

หัวข้อคุณิพนธ์	การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสัณฐานวิทยา และ โปรตีนใน กระเพาะอาหารและต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่องเพศเมีย <i>Anopheles dissidens</i> ระหว่างการเจริญเติบโตในระยะตัวเต็มวัยและการกิน เลือด และความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะอาหาร	
ผู้เขียน	นางสาวเบญจรัตน์ พัฒนวิบูลย์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ.ดร.นริศรา จริยะพันธุ์ ผศ.ดร.อัญชลิ วรรณสาร อ.ดร.ขวัญจิต ดวงสงค์ อ.ดร.พัชรา ศรีวิชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในธรรมชาติเชื้อมาลาเรียอาศัยอยู่ในยุงพาหะและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งในยุงพาหะนั้น เชื้อมาลาเรียต้องการสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการพัฒนา การเพิ่มจำนวน และการถ่ายทอดเชื้อสู่โฮสต์ตัวใหม่ โดยทั่วไประยะเวลาการสร้างสปอร์โรซอยต์ในยุงพาหะใช้เวลาประมาณ 10 ถึง 21 วัน ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียและอุณหภูมิระหว่างที่อาศัยในยุงพาหะ ในประเทศไทย ยุงก้นปล่อง *Anopheles dissidens* เป็นยุงที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ในการศึกษานี้ได้ออกแบบมา เพื่อศึกษาความเปลี่ยนแปลงลักษณะทางด้านกายวิภาค และสรีรวิทยาของกระเพาะอาหารและต่อมน้ำลายของเพศเมียในช่วงระหว่างการเจริญเติบโตในระยะตัวเต็มวัยของยุงและหลังการกินเลือดอย่างต่อเนื่อง รวมไปถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะอาหารของยุงด้วย

จากการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของกระเพาะอาหารของยุงก้นปล่องเพศเมีย *An. dissidens* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่ากระเพาะอาหารของยุงชนิดนี้มีพัฒนาการอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ภายใน 3 วัน เยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารประกอบไปด้วย electrondense vesicles ที่กระจายอยู่หนาแน่น ในส่วนของด้านในกระเพาะอาหาร ไมโครวิลไล (MV) ถูกปกคลุมด้วยร่างแห microvilli-associated network (MN) การ

เปลี่ยนแปลงของสัณฐานวิทยา ของกระเพาะอาหารของยุงชนิดนี้ พบว่าเริ่มเกิดขึ้นทันทีหลังจากการกินเลือด โดยพบว่า ภายในกระเพาะอาหารถูกล้อมรอบด้วย peritrophic matrix (PM) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวเป็นชั้นเดียวระหว่างชั้น electrondense และชั้น electronlucent ในช่วงเวลาสุดท้ายหลังจากย่อยเลือดหมดแล้ว โครงสร้างของกระเพาะอาหารจะกลับคืนสู่สภาพเดิมเหมือนเช่นก่อนการกินเลือด นอกจากนี้โปรตีนของกระเพาะอาหารยุงที่กินน้ำตาลได้รับการวิเคราะห์และจำแนกทั้งหมด 66 จุด โดยใช้วิธี 2-DE และ nano LC-MS โดยพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต

จากการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของต่อมน้ำลายยุงก้นปล่องเพศเมีย *An. dissidens* โดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าโครงสร้างต่อมน้ำลายยุงเพศเมียแบ่งออกได้ชัดเจนเป็น 3 พู ได้แก่ พูกลาง 1 พู และ พูข้าง 2 พู โดยพูข้างแบ่งเป็นส่วนบนและส่วนล่าง ซึ่งแต่ละพูจะประกอบด้วยโปรตีนหลักที่แตกต่างกัน หลังจากยุงลอกคราบ ต่อมน้ำลายมีการสะสมน้ำลายอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ภายใน 3 วัน การเสื่อมของต่อมน้ำลาย ได้แก่ การสูญเสียการกักเก็บสารหลังและการเพิ่มจำนวนของ cytoplasmic vacuolation และ concentric lamellar structures ซึ่งพบในยุงอายุ 16 วัน จากการวิเคราะห์โปรตีนต่อมน้ำลายยุงด้วยวิธี 2-DE และ nano LC-MS พบว่า มีโปรตีนหลักอย่างน้อย 17 จุด ที่แสดงออกตั้งแต่อายุ 1 วัน ถึง 21 วัน แม้ว่าการแสดงออกของโปรตีนนั้นมีความหลากหลาย แต่สามารถแบ่งรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนได้ 4 แบบ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนหลัก 15 จุด ได้ลดลงหลังจากการกินเลือดอย่างมีนัยสำคัญ โดยการลดลงนั้นพบตั้งแต่ร้อยละ 8.5 ถึง 68.11 ประกอบด้วย putative mucin-like proteins anti-platelet protein long form D7 salivary proteins putative gVAG protein precursor D7-related 3.2 protein gSG7 proteins และ gSG6 protein

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะอาหารยุงก้นปล่อง *An. dissidens* ครั้งนี้ ถูกจัดจำแนกทั้งวิธีที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีที่ไม่ได้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียส่วนมากที่พบในยุงก้นปล่อง *An. dissidens* อยู่ในสกุล *Enterobacter* และ *Pseudomonas* (ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ) กับ *Thorsellia* และ *Asaia* (ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ)

โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยให้เข้าใจถึงจุดเริ่มต้นที่มีอิทธิพลต่อการเป็นพาหะจากความ สัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ ในกระเพาะอาหารและต่อมน้ำลายยุงภายใต้การเจริญเติบโตในระยะตัวเต็มวัยและหลังการกินเลือด และแบคทีเรียที่จำแนกได้จากยุงชนิดนี้จะสามารถนำไปทดสอบความเหมาะสมในการเป็น paratransgenic candidates

Dissertation Title	Analysis of Morphological and Protein Changes in the Midgut and Salivary Glands of Female <i>Anopheles dissidens</i> During Adult Development and Blood Feeding and Bacterial Diversity in the Midgut	
Author	Ms. Benjarat Phattanawiboon	
Degree	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Narissara Jariyapan	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Anchalee Wannasan	Co-advisor
	Dr. Kwanjit Duangsonk	Co-advisor
	Dr. Patchara Sriwichai	Co-advisor

ABSTRACT

Malaria parasites circulate naturally between mosquito vectors and vertebrate hosts. Parasites in mosquito vectors require a suitable environment for development, multiplication and transmission to a new host. In general, the sporogonic cycle has been reported as approximately 10-21 days, depending on the parasite species and temperature. *Anopheles dissidens* is a potential malaria vector of *Plasmodium vivax* in Thailand. A series of experiments was designed in this study to investigate changes in the anatomical and physiological characteristics of the female midgut and salivary glands during adult development and blood feeding status, as well as diversity of bacteria in the midgut.

Midgut morphology of the female *An. dissidens* were analyzed using SEM and TEM. The midgut developed dramatically and matured within 3 days. Midgut epithelial cells consisted of abundant electrondense vesicles. Microvilli in the luminal side were covered by a microvilli-associated network (MN). The start of morphological changes was observed in the midgut immediately after blood feeding. The peritrophic matrix (PM) was formed by surrounding the luminal side and then being united by forming layers of electrondense and electronlucent regions. After completing blood digestion, the midgut returned to the same condition as before blood feeding. Additionally, midgut proteins of

the sugar fed mosquitoes were analysed and identified using 2-DE coupled with nano LC-MS. There were 66 midgut protein spots being discovered. The most abundant proteins involved carbohydrate metabolism.

Salivary gland morphology of the female of *An. dissidens* were analyzed using light microscopy and TEM. The female glands consisted of a distinctive tri-lobed structure connected to a main salivary canal, single medial and two lateral lobes with proximal and distal portions. Each lobe region contained different major proteins. Following emergence, the glands rapidly accumulated secretory material and developed completely within 3 days. Degenerative changes including loss of stored secretion and increased cytoplasmic vacuolation as well as concentric lamellar structures were observed from day 16 post emergence. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis coupled with nano LC-MS analysis showed that at least 17 major protein spots were presented from day one to day 21 post. Although variation was observed, the patterns of protein expression could be placed into one of four groups. Moreover, the fifteen protein spots showed significant depletion after blood feeding, with the percentage amount of depletion ranging from 8.5% to 68.11%, including the putative mucin-like proteins, anti-platelet protein, long form D7 salivary proteins, putative gVAG protein precursor, D7-related 3.2 protein, gSG7 proteins, and gSG6 protein.

Diversity of bacteria in the midgut was characterized by culture dependent and culture independent methods. Predominant bacteria found in the *An. dissidens* belonged to the genera *Enterobacter* and *Pseudomonas* (cultivable bacteria), and *Thorsellia* and *Asaia* (uncultivable bacteria).

The information obtained from this study would help in understanding the initial influence on vector competence from the correlation of characteristic changes in the midgut and salivary glands during adult development and after blood feeding. All of the bacteria isolated from the mosquito would be evaluated further for their suitability as a paratransgenic candidate.