COMPARISON OF ITS2 rDNA IN BLACK FLIES (DIPTERA: SIMULIIDAE) FROM THAILAND

AUNCHALEE THANWISAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL BIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-5033-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ศึกษาเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแมลงริ้นดำในประเทศไทย (COMPARISON OF ITS2 rDNA IN BLACK FLIES (DIPTERA: SIMULIIDAE) FROM THAILAND)

อัญชลี ฐานวิสัย 4336677 SCEB/ M
วท.ม. (ชีววิทยาสภาวะแวดล้อม)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เฉลียว กุวังคะดิลก Ph.D**. (พันธุศาสตร์), วิสุทธิ์ ใบไม้** Ph.D**. (พันธุศาสตร์)**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโซมัลดีเอ็นเอของแมลงริ้นดำในประเทศไทยจำนวน 40 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ใน 4 สกุลย่อย ของสกุล *Simulium* ได้แก่สกุลย่อย *Gomphostilbia* จำนวน 12 ชนิด สกุลย่อย *Nevermannia* จำนวน 5 ชนิด สกุลย่อย *Simulium* จำนวน **21** ชนิด และที่ยังไม่ทราบสกุลย่อยอีก 1 ชนิด คือ *Simulium baimaii* ผลการศึกษาพบว่าแมลงริ้นดำที่ศึกษาทั้งหมดมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่าง 247 ถึง 308 คู่เบส และมีเบสอะดีนีนและไทมีนค่อนข้างสูง โดยมีค่าระหว่าง 71 ถึง 83.3% ซึ่งสูงกว่าที่พบในยุงชนิดต่างๆ นอกจากนี้พบว่าริ้นดำจำนวน 13 ชนิดมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างโคลนภายในตัวเดียวกัน โดยมีค่าความแปรผันระหว่าง 0.3-1.1% จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ภายในริ้นดำชนิดเดียวกัน พบว่ามีความหลากหลายของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่าง *Simulium feuerborni* แต่ละตัวที่เก็บมาจากแหล่งเดียวกัน (โครงการหลวง อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่) และต่างแหล่งกันที่อยู่ในบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่และอุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย ซึ่งความแตกต่างภายในประชากรและระหว่างประชากรของ *S. feuerborni* มีค่าระหว่าง 0-2.2% และ 0.7-2.6% ตามลำดับ ความแปรผันทางพันธุกรรมของริ้นดำจำนวน 40 ชนิด มีค่าระหว่าง 10-39% และมีค่าถึง 95.2% เมื่อเปรียบเทียบกับแมลงชนิดอื่นที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบนอกกลุ่ม ได้แก่ แมลงชนิด *Phlebotomus perniciosus*, *Chironomus annularius* และ *Drosophila melanogaster* ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างริ้นดำเหล่านี้ ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์โดยวิธี maximum parsimony และ neighbor-joining ของโปรแกรม PAUP (version 4.0b10) พบว่าการวิเคราะห์ทั้งสองแบบสามารถแบ่งริ้นดำออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยริ้นดำในสกุลย่อย *Gomphostilbia* และ *Nevermannia* + *Montisimulium* ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยริ้นดำในสกุลย่อย *Simulium* และริ้นดำชนิด *S. baimaii* ซึ่งยังไม่ทราบว่าจำแนกอยู่ในสกุลย่อยใด ในการศึกษานี้ยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของริ้นดำภายในสกุลย่อย *Gomphostilbia* ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแมลงริ้นดำมีความสอดคล้องกับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

157 หน้า ISBN 974-04-5033-4

COMPARISON OF ITS2 rDNA IN BLACK FLIES (DIPTERA: SIMULIIDAE) FROM THAILAND

AUNCHALEE THANWISAI 4336677 SCEB/M

M.Sc. (ENVIRONMENTAL BIOLOGY)

THESIS ADVISORS: CHALIOW KUVANGKADILOK , Ph.D (GENETICS), VISUT BAIMAI, Ph.D. (GENETICS)

ABSTRACT

The sequence of secondary internal transcribed spacer II (ITS2) of ribosomal DNA (rDNA) were determined from forty black fly species in Thailand belonging to 4 subgenera of the genus *Simulium*: *Gomphostilbia* (12 species), *Nevermannia* (5 species), *Simulium* (21 species) and one unknown subgenus (*Simulium baimaii*). The length of the ITS2 ranged from 247 to 308 bp. All black fly species had high AT content which ranged from 71 to 83.3%, these values were higher than those found in other mosquito species. Clonal variation within individuals occurred in thirteen species and ranged from 0.3 to 1.1%. Intraspecific sequence comparisons revealed variation among *S. feuerborni* individuals collected from the same location (Royal Project at Doi Inthanon National Park, Chiang Mai) and different locations at Doi Inthanon National Park, Chiang Mai and Phu Kradung National Park, Loei. Intrapopulation and interpopulation variations in *S. feuerborni* ranged from 0 to 2.2% and 0 to 3.4%, respectively. The sequence divergence among forty black fly species ranged from 1.0 to 39% and up to 95.2% between black fly species and their outgroup species, *Phlebotomus perniciosus*, *Chironomus annularius* and *Drosophila melanogaster*. The phylogenetic relationships among the members of the black fly species in Thailand were inferred by maximum parsimony and neighbor-joining analyses of the PAUP program (version 4.0b10). Both trees obtained were almost identical in a topology that revealed two major monophyletic groups. The first monophyletic group consisted of *Gomphostilbia* and *Nevermannia* + *Montisimulium*. The second monophyletic group consisted of the subgenus *Simulium* and one species of an unknown subgenus (*Simulium baimaii*). Phylogenetic relationship the representatives in the members of subgenus *Gomphostilbia* were unresolved. However, molecular phylogeny in the present study generally agrees with existing morphology-based phylogenies.

KEY WORDS: *Simulium*/rDNA/ITS2/Phylogeny

157 pp. ISBN 974-04-5033-4