ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46274

GENETIC STUDY OF *Anopheles campestris*-LIKE

SORAWAT THONGSAHUAN

DOCTOR OF PHILOSOPHY

IN PARASITOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL

CHIANG MAI UNIVERSITY

SEPTEMBER 2011

b00256109

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46274

GENETIC STUDY OF *Anopheles campestris*-LIKE

SORAWAT THONGSAHUAN

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
SEPTEMBER 2011

GENETIC STUDY OF *Anopheles campestris*-LIKE

SORAWAT THONGSAHUAN

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY

EXAMINING COMMITTEE

..... CHAIRPERSON
Prof. Dr. Wej Choochote

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Nimit Morakote

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Kabkaew Sukontason

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol

..... MEMBER
Asst. Prof. Dr. Narissara Jariyapan

..... MEMBER
Dr. Atiporn Saeung

..... MEMBER
Dr. Wannapa Suwonkerd

THESIS ADVISORY COMMITTEE

..... ADVISOR
Prof. Dr. Wej Choochote

..... CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong

..... CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Nimit Morakote

..... CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol

..... CO-ADVISOR
Asst. Prof. Dr. Narissara Jariyapan

..... CO-ADVISOR
Asst. Prof. Dr. Anchalee Wannasan

..... CO-ADVISOR
Dr. Anuluck Junkum

..... CO-ADVISOR
Dr. Atiporn Saeung

6 September 2011

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deep sincere appreciation and gratitude to my major advisor, Professor Dr. Wej Choochote, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for his kindness, expert guidance, valuable suggestion, constructive criticism and constant encouragement which enable me to complete my doctoral study and research. I will always be indebted to him for his kind help and support.

I also wish to express my deep sincere appreciation and gratitude to my thesis co-advisors; Associate Professor Dr. Udom Chaithong, Associate Professor Dr. Nimit Morakote, Associate Professor Dr. Pongsri Tippawangkosol, Assistant Professor Dr. Dr. Narissara Jariyapan, Assistant Professor Dr. Anchalee Wannasan, Dr. Anuluck Junkum and Dr. Atiporn Saeung, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for their kindness, valuable guidance, meaningful criticism and help during my study.

I sincerely thank my overseas co-advisors, Professor Dr. Hiroyuki Takaoka and Dr. Yasushi Otsuka of the Department of Infectious Disease Control, Oita University, Japan, for their kindness, valuable guidance, meaningful criticism, emotional support and warm hospitality while I carried out my doctoral research in their lab.

I would like to express my sincere gratitude and thank to Associate Professor Dr. Kabkaew Sukontason, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University and Dr. Wannapa Suwonkerd, Office of Vector Borne Disease

Control, Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health, Chiang Mai, Thailand, external examination committee for their meaningful suggestion and valuable guidance on this thesis.

Sincere appreciation the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D Program (Grant No. PHD/0082/2549), the Biodiversity Research and Training Program (Grant No. BRT R_250009), and the Faculty of Medicine Endowment Fund for Research Publication for its financially supporting throughout my graduated study.

I would like to thank staff members of the Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for their kind help and encouragement throughout my research.

Certainly, I would like to express gratitude to all my colleagues, Dr. Sittiporn Suwannamit and other friends at Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for their encouragement and give moral support throughout my study.

Finally, I wish to express all my deepest gratitude to my beloved parents and family for their encouragement and moral support throughout my study.

Sorawat Thongsahuan

Thesis Title	Genetic Study of *Anopheles campestris*-like	
Author	Mr. Sorawat Thongsahuan	
Degree	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Wej Choochote	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Co-Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Nimit Morakote	Co-Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-Advisor
	Asst. Prof. Dr. Narissara Jariyapan	Co-Advisor
	Asst. Prof. Dr. Anchalee Wannasan	Co-Advisor
	Dr. Anuluck Junkum	Co-Advisor
	Dr. Atiporn Saeung	Co-Advisor

ABSTRACT

E46274

Anopheles campestris-like, the predominant anopheline mosquito species was considered a potential vector that played an important role in the increasing cases of *Plasmodium vivax* infection in Thailand. Its markedly karyotypic variations and taxonomic relationship remain unclear, thus, the genetic proximity among karyotypic forms were determined by using multi-disciplinary researches. In addition, its laboratory vector-competence to malaria was elucidated.

Thirty-four isolines of *An. campestris*-like, derived from human-biting females, demonstrated 3 karyotypic forms, *i.e.*, Form B (X_2, Y_2), E (X_1, X_2, X_3,Y_5) and a new karyotypic form (X_2,Y_6), designated as Form F. Likewise, 37 isolines of *An. campestris*-like, derived from animal-biting females, revealed 3 karyotypic forms, *i.e.*, Form B (X_2, Y_2), E (X_2,Y_5) and F (X_2, X_3, Y_6). All 71 isolines in this study had an average branch summation of seta 2-VI pupal skins with 20.3-30.0 branches, which was in the range of *An. campestris* (17-58 branches).

An isoline colony of *An. campestris*-like Form E was established successfully for more than 40 consecutive generations under laboratory conditions. The eggs per deposited female ranged from 19-308 eggs. The duration of egg-hatching was 2-4 days, in which the percentage embryonation and hatchability were 81-99% and 78-

E46274

96%, respectively. The larval instars matured in 7-10 days. Pupation duration ranged from 2-3 days, and more than 80% of first instar larvae eventually pupated. More than 85% of pupae emerged successfully to adults. A satisfactory percentage of blood-fed females was obtained from both direct feeding on a white rat in a cage (62%) and artificial membrane-feeding on bovine heparinized-blood in a paper cup (78%), indicating two feeding methods that could be use routinely. The best age for artificial mating in males was 5-days-old with 86.67% insemination, while males aged 4 to 8 days old could be used satisfactorily (insemination rates: 80.00-85.71%). The forced laying of eggs by placing gravid adult females in a plastic-cup ovipot proved to be a satisfactory method for egg deposition. Furthermore, the present rearing procedure also proved to be a promising method for obtaining a high yield of brain metaphase and salivary gland polytene chromosomes.

Crossing studies among 12 isolines of *An. campestris*-like Form B, E and F indicated their genetic compatibility by providing viable progenies, suggesting a conspecific relationships between the 3 karyotypic forms. Additionally, the very low intraspecific sequence variation (genetic distance < 0.005) of the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 2 (ITS2) of rDNA, and mitochondrial cytochrome c oxidase subunits I and II (COI and COII) of 28 isolines of *An. campestris*-like Form B, E and F, clearly supported their conspecific relationships.

Comparative morphological investigations of eggs, larvae, pupae and adults under light microscope of the 71 isolines of *An. campestris*-like Form B, E and F indicated that no diagnostic characters could be used to separate *An. campestris*-like forms. In addition, the surface topography of eggs among *An. campestris*-like forms under scanning electron microscopy (SEM) were morphologically similar.

Comparative salivary gland polytene chromosome examinations, among 12 isolines of *An. campestris*-like Form B, E and F, revealed the homosequential banding pattern that existed in sympatric and/or allopatric populations.

Investigation of the vector potential of *An. campestris*-like Form B, E and F to *P. vivax* and *P. falciparum* revealed that only *An. campestris*-like Form B and E, Chiang Mai strain, were susceptible to *P. vivax* with 100% oocyst rates, and sporozoite rates of 66.67 and 64.29%, respectively.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาพันธุศาสตร์ของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *Anopheles campestris*	
ผู้เขียน	นายสรวัฒน์ ทองสงวน	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. เวช ชูโชติ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ดร. อุดม ชัยทอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. นิมิตร มรกต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวังโกศล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. นริศรา จริยะพันธุ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. อัญชลี วรรณสาร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. อนุลักษณ์ จันทร์คำ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. อติพร แซ่อึ้ง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E 46274

ยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *Anopheles campestris* เป็นยุงที่พบได้มากและได้รับการพิจารณาว่าเป็นยุงที่มีศักยภาพและบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ในประเทศไทย ความแปรผันของรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ที่เด่นชัดและความสัมพันธ์ด้านอนุกรมวิธานของยุงชนิดนี้ยังมีความไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงศึกษาความใกล้ชิดทางด้านพันธุกรรมระหว่างรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ของยุงชนิดนี้โดยใช้วิธีวิจัยแบบสหวิทยาการ รวมถึงการศึกษาความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ

จากการวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* ที่กัดคนจำนวน 34 ไอโซไลน์ และกัดสัตว์จำนวน 37 ไอโซไลน์ พบว่ามีรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ 3 รูปแบบ คือ รูปแบบ B (X_2, Y_2), E (X_1, X_2, X_3, Y_5) และ F (X_2, X_3, Y_6) ซึ่งรูปแบบ F นั้นเป็นรูปแบบใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่งของยุงทั้ง 71 ไอโซไลน์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่งเท่ากับ 20.3-30.0 แขนง ซึ่งอยู่ในช่วงของยุง *An. campestris*

ไอโซไลน์โคโลนีของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ E สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องทดลองมากกว่า 40 รุ่น โดยยุงตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่จำนวน 19-308 ฟอง

E46274

หลังจากนั้นประมาณ 2-4 วัน ตัวอ่อนจึงฟักตัวออกจากไข่ โดยไข่มีอัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนในไข่เท่ากับ 81-99% และอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนออกจากไข่เท่ากับ 78-96% ตัวอ่อนที่ฟักตัวออกจากไข่ใช้เวลา 7-10 วันในการเจริญเติบโตเป็นตัวโม่ง และใช้เวลา 2-3 วันจึงลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย โดยมีอัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยมากกว่า 85% ยุงตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถกินเลือดหนูขาวในกรงได้ดีพอๆ กับการกินเลือดวัวในถ้วยกระดาษผ่านเมมเบรน โดยมีอัตราการกินเลือดเท่ากับ 62% และ 78% ตามลำดับ ยุงตัวเต็มวัยเพศผู้อายุ 5 วันสามารถผสมพันธุ์เทียมกับยุงตัวเต็มวัยเพศเมียได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการฉีดน้ำอสุจิเข้าสู่ถุงเก็บอสุจิของยุงเพศเมียเท่ากับ 86.67% ในขณะที่ยุงตัวเต็มวัยเพศผู้อายุ 4-8 วันสามารถผสมพันธุ์เทียมกับยุงตัวเต็มวัยเพศเมียได้ดีพอสมควร โดยมีอัตราการฉีดน้ำอสุจิเข้าสู่ถุงเก็บอสุจิของยุงเพศเมียอยู่ในช่วงระหว่าง 80-85.71% การวางไข่ในถ้วยพลาสติกของยุงตัวเต็มวัยเพศเมียพบว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับยุงชนิดนี้ นอกจากนี้เทคนิคที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงในครั้งนี้พบว่าเป็นเทคนิคที่ใช้เพาะเลี้ยงยุงเพื่อให้การศึกษาเมตาเฟสโครโมโซมจากเซลล์สมองและโพลีทีนโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายของลูกน้ำยุงได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ

จากการทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ระหว่างยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E, และ F จำนวน 12 ไอโซไลน์ ผลที่ได้จากการศึกษาทดลองพบว่ายุงทั้ง 12 ไอโซไลน์มีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ โดยให้ลูกรุ่น F_1 และ/หรือ F_2 ที่แข็งแรง ซึ่งผลจากการศึกษาได้สนับสนุนความสัมพันธ์ของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F เป็นแบบ conspecific นอกจากนี้ระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำในยีนทั้ง 3 ตำแหน่ง (ITS2, COI และ COII < 0.005) ถือเป็นหลักฐานทางอณูชีววิทยาที่สนับสนุนความสัมพันธ์ของยุงทั้ง 3 รูปแบบได้เป็นอย่างดี

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่ ตัวอ่อน ตัวโม่ง และตัวเต็มวัยของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F จำนวน 71 ไอโซไลน์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาที่จะใช้แยกยุงทั้ง 3 รูปแบบได้ และจากผลการศึกษาลักษณะผิวของไข่ยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงกัน

จากการศึกษาเปรียบเทียบแถบสีบนแขนของโพลีทีนโครโมโซมที่ได้จากเซลล์ต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F ในยุงทั้ง 12 ไอโซไลน์ ไม่พบความแตกต่างของการเรียงตัวของแถบสีบนแขนของโครโมโซมในยุงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

จากการศึกษาความสามารถในการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* ของยุงก้นปล่องชนิดที่คล้ายกับ *An. campestris* รูปแบบ B, E และ F พบว่ามีเพียงยุงรูปแบบ B และ E สายพันธุ์จากจังหวัดเชียงใหม่เท่านั้นที่ยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* โดยให้อัตราโอโอซิตส์ 100% และอัตราสปอโรซอยต์ 66.67 และ 64.29% ตามลำดับ

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS	iii
ABSTRACT (IN ENGLISH)	v
ABSTRACT (IN THAI)	vii
TABLE OF CONTENTS	ix
LIST OF TABLES	xiii
LIST OF FIGURES	xv
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xx
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1. STATEMENT AND SIGNIFICANCE OF THE PROBLEM	1
2. LITERATURE REVIEWS	3
3. OBJECTIVE	8
4. USEFULNESS OF THE STUDY	8
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	10
1. MATERIALS	10
1.1 For metaphase chromosome preparation	10
1.2 For light and scanning electron microscopic studies	10
1.3 For polytene chromosome preparation	10
1.4 For molecular study	10

TABLE OF CONTENTS (continued)

	Page
2. METHODS	11
2.1 Field collection and establishment of isoline colonies	11
2.2 Mosquito rearing	14
2.2.1 Wild-caught *An. campestris*-like Form E	14
2.2.2 Insectarium condition	14
2.2.3 Egg laying	15
2.2.4 Rearing of larva, pupa and adult	15
2.2.5 Searching for a suitable blood-feeding condition	16
2.2.6 Ability of free mating in a 30 cm cubed cage	17
2.2.7 Male ability to mate artificially	18
2.2.8 Searching for a suitable oviposition-condition	18
2.2.9 Establishment of the laboratory-colony strain	21
2.2.10 Rearing condition for chromosome preparation	21
2.3 Metaphase karyotype preparation	21
2.4 Crossing study	22
2.5 DNA extraction, amplification and sequencing	22
2.6 DNA sequence and phylogenetic analysis	23
2.7 Morphological studies of eggs, larvae, pupae and adults under light and/or scanning electron microscopy	23

TABLE OF CONTENTS (continued)

	Page
2.8 Salivary gland polytene chromosomes preparation	24
2.9 Malaria susceptibility test	25
2.10 Statistical analysis	26
CHAPTER III RESULTS	27
1. Mosquito rearing	27
1.1 Observation on the life duration, hatchability, pupation and emergence	27
1.2 Feeding ability	29
1.3 Ability of free mating in a 30 cm cubed cage	29
1.4 Ability of male in artificial mating	31
1.5 Ability of eggs deposition	32
1.6 Rearing condition for chromosome preparation	32
2. Metaphase karyotype characters	33
3. Crossing study	36
4. DNA sequences and phylogenetic analysis	42
5. Morphological studies of eggs, larvae, pupae and adults under light microscope	50
6. Morphological studies of eggs under scanning electron microscopy	50

TABLE OF CONTENTS (continued)

	Page
7. Salivary gland polytene chromosome investigation	54
8. Malaria susceptibility test	58
CHAPTER IV DISCUSSION	65
CHAPTER V CONCLUSION	75
REFERENCES	77
APPENDIX	96
CURRICULUM VITAE	114

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Life duration of *An. campestris*-like Form E from an iso-female line laboratory-raised colony.	28
2	Direct feeding ability on white rat in a 30 x 30 x 30 cm cage and artificial feeding ability on bovine heparined blood from different ages of *An. campestris*-like Form E.	30
3	Artificial mating ability of *An. campestris*-like Form E males.	31
4	Crossing experiments among the 12 isolines of *An. campestris*-like Forms B, E and F.	37
5	Locations, isoline colonies and karyotypic forms of *An. campestris*-like and their GenBank accession numbers.	43
6	Average genetic distance within and between the *An.campestris*-like Form B, E and F for the ITS2, COI and COII regions.	49
7	Oocysts and sporozoites detected from *An. cracens* and *An. campestris*-like Form E and F 8 and 14 days post infection with *P. falciparum* (gametocyte density/200 wbc = 40).	61

LIST OF TABLES (continued)

Table		Page
8	Oocysts and sporozoites detected from *An. cracens* and *An. campestris*-like Form B, E and F 8 and 14 days post infection with *P. vivax* (gametocyte density/200 wbc = 32, 15 and 20 in experiment I, II and III, respectively).	62

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Map of Thailand showing distribution of *An. campestris*-like Form B, E and F.	12
2	Flow chart for rapid systematic procedure.	13
3	Mosquito equipment used in this study. (A) Ovipot derived from a screen-topped plastic cup with the top covered by a black plastic-sheet (left) for single gravid wild-caught adult females to lay eggs, (middle) for 20 gravid adult females to lay eggs, and (right) top view of the plastic cup showing massive egg-batches after 12-hours-oviposition of the 20 gravid adult females; (B) eggs placed in a white plastic tray and exposed to a 40 watt light. (C) White plastic rearing tray containing 2,000 ml of filtered natural water, 15 stems of garden grass and 80 larvae, with the top of the tray covered with a transparent plastic-sheet. (D) Left: adult rearing cage partially covered with a wet towel and a transparent plastic-sheet with plastic container for holding pupae, and two bottles with cotton wicks, one containing 10% sucrose solution and the other 5% multivitamin syrup solution. Right: adult males being kept in a screen-topped paper cup with	19

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
	5% multivitamin syrup solution, and the top covered with a translucent plastic bag to maintain humidity; (E) Artificial feeding system with thin paraffin-membrane at the bottom tip of the feeding apparatus containing bovine heparinized-blood that is in close contact with 50 fasted adult female *An. campestris*-like Form E inside a screen-topped paper cup.	
4	Metaphase karyotypes of *An. campestris*-like Form B, E and F (**a-e**). Form B: **a** Kamphaeng Phet strain, showing X_2, Y_2 chromosomes; Form E: **b** Chumphon strain, showing X_2, Y_5 chromosome; **c** Sa Kaeo strain, showing X_3, Y_5 chromosome; Form F: **d** Udon Thani strain, showing X_2,Y_6. chromosome; **c** Sa Kaeo strain, showing X_3, Y_5 chromosome; Form F: **d** Udon Thani strain, showing X_2Y_6 chromosomes; **e** showing homozygous X_2, X_2 chromosomes; **f** Diagrams of representative metaphase karyotypes of *An. campestris*-like Form F.	35
5	A phylogenetic trees of *An. campestris*-like Form B, E and F (*CAM*) based on molecular analysis of ITS2. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A	46

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
	probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).	
6	A phylogenetic trees of *An. campestris*-like Form B, E and F (*CAM*) based on molecular analysis of COI. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the nodes indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).	47
7	A phylogenetic tree of *An. campestris*-like Form B, E and F (*CAM*) based on molecular analysis of COII. The tree was generated by neighbor-joining analysis. Numbers on the node indicate probabilities based on 1,000 bootstrap replicates. A probability of more than 50% is shown. Branch lengths are proportional to genetic distance (scale bar).	48
8	Egg surface topography of *An. campestris*-like under scanning electron microscope (SEM); whole eggs: (A) dorsal aspect, anterior end (a), posterior end (p) (x 230). (B) Lateral aspect, anterior end (a), posterior end (p) (x 250). (C) Anterior end, showing irregularly jagged tubercles on the deck and four large,	52

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
	rosette-shaped tubercles (2,200). (D) A higher magnification of the irregularly jagged tubercles on the deck (x 7,000).	
9	Egg surface topography of *An. campestris*-like under scanning electron microscope (SEM): (A) the inner surface of the frill (fr), showing its sclerotized, ridge-like texture with picket-like ribs (x 3,500). (B) The outer surface of the frill (fr), showing its smooth surface and parallel brick-like texture along its entire length (x 3,500). (C) The exochorionic sculptering in the middle of the egg, showing more or less regularly hexagonal reticulum with membrane like-wall enclosing many small, less prominent tubercles. (D) The anterior end, showing the micropylar orifice surrounded by a smooth collar with an irregular outer margin (x 3,300).	53
10	Complete set of salivary gland polytene chromosomes of *An. campestris*-like Form B (C = Centromere, L = Left arms, R = Right arms, X = X-chromosome).	55
11	Complete set of salivary gland polytene chromosomes of *An. campestris*-like Form E (C = Centromere, L = Left arms, R = Right arms, X = X-chromosome).	56

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
12	Complete set of salivary gland polytene chromosomes of *An. campestris*-like Form F (C = Centromere, L = Left arms, R = Right arms, X = X-chromosome).	57
13	Oocysts of *P. vivax* recovered from midgut of (A) *An. cracens* and (B) *An. campestris*-like Form E (Chiang Mai) on day 8 after infection.	63
14	Free flow regular spindle-shaped sporozoites of *P. vivax* from the squashed salivary glands (small arrow) (A) *An. cracens* and (B) *An. campestris*-like Form E (Chiang Mai) on day 14 after infection.	64

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

%	percentage
<	less than
>	more than
°C	degree Celsius
µl	microliter
µM	micromolar
bp	base pair
C	centromere
CAM	*An. campestrs*-like Forms
cm	centimeter
cm^2	square centimeter
COI	cytochome c oxidase subunit I
COII	cytochome c oxidase subunit II
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates
e.g.	exempli gratia
et al	and others
etc.	etcetera
fr	frill
hr	hour
i.e.	id est

ITS2	second internal transcribed spacer
IU	international unit
IU/Kg	international unit per kilogram
KV	voltage
L	left arms
mg/kg	milligram per kilogram
ml	milliliter
min	minute
mtDNA	mitochondrial DNA
No.	number
p	probability
PB	phosphate buffer
PCR	polymerase chain reaction
pH	potential of hydrogen
R	right arms
rDNA	ribosomal DNA
RH	relative humidity
SEM	scanning electron microscope
s.l.	sensu lato
spp.	species
s.s.	sensu stricto
wbc	white blood cell