Thesis Title Molecular Study on Sodium Channel Gene Point Mutation and the Association with Insecticide Resistance in *Aedes aegypti*

Author Miss Jintana Yanola

Degree Doctor of Philosophy (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason	Co-advisor
Dr. La-aied Prapanthadara	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-advisor

ABSTRACT

Insecticides have been used for control of mosquito-borne diseases for decades and consequently cause development of resistant mechanisms in mosquito species. One of the important mechanisms is the mutations of voltage-gated sodium channel gene, the primary target of pyrethroids, resulting reduced sensitivity of the target sites known as knockdown resistance (*kdr*). The objectives of this study were 1) determine the point mutation of voltage-gate sodium channel gene in *Aedes aegypti*, PMD-R strain which is resistant to permethrin compared with the susceptible strains by using RT-PCR and DNA sequencing. 2) determine the genetic characteristic of the point mutation by crossing experiments. 3) develop molecular tools for determining the point mutation in *Ae. aegypti* populations in Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The results revealed that the PMD-R strain has an amino acid substitution phenylalanine (F) to cysteine (C), at an amino acid position 1534 in the IIIS6 coding region of sodium channel sequences which had never been reported elsewhere. The genetic study indicated that the permethrin resistance was autosomal and incompletely recessive phenotypes and highly associated with the homozygous mutation (C/C1534). Backcrossing experiment indicated a number of unlinked gene contribute to resistance suggesting the involvement of other resistance mechanisms. Adding an oxidase inhibitor in larval bioassay resulted in a decrease of permethrin resistant level of F1 hybrid close to that of the parents. Therefore, permethrin resistance of PMD-R was mainly due to F1534C mutation of the sodium channel gene and partly oxidase enzymes.

Two monitoring tools for detection of F1534C mutation have been successfully developed; a TaqMan SNP genotyping (TaqMan SNP) and an Allele Specific PCR (AS-PCR) assays. The former was as good as the DNA sequencing where as the latter slightly overestimated the mutant allele frequency by 1.8% in wild-caught samples. The AS-PCR assay using 619 individuals from 20 localities of Thailand show that the mutant C1534 allele was widely distributed throughout Thailand with frequencies varied among populations from 0.20 to 1.00 (overall 0.77). This mutation was very closely associated with the permethrin resistant phenotype. However, 19 permethrin-resistant individuals did not have F1534C mutation but homozygous for V1016G and S989P mutations in domain II were examined by DNA sequencing. The assays can be used for the rapid detection of the F1534C resistance mutation in *Ae. aegypti* populations. The efficacy of pyrethroids for controlling *Ae.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

aegypti may be limited due to the mutation of voltage-gated sodium channels. Selection of appropriate insecticide and other control methods is necessary.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาระดับโมเลกุลของการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่ง ที่ช่องโซเดียมยีน และความสัมพันธ์กับการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงในยุงลาย *Aedes aegypti*

ผู้เขียน นางสาวจินตนา ยาโนละ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา สมบูรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. นพ. คม สุคนธสรรพ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. ละเอียด ประพันธดารา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวังโกศล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

สารเคมีฆ่าแมลงถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคที่มียุงเป็นพาหะมาหลายสิบปี ทำให้ยุงสร้างกลไกการต่อต้านสารเคมีฆ่าแมลงในรูปแบบต่างๆ ที่สำคัญประการหนึ่งคือ การกลายพันธุ์ของยีนช่องขับโซเดียม (voltage-gated sodium channel gene) ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ที่สำคัญของสารไพรีทรอยด์ มีผลทำให้ความไวของระบบประสาทต่อการรับสารไพรีทรอยด์ลดลง หรือที่เรียกว่าการต่อต้านทานฤทธิ์เฉียบพลัน (knockdown resistance, *kdr*) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ คือ 1) ค้นหาการกลายพันธุ์ของยีนช่องขับโซเดียมในยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์พีเอ็มดี-อาร์ (PMD-R) ที่ดื้อต่อสารเพอร์เมทริน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไวต่อสารเคมี โดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (RT-PCR) และการตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) 2) ทราบลักษณะทางพันธุกรรมของยีนกลายพันธุ์โดยวิธีการผสมข้ามสายพันธุ์ (cross-mating) 3) พัฒนาวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา สำหรับตรวจหาการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ในประชากรยุงลาย *Ae. aegypti* ในประเทศไทย

ผลการศึกษาพบว่ายุงลายสายพันธุ์พีเอ็มดี-อาร์ มีการกลายพันธุ์ของยีนช่องขับโซเดียม ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 1534 บริเวณโดเมนสามส่วนที่หก (IIIS6) ของยีนช่องขับโซเดียม โดยมีการเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอลานีน (F) ไปเป็นซิสเตอีน (C) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ อัลลีลดั้งเดิม (F1534) และกลายพันธุ์ (C1534) พบว่าการดื้อสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพอร์เมทรินมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบด้อยไม่สมบูรณ์ (autosomal incompletely recessive) โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการกลายพันธุ์แบบโฮโมไซกัส (C/C1534) และผลการผสมพันธุ์กลับ (backcross) พบมีกลไกการดื้อต่อสารเคมีอื่นร่วมด้วย โดยพบว่าการเพิ่มสารที่ยั้งยั้งการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดสลงในชุดรทดสอบความไวต่อสารเพอร์เมทริน ทำให้ระดับการดื้อสารเพอร์เมทรินของยุงลายลูกผสมรุ่นที่ 1 ลดลงใกล้เคียงกับยุงลายรุ่นพ่อแม่ที่ไวต่อสารเคมี ดังนั้นการดื้อสารเพอร์เมทรินของยุงลายพีเอ็มดี-อาร์ มีสาเหตุส่วนใหญ่จากการกลายพันธุ์ F1534C ของยีนช่องขับโซเดียม และบางส่วนจากเอนไซม์ออกซิเดส

การพัฒนาวิธีเพื่อใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ F1534C ประสบความสำเร็จ ได้แก่ วิธี TaqMan SNP genotyping (TaqMan SNP) และวิธี Allele Specific PCR (AS-PCR) โดยวิธีแรกให้ผลดีพอๆ กับวิธีตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ส่วนวิธีที่สองให้ผลอัลลีลกลายพันธุ์เกินจริงเพียง 1.8% ของยุงลายภาคสนาม เมื่อนำเทคนิค AS-PCR นี้ไปตรวจหาความถี่ของการกลายพันธุ์ F1534C ในยุงลายทั้ง 619 ตัวจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย 20 พื้นที่ พบว่า อัลลีลกลายพันธุ์มีการกระจายทั่วประเทศ โดยมีความถี่อยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 1.0 (รวม 0.77) และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างมากต่อการดื้อเพอร์เมทริน อย่างไรก็ตามพบยุงลายดื้อต่อสารเพอร์เมทรินจำนวน 19 ตัวซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ F1534C แต่การตรวจหาลำดับเบสพบการกลายพันธุ์แบบโฮโมไซกัสบริเวณโดเมนสองที่ตำแหน่ง V1016G และ S989P จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ F1534C ในประชากรยุงลาย *Ae. aegypti* ได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว การใช้สารไพรีทรอยด์ในการควบคุมยุงลายที่มีการกลายพันธุ์ของช่องขับโซเดียมอาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จำเป็นต้องเลือกหาสารกำจัดแมลงและวิธีการอื่นๆ ที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved