

Dissertation Title	Molecular Characterization and Gene Expression of Diapause Hormone and Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide in Bamboo Borer, <i>Omphisa fuscidentalis</i>		
Author	Miss Suphawan Suang		
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)		
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul	Advisor	
	Prof. Dr. Kiyoshi Hiruma	Co-advisor	
	Asst. Prof. Dr. Manaporn Manaboon	Co-advisor	

ABSTRACT

Diapause, an arrested period of post-embryonic development in insects, is under the control of hormonal interactions. In the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis* Hampson (Lepidoptera: Crambidae), larvae remain in diapause for as long as 9 months during the dry season, from September to the following June, although the factors that regulate larval diapause are poorly understood. The present study describes the cloning and expression analysis of the diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH-PBAN) precursor of *O. fuscidentalis* (*OfDH-PBAN* cDNA), aiming to reveal how it may be involved regulating larval diapause in this species in combination with environmental factors. The open reading frame (ORF) of the cDNA encodes a 199-amino acid precursor protein that contains DH, PBAN and three other neuropeptides, all of which share a conservative C-terminal pentapeptide motif FXPR/KL (X=G, T or S). The *Of-DH-PBAN* is highly similar (74%) to the DH-PBAN of the legume pod borer (*Maruca vitrata*). A quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) reveals that *OfDH-PBAN* mRNA is expressed only in neural tissues and that expression is highest in the subesophageal ganglion. Moreover, the expression level of *OfDH-PBAN* mRNA in the subesophageal ganglion is consistently

high during the fifth larval instar, increasing moderately in early diapause before reaching a peak during late diapause. After pupation, expression of the *OfDH-PBAN* precursor decreases to a low level. In addition to endocrine factors, the results demonstrate that photoperiod increases the expression level of *OfDH-PBAN* mRNA in larval diapause. These results also suggest that the expression of the *OfDH-PBAN* gene correlates with larval diapause development and may be activated by photoperiod in *O. fuscidentalis*.

When we assayed the responsiveness of diapausing *O. fuscidentalis* larvae to the juvenile hormone analogue (JHA: S-methoprene) and 20-hydroxyecdysone (20E) and used a qRT-PCR to survey the mRNA expression changes in response to JHA and 20E in the subesophageal ganglion (SG) and prothoracic gland (PG). We found that both *in vivo* and *in vitro* experiments presented a similar response pattern on the expression of JH receptor (*OfMet*), *OfDH-PBAN*, ecdysone receptor (*OfEcR-A* and *OfEcR-B1*) and ecdysone inducible genes (*OfBr-C*, *OfE75A*, *OfE75B*, *OfE75C* and *OfHR3*). JHA induced the expression of JH receptor and *OfDH-PBAN* in SG and PG and ecdysone receptor and ecdysone inducible genes in PG only, while 20E induced the expression of ecdysone receptor and ecdysone inducible genes in SG and PG. In addition for *in vitro* experiment, JH receptor and *OfDH-PBAN* were up-regulated by JHA alone, but ecdysone receptor and ecdysone inducible genes were up-regulated by JHA and 20E. However, JH receptor and *OfDH-PBAN* in the SG was expressed much faster than JH receptor and *OfDH-PBAN* in the PG and the expression of ecdysone receptor and ecdysone inducible genes induced by JHA much later than observed for 20E. These results indicate that JHA may stimulate the PG via JH receptor and *OfDH-PBAN* in the SG, terminating larval diapause. Current results therefore suggest a novel regulatory mechanism for larval diapause termination in *O. fuscidentalis*.

หัวข้อคุณิพนธ์	การหาลักษณะเฉพาะทางโมเลกุลและการแสดงออกของยีน ไคอะพอสฮอร์โมนและฟีโรโมน ไบโอซินทีซิส แอคทีเวตติ้ง นิวโรเปปไทด์ ในหนอนเยื่อไผ่ <i>Omphisa fuscidentalis</i>	
ผู้เขียน	นางสาวศุภวรรณ ทรวง	
ปริญญา	วิทยาศาสตรคุณิบัณฑิต (ชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร Prof. Dr. Kiyoshi Hiruma ผศ. ดร. มนพร มานะบุญ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไคอะพอสเป็นระยะพักการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้นในแมลงภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนในร่างกาย โดยหนอนเยื่อไผ่จะอยู่ในระยะลาร์วัลไคอะพอสนานประมาณ 9 เดือน ตั้งแต่เดือนกันยายนถึงเดือนมิถุนายน อย่างไรก็ตามปัจจัยที่เข้ามาควบคุมระยะลาร์วัลไคอะพอสยังมีความเข้าใจกันน้อยมากในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนนิ่งและวัดการแสดงออกของยีน diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (*OfDH-PBAN* cDNA) ของหนอนเยื่อไผ่ เพื่อแสดงให้เห็นว่ายีนนี้อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมระยะลาร์วัลไคอะพอสในหนอนเยื่อไผ่และอาจสัมพันธ์กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมด้วย โดยพบว่ายีนนี้สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ 199 กรดอะมิโน ประกอบด้วย DH, PBAN และอีก 3 นิวโรเปปไทด์ ซึ่งทั้ง 5 นิวโรเปปไทด์จะมีการแชร์ลำดับเบส FXPR/KL ที่คล้ายกันตรงส่วนท้ายทางด้าน C-terminal ลำดับกรดอะมิโนของ *Of-DH-PBAN* แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมากที่สุด 74% กับ legume pod borer (*Maruca vitrata*) จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) พบว่ายีน *OfDH-PBAN* มีการแสดงออกเกิดขึ้นพบเฉพาะในเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทเท่านั้น และมีการแสดงออกสูงที่สุดในปมประสาทใต้หลอดอาหาร (subesophageal ganglion) นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของยีน *OfDH-PBAN* ในปมประสาทใต้หลอดอาหารมีระดับสูงในระยะตัวหนอนอินสตาร์ที่ห้า โดยจะเพิ่มสูงขึ้นในระดับปานกลางในช่วงระยะแรกของการเกิดไคอะพอส จากนั้นจะเพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับสูงสุดในช่วงท้ายของระยะไคอะพอส และจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ นอกจากปัจจัย

ทางด้านฮอร์โมนแล้วยังพบว่าช่วงแสงมีผลต่อการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *OfDH-PBAN* ในระยะลาร์วัลไคอะพอส จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีน *OfDH-PBAN* ในหนอนเชื้อไฟ่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของระยะลาร์วัลไคอะพอสและอาจถูกกระตุ้นได้ด้วยช่วงแสง

เมื่อทำการวิเคราะห์การตอบสนองของระยะลาร์วัลไคอะพอสในหนอนเชื้อไฟ่ต่อฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (juvenile hormone analogue, JHA: S-methoprene) และ 20-hydroxyecdysone (20E) โดยใช้เทคนิค qRT-PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อ JHA และ 20E ในปมประสาทได้หลอดอาหารและต่อมโปรทอแรกซิก พบว่า การทดลองทั้งในสภาวะ *in vivo* และ *in vitro* แสดงรูปแบบการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีน JH receptor (*OfMet*), *OfDH-PBAN*, ecdysone receptor (*OfEcR-A* and *OfEcR-B1*) และ ecdysone inducible genes (*OfBr-C*, *OfE75A*, *OfE75B*, *OfE75C* and *OfHR3*) ที่เหมือนกัน โดย JHA ชักนำการแสดงออกของ JH receptor และ *OfDH-PBAN* ในปมประสาทได้หลอดอาหารและต่อมโปรทอแรกซิก และชักนำการแสดงออกของ ecdysone receptor และ ecdysone inducible genes ในต่อมโปรทอแรกซิกเท่านั้น ในขณะที่ 20E ชักนำการแสดงออกของ ecdysone receptor และ ecdysone inducible genes ในปมประสาทได้หลอดอาหารและต่อมโปรทอแรกซิก นอกจากนี้การทดลองในสภาวะ *in vitro* JH receptor และ *OfDH-PBAN* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ขึ้นอยู่กับ JHA เท่านั้น แต่ ecdysone receptor และ ecdysone inducible genes มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ขึ้นอยู่กับ JHA และ 20E อย่างไรก็ตาม JH receptor และ *OfDH-PBAN* ในปมประสาทได้หลอดอาหารมีการแสดงออกเกิดขึ้นเร็วกว่าในต่อมโปรทอแรกซิก และการแสดงออกของ ecdysone receptor และ ecdysone inducible genes ถูกชักนำได้ด้วย JHA มากกว่า 20E จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า JHA อาจจะกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกผ่านทาง JH receptor และ *OfDH-PBAN* ในปมประสาทได้หลอดอาหาร และส่งผลให้เกิดการสิ้นสุดของระยะลาร์วัลไคอะพอส ซึ่งผลที่ได้ก็นำไปสู่กลไกแบบใหม่ในการควบคุมระยะลาร์วัลไคอะพอสของหนอนเชื้อไฟ่