

595.771

ด ๒๓๗ ๗

๖.๖

การศึกษาคาร์โบไฮโปของยุง Anopheles balabacensis complex

ปริณฎานินพนธ์

ของ

ศิริวิทย์ มุขนาค

๕-6 พ.ค. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

เมษายน 2528

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178320

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบได้พิจารณา
ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

..... ประธาน

..... กรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือ และการให้คำแนะนำอย่างดียิ่ง
จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมใจ สิงสวลี และอาจารย์นงลักษณ์ สฤตญาณทวีทยา
ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์พันธุ์สิน เกตุทัต ที่กรุณาช่วยเหลือ
และให้คำแนะนำปรึกษาตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์กรองแก้ว
พิพิธาสถาพร ที่กรุณาช่วยเหลือในการตรวจแก้ปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาสถิติวิทยาทางการแพทย์
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือมาตลอด
ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ศิริวดี บุณนาค

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	11
จุดมุ่งหมายในการศึกษา	2
ความสำคัญของการศึกษา	3
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	9
สัตว์ทดลอง	9
การเตรียมสัตว์ทดลอง	9
วิธีดำเนินการศึกษา	12
การเก็บและรวบรวมข้อมูล	15
4 ผลการทดลอง	16
5 สรุป อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ	29
สรุป	29
อภิปรายผล	30
ข้อเสนอแนะ	34
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	40

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> และ <u>An. balabacensis</u> (Perl's form) จากส่วนสมองของลูกน้ำระยะที่ 4 โดยการ ย้อมสี Orcein	19
2	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> และ <u>An. balabacensis</u> (Perl's form) จากรังไข่ โดยการย้อมสี Orcein	20
3	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> และ <u>An. balabacensis</u> (Perl's form) จากส่วนสมองของลูกน้ำระยะที่ 4 โดยการ ย้อมสี Hoechst 33258	21
4	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> กายจุนเจือ และอสุรี จากรังไข่ โดยการย้อมสี Hoechst 33258	22
5	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> จลนวิ <u>An. balabacensis</u> (Perl's form) จากรังไข่ โดยการย้อมสี Hoechst 33258	23
6	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> กายจุนเจือ จากอสุรี โดยการย้อมสี Hoechst 33258	24
7	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> และ <u>An. balabacensis</u> (Perl's form) จากส่วนสมองของลูกน้ำระยะที่ 4 โดยการ ย้อมสี Giemsa	25
8	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> กายจุนเจือ และอสุรี จากรังไข่ โดยการย้อมสี Giemsa	26

9	โครโมโซมของยุง <u>An. dirus</u> ชลบุรี และ <u>An. balabacensis</u> (Perlis form) จากรังไข่ โดยการย้อมสี	27
10	โครโมโซมแสดงเฮเทอโรโครมาตินของยุง <u>An. balabacensis</u> complex	28

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิอากาศ ภูมิภูมิและความชื้นเหมาะสมแก่การขยายพันธุ์ของยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคต่าง ๆ หลายโรค เช่น Culex fuscocephala Cx. gelidus และ Cx. tritaeniorhynchus นำโรคไข้สมองอักเสบ (Muangman and others. 1972 : 482 - 486, Simasathien and others. 1972 : 52 - 64) Aedes aegypti และ Ae. albopictus นำโรคไข้เลือดออก (Gould and others. 1968 : 609 - 618) Mansonia annulata, M. dives, M. bonnae, M. indiana และ M. uniformis นำโรคเท้าช้างทางใต้ของประเทศไทย (Guptavanij and others. 1971 : 44 - 50) และ Anopheles balabacensis, An. minimus, An. maculatus, An. sundaicus และ An. aconitus นำโรคมalaria ในประเทศไทย (Ministry of Public Health. 1973 : 124) ยุงบางชนิดไม่นำโรคแต่ทำให้เกิดความรำคาญโดยกัดเจ็บ การที่จะป้องกันโรคต่าง ๆ ดังกล่าวนั้นควรจะต้องรู้จักยุงเหล่านี้ในทางต่าง ๆ เช่น การนำโรค ลักษณะนิสัยและแหล่งเพาะพันธุ์เพื่อประโยชน์ในการหาแนวทางป้องกัน และกำจัดยุงไม่ให้โรคร้ายแพร่ระบาด ช่วยทำให้ประชาชนปราศจากโรคร้ายดังกล่าว การงานและเศรษฐกิจของประเทศชาติจะไม่สูญเสียไปเท่าที่เป็นอยู่ (สุภัทร สุจริต 2526 : 4 - 8)

ในจำนวนโรคที่เกิดจากยุงเป็นพาหะที่กล่าวมาแล้ว โรคมalaria เป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย เพราะในขณะนี้ มีคนจำนวนมากที่ป่วยและตายด้วยโรคมalaria ถึงแม้จะมีโครงการกำจัดมalaria แห่งชาติมาหลายปี เช่น มีการใช้ยาฆ่าแมลงในการปราบยุงที่เป็นพาหะของโรคมalaria แต่ยุงพวกนี้สามารถพัฒนาตัวเองให้ต้านทานต่อยาฆ่าแมลง เมื่อยังปราบยุงที่เป็นพาหะไม่ได้โรคมalaria จึงเป็นปัญหาในขั้นนี้

หลายจังหวัดของประเทศไทย ในจำนวนยุงที่นำเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นต้นเหตุหนึ่งของโรคมาลาเรียพบว่ายุง *An. balabacensis* และ *An. minimus* เป็นพาหะของโรคโดยเฉพาะ *An. balabacensis* เป็นพาหะนำโรคมากกว่า *An. minimus* (Wilkinson and others, 1972 : 423 - 427) ยุง *An. balabacensis* มีขอบเขตการกระจายอยู่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไต้หวัน คอมามีผู้ศึกษาพบว่ายุงชนิดนี้มีลักษณะรูปร่างแตกต่างออกไปตามสภาพแวดล้อมที่อยู่ (Reid, 1968 : 520) ทำให้แบ่ง *An. balabacensis* ออกเป็น 4 สปีชีส์ โดยใช้ความแตกต่างทางภายนอกเป็นเกณฑ์ แต่ทั้ง 4 สปีชีส์ก็ยังมีส่วนเหมือนกันในบางระยะ จึงเรียกยุงทั้ง 4 สปีชีส์ใหม่นี้ว่าเป็น *An. balabacensis* complex สปีชีส์ทั้งใหม่นี้ยังโดยรูปร่างภายนอก ซึ่งยังไม่เพียงพอจะต้องมีการศึกษาทางพันธุกรรมสนับสนุน ควบคู่กันจากกันจริง (Colles, 1966 : 37 - 116)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษา kariotype (Karyotype) ซึ่งเป็นงานส่วนหนึ่งทางพันธุศาสตร์ (Cytogenetics) ว่ายุง *An. balabacensis* complex ที่นำมาจากสถานที่ต่าง ๆ กัน จะมีความแตกต่างของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส (Metaphase) อย่างไร โดยการย้อมสี Hoechst 33258 และสี Giemsa

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาความแตกต่างของ kariotype ในระยะเมตาเฟสของยุง *An. balabacensis* complex ที่นำมาจากสถานที่ต่าง ๆ กัน โดยการย้อมสี Hoechst 33258 และสี Giemsa

ความสำคัญของการวิจัย

เพื่อให้เข้าใจทางพันธุกรรมของยุง *An. balabacensis* complex ที่มาจากสถานที่ต่าง ๆ กัน ซึ่งจะช่วยให้ข้อสันนิษฐานว่าเป็นยุงสปีชีส์เดียวกันหรือไม่

ขอบเขตของการวิจัย

1. ยุง *An. balabacensis* complex นำมาจาก

1.1 ประเทศไทย ไก่แก้วจังหวัดชลบุรี กาญจนบุรี และอุตรธานี

1.2 ประเทศมาเลเซีย ไก่แก้ว บริเวณทางเหนือของประเทศมาเลเซีย

(Perlis state)

2. การศึกษาโครโมโซม

2.1 ไมโทติก โครโมโซม (Mitotic chromosome) ศึกษาจากส่วน

สมองของลูกน้ำระยะที่ 4 (Late fourth instar larva)

2.2 ไมโอติก โครโมโซม (Meiotic chromosome) ศึกษาจาก

ส่วนของรังไข่ (Ovary) และถุงอัณฑะ (Testis) ของตัวเต็มวัย (Adult stage) อายุ 1 วัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดหมวดหมู่ An. balabacensis

Phylum Arthropoda

Class Insecta

Order Diptera

Suborder Nematocera

Family Culicidae

Genus Anopheles

Subgenus Cellia

Series Neomyzomyia

ยุง An. balabacensis อยู่ในกลุ่ม Leucosphyrus ซึ่งประกอบด้วย 5 สปีชีส์คือ An. leucosphyrus, An. balabacensis, An. hackeri, An. pujutensis และ An. riasis (Reid. 1968.: 520)

ยุง Anopheles ชาวบ้านเรียก "ยุงก้นปล่อง" เวลาที่ตคนกันจะขึ้นเป็นแนว 45 องศาขึ้นราบ ส่วนใหญ่ยุงก้นปล่องมักเพาะพันธุ์ในป่า บางชนิดก็อยู่ในทุ่งนา บ่อและหนองบึง ลูกน้ำของยุงก้นปล่องจะว่ายน้ำลำตัวขนานกับผิวน้ำมักชอบน้ำสะอาด จำนวนของยุงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝน ยุงก้นปล่องที่นำโรคมาลาเรียมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีนิสัยการเพาะพันธุ์แตกต่างกันไป ยุง An. balabacensis เป็นตัวนำโรคมมาลาเรียที่สำคัญของไทย ชอบอาศัยอยู่ในป่า ไม่แพร่ในเมือง วางไข่ในน้ำนิ่ง ที่วางไข่ต้องเป็นแอ่งน้ำที่นิ่งขัง

ในประเทศไทยพบ An. balabacensis ครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1956
 พบกันพบในจังหวัดที่พบได้ ไม่พบบริเวณที่แห้งแล้งและไม่มีป่า พบ An.
balabacensis มีกลุ่มทางภาคใต้คือกับประเทศมาเลเซีย ซึ่งมีฝนตกชุกตลอดปี
 (Scanlon and Sandhinard. 1965 : 61 - 69) คนที่อาศัยอยู่ในป่า พวกทำ
 สวนยาง ทำป่าไม้ นักล่าสัตว์ นักท่องเที่ยว และพวกทำเหมืองแร่ อาจถูกยุง
An. balabacensis กัดได้ ยุงพวกนี้มีมากในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม
 ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูฝน

เพย์ตัน และแฮร์ริสัน (Peyton and Harrison. 1979 : 40 - 52)
 ได้ศึกษา An. balabacensis ในหลายจังหวัดของประเทศไทย ศึกษารูปร่างภายนอก
 ในหลายระยะคือ ระยะลูกน้ำ ระยะตัวโม่ง และระยะตัวเต็มวัย ทำให้พบความแตกต่าง
 จาก An. balabacensis จากฟิลิปปินส์และมาเลเซีย จึงได้ตั้งเป็นสปีชีส์ใหม่
 ของกลุ่ม Leucosphyrus คือ Anopheles (Cellia) dirus ในปีต่อมา
 เพย์ตัน และแฮร์ริสัน (Peyton and Harrison. 1980 : 335 - 347) ได้ศึกษา
An. balabacensis จากเกาะไต้หวันและพบว่าแตกต่างจาก An. balabacensis
 และ An. dirus จึงตั้งเป็นสปีชีส์ใหม่แยกจาก An. balabacensis คือ
Anopheles (Cellia) takasagoensis

จาก An. balabacensis สปีชีส์เดียว เมื่อใช้รูปร่างภายนอกเป็นเกณฑ์
 สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สปีชีส์คือ

1. An. balabacensis ทางภาคตะวันออกของประเทศมาเลเซีย
 และหลายเกาะในประเทศฟิลิปปินส์
2. An. balabacensis (Perlis form) ทางเหนือของประเทศ
 มาเลเซีย
3. An. dirus จากประเทศไทย
4. An. takasagoensis เกาะไต้หวัน

ทุกสปีชีส์เป็นส่วนหนึ่งของ An. balabacensis complex ทุกสปีชีส์ภายใน complex ปรากฏจากภายนอกอย่างผิวเผินแล้วจะเหมือนกัน นอกจากจะศึกษาอย่างละเอียดในรายละเอียดน้ำ ระยะเวลา และระยะตัวเต็มวัย ซึ่งพบว่าบางระยะใน complex แตกต่างกัน การที่จะแยกออกมาเป็นสปีชีส์จะต้องศึกษาทางคำรูปราง คำโครโมโซมเจเนติกส์ และการผสมข้ามพันธุ์ (Hybridization) เพราะฉะนั้นผลการศึกษาคำรูปอย่างเดียว ยังไม่สามารถแยกออกมาเป็นสปีชีส์ใหม่ได้

โครโมโซม เป็นการศึกษาถึงจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมในระยะ เมตาเฟส ซึ่งจำนวนของโครโมโซมจะต่างกันไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น คนมี 23 คู่ แมลงหมี 4 คู่ และปูมี 3 คู่ รูปร่างของโครโมโซมมีหลายแบบโดยให้ตำแหน่งของเซนโตรเมียร์ (Centromere) เป็นหลักแบ่งได้ดังนี้คือ เมตาเซนตริก (Metacentric) ตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่กึ่งกลางของโครโมโซมพอดี สับเมตาเซนตริก (Submetacentric) ตำแหน่งเซนโตรเมียร์ไม่ได้อยู่กึ่งกลางโครโมโซมแต่เอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของโครโมโซมทำให้แขนทั้งสองของโครโมโซมยาวไม่เท่ากัน อะโครเซนตริก (Acrocentric) ตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่เกือบปลายสุดของโครโมโซม ทำให้แขนข้างหนึ่งยาวมากส่วนแขนอีกข้างหนึ่งสั้น และเทโลเซนตริก (Telocentric) ตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่ปลายสุดของโครโมโซมทำให้โครโมโซมมีแขนเดียว

ปูมีโครโมโซม 3 คู่ คู่ที่สั้นที่สุดและแตกต่างจากคู่อื่นคือคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซมเพศ (Sex chromosome) ส่วนอีกสองคู่คล้ายกันแต่โครโมโซมคู่ที่ 3 ยาวกว่าคู่ที่ 2 ทั้งคู่เป็นออโตโซม (Autosome) ในปู An. indefinitus, An. vagus และ An. subpictus มีออโตโซมแบบเมตาเซนตริกเหมือนกันแต่ต่างกันที่โครโมโซมเพศ (นั่นหมายความว่า อินทรเจริณศักดิ์ 2524 : 64) ปูบางชนิดพบวานอกจากออโตโซม จะเหมือนกันแล้วโครโมโซมเพศยังมีรูปร่างเหมือนกันอีก จึงจำเป็นจะต้องวัดความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ของทุกสปีชีส์เปรียบเทียบกัน เช่น An. barbirostris, An. hyrcanusnigerrimus, An. fluviatilis, An. stephensi,

An. vagus และ An. subpictus ทุกสปีชีส์มีออตโตโซมแบบเมตาเซนตริก ขณะที่ An. hyrcanusnigerrimus, An. fluviatilis, An. stephensi และ An. vagus มีโครโมโซมเพศแบบเมตาเซนตริก An. barbirostris มีโครโมโซมเพศแบบเทโลเซนตริก และ An. subpictus มีโครโมโซมเพศแบบอะโครเซนตริก สปีชีส์ไหนที่มีโครโมโซมเพศเหมือนกันจะต้องใช้ความยาวของโครโมโซมเพศทุกคู่เปรียบเทียบกัน (Avirachan, Seetharam and Chowdaias. 1968 : 418 - 422) ในปี ค.ศ. 1978 ครูซ์เซอร์ (Kreutzer. 1978 : 554 - 588) ได้ศึกษาคาร์ิโอไทป์ของยุง Chagasia bathana พบว่ามีโครโมโซมทั้งหมด 4 คู่ โครโมโซมเพศเป็นแบบเทโลเซนตริก ออตโตโซมอีก 3 คู่เป็นแบบอะโครเซนตริก สับเมตาเซนตริกและเมตาเซนตริก

การย้อมโครโมโซมด้วยสี Hoechst 33258 และสี Giemsa ทำให้เห็นส่วนที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมมีประโยชน์เพื่อศึกษาความแตกต่างของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส โดยดูการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซม เทคนิคการย้อมสี Hoechst 33258 และสี Giemsa ของยุงได้พัฒนาเทคนิคมาจากแมลงหวี่ (Holmquist. 1975 : 333 - 356, Gatti and others. 1977 : 105 - 108, Visuit Baimai. 1977 : 85 - 93, Ajjima Traipavasin. 1983 : 58) การย้อมโครโมโซมด้วย Hoechst 33258 ทำให้เห็นส่วนที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินสว่าง (Brilliant) กว่าส่วนอื่น ในการศึกษาคาร์ิโอไทป์ของยุง An. gambiae complex ซึ่งเป็นพาหะของโรคเท้าช้างในอาฟริกาเดิมเคยทราบ ว่า An. gambiae A และ An. gambiae B มีออตโตโซมและโครโมโซมเพศเหมือนกัน แต่เมื่อดูถึงส่วนของเฮเทอโรโครมาตินโดยการย้อม Hoechst 33258 แล้วจึงทราบว่าทั้ง An. gambiae A และ An. gambiae B ไม่ใช่สปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมเพศต่างกัน (Gatti and others. 1977 : 105 - 108) ดร. วิสุทธิ์ ไบไม้ แฮริสัน และสมชิต

(Visuit Baimai, Harrison and Somchit. 1981 : 81 - 86) โดยอม
 โครโมโซมของ An. balabacensis complex ได้แก่ An. dirus,
An. takasagoensis และ An. balabacensis (Perlis form) ด้วยสี
 Orcein และสี Giemsa พบว่าทั้ง 3 สปีชีส์มีอโครโซมแบบสับเมตาเซนตริก
 ส่วนโครโมโซมเพศแตกต่างกันไป ของ An. dirus และ An. takasagoensis
 เป็นแบบเทโลเซนตริก ส่วน An. balabacensis (Perlis form) เป็นแบบ
 อะโครเซนตริก

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ยุง *An. balabacensis* complex ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มาจาก
ประเทศไทย และมาเลเซีย

1. ยุงจากประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชลบุรี กาญจนบุรี และอุตรธานี
2. ยุงจากประเทศมาเลเซีย ได้แก่ บริเวณทางเหนือของประเทศมาเลเซีย

(Perlis state)

ยุงทั้งหมดนี้เลี้ยงไว้ในห้องทดลองของภาควิชาชีววิทยาทางการแพทย์

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การเลี้ยงยุง

เลี้ยงในท้องที่ที่มีอุณหภูมิประมาณ 20 - 30 องศาเซลเซียส หรือ 77 - 86
องศาฟาเรนไฮต์ ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 - 90 เปอร์เซ็นต์

ระยะไข่

ไข่เลี้ยงไว้ในถาดที่มีขนาด 20 x 30 เซนติเมตร ฟูประมาณ 1,500 มิลลิลิตร
ใส่น้ำกลั่นสูงประมาณ 1 นิ้ว ไข่ที่อยู่ในถาดจะลอยกระจาย วิธีช่วยให้ไข่มาอยู่รวมเป็น
กลุ่มโดยใช้หลอดพลาสติกมาทอเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า หรือสามเหลี่ยมลงบนผิวหน้า
ไข่จะมารวมบริเวณหลอดพลาสติก เพื่อลดการเกาะของไข่บริเวณขอบถาด

ระยะลูกน้ำ

หลังจากไขฟักเป็นตัวแล้ว ปล่อยลูกน้ำมาเลี้ยงในถาดที่มีขนาด 25 x 32 เซนติเมตร จุประมาณ 2,000 มิลลิลิตร ในถาดหนึ่งเลี้ยงลูกน้ำประมาณ 150 - 200 ตัว ในถาดเลี้ยงลูกน้ำใส่ลูกมาเลเซีย (*Zoyia matrella*) เพื่อทำให้น้ำใส การให้อาหารครั้งหนึ่งให้ครั้งละ 0.02 มิลลิกรัม ลูกน้ำระยะที่ 1 และระยะที่ 2 ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง และเพิ่มเป็น 3 ครั้ง ตั้งแต่ระยะที่ 3 เป็นต้นไป ทำความสะอาด ถาดที่เลี้ยงลูกน้ำให้สะอาดโดยดูดเศษอาหารที่เหลือและลูกน้ำที่ตายแล้วออก ต้องเทน้ำใหม่แทนน้ำเก่าที่ระเหยไป

ระยะตัวโม่งและตัวเต็มวัย

เมื่อลูกน้ำเข้าสู่ระยะตัวโม่งให้ห่อหลอดลูกใส่ถ้วย แล้วนำถ้วยใส่กรงอะลูมิเนียม (Aluminium frame) ขนาด 30 x 30 x 30 เซนติเมตร เพื่อเลี้ยงให้เป็น ตัวเต็มวัย บริเวณหนากรมีของผสมควมามุงเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 นิ้ว ยาวประมาณ 18 นิ้ว ของนี้ไว้สำหรับเปิดถาดมุงใส่ถ้วยที่มีตัวโม่ง ใส่หนูแฮมสเตอร์ (Hamster) ที่จะให้มันเลือก ขวดน้ำหวานและขวดวิตามิน ตัวเต็มวัยของมุงเลี้ยงด้วยแพนวิตามิน ซึร์รี่ (Panvitamin syrup) ขององค์การเภสัชกรรม 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหวาน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยชุบในแท่งสำลีใส่ในขวดเล็ก ๆ ซึ่งบรรจุขวดละ 5 มิลลิลิตร อย่างละขวด

หลังจากเจริญเป็นตัวเต็มวัยแล้ว 1 วัน แยกตัวผู้ออกจากตัวเมียลงในถ้วยกระดาษ สูง 11 เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร ปากถาดเปิดควมามุงคานข้างถาดทำเป็นช่องสำหรับใส่หลอดดูดมุง (Sucking) เข้าไปได้ วางสำลีที่ชุบแพนวิตามิน ซึร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ไว้บนปากถาด หลังจากนั้น 3 วันให้ตัวเมียกินเลือด หนูแฮมสเตอร์ เพื่อการเจริญเติบโตของไข่ วันต่อมาให้นำตัวเมียมายผสมกับตัวผู้ที่มีอายุ มากกว่า 3 วัน โดยวิธีผสมเทียม (Artificial mating)

บุงที่มาจากมาเลเซียสามารถผสมกันเองได้ (Free mating) โดยไม่ต้องใช้การผสมเทียมช่วย หลังจากปล่อยตัวเมียให้กินเลือดหนูแล้วก็ปล่อยตัวผู้ให้อยู่ในกรงเดียวกับตัวเมีย

เทคนิคการผสมเทียม

เทคนิคการผสมเทียมเป็นเทคนิคของโอยง สตาร์มาเรีย และแวร์ตันซ์

(OwYang, Stamaria and Wharton. 1963 : 34 - 35) ดังนี้คือ

1. เตรียมบุงตัวผู้ให้พร้อม ใช้อีเธอร์ (Ether) สลบบุงตัวผู้แล้วใช้เข็มปักกลางส่วนอก (Thorax) ทางคานกลาง (Ventral) ของบุงตัวผู้ เข็มที่ใช้นี้ติดกับไม้ยาวประมาณ 6 นิ้ว เพื่อสะดวกในการจับ
2. บุงตัวเมื่อกินเลือดแล้วนำมาใส่หลอดแก้ว (Test tube) 3 - 5 ตัว ทอหลอด แล้วใช้อีเธอร์ทำให้สลบ นำบุงตัวเมียที่สลบแล้วมาวางบนสไลด์หุ้มกายใต้กล้องผ่าตัด (Dissecting microscope)
3. นำบุงตัวผู้ที่เตรียมไว้มาเค็ดหัวและขาออก แล้วนำไปผสมกับบุงตัวเมีย โดยให้อวัยวะสืบพันธุ์ของบุงตัวผู้ (Clasper) จับกับบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ของบุงตัวเมีย (Genitalia) เสร็จแล้วนำบุงทั้งคู่ไปพักไว้ในกล่อง โดยใส่ไม้ที่ไขจับตรงบริเวณใกล้ฐานกล่องที่ทำเป็นช่องไว้
4. เวลาที่ใช้ในการผสมพันธุ์ประมาณ 1 นาที เมื่อบุงตัวเมียหลุดออกจากบุงตัวผู้ซึ่งติดกับไม้แล้ว นำบุงตัวผู้ที่ติดกับไม้ออกจากกล่อง แล้วปิดของควายจุกไม้เพื่อกันบุงตัวเมียนั้น
5. ถ่ายบุงตัวเมียใส่ถ้วยกระดาษแล้วเลี้ยงควายนํ้าหวานประมาณ 3 วัน จึงถ่ายสู่ถาดเพื่อวางไข่ รอบ ๆ ถาดควายกระดาษกรองใส่นํ้ากลั่นลงไปสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วปิดควายพลาสติกใส

วิธีดำเนินการศึกษา

วิธีฆ่าตัว

1. การฆ่าตัวด้วยเพื่อเอาสมอง แผลลูกน้ำระยะที่ 4 ในโคลิซิน (Colchicine) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงฆ่าตัวได้โดยใช้เข็ม 2 อันตัดหัวของลูกน้ำออกจากตัว แล้วใช้เข็มกดคานหน้าของหัวเบา ๆ จนกระทั่งสมองซึ่งมีลักษณะเป็นฟองสีขาวออกมาจากส่วนหัว
2. การฆ่าตัวด้วยเพื่อเอารังไข่ และถุงอันทะ ใช้bungตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน เสียด้วยโคลิซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ผสมกับน้ำตาลให้ตัวเต็มวัยกิน ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงจึงนำbungที่กินโคลิซินทำให้สลายตัวอีเธอร์แล้วนำมาฆ่าตัวโดยใช้เข็มอันหนึ่งกดตรงส่วนอก เข็มอีกอันหนึ่งกดบริเวณส่วนท้ายของท้องแล้วค่อย ๆ ดึงส่วนท้ายให้อวัยวะภายในไหลออกมา จะพบรังไข่หรือถุงอันทะมีสีขาวใส 1 คู่ อยู่ข้าง ๆ ทางเดินอาหาร แล้วใช้เข็มตัดส่วนของรังไข่หรือถุงอันทะออกมา

วิธีย้อมสี Orcein

ใช้เทคนิคของเฟรนช์ และคณะ (French and others. 1962 :

377 - 383) มีดังนี้คือ

1. ฆ่าตัวเนื้อเยื่อที่ต้องการจากลูกน้ำระยะที่ 4 หรือตัวเต็มวัยใน Sodium citrate 1%
2. นำเนื้อเยื่อที่ฆ่าได้แล้ว คือสมอง รังไข่และอันทะย้อมมาฟิกส์ (fix) ด้วย Carnoy's solution บนสลิโคไนซ์ คอฟเวอร์สลิป (Siliconized coverslip) เป็นเวลา 30 วินาที ถึง 2 นาที
3. หยดสีย้อม Orcein บนสลิโคไนซ์ คอฟเวอร์สลิปเดียวกันนั้นแล้วย้อมเข้ากับเนื้อเยื่อที่ฟิกส์แล้ว ใช้เวลาย้อม 30 วินาที

4. ย้ายสไลด์โคไนซ์ คอฟเวอร์สลิบไปที่กระดาษขี้ (Filter paper) แลวนำสไลด์ (Slide) มาวางบนคอฟเวอร์สลิบเบา ๆ ระวังคอฟเวอร์สลิบขึ้นมามีส่วนน้อยอย่างรวดเร็ว

5. ใช้กระดาษขี้กเบา ๆ เพื่อกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากสไลด์ โดยใช้ปลายนิ้วกดเบา ๆ บนคอฟเวอร์สลิบตรงที่มีเนื้อเยื่อเพื่อให้เนื้อเยื่อกระจายดี แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์ (Phase contrast microscope) ถ้ามีโครโมโซมที่ต้องการ ทารอบ ๆ คอฟเวอร์สลิบด้วยยาทาเล็บ เก็บสไลด์ไว้ในที่เย็นประมาณ

4 องศาเซลเซียสเพื่อศึกษา และเมื่อต้องการถ่ายรูปใช้ฟิล์มสีขาวดำ Kodak ASA100 วิธีย้อมสี Hoechst 33258 และ Giemsa

1. เพื่อศึกษาไมโทติก โครโมโซม

ใช้เทคนิคของ ดร.วิสุทธิ ไบไม (Visuit Baimai. 1977 : 83 - 93) ดังนี้

1.1 นำเนื้อเยื่อสมองจากลูกนํ้าระยะที่ 4 ใน Sodium citrate 1% แลวแช่ทิ้งไว้ 10 นาที

1.2 ย้ายเนื้อเยื่อสมองไปฟอกใน Carnoy's solution เป็นเวลา 2 นาที

1.3 ย้ายเนื้อเยื่อไปยัง Acetic acid 60% แช่ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงใช้หลอดดูด ๆ เนื้อเยื่อขึ้นลงเพื่อให้เนื้อเยื่อแตกเป็นเวลา 1 นาที

1.4 ดูดเนื้อเยื่อที่แตกแล้วมาหยกบนสไลด์ที่สะอาดบนที่อุ่นสไลด์ (Slide warmer) ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ 45 องศาเซลเซียส เมื่อสไลด์แห้งแล้วจึงนำมาย้อมสี Hoechst 33258 และสี Giemsa

การย้อมสี Hoechst 33258

1. นำสไลด์ที่เตรียมไว้แลวนมาแช่ใน PBS buffer เป็นเวลา 10 นาที

2. นำสไลด์มาแช่ใน Hoechst 33258 ที่เจือจางแล้ว (Hoechst 33258 1 มิลลิลิตร : PBS 100 มิลลิลิตร) แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

3. แช่ใน PBS buffer ในอ่างครั้ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงแช่ น้ำกลั่น 4 นาที

4. ทิ้งสไลด์ให้แห้งในที่มืด 1 วัน แล้วนำสไลด์มาเมาท์ (Mount) ด้วย buffer ที่ประกอบด้วย Sodium phosphate 0.16 โมล และ Sodium citrate 0.04 โมล (PH7) แล้วทิ้งไว้ในที่มืดอีก 1 วัน จึงนำมาดูด้วยกล้อง ฟลูออเรสเซนต์ และถ่ายรูปด้วยฟิล์มสีขาวดำ Kodak ASA 400

การย้อมสี Giemsa

นำสไลด์ที่ย้อมสี Hoechst 33258 และถ่ายรูปเก็บไว้แล้วมาย้อมสี Giemsa อีกครั้งเพื่อเก็บเป็นสไลด์ถาวร โดยนำสไลด์มาย้อมสี Giemsa เป็นเวลา 40 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นสะอาด นำสไลด์มาผึ่งให้แห้ง แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และถ่ายรูปด้วยฟิล์มสี

2. เพื่อศึกษาไมโอติก โครโมโซม

ใช้เทคนิคของกัตติ พิมพินेलลี และสันตินี (Gatti, Pimpinelli and Santini. 1976 : 351 - 375) ดังนี้

2.1 นำเนื้อเยื่อรังไข่จากบุงตัวเมียอายุ 1 วัน ใน Sodium citrate 1%

2.2 นำเนื้อเยื่อที่ผ่าได้แล้มาฟiksด้วย Carnoy's solution เป็นเวลา 2 นาที

2.3 ย้ายเนื้อเยื่อมาที่ Acetic acid 45% บนสไลด์โคไนซ์ คอฟเวอร์สลิบ แล้วปิดด้วยสไลด์เบา ๆ แล้วรีบยกให้ส่วนของคอฟเวอร์สลิบมาอยู่ส่วนบนอย่างรวดเร็ว กดเบา ๆ ตรงเนื้อเยื่อเพื่อให้เนื้อเยื่อกระจายดี แล้วทารอบ ๆ คอฟเวอร์สลิบด้วยยาทาเล็บ

2.4 นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ ถ้ามีโครโมโซม ที่ต้องการนำสไลด์ที่คอปเวอร์สลิบวางบนน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ประมาณ 45 นาที แล้วใช้ใบมีดแกะคอปเวอร์สลิบออกส่วนเนื้อเยื่อจะติดอยู่บนสไลด์ แล้วจึงนำ สไลด์มาย้อมสี Hoechst 33258 และสี Giemsa พร้อมกับการย้อมกับไวศึกษา เช่นเดียวกับการศึกษาไมโทติกโครโมโซม ดังที่กล่าวไปแล้ว

การเก็บและรวบรวมข้อมูล

1. บันทึกความแตกต่างของโครโมโซมที่ย้อมด้วยสีแต่ละวิธี
2. ถ่ายรูปโครโมโซมที่ต้องการศึกษาโดยกล้องถ่ายรูป Kodak ใช้ฟิล์ม Kodak High Contrast ASA 100, ASA 400 และ VR 100
3. นำรูปถ่ายมาศึกษาเปรียบเทียบการกระจายของเฮเทอโรโครมาติก บนโครโมโซมเพศของยุงที่นำมาจากสถานที่ต่าง ๆ

ผลการศึกษา

การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของยุง An. balabacensis complex จากสถานที่ต่างกันคือ An. dirus จาก 3 จังหวัดของประเทศไทย คือ กาญจนบุรี อุตรดิตถ์ และชลบุรี และ An. balabacensis (Perlis form) จากทางเหนือของประเทศไทย เวียดนาม ย้อมโครโมโซมของยุงเหล่านี้ด้วยสี 3 ชนิด คือสี Orcein สี Hoechst 33258 และสี Giemsa โดยศึกษาไมโทติกโครโมโซมจากส่วนสมองของลูกนํ้าระยะที่ 4 และไมโอติกโครโมโซมจากรังไข่ และถุงอัมชะของยุงตัวเต็มวัย อายุ 1 วัน

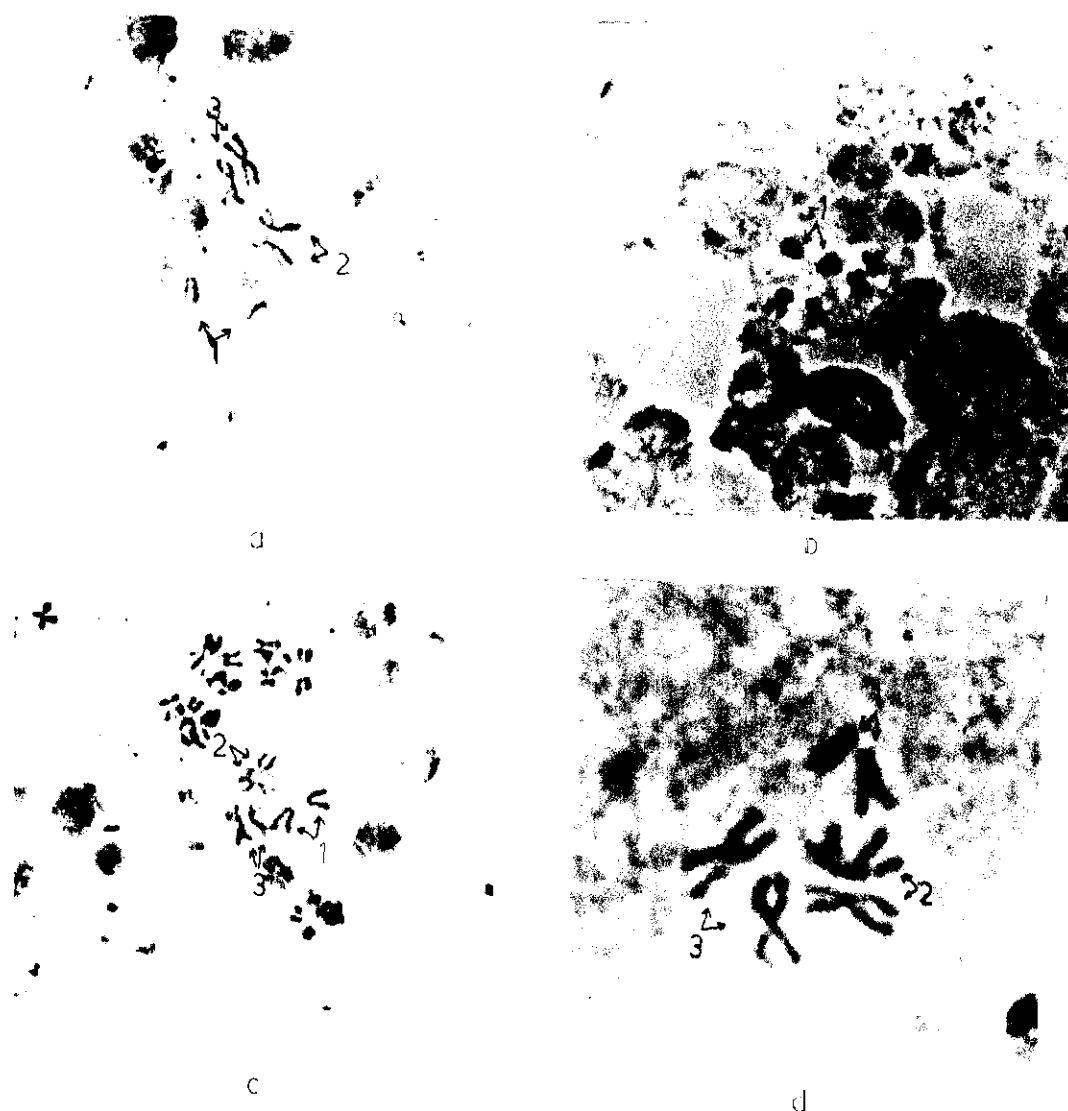
คาร์ิโอไทป์ของยุง An. balabacensis complex ประกอบด้วยโครโมโซมทั้งหมด 3 คู่ ($2n = 6$) โครโมโซมคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 เป็นออโตโซม มีรูปร่างแบบสับเมตาเซนตริก ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซมเพศและเป็นโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุด ใน An. dirus จากกาญจนบุรี อุตรดิตถ์ และชลบุรี โครโมโซมเพศมีรูปร่างแบบเทโลเซนตริก ส่วน An. balabacensis (Perlis form) โครโมโซมเพศมีรูปร่างแบบอะโครเซนตริก (ภาพประกอบ 1 - 9) การย้อมโครโมโซมด้วยสี Orcein ไม่สามารถศึกษาการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมได้ เพราะการติดสีไม่ชัดเจน (ภาพประกอบ 1 - 2) ส่วนการย้อมโครโมโซมด้วยสี Hoechst 33258 สามารถศึกษาถึงรายละเอียดการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมได้ดีกว่าการย้อมด้วยสี Orcein เพราะบริเวณที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินจะติดสีฟลูออเรสเซนส์สว่างชัด เมื่อย้อมโครโมโซมของ An. balabacensis complex ด้วยสี Hoechst 33258 ออโตโซมคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 ของ An. dirus และ An. balabacensis (Perlis form)

มีส่วนที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินติดสีสว่างมาก (very bright) เฉพาะตรงตำแหน่งเซนโตรเมียเท่านั้น ส่วนโครโมโซม X จะมีการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินแตกต่างกันคือ *An. dirus* จากกาญจนบุรีและอุดรธานี มีการกระจายของเฮเทอโรโครมาติน 2 แบบคือ แบบแรกเรียกว่าโฮโมไซกัส L-L (Homozygous Long-Long) คือโครโมโซม X ทั้งสองมีความยาวเท่ากันประมาณ 0.8 ของออโตโซมคู่ที่ 2 พบว่าส่วนที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินของโครโมโซม X ทั้งสองมีคั้งนี้คือบริเวณที่สว่างมากเป็นบริเวณที่มีเฮเทอโรโครมาตินมากที่สุด 2 แห่งคือ ตำแหน่งเซนโตรเมียและตรงกลางของความยาวโครโมโซม X ซึ่งจะเห็นลักษณะแถบสว่างชัด ส่วนบริเวณที่ทอดจากกึ่งกลางโครโมโซม X ตรงที่สว่างมากไปจนถึงส่วนปลายโครโมโซมจะเป็นบริเวณสว่าง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเฮเทอโรโครมาตินน้อยกว่าบริเวณเซนโตรเมียและตรงกลางของความยาวโครโมโซม X ส่วนช่วงตั้งแต่ตำแหน่งเซนโตรเมียไปจนถึงตรงกลางของโครโมโซม X เป็นส่วนที่ไม่มีเฮเทอโรโครมาติน จึงเป็นบริเวณที่ไม่สว่างหรือทึบ (dull) (ภาพประกอบ 3 a, b; 4a, c) แบบที่สองเรียกว่าเฮเทอโรไซกัส L-S (Heterozygous Long-Short) โครโมโซม X ทั้งสองมีความยาวไม่เท่ากันและส่วนของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซม X ทั้งสองต่างกัน กล่าวคือ โครโมโซม X อันแรกมีความยาวของโครโมโซมและการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินเหมือนแบบแรก ขณะที่โครโมโซม X อันที่สองมีความยาวเป็น 0.5 ของออโตโซมคู่ที่ 2 ส่วนเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมนั้น บริเวณที่สว่างได้แก่บริเวณตั้งแต่ตำแหน่งเซนโตรเมียลงมาประมาณหนึ่งในสามของความยาวโครโมโซมเป็นบริเวณสว่างมาก ทอดจากนั้นลงมาจนถึงปลายสุดจะเป็นบริเวณสว่าง (ภาพประกอบ 4 b, d)

An. dirus ชลบุรี มีโครโมโซม X แบบโฮโมไซกัส L-L แบบเดียว (ภาพประกอบ 3 c, 5a) *An. balabacensis* (Perlis form) โครโมโซม X ยาวประมาณ 0.8 ของออโตโซมคู่ที่ 2 แขนยาว (Long arm) ของ

โครโมโซม X จะมีการกระจายของเฮเทอโรโครมาทินคล้ายแบบโฮโมไซกัส L-L ของ *An. dirus* ขณะที่แขนสั้น (Short arm) ของโครโมโซม X เป็นบริเวณสว่าง ซึ่งมีเฮเทอโรโครมาทินน้อยกว่าตำแหน่งเซนโทรเมียร์และบริเวณตรงกลางของแขนยาวของโครโมโซม X (ภาพประกอบ 3d, 5b) ส่วนโครโมโซมเพศที่ได้จากถุงอัมพะของยุงตัวเต็มวัยของ *An. dirus* กาญจนบุรี มี X โครโมโซมเหมือนแบบโฮโมไซกัส L-L Y โครโมโซมนั้นมีความยาวประมาณ 0.6 ของออโตโซมคู่ที่ 2 มีการกระจายของเฮเทอโรโครมาทินบน Y โครโมโซมตัวนี้คือ บริเวณที่สว่างมากได้แก่ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ ส่วนบริเวณปลายสุดของโครโมโซมประมาณหนึ่งในสี่ของความยาวโครโมโซมเป็นบริเวณสว่าง (ภาพประกอบ 6)

หลังจากย้อมด้วย Hoechst 33258 และถ่ายรูปเก็บไว้ศึกษาแล้ว นำสไลด์ที่ย้อมสี Hoechst 33258 มาย้อมด้วยสี Giemsa เพื่อเก็บเป็นสไลด์ถาวร และนำมาศึกษาพบว่า การกระจายของเฮเทอโรโครมาทินบนโครโมโซมเหมือนกับเมื่อย้อมด้วย Hoechst 33258 (ภาพประกอบ 7, 8, 9) โดยส่วนที่เป็นเฮเทอโรโครมาทินจะติดสีเข้ม ขณะที่โครมาทินติดสีจาง รายละเอียดการกระจายของเฮเทอโรโครมาทินของยุง *An. balabacensis* complex แสดงเป็นโคอะแกรมอยู่ในภาพประกอบ 10



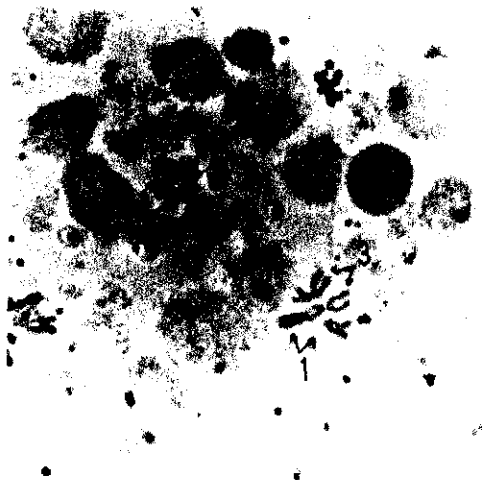
ภาพประกอบ 1 โครโมโซมของยุง *An. dirus* และ *An. balabacensis*
 (Perlis form) ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส จากสมองของ
 ลูกน้ำระยะที่ 4 โดยการย้อมสี Orcein

a. *An. dirus* จากกาญจนบุรี กำลังขยาย 3.3 x 100

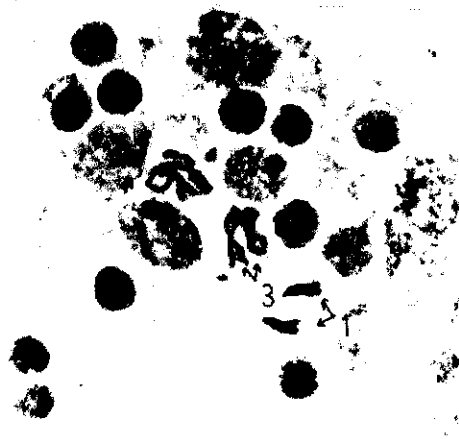
b. *An. dirus* จากอุดรธานี กำลังขยาย 3.3 x 100

c. *An. dirus* จากชลบุรี กำลังขยาย 3.3 x 100

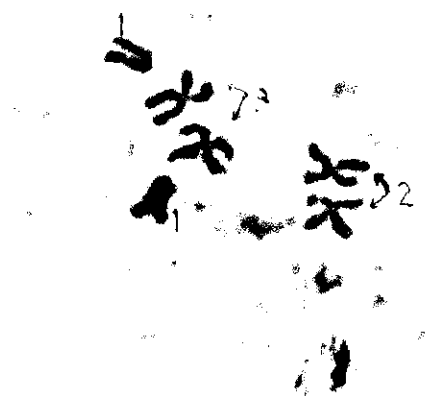
d. *An. balabacensis* (Perlis form) จากมาเลเซีย กำลังขยาย 5 x 100



a



b



c



d

ภาพประกอบ 2 โครโมโซมของยุง *An. dirus* และ *An. balabacensis* (Perlis form) ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส จากรังไข่ของ ยุงตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน โดยการย้อมสี Orcein

- a. *An. dirus* จากทางจูเนียร์ กำลังขยาย 3.3 x 100
- b. *An. dirus* จากอุทรธานี กำลังขยาย 3.3 x 100
- c. *An. dirus* จากทอบุรี กำลังขยาย 5 x 100
- d. *An. balabacensis* (Perlis form) จากมาเลเซีย กำลังขยาย 5 x 100



a



b



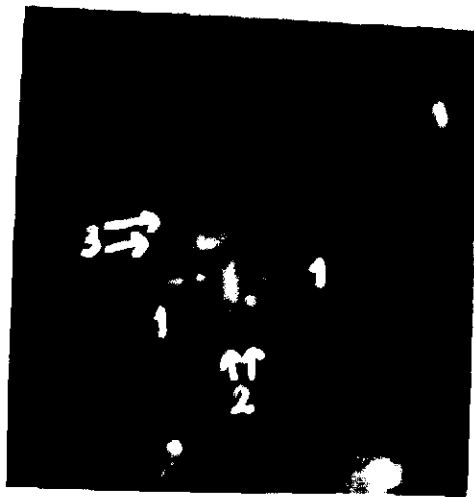
c



d

ภาพประกอบ 3 โครโมโซมของยุง *An. dirus* และ *An. balabacensis* (Perlis form) ตอนทระยะเมตาเฟส หรือระยะเมตาเฟส ของการแบ่งเซลล์แบบ ไมโทซิสจากสมองของตัวน้ำระยะที่ 4 โดยการย้อมสี Hoechst 33258 บริเวณที่ เติบโตของโครโมโซมจะสว่าง กำลังขยาย 5 x 100

- a. *An. dirus* จากกาญจนบุรี
- b. *An. dirus* จากอุดรธานี
- c. *An. dirus* จากชลบุรี
- d. *An. balabacensis* (Perlis form) จากมาเลเซีย



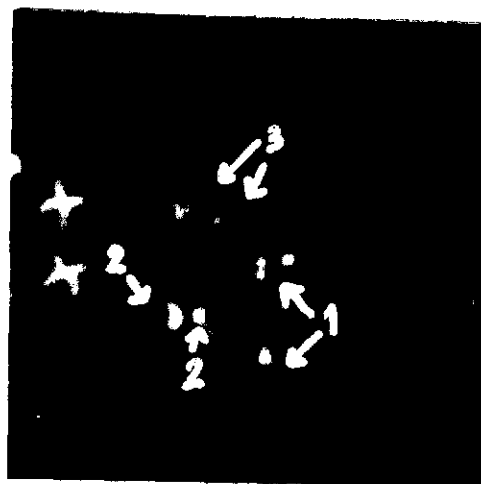
a



b



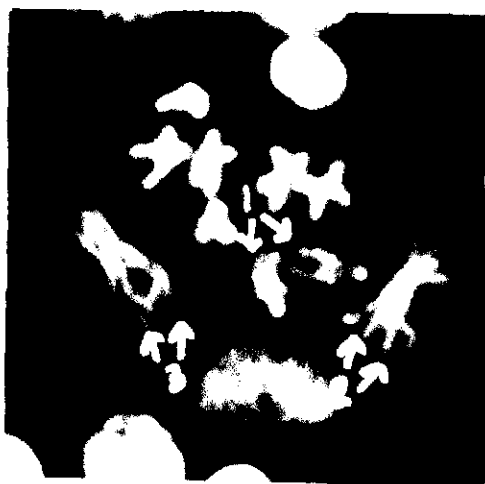
c



d

ภาพประกอบ 4 ไตรโมไทมของยุง *An. dirus* ภายจูเนียร์ (a, b) และ *An. dirus* อุดรธานี (c, d) ถ่ายด้วยระบะเมตาเฟส หรือระบะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์ไมโทซิส จากรังไข่ของตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน โดยการย้อมสี Hoechst 33258 บริเวณที่เป็นเคเทโครโครมาตินจะสว่าง กำลังขยาย

- a. *An. dirus* จากกาญจนบุรี แบบโฮโมไทป์ L-L
- b. *An. dirus* จากกาญจนบุรี แบบเคเทโครไทป์ L-S
- c. *An. dirus* จากอุดรธานี แบบโฮโมไทป์ L-L
- d. *An. dirus* จากอุดรธานี แบบเคเทโครไทป์ L-S



a

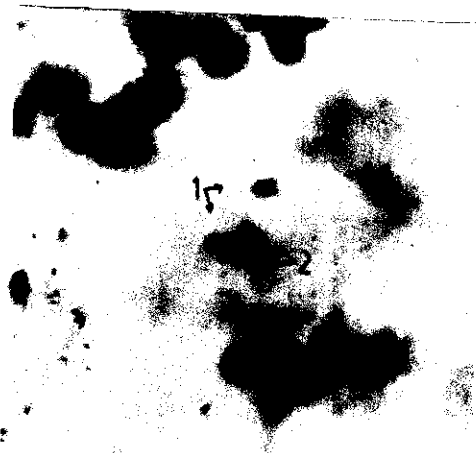


b

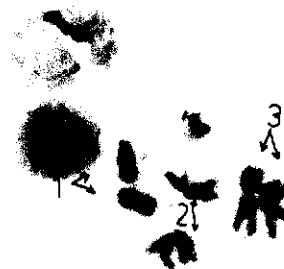
ภาพประกอบ 5 โครโมโซมของยุง *An. dirus* จากชลบุรี (a) และ *An. balabacensis* (Perl's form) จากมาเลเซีย (b) ตอนต้นระยะเมตาเฟส หลังระยะเมตาเฟส ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจากรังไข่ของยุงตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน โดยการย้อมสี Hoechst 33258 บริเวณที่เป็นเคเทโครโครมาทินจะสว่าง กำลังขยาย 5×100



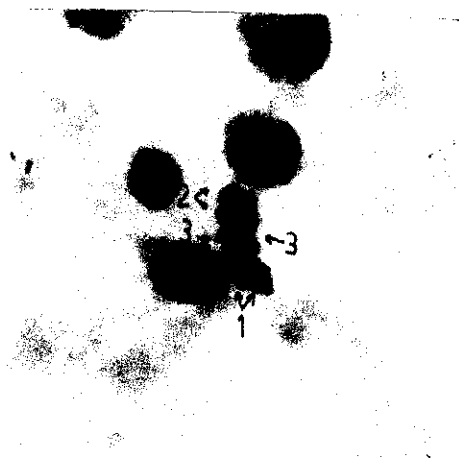
ภาพประกอบ 6 โครโมโซมของยุง *An. dirus* กาญจนบุรี ระยะเมตาเฟส
ของการแบ่งแบบไมโอซิส จากก๊อชชะของยุงตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน โดยการ
ย้อมสี Hoechst 33258 บริเวณที่เป็นเบสดีเอ็นเอจะเรืองแสง
กำลังขยาย 5 x 100



a



b

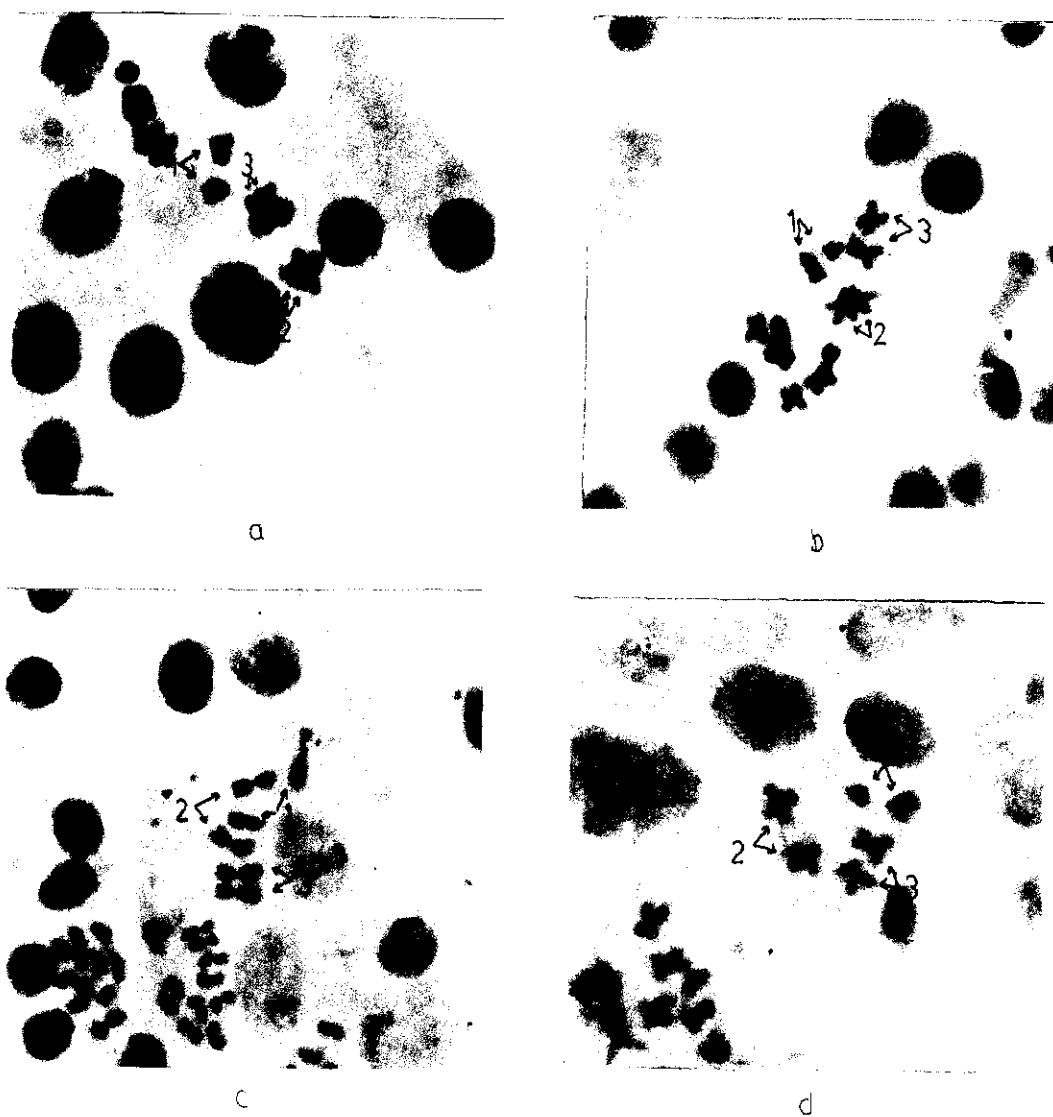


c



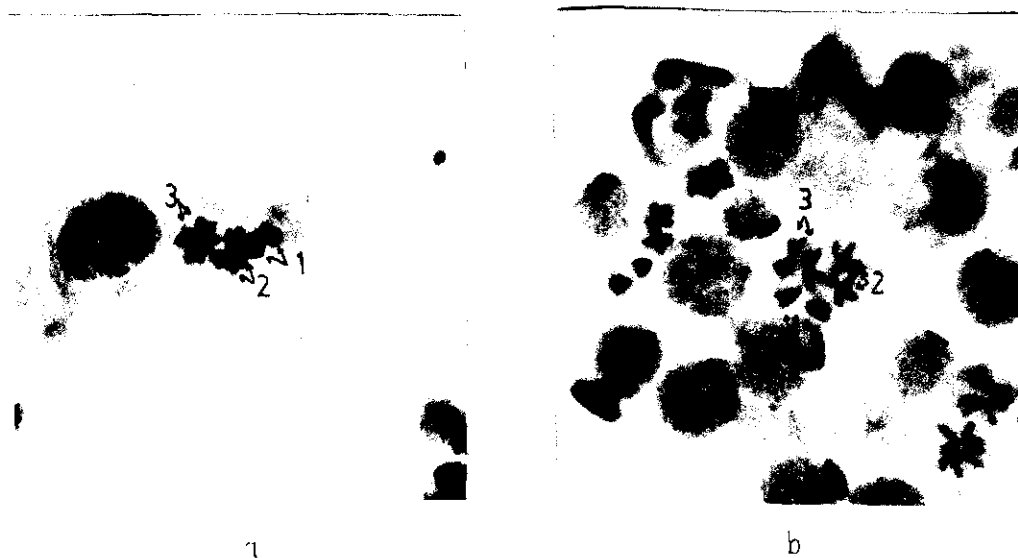
d

- ภาพประกอบ 7 โครโมโซมของยุง An. dirus และ An. balabacensis
 (Perlis form) ตอนต้นระยะเมตาเฟส หรือระยะเมตาเฟส ของการแบ่งเซลล์
 แบบไมโทซิส จากสมองลูกน้ำระยะที่ 4 โดยย้อมสี Giemsa กำลังขยาย 3.3 x 100
- a. An. dirus จากกาญจนบุรี
 - b. An. dirus จากอุดรธานี
 - c. An. dirus จากชลบุรี
 - d. An. balabacensis (Perlis form) จากมาเลเซีย



ภาพประกอบ 8 ไครโมโธของบุง *An. dirus* กากูจุนบุรี (a, b) และ *An. dirus* อุดรธานี (c, d) ตอนต้นระยะเมตาเฟส หรือระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์ไมโอซิส จากรังไข่ของบุงตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน โดยการย้อมสี Giemsa กำลังขยาย 3.3 x 100

- a. *An. dirus* จากกากูจุนบุรี แบบโฮโมไซกัส L-L
- b. *An. dirus* จากกากูจุนบุรี แบบเฮเทอโรไซกัส L-S
- c. *An. dirus* จากอุดรธานี แบบโฮโมไซกัส L-L
- d. *An. dirus* จากอุดรธานี แบบเฮเทอโรไซกัส L-S



ภาพประกอบ 9 โครโมโซมของยุง *An. dirus* จากชลบุรี (a) และ *An. balabacensis* (Perlis form) จากมาเลเซีย (b) ตอนต้นระยะเมตาเฟส หรือระยะเมตาเฟส ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส จากรังไข่ตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน โดยการย้อมสี Giemsa กำลังขยาย 3.3 x 100

	โครโมโซม คู่ที่ 3	โครโมโซม คู่ที่ 2	โครโมโซม XX		โครโมโซม XY
			แบบที่ 1	แบบที่ 2	
<u>An.dirus</u> กาดูจันบุรี					
<u>An.dirus</u> อุกรธานี					
<u>An.dirus</u> ชลบุรี					
<u>An.</u> <u>balabacen-</u> <u>sis (Perlis</u> <u>form)</u> มาเลเชีย					

ภาพประกอบ 10 โครโมแกรมแสดงเฮเทอโรโครมาทินในระยะเมตาเฟสของ

An. balabacensis complex  สว่างมาก (very bright)

 สว่าง (bright)  ทึบ (dull)

สรุป อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของยุง *An. balabacensis* complex จากสถานที่ทางกันคือ *An. balabacensis* (Perl's form) จากประเทมาเลเซีย และ *An. dirus* จาก 3 จังหวัดในประเทศไทยคือ กาญจนบุรี อุตรดิตถ์และชลบุรี โดยศึกษาไมโทติก โครโมโซมจากสมองของลูกน้ำระยะที่ 4 และไมโอติกโครโมโซมจากรังไข่และอัมชะของตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน โดยการย้อมโครโมโซมด้วยสี Orcein สี Hoechst 33258 และสี Giemsa ศึกษาโครโมโซมในระยะเมตาเฟส สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

คาร์ิโอไทป์ของยุง *An. balabacensis* complex มีโครโมโซมทั้งหมด 3 คู่ ($2n = 6$) โครโมโซมคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 เป็นออโตโซม มีรูปร่างแบบตัวเมตาเซนตริก ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซมเพศ และมีขนาดสั้นที่สุด คือใน *An. balabacensis* (Perl's form) มีรูปร่างแบบอะโครเซนตริก ส่วน *An. dirus* จาก 3 จังหวัดในประเทศไทยที่นำมาศึกษามีรูปร่างแบบเทโลเซนตริก

การย้อมโครโมโซมด้วยสี Orcein ไม่สามารถเห็นรายละเอียดของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมได้ชัดเจน เพราะเฮเทอโรโครมาตินติดสี Orcein ไม่ดีเท่าที่ควร ต่างกับการย้อมโครโมโซมด้วยสี Hoechst 33258 ซึ่งสามารถเห็นรายละเอียดของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมได้ชัดเจน โดยบริเวณที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินจะติดสีสว่าง เมื่อนำมาย้อมสี Giemsa จะเห็นตำแหน่งของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซม เช่นเดียวกับการย้อมสี Hoechst 33258

การกระจายของเฮเทอโรโครมาตินพบมากบนโครโมโซม X ขณะที่อโครโซมมีเฮเทอโรโครมาตินเฉพาะบริเวณเซนโทรเมียร์เท่านั้น

จากการศึกษาขนาด รูปร่างและการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซม X พบว่า *An. dirus* กาญจนบุรี และอุดรธานี มีโครโมโซม X เป็น 2 แบบเหมือนกันคือ แบบโฮโมไซกัส L-L และแบบเฮเทอโรไซกัส L-S ส่วน *An. dirus* ชลบุรี โครโมโซม X เป็นแบบโฮโมไซกัส L-L เท่านั้น สำหรับ *An. balabacensis* (Perlis form) โครโมโซม X มีรูปร่างต่างออกไปคือเป็นแบบอะโครเซนตริกมีทั้งแขนสั้นและแขนยาว แขนสั้นของโครโมโซม X จะเป็นเฮเทอโรโครมาติน ส่วนแขนยาวจะมีการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินคล้ายกับโฮโมไซกัส L-L ของ *An. dirus* (ภาพประกอบ 10)

อภิปรายผล

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย ปีหนึ่งรัฐบาลต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนกว่า 150 ล้านบาทต่อปี ในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรีย (Yaovamarn Clomcham, 1979 : 177) โดยเฉพาะยุงในสกุล *An. balabacensis* complex ที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย การศึกษาทางพันธุกรรมและไซโตเจเนติกส์ของยุงทำให้เข้าใจความแตกต่างของยุงนอกเหนือไปจากการศึกษารูปร่างภายนอกเพียงอย่างเดียว (Kanda and others, 1981 : 321 - 329)

ในการศึกษครั้งนี้ศึกษาเฉพาะคาร์ไโอไทป์ของยุง *An. dirus* จาก 3 จังหวัดของประเทศไทย และ *An. balabacensis* (Perlis form) จากประเทศมาเลเซีย โดยใช้เทคนิคการย้อม 3 วิธีคือ สี Orcein สี Hoechst 33258 และสี Giemsa เพื่อศึกษาความแตกต่างของรูปร่างและการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมของยุงดังกล่าว

โครโมโซมของ *An. balabacensis* complex ที่นำมาศึกษามีออโตโซมแบบสับเมตาเซนตริกเหมือนกันหมด ส่วนโครโมโซมเพศต่างกันคือใน *An. dirus* จากกาญจนบุรี อุดรธานีและชลบุรี มีรูปร่างแบบเทโลเซนตริก *An. balabacensis* (Perl's form) โครโมโซมเพศมีรูปร่างแบบอะโครเซนตริก (ภาพประกอบ 1 - 9) เหมือนกับที่ ดร.วิสุทธิ์ ไบไม แฮร์ริสัน และสมจิต ได้ศึกษาไว้ (Visuit Baimai, Harrison and Somchit. 1981 : 81 - 86) การย้อมโครโมโซมด้วยสีต่างกันทำให้สามารถเห็นเฮเทอโรโครมาตินได้ชัดโดยเฉพาะตอนต้นระยะเมตาเฟส (early metaphase) เพราะโครโมโซมค่อนข้างยาว ทำให้สามารถแยกเฮเทอโรโครมาตินจากยูโครมาตินได้ การที่จะเตรียมสไลด์เพื่อให้ได้โครโมโซมอยู่ในระยะที่เหมาะสม มีปัญหาหลายประการด้วยกัน เช่น การคัดเลือกลูกน้ำระยะที่ 4 ที่นำมาศึกษามักจะไม่ไ้ระยะที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นกับการเลี้ยงดูและโอกาสที่พบโครโมโซมจากส่วนสมองของลูกน้ำระยะที่ 4 มีน้อยกว่าโครโมโซมจากรังไข่ของยุงตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน ปัญหาอีกประการคือการได้รับโคริซินของลูกน้ำง่ายกว่าการให้แกยุงตัวเต็มวัย เพราะยุงจำนวนครึ่งหนึ่งเท่านั้นที่จะกินโคริซินและบางครั้งก็กินโคริซินไม่พร้อมกัน ฉะนั้นการที่จะได้โครโมโซมในตอนต้นระยะเมตาเฟสค่อนข้างยาก ถ้าโครโมโซมอยู่ในระยะเมตาเฟสแล้วโครโมโซมมักหดสั้นยากแก่การหาความแตกต่างของการกระจายเฮเทอโรโครมาติน

วรรณภา สุวรรณเกิด (Wannapa Suwonkerd. 1984 : 91) ได้ศึกษาโครโมโซมจากสมองของลูกน้ำระยะที่ 4 รังไข่และถุงอัมชะของตัวเต็มวัยโดยย้อมโครโมโซมของยุงจำนวน 500 - 600 ตัวด้วยสี Orcein มีสไลด์ที่เห็นเฮเทอโรโครมาตินเพียง 100 แผ่นเท่านั้น เนื่องจากโครโมโซมอยู่ในระยะที่ไม่เหมาะสม ดังที่กล่าวมาแล้ว และการติดสี Orcein ได้ไม่ดี เพราะฉะนั้นการย้อมโครโมโซมด้วยสี Orcein ส่วนใหญ่จึงสามารถศึกษาได้แค่เพียงรูปร่างและความยาวของโครโมโซมเท่านั้น (ภาพประกอบ 1 - 2) การศึกษาการกระจายของเฮเทอโรโครมาติน

บนโครโมโซมควรใช้ย้อมด้วยสี Hoechst 33258 เนื่องจากบริเวณที่มีเฮเทอโรโครมาตินจะมีคู่เบสอะดีนีน-ไทมีน (Adenine-Thymine) ซ้ำกันอยู่มากบน DNA สี Hoechst 33258 จะย้อมติดสีได้ดีเฉพาะบริเวณที่มีคู่เบสอะดีนีน-ไทมีนซ้ำกันมาก ๆ

เมื่อย้อมโครโมโซมด้วยสี Hoechst 33258 แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์บริเวณที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินจะสว่าง (Weisblum and Haenssler. 1974 : 255 - 260; Holmquist. 1975 : 333 - 356; Gatti, Pimpinelli and Santini. 1976 : 351 - 375) โครโมโซมของยุง An. balabacensis complex พบว่ามีการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินแตกต่างกันบนโครโมโซม X ส่วนออโตโซมจะมีลักษณะเหมือนกันคือมีเฮเทอโรโครมาตินที่ตำแหน่งเซนโตรเมียเท่านั้น (ภาพประกอบ 3 - 5) หลังจากย้อมสี Hoechst 33258 แล้วนำสไลด์เดิมไปย้อมสี Giemsa เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวรซึ่งจะเห็นการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินเช่นเดียวกับเมื่อย้อมสี Hoechst 33258

โคลุซซี และคิทซ์มิลเลอร์ (Coluzzi and Kitzmiller. 1975 : 258 - 309) ได้เสนอแบบของการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซม X ไว้ 2 แบบคือ แบบแรกเรียกว่าแบบ Maculipennis แขนสั้นของโครโมโซม X จะเป็นโครมาติน ขณะที่แขนยาวของโครโมโซม X ส่วนมากจะเป็นเฮเทอโรโครมาติน และโครโมโซม X อาจมีรูปร่างเป็นอะโครเซนตริก สัมเมตาเซนตริกหรือเมตาเซนตริกก็ได้ แบบที่สองเรียกว่าแบบ Gambiae แขนสั้นจะเป็นเฮเทอโรโครมาติน ขณะที่แขนยาวมีทั้งบริเวณที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินและยูโครมาติน โครโมโซม X ของแบบที่สองนี้มีรูปร่างเป็นอะโครเซนตริก หรือสัมเมตาเซนตริกก็ได้ จากการศึกษาการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินของ An. dirus จาก 3 จังหวัด และ An. balabacensis (Perlis form) พบว่ายุงใน An. balabacensis complex มีการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินเป็นแบบ Gambiae

ดร.วิสุทธิ ไบไม แฮริสัน และสมชิต (Visuit Baimai, Harrison and Somchit. 1981 : 81 - 86) ได้พบการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซม X และ Y ของ An. balabacensis complex โดยการย้อมสี Orcein และสี Giemsa มีการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินดังนี้คือ โครโมโซม X ของ An. dirus มีเฮเทอโรโครมาตินตั้งแต่ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ลงมาถึงกึ่งกลางความยาวของโครโมโซม ส่วน An. balabacensis (Perlis form) เซนตรอนของโครโมโซม X เป็นเฮเทอโรโครมาติน ขณะที่แขนยาวของโครโมโซมมีเฮเทอโรโครมาตินตั้งแต่ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ลงมาถึงกึ่งกลางความยาวของโครโมโซม ใน Y โครโมโซมของ An. balabacensis complex เป็นเฮเทอโรโครมาตินทั้งแท่ง การศึกษาการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมของยุง An. balabacensis complex ในครั้งนี้ต่างจาก ดร.วิสุทธิ ไบไม ได้ศึกษาไว้ดังนี้คือ An. dirus จากจังหวัดกาญจนบุรีและอุตรธานี มีโครโมโซม X สองแบบคือ แบบโฮโมไซกัส L-L และแบบเฮเทอโรไซกัส L-S ส่วน An. dirus จากชลบุรี มีเพียงแบบเดียวคือ โฮโมไซกัส L-L สำหรับ An. balabacensis (Perlis form) แขนยาวของโครโมโซม X มีลักษณะเหมือนแบบโฮโมไซกัส L-L ขณะที่เซนตรอนของโครโมโซมเป็นเฮเทอโรโครมาติน ใน Y โครโมโซมของ An. dirus จากกาญจนบุรี มีเฮเทอโรโครมาตินบริเวณเซนโทรเมียร์ และบริเวณส่วนปลายของโครโมโซมประมาณหนึ่งในสี่ของความยาวโครโมโซม (ภาพประกอบ 10) การศึกษาโครโมโซมจากงูอ้นทะเลเพื่อศึกษาการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบน Y โครโมโซมทำได้ยากเนื่องจากอวัยวะของงูตัวเต็มวัยมีขนาดเล็กมาก และงูตัวผู้ไม่ค่อยกินโคชิชิน

จากผลการศึกษาข้างต้นยังไม่สามารถสรุปได้ว่า An. dirus จากชลบุรีแตกต่างจาก An. dirus จากกาญจนบุรี และอุตรธานี เนื่องจาก An. dirus จากกาญจนบุรีและอุตรธานีเป็นยุงที่จับจากทองถัน ส่วน An. dirus จากชลบุรี

เป็นยุงที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลองมานานแล้วทำให้ไม่พบโครโมโซม X แบบเฮเทอโรไซกัส L-S นอกจากนี้ คร.วิสุทธิ ไบไม แฮร์สัน และสมชิต (Visuit Baimai, Harrison and Sochit. 1981 : 81 - 86) ยังได้กล่าวถึง An. balabacensis (Perlis form) ว่าเป็นยุงที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลองมานานแล้วเช่นกัน ดังนั้นลักษณะของโครโมโซม ที่เป็นอะโครเซนตริก มีแขนเป็นเฮเทอโรโครมาติน อาจเป็นลักษณะที่เปลี่ยนไปจากเดิมที่เป็นสับเมตาเซนตริกได้ ฉะนั้นการศึกษาคาร์ิโอไทป์ เพียงอย่างเดียวไม่สามารถที่จะแยกยุงเหล่านี้ทางก็เป็นคนละสปีชีส์ ใน An. balabacensis complex นอกจากจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมทางลักษณะรูปร่าง ภายนอก ไอโซเอนไซม์อิเล็กโตรโฟรีซิส (Isoenzyme electrophoresis) และการผสมข้ามพันธุ์ ดังเช่นที่ กานดา และคนอื่น ๆ (Kanda and others. 1981 : 321 - 329) ได้ศึกษาการผสมข้ามพันธุ์ และโครโมโซมจากคอกน้ำลายยุง An. dirus จากจันทบุรี กาญจนบุรี และ An. balabacensis (Perlis form) จากมาเลเซีย ทำให้ทราบว่า An. dirus จากจันทบุรีมีความใกล้เคียงกับ An. balabacensis (Perlis form) มากกว่า An. dirus จากกาญจนบุรี An. dirus ไม่สามารถแยกออกเป็นสปีชีส์ต่างออกไป เป็นแค่เพียงสับสปีชีส์หนึ่งใน An. balabacensis complex

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของยุง An. balabacensis complex ควรศึกษาในยุงที่จับมาจากท้องถิ่น หรือแหล่งเพาะพันธุ์ ไม่ควรเป็นยุงที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลองเป็นเวลานาน เพราะจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมไปมาก โครโมโซมอาจจะไม่เหมือนเดิม และจากผลการศึกษาพบว่าควรใช้สี Hoechst 33258 และ

สี Giemsa ในการย้อมโครโมโซม ซึ่งจะให้เห็นส่วนที่เป็นเฮเทอโรโครมาตินชัด และการศึกษาโครโมโซมจากรังไข่ของบุงอายุ 1 วัน

นอกจากนี้ ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านลักษณะภายนอก ไอโซเอนไซม์ อีเลคโตรโฟเรซิส และการผสมข้ามพันธุ์ของบุงเหล่านี้อย่างละเอียด เพื่อจะได้ทราบว่า บุงเหล่านี้แยกเป็นสปีชีส์ใน *An. balabacensis* complex หรือไม่

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- นันทนา อินทรเจริญศักดิ์ การศึกษาโครโมโซมของมดน้ำลายของ Anopheles
(Cellia) indefinitus และ Anopheles (Cellia) vagus Donitz
ปริญญาโท วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2524, 64 หน้า ภายเอกสาร
สุภัทร สุจริต "มดน้ำลาย" ข่าวสารวิทยาศาสตร์เขตร้อน ปีที่ 10 ฉบับที่ 10
2526, 4 - 8
- Ajjima Traipakvasin. Karyotype Variation in the Drosophila
kikkawai Complex. M.S thesis. Mahidol University,
1983. 58 p. mimeographed.
- Avirachan, T.T., P.L.Seetharam and B.N. Chowdaias. Karyotype
Studies in Oriental Anopheline. Cytologia. 34 : 418 -
422, 1968.
- Brown, S.W. Heterochromatin. Science. 151 : 417 - 425,
1966.
- Colless, D.H. The Anopheles leucosphyrus Group. Transmission
Relation Entomological Society of London. 108 : 37 -
116, 1966.
- Coluzzi, M. and J.B. Kitzmiller. Anopheles Mosquitoes.
Hand Book of Genetics. 3 : 258 - 309, 1975.
- French and others. Preparation of Mosquito Chromosome.
Mosquito News, 377 - 383, 1962.
- Gatti M., Pimpinelli and G. Santini. Characterization of
Drosophila Heterochromatin. Chromosoma (Berl). 57 : 351 -
375, 1976.
- Gatti, M. and others. Fluorescence Banning Techniques in
the Identification of Sibling Species of the Anopheles
gambiae Complex. Heredity. 105 - 108, 1971.
- Gould, D.S. and others. An Insular Outbreak of Dengue
Hemorrhagic Fever III. Identification of Vectors and
Observations on Vector Ecology. The American Journal of
Tropical Medicine and Hygiene. 17(4) : 609 - 618, 1968.

- Guptavanij, P. and others. Studies on Sub-Periodic Brugia malayi in Southern Thailand Southeast Asia. Journal Tropical Medicine and Public Health. 2(1) : 44 - 50, 1971.
- Holmquist, G. Hoechst 33258 Fluorescent Staining of Drosophila Chromosome. Chromosoma (Berl). 49 : 333 - 356, 1975.
- Kanda, T. and others. Hybridization and some Biological Facts of Seven Strains of the Anopheles leucosphyrus Group. (Reid, 1968). Japanese Journal of Sanitary Zoology. 32 : 321 - 329, 1981.
- Kreutzer. A Mosquito with Eight Chromosome Chagasia bathana Dyar. Mosquito News. 38 : 544 - 588, 1978.
- Ministry of Public Health. Public Health in Thailand. Pharmaceutical Department Press, Bangkok, Thailand. 1973. 124 p.
- Muangman, D. and others. Experimental Transmission of Japanese encephalitis Virus by Culex fuscocephala The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 21 : 482 - 483, 1972.
- Ow Yang, C.K., F.L. Stamaria and R.H. Wharton. Maintenance of a Laboratory Colony of Anopheles maculatus Theobald by Artificial Mating. Mosquito News. 23 : 34 - 35, 1963.
- Peyton, E.L. and B.A. Harrison. Anopheles (Cellia) dirus a New Species of the Leucosphyrus Group from Thailand (Diptera : Culicidae). Mosquito Systematics. 11 : 40 - 52, 1979.
- _____. Anopheles (Cellia) takasagoensis Morishita 1946, an Additional Species in the Balabacensis Complex of Southeast Asia (Diptera : Culicidae). Mosquito Systematics. 12(3) : 335 - 347, 1980.
- Reid, J.A. Anopheles Mosquitoes of Malaya and Borneo. Studies Institute Medical Research Malaya. vol 31, 1963. 520 p.
- Scanlon, S.E. and U.Sandhinard. The Distribution and Biology of Anopheles balabacensis in Thailand (Diptera : Culicidae). Journal Medical Entomology. 2 : 61 - 69, 1965.

- Simasathien, P. and others. Recovery of Japanese Encephalitis Virus from Wild-Caught Mosquitoes in Thailand Southeast Asia. Journal Tropical Medicine and Public Health. 3 : 53 - 54, 1972.
- Visuit Baimai. Chromosomal Polymorphism of Constitutive Heterochromatin and Inversion in *Drosophila*. Genetics. 85 : 85 - 93, 1971.
- Visuit Baimai, B.A. Harrison and L. Somchit. Karyotype Differentiation of Three Anopheline Taxa in the Balabacensis Complex of Southeast Asia (Diptera : Culicidae). Genetica. 57 : 81 - 86, 1981.
- Wannapa Suwonkerd. Evolutionary Genetics of the *Anopheles minimus* Group in the Northern Part of Thailand, with emphasis on Intra-Specific Species. M.S.thesis. Mahidol University, 1984. 91 p. mimeographed.
- Weisblum and Haensseler. Fluorometric Properties of the Bibenzimidazole Derivative Hoechst 33258, a Fluorescent Probe Specific for AT Concentration in Chromosomal DNA : Chromosoma (Berl). 46 : 255 - 260, 1974.
- Wilkinson, R.N., D.J.Gould and A. Boonyakanist. Comparative Susceptibility of *Anopheles balabacensis* and *Anopheles minimus* to Naturally Occurring *Plasmodium falciparum* in Central Thailand. Basic Research in Malaya. Proceeding Helminthology Society of Washington. 39 : 423 - 427, 1972.
- Yaovamarn Chomcharn. The Study of *Plasmodium falciparum* in Thailand with Respect to the Mosquito Vector *Anopheles balabacensis* Baisas and the Effect of Primaquine on the Gametocytes and sporogony. Doctor's thesis. Mahidol University, 1979. 177 p. mimeographed.

ภาคผนวก

วิธีเตรียมอาหารลูกน้ำ

1. นำส่วนผสมต่าง ๆ มาผสมให้เข้ากันดังนี้
 - 1.1 เนสตุม (Nestum) 750 มิลลิกรัม
 - 1.2 แป้งข้าวโพด 250 มิลลิกรัม
 - 1.3 คัมบด 30 มิลลิกรัม
 - 1.4 ยีสต์ 30 มิลลิกรัม
 - 1.5 ไวตามินบีรวม 0.5 มิลลิกรัม
2. ยีสต์แห้ง
3. ข้าวโอ๊ต
4. ข้าวสาลี

นำส่วนผสมจากข้อ 1 ถึง 4 มาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน แล้วปั่นให้เป็นผงโดยใช้เครื่องปั่น (Blender)

สารเคมีที่ใช้ในขบวนการย้อม

1. Sodium citrate 1 เปอร์เซ็นต์
 - 1.1 Sodium citrate 1 กรัม
 - 1.2 Distilled water 100 มิลลิลิตร
2. Carnoy's solution
 - 2.1 Acetic acid 45% 50 มิลลิลิตร
 - 2.2 Ethyl alcohol 95% 50 มิลลิลิตร
3. Orcein 2%
 - 3.1 Gurr's synthetic orcein 2 กรัม
 - 3.2 Lactic acid 85% 50 มิลลิลิตร

3.3 Glacial acetic acid 50 มิลลิลิตร

4. PBS buffer

4.1 Sodium dihydrogen phosphate 0.01 โมล

4.2 Disodium hydrogen phosphate 0.01 โมล

4.3 Sodium chloride 0.15 โมล

4.4 Potassium chloride 0.13 โมล

5. Hoechst 33258 (Stock solution)

5.1 Hoechst 33258 0.001 กรัม

5.2 Distilled water 200 กรัม

6. Giemsa (PH 6.8)

6.1 Giemsa 40 มิลลิลิตร

6.2 Phosphate buffer 2 มิลลิลิตร

การศึกษาครีโอฟีของยุง Anopheles balabacensis complex

บทคัดย่อ

ของ

ศิริวดี บุนนาค

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

เมษายน 2528

บทคัดย่อ

การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของยุง Anopheles balabacensis complex จากสถานพิกัดกันคือ An. dirus จาก 3 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ กาญจนบุรี อุดรธานี และชลบุรี และ An. balabacensis (Perlis form) จากทางเหนือของประเทศไทยเลย โดยเฉพาะระยะเมตาเฟสของเซลล์ของลูกน้ำระยะที่ 4 และจากรังไข่ของยุงตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน วิธีการย้อมด้วยสี 3 ชนิดคือ Orcein Hoechst 33258 และ Giemsa

การย้อมสี Orcein ไม่สามารถเห็นความแตกต่างของเฮเทอโรโครมาติน และยูโครมาตินบนโครโมโซมเพศได้ แต่เมื่อย้อมด้วยสี Hoechst 33258 จะเห็นการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซม X หลังจากย้อมสี Hoechst 33258 แล้วนำมาย้อมสี Giemsa เพื่อเก็บเป็นสไลด์ถาวร และเมื่อนำมาศึกษาพบว่าการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซมเหมือนกับเมื่อย้อมด้วยสี Hoechst 33258

ผลจากการศึกษาพบว่าคาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมทั้งหมด 3 คู่ ($2n = 6$) เป็นออโตโซม 2 คู่ มีรูปร่างแบบสับเมตาเซนตริก และมีเฮเทอโรโครมาตินเฉพาะบริเวณเซนโทรเมียร์เหมือนกันหมด โครโมโซมเพศของ An. dirus มีรูปร่างแบบเมโลเซนตริก ส่วนโครโมโซมเพศของ An. balabacensis (Perlis form) มีรูปร่างแบบอะโครเซนตริก ส่วนการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินบนโครโมโซม X ผลเป็นดังนี้คือ โครโมโซม X ของ An. dirus จากกาญจนบุรีและอุดรธานี มีการกระจายของเฮเทอโรโครมาตินเป็น 2 แบบ คือแบบโฮโมไซกัส L-L และแบบเฮเทอโรไซกัส L-S ใน An. dirus จากชลบุรี เป็นแบบโฮโมไซกัส L-L แบบเดียว ส่วน An. balabacensis (Perlis form) แขนยาวของโครโมโซม X มีการกระจายของเฮเทอโรโครมาติน คล้ายแบบโฮโมไซกัส L-L ของ An. dirus ขณะที่แขนสั้นเป็นเฮเทอโรไซกัส

STUDIES ON KARYOTYPES OF Anopheles balabacensis complex

AN ABSTRACT

BY

SIRIVADE BUNNAK

Present in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree
at Srinakharinwirot University

April 1985

Abstract

Karyotypes of Anopheles balabacensis complex collected from various locations; An. dirus from Kanchanaburi, Udontani and Chonburi provinces and An. balabacensis (Perlis form) in northern part of Malaysia were examined cytologically. Mitotic and meiotic karyotype investigation were prepared from the brain tissue of fourth instar larvae and the ovaries of one day old, newly emerged female. In this study three classical techniques : Orcein, Hoechst 33258 and Giemsa stain were employed.

Orcein staining technique did not show the distinguishable area of heterochromatin and euchromatin on the sex chromosome. With Hoechst 33258 staining, the chromosome showed the bright regions heterochromatin, mainly on X chromosome. By using Hoechst 33258, combined with Giemsa stained, permanent cytological preparations of differentially labelled chromatid were made, and the same results as that observed in staining with Hoechst were obtained.

The results showed three pairs of chromosome ($2n = 6$), which revealed two pairs of submetacentric autosome and showed the bright region heterochromatin at centromeric region in all group. But in sex chromosome An. dirus revealed one pair of telocentric while in An. balabacensis (Perlis form)

acrocentric type was found. The distribution of constitutive heterochromatin of An. dirus Kanchanaburi and Udontani strains had two from, homozygous L-L form and heterozygous L-S form, whereas the Chonburi strain had only one form, homozygous L-L form. In An. balabacensis, the distribution of constitutive heterochromatin on the long arm of X chromosome was the same as homozygous L-L type of An. dirus, meanwhile in the short arm of X chromosome was heterochromatin type.