



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงวันดำ
(Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล

พฤษภาคม 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงร้นดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย

รศ.ดร.ไพโรจน์ ประมวล มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนพัฒนานักวิจัย ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลียว กุวังคะดิลก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ และความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี Professor Peter Adler, Clemson University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้คำแนะนำในการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ Professor Hiroyuki Takaoka, University of Malaya ที่ให้คำแนะนำการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน และอนุเคราะห์ตัวอย่างจากประเทศมาเลเซีย และอินโดนีเซีย Dr. Adrian Plant, National Museum of Wales, United Kingdom และ Dr. Jolyon Dodgson ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ช่วยตรวจแก้ไขภาษาอังกฤษในบทความวิจัย คุณคมกริช วงศ์ภาคำ สถาบันวิจัยวลัยรุกเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างภาคสนาม

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5680013

ชื่อโครงการ: โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

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

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี (17 มิถุนายน 2556 – 16 มิถุนายน 2559)

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงรืนดำกับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย และเพื่อศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในประเทศไทย เก็บตัวอย่างแมลงรืนดำจากทุกภูมิภาคของประเทศไทยจำนวน 171 แห่ง จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา เซลล์พันธุศาสตร์ และอณูพันธุศาสตร์ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ผลการศึกษาพบแมลงรืนดำทั้งสิ้น 44 สปีชีส์ จำแนกอยู่ใน 5 สกุลย่อยของสกุล *Simulium* ประกอบด้วย สกุลย่อย *Asiosimulium* 1 สปีชีส์ สกุลย่อย *Daviesellum* 1 สปีชีส์ สกุลย่อย *Montisimulium* 1 สปีชีส์ สกุลย่อย *Gomphostilbia* 13 สปีชีส์ สกุลย่อย *Nevermannia* 5 สปีชีส์ และสกุลย่อย *Simulium* 23 สปีชีส์ การใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของแมลงรืนดำสามารถระบุชนิดในระยะตัวอ่อนของแมลงรืนดำ *Simulium bullatum* และ *S. chaliowae* ซึ่งยังไม่มีรายงานลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนนำไปสู่การจัดทำคำอธิบายลักษณะของระยะตัวอ่อนในแมลงรืนดำทั้งสองสปีชีส์ ศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan ในระยะตัวอ่อน ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase I, II และ 18S/ITS1 การวิเคราะห์โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในประเทศไทยพบว่าไม่แตกต่างจากคำคาดหมายจากการจำลองสังคมแมลงรืนดำแบบสุ่ม ขณะที่การวิเคราะห์โครงสร้างสังคมโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงรืนดำในแหล่งอาศัยเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าคำคาดหมายจากสังคมแบบสุ่มบ่งชี้ว่าปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงรืนดำ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan กับระยะห่างตามสายวิวัฒนาการพบว่าไม่มีความสัมพันธ์บ่งชี้ว่าลักษณะ labral fan มีการวิวัฒนาการแบบเข้าหา ดังนั้นแมลงรืนดำที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการอาจสามารถเลือกใช้แหล่งอาศัยที่แตกต่างกันและส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมและนำไปสู่การแตกแขนงของสปีชีส์ได้ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ที่พบว่าการปรับตัวต่อสภาพนิเวศวิทยาที่แตกต่างกันอาจเป็นสาเหตุของการแตกแขนงของสปีชีส์ เช่นเดียวกับการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรในแมลงรืนดำ *S. aureohirtum* ที่พบว่าความแตกต่างของปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ผลจากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยของแมลงรืนดำเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งในระดับประชากร และสปีชีส์ นอกจากนี้ปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยยังมีบทบาทสำคัญในการกำหนดโครงสร้างสังคม ดังนั้นผล

การศึกษานี้จึงบ่งชี้ว่าปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยเป็นปัจจัยสำคัญต่อการวิวัฒนาการของแมลง
ร้นดำ

คำหลัก: โครงสร้างสังคม, Diptera, นิเวศวิทยา, Simuliidae, *Simulium*

Abstract

Project Code : RSA5680013

Project Title : Phylogenetic community structure of black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand

Investigator : Associate Professor Pairot Pramual, Ph.D.

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

Project Period : 3 years (17 June 2014 – 16 June 2016)

The objectives of this study are to examine relationship between morphological characteristics of black flies and ecological conditions of the habitat and to determine phylogenetic community structure of black flies in Thailand. Specimens were collected from 171 sites throughout the country. Species were identified using morphology, cytology and DNA barcode. A total of 44 species were collected in this study. These species were assigned into five subgenera of the genus *Simulium* including *Asiosimulium* (1 species), *Daviesellum* (1 species), *Montisimulium* (1 species), *Gomphostilbia* (13 species), *Nevermannia* (5 species) and *Simulium* (23 species). DNA barcode was successfully associate larva to pupa or adult of *S. bullatum* and *S. chaliowae* leading to morphological descriptions of mature larvae of these species. Morphological characteristics of the larval labral fan were used for community structure analyses. These characters were selected because they were strongly related to the habitat exploitation. Phylogenetic relationship was inferred from sequences of cytochrome *c* oxidase I, II and 18S/ITS1 genes. Phylogenetic community ecology analyses revealed that community structure of black flies in Thailand is not significantly different from the null community. In contrast, community structure based on labral fan morphology revealed that species in the community are morphologically more similar than expected by chance. Because the morphological characters were significantly related to the habitat exploitation thus, habitat filtering is a primary factor underlying black fly community structure. Analysis of the relationship between labral fan morphology and phylogenetic distance found no significant relationship suggested that this character might have undergone convergent evolution. Therefore, closely related species potentially used ecologically different habitats, which facilitating population divergent and could leading to speciation. This finding is consistent with phylogenetic study of the black flies of the *S. tuberosum* species group that found that closely related species are ecologically divergent. Therefore, adaptation to different ecologies could be the factor promoting speciation. The results also supported by population genetic study of *S. aureohirtum* that found that ecological differentiation between populations is a factor responsible for genetic

differentiation. The results of this study indicated that ecological conditions of the habitat are important factor that could facilitate genetic differentiation at population and species levels. In addition, ecological conditions are also a primary factor underlying community structure of the black fly. Therefore, the results strongly suggested that ecological conditions of the habitat play important role in black fly evolution.

Keywords: community structure, Diptera, ecology, Simuliidae, *Simulium*

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
1. บทนำ	1
2. วิธีการศึกษา	3
2.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดแมลงรืนดำ	3
2.2 ป้ายยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย	3
2.3 การวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงรืนดำ	17
2.4 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์	18
2.5 การศึกษาอณูพันธุศาสตร์	19
2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	19
3. ผลการศึกษา	23
3.1 เครื่องหมายพันธุกรรม DNA barcode สำหรับการระบุชนิดแมลงรืนดำ	23
3.2 เซลล์พันธุศาสตร์และอณูพันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ <i>Simulium feuerborni</i>	28
3.3 พันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงรืนดำ <i>Simulium aureohirtum</i>	36
3.4 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ <i>Simulium tuberosum</i> ในประเทศไทย	42
3.5 โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในประเทศไทย	55
4. วิจารณ์ผลการศึกษา	63
4.1 DNA barcode สำหรับการระบุชนิดของแมลงรืนดำในประเทศไทย	63
4.2 เซลล์พันธุศาสตร์และอณูพันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ <i>Simulium feuerborni</i>	65
4.3 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ของแมลงรืนดำ <i>Simulium aureohirtum</i>	66
4.4 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ <i>Simulium tuberosum</i>	69
4.5 โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในประเทศไทย	71
4.6 สรุปผลการศึกษา	73
เอกสารอ้างอิง	74

สารบัญ

	หน้า
Output จากโครงการวิจัย	83
ภาคผนวก	85
ภาคผนวก ก Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ ระดับนานาชาติ 5 เรื่อง	86
ภาคผนวก ข บทความสำหรับการเผยแพร่	136

1. บทนำ

สังคมของสิ่งมีชีวิตเป็นหน่วยที่สำคัญของระบบนิเวศที่เชื่อมโยงระหว่างการพัฒนาการของแต่ละสปีชีส์กับหน้าที่เชิงระบบในระบบนิเวศ (Cavender-Bares et al. 2004) สังคมของสิ่งมีชีวิตเป็นสะพานเชื่อมระหว่างความหลากหลายทางชีวภาพทั้งสามระดับ คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายของสปีชีส์ และความหลากหลายของระบบนิเวศ ความรู้ความเข้าใจต่อกลไกที่มีผลต่อโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิตจึงเป็นเป้าหมายหลักประการหนึ่งของการศึกษานิเวศวิทยา มีการเสนอแนวคิดถึงกลไกที่เป็นปัจจัยที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิต 3 กลไก ได้แก่ การคัดกรองของแหล่งอาศัย (habitat filtering) การแก่งแย่งแข่งขันและกันออก (competitive exclusion) และ กระบวนการเป็นกลาง (neutral process) (Ricklefs 1987; Ricklefs and Schluter 1993; Weiher and Keddy 1995; Hubbell 2001) เป้าหมายสำคัญของการศึกษานิเวศเชิงสังคม (community ecology) คือ การประเมินเพื่อเปรียบเทียบความสำคัญของกลไกเหล่านี้ต่อโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิต

การศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic community ecology) เป็นการบูรณาการข้อมูลจากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ นิเวศวิทยา สันฐานวิทยา และสังคมของสิ่งมีชีวิต (Webb et al. 2002; Cavender Bares et al. 2009; Vamosi et al. 2009) การศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการสามารถใช้ในการเปรียบเทียบความสำคัญของกลไกที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้ การศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ทำนายกลไกที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิต ดังนี้ (1) สปีชีส์ที่อยู่ในสังคมมีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการมากกว่าสังคมที่ได้จากการจำลองเหตุการณ์ที่เกิดจากการรวมตัวของสังคมแบบสุ่ม แสดงว่า การคัดกรองของแหล่งอาศัยเป็นกลไกที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิต (2) สปีชีส์ที่อยู่ในสังคมเดียวกัน มีความแตกต่างทางสายวิวัฒนาการ มากกว่าสังคมที่เกิดจากการจำลองเหตุการณ์แบบสุ่ม แสดงว่า การแก่งแย่งแข่งขันและกันออก เป็นกลไกที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิตในชุมชน และ (3) สปีชีส์ที่อยู่ในสังคมมีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการไม่แตกต่างจากสังคมที่ได้จากการจำลองเหตุการณ์ที่เกิดจากการรวมตัวของสังคมแบบสุ่ม แสดงว่า กระบวนการเป็นกลางเป็นกลไกที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิตในชุมชน (Vamosi et al. 2009) การศึกษาในหลายพื้นที่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย แสดงให้เห็นว่าการศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการ สามารถใช้เพื่อประเมินความสำคัญของกลไกต่างๆ ที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Willis et al. 2010; Kosak et al. 2005; Vamosi and Vamosi 2007)

แมลงริ้นดำเป็นแมลงขนาดเล็กในอันดับ Diptera วงศ์ Simuliidae ทั่วโลกมีรายงานการพบ 2,177 สปีชีส์ (Adler and Crosskey 2015) แมลงริ้นดำเป็นแมลงพาหะที่มีความสำคัญ โดยมากกว่า 2,000 สปีชีส์ดูดเลือดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก รวมถึงมนุษย์ จากจำนวนสปีชีส์ของแมลงริ้นดำที่มีรายงานการพบทั่วโลก ประมาณร้อยละ 1.5 เป็นพาหะของโรคในมนุษย์ (Adler et al. 2010) โรคที่มีความสำคัญมากที่สุดที่มีแมลงริ้นดำเป็นพาหะ คือ โรค human onchocerciasis หรือ river blindness ซึ่งเกิดจากพยาธิ *Onchocerca volvulus* ซึ่งมีแมลงริ้นดำบางสปีชีส์เป็นพาหะ โดยคาดการณ์ว่ามีคนประมาณ 40 ล้านคนติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในแอฟริกา และอเมริกาใต้ ในจำนวนนี้ประมาณ 250,000 คน ตาบอด ซึ่งเป็นอาการที่รุนแรงที่สุดจากการติดเชื้อ *Onchocerca volvulus* (Adler et al. 2010) นอกเหนือจากการเป็นพาหะของโรคในมนุษย์ การกัดของแมลงริ้นดำยังส่งผลเชิงลบต่อปศุสัตว์ โดยการกัดของแมลงริ้นดำทำให้ผลผลิตนมในวัวนมรวมถึงอัตราการเจริญเติบโตลดลง (Kettle 1990; Adler et al. 2004) แมลงริ้นดำบางสปีชีส์ยังเป็นพาหะของ abovirus ที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ (Kettle 1990; Mead et al. 1999) ในประเทศไทย

ยังไม่มีรายงานการนำโรคในมนุษย์หรือสัตว์ที่มีแมลงรึ้นดำเป็นพาหะ แต่มีรายงานการพบพยาธิ *Onchocera* sp. ในแมลงรึ้นดำ 3 สปีชีส์ ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ *Simulium nodosum*, *S. nigrogilvum* และ *S. asakoe*) (Takaoka et al. 2003; Fukuda et al. 2003)

นอกเหนือจากบทบาทของการเป็นพาหะของโรค แมลงรึ้นดำยังมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ เนื่องจากระยะตัวอ่อนของแมลงรึ้นดำซึ่งอาศัยในแหล่งน้ำไหล มักพบเป็นจำนวนมากและเป็นองค์ประกอบหลักของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ (macroinvertebrate) ในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหล (Cummins 1987) การศึกษานิเวศวิทยาของแมลงรึ้นดำแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางกายภาพของแหล่งอาศัยมีบทบาทสำคัญต่อการกระจายทางภูมิศาสตร์และโครงสร้างสังคม ปัจจัยที่พบว่ามีผลสำคัญที่สุด ได้แก่ ขนาดของลำธารและความเร็วของกระแสน้ำ (Hamada and McCreadie 1999; Hamada et al. 2002; Scheder and Waringer 2002; McCreadie et al. 2004; Illéšová et al. 2008; Pramual and Kuvangkadilok 2009) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของสภาพนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยตามฤดูกาล ยังส่งผลกระทบต่อโครงสร้างสังคมของแมลงรึ้นดำเช่นกัน (Pramual and Wongpakam 2010) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาที่บูรณาการข้อมูลสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับข้อมูลนิเวศวิทยา เพื่อเปรียบเทียบความสำคัญของกลไกหรือปัจจัย ที่มีผลกระทบต่อโครงสร้างสังคมของแมลงรึ้นดำ

ในประเทศไทยมีรายงานการพบแมลงรึ้นดำ 92 สปีชีส์ (Adler and Crosskey 2015) จำแนกอยู่ใน 6 สกุลย่อย ของสกุล *Simulium* แมลงรึ้นดำในประเทศไทยมีการศึกษาในด้านต่างๆ ได้แก่ นิเวศวิทยา (Kuvangkadilok et al. 1999a; Pramual and Kuvangkadilok 2009; Pramual and Wongpakam 2010) ชีวเคมี (Thanwisai et al. 2006; Phayahasena et al. 2010; Pramual et al. 2011a, 2012; Pramual and Nanork 2012) เชลล์พันธุศาสตร์ (Kuvangkadilok et al. 1999b, c, 2008; Phasuk et al. 2005; Tangkawanit et al. 2009; Jitklang et al. 2008; Pramual et al. 2008; Pramual and Wongpakam 2011) และพันธุศาสตร์เชิงประชากร (Pramual et al. 2005, 2011b; Pramual and Kuvangkadilok 2012) ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาเหล่านี้เป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงรึ้นดำกับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย และ เพื่อศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำในประเทศไทย ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะช่วยส่งเสริมความเข้าใจด้านนิเวศวิทยาเชิงวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำ ซึ่งอาจช่วยในการหาแนวทางที่เหมาะสมในการควบคุมแมลงพาหะของโรค นอกจากนี้ผลจากการศึกษานี้จะทำให้เข้าใจบทบาทของแมลงรึ้นดำในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหลมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้สามารถทำนายผลลัพธ์จากปฏิสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการวางแผนบริหารจัดการทรัพยากรชีวภาพในอนาคต

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกชนิดแมลงรืนดำ

เก็บตัวอย่างแมลงรืนดำจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 171 แห่ง (ตารางที่ 1) เก็บตัวอย่างตัวอ่อนโดยใช้ปากคีบเล็กคีบตัวอ่อนที่เกาะตามก้อนหิน เศษวัตถุต่างๆรวมทั้งพืชและใบไม้ที่ลอยในน้ำไหล การศึกษาก่อนหน้าพบว่าการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการนี้จะทำให้ได้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของสปีชีส์ที่พบในแหล่งอาศัยได้ดี (McCreadie and Colbo 1991; McCreadie et al. 2004) วางตัวอ่อนในงานที่รองด้วยกระดาษทิชชูเพื่อซับน้ำให้แห้ง ดองใน Carnoy's fixative (3 ส่วน absolute ethanol: 1 ส่วน glacial acetic acid) นอกจากนี้ยังเก็บตัวดักแด้ที่เกาะบนใบและลำต้นของพืชน้ำและเศษวัสดุต่างๆ ด้วยสำหรับตัวดักแด้นั้นจะแยกแต่ละตัวใส่ในหลอดแก้วที่กั้นหลอดด้วยสำลีชุบน้ำให้ชื้นและปิดด้วยผ้าโปร่งบางเพื่อให้ตัวดักแด้ฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัยสำหรับการศึกษาสัณฐานวิทยาต่อไป จำแนกชนิดของแมลงรืนดำโดยใช้รูปวิธานของแมลงรืนดำในประเทศไทย รวมถึงคำอธิบายลักษณะของแมลงรืนดำในภูมิภาคเอเชีย (Takaoka and Suzuki 1984, Takaoka and Davies 1995; Takaoka and Choochote 2004) และใช้แบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทีนโครโมโซมสำหรับสปีชีส์ที่ไม่สามารถจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา (Phasuk et al. 2005; Jitklang et al. 2008; Tangkawanit et al. 2009a)

2.2 ปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย

ศึกษาปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยโดยวัดปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับการกระจายทางภูมิศาสตร์ของแมลงรืนดำ ได้แก่ ความสูงจากระดับน้ำทะเล (altitude) ความกว้าง ความลึก ของแหล่งน้ำ ความเร็วของกระแส น้ำ อัตราการไหล ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ (water conductivity) วัสดุพื้นลำธาร (streambed particles) การปกคลุมเรือนยอด (canopy cover) และประเภทของพืชริมลำธาร (riparian vegetation) (McCreadie and Colbo 1991; McCreadie and Adler 1998; Hamada and McCreadie 1999; McCreadie et al. 2004; Pramual and Kuvangkadilok 2009) ประเภทของวัสดุพื้นลำธารจำแนกเป็น 6 ประเภทตามขนาดตามวิธีการของ McCreadie et al. (2006) (ตารางที่ 2) ประเภทของพืชริมลำธารจำแนกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ไม่มีพืช (open) ไม้พุ่ม (brush) และไม้ใหญ่ (forest) ตามวิธีการของ McCreadie et al. (2006) (ตารางที่ 3) การปกคลุมของเรือนยอดแบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ไม่มีการปกคลุม (open) ปกคลุมบางส่วน (partial) และปกคลุมทั้งหมด (complete) ตามวิธีการของ McCreadie et al. (2006) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 รายละเอียดของสถานที่เก็บตัวอย่างของแมลงรึ้นดำในประเทศไทย

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
1	น้ำตกตาดม่าน อ.เชียงกลาง จ.น่าน	19° 17' 37"N/99° 05' 42"E	304	<i>S. sheilae</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. parahiyangum</i>
2	บ้านนาแว ต.ศิลาแดง อ.ปัว จ.น่าน	19° 10' 55"N/100° 59' 07"E	382	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. fenestratum</i>
3	บ้านน้ำตัน (1) ต.ภูคา อ.ภูคา จ.น่าน	19° 10' 55"N/100° 59' 07"E	1,142	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. chamlongi</i> , <i>S. fruticosum</i> , <i>S. doipuiense</i> , <i>S. asakoe</i>
4	บ้านน้ำตัน (1) ต.ภูคา อ.ภูคา จ.น่าน	19° 10' 55"N/100° 59' 07"E	1,142	<i>S. fruticosum</i> , <i>S. inthanonense</i>
5	บ้านร่องแง ต.วรนคร อ.ปัว จ.น่าน	19° 10' 31"N/100° 55' 49"E	283	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. nodosum</i>
6	บ้านพีเหนือ ต.บ้านพี อ.บ้านหลวง จ.น่าน	18° 54' 41"N/100° 27' 49"E	382	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. decuplum</i>
7	น้ำตกห้วยต้นฝิ่ง อ.เชียงม่วน จ.พะเยา	18° 55' 10"N/100° 12' 04"E	401	<i>S. chaliowae</i> , <i>S. weji</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. decuplum</i>
9	น้ำตกจำปาทอง อ.เมือง จ.พะเยา	19° 12' 35"N/99° 44' 03"E	404	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. phayaoense</i> , <i>S. pahagense</i>
10	หน่วยปฏิบัติการพัฒนาต้นน้ำแม่จอน ต.แม่จอน อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	19° 50' 29"N/99° 04' 26"E	951	<i>S. asakoe</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. doipuiense</i> <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. tani</i> ,
11	น้ำตกแม่ยะ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	18° 26' 23"N/98° 35' 53"E	587	<i>S. rudnicki</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. nakhonense</i>
12	กัวแม่ปาน อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่	18° 33' 19"N/98° 28' 56"E	2,188	<i>S. maeaiense</i> , <i>S. chomthongense</i> , <i>S. rufibasis</i>
13	น้ำตกสิริภูมิ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	18° 32' 47"N/98° 30' 56"E	1,332	<i>S. doipuiense</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. asakoe</i> <i>S. inthanonense</i> , <i>S. malayense</i>
14	โครงการหลวงดอยอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	18° 32' 35"N/98° 31' 04"E	1,318	<i>S. maeaiense</i> , <i>S. fruticosum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. feuerborni</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
15	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่	18° 53' 40"N/98° 51' 38"E	680	<i>S. asakoe</i> , <i>S. yuphae</i>
16	บ้านปางแฟน ต.ป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	19° 01' 06"N/99° 18' 13"E	618	<i>S. nigrogilvum</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
17	ด่านตรวจแม่โจ้ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงใหม่	19° 05' 10"N/99° 24' 33"E	826	<i>S. tani</i> , <i>S. decuplum</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. asakoe</i>
18	อนุสรณ์สถานภูพาน อ.ดงหลวง จ.มุกดาหาร	16° 45' 43"N/104° 07' 53"E	225	<i>S. siamense</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. aureohirtum</i>
19	บ้านสวนสวรรค์ ต.กกตูม อ.ดงหลวง จ.มุกดาหาร	16° 45' 33"N/104° 10' 50"E	269	<i>S. siamense</i> , <i>S. aureohirtum</i>
20	ต.กุดหว้า อ.ภูฉินารายณ์ จ. กาฬสินธุ์	16° 29' 58"N/104° 13' 34"E	235	<i>S. oblongum</i>
21	ภูผากูด (1) อ.หนองสูง จ.มุกดาหาร	16° 27' 38"N/104° 26' 26"E	204	<i>S. oblongum</i> , <i>S. trangense</i>
22	ภูผากูด (2) อ.หนองสูง จ.มุกดาหาร	16° 27' 49"N/104° 26' 07"E	206	<i>S. oblongum</i>
23	ทางเข้าน้ำตกตาดใหญ่ อ.ขานุมาน จ.อำนาจเจริญ	16° 05' 16"N/104° 56' 52"E	144	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. kuvangkadilokae</i>
24	น้ำตกตาดใหญ่ อ.ขานุมาน จ.อำนาจเจริญ	16° 04' 05"N/104° 57' 02"E	164	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. kuvangkadilokae</i>
25	บ้านผางาม อ.หนองหิน จ.เลย	17° 02' 38"N/101° 45' 19"E	676	<i>S. aureohirtum</i>
26	น้ำตกวังใหญ่ (1) อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ	14° 26' 38"N/104° 29' 40"E	219	<i>S. siamense</i> , <i>S. angulistylum</i>
27	น้ำตกวังใหญ่ (2) อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ	14° 26' 38"N/104° 29' 40"E	219	<i>S. siamense</i> , <i>S. aureohirtum</i>
28	น้ำตกผาหลวง จ.อุบลราชธานี	14° 26' 38"N/104° 29' 40"E	166	<i>S. siamense</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. chainarongi</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
29	ทางเข้าน้ำตกสร้อยสวรรค์ อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 22' 19"N/105° 27' 13"E	102	<i>S. siamense</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
30	ห้วยยาง อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 23' 46"N/105° 27' 26"E	89	<i>S. siamense</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
31	ห้วยมะปรางค์ อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 27' 58"N/105° 30' 28"E	139	<i>S. angulistylum</i> , <i>S. nakhonense</i>
32	ห้วยจักรขวอ อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 28' 31"N/105° 32' 44"E	190	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i>
33	ต.ห้วยไผ่ อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 24' 44"N/105° 28' 59"E	160	<i>S. chainarongi</i> , <i>S. angulistylum</i>
34	ห้วยหินแตก อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 16' 30"N/105° 29' 44"E	140	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. nakhonense</i>
35	ห้วยจันทร์ใหญ่ ต.โนนก่อ อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี	14° 58' 08"N/105° 29' 49"E	138	<i>S. siamense</i>
36	น้ำตกห้วยทรายใหญ่ อ.บุญทริก จ.อุบลราชธานี	14° 55' 10"N/105° 30' 27"E	218	<i>S. chainarongi</i> , <i>S. angulistylum</i>
37	น้ำตกห้วยหลวง อ.บุญทริก จ.อุบลราชธานี	14° 25' 38"N/105° 24' 25"E	240	<i>S. chainarongi</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. angulistylum</i>
38	น้ำตกแก่งลำดวน อ.น้ำยืน จ.อุบลราชธานี	14° 26' 08"N/105° 06' 36"E	179	<i>S. chainarongi</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. siamense</i> <i>S. angulistylum</i> ,
39	ซำกกไฟ ภูกระดึง จ.เลย			<i>S. asakoe</i>
40	น้ำตกวังกวาง (1) ภูกระดึง จ.เลย	16° 53' 29"N/101° 47' 04"E	1,267	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. baimaii</i> , <i>S. sheilae</i>
41	น้ำตกวังกวาง (2) ภูกระดึง จ.เลย	16° 53' 29"N/101° 47' 04"E	1,267	<i>S. fenestratum</i>
42	น้ำตกธารสวรรค์ ภูกระดึง จ.เลย	16° 53' 34"N/101° 46' 51"E	1,200	<i>S. baimaii</i>
43	น้ำตกถ้ำใหญ่ ภูกระดึง จ.เลย	16° 52' 54"N/101° 46' 42"E	1,200	<i>S. yuphae</i> , <i>S. baimaii</i>
44	น้ำตกเหวทราย อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ	16° 40' 40"N/101° 42' 01"E	465	<i>S. quinquestriatum</i>
45	น้ำตกสวนห้อม ต.ปวนพ้อ อ.หนองหิน จ.เลย	17° 02' 49"N/101° 45' 42"E	579	<i>S. weiji</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. asakoe</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
46	น้ำตกเพ็ญดิน ต.ปวนมู อ.หนองหิน จ.เลย	17° 03' 58"N/101° 44' 53"E	627	<i>S. weiji</i> , <i>S. fenestratum</i>
47	บ้านกกบก ต.หนองจิว อ.วังสะพุง จ.เลย	17° 28' 58"N/101° 34' 31"E	292	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. fenestratum</i> <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. asakoe</i>
48	บ้านห้วยลาก อ.ภูเรือ จ.เลย	17° 27' 02"N/101° 25' 08"E	747	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. asakoe</i>
49	น้ำตกปลาป่า อ.ภูเรือ จ.เลย	17° 23' 51"N/101° 22' 17"E	649	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. fenestratum</i>
50	น้ำตกสองคอน ต.ปลาป่า อ.ภูเรือ จ.เลย	17° 21' 13"N/101° 24' 24"E	743	<i>S. rudnicki</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S.</i> <i>fenestratum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. decuplum</i>
51	น้ำตกหินสามชั้น อ.ภูเรือ จ.เลย	17° 29' 59"N/101° 20' 09"E	1,156	<i>S. tani</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. doipuiense</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. yuphae</i> , <i>S. feuerborni</i> , <i>S. decuplum</i> , <i>S. bullatum</i>
52	น้ำตกเลิศพบ อ.ภูเรือ จ.เลย	17° 29' 19"N/101° 20' 13"E	1,152	<i>S. bullatum</i> , <i>S. decuplum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. yuphae</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. doipuiense</i>
54	บ้านห้วยตาด ต.บ้านห้วยตาด อ.ด่านซ้าย จ.เลย	17° 13' 44"N/101° 01' 34"E	473	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. siamense</i>
55	ห้วยศอก อ.ด่านซ้าย จ.เลย	17° 17' 40"N/101° 21' 24"E	458	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
56	แก่งสองคอน อ.ด่านซ้าย จ.เลย	17° 09' 06"N/101° 50' 31"E	384	<i>S. tani</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. decuplum</i>
57	บ้านนามาลา อ.นาแห้ว จ.เลย	17° 13' 44"N/101° 01' 34"E	492	<i>S. asakoe</i> , <i>S. trangense</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S.</i> <i>siamense</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. aureohirtum</i>
58	น้ำตกธารสวรรค์ อ.นาแห้ว จ.เลย	17° 29' 45"N/101° 03' 56"E	506	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. nodosum</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
59	น้ำตกครึ่ง อ.นาแห้ว จ.เลย	17° 28' 47"N/100° 58' 55"E	643	<i>S. rudnicki</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. siamense</i>
60	น้ำตกช้างตก อ.นาแห้ว จ.เลย	17° 28' 57"N/100° 58' 38"E	677	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. decuplum</i>
61	ห้วยทับคอสอด (1) อ.นาแห้ว จ.เลย	17° 30' 09"N/100° 56' 35"E	928	<i>S. fruticosum</i> , <i>S. decuplum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. inthanonense</i> , <i>S. yuphae</i>
62	ห้วยทับคอสอด (2) อ.นาแห้ว จ.เลย	17° 30' 09"N/100° 56' 35"E	928	<i>S. tani</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. dentistylum</i> , <i>S. decuplum</i> , <i>S. bullatum</i>
63	น้ำตกตาดเยื้อง อ.นาแห้ว จ.เลย	17° 33' 28"N/100° 59' 53"E	560	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. siamense</i>
64	เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	16° 48' 36"N/100° 57' 56"E	668	<i>S. asakoe</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i>
65	น้ำตกอ่างแก้ว อ.นครไทย จ.พิษณุโลก	16° 53' 13"N/100° 47' 56"E	337	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. asakoe</i>
66	คลองยาง อ.วังทอง จ.พิษณุโลก	16° 53' 07"N/100° 39' 55"E	170	<i>S. sp. (A)</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
67	บ้านห้วยจำผาง อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์	17° 47' 49"N/100° 06' 55"E	130	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. Chiangmaiense</i>
68	บ้านแม่แคม (1) ต.สวนเขื่อน อ.เมือง จ.แพร่	18° 08' 01"N/100° 15' 33"E	236	<i>S. burtoni</i> , <i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. parahiyangum</i>
69	บ้านแม่แคม (2) ต.สวนเขื่อน อ.เมือง จ.แพร่	18° 08' 01"N/100° 15' 33"E	236	<i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. fenestratum</i>
70	น้ำตกนาควา อ.เมือง จ.แพร่	18° 07' 09"N/100° 17' 59"E	556	<i>S. Chaliowae</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. weji</i>
71	ห้วยแม่คำมี ต.ไผ่โทน อ.ร้องกวาง จ.แพร่	18° 22' 58"N/100° 25' 50"E	263	<i>S. siamense</i> , <i>S. aureohirtum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. nakhonense</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
72	บ้านน้ำตัน ต.ภูคา อ.ปัว จ.น่าน	19° 11' 30"N/101° 04' 27"E	1,125	<i>S. curtatum</i> , <i>S. doipuiense</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. decuplum</i> , <i>S. chamlongi</i>
73	ทางเข้าน้ำตกต้นตอง ต.ภูคา อ.ปัว จ.น่าน	19° 12' 43"N/101° 04' 10"E	1,090	<i>S. fruticosum</i> , <i>S. aureohirtum</i>
74	น้ำตกต้นตอง ต.ภูคา อ.ปัว จ.น่าน	19° 12' 39"N/101° 04' 04"E	1,027	<i>S. triglobus</i> , <i>S. weji</i> , <i>S. chaliowae</i>
75	บ้านร่องแง อ.ปัว จ.น่าน	19° 10' 30"N/100° 55' 49"E	257	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. asakoe</i>
76	บ้านคันทา ต.พญาแก้ว อ.เขียงกลาง จ.น่าน	19° 16' 55"N/100° 53' 04"E	297	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. asakoe</i>
77	น้ำตกห้วยต้นผึ้ง อ.เขียงม่วน จ.พะเยา	18° 55' 09"N/100° 12' 03"E	361	<i>S. chaliowae</i> , <i>S. lampangense</i> , <i>S. asakoe</i> <i>S. fenestratum</i> , <i>S. weji</i> , <i>S. decuplum</i> ,
78	บ้านห้วยม่วง ต.หนองหล่ม อ.ดอกคำใต้ จ.พะเยา	18° 56' 57"N/100° 04' 37"E	582	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. angulistylum</i>
79	น้ำตกธารทอง อ.วังเหนือ จ.ลำปาง	19° 04' 11"N/99° 43' 45"E	607	<i>S. weji</i> , <i>S. fenestratum</i>
80	บ้านปางแพน ต.ป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	19° 00' 59"N/99° 18' 11"E	615	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. chamlongi</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. burtoni</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. nigrogilvum</i>
81	น้ำตกสิริภูมิ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	18° 32' 48"N/98° 30' 56"E	1,304	<i>S. doipuiense</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. chamlongi</i> , <i>S. asakoe</i>
82	โครงการหลวงดอยอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	18° 32' 36"N/98° 31' 03"E	1,330	<i>S. fruticosum</i> , <i>S. inthanonense</i>
83	น้ำตกแม่กลาง อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	18° 29' 56"N/98° 40' 13"E	259	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. nigrogilvum</i> , <i>S. siripoomense</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. asakoe</i>
84	ห้วยแม่แคม ต.ปอเหล็กลอง อ.ลอง จ.แพร่	18° 00' 53"N/99° 42' 55"E	156	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. asakoe</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
85	คลองห้วยเหิน จ.พิษณุโลก	17° 15' 27"N/100° 34' 01"E	213	<i>S. aureohirtum</i>
86	น้ำตกชาติตระการ อ.นครไทย จ.พิษณุโลก	17° 07' 56"N/100° 40' 52"E	194	<i>S. quinquestratum</i> , <i>S. nakhonense</i>
87	คลองน้ำไช บ้านห้วยทราย ต.บ้านพร้าว จ.พิษณุโลก	17° 09' 17"N/100° 42' 54"E	180	<i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. Chiangmaiense</i>
88	คลองซำร้อง ต.บ้านแยง อ.นครไทย จ.พิษณุโลก	17° 03' 45"N/100° 48' 35"E	214	<i>S. siamense</i> , <i>S. kuvangkadilokae</i> , <i>S. quinquestratum</i>
89	ห้วยกุดแช่ อ.ห้วยผึ้ง จ.กาฬสินธุ์	16° 39' 43"N/103° 49' 47"E	169	<i>S. aureohirtum</i>
90	น้ำตกคำเตย ต.บ่อแก้ว อ.นาคู จ.กาฬสินธุ์	16° 48' 49"N/103° 53' 32"E	290	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i>
91	ห้วยกระแต ต.กกตูม อ.ดงหลวง จ.กาฬสินธุ์	16° 49' 40"N/104° 08' 30"E	238	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i>
92	บ้านกวนบูน (1) ต.จันทร์เพ็ญ อ.เต่างอย จ.สกลนคร	16° 53' 44"N/104° 10' 56"E	212	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i>
93	บ้านกวนบูน (2) ต.จันทร์เพ็ญ อ.เต่างอย จ.สกลนคร	16° 54' 18"N/104° 10' 56"E	293	<i>S. aureohirtum</i>
94	ห้วยน้ำใส ต.จันทร์เพ็ญ อ.เต่างอย จ.สกลนคร	16° 54' 59"N/104° 11' 11"E	339	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. asakoeae</i> , <i>S. siamense</i>
95	บ้านกวนบูน (2) ต.จันทร์เพ็ญ อ.เต่างอย จ.สกลนคร	16° 59' 06"N/104° 10' 49"E	269	<i>S. asakoeae</i> , <i>S. gombakense</i>
96	บ้านสวนสวรรค์ ต.กกตูม อ.ดงหลวง จ.มุกดาหาร	16° 45' 33"N/104° 10' 04"E	250	<i>S. quinquestratum</i> , <i>S. aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i>
97	ทางเข้าวัดถ้ำผาหยาด ต.กกตูม อ.ดงหลวง จ.มุกดาหาร	16° 45' 43"N/104° 10' 06"E	274	<i>S. siamense</i> , <i>S. aureohirtum</i>
98	บ้านสำโรงเกียรติ อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ	14° 29' 41"N/104° 31' 35"E	194	<i>S. siamense</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. aureohirtum</i>
99	น้ำตกวังใหญ่ อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ	14° 26' 38"N/104° 29' 40"E	219	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. quinquestratum</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
100	น้ำตกอ่างแก้ว อ.วังทอง จ.พิษณุโลก	16° 53' 11"N/100° 47' 57"E	196	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
101	น้ำตกปอย อ.วังทอง จ.พิษณุโลก	16° 50' 42"N/100° 45' 02"E	210	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. siamense</i>
102	กม.16 ถนนตาก – แม่สอด อ.เมือง จ.ตาก	16° 48' 34"N/98° 59' 14"E	303	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. sheilae</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. parahiyangum</i>
103	บ้านหนองแถม อ.เมือง จ.ตาก	16° 49' 09"N/99° 04' 09"E	151	<i>S. siamense</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. aureohirtum</i>
104	น้ำตกคลองวังเจ้า (1) จ.กำแพงเพชร	16° 30' 16"N/99° 09' 35"E	236	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. chiangmaiense</i> , <i>S. sheilae</i>
105	น้ำตกคลองวังเจ้า (2) จ.กำแพงเพชร	16° 30' 15"N/99° 10' 03"E	204	<i>S. chiangmaiense</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. burtoni</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. decuplum</i>
106	บ้านคลองน้ำไหล ต.คลองน้ำไหล อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร	16° 12' 32"N/99° 20' 04"E	121	<i>S. aureohirtum</i>
107	ช่องเย็น อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	16° 05' 53"N/99° 06' 24"E	1,276	<i>S. laoleense</i> , <i>S. feuerborni</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. yuphae</i>
108	ทางขึ้นช่องเย็น อช.แม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	16° 05' 32"N/99° 06' 50"E	1,201	<i>S. laoleense</i> , <i>S. fruticosum</i> , <i>S. inthanonense</i> , <i>S. gombakense</i>
109	คลองขลุง ต.ปางไว อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร	16° 03' 43"N/99° 18' 53"E	118	<i>S. chiangmaiense</i> , <i>S. siamense</i>
110	ห้วยองธิ ต.ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	14° 42' 15"N/98° 40' 02"E	70	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. siamense</i>
111	บ้านห้วยเขย่ง ต.ห้วยเขย่ง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	14° 35' 05"N/98° 35' 28"E	237	<i>S. siamense</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. weji</i> , <i>S. parahiyangum</i>
112	บ้านห้วยเขย่ง (2) ต.ห้วยเขย่ง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	14° 37' 00"N/98° 34' 38"E	201	<i>S. siamense</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. aureohirtum</i> , <i>S. nakhonense</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
113	น้ำตกเกริงกระเวีย อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	14° 58' 52"N/98° 37' 54"E	265	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. weji</i>
114	น้ำตกไถช่องถ้อง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	14° 58' 51"N/98° 37' 34"E	200	<i>S. angulistylum</i> , <i>S. chaliowae</i> , <i>S. weji</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
115	ห้วยอุล่อง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	14° 49' 59"N/98° 39' 53"E	172	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i>
116	ห้วยลิ้นถิ่น อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	14° 32' 44"N/98° 47' 13"E	69	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. siamense</i>
117	บ้านโป่งช้าง ต.หนองปรือ อ.หนองปรือ จ.กาญจนบุรี	14° 39' 55"N/99° 21' 09"E	213	<i>S. siamense</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. tani</i>
118	บ้านทุ่งลำไย ต.ป่าโจด อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี	14° 40' 01"N/99° 19' 06"E	231	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. siamense</i>
119	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ อ.ปะคำ จ.บุรีรัมย์	14° 17' 43"N/99° 19' 06"E	231	<i>S. aureohirtum</i>
120	คลองวังใหม่ อ.วังสมบูรณ์ จ.สระแก้ว	13° 20' 01"N/102° 12' 02"E	110	<i>S. aureohirtum</i>
121	น้ำตกเขาสอยดาว อ.เขาสอยดาว จ.จันทบุรี	13° 06' 18"N/102° 11' 38"E	316	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i>
122	คลองทุ่งกร่าง อ.สอยดาว จ.จันทบุรี	13° 01' 43"N/102° 16' 08"E	229	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. aureohirtum</i>
123	บ้านทับนคร อ.มะขาม จ.จันทบุรี	12° 45' 59"N/102° 14' 41"E	24	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
124	น้ำตกคลองนารายณ์ จ.จันทบุรี	12° 34' 58"N/102° 10' 28"E	43	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. burtoni</i>
125	น้ำตกพลั่ว จ.จันทบุรี	12° 31' 40"N/102° 10' 40"E	46	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. burtoni</i>
126	คลองอ่างหงษ์ อ.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี	12° 31' 17"N/102° 10' 21"E	16	<i>S. aureohirtum</i>
127	น้ำตกคลองแก้ว อ.บ่อไร่ จ.ตราด	12° 37' 11"N/102° 34' 41"E	65	<i>S. angulistylum</i> , <i>S. aureohirtum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. burtoni</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. parahiyangum</i>
128	อุทยานแห่งชาติคลองแก้ว อ.บ่อไร่ จ.ตราด	12° 37' 11"N/102° 34' 41"E	65	<i>S. aureohirtum</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
129	บ้านสวนห้อม อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	14° 21' 07"N/101° 52' 27"E	407	<i>S. aureohirtum</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
130	บ้านสวนห้อม (2) อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	14° 20' 58"N/101° 52' 52"E	406	<i>S. siamense</i>
131	น้ำตกห้วยจันทร์ อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ	14° 31' 48"N/104° 21' 32"E	116	<i>S. siamense</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
132	น้ำตกวังใหญ่ อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ	14° 26' 38"N/104° 29' 40"E	219	<i>S. chainarongi</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. siamense</i>
133	บ้านสวนสน ต.คำเขื่อน อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี	15° 12' 56"N/105° 27' 46"E	114	<i>S. siamense</i> , <i>S. quinquestriatum</i>
134	ทอแสงโขงเจียมรีสอร์ท อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 18' 41"N/105° 29' 33"E	115	<i>S. oblongum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. aureohirtum</i>
135	น้ำตกสร้อยสวรรค์ จ.อุบลราชธานี	15° 27' 45"N/105° 34' 21"E	122	<i>S. angulistylum</i> , <i>S. siamense</i>
136	บ้านทุ่งนาเมือง อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 27' 44"N/105° 30' 35"E	114	<i>S. siamense</i> , <i>S. aureohirtum</i>
137	น้ำตกแสงจันทร์ อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	15° 31' 58"N/105° 35' 43"E	150	<i>S. siamense</i>
138	น้ำตกตาตขาม อ.บ้านแพง จ.นครพนม	17° 58' 08"N/104° 09' 34"E	122	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. siamense</i>
139	น้ำตกตาตโพธิ์ อ.บ้านแพง จ.นครพนม	17° 58' 29"N/104° 11' 10"E	122	<i>S. quinquestriatum</i>
140	น้ำตกถ้ำฝุ่น อ.บึงคล้า จ.บึงกาฬ	18° 15' 51"N/103° 54' 21"E	155	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. aureohirtum</i> , <i>S. asakoe</i>
141	น้ำตกชะแนน อ.เซกา จ.บึงกาฬ	18° 13' 14"N/103° 53' 07"E	163	<i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. trangense</i>
142	น้ำตกเจ็ดสี อ.เซกา จ.บึงกาฬ	18° 09' 36"N/103° 59' 59"E	169	<i>S. quinquestriatum</i>
143	น้ำตกถ้ำพระ อ.เซกา จ.บึงกาฬ	18° 07' 40"N/103° 59' 40"E	173	<i>S. quinquestriatum</i>
144	น้ำตกนางริน อ.หนองแสง จ.อุดรธานี	17° 03' 59"N/102° 44' 06"E	276	<i>S. siamense</i>
145	น้ำตกธาราม อ.หนองแสง จ.อุดรธานี	17° 09' 11"N/102° 44' 00"E	278	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. quinquestriatum</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
146	น้ำตกคอยนาง อ.หนองแสง จ.อุดรธานี	17° 07' 14"N/102° 43' 30"E	416	<i>S. angulistylum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. fenestratum</i>
147	น้ำตกชะโนด อ.น้ำโสม จ.อุดรธานี	17° 48' 56"N/102° 15' 22"E	220	<i>S. quinquestriatum</i>
148	น้ำตกธารทอง อ.สังคม จ.หนองคาย	18° 01' 40"N/102° 21' 54"E	187	<i>S. parahiyangum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. angulistylum</i>
149	น้ำตกธารทิพย์ อ.สังคม จ.หนองคาย	18° 07' 27"N/102° 11' 08"E	217	<i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. fenestratum</i>
150	น้ำตกยุงทอง จ.อุดรธานี	17° 55' 25"N/102° 15' 22"E	266	<i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i>
151	น้ำตกแม่กลาง (1) อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	18° 29' 39"N/98° 40' 07"E	304	<i>S. asakoe</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. siripoomense</i> , <i>S. nigrogilvum</i>
152	น้ำตกแม่กลาง (2) อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	18° 29' 39"N/98° 40' 07"E	304	<i>S. asakoe</i>
153	ห้วยแม่ลอน อ.ฮอด จ.เชียงใหม่	18° 13' 00"N/98° 26' 43"E	372	<i>S. siamense</i> , <i>S. asakoe</i>
154	ห้วยแม่อมลอง อ.ฮอด จ.เชียงใหม่	18° 09' 22"N/98° 13' 06"E	852	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. tani</i> , <i>S. chamlongi</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. siamense</i>
155	ลำห้วย ต.แม่โถ อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน	18° 09' 46"N/98° 03' 19"E	890	<i>S. feuerborni</i> , <i>S. inthanonense</i>
156	ลำห้วย อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน	18° 08' 33"N/97° 58' 35"E	203	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. asakoe</i>
157	สะพานแม่ลาน้อย อ.แม่ลาน้อย จ.แม่ฮ่องสอน	18° 22' 41"N/97° 56' 32"E	270	<i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. sheilae</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. nodosum</i>
158	บ้านหนองแห้ง ต.เมืองปอน อ.ขุนยวม จ.แม่ฮ่องสอน	18° 38' 39"N/97° 56' 29"E	471	<i>S. siamense</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. decuplum</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
159	สะพานปางสัก อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน	19° 29' 45"N/96° 03' 21"E	495	<i>S. parahiyangum</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. angulistylum</i>
160	บ้านแม่สุยะ ต.ห้วยผา อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน	19° 31' 17"N/98° 05' 32"E	379	<i>S. siamense</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. tani</i> complex, <i>S. fenestratum</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. asakoe</i>
161	บ้านสบป่อง อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน	19° 30' 37"N/98° 15' 46"E	610	<i>S. Chiangmaiense</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. tani</i> complex, <i>S. quinquestratum</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. fenestratum</i>
162	บ้านปางแพก (1) อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน	19° 26' 14"N/98° 21' 16"	787	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. quinquestratum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. Chamlongi</i> , <i>S. tani</i> complex
163	บ้านปางแพก (2) อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน	19° 26' 12"N/98° 21' 17"	849	<i>S. asakoe</i> , <i>S. fenestratum</i> , <i>S. inthanonense</i> , <i>S. angulistylum</i> , <i>S. feuerborni</i> , <i>S. yuphae</i> , <i>S. gombakense</i>
164	ลำห้วย ต.นาเต็ง อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน	19° 25' 13"N/98° 24' 13"	548	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. nodosum</i> , <i>S. tani</i> complex, <i>S. nigrogilvum</i>
165	ลำห้วย ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	19° 07' 35"N/98° 45' 14"	703	<i>S. fenestratum</i> , <i>S. asakoe</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. dentistylum</i> , <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. tani</i> complex
166	น้ำตกหมอกฟ้า อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	19° 06' 47"N/98° 45' 14"	705	<i>S. tani</i> complex, <i>S. parahiyangum</i> , <i>S. siamense</i> , <i>S. asakoe</i>

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	สปีชีส์ที่พบ
167	บ้านแม่เมะ ต.แม่แรม อ.แม่วัง จ.เชียงใหม่	18° 54' 00"N/98° 52' 37"	504	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. quinquestriatum</i> , <i>S. tani</i> complex
168	บ้านโด้งหลวง ต.แม่แรม อ.แม่วัง จ.เชียงใหม่	18° 54' 02"N/98° 52' 55"	508	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. nodosum</i>
169	น้ำตกกะเปาะ อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	10° 44' 40"N/99° 12' 39"	NA	<i>S. nobile</i>
170	น้ำตกเคียงคู่อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	NA	NA	<i>S. nakhonense</i> , <i>S. trangense</i>
171	น้ำตกไพรสวรรค์ อ.นาโยง จ.ตรัง	07° 21' 44"N/99° 57' 41"	NA	<i>S. trangense</i> , <i>S. nakhonense</i> , <i>S. parahiyangum</i>

ตารางที่ 2 การจำแนกประเภทของวัสดุพื้นลำธาร (streambed particles) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธีการของ McCreadie et al. (2006)

ประเภทของวัสดุพื้นลำธาร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (mm)	Ranking
Mud/Silt	<1	1
Sand	1-2	2
Small stone	2-32	3
Rubble	32-256	4
Boulder	>256	5
Bedrock	-	6

ตารางที่ 3 การจัดจำแนกประเภทของพืชริมน้ำ (riparian vegetation) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธีการของ McCreadie et al. (2006)

ประเภทของพืชริมน้ำ	ลักษณะของพืช	Ranking
Open	ทุ่งหญ้า	1
Brush	ไม้พุ่มขนาดเล็ก อาจมีต้นไม้ใหญ่แต่ไม่มาก	2
Forest	ป่าไม้ ต้นไม้ขนาดใหญ่	3

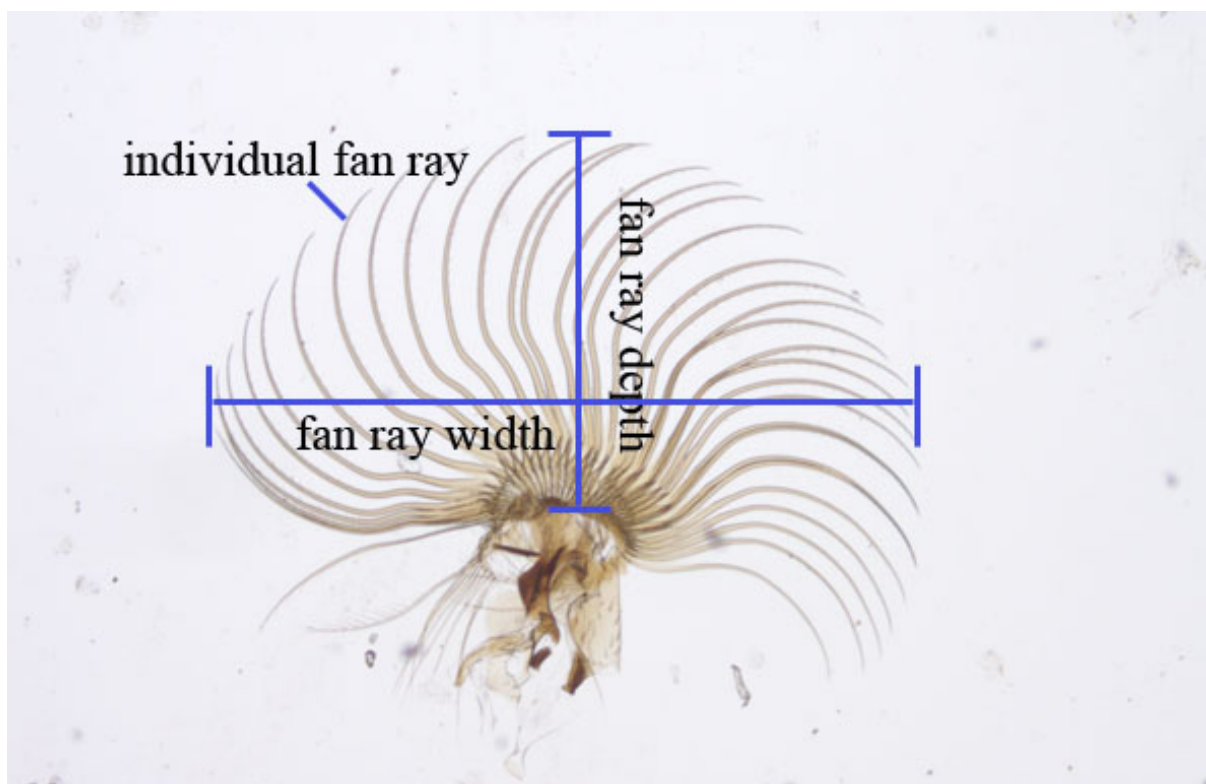
ตารางที่ 4 การจัดจำแนกประเภทของการปกคลุมของเรือนยอด (canopy cover) เพื่อการวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธีการของ McCreadie et al. (2006)

ประเภท	ระดับการปกคลุม	Ranking
Open	น้อยกว่าร้อยละ 10	1
Partial	ร้อยละ 10 – ร้อยละ 90	2
Complete	มากกว่าร้อยละ 90	3

2.3 การวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงริ้นดำ

การศึกษารั้วนี้เลือกวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงริ้นดำโดยเลือกลักษณะของ labral fan ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญของระยะตัวอ่อนที่ใช้ในการกรองอาหาร การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า labral fan มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย (Zhang and Malmqvist 1996; Palmer and Craig 2000) ดังนั้น labral fan จึงมีบทบาทสำคัญที่กำหนดการกระจายทางภูมิศาสตร์ของแมลงริ้นดำ (Palmer and Craig 2000) ใช้ตัวอ่อนระยะสุดท้าย (last instar larva) เพื่อวัดลักษณะของ labral fan 3 ลักษณะ (ภาพที่ 1) ได้แก่ ความกว้างของ fan ray ความยาวของ fan ray และจำนวน fan ray ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ micrometer เนื่องจากลักษณะของ labral fan มีความแปรผันภายในสปีชีส์ (Lucas and Hunter 1999; Adler et al. 2004) ดังนั้นในการวัดลักษณะความแปรผันของ labral fan จึงวัดจากตัวอย่างที่เก็บจากหลายประชากร แต่ละสปีชีส์วัดลักษณะของ labral fan อย่างน้อย 30 ตัวอย่าง ยกเว้น *Simulium siripoomense* และ *S. malayense* ที่มีตัวอย่างเพียง 5 และ 10 ตัว ตามลำดับ เพื่อทดสอบว่า

จำนวนตัวอย่าง 30 ตัวอย่างที่วัดเพียงพอที่เป็นตัวแทนของความแปรผันภายในสปีชีส์หรือไม่ จึงทำการทดสอบความแตกต่างของลักษณะ labral fan ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง กับกลุ่มตัวอย่างที่มากกว่าภายในสปีชีส์เดียวกัน ผลการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง หรือมากกว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญบ่งชี้ว่าการเพิ่มตัวอย่างต่อสปีชีส์มากขึ้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงผลของความแปรผันของลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงวันดำที่ศึกษา และบ่งชี้ว่าตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เพียงพอต่อการศึกษาความแปรผันของลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงวันดำ



ภาพที่ 1 การวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan ของตัวอ่อนแมลงวันดำ

2.4 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์

ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงวันดำจากตัวอ่อนระยะรองสุดท้าย (penultimate-instar larva) โดยตัดส่วนท้อง (abdomen) เพื่อนำไปศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ขณะที่ส่วนหัว (anterior) เก็บรักษาใน 80% ethanol ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาอนุพันธุศาสตร์ การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์โดยการเตรียมโพลีทีนโครโมโซมจากต่อมน้ำลาย (salivary glands) ที่พบอยู่บริเวณช่องท้อง เตรียมโพลีทีนโครโมโซมโดยการย้อมสี Feulgen ตามวิธีการของ Rothfels and Dunbar (1953) ฝ่าเปิดช่องท้องตามแนวยาว จากนั้นแช่ตัวอย่างในน้ำกลั่น 20 นาที ก่อนที่จะนำไปต้มใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 – 15 นาที ย้ายตัวอย่างลงแช่ในสี Feulgen ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างตัวอย่างด้วย sulfur water และน้ำเย็น เตรียมสไลด์โครโมโซมโดยแยกเซลล์จากต่อมน้ำลายที่มีโพลีทีนโครโมโซมจากตัวอย่างลงบนสไลด์ที่มี 50% acetic acid จากนั้นกดสไลด์เพื่อให้โครโมโซมกระจาย ตรวจสอบโครโมโซมโดยการเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของ

แบนด์โพลีทีนโครโมโซมกับแผนที่มาตรฐานของโครโมโซมที่มีรายงาน (Pramual et al. 2008; Tangkawanit et al. 2009a; Pramual and Wongpakam 2013)

2.5 การศึกษาอนุพันธุศาสตร์

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างของแมลงวันดำตามวิธีการของ Collins et al. (1987) หรือใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้แนวทางการจัดการตัวอย่างที่เก็บรักษาใน Carnoy's fixative ตามกระบวนการของ Pramual et al. (2005) และ Pramual et al. (2011a) ตัวอย่างดีเอ็นเอใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR (polymerase Chain Reaction) ในส่วนของยีน cytochrome c oxidase subunit I, II (COI, COII) และ 18S/ITS1 โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน COI คือ LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') และ HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994) ไพรเมอร์สำหรับยีน COII คือ TL2-J-3034 (5'-ATTATGGCAGAT TAGTGCA-3') และ TK-N-3785 (5'-GTTTAAGAGACCAGTAC TTG-3') และไพรเมอร์สำหรับยีน 18S/ITS1 ได้แก่ 18s/sd5' (5'-TGGTGTCATGGCCG TTCTTAG-3') และ 5.8s/sd3' (5'-GTCGATGTTTCATGTGTCCTGC-3') (Simon et al. 1994) โดยโปรแกรมอุณหภูมิสำหรับยีน COI ประกอบด้วย 94° C 3 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ 94° C 30 วินาที 45° C 1 นาที 72° C 1 นาที และ 72° C 7 นาที โปรแกรมอุณหภูมิของยีน COII ตามวิธีการของ Conflitti et al. (2010) ประกอบด้วย 94° C 2 นาที 49° C 45 วินาที 72° C 45 วินาที ตามด้วย 36 รอบของ 94° C 30 วินาที 49° C 45 วินาที 72° C 45 วินาที และ 72° C 7 นาที โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับยีน 18S/ITS1 ประกอบด้วย ประกอบด้วย 94° C 2 นาที 60° C 45 วินาที 72° C 45 วินาที ตามด้วย 36 รอบของ 94° C 30 วินาที 60° C 45 วินาที 72° C 45 วินาที และ 72° C 7 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ HighYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC BioScience, Taiwan) จากนั้นส่งผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการของ MacroGen DNA Sequencing Service ประเทศเกาหลีใต้

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.6.1 การวิเคราะห์ DNA barcode สำหรับการระบุสปีชีส์

ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในการระบุชนิดของแมลงวันดำ โดยใช้เทคนิค DNA barcode วิเคราะห์การระบุชนิดโดยใช้วิธีการ best match และ best close match ด้วยโปรแกรม TaxonDNA (Meier et al. 2006)

2.6.2 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม โครงสร้างทางพันธุกรรม และประวัติศาสตร์ของประชากร

วิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์โดยใช้ค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (haplotype diversity) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) โดยใช้โปรแกรม Arlequin ver. 3.5 (Excoffier and Lischer 2010) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ โดยใช้วิธีการ median-joining network (Bandelt et al. 1999) ด้วยโปรแกรม NETWORK ver. 4.6.1.0 (www.fluxus-engineering.com)

วิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรโดยใช้ค่า F_{ST} ด้วยโปรแกรม Arlequin ver. 3.5 ทดสอบค่าทางสถิติของค่า F_{ST} ด้วยวิธีการ permutation จำนวน 1,023 ซ้ำ ใช้ Sequential Bonferroni correction (Rice 1989) สำหรับการประเมินค่านี้สำคัญสำหรับการเปรียบเทียบหลายค่า วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมจากค่า F_{ST} กับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ของประชากรโดยใช้ Mantel test (Mantel 1967) ด้วยการทดสอบ Isolation by distance โดยใช้โปรแกรม IBD ver. 1.52 (Bohonak 2002) ทดสอบค่าทางสถิติด้วย 1,000 permutations ใช้โปรแกรม SAMOVA ver. 1.0 (Dupanloup et al. 2002) สำหรับการทดสอบหาจำนวนกลุ่มโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรโดยใช้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยจำนวนกลุ่ม (k) ที่เป็นไปได้มากที่สุดคือกลุ่มที่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (F_{CT}) สูงที่สุด และมีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม (F_{SC}) น้อยที่สุด โดยทำการวิเคราะห์ด้วยการกำหนดค่า k ระหว่าง 1 - 10

วิเคราะห์ประวัติศาสตร์ของประชากรโดยการวิเคราะห์ mismatch distribution ประชากรของสิ่งมีชีวิตที่มีการเปลี่ยนแปลงขยายขนาดอย่างรวดเร็วในอดีต (population expansion) จะมีลักษณะกราฟของ mismatch distribution เป็นแบบ unimodal (Rogers and Harpending 1992) ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าจากข้อมูลจริง (observed) และค่าจากการจำลองแบบประชากร (simulation) ภายใต้เงื่อนไขของการขยายขนาดของประชากรอย่างรวดเร็วโดยใช้ค่า sum-of-square deviation (SSD) และค่า Harpending's raggedness index (Harpending 1994) โดยใช้โปรแกรม Arlequin ver. 3.5 ถ้าประชากรแสดงลักษณะการขยายขนาดอย่างรวดเร็วในอดีตจะทำการคำนวณหาช่วงเวลาของการขยายขนาดประชากรอย่างรวดเร็วโดยใช้สมการ $\tau = 2ut$ เมื่อ $u = m_T u$ โดย m_T หมายถึงความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษา u คือ อัตราการกลายต่อนิวคลีโอไทด์ และ t คือ generation time (Rogers and Harpending 1992) โดยกำหนดให้อัตราการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันด้าเป็นอัตราเดียวกับในแมลงอันดับ Diptera คือ 2.3% ต่อ 1 ล้านปี (Brower 1994) และ generation time ของแมลงวันด้าคือ 12 ชั่วโมง ต่อ 1 ปี (Pramual et al. 2005) วิเคราะห์อัตราการเกยยีนโฟลว (gene flow) ระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม MIGRATE-N ver. 3.2.6 (Beerli and Palczewski 2010) โดยกำหนดค่าเริ่มต้นสำหรับการวิเคราะห์ด้วยค่า F_{ST} ระหว่างประชากร การตั้งค่าการวิเคราะห์ประกอบโดยใช้ 10 short chains 5,000 steps ในแต่ละ chain และ 2 long chains ซึ่งประกอบด้วย 500,000 steps ในแต่ละ chain

2.6.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันด้าโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI, COII และ 18S/ITS1 ด้วยวิธีการ maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), และ Bayesian analysis (BA) การวิเคราะห์ด้วยวิธี MP โดยใช้โปรแกรม PAUP* (Swofford 2002) โดยตั้งค่า heuristic search ใช้ 1,000 random addition replicates, TBR branch swapping, MulTree effect คำนวณค่า bootstrap โดยใช้ 1,000 ซ้ำ วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี ML โดยใช้โปรแกรม PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) คำนวณค่าการสนับสนุน node โดยใช้วิธีการ approximate likelihood-ratio test (Anisimova and Gascuel 2006; Guindon et al. 2010) เลือกรูปแบบการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการวิเคราะห์ maximum likelihood ด้วยโปรแกรม jModeltest v.0.1.0 (Posada 2008) โดยใช้ Akaike Information criterion (AIC) การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Bayesian analysis ใช้โปรแกรม MrBayes 3.04b (Huelsenbeck and Ronquist 2001) โดย run

โปรแกรม 2,000,000 generations และเก็บ tree ทุก generation ที่ 100 ใช้โปรแกรม Tracer v.1.5 (Rambaut and Drummond 2007) ในการวิเคราะห์ช่วงที่ค่า log likelihood คงที่ tree ที่เก็บก่อนหน้าช่วงนี้จะไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ค่า posterior probability

2.6.4 การวิเคราะห์โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำในประเทศไทย

วิเคราะห์โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic community structure) ของแมลงรึ้นดำในประเทศไทยโดยใช้แนวทางการวิเคราะห์ตาม Cavender-Bares et al. (2004) ซึ่งใช้กระบวนการวิเคราะห์จากข้อมูล 3 ส่วน เพื่ออนุมานปัจจัยที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงรึ้นดำ ได้แก่ (1) การทดสอบสมมติฐานว่าแมลงรึ้นดำที่พบร่วมกันในแหล่งอาศัยมีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการอย่างมีนัยสำคัญ (2) ใช้ลักษณะของ labral fan เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าแมลงรึ้นดำที่พบในแหล่งอาศัยเดียวกันมีความคล้ายคลึงของลักษณะสัณฐานวิทยามากกว่าค่าคาดหวังที่เกิดจากการจำลองสังคมแบบสุ่ม (3) ทดสอบแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างความคล้ายคลึงของลักษณะสัณฐานวิทยากับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic signal) ผลจากการวิเคราะห์ทั้ง 3 ส่วน จะใช้เพื่ออนุมานปัจจัยที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงรึ้นดำในประเทศไทย ตามแนวทางของ Cavender-Bares et al. (2004) โดยหากการวิเคราะห์พบว่าลักษณะ labral fan เป็นลักษณะที่มีการอนุรักษ์ (conserved) ตามสายวิวัฒนาการ กล่าวคือ ลักษณะ labral fan ของสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการมีความคล้ายคลึงกันมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่มีความห่างทางสายวิวัฒนาการ และสปีชีส์ที่อาศัยในแหล่งอาศัยเดียวกันมีความคล้ายคลึงกันของลักษณะ labral fan อย่างมีนัยสำคัญ (morphological clustering) จะอนุมานได้ว่าการคัดเลือกของแหล่งอาศัย (habitat filtering) เป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงรึ้นดำในประเทศไทย แต่หากพบว่า สปีชีส์ที่อาศัยในแหล่งอาศัยเดียวกันมีความแตกต่างของลักษณะ labral fan อย่างมีนัยสำคัญ (morphological overdispersion) จะอนุมานได้ว่าการแก่งแย่งแข่งขันและกันออก (competitive exclusion) เป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงรึ้นดำในประเทศไทย ถ้าการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยากับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าเกิด convergence evolution ของลักษณะ labral fan กล่าวคือ สปีชีส์ที่มีความห่างไกลตามสายวิวัฒนาการมีลักษณะของ labral fan คล้ายคลึงกันมากกว่าสปีชีส์ที่ใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ และสปีชีส์ที่พบในแหล่งอาศัยเดียวกันมีความแตกต่างของลักษณะ labral fan กระบวนการแบบสุ่ม (random process) จะเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงรึ้นดำ แต่หากสปีชีส์ที่อาศัยในแหล่งอาศัยเดียวกันมีความคล้ายคลึงของลักษณะ labral fan อย่างมีนัยสำคัญ กระบวนการคัดเลือกของแหล่งอาศัยจะเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงรึ้นดำ

การวิเคราะห์โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำในประเทศไทยวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Phylocom ver. 4.2 (Webb et al. 2008) ซึ่งใช้ในการคำนวณค่า mean phylogenetic distance (MPD) และ mean nearest taxon distance (MNTD) โดยค่า MPD วัดค่าเฉลี่ยความแตกต่างทางสายวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์ที่พบในแหล่งอาศัยเดียวกัน ค่า MNTD วัดค่าเฉลี่ยความแตกต่างทางสายวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการมากที่สุด ทั้งค่า MPD และ MNTD นำไป standardized เป็นค่า net relatedness index (NRI) และ nearest related taxon index (NTI) ตามลำดับ (Webb et al. 2002) ค่า NRI และ NTI ใช้ในการประเมินความแตกต่างระหว่างค่าระยะห่างระหว่างสปีชีส์ตามสายวิวัฒนาการเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา (observed) กับค่าจากสังคมจำลอง (null community) ค่า NRI และ NTI เป็นบวก หมายถึง สปีชีส์ที่อยู่ร่วมกันในชุมชนแหล่งอาศัยเดียวกันมีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ

มากกว่าค่าคาดหวัง ถ้าค่า NRI และ NTI เป็นลบหมายถึงสปีชีส์ในแหล่งอาศัยเดียวกันมีความห่างทางสายวิวัฒนาการมากกว่าค่าคาดหวัง (Webb et al. 2002) ทดสอบค่าทางสถิติของ NRI และ NTI โดยใช้วิธีการ independent swap เพื่อสร้าง null communities โดยใช้หลักเกณฑ์ว่าทุกสปีชีส์ในสังคมมีโอกาสเท่าเทียมกันจะนำเข้าไปในสังคม ทดสอบค่าทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าจากการสำรวจและค่าจากสังคมจำลอง (null community) โดยการเปรียบเทียบค่า NRI และ NTI กับศูนย์ โดยใช้ t-test (Ingram and Shurin 2009; Razafindratsima et al. 2013)

วิเคราะห์โครงสร้างสังคมจากลักษณะ labral fan (trait-based community structure) โดยใช้โปรแกรม Phylocom วิเคราะห์โดยใช้ค่าเฉลี่ยความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ (mean pairwise trait distance, MPD) และค่าเฉลี่ยความแตกต่างของลักษณะระหว่างสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการที่สุด (mean distance to nearest-neighbor trait distance, MNTD) โดยทั้งสองค่าจะใช้บ่งชี้การกระจายของลักษณะภายในสังคมของแมลงวันดำ ค่าการกระจายของลักษณะภายในสังคมนำไปใช้ในการสร้าง standardized effect size (SES) เพื่อเปรียบเทียบกับสังคมจำลอง (Weither and Keddy 1995; Webb et al. 2008) โดยค่า SES เป็นบวกลบบ่งชี้ว่าลักษณะของสปีชีส์ในชุมชนแมลงวันดำมีความแตกต่างกัน (overdispersion) ถ้าค่า SES เป็นลบแสดงว่าลักษณะของสปีชีส์ในชุมชนแมลงวันดำมีความคล้ายคลึงกัน (trait clustering) ใช้ t-test ในการทดสอบค่า SES ว่าแตกต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ (Ingram and Shurin 2009; Razafindratsima et al. 2013)

ทดสอบลักษณะ labral fan ว่าเป็นลักษณะที่มีการอนุรักษ์ (conserved) ตามสายวิวัฒนาการ (phylogenetic signal) โดยใช้การวิเคราะห์ analysis of trait (aot) ในโปรแกรม Phylocom โดยการวิเคราะห์หาความแปรปรวนของลักษณะสปีชีส์ในชุมชนแมลงวันดำเปรียบเทียบกับตำแหน่งบนสายวิวัฒนาการ ถ้าสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการมีลักษณะสปีชีส์ในชุมชนแมลงวันดำคล้ายคลึงกันมากกว่า ค่าความแปรปรวนของลักษณะจะต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าจำลองของลักษณะภายใต้รูปแบบจำลอง (null model) (Webb et al. 2008)

3. ผลการศึกษา

3.1 เครื่องหมายพันธุกรรม DNA barcode สำหรับการระบุชนิดแมลงรืนดำ

ข้อจำกัดที่สำคัญประการหนึ่งในการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงรืนดำคือการระบุชนิดของแมลงรืนดำในระยะตัวอ่อน (larva) ซึ่งเป็นระยะที่ใช้ในการศึกษานิเวศวิทยา ทั้งนี้เนื่องจากคำอธิบายลักษณะของแมลงรืนดำหลายชนิดไม่ครอบคลุมระยะตัวอ่อน ดังนั้นการศึกษา DNA barcode เพื่อระบุชนิดโดยใช้การสร้างความสัมพันธ์ระหว่างระยะตัวอ่อนกับระยะอื่นๆ ที่มีคำอธิบายลักษณะจะสามารถใช้ในการระบุชนิดของแมลงรืนดำได้ ในการศึกษา DNA barcode ครั้งนี้ศึกษาในแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium multistriatum* ซึ่งเป็นกลุ่มสปีชีส์ที่พบกระจายกว้างขวางในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษา DNA barcode ในแมลงรืนดำกลุ่ม *S. multistriatum* จำนวน 7 สปีชีส์ (ตารางที่ 5)

ผลการศึกษาโดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อระบุชนิดของตัวอย่างตัวอ่อนแมลงรืนดำจำนวน 53 ตัวอย่าง พบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบ่งเป็น 5 clades (ภาพที่ 2) แมลงรืนดำ *S. takenae*, *S. malayense*, *S. triglobus* และ *S. bullatum* รวมกับตัวอย่างตัวอ่อนที่ไม่ทราบสปีชีส์ 4 ตัวอย่าง แต่ละสปีชีส์แยกเป็นกลุ่ม monophyletic clade และมีค่า bootstrap support สูง แมลงรืนดำ *S. fenestratum*, *S. chainarongi* และ *S. chaliowae* รวมกับตัวอย่างตัวอ่อนที่ไม่ทราบสปีชีส์อีก 11 ตัวอย่าง แยกเป็น 1 clade โดยที่ *S. chainarongi* และ *S. chaliowae* รวมกับตัวอย่างตัวอ่อนที่ไม่ทราบสปีชีส์จำนวน 11 ตัวอย่าง แยกเป็น monophyletic clade ขณะที่ *S. fenestratum* เป็น paraphyletic clade เนื่องจากรวมเอากลุ่มของ *S. chainarongi* และ *S. chaliowae* เนื่องจากตัวอย่างตัวอ่อนที่ไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 11 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากน้ำตกนาคูหา จังหวัดแพร่ รวมกลุ่มในสายวิวัฒนาการกับตัวอย่าง *S. chaliowae* ซึ่งรายงานจากระยะดักแด้ (Pramual and Nanork 2012) ดังนั้นตัวอย่างตัวอ่อนจำนวน 11 ตัวอย่างจากน้ำตกนาคูหา จึงเป็นตัวอ่อนของแมลงรืนดำ *S. chaliowae* โดยการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์พบว่ามีค่าระหว่าง 0% - 2.25% และมีค่าเฉลี่ย 0.60% (ตารางที่ 6)

ตัวอย่างตัวอ่อนแมลงรืนดำที่ไม่ทราบสปีชีส์จากจังหวัดเลยรวมเป็นกลุ่ม monophyletic กับตัวอย่างของ *S. bullatum* (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์ DNA barcode ซึ่งพบว่าตัวอย่างตัวอ่อนที่ไม่ทราบสปีชีส์กลุ่มนี้เป็นสปีชีส์เดียวกับ *S. bullatum* ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ระบุชนิดจากระยะดักแด้ นอกจากนี้ยังทำการศึกษา DNA barcode ของแมลงรืนดำ *S. triglobus* ซึ่งเป็นแมลงรืนดำในกลุ่มสปีชีส์ *S. multistriatum* ที่มีรายงานการพบเพียงแห่งเดียวคือ น้ำตกต้นตอง จ.น่าน โดยมีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ระหว่าง 0% - 1.03% และมีค่าเฉลี่ย 0.29%

ตารางที่ 5 สปีชีส์ แหล่งที่เก็บตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และ Genbank accession numbers ของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium multistriatum* ที่ใช้ในการศึกษา DNA barcode

Species	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitude/ Longitude	Altitude (เมตร)	จำนวนตัวอย่าง	Genbank accession number
<i>Simulium bullatum</i> Takaoka & Choochote	น้ำตกหินสามชั้น อ.ภูเรือ จ.เลย	17°29'59"N/101°20'09" E	1156	3	KJ649638 – KJ649638
	น้ำตกเลศพบ อ.ภูเรือ จ.เลย	17°29'11" N/101°20'13" E	1152	5	KJ649641 – KJ649645
<i>S. chainarongi</i> Kuvangkadilok & Takaoka	น้ำตกวังใหญ่ อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ			4	JF916851– JF916854 [*]
<i>S. chaliowae</i> Takaoka & Boonkemtong	น้ำตกนาคูหา จ.แพร่	18°07'09" N/100°17'09" E	556	17	JF916855 – JF916856 [*] KJ649623 – KJ649623
<i>S. fenestratum</i> Edwards	น้ำตกสวนห้อม จ.เลย	17°02'49" N/101°45'42" E	579	1	JF916857 – JF916860 [*]
	น้ำตกคลองนารายณ์ จ.จันทบุรี			1	JF916862 – JF916864 [*]
	น้ำตกตาดเยื้อง สาธารณรัฐ			1	
	ประชาธิปไตยประชาชนลาว				
	น้ำตกวังกวาง จ.เลย			1	
	น้ำตกเพ็ญพบ จ.เลย			1	
	น้ำตกจำปาทอง จ.เลย			3	
<i>S. triglobus</i>	น้ำตกต้นตอง อ.ปัว จ.น่าน	19°12'39" N/101°04'04" E	1027	7	KJ649646 – KJ649652
<i>S. takense</i> Takaoka & Choochote	น้ำตกไถช่องถ่อง จ.กาญจนบุรี			2	JF916865 – JF916870 [*]
	น้ำตกเกริงกระเวีย จ.กาญจนบุรี			4	

(ที่มา: Pramual and Wongpakam 2014)

ตารางที่ 6 ค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์และระหว่างสปีชีส์ในแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium multistriatum* จำนวน 7 สปีชีส์ที่ศึกษา

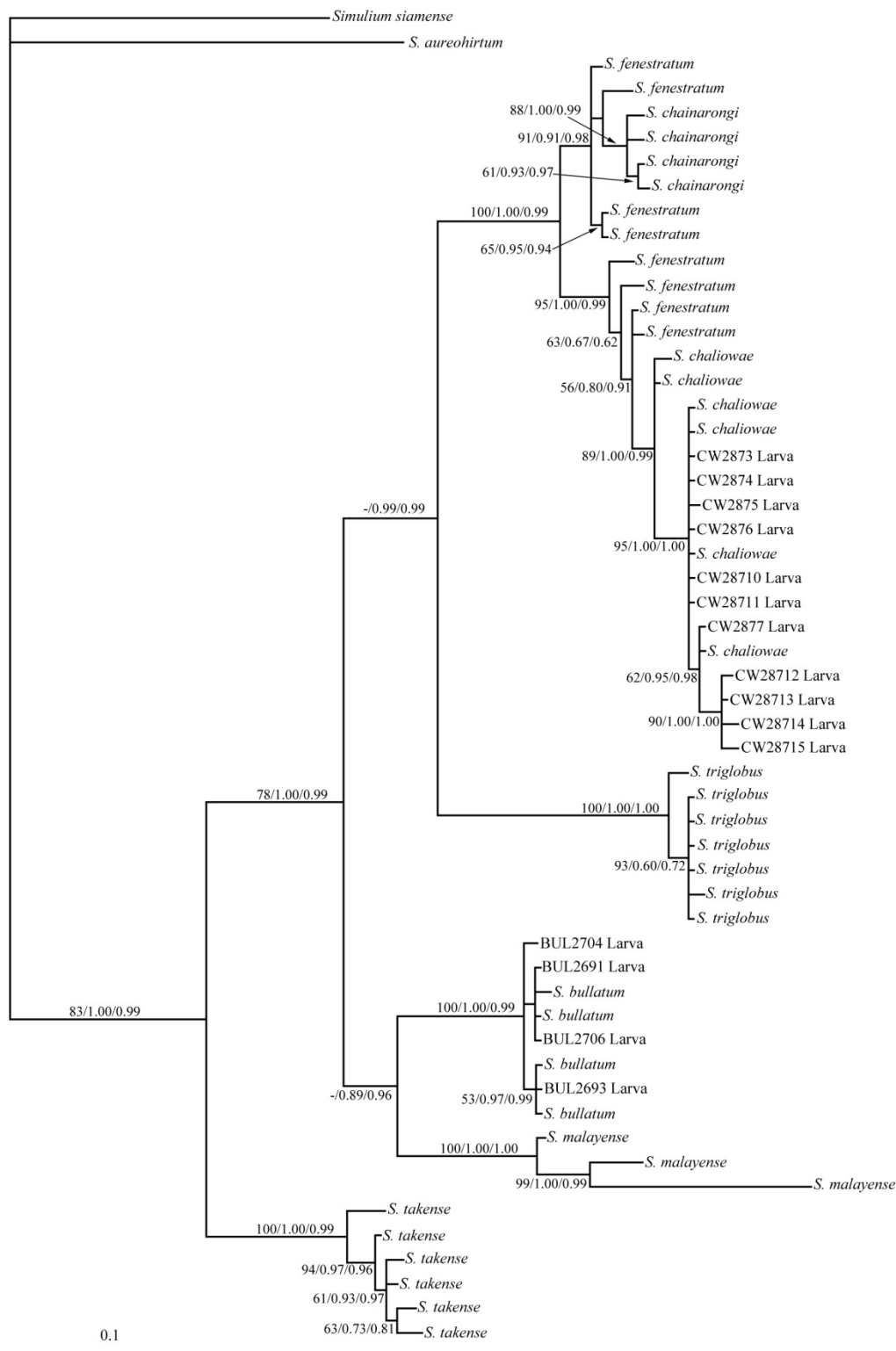
Species	จำนวนตัวอย่าง	ค่าพิสัยความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ (ค่าเฉลี่ย) %	ค่าพิสัยความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ (ค่าเฉลี่ย) %
<i>S. bullatum</i>	8	0 – 0.86 (0.36)	7.04 – 13.37 (9.65)
<i>S. chainarongi</i>	4	0.17 – 0.69 (0.54)	1.03 – 15.38 (6.88)
<i>S. chaliowae</i>	17	0 – 2.25 (0.60)	0.51 – 18.64 (8.99)
<i>S. fenestratum</i>	8	0 – 2.98 (1.85)	0.51 – 16.27 (6.85)
<i>S. malayense</i>	3	2.78 – 7.19 (5.72)	7.04 – 18.64 (12.25)
<i>S. takenae</i>	6	0.34 – 2.43 (1.16)	9.13 – 18.56 (12.52)
<i>S. triglobus</i>	7	0 – 1.03 (0.29)	9.09 – 13.21 (10.73)
Total	53	0 – 7.19 (1.15)	0.51 – 19.53 (9.41)

(ที่มา: Pramual and Wongpakam 2014)

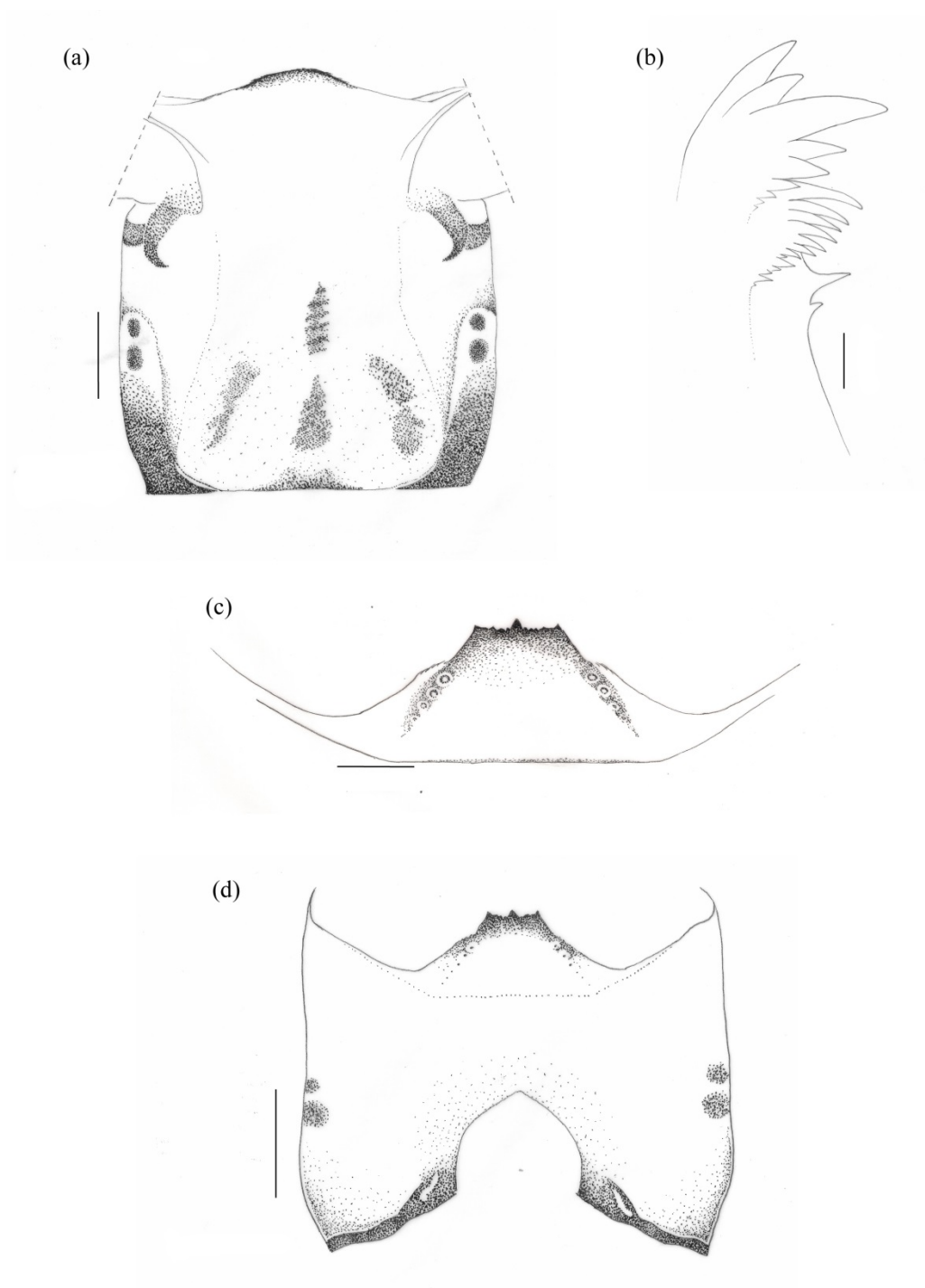
จากการที่แมลงรืนดำ *S. chaliowae* และ *S. bullatum* ยังไม่มีคำอธิบายลักษณะของระยะตัวอ่อน ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถระบุชนิดของตัวอ่อนของแมลงรืนดำทั้ง 2 สปีชีส์ได้โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม DNA barcode ดังนั้นจึงทำการอธิบายลักษณะของตัวอ่อนแมลงรืนดำทั้ง 2 สปีชีส์ ดังนี้

Simulium (Simulium) bullatum Takaoka and Choochote, 2005

Mature larva: ความยาวลำตัว 5.6 – 6.2 mm (n = 10) ลำตัวสีน้ำตาลปนเทา หรือน้ำตาลแดง cephalic apotome (ภาพที่ 3a) สีเหลืองอมน้ำตาลบริเวณส่วนหน้าและสีน้ำตาลเข้มส่วนหลัง มีแถบสีเข้มบริเวณ posterior margin และปรากฏ positive head spots อย่างชัดเจน ด้านข้างและด้านท้องของ head capsule สีเข้ม antenna ยาวกว่าก้านของ labral fan ประกอบด้วย 3 ปล้อง และ apical sensillum โดยมีสัดส่วนความยาวของปล้องที่ 1, 2 และ 3 เป็น 1:1.4:0.8 labral fan มีจำนวน fan ray ประมาณ 44 เส้น mandible (ภาพที่ 3b) ลักษณะเป็น comb-teeth ความยาวของฟันลดหลั่นจากแท่งที่ 1 ถึง 3 mandibular serrations ประกอบด้วย 2 ชั้น ที่มีขนาดใหญ่และขนาดเล็ก โดยไม่มี numerical supernumerary serrations hypostomium (ภาพที่ 3c) ประกอบด้วยฟัน 9 ซี่ ฟันซี่กลาง (median tooth) มีขนาดใหญ่ที่สุดขณะที่ 2 ซี่ ด้านขอบ 2 ข้างของ hypostomium มีขนาดค่อนข้างใหญ่ lateral margins ของ hypostomium มีรอยหยัก hypostomal bristles จำนวน 6 เส้น postgenal cleft มีขนาดใหญ่รูปร่างคล้ายใบโพธิ์ (ภาพที่ 3d) แต่ไม่คอดบริเวณส่วนฐาน ความยาวประมาณ 1.5 เท่า ของ postgenal bridge thoracic cuticle และ abdominal cuticle ไม่พบ protuberances และ setae ยกเว้นด้านหลังของปล้องสุดท้ายที่ปกคลุมด้วยขนใสบริเวณด้านข้างของ anal sclerite rectal organ ประกอบด้วย 3 lobes แต่ละ lobe ประกอบด้วย 12 – 14 secondary lobes anal sclerite ลักษณะ X-shape โดยส่วน anterior arm มีความยาว 0.9 เท่าของ posterior arm ไม่พบ accessory sclerite และ ventral papillae posterior circlets มีจำนวน 90 – 92 แถว แต่ละแถวประกอบด้วย 12 hooks



ภาพที่ 2 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ Bayesian สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I ของแมลงริ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium multistriatum* ในประเทศไทยจำนวน 7 สปีชีส์ ค่า bootstrap สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining และค่า posterior probability สำหรับการวิเคราะห์ด้วย Bayesian และ maximum likelihood แสดงบนแขนตามลำดับ (ที่มา: Pramual and Wongpakam 2014)



ภาพที่ 3 ลักษณะตัวอ่อนของแมลงรึ้นดำ *Simulium bullatum* (a) cephalic apotome (b) mandible (c) hypostoma (d) postgenal cleft scale bar = 0.1 mm สำหรับ ภาพ (a) และ (d) 0.02 mm สำหรับ ภาพ b และ 0.04 mm สำหรับภาพ (c) (ที่มา: Pramual and Wongpakam 2014)

Simulium (Simulium) chaliowae Takaoka and Kuvangkadilok, 1999

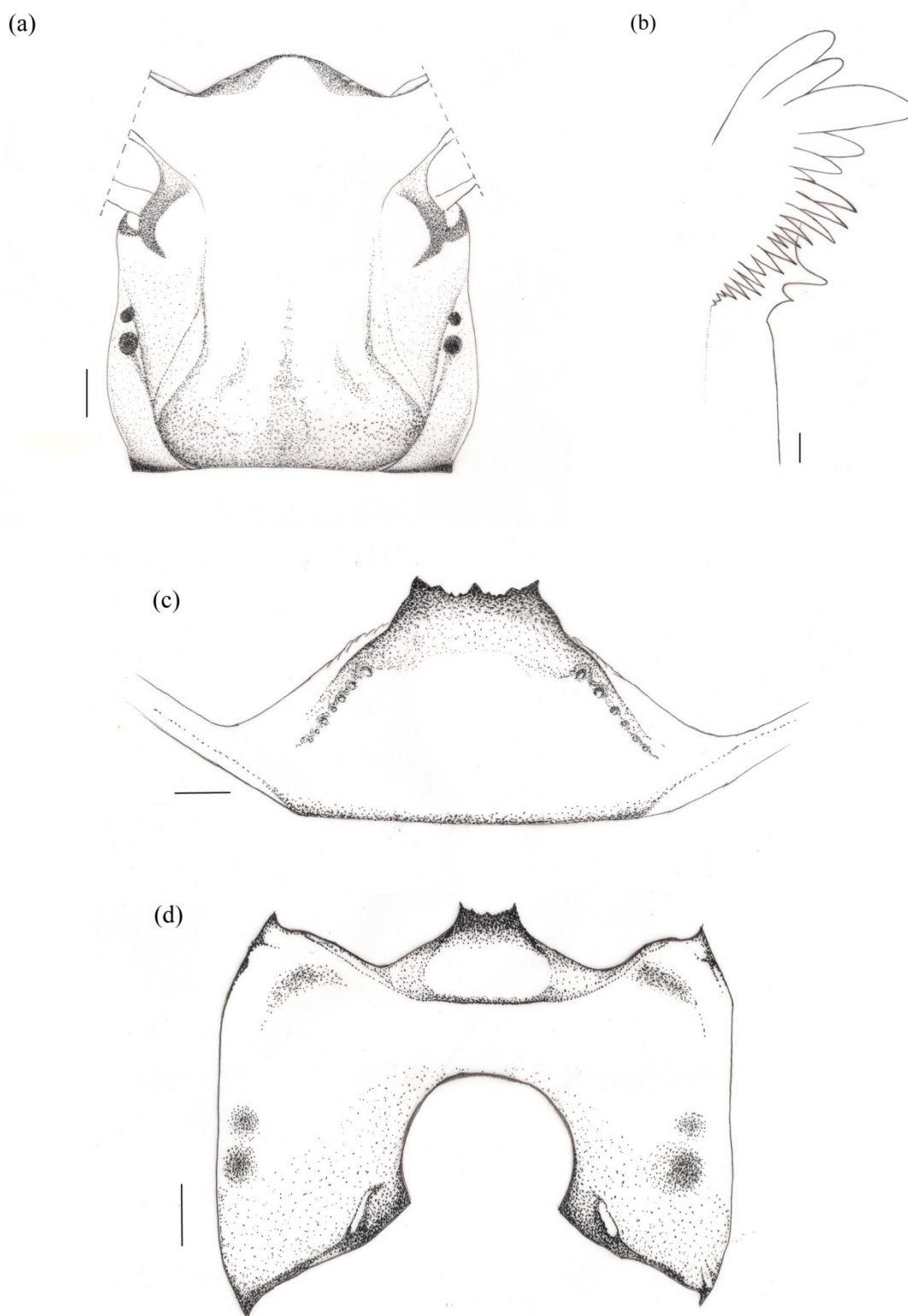
Mature larva: ความยาวลำตัว 4.9 – 6.1 mm (n = 10) ลำตัวสีเขียวเข้ม หรือสีน้ำตาลแดงบริเวณ thoracic ปล้องที่ 1 และน้ำตาลอ่อนในส่วนอื่น cephalic apotome (ภาพที่ 4a) สีเหลืองอ่อนอมน้ำตาล มีแถบสีเข้มบริเวณ posterior margin และปรากฏ positive head spots จาง antenna ยาวกว่าก้านของ labral fan ประกอบด้วย 3 ปล้อง และ apical sensillum โดยมีสัดส่วนความยาวของปล้องที่ 1, 2 และ 3 เป็น 1:1.2:0.8 labral fan มีจำนวน fan ray ประมาณ 40 เส้น mandible (ภาพที่ 4b) ลักษณะเป็น comb-teeth ความยาวของฟันลดหลั่นจากแท่งที่ 1 ถึง 3 mendibular serrations ประกอบด้วย 2 ซีน ที่มีขนาดใหญ่ และขนาดเล็ก โดยไม่มี numerical supernumerary serrations hypostomium (ภาพที่ 4c) ประกอบด้วย ฟัน 9 ซีน ฟันตัวกลาง (median tooth) มีขนาดใหญ่ที่สุดขณะที่ 2 ซีนด้านข้างรองสุดท้ายและขอบ 2 ข้างของ hypostomium มีขนาดค่อนข้างใหญ่ชัดเจน lateral margins ของ hypostomium มีรอยหยัก hypostomal bristles จำนวน 6 เส้น postgenal cleft มีขนาดใหญ่รูปร่างกลมบริเวณปลายสุด (ภาพที่ 4d) คอดบริเวณส่วนฐานเล็กน้อย ความยาวประมาณ 2 เท่า ของ postgenal bridge abdominal cuticle พบ protuberances 1 คู่ในแต่ละปล้อง ไม่พบ setae ยกเว้นด้านหลังของปล้องสุดท้ายที่ปกคลุมด้วยขนในสับริเวณ ด้านข้างของ anal sclerite rectal organ ประกอบด้วย 3 lobes แต่ละ lobe ประกอบด้วย 12 – 14 secondary lobes anal sclerite ลักษณะ X-shape โดยส่วน anterior arm มีความยาว 0.6 เท่าของ posterior arm ไม่พบ accessory sclerite และ ventral papillae posterior circlets มีจำนวน 80 แถว แต่ละแถวประกอบด้วย 17 hooks

3.2 เซลล์พันธุศาสตร์และอนุพันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ *Simulium feuerborni*

3.2.1 เซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ *Simulium feuerborni*

ศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ *Simulium feuerborni* จากประเทศมาเลเซียและประเทศอินโดนีเซียจำนวน 158 ตัวอย่าง (ตารางที่ 7) เปรียบเทียบกับตัวอย่างจากประเทศไทยที่มีรายงานการศึกษา ก่อนหน้า (Kuvangkadilok et al. 1999b; Pramual and Wongpakam 2013) ผลการศึกษาพบว่าแมลงรืนดำ *S. feuerborni* จากประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซียมีความแปรผันทางพันธุกรรมระดับโครโมโซมต่ำ (ตารางที่ 8) โดยพบอินเวอร์ชันความถี่ไม่คงที่ (floating inversion) เพียงรูปแบบเดียว คือ IS-4 จากประชากร Cameron Highlands (ภาพที่ 5) ซึ่งมีความถี่ในประชากรไม่เกิน 6% อย่างไรก็ตามพบว่าประชากรจากประเทศมาเลเซียมีความถี่ของ B chromosome สูง (ตารางที่ 8) โดยลักษณะของ B chromosome ที่พบมีขนาดเล็กแบบ metacentric (ภาพที่ 6) ตำแหน่งของ centromere สังเกตจากตำแหน่งการเข้าคู่กับโครโมโซมปกติ (A chromosome) แขนข้างหนึ่งของ B chromosome มีลักษณะ fluffy end และอีกข้างมีแบนด์เข้มขนาดใหญ่ 2 แบนด์ ใกล้กับตำแหน่งเซ็นโทรเมียร์ และแบนด์จาง 1 แบนด์บริเวณปลายของแขนประชากรจาก Puncak Java ประเทศอินโดนีเซียไม่พบความแปรผันของโครโมโซมและ B chromosome

จากการเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทินโครโมโซมระหว่างประชากรจากประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซียกับแผนที่มาตรฐานของ *S. feuerborni* จากตัวอย่างในประเทศไทยพบว่าประชากรจากประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซียมีความแตกต่างของโครโมโซมกับประชากรจากประเทศไทย และจำแนกเป็น cytoform ใหม่ ดังนี้



ภาพที่ 4 ลักษณะตัวอ่อนของแมลงรึ้นดำ *Simulium chaliowae* (a) cephalic apotome (b) mandible (c) hypostoma (d) postgenal cleft scale bar = 0.1 mm สำหรับ ภาพ (a) และ (d) 0.02 mm สำหรับ ภาพ b และ 0.04 mm สำหรับภาพ (c) (ที่มา: Pramual and Wongpakam 2014)

ตารางที่ 7 รายละเอียดของประชากรของแมลงร้นดำ *Simulium feuerborni* จากประเทศมาเลเซียและประเทศอินโดนีเซียที่ศึกษา

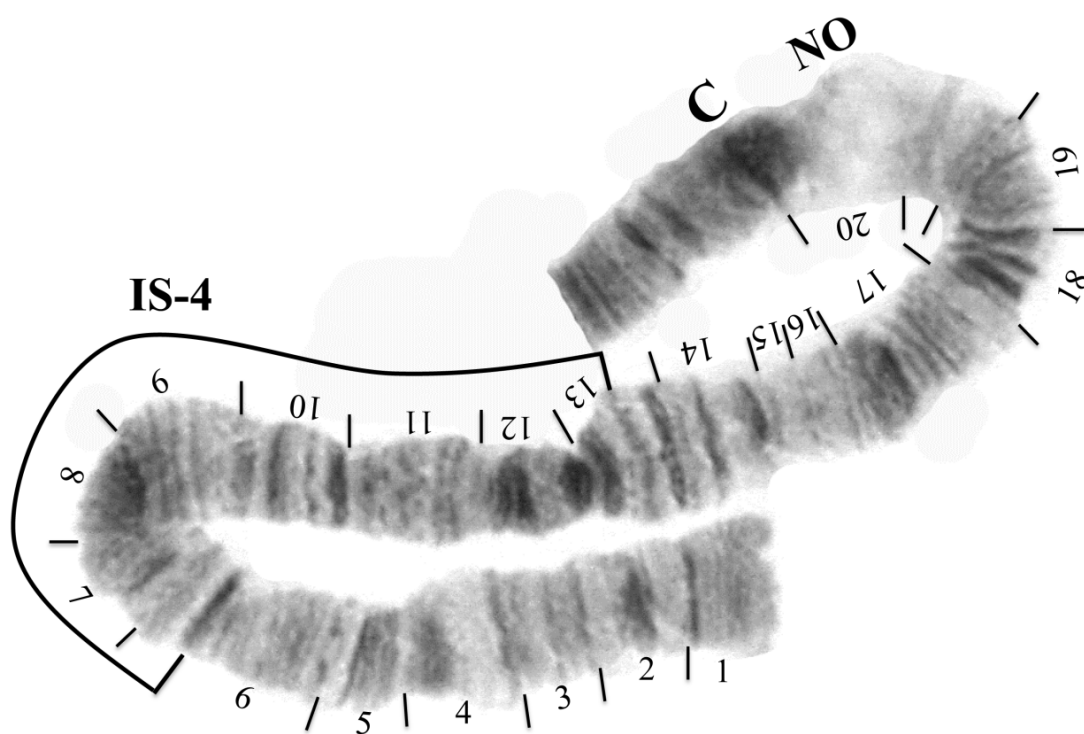
ประชากร	Code	Latitude/ Longitude	Altitude (m)	ความกว้าง (m)	ความลึก (m)	ความเร็ว กระแสน้ำ (m/s)	pH	Dissolved oxygen (mg/L)	อุณหภูมิ (°C)
Brinchang, Cameron Highlands, มาเลเซีย	CH15-1	N 04°31.461' E 101°23.338'	1,813	0.75	0.1	0.25	7.36	5.5	15.9
Tanah Rata, Cameron Highlands, มาเลเซีย	CH15-2	N 04°31.461' E 101°23.338'	1,813	0.2 0	0.05	0.22	6.69	2.4	15.4
	CH11-1	N 04°28.738' E 101°22.979'	1,405	0.03	0.22	0.54	6.81	7.4	17.0
	CH11-2	N 04°28.738' E 101°22.979'	1,405	0.03	0.22	0.54	6.81	7.4	17.0
	CH11-3	N 04°28.738' E 101°22.979'	1,405	0.03	0.24	0.41	6.60	3.59	17.0
Puncak, Java, อินโดนีเซีย	PUN	NA	1,200	0.30 – 0.40	0.20	NA	7.00	NA	NA

(ที่มา: Pramual et al. 2015)

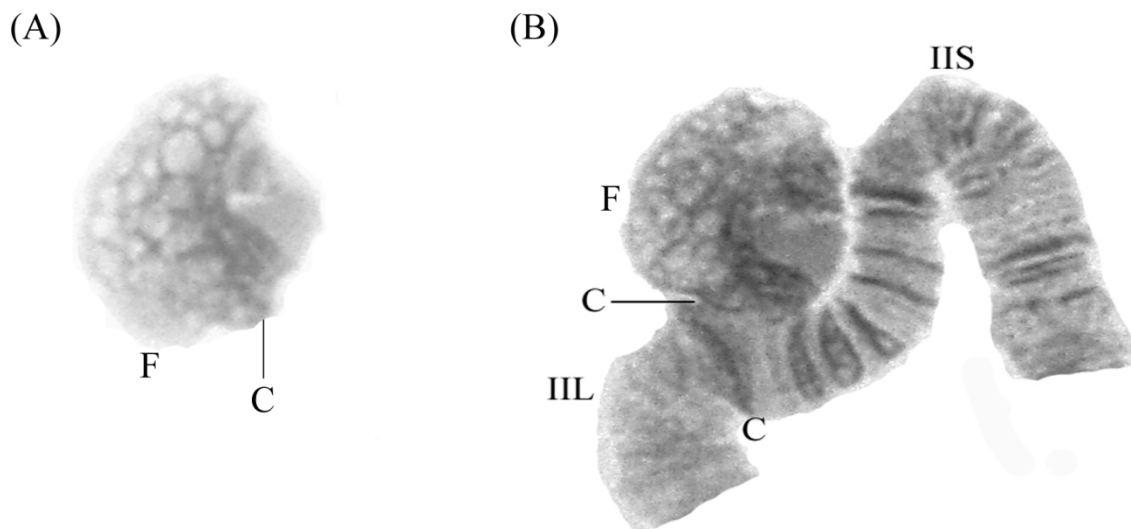
ตารางที่ 8 ความถี่ของอินเวอร์ชันและ B chromosome ในประชากรแมลงรืนดำ *Simulium feuerborni* จากประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย

Code	ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง (male: female)	Chromosome inversion	B chromosome	Cytoform
CH15-1	มาเลเซีย	6:14	IS-4 (6%) III L- 5 ^a	70%	C
CH15-2	มาเลเซีย	20:22	III L-5 ^a	62%	C
CH11-1	มาเลเซีย	3:9	III L-5 ^a	33%	C
CH11-2	มาเลเซีย	5:7	III L-5 ^a	83%	C
CH11-3	มาเลเซีย	5:6	III L-5 ^a	64%	C
PUN	อินโดนีเซีย	24:37	III L-4 ^a	-	D
รวม		63:95			

^a อินเวอร์ชันความถี่คงที่ (ที่มา: Pramual et al. 2015)



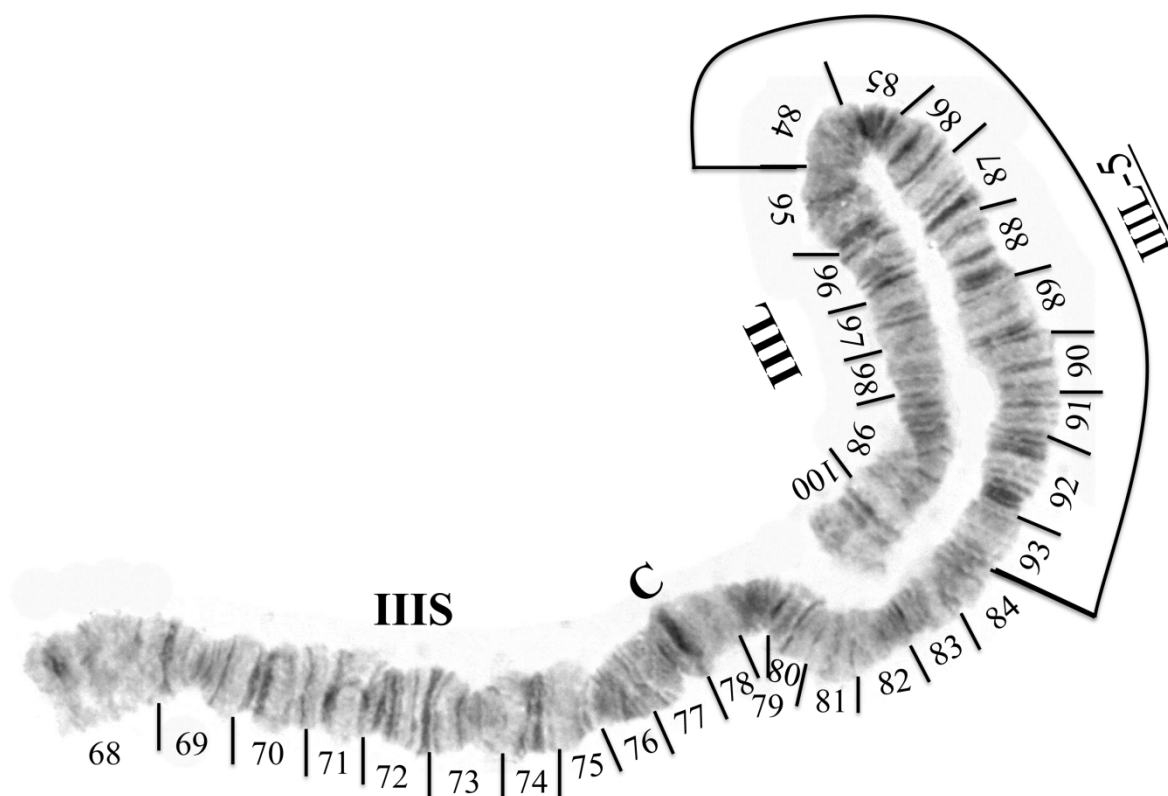
ภาพที่ 5 โครโมโซมแท่ง I แขนข้างสั้น (IS) ของแมลงรืนดำ *Simulium feuerborni* จากประเทศมาเลเซีย แสดงตำแหน่งการเกิดอินเวอร์ชัน IS-4 (ที่มา: Pramual et al. 2015)



ภาพที่ 6 B chromosome ของแมลงร้นดำ *Simulium feuerborni* จากประเทศมาเลเซีย (A) แสดงตำแหน่ง centromere (C) และ fluffy end (F) (B) ectopic pairing ระหว่าง B chromosome กับ โครโมโซม II (ที่มา: Pramual et al. 2015)

Simulium feuerborni Cytoform C

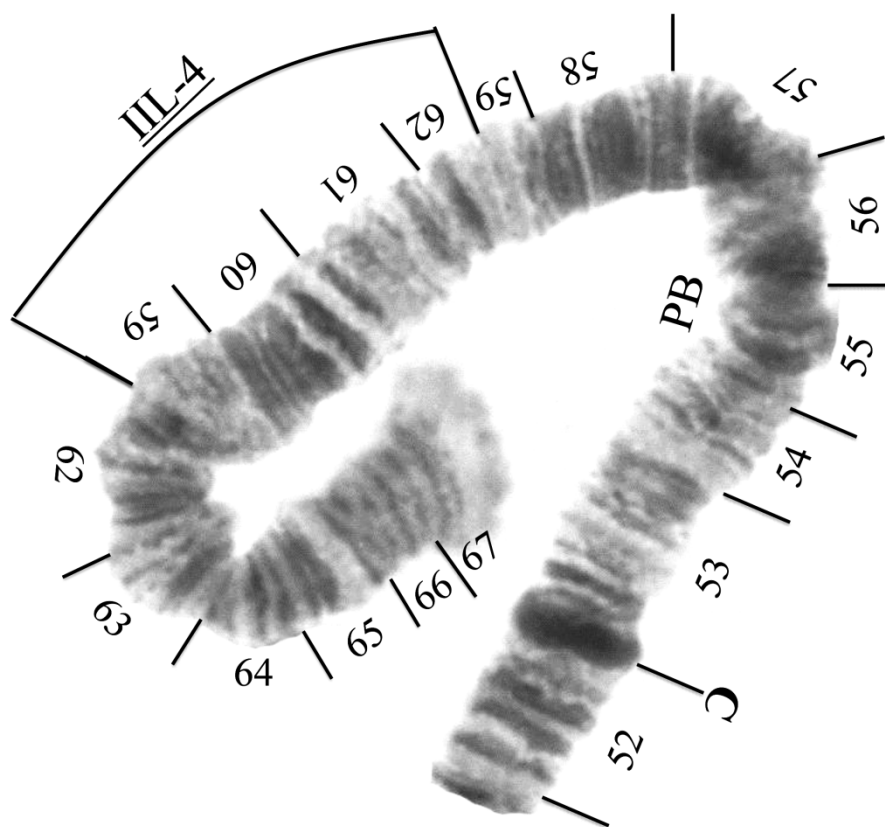
S. feuerborni cytoform C มีลักษณะของโครโมโซมแตกต่างจากแผนที่มาตรฐานโครโมโซมจากประเทศไทยจากการเกิดอินเวอร์ชันความถี่คงที่ (fixed inversion) บนแขนข้างยาวของโครโมโซม III (IIIL-5) (ภาพที่ 7) ไม่พบอินเวอร์ชันที่เกี่ยวข้องกับเพศ (sex-linked inversion) พบ B chromosome ความถี่สูงโดยพบความถี่ 33% - 83% ในประชากร แมลงร้นดำ *S. feuerborni* cytoform C พบในประชากรจาก Cameron Highlands ประเทศมาเลเซีย



ภาพที่ 7 โครโมโซมแท่ง III ของแมลงรึ้นดำ *Simulium feuerborni* จากประเทศมาเลเซีย แสดงตำแหน่งการเกิดอินเวอร์ชัน III-L-5 เปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานของสปีชีส์ (ที่มา: Pramual et al. 2015)

Simulium feuerborni Cytoform D

S. feuerborni cytoform D มีลักษณะของโครโมโซมแตกต่างจากแผนที่มาตรฐานโครโมโซมจากประเทศไทยจากการเกิดอินเวอร์ชันความถี่คงที่ (fixed inversion) บนแขนข้างยาวของโครโมโซม II (II-L-4) (ภาพที่ 8) ไม่พบอินเวอร์ชันที่เกี่ยวข้องกับเพศ (sex-linked inversion) แมลงรึ้นดำ *S. feuerborni* cytoform D พบในประชากรจาก Puncak Java ประเทศอินโดนีเซีย



ภาพที่ 8 โครโมโซมแท่ง II แขนข้างยาวของแมลงริ้นดำ *Simulium feuerborni* จากประเทศอินโดนีเซียแสดงตำแหน่งการเกิดอินเวอร์ชัน IIL-4 เปรียบเทียบกับแผนที่มาตรฐานของสปีชีส์ (ที่มา: Pramual et al. 2015)

3.2.2 ความแปรผันทางพันธุกรรมระดับอนุพันธุศาสตร์และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง cytoforms

ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมระดับอนุพันธุศาสตร์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 586 bp เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง cytoforms ของแมลงริ้นดำ *S. feuerborni* โดยศึกษาประชากรจาก Cameron Highlands ประเทศมาเลเซีย จำนวน 10 ตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีน COI สำหรับตัวอย่างจากประเทศอินโดนีเซียได้ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าประชากรของแมลงริ้นดำ *S. feuerborni* จากประเทศมาเลเซียมีความแปรผันทางพันธุกรรมต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากประเทศไทย (cytoform A และ B) (ตารางที่ 9) จากจำนวนตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง พบแฮพโลไทป์ 7 รูปแบบ โดยมีค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (haplotype diversity) 0.869 และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) 0.008 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี median joining network พบว่าตัวอย่างของ cytoform C แยกจากกลุ่มของ cytoform A และ B จากประเทศไทยอย่างชัดเจน (ภาพที่ 9) การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้ค่า F_{ST} พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับสูงระหว่าง cytoforms (ตารางที่ 10) ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ DNA barcode ที่พบว่าตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์สามารถจำแนกตาม cytoforms ได้ถูกต้อง

ตารางที่ 9 ความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (haplotype diversity) และความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมลงรึ้นดำ *Simulium feuerborni*

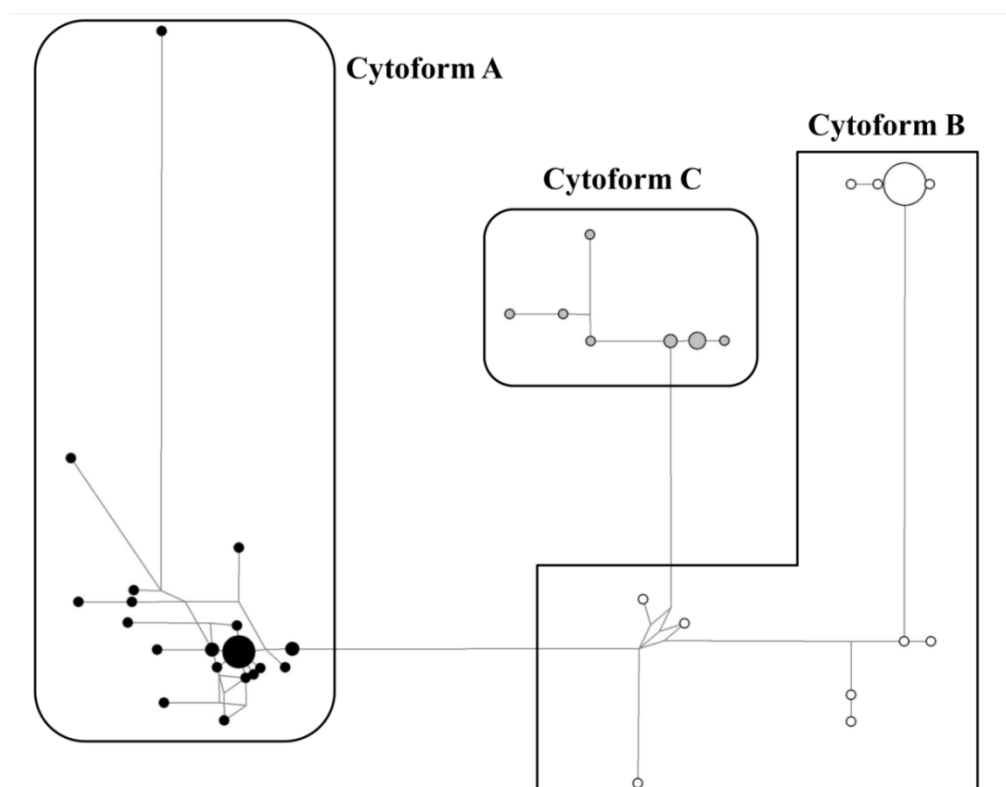
Cytoform	n	Haplotype diversity	Nucleotide diversity
A	30 ^a	0.869 (± 0.059)	0.008 (± 0.005)
B	29 ^a	0.579 (± 0.110)	0.015 (± 0.008)
C	10	0.911 (± 0.008)	0.007 (± 0.004)

^a ข้อมูลจาก Pramual and Wongpakam (2013) (ที่มา: Pramual et al. 2015)

ตารางที่ 10 ค่า pairwise F_{ST} ระหว่าง cytoforms ของแมลงรึ้นดำ *Simulium feuerborni*

Cytoform	A	B	C
A			
B	0.684*		
C	0.760*	0.696*	

* $P < 0.001$ (ที่มา: Pramual et al. 2015)



ภาพที่ 9 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ median joining network จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI 69 ตัวอย่าง ของแมลงรึ้นดำ *Simulium feuerborni* จากประเทศไทยและมาเลเซีย วงกลมหมายถึงแฮพโลไทป์ ขนาดของวงกลมเป็นสัดส่วนกับจำนวนตัวอย่างของแต่ละแฮพโลไทป์ (ที่มา: Pramual et al. 2015)

3.3 พันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงรึ้นดำ *Simulium aureohirtum*

ศึกษาความแปรผันและโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* ในประเทศไทย โดยแมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* เป็นแมลงรึ้นดำที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางพบได้ในหลายภูมิภาคทั้งในเขต Palearctic และ Oriental (Adler and Crosskey 2015) โดยแมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* มีชื่อพ้อง (synonyms) ได้แก่ *S. geniculare* Shiraki ในประเทศไต้หวัน *S. philippinense* Delfinado จากประเทศฟิลิปปินส์ *S. tuaranense* Smart and Clifford จากประเทศมาเลเซีย แมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* พบในแหล่งอาศัยที่มีลักษณะทางนิเวศวิทยาที่หลากหลาย รวมถึงสามารถปรับตัวได้ดีต่อแหล่งอาศัยที่ถูกรบกวนโดยมนุษย์ (Pramual and Kuvangkadilok 2009) การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในประชากรจากประเทศไทยพบความแปรผันของโครโมโซมสูง โดยพบอินเวอร์ชันความถี่ไม่คงที่ 14 รูปแบบ โดยมีอินเวอร์ชัน 2 รูปแบบที่มีความถี่สูงและยังพบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย ได้แก่ ละติจูด ความสูงจากระดับน้ำทะเล และอุณหภูมิ (Pramual et al. 2008) อย่างไรก็ตามยังไม่พบหลักฐานที่จะสามารถแบ่งแยก cytoform ของ *S. aureohirtum* ในประเทศไทยได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาจากตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่นที่พบว่าแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทินโครโซมเหมือนกับตัวอย่างจากประเทศไทย (Reeves and Adler 2011) การศึกษา DNA barcode พบว่าแมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* ในประเทศไทยมีความแปรผันสูง โดยมีค่าความแปรผันภายในสปีชีส์ 7.42% ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าอาจเป็นสปีชีส์ซับซ้อน (Pramual and Adler 2014) เพื่อตรวจสอบความแปรผันและโครงสร้างทางพันธุกรรมและบทบาทของปัจจัยทางนิเวศวิทยาต่อความแปรผันทางพันธุกรรมของ *S. aureohirtum* จึงศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COII โดยส่วนที่ทำการศึกษามีความยาว 697 bp

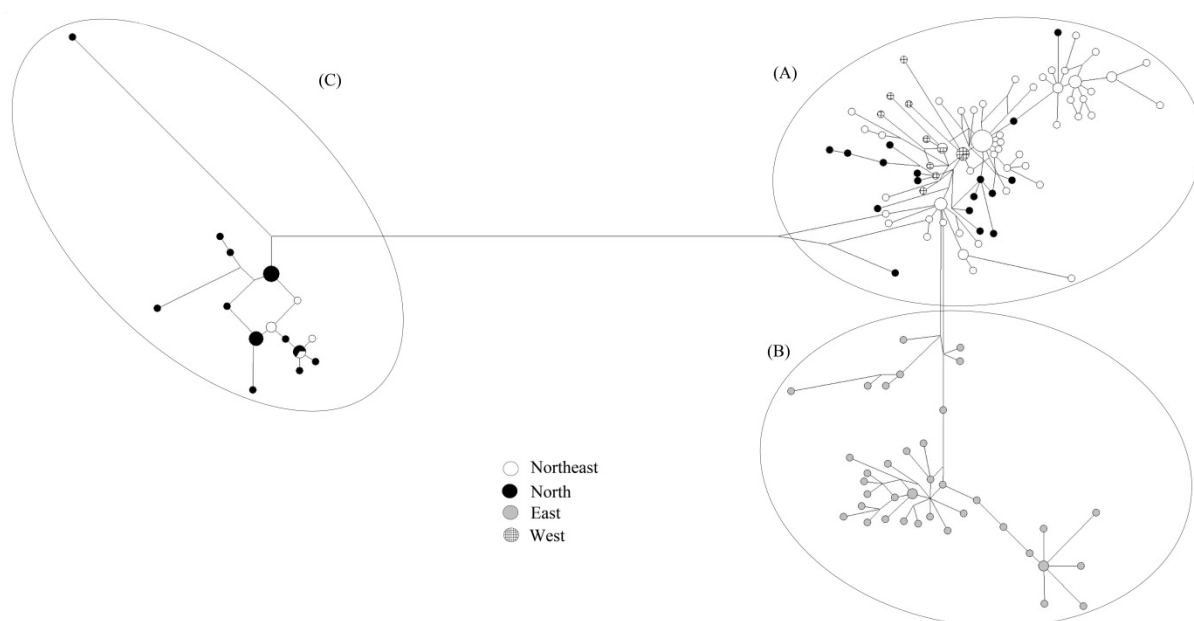
3.3.1 ความแปรผันทางพันธุกรรม

ศึกษา *S. aureohirtum* ในประเทศไทยจำนวน 158 ตัวอย่าง จาก 14 ประชากร (ตารางที่ 11) พบว่ามีรูปแบบแฮพโลไทป์ทั้งหมด 128 แฮพโลไทป์ มีค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ในประชากรระหว่าง 0.714 – 1.000 และมีค่าเฉลี่ย 0.994 (ตารางที่ 11) ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในประชากรมีค่าระหว่าง 0.006 – 0.035 และมีค่าเฉลี่ย 0.034 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ด้วยวิธี median – joining network พบว่าแมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* ในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 3 สายวิวัฒนาการ (A, B และ C) (ภาพที่ 10) โดยสายวิวัฒนาการมีความสัมพันธ์กับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์บางส่วน สายวิวัฒนาการ A เป็นตัวอย่างที่มาจากภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และบางส่วนจากภาคเหนือ สายวิวัฒนาการ B มาจากภาคตะวันออก และสายวิวัฒนาการ C มาจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

3.3.2 โครงสร้างทางพันธุกรรม

การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่าโดยรวมประชากรมีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำจากจำนวนการเปรียบเทียบระหว่างประชากรทั้งหมด 91 คู่ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญเพียง 13 คู่ (14%) (ตารางที่ 12) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางภูมิศาสตร์กับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วย Mantel's test พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($R^2 = 0.003$, $P =$

0.641) การวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบกลุ่มโครงสร้างทางพันธุกรรมด้วย SAMOVA (spatial analysis of molecular variance) พบว่าสามารถจัดกลุ่มประชากรได้ 3 กลุ่ม ซึ่งเป็นจำนวนกลุ่มที่มีค่า F_{CT} สูงที่สุด ($F_{CT} = 0.511$, $P < 0.001$) โดยกลุ่มที่จัดได้มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของประชากร กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรจากภาคเหนือ 2 ประชากร (AU293, AU271) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยประชากรจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 8 ประชากร (AU248, AU307, AU310, AU314, AU317, AU337, AU295, AU288) ประชากรภาคตะวันตก (AU336) และประชากรจากภาคเหนือ (AU295, AU288) กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยประชากรจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (AU346, AU347 และ AU341)



ภาพที่ 10 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์สร้างด้วยวิธี median – joining network จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COII จำนวน 158 ตัวอย่าง ของแมลงรึ้นดำ *Simulium aureohirtum* ในประเทศไทย (ที่มา: Thaijarern et al. 2014)

ตารางที่ 11 ประชากรของแมลงร้นดำ *Simulium aureohirtum* ที่ทำการศึกษา และดัชนีความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากร

ประชากร	Code	จำนวน ตัวอย่าง	Latitude/Longitude	Altitude (m)	Haplotype diversity	Nucleotide diversity
บ้านห้วยจักรขวา อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	AU248	11	15°28' N/ 105°32' E	190	0.891 ±0.092	0.015±0.008
ห้วยกุดแซ่ จ.กาฬสินธุ์	AU307	15	16°39'N/ 103°49' E	169	0.895 ±0.070	0.019 ±0.010
บ้านกวนปุ่น อ.เต่างอย จ.สกลนคร	AU310	8	16°53' N/ 104°10' E	212	1.000 ±0.062	0.010±0.006
บ้านสวนสวรรค์ อ.ดงหลวง จ.มุกดาหาร	AU314	10	16°45' N/ 104°10' E	250	0.978 ±0.054	0.015 ±0.008
น้ำตกวังใหญ่ อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ	AU317	12	14°26' N/ 104°29' E	219	0.969 ±0.044	0.014 ±0.008
อ.ปะคำจ.บุรีรัมย์	AU337	15	14°17' N/ 102°44' E	231	0.962 ±0.040	0.013 ±0.007
บ้านสวนหอม อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา	AU347	16	14°21' N/ 101°52'E	407	0.991 ±0.025	0.006 ±0.004
บ้านทับนคร จ.จันทบุรี	AU341	12	12°45' N/ 102°14' E	24	1.000 ±0.034	0.011 ±0.006
น้ำตกคลองแก้ว จ.ตราด	AU346	12	12°37' N/ 102°34' E	65	0.985 ±0.040	0.013 ±0.007
บ้านห้วยตาด อ.ด่านซ้าย จ.เลย	AU271	10	17°18' N/ 101°12' E	473	0.911±0.077	0.025 ±0.014
ห้วยแม่คำมี อ.ร่องวาง จ.แพร่	AU288	9	18°22' N/ 100°25' E	263	1.00 ±0.052	0.033 ±0.018
บ้านคันทนา อ.เชียงกลาง จ.น่าน	AU293	7	19°16' N/ 100°53' E	297	0.714 ±0.181	0.035 ±0.020
บ้านห้วยม่วง อ.ดอกคำใต้ จ.พะเยา	AU295	9	18°56' N/ 100°04' E	582	1.000 ±0.052	0.034 ±0.019
บ้านทุ่งลำไย อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี	AU336	12	14°40'N/ 99°19' E	231	0.954 ±0.057	0.007 ±0.004
รวม		158			0.994±0.002	0.034±0.017

(ที่มา: Thajjarern et al. 2014)

ตารางที่ 12 ค่า population pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของแมลงรึ้นดำ *Simulium aureohirtum* ในประเทศไทย

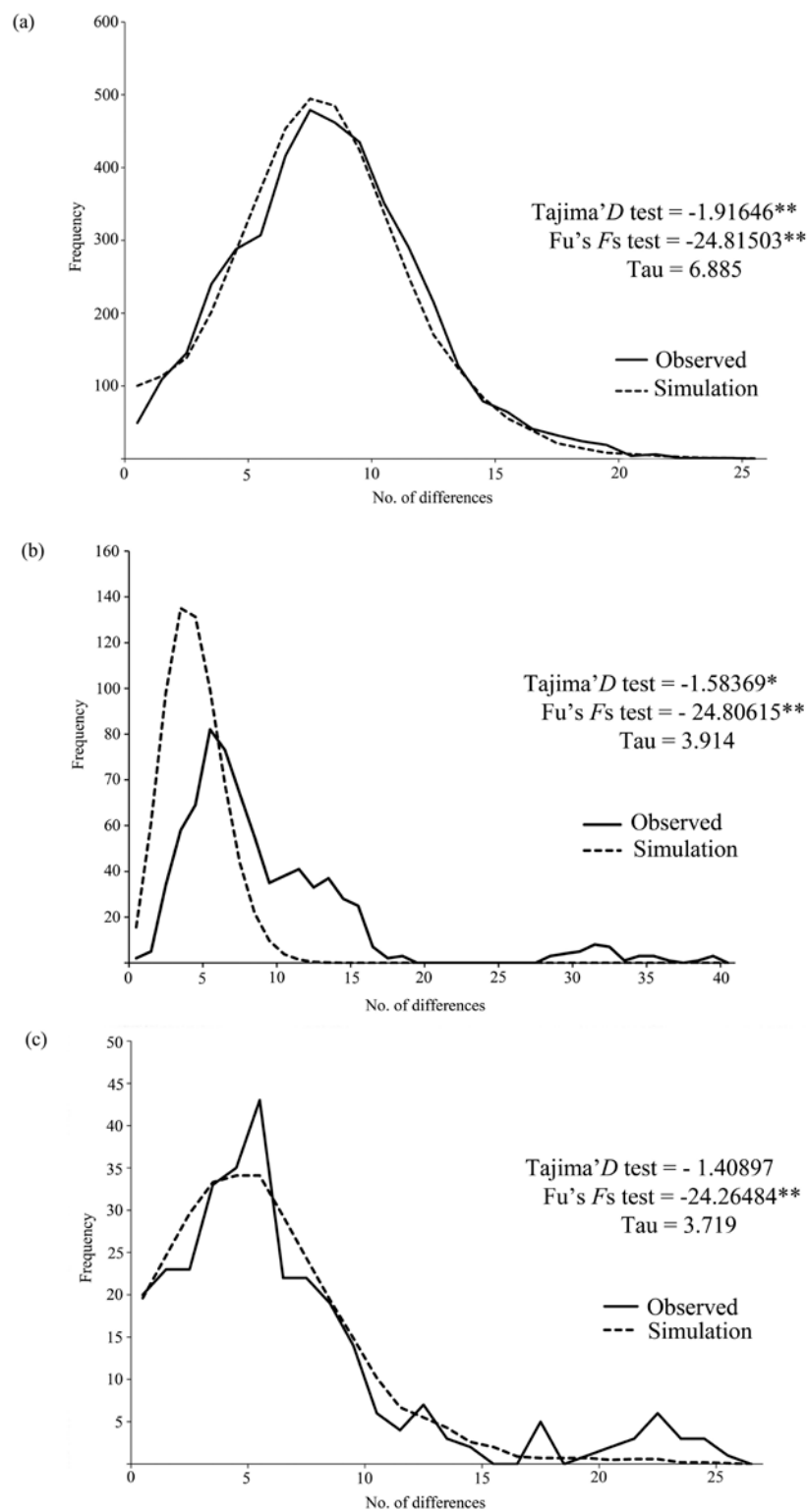
ประชากร	AU248	AU271	AU307	AU310	AU314	AU317	AU337	AU347	AU288	AU293	AU295	AU341	AU346	AU336
AU248														
AU271	0.099													
AU307	-0.016	0.097												
AU310	0.057	0.046	0.056											
AU314	0.066	0.036	0.065	0.011										
AU317	0.069	0.059	0.068	0.016	0.010									
AU337	0.072	0.062	0.071	0.020	0.030	0.034								
AU347	0.057	0.047	0.056	0.004	0.015	0.019	0.023							
AU288	0.056	0.045	0.055	0.000	0.011	0.016	0.020	0.004						
AU293	0.189	0.180	0.183	0.139	0.145	0.146	0.114	0.129	0.136					
AU295	0.056	0.012	0.055	0.000	0.011	0.016	0.020	0.004	0.000	0.136				
AU341	0.054	0.044	0.054	0.000	0.011	0.015	0.019	0.004	0.000	0.130	0.000			
AU346	0.062	0.051	0.061	0.008	0.019	0.023	0.027	0.012	0.008	0.138	0.008	0.008		
AU336	0.077	0.067	0.076	0.014	0.034	0.038	0.042	0.026	0.023	0.154	0.023	0.023	0.030	

อักษรตัวหนา หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ p-values น้อยกว่าค่า p ที่ปรับตาม Bonferroni correction (ที่มา: Thaijarern et al. 2014)

3.3.3 ประวัติศาสตร์ประชากร

การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรของสายวิวัฒนาการ A, B และ C พบว่าทั้ง 3 สายวิวัฒนาการมีการเพิ่มขนาดประชากรอย่างรวดเร็วในอดีต (population expansion) โดยมีลักษณะกราฟของ mismatch distribution เป็นแบบ unimodal (ภาพที่ 11) สอดคล้องกับค่าการจำลองเหตุการณ์ (simulation) ภายใต้เงื่อนไขของการเกิดการขยายตัวอย่างรวดเร็วของประชากร การวิเคราะห์ค่า F_S และ Tajima's D มีค่าเป็นลบ และแตกต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ สนับสนุนว่าประชากรมีการเพิ่มขนาดอย่างรวดเร็วในอดีต ซึ่งการคำนวณช่วงเวลาของการเพิ่มขนาดประชากรอย่างรวดเร็วคือประมาณ 18,000 ปี ที่ผ่านมาสำหรับสายวิวัฒนาการ A และ 10,000 ปี ที่ผ่านมาสำหรับสายวิวัฒนาการ B และ C

การวิเคราะห์การอพยพระหว่างประชากรในอดีตระหว่างประชากร 4 กลุ่ม ที่แบ่งแยกตามตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ พบว่ามีการอพยพไม่สมดุล โดยประชากรมีการอพยพจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือไปยังกลุ่มประชากรภาคเหนือในอัตราที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ การอพยพในทิศทางตรงกันข้ามที่มีน้อยมาก ขณะเดียวกัน ประชากรกลุ่มภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการอพยพเข้ามาจากกลุ่มประชากรภาคตะวันตกจำนวนมากแต่การอพยพในทิศทางตรงกันข้ามต่ำมาก การอพยพระหว่างประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับประชากรภาคอื่นๆ มีน้อยมาก (ตารางที่ 13)



ภาพที่ 11 Mismatch distribution ของ (a) สายวิวัฒนาการ A (b) สายวิวัฒนาการ B และ (c) สายวิวัฒนาการ C ของแมลงรึ้นดำ *Simulium aureohirtum* ในประเทศไทย (ที่มา: Thajjarern et al. 2014)

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ขนาดประชากร ($\theta = 2N_f\mu$) และอัตราการอพยพ ($M = m/\mu$) ระหว่างกลุ่มประชากรของแมลงรึ้นดำ *Simulium aureohirtum* ในประเทศไทย

กลุ่มประชากร	$\theta = 2N_f\mu$	อัตราการอพยพ			
		$N \rightarrow i$	$NE \rightarrow i$	$E \rightarrow i$	$W \rightarrow i$
เหนือ (N)	0.0582	-	290.17	4.5×10^{-11}	3.33×10^{-11}
ตะวันออกเฉียงเหนือ(NE)	0.0425	9.10×10^{-13}	-	1.23×10^{-12}	90.501
ตะวันออก (E)	0.0965	10.483	7.305	-	3.35×10^{-13}
ตะวันตก (W)	0.0187	9.3×10^{-14}	1.76×10^{-12}	2.01×10^{-12}	-

(ที่มา: Thajjarern et al. 2014)

3.4 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทย

แมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* (Lundström) จัดอยู่ในสกุลย่อย *Simulium* Latreille ทั่วโลกมีรายงานการพบ 49 สปีชีส์ (Adler and Crosskey 2015) แมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวาง พบได้ทั่วโลกทั้งในเขต Nearctic, Palearctic และ Oriental ในประเทศไทยมีรายงานการพบ 7 สปีชีส์ ประกอบด้วย *S. doipuiense* Takaoka and Choochote, *S. manooni* Takaoka and Choochote, *S. rufibasis* Brunetti, *S. setsukoae* Takaoka and Choochote, *S. tani* Takaoka and Davies, *S. weji* Takaoka, และ *S. yuphae* Takaoka and Choochote การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์พบว่าแมลงรึ้นดำ *S. doipuiense* และ *S. tani* เป็นสปีชีส์ซับซ้อน ประกอบด้วย 2 cytoforms และ 10 cytoforms ตามลำดับ (Tangkawanit et al. 2009a)

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* โดยใช้ความแปรผันจากการเกิดอินเวอร์ชันของโครโมโซม (Tangkawanit et al. 2009a) และลักษณะสัณฐานวิทยา (Tangkawanit et al. 2009b) พบว่าแมลงรึ้นดำ *S. tani* มีความแตกต่างจากสปีชีส์อื่นๆ มากที่สุด เพื่อทดสอบสมมติฐานนี้จึงทำการศึกษายสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมระดับอนุพันธุศาสตร์จากยีนหลายตำแหน่ง ได้แก่ COI, COII และ 18S/ITS1 จำนวน 70 ตัวอย่าง จาก 5 สปีชีส์ ประกอบด้วย *S. doipuiense*, *S. tani*, *S. weji*, *S. rufibasis* และ *S. yuphae* (ตารางที่ 14)

3.4.1 ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ COII มีความแปรผันสูงกว่ายีน 18S/ITS1 มาก โดยยีน COI ส่วนที่ทำการศึกษามีความยาว 720 bp มีความแปรผันแบบ parsimony informative จำนวน 158 ตำแหน่ง ยีน COII ส่วนที่ศึกษามีความยาว 697 bp มีความแปรผันแบบ parsimony informative 149 ตำแหน่ง ขณะที่ยีน 18S/ITS1 ส่วนที่ศึกษามีความยาว 633 bp มีความแปรผันแบบ parsimony informative เพียง 25 ตำแหน่ง แมลงรึ้นดำ *S. doipuiense* มีความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์สูงสุดสำหรับยีน COI และ COII แต่ความแปรผันภายในสปีชีส์ของยีน 18S/ITS1 ต่ำ แมลงรึ้นดำ *S. tani* และ *S. rufibasis* มีระดับความแปรผันใกล้เคียงกันสำหรับยีน COI แต่ *S. rufibasis* มีความแปรผันของยีน COII สูงกว่า *S. weji* มีความแปรผันสูงสำหรับยีน COII และ 18S/ITS1 แต่ความแปรผันของยีน COI ต่ำ แมลงรึ้นดำ *S. yuphae* มีความแปรผันต่ำที่สุดในทุกยีน (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 แมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ที่ทำการศึกษาและ Genbank accession numbers สำหรับยีน COI, COII และ 18S/ITS1

Species	Cytoform	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ความสูงจาก ระดับน้ำทะเล (m)	Accession number		
				COI	COII	18S/ITS1
<i>Simulium doipuiense</i> complex	A	บ้านน้ำตัน อ.ภูคา จ. น่าน	1,142	KF550246	KF550190	KF550264
				KF550243	KF550187	KF550265
				KF550244	KF550188	KF550266
				-	KF550186	KF550264
	A	น้ำตกสิริภูมิ จ.เชียงใหม่	1,332	KF550245	KF550189	KF550264
				-	KF550192	KF550267
				-	KF550191	KF550268
				KF550237	-	-
				KF550238	-	-
				KF550239	-	-
				KF550240	-	-
				KF550241	-	-
	A	น้ำตกห้วยทรายเหลือง จ.เชียงใหม่	1,050	KF550242	-	-
				KF550233	-	-
				KF550234	-	-
				KF550235	-	-
				KF550236	-	-
<i>Simulium rufibasis</i>		กัวแม่ปาน อ.จอมทอง จ. เชียงใหม่	2,188	KF550224	KF550193	KF550268
				KF550225	KF550194	KF550268
				KF550226	KF550195	KF550268
				KF550227	KF550197	KF550268

Species	Cytoform	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ความสูงจาก ระดับน้ำทะเล (m)	Accession number		
				COI	COII	18S/ITS1
<i>Simulium tani</i> complex	C	ถ้ำธารลอด จ. กาญจนบุรี	262	KF550228	KF550198	KF550268
				KF550229	KF550199	KF550269
				KF550230	KF550196	KF550268
				KF550218	-	-
				KF550219	-	-
				KF550220	-	-
				KF550221	-	-
				KF550222	-	-
	C, G, H [*]	ด่านตรวจแม่ไถ จ. เชียงราย	826	KF550232	KF550208	KF550270
				-	KF550209	KF550271
				AY855980	-	-
				KF550231	KF550210	KF550272
				-	KF550210	KF550273
				-	KF550211	KF550273
	B [*]	น้ำตกบกกราย จ. ระนอง	65	AY855922	-	-
	B [*]	ห้วยรู้ง จ. ระนอง	80	AY855931	-	-
	G [*]	บ้านปางแพก จ. แม่ฮ่องสอน	840	AY855934	-	-
	C, G, H [*]	บ้านห้วยหม้อ จ. เชียงใหม่	814	AY855938	-	-
	B [*]	น้ำตกคลองนารายณ์ จ. จันทบุรี	70	AY855946	-	-
	B [*]	น้ำตกเขาสอยดาว จ. จันทบุรี	65	AY855949	-	-
	C [*]	น้ำตกตาดหมอก จ. เพชรบูรณ์	468	AY855955	-	-
	C [*]	น้ำตกแม่เงิงหลวง จ. แพร่	300	AY855960	-	-

Species	Cytoform	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (m)	Accession number		
				COI	COII	18S/ITS1
<i>Simulium weji</i>	B*	น้ำตกเขาชะเมา จ. ระยอง	65	AY855967	-	-
	I*	น้ำตกทอทิพย์ จ. เพชรบุรี	400	AY855987	-	-
	C*	น้ำตกกุสอยดาว จ. จันทบุรี	650	AY855988	-	-
	A*	น้ำตกหมอกฟ้า จ. เชียงใหม่	545	AY855994	-	-
	A*	น้ำตกลานสาง จ. ตาก	250	AY856000	-	-
	B, D*	น้ำตกเหมืองหวด จ. สุราษฎร์ธานี	120	AY856013	-	-
	G*	บ้านนาจิว จ. แม่ฮ่องสอน	814	AY856031	-	-
		น้ำตกสวนห้อม จ. เลย	596	-	KF550200	KF550274
				-	KF550202	KF550276
		บ้านสวนห้อม จ. เลย	636	-	KF550201	KF550275
		น้ำตกห้วยต้นฝิ่ง จ. พะเยา	401	KF550255	KF550205	KF550277
				-	KF550206	KF550277
		น้ำตกเกริงกระเวีย จ. กาญจนบุรี	246	KF550247	-	-
				KF550248	-	-
		อ. พบพระ จ. ตาก	400	KF550249	-	-
				KF550250	-	-
		น้ำตกธารทอง จ. ลำปาง	700	KF550256	KF550204	KF550279
				-	KF550203	KF550278
				AY251527	-	-
				KF550251	-	-
				KF550252	-	-
				KF550253	-	-

Species	Cytoform	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (m)	Accession number		
				COI	COII	18S/ITS1
<i>Simulium yuphae</i>	อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่		680	KF550254	-	-
				KF550257	KF550207	KF550280
				KF550258	KF550207	KF550280
				KF550259	KF550207	KF550280
				-	KF550207	KF550280
	น้ำตกถ้ำใหญ่ จ. เลย		1,200	KF550260	-	-
				KF550261	-	-
	อ. แม่วังก จ. นครสวรรค์		486	KF550262	-	-
				KF550263	-	-

(ที่มา: Sriphirom et al. 2014)

ตารางที่ 15 ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทย คำนวณโดยใช้โมเดล Kimura 2-parameter

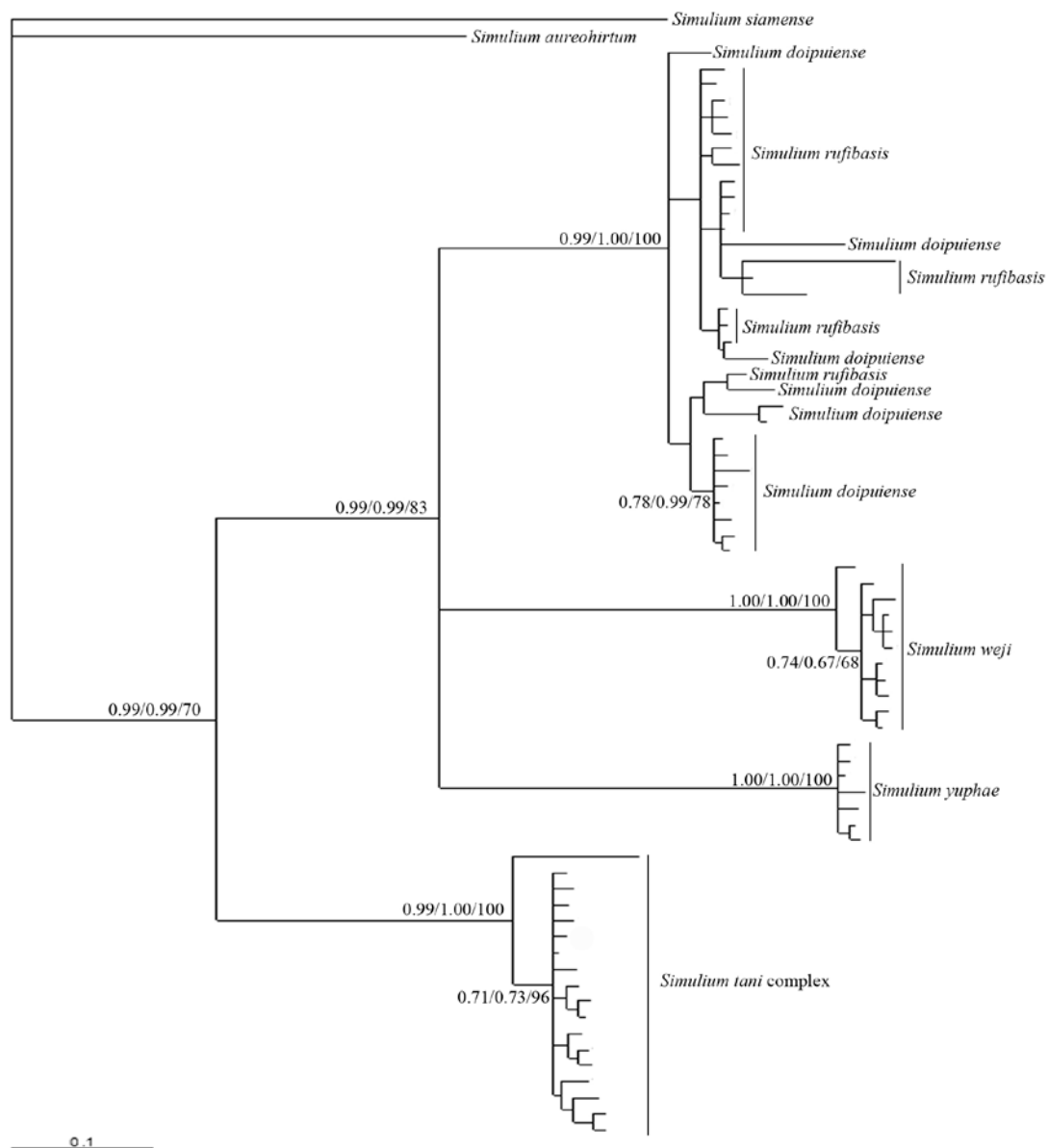
Species	Mean (%) (min.–max.)		
	COI	COII	ITS
<i>Simulium doipuiense</i>	2.28 (0 – 5.36)	2.40 (0.58 – 3.70)	0.08 (0 – 1.13)
<i>Simulium rufibasis</i>	1.82 (0.14 – 6.11)	0.77 (0.14 – 1.31)	0.09 (0 – 0.32)
<i>Simulium tani</i>	1.48 (0.14 – 4.34)	1.70 (0 – 2.49)	0.66 (0.16 – 0.97)
<i>Simulium yuphae</i>	0.36 (0 – 0.98)	0	0.07 (0 – 0.161)
<i>Simulium weji</i>	0.71 (0.14 – 1.41)	1.98 (0.14 – 5.67)	0.58 (0 – 0.97)

(ที่มา: Sriphirom et al. 2014)

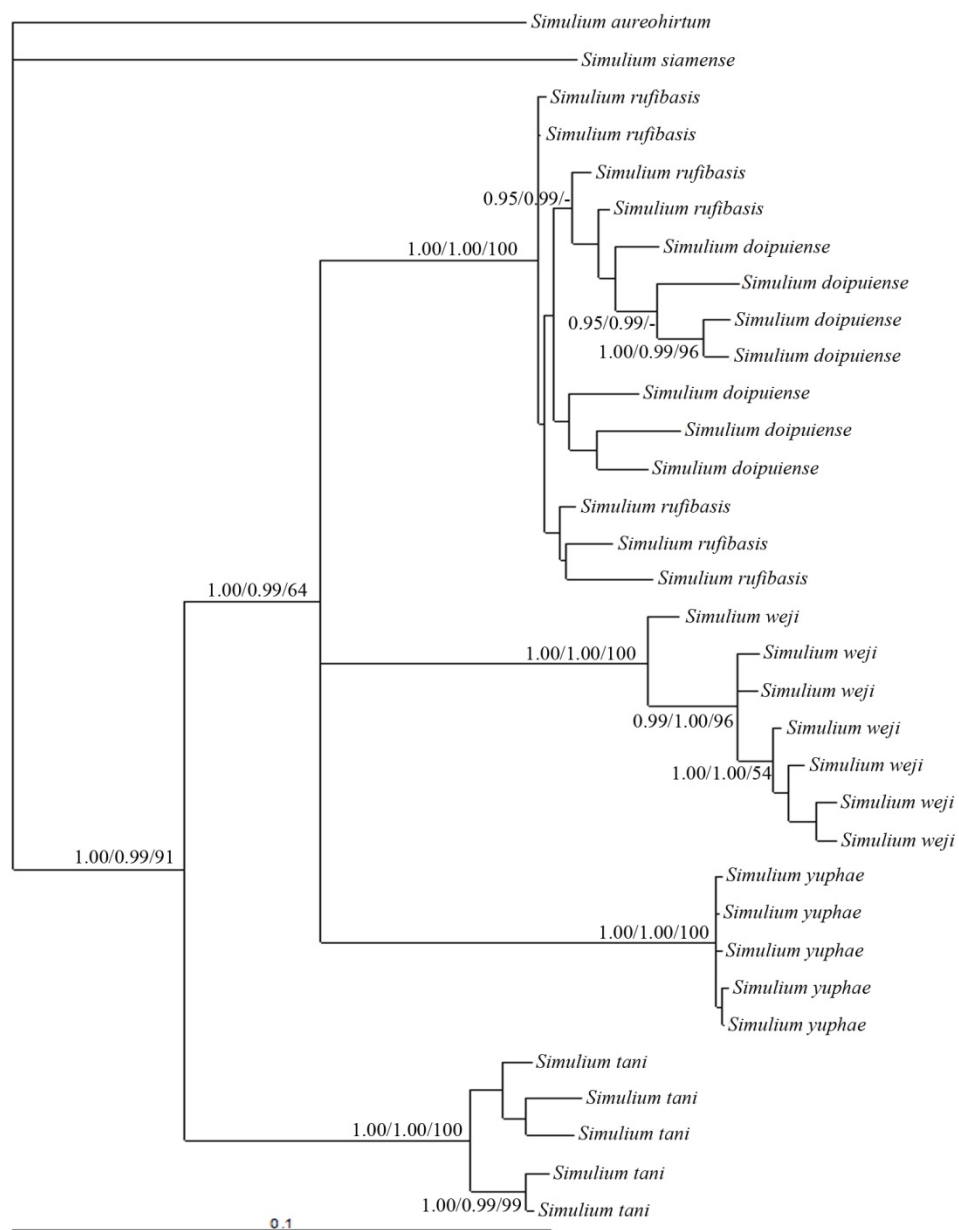
3.4.2 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทย

สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI โดยวิธีต่างๆ ได้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงแสดงเฉพาะผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bayesian analysis (ภาพที่ 12) การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 3 ยีน ด้วยวิธีการต่างๆ ได้ผลเหมือนกัน ดังนั้นจึงแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Bayesian analysis เพียงแบบเดียว (ภาพที่ 13) สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ในประเทศไทยจำนวน 5 สปีชีส์แยกเป็น 2 clades โดย clade I ประกอบด้วยแมลงรึ้นดำ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *S. doipuiense* complex, *S. rufibasis*, *S. weji* และ *S. yuphae* clade II มีแมลงรึ้นดำ *S. tani* complex เพียงสปีชีส์เดียว โดยแมลงรึ้นดำ *S. tani* complex, *S. weji* และ *S. yuphae* เป็น monophyletic species ซึ่งมีค่า bootstrap support สูง แต่แมลงรึ้นดำ *S. doipuiense* และ *S. rufibasis* เป็น polyphyletic

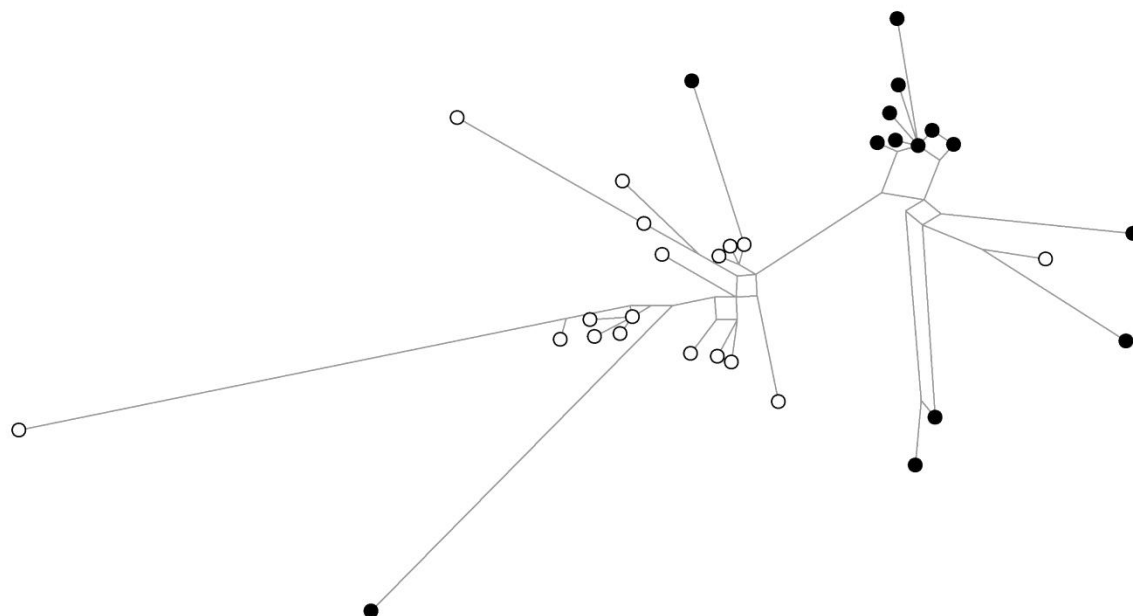
เนื่องจากการวิเคราะห์ haplotype network จะสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการได้ดีกว่า ดังนั้นเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง *S. doipuiense* complex และ *S. rufibasis* complex จึงทำการวิเคราะห์ median joining network โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างของแมลงรึ้นดำทั้งสองสปีชีส์แยกจากกันเป็นส่วนใหญ่ มีเพียง 3 แฮพโลไทป์เท่านั้นที่เชื่อมต่อกับแฮพโลไทป์ของสปีชีส์อื่น (ภาพที่ 14) ได้แก่ 2 แฮพโลไทป์ของ *S. doipuiense* complex เชื่อมกับแฮพโลไทป์ของ *S. rufibasis* และ 1 แฮพโลไทป์ของ *S. rufibasis* เชื่อมกับกลุ่มแฮพโลไทป์ของ *S. doipuiense* complex



ภาพที่ 12 Bayesian tree ของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทยสร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (ที่มา: Sriphirom et al. 2014)



ภาพที่ 13 Bayesian tree ของแมลงร้นด่ากลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทยสร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI, COII และ 18S/ITS1 (ที่มา: Sriphirom et al. 2014)



ภาพที่ 14 Median joining network ของแมลงรึ้นดำ *Simulium doipuiense* complex และ *S. rufibasis* ในประเทศไทยสร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (ที่มา: Sriphirom et al. 2014)

3.4.3 การกระจายทางภูมิศาสตร์และปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย

ข้อมูลปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ในประเทศไทย แสดงในตารางที่ 16 การวิเคราะห์ด้วยวิธี Canonical correspondence analysis (CCA) พบว่าการกระจายทางภูมิศาสตร์ของสปีชีส์มีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาสูง (>0.84) สำหรับค่า canonical axes 2 อันดับแรก (ตาราง 17) ซึ่งสอดคล้องกับ Monte Carlo permutation test ซึ่งปฏิเสธสมมติฐานว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย ($P = 0.001$) ดังนั้นผลการวิเคราะห์จึงบ่งชี้ว่าปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยที่ใช้ในการศึกษามีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับการกระจายทางภูมิศาสตร์ของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ในประเทศไทย โดยพบว่าขนาดของวัสดุพื้นลำธาร (streambed particle) และค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ (water conductivity) เป็นปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่สำคัญที่สุดของ axis I และความสูงจากระดับน้ำทะเลและความกว้างของลำธารแหล่งอาศัยเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดของ axis II (ภาพที่ 15 ตารางที่ 17) แมลงรึ้นดำ *S. doipuiense* complex อยู่ในตำแหน่งด้านซ้ายของไดอะแกรม CCA บ่งชี้ว่าแมลงรึ้นดำสปีชีส์นี้มีความสัมพันธ์กับแหล่งอาศัยที่มีวัสดุพื้นลำธารขนาดใหญ่ แมลงรึ้นดำ *S. yuphae* และ *S. rufibasis* มีความสัมพันธ์กับแหล่งอาศัยที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลมาก โดย *S. rufibasis* พบในแหล่งอาศัยที่อยู่สูงมากกว่า *S. yuphae* แมลงรึ้นดำ *S. weji* พบในแหล่งอาศัยที่มีค่าการนำไฟฟ้าของน้ำสูง แมลงรึ้นดำ *S. tani* พบในแหล่งอาศัยที่มีความกว้างและความลึกของลำธารมาก

การวิเคราะห์ข้อมูลนิเวศวิทยาด้วย Principal Component Analysis (PCA) พบว่าสามารถจัดกลุ่มของปัจจัยทางนิเวศวิทยา (principal component, PC) ได้ 3 กลุ่ม ซึ่งอธิบายความแปรปรวนที่มีจากความแปรปรวนทั้งหมด 85.39% (ตารางที่ 17) PC-1 อธิบายความแปรปรวน 47.34% มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำและอุณหภูมิของน้ำ และสัมพันธ์เชิงลบกับความสูงจากระดับน้ำทะเลและขนาดวัสดุพื้นลำธาร PC-2 อธิบายความแปรปรวนได้ 22.70% ของความแปรปรวนทั้งหมด โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ

ความกว้างและความลึกของลำธาร และสัมพันธ์เชิงลบกับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ PC-3 อธิบายความแปรปรวน 15.34% ของความแปรปรวนทั้งหมด โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความกว้างและความลึกของแหล่งน้ำ ขนาดวัสดุพื้นลำธาร และประเภทของพืชริมลำธาร (riparian vegetation) และสัมพันธ์เชิงลบกับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ (ตารางที่ 17) การวิเคราะห์ MANOVA (multivariate analysis of variance) พบว่าการกระจายของสปีชีส์มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยาตามแกน PC-1 ($F = 20.053$, $P < 0.001$) และ PC-2 ($F = 9.124$, $P < 0.001$) (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 16 ปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทย

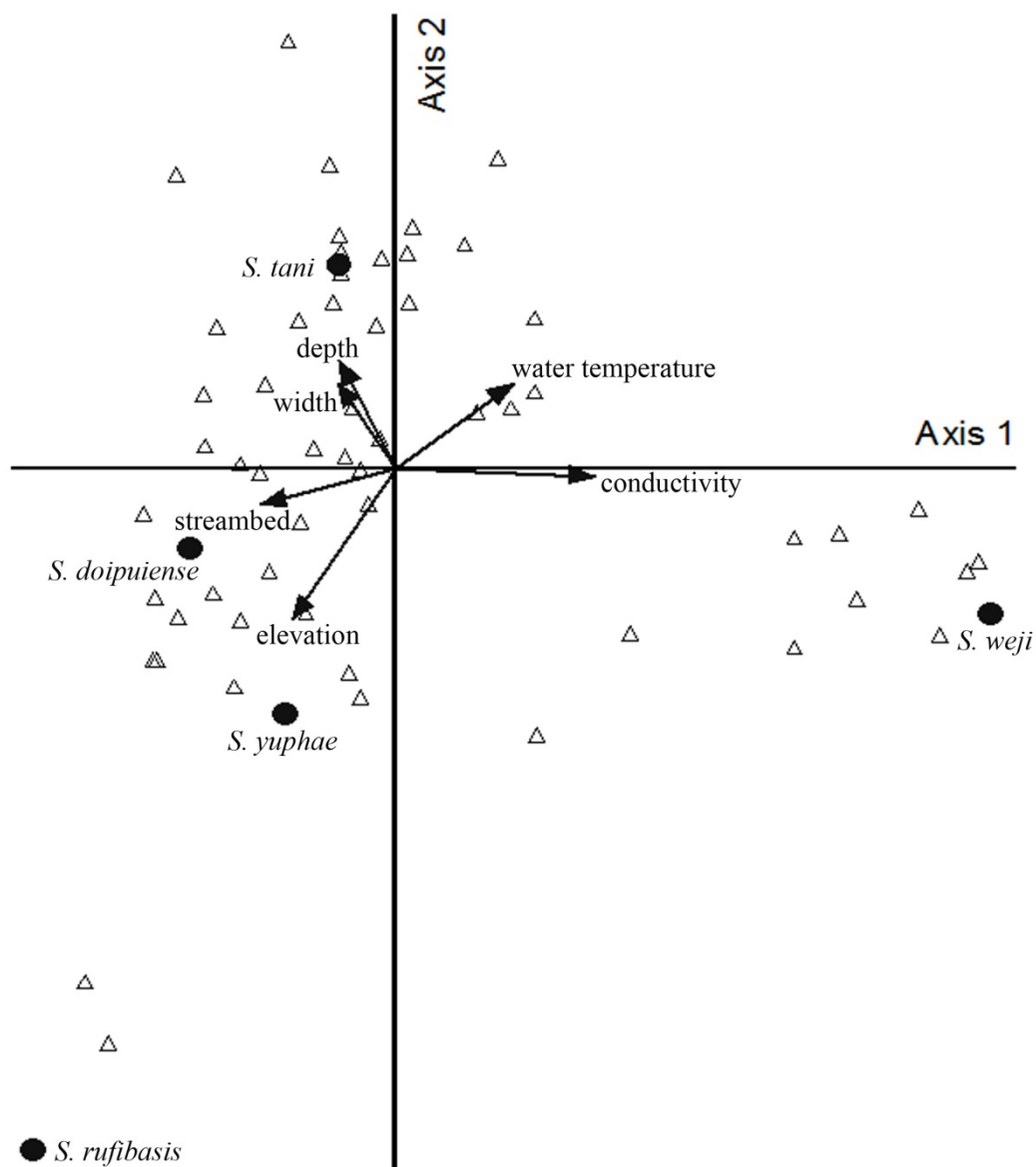
Stream variable/Species	<i>S. doipuiense</i> (n = 7)	<i>S. rufibasis</i> (n = 3)	<i>S. tani</i> (n = 28)	<i>S. weji</i> (n = 9)	<i>S. yuphae</i> (n = 9)
Altitude (m)	1116±115.20	1912.67±332.91	580.07±60.70	587.33±26.36	1209.56±80.83
mean±S.E. (min-max)	(750 – 1400)	(1250 – 2300)	(94 – 1226)	(401 – 700)	(680 – 1615)
Width (m)	2.24±0.47	2.50±0.29	3.20±0.36	1.19±0.41	1.02±0.42
mean±S.E. (min-max)	(0.73 – 4.67)	(2.00 – 3.00)	(0.22 – 7.00)	(0.13 – 3.50)	(0.17 – 4.00)
Depth (m)	0.16±0.03	0.12±0.01	0.20±0.02	0.08±0.02	0.05±0.01
mean±S.E. (min-max)	(0.05 – 0.27)	(0.10 – 0.15)	(0.06 – 0.60)	(0.02 – 0.21)	(0.01 – 0.12)
Velocity (m/s)	0.55±0.12	0.60±0.12	0.58±0.06	0.89±0.14	0.61±0.15
mean±S.E. (min-max)	(0.23 – 1.17)	(0.40 – 0.80)	(0.19 – 1.51)	(0.31 – 1.53)	(0.05 – 1.60)
pH	7.70±0.22	7.13±0.07	7.86±0.10	7.39±0.44	7.29±0.45
mean±S.E. (min-max)	(6.90 – 8.63)	(7.00 – 7.20)	(6.73 – 8.88)	(6.00 – 9.73)	(5.50 – 9.20)
Conductivity (µS/cm)	42.46±17.01	10.67±0.67	73.46±12.21	266.71±31.17	30.07±14.13
mean±S.E. (min-max)	(19.10 – 144.00)	(10.00 – 12.00)	(10.93 – 280.00)	(99.40 – 414.00)	(8.00 – 142.00)
Water temperature (°C)	17.21±1.27	15.67±1.20	22.60±0.67	24.11±0.38	18.28±0.88
mean±S.E. (min-max)	(13.40 – 22.50)	(14.00 – 18.00)	(13.50 – 27.50)	(22.40 – 26.50)	(15.00 – 23.70)
Streambed particle [*]	5 (3 – 6)	6 (5 – 6)	5 (2 – 6)	2 (1 – 6)	6 (4 – 6)
median (min-max)					
Riparian vegetation [*]	3 (1 – 3)	3 (3)	3 (1-3)	1 (1 – 3)	3 (1 – 3)
median (min-max)					

(ที่มา: Sriphirom et al. 2014)

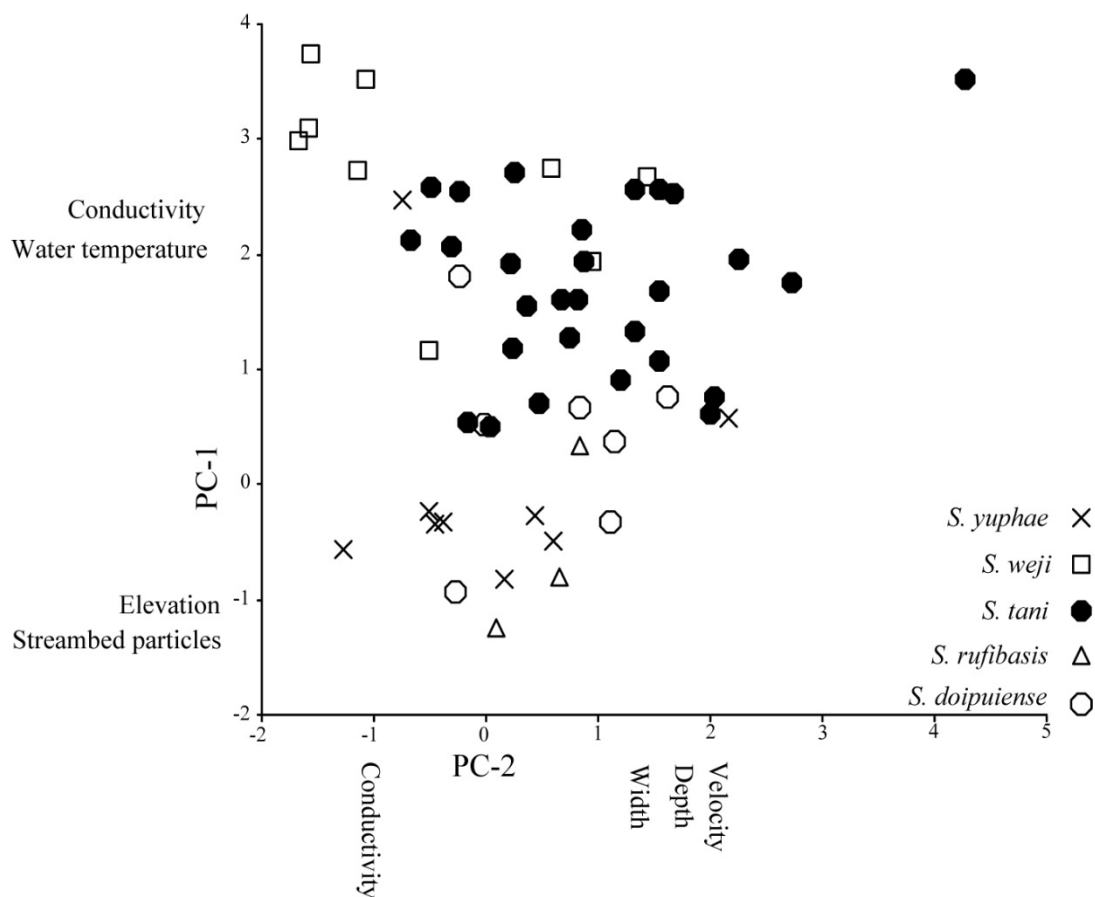
ตารางที่ 17 ค่าสถิติจากการวิเคราะห์ canonical correspondence analysis (CCA) และ principal components analysis (PCA) ของแหล่งอาศัยของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทย จำนวน 56 แห่ง

	CCA			PCA		
	Axis 1	Axis 2	Axis 3	PC-1	PC-2	PC-3
Eigenvalue	0.749	0.604	0.208	4.261	2.043	1.381
Cumulative percentage variance	20.9	16.9	5.8	47.3	22.7	15.3
Pearson's correlation for species-environment	0.873	0.849	0.477			
Spearman's correlation coefficients						
Elevation	-0.397	-0.624	-0.068	-0.803*	-0.069	0.113
Width	-0.224	0.357	-0.204	0.339	0.521*	0.475*
Depth	-0.213	0.444	-0.266	0.217	0.856*	0.776*
Velocity	0.009	0.100	-0.013	0.291	0.282*	-0.201
pH	-0.069	0.252	-0.037	0.237	-0.303	0.053
Conductivity	0.764	-0.029	-0.088	0.735*	-0.470*	-0.519*
Water temperature	0.455	0.357	0.040	0.756*	0.063	-0.339
Streambed particles	-0.523	-0.148	0.136	-0.679*	0.159	0.362*
Riparian vegetation	-0.341	-0.097	0.073	-0.189	0.045	0.555*

(ที่มา: Sriphirom et al. 2014)



ภาพที่ 15 ไดอะแกรมของ axis 1 และ axis 2 ของการวิเคราะห์ canonical correspondence analysis (CCA) ของปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย 56 แห่ง กับแมลงร้นดำกลุ่มสปิชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทย ภาพสามเหลี่ยมหมายถึงแหล่งอาศัย วงกลมหมายถึงสปิชีส์ ลูกศรแสดงปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย (ที่มา: Sriphirom et al. 2014)



ภาพที่ 16 Scatter plot ของค่า scores จากการวิเคราะห์ principal components analysis (PCA) ของปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยของแมลงร้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum* ในประเทศไทย (ที่มา: Sriphirom et al. 2014)

3.5 โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงร้นดำในประเทศไทย

ความเข้าใจต่อปัจจัยที่มีผลกระทบหรือปัจจัยที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิตเป็นเป้าหมายที่สำคัญประการหนึ่งของการศึกษานิเวศวิทยาและวิวัฒนาการ โดยทฤษฎีมีกลไกที่สำคัญ 2 กลไกที่กำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ การคัดกรองของแหล่งอาศัย (habitat filtering) (Weiher and Keddy 1995; Chesson 2000) และการแก่งแย่งทรัพยากร (competitive exclusion) (MacArthur and Levins 1967) การคัดกรองของแหล่งอาศัยและการแก่งแย่งทรัพยากรทำนายผลที่เกิดต่อโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันเกี่ยวกับลักษณะสัณฐานวิทยาและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสปีชีส์ในชุมชน การศึกษาโดยการบูรณาการข้อมูลจากนิเวศวิทยา สัณฐานวิทยา และสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งเรียกแนวทางการศึกษาว่า “การศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการ” (phylogenetic community ecology) สามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความสำคัญของกลไกดังกล่าวในการกำหนดโครงสร้างสังคมของสิ่งมีชีวิตได้ (Webb et al. 2002; Emerson and Gillespie 2008; Cavender-Bares et al. 2009; Vamosi et al. 2009) หากสปีชีส์ที่อยู่ร่วมกันในสังคมมีลักษณะสัณฐานวิทยาคลายคลึงกัน และความใกล้เคียงทางสายวิวัฒนาการอย่างมีนัยสำคัญ การคัดกรองของแหล่งอาศัยจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่กำหนดโครงสร้างสังคม แต่หากสปีชีส์ที่อยู่ร่วมกันในสังคมมีความแตกต่างของสัณฐานวิทยาและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างมี

นัยสำคัญ การแก่งแย่งทรัพยากรจะเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการกำหนดโครงสร้างสังคม (Cavender-Bares et al. 2004; Vamosi et al. 2009)

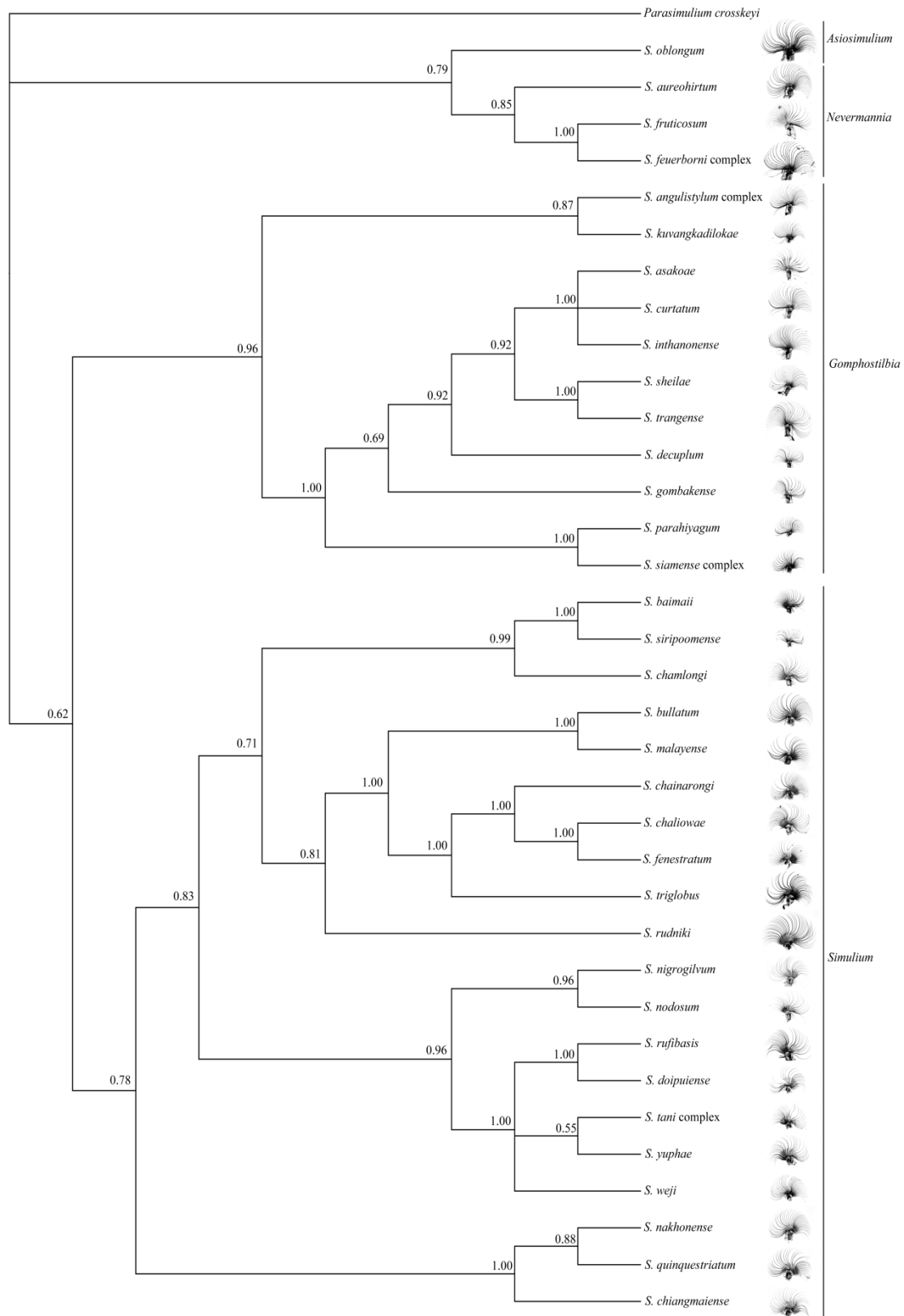
การศึกษานิเวศวิทยาของแมลงรืนดำมีความก้าวหน้าอย่างมากทั้งในประเทศไทยและภูมิภาคอื่นๆของโลก (Pramual and Kuvangkadilok 2009; Pramual and Wongpakam 2010; Hamada et al. 2002; Scheder and Waringer 2002; McCreddie et al. 2004; McCreddie and Adler 2006, 2012) แต่การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างสังคมกับสัณฐานวิทยาและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการยังมีน้อยมาก เนื่องจากองค์ความรู้ด้านอนุกรมวิธานและนิเวศวิทยาของแมลงรืนดำในประเทศไทยมีการพัฒนาดีมาก ดังนั้นแมลงรืนดำในประเทศไทยจึงเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อโครงสร้างสังคม ในการศึกษาได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างสังคม สัณฐานวิทยา และสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะสัณฐานจาก labral fan เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าลักษณะดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการกระจายทางภูมิศาสตร์และการเลือกแหล่งอาศัยของแมลงรืนดำ (Zhang and Malmqvist 1996; Palmer and Craig 2000) labral fan เป็นโครงสร้างของระยะตัวอ่อน (larva) ที่ใช้สำหรับการกรองอาหาร ประกอบด้วยเส้นแขนง (ray) จำนวนมาก ซึ่งมีขนาดและจำนวนแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ โดยสปีชีส์ที่อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความเร็วของกระแสน้ำมากจะมี labral fan ขนาดเล็ก ขณะที่สปีชีส์ที่อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความเร็วของกระแสน้ำต่ำจะมี labral fan ขนาดใหญ่ (Zhang and Malmqvist 1996; Palmer and Craig 2000) วัตถุประสงค์ของการศึกษารังนี้เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าแมลงรืนดำที่อาศัยในแหล่งอาศัยเดียวกันมีความคล้ายคลึงกันของสัณฐานวิทยาและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างมีนัยสำคัญ และเพื่อทดสอบสมมติฐานว่าลักษณะสัณฐานของ labral fan มีความสัมพันธ์กับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือไม่

3.5.1 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในประเทศไทยจำนวน 35 สปีชีส์ ที่พบในแหล่งอาศัยจำนวน 150 แห่ง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI, COII และ 18S/ITS1 ความยาว 1,875 bp ด้วยวิธี Bayesian analysis ผลการศึกษาพบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 2 clades (ภาพที่ 17) โดยแมลงรืนดำสกุลย่อย *Asiosimulium* คือ *Simulium oblongum* รวมกับสกุลย่อย *Nevermannia* ได้แก่ *S. aureohirtum*, *S. fruticosum* และ *S. feuerborni* complex อยู่ใน clade I แมลงรืนดำสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Simulium* อยู่ใน clade II ซึ่งทั้งสองสกุลย่อยแยกเป็น monophyletic clades อย่างชัดเจน

3.5.2 โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการ

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของแมลงรืนดำในแหล่งอาศัย 150 แห่ง ในประเทศไทย พบแมลงรืนดำ 35 สปีชีส์ ในแต่ละแหล่งอาศัยมีแมลงรืนดำระหว่าง 3 – 8 สปีชีส์ การวิเคราะห์โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการพบว่า 73 แห่ง (48.66%) มีค่า NRI เป็นบวก และ 77 แห่ง (51.34%) มีค่า NRI เป็นลบ ค่า NTI มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน โดยพบว่า 62 แห่ง (41.33%) มีค่า NTI เป็นบวก และ 88 แห่ง (58.67%) มีค่า NTI เป็นลบ (ตารางที่ 18) การทดสอบค่า NRI และ NTI พบว่าไม่แตกต่างจากศูนย์ (ตารางที่ 18) ดังนั้นโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในประเทศไทยไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังจากการจำลองสังคมแมลงรืนดำแบบสุ่ม (ตารางที่ 18)



ภาพที่ 17 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ Bayesian สร้างโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI, COII และ 18S/ITS1 ของแมลงร้นดำในประเทศไทยจำนวน 35 สปีชีส์ ค่า posterior probability แสดงบนแขนของสายวิวัฒนาการ และ labral fan ของแต่ละสปีชีส์แสดงใกล้ปลายสุดของสายวิวัฒนาการ (scale bar = 200 μ m) (ที่มา: Pangjanda and Pramual 2016)

ตารางที่ 18 ค่าสถิติและดัชนีสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างสังคมทางนิเวศวิทยาเชิงวิวัฒนาการและโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการจากสัญญาณวิทยาของแมลงริ้นดำในประเทศไทยจำนวน 150 แห่ง

	NRI	NTI	SES		
			Fan ray width	Fan ray length	Number of fan rays
Positive (%)	73 (48.67)	62 (41.33)	27 (18.00)	21 (16.00)	33 (22.00)
Negative (%)	77 (51.33)	88 (58.67)	123 (82.00)	126 (84.00)	117 (78.00)
Mean difference	0.063	0.059	-0.495	-0.616	-0.538
(confidence interval)	(-0.074, 0.200)	(-0.110, 0.227)	(-0.614, -0.375)	(-0.726, -0.506)	(-0.655, -0.421)
t-test	0.915	0.686	-8.209	-11.119	-9.087
P-value	0.362	0.494	<0.001	<0.001	<0.001

(ที่มา: Pangjanda and Pramual 2016)

3.5.3 โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของสัญญาณวิทยา

ค่าเฉลี่ยของลักษณะสัญญาณของ labral fan แสดงในตารางที่ 19 ลักษณะสัญญาณของ labral fan 3 ลักษณะ ประกอบด้วยจำนวนเส้นแขนง (fan ray) ความยาว และความกว้าง ของ labral fan มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 20) และสัมพันธ์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย (ตารางที่ 21) บ่งชี้ว่าลักษณะสัญญาณของ labral fan มีเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดการเลือกใช้แหล่งอาศัยของแมลงริ้นดำ การวิเคราะห์โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการจากลักษณะสัญญาณวิทยาของความกว้างของ fan ray พบว่าแหล่งอาศัย 27 แห่ง (18%) มีค่า SES เป็นบวก บ่งชี้ว่าลักษณะสัญญาณวิทยาของ labral fan ในสังคมของแมลงริ้นดำในแหล่งอาศัยเหล่านี้มีความแตกต่างกัน (overdispersed) มากกว่าค่าคาดหวังจากสังคมแบบสุ่ม แหล่งอาศัยจำนวน 123 แห่ง (82%) มีค่า SES เป็นลบ บ่งชี้ว่าลักษณะสัญญาณวิทยาของแมลงริ้นดำในแหล่งอาศัยเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกัน (clustering) มากกว่าค่าคาดหวังจากสังคมแบบสุ่ม การวิเคราะห์โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการจากลักษณะสัญญาณวิทยาของความยาวของ fan ray พบว่าแหล่งอาศัย 24 แห่ง (16%) มีค่า SES เป็นบวก บ่งชี้ว่าลักษณะสัญญาณวิทยาของ labral fan ในสังคมของแมลงริ้นดำในแหล่งอาศัยเหล่านี้มีความแตกต่างกัน (overdispersed) มากกว่าค่าคาดหวังจากสังคมแบบสุ่ม แหล่งอาศัยจำนวน 126 แห่ง (84%) มีค่า SES เป็นลบ บ่งชี้ว่าลักษณะสัญญาณวิทยาของแมลงริ้นดำในแหล่งอาศัยเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกัน (clustering) มากกว่าค่าคาดหวังจากสังคมแบบสุ่ม การวิเคราะห์โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการจากลักษณะสัญญาณวิทยาของจำนวน fan ray พบว่าแหล่งอาศัย 33 แห่ง (22%) มีค่า SES เป็นบวก บ่งชี้ว่าลักษณะสัญญาณวิทยาของจำนวน labral fan ในสังคมของแมลงริ้นดำในแหล่งอาศัยเหล่านี้มีความแตกต่างกัน (overdispersed) มากกว่าค่าคาดหวังจากสังคมแบบสุ่ม แหล่งอาศัยจำนวน 117 แห่ง (78%) มีค่า SES เป็นลบ บ่งชี้ว่าลักษณะสัญญาณวิทยาของแมลงริ้นดำในแหล่งอาศัยเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกัน (clustering) มากกว่าค่าคาดหวังจากสังคมแบบสุ่ม

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยของลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan ในแมลงรึ้นดำ 35 สปีชีส์ในประเทศไทย

Species (n) ^a	ความกว้างของ fan ray (±SE) (μm)	ความยาวของ fan ray (±SE) (μm)	จำนวน rays (±SE)
Subgenus <i>Asiosimulium</i>			
<i>S. oblongum</i> Takaoka & Choochote (62)	1516.94 (14.21)	762.90 (7.66)	42.63 (0.51)
Subgenus <i>Gomphostilbia</i>			
<i>S. angulistylum</i> Takaoka & Davies complex (42)	1032.14 (17.27)	539.29 (9.79)	33.50 (0.69)
<i>S. asakoe</i> Takaoka & Davies (66)	1202.27 (20.86)	603.41 (6.67)	37.80 (0.71)
<i>S. curtatum</i> Jitklang, Kuvangkadilok, Baimai, Takaoka & Adler (30)	1310.83 (17.23)	673.33 (9.66)	38.57 (0.36)
<i>S. decuplum</i> Takaoka & Davies (30)	924.14 (13.16)	488.79 (5.05)	29.86 (0.34)
<i>S. doipuiense</i> Takaoka & Choochote (30)	1116.67 (16.23)	583.33 (9.84)	36.97 (0.66)
<i>S. gombakense</i> Takaoka & Davies (30)	1037.93 (12.07)	532.76 (5.56)	40.97 (0.59)
<i>S. inthanonense</i> Takaoka & Suzuki (30)	1235.00 (21.73)	624.17 (10.75)	31.30 (0.56)
<i>S. kuvangkadilokae</i> Pramual & Tangkawanit (30)	820.00 (18.39)	421.67 (6.86)	33.30 (0.57)
<i>S. parahiyangum</i> Takaoka & Sigit (30)	880.00 (6.93)	441.67 (7.80)	26.73 (0.43)
<i>S. sheilae</i> Takaoka & Davies (30)	1146.55 (15.83)	547.41 (9.15)	40.48 (0.83)
<i>S. siamense</i> Takaoka & Suzuki complex (51)	1019.12 (15.04)	510.29 (7.71)	37.88 (0.83)
<i>S. trangense</i> Jitklang, Kuvangkadilok, Baimai, Takaoka & Adler (30)	1059.38 (11.14)	582.29 (11.70)	39.63 (0.53)
Subgenus <i>Nevermannia</i>			
<i>S. aureohirtum</i> Brunetti (55)	1262.27 (23.99)	619.55 (11.19)	37.22 (0.95)
<i>S. feuerborni</i> Edwards complex (30)	1298.33 (37.56)	701.67 (16.03)	35.70 (0.42)
<i>S. fruticosum</i> Takaoka & Choochote (30)	1410.00 (12.43)	739.17 (5.32)	26.40 (0.32)
Subgenus <i>Simulium</i>			
<i>S. baimaii</i> Kuvangkadilok & Takaoka (30)	1351.67 (18.76)	700.83 (7.34)	55.40 (0.48)

Species (n) ^a	ความกว้างของ fan ray (±SE) (μm)	ความยาวของ fan ray (±SE) (μm)	จำนวน rays (±SE)
<i>S. bullatum</i> Takaoka & Choochote (30)	1387.50 (27.51)	706.67 (13.34)	46.13 (0.58)
<i>S. chainarongi</i> Kuvangkadilok & Takaoka (38)	1172.37 (12.85)	590.13 (6.83)	43.61 (0.59)
<i>S. chaliowae</i> Takaoka & Bookemtong (30)	1115.83 (10.75)	555.83 (7.55)	40.00 (0.22)
<i>S. chamlongi</i> Takaoka & Suzuki (30)	631.67 (11.37)	565.83 (26.76)	41.10 (0.48)
<i>S. Chiangmaiense</i> Takaoka & Suzuki (30)	1015.00 (26.39)	570.83 (11.50)	39.23 (0.41)
<i>S. fenestratum</i> Edwards (70)	1258.93 (17.45)	596.79 (9.58)	43.03 (0.71)
<i>S. malayense</i> Takaoka & Davies (10)	1081.82 (26.56)	545.45 (16.10)	43.91 (1.54)
<i>S. nakhonense</i> Takaoka & Suzuki (61)	1052.46 (12.20)	532.17 (5.67)	40.67 (0.85)
<i>S. nigrogilvum</i> Summers (30)	1187.50 (20.08)	592.50 (9.90)	39.20 (0.88)
<i>S. nodosum</i> Puri (30)	1133.33 (7.98)	573.33 (4.31)	37.00 (0.21)
<i>S. quinquestriaum</i> Shiraki (30)	1221.67 (25.90)	613.33 (16.11)	47.43 (1.16)
<i>S. rudnicki</i> Takaoka & Davies (30)	1310.00 (34.19)	695.83 (17.21)	46.40 (1.17)
<i>S. rufibasis</i> Brunetti (30)	1335.83 (9.79)	629.17 (7.00)	43.57 (0.54)
<i>S. siripoomense</i> Takaoka & Saito (5)	418.75 (11.97)	875.00 (0.00)	37.50 (0.29)
<i>S. tani</i> Takaoka & Davies complex (30)	1024.17 (20.04)	531.67 (10.38)	32.37 (0.98)
<i>S. triglobus</i> Takaoka & Kuvangkadilok (30)	1355.83 (21.40)	620.00 (12.48)	57.00 (0.37)
<i>S. weji</i> Takaoka (30)	1021.67 (16.86)	541.67 (14.35)	36.00 (0.58)
<i>S. yuphae</i> Takaoka & Choochote (30)	1066.67 (27.63)	555.83 (13.54)	39.87 (0.74)

^aจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (ที่มา: Pangjanda and Pramual 2016)

ตารางที่ 20 ค่า Pearson correlation coefficients ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan ในแมลงวันดำ 35 สปีชีส์ในประเทศไทย

	Fan ray width	Fan ray length	Number of fan ray
Fan ray width	-		
Fan ray length	0.632*	-	
Number of fan ray	0.431*	0.317*	-

* $P < 0.01$ (ที่มา: Pangjanda and Pramual 2016)

3.5.4 Phylogenetic signal ของลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับระดับความคล้ายคลึงกันของลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความกว้าง fan ray ($P = 0.16$) และจำนวน fan ray ($P = 0.06$) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าความยาวของ fan ray มีความสัมพันธ์กับสายวิวัฒนาการอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.03$)

ตารางที่ 21 ค่า Pearson correlation coefficients ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan ในแมลงรึ้นดำ 35 สปีชีส์ กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย จำนวน 150 แห่ง ในประเทศไทย

Morphological trait	Stream variable								
	Width	Depth	Velocity	Discharge	Elevation	Conductivity	Streambed particle	Canopy cover	Riparian vegetation
Fan ray width	-0.131*	-0.139*	-0.091*	-0.161*	0.305*	0.020	0.025 ^a	-0.006 ^a	0.126* ^a
Fan ray length	-0.147*	-0.064	-0.095*	-0.133*	0.236*	0.019	-0.021 ^a	-0.010 ^a	0.090* ^a
Number of fan ray	0.032	-0.161*	0.162*	-0.149*	0.201*	0.118*	0.189* ^a	0.062 ^a	0.206* ^a

(ที่มา: Pangjanda and Pramual 2016)

4. วิจารณ์ผลการศึกษา

4.1 DNA barcode สำหรับการระบุชนิดของแมลงรึ้นดำในประเทศไทย

ข้อมูลอนุกรมวิธานมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการศึกษานิเวศวิทยาของแมลงรึ้นดำ อย่างไรก็ตาม การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงรึ้นดำมีข้อจำกัดที่สำคัญคือการระบุชนิดในหลายสปีชีส์ไม่สามารถทำได้ในระยะตัวอ่อนเนื่องจากยังขาดข้อมูลคำอธิบายลักษณะ ดังนั้นการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะสามารถช่วยในการระบุชนิดตัวอ่อนที่ยังไม่ทราบสปีชีส์ได้โดยการเชื่อมโยงข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดกับฐานข้อมูลที่มีในแมลงรึ้นดำในประเทศไทย จากการศึกษาท่อน้ำลายพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI มีประสิทธิภาพอย่างมากในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต รวมถึงการเชื่อมโยงระหว่างสปีชีส์ของแมลงที่ใช้ตัวอย่างจากระยะต่างๆ ของการเจริญพัฒนา (Miller et al. 2005; Zhou et al. 2007; Ruiter et al. 2013) ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีการนี้จะขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด จากการศึกษาในแมลงรึ้นดำในประเทศไทย และภูมิภาคอื่นๆ พบว่าเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีประสิทธิภาพสูงในการระบุชนิด (Rivera and Currie 2009; Pramual et al. 2011a; Hernandez-Triana et al. 2012; Pramual and Adler 2014) ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมลงรึ้นดำแล้ว 41 สปีชีส์ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการระบุชนิดแมลงรึ้นดำ โดยสามารถระบุชนิดได้ถูกต้องกว่า 96% (Pramual and Adler 2014) ดังนั้นจึงเป็นฐานข้อมูลสำคัญสำหรับการเชื่อมโยงดีเอ็นเอบาร์โค้ดระหว่างตัวอย่างตัวอ่อนที่ไม่ทราบสปีชีส์กับตัวอย่างที่ทราบสปีชีส์แล้ว

ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อเชื่อมโยงระหว่างตัวอย่างตัวอ่อนที่ไม่ทราบสปีชีส์กับตัวอย่างที่ทราบสปีชีส์แล้วของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium multistriatum* พบว่าตัวอย่างตัวอ่อนที่เก็บจากน้ำตกนาคูหา จ. แพร่ ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยที่รายงานการพบแมลงรึ้นดำ *S. chaliowae* เป็นครั้งแรก (Takaoka and Kuvangkadilok 1999) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI คล้ายคลึงกับตัวอย่างของ *S. chaliowae* ซึ่งรายงานก่อนหน้านี้โดยใช้ตัวอย่างจากระยะดักแด้ (Pramual and Nanork 2012) การวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยวิธีการ best match ด้วยโปรแกรม TaxonDNA จัดกลุ่มตัวอย่างตัวอ่อนที่ไม่ทราบสปีชีส์จากน้ำตกนาคูหา เป็นแมลงรึ้นดำ *S. chaliowae* ดังนั้นตัวอย่างตัวอ่อนแมลงรึ้นดำที่เก็บจากน้ำตกนาคูหา จ. แพร่ ในครั้งนี้จึงเป็นแมลงรึ้นดำ *S. chaliowae* จากการวิเคราะห์ลักษณะตัวอ่อนพบว่าแมลงรึ้นดำ *S. chaliowae* มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *S. chainarongi* Takaoka and Kuvangkadilok ซึ่งรายงานการพบในประเทศไทยเช่นเดียวกัน และคล้ายคลึงกับ *S. hirtinevis* Edwards จากประเทศมาเลเซีย (Takaoka and Davies 1995) โดยตัวอ่อนทั้ง 3 สปีชีส์มี dorsal protuberances บริเวณ abdomen อย่างไรก็ตาม *S. chaliowae* สามารถจำแนกจากสปีชีส์เหล่านี้จากการมี protuberances จาก abdomen ปล้องที่ 2 – 6 ขณะที่ *S. chainarongi* พบ protuberances จากปล้องที่ 1 – 6 (Takaoka and Kuvangkadilok 1999) ขณะที่ *S. hirtinevis* พบ protuberances บนปล้องที่ 1 – 8 (Takaoka and Davies 1995)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ส่วนที่ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ *S. bullatum* พบว่ามีความแปรผันต่ำ โดยมีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์สูงสุด 0.86% และมีค่าเฉลี่ย 0.36% ถึงแม้ว่าจะไม่มีรายงานการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงรึ้นดำ *S. bullatum* มาก่อนแต่ลักษณะของดักแด้ของแมลงรึ้นดำสปีชีส์นี้มีลักษณะเด่นที่ใช้จำแนกจากแมลงรึ้นดำสปีชีส์อื่นๆ ในกลุ่มสปีชีส์ *S. multistriatum* ได้ง่ายคือการมีก้อนใส (unpigmented organ) ขนาดใหญ่บริเวณโคนของ gill filaments จากการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนจำนวน 4 ตัวอย่าง จากแหล่งอาศัยเดียวกับดักแด้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหล่านี้รวมกลุ่มกับตัวอย่างของดักแด้จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ บ่งชี้ว่าตัวอย่างเหล่านี้เป็นสปีชีส์เดียวกัน ตัวอ่อนของ *S. bullatum* มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *S. malayense* Takaoka and Davies เนื่องจาก

postgenal cleft มีลักษณะคล้ายใบโพธิ์ และไม่พบ dorsal protuberances บริเวณ abdomen ระยะตัวอ่อนของแมลงรึ้นดำ *S. bullatum* สามารถจำแนกจาก *S. malayense* จากการมี head spot และแถบดำเข้มประมาณครึ่งหนึ่งของ cephalic apotome โดยระยะตัวอ่อนของ *S. malayense* ไม่พบลักษณะดังกล่าวโดยมี cephalic apotome สีเหลืองจาง (Takaoka and Davies 1995)

นอกจากรายงานดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ *S. chaliowae* และ *S. bullatum* ซึ่งนำไปสู่การวินิจฉัยสปีชีส์ รวมถึงการจัดทำคำอธิบายลักษณะของระยะตัวอ่อน การศึกษานี้ยังรายงานดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงรึ้นดำ *S. triglobus* เป็นครั้งแรก โดยพบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของ *S. triglobus* ต่ำ มีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์สูงสุด 1.03% และมีค่าเฉลี่ย 0.29% ซึ่งค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ต่ำ และไม่ซ้อนทับกับค่าความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ทำให้สามารถใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุสปีชีส์ของแมลงรึ้นดำ *S. triglobus* ได้อย่างถูกต้อง

จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. multistriatum* พบว่า *S. fenestratum* เป็น paraphyletic species เนื่องจากเคลดของ *S. fenestratum* รวมสปีชีส์ *S. chainarongi* และ *S. chaliowae* ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *S. fenestratum* เป็น paraphyletic species (Pramual and Nanork 2012) ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ประกอบด้วย (1) gene paralogy (2) ความแปรผันของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ไม่เพียงพอ (3) การผสมข้ามสปีชีส์ (interspecific hybridization) (4) ความไม่สมบูรณ์ของการศึกษานุกรมวิธาน (imperfect taxonomy) และ (5) ความไม่สมบูรณ์ของการคัดแยกสายวิวัฒนาการ (incomplete lineage sorting) (Funk and Omland 2003)

การศึกษาก่อนหน้าพบว่า gene paralogy ไม่ใช่สาเหตุของ species paraphyletic (Pramual and Nanork 2012) การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่พบว่ามี การแบ่งแยกของสปีชีส์อื่นๆ อย่างชัดเจน บ่งชี้ว่า ยีน COI มีความแปรผันสูงและเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สาเหตุจากความไม่สมบูรณ์ของการศึกษานุกรมวิธาน จากความผิดพลาดของการจำแนกชนิดไม่น่าใช่สาเหตุเช่นเดียวกัน เนื่องจากตัวอย่างตัวอย่างที่ศึกษาใช้ร่วมกับการศึกษาก่อนหน้าที่จำแนกชนิดโดยใช้แบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทินโครโมโซมสำหรับตัวอ่อนหรือใช้ฐานฐานวิทยาในระยะดักแด้ ซึ่งเป็นระยะที่มีความน่าเชื่อถือและแม่นยำสำหรับการระบุชนิดของแมลงรึ้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. multistriatum* ในประเทศไทย (Takaoka and Kuvangkadilok 1999; Takaoka and Choochote 2005) สาเหตุจากการผสมข้ามสายพันธุ์มีความเป็นไปได้ น้อยมาก เนื่องจากหากเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะมีแบบแผนของความใกล้ชิดระหว่างสปีชีส์ที่มาจากแหล่งอาศัยเดียวกันหรือจากภูมิภาคเดียวกัน (Funk and Omland 2003) ซึ่งไม่พบในการศึกษานี้ ดังนั้นปัจจัยที่น่าจะเป็นไปได้มากที่สุดที่ส่งผลให้ *S. fenestratum* เป็น paraphyletic species ความไม่สมบูรณ์ของการคัดแยกสายวิวัฒนาการ (Pramual and Nanork 2012) ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะพบว่าบางสปีชีส์ไม่เป็น monophyletic แต่จากการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อระบุสปีชีส์โดยใช้ระยะห่างทางพันธุกรรมพบว่าตัวอย่างสามารถระบุสปีชีส์ได้ถูกต้องทั้งหมด

ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีประสิทธิภาพอย่างมากในการเชื่อมโยงระหว่างระยะการเจริญพัฒนาต่างๆ ของแมลงรึ้นดำช่วยให้สามารถสร้างคำอธิบายลักษณะของระยะตัวอ่อนในแมลงรึ้นดำ *S. chaliowae* และ *S. triglobus* ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาในด้านต่างๆ ของแมลงรึ้นดำเหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษานิวเคลียส เนื่องจากการศึกษาต้องใช้ข้อมูลความหลากหลายของแมลงรึ้นดำในระยะตัวอ่อน

4.2 เซลล์พันธุศาสตร์และอนุพันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำ *Simulium feuerborni*

แมลงรืนดำที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์กว้างขวาง พบในแหล่งอาศัยที่หลากหลายมีความเป็นไปได้มากที่จะเป็นสปีชีส์ซับซ้อน (species complex) (Adler and McCreadie 1997) แมลงรืนดำ *S. feuerborni* พบเฉพาะในแหล่งอาศัยที่จำกัดในพื้นที่สูงเท่านั้น อย่างไรก็ตามแมลงรืนดำสปีชีส์นี้พบกระจายกว้างขวาง โดยมีรายงานการพบในประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (Adler and Crosskey 2015) การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในประเทศไทยพบว่า *S. feuerborni* เป็นสปีชีส์ซับซ้อนประกอบด้วย 2 cytoforms (A และ B) ซึ่งแตกต่างกันจากการเกิดอินเวอร์ชันความถี่คงที่หลายรูปแบบ (Pramual and Wongpakam 2013) นอกจากนี้การศึกษาในระดับอนุพันธุศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจากยีน COI พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง (Pramual and Wongpakam 2013; Pramual and Adler 2014) ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าแมลงรืนดำ *S. feuerborni* มี cytoforms เพิ่มเติม 2 cytoforms (C และ D) *S. feuerborni* cytoform C พบในประชากรจาก Cameron Highlands ประเทศมาเลเซีย โดย cytoform C จำแนกจาก cytoforms อื่นๆ จากการเกิดอินเวอร์ชันความถี่คงที่บนแขนข้างยาวของโครโมโซม III (IIIL-5) นอกจากนี้ยังพบ B chromosome ในความถี่สูง (33% - 83%) โดยปกติ B chromosome จะพบในแมลงรืนดำในเขตอบอุ่น (temperate region) (Procutner 1975; Brockhouse et al. 1989; Adler et al. 2010) ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการพบ B chromosome ในแมลงรืนดำในประเทศไทย เช่น *S. tani* complex (Tangkawanit et al. 2009a) และ *S. nakhonense* (Kuvangkadilok et al. 1999b) แต่พบในความถี่ต่ำมาก (0.5% และ 7% ตามลำดับ) ดังนั้นการพบ B chromosome ในความถี่สูงมากใน *S. feuerborni* จึงเป็นเอกลักษณ์ที่สำคัญของแมลงรืนดำในเขตร้อนชื้น ทั้งนี้อาจสัมพันธ์กับแหล่งอาศัยของแมลงรืนดำ *S. feuerborni* ซึ่งพบในที่สูง (> 1,400 เมตร จากระดับน้ำทะเล) ซึ่งมีลักษณะภูมิอากาศคล้ายคลึงกับเขตอบอุ่น ดังนั้นลักษณะสภาพภูมิอากาศของแหล่งอาศัยอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการมี B chromosome ในแมลงรืนดำ มีสมมติฐานหลายข้อเกี่ยวกับการปรากฏของ B chromosome ในประชากรของสิ่งมีชีวิต (Camacho et al. 2000) แต่การปรากฏในความถี่สูงบ่งชี้ว่า B chromosome อาจมีผลเชิงบวกต่อสิ่งมีชีวิต บทบาทของ B chromosome ในแมลงรืนดำยังไม่มีการศึกษามากนักแต่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างการมี B chromosome กับกิจกรรมทางชีววิทยาบางประการ เช่น Kachvoryan et al. (1996) พบว่าความถี่ของ B chromosome ในแมลงรืนดำ *Cnetha zakhariensis* Rubzov และ *Tetisimulium condici* มีความสัมพันธ์กับสถานะของแหล่งอาศัย Procutner (1982) พบว่าการปรากฏของ B chromosome ในแมลงรืนดำ *Cnephia dacotensis* Dyar and Shannon เพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ rRNA ส่งผลให้การเจริญพัฒนาเร็วขึ้น

แมลงรืนดำ *S. feuerborni* cytoform D พบใน Puncak เขตชาวตะวันตก ประเทศอินโดนีเซีย เนื่องจากตัวอย่าง cytoform D ห่างจากแหล่งที่เป็นแหล่งที่รายงานการพบ *S. feuerborni* เป็นครั้งแรก ประมาณ 800 กิโลเมตร ซึ่งอยู่ในเขตชาวตะวันออก (Edwards 1934) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถระบุได้ว่า *S. feuerborni* cytoform D เป็น ต้นแบบของ *S. feuerborni* หรือไม่ แมลงรืนดำ *S. feuerborni* cytoform D จำแนกจาก cytoforms อื่นๆ โดยการเกิดอินเวอร์ชันความถี่คงที่บนโครโมโซม II แขนข้างยาว (IIL-4) ซึ่งมีตำแหน่งของการเกิดอินเวอร์ชันใกล้เคียงกับอินเวอร์ชันที่มีรายงานมาก่อนใน cytoform B จากประเทศไทย (Pramual and Wongpakam 2013) ไม่พบ B chromosome ใน *S. feuerborni* cytoform D

การวิเคราะห์เปรียบเทียบปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยของตัวอ่อนแมลงรืนดำ *S. feuerborni* cytoforms ต่างๆ พบว่าแต่ละ cytoforms มีความแตกต่างของปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย โดย

S. feuerborni cytoform C พบในแหล่งอาศัยที่สูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า cytoforms อื่นๆ โดยพบในแหล่งอาศัยที่มีความสูงระหว่าง 1,405 – 1,813 เมตร จากระดับน้ำทะเล cytoform A พบที่ระดับความสูง 1,185 – 1,615 เมตร จากระดับน้ำทะเล cytoform B พบที่ระดับความสูง 950 – 1,320 เมตร จากระดับน้ำทะเล cytoform D พบที่ระดับความสูง 1,200 เมตร จากระดับน้ำทะเล นอกจากนี้ cytoform C ยังพบในแหล่งอาศัยที่มีค่า pH ต่ำกว่า cytoforms อื่นๆ โดย cytoform C พบในแหล่งน้ำที่มีค่า pH 6.60 – 7.36 ขณะที่ cytoform อื่นๆ พบในแหล่งอาศัยที่มีค่า pH มากกว่า 7.00 *S. feuerborni* cytoform C และ D พบในแหล่งน้ำไหลที่ลึกกว่า (0.05 – 0.24 เมตร) กว่า cytoform A และ B (น้อยกว่า 0.07 เมตร) (Pramual and Wongpakam 2013) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า cytoforms ของแมลงรืนดำมักพบในแหล่งอาศัยที่มีความแตกต่างของปัจจัยทางนิเวศวิทยา (Adler and McCreadie 1997; Kuvangkadilok et al. 2008; Tangkawanit et al. 2009a; Pramual and Kuvangkadilok 2012)

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับอนุพันธุ์ระหว่าง cytoforms สนับสนุนการแบ่งแยก cytoforms โดยแต่ละ cytoform มีความแตกต่างจากการวิเคราะห์ค่า F_{ST} สูง นอกจากนี้การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าการแบ่งแยกกลุ่มอย่างชัดเจนของตัวอย่างจากแต่ละ cytoform บ่งชี้ว่ามีการแบ่งแยกทางพันธุกรรมและสายวิวัฒนาการของ cytoforms เหล่านี้มายาวนาน (Avice 2000) ซึ่งสนับสนุนการศึกษาก่อนหน้าในตัวอย่าง *S. feuerborni* จากประเทศไทย (Pramual and Wongpakam 2013) ความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับสูงสอดคล้องกับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่พบว่าสามารถระบุ cytoforms ได้ถูกต้องทั้งหมด ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์สำหรับการจำแนก cytoforms ในระยะการเจริญพัฒนาอื่นๆ ซึ่งไม่สามารถศึกษาโครโมโซมได้

ผลจากการศึกษานี้พบว่ายังมีความหลากหลายซ่อนเร้นในแมลงรืนดำ *S. feuerborni* ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากแมลงรืนดำสปีชีส์นี้พบเฉพาะในแหล่งอาศัยที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเลมาก ซึ่งมีการเสนอสมมติฐานก่อนหน้านี้ว่าอาจเป็นแหล่งลี้ภัย (refugium site) สำหรับสิ่งมีชีวิตในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) (Pramual et al. 2005) ดังนั้นการศึกษายสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ของแมลงรืนดำสปีชีส์นี้จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการทำความเข้าใจบทบาทของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในยุคไพลสโตซีนต่อความหลากหลายทางชีวภาพในภูมิภาคนี้ นอกจากนี้การบูรณาการข้อมูลจากการศึกษาระดับเซลล์พันธุศาสตร์และอนุพันธุ์ศาสตร์ ทำให้สามารถเชื่อมโยงข้อมูลอนุกรมวิธานจากตัวอย่างในระยะการเจริญพัฒนาต่างๆ ได้ ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาในแมลงรืนดำที่เป็นพาหะของโรคที่สำคัญได้

4.3 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ของแมลงรืนดำ *Simulium aureohirtum*

แมลงรืนดำ *S. aureohirtum* มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวาง พบได้ทั้งในเขต Palearctic และ Oriental โดยมีรายงานการพบในประเทศอินเดีย ภูฏาน จีน เกาหลี อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น มาเลเซีย เนปาล ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ไต้หวัน และไทย (Adler and Crosskey 2015) แมลงรืนดำ *S. aureohirtum* ในประเทศไทยพบได้ในทุกภูมิภาค และพบในแหล่งอาศัยที่มีความหลากหลายของปัจจัยทางนิเวศวิทยา (Pramual et al. 2008; Pramual and Kuvangkadilok 2009) การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์พบความแปรผันของโครโมโซมสูง โดยพบอินเวอร์ชันความถี่ไม่คงที่ 14 รูปแบบ นอกจากนี้ยังพบว่าความถี่ของอินเวอร์ชันบางรูปแบบยังมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย เช่น ละติจูด ความสูงจากระดับน้ำทะเล และอุณหภูมิ บ่งชี้ว่าอินเวอร์ชันเหล่านี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการปรับตัวต่อสภาพ

นิเวศวิทยาที่แตกต่างกัน (Pramual et al. 2008) อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานว่าแมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* ในประเทศไทยเป็นสปีชีส์ซับซ้อนตามเงื่อนไขการจำแนก cytoform ของ Rothfels (1979) แต่ก็ยังไม่สามารถปฏิเสธการเป็นสปีชีส์ซับซ้อนในกรณี homosequential sibling species การวิเคราะห์ โพลีทินโครโมโซมของ *S. aureohirtum* จากเกาะกวมและเกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งห่างจากประเทศไทยประมาณ 3,500 และ 4,000 กิโลเมตร ตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเช่นกัน (Reeves and Adler 2011)

ความแปรผันทางพันธุกรรมในระดับสูงจากการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์สอดคล้องกับการศึกษาในระดับอนุพันธุศาสตร์ โดยการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากยีน COI พบว่าแมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* มีความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์สูงสุด 7.24% (Pramual and Adler 2014) ผลการศึกษาในครั้งนี้โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COII ได้ผลสอดคล้องกัน โดยพบว่า *S. aureohirtum* มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง มีค่า nucleotide diversity 0.034 ซึ่งสูงกว่าที่พบในแมลงรึ้นดำสปีชีส์ซับซ้อน เช่น *S. siamense* complex (0.0057) (Pramual et al. 2011a) *S. feuerborni* complex (0.025) (Pramual and Wongpakam 2013) และ *S. angulistylum* (0.0249) (Pramual and Kuvangkadilok 2012) ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงมากในแมลงรึ้นดำ *S. aureohirtum* เป็นผลจากการมีสายวิวัฒนาการที่แบ่งแยก 3 สาย (A, B, C) จากการวิเคราะห์โดย median joining network ซึ่งพบว่าทั้ง 3 สายวิวัฒนาการมีความสัมพันธ์กับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์บางส่วน โดยเฉพาะสายวิวัฒนาการ B ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดมาจากภาคตะวันออก

การที่ตัวอย่างของ *S. aureohirtum* จากภาคตะวันออกเกาะกลุ่มกันและแบ่งแยกจากประชากรภูมิภาคอื่นๆ โดยมีแขนของสายวิวัฒนาการสั้นเป็นลักษณะของประชากรที่แบ่งแยกจากกันไม่นาน แต่ยีนโฟลวระหว่างประชากรถูกจำกัด (Avice 2000) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ยีนโฟลวระหว่างประชากรที่พบว่าเกิดการเกิดยีนโฟลวจากประชากรภูมิภาคอื่นๆ มายังภาคตะวันออกลittle น้อยมาก ขณะที่ยีนโฟลวจากภาคตะวันออกไปยังภาคอื่นไม่เกิดขึ้นเลย ความแตกต่างของปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยเป็นมูลเหตุที่ทำให้เกิดการจำกัดของยีนโฟลวระหว่างประชากรในแมลงรึ้นดำภาคตะวันออกกับภูมิภาคอื่นๆ ในแมลงรึ้นดำ *S. tani* (Pramual et al. 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่ศึกษา ได้แก่ ความกว้าง ความลึก ของลำธาร ความเร็วของกระแสน้ำ ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ อุณหภูมิของน้ำ pH ขนาดวัสดุพื้นลำธาร การปกคลุมเรือนยอด และประเภทพรรณไม้ริมลำธาร ไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากรของ *S. aureohirtum* ในภาคตะวันออกและภาคอื่นๆ ของประเทศไทย อย่างไรก็ตามหากพิจารณาจากปัจจัยทางนิเวศวิทยาในระดับมหภาคพื้นที่ภาคตะวันออกมีลักษณะแตกต่างจากภาคอื่นๆ อย่างชัดเจน โดยภาคตะวันออกของประเทศไทยจัดอยู่ในเขตนิเวศ (ecoregion) Cardamom Mountains rainforest ขณะที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือจัดอยู่ในเขต broadleaf forest มีรายงานการศึกษาในแมลงรึ้นดำหลายชิ้นที่พบว่าการกระจายทางภูมิศาสตร์มีความสัมพันธ์กับเขตนิเวศ เช่น ซิบลิงสปีชีส์ของสปีชีส์ซับซ้อน *S. tuberosum* complex ในอเมริกาเหนือพบในเขตนิเวศที่แตกต่างกัน (Adler and McCreadie 1997) และซิบลิงสปีชีส์ของ *S. damnosum* complex มีความสัมพันธ์กับเขตสะวันนาและป่า ของแอฟริกา (Boakye et al. 1998) ความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายของซิบลิงสปีชีส์กับเขตนิเวศบ่งชี้ว่าการเกิดยีนโฟลวระหว่างเขตนิเวศสามารถถูกจำกัดได้ ผลการศึกษานี้สนับสนุนสมมติฐานเรื่องความแตกต่างของปัจจัยทางนิเวศวิทยากับการส่งเสริมให้เกิดการแตกแขนงของสปีชีส์ได้

สายวิวัฒนาการ C มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายวิวัฒนาการอื่นๆ มากที่สุด โดยมีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมจากสายวิวัฒนาการ A 7% และสายวิวัฒนาการ B 9.4% ขณะที่สายวิวัฒนาการ A กับ

B มีความแตกต่างกันเพียง 3.2% ความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับสูงบ่งชี้ว่าสายวิวัฒนาการเหล่านี้อาจเป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์แบบแผนการเรียงตัวของแบนด์โพลีทินโครโมโซมไม่พบความแตกต่าง สมาชิกของสายวิวัฒนาการ A และ C พบในพื้นที่เดียวกัน (sympatric) โดยเป็นตัวอย่างที่มาจากประชากรภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก การที่ประชากรจากพื้นที่เดียวกันมีการแบ่งแยกสายวิวัฒนาการเป็นคุณลักษณะของประชากรที่เกิดจากการผสมผสาน (admixture) ของสมาชิกที่เคยแบ่งแยกกันมาก่อนในอดีต (Avice 2000) ในประเทศไทยไม่มีเหตุการณ์ vicariance ที่จะนำไปสู่การแบ่งแยกทางภูมิศาสตร์ของประชากรอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการศึกษาทั้งในพืชและสัตว์หลายชนิดบ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศในยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) ส่งผลต่อโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมถึงประวัติศาสตร์ประชากรของสิ่งมีชีวิตในภูมิภาคนี้ (Cannon and Manos 2003; Pramual et al. 2005; O'Loughlin et al. 2008; Morgan et al. 2010; 2011) ในยุคไพลสโตซีนสภาพภูมิอากาศจะมีความแห้งแล้งและอุณหภูมิต่ำกว่าปัจจุบัน (Voris 2000; Penny 2001) ดังนั้นแหล่งน้ำไหลซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของแมลงรืนดำอาจแห้งเป็นส่วนใหญ่ โดยอาจมีบางส่วนคงเหลือเนื่องจากมีหลักฐานว่ามีความชื้นเพียงพอในพื้นที่เขาสูง (Gathorne-Dardy et al. 2002) ดังนั้นพื้นที่เขาสูงในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก อาจเป็นแหล่งอาศัยของรืนดำในยุคแห้งแล้งของไพลสโตซีน (Pramual et al. 2005; Pramual et al. 2011a) จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบโครงข่ายแฮฟโฟลโทปีพบว่าตัวอย่างจากภาคตะวันตกในจังหวัดกาญจนบุรี ภาคเหนือจากจังหวัดน่าน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือจากจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งมาจากพื้นที่ที่เทือกเขาสูงอยู่เป็นแกนของสายวิวัฒนาการสนับสนุนสมมติฐานดังกล่าว นอกจากนี้การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรยังพบว่าเกิดการขยายขนาดของประชากรอย่างรวดเร็วในทั้ง 3 สายวิวัฒนาการซึ่งเกิดในช่วงปลายยุคไพลสโตซีน (ประมาณ 18,000 ปี ที่ผ่านมา) สนับสนุนแนวคิดนี้

แม้ว่าประชากรของ *S. aureohirtum* จะมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงและมีการแบ่งแยกสายวิวัฒนาการ 3 สาย แต่การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรพบที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต่ำ โดยการวิเคราะห์ค่า F_{ST} พบว่าจากจำนวน 91 คู่ที่เปรียบเทียบระหว่างประชากร มีเพียง 13 คู่ เท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับต่ำระหว่างประชากรของ *S. aureohirtum* อาจเป็นผลจากทั้งปัจจัยในปัจจุบันและประวัติศาสตร์ประชากร การตรวจสอบพบการขยายขนาดของประชากรอย่างรวดเร็วในอดีตในยุคปลายของไพลสโตซีนประมาณ 18,000 ปี ที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าประชากรมีประวัติศาสตร์ร่วมกันเมื่อไม่นานที่ผ่านมา นอกจากนี้การศึกษานิเวศวิทยายังพบว่าแมลงรืนดำ *S. aureohirtum* สามารถใช้แหล่งอาศัยได้หลากหลาย รวมถึงปรับตัวได้ดีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแหล่งอาศัยจากกิจกรรมของมนุษย์ ดังนั้นแมลงรืนดำสปีชีส์นี้จึงพบได้ทั้งในพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรม ส่งผลให้แหล่งอาศัยของ *S. aureohirtum* มีความต่อเนื่องและส่งเสริมการเกยยีนโฟลระหว่างประชากร ซึ่งแตกต่างจากสปีชีส์ที่พบเฉพาะในพื้นที่ป่า เช่น *S. angulistylum* ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสูง (Pramual and Kuvangkadilok 2012) ขณะที่สปีชีส์ที่พบทั้งในพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรมมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต่ำ เช่น *S. siamense* (Pramual et al. 2011a)

ผลจากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่า *S. aureohirtum* ควรพิจารณาเป็นสปีชีส์ซับซ้อนเนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงรวมถึงมีสายวิวัฒนาการที่แบ่งแยกกันชัดเจน เนื่องจากสายวิวัฒนาการเหล่านี้ไม่สามารถตรวจสอบได้จากการศึกษาสัณฐานวิทยาและเซลล์พันธุศาสตร์ ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงบ่งชี้ว่าการศึกษาลักษณะทางชีวภาพของแมลงรืนดำจำเป็นต้องบูรณาการข้อมูลจากหลากหลายแหล่ง ความ

หลากหลายของแมลงรืนดำ *S. aureohirtum* พบว่าเป็นผลจากทั้งปัจจัยในปัจจุบัน เช่น ความแตกต่างของปัจจัยทางนิเวศวิทยาระหว่างภูมิภาค และการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในอดีต โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลกในยุคไพลสโตซีน ซึ่งน่าจะมีผลกระทบที่สำคัญต่อความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย

4.4 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium tuberosum*

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากหลายยีนพบว่าแมลงรืนดำ 3 สปีชีส์ในกลุ่มสปีชีส์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ได้แก่ *S. doipuiense* complex, *S. rufibasis* และ *S. tani* complex ค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ของแมลงรืนดำเหล่านี้มีค่าใกล้เคียงกับที่รายงานในแมลงรืนดำสปีชีส์ซับซ้อนในอเมริกาเหนือ (Rivera and Currie 2009) ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องและสนับสนุนการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ที่รายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าแมลงรืนดำ *S. doipuiense* และ *S. tani* เป็นสปีชีส์ซับซ้อน ประกอบด้วย 2 cytoforms และ 10 cytoforms ตามลำดับ (Tangkawanit et al. 2009a) อย่างไรก็ตามค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงมากและสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกันในแมลงรืนดำ *S. rufibasis* ขัดแย้งกับผลการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมต่ำมาก โดยพบอินเวอร์ชันความถี่ไม่คงที่เพียงรูปแบบเดียวซึ่งมีความถี่ต่ำในประชากร (Tangkawanit et al. 2009a) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่ายังมีความหลากหลายที่ซ่อนเร้นในแมลงรืนดำที่ยังไม่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการศึกษารูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแมลงรืนดำจำเป็นต้องใช้การบูรณาการผลจากการศึกษาด้วยวิธีการที่หลากหลาย (Adler and Huang 2011; Pramual and Kuvangkadilok 2012)

แมลงรืนดำ *S. yuphae* มีความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ต่ำที่สุด แม้ว่าตัวอย่างที่ศึกษานี้จะเก็บมาจากแหล่งอาศัยที่หลากหลายจากทั้งภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีระยะห่างทางภูมิศาสตร์มากกว่า 500 กิโลเมตร ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำในแมลงรืนดำ *S. yuphae* อาจเกี่ยวข้องกับนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย โดยแมลงรืนดำสปีชีส์นี้นักพบในแหล่งน้ำไหลที่มีขนาดเล็กซึ่งมีโอกาสสูงที่จะแห้งขอดในฤดูแล้ง แต่มีน้ำไหลอีกครั้งในฤดูฝน ดังนั้นประชากรของ *S. yuphae* น่าจะมีลักษณะที่เป็นวัฏจักรของการสูญพันธุ์จากแหล่งอาศัยในฤดูแล้งและก่อตั้งประชากรใหม่ในฤดูฝน (local extinction – recolonization) ซึ่งจะส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรลดลง (Pannell and Charlesworth 2000) นอกจากนี้การศึกษาในแมลงรืนดำสปีชีส์อื่นๆ ในประเทศไทยยังพบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรยังอาจได้รับผลกระทบจากประวัติศาสตร์ประชากร โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมของโลกในยุคไพลสโตซีน เช่น ในแมลงรืนดำ *S. siamense* (Pramual et al. 2001a) อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของจำนวนตัวอย่างในการศึกษานี้ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ของประชากรได้

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ในประเทศไทยโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและเซลล์พันธุศาสตร์ได้ผลที่สอดคล้องกัน คือ สายวิวัฒนาการของแมลงรืนดำกลุ่มนี้แยกเป็น 2 กลุ่ม โดย *S. tani* แยกจากแมลงรืนดำสปีชีส์อื่นๆ (Tangkawanit et al. 2009a,b) ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมระดับอนุพันธุศาสตร์ได้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาโดยสัณฐานวิทยาและเซลล์พันธุศาสตร์ แมลงรืนดำ *S. tani* complex แยกจากสปีชีส์อื่นๆ อย่างชัดเจน ความแตกต่างของแมลงรืนดำ *S. tani* complex จากแมลงรืนดำสปีชีส์อื่นๆ สอดคล้องกับลักษณะ

สัณฐานวิทยาเนื่องจาก *S. tani* complex มีลักษณะ terminal hook ในระยะดักแด้ ซึ่งไม่พบในแมลงรึ้นดำสปีชีส์อื่นๆ ในกลุ่ม *S. tuberosum* (Tangkawanit et al. 2009b)

ในระดับสปีชีส์พบว่าแมลงรึ้นดำ *S. tani* complex, *S. weji* และ *S. yuphae* เป็น monophyletic species และมีค่า bootstrap support สูง แมลงรึ้นดำ *S. rufibasis* และ *S. doipuiense* เป็น polyphyletic species ตัวอย่างของแมลงรึ้นดำทั้งสองสปีชีส์รวมอยู่ในคลดเดียวกันและมีค่า bootstrap support สูง ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาและเซลล์พันธุศาสตร์ที่พบว่าแมลงรึ้นดำ *S. doipuiense* complex และ *S. rufibasis* มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการมากที่สุด มีความเป็นไปได้หลายประการสำหรับการอธิบายสาเหตุที่ทั้งสองสปีชีส์ไม่เป็น monophyletic species ได้แก่ (1) gene paralogy (2) การผสมข้ามสปีชีส์ (interspecific hybridization) (3) ความไม่สมบูรณ์ของอนุกรมวิธาน (imperfect taxonomy) (4) ความแปรผันของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ศึกษาไม่เพียงพอ และ (5) ความไม่สมบูรณ์ของการคัดแยกสายวิวัฒนาการ (incomplete lineage sorting) (Funk and Omland 2003)

Gene paralogy ไม่น่าจะเป็นสาเหตุของการไม่เป็น monophyletic species เนื่องจากไม่พบความถี่ผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง (nonsynonymous substitutions) การแทรกสอด/การขาดหาย (indel) การกลายแบบเลื่อนกรอบแปลรหัส (frameshift mutation) หรือรหัสหยุด (stop codon) ในส่วนของยีนที่ศึกษา (Funk and Omland 2003; Conflitti et al. 2010, 2012) การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์จากตัวอย่างที่เก็บในพื้นที่เดียวกันหรือจากแหล่งอาศัยเดียวกันไม่พบหลักฐานของการผสมข้ามสปีชีส์ (Tangkawanit et al. 2009a) การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์โดยใช้โครงข่ายแฮพโลไทป์ (haplotype network) จากตัวอย่าง 32 ตัวอย่างของ *S. doipuiense* complex และ *S. rufibasis* พบว่าทั้ง 2 สปีชีส์ไม่ได้แยกจากกันทั้งหมด สอดคล้องกับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แต่พบการแยกกันเป็นส่วนใหญ่ มีเพียง 3 ตัวอย่างเท่านั้นที่เกาะกลุ่มกับสปีชีส์อื่น ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่าความไม่สมบูรณ์ของการคัดแยกสายวิวัฒนาการน่าจะเป็นสาเหตุของการไม่เป็น monophyletic species เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าวจึงทำการวิเคราะห์ช่วงเวลาของการแบ่งแยกสายวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำทั้ง 2 สปีชีส์โดยใช้โปรแกรม MDIV (Nielsen and Wakeley 2001) ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าการเกิดยีนโพลีระหว่างสปีชีส์ต่ำมาก ($M = 0.6$) ค่า effective population size (N_e) มีค่า 1,240,000 ตัว ซึ่งมีค่าประมาณ 2 เท่าของช่วงเวลา 2 สปีชีส์แยกจากกัน (divergence time) คือประมาณ 568,000 ปี ที่ผ่านมา เนื่องจากโอกาสที่สปีชีส์จะเป็น monophyletic species มีความเป็นไปได้สูงถ้าช่วงเวลา 2 สปีชีส์แยกสายวิวัฒนาการกันเกินกว่า 4 เท่าของ effective population size ($4N_e$) ดังนั้นผลการวิเคราะห์นี้จึงสนับสนุนแนวคิดที่ว่าความไม่สมบูรณ์ของการคัดแยกสายวิวัฒนาการน่าจะเป็นสาเหตุของการไม่เป็น monophyletic species นอกจากนี้ความแปรผันของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ศึกษาไม่เพียงพอเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้สปีชีส์ไม่เป็น monophyletic ได้ (Funk and Omland 2003) เช่นที่พบในการศึกษาในแมลงรึ้นดำที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ (Conflitti et al. 2010, 2012) ถึงแม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไมโทคอนเดรียที่ใช้ศึกษาในการศึกษานี้มีความแปรผันสูง และสามารถแยกสปีชีส์ 3 สปีชีส์ประกอบด้วย *S. tani* complex, *S. weji* และ *S. yuphae* ได้อย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถแยก *S. doipuiense* complex และ *S. rufibasis* ได้ การมีค่า bootstrap support ที่ต่ำ ($< 50\%$) ภายในกลุ่มที่ไม่เป็น monophyletic clade บ่งชี้ว่าความแปรผันของเครื่องหมายพันธุกรรมในการศึกษานี้ อาจไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการมาก (Conflitti et al. 2012)

การปรับตัวของแมลงรึ้นดำต่อสภาพนิเวศวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอินเวอร์ชันของโครโมโซมเป็นกลไกที่เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญต่อการแตกแขนงของสปีชีส์และการวิวัฒนาการของแมลงรึ้นดำ (Rothfel 1989)

การศึกษาต่อมาพบว่าสภาพนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยมีบทบาทที่สำคัญต่อการวิวัฒนาการของแมลงรืนดำ เช่น การปรับตัวจากการใช้แหล่งอาศัยแบบน้ำตก (cascade) เป็นลำธารหรือแม่น้ำ เป็นกลไกสำคัญต่อการแตกแขนงของสปีชีส์และวิวัฒนาการของแมลงรืนดำใน Society Islands (Joy and Conn 2001; Joy et al. 2007) การปรับตัวต่อปัจจัยทางนิเวศวิทยาอื่นๆ ที่แตกต่างกัน เช่น ความสูงจากระดับน้ำทะเล ความเร็วของกระแสน้ำ และค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างของสปีชีส์ในแมลงรืนดำในประเทศไทย (Pramual and Nanork 2012; Pramual et al. 2012) แมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ในประเทศไทยมีความแตกต่างของปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย การวิเคราะห์ CCA พบว่าแต่ละสปีชีส์มีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่ต่างกัน นอกจากนี้การวิเคราะห์ MANOVA ยังพบว่าแต่ละสปีชีส์มีการกระจายตามปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แมลงรืนดำ *S. rufibasis* มีความสัมพันธ์กับแหล่งอาศัยที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเลมาก (>1,200 เมตร) (Tangkawanit et al. 2009a) แมลงรืนดำ *S. yuphae* พบในแหล่งอาศัยที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเลมากแต่อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า *S. rufibasis* แมลงรืนดำ *S. weji* พบกระจายเฉพาะในแหล่งอาศัยที่เป็นน้ำตกซึ่งมีปริมาณหินปูนมาก (Takaoka 2001) ซึ่งแหล่งอาศัยลักษณะนี้จะมีค่าการนำไฟฟ้าของน้ำสูง ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายทางภูมิศาสตร์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยในแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* นี้ สนับสนุนแนวคิดเกี่ยวกับการปรับตัวต่อสภาพนิเวศวิทยาที่ต่างกันและการแตกแขนงของสปีชีส์ในแมลงรืนดำ ความแปรผันของโครโมโซมที่พบมากในแมลงรืนดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ในประเทศไทย (Tangkawanit et al. 2009a) อาจเป็นไปได้ที่บางอินเวอร์ชันเกี่ยวข้องกับการปรับตัวต่อสภาพนิเวศวิทยาและทำให้สปีชีส์แต่ละสปีชีส์ใช้ประโยชน์จากแหล่งอาศัยที่ต่างกัน เนื่องจากอินเวอร์ชันหลายอินเวอร์ชันพบเฉพาะในบางสปีชีส์หรือ cytoform เท่านั้น ซึ่ง cytoforms เหล่านี้มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยา (Pramual et al. 2005; Tangkawanit et al. 2009a) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าความแตกต่างของโครโมโซมนำไปสู่การปรับตัวต่อสภาพนิเวศวิทยาที่ต่างกันหรือความแตกต่างของสภาพนิเวศวิทยาส่งผลให้โครโมโซมแตกต่างกัน

4.5 โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำในประเทศไทย

ผลการศึกษาโครงสร้างสังคมของแมลงรืนดำในประเทศไทยบ่งชี้ว่าโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำไม่ได้โน้มเอียงไปทางความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic clustering) หรือความแตกต่างทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic overdispersion) กล่าวคือแมลงรืนดำที่อาศัยในแหล่งอาศัยเดียวกันไม่ได้มีแนวโน้มที่เป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันหรือแตกต่างกันทางสายวิวัฒนาการอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างสังคมโดยพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าแมลงรืนดำที่อาศัยในแหล่งอาศัยเดียวกันมีความคล้ายคลึงกันของลักษณะสัณฐานวิทยาอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าแหล่งอาศัยกว่า 78% มีแมลงรืนดำที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากกว่าค่าคาดหวังจากสังคมแบบสุ่ม ซึ่งบ่งชี้ว่าการคัดกรองของแหล่งอาศัย (habitat filtering) เป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงรืนดำ ผลการศึกษานี้ขัดแย้งกับแนวคิดที่ว่าสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกันจะมีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ (Webb et al. 2002; Emerson and Gillespie 2008) ดังนั้นสปีชีส์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันควรมีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ อย่างไรก็ตามการคัดกรองของแหล่งอาศัยในบางกรณีอาจไม่สัมพันธ์กับความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการของสปีชีส์ในแหล่งอาศัยถ้าลักษณะที่สัมพันธ์กับการใช้แหล่งอาศัยเป็นลักษณะวิวัฒนาการเข้าหา (convergent evolution) (Losos et al. 2003; Cavender-Bares et al. 2004; Kraft et al. 2007) การศึกษาก่อนหน้าในแมลงรืนดำพบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan

ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับสายวิวัฒนาการของสปีชีส์ (Zhang and Malmqvist 1996; Palmer and Craig 2000; Joy and Conn 2001) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ labral fan กับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในครั้งนี้นี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า โดยพบว่าความกว้างและจำนวน fan ray ไม่มีความสัมพันธ์กับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสปีชีส์ ซึ่งผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าการวิวัฒนาการเข้าหาอาจเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan ของแมลงวันดำ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan กับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าแมลงวันดำที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการอาจมีลักษณะ labral fan ที่แตกต่างกันได้ ซึ่งความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan ส่งผลให้สปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการสามารถใช้แหล่งอาศัยที่แตกต่างกันได้ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างของสปีชีส์ (Zhang and Malmqvist 1996; Joy and Conn 2001) เช่น แมลงวันดำที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ 2 สปีชีส์ในประเทศไทยในสกุลย่อย *Gomphostilbia* คือ *S. inthanonense* Takaoka and Suzuki และ *S. curtatum* Jitklang, Kuvangkadilok, Baimai, Takaoka and Adler ซึ่งพบในแหล่งอาศัยที่สูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,000 เมตร เช่นกัน แต่แตกต่างกันเนื่องจากแมลงวันดำ *S. inthanonense* พบในแหล่งน้ำไหลที่มีความเร็วของกระแสน้ำต่ำ (0.23 เมตร/วินาที) ขณะที่ *S. curtatum* พบในแหล่งอาศัยที่มีความเร็วของกระแสน้ำสูงกว่า (0.49 เมตร/วินาที) (Pramual et al. 2012) การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของ labral fan พบว่าแมลงวันดำทั้ง 2 สปีชีส์มีความแตกต่างของลักษณะ labral fan อย่างมีนัยสำคัญ โดยแมลงวันดำ *S. curtatum* มีขนาด labral fan เล็กกว่า *S. inthanonense* ซึ่งสัมพันธ์กับความเร็วของกระแสน้ำของแหล่งอาศัยที่ต่างกัน โดยสปีชีส์ที่อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความเร็วมากกว่าจะมีขนาด labral fan เล็กกว่า เนื่องจากแมลงวันดำทั้งสองสปีชีส์มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ (Pramual et al. 2012) ความแตกต่างของแหล่งอาศัยเนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาอาจเป็นมูลเหตุที่ส่งเสริมให้เกิดการแตกแขนงของสปีชีส์ของแมลงวันดำได้ (Joy and Conn 2001; Pramual et al. 2012)

ผลการศึกษาก่อนหน้ารวมถึงผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า labral fan มีความสัมพันธ์กับความเร็วของกระแสน้ำของแหล่งอาศัย (Zhang and Malmqvist 1996; Malmqvist et al. 1999; Palmer and Craig 2000) และบ่งชี้ว่าความเร็วของกระแสน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเลือกแหล่งอาศัยของแมลงวันดำ (Palmer and Craig 2000) การที่แมลงวันดำที่อาศัยในแหล่งอาศัยเดียวกันมีลักษณะ labral fan เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันบ่งชี้ว่าปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยเป็นปัจจัยที่คัดกรองสปีชีส์ ดังนั้นความเร็วของกระแสน้ำจึงอาจเป็นปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่สำคัญที่สุดที่คัดกรองสปีชีส์ของแมลงวันดำในแหล่งอาศัย ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าหลายชิ้น เช่น Pramual and Wongpakam (2010) พบว่าแมลงวันดำที่ต้องการปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่คล้ายคลึงกันจะอาศัยร่วมกันในแหล่งอาศัยเดียวกัน Malmqvist et al. (1999) พบว่าโครงสร้างสังคมของแมลงวันดำในประเทศสวีเดนมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย ได้แก่ ความกว้าง ความลึก ของลำธาร ความเร็วของกระแสน้ำ และขนาดของวัสดุพื้นลำธาร McCreadie and Adler (2006) พบว่าโครงสร้างสังคมของแมลงวันดำในทวีปอเมริกาเหนือถูกกำหนดโดยปัจจัยทางนิเวศวิทยา ประกอบด้วย pH ความเร็วของกระแสน้ำ และขนาดวัสดุพื้นลำธาร

ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่าปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการกำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงวันดำ ดังนั้นการคัดกรองของแหล่งอาศัยจึงเป็นกลไกสำคัญที่กำหนดโครงสร้างสังคมของแมลงวันดำในประเทศไทย อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พิจารณาจากข้อมูลที่เก็บเฉพาะทางภูมิศาสตร์แต่

ยังขาดข้อมูลช่วงเวลาหรือฤดูกาล ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อโครงสร้างสังคมของแมลงร้นดำได้เช่นกัน (Pramual and Wongpakam 2010; McCreadie and Adler 2012) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นดังกล่าว ผลการศึกษาครั้งนี้ยังบ่งชี้ว่าความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากแหล่งอาศัยอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมให้เกิดการแตกแขนงของสปีชีส์ในแมลงร้นดำได้

4.6 สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ทำการศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงร้นดำในประเทศไทย ซึ่งพบว่ามีข้อจำกัดที่สำคัญในการศึกษาคือข้อมูลอนุกรมวิธานของแมลงร้นดำบางสปีชีส์ยังไม่ครบถ้วนในระยะตัวอ่อนซึ่งเป็นระยะที่ใช้ในการศึกษานิเวศวิทยา อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงร้นดำในประเทศไทยทำให้ฐานข้อมูลซึ่งสามารถใช้ระบุสปีชีส์โดยการเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลจากระยะการเจริญพัฒนาอื่นๆ ได้ นำไปสู่การระบุสปีชีส์ของระยะตัวอ่อนและการสร้างคำอธิบายลักษณะเพื่อใช้ในการระบุสปีชีส์ด้วยสัณฐานวิทยา โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อเชื่อมโยงระยะตัวอ่อนกับระยะอื่นๆ ในแมลงร้นดำกลุ่มสปีชีส์ *Simulium multistriatum* และจัดทำคำอธิบายลักษณะของระยะตัวอ่อนของแมลงร้นดำ 2 สปีชีส์ ที่ยังไม่มีรายงานการศึกษาก่อน คือ *S. bullatum* และ *S. chaliowae*

การศึกษาโครงสร้างสังคมของแมลงร้นดำในประเทศไทยพบว่าโครงสร้างสังคมของแมลงร้นดำถูกกำหนดโดยปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย โดยปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยคัดกรองสปีชีส์ของแมลงร้นดำเข้าสู่แหล่งอาศัย ผลการศึกษานี้สะท้อนให้เห็นบทบาทความสำคัญของปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยต่อกระบวนการวิวัฒนาการของแมลงร้นดำซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ในแมลงร้นดำ *S. aureohirtum* ที่พบว่าความแตกต่างของปัจจัยทางนิเวศวิทยาส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร และการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงร้นดำกลุ่มสปีชีส์ *S. tuberosum* ที่พบว่าสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการมีความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย นอกจากนี้ผลการศึกษาโครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการยังพบว่าลักษณะ labral fan ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญที่ใช้สำหรับการกรองอาหารของระยะตัวอ่อนในแมลงร้นดำในประเทศไทยมีรูปแบบการวิวัฒนาการเข้าหา (convergent evolution) ส่งผลให้สปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการอาจมีลักษณะ labral fan แตกต่างกันได้นำไปสู่การใช้แหล่งอาศัยที่แตกต่างกันและส่งเสริมให้เกิดความแตกต่างนำไปสู่การแตกแขนงของสปีชีส์ได้

4.7 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษานี้พิจารณาจากข้อมูลที่เก็บเฉพาะทางภูมิศาสตร์แต่ยังขาดข้อมูลช่วงเวลาหรือฤดูกาล ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นดังกล่าว
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับบทบาทของปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยต่อความแตกต่างของสปีชีส์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เป็นสปีชีส์ซับซ้อนซึ่งจะทำให้ทราบถึงกลไกของปัจจัยทางนิเวศวิทยาต่อการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการ ตลอดจนความหลากหลายทางชีวภาพของแมลงร้นดำ
3. การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ในแมลงร้นดำบางสปีชีส์พบว่าการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในอดีตมีผลกระทบต่อความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงร้นดำ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในแมลงร้นดำสปีชีส์อื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบแบบแผนของความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรม ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- Adler PH, Crosskey RW (2015) World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory [2015].
<https://130.127.69.75/cafls/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>.
- Adler PH, Currie DC, Wood DM (2004) The Black Flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, USA.
- Adler PH, Cheke RA, Post RJ (2010) Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 846–865.
- Adler PH, Huang Y-T (2011) Integrated systematics of the Simuliidae (Diptera): evolutionary relationships of the little-known Palearctic black fly *Simulium acrotrichum*. *Canadian Entomologist*, 143(6), 612–628.
- Adler PH, McCreadie JW (1997) The hidden ecology of black flies: Sibling species and ecological scale. *American Entomologist*, 43, 153–162.
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology*, 55, 539–552.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, MA.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Beerli P, Palczewski M (2010) Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*, 185, 313–326.
- Bohonak AJ (2002) IBD (Isolation by Distance): a programme for analysis of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93(2), 153–154.
- Boakye DA, Back C, Fiasorgbor GK, Sib APP, Coulibaly Y (1998) Sibling species distributions of the *Simulium damnosum* complex in the West African Onchocerciasis Control Programme area during the decade 1984–93, following intensive larviciding since 1974. *Medical and Veterinary Entomology*, 12, 345–358.
- Brockhouse C, Bass JAB, Feraday RM, Straus NA (1989) Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium venum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 32, 516–521.
- Brower AVZ (1994) Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato*, inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6491–6495.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 355, 163–178.
- Cannon CH, Manos PS (2003) Phylogeography of the Southeast Asian stone oaks (Lithocarpus). *Journal of Biogeography*, 30, 211–226.

- Cavender-Bares J, Ackerly DD, Baum DA, Bazzaz FA (2004) Phylogenetic overdispersion in Floridian oak communities. *American Naturalist*, 163, 823–843.
- Cavender-Bares J, Kozak KH, Fine PVA, Kembel SW (2009) The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters*, 12, 693–715.
- Chesson P (2000) Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, 343–366.
- Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V (1987) A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37, 37 – 41.
- Conflitti IM, Kratochvil MJ, Spironello M, Shields GF, Currie DC (2010) Good species behaving badly: non-monophyly of black fly sibling species in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(1), 245–257.
- Conflitti IM, Shields GF, Currie DC (2012) A “complex” problem: delimiting sibling species boundaries in black flies (Diptera: Simuliidae). *Canadian Entomologist*, 144, 323–336.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2571–2581.
- Edwards FW (1934) The Simuliidae (Diptera) of Java and Sumatra. *Archiv fur Hydrobiologie*, 13, 92–138.
- Emerson BC, Gillespie RG (2008) Phylogenetic analysis of community assembly and structure over space and time. *Trends in Ecology and Evolution*, 23, 619–630.
- Excoffier L, Lischer H (2010) Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Fukuda M, Choochote W, Bain O, Aoki C, Takaoka H (2003) Natural infections with filarial larvae in two species of black flies (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31, 99–102.
- Funk DJ, Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 397–423.
- Gathorne-Hardy FJ, Syaukani Davies RG, Eggleton P, Jones DT (2002) Quaternary rainforest refugia in south-east Asia: using termites (Isoptera) as indicators. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75, 453–466.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59, 307–321.

- Hamada N, McCreadie JM (1999) Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia. *Hydrobiologia*, 397, 71–78.
- Hamada N, McCreadie JW, Adler PH (2002) Species richness and spatial distributions of black flies (Diptera: Simuliidae) among streams of Central Amazonia, Brazil. *Freshwater Biology*, 47, 31–40.
- Harpending HC (1994) Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66(4), 591–600.
- Hernández-Triana LM, Crainey JL, Hall A, Fatih F, Mackenzie-Dodds J, Shelley AJ, Zhou X, Post RJ, Gregory TR, Hebert PDN (2012) DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the new world. *Zootaxa*, 3514, 43–69.
- Hubbell S (2001) *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755.
- Illéšová D, Halgoš J, Krno I (2008) Blackfly assemblages (Diptera, Simuliidae) of the Carpathian river: habitat characteristics, longitudinal zonation and eutrophication. *Hydrobiologia*, 598, 163–174.
- Ingram T, Shurin JB (2009) Trait-based assembly and phylogenetic structure in northeast Pacific rockfish assemblages. *Ecology*, 90, 2444–2453.
- Jitklang S, Kuvangkadilok C, Baimai V, Takaoka H, Adler PH (2008) Cytogenetics and morphotaxonomy of the *Simulium* (*Gomphostilbia*) *ceylonicum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, 1971, 1–28.
- Joy DA, Conn JE (2001) Molecular and morphological phylogenetic analysis of an insular radiation in Pacific black flies (*Simulium*). *Systematic Biology*, 50, 18–38.
- Joy DA, Craig DA, Conn JE (2007) Genetic variation tracks ecological segregation in Pacific island black flies. *Heredity*, 99, 452–459.
- Kachvoryan EA, Chubareva LA, Petrova NA, Mirumyan LS (1996) Frequency changes of B chromosomes in synanthropic species of bloodsucking blackflies (Diptera, Simuliidae). *Genetika*, 32, 637–640.
- Kettle DS (1990) *Medical and Veterinary Entomology*. CAP International UK.
- Kozak KH, Larson A, Bonett RM, Harmon LJ (2005) Phylogenetic analysis of ecomorphological divergence, community structure and diversification rates in dusky salamanders (Plethodontidae: *Desmognathus*). *Evolution* 59, 2000–2016.
- Kraft NJB, Cornwell WK, Webb CO, Ackerly DD (2007) Trait evolution, community assembly, and the phylogenetic structure of ecological communities. *American Naturalist*, 170, 271–283.

- Kuvangkadilok C, Boonkemtong C, Phayahasena S (1999a) Distribution of the larvae of blackflies (Diptera: Simuliidae) at Doi Inthanon National Park, northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 30, 328 – 337.
- Kuvangkadilok C, Phayahasena S, Boonkemtong C (1999) Larval polytene chromosomes of five species of blackflies (Diptera: Simuliidae) from doi inthanon national park, Northern Thailand. *Cytologia*, 64, 197–207.
- Kuvangkadilok C, Lualon U, Baimai V (2008) Cytotaxonomy of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Genome*, 51, 972–987.
- Losos JB, Leal M, Glor RE, de Queiroz K, Hertz PE, Schettino LR (2003) Niche lability in the evolution of a Caribbean lizard community. *Nature*, 424, 542–545.
- Lucas P, Hunter FF (1999) Phenotypic plasticity in the labral fan of simuliid larvae (Diptera): effect of seston load on primary-ray number. *Journal of Zoology*, 77, 1843 – 1849.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2), 209–220.
- MacArthur RH, Levins R (1967) The limiting similarity, convergence and divergence of coexisting species. *The American Society of Naturalists*, 101, 377–385.
- Malmqvist B, Zhang Y, Adler PH (1999) Diversity, distribution and larval habitats of North Swedish blackflies (Diptera: Simuliidae). *Freshwater Biology*, 42, 301–314.
- McCreadie JW, Adler PH (1998) Scale, time, space, and predictability: species distributions of preimaginal black flies (Diptera: Simuliidae). *Oecologia*, 114, 79–92.
- McCreadie JW, Adler PH (2006) Ecoregions as predictors of lotic assemblages of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Ecography*, 29, 603–613.
- McCreadie JW, Adler PH (2012) The roles of abiotic factors, dispersal, and species interactions in structuring stream assemblages of black flies (Diptera: Simuliidae). *Aquatic Biosystems*, 8, 14.
- McCreadie JW, Colbo MH (1991) Spatial distribution patterns of larval cytotypes of the *Simulium venustum/verecundum* complex (Dipter: Simuliidae) on the Avalon Peninsula, Newfoundland: factors associated with occurrence. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 2651 – 2659.
- McCreadie JW, Adler PH, Grillet ME, Hamada N (2006) Sampling statistics in understanding distributions of black fly larvae (Diptera: Simuliidae). *Acta Entomologica Serbica Supplement*, 89 – 96.
- McCreadie JW, Hamada N, Grillet ME (2004) Spatialtemporal distribution of preimaginal blackflies in Neotropical streams. *Hydrobiologia*, 513, 183 – 196.
- Mead DG, Maré CJ, Ramberg FB (1999) Bite transmission of Vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) to laboratory mice by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, 36(4), 410–413.

- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PKL (2006) DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55, 715–728.
- Miller KB, Alarie Y, Wolfe GW, Whiting MF (2005) Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae). *Systematic Entomology*, 30, 499–509.
- Morgan K, Linton Y, Somboon P, Saikia P, Dev V, Socheat D, Walton C (2010) Inter-specific gene flow dynamics during the Pleistocenedated speciation of forest-dependent mosquitoes in Southeast Asia. *Molecular Ecology*, 19, 2269–2285.
- Morgan K, O’Loughlin SM, Chen B, Linton Y, Thongwat D, Somboon P, Fong MY, Butlin R, Verity R, Prakash A, Htun PT, Hlaing T, Nambanya S, Socheat D, Dinh TH, Walton C (2011) Comparative phylogeography reveals a shared impact of Pleistocene environmental change in shaping genetic diversity within nine *Anopheles* mosquito species across the Indo-Burma biodiversity hotspot. *Molecular Ecology*, 20(21), 4533 – 4549.
- Nielsen R, Wakeley JW (2001) Distinguishing migration from isolation: an MCMC approach. *Genetics*, 158, 885–896.
- O’Loughlin SM, Okabayashi T, Honda M, Kitazoe Y, Kishino H, Somboon P, Fong MY, Butlin R, Verity R, Prakash A, Htun PT, Hlaing T, Nambanya S, Socheat D, Dinh TH, Walton C (2008) Complex population history of two *Anopheles dirus* mosquito species in southeast Asia suggests the influence of Pleistocene climate change rather than human-mediated effects. *J. Evol. Biol.* 21: 1555–1569.
- Palmer RW, Craig DA (2000) An ecological classification of primary labral fans of filter-feeding black fly (Diptera: Simuliidae) larvae. *Journal of Zoology*, 78, 199–218.
- Pangjanda S, Pramual P (2016) Trait-based and phylogenetic community ecology of black flies (Diptera: Simuliidae) in tropical streams of Thailand. *Hydrobiologia*, 763(1), 345 – 356.
- Pannell JR, Charlesworth B (2000) Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1404), 1851–1864.
- Penny D (2001) A 40 000 year palynological record from northeast Thailand, implications for biogeography and palaeoenvironmental reconstruction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 171, 97–128.
- Phasuk J, Chnpaisaeng J, Adler PH, Courtney GW (2005) Chromosomal and morphological taxonomy of larvae of *Simulium (Gomphostilbia)* (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, 1052, 49-60.

- Phayuhasena S, Colgan DJ, Kuvangkadilok C, Pramual P, Baimai V (2010) Phylogenetic relationships among the black fly species (Diptera: Simuliidae) of Thailand based on multiple gene sequences. *Genetica*, 138, 633 – 648.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253–1256.
- Pramual P, Adler PH (2014) DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand. *Molecular Ecology Resources*, 14, 262–271.
- Pramual P, Kongim B, Nanork P (2011b) Phylogeography of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki complex (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomological Science*, 14, 428 – 436.
- Pramual P, Kuvangkadilok C (2009) Agricultural land use and black fly (Diptera, Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand. *Hydrobiologia*, 625, 173-184.
- Pramual P, Kuvangkadilok C (2012) Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium (Gomphostilbia) angulistylum* (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 55, 447–458.
- Pramual P, Kuvangkadilok C, Baimai V, Walton C (2005) Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*, 14, 3989-4001.
- Pramual P, Kuvangkadilok C, Jitklang S, Tangkawanit U, Adler PH (2012) Geographical versus ecological isolation of closely related black flies (Diptera: Simuliidae) inferred from phylogeny, geography, and ecology: implications for speciation in black flies (Diptera: Simuliidae). *Organisms, Diversity and Evolution*, 12, 183–195.
- Pramual P, Nanork P (2012) Phylogenetic analysis based on multiple gene sequences revealing cryptic biodiversity in *Simulium multistriatum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomological Science*, 15, 202–213.
- Pramual P, Thajjarern J, Sofian-Azirun M, Ya'cob Z, Hadi UK, Takaoka H (2015) Cytogenetic and Molecular Evidence of Additional Cryptic Diversity in High Elevation Black fly *Simulium feuerborni* (Diptera: Simuliidae) Populations in Southeast Asia. *Journal of Medical Entomology*, 52(5), 829 – 836.
- Pramual P, Wongpakam K (2011) Cytogenetics of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki, 1984 (Diptera: Simuliidae) in northeastern Thailand. *Aquatic Insects*, 33, 171–184.
- Pramual P, Wongpakam K (2010) Seasonal variation of black fly (Diptera: Simuliidae) species diversity and community structure in tropical streams of Thailand. *Entomological Science*, 13, 17–28.
- Pramual P, Wongpakam K (2013) Population genetics of the high elevation black fly *Simulium (Nevermannia) feuerborni* Edwards in Thailand. *Entomological Science*, 16, 298 – 308.

- Pramual P, Wongpakam K (2014) Association of black fly (Diptera: Simuliidae) life stages using DNA barcode. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(3), 549-554.
- Pramual P, Wongpakam K, Adler PH (2011a) Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 54, 1-10.
- Pramual P, Wongpakam K, Kuvangkadilok C (2008) Cytogenetics of black fly *Simulium aureohirtum* Brunetti from Thailand. *Cytologia*, 73, 293-304.
- Procunier WS (1975) B-chromosomes of *Cnephia dacotensis* and *C. ornithophilia* (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 53, 1638-1647.
- Procunier WS (1982) The interdependence of B chromosomes, nucleolar organizer expression, and larval development in the blackfly species *Cnephia dacotensis* and *Cnephia ornithophilia* (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 60, 2879 - 2896.
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.5. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Razafindratsima OH, Mehtani S, Dunham AE (2013) Extinctions, traits and phylogenetic community structure: insights from primate assemblages in Madagascar. *Ecography*, 36, 47-56.
- Reeves WK, Adler PH (2011) Colonization of Pacific islands by black flies (Diptera: Simuliidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 113(3), 371-376.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223 - 225.
- Ricklefs RE (1987) Community diversity: relative roles of local and regional processes. *Science*, 235, 167-171.
- Ricklefs RE, Schluter D (1993) *Species Diversity in Ecological Communities: Historical and Geographical Perspectives*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Rivera J, Currie DC (2009) Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources*, 9, 224-236.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3), 552-569.
- Rothfels KH (1979) Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). *Annual Review of Entomology*, 24(1), 507-539.
- Rothfels KH (1989) Speciation in blackflies. *Genome*, 32, 500 - 509.
- Rothfels KH, Dunbar RW (1953) The salivary gland chromosomes of the black fly *Simulium vittatum* Zett. *Canadian Journal of Zoology*, 31(3), 226-241.
- Ruiter DE, Boyle EE, Zhou X (2013) DNA barcoding facilitates associations and diagnoses for Trichoptera larvae of the Churchill (Manitoba, Canada) area. *BMC Ecology*, 13, 5.
- Scheder C, Waringer JA (2002) Distribution patterns and habitat characterization of Simuliidae (Insecta: Diptera) in a low-order sandstone stream (Weidlingbach, Lower Austria). *Limnologica*, 32, 236-247.

- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
- Sriphirom P, Sopaladawan PN, Wongpakam K, Pramual P (2014) Molecular phylogeny of black flies in the *Simulium tuberosum* (Diptera: Simuliidae) species group in Thailand. *Genome*, 57, 45–55.
- Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Vers. 4.B.10. Sinauer Associates, Sunderland, MA,.
- Takaoka H (2001) *Simulium (Simulium) weji* sp. nov. (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29, 349–354.
- Takaoka H, Choochote W (2004) A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Tropical Medicine and Health*, 32, 189–197.
- Takaoka H, Choochote W (2005) A new species of *Simulium* (Simulium) (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Medical Entomology and Zoology*, 56, 43–47.
- Takaoka H, Choochote W, Aoki C, Fukuda M, Bain M (2003) Black flies (Diptera: Simuliidae) attracted to humans and water buffalo and natural infections with filarial larvae, probably *Onchocerca* sp. in northern Thailand. *Parasite*, 10: 3–8
- Takaoka H, Davies DM (1995) *The Black Flies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia*. Kyushu University Press, Fukuoka.
- Takaoka H, Kuvangkadilok C (1999) Four new species of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27, 497 – 509.
- Takaoka H, Suzuki H (1984) The black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 35, 7 – 45.
- Tangkawanit U, Kuvangkadilok C, Baimai V, Adler P. (2009a) Cytosystematics of the *Simulium tuberosum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155(2), 289–315.
- Tangkawanit U, Kuvangkadilok C, Baimai V, Adler PH (2009b) Morphotaxonomy of the *Simulium (Simulium) tuberosum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, 2048, 31–46.
- Thaijarern J, Sopaladawan PN, Wongpakam K, Pramual P (2014) Phylogeography of the black fly *Simulium aureohirtum* (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Genome*, 57(8), 411–417.
- Thanwisai A, Kuvangkadilok C, Baimai V (2006) Molecular phylogeny of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rRNA. *Genetica*, 128, 177 – 204.
- Vamosi SM, Heard SB, Vamosi JC, Webb CO (2009) Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. *Molecular Ecology*, 18, 572–592.

- Vamosi JC, Vamosi SM (2007) Body size, rarity, and phylogenetic community structure: insights from diving beetle assemblages of Alberta. *Diversity and Distributions*, 13, 1 – 10.
- Voris HK (2000) Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of Biogeography*, 27, 1153–1167.
- Webb CO, Ackerly DD, McPeck MA, Donoghue MJ (2002) Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 475–505.
- Webb CO, Ackerly DD, Kembel SW (2008) Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics*, 24, 2098–2100.
- Weiher E, Keddy PA (1995) The assembly of experimental wetland plant communities. *Oikos*, 73, 323–335.
- Willis CG, Halina M, Lehman C, Reich PB, Keen A, McCarthy S, Cavender-Bares J (2010) Phylogenetic community structure in Minnesota oak savanna is influenced by spatial extent and environmental variation. *Ecography*, 33, 565–577.
- Zhang Y, Malmqvist B (1996) Relationships between labral fan morphology, body size and habitat in North Swedish blackfly larvae (Diptera: Simuliidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 59, 261–280.
- Zhou X, Kjer KM, Morse JC (2007) Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society*, 26, 719–742.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ผลจากการดำเนินงานโครงการวิจัย เรื่อง โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำ (Diptera: Simuliidae) สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 5 เรื่อง ดังนี้

1. Pangjanda, S., **Pramual, P.*** (2015) Trait-based and phylogenetic community ecology of black flies (Diptera: Simuliidae) in tropical streams of Thailand. **Hydrobiologia**, DOI: 10.1007/s10750-015-2389-8 (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 2.275)
2. **Pramual, P.***, Thajjarern, J., Sofian-Azirun, M., Ya'cob, Z., Hadi, U.K., Takaoka, H. (2015) Cytogenetic and Molecular Evidence of Additional Cryptic Diversity in High Elevation Black fly *Simulium feuerborni* (Diptera: Simuliidae) Populations in Southeast Asia. **Journal of Medical Entomology**, 2015; doi: 10.1093/jme/tjv080. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.953)
3. Thajjarern, J., Sopaladawan, P. N., Wongpakam, K., **Pramual, P.*** (2014). Phylogeography of black fly, *Simulium aureohirtum* Brunetti (Diptera: Simuliidae) in Thailand. **Genome**, 57, 411–417. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.558)
4. **Pramual, P.***, Wongpakam, K. (2014) Association of black fly (Diptera: Simuliidae) life stages using DNA barcode. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 17, 549 – 554. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 0.946)
5. Sriphirom P., Nanork Sopaladawan P., Wongpakam K., **Pramual P.*** (2014) Molecular phylogeny of black flies in the *Simulium tuberosum* (Diptera: Simuliidae) species-group in Thailand. **Genome**, 57, 45-55 (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.558)

*Corresponding author

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยจากโครงการ “โครงสร้างสังคมเชิงวิวัฒนาการของแมลงรืนดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย” จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเรียนการสอนในรายวิชาวิวัฒนาการ นิเวศวิทยา นิเวศวิทยาโมเลกุล และพันธุศาสตร์เชิงประชากร นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ประกอบการเขียนตำราทางวิชาการในรายวิชาดังกล่าวข้างต้น

3. อื่นๆ

ผู้วิจัยเข้าร่วมเสนอผลงานวิจัย ณ ต่างประเทศ เรื่อง “Biodiversity of black fly (Diptera: Simuliidae) in Thailand” ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 6th International Simuliidae Symposium ณ University of Torino เมืองตูริน ประเทศอิตาลี ระหว่างวันที่ 16 – 19 กันยายน 2557 และได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายพิเศษในหัวข้อ “พันธุศาสตร์กับการศึกษานิเวศวิทยา” ในงานประชุม

วิชาการ “พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19” ในระหว่างวันที่ 15-17 กรกฎาคม 2558 ณ โรงแรมเซ็นทาราแอนคอนเวนชันเซ็นเตอร์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น นอกจากนี้ยังสามารถสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ จำนวน 3 คน ซึ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาโท หลักสูตร วท.ม ชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 2 คน และระดับปริญญาเอก หลักสูตร ปร.ด. ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 1 คน

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 5 เรื่อง

1. Pangjanda, S., **Pramual, P.*** (2016) Trait-based and phylogenetic community ecology of black flies (Diptera: Simuliidae) in tropical streams of Thailand. **Hydrobiologia**, 763, 345 – 356 (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 2.275) (published)
2. **Pramual, P.***, Thajjarern, J., Sofian-Azirun, M., Ya'cob, Z., Hadi, U.K., Takaoka, H. (2015) Cytogenetic and Molecular Evidence of Additional Cryptic Diversity in High Elevation Black fly *Simulium feuerborni* (Diptera: Simuliidae) Populations in Southeast Asia. **Journal of Medical Entomology**, 52(5), 829 – 836. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.953) (published)
3. Thajjarern, J., Sopaladawan, P. N., Wongpakam, K., **Pramual, P.*** (2014). Phylogeography of black fly, *Simulium aureohirtum* Brunetti (Diptera: Simuliidae) in Thailand. **Genome**, 57, 411 – 417. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.558) (published)
4. **Pramual, P.***, Wongpakam, K. (2014) Association of black fly (Diptera: Simuliidae) life stages using DNA barcode. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 17, 549 – 554. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 0.946) (published)
5. Sriphirom P., Nanork Sopaladawan P., Wongpakam K., **Pramual P.*** (2014) Molecular phylogeny of black flies in the *Simulium tuberosum* (Diptera: Simuliidae) species-group in Thailand. **Genome**, 57, 45 – 55 (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.558) (published)

*Corresponding author

Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Pangjanda, S., **Pramual, P.*** (2016) Trait-based and phylogenetic community ecology of black flies (Diptera: Simuliidae) in tropical streams of Thailand. **Hydrobiologia**, 763, 345 – 356 (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 2.275)



PRIMARY RESEARCH PAPER

Trait-based and phylogenetic community ecology of black flies (Diptera: Simuliidae) in tropical streams of Thailand

Sirinapa Pangjanda · Pairot Pramual

Received: 6 April 2015 / Revised: 20 June 2015 / Accepted: 22 June 2015 / Published online: 26 June 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract A primary aim of community ecology is to determine mechanisms that shape community structure. In this study, we used trait-based and phylogenetic community ecology approaches to determine the factors underlying the species assemblage of black fly larvae in tropical streams of Thailand. Ecological data were obtained from 150 collections. Morphological traits were measured from 35 species. The phylogenetic relationship of these species was inferred from cytochrome *c* oxidase I, II, and 18S rRNA/ITS1 sequences. Phylogeny-based community analyses indicated that species in the community did not skew toward phylogenetic clustering or overdispersion. However, the trait-based community structure analysis

based on labral fan morphology revealed that species in most (>78%) communities were more similar morphologically than expected by chance. As labral fan morphology is strongly related to habitat exploitation, it is considered that habitat filtering is a major factor shaping community structure of black fly larvae in tropical streams of Thailand.

Keywords Aquatic insects · Black fly · Community structure · Simuliidae · *Simulium*

Introduction

Understanding factors underlying biological community structure is one of the primary goals of community and evolutionary ecology. Two principal mechanisms have been proposed as factors shaping community structure—habitat filtering (e.g., Weiher & Keddy, 1995; Chesson, 2000) and competitive exclusion (MacArthur & Levins, 1967). Habitat filtering and competitive exclusion predict different outcomes of morphological trait similarity and phylogenetic relatedness of the coexisting species. Phylogenetic community ecology, which integrates phylogenetic and morphological traits as well as species assemblage data, can be used to examine the relative importance of these mechanisms (Webb et al., 2002; Emerson & Gillespie, 2008; Cavender-Bares et al., 2009; Vamosi et al., 2009). If the coexisting species possess similar traits and are more phylogenetically related than a

Handling editor: Diego Fontaneto

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10750-015-2389-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

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

S. Pangjanda
e-mail: sirinapa.joynoi@gmail.com

P. Pramual
Biodiversity and Traditional Knowledge Research Unit,
Faculty of Science, Mahasarakham University,
Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand

random community, the community structure can be interpreted as a result of habitat filtering. On the other hand, if the co-occurring species in the community are different in morphological traits and are phylogenetically distantly related, competitive exclusion is suggested as the principal factor determining community (Cavender-Bares et al., 2004; Vamosi et al., 2009). Several studies have now used phylogenetic community ecology to test hypotheses about the factors underlying biological community structure (e.g., Kozak et al., 2005; Vamosi & Vamosi, 2007; Willis et al., 2010).

Black flies are insects belonging to the family Simuliidae, in the order Diptera. A total of 2177 species have been reported worldwide and 92 species have been recorded in Thailand (Adler & Crosskey, 2015). Adult female black flies feed on vertebrate blood, and some species are important pests of both humans and livestock (Crosskey, 1990; Adler et al., 2004). However, the immature stages are aquatic and are significant components of stream ecosystems (Cummins, 1987). Ecological studies revealed that the distribution of black fly species is determined mainly by environmental factors, such as stream size, flow velocity, pH, water conductivity, temperature, altitude, riparian forest cover, and presence of impoundments (Hamada & McCreadie, 1999; Hamada et al., 2002; Scheder & Waringer, 2002; McCreadie et al., 2004; Illéšová et al., 2008; Pramual & Kuvangkadilok, 2009). Among these factors, stream size, velocity, and presence of water impoundments play particularly important roles. In addition to individual species' distributions, species richness and species assemblage are also affected by the physical and chemical factors of the stream (McCreadie & Adler, 2006, 2012; Pramual & Kuvangkadilok, 2009; Pramual & Wongpakam, 2010).

Although the patterns of the species distribution and species assemblages of larval black flies are well documented in terms of their relationship to stream variables, the pattern reflecting phylogenetic relatedness, morphological similarity, or only environmental conditions has rarely been examined. As knowledge of the taxonomy and ecology of black flies in Thailand is well developed, they provide a good model for phylogenetic community ecology. In this study, we investigated the relationship between species assemblage, morphology, and phylogenetic relationships among black fly species in tropical streams of Thailand. The

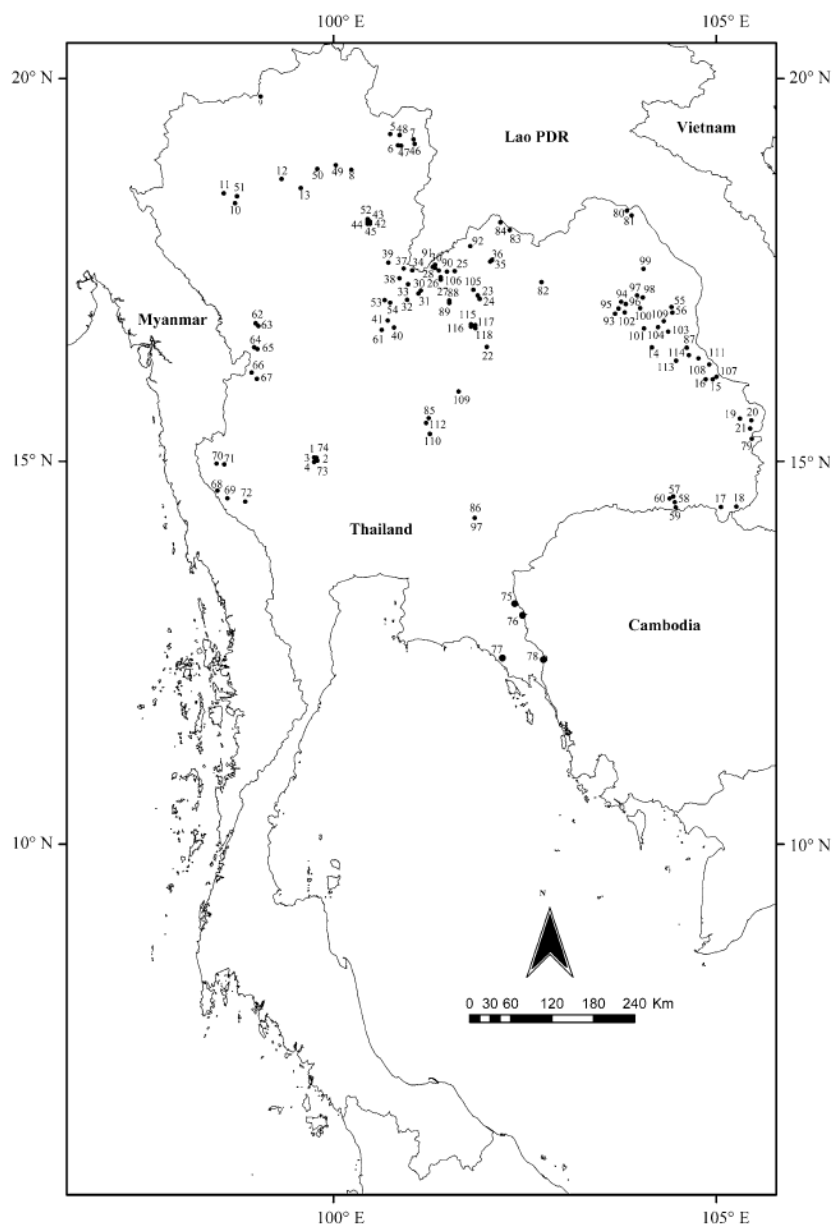
labral fan was selected as the morphological character for our study as it has been shown in previous studies that this character was strongly related to habitat exploitation (Zhang & Malmqvist, 1996; Palmer & Craig, 2000). The labral fan is a food-filtering organ of the larva which comprises numerous rays with the size and number of the rays being related to the current velocity of the stream. Species that occupy slow flowing water usually have larger fan rays than species in fast flowing streams (Zhang & Malmqvist, 1996; Palmer & Craig, 2000). Our purpose is to examine the following questions: (i) are black fly species that share a habitat more similar in labral fan morphology or phylogeny? and (ii) does the labral fan morphology relate to species phylogeny?

Materials and methods

Sample collection and identification

A total of 150 black fly collections [87 collections from present study and 63 collections from previous publications (Pramual & Kuvangkadilok, 2009; Pramual & Wongpakam, 2010)] were made from 118 sites in Thailand (Fig. 1; Table S1). Larvae and pupae were collected by hand from the substrates (such as submerged leaves or trailing grass), using fine forceps. Previous studies have demonstrated that samples collected by this procedure are representative of species occurring in a locality (McCreadie & Colbo, 1991; McCreadie et al., 2004). Larvae and pupae were preserved in modified Carnoy's solution (3:1, 95% ethanol/acetic acid). The fixative was changed twice within 1 h and again after 24 h. Species were identified morphologically using the keys and descriptions of black fly species in Thailand and Southeast Asia (e.g., Takaoka & Suzuki, 1984; Takaoka & Davies, 1995; Takaoka & Choochote, 2004). We measured the physical parameters of the larval habitats that previous studies found were associated with black fly species distribution (elevation, stream width, depth, discharge, velocity, water conductivity, dominant streambed particle size, canopy cover, and riparian vegetation) (McCreadie & Colbo, 1991; McCreadie & Adler, 1998; Hamada & McCreadie, 1999; McCreadie et al., 2004; Pramual & Kuvangkadilok, 2009). Types of streambed particles were

Fig. 1 Map showing approximate locations of 118 collection sites of black flies in Thailand. Details of sampling sites are given in Table S1



classified into six categories based on the size of the dominant particle as described in McCreadie et al. (2006). Riparian vegetation was classified into three types (open, brush, and forest) according to the vegetation forms (McCreadie et al., 2006). Canopy cover over the stream was visually estimated using three criteria (complete, partial, and open canopy) following the description of McCreadie et al. (2006).

Black fly trait data

We selected the primary labral fan rays as the morphological trait for trait-based phylogenetic community structure analysis. Previous studies have demonstrated that the labral fan morphology was related to stream variables (Zhang & Malmqvist, 1996; Palmer & Craig, 2000). Therefore, this larval character

is the principal morphological trait that determines species distribution (Palmer & Craig, 2000). Last instar larvae were used for morphological trait analysis. Labral fan morphology was assessed by measuring the fan ray width and length and number of rays of the completely opened primary fan, under a compound microscope using a microscopic micrometer. As intraspecific variation of the labral fan morphology has been reported (Lucas & Hunter, 1999; Adler et al., 2004), we selected larvae from several sampling sites for morphological measurement. For each species, at least 30 larvae were measured. The only exceptions were larvae of *Simulium siripoomense* Takaoka & Saito and *S. malayense* Takaoka & Davies where only five and ten larvae were available respectively. To test whether the sampling size was enough to capture intraspecific morphological variation, we compared the means of morphological characteristics between groups with different sampling sizes (i.e., 30 and larger) in eight geographically widespread species. All comparisons revealed no significant differences in the mean morphological characteristics, which indicates that an increase in sampling sizes is unlikely to alter the results and that our sampling size is suitable to capture intraspecific morphological variation.

DNA extraction, polymerase chain reaction, and sequencing

Most (32 species) of the DNA samples were obtained from previous studies (Pramual et al., 2012; Pramual & Adler, 2014; Sriphirom et al., 2014). Larval specimens of three species (*Simulium baimaii* Kuvangkadilok & Takaoka, *S. Chiangmaiense* Takaoka & Suzuki and *S. siripoomense*) were obtained in the present study. For molecular work, we selected one representative specimen of each species from one sampling site that was included in morphological trait analyses. Previous phylogenetic studies (Pramual et al., 2012; Pramual & Adler, 2014; Sriphirom et al., 2014) revealed that the specimens included in our analyses were from monophyletic species. In addition, we also found no significant morphological differentiation within species across different sampling sites (data not shown). Thus, we assumed that the specimens are representative of the species. Genomic DNA was extracted from the larvae following the method of Collins et al. (1987). Polymerase chain reaction (PCR) methods were conducted for

cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) using primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATA AAGATATT GG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGAC CAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994); cytochrome *c* oxidase subunit II (COII), using primers TL2-J-3034 (5'-ATTATGGCAGATTAGTGCA-3') and TK-N-3785 (5'-GTTTAAGAGACCAGTACTT G-3'); and 18S/ITS1, using primers 18 s/sd5' (5'-TG GTGCATGGCCGTTCTTAG-3') and 5.8 s/sd3' (5'-GTCGATGTTTCATGTGTCCTGC-3') (Simon et al., 1994). PCR conditions were as described by Conflitti et al. (2010). PCR products were checked with 1% agarose gel electrophoresis and cleaned using the HiYield Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC BIOSIENCE, Taiwan). Sequencing was performed at Macrogen (Seoul, Korea) using the same primers as in the PCR.

Phylogenetic analysis

DNA sequences for COI, COII, and 18S/ITS genes of 35 species were included in the phylogenetic analysis (Table S2). The combined dataset was 1875 bp (586 bp for COI, 697 bp for COII and 592 bp for 18 S/ITS1). Most (138) sequences were available from previous publications (Pramual et al., 2012; Pramual & Adler, 2014; Sriphirom et al., 2014). The remaining 34 sequences (Table S2) were obtained in this study. Phylogenetic relationships were analyzed by Bayesian methods using MRBAYES 3.04b (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). The best-fit model for Bayesian analysis was selected by hierarchical likelihood ratio tests implemented in MrModeltest (Nylander, 2004). The general time-reversible (GTR) model was selected as the best fitting model. Bayesian analysis was run for 20,000,000 generations, with a sampling frequency of 100 generations. *Parasimulium crosskeyi* Peterson was used as an outgroup because the morphological evidence indicates that it is a member of the most primitive lineage of black flies (Adler et al., 2004).

Analytical framework of phylogenetic community structure

The phylogenetic community structure of black flies in Thailand was examined following the analytical framework of Cavender-Bares et al. (2004). Three sets of analyses are required to infer the mechanisms underlying the community structure. Firstly, the

hypothesis that co-occurring black fly species are more closely related than expected was tested. Secondly, labral fan morphology was used to test the hypothesis that co-occurring black fly species are more morphologically similar than expected (i.e., they are morphologically clustered). Then the phylogenetic signal of the labral fan morphology was examined. A combination of the results of these analyses was used to infer the mechanism underlying the community structure [see Fig. 2 of Cavender-Bares et al. (2004)] of black flies in Thailand. If the phylogenetic signal analysis indicates that the labral fan morphology is conserved (i.e., closely related species possess similar fan morphology or phylogenetic conservatism) and the co-occurring species are morphologically clustered, then habitat filtering is a primary factor determining community structure. However, if the co-occurring species are morphologically overdispersed, then the community structure will be dominated by competitive exclusion. If the phylogenetic signal analysis indicates convergence of the labral fan morphology and the co-occurring species are morphologically divergent, then the random process is the primary factor that governs community structure. Otherwise, if the co-occurring species are morphologically clustered, then habitat filtering is the primary mechanism determining the community structure (Webb et al., 2002; Cavender-Bares et al., 2004).

Phylogenetic community structure

The computer package Phylocom version 4.2 (Webb et al., 2008) was used to calculate mean phylogenetic distance (MPD) and mean nearest taxon distance (MNTD). MPD measures the mean pairwise phylogenetic distance between each taxon within the community. MNTD measures the average distance to the closest relative for each taxon. These two measures were standardized into a net relatedness index (NRI) and nearest related taxon index (NTI), respectively (Webb et al., 2002). The NRI and NTI describe the differences between phylogenetic distance in the observed and null communities. Positive values of both indexes indicate that species in the community were more phylogenetically related than by chance. Alternatively, negative values reflect that species are less phylogenetically related than by chance (Webb et al., 2002). High level of trait conservatism at a deep phylogenetic level will result

in high NRI and NTI. Conservatism at more terminal levels significantly increases NTI relative to NRI (Webb et al., 2002). The independent swap method was used to generate null communities by considering all species represented in the communities as the potential source pool. *T* tests were used to determine if the means of the NRI and NTI differed from zero (Ingram & Shurin, 2009; Razafindratsima et al., 2013), which demonstrates that the community is either clustering (positive) or overdispersed (negative).

Trait-based community structure

Phylocom was used to measure morphological trait dispersion within samples across the range of communities and species pool. The matrix from the mean pairwise trait distance among taxa (MPD) and mean distances to nearest-neighbor trait distance (MNTD) were used to measure trait dispersion of the community. Dispersion values in observed and null distributions were used with standardized effect size (SES) of the trait dispersion metrics relative to the null distribution communities (Weiher & Keddy, 1995; Webb et al., 2008). These values provided a signature of the trait clustering or evenness. Negative values for SES indicate trait clustering. Positive values of SES indicate overdispersion of the trait. We used *t* tests to determine whether that mean SES values across the community were significantly different from zero (Ingram & Shurin, 2009; Razafindratsima et al., 2013).

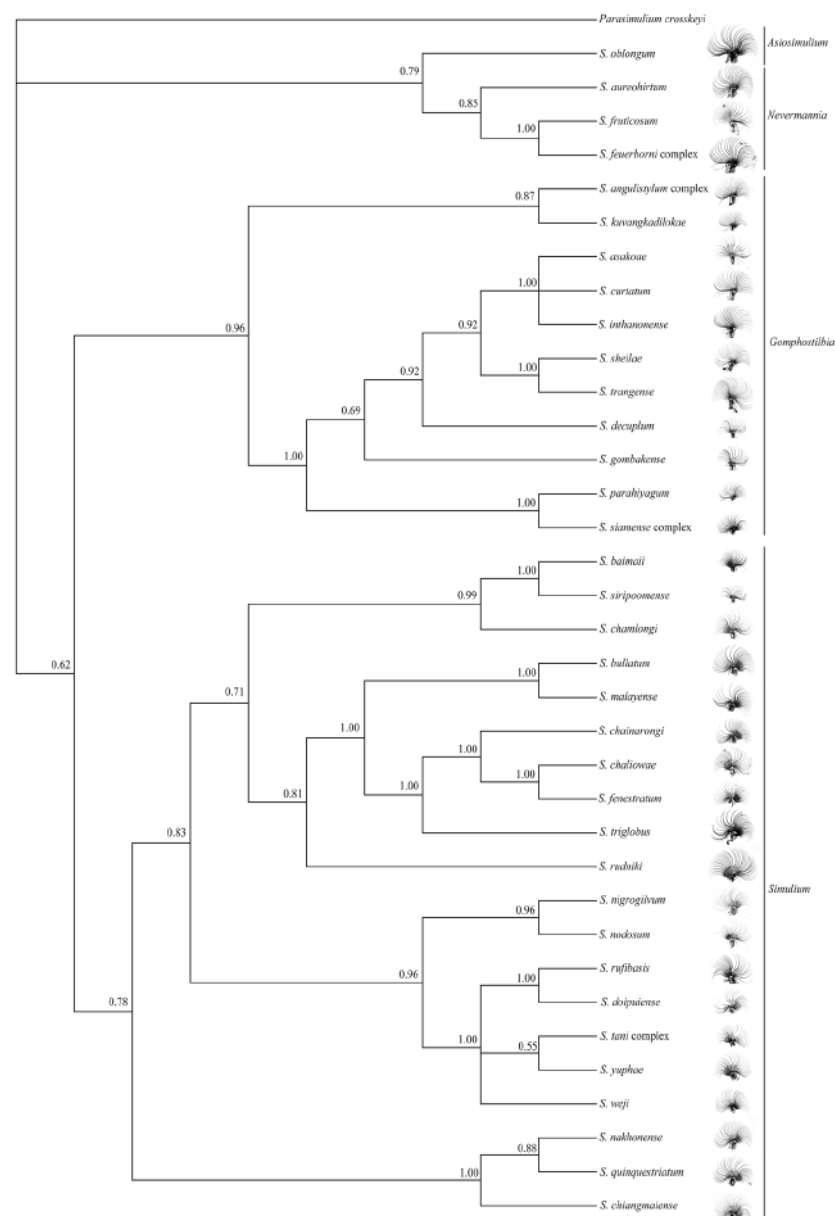
We also tested the phylogenetic signal of the labral fan morphology. The analysis of trait (aot) module in Phylocom was used to test the tendency for closely related species to share similar morphology (i.e., phylogenetic signal). The phylogenetic signal measured the magnitude of the trait variation of species relative to the phylogenetic position. If closely related species are more similar to each other, there will be small variance when compared to the expectation under the null model of randomly swapping trait values across the tree (Webb et al., 2008).

Results

Phylogenetic relationships

The Bayesian tree of 35 black fly species included in the analysis revealed two main clades (Fig. 2). A

Fig. 2 Bayesian tree for 35 species of black flies in Thailand based on 1875 bp sequences combined dataset of COI, COII, and 18S/ITS1 genes. Posterior probabilities for Bayesian analysis are shown above or near branches. Labral fan of each species was placed near tip of tree. Scale bar represent 200 μ m



single species of the subgenus *Asiosimulium* (*Simulium oblongum* Takaoka & Choochote) formed a distinct clade with the members of subgenus *Nevermannia*. Subgenera *Gomphostilbia* and *Simulium* formed a second large clade that further divided into two subclades. The 11 species of the subgenus *Gomphostilbia* included in this study formed a monophyletic clade with strong (0.96) support. Members of

the subgenus *Simulium* (20 species) formed a monophyletic clade although with moderate (0.78) support.

Phylogenetic community structure

Black fly assemblages from a total of 150 sites were included in this study. There were 35 species recorded (Table S2). The number of species in each assemblage

ranged from three to eight. Phylogenetic community analysis revealed that 73 (48.66%) sites had a positive NRI. Seventy-seven communities (51.34%) had a negative NRI. Similar patterns were observed for the NTI. Among 150 communities, 62 (41.33%) had a positive NTI and 88 (58.67%) had a negative NTI (Table 2). However, the *t* tests indicated that the mean NRI and NTI values across the communities were not significantly different from zero (Table 1), thus the phylogenetic community of black flies in Thailand is not different from that expected by chance.

Trait-based community structure

The means of the morphological characteristics of the primary fan ray of each black fly species are shown in Table 2. Three morphological traits included in this study were significantly correlated (Table 3). These morphological traits also correlated significantly, albeit rather weakly, with stream variables (Table 4) indicating that they were important morphological traits that determine species distribution. A trait-based community ecology analysis revealed that 27 (18%) communities had positive SES values for fan ray width. Positive SES values suggest that the trait values for these communities were overdispersed. One-hundred and twenty three communities (82%) had negative SES values for the fan ray width, which indicated that these communities were trait clustering. Twenty-four communities (16%) had positive SES values for the fan ray length. One-hundred and twenty six (84%) communities had negative SES values for the fan ray length. Thirty-three communities (22%) had positive SES values for the number of fan rays and 117 (78%) had negative SES values. The SES values of all three labral fan morphological characteristics were highly significantly different from zero (Table 1), which indicated that with respect to labral fan morphology, species in the community were different from that expected randomly.

Phylogenetic signal of labral fan morphology

Tests on the phylogenetic signal of the labral fan morphologies indicated no phylogenetic conservatism (Fig. 2) (i.e., no significant relationship between phylogenetic position and trait) of the fan ray width ($P = 0.16$) and number of fan rays ($P = 0.06$).

Table 1 Summary of phylogenetic community ecology indexes based on phylogenetic and trait-based analysis of 150 communities of black flies in Thailand

	SES		
	NRI	NTI	SES
	Fan ray width	Fan ray length	Number of fan rays
Positive (%)	73 (48.67)	62 (41.33)	33 (22.00)
Negative (%)	77 (51.33)	88 (58.67)	117 (78.00)
Mean difference (confidence interval)	0.063 (−0.074, 0.200)	0.059 (−0.110, 0.227)	−0.538 (−0.655, −0.421)
<i>t</i> test	0.915	0.686	−9.087
<i>P</i> value	0.362	0.494	<0.001

Table 2 Mean of morphological characteristics of primary labral fan for 35 species of black flies in Thailand

Species (n) ^a	Fan ray width (±SE) (μm)	Fan ray length (±SE) (μm)	Number of fan rays (±SE)
Subgenus <i>Asiosimulium</i>			
<i>S. oblongum</i> Takaoka & Choochote (62)	1516.94 (14.21)	762.90 (7.66)	42.63 (0.51)
Subgenus <i>Gomphostilbia</i>			
<i>S. angulistylum</i> Takaoka & Davies complex (42)	1032.14 (17.27)	539.29 (9.79)	33.50 (0.69)
<i>S. asakoe</i> Takaoka & Davies (66)	1202.27 (20.86)	603.41 (6.67)	37.80 (0.71)
<i>S. curtatum</i> Jitklang, Kuvangkadilok, Baimai, Takaoka & Adler (30)	1310.83 (17.23)	673.33 (9.66)	38.57 (0.36)
<i>S. decuplum</i> Takaoka & Davies (30)	924.14 (13.16)	488.79 (5.05)	29.86 (0.34)
<i>S. doipuiense</i> Takaoka & Choochote (30)	1116.67 (16.23)	583.33 (9.84)	36.97 (0.66)
<i>S. gombakense</i> Takaoka & Davies (30)	1037.93 (12.07)	532.76 (5.56)	40.97 (0.59)
<i>S. inthanonense</i> Takaoka & Suzuki (30)	1235.00 (21.73)	624.17 (10.75)	31.30 (0.56)
<i>S. kuvangkadilokae</i> Pramual & Tangkawanit (30)	820.00 (18.39)	421.67 (6.86)	33.30 (0.57)
<i>S. parahiyangum</i> Takaoka & Sigit (30)	880.00 (6.93)	441.67 (7.80)	26.73 (0.43)
<i>S. sheilae</i> Takaoka & Davies (30)	1146.55 (15.83)	547.41 (9.15)	40.48 (0.83)
<i>S. siamense</i> Takaoka & Suzuki complex (51)	1019.12 (15.04)	510.29 (7.71)	37.88 (0.83)
<i>S. trangense</i> Jitklang, Kuvangkadilok, Baimai, Takaoka & Adler (30)	1059.38 (11.14)	582.29 (11.70)	39.63 (0.53)
Subgenus <i>Nevermannia</i>			
<i>S. aureohirtum</i> Brunetti (55)	1262.27 (23.99)	619.55 (11.19)	37.22 (0.95)
<i>S. feuerborni</i> Edwards complex (30)	1298.33 (37.56)	701.67 (16.03)	35.70 (0.42)
<i>S. fruticosum</i> Takaoka & Choochote (30)	1410.00 (12.43)	739.17 (5.32)	26.40 (0.32)
Subgenus <i>Simulium</i>			
<i>S. baimaii</i> Kuvangkadilok & Takaoka (30)	1351.67 (18.76)	700.83 (7.34)	55.40 (0.48)
<i>S. bullatum</i> Takaoka & Choochote (30)	1387.50 (27.51)	706.67 (13.34)	46.13 (0.58)
<i>S. chainarongi</i> Kuvangkadilok & Takaoka (38)	1172.37 (12.85)	590.13 (6.83)	43.61 (0.59)
<i>S. chaliowae</i> Takaoka & Bookemtong (30)	1115.83 (10.75)	555.83 (7.55)	40.00 (0.22)
<i>S. chamlongi</i> Takaoka & Suzuki (30)	631.67 (11.37)	565.83 (26.76)	41.10 (0.48)
<i>S. Chiangmaiense</i> Takaoka & Suzuki (30)	1015.00 (26.39)	570.83 (11.50)	39.23 (0.41)
<i>S. fenestratum</i> Edwards (70)	1258.93 (17.45)	596.79 (9.58)	43.03 (0.71)
<i>S. malayense</i> Takaoka & Davies (10)	1081.82 (26.56)	545.45 (16.10)	43.91 (1.54)
<i>S. nakhonense</i> Takaoka & Suzuki (61)	1052.46 (12.20)	532.17 (5.67)	40.67 (0.85)
<i>S. nigrogilvum</i> Summers (30)	1187.50 (20.08)	592.50 (9.90)	39.20 (0.88)
<i>S. nodosum</i> Puri (30)	1133.33 (7.98)	573.33 (4.31)	37.00 (0.21)
<i>S. quinquestriatus</i> Shiraki (30)	1221.67 (25.90)	613.33 (16.11)	47.43 (1.16)
<i>S. rudnicki</i> Takaoka & Davies (30)	1310.00 (34.19)	695.83 (17.21)	46.40 (1.17)
<i>S. rufibasis</i> Brunetti (30)	1335.83 (9.79)	629.17 (7.00)	43.57 (0.54)
<i>S. siripoomense</i> Takaoka & Saito (5)	418.75 (11.97)	875.00 (0.00)	37.50 (0.29)
<i>S. tani</i> Takaoka & Davies complex (30)	1024.17 (20.04)	531.67 (10.38)	32.37 (0.98)
<i>S. triglobus</i> Takaoka & Kuvangkadilok (30)	1355.83 (21.40)	620.00 (12.48)	57.00 (0.37)
<i>S. weji</i> Takaoka (30)	1021.67 (16.86)	541.67 (14.35)	36.00 (0.58)
<i>S. yuphae</i> Takaoka & Choochote (30)	1066.67 (27.63)	555.83 (13.54)	39.87 (0.74)

^a Number of larvae used for morphological measurement

Table 3 Pearson correlation coefficients between labral fan morphological traits of 35 black fly species in Thailand

	Fan ray width	Fan ray length	Number of fan ray
Fan ray width	–		
Fan ray length	0.632*	–	
Number of fan ray	0.431*	0.317*	–

* $P < 0.01$

However, the fan ray length had significant conservatism across the phylogeny ($P = 0.03$).

Discussion

Our results indicate that the community structure of black flies in tropical streams of Thailand was not skewed toward phylogenetic clustering or overdispersion. Phylogenetic community structure analysis revealed similar proportions in the communities that show signals of phylogenetic clustering and overdispersion. In contrast, the trait-based community structure analysis found that black fly species assemblage was largely determined by habitat filtering mechanisms. Members of the black fly species in most (>78%) communities are more similar in labral fan morphology than would be expected from the null community. The results are counter intuitive as it has been suggested that closely related species usually possess similar morphological characteristics (Webb et al., 2002; Emerson & Gillespie, 2008). Therefore, phylogenetic clustering was expected with the habitat filtering. However, habitat filtering does not always produce phylogenetic clustering if the trait under study is governed by convergent evolution (Losos et al.,

2003; Cavender-Bares et al., 2004; Kraft et al., 2007). Previous studies found that black fly labral fan morphology was not related to the species phylogenetic relationships (Zhang & Malmqvist, 1996; Palmer & Craig, 2000; Joy & Conn, 2001). The results of our phylogenetic conservatism analysis for fan ray width and number of fan ray support the previous findings and indicate that convergent evolution could be a factor responsible for the species' differences in these labral fan traits.

Non-phylogenetic conservatism of the labral fan morphology implies that closely related species could have differences in this trait. Differences in labral fan morphology allow closely related species to exploit different habitats, thus it could be a factor promoting species divergence (Zhang & Malmqvist, 1996; Joy & Conn, 2001). For example, two closely related species of the subgenus *Gomphostilbia* in Thailand, *Simulium inthanonense* Takaoka & Suzuki and *S. curtatum* Jitklang, Kuvangkadilok, Baimai, Takaoka & Adler, occur in high elevation habitats (>1000 m above sea level), but the two species utilized streams with different velocities (0.49 m/s for *S. curtatum* and 0.23 m/s for *S. inthanonense*) (Pramual et al., 2012). Comparisons of the labral fan morphology indicated significant differences between the two species (fan ray length, $t = 2.734$, $P = 0.008$; fan ray width, $t = 3.401$, $P = 0.001$; number of fan rays, $t = 10.914$, $P < 0.001$). The smaller labral fan in *S. curtatum* is consistent with the prediction that this species occupies faster streams. As these species are closely related according to molecular evidence (Pramual et al., 2012), the differences in larval habitats due to morphological divergence (or vice versa) could possibly be a driving force of speciation in black flies (Joy & Conn, 2001; Pramual et al., 2012).

Table 4 Pearson correlation coefficients between morphological traits of 35 black fly species and stream variables from 150 sampling sites in Thailand

Morphological trait	Stream variable								
	Width	Depth	Velocity	Discharge	Elevation	Conductivity	Streambed particle	Canopy cover	Riparian vegetation
Fan ray width	−0.131*	−0.139*	−0.091*	−0.161*	0.305*	0.020	0.025 ^a	−0.006 ^a	0.126* ^a
Fan ray length	−0.147*	−0.064	−0.095*	−0.133*	0.236*	0.019	−0.021 ^a	−0.010 ^a	0.090* ^a
Number of fan ray	0.032	−0.161*	0.162*	−0.149*	0.201*	0.118*	0.189* ^a	0.062 ^a	0.206* ^a

* $P < 0.01$ ^a Spearman's rank correlation

Previous studies as well as our data have shown that labral fan morphology is correlated with stream velocity (Zhang & Malmqvist, 1996; Malmqvist et al., 1999; Palmer & Craig, 2000), and it has been suggested that stream velocity is one of the most important factors determining black fly species distribution (Palmer & Craig, 2000). Shared morphological characteristics related to habitat usage indicate that environmental conditions are the major factors that select species into a community (i.e., habitat filtering). Thus, stream velocity could be primarily an environmental factor filtering black fly species in the community. Our finding that habitat filtering is a primary mechanism determining black fly species assemblage was consistent with several previous studies. Pramual & Wongpakam (2010) found that species that require similar ecological niches co-exist in several communities in tropical streams of northeastern Thailand. Environmental factors associated with black fly assemblage have also been reported in other geographic areas such as Europe and North America. Malmqvist et al. (1999) found that species assemblages of black fly larvae in 56 Swedish streams were significantly associated with stream variables such as stream width, depth, velocity, and streambed particle size. McCreadie & Adler (2006) found that species assemblages of North American black flies were determined primarily by ecological factors such as pH, stream velocity, and streambed particle size.

In conclusion, the results suggest that environmental conditions in the habitat play an important role in black fly community assemblages. Thus, habitat filtering is likely to be the most important mechanism determining black fly community structure in Thailand. Nonetheless, our sampling regimes restricted us to analyzing data that could only be used to examine the spatial aspect of the community. However, the temporal dynamics of black fly species assemblages has also been reported (Pramual & Wongpakam, 2010; McCreadie & Adler, 2012) and further studies should consider including temporal factors. Our results also indicate that morphological divergence among the closely related species was related to habitat exploitation and it could be the factor promoting speciation. Therefore, integrating phylogenetic and morphological characters of the closely related species could be used to test this hypothesis in a future study.

Acknowledgments This work was funded by the Thailand Research Fund and Mahasarakham University (Grant No. RSA5680013) and Mahasarakham University Development Fund (Grant year 2014). We thank Jolyon Dodgson (Mahasarakham University, Thailand) and Adrian Plant (National Museum of Wales, Cardiff, UK) for valuable comments on an earlier version of the manuscript.

References

- Adler, P. H. & R. W. Crosskey, 2015. World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory [2015]. <https://130.127.69.75/cafls/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>.
- Adler, P. H., D. C. Currie & D. M. Wood, 2004. The Black Flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, Ithaca.
- Cavender-Bares, J., D. D. Ackerly, D. A. Baum & F. A. Bazzaz, 2004. Phylogenetic overdispersion in Floridian oak communities. *American Naturalist* 163: 823–843.
- Cavender-Bares, J., K. H. Kozak, P. V. A. Fine & S. W. Kembel, 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* 12: 693–715.
- Chesson, P., 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 343–366.
- Collins, F. H., M. A. Mendez, M. O. Rasmussen, P. C. Mehaffey, N. J. Besansky & V. Finnerty, 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37: 37–41.
- Conflitti, I. M., M. J. Kratochvil, M. Spironello, G. F. Shields & D. C. Currie, 2010. Good species behaving badly: non-monophyly of black fly sibling species in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 245–257.
- Crosskey, R. W., 1990. The Natural History of Blackflies. Wiley, London.
- Cummins, K. W., 1987. The functional role of black flies in stream ecosystems. In Kim, K. C. & R. W. Merritt (eds), *Black Flies: Ecology, Population Management and Annotated World List*. The Pennsylvania State University, University Park: 1–10.
- Emerson, B. C. & R. G. Gillespie, 2008. Phylogenetic analysis of community assembly and structure over space and time. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 619–630.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- Hamada, N. & J. W. McCreadie, 1999. Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia. *Hydrobiologia* 397: 71–78.
- Hamada, N., J. W. McCreadie & P. H. Adler, 2002. Species richness and spatial distributions of black flies (Diptera:

- Simuliidae) among streams of Central Amazonia, Brazil. *Freshwater Biology* 47: 31–40.
- Huelsenbeck, J. P. & F. R. Ronquist, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Illéšová, D., J. Halgoš & I. Kmo, 2008. Blackfly assemblages (Diptera, Simuliidae) of the Carpathian river: habitat characteristics, longitudinal zonation and eutrophication. *Hydrobiologia* 598: 163–174.
- Ingram, T. & J. B. Shurin, 2009. Trait-based assembly and phylogenetic structure in northeast Pacific rockfish assemblages. *Ecology* 90: 2444–2453.
- Joy, D. A. & J. E. Conn, 2001. Molecular and morphological phylogenetic analysis of an insular radiation in Pacific black flies (*Simulium*). *Systematic Biology* 50: 18–38.
- Kozak, K. H., A. Larson, R. M. Bonett & L. J. Harmon, 2005. Phylogenetic analysis of ecomorphological divergence, community structure, and diversification rates in dusky salamanders (Plethodontidae: Desmognathus). *Evolution* 59: 2000–2016.
- Kraft, N. J. B., W. K. Cornwell, C. O. Webb & D. D. Ackerly, 2007. Trait evolution, community assembly, and the phylogenetic structure of ecological communities. *American Naturalist* 170: 271–283.
- Losos, J. B., M. Leal, R. E. Glor, K. de Queiroz, P. E. Hertz & L. R. Schettino, 2003. Niche lability in the evolution of a Caribbean lizard community. *Nature* 424: 542–545.
- Lucas, P. & F. F. Hunter, 1999. Phenotypic plasticity in the labral fan of simuliid larvae (Diptera): effect of seston load on primary-ray number. *Journal of Zoology* 77: 1843–1849.
- MacArthur, R. H. & R. Levins, 1967. The limiting similarity, convergence and divergence of coexisting species. *The American Society of Naturalists* 101: 377–385.
- Malmqvist, B., Y. Zhang & P. H. Adler, 1999. Diversity, distribution and larval habitats of North Swedish blackflies (Diptera: Simuliidae). *Freshwater Biology* 42: 301–314.
- McCreadie, J. W. & P. H. Adler, 1998. Scale, time, space, and predictability: species distributions of preimaginal black flies (Diptera: Simuliidae). *Oecologia* 114: 79–92.
- McCreadie, J. W. & P. H. Adler, 2006. Ecoregions as predictors of lotic assemblages of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Ecography* 29: 603–613.
- McCreadie, J. W. & P. H. Adler, 2012. The roles of abiotic factors, dispersal, and species interactions in structuring stream assemblages of black flies (Diptera: Simuliidae). *Aquatic Biosystems* 8: 14.
- McCreadie, J. W. & M. H. Colbo, 1991. Spatial distribution patterns of larval cytotypes of the *Simulium venustum/verecundum* complex (Dipter: Simuliidae) on the Avalon Peninsula, Newfoundland: factors associated with occurrence. *Canadian Journal of Zoology* 69: 2651–2659.
- McCreadie, J. W., N. Hamada & M. E. Grillet, 2004. Spatial-temporal distribution of preimaginal blackflies in Neotropical streams. *Hydrobiologia* 513: 183–196.
- McCreadie, J. W., P. H. Adler, M. E. Grillet & N. Hamada, 2006. Sampling statistics in understanding distributions of black fly larvae (Diptera: Simuliidae). *Acta Entomologica Serbica* 591: 89–96.
- Nylander J. A. A. 2004. MrModeltest 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary. Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- Palmer, R. W. & D. A. Craig, 2000. An ecological classification of primary labral fans of filter-feeding black fly (Diptera: Simuliidae) larvae. *Journal of Zoology* 78: 199–218.
- Pramual, P. & P. H. Adler, 2014. DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand. *Molecular Ecology Resources* 14: 262–271.
- Pramual, P. & C. Kuvangkadilok, 2009. Agricultural land use and black fly (Diptera: Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand. *Hydrobiologia* 625: 173–184.
- Pramual, P. & K. Wongpakam, 2010. Seasonal variation of black fly (Diptera: Simuliidae) species diversity and community structure in tropical streams of Thailand. *Entomological Science* 13: 17–28.
- Pramual, P., C. Kuvangkadilok, S. Jitklang, U. Tangkawanit & P. H. Adler, 2012. Geographical versus ecological isolation of closely related black flies (Diptera: Simuliidae) inferred from phylogeny, geography, and ecology: implications for speciation in black flies (Diptera: Simuliidae). *Organisms, Diversity and Evolution* 12: 183–195.
- Razafindratsima, O. H., S. Mehtani & A. E. Dunham, 2013. Extinctions, traits and phylogenetic community structure: insights from primate assemblages in Madagascar. *Ecography* 36: 47–56.
- Scheder, C. & J. A. Waringer, 2002. Distribution patterns and habitat characterization of Simuliidae (Insecta: Diptera) in a low-order sandstone stream (Weidlingbach, Lower Austria). *Limnologica* 32: 236–247.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu & P. Flook, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- Sriphrom, P., P. N. Sopaladawan, K. Wongpakam & P. Pramual, 2014. Molecular phylogeny of black flies in the *Simulium tuberosum* (Diptera: Simuliidae) species group in Thailand. *Genome* 57: 45–55.
- Takaoka, H. & W. Choochote, 2004. A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Tropical Medicine and Health* 32: 189–197.
- Takaoka, H. & D. M. Davies, 1995. The Black Flies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia. Kyushu University Press, Fukuoka.
- Takaoka, H. & H. Suzuki, 1984. The black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Sanitary Zoology* 35: 7–45.
- Vamosi, J. C. & S. M. Vamosi, 2007. Body size, rarity, and phylogenetic community structure: insights from diving beetle assemblages of Alberta. *Diversity and Distributions* 13: 1–10.
- Vamosi, S. M., S. B. Heard, J. C. Vamosi & C. O. Webb, 2009. Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. *Molecular Ecology* 18: 572–592.
- Webb, C. O., D. D. Ackerly, M. A. McPeck & M. J. Donoghue, 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 475–505.
- Webb, C. O., D. D. Ackerly & S. W. Kembel, 2008. Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics* 24: 2098–2100.

- Weiher, E. & P. A. Keddy, 1995. The assembly of experimental wetland plant communities. *Oikos* 73: 323–335.
- Willis, C. G., M. Halina, C. Lehman, P. B. Reich, A. Keen, S. McCarthy & J. Cavender-Bares, 2010. Phylogenetic community structure in Minnesota oak savanna is influenced by spatial extent and environmental variation. *Ecography* 33: 565–577.
- Zhang, Y. & B. Malmqvist, 1996. Relationships between labral fan morphology and habitat in North Swedish blackfly larvae (Diptera: Simuliidae). *Biology Journal of Linnean Society* 59: 261–280.

Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- Pramual, P.*, Thaijarern, J., Sofian-Azirun, M., Ya'cob, Z., Hadi, U.K., Takaoka, H. (2015) Cytogenetic and Molecular Evidence of Additional Cryptic Diversity in High Elevation Black fly *Simulium feuerborni* (Diptera: Simuliidae) Populations in Southeast Asia. **Journal of Medical Entomology**, 52(5), 829 – 836. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.953)

Cytogenetic and Molecular Evidence of Additional Cryptic Diversity in High Elevation Black fly *Simulium feuerborni* (Diptera: Simuliidae) Populations in Southeast Asia

PAIROT PRAMUAL,^{1,2,3} JIRAPORN THAIJARERN,¹ MOHD SOFIAN-AZIRUN,⁴ ZUBAIDAH YA'COB,⁴ UPIK KESUMAWATI HADI,⁵ AND HIROYUKI TAKAOKA⁴

J. Med. Entomol. 1–8 (2015); DOI: 10.1093/jme/tjv080

ABSTRACT *Simulium feuerborni* Edwards is geographically widespread in Southeast Asia. Previous cytogenetic study in Thailand revealed that this species is a species complex composed of two cytoforms (A and B). In this study, we cytologically examined specimens obtained from the Cameron Highlands, Malaysia, and Puncak, Java, Indonesia. The results revealed two additional cytoforms (C and D) of *S. feuerborni*. Specimens from Malaysia represent cytoform C, differentiated from other cytoforms by a fixed chromosome inversion on the long arm of chromosome III (III-L-5). High frequencies of the B chromosome (33–83%) were also observed in this cytoform. Specimens from Indonesia represent the cytoform D. This cytoform is differentiated from others by a fixed chromosome inversion difference on the long arm of chromosome II (II-L-4). Mitochondrial DNA sequences support genetic differentiation among cytoforms A, B, and C. The pairwise F_{ST} values among these cytoforms were highly significantly consistent with the divergent lineages of the cytoforms in a median-joining haplotype network. However, a lack of the sympatric populations prevented us from testing the species status of the cytoforms.

KEY WORDS polytene chromosome, Simuliidae, *Simulium*, species complex

Black flies (Diptera: Simuliidae) are significant blood-sucking insects. The adult females of many species are important pests and vectors of disease, such as human onchocerciasis or river blindness. This disease was classified as the second placed cause of infectious blindness (Adler et al. 2010). Black fly biting can reduce poultry and cattle productivity (Crosskey 1990, Adler et al. 2004). On the other hand, the larval stage of the black fly plays an important role in nutrient turnover in stream ecosystems (Malmqvist et al. 2004). Therefore, taxonomic knowledge about black flies is crucial for understanding all aspects of their biology.

Banding patterns of the salivary gland polytene chromosomes have an indispensable role in black fly taxonomy and systematics (Rothfels 1979, Adler et al. 2010). Cytological differentiation of the morphologically inseparable species is based on the following three criteria: 1) fixed chromosome inversion differences; 2) sex

chromosome differences; and 3) different floating inversions (Rothfels 1956). Cytogenetic studies have often revealed cryptic diversity in many black fly species (e.g., Tangkawanit et al. 2009, Pramual and Wongpakam 2011, Pramual and Kuvangkadilok 2012). Despite a highly successful use of banding patterns in the polytene chromosome for black fly taxonomy and systematics, recent studies have also pointed out the necessity of using an integrated approach based on multiple characters (Ilmonen et al. 2009, Adler and Huang 2011, Pramual and Kuvangkadilok 2012, Diaz et al. 2015). Therefore, in addition to the cytogenetic level, information from molecular genetics is also requiring to fully understand black fly biodiversity.

Simulium feuerborni Edwards is geographically widespread, being recorded from Thailand, Malaysia, and Indonesia (Adler and Crosskey 2014). However, this species is ecologically restricted to high elevation streams (>700 m above sea level), which are usually small and slow flowing (Pramual and Wongpakam 2013). A previous cytogenetic and molecular population genetic study in Thailand revealed that this species is a species complex composed of two cytoforms (A and B) differentiated by several fixed chromosome inversion differences. The two cytoforms also show high levels of genetic differentiation based on mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) sequences (Pramual and Wongpakam 2013). In this study, we further examine the genetic diversity of *S. feuerborni* from two additional countries, namely, Malaysia and Indonesia.

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.

² Biodiversity and Traditional Knowledge Research Unit, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.

³ Corresponding author, e-mail: pairot.p@msu.ac.th.

⁴ Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, Kuala Lumpur, 50603, Malaysia.

⁵ Division of Parasitology and Medical Entomology, Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University, Bogor, Indonesia. Jl Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680.

Polytene chromosome banding sequences and the mitochondrial DNA COI gene were compared with those previously reported from Thailand.

Materials and Methods

Sample Collection and Species Identification. Black fly samples were collected from six collections in two countries, namely, Puncak, Java (one collection), Indonesia and the Cameron Highlands (five collections), Malaysia (Table 1). Larvae were preserved in Carnoy's solution (3:1, 95% ethanol: glacial acetic acid) for cytogenetic and molecular genetic studies (Pramual et al. 2011). Species were identified morphologically using the most recent keys of the *Simulium* (*Nevermannia*) *feuerborni* species group (Takaoka and Srisuka 2011).

Cytogenetic Study. Salivary gland polytene chromosomes were prepared from penultimate-instar larvae. The abdominal segment of the larvae was cut transversely. The anterior portion of the larval body was placed in 80% ethanol for further molecular works. The abdominal segment that contained the salivary glands was slit ventrally and then stained using the Feulgen method of Rothfels and Dunbar (1953). Chromosomes were examined under compound microscope. Banding patterns of the polytene chromosomes were read band-for-band and compared with those of the polytene chromosome map of *S. feuerborni* reported by Pramual and Wongpakam (2013). Name of the chromosome inversions were numbered in order of their discovery beginning after the inversion reported by Pramual and Wongpakam (2013).

DNA Extraction, Polymerase Chain Reaction (PCR), and Sequencing. DNA was extracted from the anterior portion of the larva following a procedure described previously (Pramual et al. 2011). The barcoding region of the COI gene was amplified using the primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGT GACCAAAAATCA-3'; Folmer et al. 1994). PCR was performed in a total volume of 50 μ l containing 5 μ l of 10 $\times$ reaction buffer, 3 μ l of MgCl₂ (50 mM), 1.6 μ l of dinucleotide triphosphates, 2 μ l of each primer (10 μ M), and 0.4 μ l of *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l).

Temperature profile was as follow: 96°C for 1 min followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min (Rivera and Currie 2009). PCR products were checked on a 1% agarose gel containing 0.5 μ g/ml of ethidium bromide and cleaned using the HiYield Gel/PCR fragment extraction kit (RBC Bioscience, Xindian City, Taiwan). Cleaned PCR products were sequenced by the Macrogen sequencing service (Seoul, Korea) using the same primers as in the PCR.

Data Analysis. Mitochondrial COI sequences were deposited in GenBank under accession numbers KP770123–KP770132. Haplotype diversity and nucleotide diversity were calculated in Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer 2010). Genetic differentiations among cytoforms were estimated by population pairwise F_{ST} in Arlequin. Significant test statistics were obtained from 1,000 permutations. A median-joining (MJ) haplotype network (Bandelt et al. 1999) was calculated using Network v.4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>). The “best match” and “best close match” methods in the program TaxonDNA (Meier et al. 2006) were used to test the frequency of successful identification of the specimens into cytoforms.

Results

Chromosome Polymorphisms. In total, 158 larvae of *S. feuerborni* from three locations, two from the Cameron Highlands, Malaysia, and one from Puncak, Java, Indonesia, were cytologically examined. Overall, we found a low frequency of polymorphic chromosome inversion. There was only a single floating inversion (IS-4; Fig. 1) with relatively low frequency (6%) from the Cameron Highlands site (Table 2). However, a high frequency of the B chromosome was found in this location (Table 2). This B chromosome is a small metacentric (Fig. 2A) where the location of the centromere was determined by the ectopic pairing to the A complement centromere (Brockhouse et al. 1989) (Fig. 2B). One arm of the B chromosome consists of fluffy end and another arm consists of two heavy bands near the centromere and one lighter band near the end (Fig. 2A). No chromosome inversion polymorphism and

Table 1. Collection sites, number of specimens, and stream variables of *S. feuerborni* in Malaysia and Indonesia used in this study

Location	Code	Collection date	Latitude/longitude	Altitude (m)	Stream width (m)	Stream depth (m)	Water velocity (m/s)	pH	Dissolved oxygen (mg/L)	Temp. (°C)
Brinchang, Cameron Highlands, Malaysia	CH15-1	26 Dec. 2012	04° 31.461' N, 101° 23.338' E	1,813	0.75	0.1	0.25	7.36	5.5	15.9
	CH15-2	21 Mar. 2013	04° 31.461' N, 101° 23.338' E	1,813	0.20	0.05	0.22	6.69	2.4	15.4
Tanah Rata, Cameron Highlands, Malaysia	CH11-1	24 Nov. 2012	04° 28.738' N, 101° 22.979' E	1,405	0.03	0.22	0.54	6.81	7.4	17.0
	CH11-2	27 Dec. 2012	04° 28.738' N, 101° 22.979' E	1,405	0.03	0.22	0.54	6.81	7.4	17.0
	CH11-3	25 Dec. 2013	04° 28.738' N, 101° 22.979' E	1,405	0.03	0.24	0.41	6.60	3.59	17.0
Puncak, Java, Indonesia	PUN	3 Apr. 2012	NA	1,200	0.30–0.40	0.20	NA	7.00	NA	NA

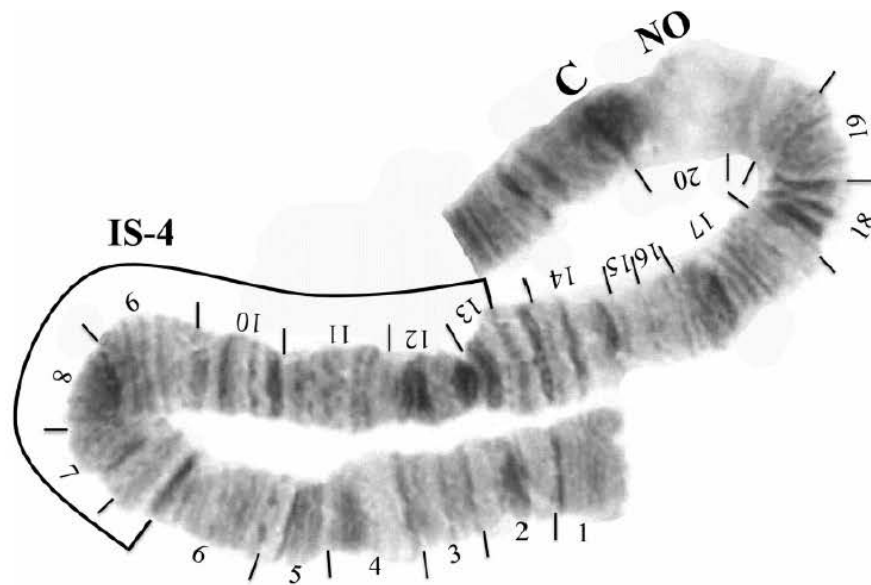


Fig. 1. Chromosome IS of *S. feuerborni* cytoform C from Cameron Highlands, Malaysia. Breakpoints of the IS-4 floating inversions are indicated with brackets. C, centromere; NO, nucleolar organizer.

Table 2. Chromosome characteristics of *S. feuerborni* in Malaysia and Indonesia compared with the standard polytene chromosome maps of this species from Thailand of Pramual and Wongpakam (2013)

Code	Country	No. of specimens (male: female)	Chromosome inversion	B chromosome	Cytoform assignment
CH15-1	Malaysia	6:14	IS-4 (6%) IIL-5 ^a	70%	C
CH15-2	Malaysia	20:22	IIL-5 ^a	62%	C
CH11-1	Malaysia	3:9	IIL-5 ^a	33%	C
CH11-2	Malaysia	5:7	IIL-5 ^a	83%	C
CH11-3	Malaysia	5:6	IIL-5 ^a	64%	C
PUN	Indonesia	24:37	IIL-4 ^a	—	D
Total		63:95			

^aFixed inversion.

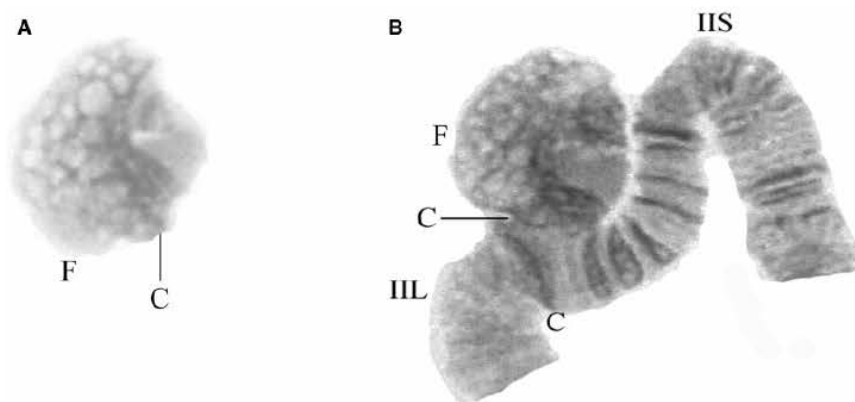


Fig. 2. The metacentric B chromosome of *S. feuerborni*. (A) B chromosome of the larva of *S. feuerborni* from Cameron Highlands, Malaysia, showing the location of centromere (C) and fluffy end (F). (B) Ectopic pairing of the B chromosome with chromosome IIL.

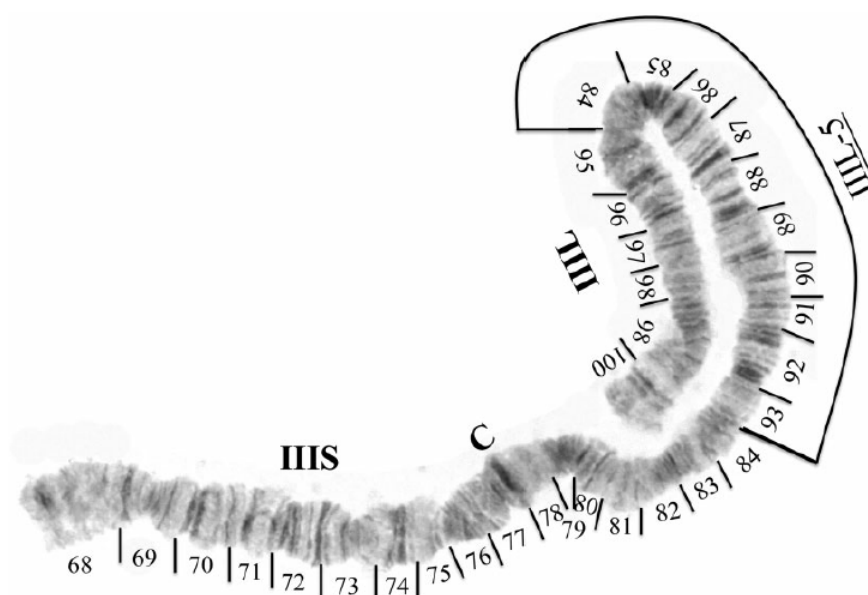


Fig. 3. Chromosome III of *S. feuerborni* cytoform C from Cameron Highlands, Malaysia. Limit of inversion III-5 that is fixed in *S. feuerborni* cytoform C is indicated by brackets. C, centromere.

B chromosome were recorded from Puncak, Java, Indonesia.

Comparisons of the polytene chromosome banding patterns between Malaysian and Indonesian populations with the standard polytene chromosome map of this species from Thailand (Pramual and Wongpakam 2013) revealed two additional cytoforms.

***S. feuerborni* Cytoform C.** Cytoform C was characterized by a fixed chromosome inversion on the long arm of chromosome III (III-5), compared with the standard polytene chromosome-banding sequences (Fig. 3), and undifferentiated sex chromosome. Larvae ($n = 97$) were examined from two populations in the Cameron Highlands (CH11 and CH15), Malaysia (Table 2). In addition, these populations also possessed a high frequency of the B chromosome (Table 2), which ranged between 33 and 83% in each collection.

***S. feuerborni* Cytoform D.** Cytoform D was characterized by a fixed chromosome inversion on the long arm of chromosome II (II-4) (Fig. 4) and undifferentiated sex chromosome. This inversion has break points very close to the II-2 inversion previously reported in cytoform B (Pramual and Wongpakam 2013). Larvae ($n = 61$) were examined from a population from Puncak, Java, (PUN) Indonesia (Table 2). No floating inversion or B chromosome was found in this population.

Mitochondrial DNA Sequence Variation and Genetic Differentiation Among Cytoforms. Ten specimens from the Cameron Highlands, Malaysia, were sequenced for a 586-bp fragment of the COI gene. The PCR with the specimens from Indonesia was unsuccessful, despite various PCR conditions being tried. In total, 69 sequences (10 from Malaysia and 59 from Thailand) were included in the data analysis.

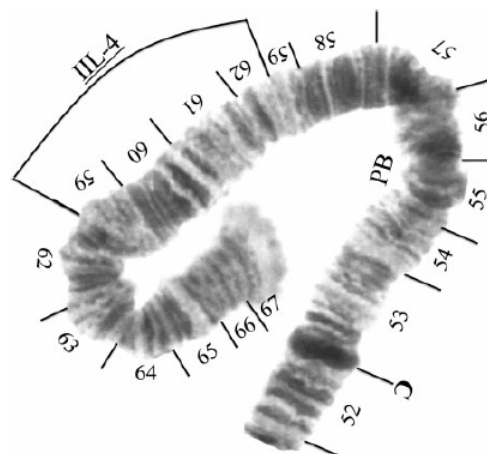


Fig. 4. Chromosome arm III of *S. feuerborni* cytoform D from Puncak, Java, Indonesia. Limit of inversion III-4 that is fixed in *S. feuerborni* cytoform D is indicated by brackets. C, centromere; PB, parabalbiani marker.

Nucleotide substitutions were detected in 72 positions (Fig. 5). No deletions or insertions were found.

Genetic diversity at the molecular level based on the COI gene revealed lower diversity in the *S. feuerborni* population from Malaysia compared with those from Thailand (Table 3). Seven haplotypes were recognized from 10 specimens with a nucleotide diversity of 0.008 and a haplotype diversity of 0.869 (Table 3).

Mitochondrial DNA genealogy between sequences of *S. feuerborni* revealed that 10 specimens from Malaysia that represent cytoform C were clustered

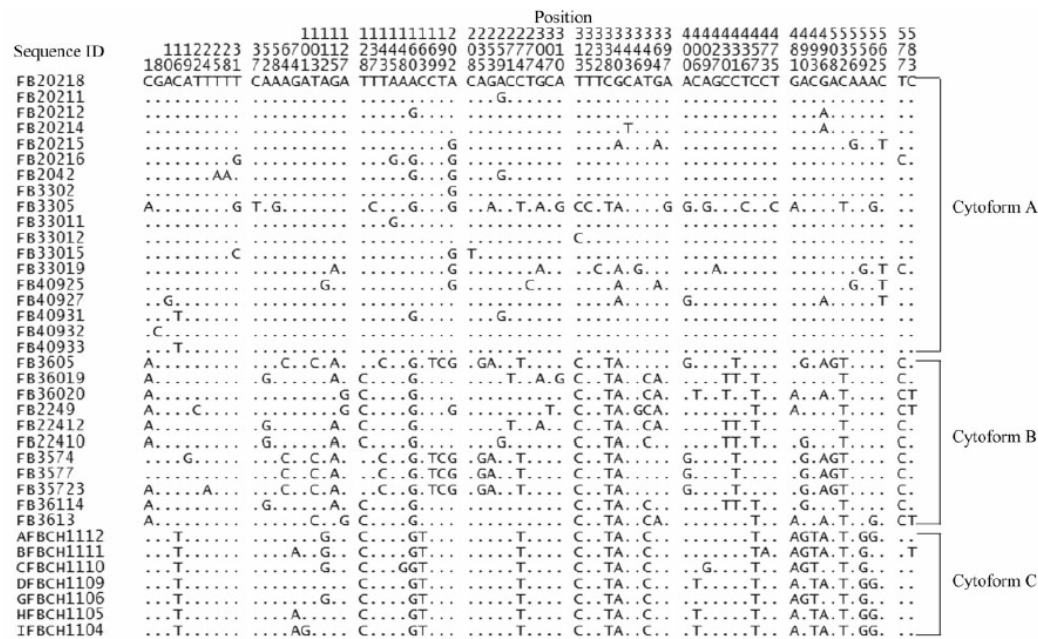


Fig. 5. Variable positions in 586 bp of the COI gene for the 36 haplotypes of *S. feuerborni* cytoforms A, B, and C.

Table 3 Genetic diversity indices of the cytoforms of *S. feuerborni* based on mitochondrial COI sequences

Cytoform	n	Haplotype diversity	Nucleotide diversity
A	30 ^a	0.869 (± 0.059)	0.008 (± 0.005)
B	29 ^a	0.579 (± 0.110)	0.015 (± 0.008)
C	10	0.911 (± 0.008)	0.007 (± 0.004)

^a Data from Pramual and Wongpakam (2013)

together and well separated from the other cytoforms (Fig. 6). Population pairwise F_{ST} indicated a high level of genetic differentiation among the cytoforms (Table 4). This was supported by the analysis of the DNA barcode using the best match and best close match methods, which revealed that all specimens were perfectly assigned into cytoforms.

Discussion

Black fly species that are geographically widespread and capable of using diverse habitats are likely to be a species complex (Adler and McCreadie 1997). *S. feuerborni* is ecologically restricted into high-elevation habitats. However, this species is geographically widespread being recorded from Thailand, Malaysia, and Indonesia (Adler and Crosskey 2014). Previous cytogenetic study in Thailand revealed that this species is a species complex composed of two cytoforms differentiated by several fixed chromosome inversion differences. This species also possesses high levels of intraspecific genetic divergence based on the COI barcoding sequences (Pramual and Wongpakam 2013, Pramual and Adler 2014).

Our results revealed two additional cytoforms (C and D) of *S. feuerborni*. Cytoform C was found in the Cameron Highlands, Malaysia. This cytoform was separated from the other by a fixed chromosome inversion on the long arm of chromosome III (III-L-5). In addition, this cytoform was also characterized by a high frequency of the B chromosome. The B chromosome was found in each collection from the Cameron Highlands population ranging from 33 to 83%. A high frequency of the B chromosome in black fly populations is usually found in the temperate and arctic species (Procnunier 1975, Brockhouse et al. 1989, Adler et al. 2010). B chromosomes have been reported in tropical black fly species such as *Simulium tani* Takaoka & Davies (Tangkawanit et al. 2009) and *Simulium nakhonense* Takaoka & Suzuki (Kuvangkadilok et al. 1999) but the frequencies are very low (0.5 and 7%, respectively). The high frequency of the B chromosome in *S. feuerborni* cytoform C, therefore, is a unique character of the tropical black fly species. As *S. feuerborni* cytoform C occurs in high elevation habitats (>1,400 m above sea level) where the climatic condition resembles that of the temperate region, it is likely that the climatic condition could play a role in the occurrence of the B chromosome in black flies. There are several possible explanations for the presence of the B chromosome in the populations (Camacho et al. 2000), but occurrence at a high frequency suggested that it might have a positive effect. The role of the B chromosome has not been fully determined in black fly, but there are some relationships between the presence of the B chromosome and biological activities. For example, Kachvoryan et al. (1996) found that the frequencies of the

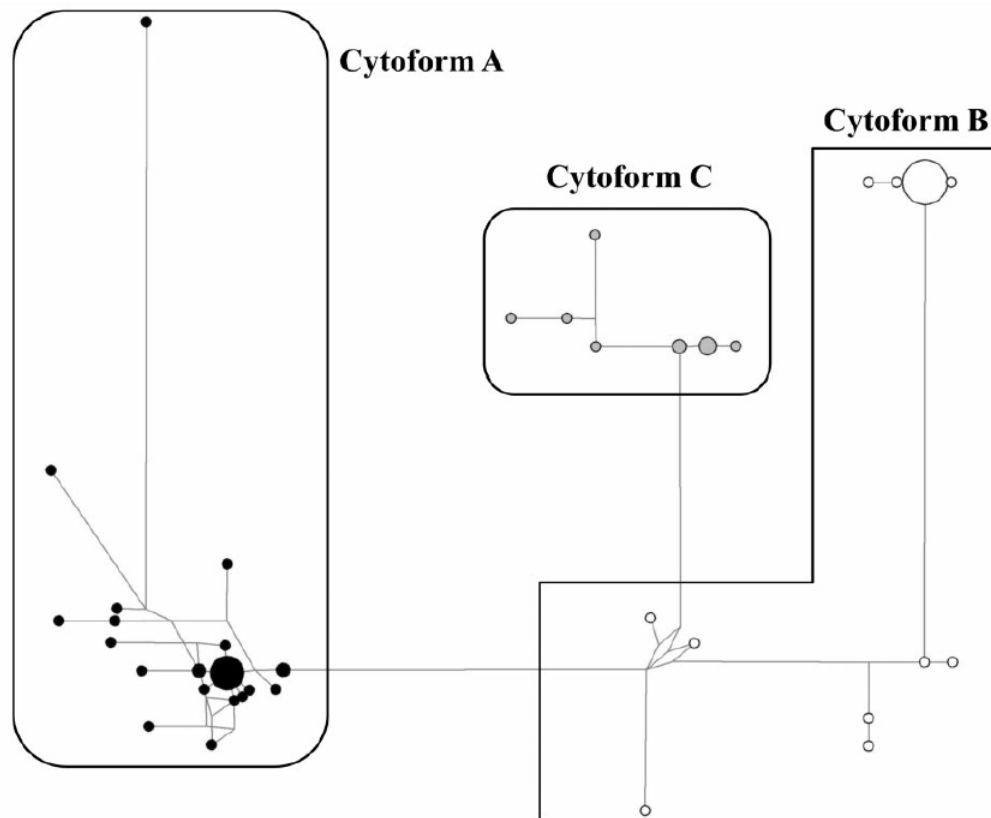


Fig. 6. MJ network of the 69 COI sequences of *S. feuerborni* from six populations from Thailand, one population from Malaysia, and one population from Indonesia. Circles represent haplotypes and the sizes are relative to the number of individuals sharing the specific haplotype.

Table 4. Population pairwise F_{ST} between cytoforms of *S. feuerborni* based on mitochondrial COI sequences

Cytoform	A	B	C
A			
B	0.684*		
C	0.760*	0.696*	

* $P < 0.001$.

B chromosome in *Cnetha zakhariensis* Rubzov and *Tetisimulium condici* were related to water pollution. Procnier (1982) found that the presence of the B chromosome in *Cnephia dacotensis* (Dyar and Shannon) increased rRNA production efficiency that resulted in faster development of the larva.

S. feuerborni cytoform D was found in Puncak, West Java, Indonesia. Because *S. feuerborni* cytoform D was collected from the location ~800 km far from the type locality of East Java (Edwards 1934), thus we cannot conclude that this cytoform could represent the typical *S. feuerborni*. *S. feuerborni* cytoform D was characterized by a fixed chromosome inversion on the long arm of chromosome II (III-4). Break points in this inversion were very close to those previously reported

in cytoform B from Thailand (Pramual and Wongpakam 2013). No B chromosome was found in this cytoform.

Ecological comparisons among the larval habitats indicated that cytoforms of *S. feuerborni* seem to occur under different ecological conditions. *S. feuerborni* cytoform C was found at a relatively higher elevation (1,405–1,813 m) than the other cytoforms (cytoform A, 1,185–1,615 m; cytoform B, 950–1,320 m [Pramual and Wongpakam 2013]; cytoform D, 1,200 m). In addition, *S. feuerborni* cytoform C was also found in more acidic water (pH 6.60–7.36) than the other cytoforms (pH >7.00). *S. feuerborni* cytoforms C and D were found in deeper streams (0.05–0.24 m) compared with cytoform A and B (<0.07 m) (Pramual and Wongpakam 2013). Our results agree with several previous studies finding that different cytoforms of black flies are associated with different stream ecologies (Adler and McCreddie 1997, Kuvangkadilok et al. 2008, Tangkawanit et al. 2009, Pramual and Kuvangkadilok 2012).

The high level of the population pairwise F_{ST} and the clear separation of the haplotype in the MJ network suggest that there is a long historical isolation of these cytoforms (Avise 2000). The high level of genetic

differentiation among cytoforms found in this study supports a previous finding (Pramual and Wongpakam 2013). We also found that the COI barcode could effectively differentiate the cytoforms of *S. feuerborni*. Therefore, the COI barcoding sequences could be used to identify cytoforms of *S. feuerborni*. This could be applied to the other life stages (e.g., pupa and adult), in which polytene chromosome study cannot.

In conclusion, our study revealed additional diversity in *S. feuerborni*, one of high elevation black flies in tropical Asia. Molecular data based on the COI barcoding sequences further support the cytoform differentiations. As this species occupies high elevation habitats, which were previously suggested as being refugium sites for black flies during the dry conditions of the Pleistocene glaciation (Pramual et al. 2005), phylogeographic study of this species would be interesting to examine the effect of the Pleistocene climatic change on high elevation faunas in this biodiversity hotspot region. In addition, our integrated method enables us to obtain information from both cytogenetic and molecular levels. Therefore, this method could be applied to the onchocerciasis vectors that are known to be cytologically species complex. Because limitation of cytogenetic for adult identification thus association of the molecular data from cytological typing larva might enable identification of the adult into cytospecies. This could encourage current effort to control onchocerciasis vectors.

Acknowledgments

This work was funded by the Thailand Research Fund and Mahasarakham University (grant RSA5680013), and also supported by the research grant from University of Malaya (RP003A-13SUS). We thank Jolyon Dodgson (Mahasarakham University, Thailand) for valuable comments on an earlier version of the manuscript.

References Cited

- Adler, P. H., and R. W. Crosskey. 2014. World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. (<http://www.clemson.edu/cafls/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>)
- Adler, P. H., and Y. T. Huang. 2011. Integrated systematics of the Simuliidae (Diptera): Evolutionary relationships of the little-known Palearctic black fly *Simulium acrotrichum*. *Can. Entomol.* 143: 612–628.
- Adler, P. H., and J. W. McCreadie. 1997. The hidden ecology of black flies: Sibling species and ecological scale. *Am. Entomol.* 43: 153–162.
- Adler, P. H., D. C. Currie, and D. M. Wood. 2004. The black flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Adler, P. H., R. A. Cheke, and R. J. Post. 2010. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infect. Genet. Evol.* 10: 846–865.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, MA.
- Bandelt, H. J., P. Forster, and A. Rohlf. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37–48.
- Brockhouse, C., J.A.B. Bass, R. M. Feraday, and N. A. Straus. 1989. Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* 32: 516–521.
- Camacho, J.P.M., T. F. Sharbel, and L.W. Beukeboom. 2000. B-chromosome evolution. *Phil. Tran. R. Soc. B.* 355: 163–178.
- Crosskey, R. W. 1990. *The natural history of blackflies*. John Wiley & Sons, London, United Kingdom.
- Diaz, S. A., L. I. Moncada, C. H. Murcia, I. A. Lotta, N. E. Matta, and P. H. Adler. 2015. Integrated taxonomy of a new species of black fly in the subgenus *Trichodagnia* (Diptera: Simuliidae) from the Páramo Region of Colombia. *Zootaxa* 3914: 541–557.
- Edwards, F. W. 1934. The Simuliidae (Diptera) of Java and Sumatra. *Arch. Hydrobiol.* 13: 92–138.
- Excoffier, L., and H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564–567.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294–299.
- Ilmonen, J., P. H. Adler, B. Malmqvist, and A. Cywinska. 2009. The *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae) in Europe: multiple character sets for assessing species status. *Zool. J. Linn. Soc.* 156: 847–863.
- Kachvoryan, E. A., L. A. Chubareva, N. A. Petrova, and L. S. Mirunyan. 1996. Frequency changes of B chromosomes in synanthropic species of bloodsucking blackflies (Diptera, Simuliidae). *Genetika* 32: 637–640.
- Kuvangkadilok, C., S. Phayubhasena, and C. Boonkemthong. 1999. Larval polytene chromosomes of five species of blackflies (Diptera: Simuliidae) from doi inthanon national park, Northern Thailand. *Cytologia* 64: 197–207.
- Kuvangkadilok, C., U. Lualon, and V. Baimai. 2008. Cytotaxonomy of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Genome* 51: 972–987.
- Malmqvist, B., P. H. Adler, K. Kuusela, R. W. Merritt, R. S. Wotton. 2004. Black flies in the boreal biome, key organisms in both terrestrial and aquatic environments: A review. *Ecoscience* 11: 187–200.
- Meier, R., K. Shiyang, G. Vaidya, and P.K.L. Ng. 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.* 55: 715–728.
- Pramual, P., and P. H. Adler. 2014. DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand. *Mol. Ecol. Resour.* 14: 262–271.
- Pramual, P., and C. Kuvangkadilok. 2012. Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium (Gomphostilbia) angulistylum* (Diptera: Simuliidae). *Genome* 55: 447–458.
- Pramual, P., and K. Wongpakam. 2011. Cytogenetics of *S. siamense* Takaoka and Suzuki, 1984 (Diptera: Simuliidae) in northeastern Thailand. *Aquat. Insect.* 33: 171–184.
- Pramual, P., and K. Wongpakam. 2013. Population genetics of the high elevation black fly *Simulium (Nevermannia) feuerborni* Edwards in Thailand. *Entomol. Sci.* 16: 298–308.
- Pramual, P., C. Kuvangkadilok, V. Baimai, and C. Walton. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* 14: 3989–4001.
- Pramual, P., K. Wongpakam, and P. H. Adler. 2011. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in

- the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). *Genome* 54: 1–9.
- Procunier, W. S. 1975.** B-chromosomes of *Cnephia dacotensis* and *C. ornithophilia* (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* 53: 1638–1647.
- Procunier, W. S. 1982.** The interdependence of B chromosomes, nucleolar organizer expression, and larval development in the blackfly species *Cnephia dacotensis* and *Cnephia ornithophilia* (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* 60: 2879–2896.
- Rivera, J., and D. C. Currie. 2009.** Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Mol. Ecol. Resour.* 9: 224–236.
- Rothfels, K. H. 1956.** Black flies: Sibling, sex and species grouping. *J. Hered.* 47: 113–122.
- Rothfels, K. H. 1979.** Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). *Annu. Rev. Entomol.* 24: 507–539.
- Rothfels, K. H., and R. W. Dunbar. 1953.** The salivary gland chromosomes of the black fly *Simulium vittatum* Zett. *Can. J. Zool.* 31: 226–241.
- Takaoka, H., and W. Srisuka. 2011.** A new species of *Simulium* (*Nevermannia*) (Diptera, Simuliidae) from Thailand, with keys to members of the *Simulium feuerborni* species-group in Thailand. *ZooKeys* 89: 57–70.
- Tangkawanit, U., C. Kuvangkadilok, V. Baimai, and P. H. Adler. 2009.** Cytosystematics of the *Simulium tuberosum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zool. J. Linn. Soc.* 155: 289–315.

Received 13 February 2015; accepted 8 June 2015.

Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Thaijarern, J., Sopaladawan, P. N., Wongpakam, K., **Pramual, P.*** (2014). Phylogeography of black fly, *Simulium aureohirtum* Brunetti (Diptera: Simuliidae) in Thailand. **Genome**, 57, 411 – 417. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.558)

Phylogeography of the black fly *Simulium aureohirtum* (Diptera: Simuliidae) in Thailand

Jiraporn Thajjarern, Piyamas Nanork Sopaladawan, Komgrit Wongpakam, and Pairot Pramual

Abstract: The black fly *Simulium aureohirtum* Brunetti (Diptera: Simuliidae) is geographically widespread and utilizes diverse habitats. Previous studies revealed high genetic diversity, suggesting that this species could be a species complex. In this study, we used mitochondrial cytochrome *c* oxidase II sequences to examine genetic structure and demographic history of *S. aureohirtum* in Thailand. High level of genetic variation was observed due to the existence of genetically divergent lineages (A, B, and C). Lineages A and C were geographically widespread, while lineage B was geographically restricted to the eastern part of Thailand. The geographic localization of lineage B suggested limitations in gene flow, which is most likely a result of ecologically different habitats. Large genetic differences between individuals of lineages A and C, but geographically sympatric distributions of the members of these lineages, are considered to represent an admixture of the populations that have evolved allopatrically. Historical environmental change during the Pleistocene glaciations is possibly the factor that drove the lineage divergence. Population demographic history analyses revealed recent population expansions in the three lineages dating back to the last glaciations. These observations further highlight the significance of the Pleistocene climatic change on current genetic structure and diversity of living organisms of the Southeast Asian mainland.

Key words: black fly, phylogeography, Pleistocene, Simuliidae.

Résumé : La mouche noire *Simulium aureohirtum* Brunetti (Diptera: Simuliidae) est largement répandue dans le monde et occupe des habitats divers. Des études antérieures ont révélé une grande diversité génétique, ce qui suggère que cette espèce pourrait en fait regrouper un complexe d'espèces. Dans ce travail, les auteurs ont employé des séquences de la cytochrome *c* oxydase II mitochondriale pour examiner la structure génétique et l'histoire démographique du *S. aureohirtum* en Thaïlande. Une grande variation génétique a été observée en raison de la présence de lignées divergentes (A, B et C). Les lignées A et C étaient largement répandues tandis que la lignée B était limitée à la partie orientale de la Thaïlande. La circonscription géographique de la lignée B suggère un flux génique limité, lequel serait vraisemblablement le résultat d'habitats différents sur le plan écologique. Les grandes différences génétiques entre individus des lignées A et C, en dépit d'une distribution géographique sympatrique, découleraient du mélange de populations qui ont évolué de manière allopatrique. Des changements environnementaux survenus lors des glaciations du Pléistocène constitueraient possiblement le facteur qui a alimenté la divergence de ces lignées. Des analyses de l'historique démographique de ces populations révèlent des expansions récentes des populations au sein des trois lignées qui remonteraient à la dernière glaciation. Ces observations soulignent davantage l'importance des changements climatiques survenus lors du Pléistocène sur la structure et la diversité génétiques actuelles chez les organismes vivants de l'Asie du Sud-Est. [Traduit par la Rédaction]

Mots-dés : mouche noire, phylogéographie, Pléistocène, Simuliidae.

Introduction

Molecular genetic markers can be used to separate the effects of historical factors from contemporary ones on the current genetic structure and diversity of species (Templeton 1998; Walton et al. 2000). The Pleistocene climatic and environmental change is among the most important historical factors that significantly contributed to the current genetic structure and diversity of organisms globally (Hewitt 1996). In Southeast Asia, several studies on diverse organisms revealed that climatic and environmental change during the last glaciation played a critical role in shaping the genetic structure and diversity of living organisms (Cannon and Manos 2003; Pramual et al. 2005; O'Loughlin et al. 2008; Morgan et al. 2010, 2011).

Cytogenetics has contributed significantly to our knowledge of black fly biodiversity (Rothfels 1979; Adler et al. 2004). However, recent studies using molecular genetic markers have frequently revealed hidden diversity in species that had not been detected at the cytological level (e.g., Pramual et al. 2011b; Pramual and Wongpakam 2013; Pramual and Adler 2014). Although the reverse (i.e., high diversity at the cytological level but low diversity at the molecular level) has also been found (Pramual et al. 2011a). Therefore, fully understanding black fly biodiversity requires integrated approaches using information from morphology, cytology, and molecular genetics.

Simulium aureohirtum Brunetti is a geographically widespread species. This species has been recorded in both Palearctic and Oriental regions (Adler and Crosskey 2014). Three synonyms of

Received 2 July 2014. Accepted 4 September 2014.

Corresponding Editor: L. Bonen.

J. Thajjarern, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand.
P.N. Sopaladawan and P. Pramual, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand;
Biodiversity and Traditional Knowledge Research Unit, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand.
K. Wongpakam, Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand.
Corresponding author: Pairot Pramual (e-mail: pairot.p@msu.ac.th).

Genome 57: 411–417 (2014) dx.doi.org/10.1139/gen-2014-0103

Published at www.nrcresearchpress.com/gen on 8 September 2014.

Table 1. Details of the sampling locations, haplotype diversity, and nucleotide diversity of *Simulium aureohirtum* in Thailand.

Location	Code	Geographic region	N	Latitude, longitude	Altitude (m)	Collection date	Haplotype diversity	Nucleotide diversity
Ban Huai Jak kwa, Ubon Ratchathani	AU248	Northeast	11	15°28'N, 105°32'E	190	02 Feb. 2014	0.891±0.092	0.015±0.008
Huai Gud Kae, Kalasin	AU307	Northeast	15	16°39'N, 103°49'E	169	03 Jan. 2014	0.895±0.070	0.019±0.010
Ban Guan Bun, Sakon Nakhon	AU310	Northeast	8	16°53'N, 104°10'E	212	03 Jan. 2014	1.000±0.062	0.010±0.006
Ban Suansawan, Mukdahan	AU314	Northeast	10	16°45'N, 104°10'E	250	03 Jan. 2014	0.978±0.054	0.015±0.008
Wang Yai waterfall, Si Sa Ket	AU317	Northeast	12	14°26'N, 104°29'E	219	15 Feb. 2014	0.969±0.044	0.014±0.008
Dong Yai Wildlife Sanctuary, Buriram	AU337	East	15	14°17'N, 102°44'E	231	04 Mar. 2014	0.962±0.040	0.013±0.007
Ban Suan Hom, Nakhon Ratchasima	AU347	East	16	14°21'N, 101°52'E	407	06 Mar. 2014	0.991±0.025	0.006±0.004
Ban Tap Nakon, Chanthaburi	AU341	East	12	12°45'N, 102°14'E	24	04 Mar. 2014	1.000±0.034	0.011±0.006
Klong Kaew Waterfall, Trat	AU346	East	12	12°37'N, 102°34'E	65	05 Mar. 2014	0.985±0.040	0.013±0.007
Ban Huai tat, Loei	AU271	North	10	17°18'N, 101°12'E	473	27 Nov. 2013	0.911±0.077	0.025±0.014
Huai Maekhammi, Phrae	AU288	North	9	18°22'N, 100°25'E	263	06 Dec. 2013	1.000±0.052	0.033±0.018
Ban Khan Na, Nan	AU293	North	7	19°16'N, 100°53'E	297	07 Dec. 2013	0.714±0.181	0.035±0.020
Ban Huai Muang, Phayao	AU295	North	9	18°56'N, 100°04'E	582	07 Dec. 2013	1.000±0.052	0.034±0.019
Ban Tung Lam Yai, Kanchanaburi	AU336	West	12	14°40'N, 99°19'E	231	22 Feb. 2014	0.954±0.057	0.007±0.004
All			158				0.994±0.002	0.034±0.017

S. aureohirtum were recognized including *Simulium geniculare* Shiraki from Taiwan, *Simulium philippinense* Delfinado from the Philippines, and *Simulium tuaranense* Smart and Clifford from Sabah, Malaysia (Adler and Crosskey 2014). *Simulium aureohirtum* is found in diverse habitats and is well adapted to areas disturbed by humans, such as agricultural land and manmade streams (Pramual and Kuvangkadilok 2009). A previous cytological study in Thailand found extensive chromosome polymorphisms with 14 floating inversions observed. Of these, two inversions were found at high frequencies and were significantly related to latitude, altitude, and annual temperature (Pramual et al. 2008). However, there is no evidence of cytological sibling species within Thai populations. Polytene chromosome analyses of specimens from Okinawa and Guam islands, which are geographically isolated from Thailand by more than 3000 km, revealed identical banding patterns (Reeves and Adler 2011). DNA barcoding analysis revealed extremely high genetic diversity in *S. aureohirtum* with maximum intraspecific genetic divergence based on a Kimura 2-parameter of 7.24%. Thus, this species was suspected to be a species complex (Pramual and Adler 2014). In this study, we used mitochondrial cytochrome c oxidase II (COII) sequences to examine the genetic structure, diversity, and demographic history of *S. aureohirtum* in Thailand. In addition, a phylogeographic study of a geographically widespread organism would enable us to determine the effect of historical and contemporary factors on the current genetic structure and diversity of species in the Southeast Asian mainland. Due to the paucity of phylogeographic studies in this region, our results will also contributed to current knowledge of this biodiversity hotspot.

Materials and methods

Sample collection and identification

Black fly specimens were collected from 14 locations in Thailand (Table 1; Fig. 1). Larvae of *S. aureohirtum* were collected in Carnoy's fixative (3:1 95% ethanol – acetic acid) and stored at –20 °C. Black flies were identified morphologically using the key of Takaoka and Choochote (2004).

DNA extraction, polymerase chain reaction, and sequencing

DNA was extracted following the method of Collins et al. (1987). The COII gene was amplified using the primers and PCR conditions described by Conflitti et al. (2010). PCR products were checked by 1% agarose gel electrophoresis and purified using a HighYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit (RBC BioScience, Taiwan). Sequencing was performed at the Macrogen DNA sequencing service (Seoul, Korea) using the same primers as in the PCR.

Data analysis

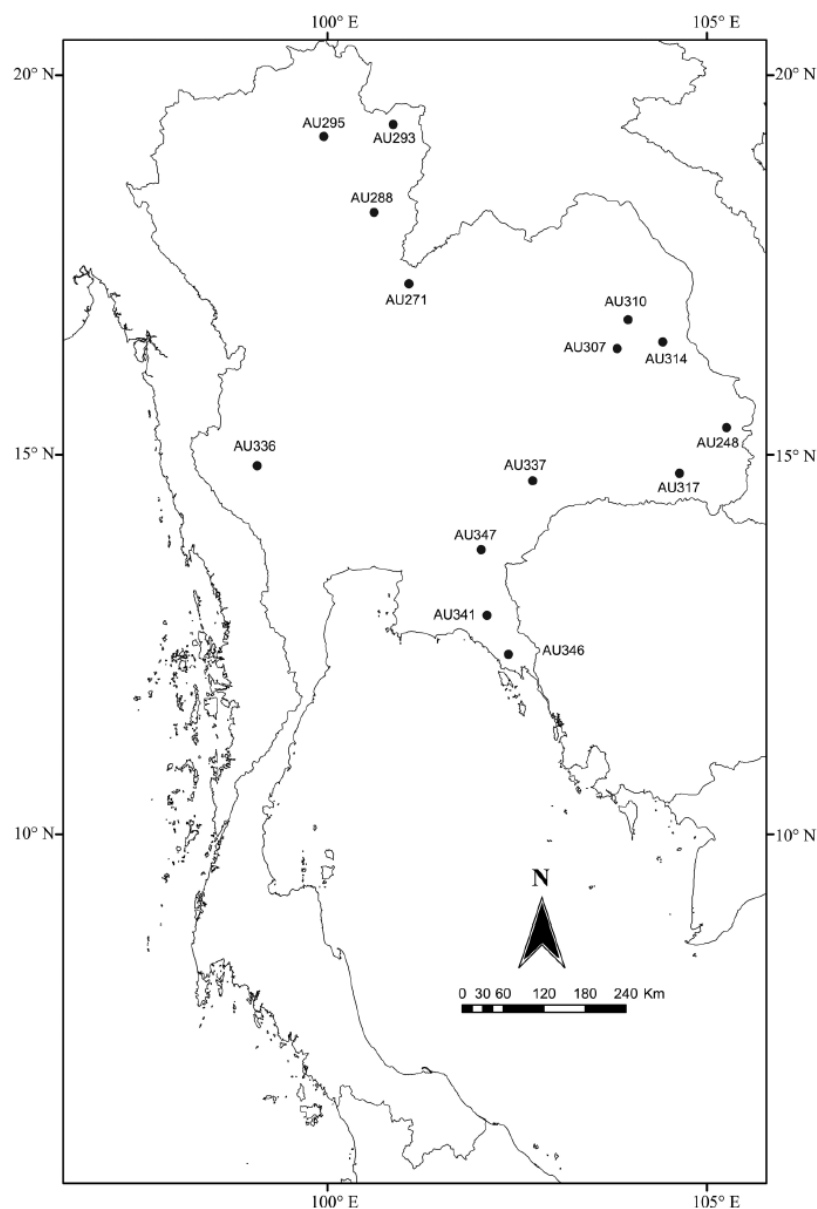
A total of 158 specimens were sequenced for the COII gene. Sequences were deposited in GenBank under the accession numbers KM076768–KM076925. Haplotype diversity and nucleotide diversity were calculated in Arlequin ver. 3.5 (Excoffier and Lischer 2010). Genealogical relationships between haplotypes were estimated using the median-joining (MJ) network algorithm (Bandelt et al. 1999) in the software NETWORK ver. 4.6.1.0 (www.fluxus-engineering.com).

The genetic structure was estimated by population pairwise F_{ST} . The significance test statistic was obtained from 1023 permutations. Sequential Bonferroni correction (Rice 1989) was applied for the multiple tests. A Mantel test (Mantel 1967) was used to determine the relationship between genetic distance (F_{ST} from Arlequin) and geographic distance (km) to test an isolation-by-distance (IBD) model. The Mantel test was implemented in IBD ver. 1.52 (Bohonak 2002) using 1000 randomizations. The program SAMOVA ver. 1.0 (Dupanloup et al. 2002) was used to define groups in the populations using genetic criteria. Given an a priori number of groups (k), SAMOVA uses a simulated annealing procedure to define the group composition in which populations within a group are as genetically homogeneous as possible (F_{SC} minimized) and groups are maximally differentiated from each other (F_{CT} maximized). SAMOVA was run using 100 simulated annealing processes for $k = 2$ to $k = 10$. The highest F_{CT} value achieved from these runs was retained as the best population grouping scheme.

Mismatch distribution analysis was used to test for a signature of historical demographic expansion. Populations that have undergone recent past demographic expansion are expected to show a unimodal mismatch distribution (Rogers and Harpending 1992). The sum-of-squares deviation and Harpending's raggedness index (Harpending 1994) were used to test deviation from the sudden expansion model. Mismatch distribution analysis was performed in Arlequin. If the mismatch distribution revealed a signature of population expansion, the expansion time was calculated from $\tau = 2ut$ (where $u = m_T\mu$, m_T is the length of the nucleotide sequences under study, μ is the mutation rate per nucleotide, and t is the generation time) (Rogers and Harpending 1992), assuming a divergence rate of 2.3% per million years for insect mtDNA (Brower 1994) and 12 generations per year for tropical black flies (Pramual et al. 2005). Fu's F_S (Fu 1997) and Tajima's D (Tajima 1989) tests were used to test the population equilibrium.

The software MIGRATE-N ver. 3.2.16 (Beerli and Palczewski 2010) was used to estimate gene flow between populations based on the coalescent framework. Populations were grouped according to geographic regions including north (AU271, AU288, AU293, and

Fig. 1. Collection sites of 14 populations of *Simulium aureohirtum* in Thailand. Details of the sampling sites are included in Table 1.



AU295), northeast (AU248, AU307, AU310, AU314, and AU317), east (AU337, AU347, AU341, and AU346), and west (AU336). The starting values for the migration rates were estimates based on pairwise F_{ST} . The searching strategy was composed of 10 short chains with 5000 steps for each chain and two long chains with 500 000 steps recorded for each chain.

Results

Mitochondrial DNA sequence variation

A 697-bp fragment of the COII gene was sequenced from 158 individuals of *S. aureohirtum* from 14 populations throughout

Thailand. A total of 128 haplotypes were identified. Haplotype diversity within populations ranged between 0.714 and 1.000 with a mean value of 0.994 (Table 1). Nucleotide diversities ranged from 0.006 to 0.035 with a mean value of 0.034 (Table 1).

Mitochondrial genealogy

The genealogy of the 158 COII sequences of *S. aureohirtum* revealed three divergence lineages (A, B, and C) (Fig. 2). These lineages were partially associated with geographic origins. Most of the individuals of lineage A were from northeastern and western Thailand, although some were from the north. Lineage B comprised individuals from the

Fig. 2. Median-joining network for 158 COII sequences of *Simulium aureohirtum* in Thailand. Circles represent haplotypes and sizes are relative to the number of individuals sharing the specific haplotype. Haplotypes are labeled according to geographic origin.

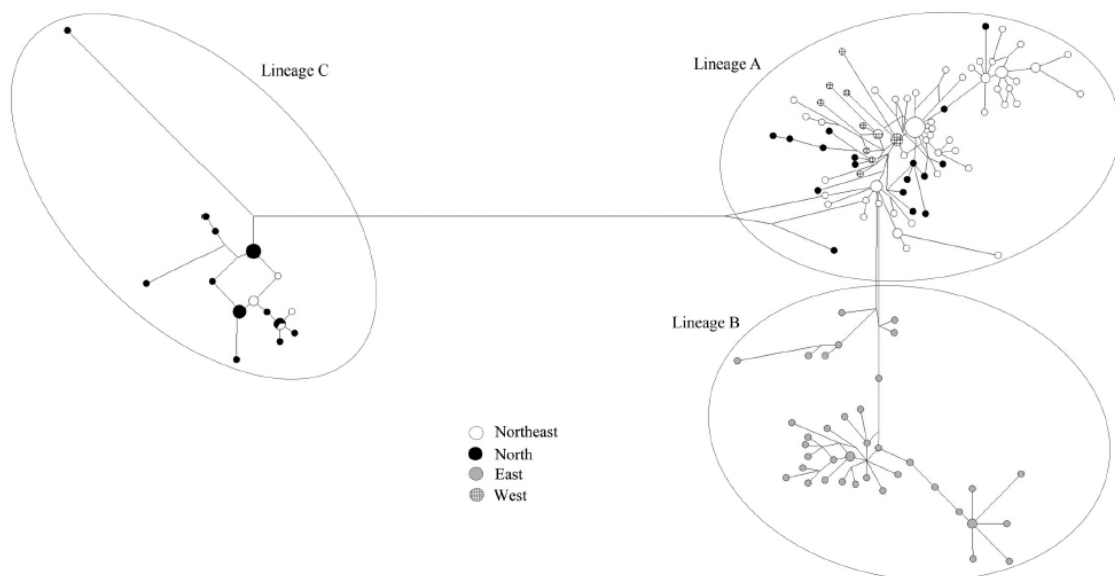


Table 2. Population pairwise F_{ST} values between 14 populations of *Simulium aureohirtum* in Thailand.

Population	AU248	AU271	AU307	AU310	AU314	AU317	AU337	AU347	AU288	AU293	AU295	AU341	AU346	AU336
AU248														
AU271	0.099													
AU307	-0.016	0.097												
AU310	0.057	0.046	0.056											
AU314	0.066	0.036	0.065	0.011										
AU317	0.069	0.059	0.068	0.016	0.010									
AU337	0.072	0.062	0.071	0.020	0.030	0.034								
AU347	0.057	0.047	0.056	0.004	0.015	0.019	0.023							
AU288	0.056	0.045	0.055	0.000	0.011	0.016	0.020	0.004						
AU293	0.189	0.180	0.183	0.139	0.145	0.146	0.114	0.129	0.136					
AU295	0.056	0.012	0.055	0.000	0.011	0.016	0.020	0.004	0.000	0.136				
AU341	0.054	0.044	0.054	0.000	0.011	0.015	0.019	0.004	0.000	0.130	0.000			
AU346	0.062	0.051	0.061	0.008	0.019	0.023	0.027	0.012	0.008	0.138	0.008	0.008		
AU336	0.077	0.067	0.076	0.014	0.034	0.038	0.042	0.026	0.023	0.154	0.023	0.023	0.030	

Note: Bold indicates significance at p values less than the Bonferroni adjusted value.

eastern populations. Lineage C comprised individuals from the north and northeast.

Population genetic structure

Population pairwise F_{ST} analysis revealed an overall low level of genetic structuring among populations of *S. aureohirtum* in Thailand. Among 91 pairwise comparisons, only 13 (14%) were statistically significant (Table 2). Mantel's test found no significant relationships between genetic and geographic distances ($R^2 = 0.003$, $P = 0.641$). SAMOVA analysis revealed that the F_{CT} value was highest at $k = 3$ ($F_{CT} = 0.511$, $P < 0.001$). Thus, we retain this as the best grouping scheme. The population grouping scheme based on genetic distance from SAMOVA corresponded well with geographic locations. Group I comprised two populations from the north (AU293 and AU271). Group II is the largest group and was comprised of populations from the northeast (AU248, AU271, AU307, AU310, AU314, AU317, AU337, AU295, and AU288) and west (AU336). However, two populations from the north (AU295 and AU288) also

belong to group II. Group III consisted of populations from the east (AU346, AU347, and AU341).

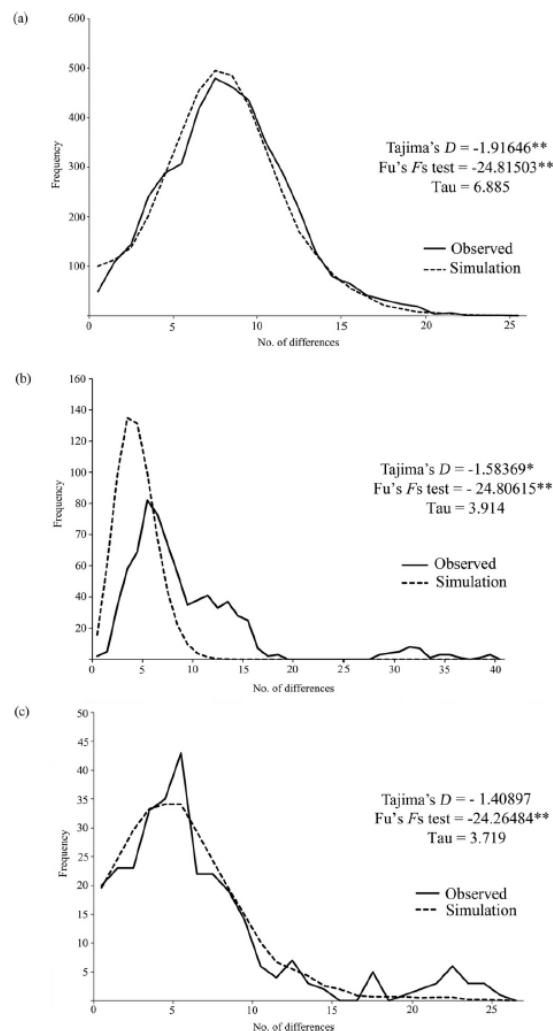
Demographic history

Mismatch distribution analyses were conducted separately for lineages A, B, and C. All three lineages showed unimodal mismatch graphs (Fig. 3) that were consistent with the simulations under the sudden expansion model. The F_s and Tajima's D values were significantly negative in all three lineages, except for the Tajima's D of lineage C (Fig. 3). Therefore, the data suggested that there was demographic expansion in these lineages. Population expansion times were estimated to be approximately 18 000 years ago for lineage A and 10 000 years ago for lineages B and C.

Historical migration patterns

Historical migrations among the four population groups were asymmetric (Table 3). Migration from the northeastern to the northern population groups was high compared to the negligible

Fig. 3. Mismatch distributions of three mitochondrial lineages representing the observed and expected pairwise differences under the sudden population expansion model. (a) Lineage A, (b) lineage B, and (c) lineage C. Mismatch distribution of all three mtDNA lineages of *Simulium aureohirtum* are consistent with the sudden population expansion model as the sum-of-square deviation (SSD) and Harpending's raggedness index are not significantly different between the observed and the expected from the simulation. Significant negative values for Tajima's D and Fu's F_s tests further support the population demographic expansion.



migration in the opposite direction. The northeastern group received migrants from the western population, but migration in the opposite direction was negligible. The eastern population group received migrants from the northern and northeastern groups albeit with low numbers. Migrations out from the eastern population group were negligible in all cases.

Discussion

Black fly species that are geographically widespread and occupy diverse habitats are possibly species complexes (Adler and

McCreadie 1997). *Simulium aureohirtum* is geographically distributed across the Palearctic and Oriental regions. This species has been recorded in India, Bhutan, China, Guam, Indonesia, Japan, Malaysia, Nepal, Pakistan, the Philippines, Sri Lanka, Taiwan, and Thailand (Adler and Crosskey 2014). In Thailand, *S. aureohirtum* was found throughout the country in habitats with a wide range of ecological conditions (Pramual et al. 2008; Pramual and Kuvangkadilok 2009). A cytogenetic study in Thailand found high levels of chromosome polymorphisms with 14 floating inversions observed (Pramual et al. 2008). There is also clinal variation of the inversion frequencies related to latitude, altitude, and temperature. However, there is no evidence to support the presence of cytological sibling species (Pramual et al. 2008) according to the criteria of Rothfels (1979), but this does not exclude the possibility of homosequential sibling species within *S. aureohirtum*. Further study is required to test this hypothesis. Polytene chromosomal analysis of the specimens from Guam and Okinawa found identical banding patterns with Thai specimens, despite large geographic separations (4500 and 3000 km, respectively) (Reeves and Adler 2011).

A high level of genetic diversity has also been detected at the molecular level. DNA barcoding analysis based on the mitochondrial DNA COI sequences suggested that this species is likely to be a species complex because of the high intraspecific genetic divergence (maximum K2P distance of 7.24%) (Pramual and Adler 2014). Our results based on COII sequences support previous findings. High levels of nucleotide diversity were found in *S. aureohirtum* (0.034) compared to other black fly species complexes in Thailand, such as the *Simulium siamense* complex (0.0057) (Pramual et al. 2011a), *Simulium feuerborni* complex (0.025) (Pramual and Wongpakam 2013), and *Simulium angulistylum* complex (0.0249) (Pramual and Kuvangkadilok 2012). High genetic diversity in *S. aureohirtum* at the molecular level is due largely to the presence of three genetically divergent lineages (A, B, and C) in the mtDNA genealogy. These lineages were partially related to geographic origins. Lineage A is the largest and is comprised of individuals from wide geographic origins in the northern, northeastern, and western parts of Thailand. Lineage C is comprised of the individuals from northern and northeastern regions, while all the members of lineage B are from the east.

Localized clustering of the haplotypes of the eastern population, with short branches isolating this lineage from the main lineage, is a characteristic of a population that has not experienced long-term isolation but in which gene flow has been limited (Avice 2000). This is consistent with the historical migration analysis that found a low migration rate from other populations to the east and no migration from this region to the others. Ecological divergence between populations was suggested as the gene flow barrier between eastern and northern populations in another black fly species in Thailand, *Simulium tani* (Pramual et al. 2005). The measured environmental conditions (stream width, depth, velocity, water conductivity, water temperature, pH, streambed particles, canopy cover, and riparian vegetation types) of the larval habitats of *S. aureohirtum* were not different between the eastern populations and the other geographic regions. However, in the wider ecological context, the eastern region is considered to be the tropical rain forest ecotype of the Cardamom Mountains rainforest ecoregion. In contrast, the northern and northeastern regions belong to a dry broadleaf forest ecoregion. Several studies found associations between black fly distributions and ecoregions. McCreadie and Adler (2006) found that distributions of black flies in South Carolina, USA, were associated with different ecoregions. Different sibling species of the *Simulium tuberosum* complex have been found in different ecoregions of North America (Adler and McCreadie 1997), and different sibling species of the *Simulium damnosum* complex are associated with the savannah or forest zones of West Africa (Boakye et al. 1998). The association of black

Table 3. Maximum-likelihood estimates of the population sizes ($\theta = 2N_e\mu$) and dispersal rates ($M = m/\mu$) for four population groups of *Simulium aureohirtum* in Thailand.

Population group (i)	Population size	Dispersal rate			
		North $\rightarrow$ i	Northeast $\rightarrow$ i	East $\rightarrow$ i	West $\rightarrow$ i
North	0.0582	—	290.17	4.5×10^{-11}	3.33×10^{-11}
Northeast	0.0425	9.10×10^{-13}	—	1.23×10^{-12}	90.501
East	0.0965	10.483	7.305	—	3.35×10^{-13}
West	0.0187	9.3×10^{-14}	1.76×10^{-12}	2.01×10^{-12}	—

fly species with ecoregions suggests that different ecological regimes could prevent gene flow between different ecoregions. Our results thus strengthen the hypothesis of ecological conditions promoting black fly speciation.

Lineage C is extremely genetically divergent from the other lineages. The genetic divergence of this lineage compared to lineage A was 7.0% and was 9.4% compared to lineage B, while between lineages A and B it was 3.2%. High genetic divergence between lineages suggested that they might be representing different species. However, chromosome analyses showed that the individuals of these lineages have identical polytene chromosome banding patterns. Members of lineages A and C were geographically broadly sympatric. The individuals of these lineages were from the northern, northeastern, and western parts of Thailand. A deep divergence in the genealogy but with members of the lineages being broadly sympatric are characterizations of admixture populations that have evolved allopatrically (Avise 2000). There has not been a major vicariance event in the Southeast Asian mainland that could have promoted allopatric divergence. However, evidence from both plants and animals point to the influence of the Pleistocene glaciations on the genetic structure and diversity of floras and faunas of this region, including Thailand (Cannon and Manos 2003; Pramual et al. 2005; O'Loughlin et al. 2008; Morgan et al. 2010, 2011). During the glaciation period, climatic conditions were thought to be drier and cooler (Voris 2000; Penny 2001). Thus, much of the running water, the habitat of immature black flies, could have dried up. However, the evidence suggests that some streams persisted during the dry period of the Pleistocene glaciations, mostly in high mountain areas (Gathorne-Hardy et al. 2002). Therefore, the mountainous regions of the northern, northeastern, and western regions could have been refugia for black flies during the Pleistocene glaciations (Pramual et al. 2005, 2011a). The interior positions in the mtDNA genealogy of the haplotype from the western population (Kanchanaburi Province), northern population (Nan Province), and northeastern population (Ubon Ratchathani Province), which were from mountainous areas, supported this hypothesis. Signals of population expansions in these lineages revealed by mismatch distribution analysis further support the role of the Pleistocene glaciations on the genetic structure and diversity of *S. aureohirtum*. The population expansions in the three lineages date back to the end of the Pleistocene glaciations (approximately 18 000 years ago).

Although high levels of genetic diversity and genetically divergent lineages within *S. aureohirtum* were found, the populations of this species were, surprisingly, largely genetically homogenous. Population pairwise F_{ST} values were significantly different in only 13 out of 91 comparisons. Low-level genetic differentiation between populations of this species could be a combination effect of historical and contemporary factors. Recent demographic expansion dating back to the end of the last Pleistocene glaciation (18 000 years ago) indicated that populations of *S. aureohirtum* shared a recent history. This could reduce the chance of the accumulation of genetic differentiation between populations. In addition, this species utilizes a wide range of ecological conditions and is also well adapted to anthropogenic disturbed habitats such as agricultural areas and artificial flowing water (Pramual and

Kuvangkadilok 2009); thus, the geographic distributions of this species are not confined to forest areas like many other black flies. Therefore, the geographic distribution of this species is continuous, thus facilitating gene flow between populations. A population genetic study in the forest-dependent species *S. angulistylum* in Thailand found high levels of genetic structuring (Pramual and Kuvangkadilok 2012), while species that were found in both forest and open areas (e.g., *S. siamense*) were genetically homogenous (Pramual et al. 2011a).

In conclusion, we found that *S. aureohirtum* should be considered a species complex because of the high level of genetic diversity and occurrence of genetically divergent lineages. As three synonyms of this species were recognized, it could be possible that these names might be applied to one or more of these lineages in future study. Since the genetically divergent lineages could not be detected at the morphological and cytological levels, our result strongly suggest that an integrated approach is necessary for fully understanding black fly biodiversity. Both historical and contemporary ecologies were found to be important factors shaping the genetic structure and diversity of this species. As this species is geographically widespread in Palearctic and Oriental regions, further study would be interesting and should include specimens from those other geographic regions.

Acknowledgements

This work was funded by the Thailand Research Fund and Mahasarakham University (grant No. RSA5680013). We thank Jolyon Dodgson (Mahasarakham University, Thailand) and Adrian Plant (National Museum of Wales, Cardiff, UK) for valuable comments on an earlier version of the manuscript.

References

- Adler, P.H., and Crosskey, R.W. 2014. World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory [online]. Available from <http://www.clemson.edu/cafls/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf> [accessed 25 April 2014].
- Adler, P.H., and McCreadie, J.W. 1997. The hidden ecology of black flies: sibling species and ecological scale. *Am. Entomol.* 43(3): 153–162.
- Adler, P.H., Currie, D.C., and Wood, D.M. 2004. The black flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., and Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37–48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036. PMID:10331250.
- Beerli, P., and Palczewski, M. 2010. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*, 185: 313–326. doi:10.1534/genetics.109.112532. PMID:20176979.
- Boakye, D.A., Back, C., Fiasorgbor, G.K., Sib, A.P.P., and Coulibaly, Y. 1998. Sibling species distributions of the *Simulium damnosum* complex in the West African Onchocerciasis Control Programme area during the decade 1984–93, following intensive larviciding since 1974. *Med. Vet. Entomol.* 12: 345–358. doi:10.1046/j.1365-2915.1998.00118.x. PMID:9824818.
- Bohonak, A.J. 2002. IBD (Isolation by Distance): a programme for analysis of isolation by distance. *J. Hered.* 93(2): 153–154. doi:10.1093/jhered/93.2.153. PMID:12140277.
- Brower, A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato*, inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(14): 6491–6495. doi:10.1073/pnas.91.14.6491. PMID:8022810.
- Cannon, C.H., and Manos, P.S. 2003. *Phylogeography of the Southeast Asian*

- stone oaks (*Lithocarpus*). *J. Biogeogr.* 30: 211–226. doi:10.1046/j.1365-2699.2003.00829.x.
- Collins, F.H., Mendez, M.A., Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Besansky, N.J., and Finnerty, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 37–41. PMID: 2886070.
- Conflitti, I.M., Kratochvil, M.J., Spironello, M., Shields, G.F., and Currie, D.C. 2010. Good species behaving badly: non-monophyly of black fly sibling species in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 57: 245–257. doi:10.1016/j.ympev.2010.06.024. PMID:20601001.
- Dupanloup, I., Schneider, S., and Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11(12): 2571–2581. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x. PMID:12453240.
- Excoffier, L., and Lischer, H. 2010. Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3): 564–567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x. PMID:21565059.
- Fu, Y.-X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915–925. PMID:9335623.
- Gathorne-Hardy, F.J., Syaakani, Davies, R.G., Eggleston, P., and Jones, D.T. 2002. Quaternary rainforest refugia in south-east Asia: using termites (Isoptera) as indicators. *Biol. J. Linn. Soc.* 75: 453–466. doi:10.1046/j.1095-8312.2002.00031.x.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66(4): 591–600. PMID:8088750.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58: 247–276. doi:10.1006/bijl.1996.0035. PMID:15101575.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27(2): 209–220. PMID:6018555.
- McCreadie, J.W., and Adler, P.H. 2006. Ecoregions as predictors of lotic assemblages of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Ecography*, 29(4): 603–613. doi:10.1111/j.0906-7590.2006.04541.x. PMID:22742597.
- Morgan, K., Linton, Y., Somboon, P., Saikia, P., Dev, V., Socheat, D., and Walton, C. 2010. Inter-specific gene flow dynamics during the Pleistocene speciation of forest-dependent mosquitoes in Southeast Asia. *Mol. Ecol.* 19: 2269–2285. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04635.x. PMID:20444081.
- Morgan, K., O'Loughlin, S.M., Chen, B., Linton, Y., Thongwat, D., Somboon, P., et al. 2011. Comparative phylogeography reveals a shared impact of pleistocene environmental change in shaping genetic diversity within nine *Anopheles* mosquito species across the Indo-Burma biodiversity hotspot. *Mol. Ecol.* 20(21): 4533–4549. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05268.x. PMID:21981746.
- O'Loughlin, S.M., Okabayashi, T., Honda, M., Kitazoe, Y., Kishino, H., Somboon, P., et al. 2008. Complex population history of two *Anopheles dirus* mosquito species in southeast Asia suggests the influence of Pleistocene climate change rather than human-mediated effects. *J. Evol. Biol.* 21: 1555–1569. doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01606.x. PMID:18800997.
- Penny, D. 2001. A 40 000 year palynological record from northeast Thailand, implications for biogeography and palaeoenvironmental reconstruction. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 171: 97–128. doi:10.1016/S0031-0182(01)00242-5.
- Pramual, P., and Adler, P.H. 2014. DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand. *Mol. Ecol. Resour.* 14: 262–271. doi:10.1111/1755-0998.12174. PMID:24112561.
- Pramual, P., and Kuvangkadilok, C. 2009. Agricultural land use and black fly (Diptera, Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand. *Hydrobiologia*, 625(1): 173–184. doi:10.1007/s10750-009-9706-z.
- Pramual, P., and Kuvangkadilok, C. 2012. Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium* (*Gomphostilbia*) *angulistylum* (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 55(6): 447–458. doi:10.1139/g2012-031. PMID:22663346.
- Pramual, P., and Wongpakam, K. 2013. Population genetics of the high elevation black fly *Simulium* (*Nevermannia*) *feuerborni* Edwards in Thailand. *Entomol. Sci.* 16: 298–308. doi:10.1111/ens.12008.
- Pramual, P., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., and Walton, C. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* 14(13): 3989–4001. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02639.x. PMID:16262854.
- Pramual, P., Wongpakam, K., and Kuvangkadilok, C. 2008. Cytogenetics of the black fly *Simulium aureohirtum* Brunetti from Thailand. *Cytologia*, 73(3): 293–304. doi:10.1508/cytologia.73.293.
- Pramual, P., Kongim, B., and Nanork, P. 2011a. Phylogeography of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki complex (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomol. Sci.* 14(4): 428–436. doi:10.1111/j.1479-8298.2011.00465.x.
- Pramual, P., Wongpakam, K., and Adler, P.H. 2011b. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 54(1): 1–9. doi:10.1139/G10-100. PMID:21217800.
- Reeves, W.K., and Adler, P.H. 2011. Colonization of Pacific islands by black flies (Diptera: Simuliidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 113(3): 371–376. doi:10.4289/0013-8797.113.3.371.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223–225. doi:10.2307/2409777.
- Rogers, A.R., and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9(3): 552–569. PMID:1316531.
- Rothfels, K.H. 1979. Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). *Annu. Rev. Entomol.* 24(1): 507–539. doi:10.1146/annurev.en.24.010179.002451.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585–595. PMID:2513255.
- Takaoka, H., and Choochote, W. 2004. A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Trop. Med. Health*, 32: 189–197. doi:10.2149/tmh.32.189.
- Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381–397. doi:10.1046/j.1365-294X.1998.00308.x. PMID:9627999.
- Voris, H.K. 2000. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *J. Biogeogr.* 27: 1153–1167. doi:10.1046/j.1365-2699.2000.00489.x.
- Walton, C., Handley, J.M., Tun-Lin, W., Collins, F.H., Harbach, R.E., Baimai, V., and Butlin, R.K. 2000. Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. *Mol. Biol. Evol.* 17: 962–974. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026377. PMID:10833203.

Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Pramual, P.*, Wongpakam, K. (2014) Association of black fly (Diptera: Simuliidae) life stages using DNA barcode. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 17, 549 – 554. (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 0.946)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Asia-Pacific Entomology

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

Association of black fly (Diptera: Simuliidae) life stages using DNA barcode

Pairot Pramual^{a,*}, Komgrit Wongpakam^b

^a Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand

^b Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand



ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2014

Revised 14 May 2014

Accepted 15 May 2014

Available online 27 May 2014

Keywords:

Black fly

DNA barcode

Simulium

S. multistriatum species-group

ABSTRACT

Black fly larvae remain unknown because they cannot be associated with the known species described from other life stages. In this study, mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) barcoding sequences were used to associate unknown larvae with the known species of black flies of the *Simulium multistriatum*-group in Thailand. Phylogenetic analyses and distance-based criteria were used to associate unknown specimens with the known species. The unknown larvae were separated into two monophyletic clades with strong support, one with *S. chaliowae* and another with *S. bullatum*. The results are consistent with distance-based species identification that assigned unknown larvae to *S. chaliowae* and *S. bullatum*; thus the results strongly suggested that the unknown larvae were *S. chaliowae* and *S. bullatum*. Morphological descriptions of these larvae and characters for species diagnosis are provided. Our results indicate that DNA barcoding sequences can be used effectively to associate unknown life stage with the known species, and this ability will facilitate further study of all aspects of black fly biology.

© 2014 Korean Society of Applied Entomology, Taiwan Entomological Society and Malaysian Plant Protection Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Black flies (Diptera: Simuliidae) are an important insect vector of human onchocerciasis or river blindness disease, which is the second leading cause of infectious blindness (Adler et al., 2010). Black fly larvae are usually present as a major component of stream macroinvertebrates (Malmqvist et al., 2004) and play significant roles (e.g. in nutrient turnover) in stream ecosystems. Taxonomic knowledge of black flies, therefore, is crucial for both epidemiology and ecological studies.

Like many other insects, morphological classifications of black flies seldom incorporate all developmental stages. Adult and pupa are rich in species-level characters and are important for taxonomic study yet the larvae of many species remain undescribed. Rearing from pupa to adult is straightforward enabling pupae to be readily associated with adults, but rearing from larva to adult is a difficult endeavor and not always successful (Adler et al., 2004). Black fly larvae need flowing water for their development, thus an elaborate system is required for rearing them from larva to adult. Therefore, the larval stage of many species remains unknown.

Molecular markers have been used successfully to associate unknown larva with adults of the known species in other insects (Miller et al., 2005; Gattolliat and Monaghan, 2010). For black flies, the DNA barcoding

sequence based on a fragment of the cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) of the mitochondrial genome is among the most effective molecular marker for species identification (Rivera and Currie, 2009; Pramual et al., 2011; Hernández-Triana et al., 2012; Pramual and Adler, 2014). This indicates that the DNA barcode could be used to associate unknown specimens from unknown life stage with the known species. The main advantage of molecular markers over traditional taxonomy (e.g. morphology) is that it is easier to associate species from different life stages. This is particularly useful for organisms where species identification is reliable only from some life stages.

Twenty-nine species of the *Simulium multistriatum* group of the subgenus *Simulium* are known globally (Adler and Crosskey, 2013). Of these, nine species have been recorded in Thailand (Takaoka and Saito, 1996; Takaoka and Kuvangkadilok, 1999; Takaoka and Choochote, 2004, 2005a,b,c; Adler and Crosskey, 2013) including *S. bullatum* Takaoka and Choochote, *S. chainarongi* Kuvangkadilok and Takaoka, *S. chaliowae* Takaoka and Boonkemthong, *S. chanyae* Takaoka and Choochote, *S. fenestratum* Edwards, *S. lampangense* Takaoka and Choochote, *S. malayense* Takaoka and Davies, *S. takense* Takaoka and Choochote and *S. triglobus* Takaoka and Kuvangkadilok. Among these, the larval stage remains unknown for five species; *S. bullatum*, *S. chaliowae*, *S. chanyae*, *S. lampangense* and *S. takense*.

Simulium chaliowae was described from specimens collected from Na Khu Ha waterfall, Phrae Province, northern Thailand (Takaoka and Kuvangkadilok, 1999). This species is distinguished from other species of the *S. multistriatum*-group by a distinct cocoon shape (shoe-shaped

* Corresponding author. Tel./fax: +66 43 754245.

E-mail addresses: pairot.p@msu.ac.th (P. Pramual), komgrit_w@yahoo.com (K. Wongpakam).

instead of fenestrate cocoon type) and some other characters of the adults. *Simulium bullatum* was described from Chiangmai Province, northern Thailand (Takaoka and Choochote, 2005a). In addition to some other morphological characters of the adult, this species could be easily distinguished in the pupal stage from other species of the *S. multistriatum*-group by having a large, unpigmented organ at the base of the gill filament (Takaoka and Choochote, 2005a). However, the larval stage of these species remains unknown.

The objectives of this study are to associate unknown larvae collected from the same location with the known pupa of two species (*S. chaliowae* and *S. bullatum*) of the *S. multistriatum* group in Thailand using DNA barcoding sequences. If the DNA barcoding successfully associates the unknown larva with the known species, descriptions of the mature larvae of these species will be provided. We also report the DNA barcoding sequences of *S. triglobus*, another member of the *S. multistriatum* group.

Materials and methods

Sample collection and identification

Black fly samples were collected from three locations in Thailand (Table 1). Larva and pupa were picked from the substrate (e.g. fallen leaves, trailing grass) along the stream using fine forceps. Both larva and pupa were collected in modified Carnoy's fixative (3:1 95% ethanol/glacial acetic acid) and stored at -20°C until processing. Specimens were identified morphologically following the keys and description of species by Takaoka and Choochote (2004, 2005a,b,c) and Takaoka and Kuvangkadilok (1999).

DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing

Genomic DNA was extracted using the methods of Collins et al. (1987). Manipulation of the specimens preserved in Carnoy's solution for molecular study followed the method of Pramual et al. (2005). The polymerase chain reaction (PCR) methods followed those of Rivera and Currie (2009), using the primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCAT AAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAA ATCA-3') (Folmer et al., 1994). PCR products were checked with a 1% agarose gel and cleaned using the HiYield Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Xindian City, Taiwan). Sequencing was performed at Macrogen (Seoul, Korea), using the same primers as in the PCR.

Data analysis

Fifty-three mtDNA COI gene sequences (30 obtained in this study and 23 obtained from our previous publications) (Table 1) were included in the analyses. Two methods were used to associate unknown larvae with the known species. First, we used phylogenetic analyses to examine the genetic relationships of unknown larval specimens with the known species. Phylogenetic analyses were estimated for 53 COI sequences representing seven species of the *S. multistriatum*-group in Thailand with *S. aureohirtum* (genbank accession no. JF916850) of the subgenus *Nevermannia* and *S. siamense* (genbank accession no. HM775226) of the subgenus *Gomphostilbia* as the outgroups. Phylogenetic analyses were conducted based on three methods including maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) and Bayesian analysis. The ML tree was implemented in PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010). Branch support was calculated using approximate likelihood ratio tests (Anisimova and Gascuel, 2006). Maximum parsimony analyses were performed in PAUP* (Swofford, 2002), using a heuristic search with 1000 random addition sequence replicates, TBR branch swapping and Multrees effect. Bootstrap support was estimated for 1000 replicates. Phylogenetic relationships were analyzed by Bayesian methods using MRBAYES 3.04b (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). The best-fit model for Bayesian analysis was selected by hierarchical likelihood ratio tests implemented in MrModeltest (Nylander, 2004). The general time-reversible (GTR) model (Rodriguez et al., 1990) with gamma distribution shape parameter of 0.8406 and proportion of invariable sites of 0.6625 was selected. Bayesian analysis was run for 2,000,000 generations, with a sampling frequency of 100 generations. Tracer version 1.5 (Rambaut and Drummond, 2004) was used for visual inspection of the point where the log likelihood is stationary. Trees sampled before this point were discarded as burn-in. The remaining trees of two simultaneous runs were included in posterior probability calculations. The second method used the "best match" criteria for species identification in TaxonDNA (Meier et al., 2006) to test the species status of an unknown specimen. This method assigns specimens to species, according to the best-matching barcode sequence (Meier et al., 2006).

Results

Identification of unknown larva

All three phylogenetic methods revealed identical tree topologies although the branch supports varied among different analytical methods, thus only the Bayesian tree is shown (Fig. 1). There are five main clades

Table 1

List of species, collection sites, number of COI sequences and haplotypes and Genbank accession numbers of samples of *Simulium multistriatum* species-group used in this study.

Species	Locality	Latitude/longitude	Altitude (m asl)	Number of samples	Genbank accession number
<i>Simulium bullatum</i> Takaoka & Choochote	Hinsamchan waterfall, Phu Rue, Loei	17°29'59" N/ 101°20'09" E	1156	3	KJ649638–KJ649638
	Lerttop waterfall, Phu Rue, Loei	17°29'11" N/ 101°20'13" E	1152	5	KJ649641–KJ649645
<i>S. chainarongi</i> Kuvangkadilok & Takaoka	Wang Yai waterfall, Sisaket			4	JF916851–JF916854 ^a
<i>S. chaliowae</i> Takaoka & Boonkemtong	Na Ku Ha waterfall, Phrae	18°07'09" N/ 100°17'09" E	556	17	JF916855–JF916856 ^a KJ649623–KJ649623
<i>S. fenestratum</i> Edwards	Suan Hom waterfall, Loei	17°02'49" N/ 101°45'42" E	579	1	JF916857–JF916860 ^a JF916862–JF916864 ^a
	Klongnarai waterfall, Chanthaburi			1	
	Tad Yieang waterfall, Champasak, Lao PDR			1	
	Wang Kwang waterfall, Loei			1	
	Pen Pop Mai waterfall, Loei			1	
<i>S. triglobus</i>	Cham Pa Thog waterfall, Phayao			3	
	Ton Tong waterfall, Pua, Nan	19°12'39" N/ 101°04'04" E	1027	7	KJ649646–KJ649652
<i>S. takense</i> Takaoka & Choochote	Dai Chong Thong waterfall, Kanchanaburi			2	JF916865–JF916870 ^a
	Kreng Kra Via waterfall, Kanchanaburi			4	

^a Data from Pramual and Adler (2014).

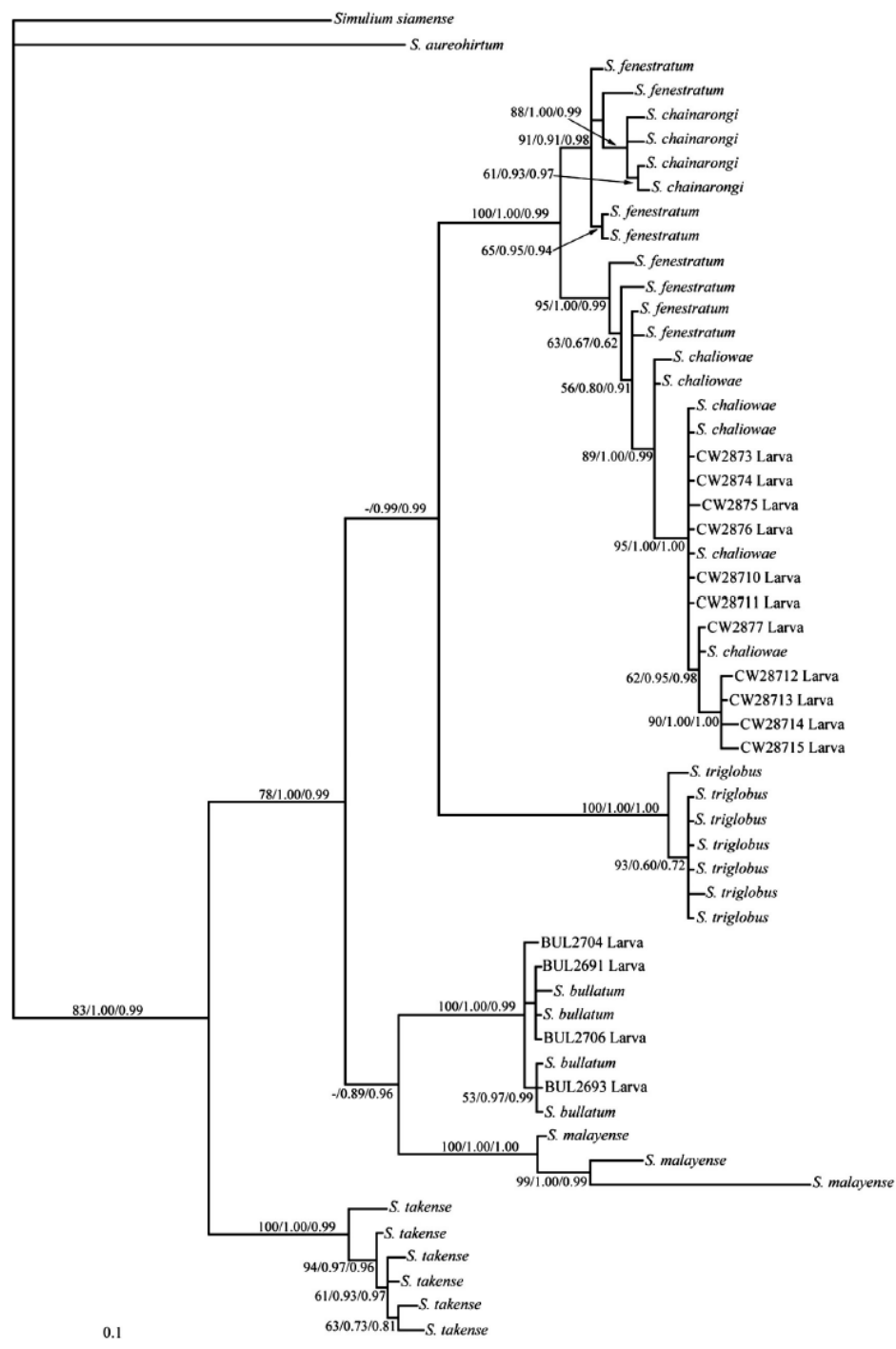


Fig. 1. Bayesian tree for the cytochrome oxidase I (COI) sequences of the seven species from the *Simulium multistriatum* species group in Thailand. Bootstrap values for maximum parsimony analysis, posterior probabilities for Bayesian analysis and likelihood-ratio test for maximum likelihood are shown above or near the branch. -, denote bootstrap support less than 50%. Scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

among seven species included in the analyses. *Simulium takense*, *S. bullatum* and four unknown larvae from Loei province, *S. malayense* and *S. triglobus* each represents monophyletic clades with strong support. *Simulium fenestratum*, *S. chainarongi*, *S. chaliowae* and 11 unknown larval specimens from Na Khu Ha waterfall formed another clade. *Simulium chainarongi* and *S. chaliowae* plus 11 unknown larvae each formed a monophyletic cluster with strong support within this clade. *Simulium fenestratum* is paraphyletic because its clade included *S. chainarongi* and *S. chaliowae*.

As the unknown specimens from Na Khu Ha waterfall were all clustered with the pupa specimens of *S. chaliowae* and with two *S. chaliowae* sequences reported previously (Pramual and Nanork, 2012) it suggests that these unknown larvae are *S. chaliowae*. This is also supported by the distance-based species identification method. The best match method in TaxonDNA identifies all of these specimens as *S. chaliowae*. Taken together, the results strongly suggested that the unknown larvae from Na Khu Ha waterfall are *S. chaliowae*. Intraspecific genetic divergences within the clade of *S. chaliowae* range from 0% to 2.25% with a mean of 0.60% (Table 2).

Four unknown larvae from Loei Province, northeastern Thailand formed a monophyletic clade with the pupa of *S. bullatum*, with strong support (Fig. 1). This is consistent with the distance-based species identification criteria. The best close match method for species identification in TaxonDNA assigned these four larvae to *S. bullatum*. The intraspecific genetic divergences of the *S. bullatum* clade range from 0% to 0.86% with a mean of 0.36% (Table 2).

The DNA barcoding sequences of *S. triglobus* of the *S. multistriatum* species group collected from the type locality (Ton Tong waterfall) (Takaoka and Kuvangkadiok, 1999) were also reported. Seven barcoding sequences of this species formed a monophyletic clade with strong support (100% bootstrap and 1.00 posterior probability) (Fig. 1). All of these sequences were correctly identified as *S. triglobus* based on the best match criteria. Intraspecific genetic divergences ranged from 0% to 1.03% with an average of 0.29% (Table 2).

Descriptions of the mature larva

Simulium (Simulium) bullatum Takaoka and Choochote, 2005a, 2005b, 2005c.

Mature larva. Body length 5.6–6.2 mm ($n = 10$). Body color grayish brown or reddish brown. Cephalic apotome (Fig. 2a) yellowish brown on the 1/2 anterior and dark brown on the 1/2 posterior, narrowly darkened along posterior margin, with distinct positive head spots. Lateral and ventral surface of head capsule darken. Antenna longer than stem of the labral fan composed of three segments and apical sensillum, proportional length of 1st, 2nd and 3rd segments is 1:1.4:0.8. Labral fan with ca. 44 main rays. Mandible (Fig. 2b) with comb-teeth, decreasing in length from 1st to 3rd; mandibular serrations composed of one large and one small teeth with no supernumerary serrations. Hypostomium (Fig. 2c) with anterior row of nine teeth. Median tooth is very prominent, the two outermost and the corner teeth moderately developed; lateral

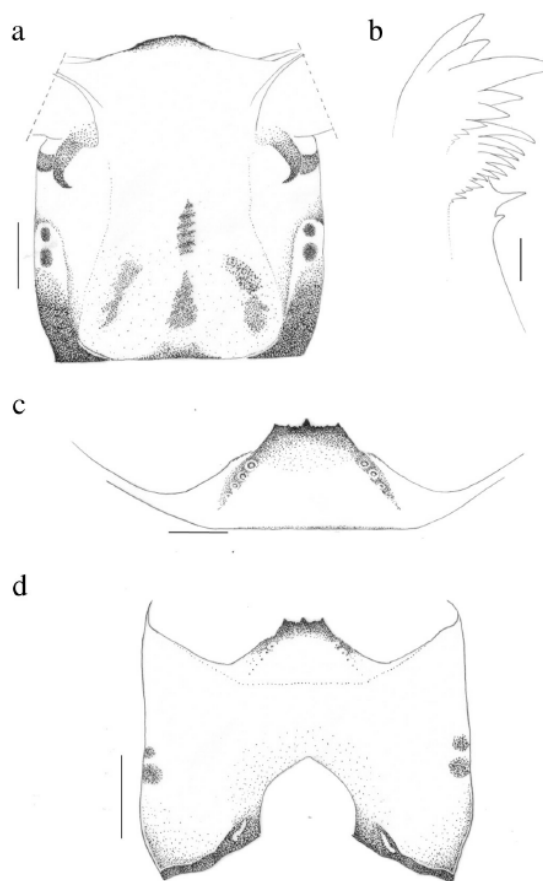


Fig. 2. Larva of *Simulium bullatum* (a) cephalic apotome showing distinct head spots; (b) mandible; (c) hypostoma; and (d) ventral view of head capsule showing postgenal cleft. Scale bars = 0.1 mm for a and d; 0.02 mm for b; and 0.04 mm for c.

margins serrated apically; hypostomal bristles six, slightly divergent posteriorly from lateral margin on each side. Postgenal cleft (Fig. 2d) large, deltoid, not constrict basally, ca. 1.5× as long as postgenal bridge. Thoracic cuticle bare. Abdominal cuticle without dorsolateral protuberances and with no distinct setae except the last segment moderately covered with short colorless setae on each side of anal sclerite. Rectal organ has three lobes, each with 12–14 finger-like secondary lobes. Anal sclerite

Table 2

DNA barcode statistics for seven species of black flies in the *Simulium multistriatum* species group in Thailand. All specimens are identified correctly based on best-match methods in TaxonDNA (Meier et al., 2006).

Species	Number of COI sequences	Range of intraspecific genetic divergence (mean) %	Range of interspecific genetic divergence (mean) %
<i>S. bullatum</i>	8	0–0.86 (0.36)	7.04–13.37 (9.65)
<i>S. chainarongi</i>	4	0.17–0.69 (0.54)	1.03–15.38 (6.88)
<i>S. chaliowae</i>	17	0–2.25 (0.60)	0.51–18.64 (8.99)
<i>S. fenestratum</i>	8	0–2.98 (1.85)	0.51–16.27 (6.85)
<i>S. malayense</i>	3	2.78–7.19 (5.72)	7.04–18.64 (12.25)
<i>S. takense</i>	6	0.34–2.43 (1.16)	9.13–18.56 (12.52)
<i>S. triglobus</i>	7	0–1.03 (0.29)	9.09–13.21 (10.73)
Total	53	0–7.19 (1.15)	0.51–19.53 (9.41)

X-shape, with anterior arm ca. 0.9 times as long as posterior arm. Accessory sclerite absent. Last abdominal segment lacking ventral papillae. Posterior circler with ca. 90–92 rows of hooklets with 12 hooks per row.

Specimens examined

Larvae were collected from a small (0.6 m wide, 0.06 m depth), moderate flowing stream (0.7 m/s) at high altitude (1156 m above sea level) at Hin Sam Chan waterfall, Phurua District, Loei Province, Northeastern Thailand on 27 November 2013. Specimens are deposited in the Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Thailand.

Simulium (Simulium) chaliowae Takaoka and Kuvangkadilok, 1999.

Mature larva. Body length 4.9–6.1 mm ($n = 10$). Body color dark greenish or reddish brown on thoracic segment 1 and light brown on the rest. Cephalic apotome (Fig. 3a) light yellowish brown, narrowly dark brown along lateral and posterior margins, with faint positive

head spots. Antenna longer than stem of the labral fan composed of three segments and apical sensillum, proportional length of 1st, 2nd and 3rd segments is 1:1.2:0.8. Labral fan with ca. 40 main rays. Mandible (Fig. 3b) with comb-teeth, decreasing in length from 1st to 3rd; mandibular serrations composed of one large and one small teeth with no supernumerary serrations. Hypostomium (Fig. 3c) with anterior row of nine teeth. Median, the 2 outermost and the corner teeth very prominent; lateral margins serrated apically; hypostomal bristles six, slightly divergent posteriorly from lateral margin on each side. Postgenal cleft (Fig. 3d) large, round apically, slightly constrict basally, ca. $2 \times$ as long as postgenal bridge. Thoracic cuticle bare. Abdominal cuticle with a pair of small dorsolateral protuberance each on segment 2–6, and with no distinct setae except the last segment moderately covered with short colorless setae on each side of anal sclerite. Rectal organ has three lobes, each with 12–14 finger-like secondary lobes. Anal sclerite X-shape, with anterior ca. 0.6 times as long as posterior arm. Accessory sclerite absent. Last abdominal segment lacking ventral papillae. Posterior circler with ca. 80 rows of hooklets with 17 hooks per row.

Specimens examined

Larvae were collected from type locality (Na Khu Ha waterfall) of *S. chaliowae* in Phrae Province ($18^{\circ}07'09''$ N/ $100^{\circ}17'36''$ E) Northern Thailand on 6 December 2013. This location is in medium size (4 m wide, 0.11 m depth), moderate flowing stream (0.98 m/s) at an altitude of 556 m above sea level. Specimens are deposited in the Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Thailand.

Discussion

Mitochondrial COI sequences have been used successfully in insects to associate life stages of unknown species with a life stage of a known species (e.g. Miller et al., 2005; Zhou et al., 2007; Ruiter et al., 2013). The success of using DNA barcoding sequences to associate different life stages depends on the availability and efficiency of this marker for species identification. Previous studies have revealed that DNA barcoding sequences were used effectively to distinguish nominal black fly species (Rivera and Currie, 2009; Pramual et al., 2011; Hernández-Triana et al., 2012; Pramual and Adler, 2014). In Thailand, the DNA barcode sequences of 41 species were available that had high success rates for species discrimination at 96% (Pramual and Adler, 2014).

In this study, we have shown that the unknown larvae could be associated with the known species using COI barcode sequences. The unknown larval specimens from Na Khu Ha waterfall formed a strongly supported monophyletic clade with the pupa of *S. chaliowae* and with two barcoding sequences of this species previously reported (Pramual and Nanork, 2012). The best match criteria in Taxon DNA also assigned these unknown larvae to *S. chaliowae*. Thus, the result strongly suggested that these larvae were *S. chaliowae*. The larva of *S. chaliowae* are similar to those of *S. chainarongi* Takaoka and Kuvangkadilok (1999) described from Thailand and *S. hirtinervis* Edwards from Malaysia (Takaoka and Davies, 1995) as they have a pair of dorsal protuberances on the abdomen. However, *S. chaliowae* can be distinguished from these species by having a pair of dorsal protuberances on segments 2–6 instead of segments 1–6 in *S. chainarongi* (Takaoka and Kuvangkadilok, 1999) and 1–8 in *S. hirtinervis* (Takaoka and Davies, 1995).

The DNA barcoding sequences of *S. bullatum* possess low intraspecific genetic divergence with a maximum value of 0.86% and an average of 0.36%. Although there are no available barcoding sequences of this species in the database, the pupa specimens are easily recognized due to fenestrated cocoon and large, unpigmented organ at the base of the gill filaments. Four larvae collected from the same location as the pupa were clustered with the sequences from the pupae with strong support indicated that they were of the same species (i.e. *S. bullatum*). Larva of *S. bullatum* is similar to *S. malayense* Takaoka and Davies because of its deltoid-shape postgenal cleft and absence of dorsal protuberance on

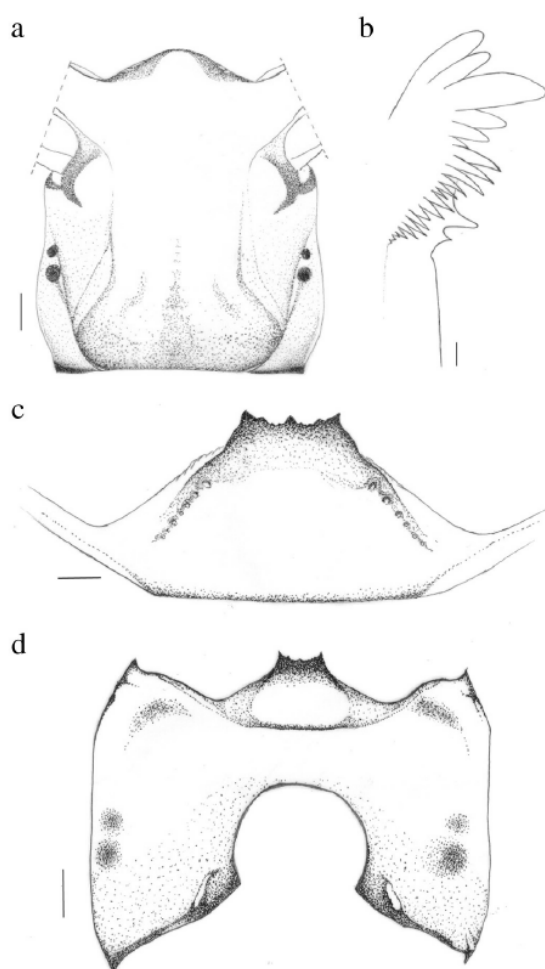


Fig. 3. Larva of *Simulium chaliowae* (a) cephalic apotome; (b) mandible; (c) hypostoma; and (d) ventral view of head capsule showing postgenal cleft. Scale bars = 0.1 mm for a and d; 0.02 mm for b; and 0.04 mm for c.

the abdomen. However, the distinct head spots and darker posterior half of the cephalic apotome in *S. bullatum* could easily distinguish this species from *S. malayense*, which has indistinct head spots and a pale yellow cephalic apotome (Takaoka and Davies, 1995).

The DNA barcoding sequences of *S. triglobus* were reported for the first time in the present study, and they also showed low intra-specific genetic divergence with a maximum value of 1.03% and an average of 0.29%. Low intraspecific and high interspecific genetic divergences with no overlap of the two values mean that the DNA barcoding of this species was highly successful. However, our results were based on the limited geographic sampling because specimens were collected from only a single location. Thus, further study is required to verify whether hidden diversity exists in this species or not.

Phylogenetic analyses revealed that *S. fenestratum* is paraphyletic because its clade included *S. chainarongi* and *S. chaliowae*. The results of the present study agree with the previous work (Pramual and Nanork, 2012; Pramual and Adler, 2014). There are several possible explanations for species non-monophyly, including (i) gene paralogy; (ii) inadequate phylogenetic signal for the genetic marker used; (iii) interspecific hybridization; (iv) imperfect taxonomy; and (v) incomplete lineage sorting (Funk and Omland 2003). A previous study indicated that gene paralogy is unlikely for COI sequences of *S. fenestratum* (Pramual and Nanork, 2012). Inadequate phylogenetic signal is also unlikely. Deeply divergent clades among species of *S. multistriatum* indicate that COI sequences have enough phylogenetic signals to resolve species relationships. Imperfect taxonomy (i.e. species misidentification) is unlikely because the COI sequences of *S. fenestratum* included in the present study were obtained from a previous publication in which species were identified chromosomally for the larval stage or morphologically for the pupal stage (Pramual and Nanork, 2012) where species recognition is straightforward (Takaoka and Kuvangkadilok, 1999; Takaoka and Choochote, 2005a). Interspecific hybridization is also an unlikely explanation. Our results revealed no indication of geographic localization of the closely related haplotypes between species, which is a signal of interspecific hybridization (Funk and Omland, 2003). Therefore, incomplete lineage sorting is the most likely explanation for the species non-monophyly of *S. fenestratum* (Pramual and Nanork, 2012).

Despite species not being recovered as a monophyletic group, the distance-based (i.e. best match) criteria for species identification perfectly identified specimens of *S. fenestratum*. The best match method used the distance between sequences as the criteria for species identification. If the closest sequences were from the same species then the identification was considered successful (Meier et al., 2006). Although specimens of *S. fenestratum* did not form a monophyletic clade, the closest sequence of each query was from the same species; therefore, all sequences were identified as *S. fenestratum*.

In conclusion, we found that DNA barcoding sequences could be used effectively to associate unknown life stages with the known black fly species. As this molecular marker is accumulating rapidly in public databases (e.g. www.boldsystems.org), future studies using DNA barcoding to associate an unknown life stage with the known species could be even more effective and would facilitate further taxonomic studies in this group.

Acknowledgments

This work was funded by the Thailand Research Fund and Mahasarakham University (grant No. RSA5680013). We thank Jolyon Dodgson (Mahasarakham University, Thailand) and Adrian Plant (National Museum of Wales, Cardiff, UK) for valuable comments on an earlier version of the manuscript.

References

- Adler, P.H., Cheke, R.A., Post, R.J., 2010. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infect. Genet. Evol.* 10, 846–865.
- Adler, P.H., Crosskey, R.W., 2013. World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory [2013]. <http://www.clemson.edu/cafs/departments/esps/bioma/pdfs/blackflyinventory.pdf> (Accessed 25 March 2013).
- Adler, P.H., Currie, D.C., Wood, D.M., 2004. The Black Flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.
- Collins, F.H., Mendez, M.A., Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Besansky, N.J., Finnerty, V., 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 37–41.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 34, 397–423.
- Gatolliat, J.L., Monaghan, M.T., 2010. DNA-based association of adults and larvae in Baetidae (Ephemeroptera) with the description of a new genus *Adnoptilum* in Madagascar. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 29, 1042–1057.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Hernández-Triana, L.M., Crainey, J.L., Hall, A., Fatih, F., Mackenzie-Dodds, J., Shelley, A.J., Zhou, X., Post, R.J., Gregory, T.R., Hebert, P.D.N., 2012. DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagnia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the new world. *Zootaxa* 3514, 43–69.
- Huelsenberg, J.P., Ronquist, F.R., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Malmqvist, B., Adler, P.H., Kuusela, K., Merritt, R.W., Wotton, R.S., 2004. Black flies in the boreal biome, key organisms in both terrestrial and aquatic environments: a review. *Ecoscience* 11, 187–200.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., Ng, K.L., 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.* 55, 715–728.
- Miller, K.B., Alarie, Y., Wolfe, G.W., Whiting, M.F., 2005. Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philydites umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae). *Syst. Entomol.* 30, 499–509.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest 2.2. Program Distributed by the Author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.
- Pramual, P., Adler, P.H., 2014. DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 262–271.
- Pramual, P., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., Walton, C., 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* 14, 3989–4001.
- Pramual, P., Nanork, P., 2012. Phylogenetic analysis based on multiple gene sequences revealing cryptic biodiversity in *Simulium multistriatum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomol. Sci.* 15, 202–213.
- Pramual, P., Wongpakam, K., Adler, P.H., 2011. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilia* (Diptera: Simuliidae). *Genome* 54, 1–9.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2004. Tracer 1.3. <http://beastbioedacuk/Tracer> (Accessed 27 May 2010).
- Rivera, J., Currie, D.C., 2009. Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Mol. Ecol. Resour.* 9, 224–236.
- Rodriguez, R., Oliver, J.L., Marin, A., Medina, J.R., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142, 485–501.
- Ruiter, D.E., Boyle, E.E., Zhou, X., 2013. DNA barcoding facilitates associations and diagnoses for Trichoptera larvae of the Churchill (Manitoba, Canada) area. *BMC Ecol.* 13, 5.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Vers. 4.B.10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Takaoka, H., Choochote, W., 2004. A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Trop. Med. Health* 32, 189–197.
- Takaoka, H., Choochote, W., 2005a. A new species of *Simulium* (*Simulium*) (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56, 43–47.
- Takaoka, H., Choochote, W., 2005b. Two new species of *Simulium* Latreille (Diptera: Simuliidae) from northwestern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56, 123–133.
- Takaoka, H., Choochote, W., 2005c. Two new species of black flies (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Med. Entomol. Zool.* 56, 319–334.
- Takaoka, H., Davies, D.M., 1995. The Blackflies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia. Kyushu University Press, Fukuoka, Japan.
- Takaoka, H., Kuvangkadilok, C., 1999. Four new species of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 497–509.
- Takaoka, H., Saito, K., 1996. A new species and new records of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 163–169.
- Zhou, X., Kjer, K.M., Morse, J.C., 2007. Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 26, 719–742.

Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Sriphirom P., Nanork Sopaladawan P., Wongpakam K., **Pramual P.*** (2014) Molecular phylogeny of black flies in the *Simulium tuberosum* (Diptera: Simuliidae) species-group in Thailand. **Genome**, 57, 45 – 55 (ฐานข้อมูล ISI, ค่า Impact Factor ปี ค.ศ. 2014 = 1.558)

Molecular phylogeny of black flies in the *Simulium tuberosum* (Diptera: Simuliidae) species group in Thailand

Paradee Sriphirom, Piyamas Nanork Sopaladawan, Komgrit Wongpakam, and Pairot Pramual

Abstract: Black flies are medically and ecologically significant insects. They are also interesting from an evolutionary standpoint regarding the role of chromosomal change and ecological adaptation. In this study, molecular genetic markers based on multiple gene sequences were used to assess genetic diversity and to infer phylogenetic relationships for a group of cytologically highly diverse black flies of the *Simulium tuberosum* species group in Thailand. Ecological affinities of the species were also investigated. High levels of genetic diversity were found in cytological species complexes, *S. tani* and *S. doipuiense*, and also in *S. rufibasis*, which was cytologically nearly monomorphic. The results highlight the necessity of integrating multilevel markers for fully understanding black fly biodiversity. Phylogenetic relationships based on multiple gene sequences were consistent with an existing dendrogram inferred from cytological and morphological data. *Simulium tani* is the most distinctive taxa among the members of the *S. tuberosum* species group in Thailand based on its divergent morphological characters. Molecular data supported the monophyletic status of *S. tani*, *S. weji*, and *S. yuphae*, but *S. doipuiense* and *S. rufibasis* were polyphyletic, most likely due to incomplete lineage sorting and inadequate phylogenetic signals. Ecological analyses revealed that members of the *S. tuberosum* species group have clearly different ecological niches. The results thus supported previous views of the importance of ecology in black fly evolution.

Key words: black fly, *Simulium*, Simuliidae, phylogenetic, *tuberosum* species group.

Résumé : Les mouches noires sont des insectes qui présentent un intérêt médical et écologique. Elles sont également intéressantes d'un point de vue évolutif en ce qui a trait aux changements chromosomiques et à l'adaptation écologique. Dans ce travail, des marqueurs génétiques provenant de l'étude de plusieurs séquences géniques ont été employés pour mesurer la diversité génétique et déduire les relations phylogénétiques au sein d'un groupe de mouches noires appartenant au groupe des *Simulium tuberosum* de Thaïlande, lesquelles sont très diversifiées sur le plan cytologique. Les affinités écologiques entre les espèces ont également été étudiées. Une grande diversité génétique a été constatée au sein des complexes d'espèces définis sur une base cytologique, soit le *S. tani* et le *S. doipuiense*, de même que chez le *S. rufibasis* qui est pratiquement monomorphe au plan cytologique. Ces résultats soulignent la nécessité d'intégrer des marqueurs de divers types pour mieux comprendre la biodiversité des mouches noires. Les relations phylogénétiques basées sur plusieurs séquences géniques étaient conformes avec un dendrogramme existant produit à partir de données cytologiques et morphologiques. Le *Simulium tani* constitue le taxon le plus distinct parmi les espèces du complexe *S. tuberosum* en Thaïlande sur la base de ses caractères morphologiques distincts. Les données moléculaires confirment le statut monophylétique du *S. tani*, du *S. weji* et du *S. yuphae*, tandis que les espèces *S. doipuiense* et *S. rufibasis* se sont avérées polyphylétiques, vraisemblablement en raison d'une séparation incomplète des lignées et de signaux phylogénétiques insuffisants. Les analyses écologiques ont révélé que les membres du complexe d'espèces *S. tuberosum* occupent des niches écologiques très différentes. Ces résultats viennent renforcer les hypothèses voulant que l'écologie joue un rôle important dans l'évolution des mouches noires. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : mouche noire, *Simulium*, Simuliidae, phylogénétique, complexe d'espèces *tuberosum*.

Introduction

Black flies (Diptera: Simuliidae) are medically and ecologically significant insects (Adler et al. 2004; Currie and Adler 2008). They are the sole vector of onchocerciasis, the second leading cause of infectious blindness (Richards et al. 2000, 2001; Adler et al. 2010). Black fly larvae, moreover, are major components of stream macroinvertebrate assemblages (Cummins 1987); thus, they play an important role in aspects of stream ecology, such as nutrient turnover (Malmqvist et al. 2004).

The *Simulium tuberosum* (Lundström) species group of the subgenus *Simulium* Latreille of the genus *Simulium* Latreille (Diptera:

Simuliidae) is comprised of 49 nominal species (Adler and Crosskey 2013). This species group is geographically widespread, being recorded from Nearctic, Palearctic, and Oriental realms (Adler and Crosskey 2013). In Thailand, seven morphological species, namely, *Simulium doipuiense* Takaoka and Choochote, 2005; *Simulium manoni* Takaoka and Choochote, 2005; *Simulium rufibasis* Brunetti, 1911; *Simulium setsukoae* Takaoka & Choochote, 2004; *Simulium tani* Takaoka & Davies, 1995; *Simulium weji* Takaoka, 2001; and *Simulium yuphae* Takaoka and Choochote, 2005, have been described (Tangkawanit et al. 2009b). Extensive cytological examination revealed that two morphological species, *S. doipuiense* and *S. tani*,

Received 21 August 2013. Accepted 15 January 2014.

Corresponding Editor: A. Civetta.

P. Sriphirom, P.N. Sopaladawan, and P. Pramual. Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand.

K. Wongpakam. Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand.

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

Genome 57: 45–55 (2014) dx.doi.org/10.1139/gen-2013-0145

Published at www.nrcresearchpress.com/gen on 16 January 2014.

Table 1. List of species in the *Simulium tuberosum* species group and Genbank accession numbers for COI, COII, and 18S/ITS1 sequences used in this study.

Species	Cytoform	Location	Elevation (m)	PCR	Accession number		
					COI	COII	18S/ITS1
<i>Simulium doipuiense</i> complex	A	Ban Nam khan, Phuka, Nan	1142	x	KF550246	KF550190	KF550264
					KF550243	KF550187	KF550265
					KF550244	KF550188	KF550266
	A	Siriphume waterfall, Chiangmai	1332	x	—	KF550186	KF550264
					KF550245	KF550189	KF550264
					—	KF550192	KF550267
					—	KF550191	KF550268
					KF550237	—	—
					KF550238	—	—
					KF550239	—	—
					KF550240	—	—
					KF550241	—	—
					KF550242	—	—
	A	Huai Sai Leuang waterfall, Chiangmai	1050	x	KF550233	—	—
					KF550234	—	—
					KF550235	—	—
					KF550236	—	—
					KF550224	KF550193	KF550268
					KF550225	KF550194	KF550268
<i>Simulium rufibasis</i>	A	Kew Mae Pan, Doi Inthanon, Chiangmai	2188	x	KF550226	KF550195	KF550268
					KF550227	KF550197	KF550268
					KF550228	KF550198	KF550268
					KF550229	KF550199	KF550269
					KF550230	KF550196	KF550268
					KF550218	—	—
	C	Khao Lod Cave, Kanchanaburi	262	x	KF550219	—	—
					KF550220	—	—
					KF550221	—	—
					KF550222	—	—
					KF550232	KF550208	KF550270
					—	KF550209	KF550271
<i>Simulium tani</i> complex	C, G, H ^a	Mae Tho check point, Chiang Rai	826	x	AY855980	—	—
					KF550231	KF550210	KF550272
					—	KF550210	KF550273
	B ^a	Bok krai waterfall, Ranong	65	x	—	KF550211	KF550273
					AY855922	—	—
					AY855931	—	—
					AY855934	—	—
					AY855938	—	—
					AY855946	—	—
	B ^a	Khaosoidao waterfall, Chanthaburi	65	x	AY855949	—	—
					AY855955	—	—
					AY855960	—	—
					AY855967	—	—
					AY855987	—	—
					AY855988	—	—
<i>Simulium weji</i>	C ^a	Tad Mork waterfall, Petchabun	468	x	AY855994	—	—
					AY856000	—	—
					AY856013	—	—
					AY856031	—	—
					—	KF550200	KF550274
					—	KF550202	KF550276
	B ^a	Huai Rung, Ranong	80	x	—	KF550201	KF550275
					—	KF550205	KF550277
					—	KF550206	KF550277
					KF550247	—	—
					KF550248	—	—
					KF550249	—	—
	B ^a	Khaosoidao waterfall, Chanthaburi	65	x	KF550250	—	—
					KF550256	KF550204	KF550279
					—	KF550203	KF550278
					AY251527	—	—
					KF550251	—	—
					KF550252	—	—
	C ^a	Morkfah waterfall, Chiangmai	545	x	KF550253	—	—
					KF550254	—	—
					—	—	—
					—	—	—
					—	—	—
					—	—	—

Table 1 (continued).

Species	Cytoform	Location	Elevation (m)	PCR	Accession number		
					COI	COII	18S/ITS1
<i>Simulium yuphae</i>		Mae Rim Botanic Garden, Chiangmai	680	×	KF550257	KF550207	KF550280
					KF550258	KF550207	KF550280
					KF550259	KF550207	KF550280
		Tham Yai waterfall, Loei	1200		—	KF550207	KF550280
					KF550260	—	—
					KF550261	—	—
		Mae Wong, Kampaengphet	486		KF550262	—	—
					KF550263	—	—

Note: × represents unsuccessful amplification of COI gene.

^aCytoform assignments according to the sampling location where such cytoform was reported (Tangkawanit et al. 2009a) because sequences were obtained from previous publication (Pramual et al. 2005) in which the cytoform has not been identified.

were cytological species complexes composed of 2 and 10 cytoforms, respectively (Tangkawanit et al. 2009a).

The species relationships of the members of the *S. tuberosum* group in Thailand have been inferred from chromosome inversions (Tangkawanit et al. 2009a) and from morphological characters (Tangkawanit et al. 2009b). Both cytology and morphology revealed similar dendrograms. *Simulium tani* is the most divergent from the other species, and *S. rufibasis* and *S. doipuiense* are the most closely related taxa among the members of the *S. tuberosum* group in Thailand (Tangkawanit et al. 2009a, 2009b). Although morphology and cytology provide significant insight into the biodiversity and systematics of *S. tuberosum* in Thailand, several studies have revealed that integrating molecular genetic data could uncover hidden diversity that cannot be detected at the morphological and cytological levels (e.g., Pramual et al. 2011b; Pramual and Nanork 2012). Molecular systematic studies have included members of the *S. tuberosum* group, but with limited sampling size. All species were represented by only a single individual, except for *S. tani* where three specimens were included (Thanwisai et al. 2006; Phayuhaseana et al. 2010). Small sample size could lead to misleading inferences about phylogenetic relationships because it does not allow identification of intraspecific genetic variation (Hedin 1997).

In this study, molecular genetic markers based on multiple gene sequences were used to infer the phylogenetic relationships of the members of the *S. tuberosum* group in Thailand. The objectives of this study were to quantify molecular genetic diversity and to test the existing hypothesis of the species relationships previously proposed based on cytological and morphological data. We also investigated the ecological affinities of members of the *S. tuberosum* group in Thailand.

Materials and methods

Sample collections and species identification

In the present study, only five species from the *S. tuberosum* species group were included (Table 1) because some species are rare, *S. manooni* was not available, and the polymerase chain reaction (PCR) for specimens of *S. setsukoe* was not successful. Manipulation of the specimens was as previously described (Pramual et al. 2005, 2011b). Species were identified using the keys and descriptions of Takaoka and Choochote (2004) and Tangkawanit et al. (2009a), and with the cytological identification of Tangkawanit et al. (2009b).

DNA extraction, amplification, and sequencing

Genomic DNA was extracted using the Genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience, Xindian City, Taiwan). The 800-bp fragment of the cytochrome oxidase I (COI) gene was amplified using the primers C1-J-2195 (5'-TTGATTTTGGTCATCCAGAAGT-3'; Simon et al. 1994) and UEA10 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'; Lunt et al. 1996) with polymerase chain reaction (PCR) conditions as described by Pramual et al. (2005). Cytochrome oxidase II (COII)

gene and 18S ribosomal RNA/internal transcribed spacer 1 (18S/ITS1) fragment were amplified using the primers and PCR conditions described by Conflitti et al. (2010). PCR products were checked by 1% agarose gel electrophoresis and purified using the HiYield Gel/PCR fragment extraction kit (RBC Bioscience). The sequencing reaction was performed on an automatic analyzer (ABI3730XL; Perkin-Elmer Applied Biosystems) by the Macrogen DNA sequencing service (Seoul, Korea).

Data analysis

Thirty individuals representing five species of the *S. tuberosum* group in Thailand were sequenced for COII and 18S/ITS1. Representative haplotypes for each gene were deposited in GenBank under accession numbers as shown in Table 1. A larger dataset was obtained for COI gene where 70 individuals from five species were sequenced. Sequences were aligned using Clustal X (Thompson et al. 1997) with a final visual inspection. Sequence length and parsimony informative sites are shown in Table 2. Intraspecific sequence divergences based on Kimura 2-parameter (K2P) were calculated separately for each gene in PAUP* v.4.10b (Swofford 2002).

Phylogenetic analyses were conducted for COI sequences and for the combined dataset (COI, COII, and 18S/ITS1). Sequences from *S. (Nevermannia) aureohirtum* (accession numbers FJ477847, JF916871, JF916839) and *S. (Gomphostilbia) siamense* (accession numbers KF550212, JF916872, JF505387) were used as outgroups. The maximum parsimony (MP) tree for COI sequences was calculated in PAUP* using a heuristic search with 1000 random addition sequence replicates, TBR branch swapping, and Multrees effect. Bootstrap support was estimated for 1000 replicates. Maximum likelihood (ML) analyses were performed in PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010). Node support was carried out using an approximate likelihood-ratio test (Anisimova and Gascuel 2006; Guindon et al. 2010). The program jModeltest v.0.1.1 (Posada 2008) was used to select the best-fit DNA substitution model for ML analysis based on the Akaike information criterion (AIC) algorithm. The best-fit model for the COI sequence was the transversion model (TVM) with a proportion of invariable sites of 0.0650 and with a gamma distribution of 0.2710. Phylogenetic relationships were also analyzed by Bayesian methods using MrBayes 3.04b (Huelsenbeck and Ronquist 2001). The best fit model for Bayesian analysis was selected by hierarchical likelihood ratio tests implemented in MrModeltest (Nylander 2004). The general time-reversible (GTR) model (Rodriguez et al. 1990) with a gamma distribution shape parameter of 0.4857 and a proportion of invariable sites of 0.4051 was selected for the COI data. Bayesian analysis was run for 2 000 000 generations with a sampling frequency of 100 generations. Tracer v.1.5 (Rambaut and Drummond 2007) was used for visual inspection of the point where the log likelihood is stationary. Trees sampled before this point were discarded as burn-in. The remaining trees of two simultaneous runs were included in the posterior probability calculations.

Table 2. Mean and range of stream variables for larval habitats of five black fly species of the *Simulium tuberosum* species group in Thailand.

Stream variable	<i>Simulium doipulense</i> (n = 7)	<i>Simulium rufibasis</i> (n = 3)	<i>Simulium tani</i> (n = 28)	<i>Simulium weji</i> (n = 9)	<i>Simulium yuphae</i> (n = 9)
Altitude (m)	1116.00±115.20 (750.00–1400.00)	1912.67±332.91 (1250.00–2300.00)	580.07±60.70 (94.00–1226.00)	587.33±26.36 (401.00–700.00)	1209.56±80.83 (680.00–1615.00)
Width (m)	2.24±0.47 (0.73–4.67)	2.50±0.29 (2.00–3.00)	3.20±0.36 (0.22–7.00)	1.19±0.41 (0.13–3.50)	1.02±0.42 (0.17–4.00)
Depth (m)	0.16±0.03 (0.05–0.27)	0.12±0.01 (0.10–0.15)	0.20±0.02 (0.06–0.60)	0.08±0.02 (0.02–0.21)	0.05±0.01 (0.01–0.12)
Velocity (m/s)	0.55±0.12 (0.23–1.17)	0.60±0.12 (0.40–0.80)	0.58±0.06 (0.19–1.51)	0.89±0.14 (0.31–1.53)	0.61±0.15 (0.05–1.60)
pH	7.70±0.22 (6.90–8.63)	7.13±0.07 (7.00–7.20)	7.86±0.10 (6.73–8.88)	7.39±0.44 (6.00–9.73)	7.29±0.45 (5.50–9.20)
Conductivity (µS/cm)	42.46±17.01 (19.10–144.00)	10.67±0.67 (10.00–12.00)	73.46±12.21 (10.93–280.00)	266.71±31.17 (99.40–414.00)	30.07±14.13 (8.00–142.00)
Water temperature (°C)	17.21±1.27 (13.40–22.50)	15.67±1.20 (14.00–18.00)	22.60±0.67 (13.50–27.50)	24.11±0.38 (22.40–26.50)	18.28±0.88 (15.00–23.70)
Streambed particle ^a	5 (3–6)	6 (5–6)	5 (2–6)	2 (1–6)	6 (4–6)
Riparian vegetation ^a	3 (1–3)	3 (3)	3 (1–3)	1 (1–3)	3 (1–3)

Note: All values are mean ± SE (min–max), except streambed particle and riparian vegetation which are median (min–max).

^aValues for the streambed particle size range from 1 (sand) to 6 (bed rock); and values for riparian vegetation range from 1 (grass land) to 3 (trees) along stream (McCreadie et al. 2006).

For the combined data analysis, 30 individuals were included. Among these, 18 have three gene (COI, COII and 18S/ITS1) sequences and 12 have two (COII and 18S/ITS1). We were unable to obtain COI sequences from 12 individuals included in the combined data because PCR was unsuccessful (Table 1). Although incomplete data potentially influenced the phylogenetic analysis, both simulation and empirical studies indicated that including more taxa, even if they have incomplete sequences, can greatly improve the accuracy of the phylogenetic analysis (Wiens 2005; Wiens and Tiu 2012). Therefore, we included all 30 individuals into the combined data set for phylogenetic analysis. The congruence among separate genes was tested using the partition homogeneity test (Farris et al. 1995) with 1000 replicates, implemented in PAUP*. The results indicated that there were no significant differences between the separate gene regions ($P = 0.250$). Therefore, genes were combined for MP, ML, and Bayesian analyses. Maximum parsimony analysis was conducted with PAUP* using the settings specified for the COI dataset. For ML analysis, the best-fit model selected by jModeltest (GTR + I + G, $I = 0.6468$, $G = 1.2393$) was used. For Bayesian analysis, the best-fit model selected by MrModeltest (GTR + I + G, $I = 0.6468$, $G = 1.2393$) was used. Bayesian analysis was implemented in MrBayes using the parameter settings as for the COI dataset.

Canonical correspondence analysis (CCA) was used to examine the relationship between environmental variables and species occurrence. Stream variables including elevation, width, depth, velocity, streambed particle sizes, water temperature, water conductivity, pH, and riparian vegetation types (Table 2) were included in the CCA analysis. In addition to the data from the present study, stream variables were also obtained from previous publications (Pramual and Kuvangkadilok 2009; Tangkawanit et al. 2009a). The CCA analysis was performed in PCORD v.5.14 (McCune and Mefford 2006).

To determine the ecological divergence among the members of the *S. tuberosum* group, we followed the approach described by Graham et al. (2004) and Pramual et al. (2012). First, the principal components analysis (PCA) was used to reduce the number of stream variables into groups of independent components (PCs). The PCs with eigenvalues greater than 1.0 were retained as variables. To interpret PCs, Spearman rank correlations were used to detect relationships between stream variables and PC scores (McCreadie et al. 2006). Multivariate analysis of variance (ANOVA) (MANOVA) was used to determine whether species were significantly distributed along the environmental space. For MANOVA analysis, species were assigned as a fixed factor and the PC score for each axis was the dependent variable (Graham et al. 2004).

Results

Sequence variation

The COI and COII sequences possessed much higher variability in sites than the 18S/ITS1 sequences. Among the 720 bp of the COI sequences, 158 sites were parsimony informative. The 697-bp fragment of the COII sequences contained 149 variable parsimony informative sites. The 633-bp fragment of the 18S/ITS1 sequences contained only 25 variable parsimony informative sites (Table 3).

The *S. doipulense* complex possessed the greatest intraspecific genetic divergence for the two mitochondrial genes (COI and COII). However, diversity for the nuclear gene (18S/ITS1) was low. The *S. rufibasis* and *S. tani* complex showed similar intraspecific genetic divergence for the COI sequences, but the latter species showed much greater diversity for the COII gene. *Simulium weji* possessed high diversity for COII and 18S/ITS1 sequences but low COI sequences divergence. *Simulium yuphae* showed the lowest diversity in all genes (Table 4).

Table 3. Statistics for individual gene segments.

Gene	Sequence length	Invariant	Variable uninformative	Variable informative
COI (n = 70)	720	512	50	158
COII (n = 34)	697	533	15	149
18S/ITS1 (n = 34)	633	596	12	25

Table 4. Intraspecific genetic divergence among the members of the *Simulium tuberosum* species group in Thailand based on the Kimura 2-parameter model.

Species	COI	COII	ITS
<i>Simulium doipulense</i>	2.28 (0.00–5.36)	2.40 (0.58–3.70)	0.08 (0.00–1.13)
<i>Simulium rufibasis</i>	1.82 (0.14–6.11)	0.77 (0.14–1.31)	0.09 (0.00–0.32)
<i>Simulium tani</i>	1.48 (0.14–4.34)	1.70 (0.00–2.49)	0.66 (0.16–0.97)
<i>Simulium yuphae</i>	0.36 (0.00–0.98)	0	0.07 (0.00–0.16)
<i>Simulium weji</i>	0.71 (0.14–1.41)	1.98 (0.14–5.67)	0.58 (0.00–0.97)

Note: All values are mean (%) (min.–max.).

Phylogenetic relationships

Phylogenetic analyses based on the COI sequences using three methods (MP, ML, Bayesian) revealed the same tree topology; thus, only the Bayesian tree was shown (Fig. 1). Phylogenetic analysis based on MP, ML, and Bayesian methods for the combined data also shows the same tree topology; thus, only the Bayesian tree was shown (Fig. 2). The five species of *S. tuberosum* in Thailand were divided into two main clades. Clade I composed of four species including the *S. doipulense* complex, *S. rufibasis*, *S. weji*, and *S. yuphae*. A single species, the *S. tani* complex, represented clade II. According to the COI and combined data trees, the *S. tani* complex, *S. weji*, and *S. yuphae* were monophyletic with high support. The *S. doipulense* complex and *S. rufibasis* were polyphyletic.

As the haplotype network is better than a phylogenetic tree to reveal genetic relationships between closely related species, the COI sequences of *S. rufibasis* and *S. doipulense* complex were subjected to median joining (MJ) haplotype network (Bandelt et al. 1999) analysis using Network v4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>). The MJ network (Fig. 3) revealed that the haplotypes of the two species were largely isolated. There were only three haplotypes that were connected to different species. Of these, two haplotypes from *S. doipulense* complex were connected to the haplotype cluster of *S. rufibasis*, and one haplotype of *S. rufibasis* was connected to a cluster of *S. doipulense* complex. This suggested that these species were genetically largely isolated.

Species distribution and stream variables

CCA revealed that the relationship between species and stream variables was high (>0.84) for the first two canonical axes (Table 5), which was consistent with the Monte Carlo permutation test that rejected the null model of the non-association between species occurrence and stream variables ($P = 0.001$). The results thus indicate that the variables used in this study were strongly related to species distribution. Streambed particles size and water conductivity were the most important factors on axis I, and the elevation and stream width were the most important factors on axis II (Table 5; Fig. 4). *Simulium doipulense* complex was situated on the lower left side of the biplot, associated with the large streambed particle sites. *Simulium yuphae* and *S. rufibasis* were associated with high elevation sites, but the latter species was associated with very high altitude sites. The stream site that was situated on the lower right side of the biplot had high water conductivity. The species associated with this site was *S. weji* (Fig. 4).

PCA extracted three PCs with eigenvalues greater than 1.00. These PCs explained 85.39% of the total variation in stream conditions (Table 5). PC-1, which accounted for 47.34% of the variation, was significantly positively related to conductivity and water

temperature, and significantly negatively related to elevation and streambed particles. PC-2 accounted for 22.70% of the variation (Table 5) and was significantly positively related to stream width and depth, and significantly negatively related to water conductivity. PC-3 accounted for 15.34% of the variation and was significantly positively related to stream width, depth, streambed particle, and riparian vegetation, and significantly negatively related to water conductivity (Table 5; Fig. 5). MANOVA analysis revealed significant differences along PC-1 ($F = 20.053$, $P < 0.001$), PC-2 ($F = 4.073$, $P = 0.006$), and PC-3 ($F = 9.124$, $P < 0.001$). Thus, the results indicated that members of the *S. tuberosum* group were significantly separated along the environmental space.

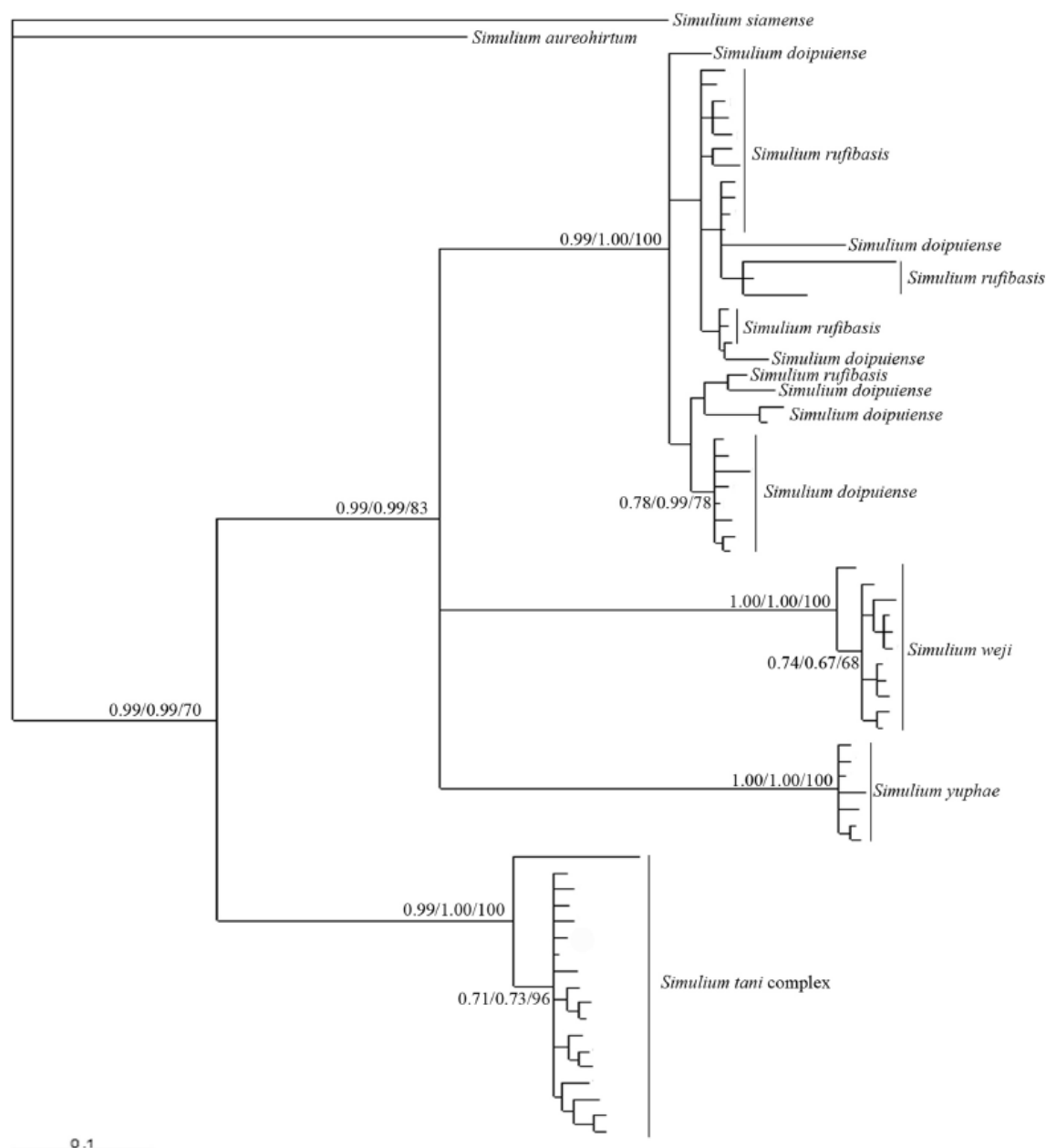
Discussion

Molecular data based on multiple gene sequences revealed high genetic diversity in the three black fly species of the *S. tuberosum* group in Thailand, including *S. doipulense* complex, *S. rufibasis*, and *S. tani* complex. The maximum intraspecific genetic divergences for COI sequences were comparable with those of other black fly species complexes (Rivera and Currie 2009). These results are consistent with and support a cytogenetic study that found that *S. doipulense* and *S. tani* were cytological species complexes comprising 2 and 10 cytoforms, respectively (Tangkawanit et al. 2009a). However, the high genetic diversity (maximum value of 6.11% for COI sequences) found at the molecular level and a divergence lineage in the mitochondrial DNA haplotype network for *S. rufibasis* was contradictory to the cytogenetic results. Chromosome study revealed that this species was a cytogenetically single lineage with only two low frequency floating inversions (Tangkawanit et al. 2009a). This indicates that hidden diversity remains to be explored in this species. The results, therefore, highlight the significance of the integrated approach for fully understanding black fly biodiversity (Adler and Huang 2011; Pramual and Kuvangkadilok 2012).

Low genetic diversity was found in *S. yuphae*, although specimens were obtained from geographically distant locations in the upper north, lower north, and northeast regions, which were isolated by more than 500 km. Low genetic diversity in this species was probably related to species ecology. Larvae of *S. yuphae* preferred bedrock rivulet or small cascade streams (<2 m wide) (Tangkawanit et al. 2009a), which are prone to drying out during the dry season but are refilled and flowing in the rainy season. Therefore, populations of *S. yuphae* are likely to experience local extinction and recolonization, which could reduce within population genetic diversity (Pannell and Charlesworth 2000). Low genetic diversity in this species could also be influenced by population history. For example, low genetic diversity was found in geographically widespread species (e.g., *S. siamense*), which was due to the recent demographic history (Pramual et al. 2011a). However, small sampling size prevents this hypothesis being tested.

Phylogenetic relationships between the members of the *S. tuberosum* group in Thailand have been inferred previously from chromosomes and morphology. Tangkawanit et al. (2009a) used chromosome inversion differences to infer relationships between 18 cytologically distinct taxa, corresponding to seven morphological species of the *S. tuberosum* group in Thailand. A cytological dendrogram revealed two lineages. Ten cytoforms of *S. tani* complex comprised one lineage, and the other species formed another lineage (Tangkawanit et al. 2009a). Species relationships inferred from eight morphological characters also found that *S. tani* complex was isolated from other species (Tangkawanit et al. 2009b). Our molecular data based on multiple gene sequences mirrors the inferred species relationships based on morphology and cytology. *Simulium tani* complex formed a separate clade from the other species with strong support from both COI and combined trees. The genetic isolation of *S. tani* complex, compared with the other members of *S. tuberosum* in Thailand, was supported by morphological characters. This species possesses a

Fig. 1. Bayesian tree for the cytochrome oxidase I (COI) sequences of the five species from the *Simulium tuberosum* species group in Thailand. Posterior probabilities based on likelihood-ratio test for maximum likelihood, and for Bayesian analysis and bootstrap values for maximum parsimony analysis, are shown above or near the branch. Scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

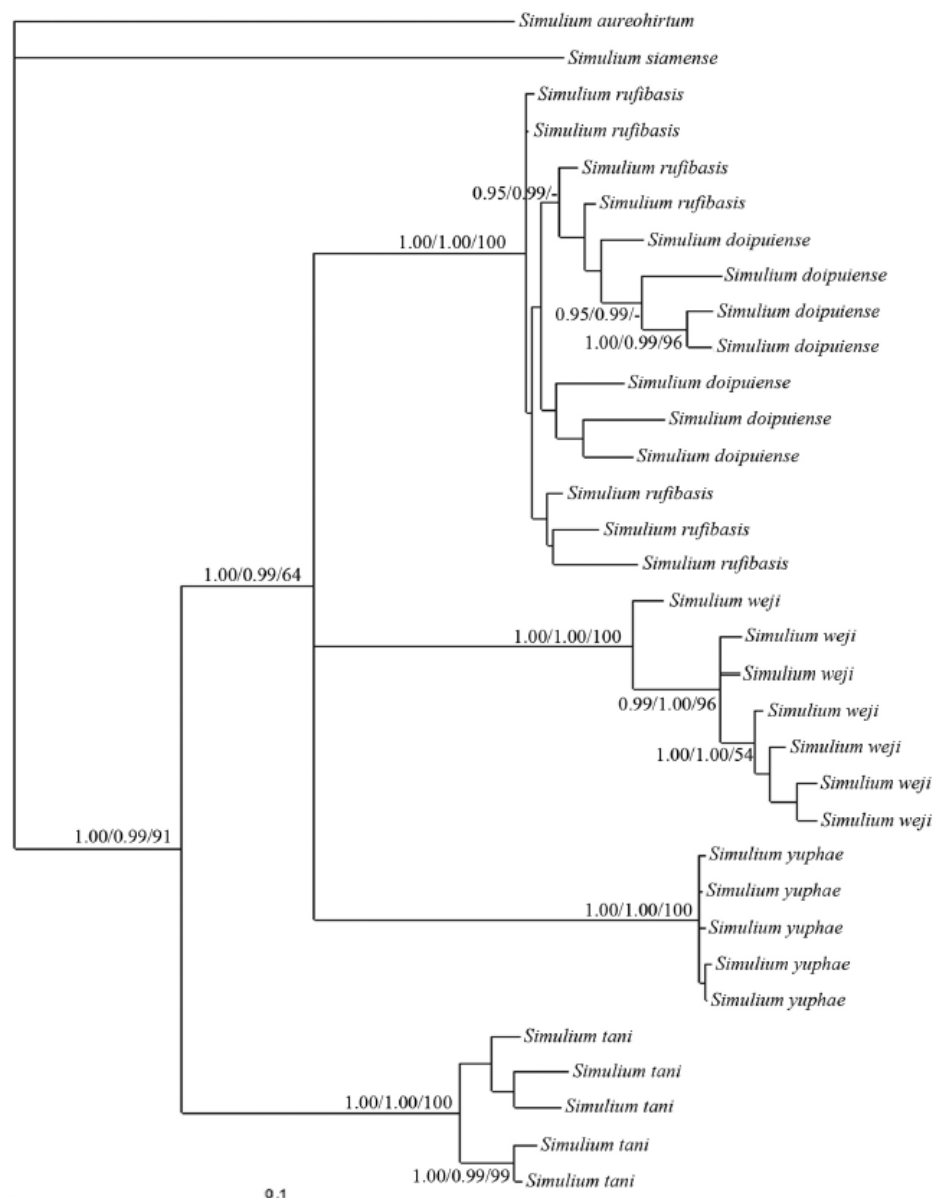


terminal hook in the pupa, whereas all other members of the *S. tuberosum* group in Thailand lack this character (Tangkawanit et al. 2009b).

At the species level, *S. tani* complex, *S. weji*, and *S. yuphae* were monophyletic with strong support. However, *S. rufibasis* and *S. doipuiense* complex were polyphyletic. Samples of *S. rufibasis* and

S. doipuiense complex formed a single clade with strong support (100%). The phylogenetic tree inferred from molecular genetic data in the present study was consistent with the morphological and cytological studies that also found *S. rufibasis* and *S. doipuiense* complex were the most closely related species among the members of the *S. tuberosum* group in Thailand. There are several

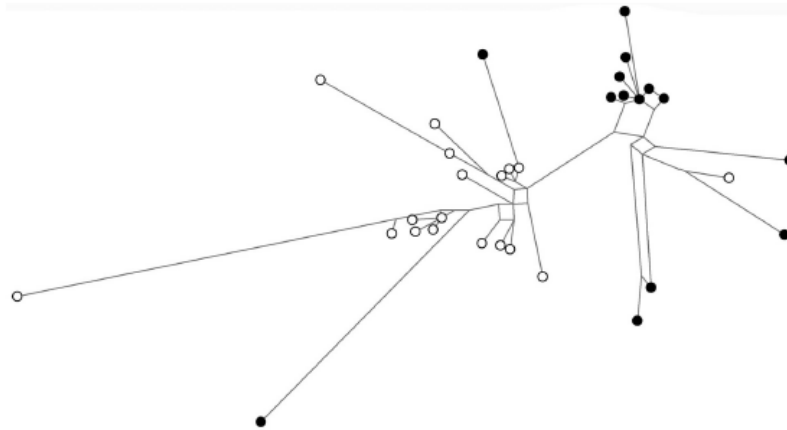
Fig. 2. Bayesian tree for the combined dataset of the cytochrome oxidase I (COI), cytochrome oxidase II (COII), and 18S rRNA/ITS1 (18S/ITS1) sequences of the five species from the *Simulium tuberosum* species group in Thailand. Posterior probabilities based on likelihood-ratio test for maximum likelihood, and for Bayesian analysis and bootstrap values for maximum parsimony analysis, are shown above or near the branch. Scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.



possible explanations for the non-monophyletic species of the *S. rufibasis* and *S. doipuiense* complex including (i) gene paralogy, (ii) interspecific hybridization, (iii) imperfect taxonomy, (iv) inadequate phylogenetic signal for the DNA sequences being used, and (v) incomplete lineage sorting (Funk and Omland 2003).

Gene paralogy is unlikely given that there is no evidence of an elevated frequency of nonsynonymous substitutions, indels, frame-

shifts, and stop codons in the sequences (Funk and Omland 2003; Conflitti et al. 2010, 2012). An extensive chromosomal study found no evidence of interspecific hybridization even when the specimens were collected from the same stream (Tangkawanit et al. 2009a). The haplotype network of the 32 COI sequences of *S. rufibasis* and *S. doipuiense* complex agrees with the phylogenetic analyses in which the two species were not completely differentiated, but revealed that

Fig. 3. Median joining network for cytochrome oxidase I (COI) sequences of *Simulium rufibasis* (open circles) and *S. doipuiense* (closed circles).Table 5. Summary of canonical correspondence analyses (CCA) and principal components analysis (PCA) of five species of the *Simulium tuberosum* species complex and nine environmental variables for 56 sampling sites in Thailand.

	CCA			PCA		
	Axis 1	Axis 2	Axis 3	PC-1	PC-2	PC-3
Eigenvalue	0.749	0.604	0.208	4.261	2.043	1.381
Cumulative percentage variance	20.9	16.9	5.8	47.3	22.7	15.3
Pearson's correlation for species-environment	0.873	0.849	0.477			
Spearman correlation coefficients						
Elevation	-0.397	-0.624	-0.068	-0.803*	-0.069	0.113
Width	-0.224	0.357	-0.204	0.339	0.521*	0.475*
Depth	-0.213	0.444	-0.266	0.217	0.856*	0.776*
Velocity	0.009	0.100	-0.013	0.291	0.282*	-0.201
pH	-0.069	0.252	-0.037	0.237	-0.303	0.053
Conductivity	0.764	-0.029	-0.088	0.735*	-0.470*	-0.519*
Water temperature	0.455	0.357	0.040	0.756*	0.063	-0.339
Streambed particles	-0.523	-0.148	0.136	-0.679*	0.159	0.362*
Riparian vegetation	-0.341	-0.097	0.073	-0.189	0.045	0.555*

Note: *, $P < 0.01$.

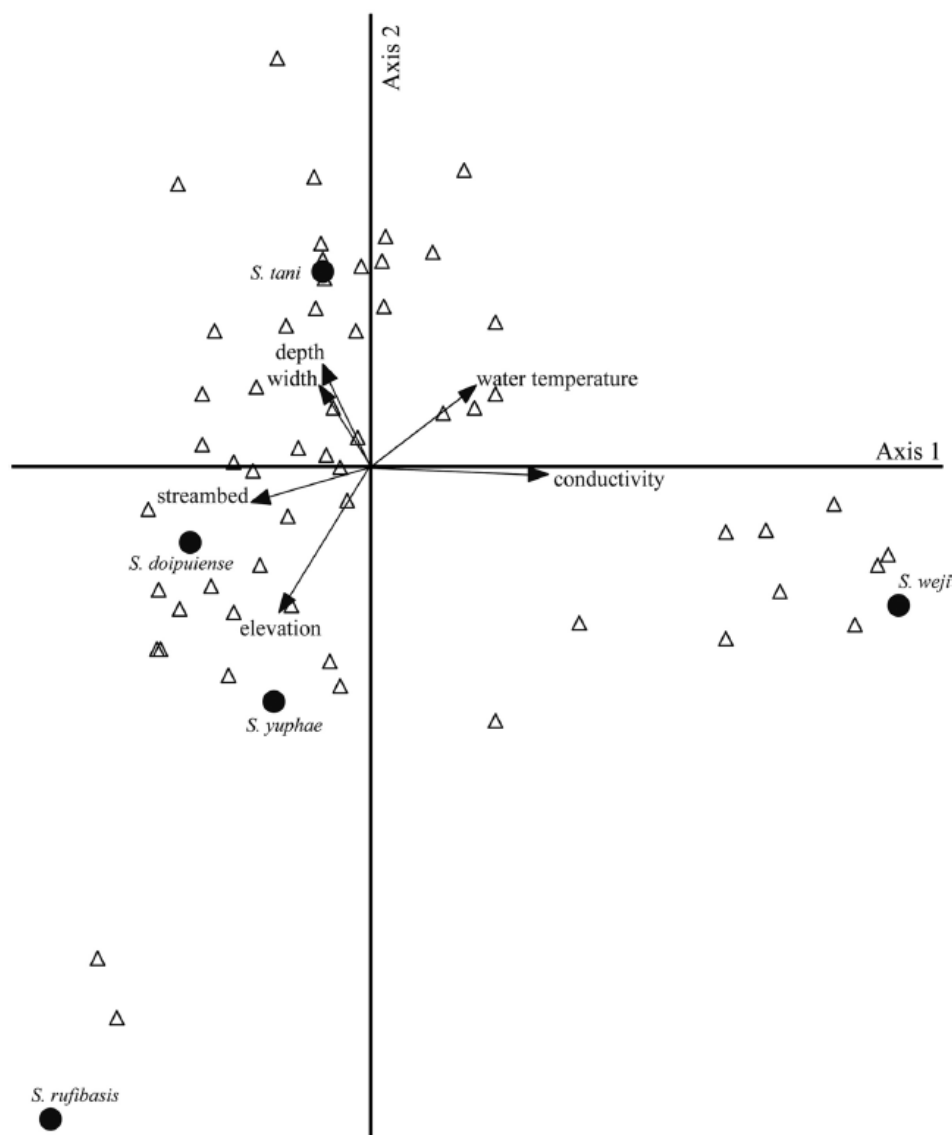
they were largely genetically isolated because almost all sequences were clustered with their own species. Thus, we hypothesized that incomplete lineage sorting is an explanation for the species non-monophyly of *S. rufibasis* and *S. doipuiense* complex. To test this hypothesis, the program MDIV (Nielsen and Wakeley 2001), which simultaneously estimates population divergence time (T), migration (M), and the population parameter (θ) using the maximum likelihood approach, was implemented for the *S. rufibasis* and *S. doipuiense* complex COI sequences. The divergence time was estimated as $t/2N_e$, where t is time in years, θ was estimated as $2N_e\mu$, where μ is the per-fragment mutation rate assuming a divergence rate of 2.3% per million years for insect mitochondrial DNA (Brower 1994) and N_e is the effective population size. The MDIV results indicated a negligible migration rate ($M = 0.6$). The effective population size (approximately 1 240 000) was estimated to be approximately twice the divergence time (568 000 years ago). Given that the probability to receive reciprocal monophyly is high if the divergence time is larger than $4N_e$ (Avise 2000), our results suggested that incomplete lineage sorting is a likely explanation for species non-monophyly of *S. rufibasis* and *S. doipuiense* complex.

An inadequate phylogenetic signal could also lead to species non-monophyly (Funk and Omland 2003); as has been found for closely related black fly species (Conflitti et al. 2010, 2012). Al-

though the mitochondrial genes included in the present study show a high level of genetic variation and successfully differentiate three nominal species (*S. tani*, *S. weiji*, and *S. yuphae*), they fail to separate the closely related species, *S. doipuiense* and *S. rufibasis*. Low (<50%) support for the nodes within the non-monophyly clade (*S. doipuiense* + *S. rufibasis*) suggested that the gene sequences used in our analyses may provide insufficient genetic variation to separate recently diverged taxa (Conflitti et al. 2012).

Ecological adaptation associated with chromosome inversion has been proposed as the important factor driving black fly speciation (Rothfels 1989). Several studies indicated the significant role of ecology on black fly evolution. For example, the larval habitat shift from cascade to river and stream habitats has been proposed as the most important mechanism promoting black fly speciation in the Society Islands (Joy and Conn 2001; Joy et al. 2007). Adaptations to different stream ecologies, such as different elevation, stream velocity, and water conductivity, have been shown to be associated with species divergence of black flies in Thailand (Pramual and Nanork 2012; Pramual et al. 2012). Members of the *S. tuberosum* group in Thailand were ecologically divergent. The CCA revealed that the distributions of the members of *S. tuberosum* complex in Thailand were associated with different ecological variables. MANOVA analysis also found statistically significant different distributions along the

Fig. 4. Ordination diagram of the first two axes of the canonical correspondence analysis (CCA) of the 56 sampling collections. Arrows denote environmental variables with strength of the environmental condition indicated by arrow length and closeness to the CCA axis. Open triangles represent sampling sites and closed circles represent the centroid niches of the species.

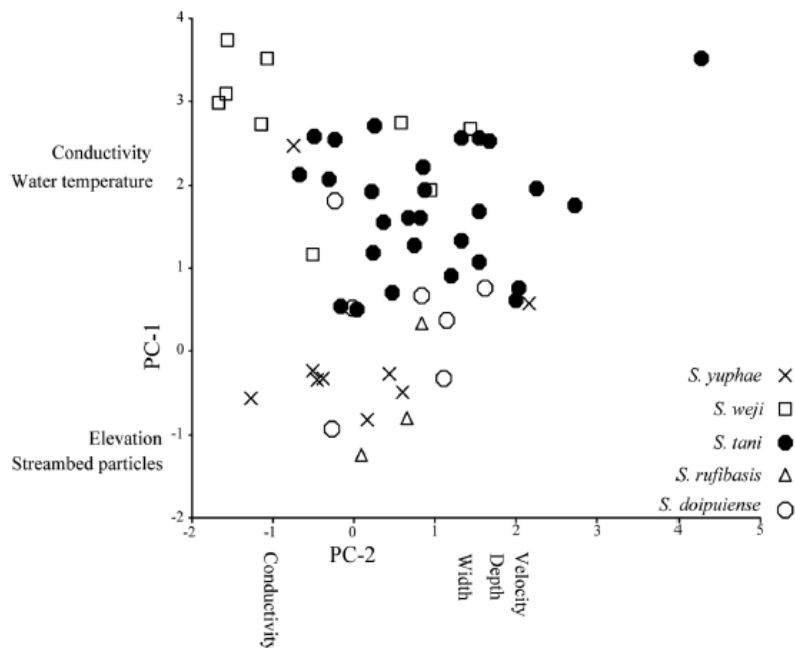


ecological space. *Simulium rufibasis* was associated with high elevation (>1200 m above sea level) streams (Tangkawanit et al. 2009a). *Simulium yuphae* also had a restricted altitude range, but this species was found at elevations lower than *S. rufibasis*. The distribution of *S. weiji* was associated with highly calcareous streams (Takaoka 2001). This stream type often shows high water conductivity; thus, the CCA result indicated a strong association of *S. weiji* with high water conductivity streams. There is ecological divergence among the closely related members of the *S. tuberosum* group, thus strengthening the view of ecological adaptation driving black fly evolution. Extensive chromosome polymorphisms were found in populations of the *S. tuberosum* group in Thailand

(Tangkawanit et al. 2009a). Some inversions were probably associated with ecological divergence as they were unique to particular cytoforms, which show ecological differences from the others (Pramual et al. 2005; Tangkawanit et al. 2009a). However, whether differences in ecology lead to chromosome divergence or the chromosome difference lead to the ecological adaptation remains to be studied.

In conclusion, a phylogenetic tree inferred from molecular genetic data based on multiple gene sequences was consistent with previous studies using chromosome and morphological data. The results thus strongly suggested two divergent lineages of *S. tuberosum* in Thailand. Members of *S. tuberosum* show distinct

Fig. 5. Scatter plot of the scores from principal components analysis (PCA) of stream variables for five black fly species of the *Simulium tuberosum* species group in Thailand. Factor score 1 (PC-1) explained 47.34% of the total variation and was related positively to conductivity and water temperature, and negatively to elevation and streambed particles. Factor score 2 (PC-2) explained 22.70% of the total variation and was positively related to stream width and depth, and negatively to conductivity. The habitats of five taxa were separated in environmental space along the two axes.



ecological niches, indicating that ecological adaptation could play a significant role in black fly evolution.

Acknowledgements

This work was funded by the Thailand Research Fund and Mahasarakham University (grant No. RSA5680013). We thank Jolyn Dodgson (Mahasarakham University, Thailand) and Adrian Plant (National Museum, Cardiff, UK) for valuable comments on an earlier version of the manuscript.

References

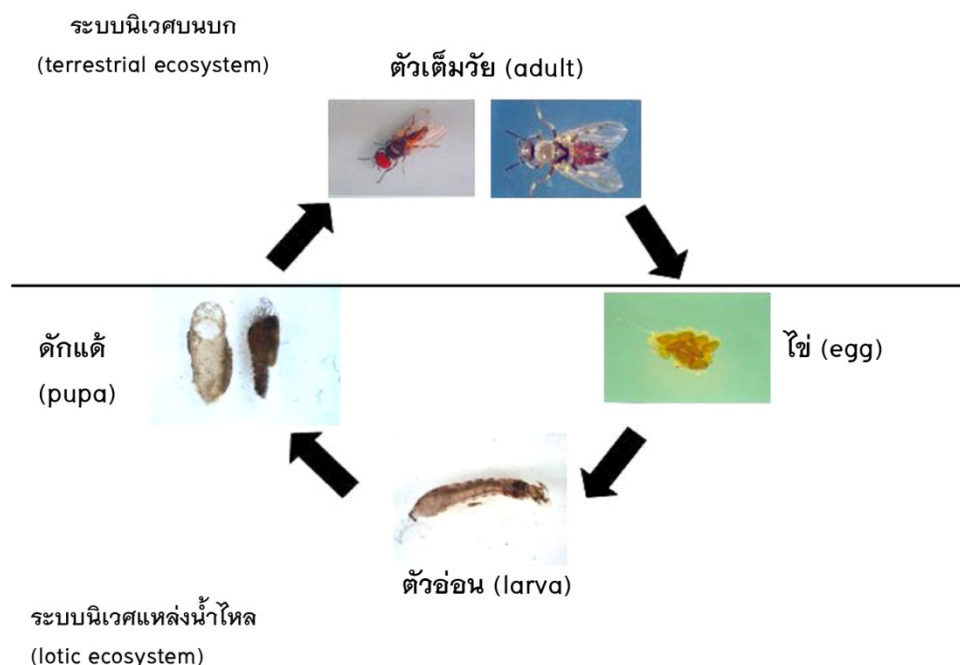
- Adler, P.H., and Crosskey, R.W. 2013. World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory [2013]. [Online.] Available from <http://www.clemson.edu/cafs/departments/esps/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf> [accessed 25 March 2013].
- Adler, P.H., and Huang, Y.-T. 2011. Integrated systematics of the Simuliidae (Diptera): evolutionary relationships of the little-known Palearctic black fly *Simulium acrotrichum*. *Can. Entomol.* **143**(6): 612–628. doi:10.4039/n11-035.
- Adler, P.H., Currie, D.C., and Wood, D.M. 2004. The black flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Adler, P.H., Cheke, R.A., and Post, R.J. 2010. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infect. Genet. Evol.* **10**: 846–865. doi:10.1016/j.meegid.2010.07.003. PMID:20624485.
- Anisimova, M., and Gascuel, O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* **55**: 539–552. doi:10.1080/10635150600755453. PMID:16785212.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., and Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 37–48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036. PMID:10331250.
- Brower, A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Hedionis erato*, inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 6491–6495. doi:10.1073/pnas.91.14.6491. PMID:8022810.
- Conflitti, I.M., Kratochvil, M.J., Spironello, M., Shields, G.F., and Currie, D.C. 2010. Good species behaving badly: non-monophyly of black fly sibling species in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **57**(1): 245–257. doi:10.1016/j.ympev.2010.06.024. PMID:20601001.
- Conflitti, I.M., Shields, G.F., and Currie, D.C. 2012. A “complex” problem: delimiting sibling species boundaries in black flies (Diptera: Simuliidae). *Can. Entomol.* **144**: 323–336. doi:10.4039/tce.2012.29.
- Cummins, K.W. 1987. The functional role of black flies in stream ecosystems. In *Black flies: ecology, population management and annotated world list*. Edited by K.C. Kim and R.W. Merritt. The Pennsylvania State University, University Park, Pa. pp. 1–10.
- Currie, D.C., and Adler, P.H. 2008. Global diversity of black flies (Diptera: Simuliidae) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**: 469–475. doi:10.1007/s10750-007-9114-1.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., and Bult, C. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10**: 315–319.
- Funk, D.J., and Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insight from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **34**: 397–423. doi:10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421.
- Graham, C.H., Ron, S.R., Santos, J.C., Schneider, C.J., and Moritz, C. 2004. Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution*, **58**(8): 1781–1793. doi:10.1554/03-274. PMID:15446430.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**: 307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010. PMID:20525638.
- Hedin, M.C. 1997. Molecular phylogenetics at the population/species interface in cave spiders of the southern Appalachians (Araneae: Nesticidae: Nesticus). *Mol. Biol. Evol.* **14**(3): 309–324. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025766. PMID:9066798.
- Huelsenbeck, J.P., and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**(8): 754–755. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754. PMID:11524383.
- Joy, D.A., and Conn, J.E. 2001. Molecular and morphological phylogenetic analysis of an insular radiation in Pacific black flies (*Simulium*). *Syst. Biol.* **50**: 18–38. doi:10.1080/10635150120897. PMID:12116592.
- Joy, D.A., Craig, D.A., and Conn, J.E. 2007. Genetic variation tracks ecological

- segregation in Pacific island black flies. *Heredity*, **99**: 452–459. doi:10.1038/sj.hdy.6801023. PMID:17611492.
- Lunt, D.H., Zhang, D.-X., Szymura, J.M., and Hewitt, G.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* **5**: 153–165. doi:10.1111/j.1365-2583.1996.tb00049.x. PMID:8799733.
- Malmqvist, B., Adler, P.H., Kuusela, K., Merritt, R.W., and Wotton, R.S. 2004. Black flies in the boreal biome, key organisms in both terrestrial and aquatic environments: a review. *Ecoscience*, **11**: 187–200.
- McCreadie, J.W., Adler, P.H., Grillet, M.E., and Hamada, N. 2006. Sampling statistics in understanding distributions of black fly larvae (Diptera: Simuliidae). *Acta Entomol. Serb. (Suppl.)*: 89–96.
- McCune, B., and Mefford, M.J. 2006. PC-ORD. Multivariate analysis of ecological data. Version 5.14. MjM Software, Gleneden Beach, Oreg., USA.
- Nielsen, R., and Wakeley, J.W. 2001. Distinguishing migration from isolation: an MCMC approach. *Genetics*, **158**: 885–896. PMID:11404349.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- Pannell, J.R., and Charlesworth, B. 2000. Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **355**(1404): 1851–1864. doi:10.1098/rstb.2000.0740.
- Phayuhasena, S., Colgan, D.J., Kuvangkadilok, C., Pramual, P., and Baimai, V. 2010. Phylogenetic relationships among the black fly species (Diptera: Simuliidae) of Thailand based on multiple gene sequences. *Genetica*, **138**: 633–648. doi:10.1007/s10709-010-9437-0. PMID:20108163.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083. PMID:18397919.
- Pramual, P., and Kuvangkadilok, C. 2009. Agricultural land use and black fly (Diptera, Simuliidae) species richness and species assemblages in tropical streams, Northeastern Thailand. *Hydrobiologia*, **625**: 173–184. doi:10.1007/s10750-009-9706-z.
- Pramual, P., and Kuvangkadilok, C. 2012. Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium (Gomphostilbia) angulistylum* (Diptera: Simuliidae). *Genome*, **55**(6): 447–458. doi:10.1139/g2012-031. PMID:22663346.
- Pramual, P., and Nanork, P. 2012. Phylogenetic analysis based on multiple gene sequences revealing cryptic biodiversity in *Simulium multistriatum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomol. Sci.* **15**: 202–213. doi:10.1111/j.1479-8298.2011.00491.x.
- Pramual, P., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., and Walton, C. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* **14**: 3989–4001. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02639.x. PMID:16262854.
- Pramual, P., Kongim, B., and Nanork, P. 2011a. Phylogeography of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki complex (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomol. Sci.* **14**(4): 428–436. doi:10.1111/j.1479-8298.2011.00465.x.
- Pramual, P., Wongpakam, K., and Adler, P.H. 2011b. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). *Genome*, **54**(1): 1–9. doi:10.1139/G10-100. PMID:21217800.
- Pramual, P., Kuvangkadilok, C., Jitklang, S., Tangkawanit, U., and Adler, P.H. 2012. Geographical versus ecological isolation of closely related black flies (Diptera: Simuliidae) inferred from phylogeny, geography, and ecology. *Org. Divers. Evol.* **12**: 183–195. doi:10.1007/s13127-012-0092-4.
- Rambaut, A., and Drummond, A.J. 2007. Tracer v1.5. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. [Accessed 9 August 2013.]
- Richards, F., Hopkins, D., and Cupp, E. 2000. Programmatic goals and approaches to onchocerciasis. *Lancet*, **355**(9216): 1663–1664. doi:10.1016/S0140-6736(00)02235-2. PMID:10905239.
- Richards, F.O., Jr., Boatín, B., Sauerbrey, M., and Sektéti, A. 2001. Control of onchocerciasis today: status and challenges. *Trends Parasitol.* **17**(12): 558–563. doi:10.1016/S1471-4922(01)02112-2. PMID:11756018.
- Rivera, J., and Currie, D.C. 2009. Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Mol. Ecol. Resour.* **9**: 224–236. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02648.x. PMID:21564982.
- Rodríguez, R., Oliver, J.L., Marín, A., and Medina, J.R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**: 485–501. doi:10.1016/S0022-5193(05)80104-3. PMID:2338834.
- Rothfels, K. 1989. Speciation in black flies. *Genome*, **32**(4): 500–509. doi:10.1139/g89-475.
- 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. Am.* **87**: 651–701.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.b.10. Sinauer, Sunderland.
- Takaoka, H. 2001. *Simulium (Simulium) weji* sp. nov. (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Jpn. J. Trop. Med. Hygiene*, **29**: 349–354. doi:10.2149/tmh.1973.29.349.
- Takaoka, H., and Choochote, W. 2004. A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Trop. Med. Health*, **32**(2): 189–197. doi:10.2149/tmh.32.189.
- Tangkawanit, U., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., and Adler, P.H. 2009a. Cytosystematics of the *Simulium tuberosum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zool. J. Linn. Soc.* **155**: 289–315. doi:10.1111/j.1096-3642.2008.00433.x.
- Tangkawanit, U., Kuvangkadilok, C., Baimai, V., and Adler, P.H. 2009b. Morphotaxonomy of the *Simulium (Simulium) tuberosum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Zootaxa*, **2048**: 31–46.
- Thanwisai, A., Kuvangkadilok, C., and Baimai, V. 2006. Molecular phylogeny of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. *Genetica*, **128**(1–3): 177–204. doi:10.1007/s10709-005-5702-z. PMID:17028950.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**(24): 4876–4882. doi:10.1093/nar/25.24.4876. PMID:9396791.
- Wiens, J.J. 2005. Can incomplete taxa rescue phylogenetic analyses from long-branch attraction? *Syst. Biol.* **54**(5): 731–742. doi:10.1080/10635150500234583. PMID:16243761.
- Wiens, J.J., and Tiu, J. 2012. Highly incomplete taxa can rescue phylogenetic analyses from the negative impacts of limited taxon sampling. *PLoS ONE*, **7**(8): e42925. doi:10.1371/journal.pone.0042925. PMID:22900065.

ภาคผนวก ข บทความสำหรับการเผยแพร่

แมลงรืนดำกับการเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพแหล่งน้ำไหล

แมลงรืนดำเป็นแมลงในอันดับดิบเทอร่า (Diptera) วงศ์ Simuliidae ทั่วโลกมีรายงานการพบ 2,177 สปีชีส์ ในประเทศไทยมีรายงานการพบ 92 สปีชีส์ แมลงรืนดำมีวงจรชีวิตประกอบด้วย 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult) (ภาพที่ 1) โดยระยะก่อนตัวเต็มวัย คือ ระยะไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ อาศัยในแหล่งน้ำไหล ขณะที่ตัวเต็มวัยอาศัยบนบก ดังนั้นแมลงรืนดำจึงจัดเป็นแมลงน้ำ แมลงรืนดำตัวเต็มวัยเพศเมียหลายชนิดดูดเลือดจากสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงมนุษย์ และยังเป็นพาหะที่นำโรคมารู่มนุษย์และสัตว์เลี้ยง โรคที่สำคัญที่สุดคือโรค Onchocerciasis หรือ River blindness ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากพยาธิหนอนตัวกลมชนิด *Onchocerca volvulus* พบระบาดที่แอฟริกา อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ ส่งผลกระทบทั้งทางการแพทย์และเศรษฐกิจอย่างกว้างขวางในพื้นที่ดังกล่าว ในประเทศไทยไม่มีรายงานการเกิดโรคดังกล่าวแต่มีรายงานการพบพยาธิหนอนตัวกลมสกุล *Onchocerca* ในแมลงรืนดำบางชนิดในเขตภาคเหนือ นอกจากนี้ยังมีรายงานการกัดของแมลงรืนดำในประเทศไทยอย่างน้อย 5 สปีชีส์ ซึ่งผู้ที่ถูกกัดจะมีอาการแตกต่างกันหากไม่ถูกกัดมากอาจเป็นตุ่มแดง (ภาพที่ 2) และมีอาการคันประมาณ 2-3 วันหรืออาจนานกว่านั้นแล้วจะหายเป็นปกติ แต่หากในรายที่แพ้อาจมีอาการบวมและมีไข้ซึ่งควรไปพบแพทย์เพื่อรักษาต่อไป



ภาพที่ 1 วงชีวิตของแมลงรืนดำ



ภาพที่ 2 การกัดของแมลงรืนดำ (ภาพบน) แผลที่เกิดจากการกัดมีอาการบวมแดง (ภาพล่าง)

นอกจากการเป็นพาหะของโรคและแมลงศัตรูของมนุษย์และสัตว์เลี้ยง ระยะตัวอ่อนของแมลงรืนดำยังเป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบนิเวศแหล่งน้ำไหลเนื่องจากตัวอ่อนแมลงรืนดำจะพบเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ ในแหล่งน้ำ ดังนั้นแมลงรืนดำจึงมีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนแร่ธาตุ และสารอาหารในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหล การศึกษานิเวศวิทยาของแมลงรืนดำในประเทศไทยพบว่าความหลากหลายทางชีวภาพและการกระจายทางภูมิศาสตร์ของแมลงรืนดำมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงสภาพทางกายภาพของแหล่งน้ำไหล เช่น อัตราการไหล ความเร็วของกระแสน้ำ มีผลต่อความหลากหลายชนิดและโครงสร้างสังคมของแมลงรืนดำ นอกจากนี้ยังพบว่าแมลงรืนดำบางสปีชีส์สามารถปรับตัวได้ดีในแหล่งอาศัยที่ถูกรบกวนโดยกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การทำการเกษตร ขณะที่แมลงรืนดำบางสปีชีส์มีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว จากความแตกต่างของการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมของระบบนิเวศแหล่งน้ำไหล รวมถึงการมีข้อมูลอนุกรมวิธานที่ดี ทำให้แมลงรืนดำมีศักยภาพสูงมากสำหรับการใช้เป็นตัวชี้บ่งชี้คุณภาพของแหล่งน้ำไหล โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของแหล่งน้ำ หรือการบุกรุกเบิกพื้นที่ป่าเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตร (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นภาวะคุกคามที่เปลี่ยนแปลงสภาพนิเวศวิทยาของระบบนิเวศแหล่งน้ำไหลที่สำคัญ ดังนั้นจึงอาจใช้แมลงรืนดำเป็นตัวชี้บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแหล่งน้ำไหลได้ในอนาคต



ภาพที่ 3 ตัวอ่อน (larva) ของแมลงรึ้นดำจำนวนมากเกาะบนพื้นลานหินของลำธาร



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ป่าต้นน้ำเพื่อทำการเกษตรส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศแหล่งน้ำไหล