

Thesis Title	Identification and characterization of diapause associated proteins in the bamboo borer, <i>Omphisa fuscidentalis</i>		
Author	Miss Jatuporn Tungjitwitayakul		
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)		
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Tippawan Singtripop		Chairperson
	Prof. Dr. Sho Sakurai		Member
	Assoc. Prof. Somsak Wanichacheewa		Member

ABSTRACT

The bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*, is a moth that is distributed throughout northern Thailand. The larvae hidden inside the internodes of bamboo culms are in diapause for nine months. During the fifth instar, larvae are prepared for entering and maintaining diapause at biochemical and molecular levels. Though many genes are shut down during diapause, some are specifically expressed at this time. In this study, five diapause associated proteins were cloned and sequenced. The first group, two major proteins, storage protein 1 and 2 (OfSP1 and OfSP2), were found to be accumulated in hemolymph of diapausing larvae. *OfSP1* and *OfSP2* mRNAs contained open reading frames encoding 700 and 691 amino acid residues, respectively. The second group, three heat shock-responsive genes, *Ofhsp70*, *Ofhsc70* and *Ofhsp90* were also identified for the first time in *O. fuscidentalis*. These genes contained open reading frames encoding 638, 652 and 716 amino acid residues, respectively.

The mRNA expression levels of the five diapause associated proteins and protein levels of OfSP1 and OfSP2 were examined through the course of larval diapause to prospect the possible involvements of their expressions in the larval diapause in this species. OfSP1 and OfSP2 concentrations in the hemolymph were high during diapause. In pupae, OfSP1 levels decreased in the male hemolymph and undetectable in the female hemolymph. *OfSP1* and *OfSP2* mRNA levels in the fat bodies were low during the third instar, but increased greatly during the fourth and fifth instars. During diapause, mRNA expression continued at a lower level than that in the feeding period. In *Omphisa*, OfSP1 and OfSP2 proteins are produced by the larval fat bodies in the fourth and fifth instars, and the proteins accumulate in the hemolymph until larvae enter diapause. OfSP1 may be reabsorbed by the fat bodies at the end of diapause for subsequent re-use during pupation. Three heat shock protein genes are up-regulated by heat-treatment, revealing that they encode the members of heat-shock proteins. The heat shock protein genes exhibited characteristic expression profiles in pre-diapause, diapause and post-diapause periods. *Ofhsp70* mRNA expression was high in pre-diapause while down-regulated in diapause and post-diapause. *Ofhsc70* expression level was low in pre-diapause and in the first half of diapause period, followed by an up-regulation in the second half of diapause period. In contrast, *Ofhsp90* expression remained at substantially high levels for the first two-third of diapause in February, and suddenly decreased at the beginning of the second one-third. The results indicate that *Ofhsp90* is associated with the maintenance of diapause and *Ofhsc70* with the termination of diapause. In contrast, the expression of *Ofhsp70* is unrelated to diapause.

To examine the hormonal control of diapause associated protein gene expressions, diapausing larvae were treated with 20-hydroxyecdysone (20E) and juvenile

hormone analogue (JHA). Injection of 20E into diapausing larvae caused an increase in *OfSP1* and *OfSP2* mRNA levels 2–3 days post-injection, followed by a decrease in their expression until pupation, which occurred 2–4 days thereafter. When larvae were treated with JHA, *OfSP1* and *OfSP2* mRNA levels gradually decreased until the onset of pupation. The 20E and JHA caused increases in the mRNA expression of *Ofhsc70*, but not *Ofhsp70* and *Ofhsp90*, in diapausing larvae. These transcriptional responses to 20E are consistent with the changes in ecdysteroid titer in the hemolymph relative to gene expression during diapause.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การระบุและการหาลักษณะเฉพาะของโปรตีนร่วมของระยะ	
	ไคอะพอสในหนอนเชื้อไผ่, <i>Omphisa fuscidentalis</i>	
ชื่อผู้เขียน	นางสาวจตุพร ตั้งจิตวิทยากุล	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ	ประธานกรรมการ
	Prof. Dr. Sho Sakurai	กรรมการ
	รศ. สมศักดิ์ วณิชชีวะ	กรรมการ

บทคัดย่อ

หนอนเชื้อไผ่เป็นระยะตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืนที่พบได้ในภาคเหนือของประเทศไทย ตัวหนอนอาศัยอยู่ในกระบอกไม้ไผ่โดยจะอยู่ในระยะไคอะพอสเป็นเวลา 9 เดือน โดยทั่วไปแมลงในระยะอินสตาร์ที่ห้าจะมีการเตรียมพร้อมก่อนที่จะเข้าสู่ระยะไคอะพอสและการคงสภาพของระยะไคอะพอสทั้งในระดับชีวเคมีและระดับโมเลกุล แม้ว่าจะมียีนหลายยีนที่หยุดการทำงานในระยะไคอะพอสแต่บางยีนก็มีรูปแบบการแสดงออกที่เฉพาะเจาะจงในช่วงดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนนิ่งและหาลำดับเบสของโปรตีนร่วมของระยะไคอะพอสในหนอนเชื้อไผ่เป็นครั้งแรกได้จำนวนห้ายีน ยีนในกลุ่มแรก ได้แก่ โปรตีนสะสมชนิดที่ 1 และ 2 (*OfSP1* และ *OfSP2*) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากในฮีโมกลิมพ์ของตัวหนอนระยะไคอะพอส โปรตีนทั้งสองชนิดประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 700 และ 671 กรดอะมิโนตามลำดับ ยีนในกลุ่มที่สอง คือ heat shock-responsive gene ได้แก่ *Ofhsp70*, *Ofhsc70* และ *Ofhsp90* พบว่าทั้งสามยีนประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 638, 652 และ 716 ตามลำดับ

เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนทั้งห้าชนิดที่เกี่ยวข้องกับระยะไคอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ จึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนร่วมของระยะไคอะพอสในระดับ mRNA และศึกษา ระดับโปรตีนของโปรตีนสะสม OfSP1 และ OfSP2 ในช่วงระยะไคอะพอส ระดับโปรตีนของ OfSP1 และ OfSP2 ในฮีโมลิฟท์สูงในระยะไคอะพอส แต่ระดับของ OfSP1 ในฮีโมลิฟท์ลดลงในดักแด้เพศผู้และไม่สามารถตรวจพบได้ในฮีโมลิฟท์ของดักแด้เพศเมีย ระดับ mRNA ของ *OfSP1* และ *OfSP2* ในก้อนไขมันอยู่ในระดับต่ำในอินสตาร์ที่สามแต่เพิ่มมากขึ้นในระหว่างอินสตาร์ที่สี่และห้า การแสดงออกของ mRNA ลดต่ำลงในระยะไคอะพอสเมื่อเทียบกับระยะที่มีการกินอาหาร จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่า OfSP1 และ OfSP2 ผลิตจากก้อนไขมันของระยะตัวหนอนอินสตาร์ที่สี่และห้า และเก็บสะสมในฮีโมลิฟท์จนกระทั่งเข้าสู่ระยะไคอะพอส เมื่อสิ้นสุดระยะไคอะพอส OfSP1 อาจถูกนำกลับเข้าไปในก้อนไขมันสำหรับการนำไปใช้ในระหว่างการเข้าดักแด้ สำหรับยีนของ heat shock protein นั้นพบว่าการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากที่ได้รับความร้อน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสามชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ heat shock proteins การแสดงออกของ heat shock proteins นั้นมีรูปแบบที่มีลักษณะเฉพาะของแต่ละยีนในช่วงก่อนเข้าไคอะพอส ในระยะไคอะพอสและภายหลังสิ้นสุดระยะไคอะพอส โดย *Ofhsp70* mRNA มีการแสดงออกสูงในระยะก่อนเข้าไคอะพอสและลดลงในระหว่างที่เข้าสู่ระยะไคอะพอสและสิ้นสุดระยะไคอะพอส ระดับการแสดงออกของ *Ofhsc70* อยู่ในระดับต่ำในช่วงก่อนเข้าไคอะพอสและในครั้งแรกของระยะไคอะพอส หลังจากนั้นระดับของ *Ofhsc70* จะเพิ่มสูงขึ้นในครั้งหลังของไคอะพอส ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของ *Ofhsp90* อยู่ในระดับสูงจนกระทั่งถึงเดือนกุมภาพันธ์ จากนั้นการแสดงออกจะลดลงทันทีในช่วงท้าย จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *Ofhsp90* เกี่ยวข้องกับการคงสภาพของไคอะพอสและ *Ofhsc70* เกี่ยวข้องกับการสิ้นสุดระยะไคอะพอส ในทางตรงกันข้ามพบว่าการแสดงออกของ *Ofhsp70* นั้นไม่มีความสัมพันธ์กับระยะไคอะพอส

เพื่อศึกษาการควบคุมของฮอร์โมนต่อการแสดงออกของโปรตีนร่วมของระยะไคอะพอส จึงให้ฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone (20E) และ Juvenile hormone analogue (JHA) แก่ตัวหนอนระยะไคอะพอส การฉีด 20E แก่ตัวหนอน ทำให้ระดับ mRNA ของ *OfSP1* และ *OfSP2* เพิ่มขึ้นภายใน 2-3 วัน หลังจากได้รับฮอร์โมน หลังจากนั้นการแสดงออกของทั้งสองยีนลดลงเมื่อเข้าดักแด้ซึ่งจะเกิดภายใน 2-4 วัน เมื่อตัวหนอนได้รับ JHA ระดับ mRNA ของ *OfSP1* และ *OfSP2* ค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งเข้าดักแด้ สำหรับ heat shock protein นั้น ระดับ mRNA ของ *Ofhsc70* ในระยะไคอะพอสเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับ 20E และ JHA แต่ระดับของ *Ofhsp70* และ *Ofhsp90* ไม่เพิ่มขึ้น ซึ่งการตอบสนองต่อ 20E นี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระดับเอกไซเตรอยด์ในฮีโมลิมพ์ซึ่งสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนในระยะไคอะพอส