

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Wolbachia* จัดอยู่ในกลุ่ม alpha-proteobacteria และมีแนวโน้มที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการนำพาเอ็นเข้าสู่ประชากรธรรมชาติของสัตว์ขาปล้อง งานวิจัยนี้ใช้ยุงพาหะเป็นตัวกลางในการศึกษา จากผลการวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถชักนำแบคทีเรีย *Wolbachia* จากยุงลาย *Aedes albopictus* (KLPP) ที่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* ถึง 2 ชนิด (superinfection) เข้าสู่ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* โดยวิธี microinjection แต่สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ของยุงลาย *Ae. albopictus* นี้ได้เฉพาะในยุง *Culex quinquefasciatus* ผู้ให้อาศัย ในรุ่น F_0 เท่านั้น การวิจัยอีกส่วนหนึ่งนั้นเกี่ยวข้องกับ bacteriophage WO ซึ่งเป็นไวรัส ดี เอ็น เอ ที่สามารถพบได้ในแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยผู้วิจัยได้ทำการตรวจหา bacteriophage WO ในยุงชนิดต่างๆในธรรมชาติพบว่ามียุง 22 ชนิดที่มี bacteriophage WO จากที่ได้ทำการทดสอบทั้งหมด 25 ชนิดและ ส่วนมากพบ bacteriophage WO เพียง 1 ชนิด ยกเว้น *Ae. perplexus* ที่พบอย่างน้อย 2 ชนิด และจากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ bacteriophage WO โดยอาศัยลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน ยีน *orf7* พบว่าความสัมพันธ์ของ bacteriophage WO กับแบคทีเรีย *Wolbachia* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดแบบเฉพาะชนิด การค้นพบนี้แตกต่างจากที่มีรายงานไว้ใน แมลงหวี่และผีเสื้อกลางคืน และผู้วิจัยทำการตรวจความหนาแน่นของ bacteriophage WO และ *Wolbachia* โดยวิธี PCR เชิงปริมาณ (quantitative PCR) เพื่อดูแนวโน้มการกระจายตัวของ bacteriophage WO และ *Wolbachia* ในยุงชนิดต่างๆ ตามธรรมชาติ ซึ่งค่าความหนาแน่นเฉลี่ยของ bacteriophage WO คือ $7.76 \times 10^5 \pm 1.61 \times 10^5$ *orf7* copies ต่อยุง 1 ตัว และค่าความหนาแน่นเฉลี่ยของ *Wolbachia* ชนิด A คือ $6.77 \times 10^5 \pm 1.80 \times 10^5$ *wsp* copies ต่อยุง 1 ตัว แต่สำหรับ *Wolbachia* ชนิด B มีค่าเฉลี่ยเป็น $1.02 \times 10^{18} \pm 8.02 \times 10^{17}$ *wsp* copies ต่อยุง 1 ตัว อย่างไรก็ตามพบว่าความหนาแน่นของปริมาณ bacteriophage WO มิได้สัมพันธ์กับปริมาณความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มัน

อาศัยอยู่ ในขณะที่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะต่างๆของการเจริญเติบโตของยุง อุณหภูมิในการเลี้ยงยุงและความหนาแน่นของประชากรยุงมีกลับผลกระทบต่อความหนาแน่นของปริมาณ bacteriophage WO ทั้งหมดในยุง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังตรวจพบอนุภาค bacteriophage WO หลังจากการสกัดแยก bacteriophage WO ออกจาก แบคทีเรีย *Wolbachia* จากรังไข่ของยุงลาย superinfected *Ae. albopictus* (KLPP) และได้ศึกษาคูอนุภาคของ bacteriophage WO ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นการยืนยันการมีอยู่ของอนุภาค bacteriophage WO และการคงสภาพการเป็น bacteriophage ที่มีประสิทธิภาพอยู่ การค้นพบนี้สนับสนุนแนวคิดในการใช้ bacteriophage WO เป็นเครื่องมือในการนำพาสารพันธุกรรมต่างๆเข้าสู่แบคทีเรีย *Wolbachia* ก่อนที่จะชักนำเข้าสู่ยุงพาหะเพื่อประโยชน์ในการควบคุมยุงพาหะโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม

Abstract

Wolbachia, classified in the alpha proteobacteria, have a potential to be used as a gene-driving system for genetic manipulation of the arthropod hosts. The mosquito was used as an arthropod model. Our results demonstrated that *Wolbachia* from the superinfected Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (KLPP), were successful transferred into F_0 of *Culex quinquefasciatus* hosts by microinjection technique. In addition, we reported the presence of the bacteriophage WO among natural populations of several mosquito hosts. Our survey revealed that 22 out of 25 *Wolbachia*-infected species of mosquitoes contained bacteriophage WO. Phylogenetic relationship based on *orf7* sequences showed that a single strain of phage WO was found in most singly or doubly *Wolbachia*-infected mosquito species. Only one species, i.e., *Aedes perplexus*, was found to harbor at least two different phage types. These results suggested that bacteriophage WO in mosquitoes preferred to co-transmit with their *Wolbachia* hosts and were likely to be specific in each mosquito species. This finding was different from those previously reported in *Drosophila* and moths. Real-time quantitative PCR assay for the density of bacteriophage WO revealed that the average density was $7.76 \times 10^5 \pm 1.61 \times 10^5$ *orf7* copies per an individual mosquito. The average density of *Wolbachia* supergroup A and supergroup B were $6.77 \times 10^5 \pm 1.80 \times 10^5$ *wsp* copies per an individual mosquito and $1.02 \times 10^{18} \pm 8.02 \times 10^{17}$ *wsp* copies per an individual mosquito, respectively. However, the density of phage WO did not correlate with that of their *Wolbachia* hosts which were varied in different mosquito species. Our results suggested that the density of bacteriophage WO depended on growth phases, rearing temperature and

crowding condition of mosquito population. Moreover, the bacteriophage WO of *Ae. albopictus* from recent colonies (KLPP) was confirmed by TEM. The viral-like particles were detected after purification and filtration of *Ae. albopictus* ovaries suggesting the presence of active phages in this mosquito vector. Our findings that the bacteriophage WO from mosquito were host-specific and were active encourage further investigation to utilize these bacteriophages as transformation vectors of *Wolbachia* in genetic engineering strategy for controlling mosquito vectors.