PDF/42/2540-ผศ.ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa* sp.) โดยใช้ DNA Fingerprinting Technique

**The Study of the Bamboo Borer (*Omphisa* sp.) Variation by DNA Fingerprinting Technique**

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

PDF
40
8
042

31 กรกฎาคม พ.ศ. 2542

สัญญาเลขที่ PDF/42/2540

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa* sp.) โดยใช้ DNA Fingerprinting Technique

**The Study of the Bamboo Borer (*Omphisa* sp.) Variation by DNA Fingerprinting Technique**


ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

สังกัด

ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ชุดโครงการ ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก ปี 2540

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุน สนับสนุนการวิจัย ประเทศไทย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณที่ทางกองทุนได้ให้โอกาสแก่ผู้วิจัยในการเริ่มต้นทำงานวิจัยในประเทศไทยหลังจากได้รับปริญญาเอกและได้พัฒนางานวิจัยของสถาบัน ขอขอบคุณหัวหน้าภาควิชาชีววิทยา รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ วนิชาชีวะ ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในการทำวิจัย งานวิจัยครั้งนี้ประสพความสำเร็จได้โดยได้รับคำแนะนำทางด้านเทคนิคและให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือการทำวิจัยจากนักวิจัยที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. Sho Sakurai คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย Kanazawa ประเทศญี่ปุ่น และ รองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ จันทราทิตย์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องและให้ความช่วยเหลือเสมอมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

# บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF 4080042

หัวข้อโครงการ : การศึกษาความหลากหลายของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa* sp.) โดยใช้ DNA Fingerprinting technique

หน่วยงาน : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : scboi020@cmu.chiangmai.ac.th.

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

วัตถุประสงค์ : 1. เพื่อศึกษาเทคนิควิธีการสกัด DNA จากหนอนเยื่อไผ่
2. เพื่อศึกษาความแตกต่างของแบบแผนของยีนของหนอนเยื่อไผ่ชนิดต่างๆ โดยการทำ DNA Fingerprinting

วิธีการ : นำหนอนเยื่อไผ่จากต้นไผ่ 5 ชนิดที่แตกต่างกันคือ ไผ่ซาง ไผ่หก ไผ่บง ไผ่ไร่รอ และไผ่สีสุก มาสกัด DNA โดยการตัดเยื่อ epidermis ตามบริเวณ thoracic และเอาไขมันที่ติดค้างออกจนหมด จากนั้นนำไปสกัด DNA และ amplify mitochondrial cytochrome C oxidase subunit gene (CO-I) โดย polymerase chain reaction (PCR) ต่อจากนั้นนำ Genomic DNA ที่ได้ไป clone ใน PUC 19 vector plasmid DNA จาก *E. coli* ถูกนำไป purify และ sequence เปรียบเทียบกันโดยใช้ DNA sequencer และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ DNASIS โปรแกรม

ผลการทดลอง : ผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบ nucleotide sequence ของ mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene พบว่า มีความแตกต่างกันเพียง 1 nucleotide แต่เมื่อนำไปเปรียบชนิดของกรดอะมิโนแล้วพบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน และจากการศึกษาเปรียบเทียบในสายวิวัฒนาการแล้วหนอนเยื่อไผ่อยู่ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับ *Spodoptera* sp. , *Manduca* sp. และ *Antheraea* sp.

สรุปผลการทดลอง : หนอนเยื่อไผ่ที่อาศัยในต้นไผ่ทั้ง 5 อยู่ใน species เดียวกัน

ข้อเสนอแนะ: ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลที่แน่ชัดว่าหนอนเยื่อไผ่ที่มีการกระจายในเขตจังหวัดเชียงใหม่เป็นชนิดเดียวกัน และงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีการหา sequence ของ mitochondrial cytochrom C oxidase subunit I gene ของหนอนเยื่อไผ่ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Lepidoptera และนำไปเปรียบเทียบสายวิวัฒนาการกับแมลงชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งผลงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลใหม่ที่สำคัญในทางชีววิยาของแมลงในประเทศไทย

Key words: Bamboo borer, moth, CO-I gene

# Abstract


Project Code : PDF 4080042

Project Title : The Study of the Bamboo Borer (*Omphisa* sp.) Variation by DNA Fingerprinting Technique

Investigators : Biology Department, Faculty of Science, Chiang Mai University

E-mail Address : scboi020@cmu.chiangmai.ac.th.

Project Period : 2 years



Objectives : 1. To study the technique of DNA extraction in bamboo borer.
2. To study the difference of DNA pattern in bamboo borers by DNA Fingerprinting technique

Methodology : Larvae were collected from 5 different bamboo species. The thoracic epidermis from 2 larvae from each bamboo species was separately dissected and cleared of all fat body. DNA was extracted and a region of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene (CO I) was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were purified and cloned into PUC 19 vector. The plasmid DNA from *E. coli* culture was purified using Flexi Prep kits and DNA products were sequenced using DNA sequencer and sequences were analyzed with DNASIS.

Conclusion : The bamboo borer larvae found on different bamboo species belong to the same species.

Implementation : The present study indicated that the bamboo borer larvae distributed in Chiang Mai Province belong to the same species. This is the first finding to show the sequencing of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene (CO-I) of this species. In addition, phylogenic study confirmed that the bamboo borers share a cluster with *Spodoptera* sp. *Manduca* sp. and *Antheraea* sp.



Key words: Bamboo borer, moth, CO-I gene

## Executive summary

The bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis* Hampson (Pyralidae, Lepidoptera), is a moth found in northern Thailand, Loa and Myanmar and its larvae feed on the inner pulp of the bamboo shoots. In a tropical highland (about 500 m sea level) forest at 19°N near Chiang Mai , Thailand, Adults appeared in early August and laid clusters of eggs on the newly grown bamboo shoot. The newly hatched larvae bore a hole in the shoot, enter an internode of the shoot and feed on the inner pulp After maturation in September, the larvae remain in an internodal cavity of bamboo for up to 9 months, from September to following June. The present study found that the larvae feed on at least 5 bamboo species, *Dendrocalamus membranaceus* Munro, *D. hamitonii* Nees & Arn, *Bambusa nutants* Wall. ex Murro, *B. blumeana* Schult, *Gigantechloa albociliata* Kurz. Nucleotide sequence analysis of the region of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene amplifed by the polymerase chain reaction (PCR) verified that larvae collected from different bamboos belong to the same species. In addition phylogenic study confirmed that the bamboo borers share a cluster with *Spodoptera ornithog, Maduca sexta* and *Theraea pernyi*.

# บทนำ

หนอนเยื่อไผ่เป็นระยะตัวหนอน (larva) ของผีเสื้อกลางคืน (moth) อาศัยและเจริญเติบโตในไม้ไผ่หลายชนิด เช่น ไผ่หก ไผ่ซาง ไผ่บง ไผ่ไร่รอ ฯลฯ จากรายงานการสำรวจแหล่งที่อยู่ของหนอนเยื่อไผ่จะพบอยู่มากในบริเวณป่าไผ่ทางภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย นอกจากนั้นยังพบในประเทศพม่า ลาว ฯลฯ จากการที่พบหนอนชนิดนี้ได้ในหลายพื้นที่ จึงทำให้หนอนมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไป เช่น คนพื้นเมืองในภาคเหนือ เรียก แน้หรือแม้ บางกลุ่มเรียก แด้หรือด้วงไม้ไผ่ อีก้อ เรียก ฮาโมลัว กะเหรี่ยง เรียก คลีเคล้ะ พม่า เรียก วาโป้ว ส่วนจีนฮ่อ เรียก จูซูง ส่วนการนำหนอนเยื่อไผ่มาประกอบอาหารจะพบทางภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยนำหนอนเยื่อไผ่มาทอดกรอบ รู้จักกันดีในชื่อของรถด่วนทอด ซึ่งเป็นที่นิยมรับประทานกันในกลุ่มคนพื้นเมืองทั่วไป (ไพฑูรย์, 2538)

หนอนเยื่อไผ่ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Omphisa fuscidentalis* Hampson จัดอยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Pyralidae จากการศึกษาการดำรงชีวิตและลักษณะวงชีวิต (ภาพที่ 1 และ 2) พบว่า แม่ผีเสื้อจะวางไข่ในช่วงประมาณเดือนสิงหาคม โดยวางไข่ตามโคนต้นและกาบของหน่อไผ่ เมื่อฟักออกมาเป็นตัวหนอนแล้วจะพากันเคลื่อนย้ายและเจาะรูเข้าไปอาศัยอยู่ในลำต้นของหน่อไผ่ จากนั้นจะกัดกินเยื่อไผ่อ่อนซึ่งบุอยู่ภายในปล้องเป็นอาหารและเจาะทะลุผ่านข้อของปล้องไม้ไผ่ขึ้นไปเรื่อยๆ จนเกือบถึงยอด ในช่วงนี้ตัวหนอนจะมีการเจริญเติบโตมากขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะกลับลงมาอยู่รวมกันที่ปล้องที่ 1 หรือ 2 ถัดจากปล้องล่างที่เคยเจาะรูเอาไว้ในตอนแรก ระยะที่อาศัยอยู่ในลำต้นไผ่ใช้เวลาประมาณ 280-304 วัน (ช่วงเดือนกันยายนถึงพฤษภาคม) จึงจะเข้าดักแด้ภายในกระบอกไผ่ (ช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม) และใช้เวลาอีกประมาณ 40-60 วัน จึงออกเป็นตัวเต็มวัยของผีเสื้อกลางคืน (ประมาณเดือนสิงหาคม) ตัวเต็มวัยมีลักษณะคือ ตัวเมีย มีสีน้ำตาลส้ม ปีกคู่บนมีลวดลายหยักเป็นเส้นโค้งสีดำ ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ (เดชา, 2535 และไพฑูรย์, 2538) จะสังเกตได้ว่า หนอนเยื่อไผ่นั้นมีวงชีวิตยาวนานถึง 1 ปี นับว่าเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เพราะมีความแตกต่างจากแมลงในกลุ่มเดียวกันเป็นอย่างมาก โดยระยะที่ใช้เวลานานที่สุดคือ ระยะที่เป็นตัวหนอนในช่วงเดือนกันยายน ถึงพฤษภาคมของปีถัดไป ระยะนี้หนอนจะกินอาหารและเจริญขึ้นเพื่อเพิ่มขนาดในช่วงเดือนแรกเท่านั้น หลังจากนั้นจะหยุดกินอาหาร ซึ่งเรียกระยะตัวหนอนนี้ว่า ระยะไดอะพอส (diapausing stage)

ตำแหน่งของจังหวัดเชียงใหม่อยู่ที่ละติจูด 18° 47' N อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ยต่อเดือนประมาณ 20°C หนอนเยื่อไผ่จัดเป็นแมลงในเขตร้อน (tropical insect) มีระยะไดอะพอส (Diapause) ซึ่งเป็นระยะฟักตัวหรือปรับตัวเพื่อการอยู่รอดในฤดูกาลที่วิกฤติ (Denlinger, 1986)

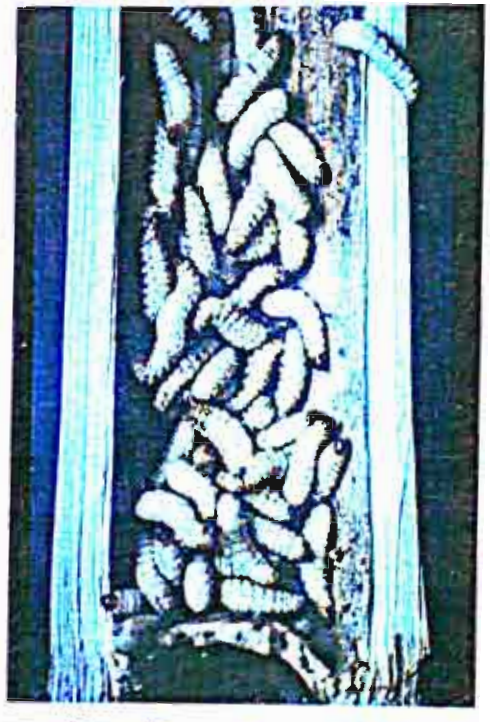
จากรายงานพบว่า มีแมลงในเขตร้อนหลายชนิดที่มีระยะไดอะพอสเป็นช่วงหนึ่งของวงชีวิต เช่น stalk stemborers, Chilo (Scheltes, 1978) และ maize stemborer, Busseola (Usua, 1970) จะมีช่วงระยะที่เป็น larval diapause และ tropical flesh flies จะเข้าสู่ระยะ pupal diapause (Delinger, 1979) Endomychid beetle (*Stenotarsus rotundus*) จะเข้าสู่ adult diapause นานถึง 10 เดือน (Wolda and Denlinger, 1984) แต่อย่างไรก็ตามรายงานเกี่ยวกับการเข้าระยะ diapause ของแมลงในเขตร้อน ยังมีน้อยมาก สำหรับหนอนเยื่อไผ่ พบว่ามีระยะ larva, diapause ถึง 9 เดือนและอาศัยอยู่ในไม้ไผ่ต่างชนิดกัน เป็นแมลงในเขตร้อนที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก

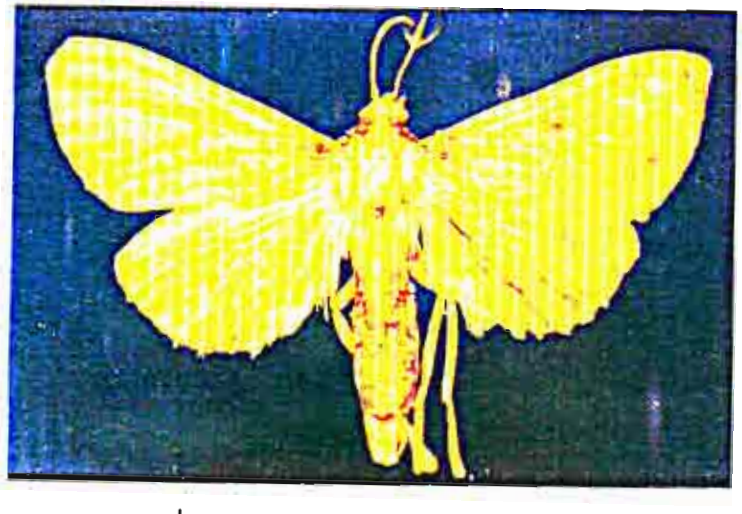
จากรายงานการจำแนกชนิดของแมลงในสกุล Omphisa พบว่ามีถึง 11 ชนิด (species) และมี 2 ชนิดที่พบว่ากระจายอยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Robinson et al., 1994) แต่พบว่ายังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษา *Omphisa* sp. ในประเทศไทย แม่ผีเสื้อของหนอนเยื่อไผ่ที่พบในเขตจังหวัดเชียงใหม่ จัดเป็น *Omphisa fuscidentalis* จากการสำรวจระยะแรก พบว่าในจังหวัดเชียงใหม่สามารถพบหนอนเยื่อไผ่อาศัยอยู่ในต้นไผ่ 5 ชนิดด้วยกันคือ

ไผ่ซาง *Dendrocalamus membranaceus* Munro
ไผ่หก *D. hamitonii* Nees & Arn
ไผ่บง *Bambusa nutants* Wall. ex Murro
ไผ่สีสุก *B. blumeana* Schult,
ไผ่ไร่รอ *Gigantechloa albociliata* Kurz.

แต่ไม่มีรายงานว่าหนอนเยื่อไผ่ ที่อาศัยอยู่ในไม้ไผ่ต่างชนิดกันจะจัดอยู่ใน species เดียวกันหรือไม่ ถึงแม้ว่าจากการศึกษาลักษณะภายนอกของหนอนเยื่อไผ่จากไม้ไผ่ทั้ง 5 ชนิด จะไม่มีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าที่จะบ่งบอกอย่างแน่ชัดว่าหนอนเยื่อไผ่จากต้นไผ่ทั้ง 5 ชนิดอยู่ใน species เดียวกัน ยังเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับของ nucleotide ของ mitochondrial DNA : cytochrome C oxidase subunit I (CO I) ของหนอนเยื่อไผ่จากต้นไผ่ทั้ง 5 ชนิด และการเลือกใช้ตำแหน่งนี้เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความเฉพาะเจาะจง (conservative region) ในกลุ่มของแมลงและทำให้แยกชนิดของแมลงได้ง่ายที่สุด

# Larval diapause of the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis* Hampson





ภาพที่ 1 แสดงระยะตัวหนอน (larva) ดักแด้ (pupa) และ ตัวเต็มวัย (adult) ของหนอนเยื่อไผ่ *(Omphisa fuscidentalis* Hampson) และต้นไผ่ที่เป็นที่อยู่อาศัย

ภาพที่ 2 แสดงวงจรชีวิตของหนอนเยื่อไผ่

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## สัตว์ทดลอง (Animals)

หนอนเยื่อไผ่ได้รับการจัดจำแนกชนิดเป็น *O. fuscidentalis* โดยนักอนุกรมวิธานของสัตว์คือ Dr. M. Shalfer Natural History Museum, London และ Dr. H. Banzinger คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หนอนเยื่อไผ่จะนำมาจากต้นไผ่ชนิดต่างๆ ในเขตอำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่

## การสกัด DNA และการหาลำดับเบส (sequencing) ของ CO I gene

หนอนเยื่อไผ่จากไม้ไผ่ทั้ง 5 ชนิด จะถูกตัดเอาเฉพาะส่วนของ thoracic epidermis และล้างเอาไขมันออกจากเนื้อเยื่อจนหมดโดยใช้ Ringer 's solution จากนั้นนำเนื้อเยื่อไป homogemize ใน 400 μl ของ homogenizing buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0) 150 mM NaCl, 10 mM EDTA-NaOH (pH 8) และ 0.1% SDS) นำไปสะกัด DNA โดยใช้ phenol/chloroform (1:1 v/v) และใช้ ethanol ในการทำให้ตกตะกอน (precipitation) mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene (CO I) และ amplify โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ด้วย 2 primers คือ

5′-GA(G/T)C(A/T)CCW(A/T)ATAGC(A/T)TT(C/T)CC-3 และ
5′-C(A/C/T) GGTAAAATTAAAATATAACTTC-3′

(Simon *et al.*, 1994)

สำหรับสารที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 120 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 6 mM (NH4) $2SO_4$, 0.001% BSA, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM DNTPs 0.2 μl DNA extracts, 0.2 μM primer 0.5 units ของ DNA polymerase (KOD Dash, Toyobo, Tokyo) reaction ของ PCR จะใช้ 94°C 15 วินาที 50°C 2 วินาที และ 74°C 30 วินาที 30 รอบ โดยเครื่อง DNA Engine (MJ Research, Watertown, MA) PCR products blunt โดยใช้ KOD (Toyobo, Tokyo) และนำไปแยกโดยอิเลกโตรโฟเรซิส (Electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose gel และแถบ DNA จะถูกตัดออกและนำไปทำให้บริสุทธิ์ (pursfy) โดยใช้ Geneclean II (BIO 101, Vista, CA) และ clone ใน PUC 19 vector ส่วน plasmid DNA จาก *E. coli*

culture จะถูกนำไป purify โดยใช้ Flexi Prep kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala) จากนั้นนำ DNA product ไป sequence โดยใช้เครื่อง DNA sequencer (Hitachi 5500 M, Hitachi, Japan) และลำดับเบสไปวิเคราะห์โดย DNASIS (Hitachi Software Engineering, Tokyo)

การวิเคราะห์ ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) โดยนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ตัดส่วนของลำดับเบสของ primer และนำไปเปรียบเทียบกับสายวิวัฒนาการ phylogenetic tree และวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนจากลำดับเบสของ CO I gene โดยใช้โปรแกรมของ DNASIS ลำดับเบสของ CO I region ของแมลงกลุ่ม Lepidoptera จาก GEN Bank Database นำไปเทียบกับ Co I sequence ของ *O. fuscidentalis* โดยใช้วิธี neighbor-joining (NJ) โดยเทียบกับ 1000 replicates Tree Vies PPC (Aladdin Systems, Watsonville, CA) ถูกนำมาใช้ในการสร้าง NJ tree

## ผลการทดลอง (Results)

จากผลการศึกษาลำดับของ nucleotide ของ CO I region โดยวิธี PCR แสดงให้เห็นว่า มีเพียง 1 nucleotide ที่แตกต่างกันคือ ตำแหน่งที่ 438 nucleotide เป็น A หรือ G ที่ตำแหน่ง 312 โดยที่ nucleotide เป็น A ในหนอนที่มาจากไม้ไผ่ *D. hamitonii* *B. blumeana* และ *G. albociliata* หรือ G ในกลุ่มของ *D. membranaceus* และ *B. nutan* แต่อย่างไรก็ตามลำดับเบสนี้ไม่แสดงผลแตกต่างในชนิดของกรดอะมิโน แต่จากการแปลรหัสเบสของ CO I gene เพื่อแสดงชนิดของกรดอะมิโน พบว่า ลำดับของกรดอะมิโนไม่มีความแตกต่างกัน ในตัวอย่างหนอนเยื่อไผ่ที่มาจากต้นไผ่ทั้ง 5 ชนิด ดังนั้นเราจึงสามารถสรุปได้ว่าหนอนเยื่อไผ่ที่อาศัยอยู่ในต้นไผ่ที่แตกต่างกันทั้ง 5 ชนิด อยู่ใน species เดียวกัน (ภาพที่ 3)

ผลจากการตรวจสอบลำดับของเบสของ CO I gene ของหนอนเยื่อไผ่ กับแมลงชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่ม Lepidoptera โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของ CO-I gene และชนิดของกรดอะมิโนกับ CO I gene ของ *Manduca sexta* (Frohlich *et al.*, 1996) ดังภาพที่ 4 จากการศึกษาเปรียบเทียบ พบว่า CO I gene มีความเหมือน (Homology) ระหว่าง *O. fuscidentalis* และ *M. sexta* 83% และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีความเหมือนถึง 93%

จากการศึกษา phylogenetic tree (ภาพที่ 5) โดยเปรียบเทียบกับแมลงในกลุ่ม Lepidoptera โดยใช้ NJ tree แสดงให้เห็นว่า *O. fuscidentalis* อยู่ในกลุ่มเดียวกับ Spodoptera, Manduca และ Antheraea มีความคล้ายคลึงกัน 76%

# Nucleotide sequence of COI region and the deduced amino acid sequence

```
CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT TGA TTA TTA CCC CCA TCT CTA ACT CTT TTA ATT TCA 57
 R   M   N   N   M   S   F   W   L   L   T   P   S   L   T   L   L   I   S

AGA AGA ATT GTT GAA AAT GGA GTA GGA ACT GGA TGA ACT GTC TAC CCC CCC CTT TCA 114
 S   S   I   V   E   N   G   V   G   T   G   W   T   V   Y   P   P   L   S

TCC AAT ATT GCT CAC AGA GGA AGT TCT GTT GAT TTA GCA ATT TTT TCC TTA CAT TTA 171
 S   N   I   A   H   S   G   S   S   V   D   L   A   I   F   S   L   H   L

GCT GGA ATT TCT TCT ATT TTA GGA GCA ATT AAT TTT ATT ACA ACT ATT ATT AAC ATA 228
 A   G   I   S   S   I   L   G   A   I   N   F   I   T   T   I   I   N   M

CGT ATT AAT GGT CTA CTA TTT GAT CAA ATA CCA TTA TTC GTC TGA TCA GTA GGA ATT 285
 R   I   N   G   L   L   F   D   Q   M   P   L   F   V   W   S   V   G   I

ACA GCT CTA TTA TTA CTT TTT TCT TTA CCT GTT CTA GCG GGA GCC ATT ACT ATA CTC 342
 T   A   L   L   L   L   F   S   L   P   V   L   A   G   A   I   T   M   L

TTA ACT GAT CGA AAC TTA AAT ACA TCC TTT TTT GAA ACT GCG GGA GGA GGA GAT CCA 399
 L   T   D   R   N   L   N   T   S   F   F   E   T   A   G   G   G   D   P

ATC CTT TAT CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GGA CAT CCA 438
 I   L   Y   Q   H   L   F   W   F   F   G   H   P
```

Note position 312: A and C, G; B, D and A, A.

**ภาพที่ 3 แสดง nucleotide sequence ของ CO-I region และ ลำดับของกรดอะมิโน ของหนอนเยื่อไผ่**

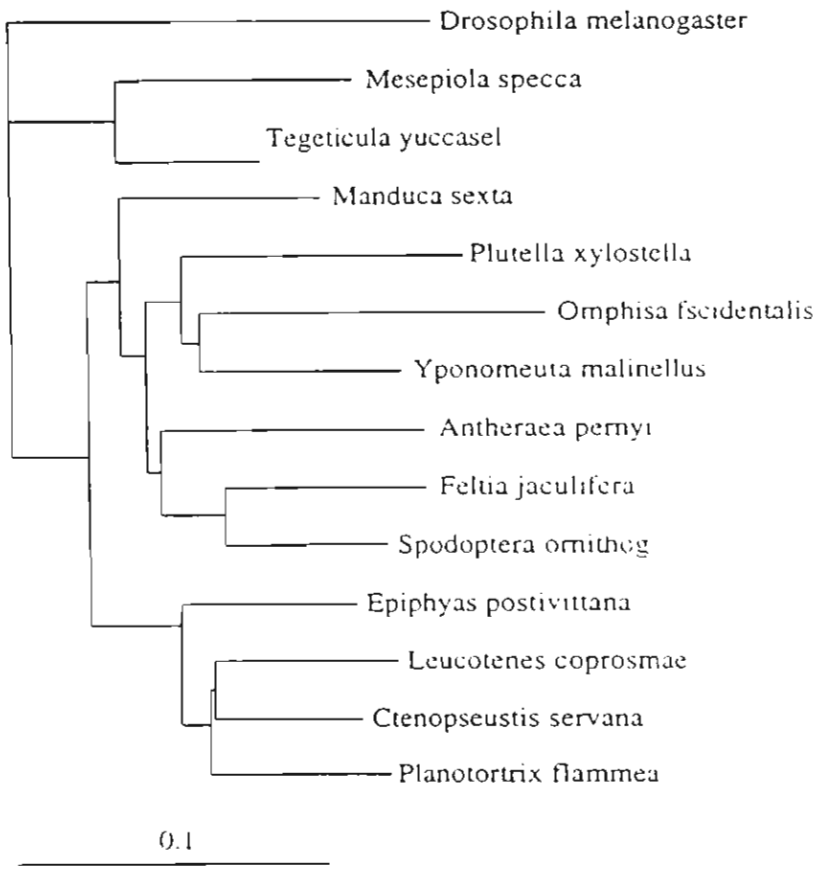
Homology of COI between *O. fuscidentalis* and *M. sexta*

```
                              *                   *
Manduca 97  RMNNMSFWLL PPSLMLLISS SIVENGAGTG WTVYPPLSSN 136
Omphisa  1  RMNNMSFWLL PPSLTLLISS SIVENGVGTG WTVYPPLSSN 40

                                                      *
       137  IAHSGSSVDL AIFSLHLAGI SSILGAINFI TTIINMRINN 176
        41  IAHSGSSVDL AIFSLHLAGI SSILGAINFI TTIINMRING 80

           **           *     *    *
       177  MSFDQMPLFV WAVGITAFLL LLSLPVLAGA ITMLLTDRNL 216
        81  LLFDQMPLFV WSVGITALLL LFSLPVLAGA ITMLLTDRNL 120

                 **
       217  NTSFFDPAGG GDPILYQHLF WFFGHP 242
       121  NTSFFGTAGG GDPILYQHLF WFFGHP 146
```

* different amino acid

**ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของหนอนเยื่อไผ่และ *M. sexta***

re 1B




**ภาพที่ 5 Phylogenic tree ของแมลงกลุ่ม Lepidoptera 13 ชนิด จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ mitochondrial cytochrome c oxidase CO-I region gene**

## อภิปรายผลและสรุปผล (Discussion and conclusion)

ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า หนอนเยื่อไผ่ที่พบใน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ อาศัยอยู่ต้นไผ่ที่ต่างชนิดกันทั้ง 5 ชนิดคือ *D. membranaceus, O. hamitonii, B. nutan, B. blumerana* และ *G. albociliata* อยู่ใน species เดียวกันคือ *O. fuscidentalis* ดังที่ Dr. M. Shafler จาก Natural History Museum และ Dr. H. Banzinger จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้จำแนกชนิดของหนอนเยื่อไผ่ไว้

จากการใช้เทคนิค DNA Finger Printing เปรียบเทียบทั้งลำดับของ nucleotide รวมทั้งตรวจลำดับกรดอะมิโน ทำให้ผลที่ได้มีความเชื่อมั่นสูงว่าหนอนเยื่อไผ่ที่มาจากต้นไผ่ทั้ง 5 ชนิด เป็นผีเสื้อกลางคืนชนิดเดียวกัน และจากการศึกษาเปรียบเทียบ NJ tree ของ nucleotide sequence ของ CO I region กับแมลงในกลุ่ม Lepidoptera พบว่า *O. fuscidentalis* มีส่วนคล้ายคลึงและอยู่ในกลุ่มเดียวกัน *Maduca* sp., *Spodoptera* sp. และ *Antheraea* sp.

## สิ่งที่ได้รับ (Out put)

จากผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสำคัญทางชีววิทยา ทำให้เราได้ทราบแน่ชัดว่า หนอนเยื่อไผ่ที่มีการกระจายอยู่ในบริเวณเขตภาคเหนือตอนบนของไทยเป็นชนิด *O. fuscidentalis* และอยู่อาศัยได้ในต้นไผ่หลายๆ ชนิดแต่แม่ผีเสื้อของหนอนเยื่อไผ่นั้นเป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งถือว่าเป็นข้อมูลที่สำคัญและไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนั้นข้อมูลนี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับผู้บริโภคที่ได้รู้จักหนอนชนิดนี้มากขึ้น และอาจจะต้องมีการศึกษาถึงผลดีหรือผลเสียจากการบริโภคหนอนชนิดนี้ และงานวิจัยนี้ได้นำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงโดยการหา sequence ของ mitochondrial DNA cytochrome C oxidase(CO-I) ในหนอนเยื่อไผ่ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Lepidoptera และยังไม่มีรายงานมาก่อน เทคนิคนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงอื่นๆ รวมทั้งการศึกษาทางวิวัฒนาการของแมลงได้อีกด้วย นอกจากนั้นยังสามารถนำไปเปรียบเทียบสายวิวัฒนาการกับแมลงชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน ทำให้รู้สำดับวิวัมนาการของหนอนเยื่อไผ่อีกด้วย ซึ่งผลงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลใหม่ที่สำคัญในทางชีววิยาของแมลงในประเทศไทย และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับงานวิจัยในขั้นตอนต่อไป

งานวิจัยนี้ได้นำไปพิมพ์เผยแพร่โดยรวมกับผลงานวิจัยเรื่องหนอนเยื่อไผ่อีกหลายหัวข้อที่ผู้วิจัยได้ทำและได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Zoological Science, Japan แล้ว ดังที่แนบมาในภาคผนวก

# เอกสารอ้างอิง


เดชา วิวัฒน์วิทยา (2535) ชีววิทยาของหนอนเยื่อไผ่ เอกสารเสนอต่อที่ประชุมการป่าไม้ 16-20 พฤศจิกายน 2535. หน้า 1-12.

ไพฑูรย์ เล็กสวัสดิ์ (2538) ชีวประวัติและศัตรูธรรมชาติของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa* sp., Pyralidae: Lepidotera) การอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 2 เล่มที่ 1 สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทยฯลฯ หน้า 96-102

Denlinger DL (1979) Pupal diapause in tropical flesh flies : Environmental and endocrine regulation, metabolic rate and genetic selection. Biol Bull 156 : 31-46.

Denlinger DL (1986) Dormancy in tropical insects. Ann Rev Entomol 31 : 239-264.

Robinson SG, Tuck KR, Shaffer M (1994) A field guide to the smaller moths of South-East Asia. The Natural History Museum, Art Prining Works Sdn. Bhd., London, p. 181.

Scheltes P (1978) The condition of the host plant during aestivation-diapause of the stalk borers *Chilo partellus* and *Chilo orichalcociliella* (Lepidoptera, Pyralidae) in Kenya. Entomol Exper Appl 24 : 479-488.

Simon C, frati F,Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook p (1994) Evolution, weighting, and phylogetic utility of mitochondral gene sequences and a compliation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann Entomol Soc Am 87:651-701

Usua EJ (1970) Diapause in the maize stemborer. J Econ Entomol 63 : 1605-1610.

Wolda H, Denlinger DL (1984) Diapause in a large aggregation of a tropical beetle, Ecol Entomol 9 : 217-230.

# ภาคผนวก

# Larval Growth and Diapause in a Tropical Moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson

Tippawan Singtripop[1]*, Somsak Wanichacheewa[1], Seiji Tsuzuki[2], and Sho Sakurai[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University
Chiang Mai 50200, Thailand
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University
Kanazawa 920-1192, Japan

Running head: larval diapause of *Omphisa fuscidentalis*

* To whom reprint request should be addressed.

---

Correspondence should be addressed to Sho Sakurai, Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-1192, Japan.
Tel: +81-76-264-5713; Fax: +81-76-264-5977;
E-mail: ssakurai@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

**ABSTRACT**---The bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*, is a moth found in northern Thailand, Lao and Myanmar and its larvae feed on the inner pulp of bamboo shoots. In a tropical highland (about 500 m sea level) forest at 19 °N near Chiang Mai, Thailand, the larvae feed on at least 5 bamboo species. Nucleotide sequence analysis of the region of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene amplified by the polymerase chain reaction (PCR) verified that larvae collected from different bamboos belong to the same species. Adults appeared in early August and laid clusters of eggs on the newly grown bamboo shoot. The newly hatched larvae bore a hole in the shoot, enter an internode of the shoot and feed on the inner pulp. After maturation in September, the larvae remain in an internodal cavity of bamboo for up to 9 months, from September to the following June. Number of larval instars was estimated by measuring the width of head capsules remained in internodes of bamboo shoots. The growth curve of the width fitted to Dyar's law and the mature larvae were estimated to be 5th instar. Mature larvae were collected in the field each month and their body weight, head capsule width, protein and fat contents and hemolymph ecdysteroid titer were measured. Body weight continuously decreased during the 9 months whereas head capsule width remained constant. Fat content fluctuated during this period while protein level remained at a similar level until March, after which it significantly increased. During this period, hemolymph ecdysteroid concentrations remained low. Current results show that the bamboo borer larvae enter diapause at the end of feeding period of fifth (last) larval instar and the larval diapause lasts until June.

## INTRODUCTION

The bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis* Hampson (Pyralidae, Lepidoptera) is found in northern Thailand, Loa and Myanmar. The mature larvae are a favored food for mountain tribe people, and they have recently become popular in urban areas as well. They are sold in markets almost throughout the year, except for the months of July-September, indicating that there are no larvae in the field in those months.

The food plant of bamboo borer larvae is young bamboo shoot. In the Chiang Mai area, bamboo shoots initiate growth from late July through August. The adult lays an egg cluster on a bamboo shoot in early August. The newly hatched larvae bore a hole through the internodal wall so that all the larvae from one egg cluster move into the internode and feed on the inner pulp. Within the plant, larvae bore a hole through the septum and move upward from internode to internode to obtain fresh inner pulp as food. When larvae become mature in middle-late September, they migrate down along the inner culm to the original internode with the entrance hole or the internode immediately above the original one in which they pupate in the middle of the following June. Adult eclosion takes place inside the internode and the newly eclosed moths escape from the

entrance hole (Wiwatwittaya, 1992; Leksawasdi, 1994). The larval period thus lasts from mid-August until early the following June.

The latitude of Chiang Mai where larvae were collected is 18° 47'N, and the lowest temperature (monthly mean value) is above 20 °C. *O. fuscidentalis* is thus a tropical insect. Diapause, a period of developmental arrest, is an adaptation to survive seasonally recurring adverse conditions and is common in the temperate zone as well as the tropics (Denlinger, 1986). Although it is difficult to distinguish between diapause and a simple quiescence in some tropical insects because the information is limited (Denlinger, 1986), there are several tropical insects in which a diapause period is a component of the life cycle. The stalk stemborers, *Chilo* (Scheltes, 1978) and the maize stemborer, *Busseola* (Usua, 1970), enter a larval diapause and tropical flesh flies enter a pupal diapause (Denlinger, 1979). An obligatory diapause for tropical insects has rarely been reported, but adults of the endomychid beetle, *Stenotarsus rotundus* enter diapause that lasts up to 10 months (Wolda and Denlinger, 1984). In the bamboo borer, preliminary observations suggested that the larvae were in diapause for 9 months but this observation has not been confirmed. Along with the unique habitat of larvae as in bamboo shoots, it was of interest to confirm the long larval diapause of this tropical insect.

Identification of experimental animals is prerequisite for physiological investigations of wild insects. Robinson *et al.* (1994) reported that there are more than 11 species in the genus *Omphisa*, two of which are distributed in South East Asia, but there are no report of distribution in Thailand nor description for their larval morphology. Preliminary observations showed that larvae in Chiang Mai Province feed on at least 5 different bamboo species, *Dendrocalamus membranaceus* Munro, *D. hamitonii* Nees & Arn, *Bambusa nutans* Wall. ex Munro, *B. blumeana* Schult and *Gigantechloa albociliata* Kurz. Moths collected in Chiang Mai were identified as *Omphisa fuscidentalis* but it was not known whether or not the larvae found from different bamboo species belong to the same species, *O.* fuscidentalis although we found no morphological differences among larvae from the different bamboo. Accordingly, it was prerequisite to verify whether or not larvae from 5 bamboo species belong to the same species before starting the present study. We addressed this issue by comparing the nucleotide sequences of the cytochrome C oxidase subunit I (COI) region of mitochondrial DNA in larvae collected from the five different bamboo species.

It is important to establish the life history of insects when developmental events such as diapause are studied. The bamboo borer possesses a long larval period in its life cycle as briefly described above but their precise life cycle, especially the larval growth was not known because of their unique habitat. To estimate the stage at which the larvae enter diapause, we estimated the number of larval instars using the head capsules remained in bamboo internodes. In order to confirm the larval diapause, we collected larvae from the field monthly and measured changes in body weight, nutrient contents

and hemolymph ecdysteroid levels. The present paper describes the results of these measurements and discusses the implications for larval diapause in this tropical species.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The moth of the bamboo borer we used was identified as *O. fuscidentalis* by two taxonomists, Dr. M. Shaffer of Natural History Museum, London and Dr. H. Banzinger of Chiang Mai University. Animals were obtained from bamboo shoots in a forest in Amphur Maewang, Chiang Mai Province, Thailand. Bamboo borer larvae were collected on the 15 or 16th day of each month from September, 1995 to May, 1996 and pupae were collected in June and July, 1996 and larvae used for DNA analysis were collected in January, 1998. Bamboo shoots for collecting head capsules were obtained in September and October, 1998.

### Measurement of head capsule width

Bamboo shoots were cut in half and the residue inside the internodes were raked out into a container. The residue was suspended in water and the precipitated materials were rinsed again with fresh water and the head capsules were collected from the sediments with forceps under dissection microscope. After dried in air, the capsule width was measured under microscope with micrometer or using vernier calipers. The head capsule width of mature larvae was directly measured with vernier calipers. The sex of matured larvae was determined according to the presence of ovary or testis after measuring the head capsule width.

### Measurement of gut contents

Larvae were anaestetized with ether and cut along the dorsal midline. Hemolymph was removed with rinsing the body well with Ringer's solution, foregut and hind gut were ligated with cotton thread, and the portions anterior to the ligature in foregut and posterior in hindgut were cut to remove the midgut. After the isolated gut was washed well and excess water was removed with paper, it was weighed. Then the gut was cut and washed well with Ringer's solution in order to removed the contents, and then the gut was weighed after removing excess water with paper. The weight difference was regarded as the weight of gut contents.

### Quantification of the nutrient contents

Total protein was measured by the Kjeldahl method. Three larvae were boiled in 15 ml conc. $H_2SO_4$ with about 2 g selenium for 1 hr. The mixture was cooled to room temperature, diluted with 20 ml distilled water, neutralized with 50 ml 30% NaOH and

then distilled using a distillation unit (Model 315, Buchi). The distilled solution was added to 50 ml 4% boric acid with a few drops of thashiro (mix-indicator) and the mixture was titrated with 0.1-N HCl. The amount of total nitrogen was calculated from the titration data according to Robert (1984). For measurement of total fat, larvae were placed in a fat extraction thimble, which was connected to a Soxhlet fat extractor using chloroform as the extraction solvent. The fat extractor was run at 15 rounds/hr for 6-8 hr. After incubation at 100 °C for 2 hr to remove the solvent, the extracted fat was weighed.

**Measurement of the hemolymph ecdysteroid concentration**

Hemolymph was collected from each larva through an incision in the prolegs. The hemolymph (30 µl) was added to 270 µl methanol and centrifuged at 10,000 xg for 5 min. The supernatant was transferred to a small test tube and dried *in vacuo* at room temperature. The residue was dissolved in water, and an aliquot of the aqueous solution was subjected to ecdysteroid radioimmunoassay (RIA) (Sakurai *et al.*, 1998). The cross-reactivity of the antibody to ecdysone and 20-hydroxyecdysone (20E) is 1:5 (Yokoyama *et al.* 1996).

**DNA extraction and sequencing of COI genes**

Larvae were collected from 5 different bamboo species. The thoracic epidermis from 2 larvae from each bamboo species was separately dissected and cleared of all fat body. Each tissue was homogenized in 400 µl homogenizing buffer (10 mM Tris-HCl ( pH 8.0 ), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA-NaOH (pH 8.0), 0.1% SDS) and DNA was extracted with phenol /chloroform (1:1 v/v) followed ethanol precipitation. A region of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene (COI) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with two primers, 5'-GA(G/T)C(A/T)CCW(A/T)GA(C/T)ATAGC(A/T)TT(C/T)CC-3' and 5'-C(A/C/T)GGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3', designated according to Simon *et al.* (1994). The 20 µl reaction mixture consisted of 120 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM KCl, 2 mM MgCl2, 6 mM (NH4)2SO4, 0.001% BSA, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM each of dNTPs, 0.2 µg DNA extracts, 0.2 µM of each of the above primers and 0.5 units of DNA polymerase (KOD Dash, Toyobo, Tokyo). The thermal profile was 94 °C for 15 sec, 50 °C for 2 sec and 74 °C for 30 sec for 30 cycles controlled by DNA Engine (MJ Research, Watertown, MA). The PCR products were bluntended with KOD (Toyobo, Tokyo), separated on 2% agarose gel, and slices of agarose containing its bands of interest were excised, purified using Geneclean II (BIO 101, Vista, CA) and cloned into a pUC19 vector. The plasmid DNA from *E. coli* culture was purified using FlexiPrep (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala). DNA products were sequenced using DNA sequencer (Hitachi 5500M, Hitachi), and sequences were analyzed with DNASIS (Hitachi Software Engineering, Tokyo).

**Phylogenetic analysis**

Sequence region corresponding to the amplification primer at both the 5' and 3'

ends of the gene were removed prior to construction of phylogenetic tree. Protein-coding sequences were translated to amino acids using DNASIS for confirmation of alignment. The COI regions of other lepidopterans that corresponds to the amplified COI sequence of *O. fuscidentalis* were obtained from GEN Bank database. The COI sequences were analyzed using neighbor-joining (NJ) method. Stability of NJ tree was assessed via bootstrapping over 1000 replicates. Tree Vies PPC (Aladdin Systems, Watsonville, CA) was used to construct NJ tree.

**Statistical analysis**

Data were statistically analyzed with 2-way ANOVA. Analysis of head capsule width was performed using JMP (ver. 3.02; SAS Institute, Inc.).

**Annual changes in climate in Chiang Mai area**

The meteorological records of 9 years from 1988 to 1996 were provided by Meteorological Observatory, Chiang Mai, Thailand. Monthly precipitation of less than 100 mm is considered to be the threshold of drought in the tropical region (Whitmore, 1984). According to these criteria, the monthly changes in precipitation in Chiang Mai (Fig. 1) clearly show a wet-dry cycle: a dry season from November through April and a rainy season from June through October. The dry season is divided into two seasons according to temperature, a cool season (winter) from November to February and a hot season (summer) from March to June. Accordingly, there are three seasons, wet season followed by dry winter and dry summer.

## RESULTS

**Identification of *Omphisa fuscidentalis***

The nucleotide sequence of the COI region amplified by PCR (Fig. 2A) showed that there was only one nucleotide difference, A or G of 438 nucleotides determined: at position 312 where the nucleotide was A in larvae from the bamboos, *D. Hamitonii*, *B. blumeana* and *G. albociliata*, or G in those from *D. membranaceus* and *B. nutans*. This single replacement of nucleotide did not affect on the amino acid residue. The deduced amino acid sequences of the amplified COI region were identical among larvae collected from 5 different bamboo species. Accordingly, we concluded that the larvae found on different bamboo species belong to the same species.

To confirm that the amplified DNA is a region of COI, we compared the gene sequence and the deduced amino acid sequence with those of *Manduca* COI (Frohlich *et al.*, 1996). As seen in Figure 2B, The homology of the amplified region between *O. fuscidentalis* and *M. sexta* was 83% for the nucleotide sequence and 93% for the deduced amino acid sequence.

The phylogenetic tree (Fig. 3) was constructed with the present data and the sequences of the same region in other lepidopteran species. The NJ tree indicated that *O. fuscidentalis* fell in the same cluster as *Spodoptera*, *Manduca* and *Antheraea* since bootstrap value was 76%.

**Estimation of number of larval instar**

Figure 4 shows frequency distribution of width of the head capsules which were collected from 17 bamboo shoots. The first and second peaks were clearly observed but the peaks were not clear in three clusters ranged between 1-1.5, 1.5-2.4 and 2.4-3.3 mm. In addition, we measured the width at different intervals according to the width: the width was measured at every 0.0263 mm if it was less than 2.6 mm and at every 0.05 mm for the width not less than 2.6 mm (Fig. 4). Thus, we standardized the distribution in common logarithm, converted each peak to a normal distribution and calculated the mean value for each peak (Table 1). Then the values of head capsule width in common logarithm was plotted against the putative number of instars (Fig. 5). The curve gave a good correlation coefficient ($r^2$=0.998) and well fitted to Dyar's law and therefore we concluded that number of *Omphisa* larval instars is five. The ratio was calculated to be 1.51 from the curve gradient of 0.180 in Figure 5.

In Figure 4, the peaks for third, fourth and fifth instars appeared to be broad. Such broad peak indicated a sexual dimorphism in the larval size and thus we tried to plot the values of first and second peaks for the third through fifth instars after converting the values in common logarithm. Since a single peak was observed for each of first and second instars, these peak values were directly used for depicting two lines in Figure 6. Each peak values were on a straight line and each line gave a good correlation coefficient ($r^2$) of 0.997 for upper line (larger width) and 0.999 for lower line (narrower width).

In order to confirm the sexual dimorphism, we determined the sex of 100 diapause larvae by dissecting and confirming the existence of ovary or testis and measured the head capsule width of the same larvae. Figure 7 shows the frequency distribution of head capsule width of male and female larvae. The head capsule width in females was significantly larger than in males (p=0.0000), showing the sexual dimorphism in the head capsule width in the mature larvae. Mann-Whitney U-test showed that the population of 100 larvae is not significantly different from that of 5th instars used for depicting Figure 4 (p = 0.84). The mean values for male ($\log_{10}$ 0.421) and female ($\log_{10}$ 0.467) were therefore replaced with those for the 5th instar in Figure 6. The newly depicted curves gave a correlation coefficient ($r^2$) of 0.996 and 0.999 for male and female, respectively. This clearly showed that the larger peaks as indicated with open triangles in Figure 4 were for females' capsules while smaller ones (filled triangles for third, fourth and fifth instars) are males' capsules.

**Body weight and head capsule width**

Figure 8 shows the changes in the wet body weight of larvae and head capsule width after maturation. Mean body weight was 0.61 g soon after larval maturation in October and then decreased continuously until February ($y = -0.045x + 0.703$, $r = 0.988$, Oct vs Dec, $p<0.0001$; Dec vs Feb, $p<0.002$). Body weight increased in March ($p<0.01$) and then again sharply decreased in May ($p<0.0001$). From September to May, larvae lost approximately 47% of their wet weight. Head capsule width did not change significantly during 9 months ($p>0.1$). There was considerable variation both in body weight and head capsule width among individuals in every month (Fig. 9). Head capsule width varied from 2.5 to 3.0 mm. However, no correlation was found between the head capsule width and body weight ($r=0.179$). This may indicate that the variation in head capsule width occurred within the same larval instar.

**Gut observation**

Gut contents were observed for larvae in diapause. In larvae collected in February, there was no solid material in their midgut. Wet weight of gut content was 21 ± 1 mg (n=3) which was 3.5 ± 0.3 % of larval body weight (595 ± 23 mg). In the gut of the bamboo borer larvae, there was no solid materials except in anus where a mass of fibrous materials was found to shape a plug in anus. To estimate the loss of gut contents during the diapause, larvae collected in January was kept at 25 °C under high humidity for one month and the gut contents was measured. In those larvae, gut contents was 9.3 ± 3.7 mg (n=3) which was 1.9 ± 0.8 % of larval body weight (504 ± 34 mg).

For comparison, we measured the gut contents of the silkworm, *Bombyx mori* at the time after cessation of feeding but before purging gut contents. The aqueous contents was 14.2 ± 2.4 % of fresh body weight (3.71 ± 0.12 g; n=6). At this time, no solid piece of artificial diet was found in fore- and mid-gut. Only a piece of frosty feces was observed at the anus.

**Changes in protein and fat contents during larval diapause**

Larval body weight in May was about half the initial weight. It was therefore interest to determine the changes in fat and protein content throughout the diapause period. As shown in Figure 10, the proportional fat content fluctuated largely month by month: the highest level was found in October (0.201) and the lowest in March (0.048). By contrast, the protein level did not change significantly until January ($p>0.1$, ANOVA), after which it appeared to increase in February, decrease in March and then increase again in May.

**Changes in the hemolymph ecdysteroid levels**

Hemolymph ecdysteroid titer was determined for larvae collected in September through May and for pupae in June and July (Fig. 11). The titer was low during the larval period but fluctuates in a range from 3 to 22 ng/ml. For the first 3 months, the

titer was less than 3 ng/ml and increased to a peak value of 22 ng/ml in December after which it declined until March. A small peak was observed in April and then decreased again in May. The hemolymph ecdysteroid titer thus showed significant fluctuations but did not increase to more than 22 ng/ml. Accordingly, the titer was maintained at low levels up to May. During the pupal period, the titer increased to approximately 1,700 ng/ml in June and decreased to 770 ng/ml in July, shortly before adult eclosion.

## DISCUSSION

### Identification of the bamboo borer larvae

For the present study, we monthly collected bamboo borer larvae from natural habitat. The moth of the bamboo borer we used was identified as *O. fuscidentalis* by two taxonomists, Dr. M. Shaffer of Natural History Museum, London and Dr. H. Banzinger of Chiang Mai University. In Chiang Mai area, we found the larvae from more than 5 different bamboo species, *D. membranaceus*, *D. hamitoni*, *B. nutan* , *B. blumeana* and *G. albociliata*. Robinson *et al* (1994) described the distribution of two species of genus *Omphisa* distribute in South-East Asia, and therefore it was possible that the bamboo borer larvae from different bamboos in the same area belong to different species. The nucleotide sequence and the deduced amino acid sequences, however, strongly suggested that all the larvae collected from 5 different bamboos belong to the same species. The NJ tree constructed from the nucleotide sequences of COI region amplified by PCR indicated that *Omphisa* share a cluster with *Manduca sexta* and *Spodoptera ornithog*. This is, however, only a matter of indication because the bootstrapping values were less that 75% inside the cluster.

### Larval growth and diapause

Dyar's law shows that the head capsule of caterpillars grows in geometrical progression, increasing in width at each molt by a ratio which is constant for a given species (Wigglesworth, 1972). When this law is applicable, it is possible to deduce the actual number of ecdysis from the cast head capsules. The growth curve for the head capsule width of the bamboo borer showed a very good correlation coefficient with the ratio of growth of 1.51, showing that growth of the bamboo borer fits Dyar's law . The ratio of 1.51 is similar to that for other lepidopteran larvae, *Samia cynthia ricini* (r=1.52) and *Crambus mutabilis* (r=1.44). Accordingly, the number of larval instars was concluded to be five and the matured larvae found from the bamboo shoot in September and thereafter must be the 5th instar.

Head capsule width of insects increases at every ecdysis but not during an intermolt period (Nijhout, 1975; Chippendale and Yin, 1976, Suzuki and Nishimura, 1997). In *O. fuscidentalis*, head capsule width of larvae did not change throughout the 9 month period from September to the following May, showing that the bamboo borer larvae did not undergo an additional larval ecdysis until pupation in the field, and

therefore *O. fuscidentalis* possesses a very long period of larval diapause. During the diapause, larval body weight decreased. When larvae were disturbed, they actively moved. There was no solid material in fore- and mid-gut while a mass of fibrous material was placed like a plug at anus. Such plug-like mass is usually observed at anus before gut purge. Prior to gut purge, such mass which is usually frosty is excreted as a last piece of feces. In addition, their body length shortened prior to pupation in June (unpublished observations), which commonly occurs at the onset of the prepupal period in lepidopteran larvae. Accordingly, all the circumstantial evidences suggest that the larvae entered diapause at the end of the phagoperiod in the last larval instar. The long larval diapause was also confirmed by very low hemolymph ecdysteroid concentrations throughout the diapause period.

Loss of body weight is common in diapause larvae. Prepupae of the Mediterranean tiger moth, *Cymbalophora pudica* spend summer in a summer diapause (aestivation) and lose up to 50 % of their body weight for 3 months. The dry weight of *C. pudica* larvae in aestivation remained stable (Kostal *et al.*, 1998), an indication that the loss may mainly due to desiccation. Larval body weight in *O. fuscidentalis* decreased to about half of the initial weight over 9 months. The small decrease compared with *C. pudica* may be due to the special habitat of the larvae, i.e. inside the bamboo internode where the relative humidity is more than 90% (unpublished observation) and desiccation is less likely. Nevertheless, desiccation may be partly involved in the loss of body weight. Wet weight of gut contents of February larvae was 3.5% of wet body weight. Though we did not weigh the gut contents for September larvae, the weight may be more than 10% of wet body weight because it was about 14% in *Bombyx* mature larvae immediately before gut purge. If this can be the case in *Omphisa*, water of gut contents must be lost during the diapause. In addition, the loss of gut contents was also observed when larvae were kept in an incubator though the container of larvae was kept under high humidity. Accordingly, aqueous gut content could partly cover such desiccation during the long larval period in diapause in *Omphisa*.

Protein content proportional to wet body weight remained at the initial level for the first 7 months except in February. This means that the total amount of protein of individual larvae decreased during this period because wet body weight decreased rapidly in the diapause period. The proportional fat content greatly fluctuated month by month. Although the monthly fluctuation was statistically significant, it is not obvious whether such fluctuations actually occur in a single larva or possesses physiological meanings. The proportional fat content appeared to increase at the end of diapause, similar to the protein content.

An increase in both of proportional protein and fat contents was observed in May, concurrent with a decrease in body weight. May was one month prior to pupation. It is a common feature that the diapause is actually terminated long before developmental events become overt, such as pupation after larval diapause (Yin and

Chippendale, 1973), adult development after pupal diapause (Bowers and Williams, 1964) and egg maturation after adult diapause (Tanaka *et al.*, 1988). Accordingly, the profile of protein and fat levels in April and May may indicate that termination of larval diapause might be initiated in or before April.

**Larval diapause in tropical insects**

The increase in plant growth stimulated by the rains provides a wealth of new food resources for many phytophagous insects and the availability of food may be influenced profoundly by seasonal rhythms (Denlinger, 1986). The long diapause is, therefore, important in maintaining synchrony between the insect life cycle and the phenology of its host plants in the tropics: diapause is adaptive as a seasonal trait as the depletion of food supply (Tauber *et al.* 1986). Such a situation may be produced in the Chiang Mai area with dry-wet season cycle by the regular occurrence of droughts (see Fig. 1) that deplete the food supply in young bamboo shoots. The bamboo borer larvae feed on the soft inner pulp of the new bamboo shoots. The bamboo produces new shoots in the wet season and the shoots become hard by the end of the wet season. This indicates that larval diapause in the bamboo borer has evolved in response to the depletion of the food supply and thereby larvae survive seasonally recurring adverse conditions.

Diapause in tropical species is often variable and may occur only in a relatively small portion of the population (Tauber et al., 1986). The diapause in tropical insects is mostly facultative diapause in which diapause or non-diapause depends on environmental cues as reported for *Diatraea grandiosella* (Kikukawa and Chippendale, 1983), the flesh flies (Denlinger, 1979), *Chilo* species (Scheltes, 1978) and *Busseola fusca* (Usua, 1973). In *Omphisa*, however, the long larval diapause appears not to be facultative. Omphisa larvae are found in local markets in Northern Thailand through a year except 4 months from June through September. When the larvae collected in October to December were kept in an incubator for months at constant temperature under dark and high humidity, they remained as larvae. Accordingly adult may appear once a year and the larval diapause may be obligatory. It remains, however, to be determined whether the larval diapause is obligatory and what environmental and genetic factors influence diapause of bamboo borer.

Pupation of individual larvae of a single colony appears to occur synchronously since adult development in pupae in one internode was well-synchronized (unpublished observation). This indicates that the break of diapause must be environmentally regulated. The environmental factor that changes largely through a year is monthly precipitation and thus possibly humidity. We kept the larvae collected from the field in laboratory conditions with a high humidity at around 25 °C, but larvae did not pupate for months if collected in October-December. Under the same conditions, the May and June larvae occasionally pupated within a month, but synchronized pupation was not observed (unpublished observation). The habitat of the larvae is inside the internode of

a bamboo culm where the humidity is rather constant. This indicated that the cue might not be humidity. Photoperiod is a common environmental cue to break diapause. The bamboo culm wall is more than 1 cm thick and it may be impossible that light would pass through the wall because the light permeability of the wall was about $1 \times 10^{-9}$%/cm (unpublished observation). The remaining possible cue is temperature but changes in temperature is not a reliable cue for predicting seasonally recurring favorable conditions. The factor which is tightly involved in the break of larval diapause in *Omphisa* remains is obscure.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank to Dr. S. Kawashima, Zenyaku Kogyo Ltd., Dr. K. Endo of University of Yamaguchi and Dr. W. Chantratit of Rama Hospital, Mahidon University for their suggestions, Dr. D.L. Denlinger of Ohio State University for his critical reading of the manuscript and valuable comments, Miss M. Manaboom and Ms. S. Imonglom of Chiang Mai University for her technical assistance and Dr. N. Kamata for the statistical analysis of the data. We appreciate Meteorological Observatory, Chiang Mai for the meteorological records. We are also grateful to the Hitachi Foundation for the Research Grant to T.S. The research was also supported by The Thailand Research Fund to T.S. (PDI 40800042) and grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan to S.S. (09220273, 08276102).

## REFERENCES

Bowers B, Williams CM (1964) Physiology of insect diapause. XIII. DNA synthesis during the metamorphosis of the cecropia silkworm. Biol Bull 126: 205-219.

Chippendale GM, Yin C-M (1976) Endocrine interactions controlling the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. J Insect Physiol 22 : 989-995.

Denlinger DL (1979) Pupal diapause in tropical flesh flies: Environmental and endocrine regulation, metabolic rate and genetic selection. Biol Bull 156: 31-46.

Denlinger DL (1986) Dormancy in tropical insects. Ann Rev Entomol 31: 239-264.

Frohlich DR, Stevenson BA, Peterson AM, Wells MA (1996) Mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I of *Manduca sexta* and a comparison with other invertebrate genes. Comp Biochem Physiol 113B: 785-788.

Leksawasdi P (1993) Life history and natural enemy of a bamboo borer (*Omphisa* sp., Pyralidae: Lepidoptera). The Second Plant Protection Conference, Vol 1, pp 96-102.

Kikukawa S, Chippendale GM (1983) Seasonal adaptation of populations of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*, from tropical and temperate

regions. J Insect Physiol 29: 561-567

Kostal V, Sula J, Simek P (1998) Physiology of drought tolerance and cold hardiness of the Mediterranean tiger moth *Cymbalophora pudica* during summer diapause. J Insect Physiol 44: 165-173

Nijhout HF (1975) A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Biol Bull 149: 214-225

Robert, CR (1984) Fertilizer. In "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed. Vol 2" Ed by S Williams. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, p 16

Robinson SG, Tuck KR, Shaffer M (1994) A field guide to the smaller moths of South-East Asia. The Natural History Museum, Art Printing Works Sdn. Bhd., London, p. 181

Sakurai S, Kaya M, Satake S (1998) Hemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid-dependent developmental events in the last-larval stadium of the silkworm, *Bombyx mori*. Role of low ecdysteroid titer in larval-pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. J Insect Physiol 44: 867-881

Scheltes P (1978) The condition of the host plant during aestivation-diapause of the stalk borers *Chilo partellus* and *Chilo orichalcociliella* (Lepidoptera: Pyralidae) in Kenya. Entomol Exper Appl 24: 479-488

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann Entomol Soc Am 87: 651-701

Suzuki CS, Nishimura K (1987) The testis development in 3rd- to 6th-instar nymphs of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. Zool Sci 14: 637-639

Tanaka S, Denlinger DL, Wolda H (1988) Seasonal changes in the photoperiodic response regulating diapause in a tropical beetle, *Stenotarsus rotundus*. J Insect Physiol 34: 1135-1142

Tauber, M.J., Tauber C.A. and Masaki S. (1986) *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, New York, pp. 67-110.

Usua EJ (1970) Diapause in the maize stemborer. J Econ Entomol 63: 1605-1610

Usua EJ (1973) Induction of diapause in the maize stemborer, *Busseola fusca*. Entomol Exper Appl 16: 322-328

Yin C-M, Chippendale GM (1973) Juvenile hormone regulation of the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. J Insect Physiol, 19: 2403-2420

Yokoyama I, Endo K, Yamanaka A, Kumagai K (1996) Species-specificity in the action of big and small prothoracicotropic hormones (PTTHs) of the swallowtail butterflies, *Papilio xuthus, P. machaon, P. bianor and P. helenus*. Zool Sci 13: 449-454

Whitmore TC (1984) Tropical rain forests of the far east. (2nd ed.) Clarendon Press,

Oxford, pp. 282
Wigglesworth VB (1972) *The principles of insect physiology* (7th ed), Chapman and Hall, London, p. 61.
Wiwatwittaya D (1991) Biology of bamboo caterpillar. *Annual Forestry Conference* 1991, Bangkok, Thailand, p. 12.
Wolda H, Denlinger DL (1984) Diapause in a large aggregation of a tropical beetle. Ecol Entomol 9: 217-230

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Meteorological data from Chiang Mai, Thailand at 19 °N. Top, highest and lowest temperature; middle, precipitation; bottom, highest and lowest relative humidity. Each datum point is a mean with SD of the statistical data for 9 years from 1988 to 1996, provided by Meteorological Observatory, Chiang Mai, Thailand.

**Fig. 2.** DNA sequence and the deduced amino acid sequence of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) region from the bamboo borer larvae collected from 5 different bamboo species (A) and a comparison of the amino acid sequence of the amplified region of COI with that of *Manduca sexta* (B) (Fröhlich et al., 1996). The nucleotide at position 312 as indicated with an asterisk in (A) was A in larvae from the bamboos, *D. Hamiltonii*, *B. blumeana* and *G. albociliata*, or G in those from *D. membranaceus* and *B. nutans*. Asterisk in (B) indicates the different amino acids between *Omphisa* and *Manduca*.

**Fig. 3.** Neighbor-joining tree calculated from an alignment of COI region sequences of 13 selected lepidopteran species. *Drosophila melanogaster* was used as an outgroup. Numbers at a node indicate percentage bootstrap values higher than 75%.

**Fig. 4.** Frequency distribution of the head capsule width in *O. fuscidentalis* larvae. Head capsules were collected from 17 bamboo shoots in September and October, 1998. Solid and open triangles indicate the peak values for depicting Figure 6. See text for details.

**Fig. 5.** Correlation of the head capsule width and number of larval instars in *O. fuscidentalis*. Head capsule width is expressed in common logarithm. $y = 0.180x - 0.462$; $r^2 = 0.999$. Thin lines indicate the upper and lower 95% mean value, respectively.

**Fig. 6.** Indication of sexual dimorphism in the larval growth. Values of head capsule

width as indicated with filled and open triangles in Figure 4 was converted to common logarithm and plotted against the number of instars. The curves for filled and open triangles in Figure 4 are indicated with diamonds and circles, respectively. The correlation coefficient ($r^2$) for diamonds and circles are 0.997 ($y = 0.194x - 0.459$) and 0.999 ($y = 0.179x - 0.478$), respectively.

**Fig. 7.** Sexual dimorphism in the head capsule width. Head capsule width was measured and then the larval sex was determined by confirming the presence of testis or ovary. The mean values for females (filled column, n = 46) and males (hatched column, n = 54) were 2.64 ± 0.13 and 2.94 ± 0.12 mm, respectively. p = 0.0000 (Student's t-test).

**Fig. 8.** Changes in wet body weight (circles) and head capsule width (triangles) of *O. fuscidentalis* larvae from September to May. Each datum point is a mean of 20 mature larvae with SD. The correlation coefficient (r) for head capsule width is 0.186 ($y = 0.009x + 2.71$).

**Fig. 9.** Correlation between the head capsule width and wet body weight of mature larvae. The correlation coefficient (r) is 0.179 ($y = 0.17x - 0.041$).

**Fig. 10.** Monthly changes of the proportional protein and fat contents of mature larvae of *O. fuscidentalis* from September to May. The ordinate indicates fat or protein content proportional to g wet body weight. Each datum point is a mean with SD of 3 different determinations.

**Fig. 11.** Changes in hemolymph ecdysteroid concentration of *O. fuscidentalis* from September to May and pupal stage in June and July. Insert is an enlargement of the data from September to May. Each datum point is a mean with SD of 20 different determinations. Datum point with no SD bar indicates that SD was smaller than the mark size.

Table 1. Various moments for each peak of head capsule width.

| | Instar | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Moment | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Number | 55 | 91 | 154 | 223 | 164 |
| Mean value (mm) | 0.533 | 0.768 | 1.199 | 1.820 | 2.774 |
| Standard deviation | 0.026 | 0.056 | 0.098 | 0.161 | 0.184 |
| Upper 95% mean value | 0.541 | 0.779 | 1.214 | 1.841 | 2.803 |
| Lower 95% mean value | 0.529 | 0.756 | 1.214 | 1.184 | 2.745 |

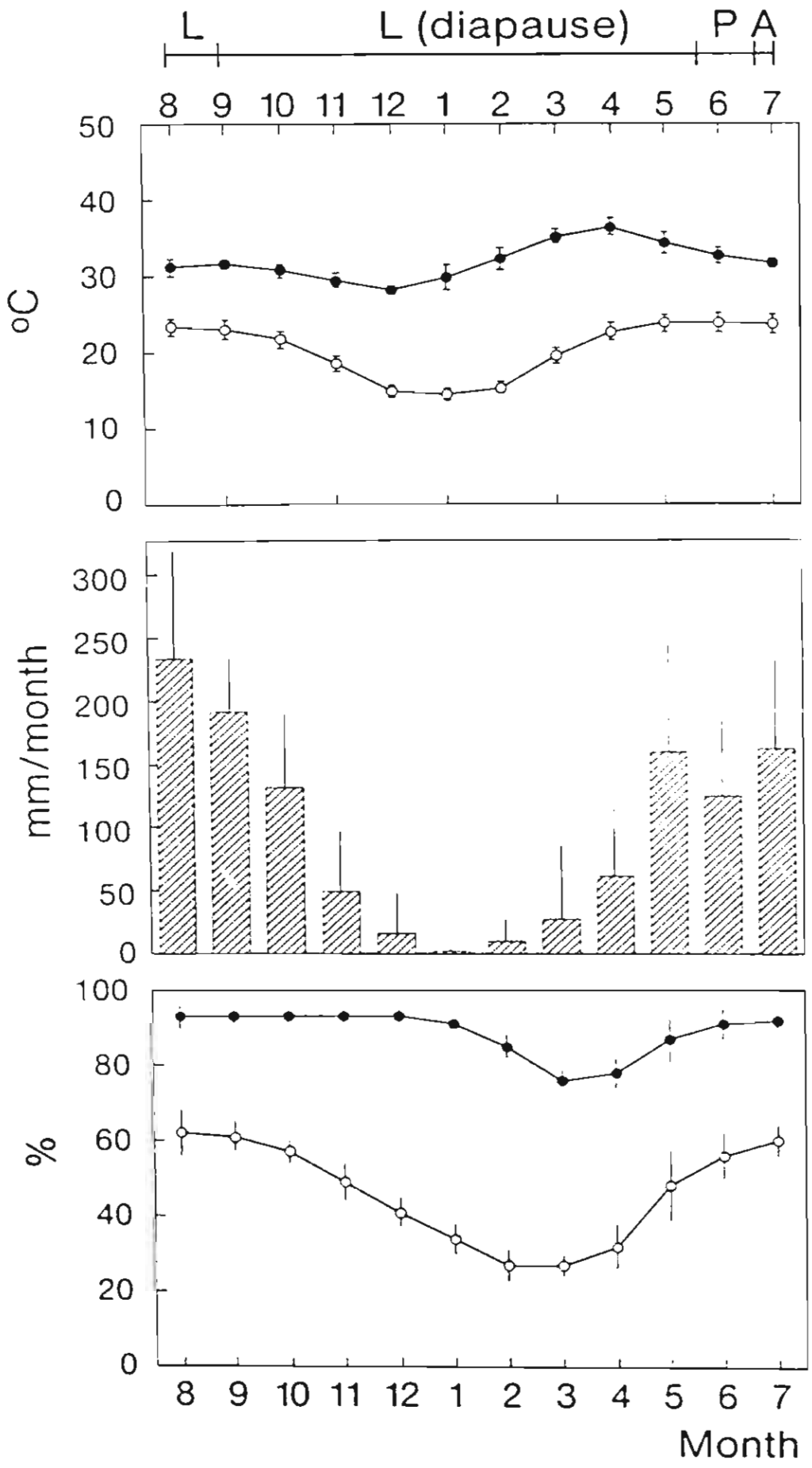

L
L (diapause)
P A
8 9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7
°C
50
40
30
20
10
0
mm/month
300
250
200
150
100
50
0
%
100
80
60
40
20
0
8 9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7
Month

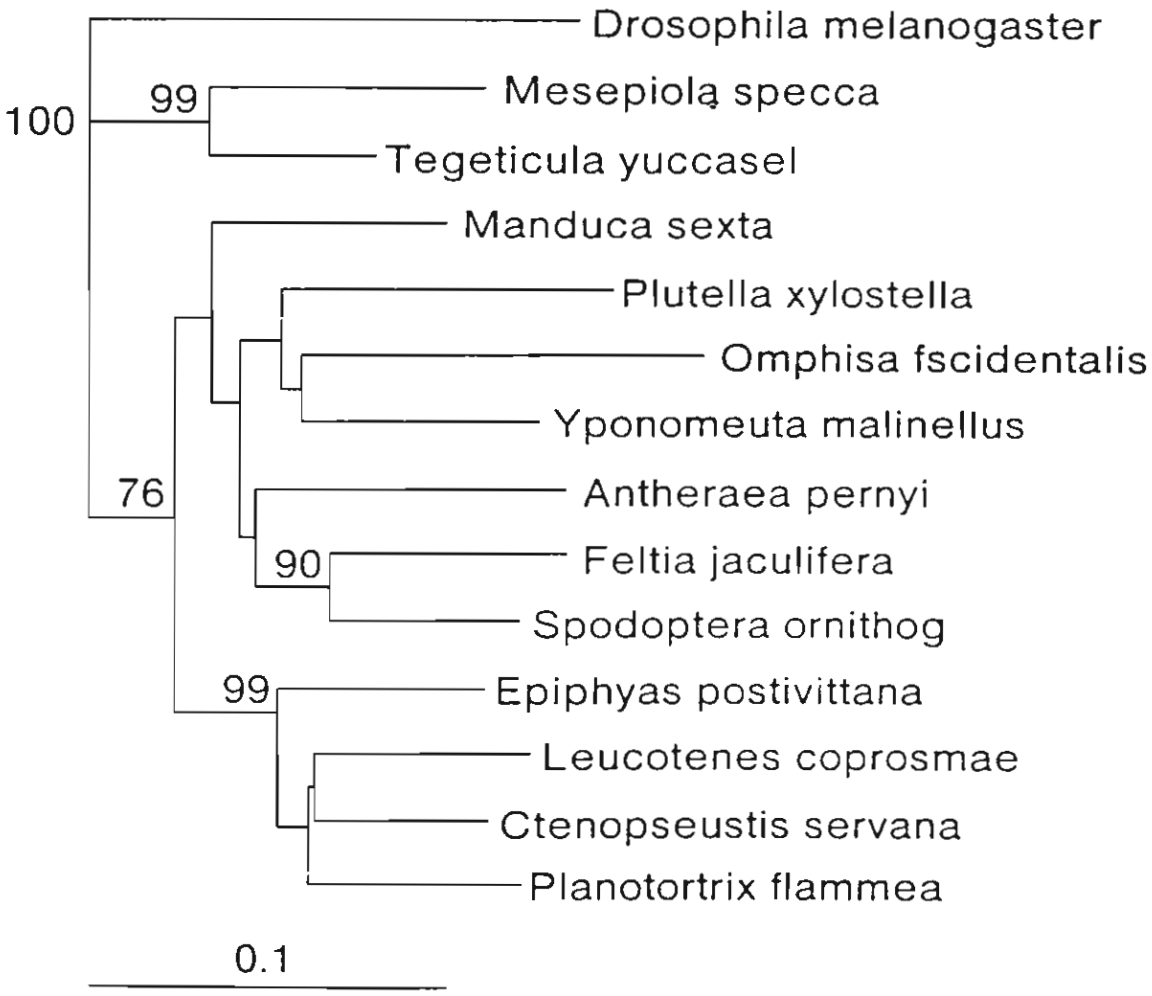
Figure 1

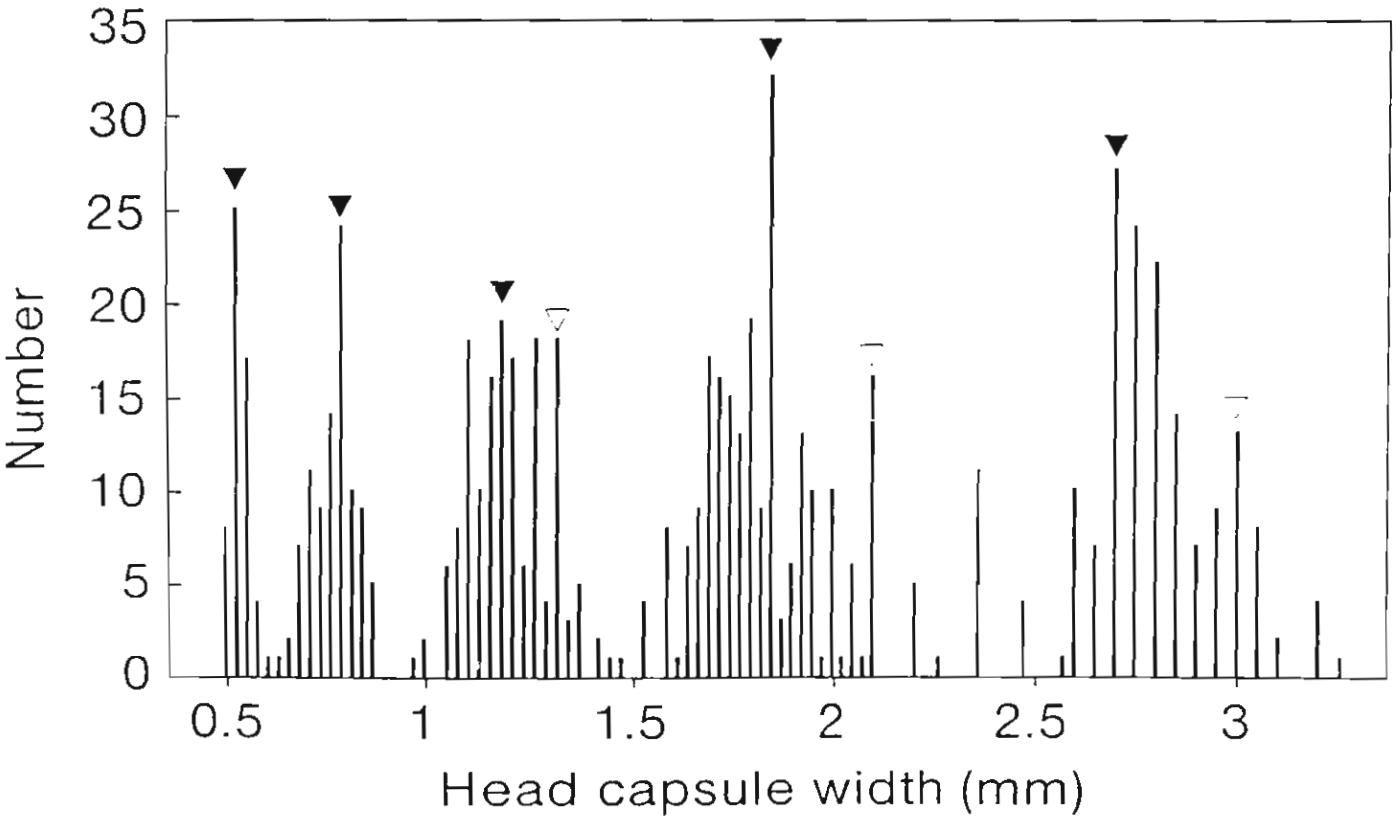
A

```
CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT TGA TTA TTA CCC CCA TCT CTA ACT CTT TTA ATT TCA 57
 R   M   N   N   M   S   F   W   L   L   T   P   S   L   T   L   L   I   S

AGA AGA ATT GTT GAA AAT GGA GTA GGA ACT GGA TGA ACT GTC TAC CCC CCC CTT TCA 114
 S   S   I   V   E   N   G   V   G   T   G   W   T   V   Y   P   P   L   S

TCC AAT ATT GCT CAC AGA GGA AGT TCT GTT GAT TTA GCA ATT TTT TCC TTA CAT TTA 171
 S   N   I   A   H   S   G   S   S   V   D   L   A   I   F   S   L   H   L

GCT GGA ATT TCT TCT ATT TTA GGA GCA ATT AAT TTT ATT ACA ACT ATT ATT AAC ATA 228
 A   G   I   S   S   I   L   G   A   I   N   F   I   T   T   I   I   N   M

CGT ATT AAT GGT CTA CTA TTT GAT CAA ATA CCA TTA TTC GTC TGA TCA GTA GGA ATT 285
 R   I   N   G   L   L   F   D   Q   M   P   L   F   V   W   S   V   G   I

ACA GCT CTA TTA TTA CTT TTT TCT TTA* CCT GTT CTA GCG GGA GCC ATT ACT ATA CTC 342
 T   A   L   L   L   L   F   S   L   P   V   L   A   G   A   I       M   L

TTA ACT GAT CGA AAC TTA AAT ACA TCC TTT TTT GAA ACT GCG GGA GGA GGA GAT CCA 399
 L   T   D   R   N   L   N   T   S   F   F   E   T   A   G   G   G   D   P

ATC CTT TAT CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GGA CAT CCA 438
 I   L   Y   Q   H   L   F   W   F   F   G   H   P
```

B

```
                          *                   *
Manduca  97 RMNNMSFWLL PPSLMLLISS SIVENGAGTG WTVYPPLSSN 136
Omphisa   1 RMNNMSFWLL PPSLTLLISS SIVENGVGTG WTVYPPLSSN  40

                                                      *
       137 IAHSGSSVDL AIFSLHLAGI SSILGAINFI TTIINMRINN 176
        41 IAHSGSSVDL AIFSLHLAGI SSILGAINFI TTIINMRING  80

           **           *     *     *
       177 MSFDQMPLFV WAVGITAFLL LLSLPVLAGA ITMLLTDRNL 216
        81 LLFDQMPLFV WSVGITALLL LFSLPVLAGA ITMLLTDRNL 120

                 **
       217 NTSFFDPAGG GDPILYQHLF WFFGHP 242
       121 NTSFFGTAGG GDPILYQHLF WFFGHP 146
```


Drosophila melanogaster
Mesepiola specca
Tegeticula yuccasel
Manduca sexta
Plutella xylostella
Omphisa fscidentalis
Yponomeuta malinellus
Antheraea pernyi
Feltia jaculifera
Spodoptera ornithog
Epiphyas postivittana
Leucotenes coprosmae
Ctenopseustis servana
Planotortrix flammea
100
99
76
90
99
0.1


35
30
25
20
15
10
5
0
Number
0.5
1
1.5
2
2.5
3
Head capsule width (mm)

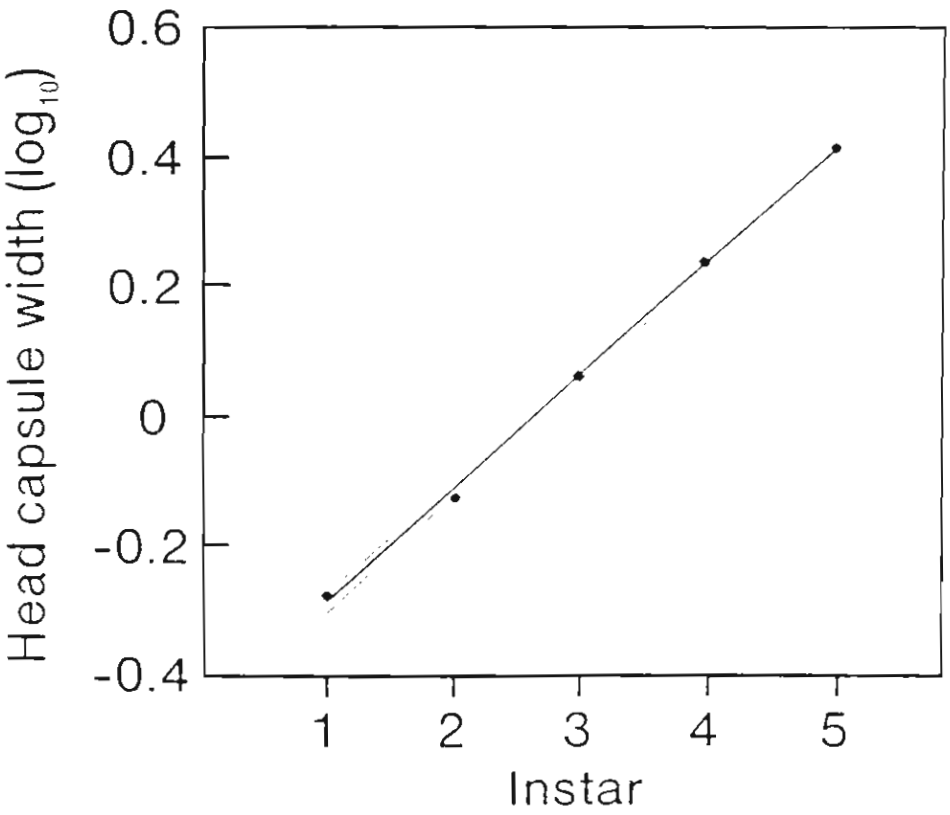
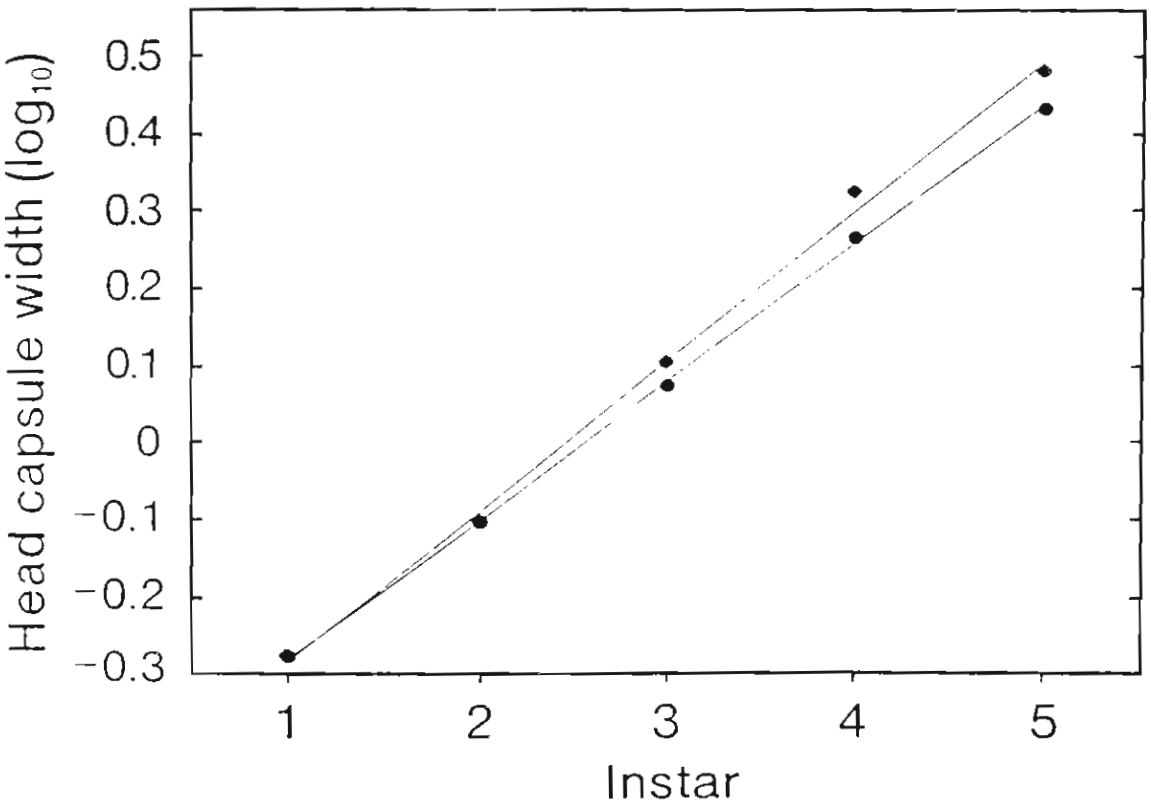
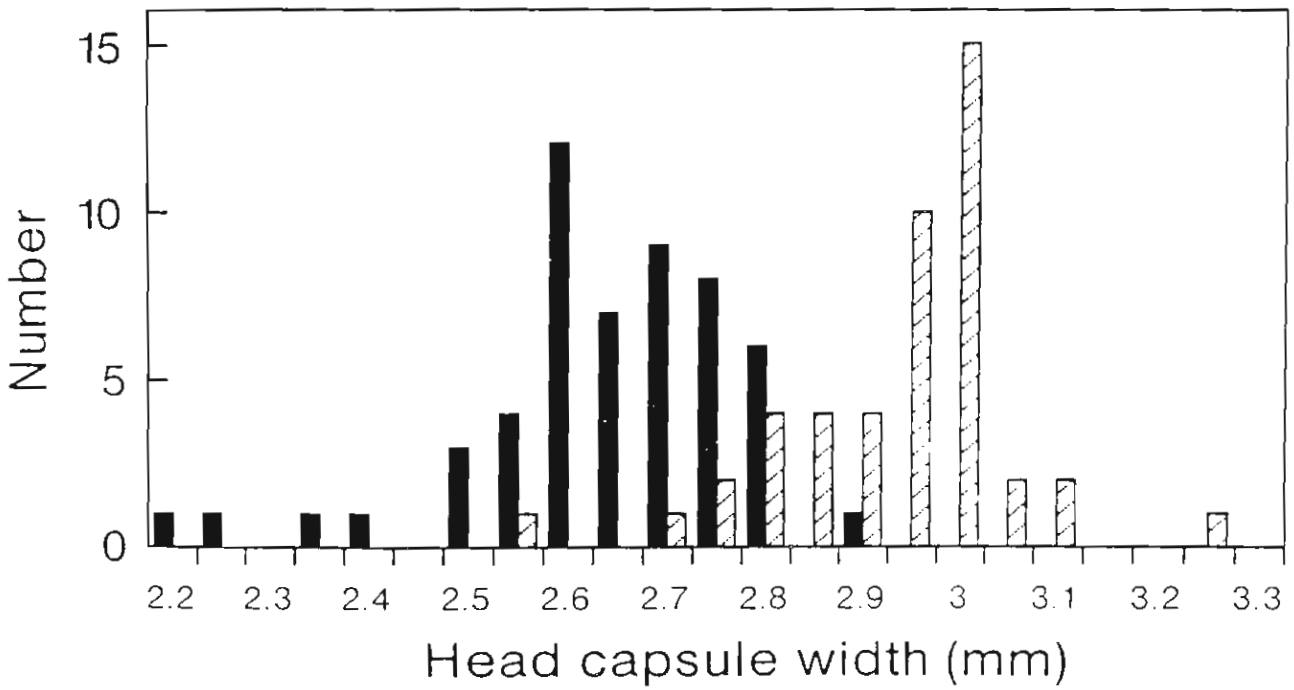
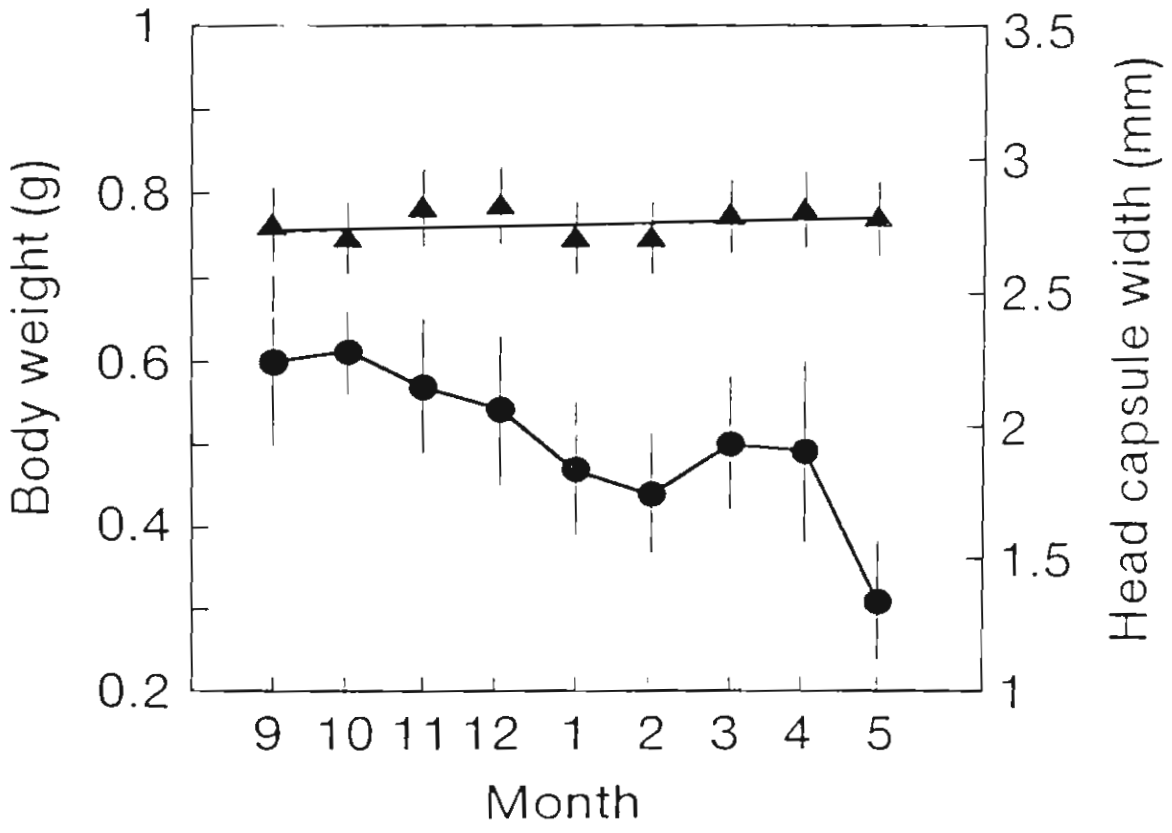

0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
Head capsule width ($log_{10}$)
1
2
3
4
5
Instar

Figure 6




15
10
5
0
Number
2.2
2.3
2.4
2.5
2.6
2.7
2.8
2.9
3
3.1
3.2
3.3
Head capsule width (mm)


Body weight (g)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
Head capsule width (mm)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
9 10 11 12 1 2 3 4 5
Month

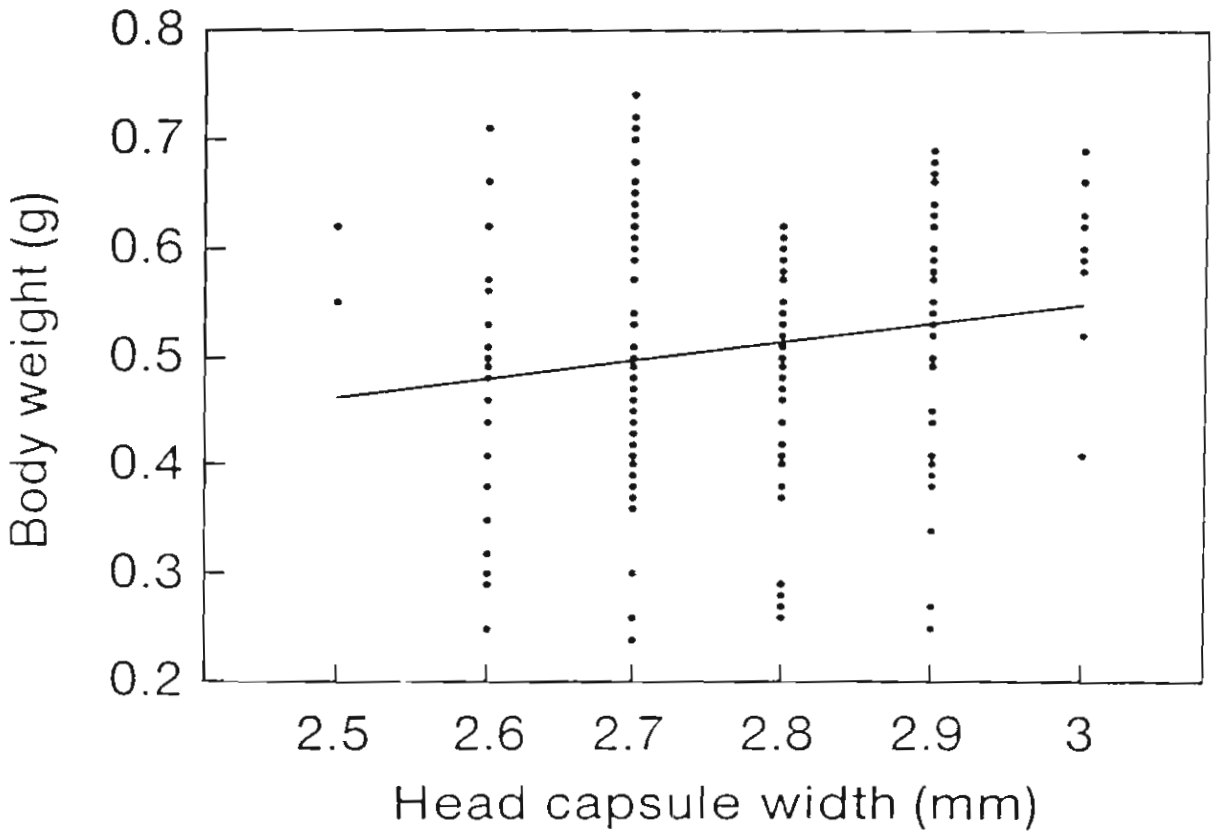
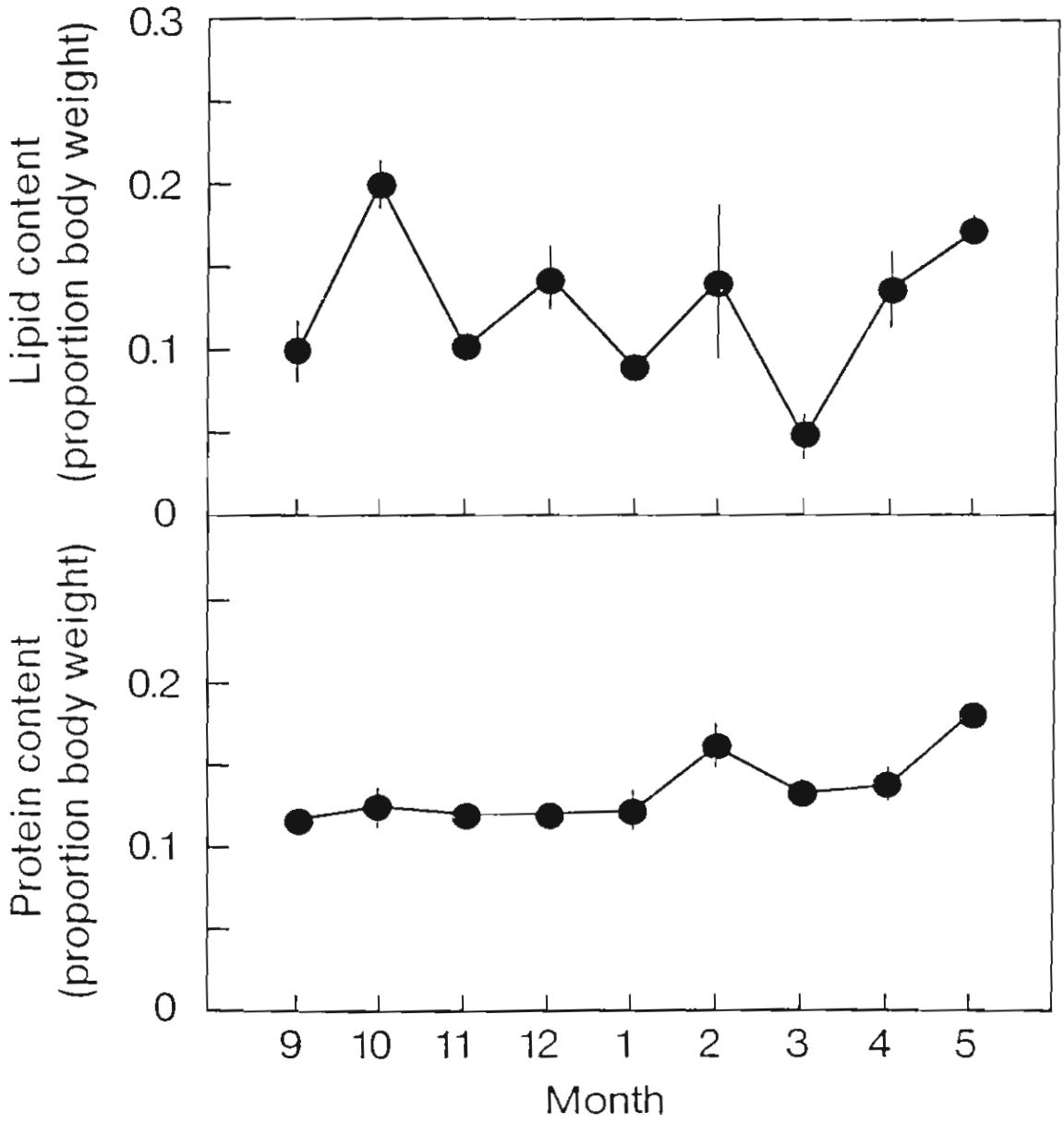
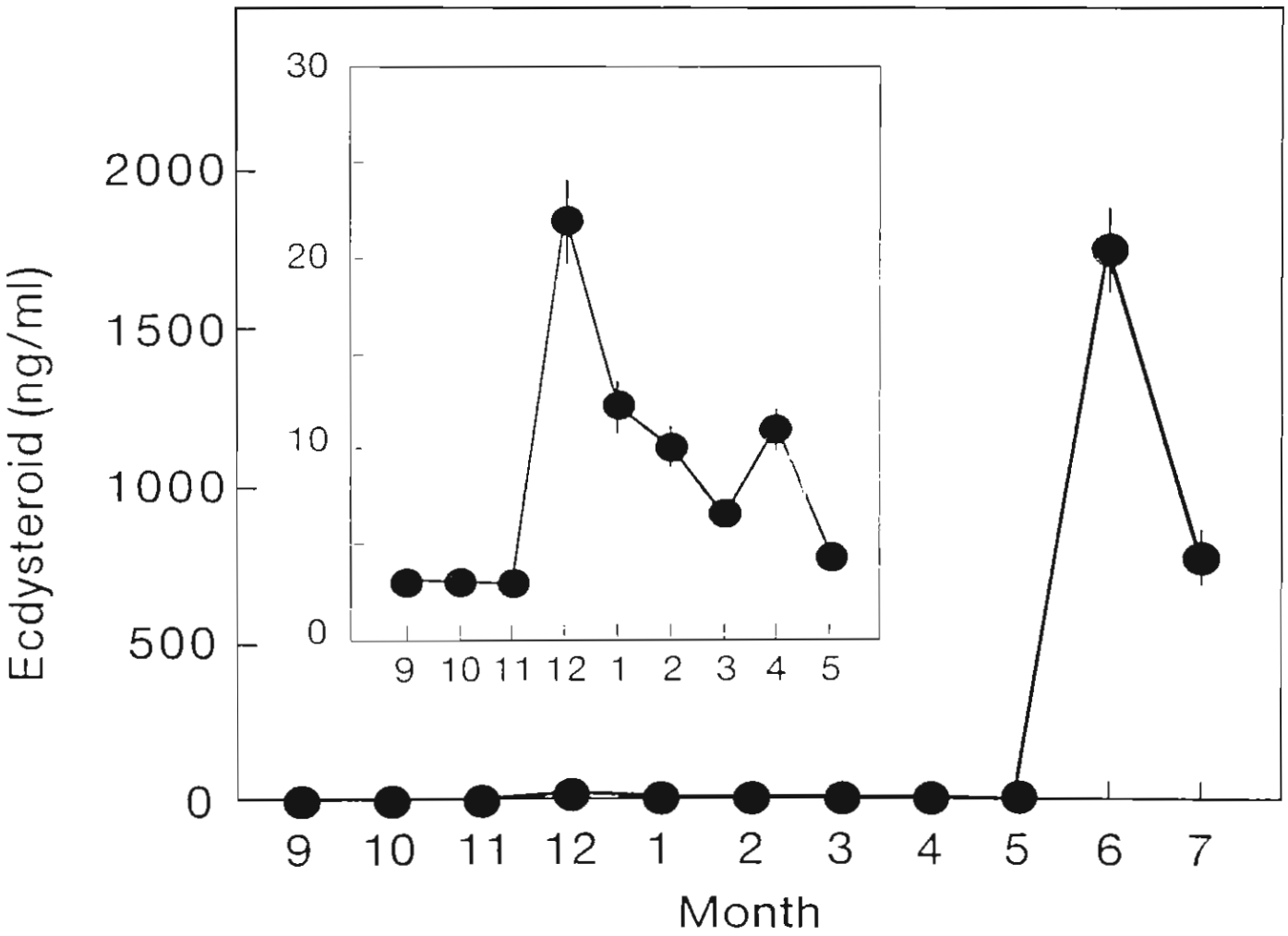

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
Body weight (g)
2.5
2.6
2.7
2.8
2.9
3
Head capsule width (mm)

Figure 10


Lipid content
(proportion body weight)
0.3
0.2
0.1
0
Protein content
(proportion body weight)
0.2
0.1
0
9
10
11
12
1
2
3
4
5
Month


Ecdysteroid (ng/ml)
2000
1500
1000
500
0
9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7
Month
30
20
10
0
9 10 11 12 1 2 3 4 5