

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ของอัตราการใช้ออกซิเจนและการทำงานของ
เอนไซม์ไซโตโครม ซี ออกซิเดสในระยะลาร์วัลไคอะพอสของ
หนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis* Hampson)

ผู้เขียน

นางสาวมนัสวัญญ์ แสงศักดิ์

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

ประธานกรรมการ

รศ. สมศักดิ์ วนิชาชีวะ

กรรมการ

รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย

กรรมการ

Prof. Dr. Katsuhiko Endo

กรรมการ

บทคัดย่อ

หนอนเยื่อไผ่ *Omphisa fuscidentalis* Hampson เป็นระยะตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืน (moth) ในวงศ์ Pyralidae อันดับ Lepidoptera จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (JHA, S-methoprene) มีผลชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เข้าสู่ระยะดักแด้และทำให้ปริมาณน้ำตาล trehalose ในฮีโมลิมพ์ลดลง และมีรายงานว่าฮอร์โมนจูวีไนล์มีผลเพิ่มอัตราเมตาบอลิซึมและอัตราการใช้ออกซิเจนใน *Dermestes vulpinus* ในระยะลาร์วาขั้นสุดท้าย, *Blatella germanica*, *Spilostetus pandurus* และ *Oncopeltus fasciatus* ในลาร์วาระยะที่ 5 และตัวเต็มวัย ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจน และการทำงานของเอนไซม์ cytochrome C oxidase ซึ่งในกระบวนการหายใจระดับเซลล์นั้นออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนซึ่งส่งต่อมาจากเอนไซม์ cytochrome C oxidase เพื่อสร้างพลังงานในรูปของ ATP และเพื่อควบคุมสมดุลกรด-ด่างภายในเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของหนอนเยื่อไผ่ระยะลาร์วัลไคอะพอสที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นแบบ supradian cycle คือเกิดขึ้นเป็นจังหวะทุก 12 ชั่วโมง หนอนมีอัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุดในช่วงเวลา 9.00-11.00 และ 21.00-23.00 น. และต่ำที่สุดในช่วงเวลา 1.00-3.00 และ 13.00-15.00 น. และเมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตรา

การใช้ออกซิเจนตั้งแต่เดือนตุลาคม - มีนาคม พบว่าในเดือนมีนาคมหนอนมีอัตราการใช้ออกซิเจนสูงกว่าเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อทำการให้ JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นหลังจากได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 7 วัน และลดต่ำลงเล็กน้อยในระยะ G0 หลังจากนั้นกลับมาเพิ่มสูงขึ้นในระยะ G1 และ G2 และเพิ่มสูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะ G3-G5 หลังจากนั้นทำการวัดอัตราการทำงานของเอนไซม์ cytochrome C oxidase หลังจากได้รับ JHA ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 ไมโครกรัม พบว่าอัตราการทำงานของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจากได้รับ JHA เป็นเวลา 1 วัน และเพิ่มสูงที่สุดเมื่อเข้าสู่ระยะ G3-G5 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แตกต่างกันไม่มีผลต่ออัตราการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการสิ้นสุดระยะโคอะพอสตามธรรมชาติ หรือการกระตุ้นโดย JHA ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นและอัตราการทำงานของเอนไซม์ cytochrome C oxidase เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าในระหว่างการเกิด larval-pupal transformation ซึ่งชักนำโดย JHA จะทำให้มีการเพิ่มอัตราเมตาบอลิซึมของร่างกาย ซึ่งสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ cytochrome C oxidase และอัตราการใช้ออกซิเจน

เมื่อทำการหาลำดับเบสของยีน cytochrome C oxidase subunit I (CO-I) ได้ fragment ขนาด 369 คู่เบส (กรดอะมิโน 123 ตัว) และมีความเหมือน (homology) สูงเมื่อเทียบกับ *Ostrinia nubilalis* (90%), *Desmia funeralis* (89%) และ *Drepana falcataria* (88%) ซึ่งเป็นแมลงในอันดับ Lepidoptera เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ายีน CO-I ของหนอนเยื่อไผ่เป็นยีนที่มีการ conserved ไว้ในสายวิวัฒนาการ ซึ่ง ลำดับเบสที่ได้มานี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน CO-I หลังจากได้รับการกระตุ้นโดย JHA ในการศึกษาขั้นต่อไป

Thesis Title	Correlation of Oxygen Consumption Rate and Cytochrome C Oxidase Activity in Larval Diapause of the Bamboo Borer (<i>Omphisa fuscidentalis</i> Hampson)	
Author	Ms. Manasawan Saengsakda	
Degree	Master of Science (Biology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Tippawan Singtripop	Chairperson
	Assoc. Prof. Somsak Wanichacheewa	Member
	Assoc. Prof. Dr. Somboon Anantalapochai	Member
	Prof. Dr. Katsuhiko Endo	Member

ABSTRACT

Bamboo borer is a larva of the moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson (Lepidoptera, Pyralidae). Previous study shows that juvenile hormone analogue (JHA, S-methoprene) induced pupation of the diapause larvae and decreased trehalose level in the hemolymph. Juvenile hormone application increases the rate of oxygen consumption and metabolism in the last instar larvae of *Dermestes vulpinus*, and in fifth instar larvae and adults of *Blatella germanica*, *Spilostetus pandurus* and *Oncopeltus fasciatus*. It is of interest to study whether the oxygen consumption rate changes with the correlation to cytochrome C oxidase activity. In cellular respiration, oxygen acts as an electron receptor from cytochrome C oxidase to form ATP, which plays a significant role in the regulation of acid-base balance. The results indicated that oxygen consumption rate of bamboo borer larvae shows a supradian rhythm, at about 12 hrs. cycles at 25 °C during diapause. The oxygen consumption reached maximum at 9.00-11.00 AM./PM. and reached minimum at 1.00-3.00 AM./PM. During the 6-month larval diapause, from October to March, oxygen consumption rate was significantly higher in March than in October to January ($P < 0.05$). When 1 µg JHA were topically applied to diapause larvae, the rate of oxygen

consumption increased 7 days after the application of JHA. The rate decreased slightly in G0, increased in G1-G2 and then reached a maximum in G3-G5. Subsequently, we studied how the cytochrome C oxidase activity changes after application of 0.1, 0.5 and 1 μg JHA. Cytochrome C oxidase activity increased gradually after 1 day of JHA application and reached the maximum level in G3-G5 ($P < 0.05$). Cytochrome C oxidase activity did not show dose-dependent response to JHA ranging 0.1-1 μg . These results indicate that termination of diapause, either it occurs naturally or induced artificially by JHA, associated with increments of oxygen consumption rate and cytochrome C oxidase activity. It may be that, JHA elicits the high metabolic activity that is correlated with the increment of cytochrome C oxidase activity and oxygen consumption rate in the larval-pupal transformation.

Nucleotide sequence of cytochrome C oxidase subunit I gene (CO-I) was obtained from skin of the larvae and amplified by the polymerase chain reaction (PCR). The amplified region CO-I gene was 369 basepairs (123 amino acids) fragment showing high homology with the nucleotides of *Ostrinia nubilalis* (90%), *Desmia funeralis* (89%) and *Drepana falcataria* (88%) (Lepidoptera). This result indicate that *Omphisa fuscidentalis* CO-I is a conserved gene in phylogeny. This partial sequence can be useful to the further study about the gene expression following the JHA application.