

แบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถอาศัยอยู่กับโฮสต์แบบซิมไบโอซิส แบคทีเรียชนิดนี้สามารถถูกถ่ายทอดจากโฮสต์รุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่งได้ และอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสืบพันธุ์ของโฮสต์ เช่นการเข้ากันไม่ได้ของไซโทพลาสซึม (cytoplasmic incompatibility, CI) ทำให้ลูกที่เกิดมาตาย ปริมาณ (density) ของ *Wolbachia* มีแนวโน้มสัมพันธ์กับอัตราการเกิด CI นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ *Wolbachia* ยังอาจสัมพันธ์กับปริมาณของ bacteriophage ที่อาศัยอยู่กับแบคทีเรียชนิดนี้ (bacteriophage WO)

ในงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาปริมาณของ bacteriophage WO gp1 รวมทั้งปริมาณของ *Wolbachia* A และ *Wolbachia* B ในระยะ ตัวอ่อน ดักแด้ ตัวเต็มวัยอายุ 3 วัน และ ตัวเต็มวัยอายุ 21 วัน ของยุงลาย *Aedes albopictus* โดยใช้เทคนิค Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) ผลที่ได้คือ ปริมาณของ *Wolbachia* B มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับ gp1 ในระยะต่างๆระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งไม่พบแนวโน้มเดียวกันนี้ระหว่าง bacteriophage WO gp1 กับ *Wolbachia* A ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงเป็นการรายงานครั้งแรกของความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากกว่าระหว่าง *Wolbachia* B และ bacteriophage WO gp1 และให้แนวคิดที่ bacteriophage WO gp1 อาจมีความเกี่ยวข้องกับ CI โดยต้องทำการศึกษาในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยเฉพาะถ้าจะนำไปใช้ในการแทนที่ประชากร (population replacement) หรือใช้ในระบบ gene drive system เพื่อลดจำนวนประชากรยุง

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังทำการศึกษาปริมาณของ prophageWO orf7 และ *Wolbachia* ระหว่างการเจริญเติบโตของ ยุงลายสายพันธุ์ KOH (มี *Wolbachia* ชนิด A) โดยใช้เทคนิค RTQ-PCR ปริมาณ prophageWO orf7 ไม่ได้มีแนวโน้มไปทางเดียวกันกับ *Wolbachia* โดยปริมาณ *Wolbachia* จะสูงในระยะหลังของการเจริญของยุง (ตัวเต็มวัย) ในขณะที่ปริมาณของ prophageWO orf7 จะต่ำในระยะตัวเต็มวัย ยุงตัวเต็มวัยอายุ 12 วันมีปริมาณ *Wolbachia* สูงกว่าในระยะอื่น ในขณะที่ตัวอ่อนระยะที่ 4 มีปริมาณ prophageWO orf7 สูงกว่าในระยะอื่นๆ

ผลการทดลองในแง่ของ Transcription patterns ของยีนสองชนิด คือ gp1 และ pk1 แสดงให้เห็นถึงการที่มีการ transcribe ของยีนทั้งสองชนิดในบางระยะของงูลาย (ตัวอ่อนระยะที่ 2 ตัวอ่อนระยะที่ 4 และตัวเต็มวัยตัวเมีย สำหรับ pk1 ยีน ส่วนใน gp1 พบการ transcribe ในระยะ ตัวอ่อนระยะที่ 2 และตัวเต็มวัยตัวเมีย) งานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษา ปริมาณเฉลี่ยของ gp1 และ pk1 ในเนื้อเยื่อจากอวัยวะส่วนต่างๆของงูลายเพื่อดูความสัมพันธ์ หรือหน้าที่ที่อาจเกี่ยวข้องกับ CI ว่าพบปริมาณสูงในอวัยวะสืบพันธุ์หรือไม่ ผลที่ได้คือ จะพบปริมาณยีนทั้งสองมากที่สุดในส่วนของรังไข่ รองลงมาคือใน ส่วนของอัมพะ ซึ่งเป็นการสนับสนุนบทบาทของยีนทั้งสองชนิดในการเกี่ยวข้องกับ CI เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ของ pk1 ในงูลาย งูรำคาญ และผีเสื้อกลางคืน พบว่า pk1 ยีนในงูลายมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ pk1 ในงูรำคาญ มากกว่ากับ ผีเสื้อกลางคืน ซึ่งอาจเป็นการสนับสนุนวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมากกว่าในส่วนของ pk1 ยีน ระหว่างงูลายกับงูรำคาญ

## Abstract

*Wolbachia* are maternally inherited symbiotic bacteria that capable of inducing an extensive range of reproductive abnormalities in their hosts, including cytoplasmic incompatibility (CI). Its density is likely to influence the penetrance of CI in incompatible crosses. In addition, the variations of *Wolbachia* density could also be linked with phageWO density. In this study, prophage WO gp1, including *Wolbachia* A and *Wolbachia* B densities were determined during mosquito development by using real-time quantitative PCR (RTQ-PCR). An interesting result was found for the same flux of prophage WO gp1 and *Wolbachia* B densities in larva, pupa, 3-day-old adult, and 21-day-old adult of *Aedes albopictus* mosquito (*Wolbachia* superinfection). The results determined that *Wolbachia* B and prophage WO gp1 developed with the same fluctuation from larval stage through adult stage. However, the same tendency was not observed with *Wolbachia* A and phageWO gp1. Hence, this bacteriophage gene is more closely associated with *Wolbachia* B strain than in *Wolbachia* A in their relative density variations. Assessment of the density data reported herein is the first to suggest the possible association of prophageWO gp1 in CI mechanisms in consequence of the same fluctuation during development with *Wolbachia* B gene density in *Aedes albopictus* mosquito.

In addition, in this study we also determined relative density of prophageWO orf7 and *Wolbachia* during early developmental and adult stages of singly infected *Aedes albopictus* mosquito (*Wolbachia* A infected) by using real-time quantitative PCR (RTQ-PCR). The result determined that PhageWO and *Wolbachia* did not develop at the same rate. Relative *Wolbachia* density (bacteria-to-host ratio) was high later in development (adult stages) whilst relative prophageWO density (phage-to-bacteria ratio) was low in the adult stages. Furthermore, twelve-day-old adults of singly infected female mosquito had the highest *Wolbachia* density. On the contrary, larval stage 4 (L4) contained the highest prophageWO-B orf7 density. The association of hosts/*Wolbachia*/phage among diverse species is different. Thus if phage and *Wolbachia* are involved in CI mechanism, the information of this association should be studied for each specific type of organism for future use of population replacement or gene drive system.

Moreover, developmental stages were examined for transcription patterns of pk1 and gp1 genes. The results provide evidence for the presence of actively transcribed virions in some mosquito stages (larval stage 2, larval stage 4 and female adult for pk1 and larval stage 2 and female adult for gp1). Furthermore, in this work, mean relative densities of tissues of gp1 and ankyrin protein (pk1 gene) were determined by RTQ-PCR to study the possible function and correlation of these genes with CI and with *Wolbachia* genes in *Aedes* mosquitoes. The highest relative densities were found in the ovary while the testis was a little lower than in the ovary in both gp1 and pk1. This implies the roles of both genes in relation with CI. The sequences of CI related gene (pk1) in *Aedes albopictus* was also investigated. The DNA sequence data provides closer relationship of pk1 from *Aedes albopictus* and *Culex pipens* than between *Aedes albopictus* and *Culex cautella* which implied closer evolutionary relationship of pk1 gene of *Aedes albopictus* and *Culex pipens*.