



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

โครงสร้างของประชากรริ้นดำ (Diptera: Simuliidae)
ในประเทศไทยโดยการศึกษาการเรียงตัวของเบสของ
ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

โดย รศ.ดร. เฉลียว กุวังคะดิลก และ นายไพโรจน์ ประมวล

กุมภาพันธ์ 2549

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ โครงสร้างของประชากรริ้นดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทยโดย
การศึกษาการเรียงตัวของเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

คณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร.เนลิยา กุวัจนะดิตร

2. นายไพโรจน์ ประมวล

สังกัด

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ใบไม้ ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งพร้อมทั้งให้ทุนสนับสนุนเพิ่มเติมในการศึกษานี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์ Peter Adler มหาวิทยาลัยเคมสัน เมืองเคมสัน ประเทศสหรัฐอเมริกา และ Dr. Catherine Walton มหาวิทยาลัยแมนเชสเตอร์ เมืองแมนเชสเตอร์ ประเทศอังกฤษ ที่ให้คำแนะนำในการศึกษานี้ คุณเสน่ห์ จิตต์กลาง คุณอุบล ตั้งวานิช นักศึกษาปริญญาเอก คุณอัญชลี ฐานวิสัย และคุณอัญชลี เหลือล้ำ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ในการสร้างนักวิจัยระดับปริญญาเอก (BGJ4580005) ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (PHD/0026/2544) และทุนเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ ใบไม้ (RDG4530034)

สัญญาเลขที่ BGJ4580005

โครงการ “โครงสร้างของประชากรรึ้นดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทยโดยการศึกษาการ
เรียงตัวของเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ”

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	โครงสร้างของประชากรรึ้นดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศ
(ภาษาอังกฤษ)	Population structure of black flies (Diptera: Simuliidae) in
	Thailand inferred from the mitochondrial DNA sequences
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.เจลิยว กุวังคะดิลก
	Assoc. Prof. Dr. Chaliow Kuvangkadilok
ชื่อนักศึกษาผู้ได้รับทุน	นายไพโรจน์ ประมวล
	Mr. Pairot Pramual
ระยะเวลาดำเนินการ	2 ปี (1 เมษายน 2545 ถึง 31 มีนาคม 2547)

บทคัดย่อ

การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีความสำคัญต่อความเข้าใจถึงกระบวนการวิวัฒนาการรวมทั้งบทบาทของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อแบบแผนและระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตตลอดจนการเกิดสปีชีส์ใหม่ นอกจากนี้ความเข้าใจรูปแบบของโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญในการจัดการทรัพยากรชีวภาพ ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงรืนดำ 3 ชนิดที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวาง ได้แก่ *Simulium tani*, *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cytochrome oxidase subunit I (COI) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม โครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงรืนดำทั้ง 3 ชนิดมีความคล้ายคลึงกัน โดยประชากรภาคเหนือมีความแตกต่างของโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงและมีความแตกต่างจากประชากรภูมิภาคอื่นๆ โดยปัจจัยทางภูมิศาสตร์ เช่น แนวเทือกเขา รวมทั้งปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยมีผลต่อระดับการถ้ายีนและนำไปสู่ความแตกต่างทางพันธุกรรม ผลของการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรพบว่าประชากรภาคเหนือของรืนดำทั้งสามชนิดมีประวัติศาสตร์ที่ยาวนานกว่าประชากรภาคใต้ โดยประชากรภาคใต้เกิดจากการ colonization ของประชากรบางส่วนจากภาคเหนือตอนล่างหรือภาคกลางเมื่อประมาณ 100,000 – 200,000 ปีตามด้วยการขยายตัวของประชากรทั้ง 3 ชนิดซึ่งอาจมีผลให้ไม่เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ความคล้ายคลึงกันของรูปแบบโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรืนดำทั้งสามชนิดอาจเป็นผลจากอิทธิพลของสภาพนิเวศวิทยาในปัจจุบันที่เหมือนกันหรือเป็นผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของภูมิภาคนี้ซึ่งอาจมีผลต่อแหล่งอาศัยของรืนดำ หรือเกิดจากผลของปัจจัยทั้งสองอย่างร่วมกัน ถึงแม้แมลงรืนดำทั้ง 3 ชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันทั้งรูปแบบโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมทั้งประวัติศาสตร์ประชากร อย่างไรก็ตามโครงสร้างทางพันธุกรรมของรืนดำแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของนิเวศวิทยาของรืนดำแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังพบว่ามี genetic introgression เกิดขึ้นระหว่าง *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ซึ่งอาจเกิดในอดีตที่มีผลต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของรืนดำทั้งสองชนิดแม้ว่า genetic introgression ยังคงดำเนินต่อไปแต่ไม่มีผลต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมมาก

Abstract

Understanding population genetic structure is an important component of evolutionary study because it allows us to determine the evolutionary forces involved in the generation of biodiversity including the generation of genetic diversity within species and particularly speciation. In addition, understanding the pattern of genetic structure and diversity also has a role to play in biological resource management and conservation. In this study, the population genetic structures of three black fly species, namely, *Simulium tani*, *S. nakhonense* and *S. quinquestriatum*, were determined using 720 base pairs of the cytochrome oxidase I (COI) gene of mitochondrial DNA. All of these black flies had similar patterns of population genetic structure and diversity. Populations from the northern region have greater diversity and highly structure in this region as well as genetic differentiation from populations in other regions. Both geographical (e.g. mountain ranges) and ecological conditions of the habitat seem to be important factors in limiting gene flow and allowing populations to genetically differentiate. The greater diversity and higher genetic structure of the northern populations is likely due to the longer history of populations in this region. In contrast, populations from the south were colonized recently from a subset of the haplotypes from the lower north or central regions approximately 100,000 to 200,000 years ago followed by population expansion. The absence of genetic structure in the southern populations is most likely due to the recent history of populations in this region rather than a high level of gene flow between populations. The similar pattern of genetic structure and diversity among geographically co-distributed species observed here reflects the shared contemporary ecological or historical (e.g. due to Pleistocene climatic change) conditions of the region. Although these black fly species share a common pattern of genetic structure and diversity each species also has species-specific pattern which can be explained in large part by the differing ecological conditions of these species. The similarity of pattern of genetic structure and diversity between *S. nakhonense* and *S. quinquestriatum* revealed by mitochondrial DNA could also be due to mitochondrial introgression which is inferred from the greater genetic similarity between sympatric populations of different species than between allopatric populations of the same species. Although ongoing genetic introgression is probably still occurring historical introgression seems to have played a greater role in determining the genetic structure and diversity of these species.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ค
รายละเอียดการดำเนินงานและผลการวิจัย	
บทสรุปย่องานวิจัย (Executive summary)	1
1. บทนำ	4
2. วัตถุประสงค์	7
3. ระเบียบวิธีวิจัย	7
4. ผลการศึกษา	17
5. อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	46
เอกสารอ้างอิง	49
6. Output ที่ได้จากโครงการ	54
ภาคผนวก	55

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. รายละเอียดของประชากรแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium tani</i> จำนวน 16 ประชากรที่ทำการศึกษา	9
2. รายละเอียดของประชากรแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> จำนวน 13 ประชากรที่ทำการศึกษา	11
3. รายละเอียดของประชากรแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium quinquestriatum</i> จำนวน 11 ประชากรที่ทำการศึกษา	13
4. Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D and F_s ของ 16 ประชากร และ 3 กลุ่มประชากรของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium tani</i>	19
5. ค่า Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D และ F_s ของ 13 ประชากรของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium nakhonense</i>	21
6. ค่า Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D และ F_s ของ 11 ประชากรของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium quinquestriatum</i>	22
7. F_{ST} ระหว่าง 3 กลุ่มประชากรของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium tani</i> ที่จัดโดย SAMOVA	27
8. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) ภายในสปีชีส์และระหว่าง สปีชีส์ของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> และ <i>Simulium quinquestriatum</i>	31
9. Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium nakhonense</i>	32
10. Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium quinquestriatum</i>	34
11. ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion ของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium tani</i>	40
12. การวิเคราะห์ด้วย Maximum likelihood เพื่อหาขนาดประชากร ($\theta = 2N\mu$), growth rates (g) และ migration rates ($M=m/\mu$) ของ 3 กลุ่มประชากรของ แมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium tani</i> .	40
13. ค่า growth rate ที่คำนวณโดย maximum likelihood ภายใต้เงื่อนไขของ exponential growth model ของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> และ <i>Simulium quinquestriatum</i>	43
14. ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion ของแมลงรึ้นคำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> และ <i>Simulium quinquestriatum</i> คำนวณโดย stepwise expansion model	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
15. ขนาดประชากร ($\theta = 2N_e\mu$), exponential growth rates (g) และ migration rates ($M=m/\mu$) คำนวณ โดย maximum likelihood ของกลุ่มประชากรของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> และ <i>Simulium quinquestriatum</i>	45

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ประชากรแมลงรืนดำชนิด <i>Simulium tani</i> ที่ทำการศึกษารายละเอียดของประชากรแสดงในตารางที่ 1	10
2. ประชากรของแมลงรืนดำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> ที่ทำการศึกษารายละเอียดและสัญลักษณ์ของแต่ละประชากรแสดงในตารางที่ 2	12
3. ประชากรของแมลงรืนดำชนิด <i>Simulium quinquestriatum</i> ที่ทำการศึกษารายละเอียดและสัญลักษณ์ของประชากรแสดงในตารางที่ 3	14
4. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) กับละติจูด (latitude)	20
5. Median-joining network ของ 147 ตัวอย่างของแมลงรืนดำชนิด <i>Simulium tani</i> โดยแต่ละวงกลมคือ 1 แสพโพลไทป์และสีของวงกลมหมายถึงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของแสพโพลไทป์ (เหลือง คือ ภาคเหนือ ชมพูคือภาคตะวันออกเฉียงคือภาคกลาง และน้ำเงินคือภาคใต้)	24
6. Median-joining network คำนวณโดยโปรแกรม NETWORK ของ 207 ตัวอย่างของแมลงรืนดำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> (123 ตัวอย่าง) และ <i>Simulium quinquestriatum</i> (84 ตัวอย่าง) ภาพวงกลมแสดงแต่ละแสพโพลไทป์โดยขนาดของวงกลมเป็นสัดส่วนกับจำนวนตัวอย่างของแต่ละแสพโพลไทป์ สีของวงกลมแสดงถึงสปีชีส์และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของแสพโพลไทป์ (สีเหลือง = <i>S. nakhonense</i> ภาคเหนือ, สีฟ้า = <i>S. nakhonense</i> ภาคกลาง, สีน้ำเงิน = <i>S. nakhonense</i> ภาคใต้, สีน้ำตาล = <i>S. quinquestriatum</i> ภาคเหนือ, สีม่วง = <i>S. quinquestriatum</i> ภาคกลาง และสีเขียว = <i>S. quinquestriatum</i> ภาคใต้)	25
7. UPGMA tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 ของแมลงรืนดำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> และ <i>Simulium quinquestriatum</i> โดยใช้ <i>Simulium fenestriatum</i> เป็น outgroup	26
8. กลุ่มประชากรแมลงรืนดำชนิด <i>Simulium tani</i> ซึ่งจัดกลุ่มโดยใช้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม SAMOVA	28
9. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของแมลงรืนดำชนิด <i>Simulium tani</i> จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
10. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางภูมิศาสตร์กับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง 16 ประชากรของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium tani</i>	29
11. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร	33
12. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) และระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (log km) ระหว่างประชากรของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium nakhonense</i>	33
13. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium quinquestriatum</i> จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร	35
14. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) และระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (log km) ระหว่างประชากรของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium quinquestriatum</i>	35
15. UPGMA tree คำนวณโดยใช้ค่า pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> และ <i>Simulium quinquestriatum</i>	36
16. Mismatch distribution ของกลุ่มประชากรของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium tani</i> (a) ภาคเหนือ (b) ภาคตะวันออก และ (c) ภาคกลาง/ใต้	39
17. Mismatch distributions ของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium nakhonense</i> โดยกราฟมีลักษณะเป็น multimodal เมื่อวิเคราะห์ประชากรทั้งหมด (a) ประชากรภาคเหนือ (b) ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่มีขนาดคงที่ (ดูคำอธิบายในเนื้อหาประกอบ) และประชากรภาคใต้ (c) เป็น unimodal ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่เกิด population expansion	41
18. Mismatch distributions ของแมลงวันค้ำชนิด <i>Simulium quinquestriatum</i> (a) ประชากรทั้งหมด (b) ภาคเหนือ และ (c) ภาคใต้ โดยกราฟไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการ simulation ภายใต้อารมณ์ของการเกิด population expansion	42

Executive summary

แมลงรืนดำจัดอยู่ในวงศ์ (family) Simuliidae อันดับ (order) Diptera ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบแล้วทั้งสิ้น 1,809 สปีชีส์ (Crosskey and Howard 2004) ในบางภูมิภาคของโลก เช่น แอฟริกา อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ แมลงรืนดำเป็นพาหะของโรค Onchocerciasis หรือ River blindness ซึ่งเกิดจาก *Onchocerca volvulus* ที่ถ่ายทอดโดยแมลงรืนดำบางชนิดในสกุล (genus) *Simulium* นอกจากนี้แมลงรืนดำยังสามารถถ่ายทอดโปรโตซัวสกุล *Lucozytozoon* ในสัตว์ปีก รวมถึงไวรัสบางชนิด (Crosskey 1990) การกัดของรืนดำจำนวนมากทำให้ผลผลิตของปศุสัตว์ลดลงได้ เช่น น้ำหนักตัวหรือปริมาณน้ำนมลดลง (Crosskey 1990; Adler *et al.* 2004) ดังนั้นแมลงรืนดำจึงมีความสำคัญทั้งทางด้านการแพทย์และเศรษฐกิจ

ในประเทศไทยมีรายงานการพบรืนดำแล้วทั้งหมด 66 สปีชีส์ จัดอยู่ใน 6 สกุลย่อย (subgenus) ของสกุล *Simulium* ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการเกิดโรคที่มีรืนดำเป็นพาหะแต่มีรายงานการพบพยาธิ *Onchocerca* sp. ซึ่งยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ในรืนดำ 3 ชนิดที่พบในภาคเหนือของประเทศไทยคือ *Simulium nodosum*, *S. asakoe* และ *S. nigrogilvum*

การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรมีส่วนสำคัญที่นำไปสู่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตรวมถึงปัจจัยและกลไกที่นำไปสู่การเกิดความหลากหลายทางชีวภาพได้ ประเทศไทยนับว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพในระดับสูงแต่ยังขาดความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับทรัพยากรชีวภาพเหล่านี้ยิ่งมามาก เช่นเดียวกันกับการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรในประเทศไทยยังมีน้อยมาก อีกทั้งปัจจุบันมีการสูญเสียทรัพยากรธรรมชาติจากกิจกรรมของมนุษย์ในอัตราที่สูง ดังนั้นความรู้พื้นฐานด้านพันธุศาสตร์ประชากรซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจแบบแผนของความหลากหลายทางพันธุกรรมในประเทศไทยจึงมีความจำเป็นต่อการจัดการทรัพยากรชีวภาพเหล่านี้

แมลงรืนดำมีความเหมาะสมในการใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในประเทศไทย ทั้งนี้เพราะแมลงรืนดำมีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาด้านอื่นๆ เช่น อนุกรมวิธาน (เจลิยว และคณะ 2544; Kuvangkadilok and Takaoka, 2000; Takaoka and Choochote, 2004b) นิเวศวิทยา (Kuvangkadilok *et al.*, 1999a) และ เซลล์พันธุศาสตร์ (Kuvangkadilok *et al.*, 1999b; Kuvangkadilok *et al.* 1999c; Kuvangkadilok *et al.* 2003) ในการศึกษาผู้วิจัยได้เลือกแมลงรืนดำ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Simulium tani* Takaoka and Davies, *S. nakhonense* Takaoka and Suzuki และ *S. quinquestriatum* Shiraki ที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางพบได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทยยกเว้นภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม

ผลการศึกษาพบว่าแมลงรืนดำทั้ง 3 ชนิดมีแบบแผนของโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือประชากรภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง

และมีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมากกว่าประชากรภาคใต้ จากการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรพบว่าประชากรแมลงรึ้นดำจากภาคเหนือมีประวัติศาสตร์ที่ยาวนานกว่าประชากรภาคใต้ในทั้ง 3 สปีชีส์ นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรจากภาคใต้นั้นเกิดจากการ colonization จากประชากรภาคเหนือเมื่อประมาณ 100,000 ถึง 200,000 ปีที่ผ่านมาตามด้วยการเกิด population expansion ความคล้ายคลึงกันของแบบแผนของโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรึ้นดำทั้ง 3 ชนิดที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์เหมือนกันอาจเป็นผลมาจากอิทธิพลของสภาพนิเวศวิทยาที่คล้ายคลึงกันหรืออาจเกิดจากอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในอดีต เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในยุคไพลโทซีน (Pleistocene) ซึ่งมีผลต่อแหล่งอาศัยของรึ้นดำทำให้รึ้นดำทั้ง 3 ชนิดมีการตอบสนองในลักษณะที่คล้ายคลึงกันต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว นอกจากนี้จากการที่ประชากรภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าภาคใต้ซึ่งเป็นผลจากการที่ประชากรภาคเหนือมีประวัติศาสตร์ที่ยาวนานกว่ายังอาจเกี่ยวเนื่องกับความหลากหลายของแหล่งอาศัยของรึ้นดำที่มีความหลากหลายมากกว่าภาคใต้

ถึงแม้ว่าแบบแผนของโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมไปถึงประวัติศาสตร์ประชากรของรึ้นดำทั้ง 3 ชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันแต่ก็มีความแตกต่างบางอย่าง เช่น ประชากรของแมลงรึ้นดำชนิด *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ในภาคเหนือของแต่ละสปีชีส์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในระดับสูงแต่ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของแมลงรึ้นดำชนิด *S. tani* ความแตกต่างเหล่านี้สามารถอธิบายได้ด้วยความแตกต่างทางนิเวศวิทยาและชีววิทยาของรึ้นดำเหล่านี้

จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของรึ้นดำทั้ง 3 สปีชีส์พบว่าปัจจัยทางกายภาพ เช่น ระยะห่างทางภูมิศาสตร์ แนวเทือกเขา และทะเล เป็นปัจจัยที่จำกัดการถ่ายยีน (gene flow) ระหว่างประชากรของรึ้นดำทั้ง 3 สปีชีส์ บ่งชี้ว่าปัจจัยทางกายภาพเหล่านี้อาจมีส่วนสำคัญในกระบวนการวิวัฒนาการของรึ้นดำ อย่างไรก็ตามความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยอาจมีบทบาทสำคัญเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อการกระจายตัวของ cytoforms

ความใกล้ชิดและความคล้ายคลึงของแบบแผนโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่าง *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* บางส่วนอาจมีผลมาจากการเกิด mtDNA introgression ระหว่างแมลงรึ้นดำ 2 ชนิดนี้โดยการเกิด mtDNA introgression ที่มีผลต่อรูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมดังกล่าวน่าจะเกิดในอดีตถึงแม้ว่า mtDNA introgression จะเกิดในปัจจุบันด้วยก็ตามแต่ไม่น่าจะมีผลมากนัก

ผลของงานวิจัยนี้เป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญซึ่งแสดงให้เห็นถึงแบบแผนของความหลากหลายทางพันธุกรรมของรึ้นดำในประเทศไทยซึ่งมีรูปแบบของโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถชี้ชัดว่าความคล้ายคลึงดังกล่าวเป็นผลจากอิทธิพลของสภาพนิเวศวิทยาในปัจจุบันที่คล้ายคลึงกันหรือเป็นผลจากอิทธิพลของการ

เปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในอดีต เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในยุคไพลโทซีน อย่างไรก็ตาม การศึกษาในสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นที่มีแบบแผนการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่เหมือนกันกับการศึกษานี้จะช่วยให้สามารถบ่งชี้ถึงปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในภูมิภาคนี้ได้ซึ่งอาจมีส่วนช่วยในการวางแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพ

1. บทนำ

แมลงรืนดำ (black flies) จัดอยู่ในวงศ์ (family) Simuliidae ในอันดับ (order) Diptera ปัจจุบันมีการค้นพบแล้วทั้งสิ้น 1,809 สปีชีส์ (Crosskey and Howard, 2004) แมลงรืนดำเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์มากที่สุดชนิดหนึ่งเนื่องจากรืนดำบางชนิดเป็นพาหะของโรค Onchocerciasis หรือ River blindness ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจาก filarial nematode ชนิด *Onchocerca volvulus* โดยมีพาหะเป็นแมลงรืนดำเพศเมียบางชนิด เช่น *Simulium damnosum*, *S. navaevie*, *S. exiguum* เป็นต้น (Crosskey, 1990) นอกจากนี้รืนดำยังสามารถถ่ายทอดโปรโตซัวสกุล *Luecozytozoon* ในสัตว์ปีก รวมทั้งไวรัสบางชนิดด้วย (Mead *et al.*, 1999) การกัดของแมลงรืนดำจำนวนมากทำให้เกิดความเสียหายต่อสัตว์ปีกและปศุสัตว์ เช่น ทำให้ผลผลิตน้ำนมและน้ำหนักตัวลดลง (Adler *et al.*, 2004) ดังนั้นแมลงรืนดำจึงมีความสำคัญทั้งทางการแพทย์และเศรษฐกิจ ในประเทศไทยมีรายงานการพบรืนดำจนถึงปัจจุบันทั้งสิ้น 66 สปีชีส์ ซึ่งจัดจำแนกอยู่ใน 6 สกุลย่อย (subgenus) และอีก 1 สปีชีส์ซึ่งยังไม่มีรายงานจำแนกอยู่ในสกุลย่อยใด รืนดำทั้งหมดอยู่ในสกุล (genus) *Simulium* แม้จะไม่มีรายงานการพบโรค Onchocerciasis ในประเทศไทย แต่มีรายงานการพบ *Onchocerca* sp. ในแมลงรืนดำ 3 สปีชีส์ คือ *S. nodosum*, *S. nigrogilvum* และ *S. asakoe* ในจังหวัดเชียงใหม่โดยเชื่อน่าจะเป็น *Onchocerca* sp. ที่อยู่ในปศุสัตว์ (Takaoka *et al.*, 2003; Fukuda *et al.* 2003)

นอกเหนือจากความสำคัญทางการแพทย์และเศรษฐกิจแล้วกระบวนการวิวัฒนาการของแมลงรืนดำก็มีความน่าสนใจ การศึกษาในภูมิภาคต่างๆแสดงให้เห็นว่ากระบวนการเกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation) ของแมลงรืนดำน่าจะเกี่ยวข้องหรือเป็นผลจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยที่แตกต่างกันของแต่ละสปีชีส์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งอาศัยของตัวอ่อน (larva) ซึ่งได้แก่แหล่งน้ำไหลตามธรรมชาติ การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทินโครโมโซมในแมลงรืนดำหลายๆชนิดที่ทำการจัดจำแนกโดยใช้รูปร่างสัณฐานวิทยาพบว่าแมลงรืนดำเหล่านี้ประกอบด้วยหลายๆซิปลิงสปีชีส์ที่สามารถแยกจากกันได้โดยอาศัยเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทินโครโมโซม (Rothfels, 1979) โดยการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของซิปลิงสปีชีส์เหล่านี้ส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย โดยแต่ละซิปลิงสปีชีส์มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัย เช่น แต่ละซิปลิงสปีชีส์ของแมลงรืนดำกลุ่มซับซ็อน *S. tuberosum* มีการกระจายตัวในแต่ละ ecoregion ของอเมริกาเหนือ (Adler and McCredie, 1997) การกระจายของซิปลิงสปีชีส์ของรืนดำชนิดซับซ็อน *S. damnosum* มีความสัมพันธ์กับเขต savannah หรือ ป่าทึบของแอฟริกาตะวันตก (Boakye *et al.*, 1998) นอกจากนี้การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังสนับสนุนแนวคิดของการเกิดสปีชีส์ใหม่ของรืนดำโดยเกิดจากผลของการปรับตัวต่อนิเวศวิทยาแหล่งอาศัยของตัวอ่อน Joy and Conn (2001) ทำการศึกษาสาย

สัมพันธภาพทางวิวัฒนาการของแมลงรืนดำใน Society Island พบว่าการเกิดสปีชีส์ใหม่ของแมลงรืนดำที่พบในหมู่เกาะนี้น่าจะเป็นผลจากการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยของตัวอ่อนที่แตกต่างกัน

การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต กระบวนการและปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสปีชีส์ใหม่ กระบวนการและรูปแบบในการถ่ายยีน (gene flow) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการถ่ายยีนระหว่างประชากร ซึ่งความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการพื้นฐานดังกล่าวนี้นอกจากจะเป็นประโยชน์ในเชิงวิชาการยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในหลายๆด้าน เช่น การควบคุมแมลงที่เป็นพาหะของโรค การปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ เป็นต้น

อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการศึกษาด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากรน้อยมาก การศึกษาในภูมิภาคอื่นๆ เช่นในอเมริกาเหนือ ออสเตรเลีย และยุโรป (reviewed in Hewitt 1996; 2004) นำไปสู่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆในภูมิภาคดังกล่าว ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการทรัพยากรชีวภาพได้ ในขณะที่ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพในระดับสูง แต่องค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมยังมีน้อยมากอีกทั้งการศึกษาส่วนใหญ่ก็จำกัดในบางภูมิภาคไม่ครอบคลุมทั่วประเทศ ดังนั้นการศึกษาด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากรในประเทศไทยจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวาง นอกจากนี้แล้วสิ่งมีชีวิตที่จะนำมาใช้ศึกษาควรมีข้อมูลพื้นฐานด้านอื่นๆประกอบด้วย เช่น การกระจายทางภูมิศาสตร์ อนุกรมวิธาน และนิเวศวิทยา เป็นต้น จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแมลงรืนดำในประเทศไทยมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรอย่างยิ่ง เนื่องจากการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางสามารถพบได้ในทุกภูมิภาค รวมทั้งมีข้อมูลการศึกษาด้านอื่นๆ เช่น อนุกรมวิธาน เซลล์พันธุศาสตร์ และนิเวศวิทยา

การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงรืนดำมีการศึกษาในหลายๆระดับ ทั้งระดับรูปร่างสัณฐานวิทยาภายนอก เซลล์พันธุศาสตร์ ชีวเคมี เช่น enzyme electrophoresis และระดับโมเลกุลโดยการศึกษาความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตามการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ เทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์โดยการเปรียบเทียบแบนด์ของโพลีทินโครโมโซม ในขณะที่การใช้เทคนิค enzyme electrophoresis ไม่ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบหาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (Furday and Leohardt, 1989; Snyder and Linton, 1984) ซึ่งต่างจากการใช้เซลล์พันธุศาสตร์ หรือการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในปัจจุบันที่สามารถตรวจสอบพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร การศึกษา enzyme electrophoresis มีข้อจำกัดเนื่องจากมีความแปรผันอยู่ในระดับต่ำจึงไม่สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างประชากรได้

การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลงหลายๆชนิดในปัจจุบันมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งของไมโทคอนเดรียอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีความแปรผันในระดับที่สูงเมื่อเทียบกับนิวเคลียสดีเอ็นเอ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่นิยมนำมาศึกษามากที่สุดคือ Cytochrome oxidase I (COI) ตัวอย่างเช่น การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อน *Anopheles dirus* ชนิด A, D และ C ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Walton *et al.*, 2000) การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของ meadow grasshopper ชนิด *Chorthippus parallelus* ในยุโรป (Lunt *et al.*, 1998) การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของ tiger beetles ในญี่ปุ่น (Satoh *et al.*, 2004) การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactocera depressa* (Mun *et al.*, 2003) จากตัวอย่างเหล่านี้จะเห็นได้ว่ายีน COI มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของแมลง

ในการศึกษานี้ได้เลือกแมลงวันรำ 3 ชนิดที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวางเพื่อทำการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากร ได้แก่ *Simulium tani* Takaoka and Davies, *S. nakhonense* Takaoka and Zusuki และ *S. quinquestriatum* Shiraki แมลงวันรำชนิด *S. tani* จัดอยู่ใน *Simulium tuberosum* species group ในประเทศไทยแมลงวันรำกลุ่มนี้มีอย่างน้อย 8 ชนิด แมลงวันรำชนิด *S. tani* มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางที่สุด การกระจายตัวของแมลงวันรำใน *S. tuberosum* species group มีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยของตัวอ่อน เช่น *S. weji* พบเฉพาะในแหล่งน้ำไหลที่มีปริมาณตะกอนหินปูนมาก (Takaoka, 2001) ในขณะที่แมลงวันรำ *S. rufibasis* พบเฉพาะในลำธารที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,000 เมตรขึ้นไป แต่แมลงวันรำชนิด *S. tani* พบกระจายในแหล่งน้ำไหลทั้งในที่สูง (>1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล) และในที่ต่ำ รวมทั้งในลำธารที่มีขนาดแตกต่างกัน (Kuvangkadilok *et al.*, 1999a) จากการที่แมลงวันรำชนิดนี้มีการกระจายตัวกว้างขวางทั้งในแง่ภูมิศาสตร์และนิเวศวิทยาแหล่งที่อยู่อาศัยจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาเปรียบเทียบถึงความสำคัญและอิทธิพลของปัจจัยทางด้านกายภาพและนิเวศวิทยาต่อระดับการถ่ายยีนและความแตกต่างทางพันธุกรรมของแมลงวันรำ

แมลงวันรำชนิด *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* จัดอยู่ใน *Simulium striatum* species group โดยแมลงวันรำในกลุ่มนี้มี 4 ชนิดที่พบในประเทศไทย แมลงวันรำสองชนิดนี้มีการกระจายที่กว้างขวางพบได้ในทุกภูมิภาคในขณะที่อีก 2 ชนิด (*S. Chiangmaiense* และ *S. thailandicum*) พบเฉพาะภาคเหนือเท่านั้น นอกจากนี้ตัวอ่อนของแมลงวันรำชนิด *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ยังอาศัยในแหล่งน้ำไหลที่คล้ายคลึงกัน คือแหล่งน้ำไหลขนาดใหญ่และน้ำไหลแรง จากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ของ ribosomal RNA พบว่าวันรำทั้งสองชนิดมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุด (Thanwisai *et al.*, 2005) ดังนั้นการศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงวันรำที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมและมีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่เหมือนกันทำให้สามารถตรวจสอบการตอบสนองของ

สิ่งมีชีวิตที่ใกล้ชิดทางสายพันธุ์กรรมต่อสภาพนิเวศวิทยาทั้งในอดีตและปัจจุบันรวมทั้งปัจจัยทางกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์ ซึ่งจะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจปัจจัยที่นำไปสู่ความแตกต่างทางพันธุกรรมของรีนดำ 2 ชนิดนี้ นอกจากนี้การเปรียบเทียบโครงสร้างทางพันธุกรรมของรีนดำชนิดนี้กับแมลงรีนดำชนิด *S. tani* จะทำให้ทราบถึงแบบแผนของความหลากหลายทางพันธุกรรมของรีนดำในประเทศไทยรวมทั้งปัจจัยที่มีผลต่อแบบแผนของการกระจายตัวดังกล่าว ข้อมูลเหล่านี้นอกจากจะมีประโยชน์ต่อความรู้ความเข้าใจพื้นฐานของกระบวนการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตแล้วยังอาจมีความสำคัญต่อการวางแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทยในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

1. ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงรีนดำแต่ละชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม
2. เปรียบเทียบระดับความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรแมลงรีนดำชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์เหมือนกัน
3. เปรียบเทียบอิทธิพลของปัจจัยทางภูมิศาสตร์และนิเวศวิทยาต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงรีนดำและประวัติศาสตร์ประชากรของแมลงรีนดำแต่ละชนิด
4. เปรียบเทียบประวัติศาสตร์ประชากรของแมลงรีนดำแต่ละชนิดที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์เหมือนกัน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างรีนดำจากแหล่งน้ำไหลธรรมชาติในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยซึ่งแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1, 2 และ 3 และภาพประกอบที่ 1, 2 และ 3 จับตัวอ่อนและดักแด้โดยใช้ปากกิบเล็กกิบตัวอ่อนและตัวดักแด้ที่เกาะตามก้อนหิน เศษวัสดุ รวมทั้งพืชและใบไม้ที่ลอยในน้ำไหล ดองตัวอย่างใน Canoy's fixative (absolute ethanol 3 ส่วนต่อ acetic acid 1 ส่วน) เปลี่ยน fixative หลังจากการเก็บตัวอย่างประมาณ 5 นาที และ 1 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอีก 2 ครั้ง หลังการเก็บตัวอย่าง 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่เก็บมาต้องแช่ในน้ำแข็งหรือในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° C สำหรับตัวเต็มวัยจับโดยใช้คนเป็นเหยื่อล่อ ตัวเต็มวัยส่วนหนึ่งได้จากการเลี้ยงตัวดักแด้แต่ละตัวในหลอดพลาสติกที่กั้นหลอดรองด้วยกระดาษกรองชุบน้ำและปิดด้วยผ้าขาวบาง เพื่อให้ดักแด้ฟักออกเป็นตัวเต็มวัย จากนั้นดองตัวเต็มวัยใน 80% ethanol

3.2 การวินิจฉัยรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนรีนด้า

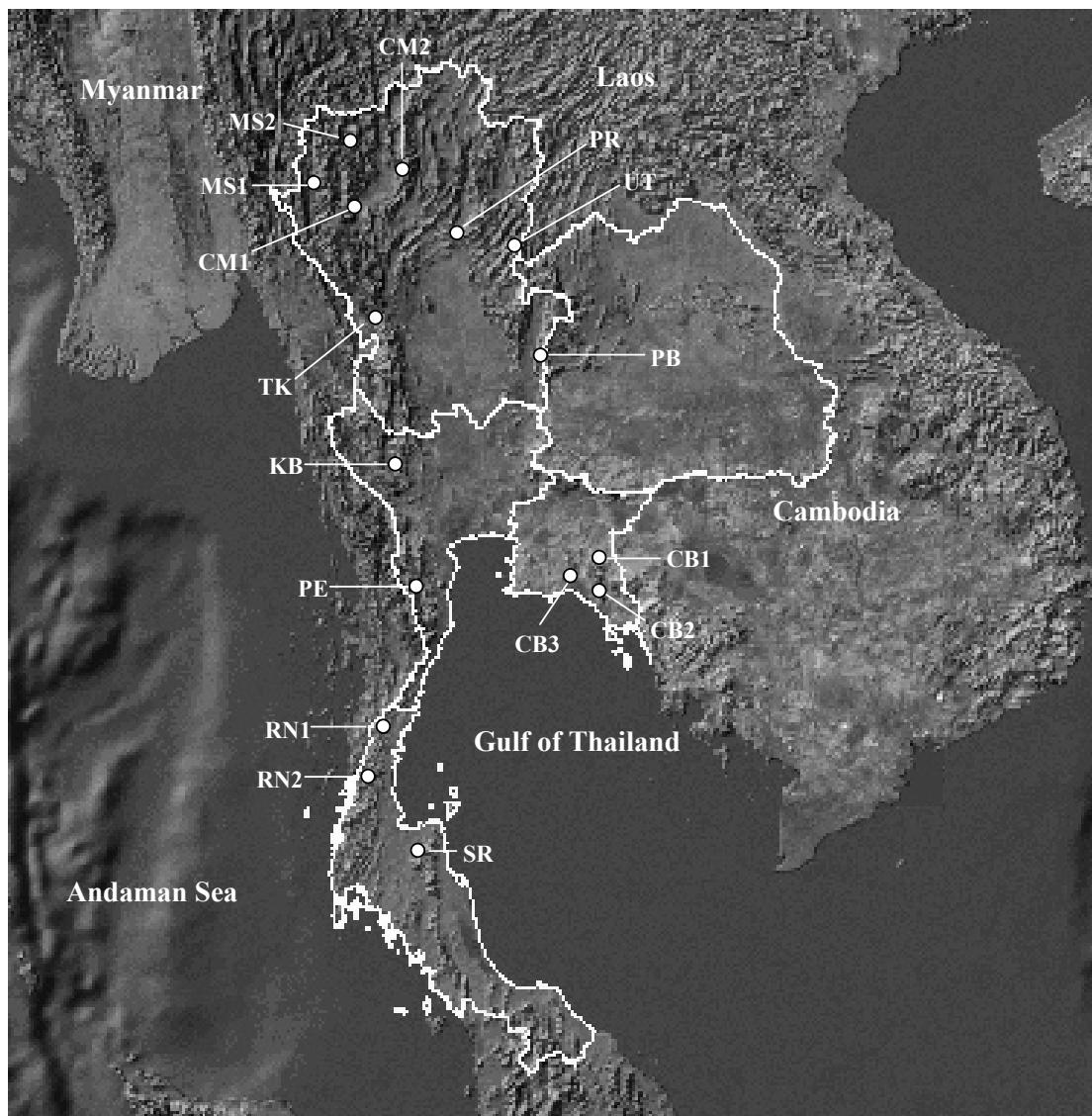
ทำการจำแนกชนิดของแมลงรีนด้าโดยการเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนและตัวดักแด้โดยใช้กุญแจของ Takaoka and Davies (1995) และรายงานการศึกษาของ Takaoka (1979), Takaoka and Suzuki (1984) และ Takaoka and Saito (1996) เนื่องจากแมลงรีนด้าหลายชนิดมีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนการเรียงตัวของแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมเพื่อช่วยในการจำแนกชนิดของแมลงรีนด้า เตรียมโพลีทีนโครโมโซมโดยใช้ Fuelgen technique ตามวิธีการของ Rothfels and Dunbar (1953) ก่อนนำเอาตัวอ่อนมาทำการเตรียมโพลีทีนโครโมโซมจะทำการตัดส่วนหัวและส่วนอกของตัวอ่อนออกแล้วนำไปดองใน absolute ethanol เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาอนุพันธุศาสตร์ต่อไป ซึ่งการศึกษาด้วยวิธีนี้จะทำให้ได้ข้อมูลทั้งด้านเซลล์พันธุศาสตร์และอนุพันธุศาสตร์ในรีนด้าตัวเดียวกัน เปรียบเทียบแบนด์ของโพลีทีนโครโมโซมแบนด์ต่อแบนด์กับแผนที่มาตรฐานของโพลีทีนโครโมโซมของ *S. tani* (Kuvangkadilok, unpublished data) *S. nakhonense* (Kuvangkadilok et al. 1999c) และ *S. quinquestratum* (Kuvangkadilok, unpublished data)

3.3 การศึกษาอนุพันธุศาสตร์

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Collins et al. (1987) จากส่วนหัวและอกของตัวอ่อนที่ทำการศึกษาโพลีทีนโครโมโซมยืนยันสปีชีส์แล้ว ดีเอ็นเอบางส่วนได้จากดักแด้ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีน cytochrome oxidase subunit I (COI) ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ C1-J-2195 (5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3'; Simon et al., 1994) และ UEA10 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'; Lunt et al., 1996) ทำ PCR ปริมาตร 50 µl ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 µM ของไพรเมอร์แต่ละชนิด 2 unit Taq DNA polymerase (Promega) และ 2 µl ของ DNA (dilute 1:20 ถึง 1:40) โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับ PCR ประกอบด้วย 94° C 5 นาที ตามด้วย 36 รอบของ 95° C 40 วินาที 45° C 50 วินาที และ 72° C 60 วินาที จากนั้นตามด้วย 72° C 5 นาที นอกจากนี้ยังได้ศึกษา 28S ribosomal DNA ส่วน D3 โดยใช้ไพรเมอร์ D3A (5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3') และ D3B (5'-TCGGAAGGAACCA-GCTACTA-3') (Litvaitis et al., 1994) โดยองค์ประกอบของ PCR เช่นเดียวกับองค์ประกอบในการศึกษายีน COI โปรแกรมอุณหภูมิประกอบด้วย 94° C 5 นาที ตามด้วย 39 รอบของ 94° C 30 วินาที 55° C 30 วินาที 72° C 1 นาที จากนั้นตามด้วย 72° C 4 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่มี ethidium bromide 0.5 µg/mL และส่องภายใต้แสง UV ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย GENE CLEAN KIT (BIO101) ผลผลิต PCR ที่บริสุทธิ์แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์เดียวกับที่ใช้ทำ PCR โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านโดยเครื่อง ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystem)

ตารางที่ 1 รายละเอียดของประชากรแมลงร้นค้ำชนิด *Simulium tani* จำนวน 16 ประชากรที่ทำการศึกษา

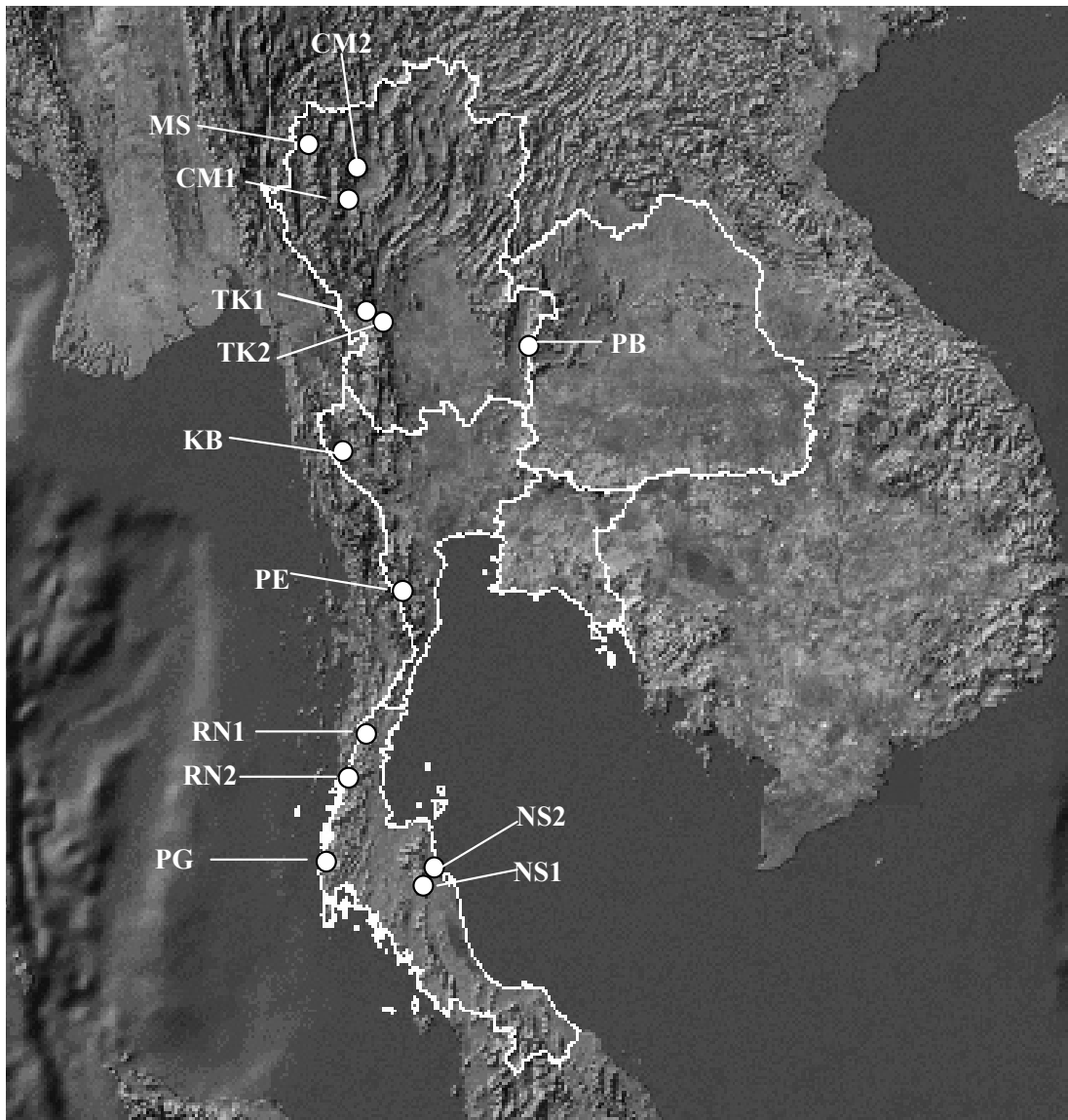
ประชากร	สัญลักษณ์	ภูมิภาค	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง (m)	วันเดือนปี
1.น้ำตกหมอกฟ้า อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่	CM1	เหนือ	19° 06'N/98° 46'E	545	07.06.46
2.บ้านห้วยหม้อ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM2	เหนือ	19° 02'N/99° 20'E	850	03.06.46
3.บ้านนาจิว อ.ขุนยวม จ.แม่ฮ่องสอน	MS1	เหนือ	18° 49'N/98° 02'E	814	05.06.46
4.บ้านปางแปก อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน	MS2	เหนือ	19° 26'N/98° 21'E	840	06.06.46
5.น้ำตกแม่เก้งหลวง อ.วังชิ้น จ.แพร่	PR	เหนือ	17° 58'N/98° 35'E	300	04.12.46
6.สะพาน กม.16 อ.เมือง จ.ตาก	TK	เหนือ	16° 46'N/99° 01'E	250	29.06.46
7.น้ำตกกุสอยดาว อ.น้ำปาด จ.อุตรดิตถ์	UT	เหนือ	17° 42'N/100° 57'E	650	18.10.46
8.น้ำตกตาดหมอก อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์	PB	เหนือ	16° 21'N/101° 21'E	468	25.10.46
9.น้ำตกเขาสอยดาว อ.สอยดาว จ.จันทบุรี	CB1	ตะวันออก	13° 06'N/102° 11'E	320	20.06.46
10.น้ำตกคลองนารายณ์ อ.เมือง จ.จันทบุรี	CB2	ตะวันออก	12° 34'N/102° 10'E	70	19.06.46
11.น้ำตกเขาชะเมา อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	CB3	ตะวันออก	12° 54'N/101° 43'E	65	19.06.46
12.ถ้ำธารลอด อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี	KB	กลาง	14° 39'N/99° 18'E	282	12.08.46
13.น้ำตกทอทิพย์ อ.เมือง จ.เพชรบุรี	PE	กลาง	12° 50'N/99° 19'E	400	16.08.46
14.น้ำตกบกกกราย อ.กระบุรี จ.ระนอง	RN1	ใต้	10° 22'N/98° 51'E	65	15.07.46
15.ห้วยรู้ง อ.เมือง จ.ระนอง	RN2	ใต้	10° 02'N/98° 39'E	80	14.07.46
16.น้ำตกเหมืองทวด อ.บ้านนาสาร	SR	ใต้	08° 45'N/99° 26'E	120	29.07.43
จ.สุราษฎร์ธานี					



ภาพที่ 1 ประชากรแมลงร้นค้ำชนิด *Simulium tani* ที่ทำการศึกษารายละเอียดของประชากรแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2 รายละเอียดของประชากรแมลงร้นค้ำชนิด *Simulium nakhonese* จำนวน 13 ประชากรที่ทำการศึกษา

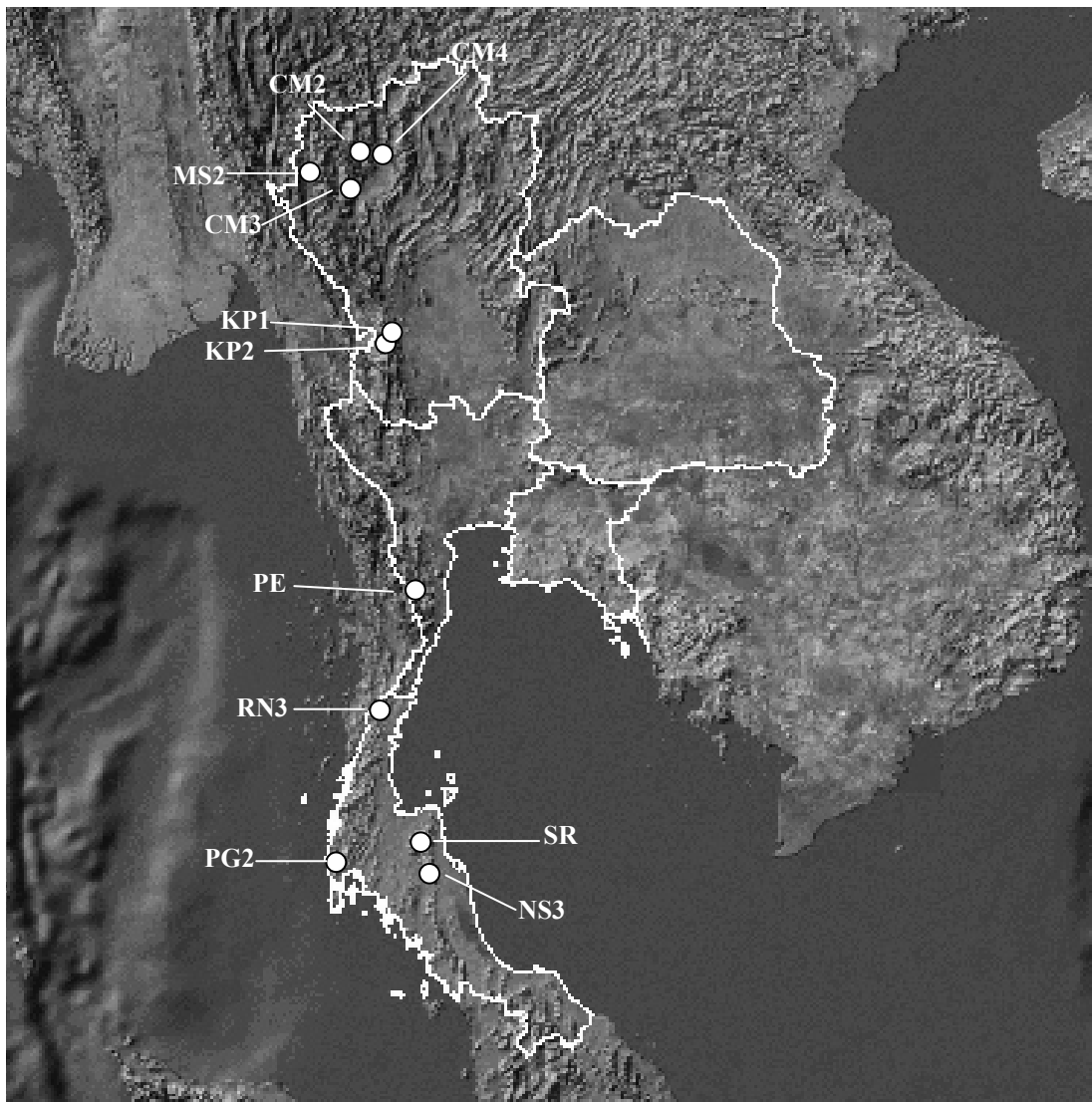
ประชากร	สัญลักษณ์	ภูมิภาค	ละติจูด / ลองจิจูด	ความสูง	วันเดือนปี ที่เก็บตัวอย่าง
1. น้ำตกวังควาย อช.คอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่	CM1	เหนือ	18° 30' N/98° 40' E	506	14.11.03
2. น้ำตกหมอกฟ้า อช.คอยสุเทพ-ปุย จ.เชียงใหม่	CM2	เหนือ	19° 06' N/98° 46' E	545	7.06.03
3. อช.ถ้ำปลา-ผาเสื่อ จ.แม่ฮ่องสอน	MS	เหนือ	19° 25' N/97° 59' E	500	6.06.03
4. น้ำตกตาดหมอก อช.ตาดหมอก จ.เพชรบูรณ์	PB	เหนือ	16° 21' N/101° 21' E	468	25.10.03
5. น้ำตกคลองวังเจ้า จ.ตาก	TK1	เหนือ	16° 30' N/99° 09' E	506	14.11.03
6. น้ำตกลานเลี้ยวม้า อช.ลานสาง จ.ตาก	TK2	เหนือ	16° 46' N/99° 01' E	260	29.06.03
7. ห้วยเขย่ง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KB	กลาง	14° 37' N/98° 31' E	202	29.02.04
8. บ้านกร่างแคมป์ อช.แก่งกระจาน จ.เพชรบุรี	PE	กลาง	12° 47' N/99° 27' E	318	16.08.03
9. ห้วยเหมือง อ.เมือง จ.ระนอง	RN1	ใต้	09° 44' N/98° 36' E	46	14.07.03
10. น้ำตกชุมแสง อ.กระบุรี จ.ระนอง	RN2	ใต้	10° 31' N/98° 54' E	35	8.01.04
11. น้ำตกตำหนัก อช.ศรีพังงา จ.พังงา	PG	ใต้	08° 59' N/98° 27' E	43	7.01.04
12. บ้านนิมิตรใหม่ กิ่ง อ.ช้างกลาง	NS1	ใต้	08° 20' N/99° 40' E	80	13.07.03
จ.นครศรีธรรมราช					
13. น้ำตกพรหมโลก อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช	NS2	ใต้	08° 31' N/99° 48' E	50	13.07.03



ภาพที่ 2 ประชากรของแมลงร้นค้ำชนิด *Simulium nakhonense* ที่ทำการศึกษารายละเอียดและ
สัญลักษณ์ของแต่ละประชากรแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 3 รายละเอียดของประชากรแมลงร้นค้ำชนิด *Simulium quinquestriatum* จำนวน 11 ประชากรที่ทำการศึกษา

ประชากร	สัญลักษณ์	ภูมิภาค	ละติจูด/ลองจิจูด	ความสูง	วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง
1. น้ำตกหมอกฟ้า อ.คอยสุเทพ-ปุย จ.เชียงใหม่	CM2	เหนือ	19° 06' N/98° 46' E	545	7.06.03
2. น้ำตกแม่ยะ อ.คอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่	CM3	เหนือ	18° 20' N/98° 20' E	500	13.12.02
3. บ้านปางน้ำถุ อ.คอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	CM4	เหนือ	19° 06' N/99° 27' E	663	11.11.03
4. บ้านแม่อุค อ.ขุนยวม จ.แม่ฮ่องสอน	MS2	เหนือ	18° 49' N/98° 02' E	1,000	5.06.03
5. น้ำตกคลองน้ำไหล อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร	KP1	เหนือ	16° 11' N/99° 15' E	300	28.06.03
6. น้ำตกคลองลาน อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร	KP2	เหนือ	16° 07' N/99° 16' E	250	28.06.03
7. น้ำตกทอทิพย์ อ.แก่งกระเจาน จ.เพชรบูรณ์	PE	กลาง	12° 50' N/99° 19' E	400	16.08.03
8. น้ำตกบกกทราย จ.ระนอง	RN3	ใต้	10° 22' N/98° 51' E	65	15.07.03
9. น้ำตกโดนไพร อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	PG2	ใต้	08° 25' N/98° 18' E	29	7.03.04
10. น้ำตกคาดฟ้า อ.ได้ร่มเย็น จ.สุราษฎร์ธานี	SR	ใต้	08° 51' N/99° 28' E	260	14.07.03
11. น้ำตกแม่ศรีษฐิ อ.ร้อนพิบูลย์ จ. นครศรีธรรมราช	NS3	ใต้	08° 09' N/99° 49' E	74	6.03.04



ภาพที่ 3 ประชากรของแมลงร้นดำชนิด *Simulium quinquestriatum* ที่ทำการศึกษา รายละเอียดและสัญลักษณ์ของประชากรแสดงในตารางที่ 3

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงรืนดำโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยศึกษาแมลงรืนดำชนิด *Simulium tani* จำนวน 147 ตัวอย่างจาก 16 ประชากร (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) *S. nakhonense* จำนวน 123 ตัวอย่างจาก 13 ประชากร (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) และ *S. quinquestriatum* จำนวน 84 ตัวอย่างจาก 11 ประชากร (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3) จัดเรียงสายดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) ใช้โปรแกรม MODELTEST 3.06 (Posada and Crandall 1998) เพื่อทดสอบหาโมเดลของ DNA substitution ที่เหมาะสมโดยใช้ hierarchical likelihood ratio test โดยพบว่า HKY + I + G (Hasegawa *et al.* 1985) เป็นโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ *S. tani* ซึ่งมีค่า $I = 0.6360$ และ $G = 0.6365$ ค่า transition/transversion = 12.0953 องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์มีสัดส่วนดังนี้ $A = 0.319$, $G = 0.160$, $C = 0.124$ และ $T = 0.347$ สำหรับ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* โมเดลของ nucleotide substitution ที่เหมาะสมที่สุดคือ TrN + I + G (Tamura and Nei, 1993) โดยมีค่า $I = 0.7457$ และ $G = 1.3022$ สำหรับ *S. nakhonense* และ $I = 0.7886$ และ $G = 1.2046$ สำหรับ *S. quinquestriatum* ค่าสัดส่วนองค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ของ *S. nakhonense* คือ $A = 0.308$, $C = 0.174$, $G = 0.153$ และ $T = 0.364$ และ *S. quinquestriatum* คือ $A = 0.308$, $C = 0.178$, $G = 0.156$ และ $T = 0.358$

3.4.1 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotype (haplotype network)

วิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotype โดยใช้ median-joining algorithm (Bandelt *et al.*, 1999) ด้วยโปรแกรม NETWORK 3.x (www.fluxus-engineering.com) โดยทำการวิเคราะห์แยกแมลงรืนดำชนิด *S. tani* ออกจาก *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ D3 haplotypes โดยการสร้าง UPGMA tree ด้วยโปรแกรม MEGA (Kumar *et al.*, 2004)

3.4.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร

คำนวณค่าความหลากหลายของ haplotype (haplotype diversity) ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) ค่า $\theta_s = 2Ne\mu$ และค่า F_{ST} ระหว่างประชากรโดยโปรแกรม ARLEQUIN 2.000 (Schneider *et al.*, 2000) โดยใช้ค่า Gamma distribution (G) จาก MODELTEST ทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดย permutation ข้อมูล 1,000 replications ใช้โปรแกรม SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002) เพื่อจัดกลุ่มประชากรตามระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรโดยการกำหนดจำนวนกลุ่มของประชากร (k) โปรแกรมจะจัดกลุ่มประชากรโดยให้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม (F_{SC}) มีค่าต่ำที่สุดและค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (F_{CT}) มีค่าสูงที่สุด ทำการวิเคราะห์โปรแกรม SAMOVA ด้วย 100 simulated annealing processes โดยกำหนดค่า $k = 2$ ถึง 10 (2 – 8 สำหรับ *S. quinquestriatum*) กลุ่มประชากรที่จัดได้มีค่า F_{CT} สูงที่สุดถือว่าเป็นการจัดกลุ่มประชากรที่ดีที่สุด ทำการทดสอบ Isolation by distance โดย

Mantel (1967) test ด้วยโปรแกรม IBD 1.52 (Bohonak, 2002) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางทางภูมิศาสตร์กับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม

3.4.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* โดยวิธีการ Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) โดยจัดกลุ่มประชากรตามสปีชีส์ ทำการทดสอบค่าทางสถิติด้วย permutation 1,000 ซ้ำ โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN

3.4.4 ประวัติศาสตร์ประชากร (Population history)

ทำการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรด้วย mismatch distribution โดยโปรแกรม ARLEQUIN ร่วมกับการใช้หลักการ coalescent theory และการวิเคราะห์ด้วย maximum likelihood framework โดยใช้โปรแกรม LAMARC 1.2.2 (Kuhner *et al.*, 2004) ทำการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรตามกลุ่มประชากรที่จัดโดยโปรแกรม SAMOVA โดยผลของ mismatch distribution จะได้กราฟที่เป็นรูป unimodal สำหรับประชากรที่เกิด population expansion และกราฟจะเป็นรูป multimodal ในประชากรที่มีขนาดไม่เปลี่ยนแปลง (stable population) (Roger and Harpending, 1992) ทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของ mismatch distribution โดย permutation 1000 replications ของชุดข้อมูลและ simulation ข้อมูลภายใต้เงื่อนไขของ stepwise expansion model จากนั้นเปรียบเทียบค่า Sum of Square Deviation (SSD) ระหว่างค่า observed กับ simulation นอกจากนี้ยังทำการคำนวณค่า population expansion parameters ซึ่งประกอบด้วย expansion time ($\tau = 2ut$, โดย $u = m_T\mu$ ซึ่ง m_T คือความยาวของนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทำการศึกษา และ μ คือ mutation rate และ t คือ time in generation) ค่า $\theta_0 = 2\mu N_e$ และ $\theta_1 = 2\mu N_e$ โดย θ_0 คือค่า theta ก่อนเกิด population expansion และ θ_1 คือค่า theta หลังเกิด population expansion โดยค่า θ_1 จะมีค่ามากกว่า θ_0 มากในกรณีที่เกิด population expansion สำหรับการวิเคราะห์ด้วย LAMARC โปรแกรมจะทำการวิเคราะห์หาค่า effective population size ($\theta = 2\mu N_e$), ค่า growth rate (g) และ migration rate ($M=m/\mu$ โดย m คือ migration rate ต่อ generation และ μ คือ mutation rate)

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรด้วย Tajima's D (Tajima, 1989) และ F_s (Fu, 1997) โดยทั้งสองค่านี้จะมีค่าเป็นลบในประชากรที่เกิด population expansion ทดสอบค่าทางสถิติของ Tajima's D และ F_s ด้วย permutation 1,000 ซ้ำ

4. ผลการศึกษา

4.1 ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

Simulium tani

จากความยาวนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษา 720 นิวคลีโอไทด์และตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 147 ตัวอย่างพบว่าเกิดความแปรผันของนิวคลีโอไทด์ 127 ตำแหน่ง ซึ่งทั้งหมดเป็นการแทนที่เบส (base substitution) โดย 110 (86.61%) ตำแหน่ง เป็นการแทนที่แบบ transition และ 17 (13.39%) ตำแหน่ง เป็นการแทนที่แบบ transversion จำนวนแฮพโลไทป์ (haplotypes) ทั้งหมดที่พบคือ 121 แฮพโลไทป์ โดยแฮพโลไทป์ที่มีการกระจายกว้างขวางที่สุดพบใน 4 ประชากรจากภาคเหนือ (TK3) ภาคกลาง (PE1) และภาคใต้ (RN3 และ RN4) ค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (ตารางที่ 4) มีค่าระหว่าง 0.857 – 1.000 ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่าระหว่าง 0.003 – 0.016 โดยระดับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์นี้มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับละติจูด ($R^2 = 0.3501$, $p = 0.016$, ภาพที่ 4)

Simulium nakhonense

จากความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ทำการศึกษา 720 คู่เบส และตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 123 ตัวอย่างจาก 13 ประชากร พบว่าเกิดความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 92 ตำแหน่ง โดยทั้งหมดเป็นการแทนที่เบส (base substitution) การแทนที่เบสส่วนใหญ่ (87 ตำแหน่ง หรือ 94.57%) เป็นการแทนที่แบบ transition และ 5 ตำแหน่ง (5.43%) เป็นการแทนที่แบบ transversion จำนวนแฮพโลไทป์ที่พบทั้งหมดคือ 78 แฮพโลไทป์ โดยแฮพโลไทป์ที่มีการกระจายกว้างที่สุดพบใน 3 ประชากรจากภาคเหนือ (CM2) และภาคกลาง (KB2 และ PE2) ความหลากหลายของแฮพโลไทป์มีค่าระหว่าง 0.318 – 1.000 (ตารางที่ 5) ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) (ตารางที่ 5) มีค่าระหว่าง 0.0005 – 0.017 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.015 ระดับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์นี้มีแนวโน้มลดลงในประชากรภาคใต้เช่นเดียวกับ *S. tani*

Simulium quinquestriatum

จากความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 720 คู่เบส และตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 84 ตัวอย่างจาก 11 ประชากร พบว่าเกิดความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 88 ตำแหน่ง โดยทั้งหมดเป็นการแทนที่เบส ซึ่งส่วนใหญ่ (79 ตำแหน่ง หรือ 89.77%) เป็นการแทนที่แบบ transition และ 9 ตำแหน่ง (10.23%) เป็นการแทนที่แบบ transversion จำนวนแฮพโลไทป์ทั้งหมดที่พบคือ 71 haplotypes ค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์มีค่าระหว่าง 0.000 – 1.000 (ตารางที่ 6) โดยประชากรส่วนใหญ่ (7 จาก 11 ประชากร) มีค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์เป็น 1.000 ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ 0.000 – 0.018 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.016 และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีแนวโน้มลดลงในประชากรจากภาคใต้เช่นเดียวกับ *S. tani* และ *S. nakhonense*

ในจำนวนแฮพโลไทป์ของ COI ยีนของ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ทั้งหมด พบว่ามี 4 แฮพโลไทป์ที่พบในทั้ง 2 สปีชีส์ โดย 3 แฮพโลไทป์พบในประชากรจากภาคใต้และ 1 แฮพโลไทป์ที่เหลือพบที่ภาคกลาง (PE1) เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากรที่มีแฮพโลไทป์ร่วมกันของสองสปีชีส์นี้มีระดับความแปรผันทางพันธุกรรมที่ต่ำ

4.2 ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S ribosomal DNA ส่วน D3 ของประชากร *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ซึ่งมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังนี้

Simulium nakhonense

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S ribosomal DNA ส่วน D3 ส่วนที่ทำการศึกษามีความยาวทั้งหมด 251 คู่เบส จากจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด 14 ตัวอย่าง พบว่าเกิดความแปรผันทั้งหมด 3 ตำแหน่ง โดยเป็นการแทนที่เบส 1 ตำแหน่งและเกิด insertion/deletion 2 ตำแหน่ง จำนวนแฮพโลไทป์ทั้งหมด 2 แฮพโลไทป์ แฮพโลไทป์ที่มีการกระจายกว้างที่สุดพบใน 9 ประชากรจากภาคเหนือ (CM2, MS3, PB และ TK2) ภาคกลาง (KB2 และ PE2) และภาคใต้ (RN1, NS2 และ PG1)

Simulium quinquestriatum

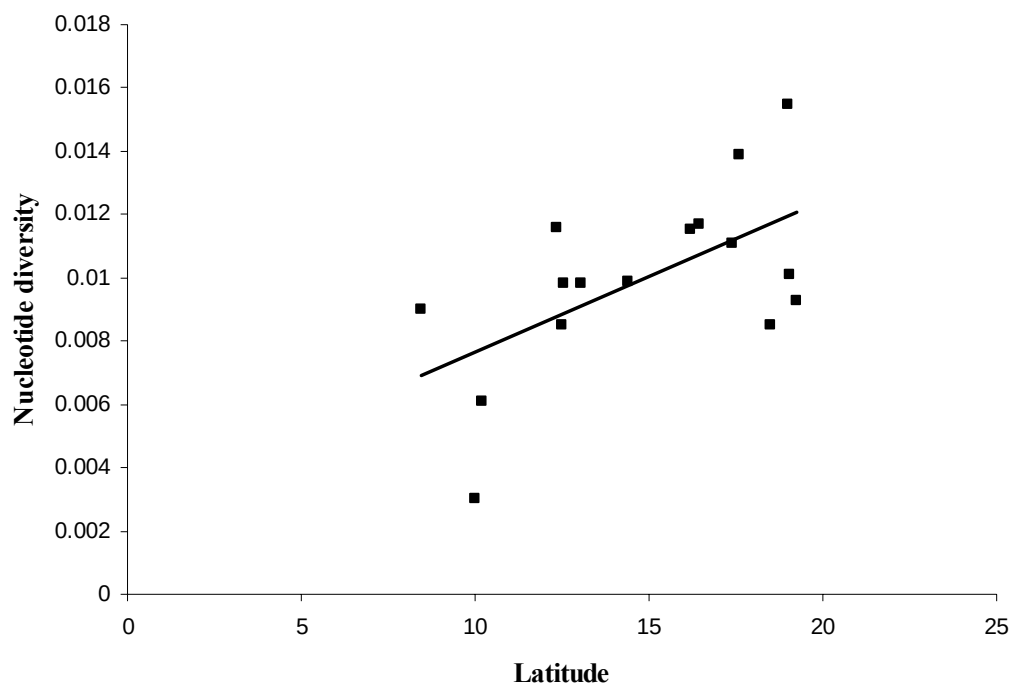
ทำการศึกษาทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ความยาวทั้งหมดของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทำการศึกษาคือ 251 คู่เบสพบความแปรผันทั้งหมด 4 ตำแหน่ง โดยเป็น insertion/deletion 2 ตำแหน่งและเป็นการแทนที่เบส 2 ตำแหน่ง จำนวนแฮพโลไทป์ที่พบคือ 4 แฮพโลไทป์ โดยแฮพโลไทป์ที่กระจายกว้างที่สุดพบใน 5 ประชากรจากภาคเหนือ (CM3 และ KP2) และภาคใต้ (SR1, NS3 และ PG2)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 พบว่าแมลงรึ้นดำ 2 ชนิดนี้ไม่มีแฮพโลไทป์ร่วมและยังพบว่ามี fixed nucleotide difference ระหว่างสองสปีชีส์นี้ 1 ตำแหน่ง

ตารางที่ 4 Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D and F_s ของ 16 ประชากร และ 3 กลุ่มประชากรของแมลงวันคําชนิด *Simulium tani*

ประชากร	n	π_n (SD)	θ_s (SD)	π_h (SD)	Tajima' D	F_s
CM2	11	0.010 (0.006)	0.010 (0.005)	1.000 (0.039)	-0.277	-5.485*
CM5	9	0.016 (0.009)	0.020 (0.009)	1.000 (0.052)	-1.189	-2.648*
MS1	6	0.008 (0.005)	0.009 (0.004)	0.933 (0.122)	-0.198	-0.055
MS2	7	0.009 (0.006)	0.010 (0.005)	0.905 (0.103)	-0.662	0.797
PR	9	0.014 (0.008)	0.017 (0.008)	1.000 (0.052)	-1.168	-2.911*
TK3	10	0.012 (0.007)	0.015 (0.007)	1.000 (0.045)	-1.240	-4.116*
UT	10	0.011 (0.006)	0.015 (0.007)	1.000 (0.045)	-1.435	-4.302*
PB	11	0.012 (0.007)	0.013 (0.005)	1.000 (0.039)	-0.609	-4.990*
KB1	10	0.010 (0.006)	0.011 (0.005)	1.000 (0.045)	-0.553	-4.692*
PE1	8	0.009 (0.005)	0.007 (0.004)	0.964 (0.077)	0.499	-1.520
CB1	10	0.010 (0.006)	0.013 (0.006)	1.000 (0.045)	-1.252	-4.738*
CB2	10	0.012 (0.007)	0.013 (0.006)	0.978 (0.054)	-0.606	-2.181
RY	10	0.010 (0.006)	0.010 (0.005)	0.933 (0.077)	-0.368	-1.181
RN3	9	0.006 (0.004)	0.008 (0.004)	0.972 (0.064)	-1.085	-3.176*
RN4	7	0.003 (0.002)	0.003 (0.002)	0.857 (0.137)	-0.734	-1.447
SR2	10	0.009 (0.005)	0.012 (0.005)	1.000 (0.045)	-1.266	-5.051*
เหนือ	73	0.012 (0.006)	0.029 (0.008)	0.995 (0.004)	-2.050*	-24.793**
ตะวันออก	30	0.011 (0.006)	0.015 (0.005)	0.986 (0.013)	-1.105	-14.517**
กลาง/ใต้	44	0.008 (0.004)	0.014 (0.004)	0.981 (0.011)	-1.612*	-25.432**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) กับละติจูด (latitude)

ตารางที่ 5 ค่า Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D และ F_s ของ 13 ประชากรของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium nakhonense*

Population	n	h	π_n (SD)	π_h (SD)	θ_s (SD)	Tajima' D	F_s
CM1	10	9	0.012 (0.007)	0.978 (0.054)	0.015 (0.007)	-1.025	-1.99
CM2	11	2	0.005 (0.003)	0.327 (0.153)	0.005 (0.002)	-0.176	6.013
MS3	9	9	0.017 (0.010)	1.000 (0.052)	0.015 (0.007)	0.336	-2.423
PB	10	6	0.012 (0.007)	0.778 (0.137)	0.012 (0.005)	-0.159	1.604
TK1	10	8	0.010 (0.006)	0.956 (0.059)	0.012 (0.005)	-0.930	-1.089
TK2	8	8	0.013 (0.007)	1.000 (0.063)	0.014 (0.006)	-0.559	-2.412
KB2	10	6	0.014 (0.008)	0.889 (0.075)	0.011 (0.005)	0.987	1.696
PE2	12	3	0.0005 (0.0006)	0.318 (0.164)	0.001 (0.001)	-1.451*	-1.325*
RN1	8	8	0.006 (0.004)	1.000 (0.063)	0.006 (0.003)	-0.411	-4.414*
RN2	4	4	0.002 (0.002)	1.000 (0.177)	0.002 (0.002)	-0.754	-2.367*
PG1	10	8	0.006 (0.004)	0.956 (0.059)	0.007 (0.003)	-1.093	-2.595
NS1	10	8	0.007 (0.004)	0.933 (0.077)	0.009 (0.004)	-1.182	-1.976
NS2	11	10	0.011 (0.006)	0.982 (0.046)	0.015 (0.006)	-1.415	-3.038
Total	123	78	0.015 (0.008)	0.976 (0.007)	0.024 (0.006)	-1.240	-24.339**

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; h = number of haplotypes in the population

ตารางที่ 6 ค่า Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima' D และ F_s ของ 11 ประชากรของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium quinquestriatum*

Population	n	h*	π_n (SD)	π_h (SD)	θ_s (SD)	Tajima' D	F_s
CM2	10	10	0.018 (0.010)	1.000 (0.045)	0.018 (0.008)	-0.115	-2.890*
CM3	11	10	0.015 (0.008)	0.982 (0.046)	0.016 (0.007)	-0.514	-2.144
CM4	6	3	0.008 (0.005)	0.600 (0.215)	0.009 (0.005)	-1.285	3.056
MS4	9	9	0.016 (0.009)	1.000 (0.052)	0.018 (0.008)	-0.779	-2.605
KP1	5	5	0.012 (0.008)	1.000 (0.126)	0.013 (0.007)	-0.583	-0.574
KP2	9	9	0.016 (0.009)	1.000 (0.052)	0.019 (0.008)	-1.032	-2.618
PE1	4	1	0	0	0	NA	NA
RN3	8	8	0.008 (0.005)	1.000 (0.063)	0.011 (0.005)	-1.422	-3.447*
PG2	10	8	0.008 (0.005)	0.933 (0.077)	0.010 (0.005)	-1.243	-1.749
SR1	6	6	0.007 (0.004)	1.000 (0.096)	0.006 (0.003)	0.576	-2.242*
NS3	6	6	0.006 (0.004)	1.000 (0.096)	0.008 (0.004)	-1.246	-2.358*
Total	84	71	0.016 (0.008)	0.994 (0.003)	0.024 (0.007)	-1.295	-24.444**

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; h = number of haplotypes in the population

4.3 สายสัมพันธ์ของ mitochondrial DNA haplotypes

Simulium tani

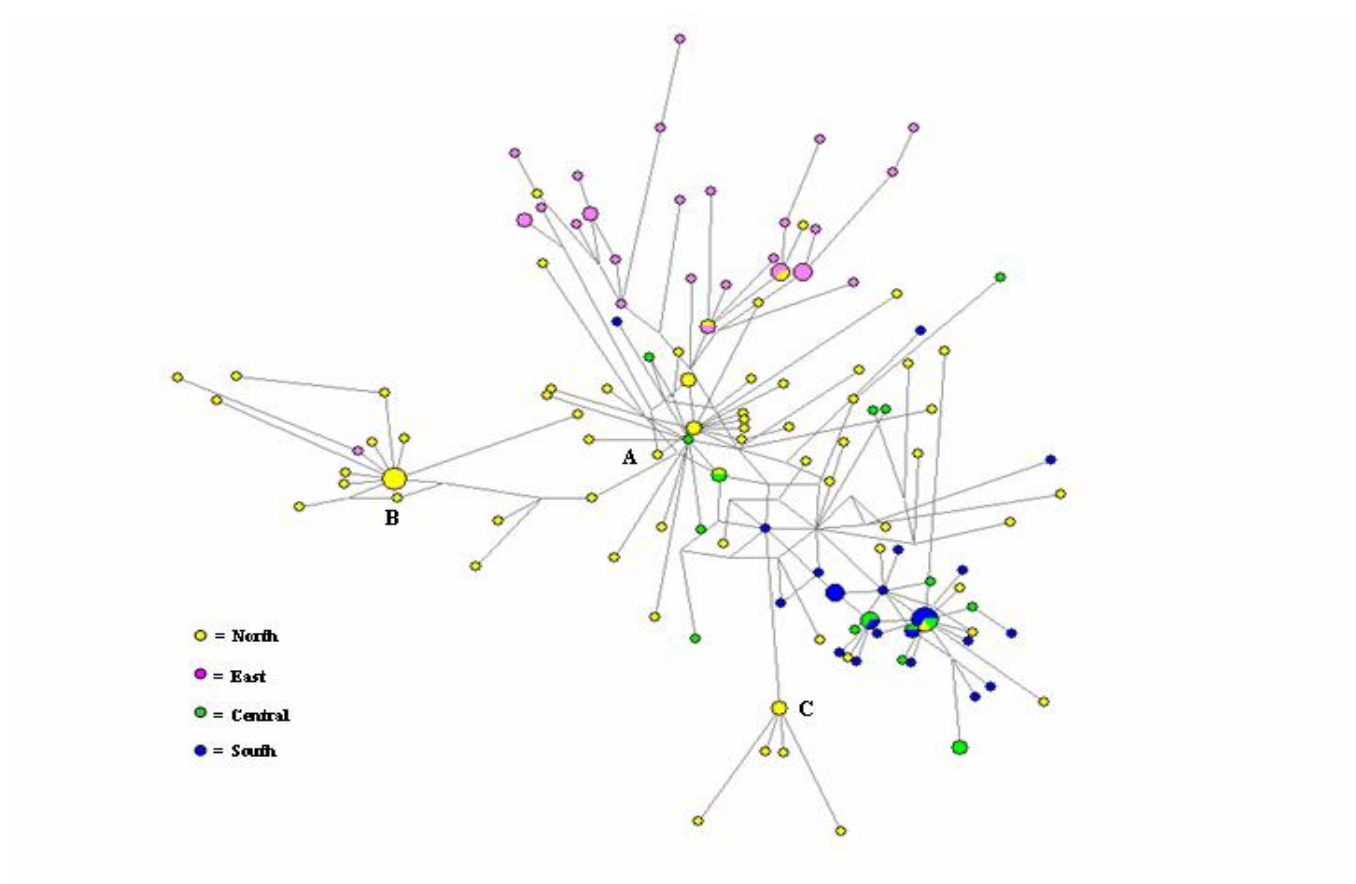
สายสัมพันธ์ของ mitochondrial DNA haplotypes ของ *S. tani* (ภาพที่ 5) พบว่าไม่เกิด phylogeographic breaks แต่มีการเกาะกลุ่มของแฮพโลไทป์จากภูมิภาคเดียวกัน โดยแฮพโลไทป์จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือเกาะกลุ่มกันด้วย branch length ที่ยาว ขณะที่แฮพโลไทป์จากภาคใต้เกาะกลุ่มกับ แฮพโลไทป์ส่วนใหญ่ของภาคกลางด้วย branch length ที่สั้นและมีลักษณะ star-like shape แฮพโลไทป์จากภาคเหนือแบ่งเป็น 3 lineages (A, B และ C, ภาพที่ 5) โดย lineage A เป็นแกนของ network และ subset ของ A เป็นบรรพบุรุษของแฮพโลไทป์จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้

Simulium nakhonense และ *Simulium quinquestriatum*

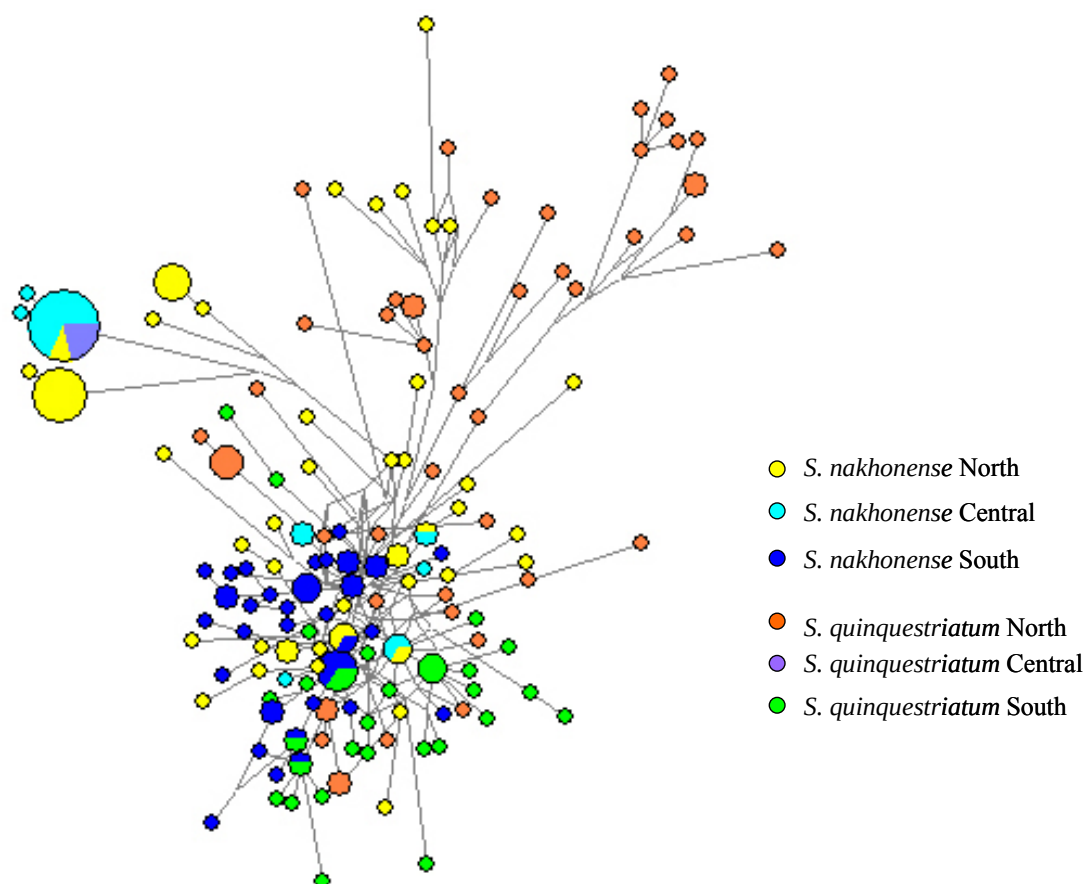
สายสัมพันธ์ของไมโทคอนเดรียลแฮพโลไทป์ของ *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* (ภาพที่ 6) พบว่าแมลงวันคำสองสปีชีส์มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม โดยสายสัมพันธ์ของไมโทคอนเดรียลแฮพโลไทป์ไม่สามารถแยกสองสปีชีส์ออกจากกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามแฮพโลไทป์จากภาคเหนือของ 2 สปีชีส์มีการแยกกันอย่างชัดเจน โดยแฮพโลไทป์จากภูมิภาคนี้แยกเป็น 4 lineages โดย 2 lineages เป็น lineage ของ *S. quinquestriatum* และอีก 1 lineage เป็นของ *S. nakhonense* ยกเว้นแฮพโลไทป์เดียวที่เป็นแฮพโลไทป์ร่วมระหว่าง 2 สปีชีส์ ในขณะที่อีก 1 lineage ประกอบด้วยแฮพโลไทป์ของทั้ง 2 สปีชีส์ แฮพโลไทป์จากภาคใต้ของทั้ง 2 สปีชีส์เกาะกลุ่มกันและมีบางแฮพโลไทป์จากภาคเหนือร่วมอยู่ด้วย โดยกลุ่มของแฮพโลไทป์นี้มีความยาวของ branch สั้น และมีลักษณะ star-like shape ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่เกิดการเพิ่มขนาดอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่สั้น

4.4 สายสัมพันธ์ของ D3 แฮพโลไทป์

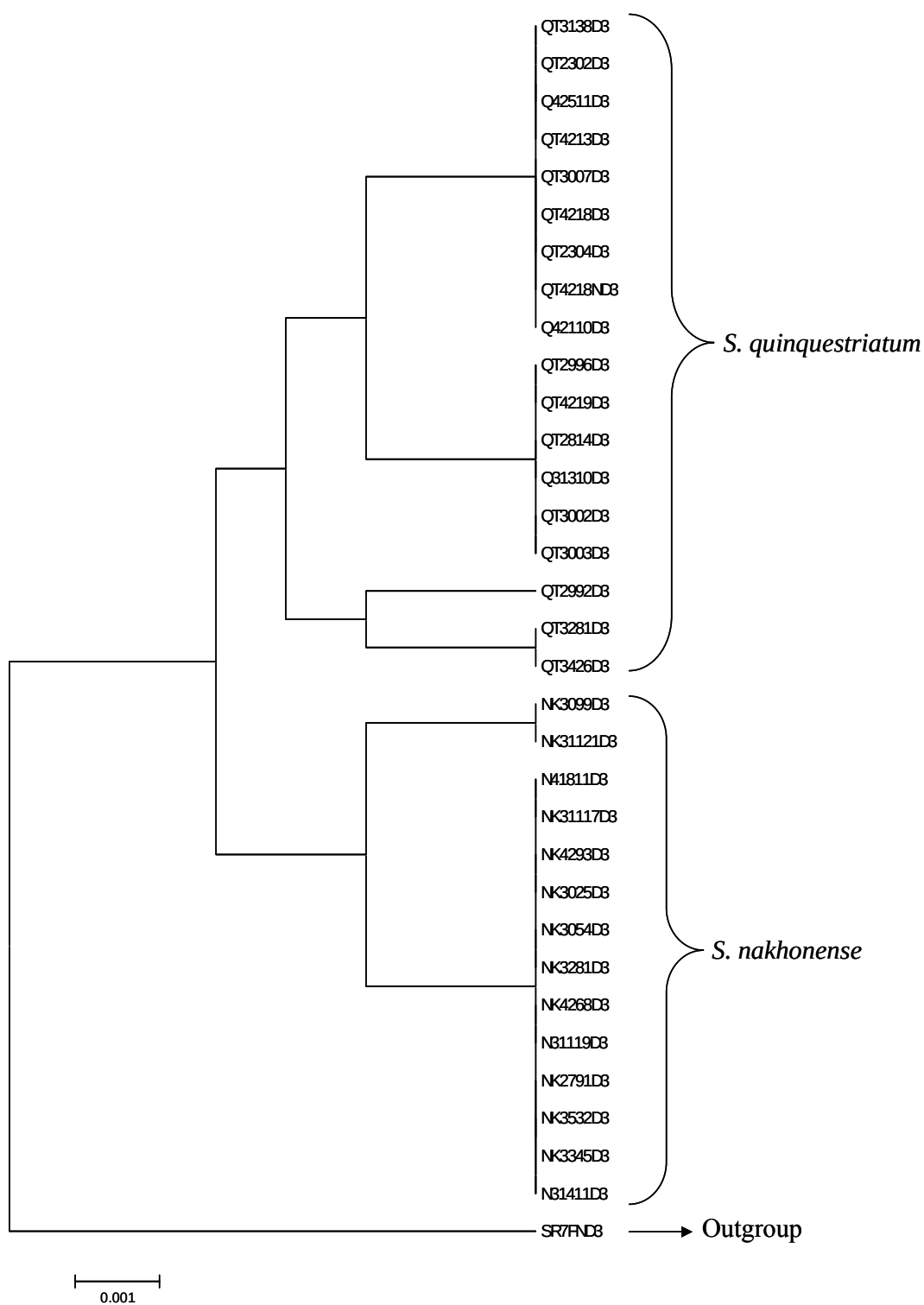
สายสัมพันธ์ของ D3 แฮพโลไทป์ที่คำนวณโดย UPGMA (ภาพที่ 7) พบว่าสามารถแยกแฮพโลไทป์จากทั้ง 2 สปีชีส์ออกจากกันอย่างชัดเจน โดยแฮพโลไทป์ของ *S. nakhonense* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยและกลุ่มแฮพโลไทป์ของ *S. quinquestriatum* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีสายสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มย่อยนี้กับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์



ภาพที่ 5 Median-joining network ของ 147 ตัวอย่างของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium tani* โดยแต่ละวงกลมคือ 1 แสพโทไฟท์และสีของวงกลมหมายถึงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของแสพโทไฟท์ (เหลือง คือ ภาคเหนือ ชมพูคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เขียวคือภาคกลาง และน้ำเงินคือภาคใต้)



ภาพที่ 6 Median-joining network คำนวณโดยโปรแกรม NETWORK ของ 207 ตัวอย่างของแมลงร้นดำ ชนิด *Simulium nakhonense* (123 ตัวอย่าง) และ *Simulium quinquestriatum* (84 ตัวอย่าง) ภาพวงกลมแสดงแต่ละแฮพโลไทป์โดยขนาดของวงกลมเป็นสัดส่วนกับจำนวนตัวอย่างของแต่ละแฮพโลไทป์ สีของวงกลมแสดงถึงสปีชีส์และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของแฮพโลไทป์ (สีเหลือง = *S. nakhonense* ภาคเหนือ, สีฟ้า = *S. nakhonense* ภาคกลาง, สีนํ้าเงิน = *S. nakhonense* ภาคใต้, สีนํ้าตาล = *S. quinquestriatum* ภาคเหนือ, สีม่วง = *S. quinquestriatum* ภาคกลางและสีเขียว = *S. quinquestriatum* ภาคใต้)



ภาพที่ 7 UPGMA tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 ของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestriatum* โดยใช้ *Simulium fenestriatum* เป็น outgroup

4.5 โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรภายในสปีชีส์

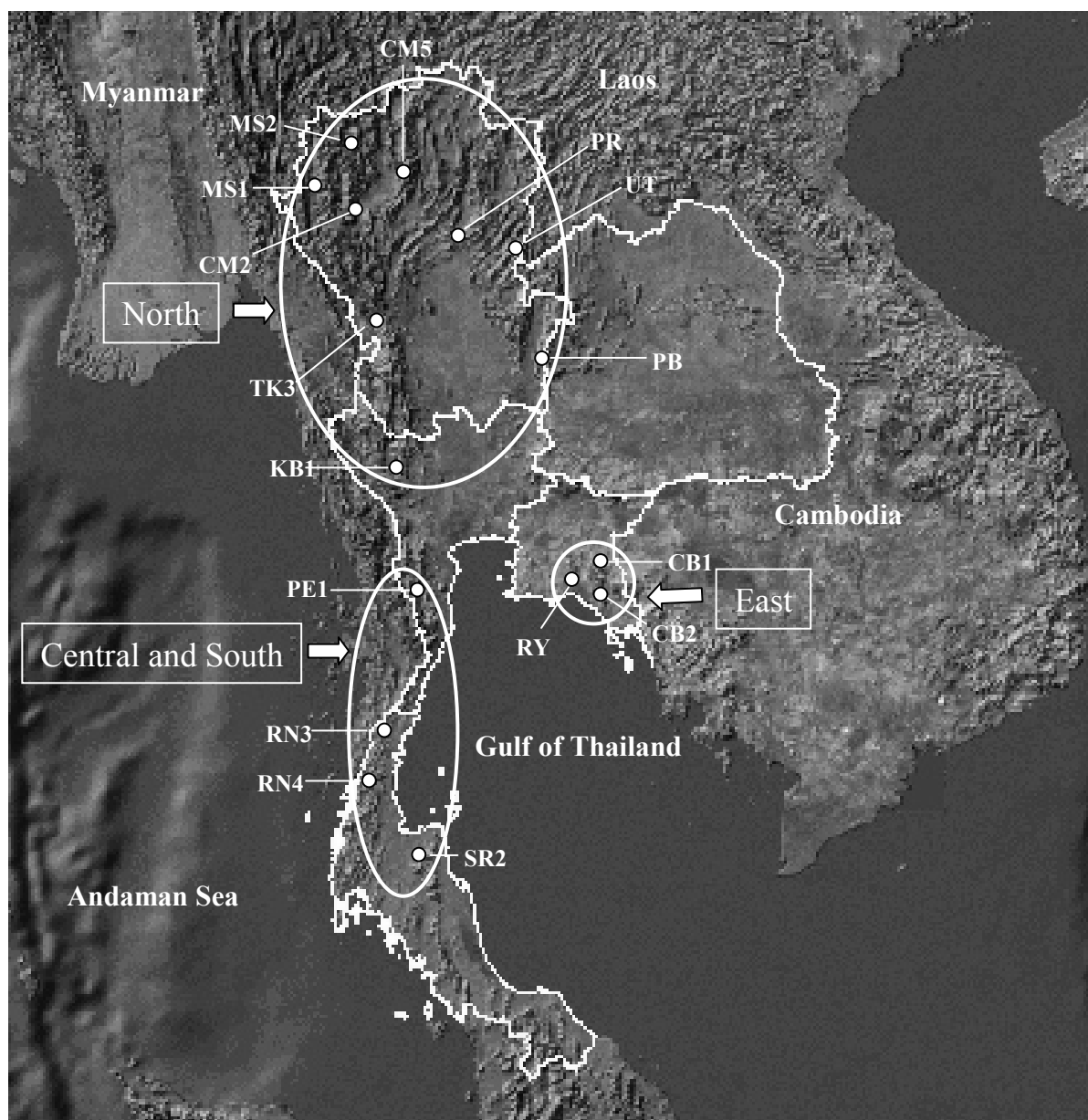
Simulium tani

ผลของ SAMOVA สามารถจัดกลุ่มประชากรได้ 3 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของประชากร (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 8 ประชากรจากภาคเหนือ ได้แก่ CM2 CM5 MS1 MS2 TK3 PB UT และ PR กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 ประชากรจากภาคตะวันออก ได้แก่ CB1 CB2 และ RY กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 2 ประชากรจากภาคกลาง และ 3 ประชากรจากภาคใต้ ได้แก่ KB1 PE1 RN3 RN4 และ SR2 ค่า F_{ST} ระหว่าง 3 กลุ่มประชากรนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7) ผลการทดสอบ Isolation by distance พบว่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ ($r = 0.5146$, $p < 0.001$, ภาพที่ 10)

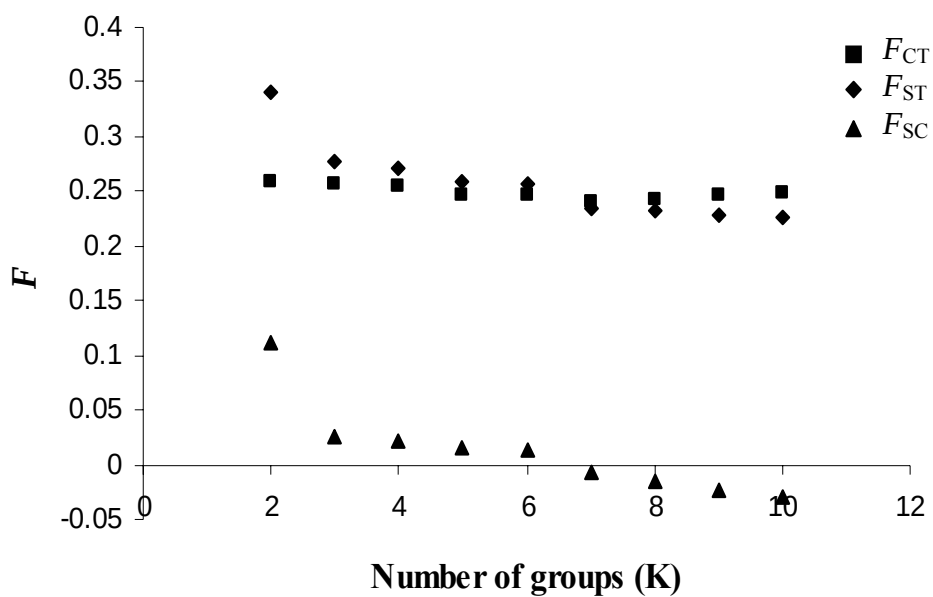
ตารางที่ 7 F_{ST} ระหว่าง 3 กลุ่มประชากรของแมลงริ้นคำชนิด *Simulium tani* ที่จัดโดย SAMOVA

	เหนือ	ตะวันออก	กลาง/ใต้
เหนือ	-		
ตะวันออก	0.240**	-	
กลาง/ใต้	0.192**	0.449**	-

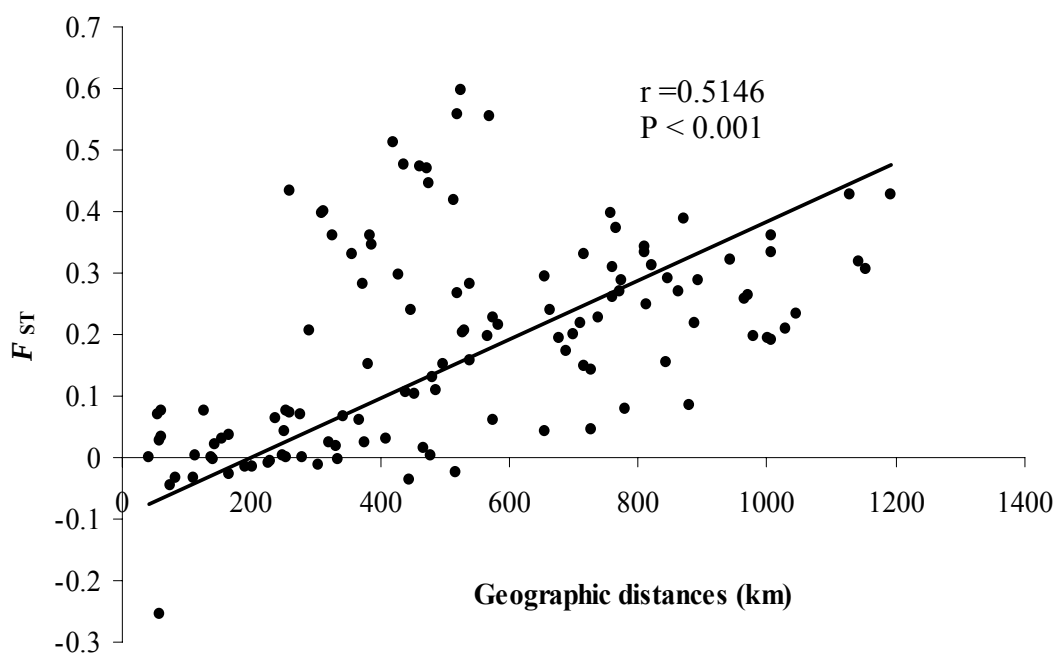
** $P < 0.001$



ภาพที่ 8 กลุ่มประชากรแมลงร้นค้ำชนิด *Simulium tani* ซึ่งจัดกลุ่มโดยใช้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม SAMOVA



ภาพที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของแมลงรึ้นดำชนิด *Simulium tani* จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร



ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางภูมิศาสตร์กับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง 16 ประชากรของแมลงรึ้นดำชนิด *Simulium tani*

Simulium nakhonense

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย AMOVA บ่งชี้ว่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอยู่ในระดับที่สูง (ตารางที่ 8) โดยค่า F_{ST} มีค่าเฉลี่ย 0.430 ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามความแปรผันที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ (57%) เป็นความแปรผันที่เกิดขึ้นภายในประชากร ค่า pairwise F_{ST} ระหว่างประชากร (ตารางที่ 9) มีค่าสูงและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยกเว้นประชากรในภาคใต้ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับที่ต่ำ การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วย SAMOVA พบว่าค่า F_{CT} มีค่าสูงและมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกจำนวนกลุ่มประชากร (k) ที่ทำการวิเคราะห์ (ภาพที่ 11) บ่งชี้ว่ามียีนพูล (gene pool) หลายยีนพูลในประชากร ซึ่งสอดคล้องกับผลของ pairwise F_{ST} และ AMOVA การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (Isolation by distance) (ภาพที่ 12) พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.2461$, $p = 0.007$)

Simulium quinquestriatum

ผลของ AMOVA (ตารางที่ 8) บ่งชี้ว่าประชากรของ *S. quinquestriatum* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า F_{ST} เฉลี่ย 0.273 ($p < 0.001$) โดยความแปรผันที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ (73%) เป็นความแปรผันภายในประชากร ผลของ pairwise F_{ST} (ตารางที่ 10) สอดคล้องกับผลของ AMOVA โดยที่ค่า F_{ST} ระหว่างประชากรส่วนใหญ่มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์โดย SAMOVA (ภาพที่ 13) พบว่าค่า F_{CT} ในทุกจำนวนกลุ่มประชากรมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงให้เห็นว่าประชากรของ *S. quinquestriatum* ประกอบด้วยหลายยีนพูล จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.3151$, $p = 0.005$) (ภาพที่ 14)

4.6 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *Simulium nakhonense* และ

Simulium quinquestriatum

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย AMOVA โดยการจัดกลุ่มประชากรเป็น 2 กลุ่มตามสปีชีส์ (ตารางที่ 8) พบว่า *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{CT} = 0.006$, $p = 0.289$) ผลของ AMOVA นี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดย UPGMA tree โดยใช้ค่า pairwise F_{ST} ระหว่างประชากร (ภาพที่ 15) ซึ่งไม่สามารถแยกกลุ่มประชากรจากแต่ละสปีชีส์อย่างชัดเจนโดยประชากรจากภาคใต้ของทั้ง 2 สปีชีส์เกาะกลุ่มกันด้วย branch ที่สั้นบ่งชี้ว่าประชากรเหล่านี้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับประชากรทางด้านตะวันตกของประเทศของทั้งสองสปีชีส์ (MS3, MS4, KP1, KP2 และ CM1) อย่างไรก็ตามประชากรจากภาคเหนือมีการแยกจากกันค่อนข้างชัดเจนด้วย branch ที่ยาว ซึ่งบ่งชี้ถึงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับที่สูง

ตารางที่ 8 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) ภายในสปีชีส์ และระหว่างสปีชีส์ของแมลงวันคําชนิด *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestriatum*

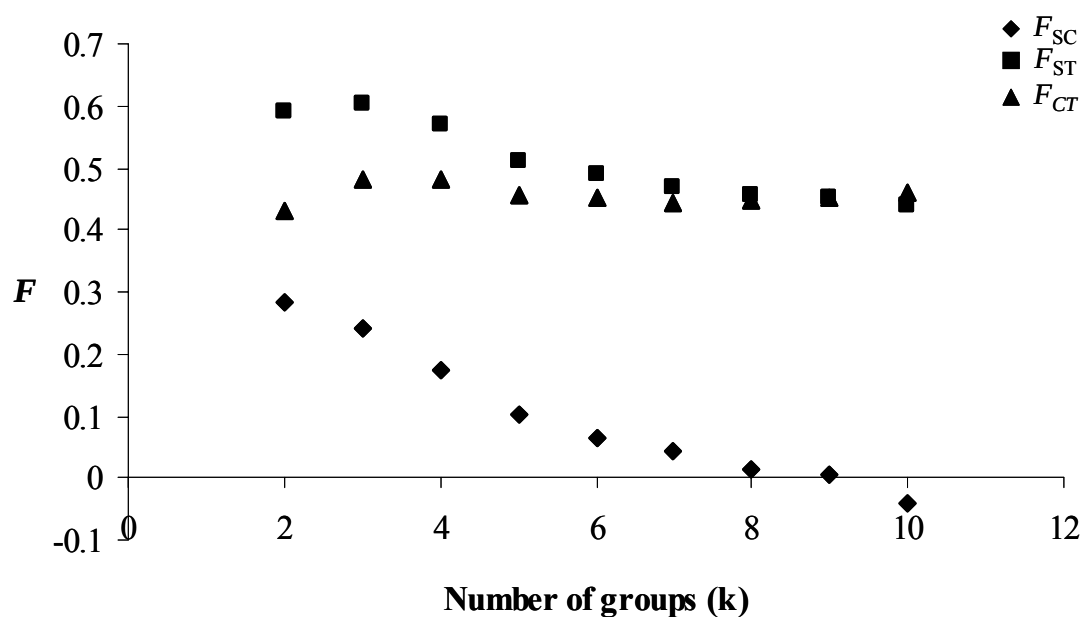
Source of variation	Variance components	Percent of total	F_{CT}	F_{ST}	F_{SC}
Within species					
<i>S. nakhonense</i>					
Within population	3.22	57.03			
Among populations	2.42	42.97		0.430**	
<i>S. quinquestriatum</i>					
Within population	4.16	27.31			
Among populations	1.56	72.69		0.273**	
Among species (<i>S. nakhonense</i> and <i>S. quinquestriatum</i>)					
Within population	3.60	62.93			0.367**
Among populations	2.09	36.50		0.371**	
within species					
Among species	0.03	0.57	0.006		

Note: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

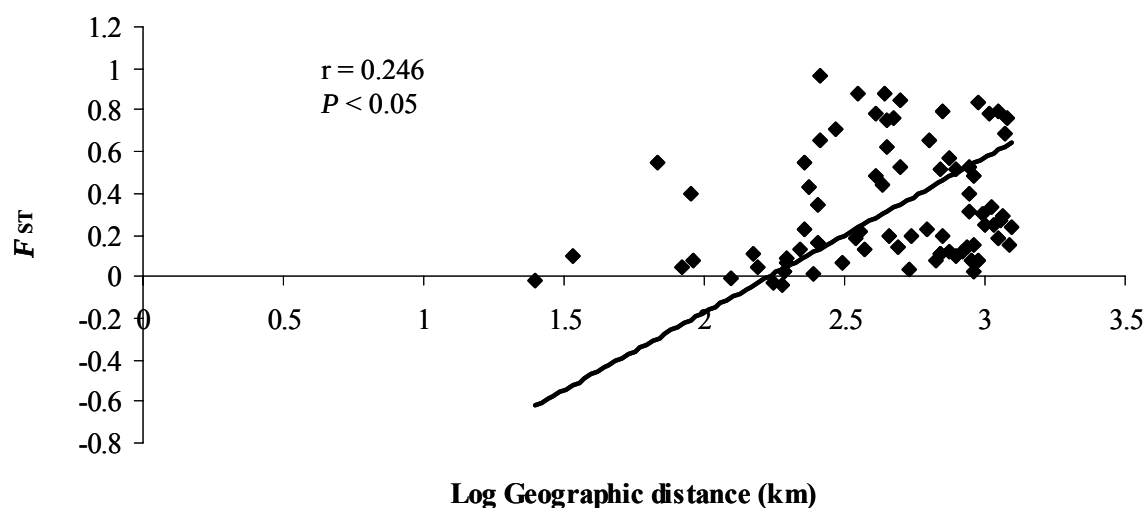
ตารางที่ 9 Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของแมลงวันคําชนิด *Simulium nakhonense*

	CM1	CM2	MS3	PB	TK1	TK2	KB2	PE2	RN1	RN2	PG1	NS1	NS2
CM1													
CM2	0.542**												
MS3	-0.006	0.401**											
PB	0.136*	0.488**	0.143*										
TK1	0.231**	0.709**	0.187*	0.428**									
TK2	0.092*	0.651**	0.069	0.339**	0.101*								
KB2	0.045	0.530**	0.035	0.218*	0.126*	0.064							
PE2	0.654**	0.791**	0.566**	0.618**	0.782**	0.755**	0.548**						
RN1	0.299**	0.779**	0.243*	0.512**	0.125*	0.100*	0.193*	0.877**					
RN2	0.314*	0.832**	0.243*	0.516**	0.072	0.112	0.191*	0.962**	0.082				
PG1	0.335**	0.790**	0.293**	0.529**	0.119**	0.137**	0.231**	0.874**	0.047	-0.026			
NS1	0.270**	0.762**	0.242**	0.485**	0.153**	0.078*	0.192*	0.843**	0.022	0.161*	0.108*		
NS2	0.179*	0.681**	0.152*	0.401**	0.072*	0.028	0.109*	0.757**	-0.037	0.017	0.044	-0.023	

Note: $P < 0.05$ ** $P < 0.001$



ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของแมลงรึ้นค้ำชนิด *Simulium nakhonense* จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร

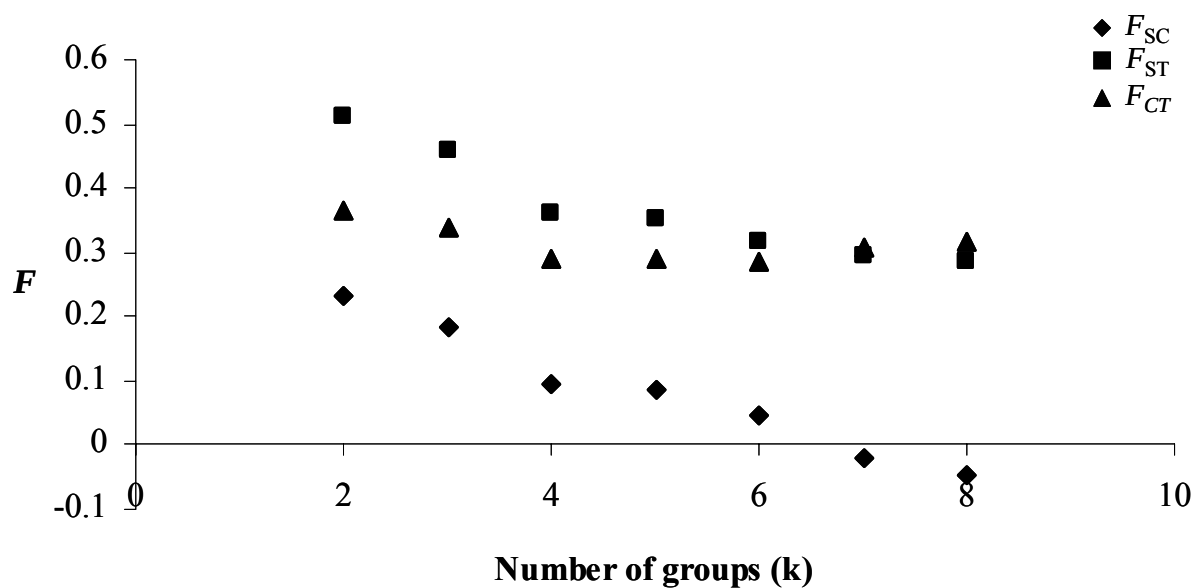


ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) และระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (log km) ระหว่างประชากรของแมลงรึ้นค้ำชนิด *Simulium nakhonense*

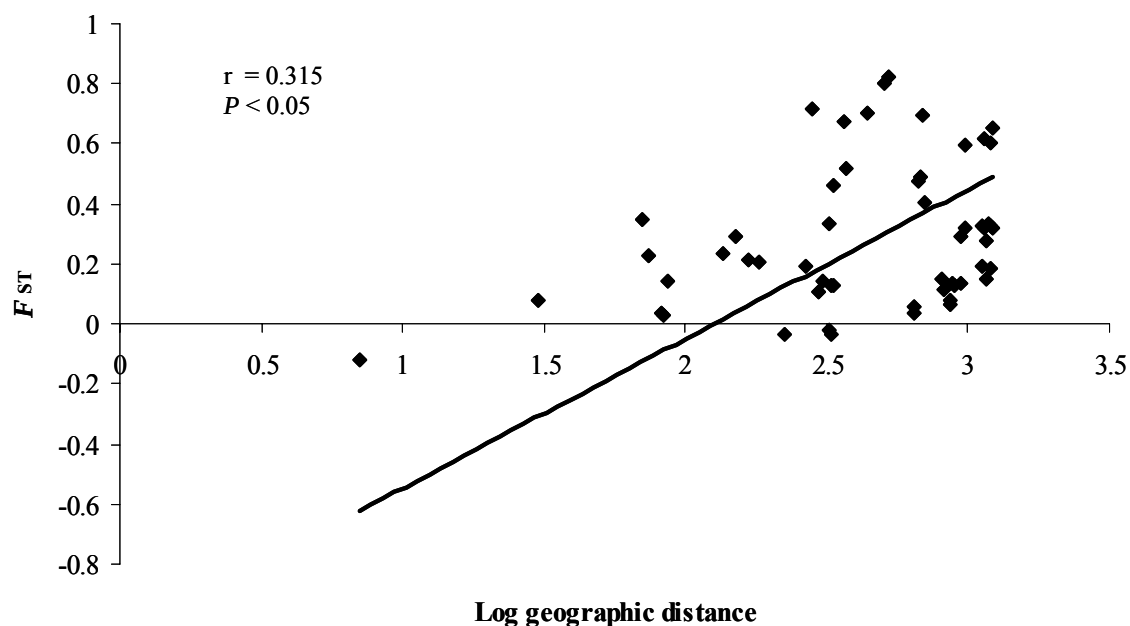
ตารางที่ 10 Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium quinquestriatum*

	CM2	CM3	CM4	MS4	KP1	KP2	PE1	RN3	PG2	SR1	NS3
CM2											
CM3	0.076										
CM4	0.228*	0.350*									
MS4	0.037	0.027	0.292**								
KP1	0.130*	0.141*	0.463*	-0.034							
KP2	0.130*	0.104*	0.335*	-0.024	-0.119						
PE1	0.407**	0.479**	0.694*	0.488**	0.677*	0.516**					
RN3	0.323**	0.291**	0.594**	0.137*	0.038	0.057*	0.713*				
PG2	0.333**	0.279**	0.602**	0.147*	0.068	0.079*	0.705**	-0.033			
SR1	0.323**	0.325**	0.618**	0.193*	0.148*	0.115*	0.801*	0.208*	0.235**		
NS3	0.322**	0.328**	0.654**	0.186*	0.135*	0.130*	0.824**	0.195*	0.216**	0.141	

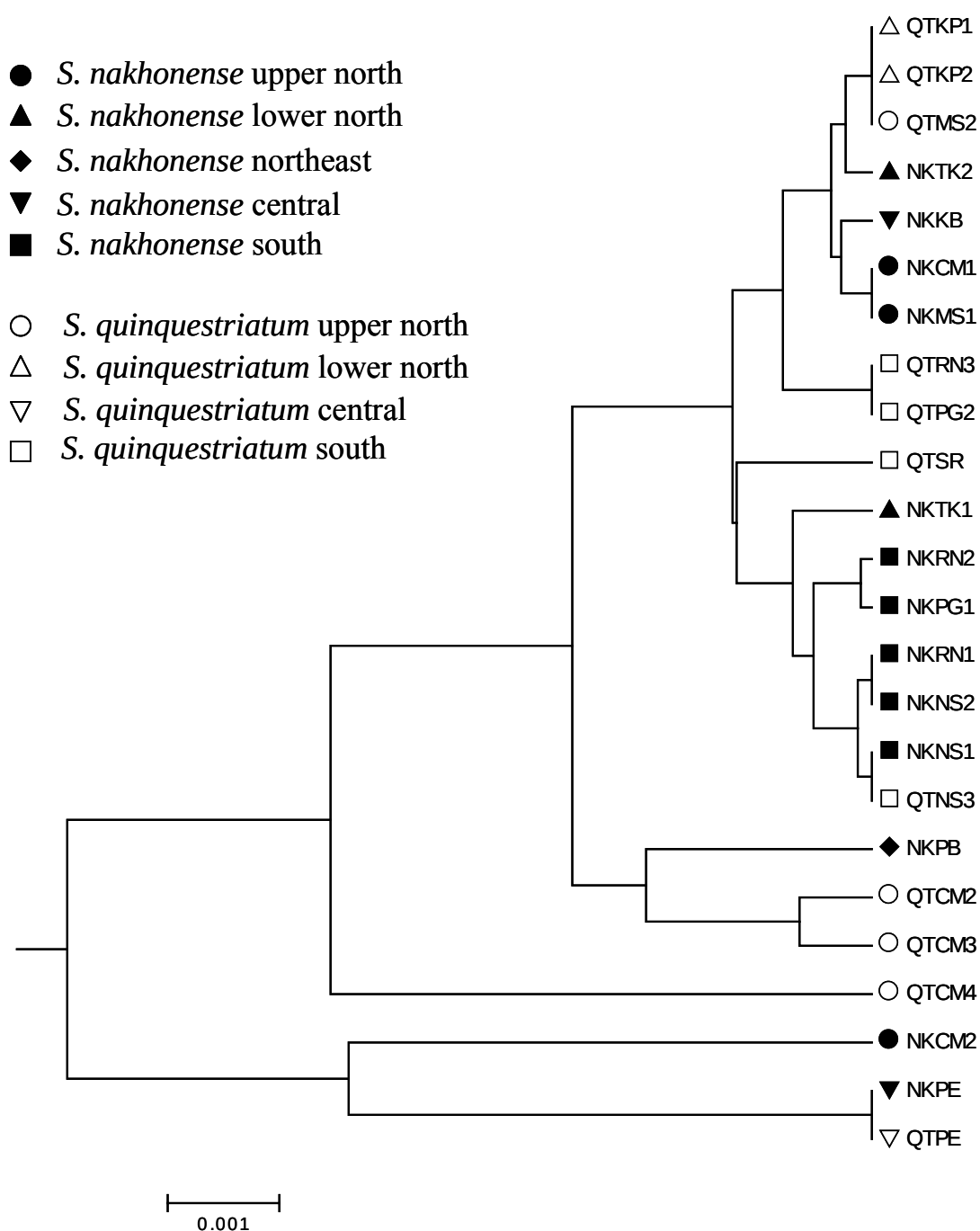
Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$



ภาพที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า fixation indices (F) และจำนวนกลุ่มประชากร (k) ของแมลงรึ้นคำชนิด *Simulium quinquestriatum* จากการวิเคราะห์ด้วย SAMOVA F_{CT} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร F_{ST} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและ F_{SC} คือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร



ภาพที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) และระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (log km) ระหว่างประชากรของแมลงรึ้นคำชนิด *Simulium quinquestriatum*



ภาพที่ 15 UPGMA tree คำนวณโดยใช้ค่า pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรของแมลงร้นคำชนิด *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestriatum*

4.7 ประวัติศาสตร์ประชากร (Population history)

Simulium tani

ค่า Tajima' D และ F_s มีค่าเป็นลบและมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากศูนย์ในทั้ง 3 กลุ่มประชากร (ยกเว้น Tajima' D ของกลุ่มประชากรภาคตะวันออก) (ตารางที่ 4) กราฟ mismatch distribution ของทั้ง 3 กลุ่มประชากร (ภาพที่ 16) สอดคล้องกับกราฟที่ได้จากการ simulated ข้อมูลภายใต้เงื่อนไขของ population expansion ค่า θ_1 มีค่ามากกว่า θ_0 ในทั้ง 3 กลุ่มประชากร (ตารางที่ 11) ค่า growth rate (ตารางที่ 12) มีค่าเป็นบวกในทั้ง 3 กลุ่มประชากร จากผลของการวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าประชากรทั้ง 3 กลุ่มเกิด population expansion ค่า expansion time ของกลุ่มประชากรภาคเหนือและภาคตะวันออกมีค่าใกล้เคียงกัน ($\tau = 8.884$ และ 8.221 ซึ่งเท่ากับ 540,000 และ 500,000 ปี ตามลำดับ) ในขณะที่กราฟ mismatch distribution ของกลุ่มประชากรภาคกลาง/ใต้เป็นรูป bimodal บ่งชี้ว่าประชากรในกลุ่มนี้เกิด population expansion 2 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกันโดย peak ของกราฟด้านซ้ายมีค่า $\tau = 1.774$ (ประมาณ 100,000 ปี) ขณะที่ peak ด้านขวามีค่าใกล้เคียงกับค่าของกลุ่มประชากรภาคเหนือกับภาคตะวันออก สำหรับ effective population size (θ) ของกลุ่มประชากรภาคเหนือมีค่า 3.740 กลุ่มประชากรภาคตะวันออกมีค่า 0.189 และกลุ่มประชากรภาคกลาง/ใต้มีค่า 0.240

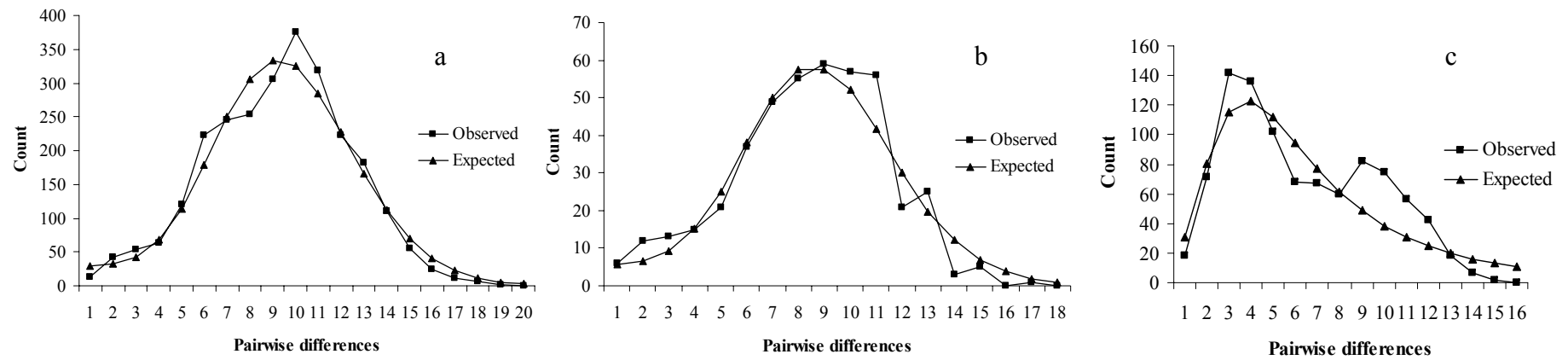
Simulium nakhonnense

Tajima' D (-1.240, $p = 0.105$) และ F_s (-24.339 $p < 0.0001$) (ตารางที่ 5) ที่มีค่าเป็นลบบ่งชี้ว่าเกิด population expansion ผลของ mismatch distribution (ภาพที่ 17a, b) ได้กราฟที่มีลักษณะเป็น multimodal ซึ่งเป็นลักษณะของกราฟของประชากรที่มีขนาดคงที่ อย่างไรก็ตามกราฟ multimodal อาจเกิดจากปัจจัยอื่นด้วยเช่น ประชากรเกิด spatial population expansion แต่ระดับการถ่ายยีนระหว่างประชากรต่ำ (Ray *et al.*, 2003) จากการวิเคราะห์ mtDNA genealogy ของ *S. nakhonnense* (ภาพที่ 6) จะเห็นว่าประกอบด้วยหลายๆ lineages ในขณะที่ 3 lineages มีลักษณะ star-like shape ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิด recent population expansion (Slatkin and Hudson, 1991) ดังนั้นกราฟ mismatch distribution ที่เป็น multimodal อาจเป็นผลมาจากการเกิด spatial population expansion แต่ระดับการถ่ายยีนระหว่างประชากรอยู่ในระดับต่ำดังจะเห็นได้จากผลของ pairwise F_{ST} ระหว่างประชากร ในขณะที่ประชากรภาคเหนือประกอบด้วยหลายๆ lineages แต่ประชากรจากภาคใต้นั้นไม่มี lineage ที่แบ่งแยกอย่างชัดเจน แต่แอฟโฟลไทป์เกาะกลุ่มกันด้วยความยาวของ branch ที่สั้นและมีลักษณะของ star-like shape ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่เกิด recent population expansion สอดคล้องกับ mismatch distribution ของประชากรจากภูมิภาคนี้ซึ่งมีกราฟเป็นรูป unimodal (ภาพที่ 17c) โดยช่วงเวลาที่เกิด population expansion ของประชากรในภาคใต้นี้ค่าประมาณ 280,000 ปีที่ผ่านมา

Simulium quinquestriatum

ผลของ mismatch distribution (ภาพที่ 18a, b) บ่งชี้ว่าเกิด population expansion ในประชากรของ *S. quinquestriatum* โดยกราฟ mismatch distribution ที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion ($SSD = 0.004$ $p = 0.364$) ซึ่งสอดคล้องกับค่า Tajima' D (-1.295 $p=0.095$) และ F_s (-24.44 $p<0.0001$) ที่ค่าเป็นลบ (ตารางที่ 6) การวิเคราะห์ growth rate ด้วย maximum likelihood (ตารางที่ 13) พบว่ามีค่าเป็นบวก ($g = 404.625$) และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการ simulation ข้อมูลภายใต้เงื่อนไขของประชากรที่มีขนาดคงที่ ($\chi^2 = 10.007$ $p<0.005$) จากผลข้างต้นบ่งชี้ว่าประชากรของ *S. quinquestriatum* เกิด population expansion ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion แสดงในตารางที่ 14 โดยช่วงเวลาที่เกิดคือประมาณ 760,000 ปีที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามเช่นเดียวกับ *S. nakhonense* ผลของสายสัมพันธ์ของแฮพโลไทป์ที่พบว่าแฮพโลไทป์จากภาคใต้ซึ่งเกาะกลุ่มกันด้วย branch ที่สั้นและมีลักษณะเป็น star-like shape ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่เกิด population expansion ในช่วงเวลาไม่นานที่ผ่านมา จากการวิเคราะห์ด้วย mismatch distribution ของแฮพโลไทป์จากภาคใต้พบว่าได้กราฟที่เป็น unimodal (ภาพที่ 18c) สอดคล้องกับการเกิด population expansion โดยช่วงเวลาที่เกิดคือประมาณ 400,000 ปีที่ผ่านมา จากผลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าประชากรของ *S. quinquestriatum* เกิด population expansion อย่างน้อย 2 ครั้งที่มีความแตกต่างทั้งตำแหน่งที่เกิดและช่วงเวลาที่เกิดเช่นเดียวกับ *S. tani*



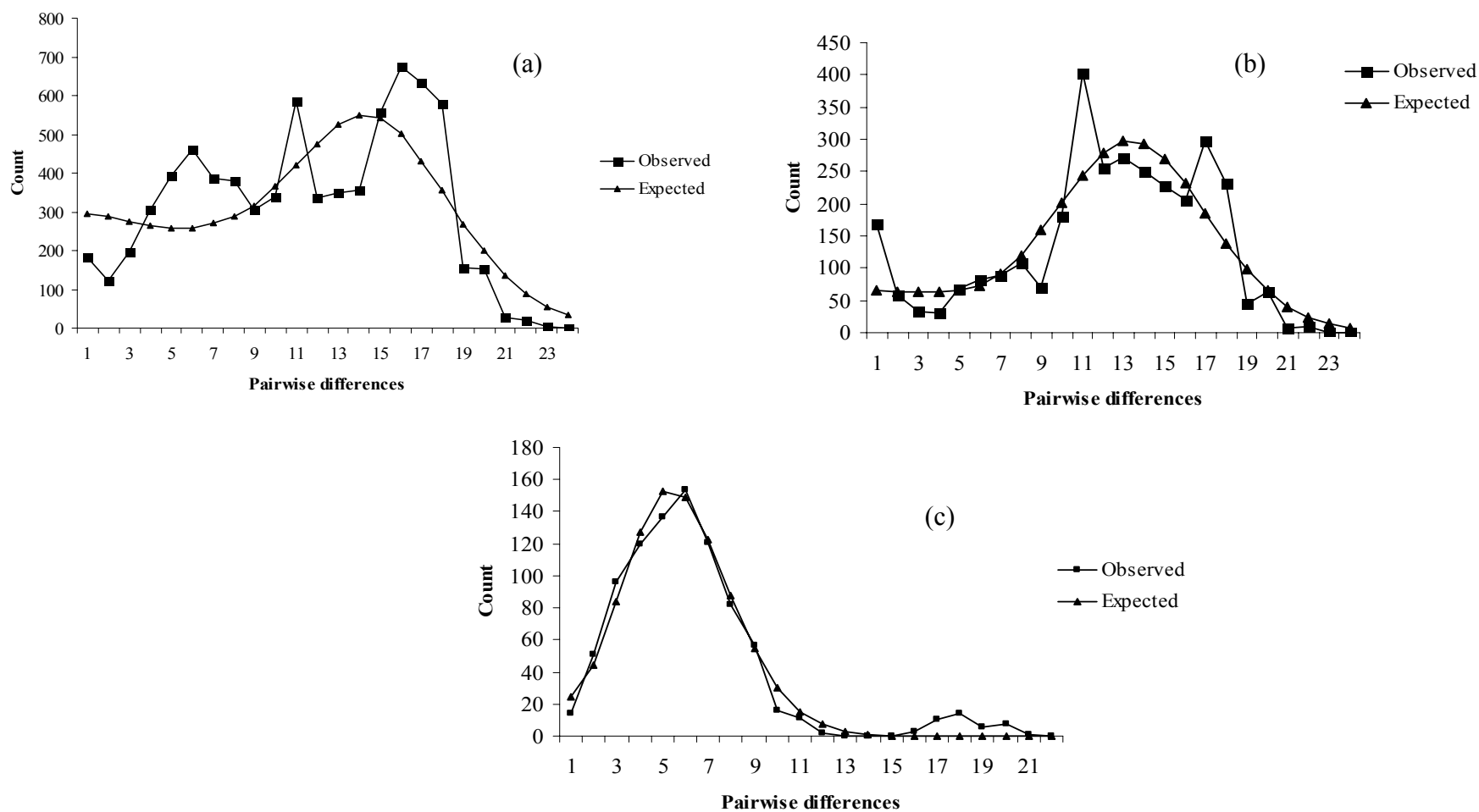
ภาพที่ 16 Mismatch distribution ของกลุ่มประชากรของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium tani* (a) ภาคเหนือ (b) ภาคตะวันออก และ (c) ภาคกลาง/ใต้

ตารางที่ 11 ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion ของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium tani*

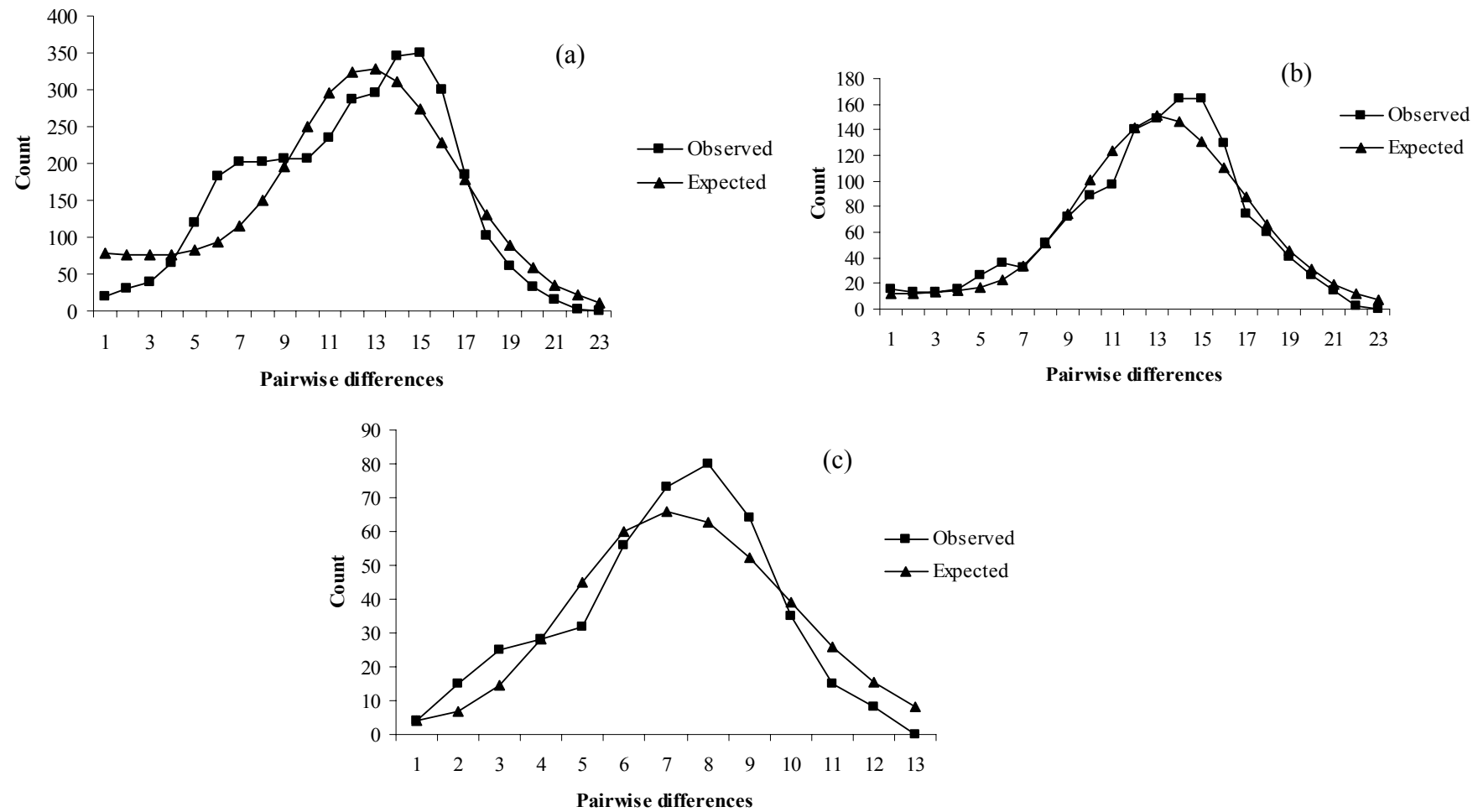
ภูมิภาค	N	$\tau = 2ut$ (95% interval)	$\theta_0 = 2uN_0$ (95% interval)	$\theta_1 = 2uN_1$ (95% interval)
เหนือ	73	8.884 (6.189-10.739)	0.006 (0.000-2.821)	88.242 (45.849-6619.492)
ตะวันออก	30	8.221 (4.912-10.366)	0.000 (0.000-2.762)	75.469 (34.044-6795.469)
กลาง/ใต้	44	1.774 (0.409 – 6.337)	4.225 (0.000-12.032)	6657.500 (32.266-7542.500)

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ด้วย Maximum likelihood เพื่อหาขนาดประชากร ($\theta = 2N_\mu$), growth rates (g) และ migration rates ($M=m/\mu$) ของ 3 กลุ่มประชากรของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium tani*.

กลุ่มประชากร (i)	$\theta = 2N_\mu$	g	M		
			$N \rightarrow i$	$E \rightarrow i$	$CS \rightarrow i$
เหนือ(N)	3.740	1929.776	-	11.08	55.63
ตะวันออก(E)	0.189	1081.865	45.66	-	5.78×10^{-5}
กลาง/ใต้ (CS)	0.240	1435.017	164.36	2.7×10^{-4}	-



ภาพที่ 17 Mismatch distributions ของแมลงร้นคำชนิด *Simulium nakhonense* โดยกราฟมีลักษณะเป็น multimodal เมื่อวิเคราะห์ประชากรทั้งหมด (a) ประชากรภาคเหนือ (b) ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่มีขนาดคงที่ (คู่คำอธิบายในเนื้อหาประกอบ) และประชากรภาคใต้ (c) เป็น unimodal ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่เกิด population expansion



ภาพที่ 18 Mismatch distributions ของแมลงร้นคำชนิด *Simulium quinquestriatum* (a) ประชากรทั้งหมด (b) ภาคเหนือ และ (c) ภาคใต้ โดยกราฟไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการ simulation ภายใต้เงื่อนไขของการเกิด population expansion

ตารางที่ 13 ค่า growth rate ที่คำนวณ โดย maximum likelihood ภายใต้เงื่อนไขของ exponential growth model ของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestratum*

	Model	θ	Growth rate (g)	ln L	χ^2
<i>S. nakhonense</i>	stable	0.1252 (0.0960 – 0.1713)	-	0.4048	8.054**
	Growth	0.4925 $\pm$ 0.0362	430.399	4.4320	
<i>S. quinquestratum</i>	stable	0.1087 (0.0889 – 0.1355)	-	2.2210	10.007**
	Growth	0.2880 $\pm$ 0.0160	404.625	12.2283	

**P<0.005

ตารางที่ 14 ค่าพารามิเตอร์ของการเกิด population expansion ของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestratum* คำนวณ โดย stepwise expansion model

Region	N	$\tau = 2ut$ (95% interval)	$\theta_0 = 2uN_0$ (95% interval)	$\theta_1 = 2uN_1$ (95% interval)
<i>Simulium nakhonense</i>				
North	80	13.156 (6.511-18.149)	0.004 (0.000-6.390)	47.697 (24.741-4548.197)
South	43	4.599 (2.006-7.612)	0.373 (0.000-3.126)	45.898 (13.391-7504.648)
All	123	14.618 (4.675-22.618)	0.003 (0.000-8.716)	24.344 (10.008-148.407)
<i>Simulium quinquestratum</i>				
North	54	12.935 (7.827-16.682)	0.005 (0.000-4.781)	111.016 (45.664-6548.516)
South	30	6.721 (3.449-8.842)	0.003 (0.000-3.082)	123.594 (24.733-8871.094)
All	84	12.616 (5.626-17.561)	0.073 (0.000-6.109)	44.077 (18.743-6634.077)

4.8 ประวัติการอพยพ

Simulium tani

จากการวิเคราะห์การอพยพของประชากรโดย maximum likelihood (ตารางที่ 12) พบว่าการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคอื่นๆมีค่าสูงกว่าการอพยพจากประชากรอื่นมายังภาคเหนือ ในขณะที่การอพยพระหว่างกลุ่มประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับกลุ่มประชากรภาคกลาง/ใต้ มีค่าต่ำมากหรืออาจไม่เกิดขึ้นเลย

Simulium nakhonense

จากการคำนวณค่าการอพยพระหว่างกลุ่มประชากรภาคเหนือ (CM1, CM2, MS3, PB, TK1, TK2, KB2 และ PE2) กับกลุ่มประชากรภาคใต้ (RN1, RN2, PG1, NS1 และ NS2) ด้วย maximum likelihood พบว่าการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคใต้มีค่าสูงกว่าการอพยพในทิศทางตรงกันข้ามมาก (ตารางที่ 15) โดยการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคใต้มีค่าประมาณ 5 เท่าของการอพยพจากภาคใต้ไปยังภาคเหนือ

Simulium quinquestriatum

จากการคำนวณค่าการอพยพระหว่างกลุ่มประชากรภาคเหนือ (CM2, CM3, CM4, MS4, KP1, KP2 และ PE1) กับกลุ่มประชากรภาคใต้ (RN3, PG2, SR1 และ NS3) ด้วย maximum likelihood พบว่าการอพยพจากกลุ่มประชากรภาคเหนือไปยังกลุ่มประชากรภาคใต้มีค่าสูงกว่าการอพยพในทิศทางตรงกันข้ามมาก (ตารางที่ 15) โดยการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคใต้มีค่าประมาณ 30 เท่าของการอพยพจากภาคใต้ไปยังภาคเหนือ

ตารางที่ 15 ขนาดประชากร ($\theta = 2N_f\mu$), exponential growth rates (g) และ migration rates ($M = m/\mu$) คำนวณ โดย maximum likelihood ของกลุ่มประชากรของแมลงริ้นดำชนิด *Simulium nakhonense* และ *Simulium quinquestriatum*

Population group (i)	$\theta= 2N_{\text{f}}\mu$	g	M	
			$N \rightarrow i$	$S \rightarrow i$
<i>S. nakhonense</i>				
North (N)	0.087	176.283	83.94	-
South (S)	0.174	1310.280	-	17.17
<i>S. quinquestriatum</i>				
North (N)	0.287	450.386	175.35	-
South (S)	0.145	1200.026	-	6.65

5. อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

Simulium tani

ระดับความแปรผันทางพันธุกรรมของรีนคำชนิด *S. tani* อยู่ในระดับที่สูงบ่งชี้ว่าประชากรของแมลงรีนคำชนิดนี้มีเสถียรภาพสอดคล้องกับการวิเคราะห์ผลของขนาดประชากร (θ) ที่พบว่าประชากรมีขนาดใหญ่ การเกิด population expansion ในช่วงกลางของยุคไพลโทซีน (Pleistocene) เมื่อประมาณ 500,000 ปีที่แล้วอาจเป็นผลมาจากการที่ประชากรของแมลงรีนคำชนิดนี้ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในช่วงเวลาดังกล่าวอันเป็นผลสืบเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศของโลก กลุ่มประชากรจากภาคกลาง/ใต้ที่เกิด population expansion ในช่วงปลายของยุคไพลโทซีน (ประมาณ 100,000 ปี) อาจเกิดจากการที่ประชากรดังกล่าวมีการ colonization จากประชากรของภาคเหนือซึ่งสอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์การอพยพที่พบว่าประชากรของ *S. tani* มีการอพยพจากภาคเหนือไปยังภาคอื่นๆซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงกลางของยุคไพลโทซีน ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับระดับของความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับละติจูด กล่าวคือประชากรภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดและระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ลดลงในทางตอนล่างของประเทศ

ประชากรรีนคำในแต่ละภูมิภาคมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติบ่งชี้ว่าระดับการถ่ายยีน (gene flow) อยู่ในระดับต่ำ สอดคล้องกับผลของสายสัมพันธ์ของแฮพโลไทป์ที่ไม่เกิด phylogeographic break แต่มีการเกาะกลุ่มของแฮพโลไทป์จากภูมิภาคเดียวกันซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่มีการถ่ายยีนจำกัด (Avise et al., 1987) ซึ่งปัจจัยที่จำกัดการถ่ายยีนนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของนิเวศวิทยาแหล่งอาศัยและปัจจัยทางกายภาพ กลุ่มประชากรภาคเหนือกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ราบลุ่มกั้นระหว่างกลุ่มประชากรซึ่งอาจเป็นปัจจัยจำกัดการถ่ายยีน เพราะที่ราบลุ่มดังกล่าวอาจไม่มีแหล่งน้ำไหลซึ่งเป็นแหล่งอาศัยที่เหมาะสมของแมลงรีนคำชนิด *S. tani* นอกจากนี้ลักษณะทางนิเวศวิทยาของภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือยังมีความแตกต่างกัน เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่สูงกว่าภาคเหนือ นอกจากนี้ยังมีประเภทของป่าแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างทางนิเวศวิทยานี้อาจเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดการถ่ายยีนระหว่างกลุ่มประชากรภาคเหนือและกลุ่มประชากรภาคใต้เช่นกัน กลุ่มประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับกลุ่มประชากรภาคกลาง/ใต้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสูง การอพยพระหว่าง 2 กลุ่มประชากรนี้ยังอาจไม่เกิดขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการที่กลุ่มประชากรทั้งสองไม่มีแฮพโลไทป์ร่วม แสดงให้เห็นว่าการถ่ายยีนระหว่าง 2 กลุ่มประชากรไม่เกิดขึ้น โดยทะเล (อ่าวไทย) ที่กั้นระหว่าง 2 กลุ่มประชากรน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดการถ่ายยีนระหว่างประชากรทั้งสองกลุ่ม

Simulium nakhonense และ *Simulium quinquestriatum*

ระดับความแปรผันทางพันธุกรรมของแมลงรีนคำทั้ง *S. nakhonense* (0.015 ± 0.008) และ *S. quinquestriatum* (0.016 ± 0.008) อยู่ในระดับที่สูง ซึ่งมีค่าสูงกว่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์

ของ COI ของยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (*Anopheles dirus* A = 0.0042 ± 0.0002 , *An. dirus* D = 0.0064 ± 0.0002) (Walton *et al.*, 2000) แต่ระดับความหลากหลายนี้มีค่าใกล้เคียงกับที่พบในแมลงวันผลไม้ *Bactrocera depressa* (0.013) (Mun *et al.*, 2003) ระดับความแปรผันทางพันธุกรรมที่สูงบ่งชี้ว่าประชากรมีเสถียรภาพและมี effective population size ขนาดใหญ่ โดยค่า female effective population size ของ *S. nakhonense* มีค่าประมาณ 720,000 และ *S. quinquestriatum* มีค่าประมาณ 1,200,000 อย่างไรก็ตามในระดับภูมิภาคมีความแตกต่างของความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์อย่างชัดเจน โดยประชากรในภาคเหนือส่วนใหญ่มีระดับความแปรผันที่สูงกว่าประชากรจากภาคใต้ของจีนดำทั้ง 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับที่พบในแมลงวันดำชนิด *S. tani* นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรยังพบว่าประชากรภาคใต้ของจีนดำทั้ง 3 ชนิดเกิด population expansion ในช่วงเวลาไม่นาน (ประมาณ 400,000 – 100,000) รวมทั้งความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของแต่ละสปีชีส์ยังอยู่ในระดับต่ำหรือไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่แมลงวันดำทั้ง 3 ชนิดนี้มีรูปแบบของโครงสร้างทางพันธุกรรมและระดับความแปรผันทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันนี้น่าจะเป็นผลมาจากการที่ประชากรของแมลงวันดำทั้ง 3 ชนิดได้รับอิทธิพลจากปัจจัยเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นปัจจัยจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในอดีต เช่น Pleistocene climatic change หรืออาจเป็นปัจจัยของสภาพนิเวศวิทยาในปัจจุบัน แต่ผลจากการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรข้างต้นที่พบว่ามี การเกิด Population expansion ในช่วงใกล้เคียงกันในยุคไพลโทซีน (Pleistocene) จึงมีความเป็นไปได้ว่าความคล้ายคลึงกันของรูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมนั้นเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศในยุคไพลโทซีน

ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของแมลงวันดำชนิด *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* โดยเฉพาะระหว่างประชากรภาคเหนือกับประชากรภาคใต้และภายในประชากรภาคเหนืออยู่ในระดับที่สูงบ่งชี้ว่าระดับการถ่ายยีน (gene flow) ระหว่างประชากรดังกล่าวอยู่ในระดับที่ต่ำซึ่งสอดคล้องกับสายสัมพันธ์ของแฮพโลไทป์ที่พบว่ามี การเกาะกลุ่มกันของแฮพโลไทป์ โดยเฉพาะแฮพโลไทป์ภาคใต้ที่มีการเกาะกลุ่มกัน ซึ่งเป็นลักษณะของประชากรที่มีการถ่ายยีนในระดับที่ต่ำแต่ไม่มีการเกิดการแบ่งแยกของประชากรในระยะเวลาที่ยาวนานเพราะไม่พบการเกิด phylogeographic break ในสายสัมพันธ์ของแฮพโลไทป์ อย่างไรก็ตามจากการจัดกลุ่มประชากรโดยใช้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมในแมลงวันดำชนิด *S. nakhonesne* และ *S. quinquestriatum* นั้นไม่สามารถจัดกลุ่มประชากรได้อย่างชัดเจนทั้งนี้เพราะทุกจำนวนกลุ่มประชากรมีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับที่สูงมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งบ่งชี้ว่าในประชากรของแมลงวันดำ 2 ชนิดนี้มีหลายยีนพูล การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์พบที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอาจบ่งชี้ว่าการถ่ายยีนถูกจำกัดด้วยระยะห่างทางภูมิศาสตร์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษานี้ประกอบด้วย

ประชากรจากหลายภูมิภาคที่มีความแตกต่างกันในด้านนิเวศวิทยา ดังนั้นความแตกต่างของนิเวศวิทยาที่อาจมีผลต่อระดับการถ่ายยีนระหว่างประชากรด้วย

จากสายสัมพันธ์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแฮพโลไทป์ของแมลงริ้นดำชนิด *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* พบว่าแมลงริ้นดำ 2 ชนิดนี้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมและไม่สามารถแยกจากกันได้อย่างชัดเจนรวมทั้งผลของ AMOVA ที่บ่งชี้ว่าแมลงริ้นดำ 2 ชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงริ้นดำในประเทศไทยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ที่พบว่าแมลงริ้นดำ 2 ชนิดนี้เป็น sister species กัน (Thanwisai *et al.*, 2005) แต่อย่างไรก็ตามการที่แมลงริ้นดำ 2 ชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากผลของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอนี้อาจเป็นผลจากการเกิด mitochondrial DNA introgression ได้ ทั้งนี้เพราะผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอส่วนของ D3 พบว่าแมลงริ้นดำ 2 ชนิดนี้แยกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน นอกจากนี้แล้วการที่พบ fixed nucleotide difference ระหว่างแมลงริ้นดำ 2 ชนิดในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 ที่เป็นนิวเคลียร์ดีเอ็นเอซึ่งมี effective population size มากกว่าไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอถึง 4 เท่า นั้นไม่น่าจะเป็นผลมาจาก incomplete lineage sorting เพราะถ้าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่เป็นผลจาก incomplete lineage sorting น่าจะเกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในระดับที่สูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

- เจลิยว กุวังคะดิลก ชัยณรงค์ บุญเข็มทอง และสุวรรณี พยุหเสนา (2544). ความหลากหลายและพันธุศาสตร์เชิงประชากรของสปีชีส์ของริ่นดำในประเทศไทย ใน: รายงานการวิจัยโครงการ BRT 2544, วิสุทธิ์ ใบไม้ และรังสิมา คุ่มหอม (บรรณาธิการ) หน้า 286 – 311. จัดพิมพ์โดยโครงการ BRT บริษัทจิรวัดน์เอ็กเพรส จำกัด กรุงเทพฯ
- Adler P. H., D. C. Currie & D. M. Wood (2004). *The Black Flies (Simuliidae) of North America*. Cornell University Press, USA
- Adler P. H. & McCreadie J. W. (1997). The hidden ecology of black flies; sibling species and ecological scale. *American Entomologist*, Fall, 153-161.
- Avise J. C., Arnold J., Ball M. R., et al. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
- Bandelt H-J, Forster P., & Röhl A. (1999) Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.
- Boakye D. A. , Back C., Fiasorgbor G. K. , Sib A. P. P., 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.
- Bohonak, A. J. (2002). IBD (Isolation By Distance): a programme for analysis of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93,153-154.
- Collins, F. H., Mendez, M.A., Rasmussen, M. O., Mehaffex, P. C., Besansky, N. J. & 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.
- Crosskey, R. W. (1990). *The natural history of blackflies*, John Wiley and Sons, London
- Crosskey, R. W. & T. M. Howard (2004). *A new taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera: Simuliidae)*. The Natural History Museum, London.
- Dupanloup I., Schneider S. & Excoffier L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571-2581.
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.

- Feraday, R. M. & Leohardt, K. G. (1989). Absence of population structure in black flies as revealed by enzyme electrophoresis. *Genome*, 32, 531-537.
- Fu Y.X. (1997). Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-925.
- Fukuda, M., W. Choochote, 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 Hygeine*. 31:99-102
- Hasegawa M., Kishino K., & Yano T. (1985). Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, 160-174.
- Hewitt G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 7, 247-276.
- Hewitt, G. M. (2004). The structure of biodiversity-insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, (In press).
- Joy D. A. & Conn J. E. (2001) Molecular and morphological phylogenetic analysis of an insular radiation in Pacific black flies (*Simulium*). *Systematic Biology*, 50, 18-38.
- Kuhner, M. K., Yamato J., Beerli P. *et al.* (2004). LAMARC v 1.2.1 University of Washington, <http://evolution.gs.washington.edu/lamarc.html>.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Kuvangkadilok C., Boonkemtong C. & Phayuhasena, S. (1999a). Distribution of the larvae of black flies (Diptera: Simuliidae) at Doi Inthanon national park, northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 30, 328-337.
- Kuvangkadilok, C., Boonkemtong, C. & Phayuhasena, S. (1999b). Larval polytene chromosomes of five *Simulium* species (Diptera: Simuliidae) from Doi Inthanon National Park, northern Thailand. *Cytologia*, 64, 197-207.
- Kuvangkadilok, C., Phayuhasena, S. & Baimai, V. (1999c). Population cytogenetic studies on *Simulium feuerborni* Edwards (Diptera: Simuliidae) from northern Thailand. *Genome*, 42, 80-86.
- Kuvangkailok, C., Boonkemtong, C., Phayuhasena S. & Baimai, V. (2003). Larval polytene chromosome of black flies (*Simulium*) of Thailand. I. Comparison among five species in the subgenus *Gomphostilbia* Enderlein. *Genetica*, 118, 69-81.

- Kuvangkadilok, C. & Takaoka, H. (2000). Taxonomic note on Simuliidae (Diptera) from Thailand: Description of a new species and new species distributional records of nine known species. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28, 167-175.
- Litvaitis, M. K., Nunn, G., Thomas, W. K. & Kocher, T. D. (1994). A molecular approach for the identification of *Meiofaunal tubellarians* (Platyhelminthes, Tubellaria). *Marine Biology*, 120, 437-442.
- Lunt D. H., Ibrahim K. M. & G. M. Hewitt (1998). MtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity*. 80: 633-641
- Lunt, D. H., Zhang, D. X., Szymura, J. M. & Hewitt GM (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primer for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5, 153-165.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.
- Mead D. G., Maré C. J. & Ramberg F. B. (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
- Mun, J., Bohonak A. J. & Roderick G. K. (2003). Population structure of the pumpkin fruit fly *Bactrocera depressa* (Tephritidae) in Korea and Japan: Pleistocene allopatry or recent invasion? *Molecular Ecology*. 12: 2941-2951
- Posada D., Crandall K. A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818.
- Ray, N. Currat, M. & Excoffier, L. (2003). Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 76-86.
- Roger A. R. & Harpending H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552-569.
- Rothfels, K. (1979). Cytotaxonomy of blackflies (Simuliidae). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 507-539.
- Rothfels, K. H. & Dunbar, R. W. (1953). The salivary gland chromosomes of black fly *Simulium vittatum* Zett. *Canadian Journal of Zoology*, 31, 226-241.

- Satoh, A., Sota, T., Ueda, T., Enokido, Y., Paik, J-C. & Hori, M. (2004). Evolutionary history of coastal tiger beetles in Japan based on comparative phylogeography of four species. *Molecular Ecology*, 13, 3057-3069.
- Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. (2000). ARLEQUIN version 2.000: a software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology and Ecology, University of Geneva, Switzerland.
- 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.
- Slatkin M., Hudson R. R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555-562
- Snyder, T. P. & Linton, M. C. (1984). Population structure in blackflies: allozymic and orphological estimates for *Prosimulium mixtum* and *P. fuscum* (Diptera: Simuliidae). *Evolution*, 38(5), 942-956.
- Tajima, F. (1989). Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Takaoka, H. (1979). The blackflies of Taiwan (Diptera: Simuliidae). *Pacific Insects*, 20, 365-403.
- 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. (2004b). A list of and keys to black flies (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Tropical Medicine and Health*, 32, 189-197.
- Takaoka H. & Davies D.M. (1995). *The blackflies (Diptera:Simuliidae) of west Malaysia*. Kyushu University Press, Fukuoka, Japan.
- Takaoka, H. & H. Suzuki. (1984). The black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 35: 7-45
- 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. & Saito, K. (1996). A new species and new records of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27, 189-194.

- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- Thanwisai, A. (2004). Comparison of ITS2 rRNA in black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand. M. Sc. Thesis. Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Thanwisai, A., Kuvangkadilok, C. & Baimai, V. (2005). Molecular phylogeny of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. *Genetica* (in press)
- Thompson J. D., Gipsen T. J., Plewma F., Jeanmougin F. & Higgins G. D. (1997). The Clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*, 24, 4876-4882.
- Walton C., Handley J. M., Tun-Lin W., Collins, F. H., Harbach, R. E., Baimai, V. & Butlin, R. K. (2000). Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 962-974.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลวิจัยจากโครงการนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติรวมทั้งได้มีการนำเสนอในการประชุมวิชาการทั้งในและต่างประเทศดังต่อไปนี้

การตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการนานาชาติ

Pairot Pramual, Chaliow Kuvangkadilok, Visut Baimai and Catherine Walton (2005)
Phylogeography of the black fly, *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*, 14, 3989-4001

บทความทางวิชาการที่อยู่ระหว่างการเตรียม manuscript เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Pairot Pramual, Chaliow Kuvangkadilok, Visut Baimai and Catherine Walton. Population structure and population history of two closely related black fly species, *Simulium nakhonense* and *Simulium quinquestriatum*: implication to the establishment and maintenance of chromosomal polymorphisms. (in manuscript)

การเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ

Pairot Pramual (2004) **Phylogeography of black fly, *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) inferred from mitochondrial DNA sequences.** 34th Population Genetic Group Meeting, Reading University, Reading, UK

Pairot Pramual, Chaliow Kuvangkadilok, Visut Baimai and Catherine Walton (2005)
Phylogeography of the black fly, *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. การประชุมวิชาการโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 6 โรงแรมจอมเทียนปาล์มบีช รีสอร์ท จังหวัดชลบุรี

ไพโรจน์ ประมวล เกลียว กุวังคะดิลก วิสุทธิ ใบไม้ และ Catherine Walton (2548) **ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ภายในสปีชีส์ของแมลงร้นดำ *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) โดยการศึกษาการเรียงตัวของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ** การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 14 โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ กรุงเทพฯ

ไพโรจน์ ประมวล เกลียว กุวังคะดิลก วิสุทธิ ใบไม้ และ Catherine Walton (2548) **โครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงร้นดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย** การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ พัฒนาคณะความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT) 8 ครั้งที่ 9 โรงแรมโซฟิเทล ราชาออดิด จังหวัดขอนแก่น

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

1. Mitochondrial DNA haplotypes 121 haplotypes ของแมลงวันคําชนิด *Simulium tani* (แสดงเฉพาะ variable sites)

Positions

Haplotypes	1	111111111	111112222	222222222	233333333	333333333	334444444	444444445	555555555	555555566	666666666	6666777	
	111333344	667778999	011222334	666890111	223556778	901122233	344456778	990111223	345577891	222233456	677889901	123345778	8999012
	9258016928	6925870362	5170365817	2589240367	5812823902	5358124703	6257492581	6954786925	8716143239	2358143214	8091547625	8739810250	7038840
TN3181	TTGGATAAAC	AATATACCTT	AACATTTCTT	CTATATAAGC	CCCACCAACG	CTTTATACTA	TTCCCAAATA	GAACCCAAAC	TATGTGAACA	AGCAATTCCC	GTACAAAATA	ATTTC AATTT	ATATCTT
TN3182		C			G..		C.			T.....			
TN3183					G..					T.....			
TN3184							C.			T.....			
TN3186				A.	G..		C.			T.....			
TN3188							A.			T.....			
TN3189				T	G..	T.	..T.T....	A.....	G..T.	T.....	G.....		
TN31829		G.			G..		A.....			T.....			
TN3169					G..	C.	A.....			T.....			
TN31618										T.....			
TN31619	..A.....						..T.T....			T.....			
TN2833	G.....				T.....	..T.T....C	A.....	A.....	T.....	T.....			
TN2836	C.....					..T.T....	A.....		G..T.	T..G			
TN28310		C.....					..T.T....	A.....		T.....			
TN28311	...G.....					..T.T....	A.....	A.....	G..T.	T.....			
TN26117					G.....	..T.T....	..T.....			T.....			
TN26116	..A.....					..T.T....	A.....	A.....	G..T.	T.....			
TN26114			A.			..CTTT..C.	G..T			T.....			
TN26113	CG.....	..G.....	T		T.....	..T.T....C	A.....A	A.....	C..T.	T.....			
TN26111			..C.....		G..	T.	C.T.T....	A..T....	A.....	G..T.	T.....		
TN26118		C.....				..T.T....	A.....	A...A.G..	G.C.T.	T.....	G.....		
TN2614	T.....		..C..A.	G.....		..T.T....	A.....		G.C.T.	T.....		C	
TN29613	..A.....G		A.	G.....	G.....	..T.T....	A..T....	A.....	G.T.G..T.	T.....			
TN2969	G.....		A.	G.....	C.	..T.T..C.	A.....		G..T.	T.....	C.....		
TN29710			..C..A.	G.....		..T.T..G.	A.....		G..T.	T.....			
TN29711			..C..A.	G..T.		..T.T....	A.....		T.....	T.....	C.....		
TN29712		..G.....	A.	G.....	G.....	..T.T....	A.....		G.T.G..T.	T.....			
TN29715	..A.....		A.	G.....	G.....	..T.T....	A..T....	A.....	G.T.G..T.	T.....			
TN2977	C.....		..C..A.	G.....		..T.T....	A.....		G.C.T.	T.....		C	
TN2978	C.....		..C..A.	T..G.....		..T.T....	A.....		G..T.	T.....			
TN2979			..C..A.	G.....		..T.T....	A.....		G..T.	T.....			
TN33411		C.....		A.....		..T.T..C.	A.....	..C.....		T.....			
TN33412					C.	..T.T....			T.....	T.....		C	
TN33414		..T..C.....		A.....		..T.T..C.	A.....	..C.....		T.....			
TN33415			T.....		T.....	..T.T..C	A.....	A.....	T.....	T.....			
TN33416			A.			..T.T....	A.....	A.....	GC..T.	T..C.			
TN3343					T.....	..T.T..C	A.....G..	A.....	G..T.	T.....			
TN4001		G.....		G.....	T.....	..T.T....	A.....		G..T.	T.....			
TN4002						..T.T....	A.....			..C.T.....		..G.....	
TN4004		A.....	..C.....			..T.T....	A.G.....		..T.G..T.	T.....			

TN1727		..T.....	T.....	G.....	..C.....	..T.T.....	A.....	T.....	...G...T...	...T.....	C.....
TN17212		..G.....	G.....	G.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	C.....
TN17211	..A.....					T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	C.....
TN17214			G.....	G.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	C.....
TN942			T.....	T.....	T.....	..T.T...C	A.....	A.....	C.T...	...T.....	T.....
TN945		C.....	A.....	A.....	A.....	..T.T...C	A.....	C.....	C.T...	...T.....	T.....
TN2967			A.....	G.....	C.....	..T.T...C	A.....	G.....	T.....	...T.....	T.....
TN32315			A.....	A.....	C.....	..T.T...C	A.....	T.....	T.....	...T.....	T.....
TN32314						T.....	T.....	T.....	T.....	...T.....	T.....
TN32817						T.....	T.....	T.....	T.....	...T.....	T.....
TN3289						..T.T...C	A.....	T.....	T.....	...T.....	T.....
TN2612		C.....	A.....	G.....	C.....	..T.T...GC	A.....	G.....	T.....	...T.....	C.....
TN2976		..G.....	..G.....	..G.....	..G.....	..T.T...C	A.....	A.....	T.....	...T.....	T.....
TN2831	G.....					..T.T...C	A.....	G.....	T.....	...T.....	G.....T.....
TN2942	C.....	G.....	A.....	G.....	C.....	..T.T...C	A.....T.....	GG...T...	...T.....	T.....	C.....
TN2941	..A.....		A.....	G.....	C.....	..T.T...C	A.....	C.....	G.....T...	...T.....	T.....
TN2745		C.....				..T.T...C	..G.....T...	G.....	T.....	...T.....	T.....
TN2747		..G.....				..T.T...C		G.....	T.....	...T.....	T.....
TN3264			G.....	G.....	C.....	..T.T...C	A.....	G.....	T.....	...T.....	T.....
TN40615		CT...	TGA...	G.....	C.....	..T.T...C	A.....	C.....	T.....	...T.....	T.....
TN3535		..G.G.....				..T.T...C	A.....	A.....	T.....	...T.....	T.....
TN3536		..G.....				..T.T...C	A.....	A.....	C.T...	...T.....	T.....
TN3344		..G.....				..T.T...GC	A.....G.....	A.....	T.....	...T.....	T.....
TN3345		..G.....		T.....		..T.T...C	A.....	A.....	T.....	...T.....	T.....
TN3346	G.....	..G.....				..T.T...T	A.....	A.....	A.T...	...T.....	C.....
TN17215		..G...C.....	..C.....			..T.T...C	..G.....		T.....	...T.....	T.....
TN1728						T.....			T.....	...T.....	T.C
TN1729	..A.....		G.....			T.....			T.....	...T.....	T.....
TN33117	C....C....		G.....			..A.....	..G.T.....	A.....	T.....	...T.....	T.....

2. Mitochondrial DNA haplotypes 78 haplotypes ของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium nakhonense* (แสดงเฉพาะ variable sites)

Positions										
haplotype	11111111	1111122222	2222222333	3333333334	4444444444	4445555555	5555555556	6666666666	77	
	112333455	6791123355	6689902236	7777899223	4456667890	1112245556	6780012334	4566888990	1122256679	
	9587069345	6501405836	2902315857	0369045170	5873468795	4586916795	8491498173	9818235453	5814770603	
N35615	TGGTGAAAAC	AATAGTCTAT	CAAACACCCC	GGAATTCTCT	ATCGCATTAC	CCTAATGGCC	AATCCAGAAC	TCTGGTTATT	AAACCCCAAT	AT
N35614		..C....GC	T.....	..G.....	...A.....	..C.....	A...		..G.....	G.
N35616		..C....G.	T.....		..C.....	A...	..C.....	G..	..G...T...	.
N35618		..C....G.	..G.T.....		..C.....T		A...	A....	..G.....	..
N775		..C.....							..G.....	..
N772		..C....G.	T.....		..C.....			G..	..G...T...	..
N1691		..C....G.	T.....	C.TC	..C.....	..G.....	G..	G..	T...	..
N1692	C.....	..C....G.	T.....		..C.A.GC.G.			G..	..G...T..G.	..
N1693	..C....G.	..C....G.	T.....		..C.....		A...			..
N29112	G.	..C....G.	T.....	..A....TC	..C.A..G..	G....	T	G..	T...	..
N27912		..C....G.	T.....		..C.....			G..		..
N2791	..A....	..C..G..G.						A....	..G.....	..
N27913	C..C....	..C....G.	T.....	T..	..C.A.G..G.	T.			..G...T..G.	..
N27916	G.	..C....G.	T.....	..A....TC	..C.A..G..	G..A.	T	G..	T...	..
N2792							T		..GG.....	..
N2798							T		..G.....	..
N2799	C.....	..C....G.	T.....		..C.A.G..G.	T.	A...		..GT.T..G.	..
N27910	..A....	..C..G..							..GT.T..G.	..
N33412		..C...T.G.	T.....		..C.A.....	..C.....	A...		..G.....	..
N3344		..C....G.	T.....		..C.....G.			A....	..G.....	..
N3345	..A....	..C....G.							..G.....	..
N33210	C.....	..C....G.	T.....		..C.A.GA.G.			G..	..G...T..G.	..
N3321		..C....G.	T...T	C.TC	..C.....	G....	G.	G..	T...	..
N3343		..G....G.	T.....	TC	..C.....		AG..	G..	T...	..
N3032	..A....	..C.....	T.....					A....	..G...T...	..
N3036	..A....	T.C.....	T.....					A....	G.G.....	..
N302410		..C....G.	T.....	..G.....	GC.....	A.	G.	..C.....	..G....G.	..
N302510	..A....	..C.....	T.....				A...	A....	..G.....	..
N302610	..A....	..C.....	T.....				A...	A....	..GT.....	..
N302101	..A....	..C.....	T.....	..G.....		A...	A...	A....	..GT.....	..
N3025	..A....	..C.....	T.....					A....	..G.....	..
N3035	C.....	G.CG...G.	T.....		..C.A.G..G.	T.		C.	..G...T..G.	..
N30511	..A....	..C..G..	..G.....	..A.....					..G.....C	..
N30512		..C....G.	T.....		..C.....T	..C.....		G.C	..G.....	..
N30516	..A....	..C..G..G.			G..	..T.....		A....	..G.....	..
N30517	..A....	..C..G..		..A.....					..G.....C	..
N30518	..A....					A...		..T.....	..GG.....	..
N3052					..A.....		A...	..T.....	..GG.....	..

N3054	A....	.C....G.	T....		.C.....	...T....	A...		.G.T....	..
N3053	AG....	.C.....	T.....					A....	.G.....	..
N41813	A....	.C.....	T.....	.A...T...					.G.....	..
N4188		.C....G.	T....		.C.....T	A...	A...	A....	.G.....	..
N4189	A....	.C.....	T.....		.T.....		A...	A....	.G.....	..
N32610	G..	.C....G.	T.TT..	TC	.C.A...G.	T.....			T....	..
N32613		.C....G.	T.TT..	TC	.C.A...G.	T.....			T....	..
N3266		.C....G.	T.TT..	TC	.C.A...G.	T.....A..			T....	..
N3146	A....	.C.....	T.....		.T.....	T			.G.....	..
N3148	A....	.C.....	T.....		.TA.....				.G.....	..
N3149	A....	.C.....	T.....		.TA.....	T			.G.....	..
N314410	A.T...	.C.....					G....A...	A....	.G.....	..
N31411	A....	.C.....							.G.....	..
N31412	A....	.C.....	T.....						.G.....	..
N31413	A...G.	.C.....		A.....	.A.....				.G.....	..
N4291	A....	.C.....	T.....					G....	.G.....	..
N4293	A....	.C.....	T.....	C..					.G.....	..
N42610	A....	.C.....	T..G....					C....	.G.....	..
N42611	A....	.C.....				T..A..			.G.....	..
N42613	A...G.	.C.....		A.....	.A...C..				.G.....	..
N4261	A....	.C.A....	T.....						.G.....	..
N4265	A....	.C.....	T.....T	..GC....					.G.....	..
N4267	A....	.C...C..	T.....						.G.....	..
N4268	A....	.C.....				T....			.G.....	..
N3114	..A.A....	.C.....	T.....T	..GC....					.G.....	..
N31116	A....	.C.....	T.....		.T.....				.G.....	..
N31117	A.T...	.C.....					A...	A....	.G.....	..
N31118			T..	C					.G.....	..
N3119	A.T...		T....				A...	C...A....	.G.....	..
N3117	A.T...	.C.....							.G.....	..
N31120	A.T...	.C.....				T....			.G.....	..
N31121	A....	.C....G.			.A.....	GA...	C.....		.G.....	..
N3093	A....	.C.....	T.....			G....G.			.G.....	..
N3096	A....	.C.....			.TAT....	C....	T....	A....	.G...G.	..
N1161	A....	.C.....	T.....		.TAT....				.G.....	..
N30914	A...GT	.C....G.			.TAT....				.G.....	..
N30916	A.T...	.C.....					A...		.G.....	..
N30922	A.T...				.A.....		GA..	C.....	.G.....	..
N30926	.A..A....	.C....G.			.A.....		GA..	C.....	.G.....	..
N30924	C.....	.CG....G.	T....		.C...GA.G.		A...	G...G.G..T..G.	.C	

3. Mitochondrial DNA haplotypes 72 haplotypes ของแมลงวันค้ำชนิด *Simulium quinquestriatum* (แสดงเฉพาะ variable sites)

		Positions								
haplotypes		1111111111	1222222222	2222233333	3333333333	4444444444	4555555555	5555566666	66666677	
	133455679	1124566789	9223355677	7788923333	4566677889	0011112247	8000112333	4578901256	77788901	
	9509845610	1407325402	3584558703	6908570369	8134658479	2845786951	9147398147	9272495170	05857384	
Q3532	TGGATACATT	AGTTACAAAA	TCCTCTACAG	AATACCCTTT	CTACAATTTA	TCCCATAGGA	TCCATAAGTA	TTGGACGACC	ATTCTTCT	
Q3533		GT....	...C....G.	T...	..G.....	A..	C.GA..	AGT.		
Q3534	C	.AC.....	...C.....	T...	G...	C..A..	...A.....			
Q3535					..G.....					
Q35310	.A.....C	.A..G....	GA	...G..T...	T.G.....	A..	C.GA..	.C.AT.A.T.		
Q35312	C.....C	...G....	G.	T...	.C..GGA..G	A..	C.GA..	...G.AGT.	G.....	
Q3537			C.....	T...	A..	C.GA..				
Q3538	C.....C	...G....	G.	T...	...GG..G	A.G	C.GA..	C....AGT.	G.....	
Q3539			..C.....	T...	..C.....	C..A..	A...			
Q2304	C.....C	...G....	G.	G.....T...	..G.G....	A..	C.GA..	AGT.	G.....	
Q2305	C.....C	...G....	...T...G.	G.....T...	..G.G....	A..	C.GA..	AGT.	G.....	
Q2306	C	...G.G..	C.....G.	...T.T...	T.G.....	A..	C.GAC.	AG..	...A..	
Q2307	.A.....	...GT....	..C...G.	T...	..G.....	...G..A..	C..A..	AGT.		
Q2308	.A.....	...G....	..C.....	T...	..G.G....	A..	C.GA..	AGT.		
Q23010	C	...G....	G.	T...		A..	C..A..	...G.AG..		
Q23011	C.....C	...G....	G.	G.....T...	..G.GG...	A..	C.GA..	AGTT	GC.....	
Q23012		.A.....	..TC.....	T...		C.....	C..A..	A...		
Q2302	.A.....									
Q23014	C.....C	...G....	G.	G.....T...	..G.G....	...G..A..	C.GA..	AGT.	G.....	
Q3422				..G.....			G....			
Q3426	C	...G....	G.	T...		..T...A..	C..A..	...AG.A.T.	T.	
Q3428	C	...G....	G.	T...		..T...A..	C.....	...AG.A.T.	T.	
Q28110		GA.....	...C..G..	T...			C..A..			
Q28111	.A...T..C	...G....	C.T...G.	T...	T.G.....	A..	C.GA..	AG..		
Q28112	C.....C	...G....	G.	G.....T...	..G.G....	A..	C.GA..	...A..AGT.	G.....	
Q28113	C	...G....	G.	T...	..GT.....	A..	C..A..	...AG.AG..		
Q2814	.A.....C	...G...G	C.....G.	T...	T.G.....	A..	C.GA..	...TAG..		
Q2817	...C...C	...G....		T...	..G.....	A..	C..A..	AG..	T.	
Q2813		.A.....	..C.....	T...		C.....A..	C..A..	A...	..C....	
Q2818	.A.....C	...G.G..	C.....	T...	T.G.....	A..	C.GA..	AG..		
Q2819	C	...G....	G.	T...	C.	...GC.A..	C.GA..	...G..G.		
Q2996	.A.....C	...G....	C.....G.	T...	T.....	A..	C.GA..	...G.A...		
Q2995							A....			
Q2994	.A.....C	...G....	C.....G.	G.....T...	T.....	A..	C.GA..	AG..		
Q2993	C	G...G.G..	C.....G.	...T.T...	T.G.....	...T..A..	C.GAC.	G..	...A..	
Q2992	C	...G....	...TG.	G.....T...	..G.....	A..	C..A..	...G.AG..	..C.....	
Q29910	.A.....C	...AG....	C.....G.	T...	T.G.....	A..	C..A..	AG..	C	
Q29911	C.	...GT....	...C...G.	T...	..G.G....	A..	C.GA..	...A...AGT.	...AC...	

Q3002	..A.....C	..G.G.....	C.....G.	T...	T.G.....	A..	C..A..	...A..AG..	C
Q3003		G.G...	C.....G.	T...	T.G.....	A..	C.GA..	AG..	
Q3004	..A.....C	G.....	C.....G.	T...	T.G.....	A..	C..A..	AG..	C
Q3006	..A.....C	GT...G	C.....G.	T...	T.G.....	A..	C..A..	AG..	
Q3007	G...		..C.....	T...			C.GA..		
Q3282	C	G.....	..TT....G.	T...	G	..T...A..	C.GA..	A.T.	
Q3183	..A.....C	G.....	C.....G.	TC..	T.G..G...	A..	C.GA..	AG..	
Q3186	..A.....C	T.G.G	C.....GA	T...	T.G.....	A..	C.GA..	A...	
Q3187	..A.....C	G.....	C.T....G.	T.C.	T.G.....	A..	C.GA..	...A..AG..	
Q31811	..A...G.C	G.....	C.T....G.	T...	T.....	A..	C..A..	AG..	
Q31812	..A.....C	G.....	C.T....G.	T...	T.G.....	A..	C.GA..	...A..AG..	G
Q31813	..A.....C	G.....	C.T....G.	T...C	T.G.....	A..	C.GA..	G..	
Q31817	C	G.....	C...C..G.	T...	T.G.....	A..	..GC..A..	AG..	
Q3185	..A.....C	G.....	C.T....G.	T...	T.GT.....	A..	C.GA..	AG..	
Q4252	..A.....	G.....	C.....G.	T...	..G...C..	.T...A..	C.GA..	AG..	T.
Q4259	..A.....C	T.G..	C.....GA	T...	T.....	A..	C.GA..	A...	
Q42510	C	G.....	C...C..G.	T...	T.G.....	A..	C..A..	AG..	
Q42511	..A.....C	G.....	C.T....G.	T...	T.G.....	A..	C.GA..	AG..	
Q4251	..A.....C	G.....	C.T....G.	T...	T.G.....	..T...A..	C.GA..	AG..	
Q42514	..A.....	G.....	C.....G.	T...	..G...C..	.T...A..	C.GA..	AG..	
Q4253	..A.....C	G.....	C.T....G.	G....T...	T.G...C...	A..	C.GA..	AG..	
Q4258	..A.....C	G...G.	C.TG...GA	T...	T.G.....	A..	C..A.G	AG..	
Q3132	C	G.....	C.....G.	T...	T.....	A..	CG.A..	C....AG..	
Q3136	..AT....C		C.....G.	T...	T.G..G...	A..	C.GA..	AG..	
Q3138	..A.....C	G.....	C.....G.	T...	T.....	A..	CG.A..	C....AG..	
Q31311	..AG....C	G.....	C.....G.	T...	T.....	A..	C...CGGA..	C....AG..	
Q31316	..A.....C	G.....	C.....G.	..C...T...	T.....	A..	CG.A..	C....AG..	
Q4213	..A.....C	G.....	C.....G.	T...	T.....	A..	.T...CG.A..	C....AG..	
Q4219	..AT....C		C.....G.	T...	T.G.....	A..	C..A..	...A..AG..	
Q42110	..AT....		C.....G.	T...	T.G.....	AA	C.GA..	AG..	
Q42113	..AT....C		C.....	T...	T.G.....	A..	..T.C.GA..	AG..	
Q4218	..AT....C		C.....G.	T...	T.G.....	A..	C.GA..	AG..	
Q4217	..AT....C	..A.....	C.....G.	T...	T.G.....	A..	C.GA..	AG..	

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D3 region ของ 28S ribosomal DNA ของริ้นค้ำชนิด *Simulium nakhonense*, *Simulium quinquestriatum* และ *Simulium fenestratum* จำนวน 33 sequences (*Simulium nakhonense* (NK) 13 ตัวอย่าง *Simulium quinquestriatum* (QT) 19 ตัวอย่างและ *Simulium fenestratum* (SR7FN) 1 ตัวอย่าง)

SR7FND3	TGAGATTAT	AAACCTCAGA	GGCGGAATTA	ACATAACTAT	TTTTTTGTTT	GGGATTACAA	ATTCTGTATT	AATAGAGAAT	TTCTCCATCC	CTGGGTATCC	ATTAGTCTTG	TTTCGTTTTA	120
NK3054D3												...T.....	
NK4268D3												...T.....	
NK2791D3												...T.....	
NK3099D3											...A.....	...T.....	
NK3281D3												...T.....	
NK3345D3												...T.....	
NK3532D3												...T.....	
NK3141D3												...T.....	
NK4181D3												...T.....	
NK3117D3												...T.....	
NK3112D3											...A.....	...T.....	
NK4293D3												...T.....	
NK3025D3												...T.....	
NK3119D3												...T.....	
QT2996D3											G.....	...T.....	
QT3281D3											G...A.....	...T.....	
QT4218ND3											G.....	...T.....	
QT3138D3											G.....	...T.....	
QT4218D3											G.....	...T.....	
QT2302D3											G.....	...T.....	
QT3426D3											G...A.....	...T.....	
QT2304D3											G.....	...T.....	
QT2814D3											G.....	...T.....	
QT2992D3											G...A.....	...T.....	
QT3002D3											G.....	...T.....	
QT3003D3											G.....	...T.....	
QT3007D3											G.....	...T.....	
QT4213D3											G.....	...T.....	
QT42110D3											G.....	...T.....	
QT42511D3											G.....	...T.....	
QT31310D3											G.....	...T.....	
QT4219D3											G.....	...T.....	

[illegible]

SR7FND3	TGCAAATCGA	T	251
NK3054D3		.	
NK4268D3		.	
NK2791D3		.	
NK3099D3		.	
NK3281D3		.	
NK3345D3		.	
NK3532D3		.	
NK31411D3		.	
NK41811D3		.	
NK31117D3		.	
NK31121D3		.	
NK4293D3		.	
NK3025D3		.	
NK31119D3		.	
QT2996D3		.	
QT3281D3		.	
QT4218ND3		.	
QT3138D3		.	
QT4218D3		.	
QT2302D3		.	
QT3426D3		.	
QT2304D3		.	
QT2814D3		.	
QT2992D3		.	
QT3002D3		.	
QT3003D3		.	
QT3007D3		.	
QT4213D3		.	
QT42110D3		.	
QT2511D3		.	
QT31310D3		.	
QT4219D3		.	

ภาคผนวก 2

บทความสำหรับการเผยแพร่งานวิจัย

ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร แมลงรืนดำ (Diptera: Simuliidae) ในประเทศไทย

การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีความสำคัญทั้งทางด้านวิชาการ และการประยุกต์ใช้ เช่น การจัดการทรัพยากรพันธุกรรม การปรับปรุงพันธุ์พืชหรือสัตว์ และการหาแนวทางที่เหมาะสมในการควบคุมพาหะของโรค เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทยยังมีน้อยมาก การศึกษาส่วนใหญ่ยังจำกัดอยู่ในพื้นที่จำกัดไม่กว้างขวางครอบคลุม ทำให้ความเข้าใจต่อรูปแบบการกระจายและระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทยรวมถึงอิทธิพลของปัจจัยต่างๆต่อรูปแบบดังกล่าวของประเทศไทยยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์กว้างขวางครอบคลุมทั้งประเทศรวมทั้งการมีข้อมูลหรือการศึกษาด้านอื่นร่วมด้วย เช่น อนุกรมวิธาน และนิเวศวิทยา จะทำให้เข้าใจรูปแบบและปัจจัยที่มีผลต่อแบบแผนดังกล่าวได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งแมลงรืนดำ (Black flies) มีความเหมาะสมต่อการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากแมลงรืนดำมีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางสามารถพบได้ในทุกภูมิภาคของประเทศ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน นิเวศวิทยา และเซลล์พันธุศาสตร์ ร่วมด้วย จึงทำให้ข้อมูลที่ได้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

แมลงรืนดำจัดอยู่ในวงศ์ (Order) Diptera สกุล (Family) Simuliidae ทั่วโลกมีการรายงานทั้งสิ้น 1,809 ชนิด (Crosskey and Howard, 2004) แมลงรืนดำเป็นพาหะของโรคที่สำคัญคือ Onchocerciasis หรือ River Blindness ในบางประเทศของทวีปแอฟริกา อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ นอกจากนี้แมลงรืนดำยังสามารถถ่ายทอดโปรโตซัวในสกุล *Luecozytozoon* รวมทั้งไวรัสบางชนิดในสัตว์ (Crosskey 1990) ในประเทศไทยแม้ยังไม่มีรายงานการเกิดโรคที่มีรืนดำเป็นพาหะแต่มีรายงานการพบ *Onchocerca* sp. ในแมลงรืนดำ 3 ชนิดในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ *Simulium nodosum*, *S. asakoe* และ *S. nigrogilvum* นอกจากนี้รืนดำยังก่อความรำคาญแก่นักท่องเที่ยวในแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญ เช่น ยอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ภูสอยดาว จังหวัดอุดรดิตถ์ และ บริเวณช่องเย็น อุทยานแห่งชาติแม่วงศ์ จังหวัดกำแพงเพชร อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลกระทบของการกัดของรืนดำต่อปศุสัตว์ เช่น วัว ควาย และสัตว์ปีก

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงรืนดำ 3 ชนิด ได้แก่ *Simulium tani*, *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cytochrome oxidase subunit I (COI) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ โครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงรืนดำทั้ง 3 ชนิดมีความคล้ายคลึงกันโดยประชากร

ภาคเหนือมีความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงและมีความแตกต่างจากประชากรภูมิภาคอื่นๆ โดยปัจจัยทั้งทางภูมิศาสตร์ เช่น แนวเทือกเขา รวมทั้งปัจจัยทางนิเวศวิทยาของแหล่งอาศัยมีผลต่อระดับการถ่ายยีนและนำไปสู่ความแตกต่างทางพันธุกรรม ความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สูงในประชากรภาคเหนือน่าจะเป็นผลจากประชากรภาคเหนือของจีนคำทั้งสามชนิดมีประวัติศาสตร์ที่ยาวนานกว่าประชากรภาคใต้ โดยประชากรภาคใต้เกิดจากการ colonization ของประชากรบางส่วนจากภาคเหนือตอนล่างหรือภาคกลางเมื่อประมาณ 100,000 – 200,000 ปีตามด้วยการขยายตัวของประชากรซึ่งอาจทำให้ไม่เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ความคล้ายคลึงของรูปแบบโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของจีนคำทั้งสามชนิดอาจเป็นผลจากอิทธิพลของสภาพนิเวศวิทยาในปัจจุบันที่เหมือนกันหรือเป็นผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในยุคไพลโทซีนที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของภูมิภาคนี้ ความคล้ายคลึงของโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่าง *S. nakhonense* และ *S. quinquestriatum* บางส่วนอาจเป็นผลจากการถ่ายยีนระหว่างแมลงจีนคำสองชนิดนี้

ผลของการวิจัยนี้เป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญซึ่งแสดงให้เห็นถึงแบบแผนของความหลากหลายทางพันธุกรรมของจีนคำในประเทศไทยซึ่งมีรูปแบบของโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าความคล้ายคลึงดังกล่าวเป็นผลจากอิทธิพลของสภาพนิเวศวิทยาในปัจจุบันที่คล้ายคลึงกันหรือเป็นผลจากอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในอดีต เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในยุคไพลโทซีน ถ้ามีการศึกษาสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่เหมือนกันกับการศึกษานี้จะทำให้สามารถบ่งชี้ถึงปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในภูมิภาคนี้ได้ซึ่งอาจมีส่วนช่วยในการวางแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพ

ภาคผนวก 3

Reprint ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences

PAIROT PRAMUAL,*† CHALIOW KUVANGKADILOK,* VISUT BAIMAI* and CATHERINE WALTON†

*Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, 10400 Thailand, †Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Oxford Road, Manchester, M13 9PT, UK

Abstract

Intraspecific phylogeography has been used widely as a tool to infer population history. However, little attention has been paid to Southeast Asia despite its importance in terms of biodiversity. Here we used the cytochrome oxidase I gene of mitochondrial DNA (mtDNA) for a phylogeographic study of 147 individuals of the black fly *Simulium tani* from Thailand. The mtDNA revealed high genetic differentiation between the major geographical regions of north, east and central/south Thailand. Mismatch distributions indicate population expansions during the mid-Pleistocene and the late Pleistocene suggesting that current population structure and diversity may be due in part to the species' response to Pleistocene climatic fluctuations. The genealogical structure of the haplotypes, high northern diversity and maximum-likelihood inference of historical migration rates, suggest that the eastern and central/southern populations originated from northern populations in the mid-Pleistocene. Subsequently, the eastern region had had a largely independent history but the central/southern population may be largely the result of recent (c. 100 000 years ago) expansion, either from the north again, or from a relictual population in the central region. Cytological investigation revealed that populations from the south and east have two overlapping fixed chromosomal inversions. Since these populations also share ecological characteristics it suggests that inversions are involved in ecological adaptation. In conclusion both contemporary and historical ecological conditions are playing an important role in determining population genetic structure and diversity.

Keywords: black fly, genetic structure, mitochondrial DNA, population expansion, *Simulium tani*, Thailand

Received 31 January 2005; revision accepted 6 May 2005

Introduction

Mitochondrial DNA sequences have been used widely as a genetic marker for population genetic studies particularly for intraspecific phylogeography. By relating genealogical relationships and geographical information, phylogeography has been used very successfully to determine factors underlying the genetic structure of species. These factors include historical events (e.g. Pleistocene climatic change, Randi *et al.* 2004), contemporary factors (e.g. ecological

conditions, ongoing gene flow, Pfenninger *et al.* 2003) as well as their integrated effects (e.g. Whorley *et al.* 2004). Phylogeographic studies have been conducted extensively in North America and Europe. However, such studies are rare in Southeast Asia (SE Asia) (e.g. Walton *et al.* 2000; Chen *et al.* 2004) although it is considered to be one of the most biologically diverse areas of the world (Myers *et al.* 2000). Even within SE Asia, such studies have been biased towards the Sundaic region while less attention has been paid to the Indo-Chinese mainland. In North America and Europe, phylogeography has provided a particularly good understanding of the effects of the periodic (c. 100 000 years interval) glaciations of the Pleistocene on present-day

Correspondence: Dr Chaliow Kuvangkadilok, Fax: +66 (0) 26448706; E-mail: scckv@mahidol.ac.th

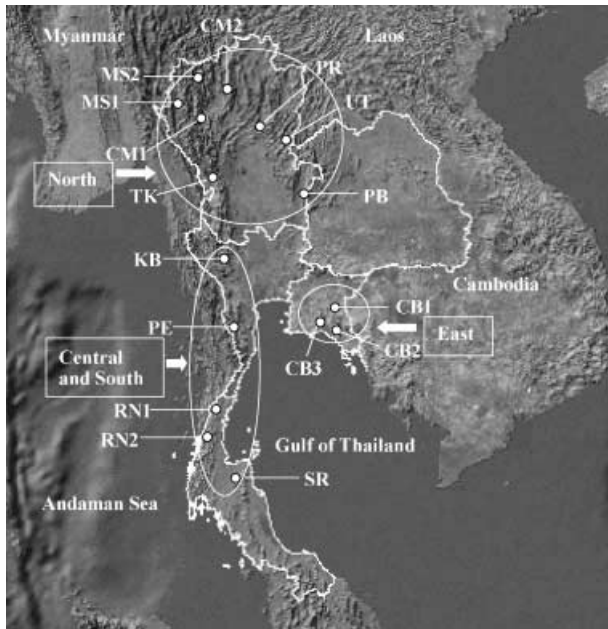


Fig. 1 Distribution of the sampling locations of *Simulium tani*. Populations are grouped according to the group composition defined by SAMOVA (see Results).

patterns of genetic diversity (reviewed in Hewitt 1996). Pleistocene climatic and environmental fluctuations also affect the tropics as during glaciations it will not only be cooler but also drier, resulting in the contraction and fragmentation of forests (Brandon-Jones 1998) which are the source of much of tropical biodiversity.

Penny (2001) has pointed out that the Indo-Chinese mainland is a biogeographically interesting area because it is located on the boundary between evergreen tropical rainforest characteristic of the Indonesian region and the temperate floras of East Asia. Although Thailand lies mainly in the Indo-Chinese region characterized by more open mixed deciduous forest, there is a transition of forest types to the evergreen tropical forest at the Isthmus of Kra on the southern Thai peninsula (just above RN1, see Fig. 1). It has been suggested that this transition is due to ingression of the sea at this point separating what is now southern Thailand from peninsular Malaysia during the Pliocene, or it may be due to a change in seasonality (Woodruff 2003). The change in forest types appears to correspond to a change in animal species distributions, e.g. birds (Hughes *et al.* 2003). Due to a paucity of studies of genetic structure in Thailand the effects within species that cross this boundary are unknown.

In Thailand black flies are one of the most taxonomically well-studied groups and are geographically widespread making them interesting models for population genetic study. Population genetic studies using allozyme variation (Feraday & Leonhardt 1989) failed to detect population

subdivision in several species of North American black flies. This was thought to be due to long-distance migration in this insect: biting flies can be found > 100 km from the nearest known breeding sites (Rempel & Arnason 1947); and mark-recapture using radioactive labelling found that flies migrated up to 35 km (Baldwin *et al.* 1975). In contrast, cytological studies have revealed an extensive level of genetic structure leading to the description of cytological sibling species (cytosppecies) using criteria such as fixed chromosomal inversion differences, the presence of different sex-chromosome systems, or differences in the frequency of inversions (Rothfels 1956). Many morphologically described species are found to be composed of several cytosppecies that often occur in different ecological conditions (Adler 1988; Adler & McCreddie 1997). Chromosomal inversions within species of Diptera have often been implicated to have a role in adaptation to different environments such as climatic conditions (e.g. precipitation rate and temperature; reviewed in Hoffmann *et al.* 2004). In black flies, several studies have revealed the association of different cytosppecies to different environmental conditions. For example, different sibling species of the *Simulium tuberosum* complex have been found in different ecoregions of North America (Adler & McCreddie 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). Phylogenetic studies at a higher taxonomic level further support the important role of ecological conditions in black fly evolution: Joy & Conn (2001) found that adaptation to different larval habitats (i.e. different stream types) is the primary mode of speciation of the Society Island black flies.

Simulium tani Takaoka & Davies (1995) belongs to the *S. tuberosum* species group. At least five species in this group have been found in Thailand (Takaoka & Choochote 2004). The distribution patterns of these species appear to be related to the different ecological conditions of streams. For example, *S. rufibasis* is found only in small streams at high altitude (> 1000 m above sea level) and *Simulium weji* is restricted to streams with high calcareous sediment (Takaoka 2001). In contrast *S. tani* has the most widespread distribution of the species in this group in Thailand. The larvae of this species can be found in streams of varying size at a wide range of altitude (from sea level to > 1000 m Takaoka & Davies 1995; Kuvangkadilok *et al.* 1999). As it is widely distributed both geographically and ecologically, *S. tani* is an interesting model species to test the relative importance of geographical and ecological conditions in shaping the genetic structure of black flies which may, ultimately, lead to speciation.

In this study we use mitochondrial DNA (mtDNA) sequences to infer the genetic structure, phylogeography and demographic history of *S. tani* on a large geographical scale from northern to southern Thailand over which environmental

conditions vary. In addition to increasing our fundamental understanding of the generation of biodiversity in Thailand, this study is also relevant to current efforts to conserve biodiversity. Many species in Thailand are at risk due to increasing anthropogenic activities, particularly deforestation, leading to the reduction and fragmentation of natural habitats (Pattanaibool & Dearden 2002). Since black flies are only found in pristine, usually forested, environments the spatial distribution of their genetic diversity is likely to be indicative of forest species (usually those most at risk) in general. The identification of evolutionary significant units (i.e. populations with independent evolutionary histories and therefore unique genetic diversity, Avise 1994) and areas of high genetic diversity has a role to play in determining conservation priorities.

Materials and methods

Sample collection and species identification

Simulium tani were collected from 16 sites throughout Thailand during 2000–2003 (Table 1 and Fig. 1). Black flies were collected as larvae and pupae from plant roots, trailing grass and fallen leaves along streams. To attempt to take a random population sample and avoid an excess of consanguinity only one or two samples were collected from the same substrate (e.g. fallen leaf, plant root) since black flies lay multiple eggs at a time (Crosskey 1990). Larvae and pupae from the same stream were pooled together as one population. Pupae were preserved in absolute ethanol and stored at -20°C . The collected larval specimens were preserved in Carnoy's fixative (absolute ethanol : acetic acid; 2:1) and stored at 4°C . Previous work has shown that

samples preserved in Carnoy's fixative can be used for molecular study (Xiong & Kocher 1991) thus enabling information to be obtained from each sample at both the cytological and molecular level. Both morphological and cytological criteria were used for species identification. For morphological identification we used the key of Takaoka & Davies (1995). Before a larval specimen was subjected to polytene chromosome preparation the head and thorax of the larva was cut off, transferred from fixative to absolute ethanol, and stored at -20°C for further molecular work. The remainder of the larva was then used for salivary gland polytene chromosome preparation following the method of Rothfels & Dunbar (1953). The polytene chromosome banding patterns were read band by band using the standard map of *S. tani* (Kuvangkadilok *et al.*, unpublished).

DNA extraction, polymerase chain reaction and sequencing

Most DNA samples were obtained from the heads of larval specimens for which species status had been confirmed by cytological criteria but some were obtained from pupae. DNA was extracted following the method of Collins *et al.* (1987). An *c.* 800-bp fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene was amplified using the primers C1-J-2195 (5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3'; Simon *et al.* 1994) and UEA10 (5'-TCCAATGCACTA-ATCTGCCATATTA-3'; Lunt *et al.* 1996). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a total volume of 50 μL containing $1\times$ reaction buffer, 2.0 mM MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 0.4 μM of each primer, 2 units of *Taq* DNA polymerase (Promega) and 2 μL of DNA sample (diluted 1:20 to 1:40 in ddH_2O). The temperature profile was as follows: 94°C for 5 min, followed by 36 cycles of 95°C for

Table 1 Details of the sampling locations of the 16 populations of *Simulium tani*

Population	Code	Region	Latitude/longitude	Altitude (m)	Date
1. Morkfah WF, Chiangmai province	CM1	North	19°06'N, 98°46'E	545	07.06.03
2. Ban Huai Mo, Chiangmai province	CM2	North	19°02'N, 99°20'E	850	03.06.03
3. Ban NaNgew, Maehongson province	MS1	North	18°49'N, 98°02'E	814	05.06.03
4. Ban PangPeak, Maehongson province	MS2	North	19°26'N, 98°21'E	840	06.06.03
5. MaeKerngLuang WF, Phrea province	PR	North	17°58'N, 98°35'E	300	04.12.03
6. Lansang WF, Tak province	TK	North	16°46'N, 99°01'E	250	29.06.03
7. PhuSoiDao WF, Uttaradit province	UT	North	17°42'N, 100°57'E	650	18.10.03
8. TadMork WF, Petchabun province	PB	North	16°21'N, 101°21'E	468	25.10.03
9. KhaoSoiDao WF, Chanthaburi province	CB1	East	13°06'N, 102°11'E	320	20.06.03
10. ClongNaRai WF, Chanthaburi province	CB2	East	12°34'N, 102°10'E	70	19.06.03
11. KhaoChaMao WF, Rayong province	CB3	East	12°54'N, 101°43'E	65	19.06.03
12. TamTanLod WF, Kanchanaburi province	KB	Central	14°39'N, 99°18'E	282	12.08.03
13. ToTip WF, Phetchaburi province	PE	Central	12°50'N, 99°19'E	400	16.08.03
14. Bokkrai WF, Ranong province	RN1	South	10°22'N, 98°51'E	65	15.07.03
15. Huai Rung, Ranong province	RN2	South	10°02'N, 98°39'E	80	14.07.03
16. MeaungTuat WF, Surat thani province	SR	South	08°45'N, 99°26'E	120	29.07.00

Note: WF, waterfall.

40 s, 45 °C for 50 s and 72 °C for 60 s, and final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were checked on a 1% agarose gel containing 0.5 µg/mL of ethidium bromide and purified using the GENECLAN Kit (BIO101). Both directions of PCR products were sequenced using the PCR primers and the sequences were assembled and edited using the SEQED software (ABI 1992). Sequencing reactions were performed on ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystem).

Data analysis

Mitochondrial DNA sequences were aligned using CLUSTAL_X (Thompson *et al.* 1997). The program MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall 1998) was used to determine the best fitting model of DNA substitution using the hierarchical likelihood-ratio test. The Hasegawa–Kishino–Yano (HKY) (Hasegawa *et al.* 1985) with gamma distribution rate heterogeneity and a significant proportion of invariable sites (HKY + G + I) is the best fit model of nucleotide substitution selected by MODELTEST. The proportion of invariable sites (*I*) was estimated to be 0.6360 with a gamma distribution shape parameter of 0.6365. The transitions/transversion (ti/tv) ratio is 12.0953. Base frequencies were estimated as: A = 0.319, C = 0.174, G = 0.160 and T = 0.347.

Haplotype network

The genealogical relationships of the haplotypes were estimated using the median-joining algorithm (Bandelt *et al.* 1999) in the software package NETWORK 3.x (www.fluxus-engineering.com). All variable sites were weighted equally. Nested clade analysis (NCA) (Templeton 1998) can be useful to extract phylogeographic information from the genealogical relationships of the haplotypes. However, there is concern that the lack of statistical support to distinguish among alternative phylogeographic scenarios may lead to erroneous interpretation of the data (Knowles & Madison 2003). The statistical parsimony network of our data constructed using TCS 1.13 (Clement *et al.* 2000) has many ambiguous closed loops (data not shown). Since this prevents reliable construction of the nested design and subsequent analysis we consider NCA to be inappropriate for our data set.

Genetic diversity and population genetic structure

Haplotype diversity, nucleotide diversity, the population parameter, $\theta_s = 2N_e\mu$ and pairwise F_{ST} were calculated using ARLEQUIN 2.000 (Schneider *et al.* 2000). Because the HKY model is not available in ARLEQUIN we used the Tamura & Nei (1993) model with the gamma distribution shape parameter of 0.6365 (from MODELTEST) to calculate the genetic diversity indices and F_{ST} . The significance of test

statistics was obtained by 1000 permutations of the data. The program SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002) was used to define groups of populations using genetic (rather than geographical) 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 10. The highest F_{CT} value achieved from these runs was retained as the best population grouping scheme. A Mantel test (1967) was used to determine the relationship between genetic distance (F_{ST} from ARLEQUIN) and geographical distance to test an isolation-by-distance model. The Mantel test was implemented in IBD 1.52 (Bohonak 2002) using 1000 randomizations.

Demographic history

To infer the demographic history of the species we used two different approaches. First we used the frequency distribution of the number of pairwise differences among all sequences (i.e. the mismatch distribution). The mismatch distributions were calculated using ARLEQUIN. Because mismatch distributions can be affected by population subdivision (Marjoram & Donnelly 1994) we estimated them separately for each population group defined by SAMOVA. The bootstrap approach (1000 replications) was used to test the observed data with the simulated data under the model of sudden expansion by comparing the sum of squared deviations (SSD) between the observed (SSD_{obs}) and simulated (SSD_{sim}) data. The following parameters were also estimated using ARLEQUIN: (i) the expansion time, $\tau = 2ut$ (Note that $u = m_T\mu$ where m_T is the number of nucleotides of the sequences under study and μ is the mutation rate per nucleotide (Roger & Harpending 1992); (ii) the theta parameter before expansion, $\theta_0 = 2\mu N_0$; and (iii) the theta parameter after expansion, $\theta_1 = 2\mu N_1$.

The second method of demographic history inference we used was the program LAMARC 1.2.2 (Kuhner *et al.* 2004) which is based on coalescent theory using a maximum-likelihood framework. LAMARC uses the Metropolis–Hastings Markov chain Monte Carlo sampling algorithm to simultaneously estimate effective population size (from $\theta = 2\mu N_e$ where μ is mutation rate per site and N_e is the female effective population size), growth rate (*g*) under the exponential growth model, and migration rate ($M = m/\mu$, where *m* is the per generation migration rate and μ is the mutation rate per site). LAMARC was run with 10 initial chains with 10 000 sampled genealogies each and two final chains with 200 000 sampled genealogies each. Both initial and final chains used sampling increments of 20. An additional run was used to check the consistency of the results. LAMARC was implemented on the three population groups defined by SAMOVA.

The F_S statistic (Fu 1997) and Tajima's D statistic (Tajima 1989) were used to test the equilibrium of the populations. The F_S statistic and Tajima's D are expected to have large negative values for demographic expansion (and also background selection and hitch-hiking associated with a selective sweep). These statistics were estimated and tested for significance by random permutation using 1000 replicates in ARLEQUIN.

Ecogeographical conditions of the sampling sites

The following ecogeographical information of the sampling sites was used for principal components analysis (PCA): latitude, longitude, altitude, stream width, depth, velocity, pH, dissolved oxygen (DO), temperature, annual rainfall and relative humidity. Environmental conditions were measured when the sampling was conducted with the exceptions of annual rainfall rate and relative humidity where the information was obtained from the Meteorological Department of Thailand for the province in which the black fly specimens were collected. PCA was implemented in the SPSS statistical package (SPSS Inc.).

Results

A total of 217 individuals were examined for their polytene chromosomes. The chromosomal banding patterns of the polytene chromosomes of *Simulium tani* revealed two different cytoforms which differed from each other by two overlapping fixed inversions on the long arm of chromosome III (IIIL). Hereafter these are called *S. tani* form A and form

B. *Simulium tani* form A ($n = 130$) is found in northern populations (CM1, CM2, MS1, MS2, TK, PR, UT and PB) whereas form B ($n = 87$) is found in the east (CB1, CB2 and CB3) and south (RN1, RN2 and SR). In the central region (KB and PE) almost all of the larvae are form A, with only one exception with one individual from PE that is form B. Further chromosomal study of five populations (CM1, CB1, CB2, CB3 and SR) supports our result (Tangkawanit *et al.*, unpublished). They found that all individuals from the CM1 population ($n = 51$) were *S. tani* form A whereas all samples from CB1, CB2, CB3 and SR ($n = 245$) were *S. tani* form B.

Mitochondrial DNA sequence variation

A total of 720 base pairs from 147 individuals of *S. tani* from 16 populations were sequenced. Representative sequences were deposited in GenBank under Accession nos AY855922–AY856042. Nucleotide substitutions were detected in 127 positions, of these, 110 were transitions and 17 were transversions. No deletions or insertions were found. A total of 121 unique haplotypes were identified. The most geographically widespread haplotype is shared by four populations in the north (TK), central (PE) and south (RN1 and RN2) regions. Haplotype diversities ranges from 0.857 to 1.000 with most (9 of 16) populations having a haplotype diversity of 1.000 (i.e. all the sequences in the population are unique). Nucleotide diversities ranges from 0.0030 to 0.0155 (Table 2) and there is a significant positive relationship with latitude ($R^2 = 0.3501$ $P = 0.016$, Fig. 2).

Table 2 Nucleotide diversity (π_n), haplotype diversity (π_h), θ_s , Tajima's D and F_S of 16 populations and three population groups of *Simulium tani*

Population	n	π_n (SD)	θ_s (SD)	π_h (SD)	Tajima's D	F_S
CM1	11	0.010 (0.006)	0.010 (0.005)	1.000 (0.039)	-0.277	-5.485*
CM2	9	0.016 (0.009)	0.020 (0.009)	1.000 (0.052)	-1.189	-2.648*
MS1	6	0.008 (0.005)	0.009 (0.004)	0.933 (0.122)	-0.198	-0.055
MS2	7	0.009 (0.006)	0.010 (0.005)	0.905 (0.103)	-0.662	0.797
PR	9	0.014 (0.008)	0.017 (0.008)	1.000 (0.052)	-1.168	-2.911*
TK	10	0.012 (0.007)	0.015 (0.007)	1.000 (0.045)	-1.240	-4.116*
UT	10	0.011 (0.006)	0.015 (0.007)	1.000 (0.045)	-1.435	-4.302*
PB	11	0.012 (0.007)	0.013 (0.005)	1.000 (0.039)	-0.609	-4.990*
KB	10	0.010 (0.006)	0.011 (0.005)	1.000 (0.045)	-0.553	-4.692*
PE	8	0.009 (0.005)	0.007 (0.004)	0.964 (0.077)	0.499	-1.520
CB1	10	0.010 (0.006)	0.013 (0.006)	1.000 (0.045)	-1.252	-4.738*
CB2	10	0.012 (0.007)	0.013 (0.006)	0.978 (0.054)	-0.606	-2.181
CB3	10	0.010 (0.006)	0.010 (0.005)	0.933 (0.077)	-0.368	-1.181
RN1	9	0.006 (0.004)	0.008 (0.004)	0.972 (0.064)	-1.085	-3.176*
RN2	7	0.003 (0.002)	0.003 (0.002)	0.857 (0.137)	-0.734	-1.447
SR	10	0.009 (0.005)	0.012 (0.005)	1.000 (0.045)	-1.266	-5.051*
North	73	0.012 (0.006)	0.029 (0.008)	0.995 (0.004)	-2.050*	-24.793**
East	30	0.011 (0.006)	0.015 (0.005)	0.986 (0.013)	-1.105	-14.517**
Central + South	44	0.008 (0.004)	0.014 (0.004)	0.981 (0.011)	-1.612*	-25.432**

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

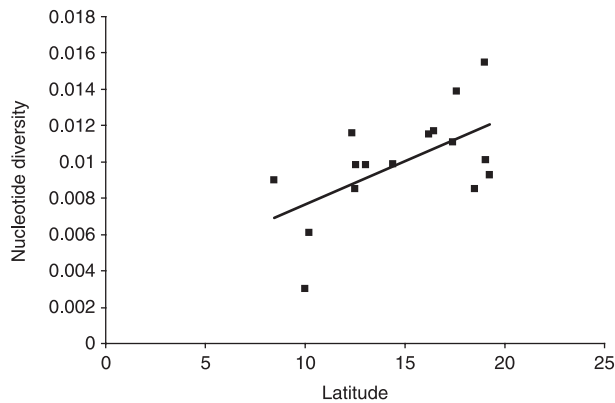


Fig. 2 Scatter plot showing the relationship between latitude and nucleotide diversity of 16 populations of *Simulium tani*.

Mitochondrial DNA genealogy

The genealogy of 147 sequences of *S. tani* (Fig. 3) revealed no major phylogeographic breaks but there was some geographical clustering of the haplotypes. Haplotypes from the east are clustered together and have relatively long branch lengths. Haplotypes from the south cluster largely with haplotypes from the central region and with some haplotypes from the north. Overall, the network has a

starlike shape, characteristic of population expansion (Slatkin & Hudson 1991). The haplotypes from the north fall into three divergent lineages (A, B and C, Fig. 3). The largest lineage is A which forms the core of the network comprised of a larger number of dispersed haplotypes. A subset of the A lineage gives rise to the eastern haplotypes and a different subset gives rise to the central/southern haplotypes.

Population genetic structure

SAMOVA revealed very similar F_{CT} values for different numbers of groups (k) (Fig. 4). However, when $k \geq 4$ the grouping structure started to disappear, that is, one of the groups was composed of only one population. Thus we used $k = 3$ as the best grouping scheme. These three groups correspond well to the geographical position of the populations (Fig. 1). The first group is composed of populations from the north (CM1, CM2, MS1, MS2, TK, PR, UT and PB), the second group of populations from the east (CB1, CB2 and CB3), and the third group of populations from central and south (KB, PE, RN1, RN2 and SR). Hereafter the central and south group is referred to as the CS group. Pairwise F_{ST} values between these three population groups (Table 3) are highly significant. The east and CS groups are similarly divergent from the north group ($F_{ST} \approx 0.2$) but they are

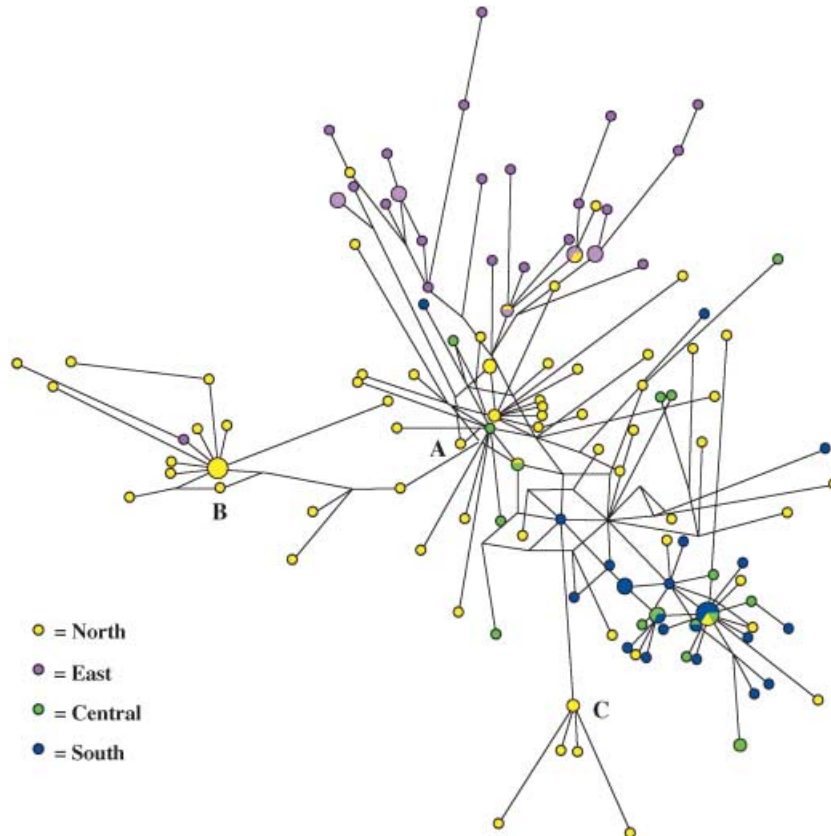


Fig. 3 Median-joining network computed by NETWORK (all sites are weighted equally) for 147 sequences of *Simulium tani*. Each haplotype is represented by a circle. The sizes of the circles are proportional to the frequency of the haplotype. Circles of the same colour represent haplotypes from the same geographical region (yellow, north; pink, east; green, central; and blue, south).

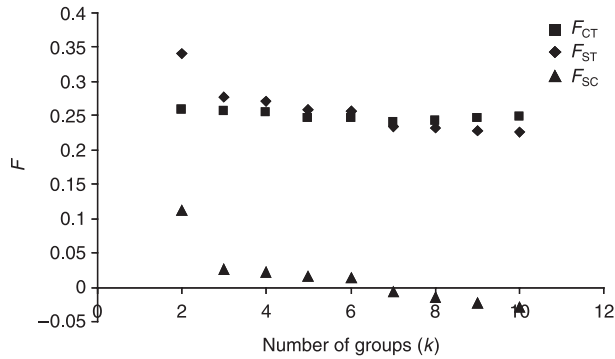


Fig. 4 Values of fixation indices, F , obtained from SAMOVA as a function of number of groups (k). F_{CT} is the differentiation between groups, F_{ST} is the differentiation between populations among groups and F_{SC} is the differentiation between populations within groups.

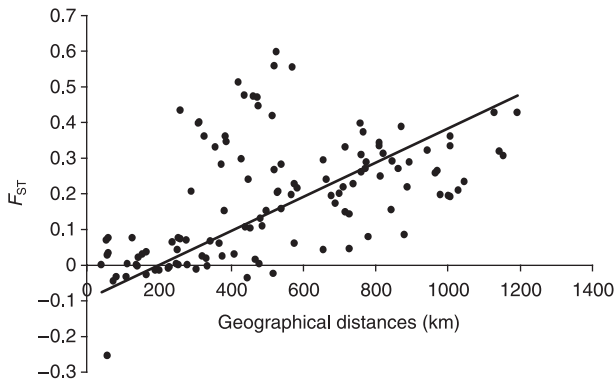


Fig. 5 Scatter plot showing the relationship between genetic distances (F_{ST}) and geographical distances (km) of 16 populations of *Simulium tani*.

Table 3 F_{ST} between three population groups defined by SAMOVA

	North	East	CS
North	—		
East	0.240*	—	
CS	0.192*	0.449*	—

Note: * $P < 0.001$; CS, central and south.

highly divergent from each other ($F_{ST} = 0.449$, $P < 0.001$). The Mantel test revealed a significant positive relationship between genetic and geographical distances ($r = 0.5146$, $P < 0.001$, Fig. 5).

Demographic history

The F_S and Tajima's D -test statistics are significantly negative in all three population groups (with the exception of Tajima's D in the east, Table 2). The mismatch distributions of all three population groups are fitted to simulated data under the model of sudden population expansion (Fig. 6). A large difference between θ_0 and θ_1 in all population groups indicates a rapid increase in the population size (Table 4). The maximum-likelihood estimates of exponential growth rates from LAMARC are also high in all three groups (Table 5). Thus, these results indicate that there has been population expansion in all three population groups.

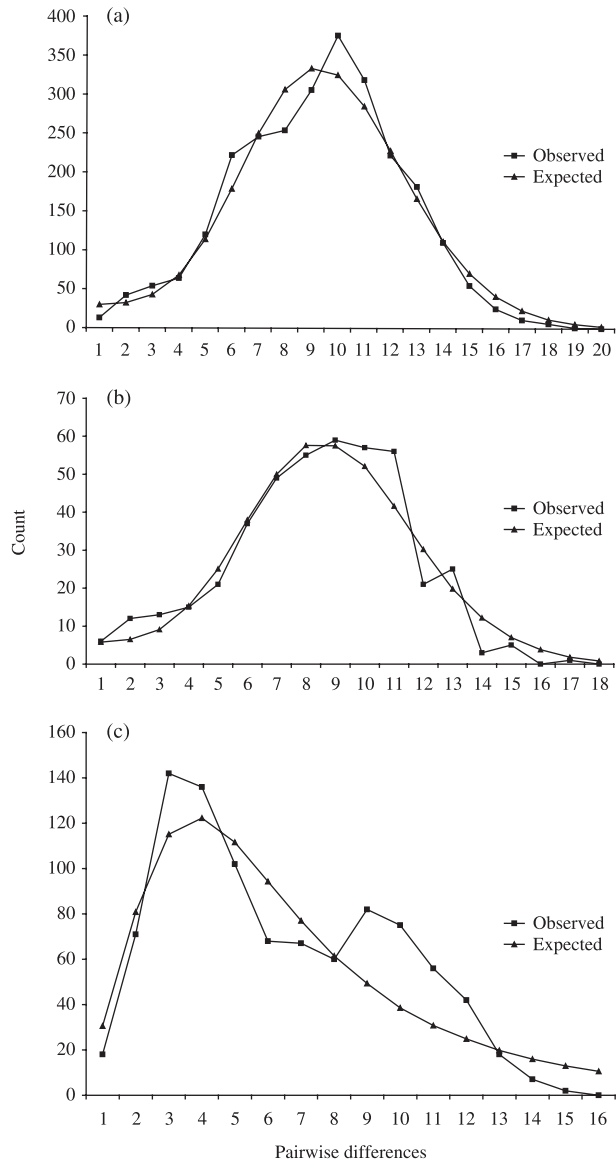


Fig. 6 Mismatch distributions of the (a) north (b) east and (c) CS population groups. The distributions fit the model of the sudden population expansion as none of the SSD values are significantly different from the distributions of the simulated data under the sudden population expansion model (see Materials and methods).

The population demographic parameters estimated by the stepwise expansion model (Table 4) indicate that expansion times of haplotypes from the northern and

Table 4 Estimated parameters of the population expansion of *Simulium tani* from the stepwise expansion model

Region	N	$\tau = 2ut$ (95% interval)	$\theta_0 = 2uN_0$ (95% interval)	$\theta_1 = 2uN_1$ (95% interval)
North	73	8.884 (6.189–10.739)	0.006 (0.000–2.821)	88.242 (45.849–6619.492)
East	30	8.221 (4.912–10.366)	0.000 (0.000–2.762)	75.469 (34.044–6795.469)
Central + South	44	1.774 (0.409–6.337)	4.225 (0.000–12.032)	6657.500 (32.266–7542.500)

Population group (i)	$\theta = 2N_i\mu$	g	M		
			$N \rightarrow i$	$E \rightarrow i$	$CS \rightarrow i$
North (N)	3.740	1929.776	—	11.08	55.63
East (E)	0.189	1081.865	45.66	—	5.78×10^{-5}
Central + south (CS)	0.240	1435.017	164.36	2.7×10^{-4}	—

Table 5 Maximum-likelihood estimates of the population sizes ($\theta = 2N_i\mu$), exponential growth rates (g) and migration rates ($M = m/\mu$) for three population groups of *Simulium tani*

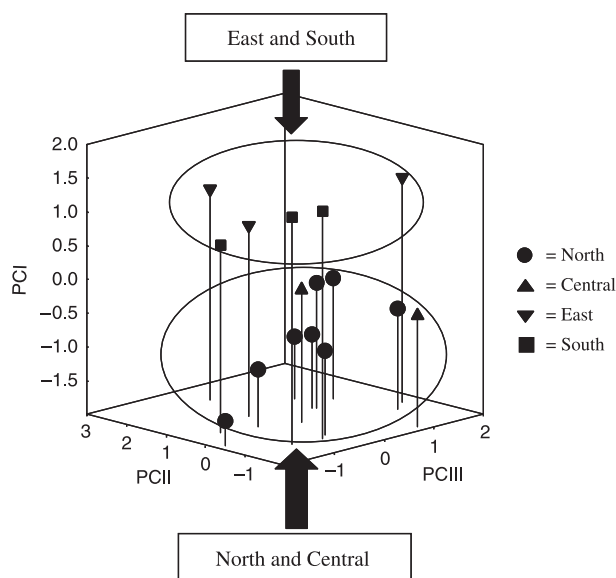
eastern regions are very similar ($\tau = 8.884$ and 8.221 , respectively). The mismatch distribution of the CS group is bimodal (Fig. 6c) suggesting that the mtDNA haplotypes from these regions have experienced two expansions at differing times. The dominant peak on the left-hand side indicates a recent expansion ($\tau = 1.774$). The smaller right-hand peak is comparable in position to that of the north and east. The population sizes (θ) estimated from the exponential growth model from LAMARC (Table 5) indicated a much larger population size in the northern population group ($\theta = 3.740$) compared to the eastern ($\theta = 0.189$) and CS population groups ($\theta = 0.240$).

Historical migration patterns

Maximum-likelihood estimates of the migration rates between the three population groups (Table 5) revealed asymmetric migration rates. The migration rate from north to east is approximately four times higher than in the opposite direction. Similarly the migration rate from north to south is approximately three times higher than in the opposite direction. Migration between the east and CS is negligible (2.7×10^{-4} and 5.78×10^{-5} migrants).

Ecological differentiation of the sampling sites

PCA results revealed that the primary factor (PCI, 38.15%) of ecological variation in the sampling sites is climatic condition (i.e. annual rainfall, relative humidity and stream temperature). The second most important factor (PCII, 17.81%) is determined mainly by the physical and chemical conditions (i.e. DO, stream depth and velocity). The third axis (PCIII, 13.56%) is determined mainly by physical conditions (i.e. stream width and altitude) of the sampling sites. Together the plot (Fig. 7) of these three axes revealed

**Fig. 7** Plot of the first three principal components scores (PCI, II and III) derived from PCA of the 11 environmental conditions of 16 sampling sites.

that the sampling sites from the northern and central regions are distinct from those of the east and south.

Discussion

Mitochondrial DNA sequence diversity, population size and oviposition behaviour

Maximum-likelihood estimates of θ (Table 5) indicate effective population sizes of $\approx 3\,000\,000$, $\approx 160\,000$ and $\approx 200\,000$ flies in the north, east and CS population groups, respectively. Although the estimates are much greater

for the northern than the east or CS groups, the effective population sizes are nonetheless considerable for all population groups. However, ecological observations reveal that there must be large seasonal fluctuations in the actual population sizes due to reduced numbers of larval breeding sizes during the dry season. For example, in the northern region, *S. tani* can only be collected at six sampling sites in the dry season compared to 25 sites in the cool season (the cool season follows the rainy season so a large amount of running water is still available) (Jitklang *et al.*, unpublished). Most of these populations are likely to undergo local extinction and recolonization. Aestivation of the eggs as a mechanism for drought survival cannot be ruled out but is less likely since most black fly eggs cannot tolerate desiccation (Zhu *et al.* 1998). A behavioural study of the *Simulium venustum/verecundum* complex found that oviposition was related neither to larval nor to adult site fidelity (Hunter & Jain 2000). Instead they tend to oviposit randomly in 'apparently suitable' habitat. Larval or adult site fidelity is expected to be associated with low genetic diversity particularly the number of haplotypes in the population (Wishart & Hughes 2001, 2003). However, high levels of genetic diversity were detected in populations of *S. tani*, particularly haplotype diversity, with more than half (9 of 16) of the populations having a haplotype diversity of 1. This suggests that the process of local recolonization is accomplished by many, unrelated females. The source of these females is presumably from the relatively small numbers of breeding sites that do not dry up during the dry season (e.g. MS2, CM1). A greater availability of such dry season breeding sites in the north where there is often year-round running water may, in part, explain the larger effective population size in the north. However, this is also largely due to demographic history (see next section).

Population history

Evidence from the mismatch distributions and LAMARC analysis indicates that there have been population expansions in all three regions (north, east and CS). Using $\tau = 2ut$ and assuming 12 generations a year for *S. tani* (P. Adler, personal communication) and a divergence rate of 2.3% per million years (Myr) for insect mtDNA (Brower 1994), the expansion times are estimated to be 540 000 and 500 000 years ago in the north and the east, respectively. The bimodal peaks of the CS mismatch distribution have a dominant left-hand peak that indicates a very recent expansion (c. 100 000 years ago) occurring only in the CS region. The smaller right-hand peak is comparable in mean number of pairwise differences to those of the north and east. This might suggest that populations in the CS region have also undergone expansion during the mid-Pleistocene along with the northern and eastern regions. However,

although such an expansion may well have occurred, the signal would probably be largely or wholly obscured by that of the more recent expansion. It is therefore most likely that the older peak in the CS mismatch distribution (which presumably corresponds to pairwise comparisons made with and among the small number of highly divergent CS haplotypes) is the result of more recent gene flow from the north.

One possible explanation for the older, mid-Pleistocene expansion is that populations in the different regions expanded independently in response to the same factor(s), perhaps the change in climatic (and consequently environmental) conditions during the mid-Pleistocene. However, the evidence supports an alternative explanation that the regional populations have resulted from the same wave of demographic expansion as in a combined analysis (data not shown) there is a single peak in the mismatch distribution (Excoffier 2004). The interior position of the northern haplotypes (Fig. 3) and their higher level of genetic diversity (Table 2) suggest that haplotypes from this region are ancestral (Crandall *et al.* 1993). The decreasing level of genetic diversity moving southwards (Fig. 2) coupled with the evidence of unidirectional migration from the north to CS and the east (Table 5) further suggests that black fly populations in CS and the east originated entirely from range expansions from the north (Hale & Singh 1987; Caracristi & Schlötterer 2003). In addition three divergent lineages have been detected in the north (A, B and C, Fig. 3) but not in other regions. Instead haplotypes in the east and CS regions are derived from one of the northern lineages (lineage A, see below) suggesting that the north has a longer history. The three divergent lineages in the north may have resulted from Pleistocene climatic fluctuation which enabled lineages to differentiate in different Pleistocene refugia. During glacial periods the climatic conditions are not only colder but also drier in the tropics (Voris 2000 and references therein; Penny 2001) with a lower precipitation rate than at the present time (Woodruff 2003 and references therein). Thus many of the streams, the larval habitats of *S. tani*, are likely to dry up during such periods. However, some of the streams in high-altitude areas (e.g. mountain tops) may still have been present as they can receive enough moisture by intercepting the weak monsoon and fog (Gathorne-Hardy *et al.* 2002). As the northern region is composed of several mountain ranges with high altitude, this area is likely to contain the refugium sites of *S. tani* during the dry periods of the Pleistocene glaciations.

The relatively long branch lengths of the eastern haplotypes indicate that they have maintained a large and relatively stable population size after the colonization. As the eastern region is in proximity to the sea, it probably receives enough moisture from the sea to allow running water to be retained in this region during the dry period of the glaciations (Gathorne-Hardy *et al.* 2002). In contrast to

the east, the CS haplotypes have shorter branch lengths and a more starlike shape suggestive of a more recent expansion that is also reflected by the lower mean number of pairwise differences in the dominant peak of the mismatch distribution. The lack of genetic differentiation between the central and southern mtDNA haplotypes suggests that the recent expansion was from a single source. The reduction in diversity from north to south suggests this source was either from a residual population that survived in the central region or from a small subset of haplotypes from further north that colonized southwards when environmental conditions improved after a period of glaciation. Interestingly, recent southern population expansion is also detected in other black flies (Pramual *et al.* in prep.) and *Anopheles dirus* mosquitoes (O'Loughlin *et al.* submitted). This general pattern perhaps indicates a response to the same environmental/geographical factor(s).

Population genetic structure: geographical and ecological barriers to gene flow

The genetic structure of a population can result from both ongoing (e.g. gene flow) and historical events (e.g. population expansion, fragmentation). Information in the genealogy of the haplotypes can be used to separate the effects of these events (Templeton 1998). The mtDNA genealogy of *S. tani* revealed no major genetic breaks but there was some localized clustering of haplotypes. This is characteristic of a species that has not experienced long-term zoogeographical barriers to dispersal but where the level of gene flow is limited (Avice *et al.* 1987). The results from SAMOVA and F_{ST} further support the limitation of gene flow between geographical regions (i.e. North, East and CS) as populations from each geographical region group together based on genetic criteria with high levels of genetic differentiation between the groups (Fig. 1 and Table 3).

Mountain ranges are unlikely to be a physical barrier to dispersal between north and east, and north and south, in *S. tani* as the species can be found breeding even in high-altitude areas (more than 1000 m above sea level; Kuvangkadilok *et al.* 1999). It is possible that extensive areas of lowland may provide a barrier to gene flow if there is insufficient fast running water. This may be the case in the area intervening the north and east regions where we did not find *S. tani* despite sampling at several sites. A greater sampling effort needs to be made in this area before we can infer that *S. tani* is likely to be absent there. The correlation between genetic and geographical distance suggests isolation by distance. However in a situation where environmental conditions vary with geographical distance, the interpretation of limited gene flow as a function of geographical distance may be misleading (Geffen *et al.* 2004). Recent studies indicate that ecological differentiation between

populations can play an important role as a barrier to gene flow potentially leading to speciation (reviewed in Schluter 2001; Pfenninger *et al.* 2003). The differentiation in environmental conditions between north and east, and north and south, is likely to be a major factor limiting gene flow between these populations with different selection regimes operating in different regions (see below).

The high level of genetic differentiation, negligible migration rates, and no common haplotype sharing between the east and CS regions suggested that gene flow between these regions is absent. The sea (Gulf of Thailand, Fig. 1) separating the east and CS is likely to be an effective barrier to gene flow. Although wind-assisted long-distance migration across the sea is possible for black flies (Crosskey 1990), it seems unlikely for *S. tani* because even the shortest distance between two populations separated in part by the sea (PE from CS and CB3 from the east) is very far at 260 km. The lack of genetic differentiation of mtDNA between the central and southern regions could be due to ongoing gene flow or the sharing of a recent common history (Templeton 1998). Given the recent population expansion the latter is likely to be the main reason but ongoing gene flow cannot be ruled out. Indeed, given the lack of obvious physical barriers between the central and southern regions ongoing gene flow from the south to the central region seems the most likely explanation for the occurrence of the *S. tani* form B (in a homozygous state) in the central region given that all other cytotyped individuals are *S. tani* form A. The alternative explanation, that reproductive barriers have formed between the cytoforms, seems less likely given their recent shared history.

The inference of historical migration associated with population expansion suggested that populations in the east and CS are derived from the north during the mid-Pleistocene (see above). No more recent connection between the east and CS has been detected. However, cytological investigations found that populations in the east and south are both of the same cytological form (*S. tani* form B). Thus *S. tani* form B in the east and south is most likely to have been derived from a common ancestor in the north. We cannot rule out the possibility of independent origins for the same chromosomal inversion but this is uncommon (Caccone *et al.* 1998). Since the PCA indicates that ecological conditions in the east and south are similar to each other but different from the north, it seems likely that fixation of the chromosomal inversions of *S. tani* form B in these regions is due to adaptation to the ecological conditions in the east and south (most probably the high relative humidity and precipitation rate of tropical rainforest). Conversely, in the northern and central regions (that are drier and have a low precipitation rate, i.e. mixed deciduous forest) *S. tani* form A appears to be favoured. Although ecological adaptation seems the most likely explanation of the fixed chromosomal differences it is

possible that there are alternative causes such as behavioural difference.

The differentiation in chromosomal arrangement coupled with limitations to gene flow suggests that adaptation to different ecological conditions is important in black fly evolution. This result is consistent with a previous study which indicated that adaptation to different ecological conditions of larval habitats played an important role in promoting speciation in black flies (Craig *et al.* 2001; Joy & Conn 2001). At present, we cannot infer if the cytoforms of *S. tani* represent early stages in the speciation process or not. However, it is interesting to note that the situation here, particularly between the south and central regions, appears somewhat analogous to the model of parapatric speciation put forward by Navarro & Barton (2003) in which speciation is driven by the differential adaptation of genes located within inverted regions of the genome in the face of gene flow.

Conclusion

Our study is the first comprehensive phylogeographic study of black flies. Integrating information from mtDNA and chromosomal inversion polymorphism has enabled us to postulate the origin of cytoforms and their role in ecological adaptation that could ultimately lead to speciation. Our results also indicated the important role of historical events (e.g. Pleistocene climatic change) and contemporary ecological conditions in conjunction with behaviour (oviposition and dispersal) in the generation and maintenance of genetic diversity and the shaping of the genetic structure of the species. If the phylogeographic results presented here are found to be similar in other organisms, it may indicate the need to consider the northern, southern and eastern regions as different management units for conservation purposes.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (PHD0026/2544, BGJ4580005 and RDG4530034). We would like to thank Prof. Peter Adler (Clemson University, USA) for his advice on cytological techniques. Special thanks for people who helped in sample collections: Suwannee Phayahasena, Anchalee Thanwisai, Sanae Jitklang, Ubon Tangkawanit and Unchulee Lualon. The manuscript of this paper was greatly improved by the comments of three anonymous referees.

References

- Adler PH (1988) Ecology of black fly sibling species. In: *Black Flies: Ecology, Population Management, and Annotated World List* (eds Kim KC, Merritt RW), pp. 63–76. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Adler PH, McCreadie JW (1997) The hidden ecology of black flies; sibling species and ecological scale. *American Entomologist*, **Fall**, 153–161.
- Avice JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avice JC, Arnold J, Ball MR *et al.* (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489–522.
- Baldwin WF, Gomery J, West AS (1975) Dispersal patterns of black flies (Diptera: Simuliidae) tagged with ^{32}P . *Canadian Entomologist*, **107**, 113–118.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- 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.
- Bohonak AJ (2002) IBD (Isolation by Distance): a programme for analysis of isolation by distance. *Journal of Heredity*, **93**, 153–154.
- Brandon-Jones D (1998) Pre-glacial Bornean primate impoverishment and Wallace's line. In: *Biogeography and Geological Evolution of SE Asia* (eds Hall R, Holloway JD), pp. 393–404. Backhuys Publisher, Leiden, The Netherlands.
- 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, USA*, **91**, 6491–6495.
- Caccone A, Min G-S, Powell JR (1998) Multiple origins of cytologically identical chromosome inversions in the *Anopheles gambiae* complex. *Genetics*, **150**, 807–814.
- Caracristi G, Schlötterer C (2003) Genetic differentiation between American and European *Drosophila melanogaster* populations could be attributed to admixture of African alleles. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 792–799.
- Chen B, Harbach RE, Butlin RK (2004) Genetic variation and population structure of the mosquito *Anopheles jeyporiensis* in southern China. *Molecular Ecology*, **13**, 3051–3056.
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) tcs: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657–1660.
- 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.
- Craig DA, Currie DC, Joy DA (2001) Geographical history of the central-western Pacific black fly subgenus *Inseliellum* (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) based on a reconstructed phylogeny of the species, hot-spot archipelagos and hydrological considerations. *Journal of Biogeography*, **28**, 1101–1127.
- Crandall M, Sabatini A, Templeton AR (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, **134**, 959–969.
- Crosskey RW (1990) *The Natural History of Blackflies*. John Wiley & Sons, London.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–2581.
- Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, **13**, 853–864.
- Feraday RM, Leohardt KG (1989) Absence of population structure in black flies as revealed by enzyme electrophoresis. *Genome*, **32**, 531–537.

- Fu YX (1997) Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Gathorne-Hardy FJ, Syaokani, 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.
- Geffen E, Anderson MJ, Wayne RK (2004) Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf. *Molecular Ecology*, **13**, 2481–2490.
- Hale LR, Singh RS (1987) Mitochondrial DNA variation and genetic structure in populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 622–637.
- Hasegawa M, Kishino K, Yano T (1985) Dating the human–ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 160–174.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **7**, 247–276.
- Hoffmann AA, Sgrò CM, Weeks AR (2004) Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 482–488.
- Hughes JB, Round PD, Woodruff DS (2003) The Indochinese–Sundaic faunal transition at the Isthmus of Kra: an analysis of resident forest bird species distributions. *Journal of Biogeography*, **30**, 569–580.
- Hunter FF, Jain H (2000) Do gravid black flies (Diptera: Simuliidae) oviposit at their natal site? *Journal of Insect Behavior*, **13**, 585–595.
- Joy DA, Conn JE (2001) Molecular and morphological phylogenetic analysis of an insular radiation in Pacific black flies (*Simulium*). *Systematic Biology*, **50**, 18–38.
- Knowles L, Madson W (2003) Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, **11**, 2623–2635.
- Kuhner MK, Yamato J, Beerli P *et al.* (2004) LAMARC 1.2.1. University of Washington <http://evolution.gs.washington.edu/lamarc.html>.
- Kuvangkadilok C, Boonkemtong C, Phayuhasena S (1999) Distribution of the larvae of black flies (Diptera: Simuliidae) at Doi Inthanon National Park, northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **30**, 328–337.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primer for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, **5**, 153–165.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209–220.
- Marjoram P, Donnelly P (1994) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution. *Genetics*, **136**, 673–683.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Navarro A, Barton NH (2003) Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. *Evolution*, **57**, 447–459.
- Pattananavibool A, Dearden P (2002) Fragmentation and wildlife in montane evergreen forests, northern Thailand. *Biological Conservation*, **107**, 155–164.
- Penny D (2001) A 40 000 year palynological record from north-east Thailand, implications for biogeography and palaeo-environmental reconstruction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **171**, 97–128.
- Pfenninger M, Staubach S, Albrecht C, Streit B, Schwenk K (2003) Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O.F. Müller, 1774). *Molecular Ecology*, **12**, 2731–2745.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817–818.
- Randi E, Alves PC, Carranza J, Milošević S, Sfougaris A, Mucci N (2004) Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) population: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, **13**, 3071–3083.
- Rempel JG, Arnason AP (1947) An account of three successive outbreaks of the black fly, *Simulium arcticum*, a serious livestock pest in Saskatchewan. *Scientific Agriculture*, **27**, 428–445.
- Roger AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552–569.
- Rothfels KH (1956) Black flies: siblings, sex, and species grouping. *Journal of Heredity*, **47**, 113–122.
- Rothfels KH, Dunbar RW (1953) The salivary gland chromosomes of black fly *Simulium vittatum* Zett. *Canadian Journal of Zoology*, **31**, 226–241.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 372–380.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN (Version 2.000): a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology and Ecology, University of Geneva, Switzerland.
- 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.
- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, **129**, 555–562.
- Tajima F (1989) Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- 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, Davies DM (1995) *The Blackflies (Diptera: Simuliidae) of West Malaysia*. Kyushu University Press, Fukuoka, Japan.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 512–526.
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**, 381–397.
- Thompson JD, Gipsen TJ, Plewamak F, Jeanmougin F, Higgins GD (1997) The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4876–4882.
- Voris HK (2000) Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of Biogeography*, **27**, 1153–1167.
- Walton C, Handley JM, Tun-Lin W *et al.* (2000) Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 962–974.

- Whorley JR, Alvarez-Castañeda T, Kenagy GJ (2004) Genetic structure of desert ground squirrels over a 20-degree-latitude transect from Oregon through the Baja California peninsula. *Molecular Ecology*, **13**, 2709–2720.
- Wishart MJ, Hughes JM (2001) Exploring patterns of population subdivision in the net-winged midge, *Elporia barnardi* (Diptera: Blephariceridae), in the mountain streams of the south-western Cape, South Africa. *Freshwater Biology*, **46**, 479–490.
- Wishart MJ, Hughes JM (2003) Genetic population structure of the net-winged midge, *Elporia barnardi* (Diptera: Blephariceridae) in streams of the south-western Cape, South Africa: implications for dispersal. *Freshwater Biology*, **48**, 28–38.
- Woodruff DS (2003) Neogene marine transgressions, palaeogeography and biogeographic transitions on the Thai-Malay Peninsula. *Journal of Biogeography*, **30**, 551–567.
- Xiong B, Kocher TD (1991) Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome*, **34**, 306–311.
- Zhu X, Pruess KP, Powers TO (1998) Mitochondrial DNA polymorphism in a black fly, *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*, **76**, 440–447.

This work is part of P. Pramual's PhD study on phylogeography and genetic structure of *Simulium* in Thailand. C. Kuvangkadilok and V. Baimai are working on cytogenetics and population genetics of insect vectors in Thailand. C. Walton is working on genetic diversity of mosquitoes in Southeast Asia.
