



ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของรีน *Culicoides peregrinus* (Diptera:
Ceratopogonidae) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย

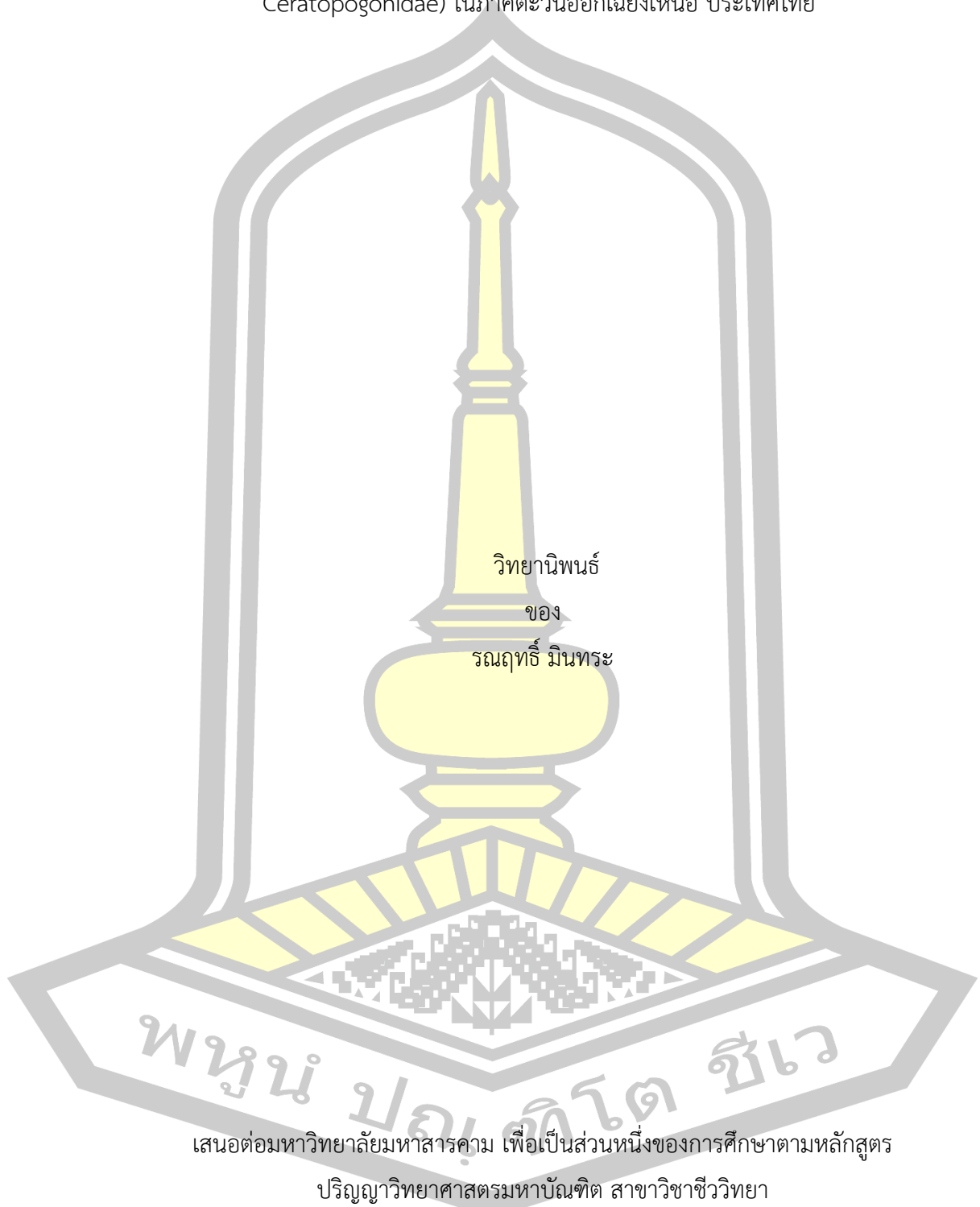
วิทยานิพนธ์
ของ
รณฤทธิ์ มินทะระ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของรี้น *Culicoides peregrinus* (Diptera:
Ceratopogonidae) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย

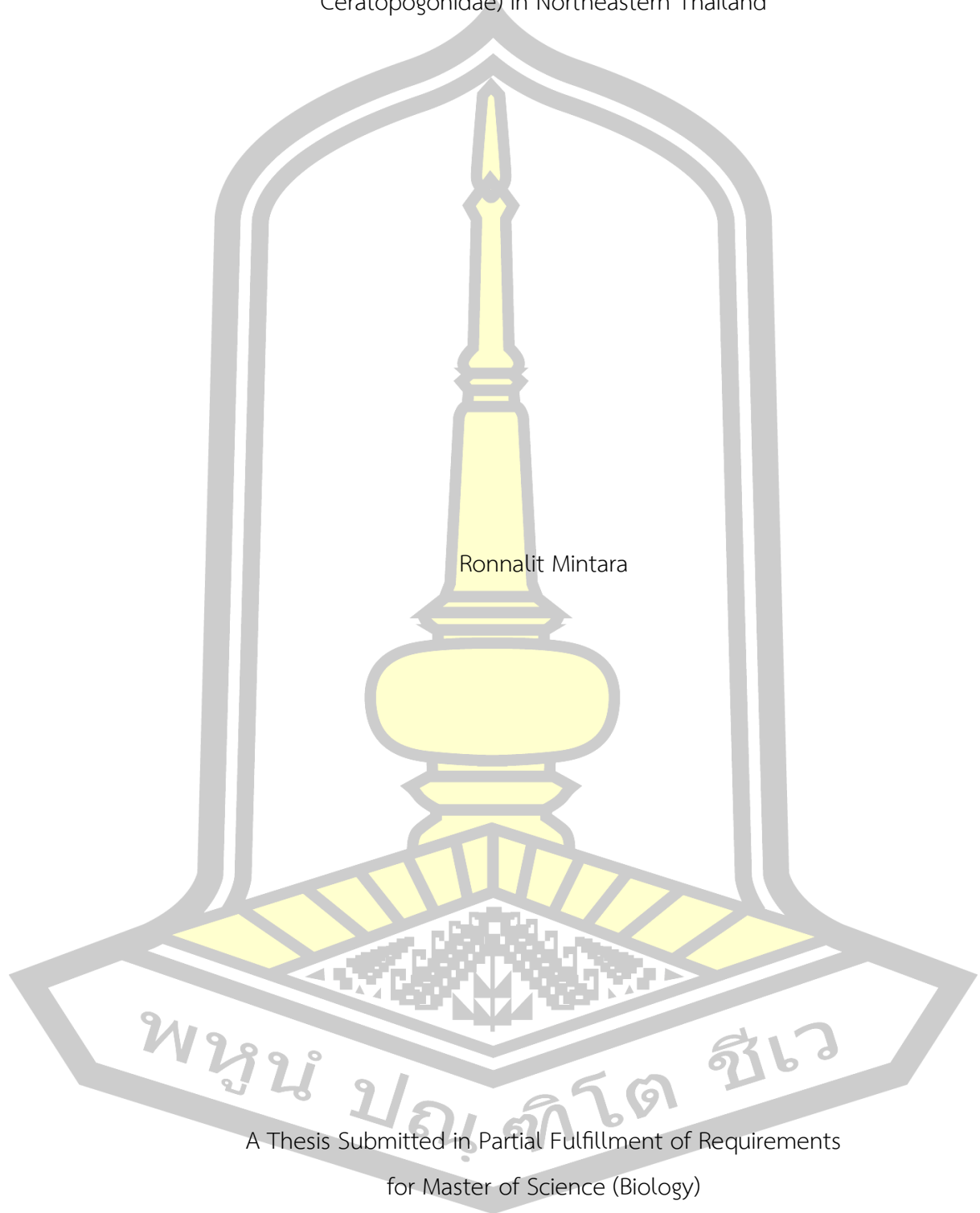


เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Genetic Diversity and Genetic Structure of Biting Midge *Culicoides peregrinus* (Diptera:
Ceratopogonidae) in Northeastern Thailand



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biology)

May 2024

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายรณฤทธิ์ มินทะระ แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
ชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. อุบล ตั้งควานิช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

.....กรรมการ

(รศ. ดร. ปิยมาศ นานอก โสภาดาวัลย์)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร. อีสระ ธานี)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

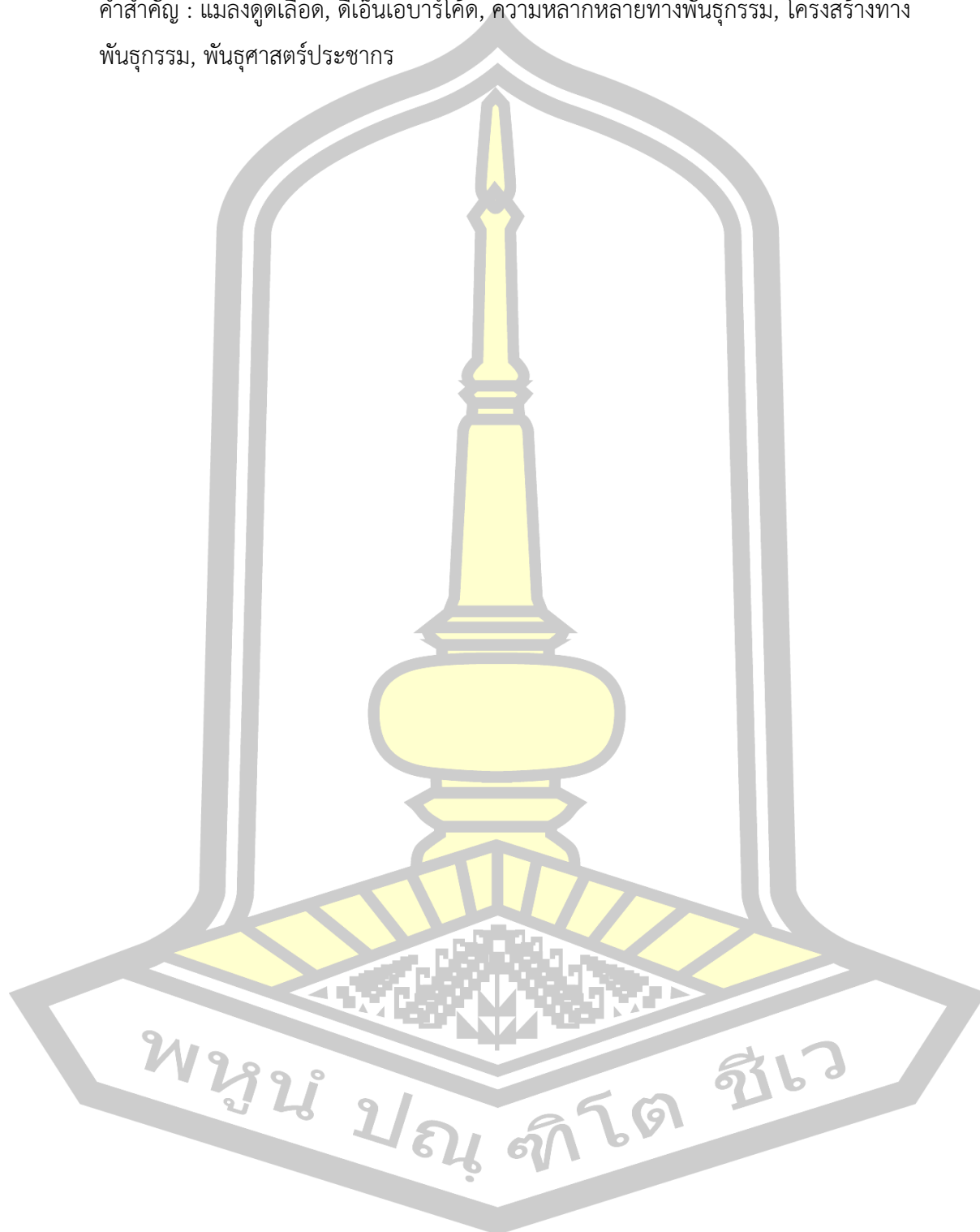
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของริ้น <i>Culicoides peregrinus</i> (Diptera: Ceratopogonidae) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย		
ผู้วิจัย	รณฤทธิ มินทร		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร. ไพโรจน์ ประมวล		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2567

บทคัดย่อ

ริ้นสกุล *Culicoides peregrinus* Kieffer เป็นแมลงดูดเลือดและเป็นแมลงพาหะที่สำคัญของเชื้อก่อโรคในสัตว์ ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรมมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการออกแบบโปรแกรมควบคุมที่มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวยังมีการศึกษาน้อยมาก ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ลำดับยีนซีโตโครม c oxidase subunit I (COI) ในไมโทคอนเดรีย เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรมของ *C. peregrinus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ยังศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง *C. peregrinus* จากประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ ที่รายงานในฐานข้อมูลสากล ความหลากหลายทางพันธุกรรมของริ้น *C. peregrinus* ในประเทศไทยมีค่าสูงสุด 3.83% การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่า ร้อยละ 71 (32 จาก 45 คู่เปรียบเทียบ) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ บ่งชี้ว่ามีการถ่ายเทยีนน้อยมาก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการปรับตัวเพื่อใช้แหล่งอาศัยในระยะตัวอ่อนที่หลากหลาย นอกจากนี้ *C. peregrinus* ยังดูดเลือดสัตว์หลากหลายชนิด ปัจจัยเหล่านี้ส่งเสริมให้ *C. peregrinus* สามารถพัฒนาระบบชีวิตได้ภายในแหล่งอาศัยเดียวโดยไม่ต้องอพยพไปยังแหล่งอาศัยอื่น ๆ ซึ่งเป็นผลให้การถ่ายเทยีนระหว่างประชากรต่ำทำให้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสูง ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่าง *C. peregrinus* ในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ พบว่าแยกเป็น 3 สายวิวัฒนาการ (A, B และ C) ซึ่งสายวิวัฒนาการนี้สอดคล้องกับแหล่งที่มาของตัวอย่าง โดยสายวิวัฒนาการ A เป็นตัวอย่างจากประเทศไทยและจีน สายวิวัฒนาการ B เป็นตัวอย่างจากประเทศออสเตรเลีย และสายวิวัฒนาการ C เป็นตัวอย่างจากประเทศอินเดียและบังคลาเทศ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายวิวัฒนาการนี้สอดคล้องกับรายงานความแปรผันของลักษณะจุดบนปีกของ *C. peregrinus* ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมจากยีนอื่นในนิวเคลียสดีเอ็นเอจะช่วยให้สามารถอธิบายสถานะทางอนุกรมวิธานของสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกันนี้ได้

คำสำคัญ : แผลงตูดเลื้อด, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, โครงสร้างทางพันธุกรรม, พันธุศาสตร์ประชากร



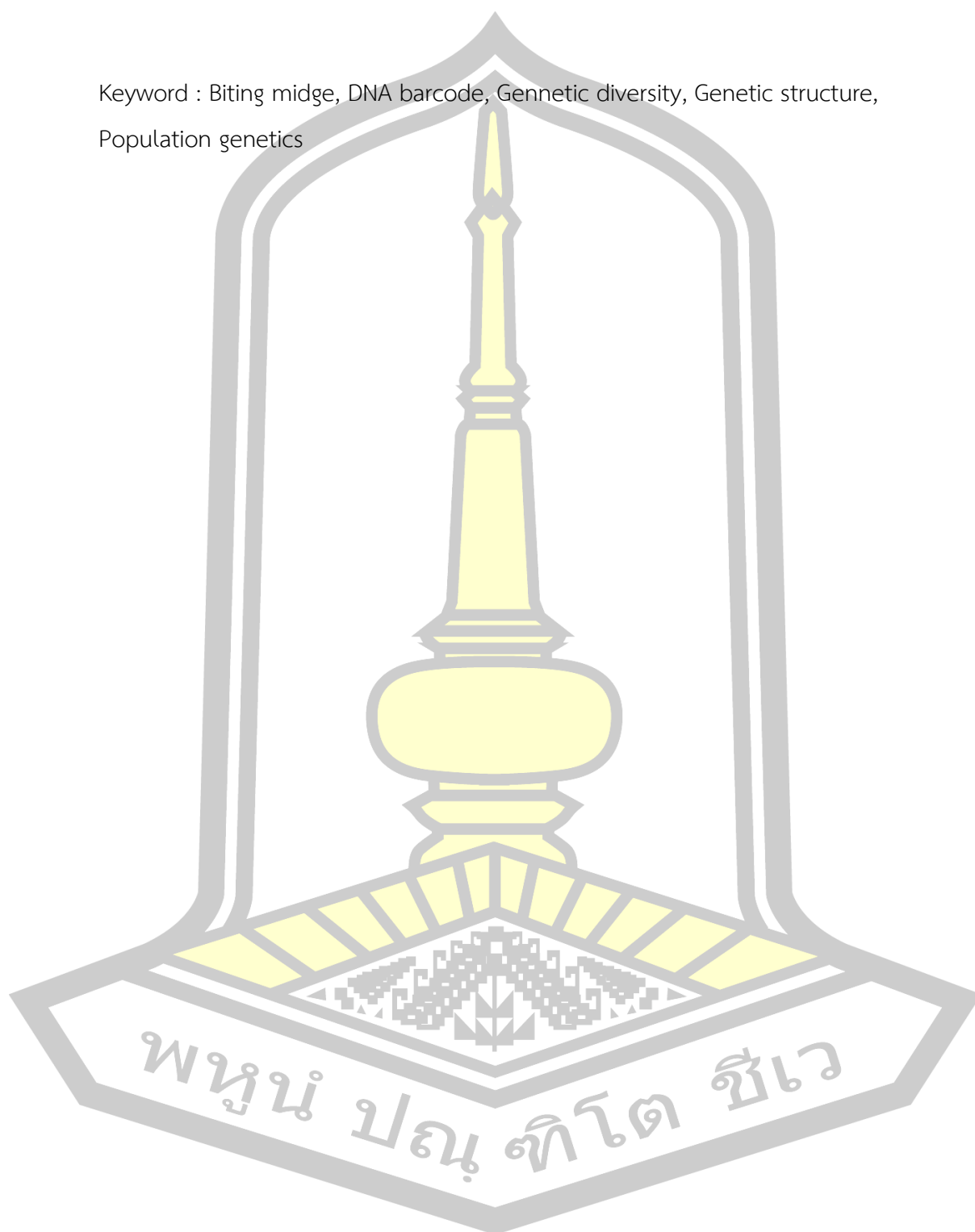
TITLE	Genetic Diversity and Genetic Structure of Biting Midge <i>Culicoides peregrinus</i> (Diptera: Ceratopogonidae) in Northeastern Thailand		
AUTHOR	Ronnalit Mintara		
ADVISORS	Professor Pairot Pramual , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2024

ABSTRACT

The biting midges *Culicoides peregrinus* Kieffer is a blood-feeding insect and a significant vector of pathogens in animals. Understanding genetic diversity and genetic structure is crucial for designing efficient control programs. However, data on *Culicoides peregrinus* are limited. In this study, genetic diversity and genetic structure of *C. peregrinus* in northeastern Thailand were examined using sequences of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. Furthermore, genetic relationships between *C. peregrinus* populations in Thailand and those reported from other geographic regions available in public databases were also inferred. Maximum genetic divergent within Thai specimens is 3.83%. Genetic structure analysis revealed that most (71%, 32 from 45 population pairs) were genetically significantly different. High level of genetic differentiation between populations suggest limited gene flow. Potential to utilize diverse immature habitats and host blood sources possibly encourage *C. peregrinus* to complete life cycle in a particular habitat which leading to limitation of gene flow and increase genetic differentiation between populations. Genetic relationships between Thai specimens and those from other geographic regions revealed three evolutionary lineages (A, B, and C), corresponding to their geographical origins. Lineage A represented sample from Thailand and China, lineage B from Australia, and lineage C from India and Bangladesh. These genetically divergent lineages are also agreeing with morphological variations in wing patterns. Further investigation using additional genetic markers from the nuclear genome will

be useful to solve the taxonomic status of these genetic lineages.

Keyword : Biting midge, DNA barcode, Genetic diversity, Genetic structure,
Population genetics

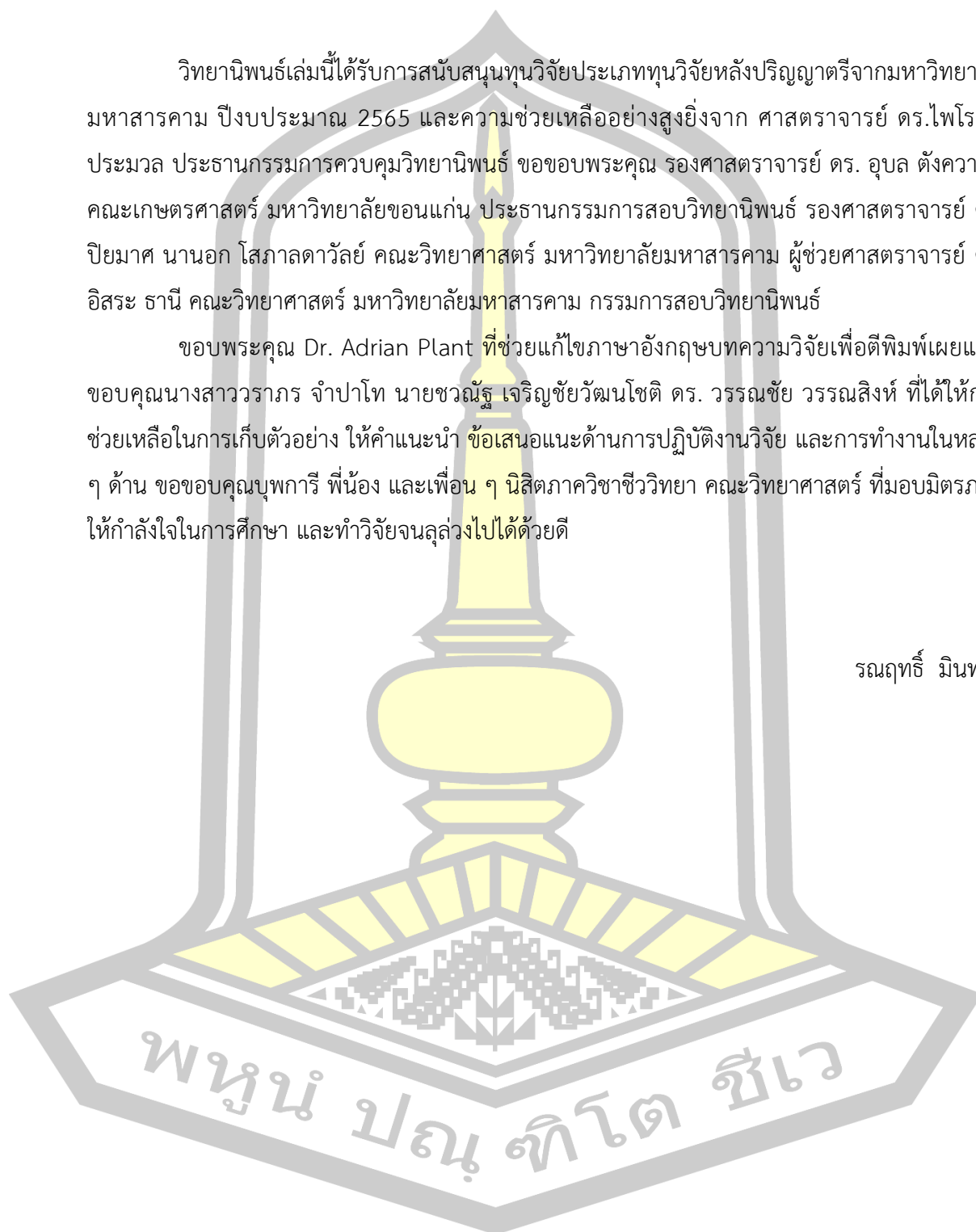


กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยประเภททุนวิจัยหลังปริญญาตรีจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2565 และความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อุบล ตั้งวานิช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะมาศ นานอก โสภาลดาวัลย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อิศระ ธาณี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ Dr. Adrian Plant ที่ช่วยแก้ไขภาษาอังกฤษบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ ขอขอบคุณนางสาววรารกร จำปาโท นายชวณัฐ เจริญชัยวัฒนโชติ ดร. วรณชัย วรณสิงห์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะด้านการปฏิบัติงานวิจัย และการทำงานในหลาย ๆ ด้าน ขอขอบคุณบุพการี พี่น้อง และเพื่อน ๆ นิสิตภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่มอบมิตรภาพให้กำลังใจในการศึกษา และทำวิจัยจนลุล่วงไปได้ด้วยดี

รณฤทธิ์ มินทะระ



สารบัญ

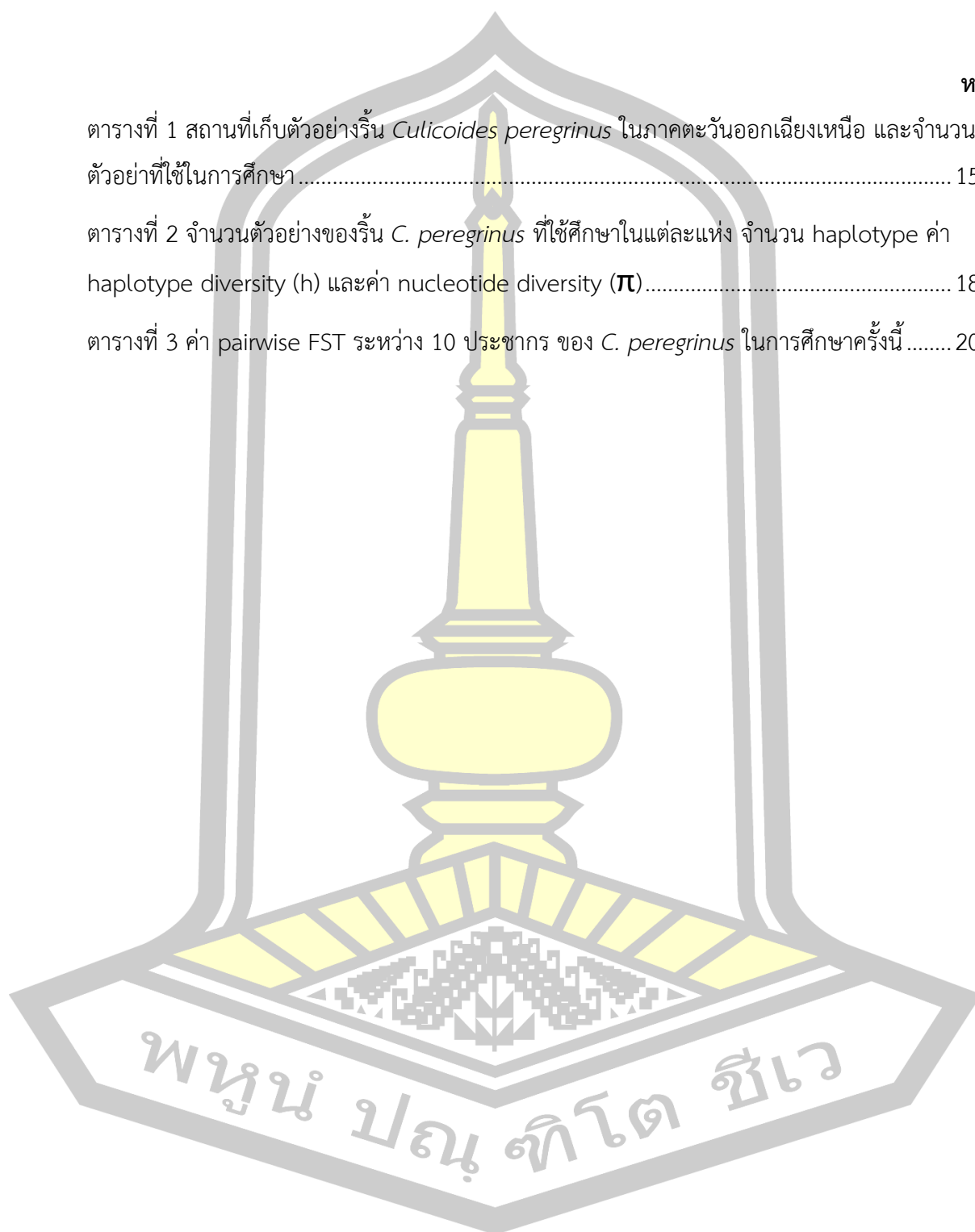
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฌ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 สถานที่ทำงานวิจัย	3
บทที่ 2	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ชีววิทยาของรื้อนสกุล <i>Culicoides</i>	4
2.2 ความสำคัญของรื้อนสกุล <i>Culicoides</i>	10
2.3 การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของรื้อน <i>Culicoides</i>	10
2.4 รื้อน <i>Culicoides peregrinus</i> Kieffer.....	11
บทที่ 3	13
วิธีดำเนินงานวิจัย	13

3.1 การเก็บตัวอย่างและการระบุปีชีส์	13
3.2 ศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุล	13
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล	14
บทที่ 4	17
ผลการวิจัย	17
4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของริ้น <i>Culicoides peregrinus</i> ในภาคตะวันออกเฉียง เหนือของประเทศไทย	17
4.2 โครงสร้างทางพันธุกรรมและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์	19
4.3 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่าง <i>Culicoides peregrinus</i> ในประเทศไทยกับภูมิภาค อื่นของโลก	21
4.4 การตรวจสอบชนิดของสัตว์ที่ริ้น <i>Culicoides peregrinus</i> ดูดเลือด	22
บทที่ 5	23
สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	23
5.1 อภิปรายผลการศึกษา	23
5.2 สรุปผลการศึกษา	25
5.3 ข้อเสนอแนะ	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	34
ภาคผนวก ก ผลงานตีพิมพ์ บทความวิจัยในวารสารวิชาการ	35
ภาคผนวก ข สถานที่เก็บตัวอย่าง	42
ประวัติผู้เขียน	44

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างริ้น <i>Culicoides peregrinus</i> ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	15
ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างของริ้น <i>C. peregrinus</i> ที่ใช้ศึกษาในแต่ละแห่ง จำนวน haplotype ค่า haplotype diversity (h) และค่า nucleotide diversity (π).....	18
ตารางที่ 3 ค่า pairwise FST ระหว่าง 10 ประชากร ของ <i>C. peregrinus</i> ในการศึกษาครั้งนี้.....	20



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>Culicoides peregrinus</i> Kieffer	5
ภาพที่ 2 โครงสร้างปีกและเส้นปีกของรีน <i>Culicoides peregrinus</i>	6
ภาพที่ 3 วงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ของรีนสกุล <i>Culicoides</i>	7
ภาพที่ 4 หนวดเพศผู้แบบ plumose กำลังขยาย 40 เท่า ข. หนวดเพศเมีย แบบ pilose กำลังขยาย 40 เท่า	9
ภาพที่ 5 ก. อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ กำลังขยาย 100 เท่า ข. อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย กำลังขยาย 100 เท่า	9
ภาพที่ 6 สถานที่เก็บตัวอย่างรีนสกุล <i>Culicoides peregrinus</i> ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย สีของสัญลักษณ์ระบุตามพื้นที่เก็บตัวอย่าง	16
ภาพที่ 7 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ของ <i>Culicoides peregrinus</i> ในประเทศไทย ...	19
ภาพที่ 8 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ของ <i>Culicoides peregrinus</i> ในประเทศไทย จีน อินเดีย บังคลาเทศ และออสเตรเลีย สร้างด้วยวิธี median-joining จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จำนวน 191 ตัวอย่าง (112 จากการศึกษาครั้งนี้และ 79 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล BOLDs และ GenBank) สีของแฉกโพลโทระบุตามประเทศต้นกำเนิดของตัวอย่าง	21
ภาพที่ 9 ภาพถ่ายปีกขวาของ <i>Culicoides peregrinus</i> เพศเมียที่ใช้ในการศึกษา ลูกศรแสดงตำแหน่งของจุดสีจางที่มีความแปรผัน	22

พูน ปรณ จิต ชีเว

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ริ้นสกุล *Culicoides* Latreille, 1809 เป็นแมลงดูดเลือดขนาดเล็ก ความยาวลำตัวประมาณ 1-4 มิลลิเมตร จัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Ceratopogonidae มีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ประกอบด้วย 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult) ปัจจุบันทั่วโลกมีรายงานการพบมากกว่า 1,347 สปีชีส์ (Borkent and Dominiak, 2020) หลายสปีชีส์เป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์ และสัตว์ชนิดอื่น ๆ เช่น โรคไข้เหลือง (Oropouche fever) ในมนุษย์ โรคบลูทังก์ (bluetongue disease) ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง กาฬโรคม้า (African horse sickness) ในม้า และ โรคลิวโคไซโตซูโนซิส (leucocytozoonosis) ในสัตว์ปีก (Mullen and Murphree, 2019)

ริ้น *Culicoides peregrinus* Kieffer, 1910 จัดอยู่ในสกุล *Culicoides* สกุลย่อย *Hoffmanai* Fox ริ้นสปีชีส์นี้มีรายงานว่าอาจเป็นพาหะของเชื้อ bluetongue virus (BTV) ในประเทศออสเตรเลีย (Mullen and Murphree, 2019) และประเทศอินเดีย (Ranjan et al., 2017) ริ้น *C. peregrinus* รายงานการพบครั้งแรกจากรัฐโอริสสา ประเทศอินเดีย (Wirth and Hubert, 1989) ปัจจุบันมีรายงานการแพร่กระจายในหลายประเทศในเอเชีย โดยพบได้ตั้งแต่ประเทศอินเดีย ศรีลังกา บังกลาเทศ ทุกประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ออสเตรเลีย ปาปัวนิวกินี ญีปุ่น และตอนใต้ของจีน (Sen and Gupta, 1959; Wirth and Hubert, 1989; Dyce et al., 2007; Liu et al., 2018) *C. peregrinus* ดูดเลือดจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น มนุษย์ ม้า แพะ แกะ โค กระบือ สุนัข และสัตว์ปีก (Wirth and Hubert, 1989; Jomkumsing et al., 2021; Kar et al., 2022b; Sunantaraporn et al., 2022; Kamyngkird et al., 2023) ทำให้ริ้น *C. peregrinus* เป็นสปีชีส์ที่พบได้ทั่วไปทั้งบริเวณภายในและบริเวณรอบ ๆ คอกสัตว์ (Harsha et al., 2020; Fujisawa et al., 2021; Kar et al., 2022a) ริ้นสปีชีส์นี้ยังสามารถเพาะพันธุ์ได้ในแหล่งอาศัยที่หลากหลาย เช่น บริเวณดินที่ชุ่มชื้นตามขอบสระหรือบ่อน้ำ ทางระบายน้ำ ในพื้นที่นาข้าว และบริเวณที่อุดมด้วยอินทรีย์สาร (Wirth and Hubert, 1989; Yanase et al., 2013; Harsha and Mazudar, 2015)

ริ้น *C. peregrinus* มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและการแพทย์ เนื่องจากเป็นแมลงศัตรู ที่ดูดเลือดจากสัตว์หลายชนิด รวมถึงสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น โค กระบือ เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นพาหะของเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตามองค์ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของ *C. peregrinus* ยังมีการศึกษาน้อย การศึกษาส่วนใหญ่เป็นเพียงรายงาน

การศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) ซึ่งใช้จำนวนตัวอย่างในการศึกษาไม่มาก ไม่ครอบคลุมการกระจายทางภูมิศาสตร์ของสปีชีส์ (Harrup et al., 2016; Liu et al., 2018; Jomkumsing et al., 2021; Gopurenko et al., 2022) ความเข้าใจเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงพาหะมีความสำคัญในด้านระบาดวิทยาของโรค สามารถนำมาใช้ในการออกแบบโปรแกรมควบคุมที่มีประสิทธิภาพได้ (Tabachnick and Black, 1995; McCoy, 2008) เช่น ระดับของความแตกต่างทางพันธุกรรมสามารถบ่งชี้ได้ถึงอัตราการเคลื่อนย้ายระหว่างประชากรในแต่ละพื้นที่ ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในกระบวนการออกแบบการควบคุมแมลงพาหะ (Tabachnick and Black, 1995) สำหรับสปีชีส์ที่มีการกระจายทางชีวภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวาง การทดสอบสถานภาพของสปีชีส์ระหว่างประชากรเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเป็นพาหะของเชื้อก่อโรค (McCoy, 2008; Powell, 2018)

การระบุสปีชีส์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของริ้นสกุล *Culicoides* นั้นค่อนข้างยาก เนื่องจากขนาดตัวที่มีขนาดเล็ก มีความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำให้ยากต่อการระบุสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน ซึ่งอาจมีความหลายของสปีชีส์ จำเป็นต้องใช้การบูรณาการข้อมูลจากทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น รายงานการค้นพบริ้น *C. mahasarakhamense* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาล้ายคลึงกับ *C. arakawae* (Arakawa) ในประเทศไทย แต่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจาก *Culicoides arakawae* มีพบกระจายอยู่ทั่วไปจาก เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศญี่ปุ่น ซึ่งจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าบางตัวอย่างที่ระบุว่าเป็น *C. arakawae* เป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกันคือ *C. mahasarakhamense* (Pramual et al., 2021a) การศึกษาต่อมาพบว่า *C. mahasarakhamense* อาจเป็นพาหะของเชื้อก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Leucocytozoon*, *Plasmodium juxtanucleare*, *P. gallinaceum* และ *Leishmania martiniquensis* (Pramual et al., 2021b; Sunantaraporn et al., 2021; Songumpai et al., 2021)

ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรมของตัวอย่างริ้น *C. peregrinus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ลำดับของยีนไมโทคอนเดรีย ในส่วนของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เพื่อระบุการเคลื่อนย้ายระหว่างประชากร ซึ่งอาจใช้สำหรับการออกแบบโปรแกรมควบคุมที่มีประสิทธิภาพ (Tabachnick and Black, 1995) นอกจากนี้ยังตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่าง *C. peregrinus* ในประเทศไทยกับตัวอย่างที่รายงานจากต่างประเทศในฐานะข้อมูลพันธุกรรม ข้อมูลนี้จะช่วยให้ระบุสถานะสปีชีส์ของประชากรที่มีการกระจายทางภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวาง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของริ้น *Culicoides peregrinus*

1.2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และโครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ของริ้น *C. peregrinus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย

1.2.3 เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่าง *C. peregrinus* ในประเทศไทยกับตัวอย่างที่รายงานจากต่างประเทศ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่างริ้น *C. peregrinus* จากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติในพื้นที่คอกสัตว์ จำแนกสปีชีส์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และโครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ของริ้น *C. peregrinus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI)

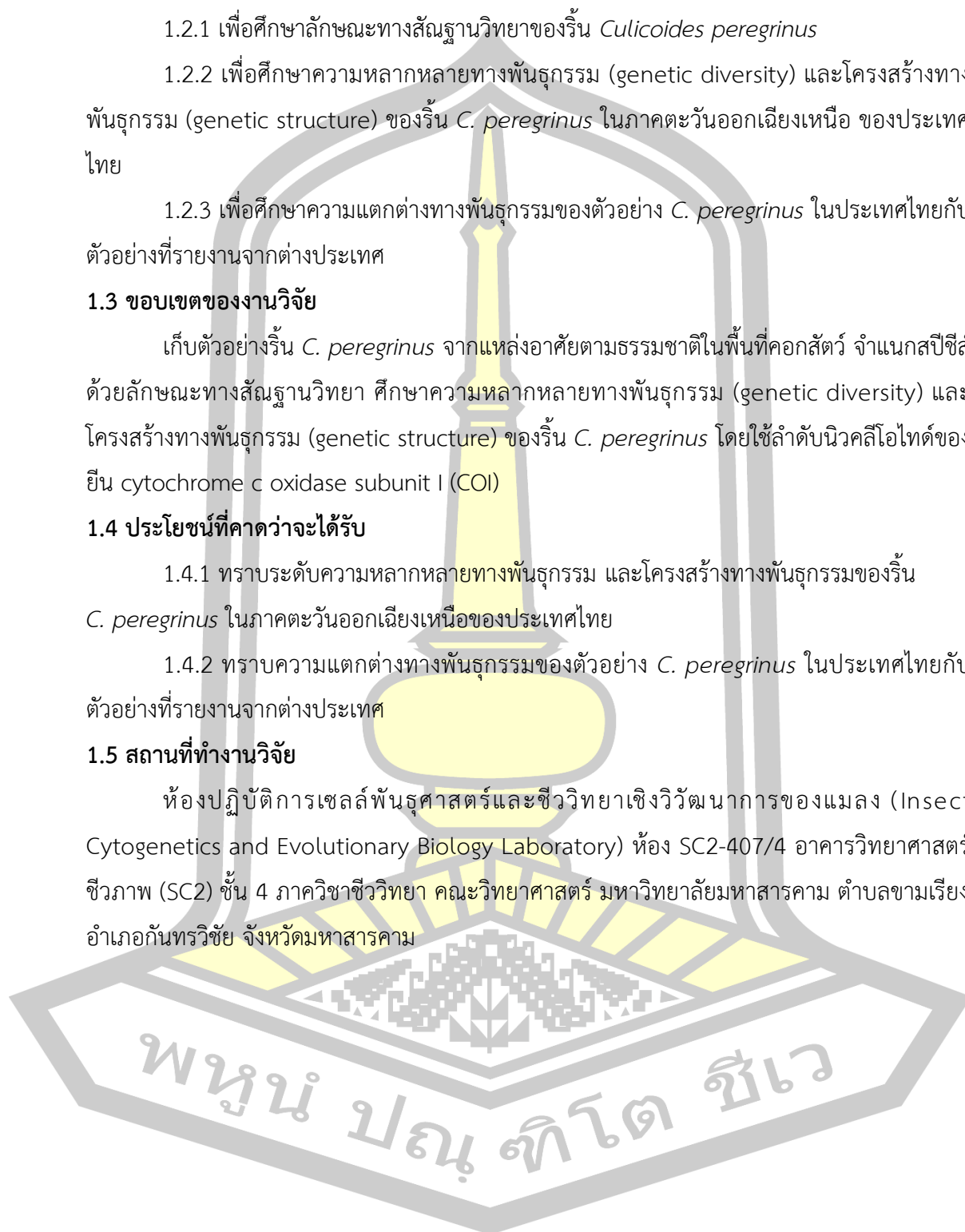
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรมของริ้น *C. peregrinus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

1.4.2 ทราบความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่าง *C. peregrinus* ในประเทศไทยกับตัวอย่างที่รายงานจากต่างประเทศ

1.5 สถานที่ทำงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์และชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการของแมลง (Insect Cytogenetics and Evolutionary Biology Laboratory) ห้อง SC2-407/4 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (SC2) ชั้น 4 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวิตวิทยาของริ้นสกุล *Culicoides*

ริ้นสกุล *Culicoides* Latreille เป็นแมลงขนาดเล็ก ความยาวลำตัวประมาณ 1-4 มิลลิเมตร เป็นแมลงที่มีปีกคู่เดียวที่ใช้ในการบิน โดยปีกคู่หลังเปลี่ยนรูปไปเป็นอวัยวะในการทรงตัวเรียกว่า halteres จัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Ceratopogonidae โดยทั่วไปเรียกริ้นในวงศ์นี้ว่า biting midges ในประเทศไทยเรียกตัวปึง หรือริ้นน้ำเค็ม ริ้นสกุล *Culicoides* ทั่วโลกมีรายงานการพบ 1,347 สปีชีส์ จัดเป็นสกุลย่อยได้ 33 สกุลย่อย 38 กลุ่มสปีชีส์ และ 136 สปีชีส์ที่ยังไม่สามารถจัดกลุ่มสปีชีส์หรือสกุลย่อยได้ (Borkent and Dominiak, 2020)

2.1.1 อนุกรมวิธานและการระบุสปีชีส์ของริ้นสกุล *Culicoides* Latreille

2.1.1.1 อนุกรมวิธานของริ้นสกุล *Culicoides* Latreille

ลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานของริ้นสกุล *Culicoides* สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Diptera

Family: Ceratopogonidae

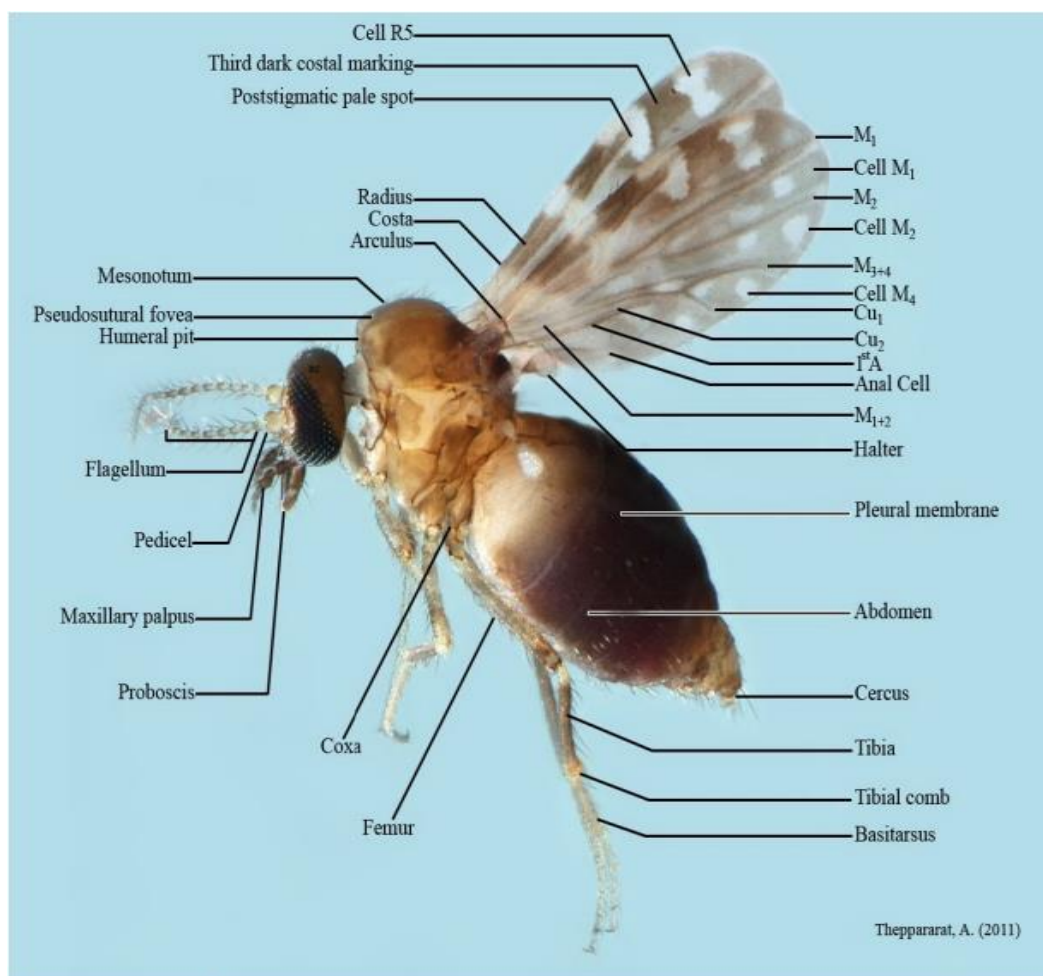
Subfamily: Ceratopogoninae

Genus: *Culicoides* Latreille, 1809

2.1.1.2 การระบุสปีชีส์ของริ้นสกุล *Culicoides*

1) การระบุสปีชีส์โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา

การระบุสปีชีส์โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาโดยส่วนใหญ่ใช้ลักษณะลดทอนด้านหลังของอก ขนาด และรูปร่างของหนวด การกระจายของกลุ่มประสาทสัมผัสตามหนวด ตำแหน่งสัมผัสของดวงตาม จำนวนถุงเก็บอสุจิในเพศเมีย รูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (ภาพที่ 1)

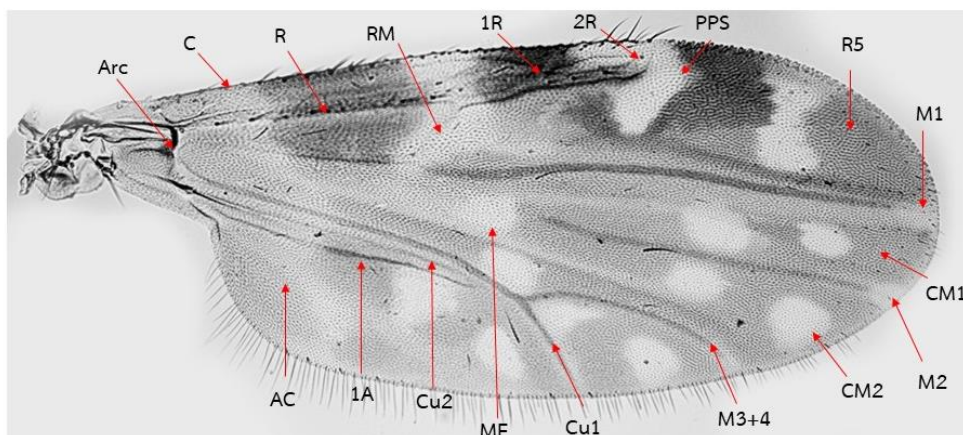


ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Culicoides peregrinus* Kieffer

(ที่มา: อรุณรัตน์ เทพรัตน์ และคณะ, 2555)

ลักษณะปีก (wing) (ภาพที่ 2) เป็นส่วนที่ใช้มากที่สุดในการระบุสปีชีส์ของรื้อสกุล *Culicoides* เนื่องจากเป็นลักษณะที่สังเกตได้ง่ายที่สุด โดยลักษณะที่ใช้ ได้แก่ ขนาดปีก รูปร่างปีก เส้นปีก และลวดลายบนปีก ลวดลายบนปีกเกิดจากเม็ดสีในเนื้อเยื่อทำให้เกิดสีขา-ดำ แตกต่างกันบนปีกแต่ละสปีชีส์ ภายในสปีชีส์เดียวกันเพศเมียมักมีลวดลายบนปีกชัดกว่าเพศผู้

พญ. ปณ. ทิโต ชีเว



Arc:	Arculus	R5:	Cell R5	1A:	1 st Anal Vein
C:	Costa	M1:	Vein M1	AC:	Anal Cell
R:	Radius	M2:	Vein M2	CM1:	Cell M1
RM:	R-M Cross Vein	M3+4:	Vein M3+M4	CM2:	Cell M2
1R:	1 st Radian Cell	Cu1:	Vein Cu1		
2R:	2 st Radian Cell	MF:	Medial Fork		
PPS:	Poststigmatic Pale Spot	Cu2:	Vein Cu2		

ภาพที่ 2 โครงสร้างปีกและเส้นปีกของริ้น *Culicoides peregrinus*

2) การระบุสปีชีส์โดยใช้เทคนิคพันธุศาสตร์โมเลกุล

สำหรับสิ่งมีชีวิตบางสปีชีส์ที่ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ หรือจำแนกได้ยากเนื่องจากมีความคล้ายคลึงของลักษณะดังกล่าว อาจจำเป็นต้องใช้ข้อมูลพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นเครื่องหมายในการระบุสปีชีส์ (Hebert et al., 2003) วิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ซึ่งเป็นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล จะช่วยให้สามารถจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษได้ (Schwenkenbecher et al., 2009)

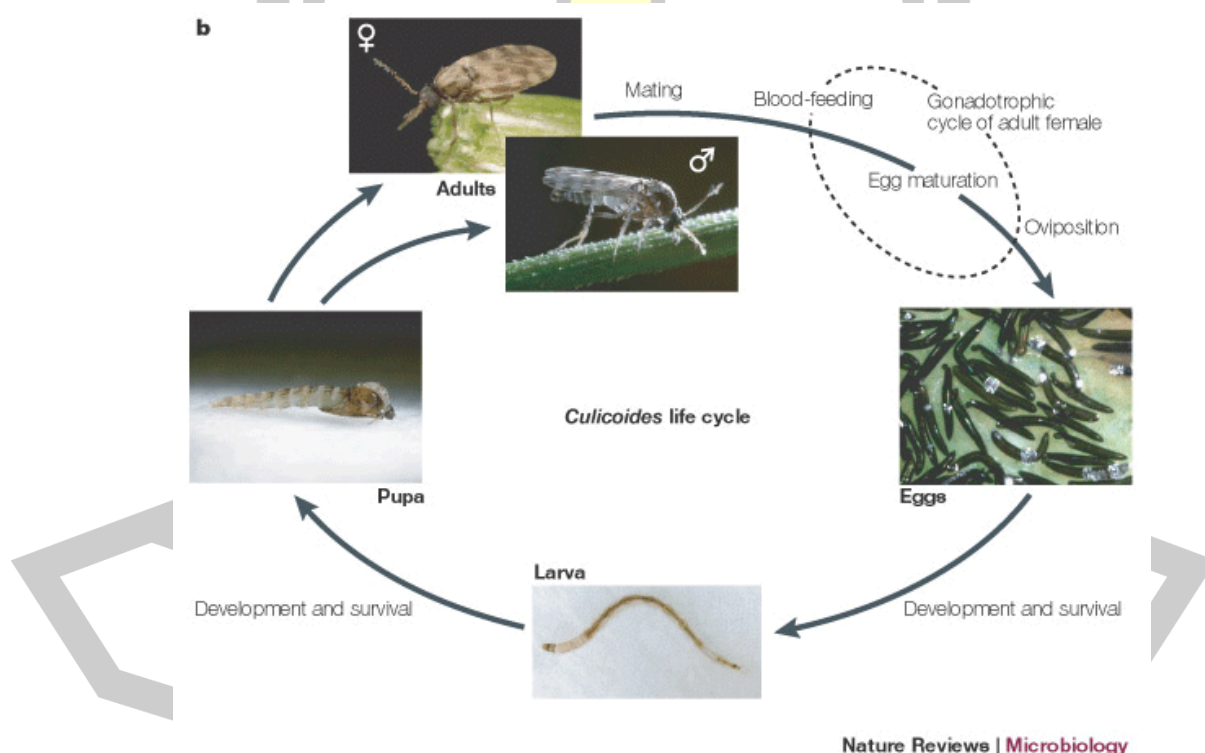
ยีนที่นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสัตว์ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) เป็นยีนที่พบในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด สายที่นำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีความยาวประมาณ 500-600 คู่เบส โดย COI เป็นยีนที่มีความแปรผันสูงจึงเหมาะในการใช้จำแนกสปีชีส์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกันได้ดี อีกทั้งยังมีข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) และ Barcode of Life Data System (BOLDS) จำนวนมากทำให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างละเอียดและมีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น (Folmer et al., 1994; Zhang and Hewitt, 1997; Frezal and Leblois, 2008)

ในการจำแนกสปีชีส์ของริ้นสกุล *Culicoides* ส่วนใหญ่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก (morphotaxonomy) ของตัวเต็มวัยในการระบุสปีชีส์ แต่การระบุสปีชีส์ด้วยลักษณะทางสัณฐาน

วิทยาของร้นสกุล *Culicoides* นั้นทำได้ยากเพราะขนาดเล็ก นอกจากนี้สปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันส่วนใหญ่มีลักษณะสัณฐานวิทยาล้ำคลึงกันมาก มีลักษณะสัณฐานวิทยาสำหรับการระบุความแตกต่างระหว่างสปีชีส์น้อย (Harrup et al., 2015) ดังนั้นการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม เช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากยีน COI จึงมีความสำคัญและจำเป็นสำหรับการศึกษานุกรมวิธานของร้น *Culicoides* (Harrup et al., 2016) เช่น ร้น *C. arakawae* ซึ่งมีรายงานการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางพบในเอเชียใต้ เอเชียตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และญี่ปุ่น (Wirth and Hubert, 1989) การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากตัวอย่าง *C. arakawae* ในประเทศไทยพบว่าบางประชากรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนกับ *C. arakawae* นำไปสู่การตั้งสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ *C. mahasarakhamense* (Pramual et al., 2021a)

2.1.2 วงชีวิตของร้นสกุล *Culicoides*

ร้นสกุล *Culicoides* มีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) (ภาพที่ 3) ประกอบด้วย 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ (egg) ระยะตัวอ่อน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult)



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ของร้นสกุล *Culicoides* (ที่มา: Purse et al. 2005)

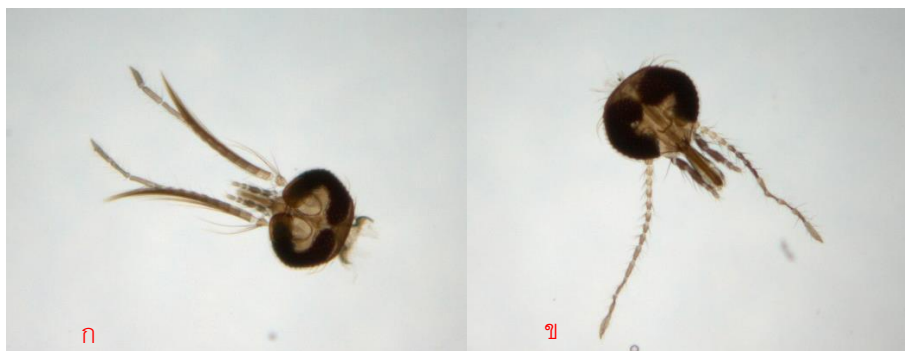
1.) **ระยะไข่ (egg)** ไข่ร้นสกุล *Culicoides* มีสีน้ำตาล หรือดำ ลักษณะเป็นทรงกระบอกโค้ง รูปร่างคล้ายกล้วยหอมมีขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร วางไข่เป็นชุด ชุดละประมาณ 30-100 ฟอง ดินเลน

หรือบนผิวโคลน โดยเฉพาะบริเวณใกล้กับบึงหรือหนองน้ำ ตามใบไม้ที่กำลังเน่าเปื่อย น้ำขังในโพรงไม้ มูลสัตว์ ใช้เวลาประมาณ 2-9 วันไข่จะพัฒนาเป็นตัวอ่อน

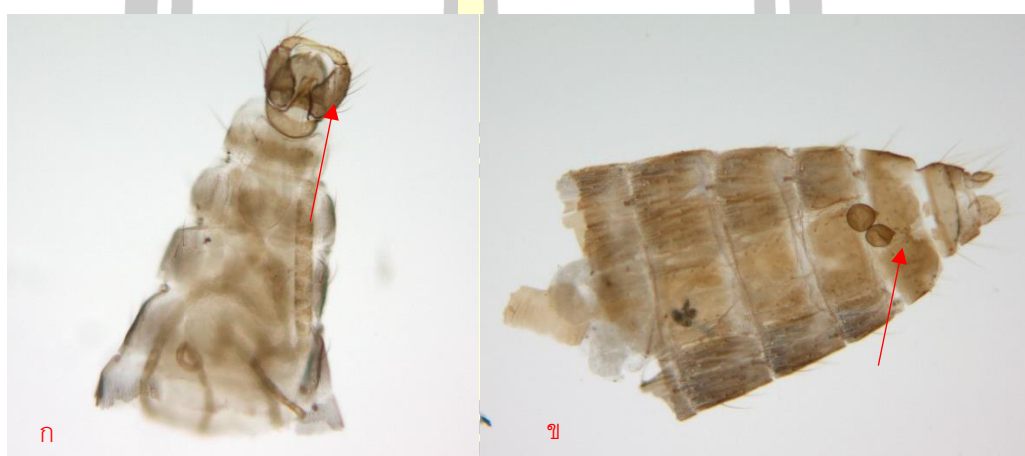
2.) ระยะตัวอ่อน (larva) อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ทั้งน้ำเค็ม น้ำจืด น้ำกร่อย ในวัตถุที่กำลังเน่า โคลนริมสระน้ำ ในโพรงของต้นไม้ และตามมูลสัตว์ กินพืชที่กำลังเน่าเปื่อย หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ในบริเวณแหล่งอาศัยเป็นอาหาร ระยะตัวอ่อนใช้เวลาในการพัฒนา 14-25 วัน ตัวอ่อนของริ้นสกุล *Culicoides* มี 4 ระยะคล้ายๆกัน ระยะสุดท้ายมีลักษณะลำตัวเป็นทรงกระบอกยาวสีขาว หัวเล็กสีเหลือง หรือดำ มีตา 1 คู่ และหนวดเล็ก ๆ 1 คู่ หลังพัฒนาจนถึงระยะสุดท้ายตัวอ่อนที่อาศัยอยู่ตามแหล่งที่แฉะแฉะ หรือโคลนตมจะคลานหาที่แห้งและลอกคราบเข้าสู่ระยะดักแด้ ส่วนชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้จะลอยขึ้นสู่น้ำ ตัวอ่อนที่เข้าสู่ระยะดักแด้จะไม่กินอาหาร

3.) ระยะดักแด้ (pupa) ดักแด้ของริ้นสกุล *Culicoides* จะลอยอยู่บนผิวน้ำ หรือผิวโคลน มีลักษณะผิวน้ำตัวโปร่งบาง ออกอ้วนใหญ่ มีช่วงหางที่สั้นยื่นออกจากลำตัว รูปร่างคล้ายตัวจุลภาค (,) มีอวัยวะใช้หายใจลักษณะเป็นท่อยาว 1 คู่ เรียกว่า trumpets ใช้เวลาในการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 3-10 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของแหล่งอาศัย ในระยะดักแด้จะไม่กินอาหารรับอากาศจากการหายใจเพียงเท่านั้น

4.) ระยะตัวเต็มวัย (adult) ตัวเต็มวัยของริ้นสกุล *Culicoides* จะมีความยาวลำตัวประมาณ 1-4 มิลลิเมตร สีน้ำตาล หรือสีดำ ออ (thorax) อ้วนใหญ่ หลังนูน ปีกมีจุดดำขาวชัดเจน (head) มีลักษณะกลมรี ตารวมทั้ง 2 ข้างรูปร่างคล้ายไต เพศผู้มีหนวด (antenna) แบบพู่ขนนก (plumose) ส่วนเพศเมียมีหนวดแบบปล้องไฟ (pilose) (ภาพที่ 4) ส่วนท้อง (abdomen) ของเพศเมียสั้นและทู่ ด้านบนส่วนท้องแบนปลาย cerci จะสั้นและกลม พบถุงเก็บอสุจิ (spermathecae) 1-3 คู่ ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ ซึ่งจะมีรูปร่างแตกต่างกัน เช่น ทรงกลม รูปไข่ หรือวงรี ส่วนท้องเพศผู้จะแคบกว่าเพศเมีย ปล้องท้องมีทั้งหมด 9 ปล้อง scleroma ประกอบด้วย แผ่น tergum และ sternum สามารถหมุนได้ 180 องศา ในขณะที่เพศผู้จับคู่ผสมพันธุ์ (ภาพที่ 5) ทั้งสองเพศกินน้ำหวานจากพืชเป็นอาหาร แต่ตัวเมียต้องดูดเลือดของสัตว์หรือมนุษย์เพื่อนำโปรตีนไปพัฒนาไข่ เมื่อดูดเลือดแล้วบางชนิดจะเข้าไปอยู่ในรูหรือโพรงใต้ดิน และพักจนกระทั่งไข่เจริญเต็มที่ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน *Culicoides* หลายชนิดสามารถวางไข่ได้โดยไม่ต้องดูดเลือดก่อน เช่น *C. furens* และ *C. subimmaculatus* แต่ส่วนใหญ่จะต้องดูดเลือดอย่างน้อย 1 ครั้ง เพื่อให้ไข่ในรุ่นต่อไปพัฒนา และเจริญเติบโต เช่น *C. brevitarsis* และ *C. puncticollis*



ภาพที่ 4 หนวดเพชผู้แบบ plumose กำลังขยาย 40 เท่า ข. หนวดเพชเมีย แบบ pilose กำลังขยาย 40 เท่า



ภาพที่ 5 ก. อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ กำลังขยาย 100 เท่า ข. อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย กำลังขยาย 100 เท่า

2.1.3 พฤติกรรมการดูดเลือดของริ้นสกุล *Culicoides*

ริ้นสกุล *Culicoides* ดูดเลือดสัตว์สูงสุดในช่วงเช้า (เวลา 06.00 - 08.00 น.) หลังพระอาทิตย์ขึ้นประมาณ 2-3 ชั่วโมง และช่วงบ่ายที่พระอาทิตย์ใกล้ตก (เวลา 16.00 - 19.00 น.) ริ้น *Culicoides* บางชนิดออกดูดเลือดสัตว์ในเวลากลางวัน เช่น *C. nubeculosus* และ *C. heliophilus* แต่ริ้น *Culicoides* ส่วนใหญ่ จะออกดูดเลือดสัตว์ตอนโพล้เพล้หรือในตอนกลางคืน ช่วงเวลาดังกล่าวจะพบอัตราการกัดสูงเมื่อลมสงบ และอัตราการกัดจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อลมแรงขึ้น บางชนิดดูดเลือดคน บางชนิดดูดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก แม้ว่าหลายสปีชีส์จะดูดเลือดสัตว์ตัวเดียวกัน แต่พบแบบแผนเฉพาะตัวแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ เช่น ในประเทศจาไมกา พบ *C. furens* และ *C. barbosa* ที่ออกดูดเลือดในเวลา และสถานที่เดียวกัน แต่พบว่าตำแหน่งที่ริ้นสปีชีส์เหล่านี้กัดบนตัวสัตว์แตกต่างกัน (Kettle, 1977) ริ้นสกุล *Culicoides* หลายชนิดสามารถวางไข่ได้โดยไม่ต้องกินเลือดก่อน เช่น *C. furens* และ *C. subimmaculatus* แต่ส่วนใหญ่จะต้องดูดเลือดสักครั้งหนึ่ง เพื่อให้ไข่รุ่นที่ 2 และรุ่นต่อ ๆ ไป เจริญเติบโต เช่น *C. brevitarsis* และ *C. puncticollis* (เผด็จ สิริยะเสถียร และ อุษาวดี ถาวรระ, 2556)

2.2 ความสำคัญของร้งสกุล *Culicoides*

ร้งสกุล *Culicoides* หลายสปีชีส์เป็นแมลงศัตรูของปศุสัตว์ รวมถึงเป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคหลายชนิด ทั้ง ไวรัส โปรโตซัว และพยาธิหนอนตัวกลม ซึ่งสามารถถ่ายทอดมาสู่มนุษย์และสัตว์ชนิดอื่น ๆ ตัวอย่างของโรคที่สำคัญที่มีสาเหตุจากเชื้อก่อโรคที่มีร้งสกุล *Culicoides* เป็นพาหะ เช่น โรคไข้เหลือง (Oropouche fever) ในมนุษย์ โรคบลูทังก์ (bluetongue disease) ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง กาฬโรคม้า (African horse sickness) ในม้า และ โรคลิวโคไซโตซูโนซิส (leucocytozoonosis) ในไก่ โรคเท้าช้าง (masonellosis) เป็นต้น (Mullen and Murphree, 2019)

ในประเทศไทยมีรายงานการพบร้งสกุล *Culicoides* มากกว่า 100 สปีชีส์ (Thepparat et al., 2015, Pramual et al., 2021a) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพของร้งสกุล *Culicoides* ในประเทศไทย และมีอย่างน้อย 8 สปีชีส์ มีรายงานการเป็นพาหะของเชื้อก่อโรคในภูมิภาคอื่น ๆ ของโลก ได้แก่ *C. brevitarsis* Kieffer, *C. fulvus* Sen and Das Gupta, *C. imicola* Kieffer, *C. peregrinus* Kieffer, *C. arakawae* (Arakawa), *C. guttifer* Meijere, *C. histrio* Johannsen และ *C. oxystoma* Kieffer (Mullen and Murphree, 2019) ตัวอย่างผลกระทบที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับร้งสกุล *Culicoides* ในประเทศไทย ได้แก่ การระบาดของ African horse sickness (AHS) ที่เกิดในประเทศไทยในช่วงปลายเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 ซึ่งทำให้ม้าตายกว่า 500 ตัว (Castillo-Olivares, 2020; King et al., 2020) การระบาดของ AHS ในประเทศไทยถือเป็นการระบาดครั้งแรกของโรคนี้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเชื่อว่ามีร้ง *C. imicola* เป็นพาหะตามที่มีรายงานในต่างประเทศ

นอกจากจะเป็นพาหะของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคที่สำคัญในปศุสัตว์แล้ว ยังเป็นพาหะของเชื้อ *Haemoproteus* และ *Leucocytozoon* (*Akiba*) *caulleryi* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรค Leucocytozoonosis โดยมีร้ง *Culicoides* อย่างน้อย 4 สปีชีส์ ได้แก่ *C. arakawae*, *C. odibilis*, *C. circumscriptus* และ *C. schultzei* เป็นพาหะ (Santiago-Alarcon et al., 2012b) ประเทศไทยมีรายงานการพบครั้งแรกโดย Campbell (1954) พบว่า *L. caulleryi* และ *L. sarazesi* ติดเชื้อในไก่ ทำให้ไก่เกิดสภาวะโลหิตจาง อูจาระเหลวสีเขียวปนขาว หงอน และเหนียงซีด อัตราการผลิตไข่ลดลง พบอัตราการตายสูงถึง 25% (สมใจ และคณะ, 2518) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความเป็นไปได้ที่ร้งสกุล *Culicoides* อาจเป็นพาหะของเชื้อ *Plasmodium* (Martinez-de la Puaente et al., 2011; Santiago-Alarcon et al., 2012a; Ferraguti et al., 2013)

2.3 การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของร้ง *Culicoides*

องค์ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงพาหะมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อวางแผนในการควบคุมและป้องกันการระบาด

ของโรคที่มีแมลงเหล่านี้เป็นพาหะ (Tabachnick and Black, 1995; McCoy, 2008) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ได้แก่ อัตราและทิศทางของการถ่ายเทยีน (gene flow) สามารถนำไปใช้ในการพิจารณาถึงแนวโน้มและทิศทาง รวมถึงสถานที่ที่อาจเกิดการระบาดของโรค (McCoy, 2008) ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอาจเกี่ยวข้องกับสถานภาพของการเป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเข้ากันได้ระหว่างพาหะและเชื้อก่อโรค (vector-parasite competency) เช่น การศึกษาในยุง *Aedes albopictus* พบว่ามีการแบ่งแยกสายวิวัฒนาการในอดีตที่มีความสัมพันธ์กับความเข้ากันได้ระหว่างยุงชนิดนี้กับเชื้อไวรัส chikungunya (Vega-Rúa et al., 2020) นอกจากนี้ข้อมูลจากการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรยังมีความสำคัญที่ใช้ในการระบุแหล่งต้นตอของการระบาดของโรคได้ (Onyango et al., 2015a, b; Jacquet et al., 2016a, b)

2.4 ไร้น *Culicoides peregrinus* Kieffer

ไร้น *Culicoides peregrinus* Kieffer จัดอยู่ในสกุลย่อย *Hoffmanai* Fox มีรายงานในประเทศออสเตรเลีย ว่าไร้นสปีชีส์นี้มีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อ bluetongue virus (BTV) (Mullen and Murphree, 2019) และประเทศอินเดีย (Ranjan et al., 2017) ไร้น *C. peregrinus* รายงานการพบครั้งแรกจากรัฐโอริสสา ประเทศอินเดีย (Wirth and Hubert, 1989) ปัจจุบันพบแพร่กระจายในหลายประเทศในเอเชีย ได้แก่ ประเทศอินเดีย ศรีลังกา บังกลาเทศ ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น ปาปัวนิวกินี จีน และทุกประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Sen and Gupta, 1959; Wirth and Hubert, 1989; Dyce et al., 2007; Liu et al., 2018) *C. peregrinus* ดูดเลือดจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น มนุษย์ ม้า แพะ แกะ วัว กระบือ สุกร สุนัข และสัตว์ปีก (Wirth and Hubert, 1989; Jomkumsing et al., 2021; Kar et al., 2022b; Sunantaraporn et al., 2022; Kamyinkird et al., 2023) ทำให้ไร้น *C. peregrinus* เป็นสปีชีส์ที่พบได้ทั่วไปทั้งบริเวณภายในและบริเวณรอบ ๆ คอกสัตว์ (Harsha et al., 2020; Fujisawa et al., 2021; Kar et al., 2022a) ไร้นสปีชีส์นี้ยังสามารถเพาะพันธุ์ได้ในแหล่งอาศัยที่หลากหลาย เช่น บริเวณดินที่ชุ่มชื้นตามขอบสระหรือบ่อน้ำ ทางระบายน้ำ ในพื้นที่นาข้าว และบริเวณที่อุดมด้วยอินทรีย์สาร (Wirth and Hubert, 1989; Yanase et al., 2013; Harsha and Mazudar, 2015)

ไร้น *C. peregrinus* มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและทางการแพทย์ เนื่องจากเป็นแมลงศัตรูพืชและแมลงพาหะของเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตามองค์ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของ *C. peregrinus* ยังมีน้อยมาก การศึกษาส่วนใหญ่เป็นเพียงรายงานการศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) ซึ่งมาจากข้อมูลจำนวนตัวอย่างที่จำกัด ทำให้ไม่ครอบคลุมถึงการกระจายทางภูมิศาสตร์ของสปีชีส์ (Harrup et al., 2016; Liu et al., 2018;

Jomkumsing et al., 2021; Gopurenko et al., 2022) ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรมของแมลงพาหะมีความสำคัญในด้านระบาดวิทยาของโรค ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการออกแบบโปรแกรมควบคุมที่มีประสิทธิภาพได้ (Tabachnick and Black, 1995; McCoy, 2008) ตัวอย่างเช่น ระดับของความแตกต่างทางพันธุกรรมสามารถบ่งชี้ได้ถึงอัตราการเคลื่อนย้ายระหว่างประชากรในแต่ละพื้นที่ ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในกระบวนการออกแบบการควบคุมแมลงพาหะ (Tabachnick and Black, 1995) สำหรับสปีชีส์ที่มีการกระจายทางชีวภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวางอย่างรึ้น *C. peregrinus* การทดสอบสถานภาพของสปีชีส์ระหว่างประชากรที่มีระยะห่างทางภูมิศาสตร์จึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเป็นพาหะของเชื้อก่อโรค (vector-pathogen competency) (McCoy, 2008; Powell, 2018)



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและการระบุปีชีส์

เก็บตัวอย่างตัวเต็มวัยของริ้น *C. peregrinus* จากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ บริเวณใกล้กับคอกปศุสัตว์ ทั้งหมด 9 แหล่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (ตารางที่ 1, ภาพที่ 6) โดยใช้สวิงเก็บแมลงในช่วงเวลาประมาณ 16.00 น. ถึง 19.00 น. รักษาสภาพของตัวอย่างในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และเก็บรักษาในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษา ระบุปีชีส์ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาโดยใช้รูปวิธาน คำอธิบาย และภาพประกอบของ Wirth and Hubert (1989) และ Dyce et al. (2007)

3.2 ศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างตัวเต็มวัยของริ้น *C. peregrinus* โดยใช้ GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis Technologies Sdn, Bhd, Malaysia) ด้วยวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นเก็บรักษา

ดีเอ็นเอในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียในส่วนของยีน cytochrome c oxidase I (COI) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ด้วยไพรเมอร์ LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') และ HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer et al., 1994) ในปริมาณรวม 25 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบได้แก่ DI Water 17 ไมโครลิตร Buffer A 2.5 ไมโครลิตร MgCl₂ 1.5 ไมโครลิตร dNTPs 0.8 ไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (10 µM) Taq DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA Template) 1 ไมโครลิตร ใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังนี้ Pre-denaturation 94 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จากนั้นอีก 36 รอบใช้ denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 45 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที Extraction 72 องศาเซลเซียส 1 นาที หลังจากครบจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา ใช้ Final-Extraction 72 องศาเซลเซียส 4 นาที

หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิต (PCR Product) โดยใช้ agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ PureDireX PCR CleanUp & Gel Extraction Kit (BioHelix, Taiwan) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการ ATCG Company Limited (Thailand Science Park (TSP), Pathumthani, Thailand) ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR

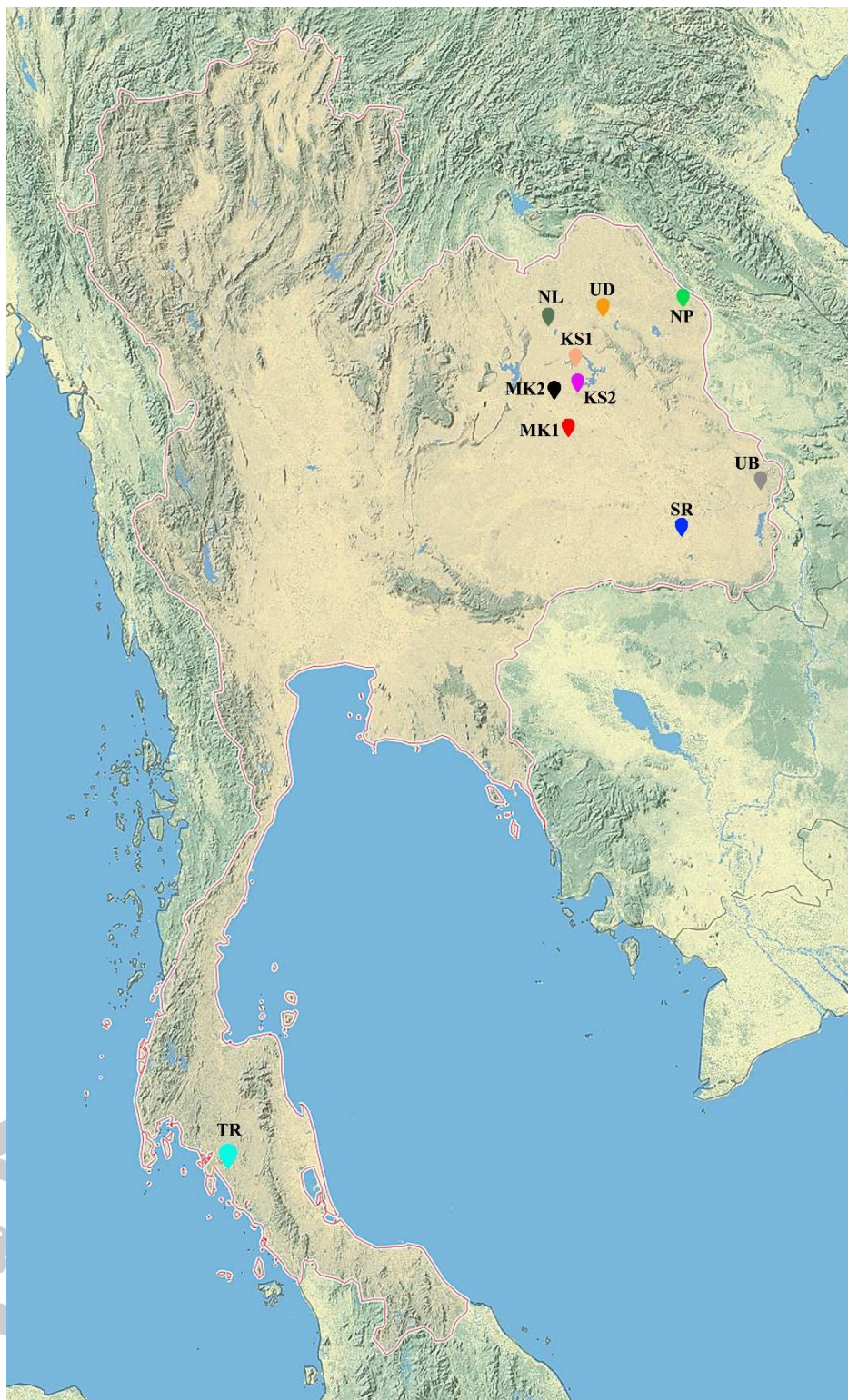
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้ p-distance ด้วยโปรแกรม TaxonDNA (Meier et al., 2006) วิเคราะห์ความหลากหลายของ haplotype และ nucleotide โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ด้วยวิธีการ median-joining (MJ) (Bandelt et al., 1999) โดยใช้โปรแกรม Network ver. 10.2.0.0 (https://www.fluxus-engineering.com/sharenet_rn.htm) ทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรด้วยค่า F_{ST} ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) ทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของค่า F_{ST} โดยวิธี permutation จำนวน 1,023 replications และเพื่อหลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดแบบ type I error เนื่องจากการเปรียบเทียบข้อมูลหลายคู่ จึงใช้ Bonferroni correction เพื่อควบคุมปรับค่านัยสำคัญ (p) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้ค่า F_{ST} และระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (km) ระหว่างแหล่งเก็บตัวอย่างแต่ละแหล่ง (isolation-by-distance (IBD) (Mantel, 1967) วิเคราะห์ค่า IBD โดยใช้โปรแกรม IBD ver 1.52 (Bohonak, 2002) ทดสอบความแตกต่างทางสถิติของ IBD โดยใช้การ 1,000 randomizations



ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างรุ่น *Culicoides peregrinus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

สถานที่เก็บตัวอย่าง	วัน/ เดือน/ปี	พิกัดทาง ภูมิศาสตร์	สปีชีส์	จำนวนตัวอย่าง			รวม	ตัวอย่างใช้ในการ การศึกษา ดีเอ็นเอ
				เพศ เมีย	เพศ ผู้	ตัวอย่าง ที่มีเลือด		
1. บ้านดอนหลี่ ต.สมอ อ.ปรางค์กู่ จ.ศรีสะเกษ (SR)	2 ม.ค. 64	14.83035 N 104.06043 E	<i>C. peregrinus</i>	100	1	1	101	10
	25 ม.ค. 65		<i>C. peregrinus</i>	70	10	65	80	10
2. บ้านห้วยเม็ก ต.ห้วยเม็ก อ.ห้วยเม็ก จ.กาฬสินธุ์ (KS1)	23 ม.ค. 64	16.60528 N 103.22320 E	<i>C. peregrinus</i>	28	0	1	28	20
3. บ้านนาหาด อ.นาइन จ.มหาสารคาม (MK1)	20 ก.พ. 64	15.68681 N 103.23162 E	<i>C. peregrinus</i>	113	21	5	134	20
4. บ้านดอนสวน อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม (MK2)	26 ก.พ. 64	16.25278 N 103.27525 E	<i>C. peregrinus</i>	53	19	8	72	20
5. บ้านหนองตานา ต.โคกใหญ่ อ.โนนสัง จ.หนองบัวลำภู (NL)	27 พ.ย. 64	16.82201 N 102.57699 E	<i>C. peregrinus</i>	7	16	0	23	10
6. บ้านหัวนาคำ อ.ยางตลาด จ.กาฬสินธุ์ (KS2)	19 พ.ย. 63	16.40762 N 103.20411 E	<i>C. peregrinus</i>	149	2	6	151	20
7. บ้านโพธิ์ศรี อ.โพนสวรรค์ จ.นครพนม (NP)	20 พ.ย. 63	17.44680 N 104.46520 E	<i>C. peregrinus</i>	32	4	2	34	20
8. บ้านโคกก่อ อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี (UB)	12 พ.ย. 65	15.31459 N 105.49841 E	<i>C. peregrinus</i>	47	7	7	54	20
9. บ้านหนองหัวหมู อ.เมือง จ.อุดรธานี (UD)	13 ต.ค. 65	17.36152 N 102.75725 E	<i>C. peregrinus</i>	239	4	223	243	10



ภาพที่ 6 สถานที่เก็บตัวอย่างริ้นสกุล *Culicoides peregrinus* ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย สีของสัญลักษณ์ระบุตามพื้นที่เก็บตัวอย่าง

(ที่มา: Mintara and Pramual, 2023)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของริ้น *Culicoides peregrinus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของริ้น *C. peregrinus* ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 160 ตัวอย่าง สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ จำนวน 112 ตัวอย่าง จาก 9 ประชากร และเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีรายงานในภูมิภาคอื่นของประเทศไทย โดยนำตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 3 ตัวอย่าง จากจังหวัดตรังที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank โดย Gopurenko et al. (2022) ร่วมวิเคราะห์ด้วยค่า nucleotide diversity ในแต่ละประชากรมีค่าระหว่าง 0 – 0.0098 และค่าโดยรวมจากทุกตัวอย่าง 0.0082 ค่า haplotype diversity ในแต่ละประชากรมีค่าระหว่าง 0 – 1 โดยมีค่าโดยรวมจากทุกตัวอย่างเป็น 0.9466 (ตารางที่ 2) ค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์วิเคราะห์โดยใช้ค่า p-distance มีค่าระหว่าง 0 – 3.14% และเมื่อนำตัวอย่าง *C. peregrinus* จากประเทศไทยที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 34 ตัวอย่างมาร่วมวิเคราะห์ด้วยพบว่ามีค่าระหว่าง 0 – 3.83%





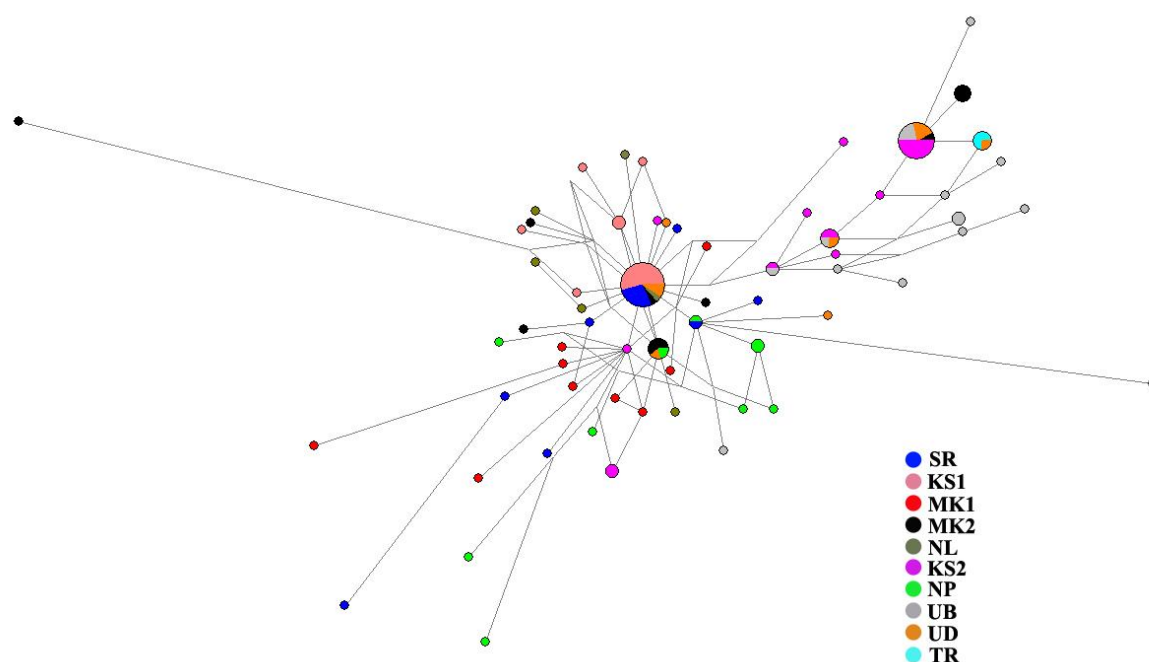
ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างของรีน *C. peregrinus* ที่ใช้ศึกษาในแต่ละแห่ง จำนวน haplotype diversity (h) และค่า nucleotide diversity (π)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	พิกัดทางภูมิศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง (จำนวน haplotype)	$\pi \pm S.E$	$h \pm S.E$
1. บ้านดอนเหลื ด.สมอ อ.ปรางค์กู่ จ.ศรีสะเกษ(SR)	14.83035 N/104.06043 E	13 (8)	0.0085 $\pm$ 0.0050	0.8077 $\pm$ 0.1131
2. บ้านห้วยเม็ก ต.ห้วยเม็ก อ.ห้วยเม็ก จ.กาฬสินธุ์(KS)	16.60528 N/ 103.22320 E	18 (6)	0.0019 $\pm$ 0.0014	0.5621 $\pm$ 0.1342
3. บ้านนาหาด อ.นาइन จ.มหาสารคาม (MK1)	15.68681 N/ 103.23162 E	9 (9)	0.0066 $\pm$ 0.0041	1.0000 $\pm$ 0.0524
4. บ้านดอนสวน อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม (MK2)	16.25278 N/ 103.27525 E	12 (8)	0.0098 $\pm$ 0.0057	0.9091 $\pm$ 0.0649
5. บ้านหนองตามา ต.โคกใหญ่ อ.โนนสัง จ.หนองบัวลำภู (NL)	16.82201 N/ 102.57699 E	6 (6)	0.0047 $\pm$ 0.0034	1.0000 $\pm$ 0.0962
6. บ้านหัวนาคำ ต.หัวนาคำ อ.ยางตลาด จ.กาฬสินธุ์ (KS2)	16.40762 N/ 103.20411 E	18 (10)	0.0063 $\pm$ 0.0037	0.8497 $\pm$ 0.0775
7. บ้านโพธิ์ศรี อ.โพธิ์สุวรรณ จ.นครพนม (NP)	17.44680 N/ 104.46520 E	10 (9)	0.0200 $\pm$ 0.011	0.9778 $\pm$ 0.0540
8. บ้านโคกก่อ อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี (UB)	15.31459 N/ 105.49841 E	16 (13)	0.0084 $\pm$ 0.0048	0.9667 $\pm$ 0.0357
9. บ้านหนองหัวหมู อ.เมือง จ.อุดรธานี (UD)	17.36152 N/ 102.75725 E	10 (7)	0.0068 $\pm$ 0.0042	0.9111 $\pm$ 0.0773
10. จ. ตรัง (TR)*	7.28807 N/ 99.3378 E*	3 (1)*	0	0
รวม		115 (64)	0.0082 $\pm$ 0.0044	0.9466 $\pm$ 0.0138

*ข้อมูลจาก Gopurenko et al. (2022)

4.2 โครงสร้างทางพันธุกรรมและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยใช้ค่า F_{ST} พบว่าประชากร 32 จาก 45 คู่เปรียบเทียบ หรือร้อยละ 71 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางทางภูมิศาสตร์กับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($R^2 = 0.252$, $P = 0.084$) การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์สำหรับตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้พบว่า haplotypes ที่มาจากประชากรเดียวกันส่วนใหญ่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรอื่น ๆ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ของ *Culicoides peregrinus* ในประเทศไทย สร้างด้วยวิธี median-joining จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จำนวน 191 ตัวอย่าง (112 จากการศึกษานี้และ 79 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล BOLDs และ GenBank) สีของแฮปโลไทป์ระบุตามประเทศต้นกำเนิดของตัวอย่าง

(ที่มา: Mintara and Pramual, 2023)

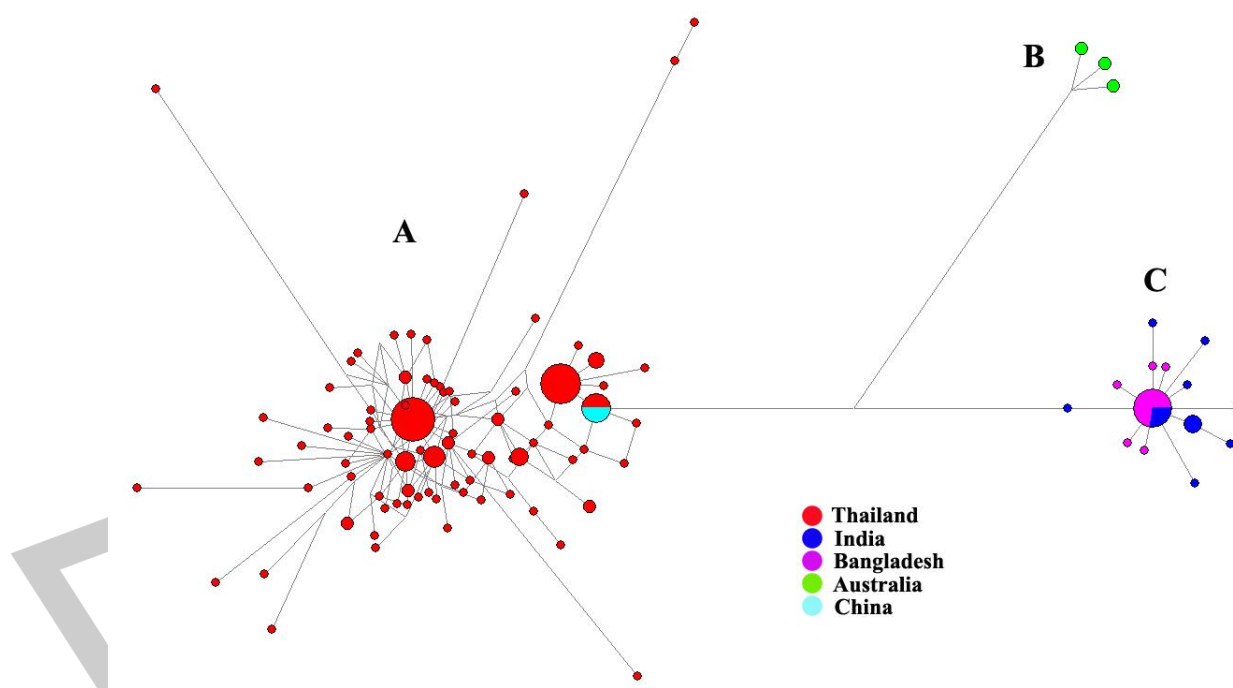
ตารางที่ 3 ค่า pairwise FST ระหว่าง 10 ประชากร ของ *C. peregrinus* ในการศึกษาครั้งนี้

	SR	KS1	MK1	MK2	NL	KS2	NP	UB	UD	TR
SR										
KS1	0.08472									
MK1	0.16539	0.36470								
MK2	0.13525	0.20072	0.23096							
NL	0.07576	0.13991	0.23445	0.09923						
KS2	0.35899	0.44416	0.39091	0.09777	0.35503					
NP	0.11227	0.28477	0.14857	0.18794	0.17016	0.37281				
UB	0.36576	0.47122	0.41449	0.1779	0.36474	0.08434	0.30978			
UD	0.23869	0.34084	0.33406	0.00078	0.22682	-0.00259	0.25978	0.06262		
TR	0.70778	0.85877	0.68557	0.31396	0.75177	0.30466	0.58066	0.11713	0.31494	

หมายเหตุ: ตัวหนาหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหลังปรับค่า p-value ด้วย Bonferroni correction.

4.3 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่าง *Culicoides peregrinus* ในประเทศไทยกับภูมิภาคอื่นของโลก

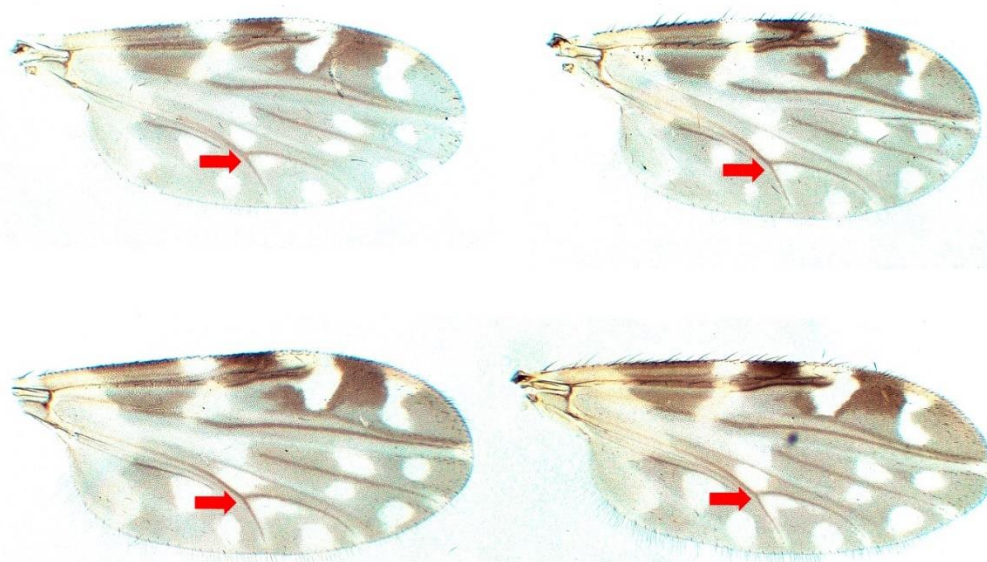
ความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างจากประเทศไทยกับตัวอย่างจากประเทศอื่นที่รายงานในฐานข้อมูลพันธุกรรม ได้แก่ อินเดีย บังกลาเทศ จีน และออสเตรเลีย พบว่ามีความแปรผันสูง มีค่า p-distance สูงสุด 5.40% โดยค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงสุดพบระหว่างตัวอย่างจากประเทศไทยเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากประเทศออสเตรเลีย การวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการภายใน สปีชีส์ด้วย MJ network ในการศึกษาพบว่าตัวอย่างของ *C. peregrinus* แยกเป็น 3 สายวิวัฒนาการ ประกอบด้วยสาย A, B และ C (ภาพที่ 8) ซึ่งสายวิวัฒนาการนี้สอดคล้องกับประเทศแหล่งที่มาของตัวอย่าง โดยสายวิวัฒนาการ A เป็นตัวอย่างจากประเทศไทยและจีน สายวิวัฒนาการ B เป็นตัวอย่างจากประเทศออสเตรเลีย และสายวิวัฒนาการ C เป็นตัวอย่างจากประเทศอินเดียและบังคลาเทศ สายวิวัฒนาการ A มีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมจากสายวิวัฒนาการ B ระหว่าง 2.44% - 5.40% และแตกต่างจากสายวิวัฒนาการ C ระหว่าง 1.22% - 4.18% สายวิวัฒนาการ B แตกต่างจากสายวิวัฒนาการ C ระหว่าง 1.57% - 2.26%



ภาพที่ 8 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ของ *Culicoides peregrinus* ในประเทศไทย จีน อินเดีย บังกลาเทศ และออสเตรเลีย สร้างด้วยวิธี median-joining จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จำนวน 191 ตัวอย่าง (112 จากการศึกษาและ 79 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล BOLDs และ GenBank) สีของแฉกโพลโทระบุตามประเทศต้นกำเนิดของตัวอย่าง

(ที่มา: Mintara and Pramual, 2023)

การตรวจสอบลักษณะแบบแผน wing patterns พบว่ามีความแปรผันของลักษณะจุดบนปีกของ *C. peregrinus* จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีลักษณะแปรผันมีบริเวณจุดสีจาง (pale spot) ขนาดใหญ่กว่าและมีลักษณะจุดสีจางบริเวณ mediocubital fork ทอดยาวตามแนวเส้น viens M3+4 และ Cu1 จนถึงขอบปีก (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ภาพถ่ายปีกขวาของ *Culicoides peregrinus* เพศเมียที่ใช้ในการศึกษา ลูกศรแสดงตำแหน่งของจุดสีจางที่มีความแปรผัน

(ที่มา: Mintara and Pramual, 2023)

4.4 การตรวจสอบชนิดของสัตว์ที่รบกวน *Culicoides peregrinus* ดูดเลือด

การตรวจสอบชนิดของสัตว์ที่รบกวน *C. peregrinus* ดูดเลือดโดยใช้วิธีพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cyt b ทำการศึกษาตัวอย่างที่มีเลือดจำนวน 44 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้นที่สามารถวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นของสัตว์มีกระดูกสันหลังได้ จากการเปรียบเทียบพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับของควาย (*Bubalus bubalis*) มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 99.32

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการศึกษา

ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ของ *C. peregrinus* ในประเทศไทย จำนวน 112 ตัวอย่าง จาก 9 ประชากร เปรียบเทียบกับตัวอย่างจากประเทศไทยที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 34 ตัวอย่างมีค่ามากกว่า 3% เป็นค่าที่มีความแตกต่างค่อนข้างมากสำหรับรื้อสกุล *Culicoides* ซึ่งอาจบ่งชี้ว่าภายในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามีความหลากหลายซ่อนเร้นมากกว่า 1 สปีชีส์ (Gopurenko et al., 2015) โดยพบว่ามี 3 haplotypes ที่มีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ ค่อนข้างมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นตัวอย่างที่เป็นสปีชีส์อื่นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *C. peregrinus* ทั้งนี้เมื่อตัดตัวอย่าง 3 haplotypes นี้ออก พบว่ามีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์สูงสุด 2.44% ซึ่งใกล้เคียงกับ *C. peregrinus* ที่รายงานจากประเทศอินเดีย (2%) (Harrup et al., 2016)

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยใช้ค่า F_{ST} และระยะห่างทางภูมิศาสตร์พบว่าประชากรส่วนใหญ่ 32 จาก 45 คู่เปรียบเทียบ หรือร้อยละ 71 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมในรื้อสกุล *Culicoides* ส่วนใหญ่ที่พบว่าประชากรที่มีระยะห่างทางภูมิศาสตร์ต่างกันไม่มาก จะไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

(Calvo et al., 2009; Onyango et al., 2015a, b; Jacquet et al., 2016a, b; Mignotte et al., 2021) การศึกษาในประเทศไทยทำการศึกษาในรื้อ *C. mahasarakhamense* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่พบได้ทั่วไปและมีจำนวนมาก มีการกระจายทางภูมิศาสตร์ร่วมกันกับ *C. peregrinus* พบความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับต่ำเช่นกัน (Pramual et al., 2022)

การตรวจสอบพบความแตกต่างทางพันธุกรรมในหลายประชากรของ *C. peregrinus* ในประเทศไทย อย่างมีนัยสำคัญบ่งชี้ว่าการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากรน้อยหรือไม่เกิดขึ้นเลย ซึ่งแย้งกับการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่พบได้ทั่วไปและมักพบเป็นจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์อื่น ๆ ที่สามารถพบได้ในบางพื้นที่เท่านั้น (Harsha et al., 2020; Fujisawa et al., 2021; Kar et al., 2022a) ทั้งนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางภูมิศาสตร์กับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($R^2 = 0.252$, $P = 0.084$) ดังนั้นระยะห่างทางภูมิศาสตร์จึงไม่ใช่ปัจจัยที่อธิบายเรื่องการถ่ายเทยีนระหว่างประชากรที่มีจำกัดได้ ปัจจัยที่อาจเป็นเหตุผลในการอธิบายระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ของ *C. peregrinus* ในประเทศไทยอาจเป็นผลจากการอพยพระหว่างประชากรต่ำ ทั้งนี้การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสปีชีส์สำหรับตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้พบว่า haplotypes ส่วนใหญ่ที่มาจากประชากรเดียวกันมีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรอื่น ซึ่งจำนวน haplotype ที่พบ 64 haplotypes ในการศึกษาครั้งนี้ มีเพียง 6 haplotypes เท่านั้นที่พบร่วมกันอย่างน้อย 2 ประชากร สอดคล้องกับค่า nucleotide diversity ในประชากรที่มีค่าต่ำ สาเหตุที่ *C. peregrinus* ไม่มีการอพยพระหว่างประชากรหรืออพยพระหว่างประชากรน้อยมากอาจเป็นผลจากความสามารถในการปรับตัวเพื่อใช้แหล่งอาศัยในระยะตัวอ่อนที่หลากหลาย โดยที่ *C. peregrinus* สามารถอาศัยในพื้นที่ชื้นแฉะทั่วไป เช่น ขอบของหนองน้ำ บ่อน้ำ ลำธาร ในทุ่งนาที่มีน้ำขัง หรือแม้กระทั่งเศษอินทรีย์วัตถุที่เน่าเปื่อยและมีความชื้น (Wirth and Hubert, 1989; Yanase et al., 2013; Harsha and Mazuda, 2015) นอกจากนี้ *C. peregrinus* ยังดูดเลือดสัตว์หลากหลายชนิด ได้แก่ มนุษย์ สุนัข โค กระบือ สุกร ม้า แพะ แกะ รวมถึงสัตว์ปีก (Wirth and Hubert, 1989; Jomkumsing et al., 2021; Kar et al., 2022b; Sunantaraporn et al., 2022; Kamyinkird et al., 2023) ปัจจัยเหล่านี้ส่งเสริมให้ *Culicoides peregrinus* สามารถเจริญพัฒนาครบวงจรชีวิตภายในแหล่งอาศัยเดียวได้โดยไม่ต้องอพยพไปยังแหล่งอาศัยอื่นๆ เพื่อหาแหล่งอาหารหรือแหล่งเพาะพันธุ์ ซึ่งส่งผลให้การถ่ายเทยีนระหว่างประชากรต่ำทำให้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสูง ความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างจากประเทศไทยกับตัวอย่างจากประเทศอื่น ๆ ได้แก่ อินเดีย บังกลาเทศ จีน และออสเตรเลีย ที่รายงานในฐานข้อมูลสากลพบที่มีความแปรผันสูง โดยมีค่า p-distance สูงสุด 5.40% โดยค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงสุดพบระหว่างตัวอย่างจากประเทศไทยเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากประเทศออสเตรเลีย มีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมที่พบมีค่าต่ำกว่าที่รายงานในฐานข้อมูล BOLDs สำหรับ BIN AAJ7131 ซึ่งเป็น Barcode Index Number เพียงอันเดียวของ *C. peregrinus* ซึ่งมีตัวอย่างใน BIN จำนวน 160 ตัวอย่างจากอินเดีย บังกลาเทศ จีน ญี่ปุ่น อินโดนีเซียติมอร์-เลสเต มาเลเซีย สิงคโปร์ ปากีสถาน และไทย โดยมีค่า p-distance สูงสุด 6.25% สาเหตุที่ระดับค่า p-distance ในการศึกษานี้ต่ำกว่าที่รายงานใน BOLDs เนื่องจากตัวอย่างบางส่วนที่อยู่ใน BIN: AAJ7131 ยังไม่เปิดเป็นสาธารณะทำให้ไม่สามารถนำมารวมในการวิเคราะห์ได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าระดับความแปรผันทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการภายในสปีชีส์ด้วย MJ network ในการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างของ *C. peregrinus* แยกเป็น 3 สายวิวัฒนาการประกอบด้วยสาย A, B และ C ซึ่งสายวิวัฒนาการนี้สอดคล้องกับประเทศแหล่งที่มาของตัวอย่าง โดยสายวิวัฒนาการ A เป็นตัวอย่างจากประเทศไทยและจีน สายวิวัฒนาการ B เป็นตัวอย่างจากประเทศออสเตรเลีย และสายวิวัฒนาการ C เป็นตัวอย่างจากประเทศอินเดียและบังกลาเทศ สายวิวัฒนาการ A มีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมจากสายวิวัฒนาการ B ระหว่าง 2.44% - 5.40% และแตกต่าง

จากสายวิวัฒนาการ C ระหว่าง 1.22% - 4.18% สายวิวัฒนาการ B แตกต่างจากสายวิวัฒนาการ C ระหว่าง 1.57% - 2.26%

เนื่องจาก *C. peregrinus* รายงานการพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย (Wirth and Hubert, 1989) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงว่าตัวอย่างจากประเทศอินเดียในสายวิวัฒนาการ C เป็น *C. peregrinus* ที่แท้จริง ตัวอย่างในสายวิวัฒนาการ A และ B ที่พบในประเทศไทยและจีน และออสเตรเลีย ตามลำดับ อาจเป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกันแต่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน หรือระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายวิวัฒนาการนี้อาจเป็นความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ (Gopurenko et al., 2015) เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าวจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ ร่วมกับการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา ทั้งนี้ Wirth and Hubert (1989) ได้รายงานความแปรผันของลักษณะจุดบนปีกของ *C. peregrinus* จากจังหวัดชลบุรี ว่ามีบริเวณจุดสีจาง (pale spot) ขนาดใหญ่กว่าและมีลักษณะจุดสีจางบริเวณ mediocubital fork ทอดยาวตามแนวเส้น viens M3+4 และ Cu1 จนถึงขอบปีก ซึ่งลักษณะดังกล่าวไม่พบในคำอธิบายลักษณะของ *C. peregrinus* จากอินเดีย จากการตรวจสอบตัวอย่างของ *C. peregrinus* จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีลักษณะแปรผันเช่นเดียวกับที่ Wirth and Hubert (1989) อธิบายไว้ในตัวอย่างจากชลบุรี นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบลักษณะปีกของตัวอย่างจากประเทศจีนที่รายงานโดย Liu et al. (2018) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession nos. KY433456 – 59) ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลครั้งนี้ พบว่ามีลักษณะความแปรผันดังกล่าวเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่พบว่าตัวอย่างจากประเทศไทยและประเทศจีนจัดอยู่ในสายวิวัฒนาการเดียวกัน เมื่อตรวจสอบลักษณะปีกของ *C. peregrinus* จากประเทศออสเตรเลียที่รายงานโดย Dyce et al. (2007) ไม่พบว่ามีลักษณะแปรผันดังกล่าว จากความแตกต่างทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI รวมถึงลักษณะแปรผันของแถบสีบนปีกจึงตั้งสมมติฐานว่าตัวอย่าง *C. peregrinus* ในประเทศไทยและประเทศจีนอาจเป็นสปีชีส์อื่น ซึ่งสามารถตรวจสอบสมมติฐานนี้ได้โดยการศึกษาด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมจากยีนอื่น ๆ เพิ่มเติม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากยีนที่อยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Gopurenko et al., 2015)

5.2 สรุปผลการศึกษา

การศึกษาความแปรผันและโครงสร้างทางพันธุกรรมของรุ่น *C. peregrinus* พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในสปีชีส์อื่น ๆ การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่าส่วนใหญ่ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ บ่งชี้ว่ามีการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากรต่ำ การเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับประชากรจากประเทศอื่น ๆ พบว่า *C. peregrinus* ที่ แยกเป็น 3 สายวิวัฒนาการ

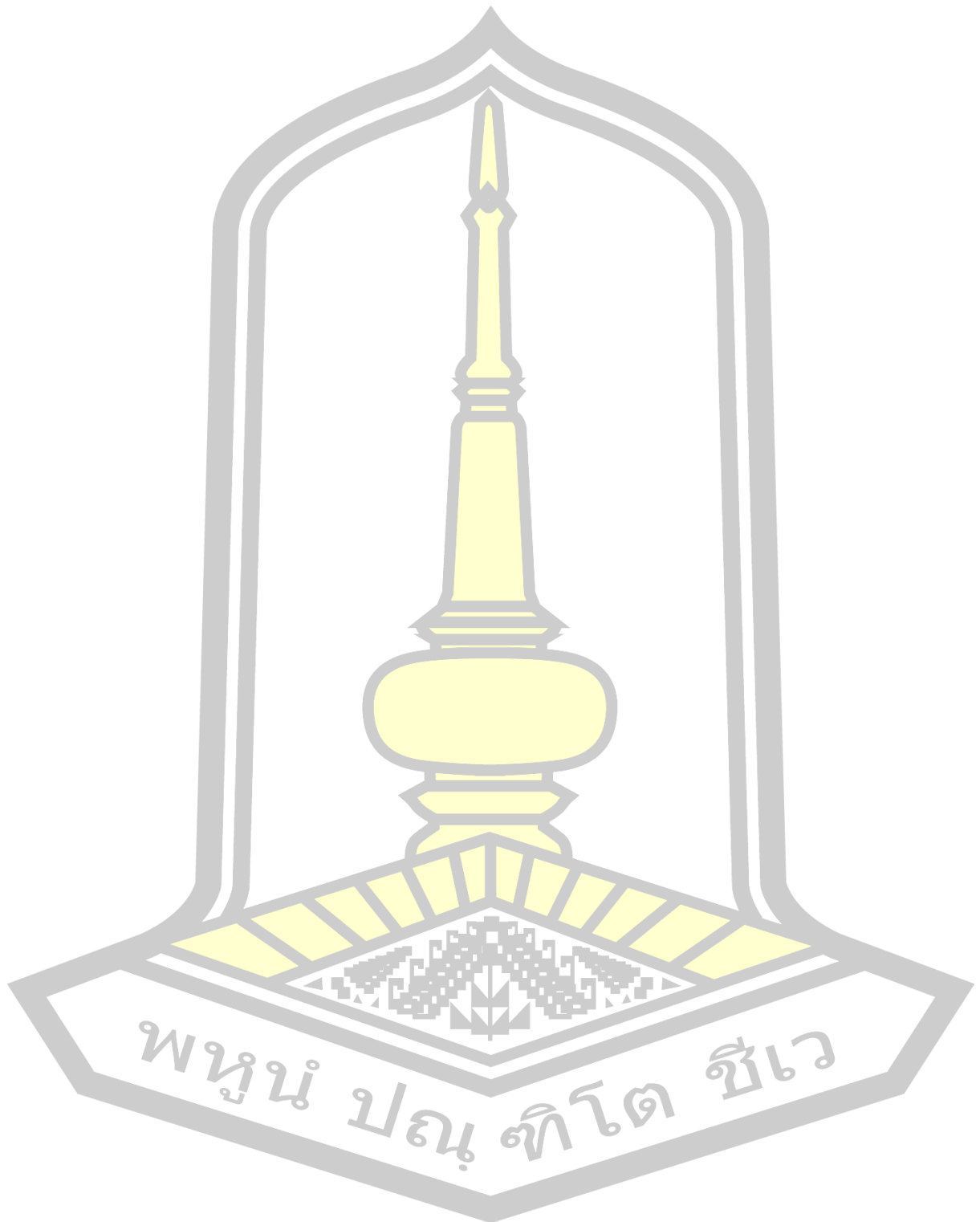
ได้แก่ สายวิวัฒนาการ A จากประเทศไทยและจีน สายวิวัฒนาการ B จากประเทศออสเตรเลีย และสายวิวัฒนาการ C จากประเทศอินเดียและบังคลาเทศ ความแตกต่างทางพันธุกรรมและการแบ่งแยกสายวิวัฒนาการนี้สอดคล้องกับความแปรผันของลักษณะลายแถบบนปีก การระบุแหล่งที่มาของเลือดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cyt b* พบว่าเป็นเลือดของควาย (*Bubalus bubalis*) มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 99.32

5.3 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมจากยีนอื่น ๆ ที่อยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอจะช่วยให้สามารถอธิบายสถานะทางอนุกรมวิธานของสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกันนี้ได้



บรรณานุกรม



- เผด็จ สิริยะเสถียร และ อุษาวดี ถาวรระ. “ร้น (Midges),” การควบคุมแมลงทางการแพทย์, อุษาวดี ถาวรระ, บรรณาธิการ (กรุงเทพฯ: บริษัท หนังสือดีวัน จำกัด, 2556), 17-27
- สมใจ ศรีหาทิม, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และปรีชา คล้ายนิล. (2518). การศึกษาพยาธิวิทยาของโรค ลิวโคไซโตซูโนซิสในไก่. *เวชศาสตร์สัตวแพทย์*, 5(30), 746-760.
- อรุณรัตน์ เทพรรัตน์, Tastsu Tsurishi, และชิตาภา เกตวัลท์. (2555). ความหลากหลายและความชุก ของร้น *Culicoides* spp. ในจังหวัดสระแก้ว. *วารสารวิจัยรามคำแหง*, 15(1), 96-111.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16(1)**: 37-48.
- Bohonak, A.J. (2002). IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity* **93(2)**: 153-154.
- Borkent, A. R. T., & Dominiak, P. (2020). Catalog of the biting midges of the world (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 4787(1), 1-377.
- Campbell, J. G. (1954). Bangkok haemorrhagic disease of chickens: An unusual condition associated with an organism of uncertain taxonomy. *The Journal of pathology and bacteriology*, 68(2), 423-429.
- Castillo-Olivares, Javier (2021) African horse sickness in Thailand: Challenges of controlling an outbreak by vaccination. *Equine Veterinary Journal*, 53, 9–14.
- Dyce, A. L., Bellis, G. A., & Muller, M. J. (2007). *Pictorial atlas of Australasian culicoides wings (diptera: ceratopogonidae)*. Australian Biological Resources Study.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10(3)**: 564-567.
- Ferraguti, M., Martínez-de la Puente, J., Ruiz, S., Soriguer, R., Figuerola, J. (2013) On the study of the transmission networks of blood parasites from SW Spain: diversity of avian haemosporidians in the biting midge *Culicoides circumscriptus* and wild birds. *Parasite & Vectors*, 6, 1–7.

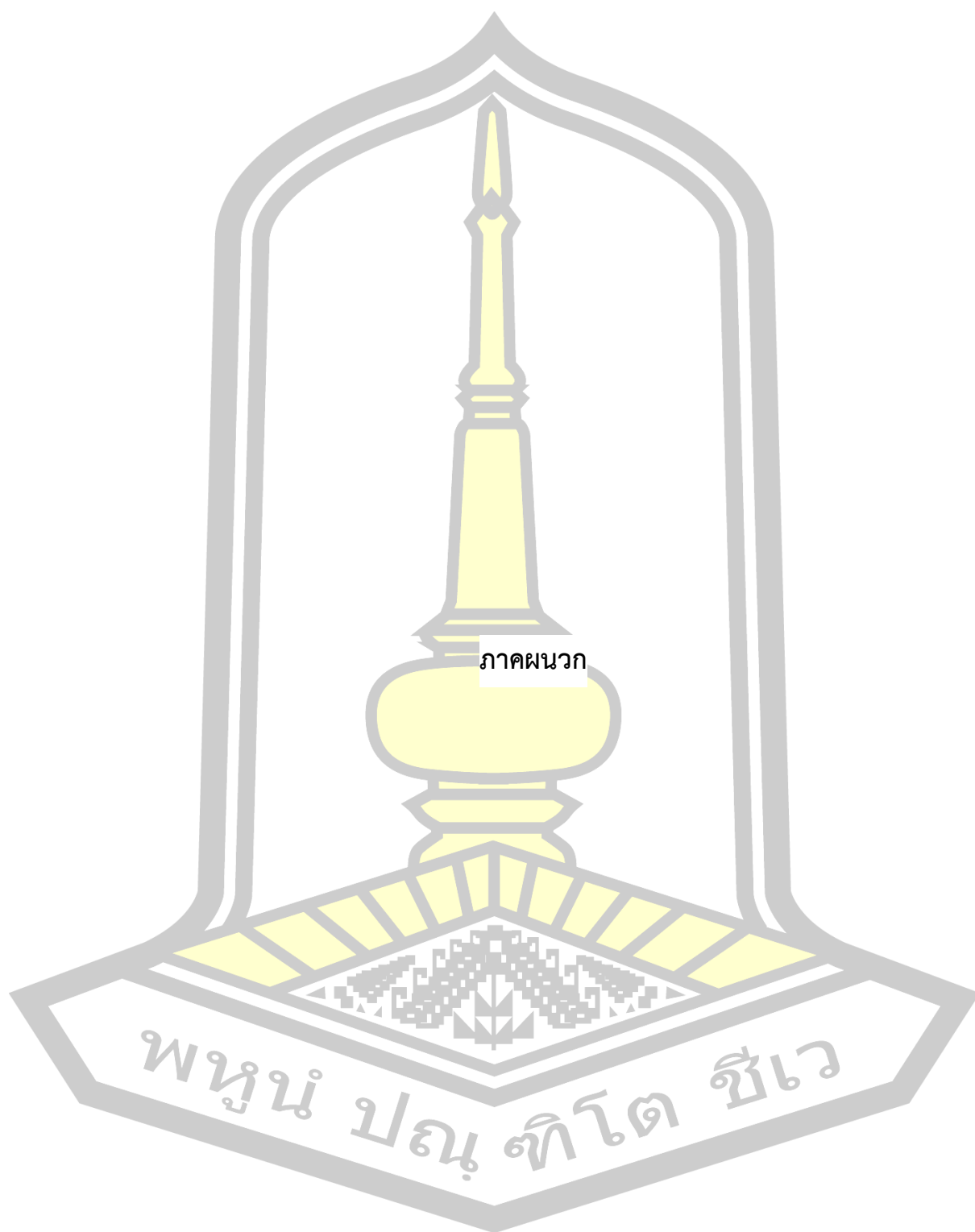
- Folmer, R. H. A., Nilges, M., Folkers, P. J. M., Konings, R. N. H., & Hilbers, C. W. (1994). A model of the complex between single-stranded DNA and the single-stranded DNA binding protein encoded by gene V of filamentous bacteriophage M13. *Journal of molecular biology*, 240(4), 341-357.
- Frézal, L., & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736.
- Fujisawa, Y., Homat, T., Thepparat, A., Changbunjong, T., Sutummaporn, K., Kornmatitsuk, S. & Kornmatitsuk, B. (2021). DNA barcode identification and molecular detection of bluetongue virus in *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from western Thailand. *Acta Tropica* **224**: 106147.
- Gopurenko, D., Bellis, G., Pengsakul, T., Siriyasatien, P. & Thepparat, A. (2022). DNA barcoding of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Thailand reveals taxonomic inconsistencies and novel diversity among reported sequences. *Journal of Medical Entomology* **59(6)**: 1960-1970.
- Harrup, L. E., Bellis, G. A., Balenghien, T. & Garros, C. (2015). *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions. *Infection, Genetics and Evolution* 30: 249-266.
- Harrup, L.E., Laban, S., Purse, B.V., Reddy, Y.K., Reddy, Y.N., Byregowda, S.M., Kumar, N., Purushotham, K.M., Kowalli, S., Prasad, M. & Prasad, G. (2016). DNA barcoding and surveillance sampling strategies for *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern India. *Parasites & Vectors* **9**: 461.
- Harsha, R., & Mazumdar, A. (2015). Laboratory rearing of immature *Culicoides peregrinus* Kieffer, a potential vector of bluetongue virus. *Medical and Veterinary Entomology* **29(4)**: 434-438.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

- Jacquet, S., Huber, K., Guis, H., Setier-Rio, M.L., Goffredo, M., Allène, X., Rakotoarivony, I., Chevillon, C., Bouyer, J., Baldet, T. & Balenghien, T. (2016). Spatio-temporal genetic variation of the biting midge vector species *Culicoides imicola* (Ceratopogonidae) Kieffer in France. *Parasites & Vectors* **9**(1): 141.
- Jacquet, S., Huber, K., Pagès, N., Talavera, S., Burgin, L.E., Carpenter, S., Sanders, C., Dicko, A.H., Djerbal, M., Goffredo, M. & Lhor, Y. (2016). Range expansion of the Bluetongue vector, *Culicoides imicola*, in continental France likely due to rare wind-transport events. *Scientific Reports* **6**: 27247.
- Jomkumsing, P., Surapinit, A., Saengpara, T., & Pramual, P. (2021). Genetic variation, DNA barcoding and blood meal identification of *Culicoides* Latreille biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Thailand. *Acta Tropica*, **217**, 105866.
- Kamyngkird, K., Choocherd, S., Chimnoi, W., Klinkaew, N., Kengradomkij, C., Phoosangwalthong, P., Thammasonthijarearn, N., Pattanatanang, K., Inpankaew, T., Phasuk, J. & Nimsuphan, B. (2023). Molecular identification of *Culicoides* species and host preference blood meal in the African horse sickness outbreak-affected area in Hua Hin district, Prachuap Khiri Khan province, Thailand. *Insects* **14**(4): 369.
- Kar, S., Mondal, B., Ghosh, J., Mazumdar, S. M., & Mazumdar, A. (2022a). Host preference of bluetongue virus vectors, *Culicoides* species associated with livestock in West Bengal, India: Potential relevance on bluetongue epidemiology. *Acta Tropica* **235**: 106648.
- Kar, S., Mondal, B., Pal, A., Harsha, R. & Mazumdar, A. (2022b). Blood meal analysis of *Culicoides* species associated with livestock in West Bengal, India. *Medical and Veterinary Entomology* **36**(4): 503-510.
- Kettle, D. S. (1977). Biology and bionomics of bloodsucking ceratopogonids. *Annual Review of Entomology*, **22**(1), 33-51.
- King, S., Rajko-Nenow, P., Ashby, M., Frost, L., Carpenter, S., & Batten, C. (2020). Outbreak of African horse sickness in Thailand, 2020. *Transboundary and Emerging Diseases*, **67**(5), 1764-1767.

- Liu, Y., Tao, H., Yu, Y., Yue, L., Xia, W., Zheng, W., ... & Chen, H. (2018). Molecular differentiation and species composition of genus *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in different habitats in southern China. *Veterinary parasitology*, 254, 49-57.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Martínez de la Puente J., Martínez J., Rivero-de Aguilar J., Herrero J., Merino S. (2011) On the specificity of avian blood parasites: revealing specific and generalist relationships between haemosporidians and biting midges. *Molecular Ecology*, 20, 3275–3287.
- McCoy, K. D. (2008). The population genetic structure of vectors and our understanding of disease epidemiology. *Parasite* 15(3): 444-448.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. & Ng, P.K. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55(5): 715-728.
- Mullen, G. R., & Murphree, C. S. (2019). Biting midges (Ceratopogonidae). In *Medical and veterinary entomology* (pp. 213-236). Academic Press.
- Onyango, M.G., Beebe, N.W., Gopurenko, D., Bellis, G., Nicholas, A., Ogugo, M., Djikeng, A., Kemp, S., Walker, P.J. & Duchemin, J.B. (2015a). Assessment of population genetic structure in the arbovirus vector midge, *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae), using multi-locus DNA microsatellites. *Veterinary Research* 46: 108.
- Onyango, M.G., Michuki, G.N., Ogugo, M., Venter, G.J., Miranda, M.A., Elissa, N., Djikeng, A., Kemp, S., Walker, P.J. & Duchemin, J.B. (2015b). Delineation of the population genetic structure of *Culicoides imicola* in East and South Africa. *Parasites & Vectors* 8: 660.
- Powell, J. R. (2018). Genetic variation in insect vectors: death of typology?. *Insects* 9(4): 139.

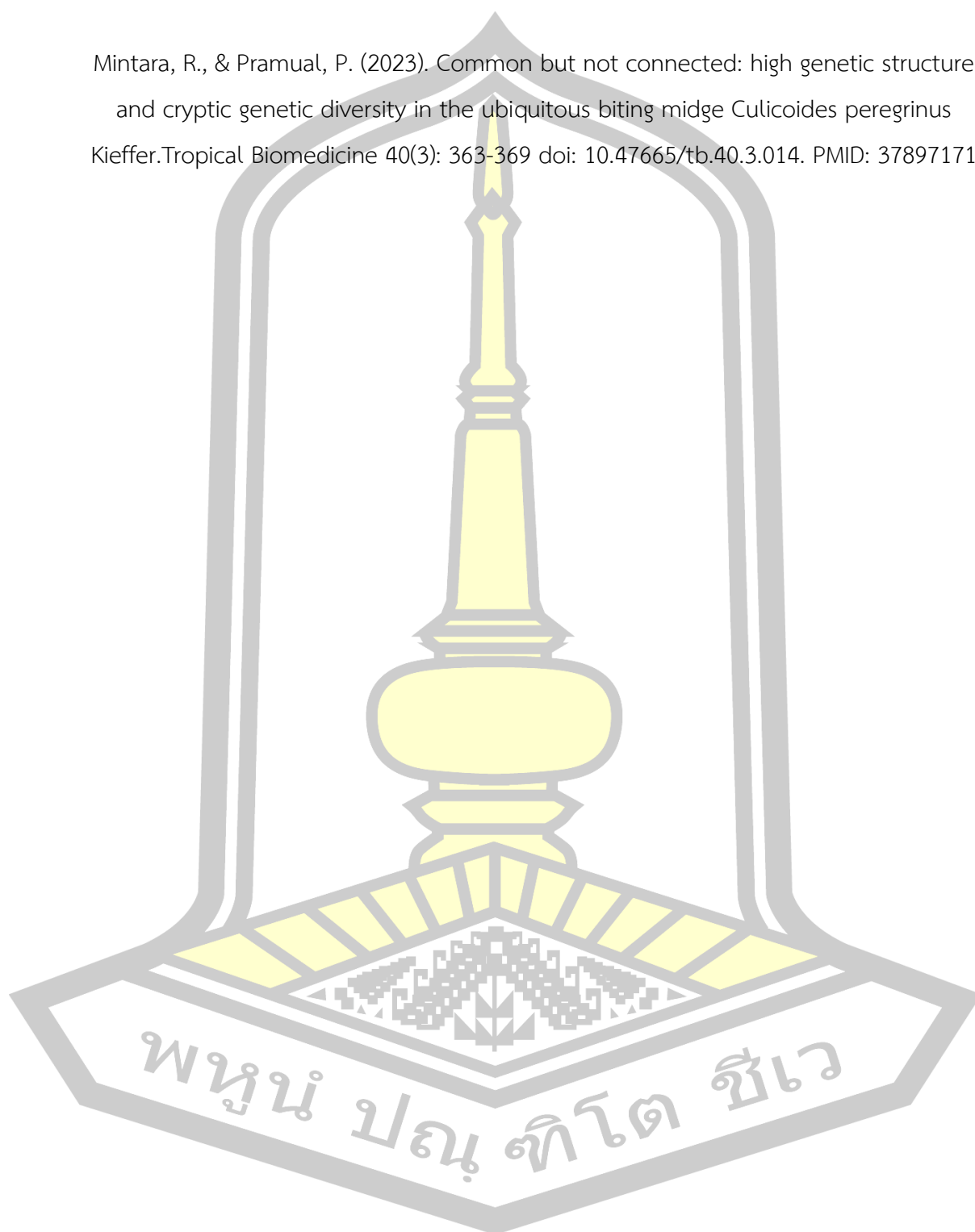
- Pramual, P., Jomkumsing, P., Jumpato, W. & Bunauea, S. (2021a). Molecular detection of avian haemosporidian parasites in biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Thailand. *Acta Tropica*, **224**: 106118.
- Pramual, P., Jomkumsing, P., Piraonapicha, K. & Jumpato, W. (2021b). Integrative taxonomy uncovers a new *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midge species from Thailand. *Acta Tropica* **220**: 105941.
- Ranjan, K., Prasad, M., Brar, B., & Prasad, G. (2017). First report of isolation of bluetongue virus 23 from *Culicoides peregrinus* vector from India. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, *38*(1), 16-21.
- Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Schaefer, H. M., Segelbacher, G. (2012a) Blood meal analysis reveals avian *Plasmodium* infections and broad host preferences of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors. *PLoS One*, *7*, e31098.
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., Schaefer, H. M. (2012b) Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews*, *87*, 928–964.
- Schwenkenbecher, J. M., Mordue, A. J., & Piernney, S. B. (2009). Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. *Bulletin of entomological research*, *99*(4), 371-375.
- Sen, P., & Gupta, S. D. (1959). Studies on Indian *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*, *52*(5), 617-630.
- Songumpai, N., Promrangsee, C., Noopetch, P., Siriyasatien, P. & Preativatanyou, K. (2022). First evidence of co-circulation of emerging *Leishmania martiniquensis*, *Leishmania orientalis*, and *Crithidia* sp. in *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), the putative vectors for autochthonous transmission in Southern Thailand. *Tropical Medicine and Infectious Disease* **7**(11): 379.

- Sunantaraporn, S., Hortiwakul, T., Kraivichian, K., Siriyasatien, P., & Brownell, N. (2022). Molecular identification of host blood meals and detection of blood parasites in *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) collected from Phatthalung Province, Southern Thailand. *Insects* **13**(10): 912.
- Sunantaraporn, S., Thepparat, A., Phumee, A., Sor-Suwan, S., Boonserm, R., Bellis, G., & Siriyasatien, P. (2021). *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors for *Leishmania martiniquensis* and *Trypanosoma* sp. in northern Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **15**(12): e0010014.
- Tabachnick, W.J. & Black IV, W. (1995). Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. *Parasitology Today* **11**(1): 27-30.
- Thepparat, A., Bellis, G., Ketavan, C., Ruangsittichai, J., Sumruayphol, S., & Apiwathnasorn, C. (2015). Ten species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) newly recorded from Thailand. *Zootaxa*, 4033(1), 48-56.
- Vega-Rúa, A., Marconcini, M., Madec, Y., Manni, M., Carraretto, D., Gomulski, L. M., ... & Malacrida, A. R. (2020). Vector competence of *Aedes albopictus* populations for chikungunya virus is shaped by their demographic history. *Communications biology*, 3(1), 326.
- Wirth, W. W., & Hubert, A. A. (1989). *The Culicoides of Southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae)* (Vol. 44, pp. 1-508). American Entomological Institute.
- Yanase, T., Matsumoto, Y., Matsumori, Y., Aizawa, M., Hirata, M., Kato, T., ... & Noda, H. (2013). Molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the southern part of Japan. *Journal of medical entomology*, 50(5), 1105-1110.
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(2), 99-120



ภาคผนวก ก ผลงานตีพิมพ์ บทความวิจัยในวารสารวิชาการ

Mintara, R., & Pramual, P. (2023). Common but not connected: high genetic structure and cryptic genetic diversity in the ubiquitous biting midge *Culicoides peregrinus* Kieffer. *Tropical Biomedicine* 40(3): 363-369 doi: 10.47665/tb.40.3.014. PMID: 37897171





RESEARCH ARTICLE

Common but not connected: high genetic structure and cryptic genetic diversity in the ubiquitous biting midge *Culicoides peregrinus* Kieffer

Mintara, R.¹, Pramual, P.^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150 Thailand

*Corresponding author: pairrot.p@msu.ac.th

ARTICLE HISTORY

Received: 14 June 2023

Revised: 30 June 2023

Accepted: 3 July 2023

Published: 30 September 2023

ABSTRACT

The biting midge *Culicoides peregrinus* Kieffer is a significant pest and vector species, and knowledge of its genetic diversity and genetic structure is critically important for designing an effective control program. However, such information is limited to only small sample-size DNA barcoding studies. Therefore, in this study, we used mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) to examine genetic structure and diversity of *C. peregrinus* from northeastern Thailand. In addition, we also inferred genetic relationships between *C. peregrinus* from Thailand and those reported from other countries across the geographic range of the species. Maximum intraspecific genetic divergence (3.83%) within Thai specimens was relatively high compared to other *Culicoides* species. Genetic structure analysis revealed that 71% (32 from 45) of population comparisons were highly significantly different. A high level of genetic structure among populations, even between those in close geographic proximity (22 km geographic distance) suggested that there has been little or no movement between local populations. This is possibly due to the ability to exploit diverse types of breeding site and a generalist feeding habit which enables *C. peregrinus* to complete its life cycle within cattle pens. Genetic relationships between Thai *C. peregrinus* and those reported from other countries revealed three genetically divergent lineages (A, B and C) associated with geographic origins. Specimens from Thailand + China formed lineage A, those from Australia formed lineage B and India + Bangladesh belonged to lineage C. These genetically divergent lineages also agree with morphological variation of the wing pale marking spots. Further investigation using independent genetic loci from nuclear genes will be very useful to resolve taxonomic status of these divergent lineages.

Keywords: Biting midge; DNA barcode; genetic diversity; genetic structure; population genetics.

INTRODUCTION

Biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) are small (<2.5 mm in body length) blood-sucking insects. There are >1,300 extant species recorded globally (Borkent & Dominiak, 2020). Many of these are vectors of pathogens that can be transmitted to humans and other animals, causing diseases such as Oropouche fever in humans, bluetongue disease in ruminants, African horse sickness in equines, and leucocytozoonosis in chickens (Mullen & Murphree, 2019).

Culicoides peregrinus Kieffer is a member of the subgenus *Hoffmania* Fox of the genus *Culicoides* Latreille. This species was distinguished as a potent vector of the bluetongue virus (BTV) in Australia (Mullen & Murphree, 2019) and India (Ranjan *et al.*, 2017). *Culicoides peregrinus* was described from the Orrisa Coast, India (Wirth & Hubert, 1989). The species is geographically widespread being recorded from India, Sri Lanka, Bangladesh, Southeast Asia, Australia, Papua New Guinea, Japan and Southern China (Sen & Gupta, 1959; Wirth & Hubert, 1989; Dyce *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2018). *Culicoides peregrinus* is a common species often found in high abundance in or near the animal farms (Harsha *et al.*, 2020; Fujisawa *et al.*, 2021; Kar *et al.*, 2022a). This species has exploited

a wide variety of breeding sites including shaded pools and pond margins, drains and stream margins, paddy fields as well as organic rich substrates (Wirth & Hubert, 1989; Yanase *et al.*, 2013; Harsha & Mazuda, 2015). Based on the biting habit, *C. peregrinus* was considered as a general feeder because it feeds on diverse hosts including humans, horse, goat, sheep, cow, buffalo, pig, dog and birds (Wirth & Hubert, 1989; Jomkumsing *et al.*, 2021; Kar *et al.*, 2022b; Sunantaraporn *et al.*, 2022; Kamyengkird *et al.*, 2023).

Despite its significance as a pest and potent vector, little is known about the genetic diversity and genetic structure of *C. peregrinus* except for DNA barcoding studies based on small sample sizes (Harrup *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Jomkumsing *et al.*, 2021; Gopurenko *et al.*, 2022). Understanding the genetic diversity and genetic structure of the vector species is important for disease epidemiology and might be used to design an effective control program (Tabachnick & Black, 1995; McCoy, 2008). For example, the level of genetic differentiation could indicate rate of individual movement between local populations. This information is critically important for vector control strategy (Tabachnick & Black, 1995). For species that are widely distributed, such as those found across different biogeographic regions, it is also important to test species status between geographically distant populations as it could be

Table 1. Sampling locations, number of specimen (N), number of haplotypes, nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (h) of *Culicoides peregrinus* from Thailand

Location	Latitude/Longitude	N (no. of haplotypes)	$\pi \pm S.E.$	$h \pm S.E.$	Collection date
1. Prangku, Si Sa Ket (SR)	14.83035 N/104.06043 E	13 (8)	0.0085 $\pm$ 0.0050	0.8077 $\pm$ 0.1131	2 Jan 2021/ 4 Jun 2022
2. Huai Mek, Kalasin (KS1)	16.60528 N/ 103.22320 E	18 (6)	0.0019 $\pm$ 0.0014	0.5621 $\pm$ 0.1342	23 Jan 2021
3. Nadun, Maha Sarakham (MK1)	15.68681 N/ 103.23162 E	9 (9)	0.0066 $\pm$ 0.0041	1.0000 $\pm$ 0.0524	20 Feb 2021
4. Ban Don Suan, Kantharawichai, Maha Sarakham (MK2)	16.25278 N/ 103.27525 E	12 (8)	0.0098 $\pm$ 0.0057	0.9091 $\pm$ 0.0649	26 Feb 2021
5. Non Sang, Nong Bua Lamphu (NL)	16.82201 N/ 102.57699 E	6 (6)	0.0047 $\pm$ 0.0034	1.0000 $\pm$ 0.0962	27 Feb 2021
6. Ban Hua Na Kam, Kalasin (KS2)	16.40762 N/ 103.20411 E	18 (10)	0.0063 $\pm$ 0.0037	0.8497 $\pm$ 0.0775	19 Nov 2020
7. Ban Pho Si, Nakhon Phanom (NP)	17.44680 N/ 104.46520 E	10 (9)	0.0200 $\pm$ 0.011	0.9778 $\pm$ 0.0540	20 Nov 2020
8. Khongchiam, Ubon Ratchathani (UB)	15.31459 N/ 105.49841 E	16 (13)	0.0084 $\pm$ 0.0048	0.9667 $\pm$ 0.0357	12 Nov 2022
9. Ban Nong Hua Mu, Udon Thani (UD)	17.36152 N/ 102.75725 E	10 (7)	0.0068 $\pm$ 0.0042	0.9111 $\pm$ 0.0773	13 Oct 2022
10. Trang (TR) ^a	7.83065 N/ 99.33763 E ^a	3 (1) ^a	0	0	29 Sep 2012 ^a
Total		115 (64)	0.0082$\pm$0.0044	0.9466$\pm$0.0138	

^aData from Gopurenko et al. (2022).

related to the vector-pathogen competency (McCoy, 2008; Powell, 2018). Morphological identification of *Culicoides* is difficult due to their small size and low within-species morphological variation which provide only limited diagnostic characters distinguishing closely related species (Harrup et al., 2015). Therefore, genetic markers such as DNA barcodes can be very helpful for testing species status (Ander et al., 2013; Harrup et al., 2016). An example of this type of study is the discovery of morphologically similar but genetically different species within the so-called *C. arakawae* (Arakawa) in Thailand (Pramual et al., 2021b). *Culicoides arakawae* is geographically widely distributed from southern, eastern and southeastern Asia and Japan (Wirth & Hubert, 1989). DNA barcode analyses revealed that some specimens formerly identified as *C. arakawae* are actually different species which were then formally described as *C. mahasarakhamense* (Pramual et al., 2021b). Recent studies have revealed that *C. mahasarakhamense* is a potent vector of several disease-causing agents including *Leucocytozoon*, *Plasmodium juxtanucleare*, *P. gallinaceum* and *Leishmania martiniquensis* (Pramual et al., 2021a; Sunantaraporn et al., 2021; Songumpai et al., 2022).

In this study, we examined the genetic diversity and genetic structure based on the mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) gene sequences of *C. peregrinus* collected from cattle pens in northeastern Thailand. By using a population genetic approach, the level of genetic differentiation between local populations can be inferred. This information can then be used to indicate inter-population movement which can potentially be used for designing effective control programs (Tabachnick & Black, 1995). We also examined genetic relationships between specimens of *C. peregrinus* from Thailand with those reported from other countries. This enabled determination of species status of populations from geographically widespread regions.

MATERIALS AND METHODS

Specimen collection and identification

Adult fly specimens of *C. peregrinus* were collected around cattle pens from nine locations (Table 1 and Figure 1) in northeastern Thailand between 19 November 2020 and 12 November 2022. Specimens were collected by a sweep net swept around the animal host and in the air around the cattle pens. Specimens were preserved in 80% ethanol and stored at -20°C in a freezer until use. The species was identified using keys and descriptions of Southeast Asian biting



Figure 1. Map of Thailand (obtained from Food and Agriculture Organization of the United Nations available at <https://www.fao.org/faostat/en/#country/216>) indicating the 9 sampling locations of *Culicoides peregrinus* obtained in this study plus one (TR) retrieved information from Gopurenko et al. (2022). Details of sampling locations are included in Table 1.

In contrast to the low level of genetic divergence, population pairwise F_{ST} analysis revealed a surprisingly high level of genetic structuring. Among 45 pairwise comparisons, 32 (71%) were significantly different (Table 2). The many population genetic studies of the *Culicoides* species have usually found low or no genetic structuring, particularly between geographically proximal populations (Calvo et al., 2009; Onyango et al., 2015a, 2015b; Jacquet et al., 2016a, 2016b; Mignotte et al., 2021). In Thailand, a population genetic study of the geographically co-distributed and common species, *C. mahasarakhamense*, also found a low level of genetic differentiation between populations (Pramual et al., 2022).

The very high level of genetic structuring between populations of *C. peregrinus* is unexpected given that it is among the most abundance and common species, particularly near animal farms. The high level of genetic differentiation among populations of *C. peregrinus* indicated that gene flow is limited. The IBD analysis revealed no significant relationship between level of genetic (i.e. F_{ST} value) and geographic distances ($R^2 = 0.252$, $P = 0.084$). Therefore, geographic distance cannot explain the genetic structuring found in this species. A possible explanation for the high level of genetic differentiation between populations of *C. peregrinus* is that there is limited movement between local population i.e. between cattle pens. The MJ network of the specimens obtained in the present study (Figure 2) indicated more closely related haplotypes within the same population than those from others. Among 64 haplotypes identified in this study, only 6 were shared by >2 populations. This was also supported by the generally low nucleotide diversity in each population. The ability to use diverse types of breeding habitats suggest that immature stages of *C. peregrinus* could be using moist soil around the cattle pens. Furthermore, the generalist feeding habit enables this species to search for host blood sources within or around the cattle pens where different animals including buffalos, cows, chickens and human are available. Taken together, these factors facilitate *C. peregrinus* to complete its life cycle within a cattle pens without any need for searching for host blood sources in other places. This will promote genetic differentiation between local populations.

Although genetic divergence within Thai specimens was relatively low, it was very high (max. p-distance of 5.40%) when sequences from other countries (Australia, China, India, Bangladesh) recorded in GenBank and BOLDs were included. The maximum genetic divergence was found between specimens from Thailand and Australia. This level of genetic divergence is lower than those reported in BOLDs (max. p-distance of 6.25%) for BIN BOLD:AAJ7131 (https://www.boldsystems.org/index.php/Public_BarcodeCluster?clusteruri=BOLD:AAJ7131), a single BIN recorded in BOLDs for *C. peregrinus* thus far (accessed on June 11, 2023). The lower value of genetic divergence in this study compared to BOLD

is due to smaller sample size because many sequences from some countries (Indonesia, Timor-Leste, Malaysia, Singapore, Pakistan) used for p-distance calculation in BOLD are not publicly available and thus were not included in our analysis.

Despite the limitations of accessing COI sequences from BOLDs, we have detected cryptic genetic diversity in *C. peregrinus* specimens included in the present study. The MJ network analysis revealed three divergent lineages (A, B, C) (Figure 3) within *C. peregrinus* from Thailand, China, Bangladesh, India and Australia. Specimens from Thailand and China formed lineage A. In fact, five specimens from China shared a haplotype with those from Thailand. Sequences of *C. peregrinus* from Australia formed lineage B and those from India and Bangladesh belonged to lineage C. Genetic differentiation between lineage A (Thailand + China) and B (Australia) ranged between 2.44% and 5.40% and between A and C (India + Bangladesh) ranged between 1.22%–4.18%. Lower genetic divergence was found between lineage B and C with the p-distance varying between 1.57% and 2.26%.

The type locality of *C. peregrinus* is in India (Wirth & Hubert, 1989), therefore, we assume that the COI sequences reported from that country are more likely to be the true *C. peregrinus*. Genetically divergent lineages of specimens from Thailand + China and Australia from those of India + Bangladesh could either be indicative of different, but morphologically similar species or of genetic structuring within species (Gopurenko et al., 2015). Wirth and Hubert (1989) has noted that some females collected from Chonburi province, central Thailand, are different from typical *C. peregrinus* by having more extensive, yellowish pale wing marking. In addition, the pale spot at the base of the mediocubital fork is continuous along veins M3+4 and Cu1 to the wing margin. Our specimens used in this study collected from northeastern Thailand, have the pale wing marking (Figure 4) which agrees with those from central Thailand described in Wirth and Hubert (1989). In addition, based on wing photographs of *C. peregrinus* from China provided in Liu et al. (2018) from which the COI sequences (accession nos. KY433456 – 59) were included in present study, these variations of pale wing marking were also found in their specimens. This is in agreement with the COI sequences where Thailand and China belonged to the same lineage. For those specimens of *C. peregrinus* from Australia, according to the wing photograph (Dyce et al., 2007), no such variations were found. Based on the COI barcoding sequences and morphological differentiations, we hypothesize that specimens so-called *C. peregrinus* in Thailand and China are different species from those in India and Australia. To test this hypothesis, further study using additional independent molecular marker from nuclear genes is needed to resolve species status of these COI genetically divergent lineages (Gopurenko et al., 2015).

Table 2. Population pairwise F_{ST} values between 10 populations of *Culicoides peregrinus* from Thailand

	SR	KS1	MK1	MK2	NL	KS2	NP	UB	UD	TR
SR										
KS1	0.08472									
MK1	0.16539	0.36470								
MK2	0.13525	0.20072	0.23096							
NL	0.07576	0.13991	0.23445	0.09923						
KS2	0.35899	0.44416	0.39091	0.09777	0.35503					
NP	0.11227	0.28477	0.14857	0.18794	0.17016	0.37281				
UB	0.36576	0.47122	0.41449	0.1779	0.36474	0.08434	0.30978			
UD	0.23869	0.34084	0.33406	0.00078	0.22682	-0.00259	0.25978	0.06262		
TR	0.70778	0.85877	0.68557	0.31396	0.75177	0.30466	0.58066	0.11713	0.31494	

Note: Bold number indicates statistical significance after Bonferroni correction.

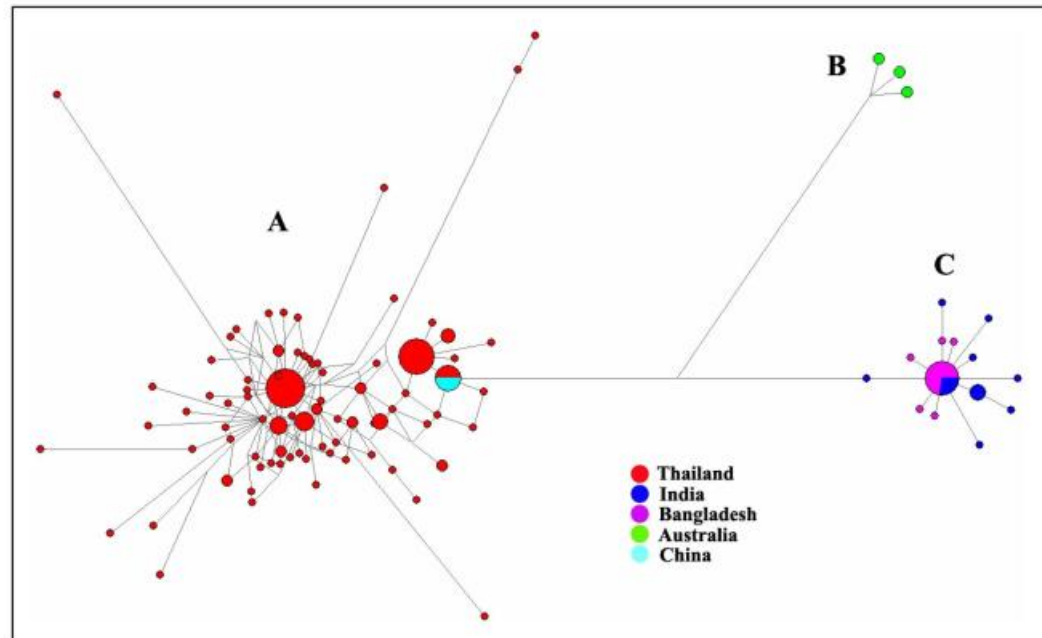


Figure 3. Median joining network of 191 mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) sequences of *Culicoides peregrinus* from northeastern Thailand and those reported from other countries reported in public database. Each circle represents a haplotype and sizes are relative to number of individuals sharing such haplotype. Haplotypes are labelled according to the country of origin.

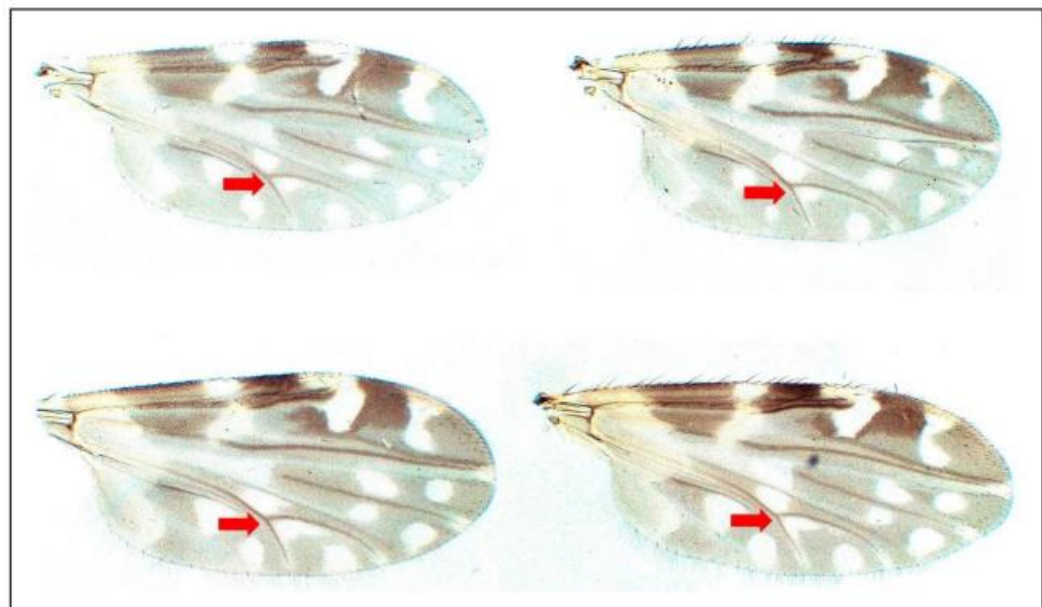


Figure 4. Photographs of female right wings of *Culicoides peregrinus* in northeastern Thailand collected in this study. Arrow indicates variations of the pale spot at the base of mediocubital vein and along the veins M3+4 and Cu1.

In conclusion, we found a high level of genetic structuring within *C. peregrinus* from northeastern Thailand. The ability to utilized diverse breeding habitats as well as a generalist feeding habit could enable *C. peregrinus* to complete its life cycle within cattle pens. This would limit dispersal for host searching or mating and thereby facilitate genetic differentiation even between geographically proximal populations. At the wider geographic scale (i.e. comparisons of specimens from different countries), we found three genetically divergent lineages within *C. peregrinus*. Specimens from Thailand and China belonged to the same lineage and were different from those of India + Bangladesh and Australian lineages. The genetically divergent lineages based on COI sequences were also supported by morphological characteristics. Therefore, these lineages are potentially different, but morphologically similar species. Additional study using the independent genetic markers from nuclear DNA genes will be useful to resolve the species status of *C. peregrinus* recorded in Thailand.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by Mahasarakham University (Postgraduate Fellowship). We would like to thank Dr. Adrian Plant for valuable comments and English language editing of the manuscript.

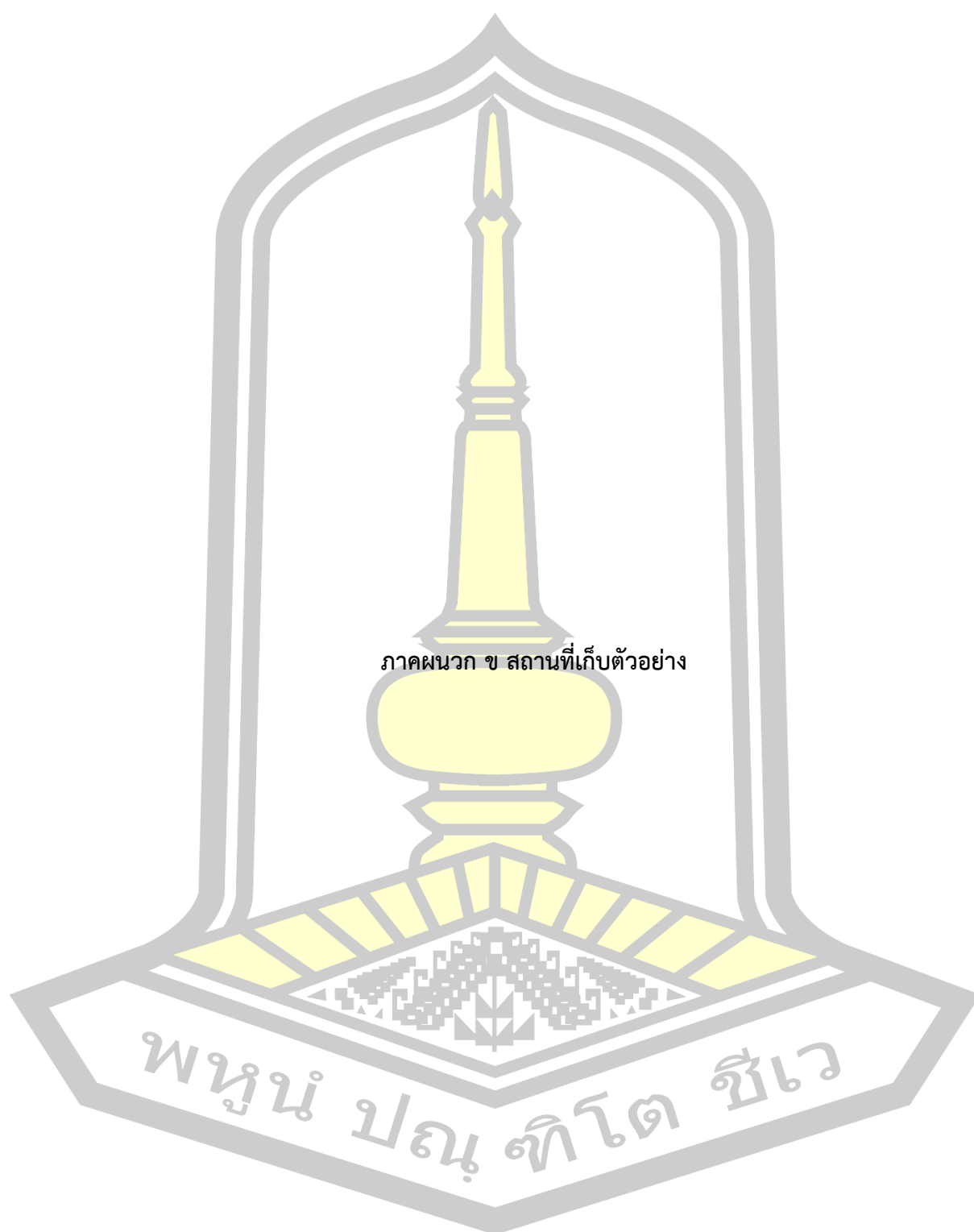
Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Ander, M., Troell, K. & Chirico, J. (2013). Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Medical and Veterinary Entomology* **27**: 323-331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01050.x>
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Bohonak, A.J. (2002). IBD (Isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity* **93**: 153-154. <https://doi.org/10.1093/hered/93.2.153>
- Borkent, A. & Dominiak, P. (2020). Catalog of the biting midges of the world (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa* **4787**: 1-377. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>
- Calvo, J.H., Calvete, C., Martínez-Royo, A., Estrada, R., Miranda, M.A., Borrás, D., Montoya, V.S.J., Pages, N., Delgado, J.A., Collantes, F. et al. (2009). Variations in the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene indicate northward expanding populations of *Culicoides imicola* in Spain. *Bulletin of Entomological Research* **99**: 583-591. <https://doi.org/10.1017/S0007485309006622>
- Dyce, A.L., Bellis, G.A. & Muller, M.J. (2007). Pictorial Atlas of Australian *Culicoides* Wings (Diptera: Ceratopogonidae). ABRIS.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294-299.
- Fujisawa, Y., Homat, T., Thepparat, A., Changbunjong, T., Sutummaporn, K., Kormatitsuk, S. & Kormatitsuk, B. (2021). DNA barcode identification and molecular detection of bluetongue virus in *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from western Thailand. *Acta Tropica* **224**: 106147. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106147>
- Gopurenko, D., Bellis, G., Pengsakul, T., Siriysatien, P. & Thepparat, A. (2022). DNA barcoding of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Thailand reveals taxonomic inconsistencies and novel diversity among reported sequences. *Journal of Medical Entomology* **59**: 1960-1970. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac142>
- Gopurenko, D., Bellis, G.A., Yanase, T., Wardhana, A.H., Thepparat, A., Wang, J., Li, H., Cai, D. & Mitchell, A. (2015). Integrative taxonomy to investigate species boundaries within *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae): a case study using subgenus *Avaritia* from Australasia and Eastern Asia. *Veterinaria Italiana* **51**: 345-378. <https://doi.org/10.12834/VetIt.515.2463.2>
- Harrup, L.E., Bellis, G.A., Balenghien, T. & Garros, C. (2015). *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions. *Infection, Genetics and Evolution* **30**: 249-266. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.018>
- Harrup, L.E., Laban, S., Purse, B.V., Reddy, Y.K., Reddy, Y.N., Byregowda, S.M., Kumar, N., Purushotham, K.M., Kowall, S., Prasad, M., Prasad, G. et al. (2016). DNA barcoding and surveillance sampling strategies for *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern India. *Parasites & Vectors* **9**: 461. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1722-z>
- Harsha, R. & Mazumdar, A. (2015). Laboratory rearing of immature *Culicoides peregrinus* Kieffer, a potential vector of bluetongue virus. *Medical and Veterinary Entomology* **29**: 434-438. <https://doi.org/10.1111/mve.12136>
- Harsha, R., Mazumdar, S.M. & Mazumdar, A. (2020). Abundance, diversity and temporal activity of adult *Culicoides* spp. associated with cattle in West Bengal, India. *Medical and Veterinary Entomology* **34**: 327-343. <https://doi.org/10.1111/mve.12446>
- Jacquet, S., Huber, K., Guis, H., Setier-Rio, M.L., Goffredo, M., Allone, X., Rakotoarivony, I., Chevillon, C., Bouyer, J., Baldet, T. et al. (2016a). Spatio-temporal genetic variation of the biting midge vector species *Culicoides imicola* (Ceratopogonidae) Kieffer in France. *Parasites & Vectors* **9**: 141. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1426-4>
- Jacquet, S., Huber, K., Pagus, N., Talavera, S., Burgin, L.E., Carpenter, S., Sanders, C., Dicko, A.H., Djerbal, M., Goffredo, M. et al. (2016b). Range expansion of the bluetongue vector, *Culicoides imicola*, in continental France likely due to rare wind-transport events. *Scientific Reports* **6**: 27247. <https://doi.org/10.1038/srep27247>
- Jomkumsing, P., Surapinit, A., Saengpara, T. & Pramual, P. (2021). Genetic variation, DNA barcoding and blood meal identification of *Culicoides* Latreille biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Thailand. *Acta Tropica* **217**: 105866. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105866>
- Kar, S., Mondal, B., Ghosh, J., Mazumdar, S.M. & Mazumdar, A. (2022a). Host preference of bluetongue virus vectors, *Culicoides* species associated with livestock in West Bengal, India: Potential relevance on bluetongue epidemiology. *Acta Tropica* **235**: 106648. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106648>
- Kar, S., Mondal, B., Pal, A., Harsha, R. & Mazumdar, A. (2022b). Blood meal analysis of *Culicoides* species associated with livestock in West Bengal, India. *Medical and Veterinary Entomology* **36**: 503-510. <https://doi.org/10.1111/mve.12588>
- Kamyngkird, K., Choocherd, S., Chinnol, W., Klinkaew, N., Kengradomkij, C., Phoosangwalthong, P., Thammasonthijarn, N., Pattanatanang, K., Inpankaew, T., Phasuk, J. et al. (2023). Molecular identification of *Culicoides* species and host preference blood meal in the African horse sickness outbreak-affected area in Hua Hin district, Prachuap Khiri Khan province, Thailand. *Insects* **14**: 369.
- Liu, Y., Tao, H., Yu, Y., Yue, L., Xia, W., Zheng, W., Ma, H., Liu, X. & Chen, H. (2018). Molecular differentiation and species composition of genus *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in different habitats in southern China. *Veterinary Parasitology* **254**: 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.035>
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- McCoy, K.D. (2008). The population genetic structure of vectors and our understanding of disease epidemiology. *Parasite* **15**: 444-448. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153444>
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. & Ng, P.K. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* **55**: 715-728. <https://doi.org/10.1080/10635150600969864>
- Mignotte, A., Garros, C., Dellicour, S., Jacquot, M., Gilbert, M., Gardès, L., Balenghien, T., Duhayon, M., Rakotoarivony, I., de Wavrechin, M. et al. (2021). High dispersal capacity of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae), vector of bluetongue and Schmallenberg viruses, revealed by landscape genetic analyses. *Parasites & Vectors* **14**: 93. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04522-3>

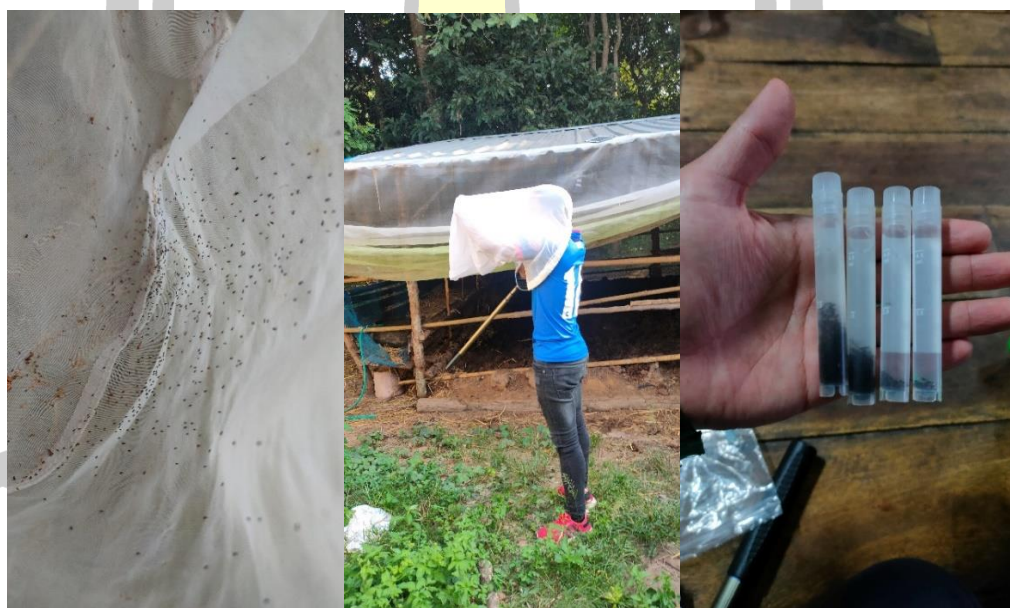
- Mullen, G.R. & Murphree, C.S. (2019). Biting midges (Ceratopogonidae). In: Medical and Veterinary Entomology, Mullen, G.R. & Durden, L.A. (editors), 3rd edition. San Diego, CA: Elsevier, pp. 213-236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00013-3>
- Onyango, M.G., Beebe, N.W., Gopurenko, D., Bellis, G., Nicholas, A., Ogugo, M., Djikeng, A., Kemp, S., Walker, P.J. & Duchemin, J.B. (2015a). Assessment of population genetic structure in the arbovirus vector midge, *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae), using multi-locus DNA microsatellites. *Veterinary Research* 46: 108. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0250-8>
- Onyango, M.G., Michuki, G.N., Ogugo, M., Venter, G.J., Miranda, M.A., Elissa, N., Djikeng, A., Kemp, S., Walker, P.J. & Duchemin, J.B. (2015b). Delineation of the population genetic structure of *Culicoides imicola* in East and South Africa. *Parasites & Vectors* 8: 660. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1277-4>
- Powell, J.R. (2018). Genetic variation in insect vectors: death of typology? *Insects* 9: 139. <https://doi.org/10.3390/insects9040139>
- Pramual, P., Jomkumsing, P., Jumpato, W. & Bunauea, S. (2021a). Molecular detection of avian haemosporidian parasites in biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Thailand. *Acta Tropica* 224: 106118. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106118>
- Pramual, P., Jomkumsing, P., Piraonapicha, K. & Jumpato, W. (2021b). Integrative taxonomy uncovers a new *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midge species from Thailand. *Acta Tropica* 220: 105941. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105941>
- Pramual, P., Jomkumsing, P., Wongpakam, K., Vaisusuk, K., Chatan, W. & Gomontean, B. (2022). Population genetic structure and population history of the biting midge *Culicoides mahasarakhamense* (Diptera: Ceratopogonidae). *Insects* 13: 724. <https://www.mdpi.com/2075-4450/13/8/724#>
- Ranjan, K., Prasad, M., Brar, B. & Prasad, G. (2017). First report of isolation of bluetongue virus 23 from *Culicoides peregrinus* vector from India. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases* 38: 16-21. <http://10.0.23.70/0974-0147.2017.00003.4>
- Sen, P. & Gupta, S.D. (1959). Studies on Indian *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera). *Annals of the Entomological Society of America* 52: 617-630. <https://doi.org/10.1093/aesa/52.5.617>
- Songumpai, N., Promrangsee, C., Noopetch, P., Siriyasatien, P. & Preativatanyou, K. (2022). First evidence of co-circulation of emerging *Leishmania martiniquensis*, *Leishmania orientalis*, and *Crithidia* sp. in *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), the putative vectors for autochthonous transmission in Southern Thailand. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 7: 379.
- Sunantaraporn, S., Hortiwakul, T., Kraivichian, K., Siriyasatien, P. & Brownell, N. (2022). Molecular identification of host blood meals and detection of blood parasites in *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) collected from Phatthalung Province, Southern Thailand. *Insects* 13: 912.
- Sunantaraporn, S., Thepparat, A., Phumee, A., Sor-Suwan, S., Boonserm, R., Bellis, G. & Siriyasatien, P. (2021). *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors for *Leishmania martiniquensis* and *Trypanosoma* sp. in northern Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15: e0010014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010014>
- Tabachnick, W.J. & Black IV, W. (1995). Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. *Parasitology Today* 11: 27-30. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80105-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80105-7)
- Tangkawanit, U., Wongpakam, K. & Pramual, P. (2018). A new black fly (Diptera: Simuliidae) species of the subgenus *Asiosimulium* Takaoka Choochote from Thailand. *Zootaxa* 4388: 111-122. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4388.1.8>
- Wirth, W.W. & Hubert, A.A. (1989). The *Culicoides* of Southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 44: 1-508.
- Yanase, T., Matsumoto, Y., Matsumori, Y., Aizawa, M., Hirata, M., Kato, T., Shirafuji, H., Yamakawa, M., Tsuda, T. & Noda, H. (2013). Molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the southern part of Japan. *Journal of Medical Entomology* 50: 1105-1110. <https://doi.org/10.1603/ME11235>



สถานที่เก็บตัวอย่าง



บ้านดอนสวน อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม



บ้านหนองหัวหมู อ.เมือง จ.อุดรธานี

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ

รณฤทธิ์ มินตระ

วันเกิด

วันพุธ ที่ 31 มีนาคม 2542

สถานที่เกิด

โรงพยาบาลบึงกาฬ

สถานที่อยู่ปัจจุบัน

104 หมู่ 11 ตำบลนาทับไฮ อำเภอรัตนวาปี จังหวัดหนองคาย

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2560 มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนหนองยองพิทยาคม รัชมังคลาภิเษก จังหวัดบึงกาฬ

พ.ศ. 2565 วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท. บ) สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

พ.ศ. 2567 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม) สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

ทุนวิจัย

ทุนวิจัยหลังปริญญาตรี (Postgraduate) ประจำปีงบประมาณ 2565

ผลงานวิจัย

Mintara, R., & Pramual, P. (2023). Common but not connected: high genetic structure and cryptic genetic diversity in the ubiquitous biting midge *Culicoides peregrinus* Kieffer. *Tropical Biomedicine* 40(3): 363-369

พูน ปณ ภิโต ชีเว