

**EVALUATION OF INSECTICIDE RESISTANCE
AND ITS MECHANISM IN *CULEX* MOSQUITO
FROM RICE PADDY FIELD**

UTSANEE SUPCHAROENCOON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง และกลไกที่เกี่ยวข้องในยุงรำคาญ (*CULEX*) ที่มีแหล่งเพาะพันธุ์
ในนาข้าว (EVALUATION OF INSECTICIDE RESISTANCE AND ITS MECHANISM IN
CULEX MOSQUITO FROM RICE PADDY FIELD)

อุษณี ทรัพย์เจริญกุล 4736817 MTMT/M

วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: รัชฎา เกียรติเฟื่องฟู, ปร.ค., วิไลรัตน์ นุชประมุข, พ.บ., อ.ว. (พยาธิวิทยา
คลินิก), ระพีพร ใหญ่เจริญ, ปร.ค.

บทคัดย่อ

ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) ที่มีแหล่งเพาะพันธุ์ในนาข้าว มีรายงานว่าเป็นพาหะของโรคไข้สมองอักเสบจากเชื้อ Japanese encephalitis virus (JEV) การใช้สารเคมีกำจัดแมลงเป็นจำนวนมากในนาข้าว ก่อให้เกิดความต้านทานต่อสารเคมีเหล่านี้ในยุง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงในยุงรำคาญที่มีแหล่งเพาะพันธุ์ในนาข้าว และศึกษากลไกที่เกี่ยวข้อง โดยเก็บตัวอย่างลูกน้ำและตัวโม่งของยุงรำคาญจากนาข้าวในจังหวัดปทุมธานี ระหว่างเดือนธันวาคม 2548 ถึงเดือนพฤษภาคม 2549 และทำการจำแนกสายพันธุ์ของยุง นำยุงตัวเต็มวัยเพศเมียมาทดสอบหาความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงด้วยวิธี Bottle bioassay ผลการทดสอบพบว่ายุงมีความต้านทานต่อ Temephos, Permethrin, Deltamethrin และ DDT โดยมีระดับความต้านทาน (RR_{LT50}) คิดเป็น 3.46, 2.57, 1.48 และ 1.32 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยุง *Cx. quinquefasciatus* สายพันธุ์ที่มีความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งสอดคล้องกับประวัติการใช้สารเคมีกำจัดแมลงของเกษตรกรในพื้นที่ ซึ่งได้แก่สารเคมีในกลุ่ม Organophosphate, Carbamate, Pyrethroid และ Organochlorine จากการศึกษพบว่า การดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ Activity ของเอนไซม์ Mixed function oxidases ($p=0.03$) และ α -esterase ($p=0.00$) เมื่อเทียบกับยุง *Cx. quinquefasciatus* สายพันธุ์ที่ไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง ในขณะที่ Activity ของเอนไซม์ β -esterase และ Glutathione-s-transferases ไม่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ Acetylcholinesterase ในยุงที่ทำการศึกษาคือเอนไซม์ลดความว่องไวในการจับกับสารเคมีกำจัดแมลง และในการศึกษาระดับโมเลกุลพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งการออกฤทธิ์ของ DDT และ Pyrethroid คือมีการแทนที่ของเบส Adenine ด้วย Thymine ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Leucine เป็น Phenylalanine ใน Sodium channel gene (IIS6) จากยุงที่มีความต้านทานต่อ DDT จำนวน 2 ตัวอย่าง จาก 4 ตัวอย่างที่แสดง Band จำนวน 1 Band ของ PCR product การศึกษานี้สรุปได้ว่ายุงจากนาข้าวได้พัฒนาความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่ใช้ในนาข้าว โดยอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการเพิ่มขึ้นของระดับ Activity ของเอนไซม์บางตัว และการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายต่อสารเคมีกำจัดแมลง ในการศึกษาเป็นการพบความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงในยุงรำคาญด้วยวิธี Bottle bioassay เป็นครั้งแรกของประเทศไทย

EVALUATION OF INSECTICIDE RESISTANCE AND ITS MECHANISM IN *CULEX* MOSQUITO FROM RICE PADDY FIELD

UTSANEE SUPCHAROENCOON 4736817 MTMT/M

M.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: RACHADA KIATFUENGFOO, Ph.D., WILAIRAT
NUCHPRAMOOL, M.D., RAPEEPORN YAICHAROEN, Ph.D.**ABSTRACT**

Culex vishnui, a mosquito species usually bred in rice paddy fields, has been reported as a vector of Japanese encephalitis (JE) from Japanese encephalitis virus (JEV). Intensive exposure to insecticides used in agriculture can rapidly increase insecticide resistance in mosquitos. This study evaluated the insecticide resistance and possible resistance mechanism(s) in *Culex* mosquitoes. Larvae and pupae were collected from rice paddy fields in Pathum Thani province, Thailand, during December 2005 to May 2006 and the species was identified following a mosquito illustration key. Adult female mosquitoes were subjected to insecticide susceptibility test using bottle bioassay. Metabolic and target site resistance mechanisms were studied by microtiter plate assay and nucleic acid sequencing technique, respectively. In comparison to *Cx. quinquefasciatus*, it was found that the results of bioassay showed the evidence of resistance to temephos ($RR_{LT50}=3.5$), permethrin ($RR_{LT50}=2.6$), deltamethrin ($RR_{LT50}=1.5$) and DDT ($RR_{LT50}=1.3$) which correlated to insecticide groups used in rice fields (organophosphate, carbamate, pyrethroid and organochlorine). Biochemical assay was demonstrated as significantly increasing in MFO ($p=0.03$) and α -esterase ($p=0.00$) activities, whereas, increase in β -esterase and GST activities was not observed. There is insensitive AChE presented in this mosquito population. *Kdr* mutation in the S6 transmembrane segments of domain II of the sodium channel gene was found in 2 of 4 insecticide resistant mosquitoes and these showed a positive single band of PCR product. A single base substitution from adenine to thymine resulted in changing of the amino acid from leucine to phenylalanine. These findings suggest that the evidence of insecticide resistance in *Culex* mosquitoes from rice paddy fields results from insecticide use for agriculture and is associated with increasing detoxifying enzymes and target site alteration. This study is the first report of insecticide resistance by bottle bioassay in *Culex* mosquitoes from Thailand.

KEY WORDS: *CULEX*/ INSECTICIDE RESISTANCE/ BOTTLE BIOASSAY/
BIOCHEMICAL ASSAY/ *KDR* MUTATION

94 P.