



การสำรวจเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบความชุกชุมของแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงจังหวัดนครปฐม

ภาณุพงษ์ ทองเปรม^{1*}, สุวิษฐา ประทุมราช¹ และ สรลวิชญ์ จินแส¹

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม

*thongprem_p@su.ac.th

บทคัดย่อ

สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมักมีแบคทีเรียร่วมอาศัยดำรงชีวิตอยู่ภายในเซลล์ โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะมีบทบาทต่อชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์ ซึ่งนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการขับเคลื่อนวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า *Wolbachia* และ *Rickettsia* เป็นแบคทีเรียที่จัดเป็น endosymbionts ของยูคาริโอตหลายชนิด รวมไปถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวกแมลง แต่ความเข้าใจเรื่องการแพร่กระจายของแบคทีเรียเหล่านี้ในแมลงชนิดต่าง ๆ ยังมีอยู่น้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการสำรวจเบื้องต้นเพื่อตรวจหาความชุกชุมของแบคทีเรียร่วมอาศัยทั้งสองกลุ่มในประชากรแมลงจังหวัดนครปฐม โดยใช้การตรวจด้วยวิธี PCR และใช้ DNA primers ที่จำเพาะต่อ *Wolbachia* และ *Rickettsia* จากการสำรวจแมลงจำนวน 113 ตัว จัดเป็น 4 อันดับ คือ Hymenoptera Lepidoptera Coleoptera และ Diptera จำแนกได้เป็น 20 ชนิด พบแมลงที่มี DNA ของ *Wolbachia* อยู่ 4 ชนิด คือ มดละเอียด (*Monomorium* sp.) ฝีเสื้อขาวแคระ (*Leptosia nina*) ฝีเสื้อแพนซีสีตาล (*Junonia lemonias*) และแมลงวันหลังค่อม (*Megaselia scalaris*) ส่วนแมลงที่พบ DNA ของ *Rickettsia* คือ ยุงรำคาญ (*Culex* sp.) และแมลงวันหลังค่อม (*M. scalaris*) การตรวจพบจากงานวิจัยนี้จะนำไปสู่การตรวจสอบในระดับชนิดของ *Wolbachia* และ *Rickettsia* ในการศึกษาต่อไป เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียร่วมอาศัยเหล่านี้ และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการเจาะกลุ่มแมลงเพื่อศึกษาการกระจายของกลุ่มแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงกลุ่มที่จำเพาะมากขึ้น

คำสำคัญ: แมลง แบคทีเรียร่วมอาศัย *Wolbachia* *Rickettsia*

A Preliminary Observation for Screening the Prevalence of Endosymbionts in Insects from Nakhon Pathom, Thailand

Panupong Thongprem^{1*}, Suwitchaya Pratumrach¹ and Sarunwitch Cheensae¹

¹Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom

*thongprem_p@su.ac.th

Abstract

Living organisms commonly harbour endosymbiotic bacteria within their cells, which can have a significant impact on the host's biology and evolution. Among these endosymbionts, *Wolbachia* and *Rickettsia* have been identified as widespread bacteria that associate with various eukaryotic hosts, including invertebrates such as insects. However, our understanding of the distribution and transmission of these endosymbionts among different insect species remains inadequate. Therefore, this research aims to conduct a preliminary survey to investigate the prevalence of the both endosymbiotic bacteria in insect populations in Nakhon Pathom province. The screening was performed using PCR assays with specific DNA primers for both *Wolbachia* and *Rickettsia*. The observation of 113 insect individuals, representing 4 insect orders, i.e., Hymenoptera, Lepidoptera, Coleoptera and Diptera, and classified as 20 species. Four species were found to be positive for *Wolbachia*, i.e., *Monomorium sp.*, *Leptosia nina*, *Junonia lemonias* and *Megaselia scalaris*. However, *Rickettsia* was detected in *Culex sp.* and *M. scalaris*. The findings from this research will be used for further investigations into the strain-level of *Wolbachia* and *Rickettsia*, to better understand the evolutionary relationships of these endosymbiotic bacteria. Additionally, these results may provide basic knowledge for narrowing down a particular insect group to study the distribution of endosymbiotic bacteria that are more specific to certain insect taxa.

Keywords: Insects, Endosymbionts, *Wolbachia*, *Rickettsia*

1. บทนำ

สิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีวิวัฒนาการร่วมกันกับแบคทีเรียร่วมอาศัย ซึ่งดำรงชีวิตอยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์ จุลชีพเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัวแปรที่สำคัญในการขับเคลื่อนวิวัฒนาการและชีววิทยาของโฮสต์ในกลุ่มยูคาริโอต ตั้งแต่สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวจำพวก micro-eukaryote จนถึงกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดโดยเฉพาะแมลง แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งผลกระทบต่อทั้งเชิงลบและเชิงบวกต่อชีววิทยาของแมลง ตัวอย่างการเกิดผลกระทบเชิงลบ เช่น ส่งผลต่อการกำหนดเพศของแมลงบางชนิด ทำให้มีสัดส่วนของเพศผู้และเพศเมียไม่สมดุลกันในประชากร [1, 2] ส่งผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อน โดยเหนี่ยวนำการเกิด cytoplasmic incompatibility (CI) [3, 4] และการลด fitness ต่าง ๆ ของแมลง [5-7] ส่วนผลกระทบเชิงบวก มักมีส่วนในการส่งเสริม fitness ของแมลงให้ดีขึ้น เช่น ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด [8, 9] ทนต่อการ



เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ [10] และการสร้างสารอาหารที่จำเป็นต่อแมลง [11] เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของโฮสต์และชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัย

แบคทีเรียร่วมอาศัยเหล่านี้มีความหลากหลายมาก โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม Proteobacteria เช่น *Rickettsia* และ *Wolbachia* สิ่งมีชีวิตเหล่านี้ต้องดำรงชีวิตอยู่ในเซลล์ของโฮสต์เท่านั้น จึงมีชื่อเรียกกลุ่มแบคทีเรียที่มีการดำรงชีวิตเช่นนี้ว่า ‘endosymbiont’ โดยส่วนใหญ่ *Wolbachia* มักถูกนำมาศึกษาในแง่ของการใช้เป็นแบคทีเรียที่ช่วยควบคุมประชากรของแมลงที่เป็นพาหะของโรคติดต่อหลายชนิด เช่น ยุงลาย เพราะ *Wolbachia* มักมีบทบาทในการเป็น reproductive parasite ที่ทำให้เกิด cytoplasmic incompatibility ได้ในยุงหลายชนิด [3, 12, 13] อีกทั้งในหลายการศึกษาได้ชี้ให้เห็นว่า *Wolbachia* เป็น endosymbionts ที่สามารถพบได้มากที่สุด (มากกว่า 50%) ของประชากรแมลงในธรรมชาติ [14] อย่างไรก็ตาม *Rickettsia* มักถูกศึกษาในแง่ของการศึกษาการก่อโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เนื่องจาก *Rickettsia* เคยเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในประวัติศาสตร์ของมนุษย์ เช่น โรคไข้รากสาดใหญ่ (typhus) และโรคไข้พุงเทือกเขาร็อกกี้ (Rocky Mountain spotted fever) เป็นต้น [15, 16] ดังนั้นการศึกษา *Rickettsia* จึงเน้นการศึกษาไปในการแพทย์เป็นส่วนใหญ่ แต่ข้อมูลเกี่ยวกับการแพร่กระจายและบทบาทที่มีต่อชีววิทยาของโฮสต์ยังมีอยู่น้อย

ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความชุกชุมของแมลงที่เป็นโฮสต์ให้กับ *Wolbachia* และ *Rickettsia* โดยใช้เทคนิค PCR จากการสุ่มตรวจจากประชากรแมลงบางชนิดในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ซึ่งเป็นจังหวัดที่ตั้งอยู่บริเวณที่ราบลุ่มภาคกลางตอนล่าง ลักษณะพื้นที่ที่มีความหลากหลายโดยเฉพาะพื้นที่เกษตรกรรม คิดเป็นร้อยละ 58.78 ของพื้นที่จังหวัดนครปฐม [17] ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่เกษตรกรรมมาจากระบบคลองชลประทานที่เข้าถึงได้หลายพื้นที่ และมีแม่น้ำท่าจีนตัดผ่าน โดยปัจจัยเหล่านี้จะพบการแพร่กระจายของแมลงหลายชนิดที่เป็นโฮสต์ให้กับ endosymbionts เหล่านี้

2. วิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างแมลงชนิดต่าง ๆ ในจังหวัดนครปฐม ในพื้นที่ทุ่งหญ้าใกล้กับพื้นที่เกษตรกรรมด้วยวิธีการใช้สวิงโฉบ โดยจับแมลงที่พบในพื้นที่สำรวจด้วยวิธีการมองหาแบบเห็นตัว (visual encounter survey) และสุ่มใช้สวิงโฉบบนยอดหญ้าหรือพุ่มไม้ (random sweep) หรืออาจมีการใช้กับดักแมลง นำตัวอย่างของแมลงขนาดเล็กที่เก็บได้รักษาสภาพใน 95% EtOH เพื่อนำมาสกัด DNA [5, 14, 18, 19] หากเป็นแมลงตัวเต็มวัยขนาดใหญ่จะถูกทำให้ตายอย่างสงบด้วยการใช้โหลสลบแมลงที่เปิดสนิทภายในบรรจุสุภาสุบ Ethyl acetate ซึ่งมีความเป็นพิษต่อคนน้อย โดยเปิดใช้ในที่โล่ง [20] หากสามารถนำแมลงที่มีชีวิตกลับมาที่ห้องปฏิบัติการได้จะนำมาทำให้ตายอย่างสงบด้วยวิธี Rapid Chilling [21] โดยการนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 -20°C เป็นเวลาประมาณ 15-30 นาที หรือจนกว่าแมลงจะตายสนิท

ตัวอย่างแมลงที่ถูกเก็บรักษาสภาพจะถูกนำมาสกัด DNA ด้วยวิธี SDS-EB [22] หากเป็นแมลงที่มีขนาดเล็กตั้งแต่ 5 มิลลิเมตร เป็นต้นไปจะใช้ทั้งตัวในการสกัด DNA แต่หากแมลงมีขนาดใหญ่หรือมีความยาวลำตัวมากกว่า 5 มิลลิเมตร ขึ้นไป จะเลือกใช้ส่วนขาหรือตัดเนื้อเยื่อบริเวณปลายสุดของส่วนท้องในการสกัด DNA [19]

นำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจหา *Rickettsia* และ *Wolbachia* โดยวิธี PCR การทำ PCR จะทำ 2 ขั้นตอนคือ ใช้ universal primers สำหรับเพิ่มจำนวน DNA ในตำแหน่งยีน COI ของแมลงที่เป็น host เพื่อใช้ในการตรวจคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ โดย primers ที่ใช้คือ LCO_2190 / HCO_2198 [23] จากนั้นเมื่อมั่นใจว่า DNA ที่สกัดได้มีคุณภาพเพียงพอจึงใช้ specific primers ที่มีความจำเพาะกับ endosymbionts ทั้ง 2 กลุ่ม โดย primers สำหรับ *Rickettsia* คือ RiGltA405_F / RiGltA1193_R [18] ในการเพิ่มจำนวน DNA ในตำแหน่งยีน citrate synthase (*gltA*) ส่วน primers สำหรับ *Wolbachia* คือ *ftsZF* และ *ftsZR* [24] ในการเพิ่มจำนวน DNA ในตำแหน่งยีน 16S rRNA ลำดับเบสและสถานะอุณหภูมิที่เหมาะสมของ primers ต่าง ๆ รวมถึงระยะเวลาในการทำ PCR assays แสดงในตารางที่ 1 การเลือกใช้ primers ทั้งสองเนื่องจากได้ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามีความจำเพาะอย่างมากต่อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม การทำ PCR แต่ละครั้งจะใช้ positive control จาก

ตัวอย่าง DNA ที่เคยทดสอบแล้วว่าไม่มี DNA ของ *Wolbachia* และ *Rickettsia* อยู่จริง ส่วน negative control จะใช้น้ำสะอาด (molecular graded water) ที่ไม่มีการปนเปื้อนของ DNA ใดในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์เบื้องต้นจะรายงานเป็นจำนวนแมลงที่พบการติดเชื้อของ *Wolbachia* และ *Rickettsia* จากประชากรของแมลงในวงศ์ต่าง ๆ ที่สำรวจได้

ตารางที่ 1 ข้อมูลลำดับเบสของ primers ต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ โดยการทำให้ PCR ของ primers ทั้งสามชุดจะใช้สภาวะและอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนเหมือนกันดังนี้ initial denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที, ตามด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่ 35 cycles ดังนี้ denaturation (94°C เป็นเวลา 30 วินาที) annealing (Ta°C เป็นเวลา 30 วินาที) extension (72°C เป็นเวลา 50 วินาที) หลังจากครบ 35 cycles แล้ว ต่อด้วยขั้นตอน final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

ยีน และสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย	ชื่อของ primers	Sequence (5'-3')	Ta (°C)	Product size (bp)	Ref.
ยีน <i>COI</i> ของแมลง	<i>LCO_1490</i> <i>HCO_2198</i>	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	52	380	[23]
ยีน <i>gltA</i> ของ <i>Rickettsia</i>	<i>RiGltA405_F</i> <i>RiGltA1193_R</i>	GAT CAT CCT ATG GCA TCT TTC CAT TGC CCC	54	786	[18]
ยีน <i>ftsZ</i> ของ <i>Wolbachia</i>	<i>ftsZF</i> <i>ftsZR</i>	GTA TGC CGA TTG CAG AGC TTG GCC ATG AGT ATT CAC TTG GCT	54	420	[24]

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

จากการสำรวจพบแมลงจำนวน 113 ตัว จำแนกได้เป็น 4 อันดับ คือ Hymenoptera Coleoptera Lepidoptera และ Diptera สามารถจำแนกทั้งหมดได้ 20 ชนิด จากผลการตรวจด้วยวิธี PCR พบ *Wolbachia* ใน DNA ของแมลง 4 ชนิดได้แก่ มดละเอียด (*Monomorium* sp.) ผีเสื้อขาวแคระ (*Leptosia nina*) ผีเสื้อแพนซีสีตาล (*Junonia lemonias*) และ แมลงวันหลังค่อม (*Megaselia scalaris*) ส่วนแมลงที่ตรวจพบ *Rickettsia* จากวิธี PCR ได้แก่ ยุงรำคาญ (*Curex* sp.) และแมลงวันหลังค่อม (*M. scalaris*) ดังแสดงในตารางที่ 2

การศึกษาในครั้งนี้ได้พบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในประชากรของมดละเอียด (*Monomorium* sp.) โดยมีการรายงานการติดเชื้อ *Wolbachia* ในมดสกุลเดียวกันชนิด *Monomorium pharaonis* และพบบทบาทสำคัญในเบื้องต้นว่า *Wolbachia* มีผลทำให้ประชากรของมด *M. pharaonis* มีการผลิตมดวรรณะนางพญาเร็วกว่าประชากรที่ไม่มีการติดเชื้อ *Wolbachia* [25] ซึ่งส่งผลต่อการแพร่กระจายพันธุ์ที่เร็วขึ้น และอาจเป็นไปได้ว่าหาก *Wolbachia* ที่พบในมดละเอียดนี้เป็นกลุ่มเดียวกันก็อาจส่งผลต่ออัตราการผลิตมดนางพญาเช่นเดียวกันด้วย

ถึงแม้การศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีรายงานพบ *Wolbachia* เป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยในบางประชากรของผีเสื้อขาวแคระ และผีเสื้อแพนซีสีตาลจากประเทศอินเดีย [26] และยังคงมีการตรวจพบ *Wolbachia* ในประชากรของแมลงวันหลังค่อมในประเทศอเมริกาแล้ว [27] การศึกษาในครั้งนี้ก็เป็นหลักฐานอีกขั้นหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่า แมลงเหล่านี้ที่มีการแพร่กระจายอยู่ในประเทศไทยก็มีแบคทีเรียร่วมอาศัยเหล่านี้ด้วย อาจสะท้อนให้เห็นถึงรูปแบบการแพร่กระจายพันธุ์ของแมลงไปตามเขตภูมิศาสตร์ต่าง ๆ แต่ถึงอย่างไรก็ตามยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่า *Wolbachia* เหล่านี้จะเป็นชนิดเดียวกันกับที่พบจากการศึกษาก่อนหน้า และยังไม่ทราบถึงบทบาทของ *Wolbachia* ได้



ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนของแมลงที่พบ และผลสำรวจการติดเชื้อของ endosymbionts ด้วยวิธีการ PCR โดยแบ่งพื้นที่สำรวจออกเป็นเขตพื้นที่การปกครองระดับอำเภอในจังหวัดนครปฐม คือ B = บางเลน K = กำแพงแสน M = เมือง และ N = นครชัยศรี na = ยังไม่สามารถระบุผลการตรวจสอบด้วยวิธี PCR ได้

อันดับ	วงศ์	ชนิด	พื้นที่	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	จำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อ	
					<i>Wolbachia</i>	<i>Rickettsia</i>
Hymenoptera	Formicidae	<i>Monomorium</i> sp.	M	20	10	-
	Apidae	<i>Apis cerana</i>	K	20	-	-
		<i>A. cerana</i>	N	4	-	-
	Anthophoridae	<i>Ceratina</i> sp.	N	2	-	-
Coleoptera	Tenebrionodae	<i>Tenebrio molitor</i>	M	20	-	-
	Coccinellidae	<i>Coccinella transversalis</i>	N	1	-	-
Lepidoptera	Papilionidae	<i>Papilio palytes</i>	M	1	na	-
		<i>Graphium agamemnon</i>	M	2	na	-
	Pieridae	<i>Catopsilia pomona</i>	M	2	-	-
		<i>Appias olferna</i>	M	1	-	-
		<i>Ixias pyrene</i>	M	1	-	-
		<i>Leptosia nina</i>	M	5	5	-
	Nymphalidae	<i>Elymnias hypermnestra</i>	M	1	-	-
		<i>Tirumala limniace</i>	M	2	-	-
		<i>Junonia lemonias</i>	M	1	1	-
		<i>Ideopsis similis</i>	M	1	na	-
		<i>Danaus genutia</i>	M	2	na	-
	Lycaenidae	<i>Zizula hylax</i>	M	3	na	-
Diptera	Culicidae	<i>Culex</i> sp.	B	1	na	1
	Chironomidae	<i>Chironomus</i> sp.	N	3	-	-
	Phoridae	<i>Megaselia scalaris</i>	M	20	7	1

การตรวจพบ *Rickettsia* เบื้องต้นในแมลงกลุ่ม Diptera ถือว่าเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เนื่องจากยุงรำคาญ (*Culex* sp.) และแมลงวันหลังค่อม (*Megaselia scalaris*) จัดเป็นกลุ่มแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ [28, 29] มีวงจรชีวิตสั้นสามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อที่จะใช้เป็นโมเดลในการศึกษาอิทธิพลของ *Rickettsia* ต่อชีววิทยาของโฮสต์ในแง่ของวิวัฒนาการ อีกทั้งยังเคยมีรายงานการค้นพบ *Rickettsia* ในกลุ่ม torix ในยุงก้นปล่อง (*Anopheles plumbeus*) จากประเทศอังกฤษ [30] โดย *Rickettsia* ในกลุ่มนี้ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลังแต่มีส่วนสำคัญในการกำหนดชีววิทยาบางประการของสัตว์ที่เป็นโฮสต์ [5, 19, 31]

ในการศึกษาต่อไปจะต้องศึกษาถึงชนิดหรือสายพันธุ์ของ *Wolbachia* และ *Rickettsia* ที่พบในแมลงชนิดต่าง ๆ ซึ่งอาจใช้เทคนิค DNA barcoding และนำข้อมูลลำดับเบสของแบคทีเรียเหล่านี้มาวิเคราะห์ Phylogenetic tree เพื่อที่จะทำให้เข้าใจถึงความหลากหลายของแบคทีเรียร่วมอาศัย และอาจใช้อุ่นภูมามานถึงบทบาทของแบคทีเรียต่อชีววิทยาของโฮสต์ได้ ถึงแม้

การศึกษาในครั้งนี้ยังไม่ทราบถึงชนิดหรือกลุ่มของ *Rickettsia* และ *Wolbachia* ที่ชัดเจน แต่ก็ได้ผลการศึกษาที่สำคัญและสามารถใช้เป็นแนวทางในการเจาะกลุ่มแมลงเพื่อศึกษาการกระจายของกลุ่มแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงกลุ่มที่จำเพาะมากขึ้น เพื่อให้มีความสะดวกต่อการศึกษาเชิงวิวัฒนาการของแมลงที่ถูกขับเคลื่อนโดยแบคทีเรียร่วมอาศัยเหล่านี้

4. สรุปผล

จากการศึกษาความชุกชุมของแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงจำนวน 20 ชนิด ที่สำรวจในจังหวัดนครปฐม ด้วยวิธี PCR พบแมลงจำนวน 4 ชนิด มี DNA ของ *Wolbachia* ได้แก่ มดละเอียด (*Monomorium* sp.) ผีเสื้อขาวแคระ (*Leptosia nina*) ผีเสื้อแพนซีสีตาล (*Junonia lemonias*) และ แมลงวันหลังค่อม (*Megaselia scalaris*) ส่วนแมลงจำนวน 2 ชนิด คือ ยุงรำคาญ (*Culex* sp.) และ แมลงวันหลังค่อม (*M. scalaris*) ตรวจพบ DNA ของ *Rickettsia* ซึ่งแมลงสองชนิดนี้จัดเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์และน่าจะสามารถนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาบทบาทต่อโฮสต์ในแง่ของวิวัฒนาการ ที่ง่ายต่อการศึกษาในห้องปฏิบัติการ

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับอาจารย์หลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก จากกองทุนสนับสนุนการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ 2565

6. คำชี้แจง

การใช้สัตว์ในการวิจัยนี้ได้ผ่านการขออนุญาตการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (คกส. มสภ.) โครงการเลขที่ 14/2565 ใบอนุญาตการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์เลขที่ U1-09605-2564

7. เอกสารอ้างอิง

- [1] Werren, J. H., Hurst, G. D., Zhang, W., Breeuwer, J. A., Stouthamer, R., & Majerus, M. E. (1994). Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *Journal of Bacteriology*, 176(2), 388-394
- [2] Jiggins, F. M. (2003). Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics*, 164(1), 5-12.
- [3] Atyame, C. M., Pasteur, N., Dumas, E., Tortosa, P., Tantely, M. L., Pocquet, N., Licciardi, S., Bheecarry, A., Zumbo, B., Weill, M., & Duron, O. (2011). Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the south-western indian ocean. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(12), e1440.
- [4] Narita, S., Shimajiri, Y., & Nomura, M. (2009). Strong cytoplasmic incompatibility and high vertical transmission rate can explain the high frequencies of *Wolbachia* infection in Japanese populations of *Colias erate poliographus* (Lepidoptera: Pieridae). *Bull Entomol Res*, 99(4), 385-391.
- [5] Thongprem, P., Evison, S. E. F., Hurst, G. D. D., & Otti, O. (2020). Transmission, tropism, and biological impacts of torix *Rickettsia* in the common bed bug *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Frontiers in microbiology*, 11, 608763.



- [6] Goodacre, S. L., Martin, O. Y., Bonte, D., Hutchings, L., Woolley, C., Ibrahim, K., George Thomas, C., & Hewitt, G. M. (2009). Microbial modification of host long-distance dispersal capacity. *BMC Biol*, 7, 32.
- [7] White, J. A., Kelly, S. E., Cockburn, S. N., Perlman, S. J., & Hunter, M. S. (2011). Endosymbiont costs and benefits in a parasitoid infected with both *Wolbachia* and *Cardinium*. *Heredity*, 106(4), 585-591.
- [8] Jones, J. E., & Hurst, G. D. D. (2020). Symbiont-mediated protection varies with wasp genotype in the *Drosophila melanogaster*–*Spiroplasma* interaction. *Heredity*, 124(4), 592-602.
- [9] Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., & Strohm, E. (2005). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Curr Biol*, 15(5), 475-479.
- [10] Brumin, M., Kontsedalov, S., & Ghanim, M. (2011). *Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Science*, 18(1), 57-66.
- [11] Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.-Y., & Fukatsu, T. (2010). *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *PNAS*, 107(2), 769-774.
- [12] Atyame, C. M., Delsuc, F., Pasteur, N., Weill, M., & Duron, O. (2011). Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2761-2772.
- [13] Johnson, K. N. (2015). The Impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes. *Viruses*, 7(11).
- [14] Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., & Hurst, G. D. (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology*, 6(27).
- [15] Parola, P., Paddock, C. D., & Raoult, D. (2005). Tick-borne Rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719-756.
- [16] Perlman, S. J., Hunter, M. S., & Zchori-Fein, E. (2006). The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 2097-2106.
- [17] Nakhon Pathom Provincial Office. (2017). Summarizing report of Nakhon Pathom Province in 2017. Provincial Government Center, Nakhon Pathom. (In Thai)
- [18] Pilgrim, J., Ander, M., Garros, C., Baylis, M., Hurst, G. D. D., & Siozios, S. (2017). Torix group *Rickettsia* are widespread in *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), reach high frequency and carry unique genomic features. *Environ Microbiol*, 19(10), 4238-4255.
- [19] Thongprem, P., Davison, H. R., Thompson, D. J., Lorenzo-Carballa, M. O., & Hurst, G. D. D. (2020). Incidence and Diversity of Torix *Rickettsia*–Odonata Symbioses. *Microbial Ecology*.
- [20] Loru, L., Sassu, A., Fois, X., & Pantaleoni, R. A. (2010). Ethyl acetate: a possible alternative for anaesthetizing insects. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)*, 46(3-4), 422-424.
- [21] Rayl, R. J. (2018). Anesthesia methods and the agroecology of *Scaptomyza flava* (Drosophilidae), a Brassicaceae pest in New Zealand and associated parasitoid, *Asobara nr. persimilis* (Braconidae) Lincoln University. New Zealand.
- [22] Kamiya, M., & Kiguchi, T. (2003). Rapid DNA extraction method from soybean seeds. *Breeding Science*, 53(3), 277-279.



- [23] 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(5), 294-299.
- [24] Werren, J. H., Zhang, W., & Guo, L. R. (1995). Evolution and Phylogeny of Wolbachia: Reproductive Parasites of Arthropods. *Proceedings: Biological Sciences*, 261(1360), 55-63.
- [25] Singh, R., & Linksvayer, T. A. (2020). Wolbachia-infected ant colonies have increased reproductive investment and an accelerated life cycle. *J Exp Biol*, 223(9).
- [26] Salunke Bipinchandra, K., Salunkhe Rahul, C., Dhotre Dhiraj, P., Walujkar Sandeep, A., Khandagale Avinash, B., Chaudhari, R., Chandode Rakesh, K., Ghate Hemant, V., Patole Milind, S., Werren John, H., & Shouche Yogesh, S. (2012). Determination of Wolbachia Diversity in Butterflies from Western Ghats, India, by a Multigene Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4458-4467.
- [27] Chen, J., Camello, J., & Hafen, L. (2014). Wolbachia infection rates in Los Angeles basin humped-back flies (insecta: Diptera: phoridae). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 113, 140.
- [28] Solgi, R., Djadid, N. D., Eslamifar, A., Raz, A., & Zakeri, S. (2017). Morphological and Molecular Characteristic of *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae) Larvae as the Cause of Urinary Myiasis. *Journal of Medical Entomology*, 54(3), 781-784.
- [29] Molaei, G., Andreadis, T. G., Armstrong, P. M., Anderson, J. F., & Vossbrinck, C. R. (2006). Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerg Infect Dis*, 12(3), 468-474.
- [30] Pilgrim, J., Thongprem, P., Davison, H. R., Siozios, S., Baylis, M., Zakharov, E. V., Ratnasingham, S., deWaard, J. R., Macadam, C. R., Smith, M. A., & Hurst, G. D. D. (2021). *Torix Rickettsia* are widespread in arthropods and reflect a neglected symbiosis. *GigaScience*, 10(3).
- [31] Kikuchi, Y., & Fukatsu, T. (2005). *Rickettsia* infection in natural leech populations. *Microbial Ecology*, 49, 265–271.