ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การชักนำการแสดงออกของยีนเอคไดโซนรีเซพเตอร์ และอัลตราสไปราเคิลโดยฮอร์โมนจูวีไนล์และเอคไดโซน ในการสิ้นสุดระยะไดอะพอสของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis*)

ผู้เขียน นายปุญญวัช ปั้นจาด

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

บทคัดย่อ

ในช่วงระยะไดอะพอสของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis*) พบว่ามีปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ต่ำ แสดงว่าต่อมโปรทอแรคซิคมีการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนในปริมาณต่ำเช่นเดียวกัน การให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (JHA) แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสสามารถชักนำให้เกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยการเพิ่มปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์สูงขึ้น 20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน (20E) จะจับกับเอคไดโซนรีเซพเตอร์ (EcR) และอัลตราสไปราเคิล (USP) ซึ่งเป็น heterodimers และควบคุมกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีนเป้าหมาย (target genes) เพื่อศึกษาการแสดงออกของ *OfEcR-A, OfEcR-B1, OfUSP-1* และ *OfUSP-2* mRNA ในต่อมโปรทอแรคซิคของ *O. fuscidentalis* จึงทำการโคลนยีน *OfUSP-1* และ *OfUSP-2* พบว่า partial sequence ของ *OfUSP-1* มีขนาด 410 คู่เบส หรือคิดเป็นกรดอะมิโน 138 ตัว มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity) มากกับ rice stem borer *(Chilo suppressalis, CsUSP-1),* tobacco hornworm *(Manduca sexta, MsUSP-1)* และ indianmeal moth *(Plodia interpunctella, PiUSP-1)* คิดเป็น 78% ลำดับเบสของ *OfUSP-2* มีขนาด 2005 คู่เบส หรือคิดเป็นกรดอะมิโน 409 ตัว มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *C. suppressalis (CsUSP-2)* และ cluster caterpillar *(Spodoptera litura, SlUSP-2)* คิดเป็น 82.07% และ 81.60% ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

OfEcR-A, OfEcR-B1, OfUSP-1 และ *OfUSP-2* mRNA ในสภาวะ *in vivo* และ *in vitro* โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR ผลการทดลองโดยการศึกษาในสภาวะ *in vivo* พบว่าการแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* mRNA ลดลงหลังจากได้รับฮอร์โมน JHA ก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* mRNA จะเพิ่มขึ้นในช่วงระยะ G1 และ G2 ของการเข้าระยะดักแด้ แล้วลดลงอีกครั้งในระยะ G3 การฉีดฮอร์โมน 20E ทำให้การแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* mRNA ลดลงในวันที่ 2และระยะ G0 แล้วเพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะ G1 และระยะ G2 สำหรับการแสดงออกของ *OfUSP-1* และ *OfUSP-2* mRNA ทั้งในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน JHA และ 20E จะเพิ่มขึ้นในระยะ G1 จนถึงระยะ G2 แล้วลดลงในระยะ G3 เช่นกัน สำหรับการศึกษาในสภาวะ *in vitro* ทำการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิคใน Grace's insect medium ที่เติม JHA หรือ 20E ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ผลการทดลองพบว่า JHA และ 20E ที่ความเข้มข้นสูงสามารถเพิ่มการแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B1*, *OfUSP-1* และ *OfUSP-2* เมื่อเพาะเลี้ยงต่อมใน Grace's insect medium ที่เติม JHA 1 ไมโครกรัม ที่เวลาต่างๆ กัน พบว่าการแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* มีค่าสูงในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ในทางตรงกันข้าม การแสดงออกของ *USP-2* มีค่าสูงในชั่วโมงที่ 4 แต่การแสดงออกของ *USP-1* มีค่าสูงในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองที่ได้คล้ายกับผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต่อมใน Grace's insect medium ที่เติม 20E 1 ไมโครกรัม โดยพบว่าการแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* เพิ่มขึ้นที่ชั่วโมงที่ 4 อย่างไรก็ตามกลับพบว่าการแสดงออกของ *OfUSP-1* มีค่าลดลงในขณะที่การแสดงออกของ *OfUSP-2* มีค่าสูงที่ชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การให้ฮอร์โมน JHA และ 20E ทำให้สิ้นสุดระยะไดอะพอสของ *O. fuscidentalis* โดยมีผลต่อการเพิ่มระดับเอคไดสเตอรอยด์ในฮีโมลิมพ์และเพิ่มการแสดงออกของ *EcR* และ *USP* ในต่อมโปรทอแรคซิค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Juvenile Hormone and Ecdysone Induction of Ecdysone Receptor and Ultraspiracle Gene Expression in the Termination of Larval Diapause of Bamboo Borer (*Omphisa fuscidentalis*)
Author	Mr. Poonnawat Panchad
Degree	Master of Science (Biology)
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Tippawan Singtripop

Abstract

During larval diapause of the bamboo borer (*Omphisa fuscidentalis*), the ecdysteroid titer is very low and the prothoracic glands (PG) exhibit low secretory activity. A juvenile hormone analogue (JHA) application to diapause larvae induces pupation by increasing ecdysteroid in hemolymph. 20-hydroxyecdysone (20E) binds to the heterodimers of the ecdysone receptor (EcR) and the ultraspiracle (USP), and controls transcription of target genes. In order to study the *OfEcR-A*, *OfEcR-B1*, *OfUSP-1* and *OfUSP-2* mRNA expression in the PG of *O. fuscidentalis*, *OfUSP-1* and *OfUSP-2* were cloned. The partial sequence of *OfUSP-1* was 410 bp in length encoding 138 amino acids and was highly homologous (78%) with rice stem borer, *Chilo suppressalis* (*CsUSP-1*), tobacco hornworm, *Manduca sexta* (*MsUSP-1*) and indianmeal moth, *Plodia interpunctella* (*PiUSP-1*). *OfUSP-2* was 2005 bp in length encoding 409 amino acids and was highly homologous with *C. suppressalis* (82.07%) and cluster caterpillar, *Spodoptera litura (SlUSP-2)* (81.60%). The expression of *OfEcR-A*, *OfEcR-B1, OfUSP-1* and *OfUSP-2* mRNA both *in vivo* and *in vitro* were determined by semi-quantitative RT-PCR. Results from the in vivo study showed that *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* mRNA expression

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

decreased after JHA application prior to pupation. However *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* mRNA expression sharply increased during the G1 and G2 stages of pupation, and decreased again by stage G3. A 1.0 µg 20E injection caused of the *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* mRNA expression to decrease in day 2 and at G0 and increased sharply again in G1 and G2. The expression of *OfUSP-1* and *OfUSP-2* mRNA gradually increased in G1 to G2 and decreased in G3 in both JHA application and 20E injection. For *in vitro* study, PGs were cultured in Grace's insect medium with various concentration of JHA or 20E. Results showed that high concentrations of JHA or 20E were able to increase the expression of *OfEcR-A*, *OfEcR-B1*, *OfUSP-1* and *OfUSP-2*. When the glands were cultured in Grace's medium with 1 µg JHA for different hours, the expression of *EcR-A* and *EcR-B1* increased at 8 h. On the other hands, the expression level of *USP-2* increased at 4 h while the expression of *USP-1* increased 12 h later after the culture. Similar results were obtained when PGs were cultured in Grace's medium with 1 µg 20E. The expressions of *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* mRNA increased within 4 h. However, *OfUSP-1* mRNA expression decreased while *OfUSP-2* mRNA expression increased at 8 h.

The present results indicate that JHA and 20E terminate the larval diapause of the *O. fuscidentalis* by increasing of ecdysteroid titer in hemolymph and *EcR* and *USP* expression in prothoracic gland.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved