232179

ภาษาไทย:

ได้จับยุง *Anopheles aconitus* จากจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และ เพชรบุรี มาเลี้ยงแบบ iso-female lines (isolines) เพื่อวินิจฉัยรูปแบบคาริโอไทป์ จากการวินิจฉัยยุงทั้งหมด 96 isolines พบคาริโอไทป์รูปแบบ C จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน 5 isolines รูปแบบ B จากจังหวัดเพชรบุรี 4 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ 48 isolines และรูปแบบ C จากจังหวัดเชียงใหม่ 41 isolines

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบขนาดของไข่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ และผิวของไข่ยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จังหวัดแม่ฮ่องสอน เพชรบุรี และเชียงใหม่ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกวาด พบว่ามี intraspecific variations ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบและ/หรือ strains ของยุง คือ float width [36.77 $\pm$ 2.30 μm (Form C: Chiang Mai strain) = 38.49 $\pm$ 2.78 μm (Form B: Chiang Mai strain) = 39.06 $\pm$ 2.37 μm (Form B: Phet Buri strain) > 32.40 $\pm$ 3.52 μm (Form C: Mae Hong Son strain) ($F = 11.73$, $P < 0.05$)] และ number of posterior tubercles on deck [2.40 $\pm$ 0.52 (Form B: Phet Buri strain) = 2.70 $\pm$ 0.82 (Form B: Chiang Mai strain) < 3.10 $\pm$ 0.32 (Form C: Chiang Mai strain) = 3.20 $\pm$ 0.42 (Form C: Mae Hong Son strain) ($H = 11.43$, $P < 0.05$)] สำหรับผิวของไข่ซึ่งได้แก่ contour of entire egg, float ribs, large-lobed tubercles on deck, small tubercles on deck and in the area covered by floats, inner and outer surface of frill, micropylar orifice, and outer chorionic tubercles on entire eggs พบว่าไม่มีความแตกต่างที่จะใช้แยก form-specific หรือ strain-specific characteristics ได้

ผลการศึกษาเปรียบเทียบ band to band ของแขน chromosomes (X, 2R, 2L, 3R, 3L) เดียวกันของ ovarian nurse cell polytene chromosomes ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B จากจังหวัดเพชรบุรี 4 isolines และรูปแบบ C จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน 3 isolines และจากจังหวัดเชียงใหม่ 20 isolines กับ standard map ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B จากจังหวัดเชียงใหม่ ไม่พบความแตกต่างของ chromosomal rearrangements ที่มีความสัมพันธ์กับ karyotype variations การศึกษาเพื่อหาความแตกต่างทางไอโซเอ็นไซม์ของยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวอ่อนระยะที่ 4 ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จากทั้งสามจังหวัด ด้วยไอโซเอ็นไซม์ทั้งหมด 19 ชนิด พบไอโซเอ็นไซม์ที่สามารถอ่านและวิเคราะห์ผลได้ 16 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบผลของ allelic frequencies ของไอโซเอ็นไซม์ 10 ชนิด 16 loci ของตัวอ่อนระยะที่ 4 และไอโซเอ็นไซม์ 11 ชนิด 13 loci ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ไม่พบไอโซเอ็นไซม์ที่มี fixed different loci ที่สามารถใช้เป็น enzyme marker ในการแยกยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C ได้ ได้ทดลองผสมข้ามพันธุ์ระหว่างยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จากทั้งสามจังหวัด พบว่ามีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ดี และให้ F_1-hybrids ที่มี synaptic salivary gland polytene chromosomes จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ของ DNA ที่ตำแหน่งต่างๆ ของ rDNA (ITS1, ITS2), mt DNA (COI, COII) และ D3 regions ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาในยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C สายพันธุ์จากทั้งสามจังหวัด พบว่ามีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ต่ำมาก คือ 0.15-0.8% ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาวิจัยแบบสหวิทยาการในส่วนนี้ ทำให้ได้ข้อสรุปว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C เป็น conspecific cytological races

ได้นำ mixed colony ของยุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี และแม่ฮ่องสอน มาศึกษาการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* โดยเปรียบเทียบกับยุงพาหะหลัก *An. dirus* B และ *An. minimus* A และ C จากการวิเคราะห์ผลของ oocyst และ sporozoite rates ในวันที่ 8 และ 12 หลังจากยุงกินเลือดที่มีระยะ gametocyte ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* พบว่ายุง *An. aconitus* มีความสามารถในการยอมรับเชื้อไม่แตกต่างจากยุงพาหะหลัก *An. minimus* A และ C ผลเพิ่มเติมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่ายุง *An. aconitus* รูปแบบ B และ C มี sporozoite-like crystals ใน median lobe ของ salivary glands ที่อาจเป็นสาเหตุให้วินิจฉัยผิดพลาดเป็น true sporozoites ได้ และเป็นข้อควรระวังในการวินิจฉัย sporozoites ใน salivary glands ทั้งของยุงที่ทดสอบการติดเชื้อในห้องทดลองและยุงที่ติดเชื้อในภาคสนาม

ได้ศึกษาความชุกชุมและนิสัยในการเข้ากัดกินเลือดของยุง *An. aconitus* ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2548 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549 พบว่ามียุง *An. aconitus* ชุกชุมระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายน และมีความชุกชุมสูงสุด (peak) ในเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงเดือนที่มีการเปลี่ยนจากฤดูฝนเป็นฤดูหนาว และความชุกชุมของยุงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณน้ำฝน จากการวิเคราะห์ข้อมูลของการเข้ากัดคนและกระบือในแต่ละชั่วโมง พบว่ายุง *An. aconitus* มีนิสัยในการเข้ากัดคนและกระบือเฉพาะตอนหัวค่ำเท่านั้น และชอบกัดกระบือมากกว่าคน โดยมีช่วงเวลาในการเข้ากัดตั้งแต่หกโมงเย็นถึงสองทุ่ม และไม่พบ หรือพบน้อยมากที่ยุง *An. aconitus* จะเข้ากัดคนและกระบือในช่วงเวลาอื่น ๆ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า รูปแบบของการเข้ากัดคนและสัตว์เป็นแบบ unimodal pattern เท่านั้น จากการผ่ารังไข่ของยุงทั้งหมด 1,139 ตัว เพื่อศึกษา parity พบว่ายุง *An. aconitus* มี parous rate เท่ากับ 51.19% มีพิสัยของ parous rate ระหว่าง 35.85% ถึง 75% สำหรับ parous rate ของยุงในเดือนที่มีประชากรชุกชุม คือ เดือนสิงหาคม กันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน พบว่ามี parous rates เท่ากับ 56.69%, 42.86%, 56.10% และ 61.57% ตามลำดับ จากการผ่ายุงทั้งหมด 1,198 ตัว เพื่อตรวจหา oocyst จากกระเพาะอาหาร และ sporozoite จากต่อมน้ำลาย พบว่ามียุงที่กัดกระบือเพียง 2 ตัว (0.17%; 2/1,198) เท่านั้น ที่พบ oocysts บริเวณผนังด้านนอกของกระเพาะอาหาร สำหรับต่อมน้ำลายที่ผ่าได้จากยุงทั้งหมด 1,198 ตัว ไม่พบ sporozoite ในต่อมน้ำลายเลย

232179

ภาษาอังกฤษ:

Iso-female lines (isolines) of *Anopheles aconitus* collected from Mae Hong Son, Phet Buri and Chiang Mai Province were successfully identified to karyotypic forms. The results of identification revealed that *An. aconitus* Form B (X_1, X_2, Y_2) was obtained from 4 and 48 isolines in Phet Buri and Chiang Mai Province, respectively, and Form C (X_1, X_2, Y_3) was recovered from 3 and 41 isolines in Mae Hong Son and Chiang Mai Province, respectively.

Comparative morphometric and morphological studies of eggs under scanning electron microscope (SEM) were undertaken in the three strains of two karyotypic forms of *Anopheles aconitus*, i.e., Form B (Chiang Mai and Phet Buri strains) and Form C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains). Morphometric examination revealed the intraspecific variation with respect to the float width [36.77 ± 2.30 μm (Form C: Chiang Mai strain) = 38.49 ± 2.78 μm (Form B: Chiang Mai strain) = 39.06 ± 2.37 μm (Form B: Phet Buri strain) > 32.40 ± 3.52 μm (Form C: Mae Hong Son strain)] and number of posterior tubercles on deck [2.40 ± 0.52 (Form B: Phet Buri strain) = 2.70 ± 0.82 (Form B: Chiang Mai strain) < 3.10 ± 0.32 (Form C: Chiang Mai strain) = 3.20 ± 0.42 (Form C: Mae Hong Son strain)], whereas the surface topography of eggs among the three strains of two karyotypic forms were morphologically similar.

Comparing band to band on the same arm of ovarian nurse cell polytene chromosomes of *An. aconitus* Form B (Phet Buri: 4 isolines) and C (Mae Hong Son: 3 isolines, Chiang Mai: 20 isolines) to the standard chromosome mapping of *An. aconitus* Form B (Chiang Mai: 20 isolines), no major chromosomal rearrangements that related to the karyotype variations were demonstrated. The investigations on allelic frequencies of 4th stage larvae and adult females of 3 (Form C: Mae Hong Son), 4 (Form B: Phet Buri), 41 (Form C: Chiang Mai) and 48 (Form B: Chiang Mai) isolines suggested that *An. aconitus* Form B and C of all strains have similar allelic frequencies. This was observed at 10 isoenzymes 16 loci in 4th stage larvae, and 11 isoenzymes 13 loci in adult females. Hybridization tests among the four laboratory-raised isolines of *An. aconitus* Form B (Chiang Mai and Phet Buri) and C (Chiang Mai and Mae Hong Son) employed by induced copulation. The results of crosses indicated that they were genetically compatible, providing viable progeny and completely synaptic salivary gland polytene

232179

chromosomes. The complete sequences of rDNA internal-transcribed spacer 1 and 2 (ITS1, ITS2), and partial sequences of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I and II (COI and COII), and D3 regions from genomic DNA of *An. aconitus* Form B and C were identified. The results show that the consensus sequences of the five loci of the two forms are consistent with those of mosquitoes in the genus *Anopheles*. No intraindividual variation was detected, but intrapopulation variation was present with polymorphic sequences in some forms for each gene examined. The variation rates were approximately 0.15 to 0.8%. Based on evidence of no pre- and post-mating isolations, and nearly identical of DNA sequences of ITS1, ITS2, COI and COII, and D3 regions between *An. aconitus* Form B and C, we conclude that they are conspecific cytological races in the Thai population.

Four laboratory-raised colonies of two karyotypic forms of *Anopheles aconitus*, i.e., Form B (Chiang Mai and Phet Buri strains) and C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains), were experimentally infected with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* using an artificial membrane feeding technique and dissected 8 and 12 days after feeding for oocyst and sporozoite rates, respectively. The results revealed that *An. aconitus* Form B and C were susceptible to *P. falciparum* and *P. vivax*, i.e., Form B (Chiang Mai and Phet Buri strains/*P. falciparum* and *P. vivax*) and Form C (Chiang Mai and Mae Hong Son strains/*P. vivax*). Comparative statistical analyses of the oocyst rates, average number of oocysts per infected midgut and sporozoite rates among all strains of *An. aconitus* Form B and C to the ingroup control vectors, *An. minimus* A and C, exhibited mostly no significant differences, confirming the high potential vector of the two *Plasmodium* species. The sporozoite-like crystals found in the median lobe of the salivary glands, which could be a misleading factor in the identification of true sporozoites in salivary glands were found in both *An. aconitus* Form B and C.

The seasonal abundance and nocturnal biting activity of *Anopheles aconitus*, the secondary vector of malaria in Thailand, were investigated during January 2005 to February 2006. Seasonal changes in abundance were mainly influenced by monthly rainfall, with a major peak occurring from August to November. This species preferred to bite on animals rather than humans, and favored biting humans outdoors more than indoors. The biting activity on both humans and animals exhibited high

and/or evening, but there were very low and erratic bitings throughout the remaining night-hours. Thus, a unique unimodal pattern, with a peak occuring during 1800-2000 hours was clearly seen in *An. aconitus*. Overall, the parous rate was 51.19% (35.85-75.00%). During the major peak of abundance (August to November), a high parous rate that ranged from 42.86-61.57 was observed. Out of 1,198 dissected stomaches, only 0.17% (2/1,198) were found infected with oocysts. There were no sporozoites detected in any of the 1,198 mosquito-dissected salivary glands.