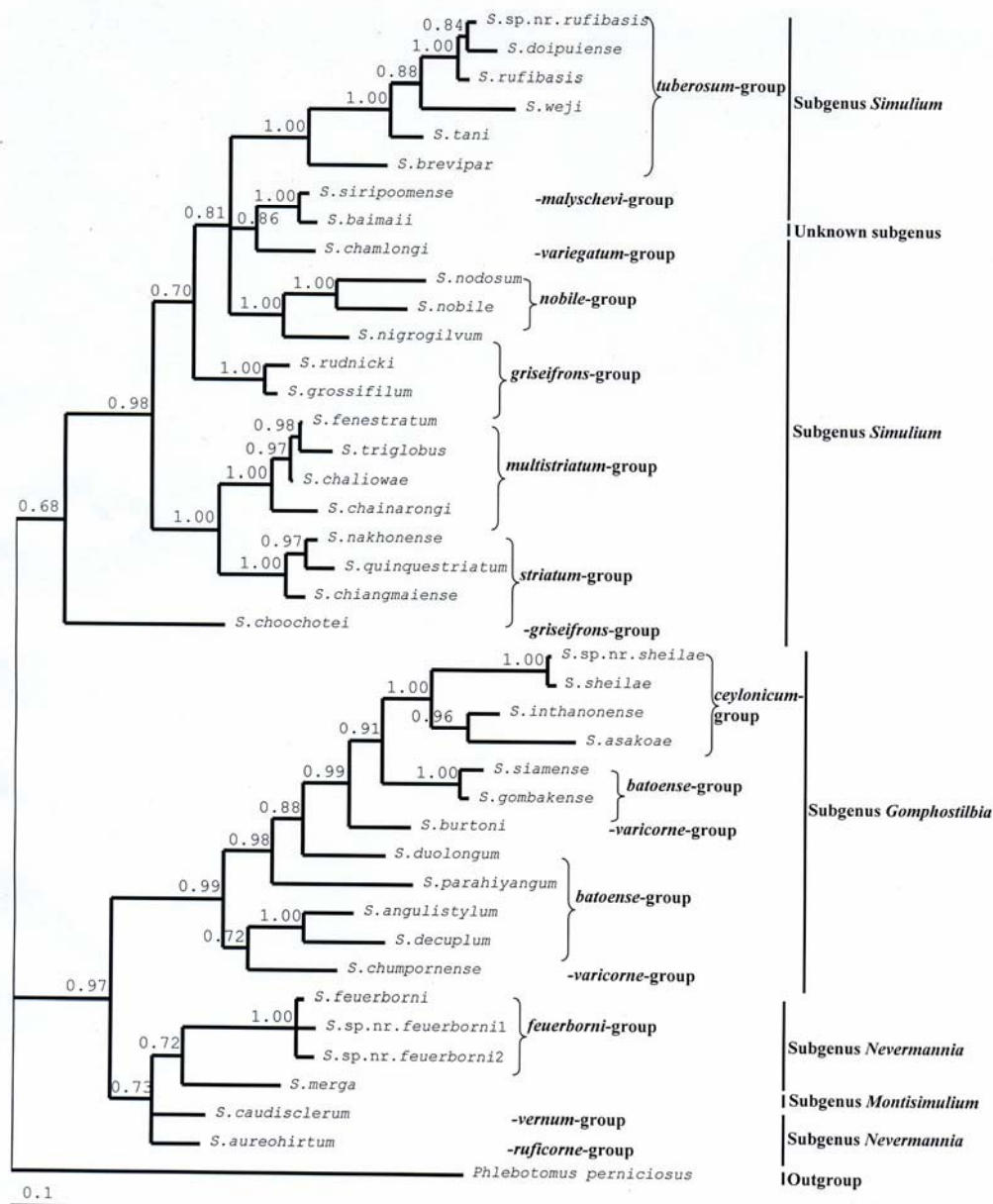
จากการวิเคราะห์โดยวิธี neighbor joining (ภาพที่ 5.45) แสดงให้เห็นว่าสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของริ้นดำภายในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นริ้นดำในกลุ่ม *batoense* (*S. siamense*, *S. gombakense* และ *S. duolongum*), *ceyonicum* (*S. sp. nr. shailae*, *S. sheilae*, *S. asakoe* และ *S. inthanonense*) และ *varicorne* (*S. burtoni*) และกลุ่มที่สองเป็นริ้นดำในกลุ่ม *batoense* (*S. angulistylum* และ *S. decuplum*), *varicorne* (*S. chumpornense*) และ ริ้นดำกลุ่ม *batoense* (*S. parahiyangum*) ซึ่งทั้งสองกลุ่มเป็น sister group กันด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 99% สำหรับลักษณะสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของริ้นดำภายในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* พบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มเช่นกัน กลุ่มแรกเป็นริ้นดำกลุ่ม *multistriatum*, *striatum*, *griseifrons* (*S. choochotei*) และ *tuberosum* และกลุ่มที่สองเป็นริ้นดำในกลุ่ม *nobile*, *malyschevi*, *variegatum*, *griseifrons* และ unknown subgenus (*S. baimaii*) ทั้งสองกลุ่มเป็น sister group กันด้วยค่า bootstrap ที่ค่อนข้างต่ำคือน้อยกว่า 50% ลักษณะสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของริ้นดำภายในกลุ่มแรกพบว่า ริ้นดำกลุ่ม *striatum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับริ้นดำกลุ่ม *multistriatum* มากกว่าริ้นดำกลุ่ม *tuberosum* สำหรับ *S. choochotei* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *griseifrons* ถูกวางอยู่ในกลุ่ม *striatum* สำหรับสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของริ้นดำภายในกลุ่มที่สองพบว่าริ้นดำชนิด *S. nigrogilvum* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *griseifrons* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับริ้นดำในกลุ่ม *variegatum* (*S. chamlongi*), *malyschevi* (*S. siripoomense*) และ *S. baimaii* สำหรับ *S. baimaii* ซึ่งเป็นริ้นดำที่ยังไม่ทราบว่าจะจัดอยู่ในกลุ่มสกุลย่อยใดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับริ้นดำชนิด *S. siripoomense* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *malyschevi*



ภาพที่ 5.44 แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Montisimulium*, *Simulium* และแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลใดอีกหนึ่งชนิด วิเคราะห์จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 โดยใช้โปรแกรม PAUP (version 4.01b) ด้วยวิธี Maximum parsimony (1,000 bootstrap replications) โดยมี *Phlebotomus perniciosus* (AF 205526; Muccio *et al.*, 2000), *Chironomus annularius* (AJ296770; Koepf *et al.*, Unpublished data)



ภาพที่ 5.45 แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Montisimulium*, *Simulium* และแมลงรืนดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลใดอีกหนึ่งชนิด วิเคราะห์จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 โดยใช้โปรแกรม PAUP (version 4.01b) ด้วยวิธี neighbor joining (1,000 bootstrap replications) โดยมี *Phlebotomus perniciosus* (AF 205526; Muccio *et al.*, 2000), *Chironomus annularius* (AJ296770; Koepf *et al.*, Unpublished data) and *Drosophila yakuba* (Z28416; Schlöetterer *et al.*, 1994) เป็น outgroup



ภาพที่ 5.46 แผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงริ้นดำในกลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Montisimulium*, *simulium* และแมลงริ้นดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่ในสกุลใดอีกหนึ่งชนิด วิเคราะห์จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 โดยใช้โปรแกรม MrBays (v3.0B4) ด้วยวิธี maximum likelihood (100 generations) โดยมี *Phlebotomus perniciosus* (AF 205526; Muccio *et al.*, 2000) เป็น outgroup

5.9.5 สรุปผล

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแมลงวันดำโดยใช้ข้อมูลการศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณกับการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ให้ผลคล้ายคลึงกัน แม้ว่าตัวอย่างการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยามีจำนวนจำกัดจากผลชี้ให้เห็นว่าวันดำในสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Montisimulium* มีความใกล้ชิดกันมากกว่าวันดำในสกุลย่อย *Simulium* นอกจากนี้วันดำที่อยู่ในกลุ่มสปีชีส์เดียวกันจะรวมอยู่ในแขนงเดียวกัน อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการที่ใช้ข้อมูล ITS 2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอให้ผลเด่นชัดกว่าเนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างศึกษาและวิธีวิเคราะห์มากกว่า จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS 2 ด้วยวิธี Maximum parsimony และ Neighbor joining ของโปรแกรม PAUP และวิธีวิธี Maximum likelihood ของโปรแกรม MrBays พบว่ามีลักษณะคล้ายกัน คือวันดำถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยวันดำในสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Nevermannia* + *Montisimulium* ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยวันดำในสกุลย่อย *Simulium* และ *S. baimaii* วันดำกลุ่มสกุลย่อย *Montisimulium* มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* มากที่สุด และวันดำชนิด *S. baimaii* ซึ่งยังไม่ทราบว่าจะจำแนกอยู่ในสกุลย่อยใดมีความใกล้ชิดกับวันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* ซึ่งเป็นไปได้ว่า *S. baimaii* เป็นวันดำในกลุ่ม *malyschevi* สกุลย่อย *Simulium* นอกจากนี้วันดำในกลุ่มสกุลย่อย *Nevermannia* และ *Montisimulium* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Gomphostilbia* มากกว่ากลุ่มสกุลย่อย *Simulium* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพฤติกรรม เนื่องจากว่าตัวอ่อนของวันดำทั้งสามกลุ่มสกุลย่อยมี ventral papillae และตัวเต็มวัยเพศเมียดูดเลือดนกเป็นอาหาร (ornithophilic) ส่วนตัวเต็มวัยเพศเมียของกลุ่มสกุลย่อย *Simulium* ดูดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นอาหาร (mammalophilic) ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของวันดำภายในสกุลย่อย *Gomphostilbia* ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแมลงวันดำมีความสอดคล้องกับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

จากการวิเคราะห์ความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของแมลงวันดำจำนวน 32 ชนิด ที่จัดจำแนกอยู่ใน 5 สกุลย่อย ได้แก่ กลุ่มสกุลย่อย *Gomphostilbia* (12 ชนิด), *Nevermannia* (5 ชนิด), *Montisimulium* (1 ชนิด), *Simulium* (21 ชนิด) รวมทั้งแมลงวันดำที่ยังไม่ทราบว่ายู่สกุลใดจำนวน 1 ชนิด (*S. baimaii*) พบว่ามีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 247-308 คู่และมีค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ A และนิวคลีโอไทด์ T อยู่ระหว่าง 71.0-83.3%

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ภายในวันดำชนิดเดียวกัน พบว่ามีความหลากหลายของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่าง *Simulium feuerborni* แต่ละตัวที่เก็บมาจากแหล่งเดียวกัน (โครงการหลวง อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่) และต่างแหล่งกันที่อยู่ในบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่และอุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย ซึ่งความแตกต่างภายในประชากรและระหว่างประชากรของ *S. feuerborni* มีค่าระหว่าง 0-2.2% และ 0.7-2.6% ตามลำดับ

5.10 บทสรุป

งานวิจัยนี้แบ่งการศึกษาออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาหาข้อมูลภาคสนาม ส่วนที่สองเป็นการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ การศึกษาภาคสนามได้ทำการเก็บตัวอย่างตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงวันดำ พร้อมทั้งได้ศึกษานิเวศวิทยาของแหล่งเพาะพันธุ์ของแมลงวันดำ โดยทำการสังเกตและวัดค่าตัวแปรทางกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์เช่น อุณหภูมิ และความเร็วของกระแส น้ำ ความเป็นกรดต่าง และระดับความสูงเหนือระดับน้ำทะเล เป็นต้น สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการได้ทำการศึกษานุกรมวิธานแยกชนิดของตัวอ่อน ตัวดักแด้ และตัวเต็มวัย โดยการศึกษารูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยา และโครโมโซมพร้อมทั้งศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์เชิงประชากรและพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุลของแมลงวันดำ ในการศึกษาการแพร่กระจาย และชนิดของแมลงวันดำในทุกภูมิภาคของประเทศได้พบวันดำที่มีชื่อวิทยาศาสตร์แล้วจำนวน 45 ชนิด วันดำทั้งหมดอยู่ในสกุล *Simulium* และ จัดจำแนกอยู่ใน 6 สกุลย่อย และอีก 1 ชนิด (*Simulium baimaii*) ยังไม่จัดอยู่ในสกุลย่อยใด วันดำเหล่านี้มีการแพร่กระจายในแหล่งเพาะพันธุ์ต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแพร่กระจายและนิเวศวิทยาของแมลงวันดำในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบริเวณ 10 จังหวัดภาคเหนือ การศึกษาการแพร่กระจายและนิเวศวิทยาของแมลงวันดำในแหล่งน้ำไหลธรรมชาติบริเวณ 10 จังหวัดภาคเหนือ โดยการศึกษารูปร่างลักษณะภายนอกทำให้พบแมลงวันดำทั้งหมดจำนวน 27 ชนิด โดยวันดำบางชนิดมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางหลายจังหวัด แต่บางชนิดมีการแพร่กระจายจำกัดในแหล่งน้ำใดแหล่งน้ำหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้แมลงวันดำบางชนิดมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางกายภาพและเคมีของแหล่งน้ำเพาะพันธุ์ เช่น ความกว้างของลำธาร อัตราความเร็วของน้ำ อุณหภูมิและความเค็มของน้ำ ผลงานวิจัยนี้อาจมีประโยชน์ในการควบคุมและกำจัดตัวอ่อน และตัวดักแด้ของแมลงวันดำชนิดที่เป็นอันตรายกับคนและสัตว์เลี้ยงในนาคต สำหรับการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ และพันธุศาสตร์เชิงประชากรงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ และพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงวันดำ 2 ชนิด คือ ชนิด *S. siamense* และ *S. tani* ที่มีการกระจายอย่างกว้างขวางในทุกภูมิภาคของประเทศ โดยการศึกษาแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทินโครโมโซม ที่มาจากต่อมน้ำลายของตัวอ่อน โดยการศึกษาพิจารณาลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายลักษณะดังต่อไปนี้คือ ลักษณะการเรียงตัวของแบนด์ที่จำเพาะในแต่ละประชากร ระบบโครโมโซมเพศต่างกัน (ศึกษาจากโครโมโซมเพศที่มีความสัมพันธ์กับอินเวอร์ชันจำเพาะ) และการมี autosomal polymorphism ต่างกัน ทำให้แยกประชากรของแมลงวันดำชนิด *S. siamense* และ *S. tani* ออกเป็น 6 (A-F) และ 8 (A-H) cytoforms ตามลำดับ แต่ละ cytoforms ของวันดำมีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกันมากและมีการแพร่กระจายแบบ sympatric และ allopatric ดังนั้นการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ นอกจากจะมีประโยชน์ในการแยกชนิดของแมลงแล้ว ยังมีประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการของแมลงอีกด้วย ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของแมลงวันดำ 3 ชนิด ที่มีการกระจายอย่างกว้างขวางในทุกภูมิภาคของประเทศ ได้แก่ วันดำชนิด *S. tani*, *S. nakonense* และ *S. quinquestriatum* พบว่าแบบแผนโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมลงวันดำทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกันซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในยุคไพลโทซีน และหรือสภาพนิเวศวิทยาที่เหมือนกัน ประชากรภาคเหนือมีความแตกต่าง

ของโครงสร้าง และความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าประชากรภาคอื่นๆ เนื่องจากประชากรภาคเหนือมีประวัติการที่ยาวนานและน่าจะเป็นบรรพบุรุษของประชากรภาคอื่นโดยเฉพาะประชากรภาคใต้ที่คาดว่าเกิดจากการ colonization ของประชากรจากภาคเหนือตอนล่างบางส่วนหรือภาคกลางเมื่อไม่นานนี้ (ประมาณ 100,000-200,000 ปี) จากแบบแผนโครงสร้างทางพันธุกรรมชี้ให้เห็นว่า การถ่ายยีน (gene flow) ระหว่างประชากรของแมลงวันดำแต่ละชนิดที่มีแหล่งเพาะพันธุ์ในบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกและภาคใต้มีจำกัดเนื่องจากสภาพทางภูมิศาสตร์ (เช่น ระยะทาง แนวเขา และทะเล) รวมทั้งสภาวะทางนิเวศวิทยาที่เป็นเครื่องกีดขวางการถ่ายยีนระหว่างประชากร ผลการศึกษาทำให้เข้าใจอิทธิพลของสภาวะแวดล้อม และการเปลี่ยนแปลงสภาวะภูมิอากาศของโลกในอดีตต่อความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการอนุรักษ์และจัดการทรัพยากรชีวภาพของประเทศโดยเฉพาะบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สำหรับการศึกษาการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ การศึกษาการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแมลง 40 ชนิดพบที่มีความยาวระหว่าง 247-308 คู่เบส และประกอบด้วยเบส AT เป็นเปอร์เซ็นต์สูง การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum parsimony และ Neighbor joining (PAUP, version 4.0b10) และ Maximum likelihood (MrBAYES, version 3.0B4) แสดงผลคล้ายคลึงกันโดยรันดำถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกประกอบด้วยรันดำสกุลย่อย *Simulium* และรันดำชนิด *S. baimaii* กลุ่มที่สองประกอบด้วยรันดำสกุลย่อย *Nevermannia* + *Montisimulium* ซึ่งอยู่ในแขนงเดียวกันและเป็น sister group ของรันดำสกุลย่อย *Gomphostilbia* ผลนี้ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างรันดำสกุลย่อย *Nevermannia* และ *Montisimulium* และรันดำทั้งสองสกุลย่อยที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรันดำสกุลย่อย *Gomphostilbia* มากกว่าสกุลย่อย *Simulium* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใช้ข้อมูลของรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยา ผลงานวิจัยนี้ยังเสนอแนะว่าแมลงวันดำชนิด *S. baimaii* (ซึ่งไม่ทราบว่ายู่ในกลุ่มและสกุลย่อยใด) ควรถูกจัดจำแนกอยู่ในกลุ่ม *malyschevi* ของสกุลย่อย *Simulium*

5.11 ข้อเสนอแนะ

แมลงวันดำเป็นแมลงที่เหมาะสมเป็นโมเดลในการศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรและกระบวนการวิวัฒนาการของการแตกแขนงเป็นสายพันธุ์ใหม่ซึ่งเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญยิ่งของสิ่งมีชีวิตที่เอื้ออำนวยให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) นอกจากนี้การศึกษากลุ่มสปีชีส์ซับซ้อนของแมลงที่มีผลทางเศรษฐกิจและการแพทย์จะเป็นประโยชน์ในด้านวิชาการวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ทำให้เข้าใจถึงกระบวนการพัฒนาการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของแมลง และได้ข้อมูลถูกต้องเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของกลุ่มสมาชิกตามสายวิวัฒนาการเพื่อประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดและควบคุมให้มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต ดังนั้นจึงสมควรจะให้การสนับสนุนในการทำวิจัยด้านพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและการแพทย์ต่อไป อย่างไรก็ตามในการวิจัยตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติ ควรจะได้ทำการศึกษาหลาย ๆ ด้านควบคู่กันไป โดยทำการศึกษาทั้งระดับฟีโนไทป์ (ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา) ระดับโครโมโซม และระดับโมเลกุล (ยีน) และถ้าเป็นไปได้ควรจะทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับ

ฟีนไทด์ ระดับโครโมโซม และระดับโมเลกุลภายในตัวเดียวกัน เพื่อจะได้ทราบว่า การศึกษาทั้ง 3 ระดับ สอดคล้องหรือขัดแย้งกันอย่างไร ซึ่งจะได้ความรู้พื้นฐานทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้นอย่างแท้จริงเพื่อประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ให้ได้ผลดี และมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

5.12 เอกสารอ้างอิง

- เนลิยา กุวังคะดิลก ชัยณรงค์ บุญเข็มทอง และสุวรรณี พยุหเสนา 2544a. ความหลากหลายและพันธุศาสตร์เชิงประชากรของสปีชีส์ของริ้นดำในประเทศไทย ใน: รายงานวิจัยโครงการ BRT 2544, วิสุทธิ์ ไบไม้ และรังสิมา คุ่มหอม (บรรณาธิการ) หน้า 286-311 จัดพิมพ์โดยโครงการ BRT บริษัทจิรวัดน์เอ็กเพรส จำกัด กรุงเทพฯ
- เนลิยา กุวังคะดิลก สุวรรณี พยุหเสนา ชัยณรงค์ บุญเข็มทอง และ วิสุทธิ์ ไบไม้ 2544b การแพร่กระจาย สันฐานวิทยา และเซลล์พันธุศาสตร์ของตัวอ่อนริ้นดำในภาคใต้ของประเทศไทย ใน: พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติ สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 จัดพิมพ์โดย บริษัทเท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 123-130
- Adler, P.H., Currie, D.C. and Wood, D.M. 2004. The black flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Adler, P.H. and Kachvorian, E.A. 2001. Cytogenetics of the Holarctic black fly *Simulium noelleri* (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool. 79:1972-1979.
- Allan, J. D. 1995. Stream Ecology: Structure and function of running waters. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 388 pp.
- Avise, J.C., Arnold, J. and Ball M.R. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 489-522.
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. Mol. Phylogenet. Evol. 1: 3-16.
- Beach, R.F., Mills, D. and Collins, F.H. 1989. Structure of ribosomal DNA in *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Ann. Entomol. Soc. Amer. 82: 641-648.
- Bedo, D.G. 1975. C-banding in polytene chromosomes in pupal and adult blackflies (Diptera: Simuliidae). Chromosoma 51: 291-300.
- Bedo, D.G. 1977. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). I. Sibling speciation. Chromosoma 64: 37-65.
- Behansky, N.J., Lehmann, T., Fahey, G.T., Fontenille, D., Braock, L.E., Haweley, W.A. and Collins, F.H. 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. Genetics 147: 1817-1828.
- Belbin, L. 1995. Pattern analysis package. Division of Wildlife and Ecology. CSIRO, Australia.

- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Piffaretti, J.C. and Ward, P.I. 2000. Phylogenetic relationships among Muscoidea (Diptera: Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 9: 67-74.
- Bohonak, A.J. 2002. IBD (Isolation by distance): a programme for analysis of isolation by distance. *J. Heredity* 93: 153-154.
- Brandon-Jones, D. 1998. Pre-glacial Bornean primate impoverishment and Wallace's line. In R. Hall and J.D. Holloway (eds.). *Biogeography and geological evolution of SE Asia*. pp. 393-404. Backhuys Publisher, Leiden, Netherlands.
- Caccone, A., Garcia, B.A. and Powell, J.R. 1996. Evolution of mitochondrial DNA control region in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect mol. Biol.* 5: 51-59.
- Charalambous, M., Ready, P.D., Shelley, A.J., Arzube, M. and Lowry, C.A. 1993. Cytological and isoenzyme analysis of the Bucay and Quevado cytotypes of the onchocerciasis vector *Simulium exiguum* (Diptera: Simuliidae) in Ecuador. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 88: 39-48.
- Charalambous, M., Shelley, A.J., Herzog M.M. and Dias, A.P. 1996. Four new cytotypes of the onchocerciasis vector blackfly *Simulium guianense* in Brazil. *Met Vet. Entomol.* 10: 111-120.
- Clary, D.O. and Wolstenholme. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba* nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J Mol. Evol.* 22: 252-271.
- Collins, F.H., Mendez, M.A., Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Beasansky, N.J. and Finnerty, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiation member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 37-41.
- Collins, F.H., Paskewitz, S.M. and Finnerty, V. 1989. Ribosomal RNA genes of the *Anopheles gambiae* complex. *Adv. Dis. Vector Res.* 6: 1-28.
- Conn, J.E., Mitchell, S.E. and Cockburn, A.F. 1997. Mitochondrial DNA variation within and between two species of neotropical *anopheles* mosquitoes (Diptera; Culicidae). *J. heredity* 88: 98-107.
- Corkum, L.D. and Currie, D.C. 1987. Distributional patterns of immature Simuliidae (Diptera) in northwestern of North America. *Freshwater Biol.* 17: 201-221.
- Coscaron, S. 2001. Cladistic analysis of *Simulium* (*Trichodasmia*) and *Simulium* (*Thyrsopelma*) (Diptera: Simuliidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 132: 429-439.
- Crawford, A.J. 2003. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol. Ecol.* 12: 2525-2540.
- Crosskey, R.W. 1973. Family Simuliidae. In M.D. Delfinado and D. E. Hardy (eds.). *A catalog of the Diptera of the Oriental region*, pp. 423-430. University of Hawaii Press, Honolulu.

- Crosskey, R.W. and Howard, T.M. 2004. A revised taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera: Simuliidae). The Natural History Museum, London.
- Datta, M. 1974. Some black flies (Diptera: Simuliidae) of the subgenus *Simulium* Latreille (s. str.) from the Darjeeling area (India). *Oriental Insects* 8: 15-27.
- Davies, L. 1968. A key to the British species of *Simulium* (Diptera) in the larval, pupal and adult stages. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 24.
- Donnelly, M.J., Licht, M.C. and Lehmann, T. 2001. Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1353-1364.
- Dunbar, R.W. 1976. The East African situation and review of the *Simulium Damnosum* complex as a whole. WHO/VBC/SC/76.20. Mimeogr. Doc.
- Dupanloup, I., Schneider, S. and Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11: 2571-2581.
- Edwards, F.W. 1928. Diptera Nematocera from the Federated Malay States Museums. *J. Fed. Malay States Mus.* 14: 1-139.
- Fleischer, R.C., Perry, E.A., Muralidharan, K., Stevens, E.E. and Wemmer, C.M. 2001. Phylogeography of the Asian elephant (*Elephas maximus*) based on mitochondrial DNA. *Evolution* 55: 1882-1892.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Fukuda, M., Choochote, W., Bain, O., Aoki, C. and Takaoka, H. 2003. Natural infections with filarial larvae in two species of black flies (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 99-102.
- Gale, K. and Crampton, J. 1989. The ribosomal genes of mosquito, *Aedes aegypti*. *Eur. J. Biochem* 185: 311-317.
- Gerber, A.S., Tibbets, C.A. and Dowling, T.E. 2001. The role of introgressive hybridization I. The evolution of the *Gila robusta* complex (Teleostei: Cyprinidae). *Evolution* 55: 2028-2039.
- Gerbi, S.A. 1985. Evolution of ribosomal DNA. In R.J. MacIntyre (eds.) *Molecular Evolutionary Genetics*, pp 419-517. Plenum, New York.
- Hamada, N. and McCreadie, J.W. 1999. Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia. *Hydrobiologia* 397: 71-78.

- Hamada, N., McCreadie, J. W. and Adler, P.H. 2002. Species richness and spatial distribution of blackflies (Diptera: Simuliidae) in streams of Central Amazonia, Brazil. *Freshwater Biology* 47: 31-40.
- Hasegawa, M., Kishino, K. and Yano, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.
- Hewitt, G.M. 1996 Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 7: 247-276.
- Hillis, D.M. and Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- Hirai, H., Procunier, W.S., Ochoa, J.O. and Uemoto, K. 1994. A cytogenetic analysis of the *Simulium ochraceum* species complex (Diptera: Simuliidae) in central America. *Genome* 37: 36-53.
- Kettle, D.S. 1990. Medical and Veterinary Entomology. CAP Intertional UK.
- Krüger, A and Garms, R. 1999. Morphometric characterization of members of the *Simulium damnosum* Theobald complex (Diptera: Simuliidae) from East and West Africa. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 93: 753-761.
- Kuhner, S., Yamato, J. and Beerti, P. 2004. LAMARC v1.1.2.1 University of Washington, <http://evolution.gs.washington.edu/lamarc.html>.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. 2001. MEGA 2.1. Molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*: 150-163.
- Kuvangkadilok, C. and Takaoka, H. 2000. Taxonomic notes on Simuliidae (Diptera) from Thailand : description of a new species and new species distributional records of nine known species. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 167-175.
- Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C. and Phayahasena, S. 1999a. Distribution of the larvae of chromosomes of six *Simulium* species (Diptera: Simuliidae) at Doi Inthanon national Park, northern Thailand. *Southeast Asian J. Med. Publ. Hlth.* 30: 328-337.
- Kuvangkadilok, C., Phayahasena, S. and Boonkemtong, C. 1999b. Larval polytene chromosomes of five *Simulium* species (Diptera: Simuliidae) from Doi Inthanon National Park, northern Thailand. *Cytologia* 64: 197-207.
- Kuvangkadilok, C., Phayahasena, S. and Baimai, V. 1999c. Population cytogenetic studies on *Simulium feuerborni* Edwards (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Genome* 42: 80-86.

- Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C., Phayuhasena, S. and Baimai, V. 2003. Larval polytene chromosomes of black flies (*Simulium*) of Thailand. I. Comparison among five species in the subgenus *Gomphostilbia* Enderlein. *Genetica* 118: 69-81.
- Lunt, D.H., Ibrahim, K.M. and Hewitt, G.M. 1998. MtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Hereditas* 80: 633-641.
- Maufuyai, H.B., Post, R.J. Vajime, C.G. and Molyneux, D.H. 1996. Cytotaxonomic identification of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae) from Nigeria. *Trop. Med. Int. Health* 1: 779-785.
- McCreadie, J.W., Adler, P.H. and Colbo, M.H. 1995. Community structure of larval black flies (Diptera: Simuliidae) from the Avalon Peninsula Newfoundland. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 88: 51-57.
- Miller, B.R., Crabtree, M.B. and Savage, H.M. 1996. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect mol. Biol.* 5; 93-107.
- Millest, A.L. 1992. Identification of members of the *Simulium ochraceum* complex in the three onchocerciasis foci in Mexico. *Med. Vet. Entomol.* 6: 23-28.
- O' Grady, P.M. 1999. Reevaluation of phylogeny in the *Drosophila obscura* species group based on combined analysis of nucleotide sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12:124-139.
- Penny, D. 2001. A 40,000 year palynological record from north-east Thailand, implications for biogeography and palaeo-environmental reconstruction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 171: 97-128.
- Peterson, B.V. 1984. Simuliidae. In R.W. Merritt and K.W. Cummins (eds.). *An introduction to the aquatic insects of North America*, pp. 534-550. Kenda/Hunt, Dubugue, Iowa.
- Porter, C.H. and Collins, F.H. 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles feuerborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Simuliidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 271-279.
- Porter, C.H. and Collins, F.H. 1996. Phylogeny of Nearctic members and the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6; 178-188.
- Richards, F., Hopkins, D. and Cupp, E.D. 2000. Programatic goals and approaches to onchocerciasis. *The Lancet.* 335: 1663-1664.
- Rothfels, K.H. and Featherston, D.W. 1981. The population structure of *Simulium vittatum* (Zett): the IIL-1 and IS-7 sibling species. *Can. J. Zool.* 51: 1857-1883.

- Rothfels, K.H. and Dunbar, R.W. 1953. The salivary gland chromosomes of the back fly *Simulium vittatum* Zett. Can. J. Zool. 31: 226-241.
- Roger, A.R. and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Mol. Biol. Evol. 9: 552-569.
- Schlotter, C., Hauser, M-T., Haeseler, A.V. and Tautz, D. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 11: 513-522.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. 2000. ARLEQUIN version 2.000: a software for population genetic data analysis. Genetics and biometry laboratory. Department of Anthropology and Ecology, University of Geneva, Switzerland.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H and Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Amer. 87: 651-701.
- Snyder, T.P. and Linton, M.C. 1984. Population structure in black flies : allozymic and morphological estimates for *Prosimulium mixtum* and *P. fuscum* (Diptera: Simuliidae). Evolution 38: 942-956.
- Spicer, G.S. and Pitnick, S. 1996. Molecular systematics of the *Drosophila hydei* subgroup as inferred from mitochondrial DNA sequence. J. Mol. Evol. 43: 281-286.
- Strieder, M. and Daniel, V. 2002. A cladistic analysis of *Inaequalium* (Cascaron & Wygodzinsky, 1984), with information on geographical distribution (Diptera: Simuliidae). Mem inst oswaldo Cruz Rio de Janeiro 97: 65-72.
- Summer, S.L.M. 1911. Notes from the Entomological Department of the London School of Tropical Medicine. No 11. Description of a new species of *Simulium* from the *Siamense* hills. Ann. Mag. Nat. Hist. 8: 586-588.
- Swofford, D.L. 2002. PUAP. Phylogenetic analysis using Parsimony version 4.ob10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.
- Takaoka, H. 1977. Studies on black flies of the Namsei islands, Japan (Diptera: Simuliidae) III. In six species of the subgenus *Simulium* latreille. Jpn. J. Sanit. Zool. 28: 193-217.
- Takaoka, H. 1979. The black flies of Taiwan (Diptera: Simuliidae). Proc. Insects. 20: 365-403.
- Takaoka, H. 2001. *Simulium (Simulium) weiji* sp. nov. (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 29: 349-354.

- Takaoka, H. and Adler, P.H. 1997. A new subgenus, *Simulium* (*Daviesellum*), and a new species *S. (D.) courtneyi*, (Diptera: Simuliidae) from Thailand and Peninsular Malaysia. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 25: 17-27.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2002. Taxonomic notes on the *Griseifrons* species-group in *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) from Thailand : Descriptions of two new species and description of the male, pupa and larva of *S. (S.) digrammicum* Edwards. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 30: 115-132.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2004a. A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. Trop. Med. Health 32: 189-197.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2004b. Taxonomic notes on the *Griseifrons* species-group of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand. Trop. Med. Health 32: 311-327.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2004c. Two new species of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Trop. Med. Health 32: 31-36.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2005a. A new species of *Simulium* (*Simulium*) from northern Thailand (Diptera: Simuliidae). Trop. Med Health. 33: 95-101.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2005b. Two new species of *Simulium* (*Montisimulium*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. Med. Entomol. Zool 56: 21-31.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2005c. A new subgenus and a new species of *Simulium* s.l. (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Med. Entomol. Zool. 56: 33-41.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2005d. A new species of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. Med. Entomol. Zool. 56: 43-47.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2005e. Two new species of *Simulium* Latreille (Diptera: Simuliidae) from northwestern Thailand. Med. Entomol. Zool. 56:123-133.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2005f. Two new species of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. Med. Entomol. Zool. 56: 99-110.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2005g. Two new species of the *Griseifrons*-species-group of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand Med. Entomol. Zool 56: 219-235.
- Takaoka, H. and Choochote, W. 2005h. Two new species of *Simulium* (*Nevermannia*) (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. Trop. Med Health. 33: 133-141.
- Takaoka, H. and Davies D.M. 1995. The black flies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia. Kyushu University Press, Fukuoka. 175 pp.
- Takaoka, H. and Kuvangkadilok, C. 1999. Four new species of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 27: 497-509.

- Takaoka, H. and Saito, K. 1996. A new species and new records of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 24: 163-169.
- Takaoka, H. and Suzuki, H. 1984. The blackflies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. Jpn. J. Sanit. Zool. 35: 7-45.
- Thomson, J.D., Gibson, T.J., Plewamak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, G.D. 1997. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Research 24: 4876-4882.
- Vajime, C.G. and Dunbar, R.W. 1975. Chromosomal identification of eight species of the subgenus *Edwardsellum* near and including *Simulium* (*Edwardsellum*) *damnosum* theobald (Diptera: Simuliidae). Tropenmed. Parasitol. 26: 111-138.
- Vajime, C.G., Tombala, P.A., Kruger, A. and Post, R.J. 2000. the cytotaxonomy of *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae) from the Thyolo onchocerciasis focus in Malawi and description of a new member of the complex. Ann. Trop. Med. Parasitol. 94: 279-290.
- Vogler, A.P. and DeSalle, R. 1994. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. Mol. Biol. Evol. 11: 393-405.
- Voris, H.K. 2000. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: Shorelines, river systems and time durations. J. Biogeography 27: 1153-1167.
- Walton, C., Handley, J.M. and Tun-Lin, W. 2000. Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. Mol. Biol. Evol. 17: 962-974.
- Weekers, P.H.H., De Jonckheere, J.F. and Dumont, H.J. 2001. Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insect: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European zone. Mol. Phylogenetic. Evol. 20: 89-99.
- Well, J.D. and Sperling, F.A. 1999. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: calliphoridae). J. Mol. Entomol. 36: 222-226.
- Wesson, D.M., Porter, C.H. and Collins, F.H. 1992. Sequence and structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). Mol. Phylogenetic. Ecol. 1; 53-59.
- Wesson, D.M., McLain, D.K., Oliver, J.H., Piesman, J. and Collins, F.H. 1993. Investigation of the validity of species studies of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. Proc Natl. Acad. Sci. USA 90: 10221-10225.
- Woodruff, D.S. 2003. Neogene marine transgressions, palaeogeography and biogeographic transitions on the Thai-Malay Peninsula. J. Biogeography 30: 551-567.
- Xu, J.N. and Qu, F.Y. 1997. Ribosomal RNA differences between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. Med. Vet. Entomol. 11: 134-138.

- Young, I. and Coleman, A.W. 2004. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. Mol. Phylogenet. Evol. 30; 236-242.
- Zhang, D-X. and Hewitt, G.M. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. Insect Mol. Biol. 6; 143-150.

6. รายชื่อคณะผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งใน โครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	สภาพปัจจุบัน
1. นายวิสุทธิ์ ไบไม่	ศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	หัวหน้าโครงการ	ศ.ดร.	ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: พาะและโรคที่ นำโดยพหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
2. น.ส. เฉลียว กุวัจนะดิลก	รศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักวิจัย	รศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
3. นางปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์	รศ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักวิจัย	รศ.ดร.	ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: พาะและโรคที่ นำโดยพหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
4. นายจอห์น มิลน์	อจ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักวิจัย	อจ.ดร.	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	
5. นางสาววันวิสาข์ จ้านงศ์ลักษณ์	อจ.ดร.	ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: พาะ และโรคที่นำโดยพหะ	นักวิจัย	อจ.ดร.	ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: พาะและโรคที่ นำโดยพหะ	ปฏิบัติงานต่างประเทศ
6. นางนพมณี เชื้อวชิรินทร์	อจ.ดร.	ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: พาะ และโรคที่นำโดยพหะ	นักวิจัย	อจ.ดร.	ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: พาะและโรคที่ นำโดยพหะ	
7. นายตุลย์ เรืองอารีรัชต์	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก	-	ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: พาะและโรคที่ นำโดยพหะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	จบปริญญาเอก (ทุน คปก.)
8. นาย สุพัฒน์ วิวัฒนรัตนบุตร	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก	-	ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ พาะและโรคที่ นำโดยพหะ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก (ทุน คปก.)

	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
ชื่อ-นามสกุล	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งใน โครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	สภาพปัจจุบัน
9. นายไพโรจน์ ประมวล	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหาสารคาม	จบปริญญาเอก (ทุน คปก. และ วปก.)
10. นายยิ่งศักดิ์ สวัสดิ์พาณิชย์	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก
11. น.ส. เสน่ห์ จิตต์กลาง	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก (ทุน คปก.)
12. น.ส. อุบล ตั้งวานิช	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาเอก (ทุน คปก.)
13. น.ส. อัญชลี ฐานวิสัย	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาโท	-	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล	จบปริญญาโท
14. น.ส. อัญชลี เหลือล้น	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาโท	-	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	นักศึกษาปริญญาโท

7. ผลงานตีพิมพ์และเสนอผลงานวิจัย

ก. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

- ผลงานที่ตีพิมพ์เผยแพร่แล้ว (published)

1. Ruang-areerate, T., P. Kittayapong, E.A. McGraw, V. Baimai and S.L. O'Neill. 2004. *Wolbachia* replication and host cell division in *Aedes albopictus*. *Current Microbiol.* 49:10-12.
2. Pramual, P., C. Kuvangkadilok, V. Baimai and C. Walton. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Dipter: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molec. Ecol.* 14: 3989-4001.
3. Thanwisai, A., C. Kuvangkadilok and V. Baimai. 2006. Molecular phylogeny of black flies (Diptera: simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. *Genetica.* (in press).

- ผลงานวิจัยที่ได้รับตีพิมพ์ (accepted)

1. Ruang-areerate, T. and P. Kittayapong. 2006. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: A potential gene driver of dengue vectors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* (accepted)
2. Chauvatcharin, N., A. Ahantarig, V. Baimai and P. Kittayapong. 2006. Bacteriophage WO-B and *Wolbachia* in natural mosquito hosts: Infection incidence, transmission mode and relative density. *Molec. Ecol.* (accepted)

- ผลงานวิจัยที่ส่งพิจารณาเพื่อตีพิมพ์ (submitted)

1. Wiwatanaratnabutr, S., S. Allan, K.J. Linthicum and P. Kittayapong. 2006. Comparison of mating, oviposition and host seeking behaviors of *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes albopictus* mosquitoes. (submitted)
2. Wiwatanaratnabutr, S. and P. Kittayapong. 2006. Effect of temephos on *Wolbachia* load and life history traits of *Aedes albopictus* mosquito host. (submitted)
3. Wiwatanaratnabutr, S., P. Kittayapong and D. Bouchon. 2006. Phylogeny of *Wolbachia* strains in arthropods based on *groE*-homologous gene sequences. (submitted)
4. Morales-Vargas, E.M. and P. Kittayapong. 2006. Dynamics of dengue-2 virus isolated from dengue patients exhibiting disease severity in *Aedes aegypti*: Vector competence and virus infectivity variations. (submitted)

5. Kittayapong, P., W. Jamnongluk, S. Wiwatanaratnabutr and L. Sanaomuang. 2006. *Wolbachia* infection in natural fresh water copepods and their effects on mosquito control. (submitted)

- ผลงานวิจัยที่อยู่ในรูปแบบต้นฉบับ (in manuscript)

1. Pramual, P., C. Kuvangkadilok, V. Baimai and C. Walton. Population structure and population history of two closely related black fly species, *Simulium nakhonense* and *S. quinquestriatum*: implication to the establishment and maintenance of the chromosomal polymorphisms. (in manuscript)
2. Tangkawanit, U., C. Kuvangkadilok, V. Baimai and P. H. Adler. Cytogenetics of the *Simulium tuberosum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. (in manuscript).
3. Jamnongluk, W., R. Khumthong, P. Kosiyachinda, B.N. Afanasiev, J.O. Carlson and P. Kittayapong. 2006. Genome sequencing of the mosquito densovirus *AthDNV*: Genomic analysis, phylogenetic comparison and sequence stability in *Aedes aegypti* host. (in manuscript)
4. Hirunkanokpun, S., J.O. Carlson and P. Kittayapong. 2006. Evaluation of densovirus for controlling *Aedes aegypti*: Efficacy variations due to virus strains and geographic origins of mosquitoes. (in manuscript)
5. Ahantarig, A., N. Chauvatcharin and P. Kittayapong. 2006. Bacteriophage WO-B and *Wolbachia* in *Aedes albopictus* in Thailand: Infection incidence variation, maternal transmission and relative density. (in manuscript)
6. Morales-Vargas, E.M. and P. Kittayapong. 2006. Reduction of vector competence for dengue viruses in *Aedes albopictus* mosquitoes carrying the bacteria *Wolbachia*. (in manuscript)
7. Wiwatanaratnabutr, S. and P. Kittayapong. 2006. Comparison of *Wolbachia* density between cytoplasmic incompatibility and feminization-inducing *Wolbachia* strains in insect and crustacean hosts. (in manuscript)

- ผลงานวิจัยที่กำลังเตรียมต้นฉบับ (in preparation)

1. Swasdipanich, Y., J. Gaywee and V. Baimai. Technique for genomic DNA purification from a single chigger. (in preparation).
2. Swasdipanich, Y., J. Gaywee and V. Baimai. Two γ -proteobacteria in chiggers, *Ascoschoengastia globola*, from Thailand. (in preparation).

3. Swasdipanich, Y., J. Gaywee and V. Baimai. Phylogenetic relationships among trombiculid mites, (Acari : Trombiculidae) in Thailand based on 18S RNA sequences. (in preparation).
4. Jitklang, S., C. Kuvangkadilok, V. Baimai and P. H. Adler. Species diversity and community structure of black flies (Diptera: Simuliidae) in streams of northern Thailand: environmental factors associated with the larval distribution. (in preparation).
5. Lualon, A., C. Kuvangkadilok and V. Baimai. Cytogenetics of *Simulium siamense* (Diptera: Simuliidae) in Thailand. (in preparation).

ข. ความร่วมมือกับนักวิชาการในสถาบันวิจัยต่างประเทศ

1. Professor Jonathan O. Carlson, Department of Microbiology, Immunology and Pathobiology, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA
2. Dr. Kenneth J. Linthicum, Director, Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, U.S. Department of Agriculture (USDA-ARS), Gainesville, FL, USA
3. Professor Scott L. O'Neill, Head, School of Integrative Biology, University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia
4. Professor Didier Bouchon, Head, Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, Université de Poitiers, CNRS UMR 6556, Poitiers Cedex, France
5. Dr. Jean Paul Gonzalez, Director, Research Unit on Fundamentals & Territories of Emerging Diseases (Unit 178), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Paris, France
6. Professor Peter Adler, Clemson University, Department of Entomology, Soils & Plant Sciences, Clemson, USA.
7. Dr. Catherine Walton, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, UK.

ค. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ การบรรยาย และการอบรมดูงานต่างประเทศ

● การบรรยายวิชาการและการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการในประเทศ

1. Morales-Vargas, R.E., V. Baimai and P. Kittayapong. Studies on genetic diversity and oral susceptibility to dengue type 2 in *Aedes aegypti* from high and low dengue risk areas. The 7th Annual Meeting of the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2003, Chiang Mai, Thailand.
2. Kittayapong, P., L. Sanoamuang and W. Jamnongluk. 2003. *Wolbachia* strain diversity and feminization effect in copepods, a biocontrol agent of mosquito larvae. The 7th Annual

- Meeting of the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2003, Chiang Mai, Thailand.
3. Jamnongluk, W., P. Kittayapong, V. Baimai, B.N. Afanasiev and J.O. Carlson. Evolution of the Parvoviridae and genomic analysis of the Thai strain *Aedes* densovirus (*AThDNV*). The 7th Annual Meeting of the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2003, Chiang Mai, Thailand.
 4. Kosiyachinda, P., P. Kittayapong, V. Baimai, B.N. Afanasiev and J.O. Carlson. Genetic engineering of the Thai strain *Aedes* densovirus (*AThDNV*) for controlling dengue virus in mosquito vectors. The 7th Annual Meeting of the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2003, Chiang Mai, Thailand.
 5. Thanwisai, A., C.Kuvangkadilok and V. Baimai. 2003. Comparison of ITS2 rDNA in black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. 29th Congress on Science and Technology of Thailand. 20-22 October 2003. Khon Kaen University. P 53.
 6. Kuvangkadilok, C., C. Boonkemtong, S. Phayuhaseana and V. Baimai. 2003. Distribution and polytene chromosomes of black flies in Thailand. 29th Congress on Science and Technology of Thailand. 20-22 October 2003. Khon Kaen University. P 55.
 7. เฉลียว กุวัจนะดิกล, สุวรรณ พุฒเสนา, ชัยณรงค์ บุญเข็มทองและวิสุทธิ์ ไบไม้. 2546. ความหลากหลายและเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงวันดำในประเทศไทย. ใน: พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 13 วันที่ 5-7 มิถุนายน 2546 มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก. จัดพิมพ์โดยบริษัทเท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชันจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 356-361.
 8. สุวรรณ พุฒเสนา, เฉลียว กุวัจนะดิกล, วิสุทธิ์ ไบไม้ และ Donald J. Colgan. 2546. การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทยโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome oxidase I. ใน: พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 13 วันที่ 5-7 มิถุนายน 2546 มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก. จัดพิมพ์โดยบริษัทเท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชันจำกัด กรุงเทพฯ หน้า 395-399.
 9. Kittayapong, P., L. Sanaomuang, and W. Jamnongluk. *Wolbachia* infection and feminization effect in tropical freshwater copepods, a biological control agent of mosquito larvae. The 8th Annual Meeting of the TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2004, Suratthani, Thailand.
 10. Ruang-areerate, T., P. Kittayapong and S.L. O'Neill. Could *Wolbachia* be used in genetic control of mosquito vectors? The 8th Annual Meeting of the TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2004, Suratthani, Thailand.
 11. Chauvatcharin N., P. Kittayapong and V. Baimai. Molecular evidence of co-transmission of phage WO and *Wolbachia* bacteria in mosquito hosts. The 8th Annual Meeting of the

- TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2004, Suratthani, Thailand.
12. Chauvatcharin N., P. Kittayapong, S. Wiwatanaratnabutr and V. Baimai. Real-time PCR quantification of *Wolbachia* phage WO density in *Aedes albopictus* vector with emphasis on temperature and crowding effect. The 8th Annual Meeting of the TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2004, Suratthani, Thailand.
 13. Chauvatcharin N., M. Raimond, M. Johnson, D. Bouchon and P. Kittayapong. Real-time PCR quantification of *Wolbachia* density in developmental stage of woodlice. The 8th Annual Meeting of the TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2004, Suratthani, Thailand.
 14. Wiwatanaratnabutr, S. and P. Kittayapong. Comparison of *Wolbachia* density between cytoplasmic incompatibility and feminization-inducing *Wolbachia* strains insect and crustacean hosts. The 8th Annual Meeting of the TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2004, Suratthani, Thailand.
 15. Wiwatanaratnabutr, S., P. Kittayapong and D. Bouchon. Molecular phylogeny based on groE-homologous gene sequences of *Wolbachia* strains in arthropod hosts. The 8th Annual Meeting of the TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2004, Suratthani, Thailand.
 16. Morales-Vargas, R.E. and P. Kittayapong. Variations in vector competence and viral infectivity in *Aedes aegypti* challenged with dengue-2 virus isolated from patients exhibiting different disease severity. The 8th Annual Meeting of the TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, October 2004, Suratthani, Thailand.
 17. รศ.ดร. เฉลียว กุวังคะติลก เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานวิจัย เรื่อง Distribution and polytene chromosomes of black flies in Thailand ในการประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 8 วันที่ 14-17 ตุลาคม 2547 จ. สุราษฎร์ธานี
 18. เสน่ห์ จิตต์กลาง เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานวิจัย เรื่อง ความหลากหลายและการกระจายของแมลงวันดำในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ในการประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 8 วันที่ 14-17 ตุลาคม 2547 จ. สุราษฎร์ธานี
 19. อัญชลี เหลือสิน และอุบล ตั้งวานิช เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานวิจัย เรื่อง Cytogenetics of *Simulium siamense* and *S. tani* ในการประชุมวิชาการประจำปี โครงการ BRT ครั้งที่ 8 วันที่ 14-17 ตุลาคม 2547 จ. สุราษฎร์ธานี
 20. Kittayapong, P. Integrated Approaches to reduce dengue virus transmission. The Mahidol-IRD Research Forum on Emerging Infectious Diseases with Emphasis on Biodiversity and Interaction of Vectors, Pathogens and Hosts, November 2005, Faculty of Science,

Mahidol University, Bangkok, Thailand. (invited by organizers and sponsored by Mahidol University and IRD, France)

21. เฉลียว กุวังคะดิลก, ชัยณรงค์ บุญเข็มทอง, สุวรรณี พยุหเสนา, และวิสุทธิ์ ไบไม่. 2548. อนุกรมวิธานของแมลงรืนดำในประเทศไทยโดยการศึกษาโพลีทีนโครโมโซม. ใน: พันธุศาสตร์จากพื้นฐานสู่เทคโนโลยีระดับโมเลกุล สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 14 วันที่ 11-13 มีนาคม 2548. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ. จัดพิมพ์โดยบริษัทเท็กซ์แอนด์ เจอร์นัลส์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 60-66
22. ไพโรจน์ ประมวล, เฉลียว กุวังคะดิลก, วิสุทธิ์ ไบไม่ และ Catherine Walton. 2548. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ภายในสปีชีส์ของแมลงรืนดำ *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) โดยการศึกษาการเรียงตัวของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ. ใน: พันธุศาสตร์จากพื้นฐานสู่เทคโนโลยีระดับโมเลกุล สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 14 วันที่ 11-13 มีนาคม 2548. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ. จัดพิมพ์โดยบริษัทเท็กซ์แอนด์ เจอร์นัลส์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 67-73
23. เสน่ห์ จิตต์กลาง, เฉลียว กุวังคะดิลก, Peter H. Adler และวิสุทธิ์ ไบไม่. 2548. ความหลากหลาย การกระจายและประวัติของตัวอ่อนแมลงรืนดำในเขตภาคเหนือของประเทศไทย. ใน: พันธุศาสตร์จากพื้นฐานสู่เทคโนโลยีระดับโมเลกุล สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 14 วันที่ 11-13 มีนาคม 2548. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ. จัดพิมพ์โดยบริษัทเท็กซ์แอนด์ เจอร์นัลส์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 183-189
24. อุบล ตั้งวานิช, เฉลียว กุวังคะดิลก, Peter H. Adler และวิสุทธิ์ ไบไม่. 2548. การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำชนิด *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย. ใน: พันธุศาสตร์จากพื้นฐานสู่เทคโนโลยีระดับโมเลกุล สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 14 วันที่ 11-13 มีนาคม 2548. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ. จัดพิมพ์โดยบริษัทเท็กซ์แอนด์ เจอร์นัลส์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 190-195
25. อัญชลี เหลือล้น, เฉลียว กุวังคะดิลก, และวิสุทธิ์ ไบไม่. 2548. การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำชนิด *Simulium siamense* (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย. ใน: พันธุศาสตร์จากพื้นฐานสู่เทคโนโลยีระดับโมเลกุล สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 14 วันที่ 11-13 มีนาคม 2548. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ. จัดพิมพ์โดยบริษัทเท็กซ์แอนด์ เจอร์นัลส์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 196-201

● การบรรยายวิชาการและการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ

1. Phayuhaseana, S., C. Kuvangkadilok, D. Colgan and V. Baimai. 2002. Systematics of black flies 5th International Congress of Dipterology. Brisbane, Australia. 29 September-4 October 2002. P 190. (Abstract).

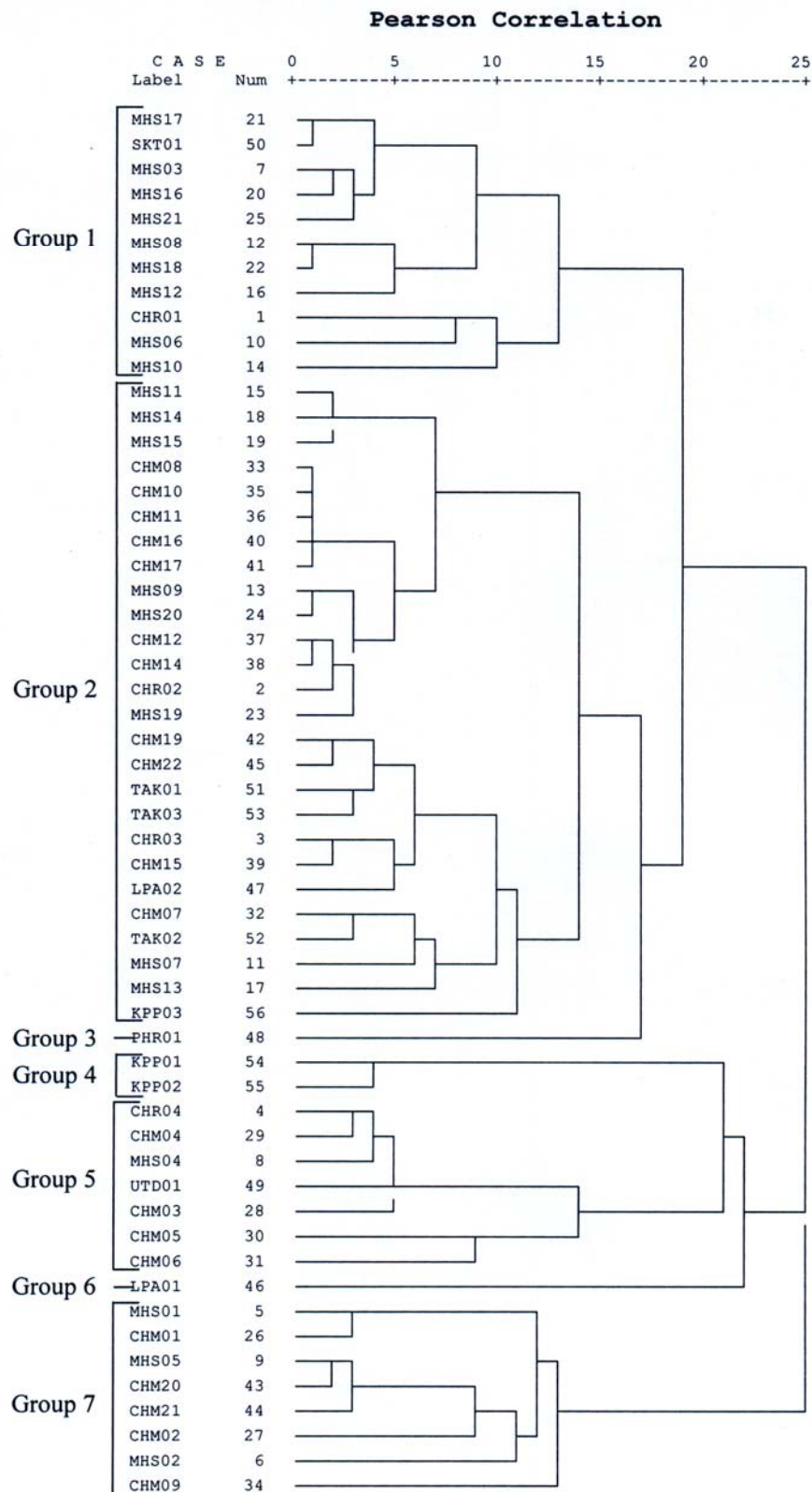
2. ศ.ดร. วิสุทธิ์ ไบไม้ เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานวิจัยในการประชุม First Coordination Meeting of MALVECASIA ที่กรุงฮานอย ประเทศเวียดนาม ระหว่างวันที่ 8-10 มกราคม 2546
3. Kittayapong, P. Situation report on dengue and malaria in Southeast Asia. The WHO/TDR Working Group on Strategic Plan to Bridge Laboratory and Field Research in Disease Vector Control, July 2004, Nairobi, Kenya. (invited and sponsored by WHO/TDR)
4. Kittayapong, P., S. Yoksarn, U. Chansang, C. Chansang and A. Bhumiratana. Suppression of dengue transmission by application of integrated vector control measures at sero-positive GIS-based foci: Demonstration of a cost-effective model. Symposium on Changing Environments, Emerging Disease Vectors. The XXII Meeting of the International Congress of Entomology, August 2004, Brisbane, Australia
5. Kittayapong, P., Yoksan, S., Changsang, U., Changsang, C., and Bhumiratana. A. Suppression of dengue transmission by application of integrated vector control measures at sero-positive GIS-based foci: Demonstration of a cost-effective model. The XXII International Congress of Entomology; Strength in Diversity, August 14-22, 2004, Brisbane, Australia.
6. Thanwisai, A., C. Kuvangkadilok and V. Baimai. 2004. Phylogenetic reconstruction of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. XXI International Congress of Entomology. Brisbane, Australia. 15-21 August 2004. (Abstract).
7. Milne, J.R., S. Sintupachee, S. Poonchaisri, V. Baimai, and P. Kittayapong. 2004. Phylogenetic evidence for *Wolbachia* horizontal transmission via the plant. The 3rd International *Wolbachia* Conference, August 21-26, 2004, Heron Island, Gladstone, Australia.
8. Thayanukul, P., and P. Kittayapong. 2004. Bacteriophage WO of *Wolbachia* infecting insects associated with tropical rice field communities. The 3rd International *Wolbachia* Conference, August 21-26, 2004 Heron Island, Gladstone, Australia.
9. รศ.ดร. เฉลียว กุวัจคะดิลก เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานวิจัย เรื่อง Phylogenetic reconstruction of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand using ITS2 rDNA ในการประชุม "International Congress of Entomology: Strength in Entomology" ครั้งที่ XXII ในวันที่ 15-21 สิงหาคม 2547 ณ เมืองบริสเบน ประเทศออสเตรเลีย
10. ศ.ดร. วิสุทธิ์ ไบไม้ เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานวิจัยในการประชุม Second Coordination Meeting of MALVECASIA ที่เมืองเวียงจันทน์ ประเทศลาว ระหว่างวันที่ 2-6 กุมภาพันธ์ 2547
11. ไพโรจน์ ประมวล เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานวิจัย เรื่อง Phylogeography of Black fly (*Simulium tani*) inferred from mitochondrial DNA sequence ในการประชุม "Population Genetics Group Meeting" ครั้งที่ 38 วันที่ 14-17 ธันวาคม 2547 ณ เมืองเรดดิง (Reading) ประเทศอังกฤษ
12. Kittayapong, P. Controlling insect vectors using environmental-friendly, integrated, community-based approaches. The International Symposium on Urban and Peri-urban Entomology:

Surveillance, Insect Control, Impacts on Environment and Community, February 2005, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. (invited and sponsored by the Thai-French Cooperation Program on Higher Education and Research)

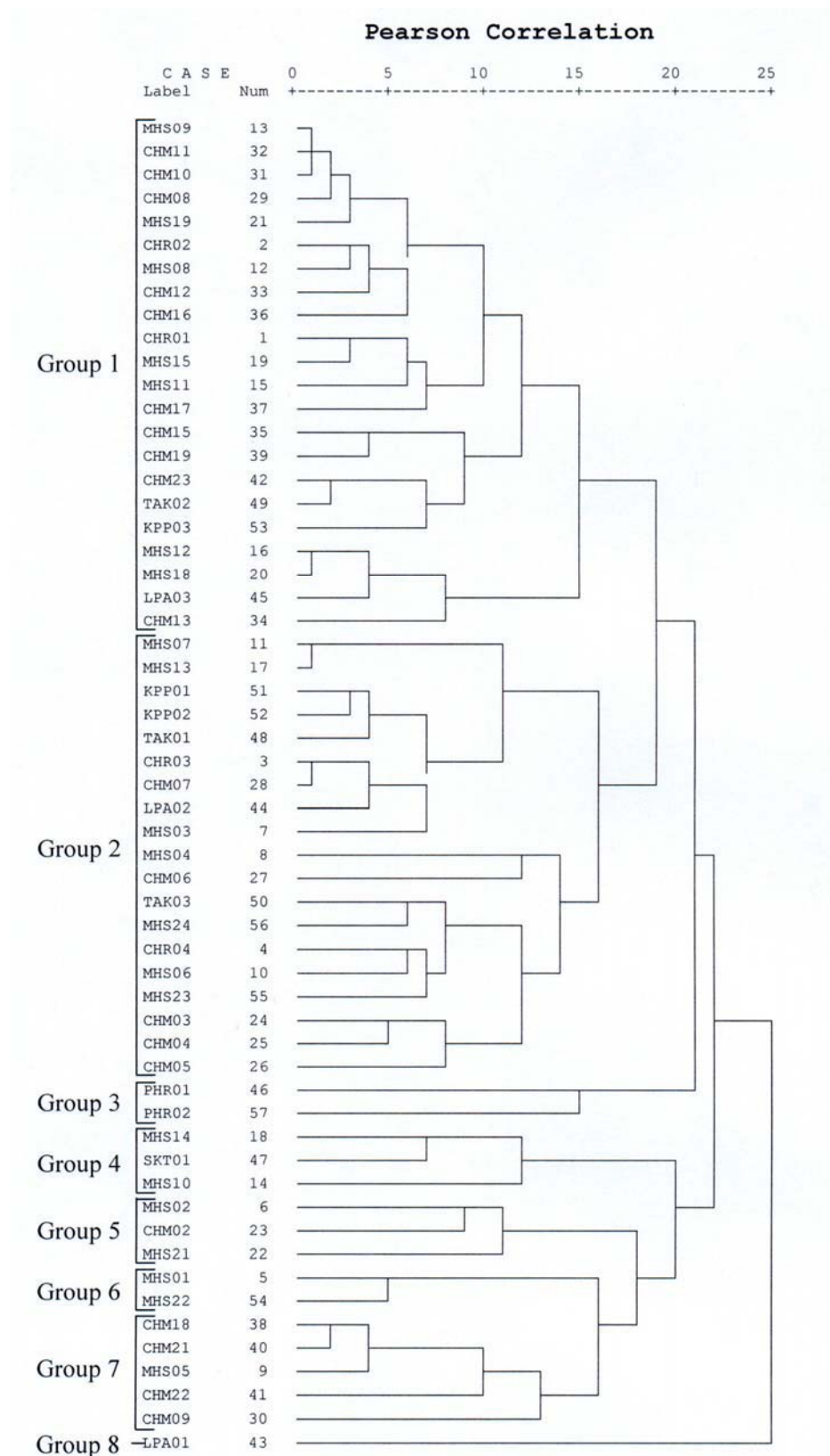
13. Kittayapong, P. Overcoming technical barriers in prevention and control of dengue haemorrhagic fever. The International Meeting on Emerging Infectious Diseases and Socio-ecological Systems, March 2005, Honolulu, Hawaii, U.S.A. (invited and sponsored by the University of Hawaii and the East-West Center)
14. Kittayapong, P. Integrated dengue vector control through community participation in Thailand. The 2nd Arbovirus Surveillance and Mosquito Control Workshop, March 2005, St. Augustine, Florida, U.S.A. (invited by the Anastasia Mosquito Control District, USDA/CMAVE and Florida Mosquito Control Association)
15. Kittayapong, P., U. Chansang, C. Chansang, A. Bhumiratana and S. Yoksarn. Community participation and appropriate technologies for dengue vector control at transmission foci in Thailand. Symposium on Enhancing Mosquito Control without Pesticides. The 71st Annual Meeting of the American Mosquito Control Association, April, 2005, Vancouver, Canada. (invited by symposium organizers)
16. Kittayapong, P. Dengue vector control without insecticide. Symposium on *Aedes aegypti*: From lab to field. The 16th International Course on Biology of Disease Vectors, June 2005, Chang Island, Trat Province, Thailand. (invited by organizers and sponsored by WHO/TDR and McArthur Foundation)
17. ศ.ดร. วิสุทธิ์ ไบไม้ เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานวิจัยในการประชุม Third Coordination Meeting of MALVECASIA ที่เมือง Halong Bay ประเทศเวียดนาม ระหว่างวันที่ 24-28 มกราคม 2548
18. ศ.ดร. วิสุทธิ์ ไบไม้ บรรยายเรื่อง “*Anopheles* Taxonomy” ในการประชุมเชิงปฏิบัติการนานาชาติ “Biology of Disease Vectors” วันที่ 24 มิถุนายน 2548 ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

ง. เป็นเจ้าภาพจัดประชุมเชิงปฏิบัติการนานาชาติเรื่อง 16th Biology of Disease Vectors ระหว่างวันที่ 13-25 มิถุนายน 2548 ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

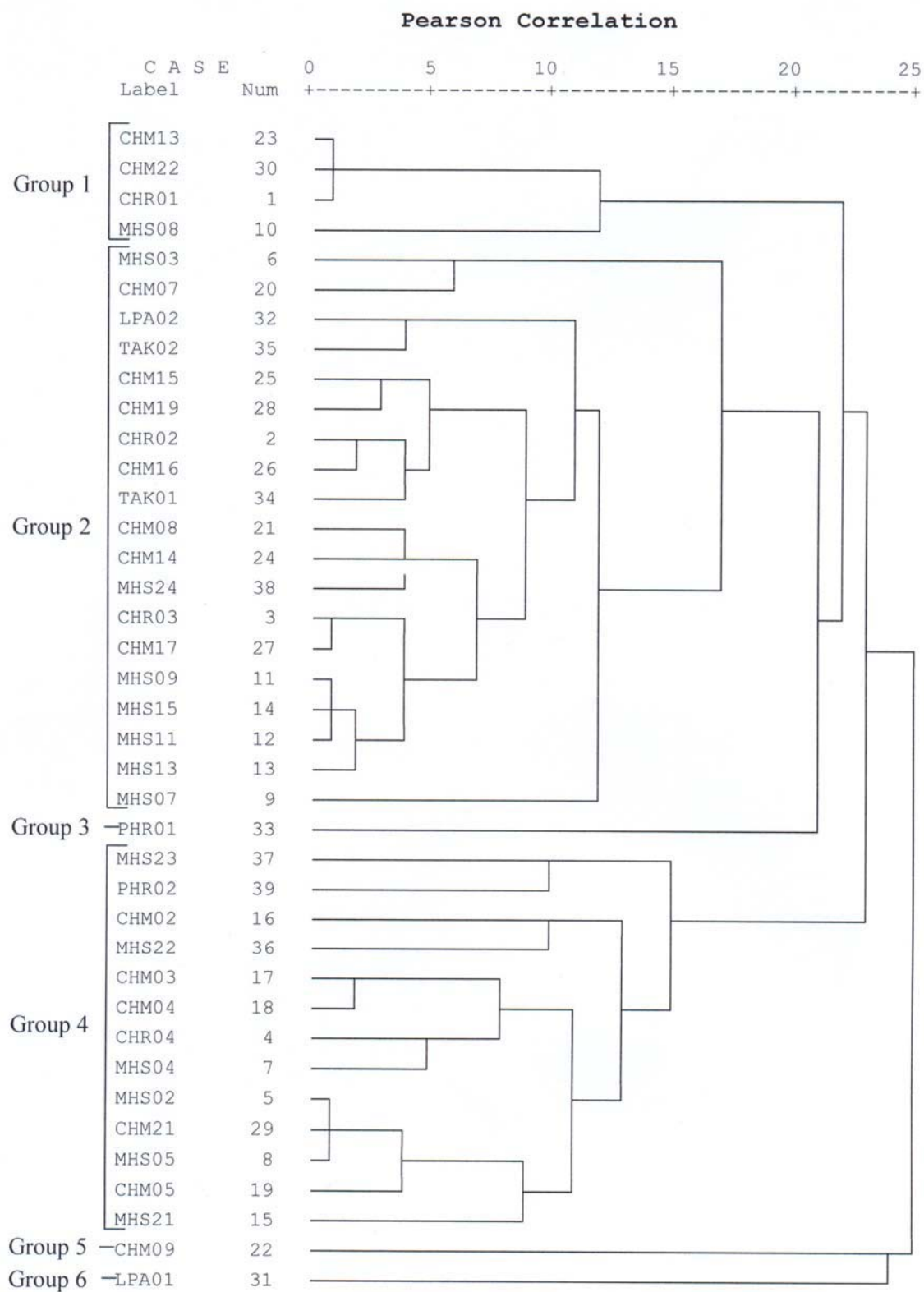
ภาคผนวก 1



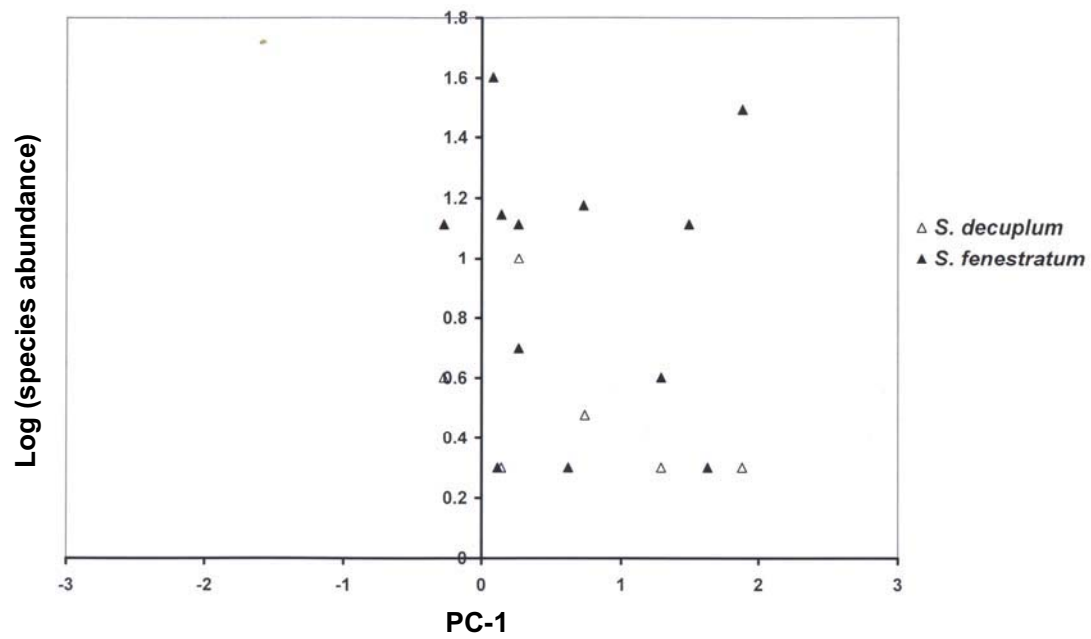
ภาพที่ A-1 แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 56 แห่งในช่วงฤดูฝน (พฤษภาคม-มิถุนายน 2546) สามารถจัดกลุ่มเป็น 7 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วยวิธี Hierarchical Cluster analysis แบบ Pearson correlation



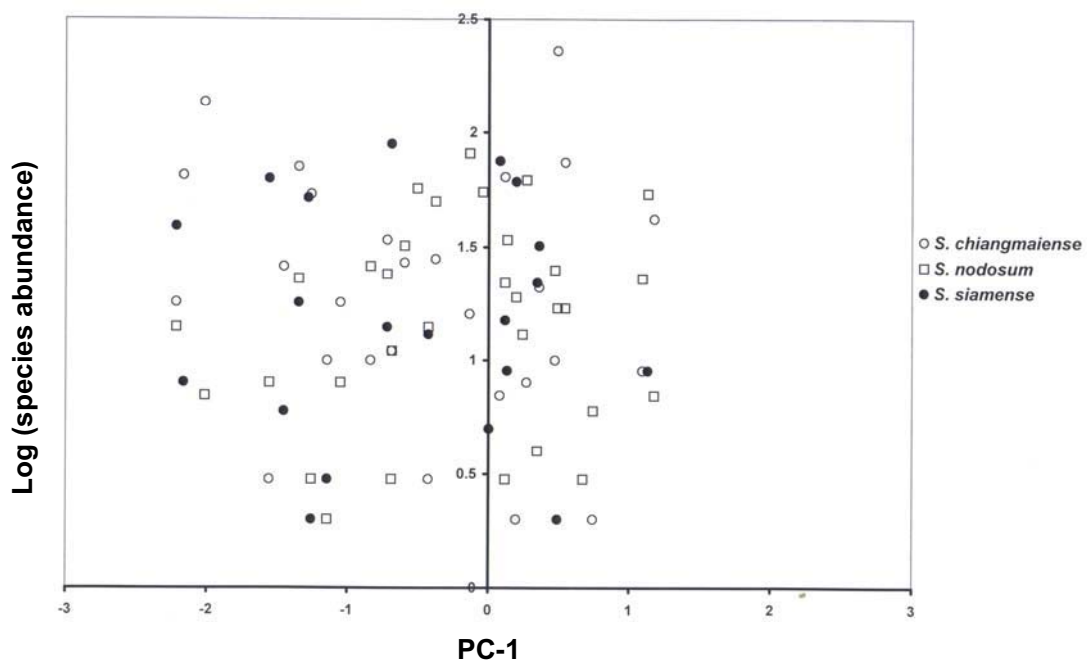
ภาพที่ A-2 แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 57 แห่งในช่วงฤดูหนาว (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546) สามารถจัดกลุ่มเป็น 8 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วยวิธี Hierarchical Cluster analysis แบบ Pearson correlation



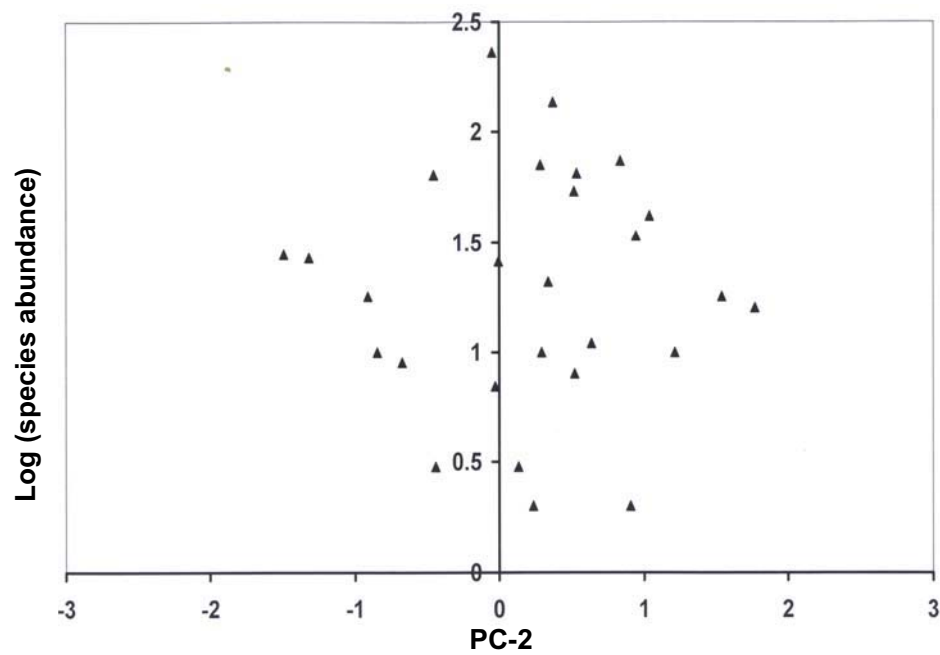
ภาพที่ A-3 แสดงการจัดกลุ่มแหล่งน้ำไหลจำนวน 39 แห่งในช่วงฤดูร้อน (เมษายน 2547)
สามารถจัดกลุ่มเป็น 6 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลทางชีวภาพ ด้วยวิธี Hierarchical Cluster
analysis แบบ Pearson correlation



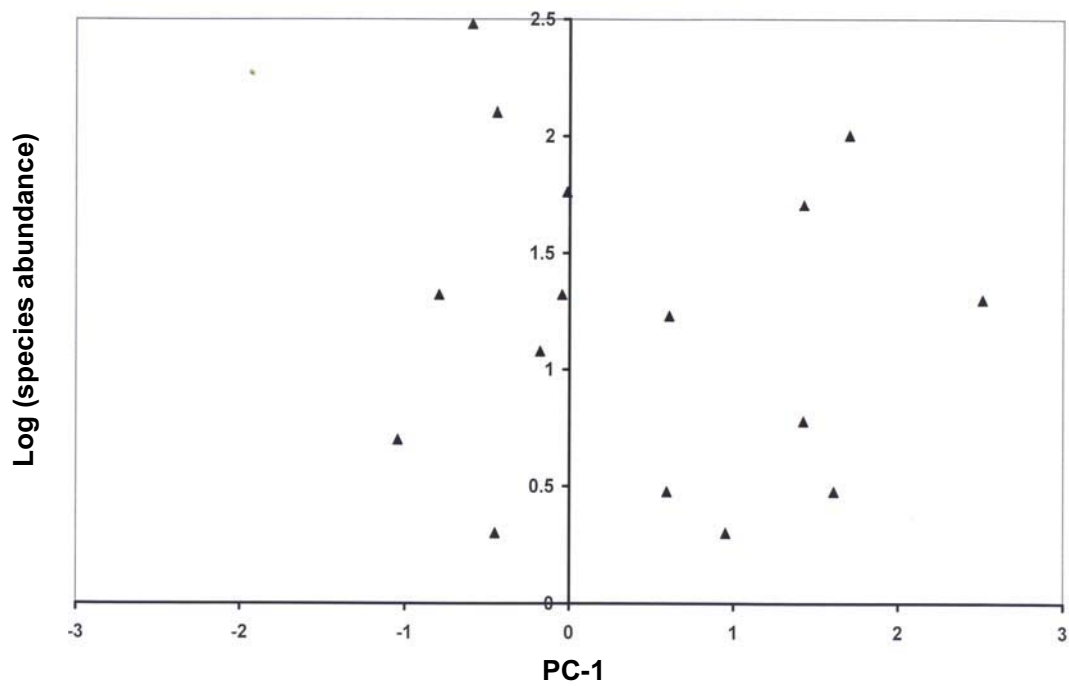
ภาพที่ A-4 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแมลงรึ้นดำชนิด *S. decuplum* และ *S. fenestratum* กับ PC-1 ในฤดูฝน



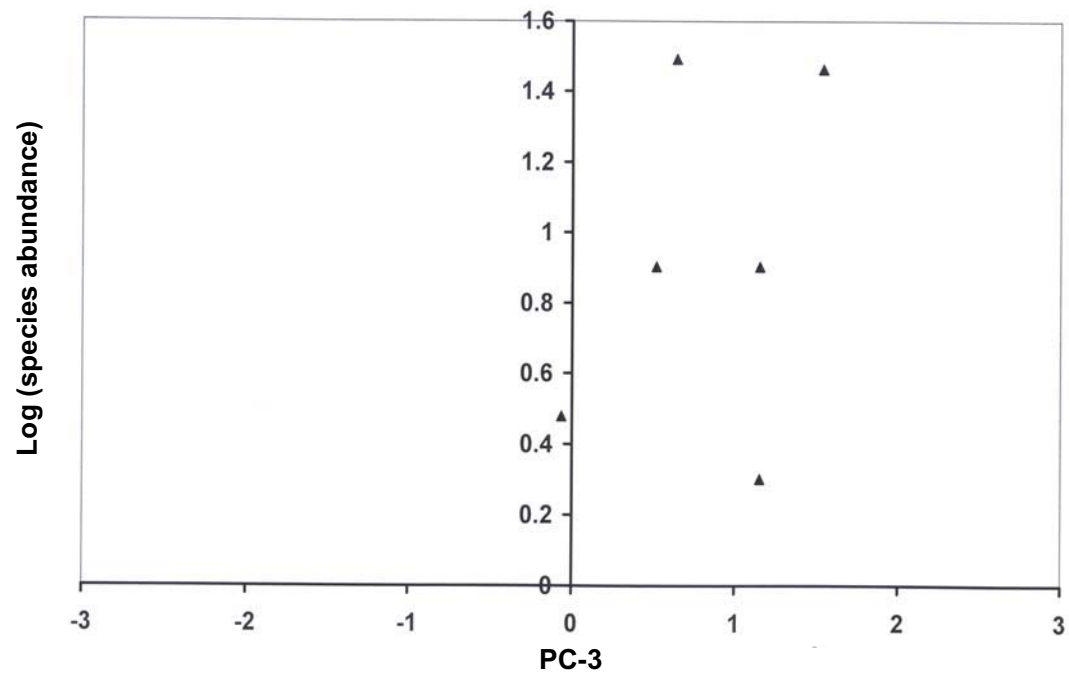
ภาพที่ A-5 ความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างแมลงรึ้นดำชนิด *S. chiangmaiense*, *S. nodosum* และ *S. siamense* กับ PC-1 ในฤดูฝน



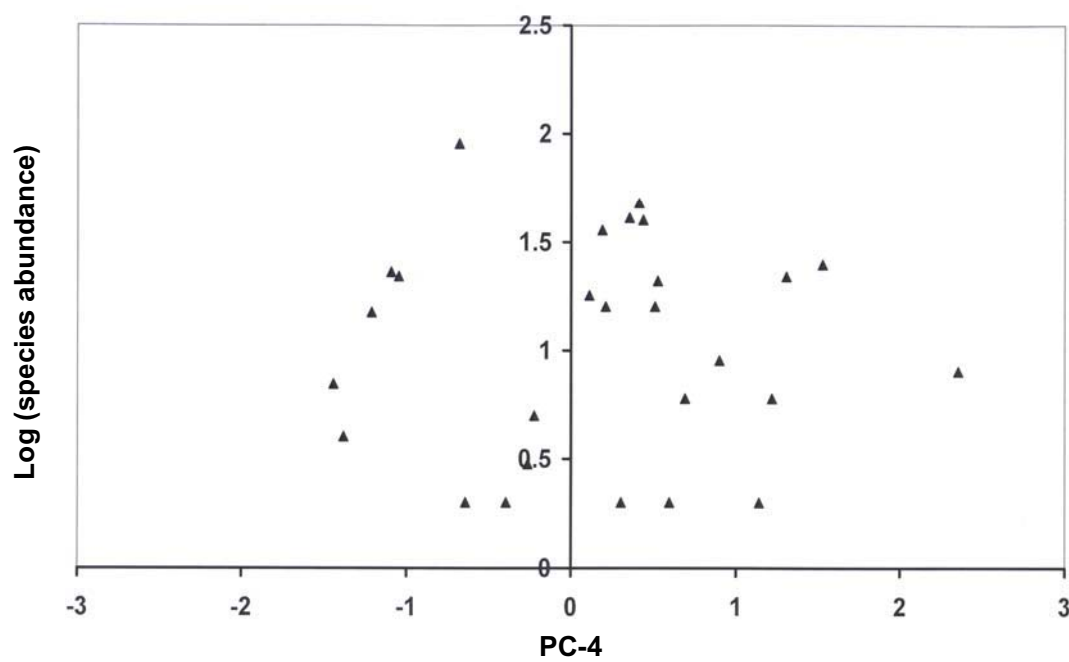
ภาพที่ A-6 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแมลงร้นดำชนิด *S. chiangmaiense* กับ PC-2 ในฤดูฝน



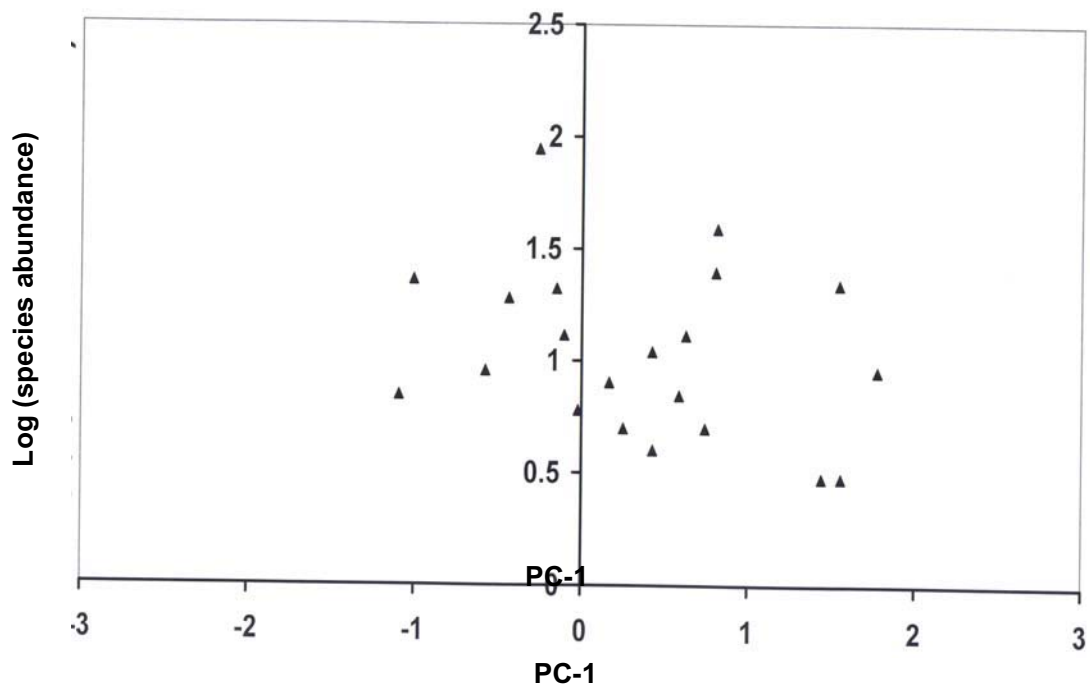
ภาพที่ A-7 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแมลงร้นดำชนิด *S. chamlongi* กับ PC-1 ในฤดูหนาว



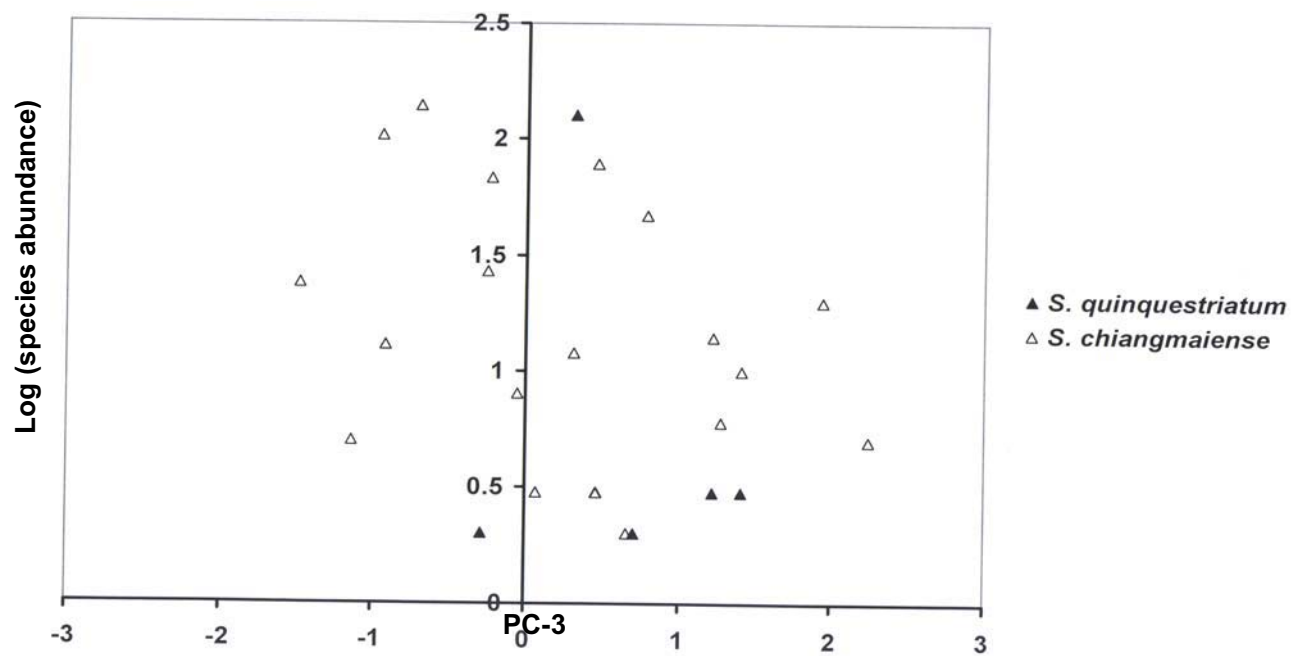
ภาพที่ A-8 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแมลงรึ้นดำชนิด *S. sp.nr. rufibasis* กับ PC-3 ในฤดูหนาว



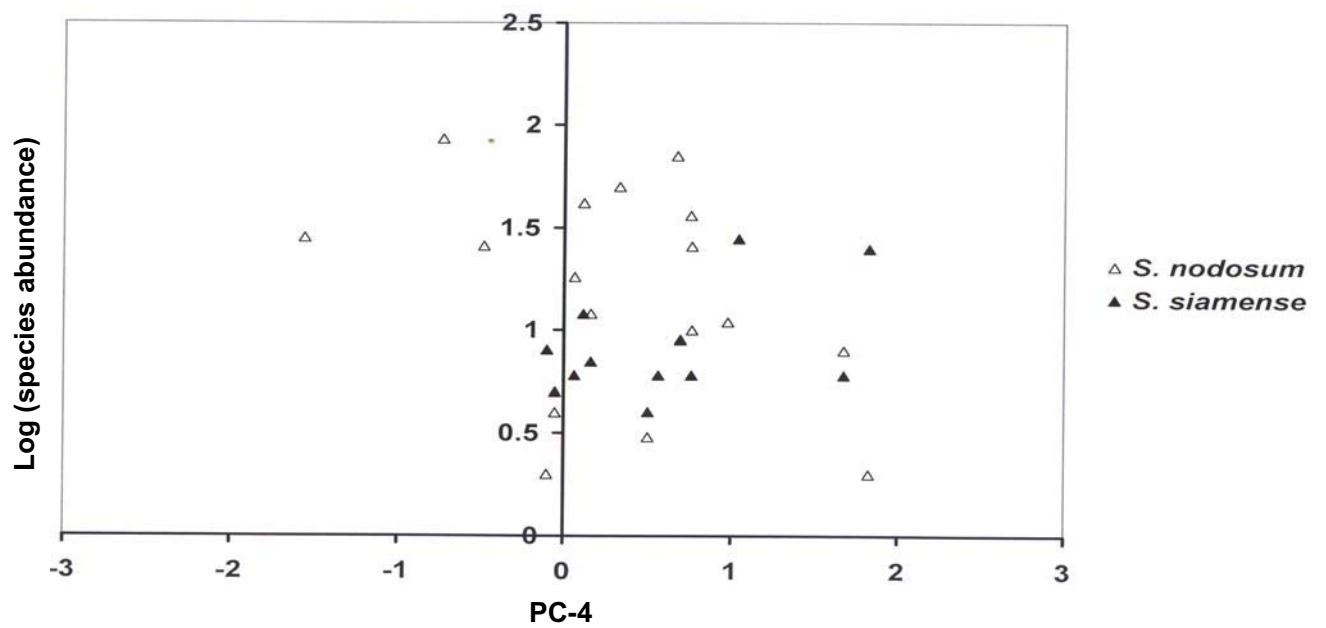
ภาพที่ A-9 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแมลงรึ้นดำชนิด *S. nodosum* กับ PC-4 ในฤดูหนาว



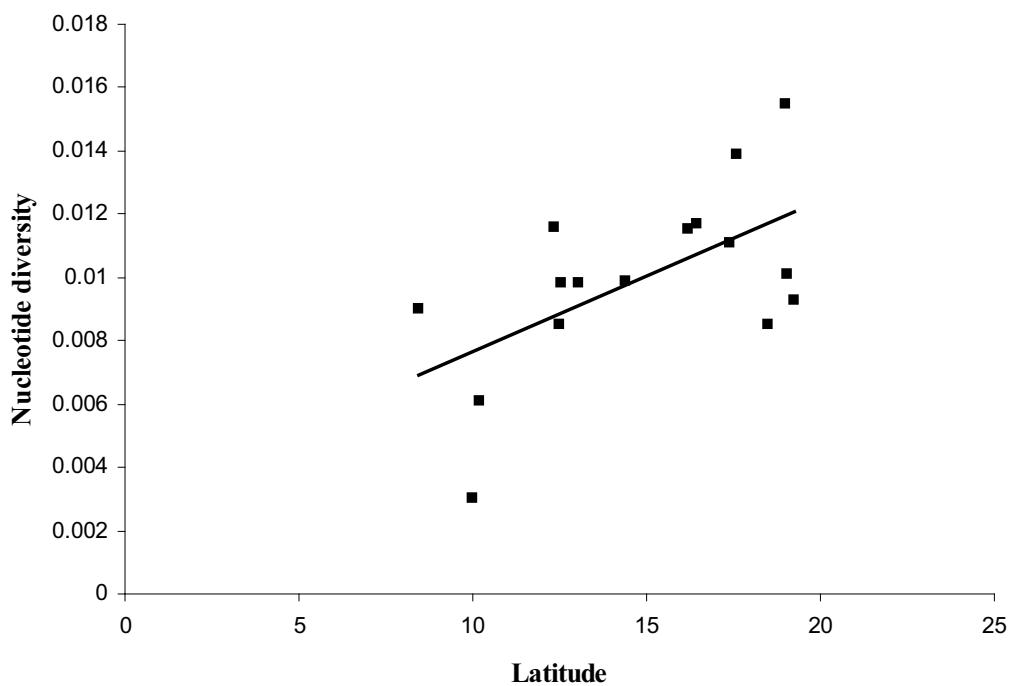
ภาพที่ A-10 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแมลงร้นดำชนิด *S. nakhonense* กับ PC-1 ในฤดูร้อน



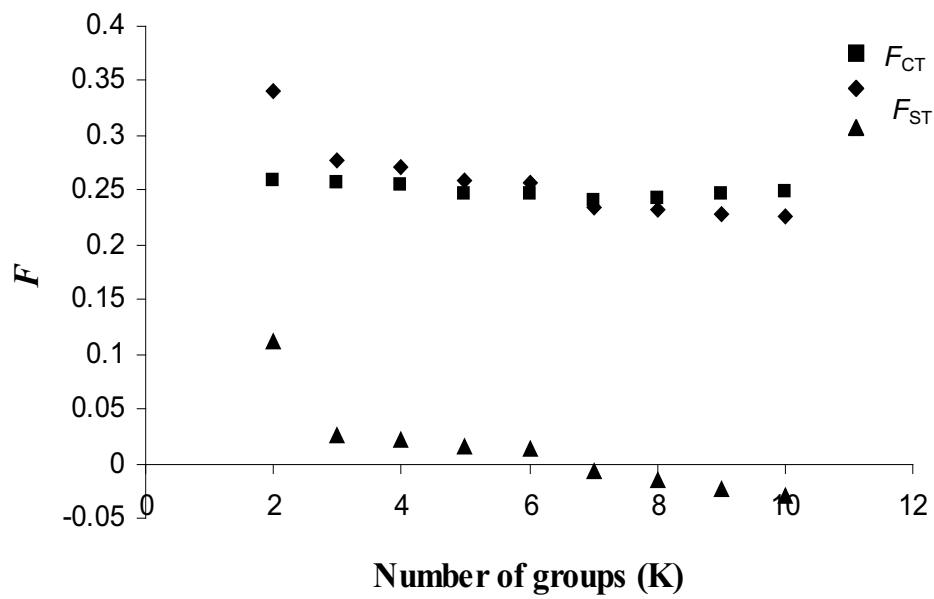
ภาพที่ A-11 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแมลงร้นดำชนิด *S. chiangmaiense* และ *S. quinquestriatum* กับ PC-3 ในฤดูร้อน



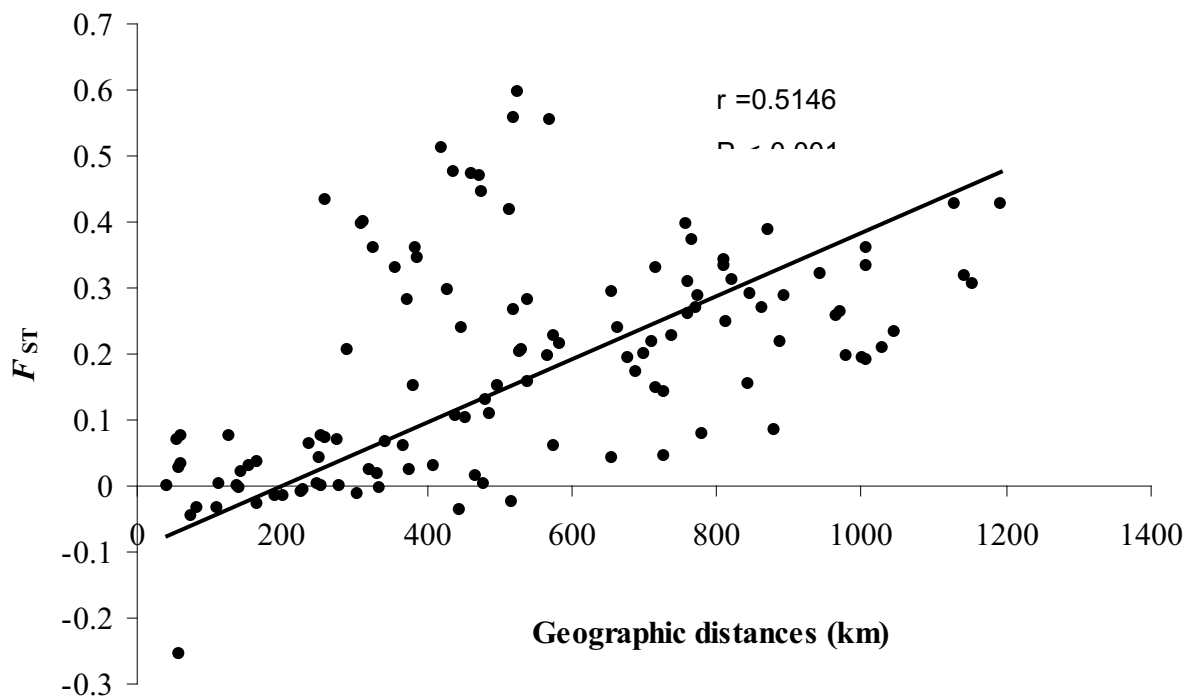
ภาพที่ A-12 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแมลงร้นค้ำชนิด *S. nodosum* และ *S. siamense* กับ PC-4 ในฤดูร้อน



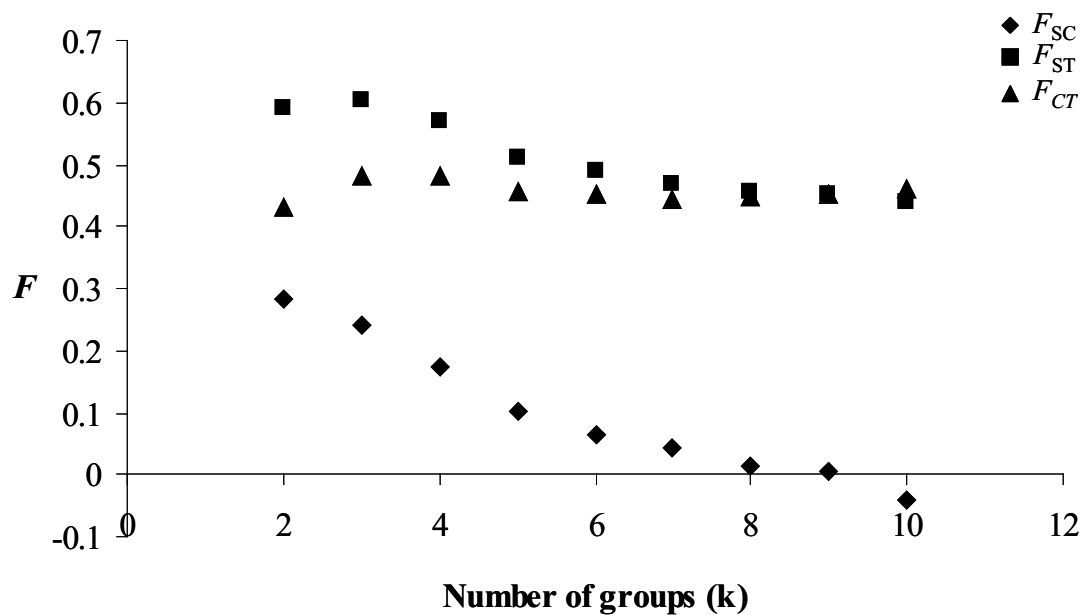
ภาพที่ A-13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) กับละติจูด (latitude)



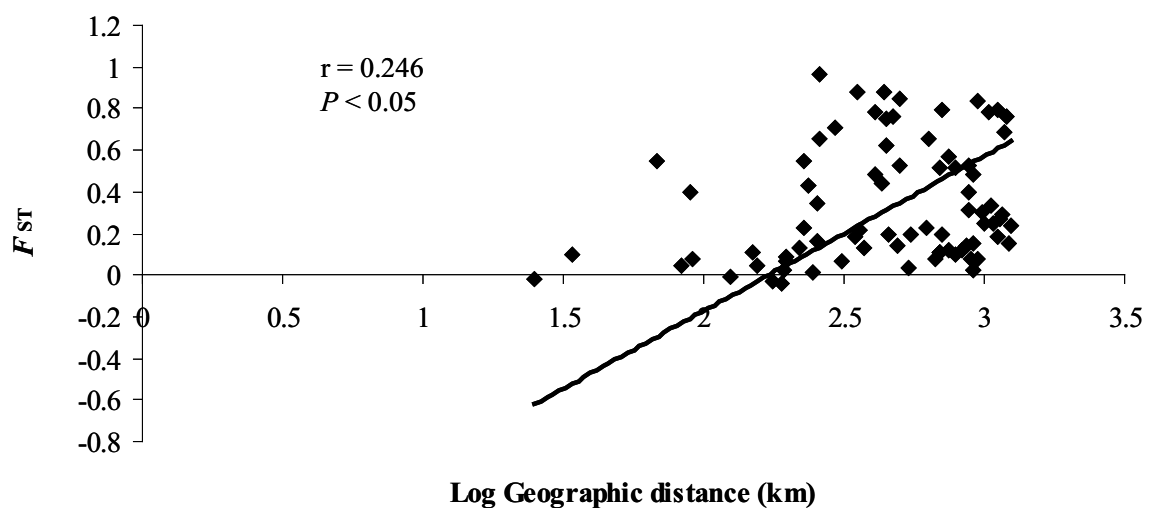
ภาพที่ A-14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของ *S. tani* จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร



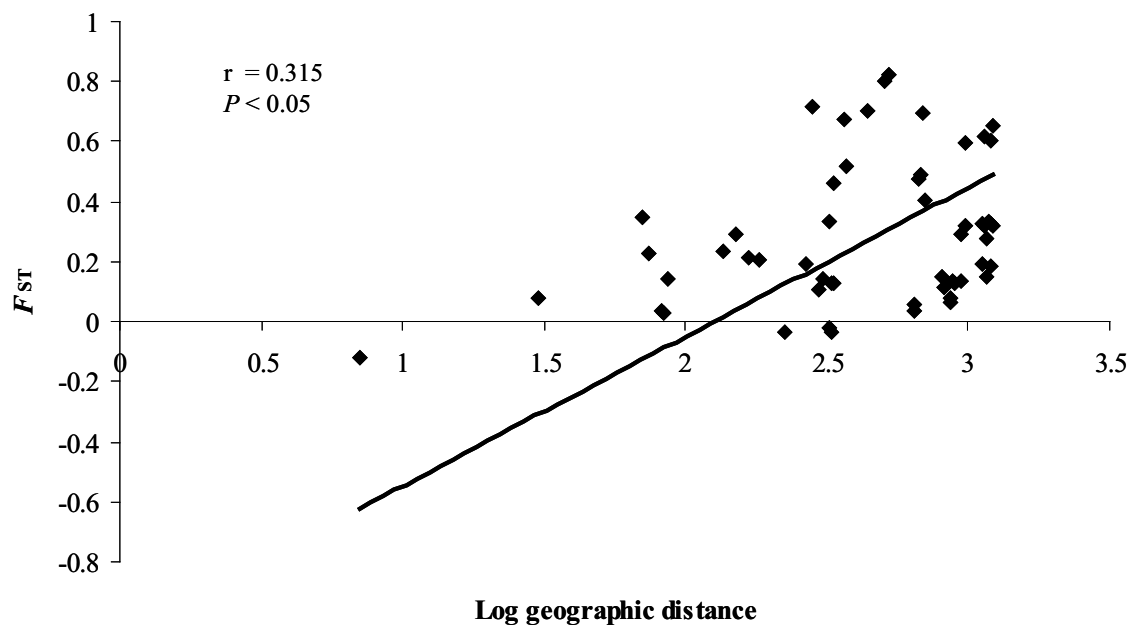
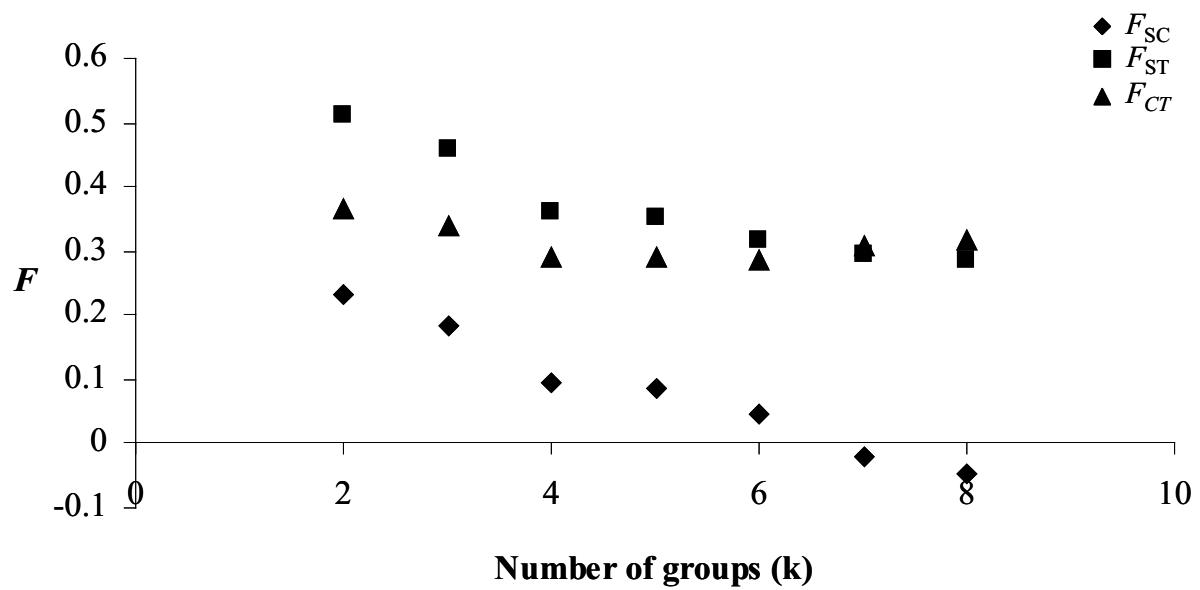
ภาพที่ A-15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางทางภูมิศาสตร์กับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง 16 ประชากรของ *S. tani*



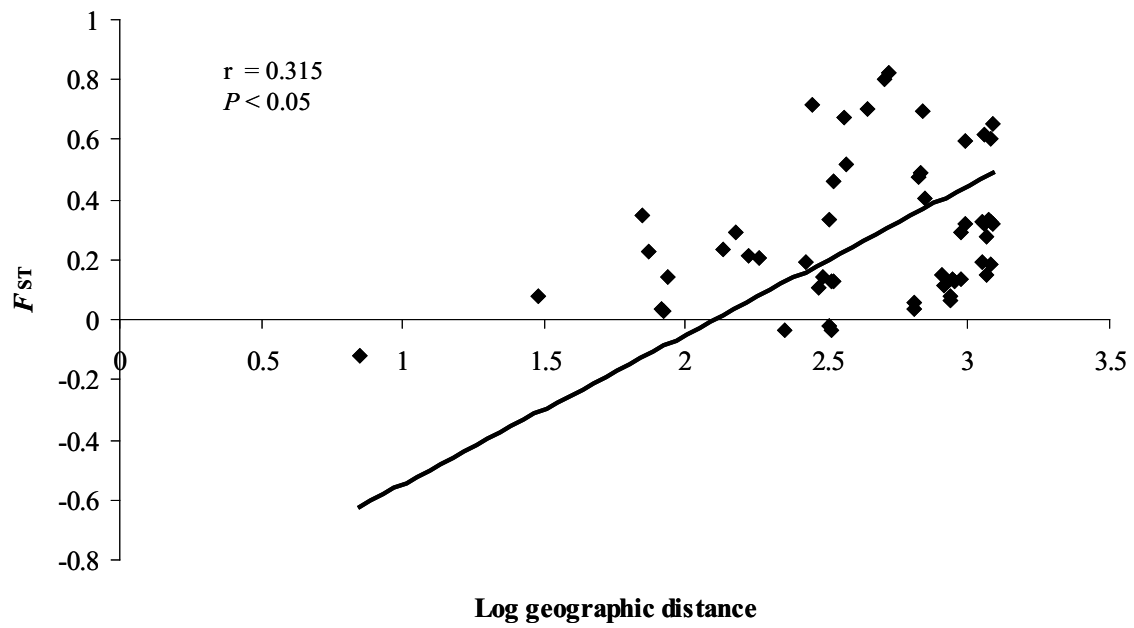
ภาพที่ A-16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของ *S. nakhonense* จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร



ภาพที่ A-17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) และระยะทางทางภูมิศาสตร์ (log km) ระหว่างประชากรของ *S. nakhonense*



ภาพที่ A-18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของ *S. quinquestriatum* จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร



ภาพที่ A-19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) และระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (log km) ระหว่างประชากรของ *S. quinquestratum*

ภาคผนวก 2

ตารางที่ A-1 การทดสอบสมมูล Hardy – Weinberg ของ INVERSION แต่ละรูปแบบที่เกิดในประชากร *Simulium siamense* ที่เก็บมาจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติต่าง ๆ

Populations	Observed or expected	IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4	รวม	χ^2	P
Cytoform A							
ห้วยหยวก	Obs.	51	56	0	107		
	Exp.	58.59	41.47	7.23		11.97**	<0.001
		IIL-st/st	Inversion IIL-2 IIL-st/2	IIL-2/2			
ห้วยหยวก	Obs.	101	6	0	107		
	Exp.	100.68	6.23	0.09		0.0995	>0.95
		IIL-st/st	Inversion IIL-3 IIL-st/3	IIL-3/3			
ห้วยหยวก	Obs.	95	12	0	107		
	Exp.	95.35	11.31	0.34		0.3833	>0.75
		IIL-st/st	Inversion IIIL-1 IIIL-st/1	IIIL-1/1			
ห้วยหยวก	Obs.	86	21	0	107		
	Exp.	86.67	19.26	1.07		1.232	>0.50
		IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4			
บ้านแม่โถ	Obs.	16	21	0	37		
	Exp.	19.18	14.91	2.90		5.941	>0.05
		IIL-st/st	Inversion IIL-3 IIL-st/3	IIL-3/3			
บ้านแม่โถ	Obs.	30	7	0	37		
	Exp.	30.37	6.30	0.33		0.4122	>0.75
		IS-st/st	Inversion IS-7 IS-st/7	IS-7/7			
รพ.พปพระ	Obs.	23	5	0	28		
	Exp.	23.18	4.58	0.23		0.269	>0.75
		IIIS-st/st	Inversion IIIS-1 IIIS-st/1	IIIS-1/1			
รพ.พปพระ	Obs.	8	1	19	28		
	Exp.	2.52	11.76	13.72		23.78**	<0.001
		IIL-st/st	Inversion IIL-6 IIL-st/6	IIL-6/6			
ห้วยแม่ตำ	Obs.	51	6	1	57		
	Exp.	50.36	6.43	0.20		3.23	>0.1

ตารางที่ A-1 (ต่อ)

Populations	Observed or expected	IIIS-st/st	Inversion IIIS-1 IIIS-st/1	IIIS-1/1	รวม	χ^2	P
ห้วยแม่ตำ	Obs.	33	15	9	57		
	Exp.	28.73	23.47	4.79		7.39**	<0.01
		IIIL-st/st	Inversion IIIL-1 IIIL-st/1	IIIL-1/1			
ห้วยแม่ตำ	Obs.	52	5	0	57		
	Exp.	52.09	4.79	0.11		0.119	>0.90
		IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4			
ห้วยแม่สาคร	Obs.	16	21	1	38		
	Exp.	18.09	16.25	3.65		3.55	>0.10
		IIIL-st/st	Inversion IIIL-6 IIIL-st/6	IIIL-6/6			
ห้วยแม่สาคร	Obs.	22	16	0	38		
	Exp.	23.65	12.65	1.69		2.69	>0.25
		IIIL-st/st	Inversion IIIL-1 IIIL-st/1	IIIL-st/1			
ห้วยแม่สาคร	Obs.	25	13	0	38		
	Exp.	26.05	10.82	1.12		1.60	>0.25
		IIIL-st/st	Inversion IIIL-4 IIIL-st/4	IIIL-4/4			
ห้วยแม่สาคร	Obs.	33	5	0	38		
	Exp.	33.15	4.68	0.165		0.186	>0.90
		IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4			
กม.50 เวียงสา- ร้องกวาง	Obs.	16	15	0	31		
	Exp.	17.81	11.37	1.81		3.15	>0.10
		IIIL-st/st	Inversion IIIL-6 IIIL-st/6	IIIL-6/6			
กม.50 เวียงสา- ร้องกวาง	Obs.	26	5	0	31		
	Exp.	26.18	4.61	0.20		0.233	>0.75

ตารางที่ A-1 (ต่อ)

Populations	Observed or expected	III-st/st	Inversion III-L-6 III-st/6	III-L-6/6	รวม	χ^2	P
น.ห้วยจันทร์	Obs.	91	27	0	118		
	Exp.	91.38	24.92	1.7		1.875	>0.25
		IIIS-st/st	Inversion IIIS-1 IIIS-st/1	IIIS-1/1			
น.ห้วยจันทร์	Obs.	100	1	17	118		
	Exp.	85.26	30.09	2.66		107.97**	<0.001
		IIIS-st/st	Inversion IIIS-1 IIIS-st/1	IIIS-1/1			
อช.ภูพาน	Obs.	93	12	9	114		
	Exp.	85.89	26.12	1.99		32.91**	<0.001
		IIIL-st/st	Inversion IIIL-4 IIIL-st/4	IIIL-4/4			
บ้านปัดวี1	Obs.	65	9	0	74		
	Exp.	65.39	8.35	0.27		0.3223	>0.75
		IIIL-st/st	Inversion IIIL-5 IIIL-st/5	IIIL-5/5			
บ้านปัดวี1	Obs.	67	7	0	74		
	Exp.	66.78	7.03	0.18		0.180	>0.90
		IIIS-st/st	Inversion IIIS-2 IIIS-st/2	IIIS-2/2			
เขาสอยดาว2	Obs.	60	0	5	65		
	Exp.	55.01	4.87	5.2		5.23	>0.05

หมายเหตุ ** =ค่า χ^2 ที่คำนวณได้ มีค่ามากกว่าค่า χ^2 ที่เปิดได้จากตารางไคสแควร์ ($\chi^2_{0.05,2} = 5.991$)

ตารางที่ A-2 ความสัมพันธ์ระหว่าง INVERSION แต่ละรูปแบบ และเพศของ *Simulium siamense* cytoform A,C และ D ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติต่างๆ

Populations	Sex	IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4	รวม	χ^2 (G – test)
Cytoform A						
ห้วยห้วยก	♂	27	30	0	57	
	♀	24	26	0	50	
	รวม	51	56	0	107	0.002, P>0.995
		III-st/st	Inversion III L-3 III-st/3	III-3/3		
ห้วยห้วยก	♂	50	7	0	57	
	♀	45	5	0	50	
	รวม	95	12	0	107	0.14, P>0.90
		IIIL-st/st	Inversion III L-1 IIIL-st/1	IIIL-1/1		
ห้วยห้วยก	♂	46	11	0	57	
	♀	40	10	0	50	
	รวม	86	21	0	107	0.008, P>0.995
		IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4		
บ้านแม่โถ	♂	6	13	0	19	
	♀	10	8	0	18	
	รวม	16	21	0	37	2.185, P>0.995
		IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4		
บ้านแม่สะงา	♂	15	4	0	19	
	♀	21	6	0	27	
	รวม	36	10	0	46	0.008, P>0.995
		IIIS-st/st	Inversion IIIS-1 IIIS-st/1	IIIS-1/1		
ห้วยแม่ตำ	♂	17	9	3	29	
	♀	16	6	6	28	
	รวม	33	15	9	57	1.629, P>0.25
		IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4		
ห้วยแม่สาคร	♂	10	14	0	24	
	♀	6	7	1	14	
	รวม	16	21	1	38	2.104, P>0.25
		III-st/st	Inversion III L-6 III-st/6	III-6/6		
ห้วยแม่สาคร	♂	12	12	0	24	
	♀	10	4	0	14	
	รวม	22	16	0	38	2.114, P>0.25

ตารางที่ A-2 (ต่อ)

Populations	Sex	IIIL-st/st	Inversion IIIL-1 IIIL-st/1	IIIL-1/1	รวม	χ^2 (G – test)
ห้วยแม่สาคร	♂	18	6	0	24	
	♀	7	7	0	14	
	รวม	25	13	0	38	2.425, P>0.25
		IS-st/st	Inversion IS-4 IS-st/4	IS-4/4		
กม50 เวียงสา-ร่องกวาง	♂	7	3	0	10	
	♀	9	12	0	21	
	รวม	16	15	0	31	2.043, P>0.25
		IS-st/st	Inversion IS-1 IS-st/1	IS-1/1		
น.ห้วยจันทร์	♂	58	0	7	65	
	♀	44	0	9	53	
	รวม	102	0	16	118	0.96, P>0.50
		IIIL-st/st	Inversion IIIL-6 IIIL-st/6	IIIL-6/6		
น.ห้วยจันทร์	♂	51	14	0	65	
	♀	40	13	0	53	
	รวม	91	27	0	118	0.14, P>0.90
		IIIS-st/st	Inversion IIIS-1 IIIS-st/1	IIIS-1/1		
น.ห้วยจันทร์	♂	58	0	7	65	
	♀	42	1	10	53	
	รวม	100	1	17	118	3.216, P>0.10
		IIIS-st/st	Inversion IIIS-1 IIIS-st/1	IIIS-1/1		
อช.ภูพาน	♂	43	7	6	56	
	♀	50	5	3	58	
	รวม	93	12	9	114	1.886, P>0.25
		IS-st/st	Inversion IS-6 IS-st/6	IS-6/6		
Cytoform C						
ร่อนน้ำห้วยเขย่ง	♂	29	0	0	29	
	♀	3	28	0	31	
	รวม	32	28	0	60	63.19**, P<0.001
Cytoform D						
		IS-st/st	Inversion IS-7 IS-st/7	IS-7/7		
ห้วยองธิ	♂	16	1	0	17	
	♀	9	31	0	40	
	รวม	25	32	0	57	27.9**, P<0.001

หมายเหตุ ** =ค่า χ^2 ที่คำนวณได้ มีค่ามากกว่าค่า χ^2 ที่เปิดได้จากตารางไคสแควร์ ($\chi^2_{0.05,2} = 5.991$)

ตารางที่ A-3 การทดสอบสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ของอินเวอร์ชัน IS-5, IS-7, IL-2, IIL-7 และ IIL-18 ในประชากรของ *Simulium tani*. Cytoform A, B, C และ F

แหล่งที่เก็บ	Cytoform	Observe or expected	Inversion IS-5 frequency			χ^2	P
			ss	si	ii		
น้ำตกเขาสอยดาว จ. จันทบุรี	B	Obs. Exp.	54 91.26	8 7.48	0 0.26	0.26	>0.01
			Inversion IS-7 frequency			χ^2	P
			ss	si	ii		
น้ำตกบกทราย จ.ระนอง (15 ก.ค. 46)	B	Obs. Exp.	100 91.88	47 63.23	19 10.88	10.98	<0.01
ห้วยรัฐ จ. ระนอง	B	Obs. Exp.	44 37.14	20 33.23	14 7.38	12.36	<0.005
เขาพระนารายณ์ จ. ระนอง	B	Obs. Exp.	9 6.07	9 14.85	12 9.07	4.65	>0.05
			Inversion IL-2 frequency				
			ss	si	ii		
น้ำตกแม่สุรินทร์ จ.แม่ฮ่องสอน	A	Obs. Exp.	3 3.57	14 12.85	11 11.57	0.22	>0.75
น้ำตกบกทราย จ.ระนอง (15 ก.ค. 46)	B	Obs. Exp.	40 35.25	73 82.49	53 48.25	2.19	>0.25
ห้วยรัฐ จ. ระนอง	B	Obs. Exp.	42 27.72	9 37.56	27 12.72	45.09	<0.005
น้ำตกเหมืองทวด จ. สุราษฎร์ธานี(13 กค 46)	B	Obs. Exp.	0 1.06	19 17.23	69 69.70	1.24	>0.5
น้ำตกวังบัวบาน จ.เชียงใหม่	C	Obs. Exp.	44 32.45	10 33.12	20 8.45	36.04	<0.005
ด่านตรวจแม่เฒ จ.เชียงใหม่ (10 ธ.ค47)	C	Obs. Exp.	14 11.77	7 11.44	5 2.78	3.92	>0.10
บ้านพัสดกลาง จ. กาญจนบุรี	F	Obs. Exp.	5 4.14	25 26.26	42 41.58	0.024	>0.95
			Inversion IIL-1 frequency				
			ss	si	ii		
บ้านพัสดกลาง จ. กาญจนบุรี	F	Obs. Exp.	49 48.41	20 21.25	3 2.33	0.267	>0.75
			Inversion IIL-7 frequency				
			ss	si	ii		
น้ำตกเขาสอยดาว จ. จันทบุรี	B	Obs. Exp.	46 42.77	11 17.44	5 1.78	8.46	<0.005
			Inversion IIL-18 frequency				
			ss	si	ii		
สวนอูคอ จ. แม่ฮ่องสอน	A	Obs. Exp.	20 12.48	22 37.09	35 27.48	12.69	<0.005

ตารางที่ A-4 เปรียบเทียบการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ภายในประชากรของ *Simulium* (*Nevermannia*) *feuerborni* (intraspecific variation) จำนวน 5 ตัว (10 โคลน) ที่เก็บจากโครงการหลวง (RPJ) อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่

ชนิด	ตำแหน่ง	ลักษณะ	โคลน											ลำดับเบสที่เหมือนกันมากที่สุด
			เบส	ลำดับ	1L1	1L2	2L1	2L2	3L1	3L2	4L1	4L2	5L1	5L2
					(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)
S. <i>feuerborni</i>	23	T or C		T	T	T	T	T	C	C	T	T	T	T
	26	T or A		T	T	T	T	T	A	A	T	T	T	T
	27	C or T		C	C	C	C	C	T	T	C	C	T	T
	28-29	(T) _n		-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
	30	G or A		G	G	G	G	G	-	-	G	G	A	A
	31	A		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	32	A or T		A	A	A	A	A	-	-	A	A	T	T
	33-35	(AGA)		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	38	C, G or A		C	C	C	C	C	G	G	C	C	A	A
	39	A or T		A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	T
	40	A or T		A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	T
	220	A or G		A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G
	241	A or G		A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	G
	261-262	(AT)		+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-

ตารางที่ A-5 เปรียบเทียบการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ภายในประชากรของ *Simulium* (*Nevermannia*) *feuerborni* (intraspecific variation) จำนวน 5 ตัว (10 โคลน) และจำนวน 1 ตัว (2 โคลน) ที่เก็บจากโครงการหลวง (RPJ) และน้ำตกห้วยทรายเหลือง (HSL) อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่

ชนิด	ตำแหน่ง	เบส	โคลน											เบสที่เหมือนกันมากที่สุด
			1L1	1L2	2L1	2L2	3L1	3L2	4L1	4L2	5L1	5L2	L1	L2
			(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(RPJ)	(HSL)	(HSL)
S. <i>feuerborni</i>	23	T or C	T	T	T	T	C	C	C	C	T	T	T	T
	26	T or A	T	T	T	T	A	A	T	T	T	T	T	T
	27	C or T	C	C	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C
	28-29	(T) _n	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-
	30	G or A	G	G	G	G	-	-	G	G	A	A	G	G
	31	A	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	32	A or T	A	A	A	A	-	-	A	A	T	T	A	A
	33-35	(AGA)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	38	C or G or A	C	C	C	C	G	G	C	C	A	A	A	A
	39	A or T	A	A	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T
	40	A or T	A	A	A	A	A	A	A	A	T	T	A	A
	218	A or G	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G
	224	G or A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A
	238	(T)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	260-261	(TA)	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+