ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการสิ้นสุดระยะไดอะพอสของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis* Hampson)

ชื่อผู้เขียน นางสาวอัญชลี เนตตกูล

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ ประธานกรรมการ
รศ. สมศักดิ์ วนิชาชีวะ กรรมการ
อ. บุญเกตุ ฟองแก้ว กรรมการ
Prof. Dr. Sho Sakurai กรรมการ

บทคัดย่อ

หนอนเยื่อไผ่คือระยะตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืนจัดอยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Pyralidae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Omphisa fuscidentalis* Hampson พบอาศัยอยู่ตามป่าไผ่บนภูเขาทางภาคเหนือของประเทศไทย จากการศึกษาวงชีวิต พบว่า ตัวหนอนจะเข้าสู่ระยะไดอะพอสในเดือนกันยายนและใช้เวลาในระยะไดอะพอสนานถึง 9 เดือน ซึ่งการเกิดไดอะพอสจะถูกควบคุมโดยสภาพแวดล้อมและระบบประสาทและฮอร์โมน ดังนั้นการให้ฮอร์โมนจูวีไนล์เพื่อชักนำให้ระยะไดอะพอสของหนอนชนิดนี้สิ้นสุดลงจึงเป็นสิ่งที่สนใจศึกษา ในการทดลองนี้ได้ใช้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (JHA) S-methoprene ความเข้มข้นต่างๆ (0.0001 0.0005 0.001 0.005 0.025 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร) หยดลงบนตัวหนอนจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีลำตัว ส่วนหนอนในกลุ่มควบคุมจะหยดเพียงอะซิโตน 5 ไมโครลิตร/ตัวเท่านั้น อีกการทดลองหนึ่งหยด JHA 1 ไมโครกรัมลงบนตัวหนอนแล้วเก็บฮีโมลิมพ์ทุกๆ 2 วันเป็นเวลาทั้งหมด 20 วันและทุกระยะการเปลี่ยนแปลงสีผิวลำตัว (G1 G2 G3 G4 และ G5) เพื่อตรวจหาระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์โดยวิธี RIA จากนั้นเพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องของสมองต่อกลไกการทำงานของ JHA ต่อการสิ้นสุดระยะไดอะพอส โดยการผ่าตัดเอาสมองของหนอนออกแล้วหยด JHA ความเข้มข้นต่างๆ (0.005 0.025 0.05 0.1 0.25 0.5 และ 1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร) แก่หนอนเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีผิวลำตัวและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของสมองและต่อมโปรทอแรกซิกพร้อมกันนั้นได้ศึกษาถึงระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์และชนิดโปรตีนสะสมโดยทำการเก็บฮีโมลิมพ์ในระยะต่างๆ (วันที่ 5 วันที่ 10 วันที่ 15 หลังจาก

ทยด JHA ระยะ prepupa ระยะ G1 ระยะ G2 ระยะ G3 รวมทั้งดักแด้ที่ได้จากการทดลองและดักแด้จากธรรมชาติทั้งเพศผู้และเพศเมีย) โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซิส

จากผลการวิจัย พบว่า JHA สามารถชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ ระยะเวลาในการชักนำนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณฮอร์โมน โดยความเข้มข้นสูงจะชักนำให้หนอนเข้าดักแด้ได้เร็วกว่าความเข้มข้นต่ำ ความเข้มข้นของ JHA ต่ำสุดที่สามารถชักนำให้ระยะไดอะพอสสิ้นสุดนั้นได้แก่ 0.025 ไมโครกรัม นอกจากนี้ JHA มีผลทำให้ระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์ในช่วงก่อนระยะการเปลี่ยนแปลงเข้าดักแด้เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้หนอนเกิดการเข้าดักแด้ได้และพบว่าสมองของหนอนที่ถูกให้ JHA จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและส่วนของออฟติคโลปและแอนเทนนัลโลปมีการพัฒนาขึ้นคล้ายสมองของดักแด้ธรรมชาติ นอกจากนั้นยังมีการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนนี้ต่อต่อมโปรทอแรกซิกโดยเกิด nuclear folding เพราะมีการกระตุ้นการสร้างและสะสมซีครีทอรีซับสแทนซ์เพิ่มมากขึ้น ส่วนการตอบสนองของหนอนที่ถูกตัดสมองออกต่อ JHA แสดงให้เห็นว่า JHA อาจมีผลโดยตรงต่อต่อมโปรทอแรกซิกโดยการกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนเอกไดโซน ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการเข้าดักแด้และ JHA ยังมีผลทำให้ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์เพิ่มสูงขึ้นในช่วงต้นของการเจริญในระยะตัวหนอนจากนั้นจะลดลงในช่วงการเปลี่ยนแปลงเข้าดักแด้ ส่วนชนิดโปรตีนสะสมในฮีโมลิมพ์ ได้แก่ SP1 และ SP2 นั้นจะพบมากในช่วงการเจริญระยะตัวหนอนและจะลดลงในช่วงการเปลี่ยนแปลงจากระยะตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้

จากผลการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า JHA ในปริมาณที่เหมาะสม สามารถชักทำให้ระยะไดอะพอสของหนอนเยื่อไผ่สิ้นสุดลงได้

Thesis Title	Effects of Juvenile Hormone on Termination of Bamboo Borer Larval Diapause (*Omphisa fuscidentalis* Hampson)
Author	Ms. Anchalee Nettagul
M.S.	Biology

Examining Committee	Asst. Prof. Dr.	Tippawan	Singtripop	Chairman
	Assoc. Prof.	Somsak	Wanichachewa	Member
	Lecturer	Boongate	Fongkaew	Member
	Prof. Dr.	Sho	Sakurai	Member

ABSTRACT

Bamboo borer is the larva of the moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson (Lepidoptera, Pyralidae) and found in the northern mountains of Thailand. The larvae enter larval diapause in September and the diapause lasts for 9 months. It is well known that the diapause are regulated by the environmental stimuli and neuroendocrine system. In the present study, we were interested in the effects of juvenile hormone (JH) on larval diapause termination. For this end, we used juvenile hormone analogue (JHA) , S-methoprene. First, to determine the dose-response of JHA, diapausing larvae were topically appiled with various doses of JHA (0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.025, 0.05 and 0.1 μg/5μl of acetone) and morphological changes of the larvae were observed. Control larvae were applied with acetone only. Second, the larvae were topically applied with 1 μg JHA and haemolymph was collected every 2 days for 20 days and at each stage of the skin color changes (G1, G2, G3, G4 and G5), for determination of haemolymph ecdysone concentration by radioimmunoassay (RIA). To examine the involvement of brain in the diapause termination by JHA , diapausing larve were treated with various doses of JHA (0.005, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 μg/5μl of acetone) and their brains were extirpated. The morphological and histological changes in the brain and the prothoracic gland (PG) were also observed after JHA application. We also interested in the protein level in haemolymph and found that the storage proteins changed in haemolymph in both sexes after treatment with 1 μg of JHA. Haemolymph were collected in various stages (day5, day10, day15 after

JHA treatment, prepupa, G1, G2, G3, treated pupa and natural pupa) to measure the total protein level and to separate the storage proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Results showed that JHA terminated the larval diapause in a dose dependent manner. Higher doses examined caused the shorter the time-period for inducing pupation. The lowest dose of JHA to terminate the larval diapause was 0.025 μg. The haemolymph ecdysteroid titer increased after JHA application and significantly higher than that in the control. The brains of G3 larvae which were obtained with JHA treatment changed in shape, and the optic and antennal lobe developed as those in complete natural pupa. The PG cells also changed after JHA treatment in nuclear folding for synthesis and storage of secretory substances. The diapausing larvae responded to JHA after brain extirpation. This indicated that JHA may act directly to PG to secrete ecdysone which caused pupation. JHA treatment caused the haemolymph protein level to increase in early stage after treatment, then to decrease in nearly the time of pupation. Storage proteins, SP1 and SP2 were found abandant in diapausing larvae and were shown to decline in concentration in haemolymph during larval-pupal transformation.

From these results, it is concluded that JHA terminates the larval diapause of the bamboo borer by stimulating directly the PG and thereby increasing the haemolymph ecdysone level.