รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อการระบุชนิดของยุงลายและยุงรำคาญ (Diptera: Culicidae) ในภาคใต้ ของประเทศไทย

DNA Barcoding for Identification of *Aedes* and *Culex* Mosquito Species (Diptera: Culicidae) in Southern of Thailand

คณะนักวิจัย

ผศ.ดร.ธีรกมล เพ็งสกุล
รศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร
นางสาวโสภาวดี มูลเมฆ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2559
รหัสโครงการ 2559A11502079 และ MET590137S

ชื่อชุดโครงการ ไม่มีโครงการย่อย

ชื่อโครงการ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อการระบุชนิดของยุงลายและยุงรำคาญ (Diptera:Culicidae) ในภาคใต้ ของประเทศไทย

DNA Barcoding for Identification of *Aedes* and *Culex* Mosquito Species (Diptera: Culicidae) in Southern of Thailand

คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด

1. ผศ.ดร.ธีรกมล เพ็งสกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. รศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. นางสาวโสภาวดี มูลเมฆ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่12 สงขลา กรมควบคุมโรค

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นวิธีพื้นฐานที่ถูกใช้ในการจำแนกยุงในระดับชนิด แต่วิธีการดังกล่าว ในบางครั้งก็ไม่สามารถระบุชนิดของยุงที่มีรูปร่างภายนอกที่คล้ายคลึงกันได้ อีกทั้งยังต้องใช้ผู้มีความเชี่ยวชาญและมีประสบการณ์จึงจะสามารถระบุชนิดยุงด้วยวิธีนี้ได้อย่างถูกต้อง จากข้อจำกัดข้างต้นวิธีการทางดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงถูกนำมาใช้เพื่อยืนยันการระบุชนิดจากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้จำแนกตัวอย่างยุงในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย รวม 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสงขลา พัทลุง ตรัง กระบี่ ภูเก็ต นครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำแนกชนิดยุงตัวเต็มวัยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน *COI* ในไมโทคอนเดรีย ที่มีขนาด 632 คู่เบส วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงแต่ละชนิด วิเคราะห์ค่าความผันแปรทางพันธุกรรม และวิเคราะห์แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ ผลการศึกษาได้จำแนกชนิดยุงด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 4 ชนิด ได้แก่ *Ae. aegypti, Cx. quinquefasciatus, Ae. albopictus* และ *Mn. uniformis* วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุง 3 ชนิด ได้แก่ *Ae. aegypti, Cx. quinquefasciatus* และ *Ae. albopictus* กับฐานข้อมูล NCBI ที่ให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่มีค่าเฉลี่ยมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ หรือความคล้ายคลึงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ความแปรผันทางพันธุกรรมของยุงภายในชนิดเดียวกันมีค่าต่ำกว่า 0.01 และยุงต่างชนิดกันมีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมมากกว่า 0.1 และสูงถึง 5.0 แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการของยุงลาย *Ae. aegypti, Ae. albopictus*, ยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในพื้นที่ภาคใต้ ของประเทศไทยเทียบกับยุงสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ *Cx. gelidus, Mn. uniformis, An. quadrimaculatus* และ *An. gambiae* แยกออกจากกันเป็นกลุ่ม 3 กลุ่ม (clade) ได้แก่ เคลด A; *Ae. albopictus*, เคลด B; *Ae. aegypti* และเคลด C; *Cx. quinquefasciatus* แต่ละเคลดมีค่าความเชื่อมั่น 100, 90 และ 100 ตามลำดับ สรุปผลการศึกษาจัดจำแนกระบุชนิดยุงด้วยวิธีดีเอ็นบาร์โค้ดสามารถระบุชนิดยุงเป็นไปอย่างถูกต้อง รวดเร็ว และสามารถยืนยันการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ ดังนั้นวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดซึ่งเป็นวิธีทางอณูชีววิทยานี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่นำไปสู่การควบคุมและการเฝ้าระวังแมลงที่เป็นพาหะโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ยุงลาย, ยุงรำคาญ และยีน *COI*

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

Mosquitoes identification based on morphological characterization is gold standard method; however, the identification of mosquitoes with similarity in morphology is poorly reliable. Moreover, this method requires experienced taxonomists for certain identification. Due to this limitation, DNA barcoding, molecular technique used nucleotide sequences for identification of species, plays important role to confirm the identification by morphology. Adult mosquitoes collected in 7 provinces of southern Thailand; Songkhla, Phatthalung, Trang, Krabi, Phuket, Nakhon Si Thammarat, and Surat Thani were used in this study. The samples were identified based on morphology and DNA barcoding. This DNA barcoding was performed by partial mitochondrial *COI* gene sequence of 632 bp. DNA sequence were then aligned, calculated pairwise genetic distance and performed phylogenetic analysis. Morphologically, the specimens were identified as belonging to four species*: Ae.aegypti, Cx. quinquefasciatus, Ae. albopictus* and *Mn. uniformis.* DNA sequence analysis of *Ae. aegypti, Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus* were compared to NCBI database and only average more than 98 % identity and 90% similarity of *COI* gene were selected. Pairwise genetic distance analysis between revealed intraspecific and interspecific distances of 3 species, which gene average genetic divergence within species were less than 0.01 and different species were more than 0.1 up to 5.0. Moreover, phylogenetic analysis of mosquitoes in southern Thailand and other mosquitoes; *Cx. gelidus, Mn. uniformis, An. quadrimaculatus* and *An. gambiae* were separated into 3 clades (clade A; *Ae. albopictus*, clade B; *Ae. aegypti*, clade C; *Cx. quinquefasciatus*) with bootstrap value of 100, 90 and 100 respectively. Inconclusions, this study shows the ability of DNA barcoding method for the identification of mosquito species which is accurate, fast and helps supporting morphological identification. This indicates that DNA barcoding which is molecular technique is applicable for identifying medical important insects leading to the control and surveillance of vectors related to vector borne diseases.

Keywords: DNA barcoding, Mosquitoes, *Aedes, Culex* and *COI* gene