ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	บทบาทของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสและการแสดงออกของยีนเอคไดโซนรีเซพเตอร์ในหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis* Hampson)
ผู้เขียน	นางสาวนุจิรา ทาตัน
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

บทคัดย่อ

กระบวนการเมตาบอลิซึมของ trehalose ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ trehalase ที่พบบริเวณผนังของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) เมื่อทำการศึกษาระดับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ trehalase ใน midgut ของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสและระยะดักแด้ พบว่าการทำงานของเอนไซม์อยู่ในระดับต่ำในช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนเมษายน และจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 4 เท่าในเดือนพฤษภาคมและยังคงอยู่ในระดับสูงเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ในเดือนกรกฎาคม เมื่อทำการทดลองให้ juvenile hormone analogue (JHA) แก่หนอนเยื่อไผ่ พบว่าการทำงานของเอนไซม์ trehalase ใน midgut เริ่มเพิ่มขึ้นหลังจากะยะ G0 และสูงสุดในระยะดักแด้ ดังนั้นผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า JHA อาจมีผลกระตุ้นให้ระดับฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้นและมีผลให้เอนไซม์ trehalase ทำงานมากขึ้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาบทบาทโดยตรงของฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone (20E) ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ trehalase ใน midgut พบว่า 20E สามารถชักนำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะ G0 และมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ trehalase ใน midgut ให้เพิ่มสูงขึ้นภายในวันที่ 3 หลังจากการให้ฮอร์โมน ในการเพาะเลี้ยง midgut ใน medium ที่มี 20E ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการทำงานของเอนไซม์ trehalase เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และอยู่ในระดับสูงหลังจากนั้น แสดงให้เห็นว่า 20E คือปัจจัยที่เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ trehalase ใน midgut ให้เพิ่มสูงขึ้น เป็นที่ยอมรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยทั่วไปว่า 20E จะออกฤทธิ์ได้โดยการจับกับ EcR/USP heterodimeric nuclear receptor ดังนั้นจึงทำการแยกและศึกษาการแสดงออกของ ecdysone receptor (OfEcR) ทั้งสอง isoform คือ OfEcR-A และ OfEcR-B1 ใน midgut ในช่วงไดอะพอสและหลังจากให้ JHA จากการโคลน OfEcR-A และ OfEcR-B1 ที่ได้ประกอบด้วย A/B, C, D และ E regions พบว่าทั้งสอง isoforms มีความแตกต่างกันในส่วน N-terminal A/B region ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ OfEcR-B1 พบว่ามีการแสดงออกเล็กน้อยในวันที่ 12 หลังจากการให้ฮอร์โมนแล้วเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 20 ถึงระยะ G0 แต่การแสดงออกของ OfEcR-A จะเริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 18 และสูงสุดที่ระยะ G1 ซึ่งรูปแบบการแสดงออกของ OfEcR ทั้งสอง isoforms และการทำงานของเอนไซม์ trehalase จะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ ecdysteroid ในฮีโมลิมพ์ แสดงให้เห็นว่า JHA กระตุ้นให้ ecdysteroid ในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้น ซึ่งระดับ ecdysteroid ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลกระตุ้นการแสดงออกของ EcR และการทำงานของเอนไซม์ trehalase

นอกจากนี้ยังพบว่ามีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trehalase คือ trehalase inhibitor ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่ซึ่งตรวจพบเป็นปริมาณที่สูงในช่วงไดอะพอส เมื่อทำการทดลองให้ 20E พบว่ามีผลทำให้ความสามารถของ trehalase inhibitor ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trehalase ลดลงและมีผลทำให้เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ trehalase จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าอาจมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ trehalase อย่างน้อย 2 ปัจจัย คือการกระตุ้น trehalase gene และการลดการทำงานของ trehalase inhibitor ซึ่งปัจจัยทั้ง 2 นี้อาจถูกชักนำโดย 20E

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Role of Juvenile Hormone on the Changes in Trehalase Activity and Ecdysone Receptor Gene Expression in the Bamboo borer *Omphisa fuscidentalis* Hampson

Author Ms. Nujira Tatun

Degree Master of Science (Biology)

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Tippawan Singtripop

Abstract

Since trehalose metabolism, depends on trehalase activity that locates on the surface of midgut, trehalase activity in midgut homogenates was measured through out the larval diapause period and in the pupal stage. The midgut homogenates exhibited low trehalase activity from December to April, showed a 4-fold increase in May and remained high in the pupal stage in July. After juvenile hormone analogue (JHA) application, the trehalase activity began to increase after G0 and attained the maximal level after pupation. Thus, the results indicate that JHA brings about an increase in the ecdysteroid titer, which causes the increase in the trehalase activity. In this study we examined the direct effects of 20-hydroxyecdysone (20E) on the change in the trehalase activity in the midgut. Results showed that 20E induced G0 morphology three days after the injection, and the trehalase activity increased from G0. In vitro culture of whole midgut in Grace's insect medium with 1μg/ml 20E for 72 h increased the trehalase activity to a high level at 48 h of the culture and remained high thereafter. This clearly shows that 20E is the factor for the increase in the trehalase activity. It is generally accepted that 20E exerts its effects through EcR/USP heterodimeric nuclear receptor, in which 20E binds to EcR. Accordingly, two isoforms of ecdysone receptor from the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis* (OfEcR) were identified and examined for their expression levels in the midgut during the diapause period as well as those

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

after JHA application. We have cloned both OfEcR-A and OfEcR-B1 encoding the A/B, C, D, and E regions. Two isoforms differed only in the N-terminal A/B region. In the expression profile of OfEcR-B1 after JHA application, there was a transient peak on day 12 and another large peak on day 20 to G0. By contrast, OfEcR-A increased from day 18 and peaked at G1. These peaks of both isoforms correlated well with the time of the increase in the ecdysteroid titer in hemolymph and followed by an increase in the trehalase activity. These results suggest that JHA stimulates the increase in hemolymph ecdysteroids, and then the increased ecdysteroids induced the increases in the EcR mRNAs and the trehalase activity.

In addition, we found another possible cause for the increase in the trehalase activity. The inhibitory effects of trehalase inhibitor, which was found in the diapause larval hemolymph, was high in the diapause period. After 20E injection, the inhibitor activity decreased complementarily with the increase in trehalase activity. Taken together, there may be at least two factors that participate in the changes in trehalase activity, up-regulation of the trehalase gene and the decrease in the trehalase inhibitor activity, both of which may be induced by 20E.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved