

บทคัดย่อ

176701

รหัสโครงการ: RDG4530034

ชื่อโครงการ: การศึกษาอนุพันธุศาสตร์และนิเวศวิทยาของพาหะกับเชื้อก่อโรค

ชื่อนักวิจัย: วิสุทธิ์ ไบไม้^{1,2}, เฉลียว กุวังคะดิลก¹, ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์^{1,2}, จอนห์ มิลน์¹, วันวิสาข์
จำนงค์ลักษณ์^{1,2}, นพมณี เชื้อวัชรินทร์^{1,2}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ

²ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: หน่วยพาหะและโรคที่นำโดยพาหะ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ

E-mail Address: scvbm@mahidol.ac.th

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย: 1 กันยายน 2545 ถึง 31 ธันวาคม 2548

วัตถุประสงค์: ศึกษาเดนโซไวรัสและแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงพาหะและสัตว์ขาปล้อง แบคทีเรีย
Eubacteria และการแพร่กระจายของไรอ่อนกลุ่ม Trombiculid, นิเวศวิทยาและวิวัฒนาการของประชากร
ธรรมชาติของแมลงวันดำในประเทศไทย

สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรีย *Wolbachia* และเดนโซไวรัส: การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และ
เดนโซไวรัสในยุง 53 ชนิด จำนวน 416 ตัว จากประชากรธรรมชาติในจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศไทยด้วย
เทคนิค PCR พบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงจิ้งหรีด *Aedes* จำนวน 7 ชนิด ในขณะที่พบการ
ติดเชื้อเดนโซไวรัส ในยุง 3 ชนิด คือ *Aedes aegypti*, *Anopheles dirus* A และ *Anopheles minimus* การ
ทดลองศึกษาความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยเทคนิค Quantitative Real-time PCR ในแต่ละ
ช่วงการเจริญของยุง *Ae. albopictus* โดย *Ae. aegypti* ที่ได้รับการถ่ายฝากเชื้อ *Wolbachia* wAlbA และ
wAlbB จากยุง *Ae. albopictus* พบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะพัก
แสดงให้เห็นถึงการอาศัยอยู่แบบเกื้อกูลกัน (symbiosis) ระหว่างโฮสต์กับแบคทีเรีย *Wolbachia* นอกจากนี้
ยังพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วย โดยความหนาแน่นลดลงในยุงที่
เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับการตรวจสอบความ
หนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในแต่ละระยะของการเจริญในยุง *Ae. aegypti* ที่ได้รับการถ่ายฝากเชื้อ
Wolbachia จากยุง *Ae. albopictus* สายพันธุ์ KLPP พบว่าความหนาแน่นของ *Wolbachia* ในยุง
Ae. aegypti เพิ่มขึ้นน้อยกว่าในยุง *Ae. albopictus* แสดงให้เห็นว่ายุง *Ae. aegypti* มีความต้านทานการเพิ่ม
จำนวนของแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ดีกว่ายุง *Ae. albopictus*

ไรอ่อน: ศึกษาสายพันธุ์ของตัวอย่างไรอ่อนกลุ่ม Trombiculids โดยการจำแนกลักษณะเฉพาะด้าน สัณฐานวิทยา ร่วมกับด้านอนุพันธุศาสตร์โดยใช้ยีน rRNA ในส่วน 18S rRNA พบไร 7 สปีชีส์ ใน 4 จินัส คือ *Ascoschoengastia globola*, *Walchia lupella*, *Walchia kalrata*, *Trombicula (Blankaartia) gracilis*, *Trombicula (Blankaartia) niloticum*, *Trombicula (letotrombidium) sp.* และ *Helenicula sp.* เมื่อสร้าง Phylogenetic tree พบว่า ไรอ่อนประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม 1 (*Ascoschoengastia sp.* กับ *Walchia sp.*) และกลุ่ม 2 (*Trombicula sp.* กับ *Helenicula sp.*) โดยทั้ง 2 กลุ่มนี้มีค่าเฉลี่ย Genetic distance เท่ากับ 18.9% ในขณะที่ค่าเฉลี่ย Genetic distance ระหว่างจिनัสภายในกลุ่มที่ 1 เท่ากับ 6.74% และภายในกลุ่มที่ 2 เท่ากับ 3.1% อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ย Genetic distance ระหว่างสายพันธุ์ภายใน *Ascoschoengastia sp.* เท่ากับ 0.4% สำหรับการตรวจหาเชื้อ Eubacteria ในตัวไรอ่อนด้วยเทคนิคทาง โมเลกุลพบ Eubacteria กลุ่ม γ -proteobacteria ในตัวอย่างไรอ่อน 2 ตัวโดยแบคทีเรียในตัวหนึ่งคล้ายกับ *Pantoea agglomerans* ที่สามารถก่อโรค cotton fever และในอีกตัวหนึ่งคล้ายกับ *Phototribadus luminescens* ซึ่งเป็นศัตรูของแมลง แบคทีเรียที่พบในไรอ่อนนี้อาจมีความสัมพันธ์กับความสามารถของ ไรอ่อนในการเป็นพาหะนำเชื้อก่อโรคในคนหรือในแมลง

แมลงวันตำ: การศึกษาในโครงการนี้พบแมลงวันตำจำนวน 45 ชนิด วันตำที่กระจายในภาคเหนือมี ประมาณ 27 ชนิด และมีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางกายภาพของแหล่งเพาะพันธุ์ เช่น ขนาดของลำธาร ความสูงเหนือระดับ น้ำทะเล และความเร็วของกระแสน้ำ การศึกษาแบบแผนการเรียงลำดับของโพลีทีน-โครโมโซมแบนด์ของตัวอ่อนพบว่าประชากรของแมลงวันตำชนิด *Simulium siamense* และ *Simulium tani* แบ่งออกเป็น cytoforms ต่างๆที่มีรูปร่างคล้ายคลึงกัน การศึกษานิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (COI) แสดงให้เห็นว่าประชากรของแมลงวันตำ 3 ชนิดจากภาคเหนือมีความหลากหลายและโครงสร้างทาง พันธุกรรมสูงกว่าประชากรจากภาคอื่นๆ นอกจากนี้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 ไรโบโซมัลดีเอ็นเอทำให้ทราบสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของวันตำกลุ่มต่างๆ อย่างชัดเจน ข้อมูลจากการศึกษานี้อาจเป็น ประโยชน์ในการพัฒนาหามาตรการควบคุมประชากรธรรมชาติของแมลงวันตำในอนาคต

Abstract

176701

Project Code: RDG4530034

Project Title: Molecular genetics and ecology of vectors and their pathogens

Investigators: Visut Baimai¹, Chaliow Kuvangkadilok¹, Pattamaporn Kittayapong¹, John Milne¹,
Wanwisa Jamnongluk^{1,2}, Nopmanee Chauvatcharin

¹Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, ² Center for Vectors and Vector-Borne Diseases, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok,

E-mail Address: scvbm@mahidol.ac.th

Project Period: 1 September 2002 - 31 December 2005

Objectives: To study densovirus and *Wolbachia* bacteria in mosquito vectors and anthropods, Eubacteria in and distribution of chiggers (Trombiculids), and ecology and evolution in natural populations of black fly in Thailand.

Methodology and Results:

Wolbachia bacteria and densovirus: A total of 416 individual samples of 53 species of mosquitoes collected from natural populations throughout Thailand were tested for *Wolbachia* and densovirus infection using PCR method. Only 7 species of mosquitoes in genus *Aedes* were infected with *Wolbachia*, while 3 species, i.e., *Aedes aegypti*, *Anopheles dirus* A and *Anopheles minimus* were infected with densovirus. Quantitative Real-time PCR was performed to study *Wolbachia* density at different developmental stages of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* transfected with *Wolbachia* wAlbA and wAlbB from *Ae. albopictus*. The results showed that *Wolbachia* density was decreased at diapause stage indicating symbiosis of *Wolbachia* and the host. Moreover, culture temperature also affected *Wolbachia* density: lower density was detected in mosquito cultured at 37°C compared to those at 25°C. Examination of *Wolbachia* density in different developmental stages of *Ae. aegypti* transfected from the KLPP strain of *Ae. albopictus* revealed that *Wolbachia* density in *Ae. aegypti* increased at a lower rate than that of *Ae. albopictus*. The results seem to suggest that *Ae. aegypti* may have a better resistance to multiplication of *Wolbachia* than *Ae. albopictus*.

Chigger: The chiggers (Trombiculids) were identified to genus and species by morphology and molecular genetic techniques using 18S rRNA gene. We were able to identify 7 species of chiggers belonging to 4 genera, i.e., *Ascoschoengastia globosa*, *Walchia lupella*, *Walchia kalrata*, *Trombicula (Blankaartia) gracilis*, *Trombicula (Blankaartia) niloticum*, *Trombicula (letotrombidium) sp.* and *Helenicula sp.* The phylogenetic tree showed two groups of chiggers: group 1 (*Ascoschoengastia sp.* and *Walchia sp.*) and group 2 (*Trombicula sp.* and *Helenicula sp.*). The average Genetic distance between the two groups was 18.9%, between the genera within group 1 was 6.74%, and within group 2 was 3.1%. However, the average Genetic distance among strains of *Ascoschoengastia sp.* was 0.4%. Exploring for possible medically related eubacteria in chiggers by molecular techniques has revealed positive results for γ -proteobacteria in 2 specimens: one was related to *Pantoea agglomerans*, causative of cotton fever, and the other was related to *Photorhabdus luminescens*, entomopathogenic bacteria. These eubacteria may be related to vectorial capability of chiggers for human or insect pathogens.

Black fly: Forty five known species of black fly were found in Thailand during this study. The distribution of 27 larval black fly species from northern Thailand was related to some physical parameters of the breeding sites such as stream size, altitude and water velocity. Study of larval polytene chromosomes has revealed the existence of different cytoforms with morphological uniforms in the populations of *Simulium siamense* and *Simulium tani*. Based on the mitochondrial DNA (COI) sequence, the populations of three black fly species from the northern region showed greater diversity and highly genetic structure within the region as well as genetic differentiation from populations in the other regions. Moreover, molecular sequence of ITS2 rDNA clarified phylogenetic relationships among 40 black fly species. This fundamental knowledge may be useful for developing control measures for black fly populations in Thailand in the future.