

**CYTOGENETICS OF THE *SIMULIUM TUBEROSUM* GROUP
(DIPTERA: SIMULIIDAE) IN THAILAND**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของแมลงรืนดำกลุ่ม *tuberosum* (DIPTERA: SIMULIIDAE) ในประเทศไทย (CYTOGENETICS OF THE *SIMULIUM TUBEROSUM* GROUP (DIPTERA: SIMULIIDAE) IN THAILAND)

อุบล ตั้งควานิช 4436030 SCBI/D

ปร.ค. (ชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เฉลียว กูวังคะดิลก Ph.D. (พันธุศาสตร์), วิสุทธิ์ ไบไม้ Ph.D. (พันธุศาสตร์), Peter H. Adler, Ph.D. (กีฏวิทยา)

บทคัดย่อ

การศึกษาโพลีทีนโครโมโซม ของตัวอ่อนแมลงรืนดำกลุ่ม *tuberosum* จำนวน 3,347 ตัว ที่เก็บจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติ จำนวน 59 แห่ง ในบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ของประเทศไทย จากการศึกษาเปรียบเทียบแบบดีโพลีทีนโครโมโซมกับแผนที่โครโมโซมมาตรฐานของแมลงรืนดำในสกุลย่อย *Simulium* ทำให้จำแนกแมลงกลุ่มนี้ออกเป็น 17 ชนิดโดยการศึกษาความแตกต่างของอินเวอร์ชันคงที่ ความแตกต่างของอินเวอร์ชันที่เกี่ยวข้องกับเพศ และความแตกต่างของชนิดและความถี่ของอินเวอร์ชันไม่คงที่ แมลงรืนดำ 6 ชนิดสอดคล้องกับชนิดที่ได้ศึกษาและตั้งชื่อแล้ว ได้แก่ รืนดำชนิด *S. doipuiense*, *S. rufibasis*, *S. setsukoeae*, *S. tani*, *S. weji* และ *S. yuphae* อีก 2 ชนิด เป็นชนิดที่ไม่ทราบชื่อ (unknown sp.1 และ unknown sp.2) นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรของแมลงรืนดำชนิด *S. doipuiense* แยกออกเป็น 2 cytoforms (*S. doipuiense* A และ *S. doipuiense* B) ซึ่งมีอินเวอร์ชันที่เกี่ยวข้องกับเพศต่างกัน และพบ 9 cytoforms (*S. tani* A-I) ในประชากรแมลงรืนดำชนิด *S. tani* โดยแมลงรืนดำ cytoforms A และ E มีความแตกต่างของอินเวอร์ชันคงที่ แมลงรืนดำ cytoforms C, D, E, F และ G มีอินเวอร์ชันที่เกี่ยวข้องกับเพศต่างกัน (โดยมีโครโมโซม X และ Y ต่างกัน) ได้แก่ X_2Y_1 , X_0Y_1 , X_2Y_0 , X_1Y_2 และ X_3Y_0 ตามลำดับ ส่วน cytoforms I แยกออกจากชนิดอื่นโดยมีอินเวอร์ชันไม่คงที่ ปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปสถานะภาพด้านอนุกรมวิธานของ cytoforms ของแมลงรืนดำชนิด *S. tani* ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าประชากรของแมลงรืนดำชนิด *S. tani* ประกอบด้วย cytoforms ที่ต่างกันอย่างน้อย 9 cytoforms ซึ่งมี cytoform H ต่างจาก cytoforms อื่นมากที่สุดโดยมีอินเวอร์ชันที่เกี่ยวข้องกับเพศ และลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นเหงือกและปลอกหุ้มส่วนหัวของคักแตกต่างจากชนิดอื่น นอกจากนี้การกระจายของตัวอ่อนแมลงรืนดำกลุ่ม *tuberosum* อาจขึ้นกับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งที่อยู่อาศัย

การศึกษาเปรียบเทียบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของไรโบโซมดีเอ็นเอ พบว่าแมลงรืนดำกลุ่ม *tuberosum* มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 259 bp ถึง 272 bp โดยมีค่าเบสอะดีนีนและไทมีนค่อนข้างสูง ระหว่าง 77.8 ถึง 81.8% จากการศึกษาพบความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างโคลนภายในตัวเดียวกันในแมลงรืนดำจำนวน 14 ชนิดโดยมีค่าความแปรผันระหว่าง 0.4 ถึง 16.0 % และพบความแปรผันของ ITS2 ภายในประชากรของแมลงรืนดำชนิดเดียวกันจำนวน 7 ชนิด และความแปรผันระหว่างประชากรของแมลงรืนดำจำนวน 2 ชนิด โดยมีค่าความแปรผันตั้งแต่ 1.2 ถึง 16% และ 0.8 ถึง 13.5% ตามลำดับ ส่วนความแปรผันของ ITS2 ระหว่างแมลงรืนดำแต่ละชนิดในกลุ่ม *tuberosum* มีค่าตั้งแต่ 0.4 ถึง 14.7% การศึกษานี้ได้แบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 จาก 72 โคลนออกเป็น 9 กลุ่ม ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างแมลงกลุ่ม *tuberosum* โดยใช้ข้อมูลด้านเซลล์พันธุศาสตร์ได้พิจารณาจากการมีอินเวอร์ชันร่วมกัน สำหรับการศึกษาสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและไรโบโซมดีเอ็นเอ ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม PAUP (version 4.0b10) และโปรแกรม MrBAYES (version 3.1.2). จากการศึกษาเปรียบเทียบพบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัยข้อมูลทางเซลล์พันธุศาสตร์ มีความเหมาะสมและแม่นยำมากที่สุด แม้ว่าผลการศึกษาสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและไรโบโซมดีเอ็นเอจะสอดคล้องกับการศึกษาที่ใช้ข้อมูลทางเซลล์พันธุศาสตร์โดยแยกแมลงรืนดำออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย แมลงรืนดำชนิด *S. tani* จำนวน 9 cytoforms และกลุ่มที่สองประกอบด้วย แมลงรืนดำชนิด *S. doipuiense*, *S. rufibasis*, *S. setsukoeae*, *S. weji*, *S. yuphae*, unknown sp. 1 และ unknown sp. 2 แต่ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและไรโบโซมดีเอ็นเอ ไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างแมลงรืนดำแต่ละชนิดภายในกลุ่มได้ชัดเจน

285 หน้า

CYTOGENETICS OF THE *SIMULIUM TUBEROSUM* GROUP (DIPTERA: SIMULIIDAE) IN THAILAND.

UBON TANGKAWANIT 4436030 SCBI/D

Ph.D. (BIOLOGY)

THESIS ADVISORS: CHALIW KUVANGKADILOK, Ph.D. (GENETICS), VISUT BAIMAI, Ph.D. (GENETICS), PETER H. ADLER, Ph.D. (ENTOMOLOGY)

ABSTRACT

The polytene chromosomes of 3,347 larvae of the *Simulium tuberosum* group collected from 59 locations in northern, northeastern, central and southern Thailand were analyzed. Band by band comparisons, relative to the established standard chromosome map for the subgenus *Simulium*, revealed 17 cytogenetically distinct taxa, based mainly on fixed, sex-linked and floating inversions in the long arm of chromosome III. Six of these taxa correspond to morphologically described species, i.e., *S. doipuiense*, *S. rufibasis*, *S. setsukoae*, *S. tani*, *S. yuphae* and *S. weji*; 2 unknown species (unknown sp.1 and unknown sp.2) were discovered. Two cytoforms (cytoform A and B) were found in *S. doipuiense* based on different sex-linked inversions, whereas 9 cytoforms (cytoforms A-I) were present in *S. tani*. *S. tani* cytoforms A and E differed from the standard cytoform (cytoform B) by fixed inversions. Cytoforms C, D, F, G and H were distinguished by sex-linked inversions, X_2Y_1 , X_0Y_1 , X_2Y_0 , X_1Y_2 and X_3Y_0 , respectively. Cytoform I was characterized by floating inversions. At present, the taxonomic status of the different cytoforms of *S. tani* has not been determined. However, this study indicates that *S. tani* is represented by at least 9 cytoforms, of which cytoform H is the most distinct by having a unique sex-linked inversion and a distinct gill-filament pattern as well as a different density of microtubercles on the cephalic plate. Ecologically, the distributions of larvae of each taxon may be influenced by some macro- and microhabitat factors.

The sequences of the secondary internal transcribed spacer II (ITS2) of ribosomal DNA (rDNA) among members of the *S. tuberosum* species group ranged from 259 to 272 bp in length, with high AT content ranging from 77.8 to 81.8%. Clonal variation within individuals occurred in 14 taxa, ranging from 0.4 to 16.0%. Intrapopulation variation was found in 7 taxa, ranging from 1.2 to 16.0%, whereas interpopulation variation was detected in 2 taxa, with the range of 0.8 to 13.5%. The sequence divergence among members of the *S. tuberosum* species group ranged from 0.4 to 14.7%. Additionally, nine types of ITS2 from 72 clones were revealed. The cytological phylogeny among the *S. tuberosum* species based on sharing of inversions was well resolved, whereas the morphological and molecular phylogenies, inferred by using PAUP (version 4.0b10) and MrBAYES (version 3.1.2), were not well resolved. Although the morphological and molecular trees are consistent with the cytological tree in supporting two monophyletic groups (one with 9 cytoforms of *S. tani* and the other with the remaining species), the phylogenetic relationships among the *S. tani* cytoforms and the other taxa, based on morphological and molecular data are unresolved.

KEY WORDS: SIMULIUM/ POLYTENE CHROMOSOMES /rDNA /ITS2 /PHYLOGENY
285 pp.