



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารคล้ายฮอร์โมนจูวีโนลส์จากพืชต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่
Omphisa fuscidentalis

โดย ดร. เอกอาทิตย์ ฤทธิเดชยিংและคณะ

มิถุนายน 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารคล้ายฮอร์โมนจูวีโนลจากพืชต่อการเจริญของหนอนเยื่อไฟ *Omphisa fuscidentalis*

1. ดร. เอกอาทิตย์ ฤทธิเดชยิ่ง สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม. แม่โจ้ แพร่
เฉลิมพระเกียรติ
2. ผศ. ดร. มนพร มานะบุญ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. เชียงใหม่
3. Prof. Dr. Stephen S. Tobe Department of cell and system biology,
Faculty of Art and Science, University of
Toronto, Canada

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.
และมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ TRG5880178
ชื่อโครงการ ผลของสารคล้ายฮอร์โมนจูวีไนล์จากพืชต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่
ชื่อนักวิจัย ดร. เอกอาทิตย์ ฤทธิเดชยิ่ง
E-mail Address eakartit@mju.ac.th
ระยะเวลาโครงการ 1 กรกฎาคม 2558 – 30 มิถุนายน 2560

บทคัดย่อ

พืชหลายๆชนิดมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากแมลงศัตรู โดยการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งสารดังกล่าวไปมีผลต่อการทำหน้าที่ต่างๆของระบบสรีรวิทยาในแมลง นอกจากนี้พบว่าสารในกลุ่มนี้ในบางตัวมีโครงสร้างทางเคมี และการออกฤทธิ์ที่คล้ายคลึงกับฮอร์โมนจูวีไนล์ (phytojuvenoid) จากการทดลองให้ฮอร์โมน phytojuvenoid ที่สกัดได้จากผกากรอง (*Lantana camera*) ในปริมาณ 0.1 0.5 1.0 5.0 10.0 50.0 และ 100.0 ไมโครกรัมแก่หนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis*) ในระยะไคอะพอส พบว่าทุกการทดลองมีผลในการเหนี่ยวนำให้ตัวหนอนเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะดักแด้ได้สูงกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดย phytojuvenoid ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด เนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำให้ตัวหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ในวันที่ 14 และตัวหนอนเข้าดักแด้ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 44 วัน ยีน *OfKr-h1* ประกอบไปด้วย 1,050 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่มีความยาว 350 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *OfKr-h1* ไปเทียบกับ *Kr-h1* ของแมลงชนิดอื่นๆ ในลำดับ *Lepidoptera* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) กับ *Amyelois transitella* *Kr-h1* (85.8%) มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *Helicoverpa armigera* *Kr-h1* (84.8%) *Bombyx mori* *Kr-h1* (82.5%) และ *Papilio xuthus* *Kr-h1* (80.6%) ตามลำดับ ยีน *OfKr-h1* แสดงออกสูงที่สุดในสมอง และเมื่อศึกษาถึงระดับการแสดงออกของ *OfKr-h1* mRNA ในสมองในระหว่างการเจริญ พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงที่สุดในช่วงแรกของระยะไคอะพอส จากนั้นลดลงในช่วงไคอะพอส และเพิ่มสูงขึ้นในระยะดักแด้ สำหรับการศึกษาผลของ methoprene และ phytojuvenoid ต่อการชักนำการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* แสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนทั้งสองชนิดสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *OfKr-h1* mRNA ได้ในรูปแบบเดียวกัน กล่าวคือ ระดับ *OfKr-h1* mRNA จะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นภายหลังจากให้ฮอร์โมน แล้วเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงที่สุดในระยะดักแด้ จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัด phytojuvenoid จากผกากรอง สามารถนำมาใช้ในการควบคุมการเจริญของแมลงผ่าน *OfKr-h1* mRNA ในวิธีการทำงานของฮอร์โมนจูวีไนล์ได้ ตลอดจนสามารถพัฒนาการใช้ยีน *OfKr-h1* ให้เป็นยีนเป้าหมายในการควบคุมแมลงสำหรับการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานในสภาพแปลงต่อไป

คำสำคัญ: bamboo borer, juvenile hormone analog, phytojuvenoid, *Kr-h1*, *L. camera*

Project Code **TRG5880178**
Project Title Effects of phytojuvenoid on development of the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*
Investigator Eak-artit Ritdachyeng, Ph.D.
E-mail Address eakartit@mju.ac.th
Project Period July 1st, 2015 – June 30th, 2017

ABSTRACT

Many plants defend themselves against insect herbivory by way of the production of secondary metabolites which interfere with insect physiological functions. These may include compounds which mimic juvenile hormones (JHs) and may interfere with their biosynthesis. In this study, Topical application of phytojuvenoid extracted from *Lantana camera* at dose of 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 and 100.0 µg were evaluated against *Omphisa fuscidentalis* diapausing-larvae. Percent pupation and the day of pupation were recorded. The results showed all dose induced pupation in this insects and were significantly different than those of control group ($P < 0.05$) especially in 0.5 µg of extract showed high efficiency by induced pupation at day 14 after application and reached 100% of pupation within 44 days. We also cloned and sequenced *Omphisa Krüppel-homolog 1* (*OfKr-h1*). The full sequence of *OfKr-h1* is comprised of 1,050 nucleotides in length encoding 305 amino acids. The deduced protein sequence of *OfKr-h1* showed high homology with lepidopteran, *Amyelois transitella* Kr-h1 (85.8%), *Helicoverpa armigera* Kr-h1 (84.8%), *Bombyx mori* Kr-h1 (82.5%) and *Papilio xuthus* Kr-h1 (80.6%). The *OfKr-h1* was expressed mainly in the brain. *OfKr-h1* transcripts in the brain showed the maximum in early diapause, followed by the significant decreased to low level when the larvae entered diapause in October. Expression then remained low until March, after which expression dramatically increased in the pupal stage. Both juvenile hormone analog (JHA), methoprene, phytojuvenoid exhibited a similar stimulatory pattern in *OfKr-h1* expression of diapausing larvae. *OfKr-h1* mRNA levels gradually increased after hormone application and showed a peak of gene expression in the pupal stage. These preliminary study may help us to provide the possibility for searching new chemical means in natural product e.g. phytojuvenoid extracted from *L. camera* to control insects by interrupting its development. Therefore, this work will not only deepen our understanding of the functions of *OfKr-h1* in the JH-signaling pathway in the molecular level, but also make it possible to use *OfKr-h1* as a new target gene for integrated pest management in the field.

Keywords: bamboo borer, juvenile hormone analog, phytojuvenoid, *Kr-h1*, *L. camera*

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
สารบัญ	ค
สารบัญภาพ	ง
สารบัญตาราง	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย	26
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	33
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	41

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงหนอนเยื่อไผ่ที่พบภายในกระบอกไม้ไผ่	3
2 แสดงวงชีวิตของหนอนเยื่อไผ่	5
3 แสดงลักษณะดักแด้และตัวเต็มวัยของหนอนเยื่อไผ่	5
4 แสดงตำแหน่ง JH response element (JHRE) ของ <i>BmKr-h1</i>	9
5 แผนภาพแสดงกลไกการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน <i>BmKr-h1</i>	10
6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในระยะตัวเต็มวัย	11
7 แสดงลักษณะภายนอกของผกากรอง	13
8 แสดงการเปลี่ยนสีของลำตัว 2 ระดับ	18
9 ผลของ phytojuvenoid ที่ปริมาณต่างๆ ที่ตัวหนอนในระยะไคอะพอสได้รับต่อเปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้	26
10 ผลของ phytojuvenoid ที่ปริมาณต่างๆ ที่ตัวหนอนในระยะไคอะพอสได้รับต่อจำนวนวันที่ตัวหนอนเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะดักแด้	27
11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของ OfKr-h1	29
12 แสดง alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ OfKr-h1 เทียบกับแมลงชนิดอื่นๆ ในอันดับ Lepidoptera	30
13 การแสดงออกของ <i>OfKr-h1</i> mRNA ในอวัยวะต่างๆ ของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอส	31
14 การแสดงออกของ <i>OfKr-h1</i> mRNA ในสมองของหนอนเยื่อไผ่รายเดือนและระยะดักแด้	31
15 การแสดงออกของ <i>OfKr-h1</i> mRNA ในสมองของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอสหลังจากได้รับ methoprene และ phytojuvenoid	32

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ชนิดของพืชที่มีการรายงานว่าพบ phytojuenoid	12
2	แสดงเปอร์เซ็นต์ homology ของลำดับกรดอะมิโนของ OfKr-h1	27

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ฮอร์โมนจูวีไนล์ (Juvenile hormone; JH) ในแมลงจัดเป็นสารในกลุ่ม เซสควิเทอเพินอยด์ (sesquiterpenoid) สังเคราะห์มาจากต่อมขนาดเล็กที่อยู่ด้านท้ายสมองที่เรียกว่า ต่อมคอปัส อัลลาตัม (corpus allatum gland) (Dewick, 2009) โดย JH นั้นทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ ของแมลง เช่น พฤติกรรม การพักการเจริญ (diapause) และ การหลากรูป (polyphenism) โดยในระยะตัวหนอนของแมลงทั่วไปนั้น JH จะควบคุมไม่ให้แมลงพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยโดยการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ ส่วนในตัวเต็มวัย JH ควบคุมการเจริญของระบบสืบพันธุ์ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าได้มีการใช้ JH สังเคราะห์ เช่น เมโทพรีน (methoprene) และ ไพริโปรไซเฟน (pyriproxyfen) มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูหลายชนิด (Jindra *et al.*, 2013) ทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งส่งผลข้างเคียงต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม

ในระดับเซลล์นั้น พบว่า JH จะทำงานร่วมกันกับโปรตีนหลายๆชนิด โปรตีน ครับเบิล โฮโมล็อก หนึ่ง (*Krüppel homolog 1 (Kr-h1)*) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน (transcription factor) ที่เป็นผลจากการสังงานโดย JH โดยการแสดงออกของยีน *Kr-h1* จะอยู่ภายใต้การเหนี่ยวนำของ JH นอกจากนี้ยังพบว่า ยีน *Kr-h1* ในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Min-na *et al.*, 2014) มีส่วนสำคัญในการควบคุมการเจริญของปีก และระบบสืบพันธุ์ในระยะตัวเต็มวัย จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาได้พิสูจน์แล้วว่า *Kr-h1* สามารถพัฒนาให้เป็นโมเลกุลเป้าหมายในการที่จะรบกวนการทำงานของ JH ในแมลงศัตรูได้

พืชหลายๆชนิด มีกลไกในการป้องกันตัวเองจากแมลงศัตรู โดยการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งสารดังกล่าวไปมีผลต่อการทำหน้าที่ต่างๆของระบบสรีรวิทยาในแมลง (Chaitanya *et al.*, 2012) นอกจากนี้พบว่า สารในกลุ่มนี้ในบางตัวมีโครงสร้างทางเคมี และการออกฤทธิ์ที่คล้ายคลึงกับฮอร์โมนจูวีไนล์ ทำให้สามารถเข้าไปรบกวนขั้นตอนการสังเคราะห์ JH ในแมลงได้ จากการศึกษาผลของการหยุดสารสกัดคล้าย JH จากพืชในตัวทำลายที่เหมาะสม (phytojuvenoid) ต่อแมลง พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโคติน (Gopakumar *et al.*, 1977; Slama, 1979; Ajami and Riddiford, 1973; Grenir and Grenir, 1983; Khyade *et al.*, 2002)

ผกากรอง (*Lantana camera* L.) จัดเป็นวัชพืชที่กระจายตัวทั่วไปทั้งบริเวณเขตร้อนชื้น และเขตกึ่งร้อนชื้น (Ivens *et al.*, 1978) ตลอดจนผกากรองยังนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ (Ghizalberti, 2000) Khyade *et al.* (2011) ได้รายงานว่าสามารถสกัดสารคล้าย JH จากส่วนเปลือกหุ้มลำต้นของผกากรอง โดยเมื่อนำไปทดสอบหยดลงไปที่บริเวณด้านหลังของหนอนไหม (*Bombyx mori*) พบว่าปริมาณโคตินที่ผิวหนังของแมลงลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมี คุณสมบัติการต่อต้านจุลชีพ และฟีนอลของสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติคล้าย JH ในผกากรอง โดยพบว่า สารประกอบดังกล่าว อยู่ในกลุ่ม sesquiterpenoid เช่น ฮูมูลิน (humulene) และ ซีส-แคร์โอฟิลลิน (cis-caryophyllene) อีกทั้งยังมีการศึกษาถึงผลของ phytojuvenoid ในการควบคุมแมลงศัตรูโรงเก็บหลายๆชนิด (Zandi-Sohani *et al.*, 2012, Mohamed and abdelgaleil, 2008, Zoubiri and Baaliouamer, 2011) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเลือกใช้สารสกัด phytojuvenoid จากผกากรองในการพัฒนาเป็นสารสำคัญในควบคุมศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (Integrated Pest Management : IPM)

หนอนเยื่อไผ่ หรือ อีกชื่อหนึ่งเรียกว่า หนอนรด่วน เป็นระยะตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืน ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Omphisca fuscidentalis* หนอนเยื่อไผ่จัดเป็น holometabolous insect ที่มีแบบแผนการเจริญเป็นแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ประกอบไปด้วยระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย มีวงจรชีวิตนานประมาณ 1 ปี (Singtripop *et al.*, 1999) ระยะที่นานที่สุดในวงจรชีวิต คือ ระยะตัวหนอน เรียกระยะนี้ว่า ลาร์วัล- ไดอะพอส (larval diapause) หนอนในระยะนี้จะไม่กินอาหารและมีอัตราเมตาบอลิซึมต่ำ อย่างไรก็ตามพบว่าตัวหนอนสามารถเปลี่ยนเป็นดักแด้ได้ เมื่อฉีดตัวหนอนด้วย 20E โดยระยะเวลาที่ใช้ในการเข้าดักแด้ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของฮอร์โมน นอกจากนี้ยังพบว่าการหยด JH สังเคราะห์ชนิด เมโทพรีน (methoprene) ลงบนตัวหนอนระยะไดอะพอส สามารถชักนำให้ตัวหนอนเปลี่ยนเป็นดักแด้ได้เช่นกัน (Singtripop *et al.*, 2000) ทั้งที่โดยปกติแล้วการให้ฮอร์โมนชนิดนี้ในระยะตัวหนอนของแมลงชนิดอื่น จะทำให้ตัวหนอนเกิดการลอกคราบเป็นตัวหนอนอีกครั้ง แต่จะไม่มีกระบวนการเจริญเติบโตเพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นดักแด้ หรือ ตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่า JH มีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมการเจริญในระยะตัวหนอนของหนอนเยื่อไผ่

จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ทำให้เกิดแนวคิดของการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติคล้าย JH ในการที่จะเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของแมลง (insect growth regulators) ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ในการควบคุมแมลงศัตรูทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เพราะสารเหล่านี้ ให้ผลข้างเคียงต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆต่ำ ลดปัญหาแมลงสร้างความต้านทาน และไม่ก่อฤทธิ์ตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ได้นำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูแล้วในปัจจุบัน โดยพบว่า JHA จะไปขัดขวางการทำงานของระบบประสาทและต่อมไร้ท่อในแมลง ส่งผลให้เกิดการเจริญที่ผิดปกติไป จนกระทั่งทำให้ระยะตัวหนอนตายไปในที่สุด (Slama and William, 1965) อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบการศึกษาถึงผลของ phytojuvenoid ที่สกัดจากผลการกรองต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่มาก่อน

งานวิจัยในครั้งนี้ จึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของ phytojuvenoid ที่สกัดจากผลการกรองต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ จากนั้นจะทำการศึกษาถึงผลของ สารสกัดดังกล่าว และ methoprene ต่อการแสดงออกของยีน *Kr-h1* ตลอดจน ศึกษาถึงรูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการใช้สารสกัด phytojuvenoid จากผลการกรอง ในการควบคุมการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ ผ่านการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *Kr-h1* นั้นจะสามารถอธิบายกลไกการทำงานของและการควบคุมการเจริญของแมลงโดย JH ผ่านโปรตีน *Kr-h1* ได้ ผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการพัฒนา phytojuvenoid จากผลการกรองเพื่อเป็นสารควบคุมแมลงศัตรูชนิดอื่นๆ ตลอดจนสามารถใช้หนอนเยื่อไผ่เป็นต้นแบบของการศึกษาผลของสารสกัดชนิดอื่นๆ ในแมลงอันดับ Lepidoptera นอกเหนือไปจากหนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*) และหนอนไหม (*Bombyx mori*) ที่มีผู้สนใจศึกษากันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ งานวิจัยนี้จะทำให้การศึกษาวิจัยทางต่อมไร้ท่อวิทยาของแมลง (Insect endocrinology) ในประเทศไทยเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของ phytojuvenoid ที่สกัดจากผลการกรองต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณลักษณะเฉพาะทางโมเลกุล และการแสดงออกของยีน *Kr-h1* ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของ JHAs ได้แก่ methoprene และ phytojuvenoid ต่อการแสดงออกของยีน *Kr-h1* ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สันฐานวิทยาของหนอนเยื่อไผ่

หนอนเยื่อไผ่เป็นระยะตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืน มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Omphisa fuscidentalis* Hampson จัดอยู่ในวงศ์ Pyralidae อันดับ Lepidoptera จากการศึกษาลักษณะโดยทั่วไปของหนอนเยื่อไผ่พบว่า ลักษณะตัวหนอนเป็นแบบ eruciform โดยมีส่วนหัวเจริญดี มีปากแบบกัดกิน (chewing type) มีหนวด (antennae) สั้นมาก 1 คู่ ลำตัวแบ่งออกเป็นทั้งหมด 13 ปล้อง ส่วนอกมี 3 ปล้อง ส่วนท้องมี 10 ปล้อง ปล้องอกแต่ละปล้องมีขาจริง (true leg) ปล้องละ 1 คู่ ส่วนขาเทียม (proleg) จะพบที่ส่วนท้องปล้องที่ 6 7 8 9 และ 10 ปล้องละ 1 คู่ โดยขาเทียมต่างจากขาจริงคือ มีกล้ามเนื้อมากกว่าและตรงปลายขามีตะขอเล็กๆ เรียงเป็นวง เรียก crochets ทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นท่อตรงยาวตลอดตัว แบ่งเป็นทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ส่วนกลาง (midgut) และส่วนท้าย (hindgut) เปิดออกสู่ภายนอกที่ปล้องท้ายสุดของลำตัว ระบบหายใจประกอบด้วยท่ออากาศ (trachea) และรูหายใจ (spiracle) ระบบหมุนเวียนโลหิตพบว่ามี dorsal blood vessel อยู่ทางกึ่งกลางด้านบนของลำตัว ส่วนระบบประสาทมีสมอง 1 คู่ อยู่บริเวณส่วนหัว และมีเส้นประสาทอยู่ทางกึ่งกลางด้านล่างตลอดความยาวลำตัว (วนิดา, 2539)

2.2 วงชีวิตและการดำรงชีวิตของหนอนเยื่อไผ่

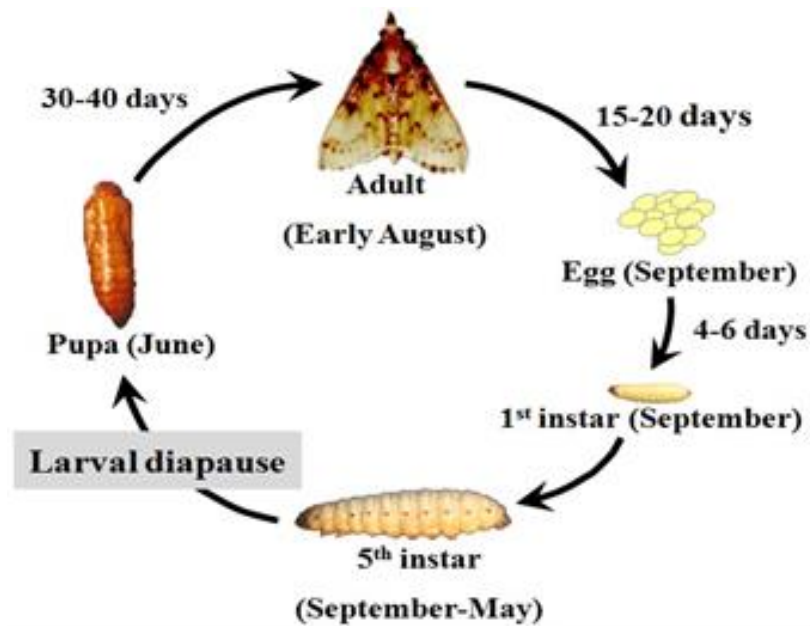
หนอนเยื่อไผ่อาศัยอยู่ภายในต้นไผ่ตลอดระยะเวลาการเป็นตัวหนอน (ภาพที่ 1) ไผ่ที่พบว่ามีอาการเจริญเติบโตของหนอนเยื่อไผ่อยู่ภายใน เช่น ไผ่บง ไผ่ซาง ไผ่หก เป็นต้น พบว่าการแพร่กระจายมากที่สุดบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยได้แก่ จังหวัดน่าน ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และเชียงราย นอกจากนี้ยังพบได้ในประเทศใกล้เคียง เช่น ประเทศพม่า ประเทศลาว ประเทศจีน และประเทศมาเลเซีย เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีสภาพพื้นที่และลักษณะภูมิอากาศที่คล้ายคลึงกัน โดยปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการกำหนดถิ่นอาศัยของหนอนเยื่อไผ่คือ ต้องเป็นบริเวณที่มีความชื้นและมีปริมาณน้ำฝนในแต่ละปีสูง อากาศค่อนข้างเย็น ป่าไผ่ต้องมีความหนาแน่นพอสมควรและมีร่มเงามากเพราะหนอนเยื่อไผ่เป็นแมลงที่ไม่ชอบแสง ดังนั้นลักษณะของไผ่จะต้องเป็นไผ่ที่มีเนื้อหนาและมีช่องว่างภายในใหญ่พอสมควร เพราะหนอนอาศัยกินเยื่อไผ่เป็นอาหาร (เดชา, 2535) จากการที่พบหนอนเยื่อไผ่ได้ในหลายพื้นที่ จึงทำให้มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น คนพื้นเมืองในภาคเหนือส่วนใหญ่เรียก แ่นหรือมะ บางกลุ่มเรียก แด้หรือด้วงไม้ไผ่ อีโก้เรียก ฮาโบลัว กะเหรี่ยงเรียก คลีแคล๊ะ พม่าเรียก วาปั๋ว ส่วนจีนฮ่อเรียก จูซุง (ไพฑูรย์, 2538)



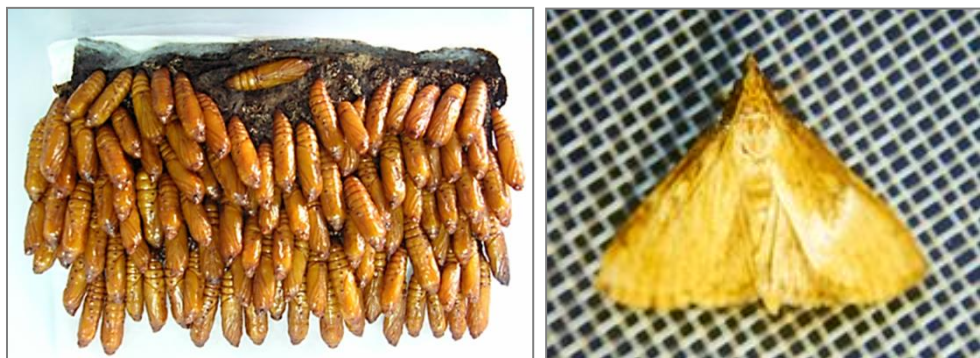
ภาพที่ 1 แสดงหนอนเยื่อไผ่ที่พบภายในกระบอกไม้ไผ่ (ที่มา : ทิพวรรณ, 2554)

จากการศึกษาวงจรชีวิตของหนอนเยื่อไผ่ (ภาพที่ 2) พบว่าผีเสื้อตัวเมียจะวางไข่สีขาวขุ่นที่บริเวณโคนหน่อไผ่ที่โผล่พ้นดินแล้วประมาณ 10-15 วัน ซึ่งสามารถพบได้ในช่วงต้นเดือนสิงหาคม ระยะไข่ใช้เวลาประมาณ 4-6 วัน จึงฟักเป็นตัวหนอนแล้วจะพากันเจาะทะลุหน่อไผ่ให้เป็นรูเพื่อเข้าไปอาศัยอยู่ภายใน ปล้องไผ่ไผ่ ลักษณะไผ่ที่ถูกหนอนกัดกินเมื่อสังเกตจากภายนอกจะพบว่าปลายยอดจะหักและเห็นได้อย่างชัดเจน ด้านข้างปล้องมีรูเล็กๆ รูปวงรีเพื่อให้อากาศถ่ายเทและเป็นทางออกของตัวเต็มวัย ตัวหนอนจะมีการเจริญเติบโตภายในกระบอกไผ่และอยู่กันเป็นกลุ่มโดยจะกัดกินเยื่อของไผ่ที่บุอยู่ภายในเป็นอาหาร ระหว่างที่หนอนเจริญเติบโตและพร้อมกันนั้นต้นไผ่ก็สูงขึ้นเรื่อยๆ หนอนจะพากันเจาะทะลุระหว่างปล้องแล้วเคลื่อนย้ายกัดกินเยื่อไผ่ขึ้นไปเรื่อยๆ เพราะหนอนจะกินเฉพาะเยื่อไผ่ที่ยังอ่อนเท่านั้น ส่วนใหญ่หนอนจะกินบริเวณโคนปล้องก่อนเรื่อยไปจนถึงกลางปล้อง หลังจากที่ตัวหนอนย้ายขึ้นไปอยู่ปล้องอื่นแล้วจะพบว่ามีส่วนคล้ายลักษณะเหมือนฟองน้ำ สีน้ำตาลติดอยู่ตามผนังของปล้อง นอกจากนั้นสีผิวของไผ่ภายในปล้องจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มออกดำแดง แตกต่างไปจากลักษณะภายในของปล้องที่ไม่มีหนอนอาศัยอยู่อย่างชัดเจน ไผ่ลำหนึ่งจะพบหนอนอาศัยอยู่ประมาณ 100-250 ตัว โดยระยะตัวหนอนนี้ใช้เวลานานประมาณ 280-304 วัน หรือประมาณ 9 เดือน จากนั้นจึงจะเข้าสู่ระยะดักแด้ (ภาพที่ 3) โดยจะพบได้ตั้งแต่ช่วงเดือนกันยายนไปจนถึงปลายเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป

เมื่อตัวหนอนเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะเคลื่อนย้ายผ่านระหว่างปล้องที่เคยเจาะไว้ในตอนแรกลงมาอยู่รวมกันใกล้ปล้องด้านล่างที่เจาะรูเข้ามาในตอนแรกเพื่อรอเข้าดักแด้ในปล้องนั้น ซึ่งในระหว่างที่รอเข้าดักแด้ตัวหนอนจะพากันสร้างเยื่อหนาสีน้ำตาลล้อมรอบบริเวณที่รวมกลุ่มกันอยู่ เพื่อป้องกันการรบกวนจากศัตรูธรรมชาติ เช่น มด ส่วนรูที่ทะลุระหว่างปล้องก็จะถูกปิดไว้เพื่อป้องกันศัตรูเช่นกัน ในช่วงปลายเดือนพฤษภาคมหนอนจะสร้างใยสีขาวขนาดเล็กจำนวนมากพาดตามแนวขวางของปล้องจากนั้น ตัวหนอนจะเริ่มห้อยหัวลงโดยมีส่วนท้ายของลำตัวยึดติดกับผนังของปล้องไผ่ด้วยเส้นใยดังกล่าวแล้วทยอยลอกคราบกลายเป็นดักแด้ โดยดักแด้จะมีสีน้ำตาลอ่อนในระยะแรกและค่อยๆ เข้มขึ้นในเวลาต่อมา ระยะดักแด้ใช้เวลาประมาณ 30-40 วัน ซึ่งจะพบในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม การแขวนตัวของดักแด้มีประโยชน์ในการออกเป็นตัวเต็มวัย โดยอาศัยแรงดึงดูดของโลกช่วยในการลอกคราบและกางปีกแล้วคลานออกจากรูที่เตรียมไว้สำหรับตัวเต็มวัยสามารถพบได้ในช่วงต้นเดือนสิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงที่หน่อไผ่อ่อนกำลังแทงยอดขึ้น แม้ผีเสื้อจึงทยอยวางไข่ได้ต่อไป ตัวเต็มวัยของหนอนเยื่อไผ่เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก มีสีน้ำตาลเข้มทั้งตัว ลักษณะเด่นคือปลายปีกคู่หน้ามีรอยหยักเป็นเส้นโค้งสีดำสามารถเห็นได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 3) ขนาดกว้างเมื่อกางปีกแล้วจะวัดได้ 30-60 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับเพศ โดยตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ระยะตัวเต็มวัยใช้เวลาเพียง 15-20 วันเท่านั้น



ภาพที่ 2 แสดงวงจรชีวิตของหนอนเยื่อไผ่
(ที่มา : ทิพวรรณ, 2549)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะดักแด้และตัวเต็มวัยของหนอนเยื่อไผ่
(ที่มา : ทิพวรรณ, 2554)

2.3 ฮอร์โมนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง

2.3.1 ฮอร์โมนเอคไโดโซน (ecdysone, Ec)

ฮอร์โมนเอคไโดโซนถูกค้นพบเป็นครั้งแรกจากดักแด้ของ *B. mori* โดยพบว่ามีส่วนประกอบ 2 โมเลกุลที่มีความแตกต่างกันและมีบทบาทในการชักนำให้เกิดการลอกคราบได้และให้ชื่อว่า “ α -ecdysone” และ “ β -ecdysone” (Butenand and Karlson, 1954) ต่อมาได้สกัดแยกฮอร์โมนออกมาจากแมลงได้ คือ α -ecdysone ซึ่งในปัจจุบันเรียกว่า “เอคไโดโซน” เป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมโปรทอแรกซิก โดยปกติแล้วเอคไโดโซนจะอยู่ในสภาพเฉื่อย (inactive) หรือเรียกว่า “prohormone” ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปอยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำงาน (active form) คือ 20-ไฮดรอกซีเอคไโดโซนซึ่งถือว่าเป็นฮอร์โมนลอกคราบตัวแรกที่พบในแมลงเป็นจำนวนมาก (Gilbert, 1989)

ฮอร์โมนเอกไดโซนเป็นฮอร์โมนที่จำเป็นต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง โดยมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเซลล์อีพิเดอร์มิส (epidermis) ให้หลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของแมลงและสารไคติน (chitin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของคิวติเคิลทำให้เซลล์อีพิเดอร์มิสมีการเจริญและแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ นอกจากนี้ฮอร์โมนเอกไดโซนยังส่งผลกระทบต่องานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของแมลงและมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม การซ่อมแซมอวัยวะส่วนที่ชำรุดเสียหาย (regeneration) และการเปลี่ยนแปลงสีลำตัวของแมลงอีกด้วย แต่บทบาทที่สำคัญที่สุดก็คือการกระตุ้นให้แมลงเกิดการลอกคราบ (สมร, 2535) จากการศึกษาพบว่าฮอร์โมน 20E สามารถชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ก่อนเวลาตามธรรมชาติได้ การเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน 20E ที่ให้แก่ ตัวหนอน ซึ่งฮอร์โมนความเข้มข้นสูงจะทำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้เร็วกว่ากลุ่มที่ให้ฮอร์โมนความเข้มข้นต่ำ ซึ่งลักษณะของดักแด้ที่ได้สามารถแบ่งตามการเปลี่ยนแปลงสีคิวติเคิลดังนี้ ในระยะ G0 ดักแด้จะมีสีขาวปกติและตัวหนอนจะหยุดการเคลื่อนไหว ระยะ G1 จะเริ่มเห็นจุดสีส้มกระจายตามลำตัว ระยะ G2 สีลำตัวจะเปลี่ยนเป็นสีส้มทั่วลำตัว และระยะ G3 ผิวลำตัวจะเปลี่ยนเป็น คิวติเคิลสีน้ำตาล ตามลำดับ (Singtripop *et al.*, 2002)

2.3.2 ฮอร์โมนโปรทอแรคซิคโคโทรปิก (prothoracicotropic hormone, PTTH)

มีหน้าที่ควบคุมการหลั่งเอกไดสเตอรอยด์ (ecdysteroid) เป็นฮอร์โมนตัวแรกที่ถูกค้นพบในแมลง และเป็นนิวโรซีครีทอรีฮอร์โมนตัวแรกที่ถูกค้นพบในสัตว์ด้วย บทบาทของฮอร์โมนนี้ถูกค้นพบโดย Kopeck (1917) จากการทำการแยกบริสุทธิ์เพื่อหาลักษณะเฉพาะของฮอร์โมนนี้จากหนอนใยสาบและหนอนไหม (*Bombyx mori*) พบว่าฮอร์โมนนี้มี 2 รูปแบบคือ รูปแบบที่มีโมเลกุลใหญ่เรียกว่า big PTTH และรูปแบบที่มีขนาดเล็กเรียกว่า small PTTH โดยรูปแบบที่มีขนาดเล็กที่ได้จากหนอนไหมจะเรียกว่า bombyxin ซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์ที่คล้ายกับอินซูลินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (insulin like growth factor) (อ้างโดย ทิพวรรณ, 2555)

2.3.3 ฮอร์โมนจูวีไนล์ (juvenile hormone, JH)

ฮอร์โมนจูวีไนล์เป็นฮอร์โมนที่พบมากในอาณาจักรสัตว์ทั้งหมด มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเจริญพัฒนาของแมลง การสืบพันธุ์ การแยกวรรณะในแมลงสังคม การควบคุมพฤติกรรม การอยู่เป็นโคลนิกของผึ้ง ความหลากหลายในพวกเพลี้ยอ่อนและด้วงเต้าน การควบคุมการเกิด larval diapause และ adult diapause การสังเคราะห์ vitellogenin การเจริญพัฒนาของไข่ และการควบคุมเมแทบอลิซึมหลายๆ อย่าง ฮอร์โมนจูวีไนล์จะหลั่งมาจากต่อมคอร์ปอรา อัลลาตา ในปี 1956 Williams เป็นคนแรกที่สามารถสกัดฮอร์โมนจูวีไนล์ได้จากส่วนท้องในระยะตัวเต็มวัยของผีเสื้อยักษ์เพศผู้ (*Hyalophora cecropia*) และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาฉีดเข้าไปในระยะดักแด้ ทำให้ดักแด้เกิดการลอกคราบไปเป็นดักแด้ระยะที่สอง (second pupae) แทนที่จะกลายเป็นตัวเต็มวัย โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนจูวีไนล์ได้มีการค้นพบโดย Roller *et al.* (1967) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบประเภท sesquiterpenoid ที่เปลี่ยนมาจาก farnesic acid มี epoxide group ที่ส่วนปลาย และ methyl ester อยู่อีกด้าน ภายหลังได้มีการค้นพบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์ในธรรมชาติมีหลายรูปแบบ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกันเกือบทั้งหมด แต่แตกต่างกันเฉพาะ ethyl side chain ฮอร์โมนจูวีไนล์ที่ Roller ค้นพบนั้นปัจจุบันนี้คือ JH-I (C18-JH) และภายหลังพบอีก 4 ไอโซฟอร์ม รวมเป็น 5 ไอโซฟอร์ม (อ้างจากทิพวรรณ, 2554)

ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์คือฮอร์โมนจูวีไนล์ที่ถูกใช้ในห้วงปฏิบัติการ เนื่องจากฮอร์โมนจูวีไนล์ในธรรมชาติไม่มีความคงทนต่ออุณหภูมิห้องและแสงได้ จึงมีการสังเคราะห์สารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนจูวีไนล์ขึ้นมาใหม่ โดยฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ตัวแรกที่ถูกค้นพบคือ juvabione ส่วนฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ที่

นิยมใช้มี 3 พอร์ม ได้แก่ (1) Kinoprene รู้จักกันในชื่อ Enstar (ZR777), (2) methoprene รู้จักกันในชื่อ Alosid (ZR515) และ (3) hydroprene รู้จักกันในชื่อ ZR512 (Nijhout, 1994)

เมื่อฮอร์โมนจูวีไนล์มีปริมาณสูงในฮีโมลิฟฟ์จะทำให้ยังคงรักษารูปร่างลักษณะของการเป็นตัวอ่อนเอาไว้ไม่ให้เปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย แต่เมื่อระดับฮอร์โมนในฮีโมลิฟฟ์ลดต่ำลงจะกระตุ้นให้เกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้ และถ้าฮอร์โมนจูวีไนล์หมดไปก็จะกระตุ้นให้เข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย (เสาวภา, 2536) (อ้างโดย ทิพวรรณ, 2549)

จากการศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ในหนอนเยื่อไผ่พบว่า การให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะโอะอะพอสในปริมาณที่เหมาะสมสามารถชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยความสามารถในการชักนำนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ให้โดยกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนปริมาณสูงจะใช้เวลาในการเข้าสู่ระยะดักแด้เร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนในปริมาณต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์สามารถกระตุ้นให้ปริมาณฮอร์โมนเอกโดโซนในฮีโมลิฟฟ์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้หนอนเยื่อไผ่เข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของสีผิวเป็น สีน้ำตาลเนื่องจากการสร้างคิวติเคิลของดักแด้ (pupal cuticle) หรือการเข้าดักแด้อย่างสมบูรณ์ (complete pupa) เมื่อให้ฮอร์โมนในปริมาณที่เหมาะสม (Singtripop *et al.*, 2002)

2.4 โอะอะพอสในแมลง

โอะอะพอส เป็นระยะพักการเจริญที่พบในแมลงหลายชนิด เพื่อปรับตัวให้อยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสม (Delinger, 1985) โดยระยะนี้แมลงจะหยุดกิจกรรมต่างๆ ของร่างกายเพื่อใช้พลังงานที่สะสมไว้น้อยที่สุดจึงมีผลทำให้อัตราเมตาบอลิซึมลดต่ำลงไปด้วย โอะอะพอสมีอยู่ 2 แบบได้แก่ โอะอะพอส (obligatory diapause) เป็นการพักตัวแบบที่ไม่ได้ขึ้นอยู่กับเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม โดยปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการพักตัวในรูปแบบนี้ได้แก่ กรรมพันธุ์ ส่วนสภาพแวดล้อมจะมีบทบาทเกี่ยวกับความยาวนานของการพักตัว สำหรับการพักตัวในแบบที่สองเรียกว่า แฟคคัลเททีฟ โอะอะพอส (facultative diapause) โดยเป็นการพักตัวที่ถูกกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความสั้นยาวของช่วงแสง (photoperiod) ความชื้นของอากาศ สภาวะทางโภชนาการ และอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำจนเกินไป

การเข้าสู่การพักตัวของแมลงในระยะตัวหนอนนั้น พบว่าเกี่ยวข้องกับระดับของ JH เพราะจากการศึกษาใน southern corn borer (*Diatraea grandiosella*) โดย Yin and Chippendale (1979) รายงานว่าในฮีโมลิฟฟ์ของตัวหนอนระยะโอะอะพอส จะตรวจพบ JH ในปริมาณสูง Singtripop *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษการเจริญและระยะโอะอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ พบว่า ระยะของการเกิด larval diapause ในหนอนเยื่อไผ่จะนานประมาณ 9 เดือน ซึ่งสามารถพบได้ในหนอนทุกรุ่น และเกิดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกันทุกปี โดยหนอนเยื่อไผ่จะเริ่มเข้าโอะอะพอสหลังจากที่มีการเจริญเป็นตัวหนอนขั้นสุดท้าย (อินสตาร์ที่ 5) และอยู่ในช่วงสุดท้ายของระยะการกินอาหาร (feeding period) ซึ่งหลังจากเข้าโอะอะพอส หนอนเยื่อไผ่จะหยุดกินอาหาร จึงถือว่าตัวหนอนมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว แต่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะถัดไป ในระยะนี้ความเข้มข้นของเอกโดสเตอรอยด์ในฮีโมลิฟฟ์ของหนอนเยื่อไผ่จะต่ำ (Singtripop *et al.*, 2002) จึงอาจเป็นไปได้ว่า ลาร์วัลโอะอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ อาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ JH จึงทำให้หนอนเยื่อไผ่อยู่ในระยะนี้เป็นเวลานานถึง 9 เดือน

ต่อมาจึงมีการศึกษาถึงบทบาทของ JHA (methoprene) ต่อการสิ้นสุดของระยะโอะอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ พบว่าการให้ methoprene ปริมาณตั้งแต่ 0.05 ไมโครกรัมต่อตัว มีผลชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เข้าดักแด้ได้ โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของคิวติเคิลออกเป็นระดับสีต่างๆ เมื่อทำการผ่าตัดดูลักษณะโครงสร้างภายในพบว่า อวัยวะภายในเกิดลักษณะของดักแด้ขึ้น นอกจากนี้การให้ methoprene แก่หนอนที่

ผ่าตัดเอาสมองออก พบว่าสามารถชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เข้าดักด้ได้เช่นกัน ซึ่งได้มีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า methoprene จะไปกระตุ้นให้ต่อมโปรโทแรคซิกให้มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเอคโดโซนเพิ่มขึ้น และทำให้ระยะโตอะพอสในหนอนเยื่อไผ่สั้นสุดลง (Singtripop *et al.*, 2000)

2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนเอคโดโซนและฮอร์โมนจูวีไนล์ในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของสิ่งมีชีวิตเป็นเหตุการณ์สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตในสัตว์ พบทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งกลไกเหล่านี้ล้วนแล้วแต่ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนจากต่อมไร้ท่อทั้งสิ้น สำหรับในแมลงซึ่งเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังมีฮอร์โมนเป็นตัวควบคุมกลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเช่นกัน โดยมีรายงานการศึกษายาทบาทของฮอร์โมนในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในแมลงหลายชนิด หนอนใบยาสูบจัดเป็นแมลงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ การศึกษาการเจริญเติบโตในหนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*) โดย Nijhout (1999) พบว่ามีระดับของฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮิโมลิฟลดลงก่อนที่จะเกิดการลอกคราบของตัวหนอน จากนั้นจะมีการหลั่งฮอร์โมนโปรโทแรคซิกโคโทรปิกจากเซลล์นิวโรซีรีทอรี (neurosecretory cells) ในสมอง โดยฮอร์โมนโปรโทแรคซิกโคโทรปิกจะไปกระตุ้นต่อมโปรโทแรคซิกให้มีการหลั่งฮอร์โมนเอคโดโซนออกมากระตุ้นให้หนอนเกิดการลอกคราบเจริญเข้าสู่หนอนขั้นถัดไป หรือเกิดการลอกคราบเข้าสู่ดักแด้ และเมื่อฮอร์โมนจูวีไนล์มีระดับที่ต่ำมากหรือหายไปจะทำให้ดักแด้เข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย

จากการศึกษาในหนอนไหม (*B. mori*) พบว่าในตัวหนอนชั้นที่ 1 มีฮอร์โมนจูวีไนล์อยู่ในฮิโมลิฟของตัวหนอนสูงเพื่อให้ร่างกายยังคงสภาพการเป็นตัวหนอนอยู่ได้ แต่เมื่อฮอร์โมนจูวีไนล์ลดต่ำลง และฮอร์โมน 20-ไฮดรอกซีเอคโดโซนเพิ่มสูงขึ้น มีผลไปกระตุ้นให้หนอนเกิดการลอกคราบ เมื่อเข้าสู่ช่วงปลายของระยะตัวหนอน พบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์ลดต่ำลงอย่างมาก ทำให้ตัวหนอนนั้นเริ่มมีการเตรียมตัวเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ ในระยะนี้เองร่างกายของหนอนจะมีการตอบสนองต่อฮอร์โมน 20-ไฮดรอกซีเอคโดโซน เนื่องจากก่อนหน้านี้แม้จะมีการหลั่งฮอร์โมน 20-ไฮดรอกซีเอคโดโซนออกมา แต่ก็ถูกฮอร์โมนจูวีไนล์นั้นยับยั้งไม่ให้ต่อมโปรโทแรคซิกทำงาน แต่เมื่อฮอร์โมนจูวีไนล์ได้รับการตอบสนองจากต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นน้อยลง จะทำให้ฮอร์โมน 20-ไฮดรอกซีเอคโดโซนสามารถทำงานหรือหลั่งออกมาจากต่อมโปรโทแรคซิกได้ ทำให้ตัวหนอนเกิดการเข้าสู่ดักแด้เมื่อลอกคราบเข้าสู่ตัวเต็มวัยแล้ว พบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์หมดไปจากตัวแมลงแล้ว (Sakurai *et al.*, 1998)

2.5 บทบาทของ Krüppel homolog 1 (Kr-h1) ในการควบคุมการเจริญของแมลง

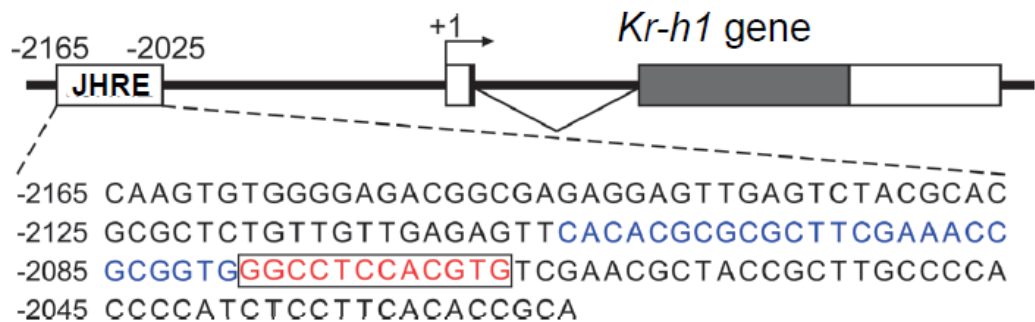
Kr-h1 เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายนิ้วมือที่เกิดจากธาตุสังกะสี (zinc-finger) ชนิด C₂H₂ โปรตีนชนิดนี้ค้นพบครั้งแรกในแมลงหวี่ (Pecasse *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2004) โดยในแมลงหวี่นั้น Kr-h1 มีหลายไอโซฟอร์ม โดยไอโซฟอร์ม Kr-h1 β จะพบการแสดงออกในเซลล์ประสาทในระหว่างการเจริญขั้นต้น โดยมีความสำคัญในการเจริญและควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของฮอร์โมน 20-E (Beck *et al.*, 2004) สำหรับ Kr-h1 α เป็นไอโซฟอร์มหลักที่พบในแมลงชนิดนี้ โดยจะแสดงออกในช่วงต้นของการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และมีความจำเป็นต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้สมบูรณ์ นอกจากนี้ Kr-h1 α ยังเกี่ยวข้องกับวิถีการควบคุมการเจริญของแมลงผ่านฮอร์โมน 20-E (Pecasse *et al.*, 2000)

จากการศึกษาการทำงานของ Kr-h1 พบว่าถูกควบคุมโดย JH ในระหว่างการเจริญของแมลงหวี่ นอกจากนี้การแสดงออกที่ผิดปกติไปของ Kr-h1 ส่งผลให้เกิดความผิดปกติที่เกิดจากแมลงได้รับ JHA ในระหว่างเริ่มการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง นอกจากนี้ยังพบว่า Kr-h1 α สามารถถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกได้โดย JHA สำหรับงานวิจัยในมอดแป้งนั้น ได้มีการทดลองและพิสูจน์แล้วว่า Kr-h1 ทำงานในเซลล์โดยเป็นตัวส่ง

สัญญาณของ JH ไปยังโปรตีนตัวรับสัญญาณ (signaling molecules) ตัวอื่นๆในเซลล์แมลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งแมลงในระยะตัวหนอนไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Minakuchi *et al.*, 2008, Minakuchi *et al.*, 2009)

นอกจากนี้ Kayukawa *et al.* (2012) ยังศึกษาถึงคุณลักษณะเฉพาะทางโมเลกุลของยีน *Kr-h1* ใน *B. mori* โดยพบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ (จำนวน 141 คู่เบสอยู่บริเวณก่อนตำแหน่งของยีน *Kr-h1* ประมาณ 2000 คู่เบส) ที่สามารถจับกับ JH (JH response element; JHRE) ได้ (ภาพที่ 4) ตลอดจนได้เสนอกลไกในระดับเซลล์ของ JH ในการควบคุมการแสดงออกของ *Kr-h1* เพื่อที่จะยับยั้งแมลงในระยะตัวหนอนไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นระยะดักแด้ (ภาพที่ 5)

Min-na *et al.* (2014) ศึกษาการโคลนยีนและบทบาทหน้าที่ของยีน *Kr-h1* ในการควบคุมการเจริญของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) เพื่อพัฒนาให้ยีนชนิดนี้เป็นหนึ่งในยีนเป้าหมายของการพัฒนาสารควบคุมแมลงผ่านการขัดขวางการทำงานของ JH ทดแทนการใช้สารเคมี โดยพบว่ายีนดังกล่าวมีความยาว 1,833 คู่เบส ที่แสดงออกมาเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 611 ตัว โดยภายในโมเลกุลของโปรตีน พบ zinc finger 8 ตำแหน่ง การแสดงออกของยีนพบมีการแสดงออกตลอดการเจริญของแมลง โดยพบระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดในระยะตัวอ่อนที่มีอายุ 4 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาถึงการกดการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RNAi ในตัวเต็มวัย พบว่าแมลงมีปีกกุด และลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกของทั้งสองเพศมีความผิดปกติ (ภาพที่ 6) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *Kr-h1* เกี่ยวข้องกับการเจริญของปีกและระบบสืบพันธุ์ในระยะตัวเต็มวัยของแมลง จึงทำให้ยีนชนิดนี้สามารถเป็นยีนเป้าหมายของการพัฒนาสารควบคุมแมลงต่อไปในอนาคต

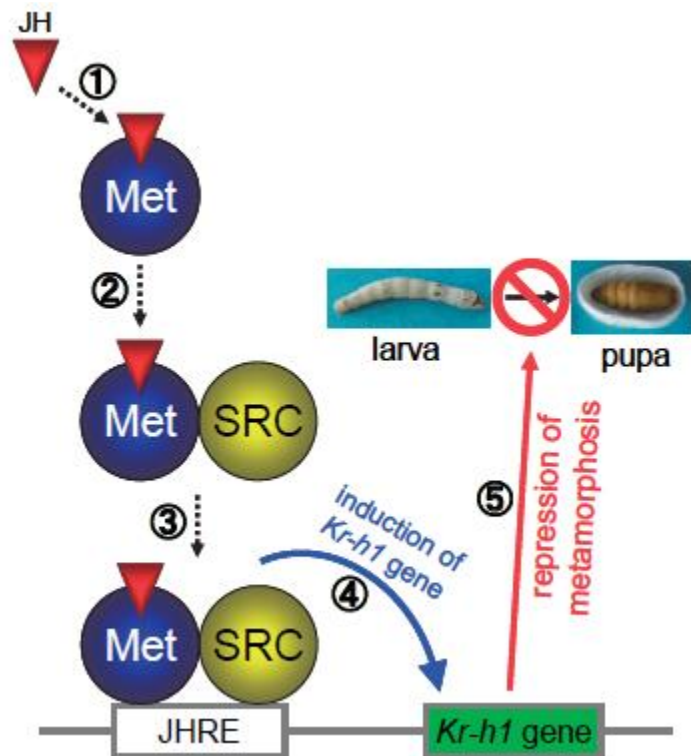


Red : indispensable DNA sequence for JH response (E-box: CACGTG)

Blue : important DNA sequence for JH response

Black : necessary DNA sequence for maximum JH response

ภาพที่ 4 ตำแหน่ง JH response element (JHRE) ของ *BmKr-h1* (JHRE, 141 นิวคลีโอไทด์) ที่ตั้งอยู่ก่อนตำแหน่งที่ยีน *BmKr-h1* จะเริ่มถอดรหัส โดยจะประกอบไปด้วยตำแหน่ง E-box ซึ่งเป็นที่จับของ transcription factor ชนิด bHLH (Kayukawa *et al.*, 2012)



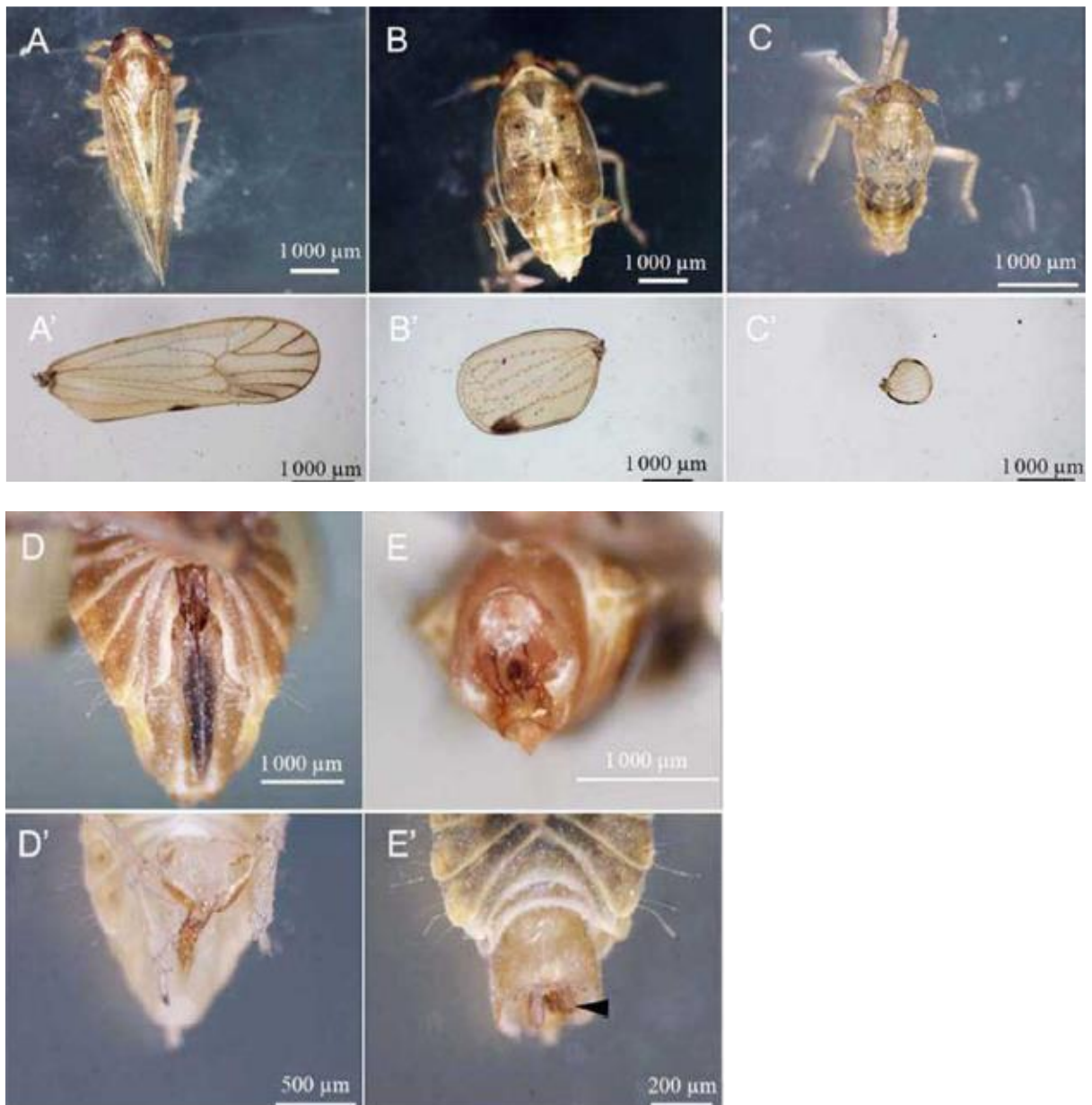
ภาพที่ 5 แผนภาพแสดงกลไกการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *BmKr-h1* โดยเริ่มจาก (1) Met จับกับ JH (เปรียบเสมือนเป็น ligand) (2) JH/Met จับกับ SRC (3) โครงสร้างเชิงซ้อน JH/Met/SRC จับกับ JHRE ของยีน *BmKr-h1* (4) ยีน *BmKr-h1* ถูกกระตุ้นให้แสดงออก (5) โปรตีน BmKr-h1 ไปทำหน้าที่ในการยับยั้งไม่ให้ตัวหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นระยะดักแด้ (Kayukawa *et al.*, 2012)

2.5 ความสำคัญของสารคล้ายจิวไนลอร์โมน (JHA) ในการควบคุมแมลง

จากรายงานที่ผ่านมาพบมีการใช้ JHA หลายชนิดเช่น Farnasol Methyl Ether (FME) methoprene hydroprene isoprene kinoprene และ pyriproxyfen เป็นต้น ในการควบคุมแมลงศัตรูมากกว่าสิบปี (Jindra *et al.*, 2013) โดย JHA เหล่านี้ได้มาจากการสังเคราะห์เลียนแบบ JH ในแมลงโดยวิธีการทางเคมี

พืช ถือว่าเป็นแหล่งสำคัญหลักที่พบ JHA ปริมาณมากสำหรับแมลงที่กินพืชเป็นอาหาร (phytophagous insects) โดยจะเรียก JHA ในพืชว่า ไฟโตจิวไนอยด์ (phytojuvenoid) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สามารถสกัด phytojuvenoid ชนิด juvabione จากเยื่อไม้ของไม้จำพวกสน ที่ชื่อว่า บัลซัมเฟอร์ (balsam fir, *Abies balsamea*) โดยนำมาทดสอบโดยการหยดสารสกัดดังกล่าว บนมวนชนิดหนึ่ง (European linden bug, *Pyrrhocoris apterus*) พบว่า สามารถกระตุ้นให้ตัวหนอนของแมลงมีขนาดใหญ่กว่าปกติ และตายไปก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นตัวเต็มวัย (Slama and William, 1966) นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดสอบสารสกัด phytojuvenoid ชนิด juvadecene และ juvocimenes จากส่วนรากแห้งของพริกไทย (*Macropiper excelsum* Miq) และใบกะเพรา (*Ocimum basilicum* L.) ตามลำดับ ต่อแมลง โดยจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นให้มีการลอกคราบในระยะตัวหนอนที่มากเกินไปกว่าปกติ (Nichida *et al.*, 1983; Bowers and Nishida, 1980) ตลอดจนสารสกัดจากไม้ดอกอัสเจอเรตัม (*Ageratum houstonianum*) ได้แก่ precocenes I และ II ให้ผลโดยการเข้าไปรบกวนกระบวนการสังเคราะห์ JH ส่งผลให้แมลงเกิดการ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างเร็วเกินกว่าปกติ จนทำให้แมลงในระยะตัวเต็มวัยเป็นหมัน (Bowers *et al.*, 1976) ทั้งนี้ยังรายงานการพบ phytojuvenoid ในพืชอีกหลายชนิด ดังตารางที่ 1 (Khyad *et al.*, 2012)



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในระยะตัวเต็มวัย ภายหลังจากการกดแสดงออกของยีน *NlKr-h1* โดยการฉีด double strand RNA (dsRNA) ในตัวอ่อนระยะที่ 3 โดยภาพ A, A', B, B' แสดงภาพของปีกที่ปกติ C, C' แสดงภาพปีกที่ผิดปกติไปภายหลังจากที่ฉีดด้วย dsRNA ภาพ D, E แสดงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกที่ปกติของแมลงเพศเมีย และผู้ตามลำดับ และ D' E' แสดงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกที่เจริญผิดปกติไปภายหลังจากที่ฉีดด้วย dsRNA ของแมลงเพศเมีย และผู้ตามลำดับ (Min-na *et al.* 2014)

ตารางที่ 1 ชนิดของพืชที่มีการรายงานว่าพบ phytojuveniod (Khyad et al., 2012)

No	Plant	Juvenoid Content (FME)
1	<i>Acalypha hispida</i> (L)	61
2	<i>Anacardium occidentale</i> (L)	20
3	<i>Bauhinia accuminata</i> (L)	61
4	<i>Bougainvillea glabra</i> (L)	31
5	<i>Cocos nucifera</i> (L)	61
6	<i>Hibiscus rosasinesis</i> (L)	20
7	<i>Lantana camera</i> (L)	132
8	<i>Malvaviscus populinus</i> (L)	31
9	<i>Morinda tinctoria</i> (L)	61
10	<i>Morus alba</i> (L)	102
11	<i>Nyctanthus arbor</i> (L)	61
12	<i>Pterocarpus marsupium</i> (L)	82
13	<i>Santalum album</i> (L)	184
14	<i>Tectona grandis</i> (L)	128
15	<i>Terminalia paniculata</i> (L)	60
16	<i>Verteria indica</i> (L)	44
17	<i>Vitis vinifera</i> (L)	367
18	<i>Sesamum indicum</i> (L)	92

Khyade et al. (2012) ได้สกัด phytojuveniod จากพืช 4 ชนิดได้แก่ องุ่น (*Vitis vinifera*) แก่นจันทน์ (*Santalum album*) ผกากรอง (*Lantana camera*) และสัก (*Tectona grandis*) โดยพบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างใน *B. mori* โดยไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของชั้นคิวติเคิลที่ปกคลุมลำตัวแมลง นอกจากนี้ยังมีการทดสอบ phytojunoid ที่สกัดได้จาก สน (*Pinus longifolia*) บัลซัมเฟอร์ (*A. balsamea*) โกฐนชิณี (*Psoralea corylifolia*) และ สะเดา (*Azadirachta indica*) ต่อการผลิตไหมของ *B. mori* พบว่า phytojuvenoid สามารถเหนี่ยวนำให้แมลงอยู่ในระยะตัวหนอนพร้อมๆกัน และอยู่ในระยะตัวหนอนนานขึ้น ตลอดจนส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้างไหม ส่งผลให้เพิ่มการสร้างไหมในแมลงชนิดนี้ได้ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตไหม (Srivastava and Upadhyay, 2013)

ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้เลือกใช้ผกากรอง เป็นพืชตัวอย่างสำหรับการสกัด phytojuveniod โดยผกากรองนั้น เป็นพืชในวงศ์ Verbenaceae พบเป็นพืชพื้นเมืองในทวีปอเมริกา ด้วยสีสนที่สวยงามจึงนิยมนำมาปลูกเป็นไม้แต่งสวน จนกลายเป็นพืชุกรานในเขตร้อน (Ghizalberti, 2000) ลักษณะเป็นไม้พุ่มหรือไม้พุ่มกึ่งเลื้อย (ภาพที่ 7) ปลายใบแหลม ขอบใบจักฟันเลื่อย เส้นใบเห็นเป็นร่องชัดเจน ดอกเป็นช่อกระจุก มีหลายสี ดอกย่อยเป็นทรงปากแตร ดอกมีกลิ่นฉุน ขนตามลำต้นเมื่อถูกผิวหนังทำให้คัน ถ้ารับประทาน ทำให้ปวดท้อง อาเจียน กล้ามเนื้ออ่อนแรง หายใจขัด หมดสติ (เศรษฐมนตร์, 2552) ผกากรองเป็นวัชพืชที่พบได้ตามทุ่งหญ้าทั่วไป มักอยู่เป็นพุ่มต่ำ คอยขยายเผ่าพันธุ์และทำลายความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่ที่

ผกากรองได้เติบโตอยู่ เมื่อพุ่มของผกากรองเติบโตหนาแน่นมากขึ้นจะส่งผลกระทบต่ออัตราการขยายตัวของป่าไม้ที่จะลดลงไปเนื่องจากต้นผกากรองจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบรายงานการใช้ประโยชน์จากผกากรองของชาวโอรังอัสนี ในรัฐเปรัก ประเทศมาเลเซีย โดยได้นำไปต้มน้ำดื่มกับน้ำ เพื่อใช้ฉีดพ่นสำหรับไล่แมลง (Samuel *et al.*, 2010)



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะภายนอกของผกากรอง (Ghizalberti, 2000)

จากงานวิจัยที่ศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของ phytojuvenoid ที่สกัดได้จากผกากรอง พบว่าเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenes ได้แก่ humulene และ cis-caryophyllene เป็นองค์ประกอบหลัก (Zandi-Sohani *et al.*, 2012) ผกากรองยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านจุลชีพ (antimicrobial) และฟังไจ (antifungal) (Deena and Thoppil, 2000; Kruade *et al.*, 2010; Saraf *et al.*, 2011; Saikia and Sahoo, 2011) ทั้งนี้สารสกัดน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผกากรองยังสามารถให้ฤทธิ์ในการกำจัด และไล่แมลงศัตรูโรงเก็บได้หลายชนิด (Zandi-Sohani *et al.*, 2012, Mohamed and abdelgaleil, 2008, Zoubiri and Baaliouamer, 2011) จากข้อมูลข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงคาดหวังว่าจะสามารถพัฒนาสารสกัด phytojuvenoid จากผกากรองเพื่อนำมาควบคุมแมลงศัตรูพืช ทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ การตกค้างในสิ่งแวดล้อม และเกิดภาวะความต้านทานต่อสารเคมีของแมลงศัตรูต่อไปในอนาคต อีกทั้งยังถือว่าการใช้ประโยชน์จากพืชอีกด้วย

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 สัตว์ทดลอง

หนอนเยื่อไผ่ จากป่าไผ่ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

- 1) กล่องพลาสติกพร้อมฝาปิดที่เจาะรู
- 2) เข็วกระตาดาชูบน้ำพอมหาด
- 3) ตู้เพาะเลี้ยงแมลง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมีในการให้ฮอร์โมน

- 1) อะซิโตน (acetone)
- 2) ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (S-methoprene), Zoecou, USA

3.1.4 อุปกรณ์ทั่วไป

- 1) ชุดสกัดซอกซ์เลต (Soxhlet extraction apparatus)
- 2) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
- 3) เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heating Block)
- 4) เครื่องทำความสะอาดด้วยแรงสั่น (Sonicator)
- 5) ชุดอุปกรณ์สำหรับการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis)
- 6) เครื่องชั่งน้ำหนักแบบความละเอียด 2 ตำแหน่ง
- 7) ชุดเครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ กรรไกรผ่าตัด กรรไกร คีมคีบขนาดเล็ก
- 8) พลาสติกโฮโมจีไนเซอร์ (plastic homogenizer)
- 9) ปีกเกอร์
- 10) เข็มปักแมลงเบอร์ 3 (insect pin No.3)
- 11) ข้อนตักสารและกระตาดาชั่งสาร
- 12) กระตาดากรอง
- 13) ไมโครปิเปต (micropipette)
- 14) หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 15) เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลจากเจล (Biodoc-it ® imaging system)
- 16) เครื่องผสมเขย่า (vortex mixture)
- 17) ตู้แช่แข็ง (freezer) อุณหภูมิ -20 และ -30 องศาเซลเซียส
- 18) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 19) ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-1601)
- 20) หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

- 21) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 22) แผ่น parafilm
- 23) เครื่องวัดความเป็น กรด-ด่าง (pH meter)
- 24) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator)

3.1.5 สารเคมีทั่วไป

- 1) น้ำกลั่น (Distilled Water)
- 2) สารละลายริงเกอร์ (Ringer's solution)
- 3) 100 mM MgCl₂ (Magnesium chloride)
- 4) PBS (phosphate buffer saline)
- 5) 100 mM CaCl₂ (Calcium chloride)
- 6) 75% และ 99.5% ethanol
- 7) 0.5X TAE buffer
- 8) Agarose S
- 9) DEPC-H₂O

3.1.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA และการเตรียม cDNA

- 1) Ribozol (Amresco, USA)
- 2) Deoxyribonuclease (DNase I)
- 3) Isopropanol
- 4) Chloroform
- 5) 25 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 6) 3M Sodium acetate (NaOAc) pH 4.0, 5.2, 6.0
- 7) Tris-EDTA (TE buffer)
- 8) 10X DNase buffer
- 9) 5X Reverse transcriptase buffer (RT buffer)
- 10) 10M deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs)
- 11) Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT)
- 12) Oligo dT

3.1.7 สารเคมีในการทำ polymerase chain reaction (PCR) และ qPCR

- 1) T100™ Thermal Cycler from BIO-RAD
- 2) iCycler iQ5™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)
- 3) ดีเจเนอเรตไพรเมอร์ (Degenerated primers) สำหรับโคลนยีน *OfKr-h1*
 forward primer (20 base) : 5'- ACNACNCGNAGYGCNCTNAC -3'
 reverse primer (20 base) : 5'- RTGNAGYTTNCCRGARTGYT -3'
- 4) ไพรเมอร์ (primers) สำหรับทำ qPCR
 สำหรับ *OfKr-h1* ขนาด 240 คู่เบส (bp)

forward primer (24 base) : 5'- TGTTCCAAACAATTAAAGGTTTCAC -3'

reverse primer (24 base) : 5'- TTTAGTGTTAAATGTTCCACTACA -3'

สำหรับ *Of Ribosomal Protein L 3 (OfRpL3)* ขนาด 299 คู่เบส (bp) ซึ่งจะใช้เป็น internal standard เนื่องจากระดับการแสดงออกของ *OfRpL3* mRNA ในเนื้อเยื่อของหนอนเยื่อไผ่จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะต่างๆ ของตัวหนอน

forward primer (22 base) : 5'-TCTACCCCAAGAAGAGGTCTCG-3'

reverse primer (22 base) : 5'-ACGACAGTCCTCAGACATGTGC-3'

- 5) Taq polymerase
- 6) 10X PCR buffer
- 7) 2 mM dNTPs
- 8) 25 mM MgCl₂
- 9) Nuclease free water
- 10) RACE cDNA amplification kit
- 11) SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit
- 12) เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

3.1.8 สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน *OfKr-h1*

- 1) GEL/PCR Purification Mini Kit
- 2) GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kit
- 3) Promega pGEM-T Easy Cloning kit
- 4) Competent cell (*E. coli* DH5α)
- 5) S.O.C medium
- 6) LB medium และ LB agar plate
- 7) Ampicillin
- 8) IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)
- 9) X-gal (5-bromo-4-chloro-3-iodyl-β-D-thiogalactoside)
- 10) ABI PRISM® Bigdye® Terminator (version 3.1) cycle Sequencing Kit

3.1.9 โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

- 1) โปรแกรม SPSS (one-way ANOVA) สำหรับวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

3.1.10 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการวิจัยต่อมไร้ท่อวิทยา (Endocrinology research laboratory)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 การสกัด phytojuvenoid จากผกากรอง

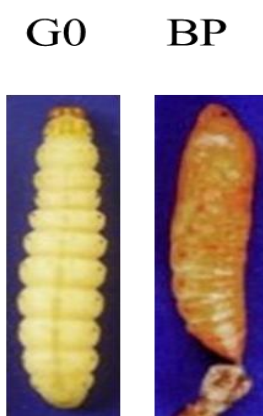
เก็บตัวอย่างพืช แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด จากนั้นอบส่วนเปลือกหุ้มลำต้นให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C แล้วตัดให้เป็นชิ้นขนาดที่เล็กลง นำตัวอย่างไปชั่งแล้วนำไปสกัดด้วยชุดสกัด soxlet โดยใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย ทำการกลั่นเป็นเวลา 20-40 ชั่วโมง ภายหลังจากสกัดเสร็จ นำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) จากนั้นละลายสารสกัดที่ได้ด้วยอะซิโตนเพื่อเตรียมเป็นสารละลายตั้งต้นสำหรับการทดลองต่อไป

3.3 การศึกษาผลของ phytojuvenoid ต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไดอะพอส

ในการศึกษาผลของ phytojuvenoid ต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไดอะพอสนั้น วิธีการที่ง่ายที่สุดคือติดตามการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และพิษวิทยา เช่น การตายของแมลง การเปลี่ยนแปลงเป็นระยะดักแด้ของตัวหนอน เป็นต้น โดยนำหนอนเยื่อไผ่ในระยะไดอะพอส มาแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หยดอะซิโตนเพียงอย่างเดียว 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 2 หยดสารสกัด phytojuvenoid ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 3 หยดสารสกัด phytojuvenoid ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 4 หยดสารสกัด phytojuvenoid ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 5 หยดสารสกัด phytojuvenoid ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 6 หยดสารสกัด phytojuvenoid ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 7 หยดสารสกัด phytojuvenoid ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 8 หยดสารสกัด phytojuvenoid ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว

เมื่อแบ่งหนอนได้เป็นกลุ่มต่างๆ แล้ว ให้ใช้ไมโครปิเปตหยดสารสกัด phytojuvenoid ความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายใน อะซิโตนให้กับหนอนเยื่อไผ่ โดยหยดบริเวณด้านบนของปล้องกลางลำตัวจนถึงปล้องสุดท้ายของหนอนเยื่อไผ่ เมื่อหยดฮอร์โมนแล้วเริ่มบันทึกข้อมูล การตาย และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวหนอน โดยนับเป็นวันแรก (day 0; D0) จากนั้นเก็บข้อมูลในแต่ละกลุ่มการทดลองทุกๆ วันเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งหนอนเยื่อไผ่เปลี่ยนแปลงเป็นดักแด้ครบในทุกกลุ่มการทดลอง การเกิดดักแด้ที่ถูกชักนำโดยฮอร์โมนนี้ จะทำให้ตัวหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาภายนอกของลำตัว ที่สามารถสังเกตได้ง่ายตามระดับการเปลี่ยนแปลงสีคิวติเคิลที่ระดับ G0 (ตัวหนอนหยุดการเคลื่อนไหว) และ Brown pupa (BP) (ดักแด้สีน้ำตาล) (ภาพที่ 8) ดังนี้



ภาพที่ 8 แสดงการเปลี่ยนสีของลำตัว 2 ระดับ

3.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำให้ยีน *Kr-h1* บริสุทธิ์

ทำการออกแบบ degenerated primer โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Kr-h1* ในแมลงในอันดับ Lepidoptera จากนั้นใช้ primer ที่ออกแบบได้มาเพิ่มจำนวนยีนโดยวิธี polymerase chain reaction โดยใช้ตัวอย่าง cDNA จากเนื้อเยื่อสมองของหนอนเยื่อไผ่ ภายหลังจากทำการหยดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรอะซิโตน แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสเป็นเวลา 10 วัน เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วนำ PCR product ที่ได้ไป load บน 2% agarose S gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์และ 180 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นระยะเวลา 25 นาที เมื่อพบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วจึงตัดแถบ DNA มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไป insert ใน plasmid DNA โดยการเชื่อมต่อชิ้น DNA กับเวกเตอร์ (ligation) จากนั้นนำ plasmid DNA ดังกล่าวไปทำการบวกรับการนำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ใน *E. coli* (transformation) หลังจากนั้นทำการตรวจหา plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วนยีนที่ต้องการ เมื่อตรวจพบแล้วทำการสกัด plasmid DNA เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Kr-h1* และเมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนแล้ว จึงออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน (gene specific primers) เพื่อทำการเพิ่มจำนวนยีน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full length *Kr-h1* โดย cDNA ที่ใช้เป็น template สังเคราะห์มาจาก mRNA โดยวิธี 5'/3' RACE (5'/3' Rapid Amplification cDNA ends) ส่วนปลายทางด้าน 5' และ 3' จะใช้เทคนิค RACE (Rapid Amplification cDNA ends) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เหลือ โดยมีวิธีการทดลองในขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. การสกัด RNA จากเนื้อเยื่อสมองของหนอนเยื่อไผ่โดยใช้ Ribozol

- 1.1) บดสมองให้ละเอียดในหลอดพลาสติกที่เติม Ribozol ปริมาตร 300 ไมโครลิตรโดยใช้พลาสติกโฮโมจีไนเซอร์ โดยทำในน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อไว้
- 1.2) บ่มตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 10 นาที
- 1.3) เติม chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- 1.4) นำไปปั่นเขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 15 วินาที
- 1.5) บ่มตัวอย่างบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.6) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 1.7) ดูด supernatant ใส่หลอดใหม่ให้ได้มากที่สุด แล้วตกตะกอนด้วย isopropanol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที
- 1.8) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 1.9) ดูด supernatant ที่ก้นจากนั้นล้างตะกอนด้วยเอธานอล 75% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- 1.10) แล้วเขย่าให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา (inverting mix)
- 1.11) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 1.12) ดูดเอธานอลออกให้หมด แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- 1.13) ละลายตะกอนที่ได้ด้วย DEPC-H₂O ปริมาตร 11 ไมโครลิตร
- 1.14) ดูดสารละลาย RNA ที่ได้ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เจือจางด้วย Milli Q ปริมาตร 99 ไมโครลิตร นำไปวัดค่า OD ที่ 260/280 เพื่อคำนวณหาปริมาณของ RNA

2. การทำ DNase treatment

- 2.1) เติม 10X DNase buffer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ลงใน RNA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
- 2.2) เติม DEPC-H₂O ปริมาตร 7 ไมโครลิตร
- 2.3) เติม DNase I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- 2.4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 2.5) เติม 25 mM EDTA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- 2.6) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็ง
- 2.7) เติมเอธานอล 99.5% ปริมาตร 2 เท่า และ 3M NaOAc pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่า ของสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 2.5
- 2.8) บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการสังเคราะห์ cDNA โดยการทำให้ reverse transcription ต่อไป

3. การทำ reverse transcription

- 3.1) นำสารละลายจากการทำ DNase treatment มาปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 3.2) ดูดเอธานอลออกให้หมด แล้วเติมเอธานอล 75% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- 3.3) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 3.4) ดูดเอธานอลออกให้หมด แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- 3.5) ละลายตะกอนที่ได้ด้วย DEPC-H₂O ปริมาตร 11 ไมโครลิตร
- 3.6) ดูดสารละลาย RNA ที่ได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เจือจางด้วย Milli Q ปริมาตร 99 ไมโครลิตรแล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 260/280 เพื่อคำนวณหาปริมาณ RNA ที่ได้
- 3.7) คำนวณ 0.5 ไมโครกรัมของ RNA ที่ได้ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 11 ไมโครลิตรด้วย DEPC-H₂O
- 3.8) เติม oligo dT ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
- 3.9) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีโดยใช้เครื่อง PCR จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งทันที
- 3.10) เติม 5x RT buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
- 3.11) เติม 10mM dNTPs ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
- 3.12) เติม DEPC-H₂O ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร
- 3.13) เติม MMLV Reverse Transcriptase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร
- 3.14) บ่มที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ดังนี้
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.15) เติม TE ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ต่อไป

4. การทำ polymerase chain reaction (PCR) และ quantitative PCR (qPCR)

4.1) Reaction volume ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้

10X Taq buffer	1	ไมโครลิตร
2mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	1	ไมโครลิตร
10 µM forward primer	0.2	ไมโครลิตร
10 µM reverse primer	0.2	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.05	ไมโครลิตร
milli Q water	1	ไมโครลิตร
template	1	ไมโครลิตร

4.2) PCR condition

PCR condition ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวน *OfRpL3*

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
จำนวน 40 รอบ	

PCR condition ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวน *OfKr-h1*

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
จำนวน 40 รอบ	

4.3) นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR 10 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตรมา load บน 1.2% agarose S gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ 180 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 25 นาที

4.4) ย้อมเจลด้วย ethidium bromide 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 30 นาที

4.5) ถ่ายรูปเจลที่ได้ด้วย Biodoc-it® imaging system แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ที่เกิดขึ้นโดยใช้โปรแกรม NIH image หรือนำไปวิเคราะห์ relative expression ตามวิธีของ Livak and Schmittgen (2001)

5. การทำให้บริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (DNA purification)

- 5.1) ตัดแถบ DNA ที่ได้นบน agarose gel จากการทำให้ PCR ใส่ลงในหลอดแล้วล้างน้ำหนักเจลที่ได้
- 5.2) เติม FADF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ประมาณ 1 นาที
- 5.3) นำไปปั่น (incubate) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ผสมให้เข้ากันโดย vortex ทุกๆ 2-3 นาที จนกว่าเจลละลายจนหมด
- 5.4) นำออกมาวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15-20 นาที
- 5.5) วาง FADF column ในหลอด collection tube ขนาด 2 มิลลิเมตร
- 5.6) เติมสารละลายที่ได้จากข้อ 3 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ลงใน FADF column
- 5.7) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- 5.8) นำ FADF column ใส่ลงไปใน collection tube
- 5.9) เติม wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงไปใน FADF
- 5.10) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- 5.11) นำ FADF column ใส่ลงไปใน collection tube อีกครั้ง
- 5.12) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- 5.13) นำส่วนของ FADF column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube
- 5.14) เติม elution buffer ปริมาตร 20-40 ไมโครลิตร บริเวณตรงกลางของ FADF column
- 5.15) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3 นาที จนสารละลาย elution buffer ถูกดูดซึมจนหมด
- 5.16) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- 5.17) เก็บสารละลายจากข้อ 16 ไว้ที่ตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทำ ligation ต่อไป

6. การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์กับเวกเตอร์ (ligation)

หลังจากที่ได้ DNA ที่บริสุทธิ์แล้ว จึงนำไปตรวจสอบอีกครั้ง โดยการทำให้ electrophoresis ของตัวอย่างดังกล่าวควบคู่กันกับตัวอย่างของ DNA ที่ทราบปริมาณ เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณของ DNA ที่ต้องการใช้ในการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์กับเวกเตอร์ โดยอาศัยการวิเคราะห์แถบ DNA ด้วยโปรแกรม NIH image โดยขั้นตอนการทำ ligation มีดังนี้

- 6.1) คำนวณหาปริมาณของ DNA ที่ต้องการจากสูตร

$\text{DNA ที่ต้องการ (ng)} = \frac{\text{plasmid DNA (ng)} \times \text{PCR product size (bp)} \times \text{fold of PCR product}}{\text{plasmid size (bp)}}$

** ปริมาณของ plasmid DNA ที่ใช้คือ 50-500 นาโนกรัม

ปริมาณของ PCR product ที่นิยมใช้คือ 4-10 เท่า

- 6.2) ใส่ plasmid DNA ที่ใช้เป็นเวกเตอร์คือ pGEM T ปริมาตร 100 นาโนกรัม ลงในสารละลายที่ได้จากการทำให้ DNA บริสุทธิ์ ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร

- 6.3) เติม 5x ligation buffer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร
- 6.4) เติม T4 DNA ligase ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร
- 6.5) เติม Nuclease free H₂O ให้ครบปริมาตร 10.0 ไมโครลิตร
- 6.6) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต
- 6.7) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

7. การนำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* (transformation)

- 7.1) ละลาย competent cell (*E. coli* DH5 α) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง
- 7.2) เติมสารละลาย ligation mixture ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 7.3) วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
- 7.4) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที
- 7.5) วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 90 วินาที
- 7.6) เติมสารละลาย LB ปริมาตร 350 ไมโครลิตร
- 7.7) เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที
- 7.8) กระจายเซลล์ที่ได้จากข้อ 7.7 หยดลงไปในจานเพาะเลี้ยง (LB agar plate) ที่มี IPTG, X-gal อย่างละ 40 ไมโครลิตร และ ampicillin 20 ไมโครลิตร
- 7.9) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

8. การคัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของยีน (positive colony selection)

- 8.1) ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ และโคโลนีเดี่ยวสีขาว ใส่ลงไปใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 60 ไมโครลิตร
- 8.2) แกว่งไม้จิ้มฟันเพื่อให้เศษของโคโลนีที่ติดอยู่หลุดออกมา หลังจากนั้นจึงนำไปแตะลงบนจานเพาะเลี้ยง LB plate ที่เตรียมไว้เป็น master plate
- 8.3) บ่ม LB plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง
- 8.4) สำหรับตัวอย่างของแต่ละโคโลนีที่อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นนำลงแช่ในน้ำแข็งทันที
- 8.5) นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 4 บ่มที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดย supernatant ที่ได้จะใช้เป็น template ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบโคโลนีที่ต้องการ ซึ่งปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR ในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร มีดังนี้

10x Taq buffer	1	ไมโครลิตร
2 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	0.6	ไมโครลิตร
10 μ M forward primer	0.5	ไมโครลิตร
10 μ M reverse primer	0.5	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.05	ไมโครลิตร
template	5.0	ไมโครลิตร
milli Q water	1.35	ไมโครลิตร

PCR condition ที่ใช้คือ

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
จำนวน 30 รอบ	

8.6) นำ PCR product ที่ได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้ว load บน 1.2% agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 200 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 30 นาที

8.7) ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบแถบของ DNA ด้วยเครื่อง Biodoc-it® imaging system เพื่อตรวจสอบหา positive cloned

9. การทำบริสุทธิ์ plasmid DNA โดยใช้ GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kit

9.1) เลือกโคโลนีสีขาว นำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองขนาดกลาง โดยใช้ LB medium ปริมาณ 1-5 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

9.2) เมื่อครบเวลาที่เพาะเลี้ยง ให้ย้ายลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร

9.3) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

9.4) เติม resuspension solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

9.5) เติม lysis solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายเหนียวข้น

9.6) เติม neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายเหนียวข้น มีตะกอนขุ่นสีขาว

9.7) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

9.8) ดูด supernatant ออกแล้วถ่ายลงหลอดใหม่

9.9) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

9.10) ดูด supernatant ออกแล้วใส่ลงใน spin column ปริมาตร 450 ไมโครลิตร

9.11) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

9.12) นำ spin column ออกแล้วใส่ในหลอดใหม่ ดูด supernatant ใส่ลงไปอีกครั้ง ปริมาตร 450 ไมโครลิตร

9.13) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

9.14) นำ spin column ออกแล้วใส่ในหลอดใหม่

9.15) เติม wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

9.16) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

9.17) นำ spin column ออก จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ภายในหลอดทิ้ง

9.18) เติม wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

- 9.19) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- 9.20) นำ spin column ใส่ลงในหลอดใหม่
- 9.21) เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- 9.22) วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
- 9.23) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- 9.24) เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10. การหาลำดับเบสของยีน *Kr-h1*

นำพลาสมิด pGEM-T-*Kr-h1* ที่สกัดได้มาหาลำดับเบสยีน *Kr-h1* โดยเตรียมพลาสมิดที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 200 ng/ml แล้วส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท FirstBase ประเทศมาเลเซีย แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอจากธนาคารยีน (Genbank)

3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* ในอวัยวะชนิดต่างๆของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอส เพื่อที่จะเลือกอวัยวะที่มีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดเป็นตัวแทนของระดับการแสดงออกของยีนนี้ทั้งหมดในแมลงหนอนเยื่อไผ่ โดยเลือกเก็บตัวอย่างอวัยวะของหนอนเยื่อไผ่ ได้แก่ สมอง (brain, Br) ปมประสาทใต้หลอดอาหาร (sub-esophageal ganglion, Sg) ปมประสาทส่วนอก (thoracic ganglion, Tg) ปมประสาทส่วนท้อง (abdominal ganglion, Ag) เนื้อเยื่อไขมัน (fat body, Fb) และ ท่อมัลพิเจียน (malpighian tubule, Mt) จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัด RNA แล้วนำ RNA ที่ได้มาทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อให้ได้ cDNA ตามลำดับ แล้วจึงตรวจวัดระดับการแสดงออกของ *Kr-h1* mRNA โดยอาศัยเทคนิค qPCR

เมื่อได้ตัวแทนอวัยวะแล้ว จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ต่อไป โดยในการเก็บตัวอย่างจะแบ่งเป็นสามระยะหลักๆ ได้แก่ ระยะไคอะพอสตอนต้น (early diapause period พบในเดือนกันยายน) ระยะไคอะพอส (diapause period พบในเดือนตุลาคม-มกราคม) ระยะไคอะพอสตอนปลาย (late diapause period พบในเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม) และระยะดักแด้ (pupal stage) จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัด RNA แล้วนำ RNA ที่ได้มาทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อให้ได้ cDNA ตามลำดับ แล้วจึงตรวจวัดระดับการแสดงออกของ *Kr-h1* mRNA โดยอาศัยเทคนิค qPCR

3.6 การศึกษาผลของ JHA (methoprene) และ phytojuvenoid ที่ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม ต่อการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* ของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอสในสถานะ *in vivo*

จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* ของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับฮอร์โมนที่ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม โดยการแบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 หยดฮอร์โมน methoprene ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 2 หยดฮอร์โมน phytojuvenoid ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว
- กลุ่มที่ 3 หยดอะซิโตน ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อตัว (ชุดควบคุม)

วิธีการหยดฮอร์โมน จะใช้ micropipette หยดฮอร์โมนที่ละลายในอะซิโตน โดยหยดบริเวณด้านหลังของปล้องกลางลำตัวจนถึงปล้องสุดท้ายของหนอนเยื่อไผ่ (Topical application method) จากนั้นทำการ

เก็บตัวอย่างสมองของหนอนเยื่อไผ่แต่ละกลุ่มๆ ละ 5 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ ทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งหนอนเยื่อไผ่เกิด การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาโดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะดักแด้ จากนั้นนำตัวอย่างสมองมา สกัด RNA แล้วนำ RNA ที่ได้มาทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อให้ได้ cDNA ตามลำดับ แล้วจึงตรวจวัดระดับการแสดงออกของ *Kr-h1* mRNA โดยอาศัยเทคนิค qPCR

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

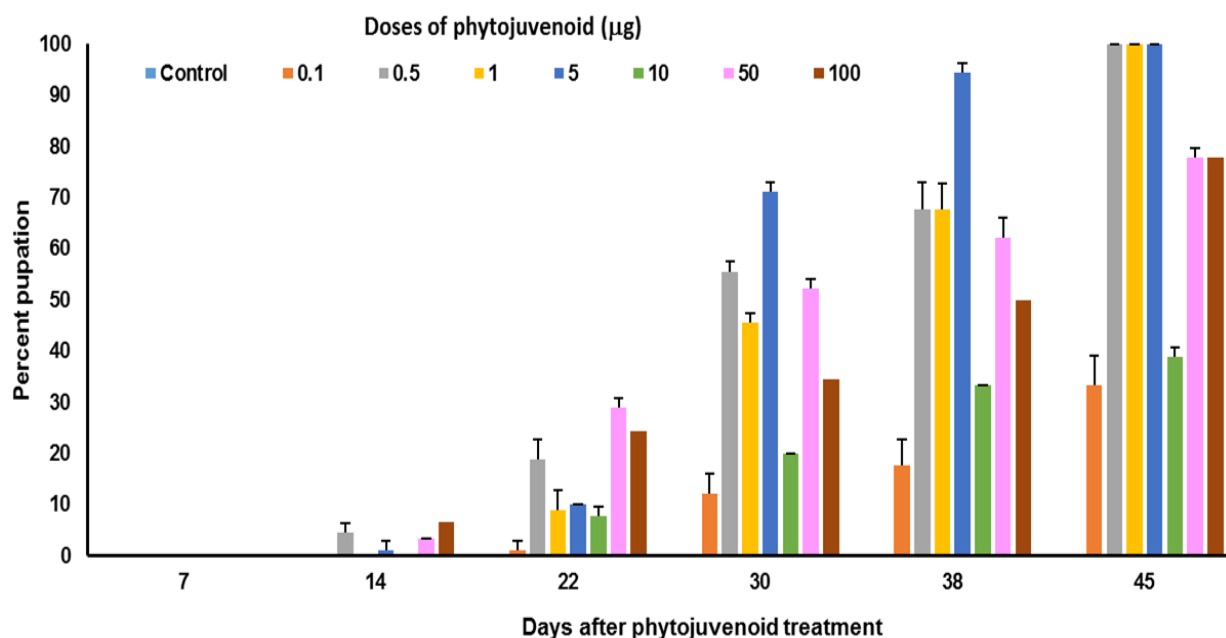
ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทั้งหมดที่มีการเปรียบเทียบในงานวิจัยครั้งนี้ เช่น ค่าเฉลี่ยของจำนวนวันการ เข้าดักแด้ ค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีน ในทุกการทดลองจะวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20 โดยอาศัยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4 ผลการวิจัย

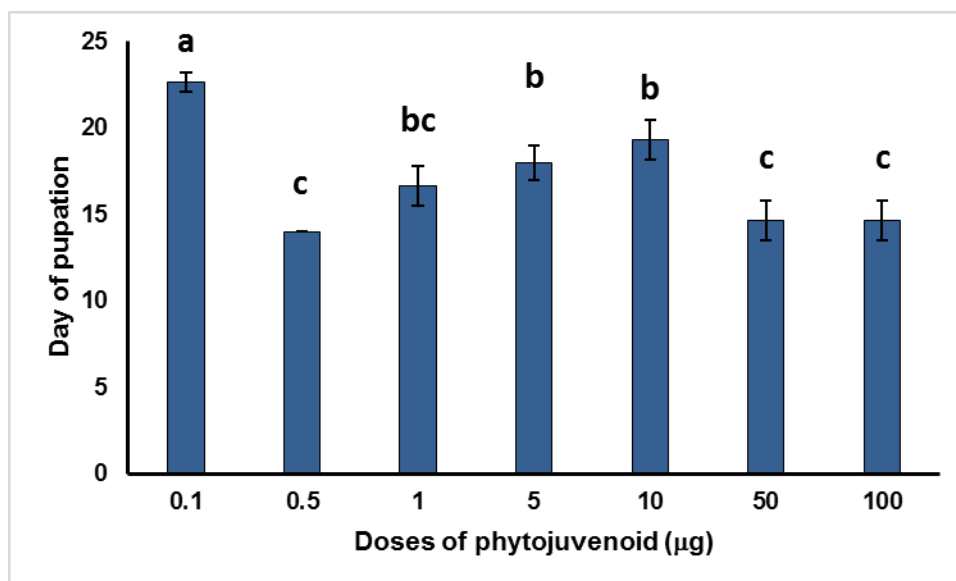
4.1 ผลของ phytojuvenoid ต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอส

เมื่อทำการทดลองให้ phytojuvenoid ปริมาณ 0.1 0.5 1.0 5.0 10.0 50.0 และ 100.0 ไมโครกรัม แก่หนอนเยื่อไผ่ จากนั้นทำการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะดักแด้ พบว่าเมื่อครบ 7 วันหลังการทดสอบ ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงในทุกการทดลอง เมื่อครบ 14 วัน พบดักแด้ในการทดลองที่ให้ phytojuvenoid ปริมาณ 0.1 0.5 5.0 50.0 และ 100.0 ไมโครกรัม คิดเป็น 4.44 1.11 3.33 และ 6.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อครบ 22 วัน พบดักแด้ในทุกการทดลองที่ให้ phytojuvenoid คิดเป็น 1.11 18.89 8.89 10.00 7.78 28.89 และ 24.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อครบ 30 วัน พบดักแด้ในทุกการทดลองที่ให้ phytojuvenoid คิดเป็น 12.22 55.56 45.56 71.11 20.00 52.22 และ 34.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อครบ 38 วัน พบดักแด้ในทุกการทดลองที่ให้ phytojuvenoid โดยคิดเป็น 17.78 67.81 67.78 94.44 33.33 62.22 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อครบ 45 วัน พบการเข้าดักแด้ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ในการทดลองที่ให้ phytojuvenoid ปริมาณ 0.5 1.0 และ 5.0 ไมโครกรัม ส่วนปริมาณ 0.1 10.0 50.0 และ 100.0 ไมโครกรัม พบการเข้าดักแด้คิดเป็น 33.34 38.89 77.78 และ 77.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองชุดควบคุม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ ดังแสดงในภาพที่ 9

เมื่อศึกษาถึงผลของปริมาณของ phytojuvenoid ต่อค่าเฉลี่ยของจำนวนวันที่หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ พบว่า phytojuvenoid ที่ปริมาณ 0.1 0.5 1.0 5.0 10.0 50.0 และ 100.0 ไมโครกรัม สามารถชักนำให้ตัวหนอนเปลี่ยนแปลงของเข้าสู่ระยะดักแด้ภายในระยะเวลาเฉลี่ย 22.27 ± 0.58 14.00 ± 0.00 16.67 ± 0.15 18.00 ± 1.10 19.33 ± 1.15 14.67 ± 1.15 และ 14.67 ± 1.15 ตามลำดับ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ผลของ phytojuvenoid ที่ปริมาณต่างๆ (Doses of phytojuvenoid, µg) ที่ตัวหนอนในระยะไคอะพอสได้รับต่อเปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้ (Percent pupation) ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 7 14 22 30 38 และ 45 วัน (Days after phytojuvenoid treatment)



ภาพที่ 10 ผลของ phytojuvenoid ที่ปริมาณต่างๆ (Doses of phytojuvenoid, μg) ที่ตัวหนอนในระยะ ไดอะพอสได้รับต่อจำนวนวันที่ตัวหนอนเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะดักแด้ (Day of pupation)

4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OfKr-h1*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OfKr-h1* ประกอบไปด้วย 1,050 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลรหัสออกมาเป็น โปรตีนที่มีความยาว 350 กรดอะมิโน (ภาพที่ 11) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *OfKr-h1* ไปเทียบกับ *Kr-h1* ของแมลงชนิดอื่นๆ ในลำดับ Lepidoptera พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) กับ *AtKr-h1* (85.8%) มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ *HaKr-h1* (84.8%) *BmKr-h1* (82.5%) และ *PxKr-h1* (80.6%) ตามลำดับ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ *OfKr-h1* ประกอบด้วยส่วนที่เป็น C_2H_2 -type zinc-fingers ทั้งหมด 8 ตำแหน่งโดยทุกตำแหน่งมีความเหมือนกันที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับภายในแมลงในอันดับ Lepidoptera อีกสามชนิด (ภาพที่ 12) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Kr-h1* ได้อยู่ในฐานข้อมูลของธนาคาร ยีน (GenBank) ที่มี accession number คือ KY400007

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ homology ของลำดับกรดอะมิโนของ *OfKr-h1* เมื่อเปรียบเทียบกับ *Kr-h1* ของ แมลงชนิดอื่นๆ ในอันดับ Lepidoptera

Species	Identity (%)	Similarity (%)
<i>Amyelois transitella (AtKr-h1)</i>	85.8	90.1
<i>Helicoverpa armigera (HaKr-h1)</i>	84.8	88.0
<i>Bombyx mori (BmKr-h1)</i>	82.5	86.2
<i>Papilio xuthus (PxKr-h1)</i>	80.6	84.4

4.3 การแสดงออกของยีน *OfKr-h-1* ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OfKr-h-1* ในอวัยวะต่างๆของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอส เพื่อที่จะเลือกอวัยวะที่มีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดเป็นตัวแทนของระดับการแสดงออกของยีนนี้ในหนอนเยื่อไผ่ โดยเลือกเก็บตัวอย่างอวัยวะของหนอนเยื่อไผ่ ได้แก่ สมอง (brain, Br) ปมประสาทใต้หลอดอาหาร (sub-esophageal ganglion, Sg) ปมประสาทส่วนอก (thoracic ganglion, Tg) ปมประสาทส่วนท้อง (abdominal ganglion, Ag) เนื้อเยื่อไขมัน (fat body, Fb) และท่อมัลพิเกียน (malpighian tubule, Mt) ซึ่งพบระดับการแสดงออกของ *OfKr-h-1* mRNA สูงที่สุดในเนื้อเยื่อสมอง และพบการแสดงออกในระดับต่ำในปมประสาทใต้หลอดอาหาร ปมประสาทส่วนอก ปมประสาทส่วนท้อง เนื้อเยื่อไขมันและท่อมัลพิเกียน (ภาพที่ 13) จากการทดลองนี้จึงเลือกเนื้อเยื่อสมองเป็นตัวแทนของระดับการแสดงออกของยีนนี้ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

โดยในระหว่างการเจริญแมลงหนอนเยื่อไผ่ พบระดับการแสดงออกของ *OfKr-h-1* mRNA สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$) ในเดือนกันยายน (ระยะไคอะพอสตอนต้น) จากนั้นระดับการแสดงออกจะลดลงในเดือนตุลาคม-มีนาคม (ระยะไคอะพอส) หลังจากนั้นระดับ *OfKr-h-1* mRNA จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะดักแด้ (ภาพที่ 14)

4.4 ผลของ JHA (methoprene) และ phytojuvenoid ต่อการแสดงออกของยีน *OfKr-h-1* ของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอสในสถานะ *in vivo*

ในการทดลองให้ methoprene 0.5 μg แก่หนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอส และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองทุกๆ 3 วัน คือวันที่ 3, 6, และ 9 จนกระทั่งตัวหนอนหยุดการเคลื่อนไหวและลอกคราบเป็นดักแด้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่หยดอะซิโตน 5 ไมโครลิตร แล้วนำมาศึกษาระดับการแสดงออกของ *OfKr-h-1* mRNA พบว่าระดับ ของ *OfKr-h-1* mRNA จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่เริ่มให้ฮอร์โมน จากนั้นการแสดงออกค่อยๆ เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 ถึง 9 แล้วเพิ่มจนถึงระดับสูงที่สุดในระยะดักแด้ (ภาพที่ 15 ก)

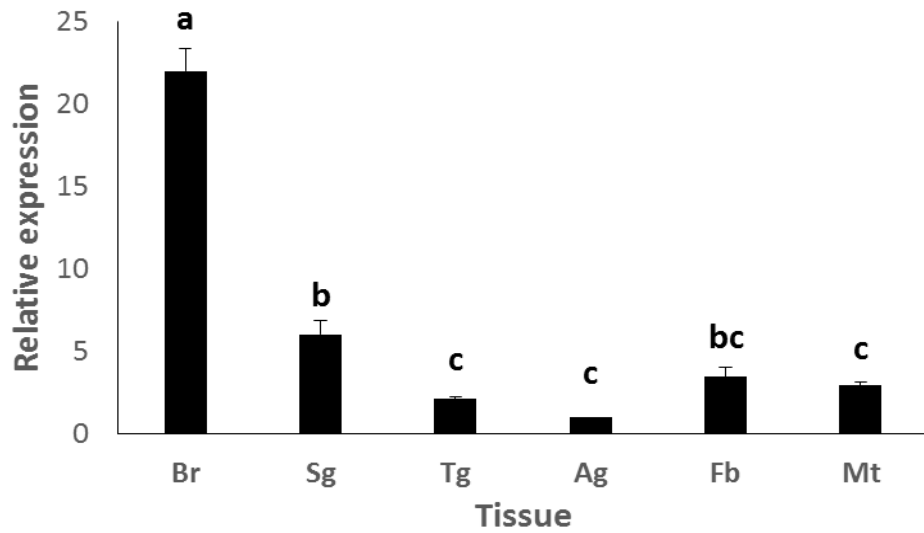
ในการทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของ phytojuvenoid ต่อการแสดงออกของยีน *OfKr-h-1* โดยหยด phytojuvenoid บนด้านหลังของตัวหนอน ปริมาณ 0.5 μg แก่หนอนเยื่อไผ่ในระยะไคอะพอส โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองทุกๆ 3 วัน คือวันที่ 3, 6, 9 และ 12 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่หยดอะซิโตน 5 ไมโครลิตร ซึ่งผลการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *OfKr-h-1* ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่เริ่มให้ฮอร์โมน จนถึงวันที่ 12 จากนั้นการแสดงออกจะเพิ่มสูงขึ้นถึงระดับสูงที่สุดในระยะดักแด้ (ภาพที่ 15 ข)

CCGTCGCTTGAGCGAGCGTTTGTGTTTGTGTTAATCCGGCTTCTGTGCGCAA																		-120
CCTACAACATCATCGCCATTACACCTATTGACTTCTACCGAGAAAAGTGATCAATCACTGTGCATCACGCAAC																		-71
ATG	ATA	GGT	GAA	GAT	GAG	CGC	AAC	CAT	CAA	TGC	GGG	GAG	TGC	GGT	CTG	ACA	CTT	54
M	I	G	E	D	E	R	N	H	Q	C	G	E	C	G	L	T	L	18
ACC	ACG	CGA	AGT	GCA	CTA	ACG	GCT	CAC	GCG	CGT	TCA	CAT	GAT	AAA	ACT	TTT	GCC	108
T	T	R	S	A	L	T	A	H	A	R	S	H	R	V	A	A	D	36
GTG	CCA	GCG	CGG	CTC	CGA	GTT	GCT	GCA	GAT	GCT	CAT	CGT	TGC	GAC	GTC	TGC	GTG	162
A	H	R	C	D	V	C	D	K	T	F	A	V	P	A	R	L	V	54
CGT	CAT	TAC	AGG	ACC	CAT	ACT	GGA	GAA	CGA	CCC	TTC	GAA	TGC	GAA	TAT	TGC	CAC	216
R	H	Y	R	T	H	T	G	E	R	P	F	E	C	E	Y	C	H	72
AAG	ATG	TTC	AGT	GTC	AAA	GAA	AAT	TTA	CAG	GTG	CAT	CGC	CGC	ATA	CAC	ACC	AAA	270
K	M	F	S	V	K	E	N	L	Q	V	H	R	R	I	H	T	K	90
GAA	AGA	CCT	TAT	CGT	TGC	AAT	GTA	TGC	AAT	GCT	GCA	TTT	GAG	CAC	TCT	GGT	AAA	324
E	R	P	Y	R	C	N	V	C	N	A	A	F	E	H	S	G	K	108
CTG	CAT	CGG	CAT	GCA	CGA	ATC	CAT	ACT	GGA	GAA	AGA	CCT	CAT	GCG	TGT	CCT	CAT	378
L	H	R	H	A	R	I	H	T	G	E	R	P	H	A	C	P	H	126
TGT	CAC	AAA	ACT	TTT	ATT	CAG	TCT	GGT	CAA	CTA	GTG	ATA	CAT	CTC	AGA	ACA	CAC	432
C	H	K	T	F	I	Q	S	G	Q	L	V	I	H	L	R	T	H	144
ACA	GGC	GAA	AAA	CCA	TAT	CGT	TGT	CCT	GCA	CCG	GGT	TGC	GGT	AAG	GGT	TTT	ACT	486
T	G	E	K	P	Y	R	C	P	A	P	G	C	G	K	G	F	T	162
TGT	TCC	AAA	CAA	TTA	AAG	GTT	CAC	TCT	CGC	ACT	CAT	ACC	GGA	GAA	AGG	CCG	TAC	540
C	S	K	Q	L	K	V	H	S	R	T	H	T	G	E	R	P	Y	180
ACC	TGT	GAC	ATA	TGT	CTA	CGT	GAT	TTT	GGA	TAC	AAT	CAT	GTT	CTA	AAA	CTA	CAT	594
T	C	D	I	C	L	R	D	F	G	Y	N	H	V	L	K	L	H	198
CGT	TTT	CAA	CAT	TAC	GGC	GAA	CGC	TGT	TAT	CGC	TGT	ACT	GTG	TGT	GAT	GGA	ACA	648
R	F	Q	H	Y	G	E	R	C	Y	R	C	T	V	C	D	G	T	216
TTT	AAC	ACT	AAA	AAG	CAA	ATG	GAA	GCT	CAT	ATA	TAC	AAG	GAA	CAT	GGA	GCT	GAA	702
F	N	T	K	K	Q	M	E	A	H	I	Y	K	E	H	G	A	E	234
ACA	CCT	CGC	ATA	GCA	TCT	GTA	CAA	TCT	GCG	GTA	CCT	ATA	CCA	GTG	GGA	GAA	AAT	756
T	P	R	I	A	S	V	Q	S	A	V	P	I	P	V	G	E	N	252
GGA	AAT	GTT	ATG	TGT	GAC	TTA	GTG	GAA	GCA	GCA	TTG	CAA	CAG	TTG	CCT	CCA	ACG	810
G	N	V	M	C	D	L	V	E	A	A	L	Q	Q	L	P	P	T	270
CCA	CCA	AGC	TCT	CCT	CCA	TCG	CCC	CCT	TGC	CCG	GCT	CCA	CAG	ACT	GCT	TCT	AAA	864
P	P	S	S	P	P	S	P	P	C	P	A	P	Q	T	A	S	K	288
GTA	GTG	CCG	TCG	ACT	CCA	CCT	CTT	TCA	ACC	TCT	CCA	TCT	CCC	ACA	GTG	TCG	AGT	918
V	V	P	S	T	P	P	L	S	T	S	P	S	P	T	V	S	S	306
CTA	CAA	TAT	ATA	TTG	GCA	CCT	TCA	TCA	CTT	CCA	CCG	CGC	AAA	CGT	AAA	CTT	ACC	972
L	Q	Y	I	L	A	P	S	S	L	P	P	R	K	R	K	L	T	324
CCG	CAA	CCA	GAA	ACT	AGC	AAT	GTT	GTC	GTA	CGC	CAC	ACA	TCG	GTT	ATT	CAA	TTC	1026
P	Q	P	E	T	S	N	V	V	V	R	H	T	S	V	I	Q	F	342
GCC	CCA	GCG	GCA	GCT	GAC	GTA	GTG	TAG	AGCGTTATTAGTGTTATATTATTAAAGGTTTTGCC									1088
A	P	A	A	A	D	V	V											350
ATAGCTTTGTTCTATGTAAGGAATATGCTATTTTAGTTCTGATCCAGTTTCTGTGAGGTGATTATGGATTC																		1159
TAGCTTAAAGATGTAGATGTAGTGAATATGATACCTATGTAGTTTAAAGAATTGAGTAAAGACTAAATAT																		1230
ATTAAGCTGTCTAAATGCGTTTGTGCTGTGCATCGATGTAAGTTTACATTTATGTTTCCTATCCATCTATT																		1301
TTAATTAATGATGTACAAATTACATAAATACAAACGTTTAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA																		1370

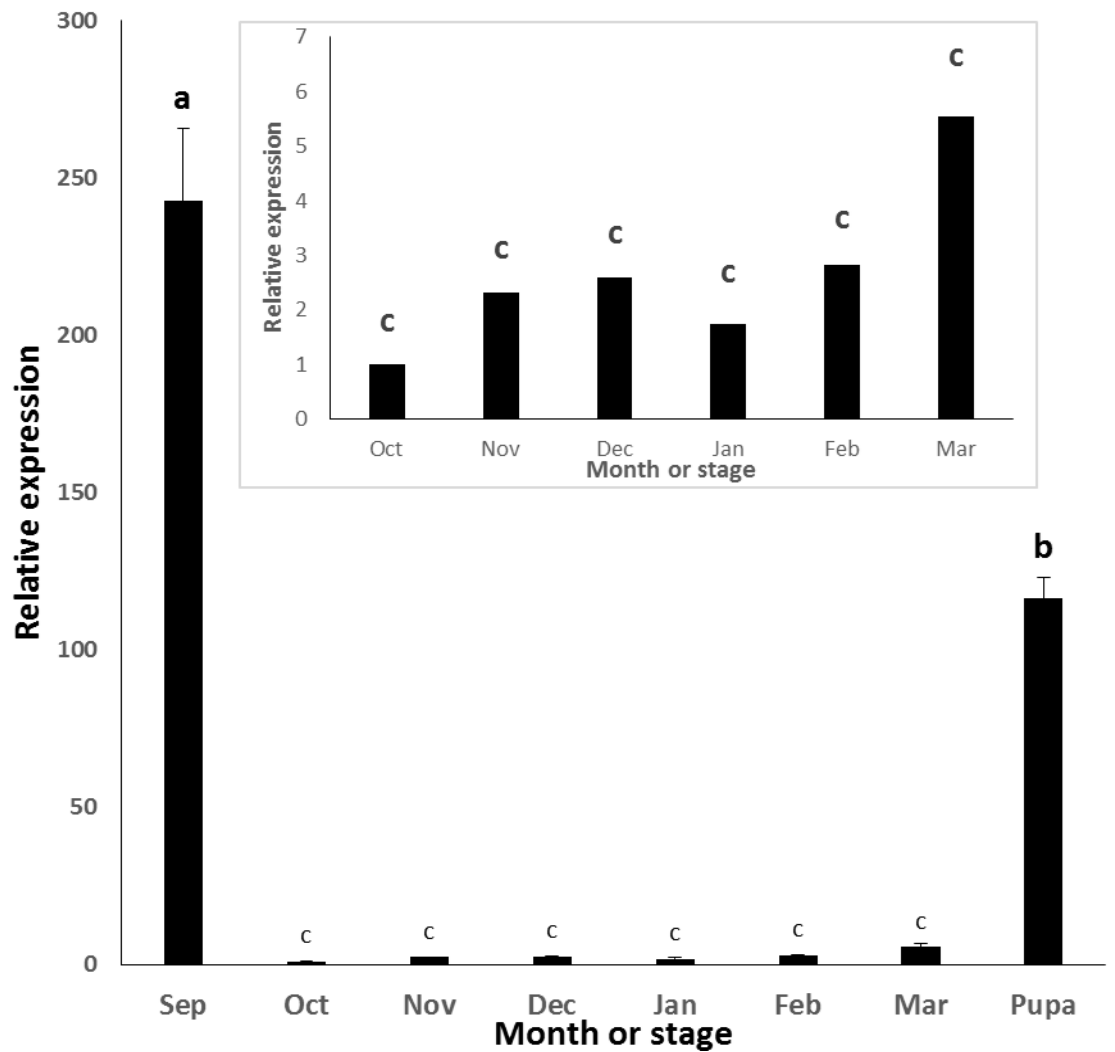
ภาพที่ 11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของ OfKr-h1; ลูกศรแสดงตำแหน่ง และทิศทางที่ใช้ในการออกแบบ degenerated primers, (*) แสดงตำแหน่ง stop codon (GenBank accession number: KY400007)

	Zn1	Zn2			
PxKr_h1	MIGEDERMHQCGECGLTLSTRSALT	AHARSHRVAADAHRC	VDVCHKTF	FAVPARLVRHYRTH	60
OfKr_h1	MIGEDERNHQCGECGLTLTSTRSALT	AHARSHRVAADAHRC	VDVCDKTF	FAVPARLVRHYRTH	60
AtKr_h1	MIGEEERVHQCGECGLTLSTRSALT	AHARSHRVSADAHRC	VDVCHKTF	FAVPARLVRHYRTH	60
BmKr_h1	MIGDEERVHQCGECGLTLSTRSALT	AHARSHRSTADAHRC	VDVCHKTF	FAVPARLVRHYRTH	60
	.:** **:***** :*****.*****				
	Zn3	Zn4			
PxKr_h1	TGERPFCEYCHKMFSVKENLQVHRR	IHTKERPYRCSVCGAAFEHSGKLHRHARIHTGER	120		
OfKr_h1	TGERPFCEYCHKMFSVKENLQVHRR	IHTKERPYRCNVCNAAFEHSGKLHRHARIHTGER	120		
AtKr_h1	TGERPFCEYCHKMFSVKENLQVHRR	IHTKERPYRCNVCDAAFEHSGKLHRHARIHTGER	120		
BmKr_h1	TGERPFCEYCHKMFSVKENLQVHRR	IHTKERPYRCNVCDAAFEHSGKLHRHARIHTGER	120		
	*****.**,*****				
	Zn5	Zn6			
PxKr_h1	PHACQHC	KTFIQSGQLVIHMR	THTGEKPYRCPAPGCGKGFTCSKQLKVHSRTH	TGERPY	180
OfKr_h1	PHACPHCH	KTFIQSGQLVIHLR	THTGEKPYRCPAPGCGKGFTCSKQLKVHSRTH	TGERPY	180
AtKr_h1	PHACPHCD	KTFIQSGQLVIHLR	THTGEKPYRCPAPGCGKGFTCSKQLKVHSRTH	TGERPY	180
BmKr_h1	PHACPHCH	KTFIQSGQLVIHLR	THTGEKPYRCPAPGCGKGFTCSKQLKVHSRTH	TGERPY	180
	**** **,*****:*****				
	Zn7	Zn8			
PxKr_h1	TCDICLRDFGYNHVLK	LHRFQHYGERCYR	CTVCDGTFNTKKQMEAH	IYKEHGAETPRAAA	240
OfKr_h1	TCDICLRDFGYNHVLK	LHRFQHYGERCYR	CTVCDGTFNTKKQMEAH	IYKEHGAETPRIAS	240
AtKr_h1	TCDICLRDFGYNHVLK	LHRFQHYGERCYR	CTVCDGTFNTKKQMEAH	IYKEHGAETPRTQT	240
BmKr_h1	TCEICLRDFGYNHVLK	LHRFQHFGERCYR	CTVCDGTFNTKKQMEAH	IYKEHGAEPRTAP	240
	.:***:*****:*****:***				
PxKr_h1	ALSTVP--VASNGNPMCDLVK	VALQQMPPTPPSSPPSP	PCTITAVPAAASPALIPAADPA	298	
OfKr_h1	VQSAVPIPVGENGNVMCDLVEAALQQLPPTPPSSPPSP	PCPAPQ	TASKVVPSTP-----	294	
AtKr_h1	LQSSVPL--VVNGNVMCDLVEAALQQLPPTPPSSPPSP	QCQSTEVVPVAPSSS-----	291		
BmKr_h1	LQSTTPM--AADGKVMCDLVEAALQQLPPTPPSSPPSP	RCPSISVASMMPSSTQ-----	292		
	*:. * :*: *****:*****:***** *				
PxKr_h1	PAPLITPI	PASTPSPSPPTTNLQFTLAPSSLPPRKR	KLI	PYHDSLSASATVSVPAVRH	358
OfKr_h1	-----PLSTSP	SPTVSSLQYILAPSSLPPRKR	KLTPQ	PET-----S-NVVVRH	336
AtKr_h1	-----LSHVPL	PSQVTPLQYTTVHSTLPPRKR	KFI	PQPEP-----APVPVVRH	334
BmKr_h1	-----VNDTPT	SLAAVPVHYISLPSDLPPRKR	KFI	PINE-----EITPAVRH	335
	. ::: * *****: * : ,***				
PxKr_h1	TSVIQFAPPAAGLS	373			
OfKr_h1	TSVIQFAPAAADV-	350			
AtKr_h1	TSVIQFAPAVVDAS-	348			
BmKr_h1	TSVIQFAPPATES--	348			

ภาพที่ 12 แสดง alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ OfKr-h1 เทียบกับแมลงชนิดอื่นๆ ในอันดับ Lepidoptera; โดยสัญลักษณ์ (*) แสดง identity, (:) และ (.) แสดง similarity และ (__) แสดงตำแหน่งของ zinc-finger motif ทั้ง 8 ตำแหน่ง (Zn1-Zn8)

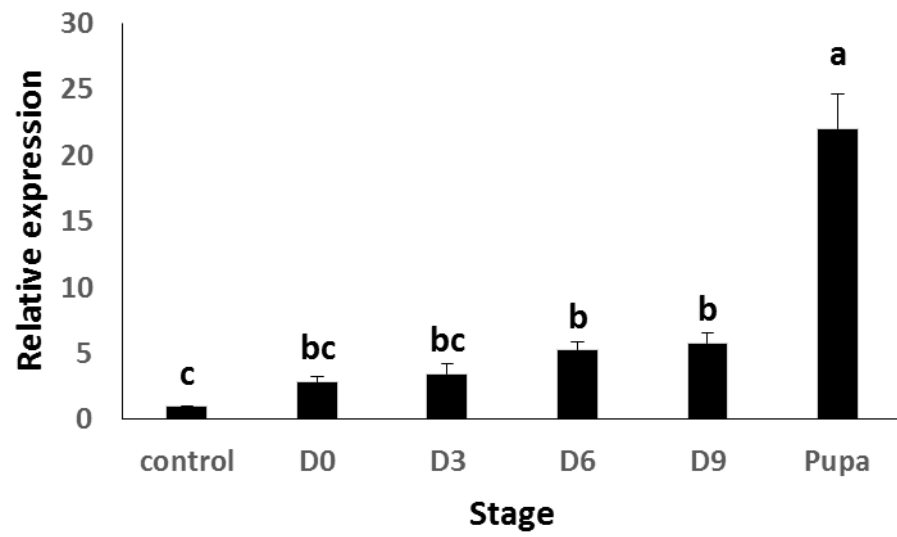


ภาพที่ 13 การแสดงออก (relative expression) ของ *OfKr-h1* mRNA ในอวัยวะต่างๆ ของหนอนเชื้อไฟใน ระยะไดอะพอส

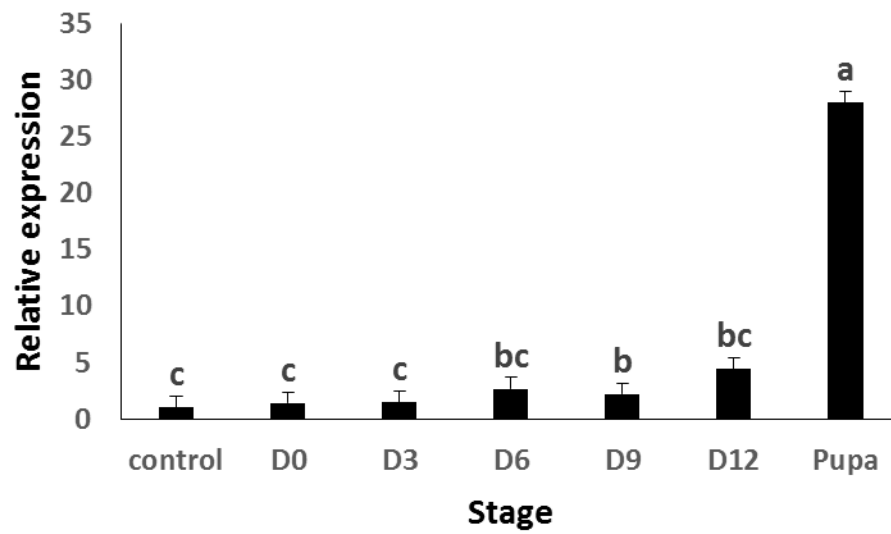


ภาพที่ 14 การแสดงออก (relative expression) ของ *OfKr-h1* mRNA ในสมองของหนอนเชื้อไฟรายเดือน และระยะดักแด้

(ก)



(ข)



ภาพที่ 15 การแสดงออก (relative expression) ของ *OfKr-h1* mRNA ในสมองของหนอนเยื่อไผ่ในระยะโตอะพอสหลังจากได้รับ methoprene (ก) และ phytojuvenoid (ข) ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อตัว

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 ผลของ phytojuvenoid ต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไต่อะพอส

จากการทดลองให้ฮอร์โมน phytojuvenoid ในปริมาณ 0.1 0.5 1.0 5.0 10.0 50.0 และ 100.0 ไมโครกรัม แก่หนอนเยื่อไผ่ในระยะไต่อะพอส พบว่าทุกการทดลอง มีผลในการเหนี่ยวนำให้ตัวหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ แสดงให้เห็นว่า phytojuvenoid จากผลการกรองสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นสารควบคุมแมลงศัตรูชนิดอื่นได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khyade *et al.* (2012) ที่ศึกษาผลของสารสกัด phytojuvenoid จากผลการกรองต่อการเจริญของ *B. mori* โดยพบว่าสารสกัดดังกล่าว สามารถไปรบกวนการเจริญของแมลงได้โดย ไปยังยังกระบวนการสร้างและสะสมไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของคิวติเคิลของชั้นผิวหนังของแมลง ทั้งนี้เพื่อให้นักศึกษามีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น ควรนำสารสกัดดังกล่าวไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ การระบุถึงสารออกฤทธิ์ที่จำเพาะเจาะจง และการหาปริมาณของ phytojuvenoid ที่แท้จริง ผ่านเทคนิคขั้นสูงมากยิ่งขึ้น ได้แก่ solid phase extraction (SPE), high performance liquid chromatography (HPLC) และ mass spectrometry (MS) เป็นต้น

5.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Kr-h1*

เพื่อที่จะศึกษาถึงโมเลกุลที่จะนำมาพัฒนาให้เป็นโมเลกุลเป้าหมายในการควบคุมแมลงโดยชีววิธีนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะเฉพาะทางโมเลกุลของโมเลกุลดังกล่าวผ่านการโคลนนิ่ง โดยยีน *OfKr-h1* นั้นโคลนมาจากเนื้อเยื่อสมองของหนอนเยื่อไผ่ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมน methoprene เมื่อศึกษาถึงลำดับของกรดอะมิโน ซึ่งจะเป็นผลผลิตของยีนดังกล่าว พบว่าประกอบด้วย ตำแหน่ง zinc-finger ถึง 8 ตำแหน่ง (Zn1-Zn8) ซึ่งถือว่าเป็นเอกลักษณ์ที่สำคัญของโปรตีนชนิดนี้ในแมลง โดยลำดับกรดอะมิโนที่พบในทั้ง 8 ตำแหน่งนี้มีความเหมือนกันสูงมากเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับโปรตีนชนิดเดียวกันในแมลงในอันดับ Lepidoptera และอื่นๆ ทำให้อนุมานได้ว่า โปรตีน *OfKr-h1* ก็จะทำหน้าที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า *OfKr-h1* จะทำหน้าที่ร่วมกับ JH และโปรตีนตัวส่งสัญญาณอื่นๆ (signaling molecules) ในเซลล์ของในแมลง เช่น methoprene (Met) และ steroid receptor coactivator (SCR) เป็นต้น ในการควบคุมให้แมลงยังคงอยู่ในระยะตัวหนอนในแมลงหลายๆชนิด (Kayukawa *et al.*, 2012) ตลอดจนช่วยควบคุมการเจริญของแมลงให้เป็นปกติ (Beck *et al.*, 2004; Fussnecker and Grozinger, 2008; Minakuchi *et al.*, 2008; Minakuchi *et al.*, 2009)

5.3 การแสดงออกของยีน *OfKr-h1* ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

เนื่องจากสมองมีระดับการแสดงออกของ *OfKr-h1* mRNA สูงที่สุดจากตัวอย่างหนอนเยื่อไผ่ในระยะไต่อะพอส จึงเลือกสมองเป็นตัวแทนของเนื้อเยื่อจากหนอนเยื่อไผ่ในการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนดังกล่าวในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ จากผลการทดลองพบระดับการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* สูงที่สุดในช่วงแรกที่หนอนกำลังเข้าสู่ระยะไต่อะพอส จากนั้นการแสดงออกจะลดลงในระหว่างระยะไต่อะพอส แล้วเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในระยะดักแด้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ระดับการแสดงออกของ *OfKr-h1* mRNA อาจสอดคล้องกับปริมาณของ JH ในแมลงตามการทดลองของ Yin and Chippendale (1989) ที่บอกว่าระดับของ JH ที่สูงในระยะตัวหนอนของแมลงจะเหนี่ยวนำให้แมลงเข้าสู่ระยะไต่อะพอสได้ และการที่ยังคง

ตรวจพบระดับของ JH ในฮีโมลิมป็นั้นจะช่วยรักษาการเกิดไดอะพอสให้คงอยู่ต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Minakuchi *et al.* (2009) โดยแสดงให้เห็นว่า การที่ *Krh-1* ยังคงมีการแสดงออกในระยะตัวหนอนของมอดแป้ง (*T. castaneum*) นั้นจะทำให้ตัวหนอนยังคงความเป็นระยะตัวหนอนต่อไป นอกจากนั้น JH ยังมีบทบาทในการป้องกันไม่ให้แมลงเกิดการเจริญเติบโตเต็มที่ก่อนเวลาอันควรในช่วงก่อนระยะดักแด้ (Riddiford, 2012) จึงเป็นเหตุผลที่พบการแสดงออกของ *OfKrh-1* mRNA ในระยะดักแด้ของหนอนเยื่อไผ่ อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาหน้าที่ของ *Krh-1* ในแมลงระยะตัวเต็มวัยในแมลงชนิดอื่นๆ พบว่า *Krh-1* มีส่วนควบคุมการเจริญของปีก และระบบสืบพันธุ์ผ่าน JH (Zera and Cisper, 2001; Zera *et al.*, 2007; Min-na *et al.*, 2014)

5.4 ผลของ JHA (methoprene) และ phytojuvenoid ต่อการแสดงออกของยีน *OfKrh-1* ของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไดอะพอสในสถานะ *in vivo*

จากงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับกลไกการควบคุมทำงานของ *Krh-1* ในแมลงชนิดอื่นๆ พบว่า *Krh-1* จะถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกโดย JH (Minukuchi *et al.*, 2009; Lozano and Belles, 2001; Minukuchi *et al.*, 2011) โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ทั้ง methoprene และ phytojuvenoid สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *Krh-1* mRNA ได้โดยระดับการแสดงออกจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับฮอร์โมน แล้วสูงที่สุดในระยะดักแด้ ซึ่งจะเห็นได้ว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนจะคล้ายคลึงกับการศึกษาวัฏจักรการแสดงออกของยีนในระหว่างการเจริญก่อนหน้านี้ แตกต่างกันเพียงแค่ว่าเมื่อทดสอบด้วยฮอร์โมนทั้งสองชนิดระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจะสั้นกว่าตัวหนอนในธรรมชาติ ผลการศึกษาในนี้แสดงให้เห็นว่า *krh-1* สามารถถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกได้ เมื่อให้ JH จากภายนอก นอกจากนี้ *Krh-1* ยังทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณต่อไปยัง signaling molecules ตัวอื่นๆ เพื่อที่จะควบคุมการเจริญของแมลงให้เป็นปกติ อย่างไรก็ตาม อาจจะต้องทำการศึกษาผลของฮอร์โมน methoprene และ phytojuvenoid ต่อการแสดงออกของยีน *OfKrh-1* ของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไดอะพอสในสถานะ *in vitro* เพิ่มเติมในอนาคตเพื่อยืนยันผลการทดลองข้างต้น

งานวิจัยครั้งนี้ถือว่าเป็นงานวิจัยขั้นต้น เพื่อที่จะศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการหาแหล่งของสารที่มีฤทธิ์คล้าย JH ในธรรมชาติ โดย phytojuvenoid ที่สกัดได้จากผงการอง แสดงให้เห็นว่าสามารถนำมาศึกษาวิจัย และพัฒนาต่อยอดในการผลิตเป็นสารควบคุมแมลงศัตรู โดยการเข้าไปขัดขวางกระบวนการเจริญของแมลงได้ ผลการวิจัยในครั้งนี้ ไม่เพียงแต่จะทำให้คณะผู้วิจัยเข้าใจถึงบทบาท หน้าที่และการทำงานของ *Krh-1* ร่วมกับ JH ในการควบคุมการเจริญของหนอนเยื่อไผ่แล้ว แต่ยังสามารถบอกได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ *Krh-1* เป็นยีนเป้าหมายในการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (Integrated Pest Management : IPM) ในสภาพแปลงได้ในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

สารสกัด phytojuvenoid จากผลกากรอง สามารถกระตุ้นให้หนอนเยื่อไผ่ในระยะไถอะพอสเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ ซึ่งปริมาณของสารสกัดที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด คือ ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม โดยสามารถชักนำให้ตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ภายในระยะเวลา 14 วัน และสามารถชักนำให้เกิดดักแด้ได้ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ได้ภายในระยะเวลา 44 วันภายหลังจากการทดสอบ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OfKr-h1* ซึ่งพบว่ามีความยาว 1,050 คู่เบส และมีค่าความเหมือนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (% Identity) สูงเมื่อเทียบกับแมลงในอันดับ Lepidoptera ได้แก่ navel orangeworm (*Amyelois transitella*) หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) citrus swallowtail (*Papilio xuthus*) และหนอนไหม (*B. mori*) การตรวจวัดการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* ในหนอนเยื่อไผ่ระยะไถอะพอสระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนมีนาคม ทำให้ทราบว่า *OfKr-h1* มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดในช่วงแรกของระยะไถอะพอส ลดลงในช่วงไถอะพอส และเพิ่มสูงขึ้นในระยะดักแด้ แสดงให้เห็นว่า *OfKr-h1* มีบทบาทสำคัญในการเข้าสู่ระยะไถอะพอส และในระยะดักแด้ของแมลงชนิดนี้

การศึกษาผลของ methoprene และ phytojuvenoid ต่อการชักนำการแสดงออกของยีน *OfKr-h1* แสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนทั้งสองชนิดสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *OfKr-h1* mRNA ได้ในรูปแบบเดียวกัน กล่าวคือ ระดับ *OfKr-h1* mRNA จะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นภายหลังจากให้ฮอร์โมน แล้วเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงที่สุดในระยะดักแด้ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถพัฒนาการใช้ยีน *OfKr-h1* ให้เป็นยีนเป้าหมายในการควบคุมแมลงผ่านการทำงานของ JH ได้

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด phytojuvenoid จากผลกากรอง สามารถกระตุ้นให้หนอนเยื่อไผ่ในระยะไถอะพอสเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะดักแด้ผ่านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *OfKr-h1* mRNA ให้สูงขึ้นได้ในรูปแบบที่คล้ายคลึงกับเมื่อทดสอบด้วย methoprene

เอกสารอ้างอิง

- เดชา วิวัฒน์วิทยา. 2535. ชีววิทยาของหนอนเยื่อไม้ไผ่. Bamboo: Caterpillar. เอกสารเสนอต่อที่ประชุมป่าไม้. กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ.
- ไพฑูรย์ เล็กสวัสดิ์. 2538. ชีวประวัติและศัตรูธรรมชาติของหนอนเยื่อไม้ (*Omphisa* sp., Pyralidae: Lepidoptera). การอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 2 เล่มที่ 1 สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย ฯลฯ. หน้า 96-102.
- วนิดา แซ่จิ่ง. 2539. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญเติบโต และปริมาณสารอาหารที่พบในหนอนเยื่อไม้ (*Omphisa* sp., Pyralidae: Lepidoptera). วิทยาศาสตร์บัณฑิต.
- สมร คลื่นสุวรรณ. 2535. กีฏวิทยา สรีรวิทยาพื้นฐาน. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เสาวภา สนธิไชย. 2536. ชีววิทยาของแมลง เล่มที่ 2. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล. 2552. ไม้มีพิษ. เศรษฐศิลป์ กรุงเทพฯ.
- Ajami, A. M., Riddiford, L.M. 1973. Comparative metabolism of the cecropia juvenile hormone. Journal of Insect Physiology. 19: 635 – 646.
- Beck, Y., Pecasse, F., Richards, G. 2004. Krüppel-homolog is essential for the coordination of regulatory gene hierarchies in early *Drosophila* development. Developmental Biology. 268(1): 64-75.
- Bowers, W.S., Ohta, T., Cleere, J.S., Marsella, P.A. 1976. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. Science. 193(4253): 542-547.
- Butenand, A., Karlson. 1954. Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormones der Insekten in kristalliner Form. Zoo Naturforsch. 9b: 389-391.
- Chaitanya, R.K., Sridevi, P., Senthilkumaran, B., Dutta Gupta, A. 2012. Effect of juvenile hormone analog, methoprene on H-fibroin regulation during the last instar larval development of *Corcyra cephalonica*. General and Comparative Endocrinology. 181: 10–17.
- Deena, M.J., Thoppil, J. E. 2000. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. Fitoterapia. 71: 453-455.
- Denlinger, D.L. 1985. Hormonal control of diapause. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.). Pergamon Press, Oxford, pp. 353-412.
- Dewick, P.M. 2009. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd.

- Fussnecker, B., Grozinger, C. 2008. Dissecting the role of Kr-h1 brain gene expression in foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Molecular Biology*. 17(5):515-22.
- Ghizalberti, E.L. 2000. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia*. 71: 467-486.
- Gillbert, L.I. 1989. The endocrine control of molting in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, as a model system. In: Koolman J. (Ed.). *Ecdysone*, Stuttgart, Georg Thieme, pp. 488-471.
- Gopakumar, B., Ambika, B., Prabhu, V.K.K. 1977. Juvenmimetic activity in some south Indian plants and their probable cause of this activity in *Morus alba* (L), *Entomon*, 2: 259 – 261.
- Grenier, Grenier. 1983. Fenoxycarb a fairly new growth regulator: a review of its effects on insects, *Annals of Applied Biology*. 122: 369–403.
- Jindra, M., Palli, S.R., Riddiford, L.M. 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual Review of Entomology*. 58:181-204.
- Kayukawa, T., Minakuchi, C., Namiki, T., Togawa, T., Yoshiyama, M., Kamimura, M., Mita, K., Imanishi, S., Kiuchi, M., Ishikawa, Y., Shinoda, T. 2012. Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(29): 11729-11734.
- Khyade, V.B., Patil, S.B., Khyade, S.V., Bhawane, G.P. 2002. Influence of acetone macerates of *Vitis vinifera* on the larval parameters of silk worm, *Bombyx mori* (L), *Indian Journal of Comparative Animal Physiology*. 20: 14-18.
- Khyade, V.B., Shukla, K.K., Sarawade, J.P. 2012. Juvenoid activity of some non mulberry plant extractives through inhibition of chitin deposition in the integument of fifth instar larvae of silkworm, *Bombyx mori* (L) (Race: PM x CSR2). *Research Journal of Recent Science*. 1: 1-6.
- Kopec, S. 1917. Experiments on metamorphosis of insects. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences, Cracovie, Classe des Sciences Mathematiques et Naturelles. Serie B*: 57-60.
- Kruade, N.P., Jeitak, V., Kaul, V.K., Sharma, O.P. 2010. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Lantana camara*, *Ageratum houstonianum* and *Eupatorium adenophorum*. *Pharmaceutical Biology*. 48: 539-544.
- Lozano, J., Belles, X. 2011. Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Scientific reports*. 1: 163.

- Minakuchi, C., Namiki, T., Shinoda, T. 2009. Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology*. 325(2): 341-50.
- Minakuchi, C., Tanaka, M., Miura, K., Tanaka, T. 2011. Developmental profile and hormonal regulation of the transcription factors broad and Krüppel homolog 1 in hemimetabolous thrips. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41(2): 125-134.
- Minakuchi, C., Zhou, X., Riddiford, L. M. 2008. Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*. 125(1-2): 91-105.
- Min-na, J., Jian, X., Yun, Y., Xin-da, L. 2014. Molecular Characterization and Functional Analysis of *Krüppel-homolog 1 (Kr-h1)* in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Journal of Integrative Agriculture*. 13: 1972–1981.
- Mohamed, M.I.E., Abdelgaleil, S.A.M. 2008. Chemical composition and insecticidal potential of essential oils from Egyptian plants against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Applied Entomology and Zoology*. 43:599-607.
- Nishida, R., Bowers, W.S. 1980. *Insect Biology of the future*. Academic Press, Eds., Locke. M., Smith, D.S., p. 621.
- Nishida, R., Bowers, W.S., Evans, P.H. 1983. Juvadecene: Discovery of Juvenile hormone Mimic in the Plant, *Macropiper excelsum*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 1: 17-24.
- Nijhout, H.F. 1994. *Insect Hormones*. Princeton, Princeton University Press.
- Nijhout, H.F. 1999. Control mechanisms of polyphenic development in insects: In polyphenic development, environmental factors alter some aspects of development in an orderly and predictable way. *Bioscience*. 49: 181-192.
- Pecasse, F., Beck, Y., Ruiz, C., Richards, G. 2000. Krüppel-homolog, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology*. 221(1): 53-67.
- Riddiford, L.M. 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction?. *General and Comparative Endocrinology*. 179: 477–484.
- Röller, H., Dahm, K.H., Sweeley, C.C., Trost, B.M. 1967. The Structure of the Juvenile Hormone. *Angewandte Chemie International Edition*. 6:179.
- Saikia, A.K., Sahoo, R.K. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana camara* L. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 8: 599-602.

- Samuel, A.J.S.J., Kalusalingam, A., Chellappan, D.K., Gopinath, R., Radhamani, S., Husain, H.A., Muruganandham, V., Promwichit, P. 2010. Ethnomedical survey of plants used by the orang asli in kampong bawong, Perak, West Malaysia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 6:5.
- Saraf, A., Quereshi, S., Sharma, K., Khan, N.A. 2011. Antimicrobial activity of *Lantana camara* L. *Journal of Experimental Sciences*. 2: 50-54.
- Singtripop, T., Wanichacheewa, S., Tsuzuki, S., Sakurai, S. 1999. Larval growth and diapause in a tropic moth *Omphisa fuscidentalis* Hampson. *Zoological Science*. 16: 725-733.
- Singtripop, T., Wanichacheewa, S., Sakurai, S. 2000. Juvenile hormone mediated termination of larval diapause in *Omphisa fuscidentalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 847-854.
- Singtripop, T., Wanichacheewa, S., Sakurai, S. 2002. Sensivity of juvenile hormone and ecdysteroid in the diapause larvae of *Omphisa fuscidentalis* based on the hemolymph trehalose dynamic index. *Journal of Insect Physiology*. 48: 817-824.
- Slama, K. 1979. Insect Hormones and anti-hormones in plants. Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites (Eds. G.A. Rosenthal and D. H. Janzen; Academic Press, New York, pp. 683-700.
- Slama, K., Williams, C.M. 1966. The Juvenile Hormone. VI. Effects of the "Paper Factor" on the Growth and Metamorphosis of the Bug, *Pyrrhocoris Apteris*. *The Biological Bulletin*. 130(2): 247 – 253.
- Srivastava, R., Upadhyay, V.B. 2013. Influence of Bioactive Phytojuvenoid on the silk producing Potential of Multivoltine Mulberry Silkworm (*Bombyx mori* Linn.). *International Journal of Fauna and Biological Studies*. 1(2): 26-31.
- Williams, C.M. 1956. The juvenile hormone of insects. *Nature*. 178: 212-213.
- Yin, C.M, Chippendale, G.M., 1979. Diapause of the southwestern corn, *Diatraea grandiosella*: further evidence showing juvenile hormone to be the regulator. *Journal of Insect Physiology*. 25: 513-523.
- Zandi-Sohani, N., Hojjati, M., Carbonell-Barrachina, A.A. 2012. BIOACTIVITY OF *Lantana camara* L. ESSENTIAL OIL AGAINST *Callosobruchus maculatus* (FABRICIUS). *Chilean Journal of Agricultural Research*. 72(4): 502-506.
- Zera, A.J., Cisper, G. 2001. Genetic and diurnal variation in the juvenile hormone titer in a wing-polymorphic cricket: Implications for the evolution of life histories and dispersal. *Physiological and Biochemical Zoology*. 74: 293-306.
- Zera, A.J., Zhao, Z., Kaliseck, K. 2007. Hormones in the field: evolutionary endocrinology of juvenile hormone and ecdysteroids in field populations of the wing-dimorphic cricket *Gryllus firmus*. *Physiological and Biochemical Zoology*. 80: 592-606.

Zoubiri, S., Baaliouamer, A. 2011. GC and GC/MS analyses of the Algerian *Lantana camara* leaf essential oil: Effect against *Sitophilus granarius* adults. Journal of Saudi Chemical Society doi:10.1016/j.jscs.2011.01.013.

ภาคผนวก

Manuscript

Effects of phytojuvenoid on development of the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*

Eak-artit Ritdachyeng^{a,*}, Manaporn manaboon^b, xxxxc^c, Stephen S. Tobe^d

^a Division of Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Maejo University, Phrae 54140, Thailand

^b Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^d Department of Cell and Systems Biology, The University of Toronto, Toronto, Ont. M5S 3G5, Canada

* Address correspondence to: Eak-artit Ritdachyeng, Division of Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Maejo University, Phrae 54140, Thailand

Telephone: +66 53 943346; fax: +66 53 892259.

E-mail: eakartit@mju.ac.th or noom.eak@gmail.com

Abstract

Many plants defend themselves against insect herbivory by way of the production of secondary metabolites which interfere with insect physiological functions. These may include compounds which mimic juvenile hormones (JHs) and may interfere with their biosynthesis. In this study, Topical application of phytojuvenoid extracted from *Lantana camera* at dose of 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 and 100.0 µg were evaluated against *Omphisca fuscidentalis* diapausing-larvae. Percent pupation and the day of pupation were recorded. The results showed all dose induced pupation in this insects and were significantly different than those of control group ($P < 0.05$) especially in 0.5 µg of extract showed high efficiency by induced pupation at day 14 after application and reached 100% of pupation within 44 days. We also cloned and sequenced *Omphisca Krüppel-homolog 1* (*OfKr-h1*). The full sequence of *OfKr-h1* is comprised of 1,050 nucleotides in length encoding 305 amino acids. The deduced protein sequence of *OfKr-h1* showed high homology with lepidopteran, *Amyelois transitella* Kr-h1 (85.8%), *Helicoverpa armigera* Kr-h1 (84.8%), *Bombyx mori* Kr-h1 (82.5%) and *Papilio xuthus* Kr-h1 (80.6%). The *OfKr-h1* was expressed mainly in the brain. *OfKr-h1* transcripts in the brain showed the maximum in early diapause, followed by the significant decreased to low level when the larvae entered diapause in October. Expression then remained low until March, after which expression dramatically increased in the pupal stage. Both juvenile hormone analog (JHA), methoprene, phytojuvenoid exhibited a similar stimulatory pattern in *OfKr-h1* expression of diapausing larvae. *OfKr-h1* mRNA levels gradually increased after hormone application and showed a peak of gene expression in the pupal stage. These preliminary study may help us to provide the possibility for searching new chemical means in natural product e.g. phytojuvenoid extracted from *L. camera* to control insects by interrupting its development. Therefore, this work will not only deepen our understanding of the functions

of *OfKr-h1* in the JH-signaling pathway in the molecular level, but also make it possible to use *OfKr-h1* as a new target gene for integrated pest management in the field.

Keywords: bamboo borer, phytojuvenoid, *Kr-h1*, *L. camera*

1. Introduction

Juvenile hormones (JHs) in most insect species are a family of acyclic sesquiterpenoid molecules synthesized via the mevalonate pathway in the corpora allata (CA), a small pair of glands located posterior to the brain (Dewick, 2009). JH regulates a number of physiological processes in insect development for example; behavior, caste determination, diapause and various polyphenisms. In larval stages, JH regulates metamorphosis to the adult stage by way of specific gene up regulation and down regulation (Riddiford, 1994; Truman and Riddiford, 1999; Gilbert et al., 2000). In adults, JH is prerequisite for reproduction (Wyatt and Davey, 1996). However, how JH is able to regulate metamorphosis is poorly understood and the existence of a JH receptor and other relevant proteins remain uncertain.

Many plants defend themselves against insect herbivory by way of the production of secondary metabolites which interfere with insect physiological functions (Chitanya et al., 2012). These may include compounds which mimic JHs or interfere with their biosynthesis. Application of phytojuvenoid extract with proper solvent exhibited massive changes of metabolites including proteins, lipids, carbohydrates, amino acid, fatty acid and chitin (Gopakumar et al., 1977; Slama, 1979; Ajami and Riddiford, 1973; Grenir and Grenir, 1983; Khyade et al., 2002).

Lantana camera L. (Verbrnaceae) is a common widespread weed pest found in subtropical and tropical crops (Ivens et al., 1978) and it is very popular as ornamental plant (Ghizalberti, 2000). Khyade et al. (2011) demonstrated that the extract of dried stem bark from *L. camera* had a plant derived insect juvenoid activity by interrupting metamorphosis via some of biochemical reactions including reduce in chitin deposition in the larval body wall of silkworm, *Bombyx mori*. Chemical composition, antimicrobial, antifungal properties of *L. camera* have been studied in previous researches Deena and Thoppil, 2000; Kruade et

al., 2010; Saraf et al., 2011; Sakai and Sahoo, 2011). High amount of some sesquiterpenes, mainly humelene and cis-caryophyllene were detected from essential oil extract by using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (Zandi-Sohani et al., 2012). Moreover, Insecticidal and repellent activities of *L. camera* have also been reported on many stored-product insects (Zandi-Sohani et al., 2012, Mohamed and abdelgaleil, 2008, Zoubiri and Baaliouamer, 2011). A possible use of this plant as a pesticide would open out the avenue for their exploitation as agents of integrated pest management.

The bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis* Hampson, is a moth belonging to the family Pyralidae which is found in northern Thailand, Laos and Myanmar. The fifth instar larvae enter diapause and remain inside the internode of bamboo culm for 9 months from September until the following June (Singtripop et al., 1999). During the long larval diapause in *O. fuscidentalis*, the hemolymph ecdysteroid concentration is low (Singtripop et al., 1999). Application of the juvenile hormone analog (JHA), methoprene, to larval diapause larvae induces pupation and an increase in ecdysteroid titer (Singtripop et al., 2000). These results indicated that the JHA might be involved in the termination of larval diapause of *O. fuscidentalis*. Recently, Knowledge of using natural product with JH activity as an insect growth regulators (IGRs) became more applicable as the new alternative pest control in the further development of such agents since they possess low side-target toxicity and minimal environmental danger, in contrast to some synthetic pesticide and have been used to control pest for decades. There have been many reports suggest that JHAs disrupt insect endocrine regulation, causing abnormal development and larval mortality (Slama and William, 1965). Furthermore, the knowing the structure and function of these is important for understanding JH mode of action at the molecular level. Theoretically, JHAs especially from plant extract could be used as a powerful alternative IGRs in the future. However, the effects of some

plant-derived juvenile hormone analog on the development of the bamboo borer have not been studied.

Juvenile hormone and ecdysone (molting hormone) play essential signaling roles during insect growth and metamorphosis (Liu et al., 2008; Jindra et al, 2013) including normal reproductive development in the adult insects (Jindra et al, 2013). JH modulates or suppresses the ecdysone signal during insect development and metamorphosis. In the cricket *Gryllus firmus*, JH is the key factor in the development of wing dimorphism. JH mimics such as methoprene and pyriproxyfen have been used to control insect pests for decades, but the molecular mechanism of the JH signaling pathway is not well understood.

Recently, it has been demonstrated that the gene *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*), a transcription factor containing eight C₂H₂- type zinc finger (DNA binding motif) is a key player in JH signaling pathway. *Kr-h1* was originally identified in *Drosophila melanogaster* as a JH early-inducible gene. It is required for insect development and metamorphosis as well as for maintaining normal physiological function during the adult stage. In the past decade, *Kr-h1* has been extensively studied in the range of holometabolous and hemimetabolous insects. *Kr-h1* is clearly a key element of the JH signaling pathway and may therefore present a promising target for chemical disruption of JH signaling for insect pest management.

In this research, we propose to examine the effects of phytojuvenoid extracted from *L. camera* on the development of *O. fuscidentalis*. In addition, *OfKr-h1* will be cloned and characterized by rapid amplification of cDNA ends (RACE) and reverse transcription PCR (RT-PCR). The spatial and temporal mRNA expression profile were examined by real-time quantitative PCR. Thereafter, the effects of juvenile hormone analogs on *OfKr-h1* mRNA expression in *in vivo* experiments also will be investigated in the molecular level.

2. Materials and methods

2.1 Animals

O. fuscidentalis were obtained from bamboo forests in Amphur Maewang, Chiang Mai Province, Thailand. Diapausing larvae were collected from September to March, and pupae were collected in June. Larvae were kept in containers (12x14x8 cm) lined with sheets of wet paper towel. The containers were maintained at 25 °C in continuous dark (Singtripop et al., 1999).

2.2 Extraction of phytojuvenoid from *Lantana camera*

Plants were collected and washed thoroughly with distilled water and then dried in incubator at 37 °C. The dried materials were powdered using mechanical electric mixture. Known quantity of each plant powder was subjected to extraction separately by soxlet apparatus with acetone for 20-40 hour. After extraction, each extracts were evaporated to dryness. Known quantity of plant extract was dissolved in acetone to desire concentrations for further experiments, a 1 µL of solution was used to treat diapausing larvae by topical application method.

2.3 Hormonal treatments

JHA (S-methoprene, >95% stereochemically pure; SDS Bio-tech, Tokyo) was dissolved in acetone (final concentration 5 mg/ml) and stored at -35°C as a stock solution. The stock solution was diluted to 0.5 µg/5µl with acetone, and a 5µl aliquot was applied to the dorsal abdomen of individual diapausing larvae using a 50 µl microsyringe. Individuals in the control were treated with 5 µl acetone. After JHA treatment, larvae (designated as G0) become motionless, then their epidermis turned brown and formed a hard, pigmented cuticle. Phytojuvenoid extract was dissolved in acetone to final concentration 1.0 g/mL and kept at

-35°C as a stock solution. The stock was diluted with acetone, and diapausing larvae were treated by topical application method according to Singtripop *et al.* (2000).

2.3 RNA isolation and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from larval brain using RiboZol™ RNA Extraction reagent (Amresco, Solon, OH) following to the manufacturer's instructions. Prior to cDNA synthesis, the RNA was treated with RNase-free DNaseI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). 0.5 µg of total RNA was used to generate first-strand cDNA by an oligo-dT primer and M-MuLV-Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Degenerated primers were designed base on conserved regions found in Kr-h1 of other lepidopteran species (*Bombyx mori* Kr-h1, GenBank accession no. NM_001177861.1; *Helicoverpa armigera* Kr-h1 KJ825896; *Agrotis ipsilon* Kr-h1 AEL97587.1; *Papilio xuthus* Kr-h1 XP_013168278.1). Conservation was estimated from sequence alignments using Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The first round of PCR was performed using the following degenerate primers: OfKr-h1F: 5'-ACN ACN CGN AGY GCN CTN AC-3' and OfKr-h1R: 5'-RTG NAG YTT NCC RGA RTG YT-3'. The thermal cycling condition were as follows: 1 cycle for 5 min at 94°C, follow by 30 s at 94°C, 30 s at 56°C and 40 s at 72°C for 40 cycles, and then a final extension step for 2 min at 72°C.

2.4 Rapid amplification of cDNA ends (5' and 3' RACE)

To obtain a full-length cDNA, 3' and 5' RACE were conducted using a SMART™ RACE cDNA amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA) according to manufacturer's manual instruction. For the 5' region, a nested universal primer (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3') and a gene-specific primer (5'- TAT GTC ACA GGT GTA CGG CCT-3') were used for PCR under the following conditions: an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 38 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 40 s, and a final

extension at 72°C for 5 min. A nested PCR was performed under the same conditions using the first PCR product as template, the same nested universal primer and another gene-specific primer, 5'-ACC AGA GTG CTC AAA TGC AGC-3'. The 3' region was amplified using gene specific primer (5'-TGT TAT CGC TGT ACT GTG TGT GAT-3') and the same nested universal primer. The 3'RACE PCR was performed with the same conditions as described above.

2.5 Cloning

The PCR products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel, and the cDNA fragments of interest were purified using a GEL/PCR Purification Mini Kit (Favor-gen Biotech, Taiwan). Purified DNA fragments were ligated into pGEM[®]-T Easy vector (Promega, Madison, WI) and transformed into *Escherichia coli* DH5 α competent cells, and plasmid DNA was extracted and purified using a GeneJET[™] Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). DNA sequencing was performed by an ABI PRISM[®] Bigdye[®] Terminator (version 3.1) cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA) and an automated DNA sequencer (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer; Applied Biosystems). The cDNA sequences of Kr-h1 were submitted to search against the GenBank database by using FASTA.

2.6 Sequence analysis

The deduced amino acid sequence *OfJHBP* was translated using ExPASy translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>). PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) was used to predict the putative zinc finger region. A multiple sequence alignment of *OfKr-h1* and other lepidopteran *Kr-h1s* was constructed using Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.7 Quantitative real-time PCR (Q-RT-PCR)

Total RNA was isolated from the fat bodies using RiboZol™ RNA Extraction reagent (Amresco, Solon, OH) according to the manufacturer's instructions, then reverse transcribed (500 ng) using oligo (dT)₁₂₋₁₈ and M-MuLV-Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The primers used for amplifying the *OfKr-h1* were as follows: forward primer (5'-TGT TCC AAA CAA TTA AAG GTT CAC-3') and reverse primer (5'-TTT AGT GTT AAA TGT TCC ACT ACA-3') while for *OfRpL3* (*O. fuscidentalis* ribosomal protein L3, GenBank accession no. EF453378), forward primer (5'-TCT ACC CCA AGA AGA GGT CTC G-3') and reverse primer (5'-ACG ACA GTC CTC AGA CAT GTG C-3'). *OfRpL3* was used as an endogenous control. Serial five-fold dilutions of the cDNA samples were prepared. Standard curves were generated using five serial cDNA dilutions and three technical replications for each gene (Larionov et al., 2005). Quantitative real-time PCR (real-time Q-PCR) was conducted using a SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, Foster City, CA) and a iCycler iQ5™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). Each reaction was run in triplicate containing 1 µl of template cDNA or the standard and 0.2 µM primers in a final reaction volume of 20 µl. The thermal cycling parameters were 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94°C for 20 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 40 s. After Q-RT-PCR, the absence of undesired byproducts was confirmed by an automated melting curve analysis and agarose gel electrophoresis of the PCR product. The relative expression level of *OfKr-h1* from samples with different treatments was estimated by a comparative C_T method ($\Delta\Delta C_T$) for relative quantitation of gene expression. The C_T (cycle threshold) is defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the background level. The dynamic range of both target (*OfKr-h1*) and normalizer (*OfRpL3*) were determined. After normalization with *OfRpL3* (i.e. $\Delta C_T = C_{T(OfKr-h1)} - C_{T(OfRpL3)}$), the ΔC_T value of the treatment group was further compared with that of the control group (i.e.

$\Delta\Delta C_T$). The relative expression level was determined by the formula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Relative expression was calculated separately for each replicate (n=3). Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons, where differences were considered significant at $P < 0.01$. Data are presented as mean $\pm$ SE.

3. Results

3.1 Effects of phytojuvenoid extract on *O. fuscidentalis* development

The effects of plant-derived juvenile hormone analog extracted from *Lantana camera* L. were evaluated against *Omphisa fuscidentalis* diapausing-larvae collected in January. Soxlet extraction of plant was used in 7 experimental groups (n=30) at doses of 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 and 100.0 μ g by topical application method. Percent pupation and day of pupation were recorded for six weeks. After the diapausing larvae were topically treated with all dose of extract, they become inactive before formation of the brown cuticle, which indicated pupation of these larvae. Interestingly, 0.5 μ g of extract showed high efficiency by induced pupation at 14 days after application and reached 100% of pupation within 44 ± 1.00 days. (Fig. 1, Fig. 2)

3.1 *OfKr-h1* cDNA and sequence alignment

Fig. 3 shows the full-length cDNA sequence and the deduced amino acid sequence below the nucleotide sequence (GenBank accession number KY400007). The open reading frame of 1,050 nucleotides, encoding a protein of 350 amino acids, followed by a stop codon and 3'- untranslated region. The deduced protein sequence of *OfKr-h1* (Table. 1) shows 85.8% identity to the lepidopterans, *Amyelois transitella* Kr-h1, 84.8% identity to the

Helicoverpa armigera Kr-h1, 82.5% identity to the *Bombyx mori* Kr-h1, and 80.6% identity to the *Papilio xuthus* Kr-h1. The *OfKr-h1* amino acid sequence comprised eight highly conserved C₂H₂-type zinc-fingers present at analogous positions in the three other lepidopteran Kr-h1 proteins (Fig. 4). The full length *OfKr-h1* coding sequence was submitted in Genbank with accession no. of KY400007.

3.2 Spatial and temporal expression of the *OfKr-h1* mRNA during diapause and post-diapause

Fig. 5 shows the tissue distribution of the *OfJHBP* transcript of diapausing larvae. High levels of the transcript were detected in the brain and low levels in sub-esophageal ganglion, thoracic ganglion, abdominal ganglion, fat body and malpighian tubule.

Since *O. fuscidentalis* larval brain showed the highest *OfKr-h1* mRNA expression level (Fig. 5), we collected the brain as the representative RNA source of the following experiments. The developmental expression of the *OfKr-h1* mRNA during diapause and the pupal stage were determined (Fig. 6). The expression of *OfKr-h1* showed the maximum in September (early diapause), followed by the significant decrease to the minimum when the larvae entered diapause in October. Expression then remained low until March, after which expression dramatically increased in the pupal stage.

3.3 Effects of JHAs on *OfKr-h1* gene expression

We induced pupation by treating diapausing larvae with JHA. After the application of 0.5 µg JHA (Fig. 7A), *OfKr-h1* mRNA levels gradually increased from day 0 to day 9 and peaked on the pupal stage.

We also examined the effects of phytojuvenoid extracted from *L. camera* on the gene expression of *OfKr-h1*. In larvae applied with 0.5 µg extract (Fig. 7B), *OfKr-h1* mRNA levels

were low from day 0 to day 3, and then increased gradually until day 12. Thereafter, it decreased dramatically to the highest in pupal stage.

4. Discussion

Juvenile hormone analog have been used to control insect growth and development for years (Nichida *et al.*, 1983; Bowers and Nishida, 1980; Rosenthan and Berenbaum, 1991). In *B. mori*, the application of phytojuvenoid on larvae exhibited synchronized maturation of larvae and simultaneous spinning of cocoon which is very important in the sericulture industry (Khyade *et al.*, 2002). Furthermore, phytojuveniod extracted from some non-mulberry plants (e.g. *L. camera*, *Santalum album*, *Tectona grandis* and etc.) showed some inhibitory effect on chitin deposition in the in tegument of fifth instar larvae of *B. mori* (Khyade *et al.*, 2012). On the contrary to other insects, application of JHA (methoprene) to diapausing larvae of *O. fuscidentalis* induced pupation (Singtripop *et al.*, 2000).

Based on the availability and intensity of juveniod content (Khyade *et al.*, 2012), we examined the effects of phytojuveniod extracted from *L. camera* on the *O. fuscidentalis* development. After topical application of the extracts to diapausing larvae, the results showed all concentration also induced pupation especially in 0.5 µg of extracted show high efficacy by induced pupation in Day 14 after treatment and reached 100% of pupation rate within 44 days. This preliminary study supports the idea that phytojuveniod can be used to control other insect pests by interfering their post-embryonic development.

In order to identify novel physiological and developmental targets to control insect pest, we need to understand how this molecules function in the molecular level. Recently, *Kr-h1* has been identify to be induced by JH and to mediate the JH function during the larval

stage in several insect species (Minukuchi *et al.*, 2009; Lozano and Belles, 2001; Minukuchi *et al.*, 2011). In holometabolous insects, *Kr-h1* is a transcriptional factor containing C₂H₂-type zinc finger and acts as early JH-response gene in *D. melanogaster* (Minaguchi *et al.*, 2008) and the red flour beetle (*Tribolium castaneum*)(Minaguchi *et al.*, 2009). In *T. castaneum*, the *TcKr-h1* expression profile correlated well with that of JH titer, suggesting that the amount of *Kr-h1* transcript is depend on the JH level (Minaguchi *et al.*, 2009).

We cloned the *OfKr-h1* gene from the brain of diapausing larvae after treatment with methoprene. The deduced amino acid sequence alignment indicated that *Kr-h1* is highly conserved among lepidopteran insects. High conservation was found in zinc finger (Zn1-Zn8) domains, showing a possible conserved role of the zinc fingers. Similar to previously identified *Kr-h1* homologues (), *OfKr-h1* appears to play a crucial role in the normal development of this insect.

Since *OfKr-h1* mRNA was abundant in the brain of diapausing larvae. Then, we chose this tissue representing the whole *OfKr-h1* mRNA levels of this insect. Developmental expression of *OfKr-h1* mRNA may provide the role of *Kr-h1* in *O. fuscidentalis* development. The mRNA level was maximum during the early diapause in September. Expression remained low during diapause from October to March, and then increased dramatically in the pupal stage. The level of *OfKr-h1* mRNA expression may correspond to JH titer in agreement with the study of Yin and Chippendale (1989). In insects that experiences the larval diapause, high JH titer during the early diapause period would signal any downstream genes eg. *Kr-h1* in order to maintain the larval diapause. Additionally, JH is required for preventing premature development of imaginal structures at the prepupal stage (Riddiford, 2012). This explains why the *OfKr-h1* gene expression was high in the pupal stage in this insect. However, since *Kr-h1* in other insects plays an important roles in wing and reproductive development in the

adult (Zera and Cisper, 2001; Zera *et al.*, 2007; Min-na *et al.*, 2014), the functions of Kr-h1 in adult *O. fuscidentalis* still have not been clarified.

It has been shown that *Kr-h1* expression is induced by JH (Minukuchi *et al.*, 2009; Lozano and Belles, 2001; Minukuchi *et al.*, 2011). Since both synthesized (methoprene) and plant extracted (phytojuveniod) JHA can induce pupation in diapausing larvae of *O. fuscidentalis*, these treatment also results in similar pattern of stimulation of *OfKr-h1* mRNA expression. After application of hormones, mRNA levels increased and remains at low level. Thereafter, expression increase reaching a maximum in the pupal stage (Fig. 5). This time course almost coincides with the previous study on developmental *OfKr-h1* mRNA expression. The finding in this study may support the recent studies in other insects that *Kr-h1* is inducible by exogenous JHA and appears to mediate JH function to other downstream signaling molecules in order to maintain the normal development in insects. Furthermore, the *in vitro* experiment on regulation of gene expression should be further investigated for confirmation.

These preliminary study may help us to provide the possibility for searching new chemical means in natural product e.g. phytojuvenoid extracted from *L. camera* to control other insect pests by interrupting its development. Therefore, this work will not only deepen our understanding of the functions of *OfKr-h1* in the JH-signaling pathway in the molecular level, but also make it possible to use *OfKr-h1* as a new target gene for integrated pest management in the field.

Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund through a TRF grant for new researcher awarded to E.R. (TRG5880178)

References

- Ajami, A. M., Riddiford, L.M. 1973. Comparative metabolism of the cecropia juvenile hormone. *Journal of Insect Physiology*. 19: 635 – 646.
- Beck, Y., Pecasse, F. Richards, G. 2004. Krüppel-homolog is essential for the coordination of regulatory gene hierarchies in early *Drosophila* development. *Developmental Biology*. 268(1): 64-75.
- Bowers, W.S., Ohta, T., Cleere, J.S., Marsella, P.A. 1976. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. *Science*. 193(4253): 542-547.
- Butenand, A. Karlson. 1954. Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormones der Insekten in kristalliner Form. *Zoo Naturforsch.* 9b: 389-391.
- Chaitanya, R.K., Sridevi, P., Senthilkumaran, B., Dutta Gupta, A. 2012. Effect of juvenile hormone analog, methoprene on H-fibroin regulation during the last instar larval development of *Corcyra cephalonica*. *General and Comparative Endocrinology*. 181: 10–17.
- Deena, M.J., Thoppil, J. E. 2000. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. *Fitoterapia*. 71: 453-455.
- Denlinger, D.L. 1985. Hormonal control of diapause. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.). Pergamon Press, Oxford, pp. 353-412.
- Dewick, P.M. 2009. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons Ltd.

- Fussnecker, B., Grozinger, C. 2008. Dissecting the role of *Kr-h1* brain gene expression in foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Molecular Biology*. 17(5):515-522.
- Ghizalberti, E.L. 2000. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia*. 71: 467-486.
- Gillbert L.I. 1989. The endocrine control of molting in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, as a model system. In: Koolman J. (Ed.). *Ecdysone*, Stuttgart, Georg Thieme, pp. 488-471.
- Gopakumar, B., Ambika, B., Prabhu, V.K.K. 1977. Juvenmimetic activity in some south Indian plants and their probable cause of this activity in *Morus alba* (L), *Entomon*, 2: 259-261.
- Grenier , Grenier. 1983. Fenoxycarb a fairlynew growth regulator: a review of its effects on insects, *Annals of Applied Biology*. 122: 369–403.
- Jindra, M., Palli, S.R., Riddiford, L.M. 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual Review of Entomology*. 58:181-204.
- Kayukawa, T., Minakuchi, C., Namiki, T., Togawa, T., Yoshiyama, M., Kamimura, M., Mita, K., Imanishi, S., Kiuchi, M., Ishikawa, Y., Shinoda, T. 2012. Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(29): 11729-11734.
- Khyade V.B., Patil, S.B., Khyade, S.V., Bhawane, G.P. 2002. Influence of acetone maceratives of *Vitis vinifera* on the larval parameters of silk worm, *Bombyx mori* (L), *Indian Journal of Comparative Animal Physiology*. 20: 14-18.

- Khyade, V. B., Shukla, K. K., Sarawade, J. P. 2012. Juvenoid activity of some non mulberry plant extractives through inhibition of chitin deposition in the integument of fifth instar larvae of silkworm, *Bombyx mori* (L) (Race: PM x CSR2). Research Journal of Recent Science. 1: 1-6.
- Kopec, S. 1917. Experiments on metamorphosis of insects. Bulletin of the Russian Academy of Sciences, Cracovie, Classe des Sciences Mathematiques et Naturelles. Serie B: 57-60.
- Kruade, N.P., Jeitak, V., Kaul, V.K., Sharma, O.P. 2010. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Lantana camara*, *Ageratum houstonianum* and *Eupatorium adenophorum*. Pharmaceutical Biology. 48: 539-544.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods. 25: 402-408.
- Lozano, J., Belles, X. 2011. Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. Scientific reports. 1: 163.
- Minakuchi, C., Namiki, T., Shinoda, T. 2009. Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Developmental Biology. 325(2): 341-50.
- Minakuchi, C., Tanaka, M., Miura, K., Tanaka, T. 2011. Developmental profile and hormonal regulation of the transcription factors broad and Krüppel homolog 1 in hemimetabolous thrips. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 41(2): 125-134.

- Minakuchi, C., Zhou, X., Riddiford, L. M. 2008. Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*. 125(1-2): 91-105.
- Min-na. J., Jian, X., Yun, Y., Xin-da, L. 2014. Molecular Characterization and Functional Analysis of *Krüppel-homolog 1 (Kr-h1)* in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Journal of Integrative Agriculture*. 13: 1972–1981.
- Mohamed, M.I.E., Abdelgaleil, S.A.M. 2008. Chemical composition and insecticidal potential of essential oils from Egyptian plants against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Applied Entomology and Zoology*. 43:599-607.
- Nishida, R., Bowers, W. S. 1980. *Insect Biology of the future*. Academic Press, Eds., Locke. M., Smith, D.S., p. 621.
- Nishida, R., Bowers, W. S., Evans, P. H. 1983. Juvadecene: Discovery of Juvenile hormone Mimic in the Plant, *Macropiper excelsum*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 1: 17-24.
- Nijhout, H.F. 1994. *Insect Hormones*. Princeton, Princeton University Press.
- Nijhout, H.F. 1999. Control mechanisms of polyphenic development in insects: In polyphenic development, environmental factors alter some aspects of development in an orderly and predictable way. *Bioscience*. 49: 181-192.
- Pecasse, F., Beck, Y., Ruiz, C., Richards, G. 2000. Krüppel-homolog, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology*. 221(1): 53-67.

- Riddiford, L.M. 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction?. *General and Comparative Endocrinology*. 179: 477–484.
- Röller, H., Dahm, K. H., Sweeley, C.C., Trost, B. M. 1967. The Structure of the Juvenile Hormone. *Angewandte Chemie International Edition*. 6:179.
- Saikia, A.K., Sahoo, R.K. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana camara* L. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 8: 599-602.
- Samuel, A.J.S.J., Kalusalingam, A., Chellappan, D.K., Gopinath, R., Radhamani, S., Husain, H. A., Muruganandham, V., Promwichit, P. 2010. Ethnomedical survey of plants used by the orang asli in kampong bawong, Perak, West Malaysia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 6:5.
- Saraf, A., Quereshi, S., Sharma, K., Khan, N.A. 2011. Antimicrobial activity of *Lantana camara* L. *Journal of Experimental Sciences*. 2: 50-54.
- Singtripop, T., Wanichacheewa, S., Tsuzuki, S., Sakurai, S. 1999. Larval growth and diapause in a tropic moth *Omphisa fuscidentalis* Hampson. *Zoological Science*. 16: 725-733.
- Singtripop, T., Wanichacheewa, S., Sakurai, S. 2000. Juvenile hormone mediated termination of larval diapause in *Omphisa fuscidentalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 847-854.
- Singtripop, T., Wanichacheewa, S., Sakurai, S., 2002. Sensivity of juvenile hormone and ecdysteroid in the diapause larvae of *Omphisa fuscidentalis* based on the hemolymph trehalose dynamic index. *Journal of Insect Physiology*, 48: 817-824.

- Slama, K. 1979. Insect Hormones and anti-hormones in plants. Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites (Eds. G.A. Rosenthal and D. H. Janzen; Academic Press, New York, pp. 683-700.
- Slama, K., Williams, C.M. 1966. The Juvenile Hormone. VI. Effects of the "Paper Factor" on the Growth and Metamorphosis of the Bug, *Pyrrhocoris Apterus*. The Biological Bulletin. 130(2): 247 – 253.
- Srivastava, R., Upadhyay, V.B. 2013. Influence of Bioactive Phytojuvenoid on the silk producing Potential of Multivoltine Mulberry Silkworm (*Bombyx mori* Linn.). International Journal of Fauna and Biological Studies. 1(2): 26-31.
- Williams, C.M. 1956. The juvenile hormone of insects. Nature. 178: 212-213.
- Yin, C.M, Chippendale, G.M., 1979. Diapause of the southwestern corn, *Diatraea grandiosella*: further evidence showing juvenile hormone to be the regulator. J. Insect Physiol. 25: 513-523.
- Zandi-Sohani, N., Hojjati, M., Carbonell-Barrachina, A.A. 2012. BIOACTIVITY OF *Lantana camara* L. ESSENTIAL OIL AGAINST *Callosobruchus maculatus* (FABRICIUS). Chilean Journal of Agricultural Research. 72(4): 502-506.
- Zera, A.J., Cisper, G. 2001. Genetic and diurnal variation in the juvenile hormone titer in a wing-polymorphic cricket: Implications for the evolution of life histories and dispersal. Physiological and Biochemical Zoology. 74: 293-306.
- Zera, A.J., Zhao, Z., Kaliseck, K. 2007. Hormones in the field: evolutionary endocrinology of juvenile hormone and ecdysteroids in field populations of the wing-dimorphic cricket *Gryllus firmus*. Physiological and Biochemical Zoology. 80: 592-606.

Zoubiri, S., Baaliouamer, A.. 2011. GC and GC/MS analyses of the Algerian Lantana camara leaf essential oil: Effect against *Sitophilus granarius* adults. Journal of Saudi Chemical Society doi:10.1016/j.jscs.2011.01.013.

Figure legends

Fig. 1 Effects of phytojuvenoid on percent pupation within 45 days after application

Fig. 2 Effect of doses of phytojuvenoid on day of pupation

Fig. 3 Induction of pupation by various doses of phytojuvenoid in the diapausing larvae of *O. fuscidentalis* in January 2016.

Fig. 4 Effect of doses of phytojuvenoid on day of pupation of *Omphisa* diapause larvae

Fig. 5 *OfKr-h1* nucleotide and deduced amino acid sequences.

Fig.6 Alignment of deduced amino acid sequence of *OfKr-h1* with the sequence other lepidopteran *Kr-h1s*

Fig. 7 Tissues distribution of *OfKr-h1* mRNA expression

Fig. 8 *Kr-h1* mRNA expression in *O. fuscidentalis* development

Fig. 9 *OfKr-h1* response to JHAs (A) methoprene (B) phytojuvenoid

Table legend

Table 1 homology of deduced amino acid sequences of *OfKr-h1* to other *Kr-h1s*

Fig.1

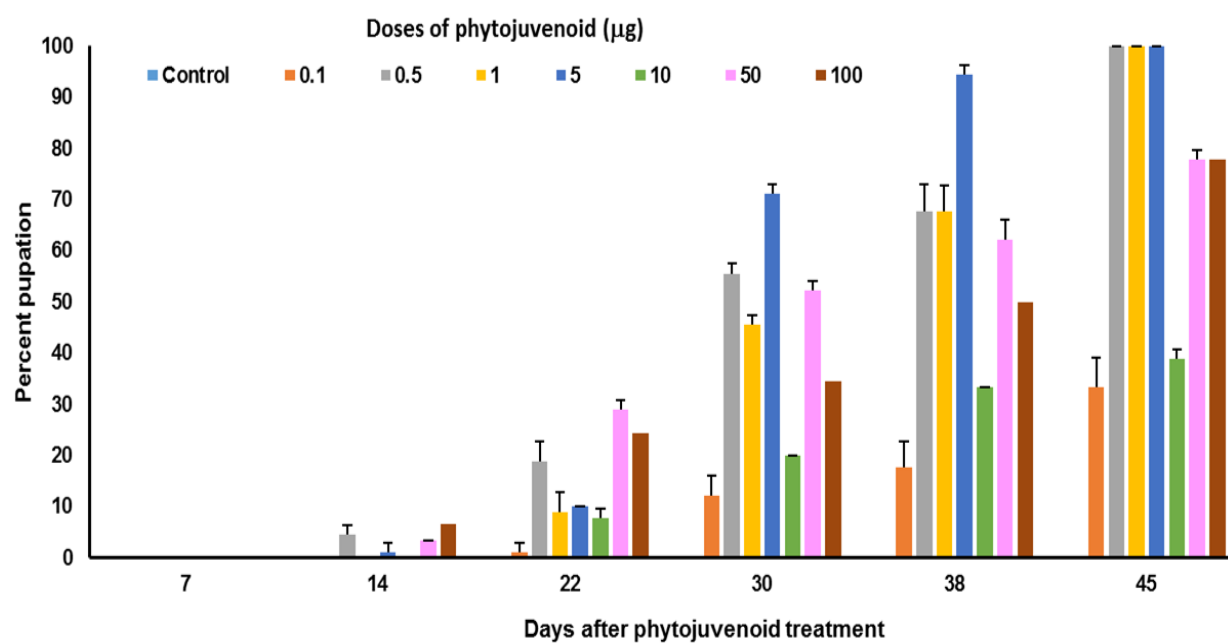


Fig. 2

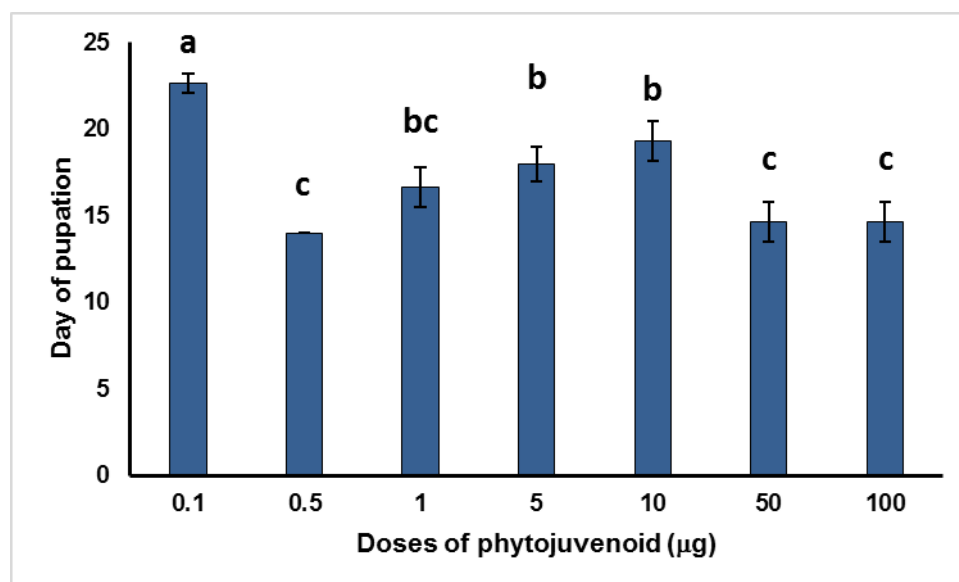


Fig. 4

	Zn1	Zn2	
PxKr_h1	MIGEDERMHQCGECGLTLSTRSALTAHARSHRVAADAHRC	VDVCHKTFAVFPARLVRHYRTH	60
OfKr_h1	MIGEDERNHQCGECGLTLSTRSALTAHARSHRVAADAHRC	VDVCDKTFVAVFPARLVRHYRTH	60
AtKr_h1	MIGEEERVHQCGECGLTLSTRSALTAHARSHRVSA	DAHRCVDVCHKTFAVFPARLVRHYRTH	60
BmKr_h1	MIGDEERVHQCGECGLTLSTRSALTAHARSHRSTADAHRC	VDVCHKTFAVFPARLVRHYRTH	60
	::** **:*****:*****.*****		
	Zn3	Zn4	
PxKr_h1	TGERPFCEYCHKMFSVKENLQVHRR	IHTKERPYRCSVCGAAFEHSGKLHRHARIHTGER	120
OfKr_h1	TGERPFCEYCHKMFSVKENLQVHRR	IHTKERPYRCNVCNAAFEHSGKLHRHARIHTGER	120
AtKr_h1	TGERPFCEYCHKMFSVKENLQVHRR	IHTKERPYRCNVCDAAFEHSGKLHRHARIHTGER	120
BmKr_h1	TGERPFCEYCHKMFSVKENLQVHRR	IHTKERPYRCNVCDAAFEHSGKLHRHARIHTGER	120
	*****.**,*****		
	Zn5	Zn6	
PxKr_h1	PHACQHCHKTFIQSGQLVIHMR	THTGKPYRCPAPGCGKGFTCSKQLKVHSRTH	TGERPY 180
OfKr_h1	PHACPHCHKTFIQSGQLVIHLR	THTGKPYRCPAPGCGKGFTCSKQLKVHSRTH	TGERPY 180
AtKr_h1	PHACPHCDKTFIQSGQLVIHLR	THTGKPYRCPAPGCGKGFTCSKQLKVHSRTH	TGERPY 180
BmKr_h1	PHACPHCHKTFIQSGQLVIHLR	THTGKPYRCPAPGCGKGFTCSKQLKVHSRTH	TGERPY 180
	**** ** *****:*****		
	Zn7	Zn8	
PxKr_h1	TCDICLRDFGYNHVLKLHRFQHYGERCYR	CTVCDGTFNTKKQMEAHYKEHGAETPRAAA	240
OfKr_h1	TCDICLRDFGYNHVLKLHRFQHYGERCYR	CTVCDGTFNTKKQMEAHYKEHGAETPRIAS	240
AtKr_h1	TCDICLRDFGYNHVLKLHRFQHYGERCYR	CTVCDGTFNTKKQMEAHYKEHGAETPRTQT	240
BmKr_h1	TCEICLRDFGYNHVLKLHRFQHFGERCYR	CTVCDGTFNTKKQMEAHYKEHGAEPRTAP	240
	** *****:*****:***		
PxKr_h1	ALSTVP--VASNGNPMCDLVKVALQQMPPT	PPSSPPSPCTITAVPAAASPALIPAADPA	298
OfKr_h1	VQSAVPIPVGENGNVMCDLVEAALQQLPPT	PPSSPPSPPCPAPQTASKVVPSTP-----	294
AtKr_h1	LQSSVPL--VVNGNVMCDLVEAALQQLPPT	PPSSPPSPQCCSTEVVPVAPSSS-----	291
BmKr_h1	LQSTTPM--AADGKVMCDLVEAALQQLPPT	PPSSPPSPRCPSISVASMMPSSTQ-----	292
	:, :*: *****:***** *		
PxKr_h1	PAPLITPIPASTPSPSPPTTNLQFTLAPSS	LPKRKLIPYHDSLSASATVSVPAVRH	358
OfKr_h1	-----PLSTSPSPTVSSLQYILAPSS	LPKRKLTPQPET-----S-NVVVRH	336
AtKr_h1	-----LSHVPLPSQVTPLQYTTVHST	LPKRKRFIPQPEP-----APVPVVRH	334
BmKr_h1	-----VNDTPTSLAAVPVHYISLPSD	LPKRKRFIPHINE-----EITPAVRH	335
	. ::: * *****: * : ,***		
PxKr_h1	TSVIQFAPPAAAGLS		373
OfKr_h1	TSVIQFAPAAADV-		350
AtKr_h1	TSVIQFAPAVVDAS-		348
BmKr_h1	TSVIQFAPPATES--		348
	***** ..		

Fig. 5

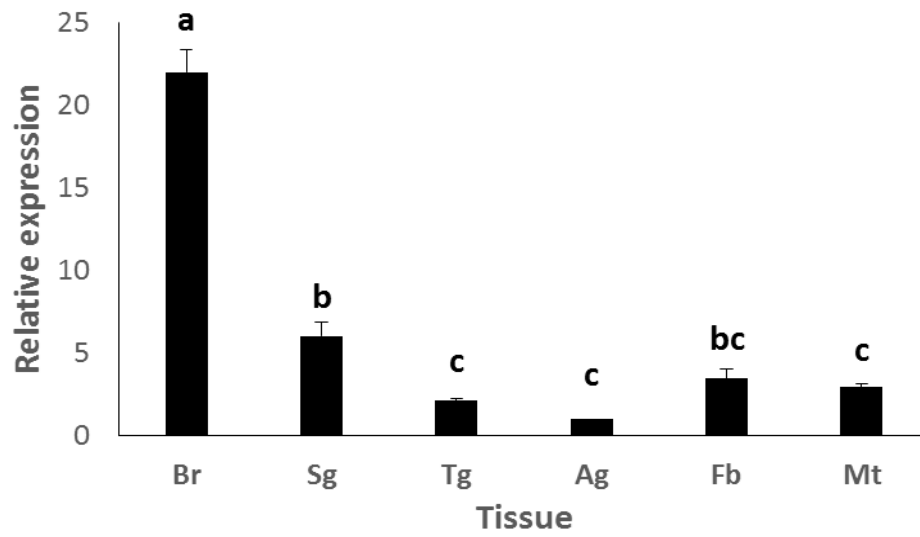


Fig. 6

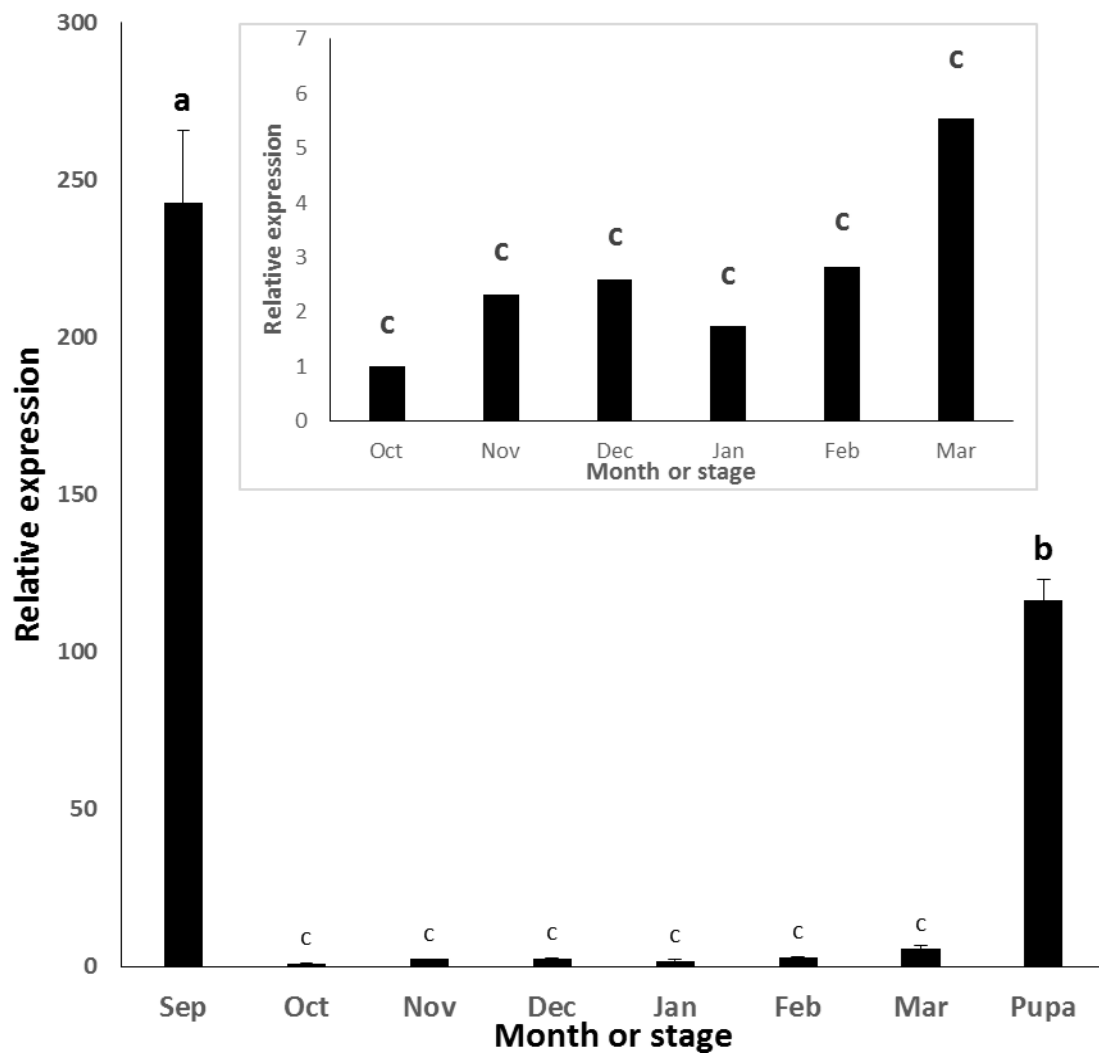
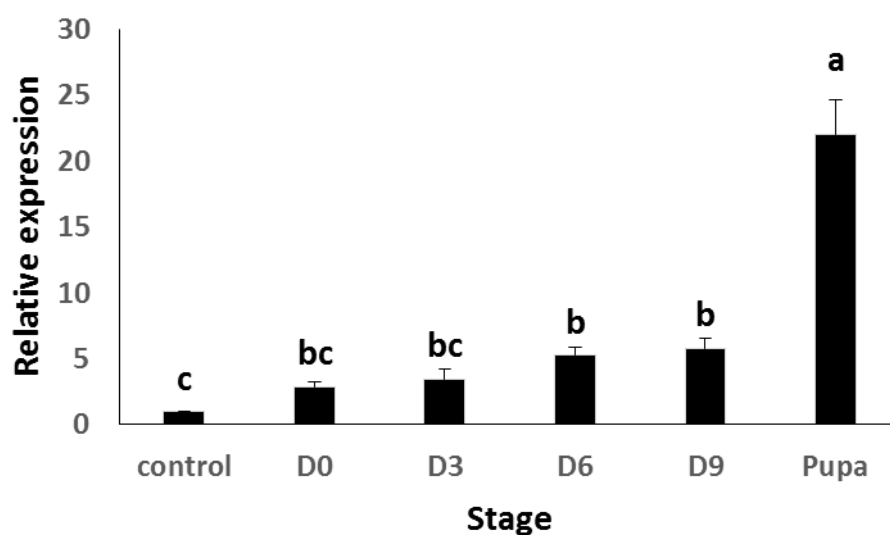


Fig. 7

(A)



(B)

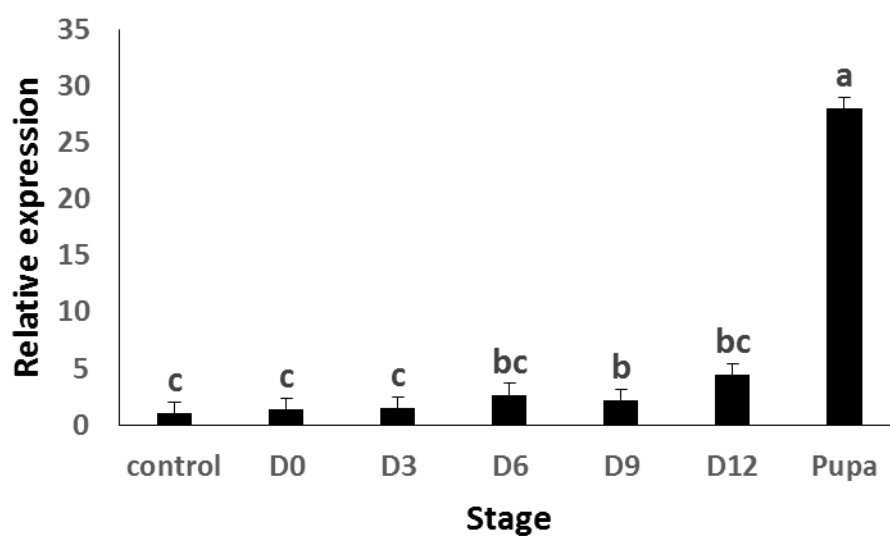


Table 1

Species	Identity (%)	Similarity (%)
<i>Amyelois transitella</i> (<i>AtKr-h1</i>)	85.8	90.1
<i>Helicoverpa armigera</i> (<i>HaKr-k1</i>)	84.8	88.0
<i>Bombyx mori</i> (<i>BmKr-h1</i>)	82.5	86.2
<i>Papilio xuthus</i> (<i>PxKr-h1</i>)	80.6	84.4