บทที่ 4

ผลการวิจัย

1) ผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ (JHA) ต่อการชักนำการเข้าดักแด้

ในการทดลองที่ 1 หลังจากหยด JHA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆแก่หนอนเยื่อไผ่แต่ละกลุ่ม เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่หยดอะซีโตนโดยยึดเกณฑ์ของ Singtripop *et al.* (1999) หนอนจะแสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีลำตัวโดยเริ่มตั้งแต่ Grade(G) 0 หมายถึง สีลำตัวปกติ G 2 หมายถึง เริ่มเห็นจุดสีส้มกระจายทั่วผิวลำตัว G 3 หมายถึง ผิวลำตัวมีสีส้มอมน้ำตาลทั่วตัวหรือเปลี่ยนเข้าดักแด้อย่างสมบูรณ์ ส่วน G 4 หมายถึง ผิวลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มและ G5 หมายถึง ผิวลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มมากถึงดำ แต่สีลำตัวที่ถือว่าหนอนเกิดการเข้าดักแด้แล้วคือ G3 เพราะเมื่อนำมาศึกษาดูลักษณะผิวลำตัว พบว่าสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นคือผลจากการสร้าง pupal cutical และเมื่อนำมาศึกษาโครงสร้างภายในภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการผ่าตัดเอา pupal cutical ออก พบว่า โครงสร้างภายในของหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างของดักแด้ เช่น การเกิดปุ่มปีก (wing disc)และหนวด (antennae) จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ JHA ที่ไม่มีผลต่อการชักนำให้หนอนเกิดการเข้าดักแด้คือกลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.0001, 0.0005 , 0.001 และ 0.005 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร ส่วนกลุ่มที่ให้ JHA อีก 3 ความเข้มข้นคือ 0.025, 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตรนั้นสามารถชักนำให้หนอนเกิดการเข้าดักแด้ได้โดยมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีผิวลำตัวดังภาพ 10 กลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัม มีหนอนที่เข้าดักแด้เพียง 10 เปอร์เซนต์ ในขณะที่กลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมนั้นพบหนอนเข้าดักแด้มากขึ้นเป็น 50 เปอร์เซนต์ ส่วน JHA ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถชักนำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G3 ได้มากที่สุด คือ 55 เปอร์เซนต์ ซึ่งเป็นจำนวนที่พบมากที่สุดในบรรดากลุ่มทดลอง เมื่อพิจารณาวันที่หนอนเข้าดักแด้นั้น พบว่ากลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมสามารถชักนำให้หนอนเกิดการเข้าดักแด้ได้เร็วที่สุด คือ 24.5 $\pm$ 3.1 วัน รองลงมาได้แก่ กลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัม คือ 28.5 $\pm$ 0.5 วัน ในขณะที่กลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัม เกิดการเข้าดักแด้ได้ช้าที่สุดโดยใช้เวลา 32.1 $\pm$ 9.3 วัน (ภาพ 11)

เมื่อนำระยะเวลาวันที่หนอนเกิดการเข้าดักแด้ของกลุ่มที่ให้ JHA ทั้ง 3 ความเข้มข้น คือ 0.025, 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตรมาหาค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาพ 10 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงผิวสีลำตัวหลังจากหยด JHA ของหนอนเยื่อไผ่เทียบกับหนอนกลุ่มควบคุมที่หยดอะซีโตน

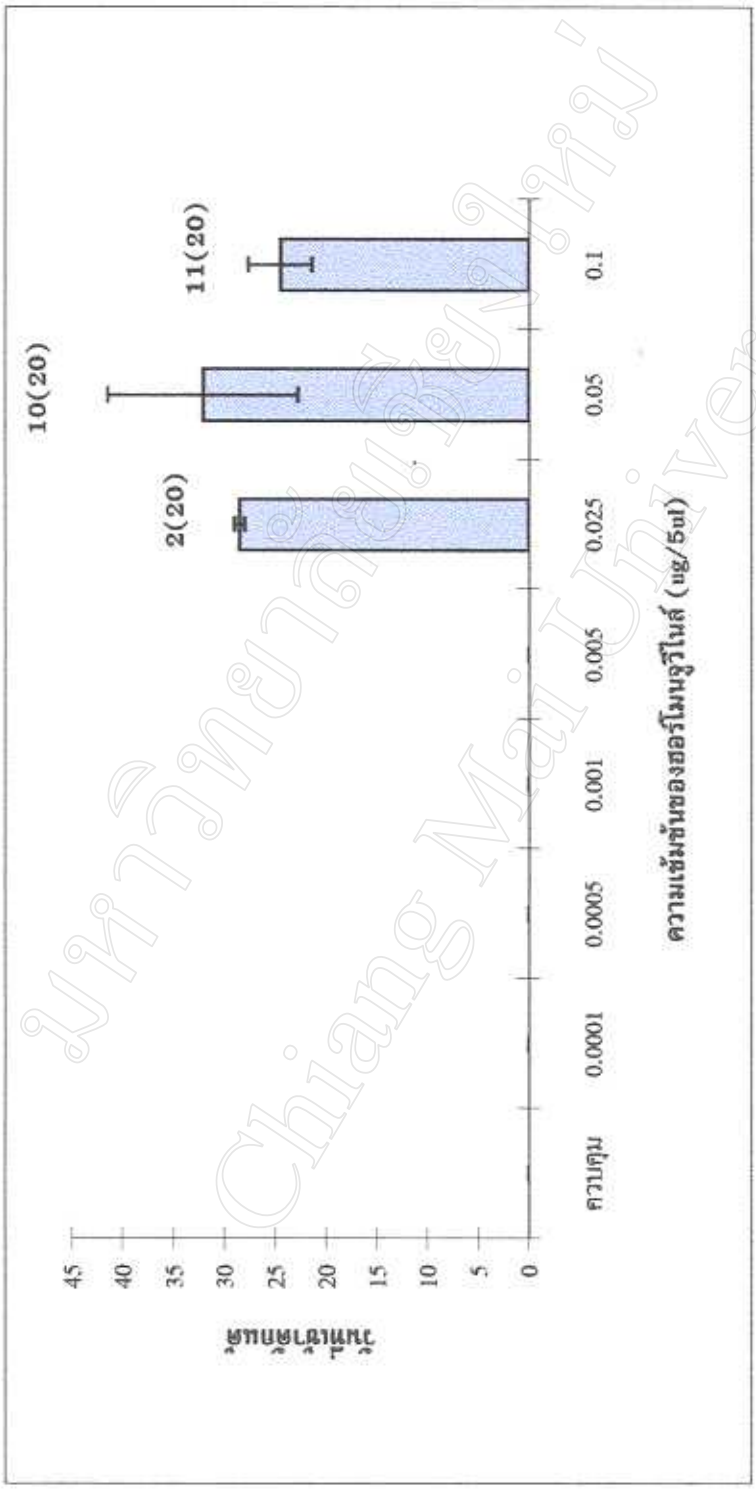
ระยะ G1 ; เริ่มเห็นจุดส้ม กระจายตามผิวลำตัว

ระยะ G2 ; ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นสีส้มเข้มมากขึ้นทั่วผิวลำตัว

ระยะ G3 ; ผิวลำตัวมีสีส้มอมน้ำตาลทั่วตัว

ระยะ G4 ; ผิวลำตัวมีสีน้ำตาลเข้ม

ระยะ G5 ; ผิวลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ



ภาพ 11 ผลของ JHA ความเข้มข้นต่าง ๆที่มีต่อหนอนเยื่อไผ่

หมายเหตุ ตัวเลขแสดง จำนวนตัวที่เข้าดักแด้ (จำนวนตัวทั้งหมด)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2) ผลของ JHA ต่อระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์

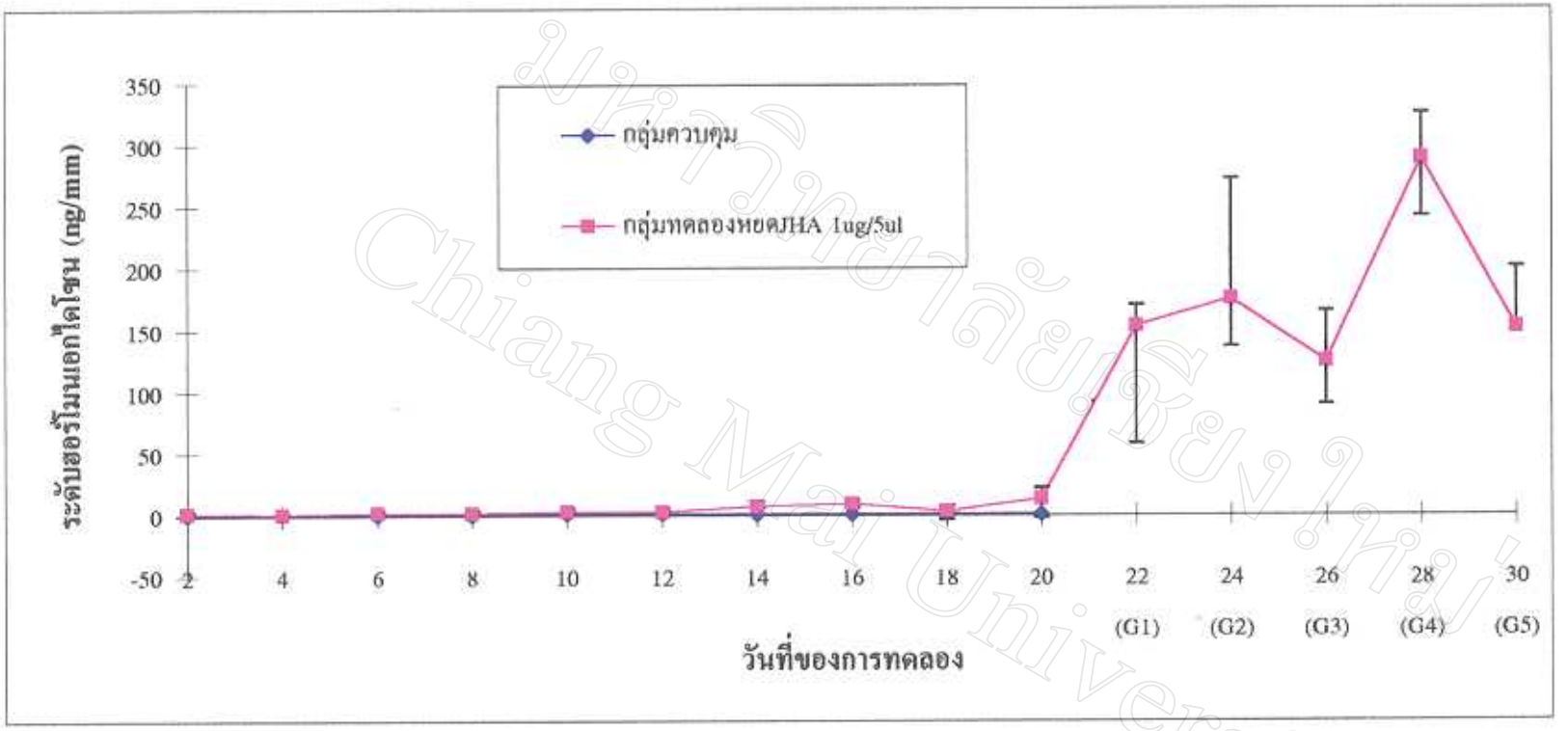
เมื่อหยด JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร แก่หนอนเยื่อไผ่ หลังจากนั้นทำการเก็บฮีโมลิมพ์ของหนอนทุก ๆ 2 วันเพื่อตรวจหาระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์โดยวิธี RIA ได้ผลดังนี้ กลุ่มควบคุม วันที่ 2 และ 4 ของการทดลอง ระดับฮอร์โมนมีค่า 1.1 ± 0.2 และ 1.2 ± 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนวันที่ 6 และ 8 ของการทดลองลดลงมาที่ 0.8 ± 0.3 และ 0.9 ± 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่วันที่ 10 และ 12 ของการทดลองระดับฮอร์โมนเพิ่มขึ้นเท่ากันคือ 1.7 ± 0.1 และ 1.7 ± 0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนวันที่ 14 และ 16 ของการทดลอง ระดับฮอร์โมนลดลงมาอยู่ที่ 1.5 ± 0.4 และ 1.5 ± 0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 18 ของการทดลอง ระดับฮอร์โมนเพิ่มขึ้นเป็น 1.8 ± 0.5 ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุดของกลุ่มควบคุมก่อนที่จะลดลงมาเป็น 1.5 ± 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 20 ของการทดลอง (ภาพ 13)

ส่วนกลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมนั้น ระดับฮอร์โมนในช่วงวันที่ 2 ถึง 18 ของการทดลองจะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม นั่นคือ วันที่ 2 4 6 และ 8 ของการทดลอง ระดับฮอร์โมนมีค่า 2.2 ± 0.9, 1.4 ± 0.2, 2.8 ± 0.6 และ 2.4 ± 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเข้าสู่วันที่ 10 และ 12 ของการทดลอง ค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3.7 ± 1.5 และ 3.6 ± 1.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนวันที่ 14 และ 16 นั้น ระดับฮอร์โมนเพิ่มมากขึ้นเป็น 8.1 ± 2.7 และ 9.8 ± 2.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 18 ของการทดลอง ระดับฮอร์โมนจะลดลงเป็น 4.1 ± 3.6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่หลังจากวันที่ 18 เป็นต้นไประดับฮอร์โมนมีค่าสูงขึ้นอีกครั้งคือวันที่ 20 ของการทดลองมีค่า 14.0 ± 7.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 22 ถึง 30 ของการทดลองซึ่งในช่วงนั้นหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G ต่าง ๆ ในวันที่ 22 และ 24 ของการทดลองหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G1และ G2 ระดับฮอร์โมนเพิ่มสูงเป็น 154 ± 16.2 และ 176 ± 96.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนวันที่ 26 ของการทดลองหนอนเกิดการเข้าดักแด้อย่างสมบูรณ์หรือเข้าสู่ G3 ระดับฮอร์โมนมีค่า 125.2 ± 39.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดลงจากระยะ G1 และ G2 เล็กน้อย เมื่อเข้าสู่วันที่ 28 ของการทดลองซึ่งหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G4 ระดับฮอร์โมนมีค่าเพิ่มสูงสุด คือ 289.4 ± 35.8 ก่อนที่จะลดลงมาเหลือ 152.8 ± 47.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 30 ของการทดลองหรือระยะที่หนอนเข้าสู่ระยะ G5 (ภาพ 12 และ 13)

เมื่อนำค่าระดับฮอร์โมนในฮีโมลิมพ์ของทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่หยด JHA ที่เก็บทุก ๆ 2 วันตั้งแต่วันที่ 2 ถึง 20 ของการทดลองมาคิดค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด ส่วนระดับฮอร์โมนของกลุ่มที่หยด JHA ในช่วงการ

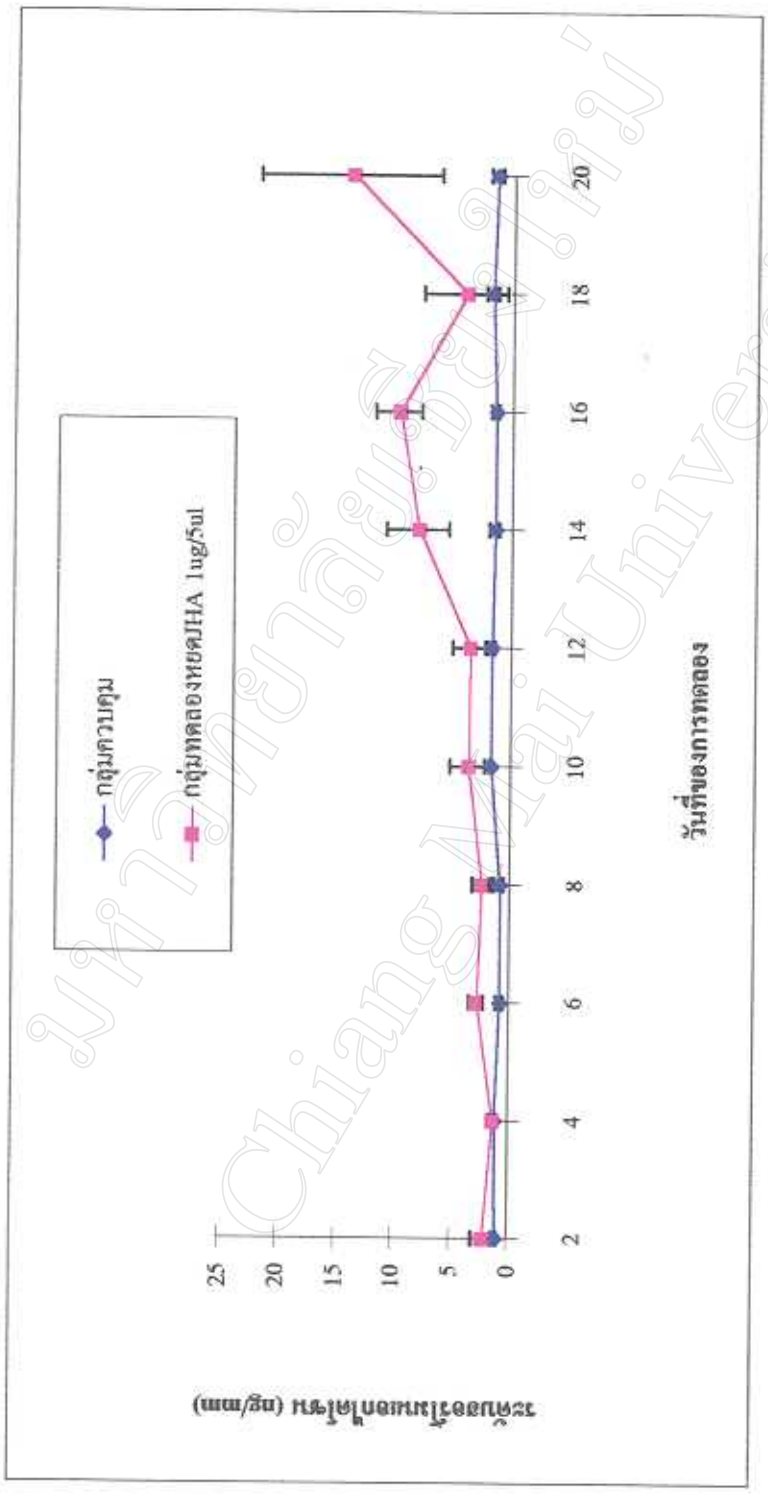
เปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G ต่าง ๆนั้น เมื่อนำมาคิดค่าความแตกต่างทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P< 0.01$ แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะ G1 ถึง G5 พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพ 12 ระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่หลังจากหยดฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้น 1 ug/5ul

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



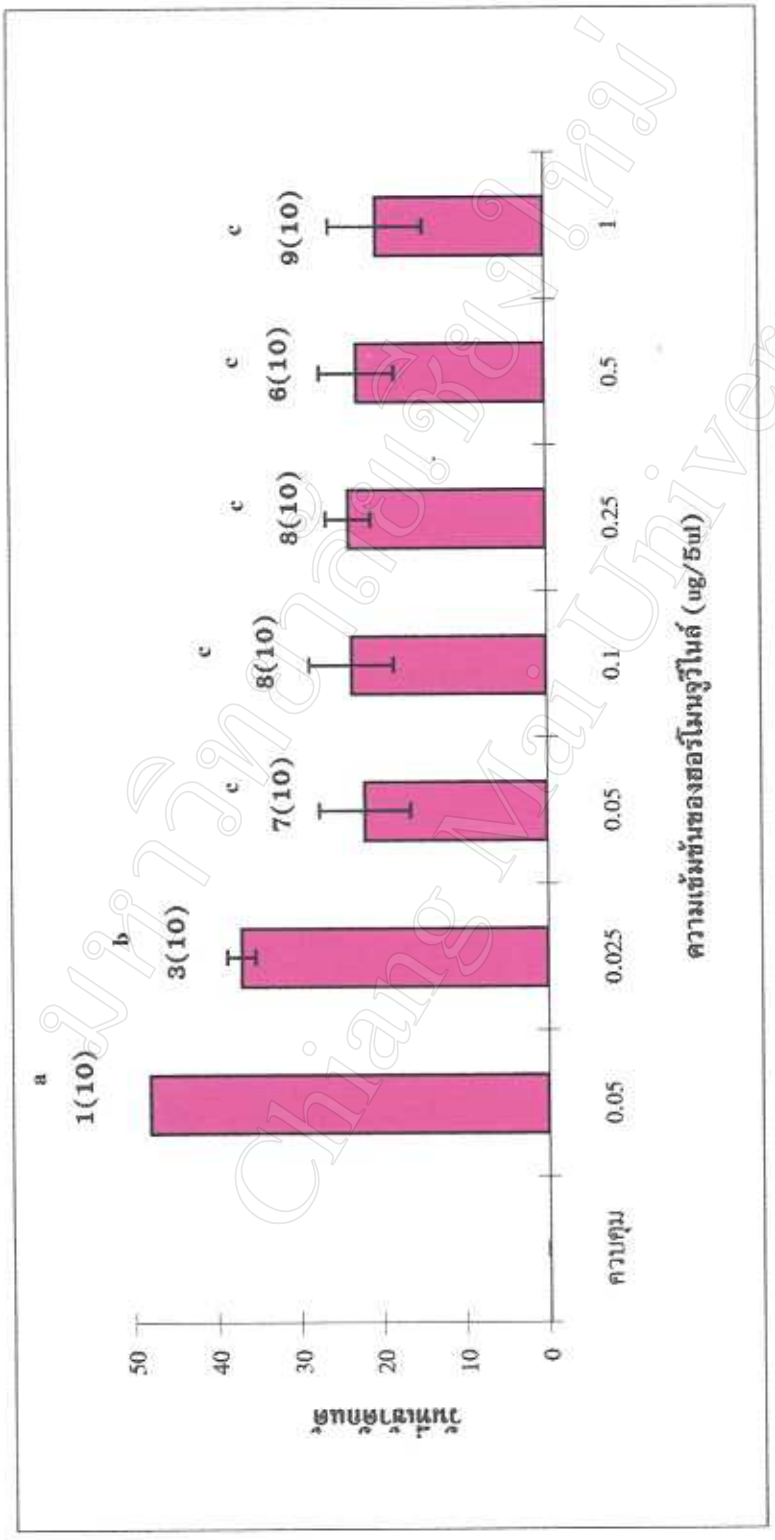
ภาพ 13 เปรียบเทียบผลของ JHA ต่อระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

3) กลไกการทำงานของ JHA

การทดลองที่ 3 เพื่อต้องการทราบถึงกลไกการทำงานของ JHA ภายในร่างกายของหนอนจึงทำการผ่าตัดเอาสมองของหนอนเยื่อไผ่ออกแล้วหยด JHA ความเข้มข้นต่าง ๆแก่หนอนจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จะเกิดขึ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ผ่าตัดเอาสมองออกเช่นกันแต่หยดอะซีโตนแทน ผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะใด ๆเกิดขึ้น ในขณะที่กลุ่มหยด JHA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้หนอนที่ผ่าตัดเอาสมองออกเกิดการเข้าดักแด้หรือเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G3 ได้ โดยความสามารถในการชักนำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน นั่นคือ กลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงที่สุดในการทดลองนี้สามารถชักนำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือ 90 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ กลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม พบหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 60 เปอร์เซนต์ ถัดมาคือ กลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.1 ไมโครกรัม สามารถชักนำให้พบหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G3 ได้ความเข้มข้นละ 80 เปอร์เซนต์เท่ากัน ส่วนกลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมนั้นพบหนอนจำนวน 70 เปอร์เซนต์ ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G3 ถัดมาคือ JHA ความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัมต่อ5ไมโครลิตร สามารถชักนำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ 30 เปอร์เซนต์และความเข้มข้น 0.005 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดจะสามารถชักนำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงได้น้อยที่สุดเพียง 10 เปอร์เซนต์เท่านั้น ส่วนระยะเวลาที่หนอนจะเข้าดักแด้หลังจากให้ฮอร์โมนนั้นมีความแตกต่างกัน โดย พบว่า กลุ่มที่หยด JHA 1 ไมโครกรัมสามารถชักนำให้หนอนเกิดการเข้าดักแด้ได้เร็วที่สุด คือ 20.3 ± 5.7 วัน รองลงมาได้แก่ กลุ่มที่หยด JHA ความเข้มข้น 0.5 และ 0.05 ไมโครกรัม ซึ่งสามารถพบหนอนที่เข้าดักแด้ได้ในเวลาใกล้เคียงกัน คือ 22.7 ± 4.5 และ 22.0 ± 5.5 วัน จากนั้นได้แก่ กลุ่มที่หยด JHA 0.1 และ 0.25 ไมโครกรัมซึ่งพบหนอนเข้าดักแด้ในเวลาใกล้เคียงกัน คือ 23.5 ± 5.1 และ 23.8 ± 2.7 วัน เมื่อนำระยะเวลาของการชักนำให้เกิดการเข้าดักแด้ของกลุ่มที่ให้ JHA ความเข้มข้นต่าง ๆทุกกลุ่มมาหาค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P< 0.01$ (ภาพ 14)

การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่เกิดกับหนอนเยื่อไผ่ที่ผ่าตัดเอาสมองออกและหยด JHA มีความคล้ายคลึงกับลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหนอนปกติแล้วหยดฮอร์โมน แต่จากการสังเกตลักษณะการเคลื่อนไหวมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยหนอนที่ผ่าตัดเอาสมองออกจะมีการเคลื่อนไหวอย่างเชื่องช้า มักไม่พบลักษณะการรวมกลุ่ม ในขณะที่หนอนปกติ จะเคลื่อนไหวอย่างสม่ำเสมอและมักอยู่รวมกลุ่มกัน



ภาพ 14 ผลของ JHA ความเข้มข้นต่าง ๆที่มีต่อหนอนเยื่อไผ่ที่ผ่าตัดเอาสมองออก

หมายเหตุ ตัวเลขแสดง จำนวนตัวที่เข้าดักแด้ (จำนวนตัวทั้งหมด)

อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ P < 0.01

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

4) ผลของ JHA ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของสมองและต่อมโปรทอแรกซิก

ในการทดลองที่ 4 หลังจากหยดฮอร์โมนจูวีไนส์ ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร แก่หนอนเยื่อไผ่เพื่อชักนำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ ซึ่งถือว่าเป็นการสิ้นสุดระยะไดอะพอส จากนั้นผ่าตัดสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสมองและต่อมโปรทอแรกซิกเปรียบเทียบกันทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยา พบว่า ในระยะไดอะพอส สมองมีลักษณะเป็นก้อนกลมนูน 2 ก้อนอยู่ติดกัน ด้านข้างของสมองแต่ละก้อนมีแนวเชื่อมติดกันจนเกือบถึงปลายสุดความยาวของก้อนสมอง (ภาพ 15ก) เมื่อหนอนมีการเปลี่ยนแปลงสีผิวลำตัวเข้าสู่ระยะ G3 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระยะนี้ถือได้ว่าหนอนเกิดการเข้าดักแด้เรียบร้อยแล้ว ก้อนสมองมีความกลมนูนลดลงโดยจะมีลักษณะยาว เรียวรี ลงไปทางด้านล่างมากขึ้น บริเวณที่เชื่อมต่อกันของก้อนสมองลดความยาวลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของความยาวก้อนสมอง ทำให้บริเวณส่วนปลายก้อนสมองทั้งสองข้างอยู่ห่างกันมากกว่าในระยะไดอะพอส (ภาพ 16ก) และเมื่อนำสมองในระยะดักแด้มาเปรียบเทียบ พบว่า รูปร่างของสมอง มีลักษณะแบน ยาวรีลงด้านล่างและพบว่า บริเวณส่วนปลายก้อนสมองแยกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัด (ภาพ 17ก) ส่วนในทางเนื้อเยื่อวิทยาของสมองนั้น เซลล์นิวโรซีครีทอรีของสมองจะประกอบไปด้วยเซลล์หลายกลุ่มสามารถจำแนกได้ตามตำแหน่งการติดสีหรือแม้แต่ขนาดของเซลล์ สีที่ใช้ย้อมเซลล์นิวโรซีครีทอรีมีอยู่หลายชนิด ซึ่งจะทำให้สามารถสังเกตประเภทของเซลล์นิวโรซีครีทอรีได้แตกต่างกันไป แต่ในการทดลองนี้ ได้ใช้เพียงสี eosin-haematoxylin เท่านั้น จึงไม่สามารถจำแนกถึงความแตกต่างของเซลล์นิวโรซีครีทอรีได้ ดังนั้นในการรายงานผลจึงสังเกตเฉพาะลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาของสมองพบว่า เนื้อสมองสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ชั้นนอกหรือเรียกว่า cortical layer ในชั้นนี้จะเป็นที่อยู่ของเซลล์ประสาท (cell body) ซึ่งตัวเซลล์ทั้งหลายจะเห็นติดสีเข้ม และชั้นในทั้งหมดเรียก ชั้นนิวโรไพล์ (neuropile) จะประกอบไปด้วยแอกซอนของเซลล์ประสาทชนิดต่างๆรวมทั้งจุดซิแนบป์ของเส้นประสาทเหล่านั้น ส่วนตำแหน่งของก้อนสมอง แบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ

- โปรโตซีรีบรัม (protocerebrum) จัดเป็นส่วนที่ใหญ่ที่สุด ชั้นนิวโรไพล์ภายในยังสามารถแบ่งออกเป็นพูต่างๆ เช่น กลุ่มของคอร์พัส พีดันคิวลาตา (glomoli of corpus pedunculata) และออพติคโลป (optic lobe)
- ดิวโตซีรีบรัม (deutocerebrum) ภายในส่วนนี้มีนิวโรไพล์ เรียก แอนเทนนัลโลป (antennal lobe)
- ไตรโตซีรีบรัม (tritocerebrum) ส่วนนี้อยู่ค่อนไปทางด้านหลัง

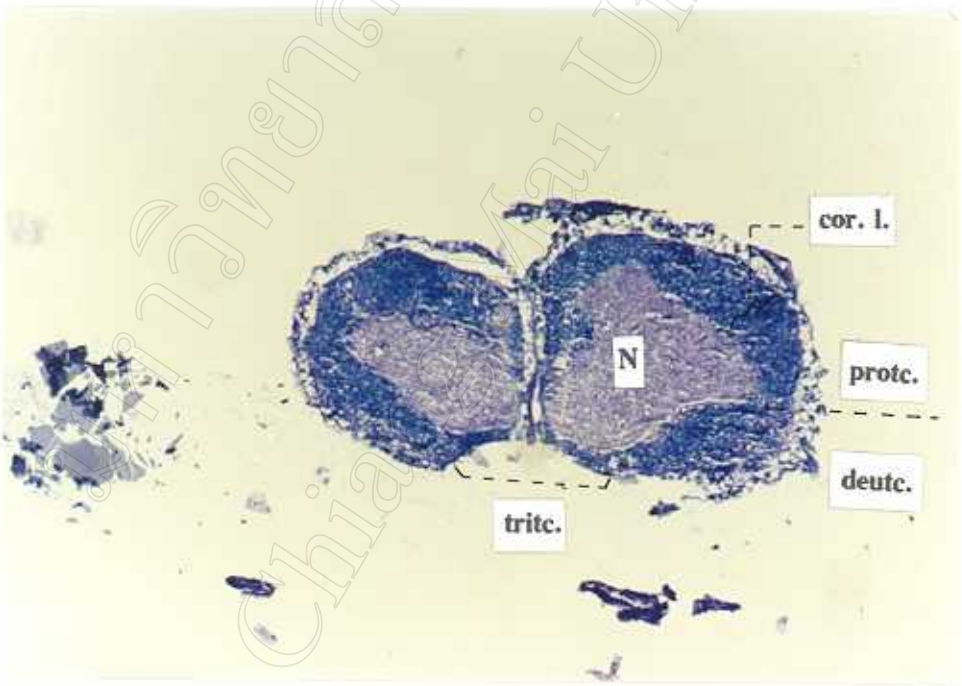
ในระยะไดอะพอส พบว่า ชั้น cortical layer ค่อนข้างหนา ในชั้นนิวโรไพล์ของสมองแต่ละก้อนยังไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นกลุ่มแอกซอนของส่วนใด ส่วนไตรโตซีรีบรัมค่อนข้างแคบซึ่งก็

แสดงได้ถึงรูปทรงของสมองที่ค่อนข้างกลม (ภาพ 15ข) เมื่อหนอนเข้าสู่ระยะ G3 พบว่า ชั้น cortical layer บางลง บริเวณชั้นนิวโรไพล์กว้างขึ้น ในระยะ G3 ซึ่งถือว่าหนอนเกิดการเข้าดักแด้เรียบร้อยแล้วนั้น บริเวณนิวโรไพล์ของบางส่วนมีการพัฒนาขึ้นโดยในชั้นโปรโตซีรีบรัม สามารถสังเกตเห็นกลุ่มของคอร์พัส พีดันคิวลาตาและออพติคโลปพัฒนาขึ้นมาอยู่ชิดกับชั้น cortical layer ส่วนชั้นดิวโตซีรีบรัมสามารถสังเกตเห็น แอนเทนนัลโลป พัฒนาขึ้นมาได้ ส่วนในชั้นไตรโตซีรีบรัมกว้างออกเล็กน้อย พบเซลล์นิวโรซีครีทอรีกระจายอยู่ตามขอบของก้อนสมอง (ภาพ 16ข) ส่วนสมองของดักแด้ธรรมชาติ ก็สามารถพบกลุ่มของคอร์พัส พีดันคิวลาตาและออพติคโลป ในชั้นของโปรโตซีรีบรัมและพบส่วนของแอนเทนนัลโลปในชั้นดิวโตซีรีบรัมได้เช่นเดียวกัน ส่วนชั้นไตรโตซีรีบรัมมีความกว้างเพิ่มขึ้นมาก แสดงว่า สมองในระยะดักแด้มีการเจริญพัฒนามากกว่าระยะตัวหนอนโดยสมองจะถูกดึงให้กว้างออกไปทางด้านข้าง (ภาพ 17ข)

ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนเยื่อไผ่กลุ่มควบคุมซึ่งอยู่ในระยะไดอะพอสนั้น เนื้อต่อมมีลักษณะบางใส (ภาพ 18ก) เมื่อดูถึงระดับเนื้อเยื่อ พบว่า ภายในต่อมยังแบ่งออกเป็น grandular cells หลายขนาด ลักษณะเป็นวงรี แบน บาง ขนาดใหญ่ ภายใน grandular cells จะประกอบไปด้วยนิวเคลียส ซึ่งมักพบอยู่ตรงกลางของเซลล์ แต่ในการทดลองนี้ใช้เพียงสี eosin-haematoxylin ย้อมเนื้อเยื่อและศึกษาในระดับของ light-microscope เท่านั้น จึงไม่สามารถแยกขอบเขตระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมได้ ชั้นนอกของ grandular cells ถูกคลุมไว้ด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ในช่วงนี้ยังไม่มีการสร้างฮอร์โมน จึงยังไม่พบลักษณะของซีครีทอรีซับสแทนซ์ ไม่ว่าจะภายในหรือระหว่างเซลล์ (ภาพ 18ข) แต่หลังจากหนอนเริ่มเข้าสู่ระยะ G3 ซึ่งถือว่าเป็นช่วงการสิ้นสุดระยะไดอะพอส เนื้อต่อมจะมีสีขาวขุ่นขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพ 19ก) ลักษณะเซลล์จะเริ่มมีการสังเคราะห์สาร นั่นคือ มีการเพิ่มขนาดของนิวเคลียส โดยจะสังเกตได้ว่า grandular cells ขยายตัวไม่เป็นระเบียบ (ภาพ 19ข) การที่นิวเคลียสมีการขยายตัว ก็เนื่องมาจาก เซลล์ของต่อมเริ่มมีการสร้างซีครีทอรีซับสแทนซีขึ้นมาสะสมอยู่ภายในเซลล์ นอกจากนั้นภายในเซลล์พบลักษณะของซีครีทอรีซับสแทนซ์เป็นเม็ดสีดำรวมกลุ่มกันอยู่ภายในเซลล์ ในท่านองเดียวกันของต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนในช่วงท้ายของระยะ G3 เนื้อต่อมมีสีขาวขุ่นทั่วทั้งต่อม (ภาพ 20ก) แสดงว่า ในระยะนี้ต่อมมีการทำงานอย่างเต็มที่ จึงมีการผลิตซีครีทอรีซับสแทนซ์ออกมาเป็นจำนวนมาก (ภาพ 20ข)

ส่วนผลของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของสมองและต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนในกลุ่มที่หยด JHA 0.05 ไมโครกรัมนั้นได้ผลเหมือนกัน จึงรายงานผลเฉพาะของกลุ่มที่หยด JHA 1 ไมโครกรัมเท่านั้น

ก



ข

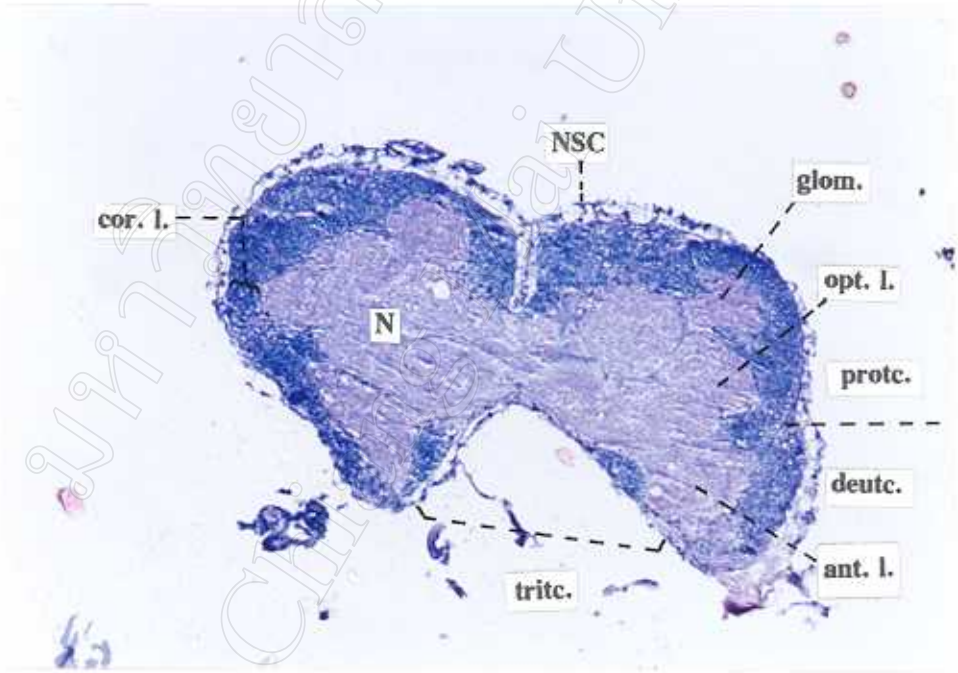
ภาพ 15 เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของสมองในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา กำลังขยาย 50 เท่า

ข. ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา กำลังขยาย 33 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก



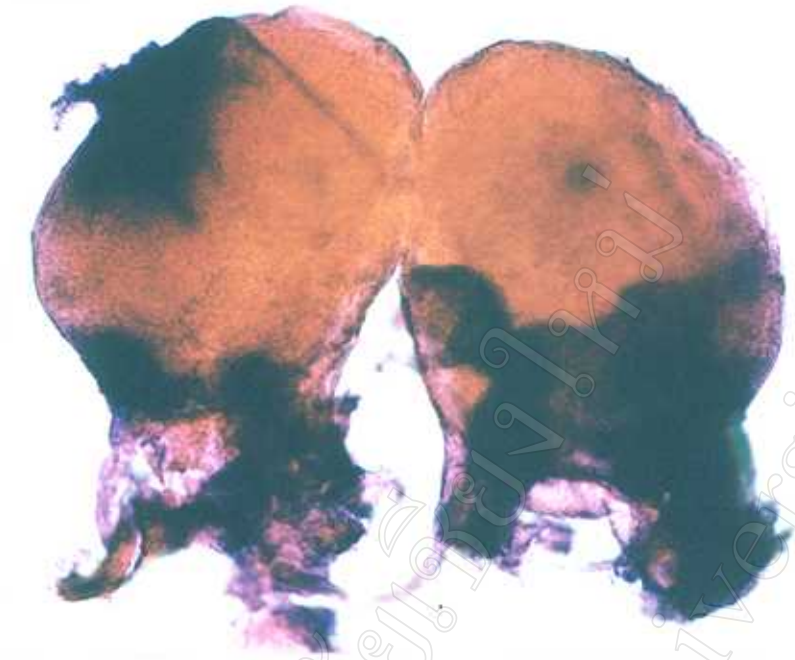
ข

ภาพ 16 เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของสมองในหนอนเยื่อไผ่ระยะ G3

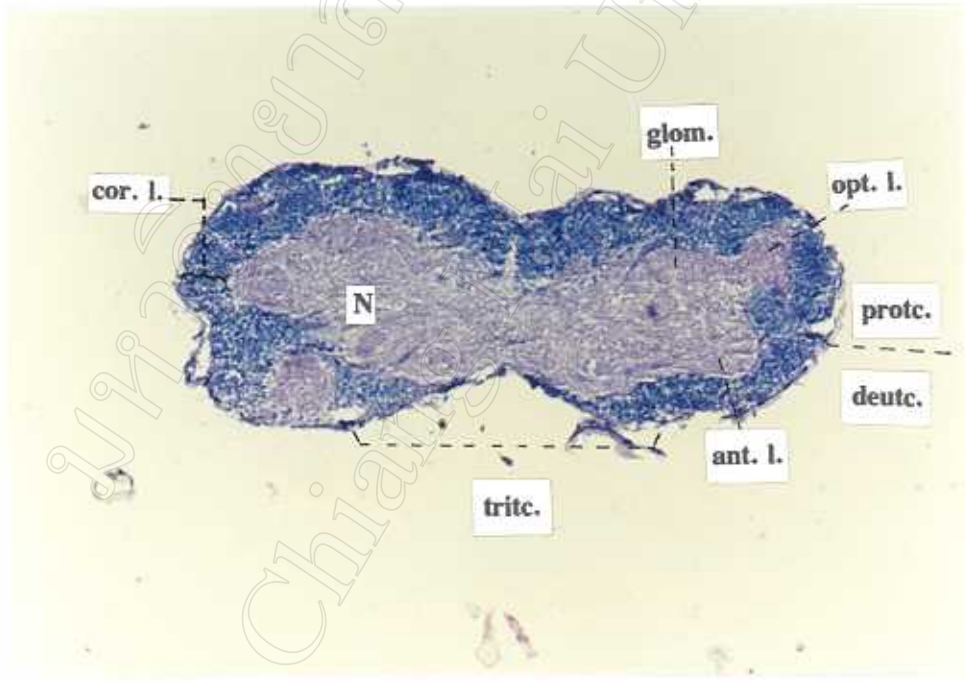
ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา กำลังขยาย 50 เท่า

ข. ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา กำลังขยาย 33 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ก



ข

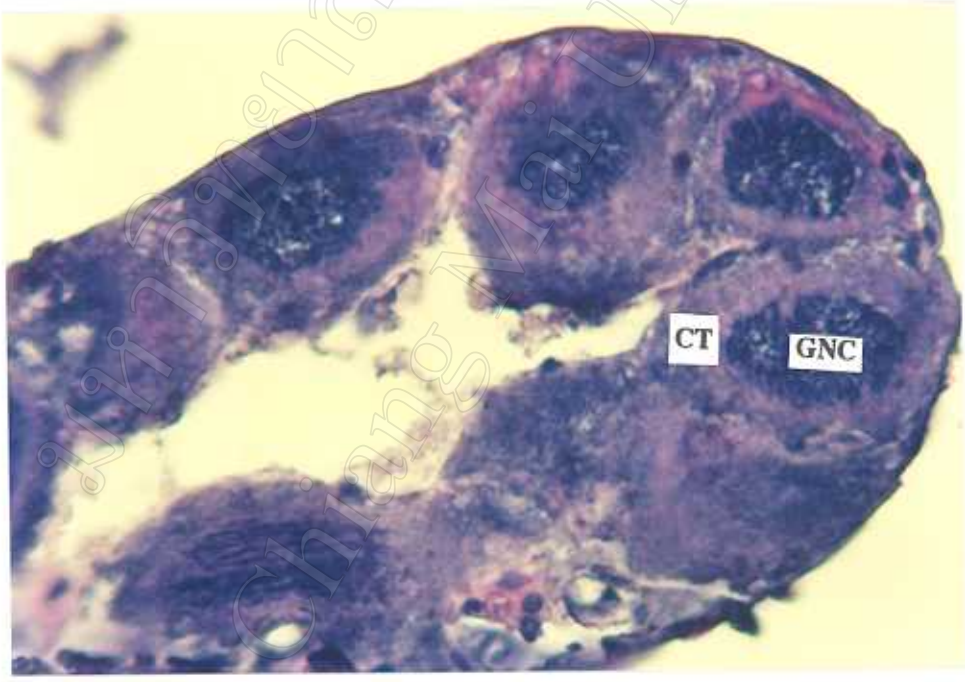
ภาพ 17 เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของสมองในหนอนเยื่อไผ่ระยะดักแด้ในธรรมชาติ

ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา กำลังขยาย 50 เท่า

ข. ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา กำลังขยาย 33 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก



ข

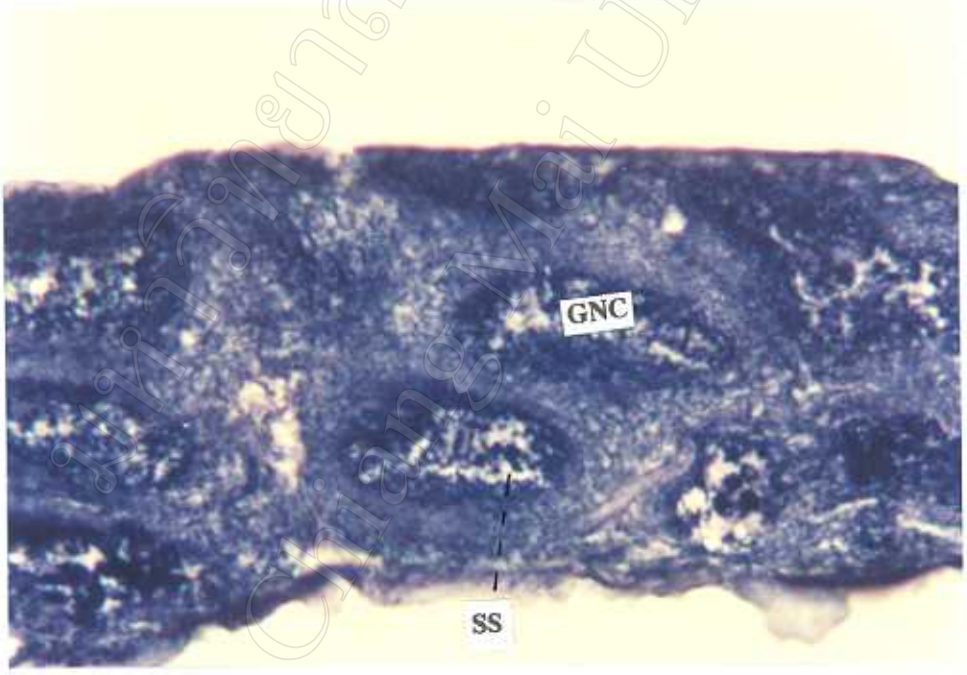
ภาพ 18 เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา กำลังขยาย 165 เท่า

ข. ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา กำลังขยาย 200 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก



ข

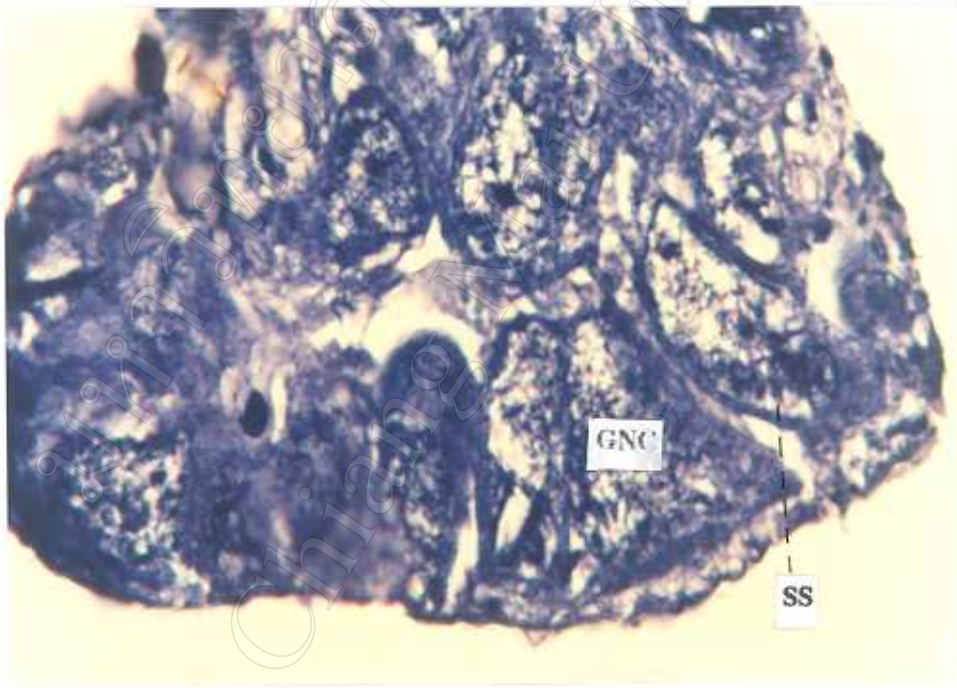
ภาพ 19 เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเยื่อไผ่ระยะ G3 ช่วงต้น

ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา กำลังขยาย 165 เท่า

ข. ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา กำลังขยาย 200 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก



ข

ภาพ 20 เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเยื่อไผ่ระยะ G3 ช่วงท้าย

ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา กำลังขยาย 165 เท่า

ข. ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา กำลังขยาย 200 เท่า

5) ผลของ JHA ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนและชนิดโปรตีนในหนอนเยื่อไผ่ระยะต่าง ๆทั้งเพศผู้และเพศเมีย

จากการทดลองที่ 5 หลังจากหยด JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม แก่หนอนเยื่อไผ่ จะสังเกตพบว่า หลังจากหยดฮอร์โมน หนอนจะเริ่มมีอาการหยุดนิ่ง ไม่เคลื่อนไหว ตัวแข็ง ลักษณะปล้องลำตัวยืดขยายเต็มที่ เรียกระยะนี้ว่า prepupa ต่อจากนั้นประมาณ 2-3 วัน หนอนในระยะ prepupa จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีผิวลำตัว เป็นระยะ G1 G2 และ G3 ตามลำดับ ดังนั้นจะทำการเก็บฮีโมลิมพ์ของหนอนในระยะต่าง ๆ โดยนับจากวันที่หยด JHA แล้ว 5 วัน (day5) 10 วัน (day10) 15 วัน (day15) และระยะ G1 G2 และ G3 ตามลำดับ นอกจากนี้ JHA 1 ไมโครกรัมยังสามารถชักนำให้หนอนบางตัวเกิดการเข้าดักแด้ได้อย่างสมบูรณ์ จึงเก็บฮีโมลิมพ์ของดักแด้ที่ได้จากการทดลอง (treated pupa) และเก็บฮีโมลิมพ์จากระยะดักแด้ในธรรมชาติ (natural pupa) ช่วงเดือนพฤษภาคม โดยทำการเก็บฮีโมลิมพ์ของทั้งเพศผู้และเพศเมียจากนั้นแบ่งฮีโมลิมพ์ออกมาส่วนหนึ่งจากทุกระยะของทั้ง 2 เพศมาตรวจหาระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการหยดฮอร์โมนก็จะเก็บฮีโมลิมพ์ในระยะเดียวกับกลุ่มทดลอง จากผลการทดลองพบว่า ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเพศผู้ระยะไดอะพอสมีค่า 0.346 ± 0.016 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกันในวันที่ 5 10 และ 15 ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์มีค่าเป็น 0.395 ± 0.011 0.425 ± 0.018 และ 0.452 ± 0.016 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่ระยะ prepupa ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ลดลงเล็กน้อยเท่านั้น คือ 0.419 ± 0.013 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นหนอนเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ช่วง G ต่าง ๆ โดย ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของระยะ G1 มีค่า 0.204 ± 0.008 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเข้าสู่ระยะ G2 ค่าจะใกล้เคียงกัน คือ 0.264 ± 0.011 และเพิ่มเป็น 0.336 ± 0.028 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในระยะ G3 ส่วนใน treated pupa ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ลดลงอยู่ที่ 0.243 ± 0.007 ในขณะที่ของ natural pupa มีค่าน้อยที่สุด คือ 0.038 และพบว่าระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศผู้ทุกระยะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ (ภาพ 21)

ส่วนผลการตรวจวัดระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียระยะต่าง ๆ พบว่าในระยะไดอะพอสมีค่า 0.451 ± 0.017 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และใน day 5 ค่าค่อนข้างใกล้เคียงกันอยู่ที่ 0.44 ± 0.003 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นใน day 10 และ day 15 เป็น 0.527 ± 0.007 และ 0.538 ± 0.013 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่ระยะ prepupa ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ลดลงเป็น 0.429 ± 0.008 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเมื่อหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงสีผิวลำตัวเข้าสู่ระยะ G1 ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์มีค่า 0.259 ± 0.004 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 0.276 ± 0.006 และ 0.323 ± 0.007 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเข้าสู่ระยะ G2 และ G3 ตามลำดับ ใน treated pupa ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์มีค่า 0.227 ± 0.004

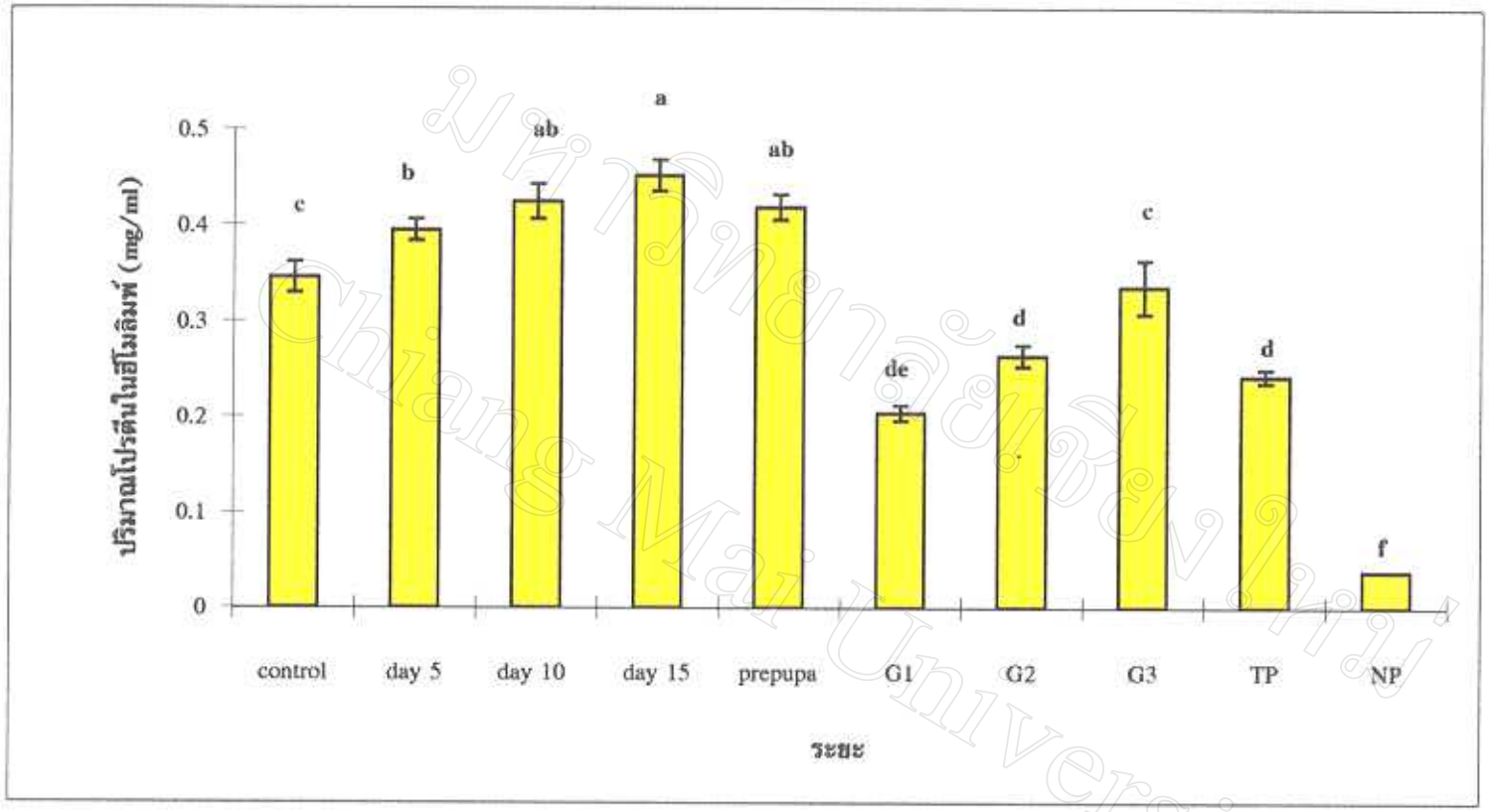
มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ natural pupa ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์มีค่าน้อยที่สุด คือ 0.033 ± 0.003 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและพบว่าระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียทุกระยะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ (ภาพ 22)

จากผลการทดลองสังเกตได้ว่า ในหนอนเยื่อไผ่ทั้ง 2 เพศ ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ในช่วง 15 วันแรกหลังจากหยด JHA มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม แต่พอเข้าสู่ระยะ prepupa ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์เริ่มลดลง เมื่อหนอนเริ่มเปลี่ยนแปลงสีผิวลำตัวเข้าสู่ระยะ G ต่าง ๆ ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์จะมีค่าต่ำกว่าในระยะแรก ๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบในระยะ G ด้วยกัน พบว่า จาก G1 ถึง G3 มีค่าที่เพิ่มขึ้นค่อนข้างใกล้เคียงกันโดยในระยะ G3 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากที่สุด ส่วนในระยะดักแด้ทั้งจากดักแด้ที่ได้จากการทดลองหรือดักแด้จากธรรมชาติ ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์มีค่าลดลง

เมื่อวัดระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนได้แล้ว ได้นำฮีโมลิมพ์อีกส่วนมาทำการแยกชนิดโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซิส พบว่า ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียแต่ละระยะพบชนิดโปรตีนคล้าย ๆกัน แต่มีปริมาณของโปรตีนแตกต่างกัน (ภาพ 23 ก) จากนั้นนำเจลไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน จากนั้นนำระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดปรากฏบนแผ่นเจล (R_f) มาพล็อตกับน้ำหนักโมเลกุลของตัวมันโดยต้องทำหน่วยของน้ำหนักโมเลกุลเป็นค่า log10 จะได้ เส้นกราฟมาตรฐานไว้เปรียบเทียบกับระยะของตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทราบถึงน้ำหนักโมเลกุล (ภาพ 24ก) จากนั้น เลือกผลของ day15 มาวิเคราะห์ปริมาณและชนิดโปรตีนตามลำดับน้ำหนักโมเลกุล พบว่า มีโปรตีนเกิดขึ้นทั้งหมด 11 ชนิด พบที่น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 29.8 ถึง 75.2 กิโลดาลตัน โดยแถบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ สีเข้ม แสดงว่ามีปริมาณของโปรตีนมากกว่าแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็ก สีจาง (ภาพ 25) จากหลักการคำนวนหาน้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวข้างต้น สามารถทราบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบในแต่ละระยะได้ จะเห็นว่า ในทุกระยะ ยกเว้น natural pupa พบโปรตีนทั้งหมด 11 ชนิด โดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 29.8 ถึง 75.2 กิโลดาลตัน ส่วน natural pupa พบทั้งหมด 12 ชนิดโดยพบที่น้ำหนักโมเลกุล 54.7 กิโลดาลตันเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชนิดดังภาพ 26 ดังนั้นจึงให้ความสนใจโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 67,000 ถึง 94,000 กิโลดาลตัน เพราะคาดว่าเป็นโปรตีนสะสมที่มีความจำเพาะในช่วงของระยะการเจริญเติบโตในทุกระยะ โดยชนิดโปรตีนที่มีความหนาแน่นมากที่สุด มองเห็นเป็นแถบขนาดใหญ่ ไม่สามารถแยกขอบเขตของแถบได้ชัดเจนพบที่น้ำหนักโลกุล 67,000 ถึง 94,000 กิโลดาลตัน ส่วนโปรตีนที่พบต่ำจากน้ำหนักโมเลกุล 67,000 กิโลดาลตัน ลงมา มีความหนาแน่นของโปรตีนน้อยลง เมื่อนำปริมาณฮีโมลิมพ์ มาเจือจาง ประมาณ 20 เท่า จะพบว่ามีโปรตีนอยู่ 2 ชนิดอย่างชัดเจน (ภาพ 27) เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด (ภาพ 24ข) พบว่ามี น้ำหนักโมเลกุล 75.2 กิโลดาลตัน คือ storage protein 1 (SP1) และที่

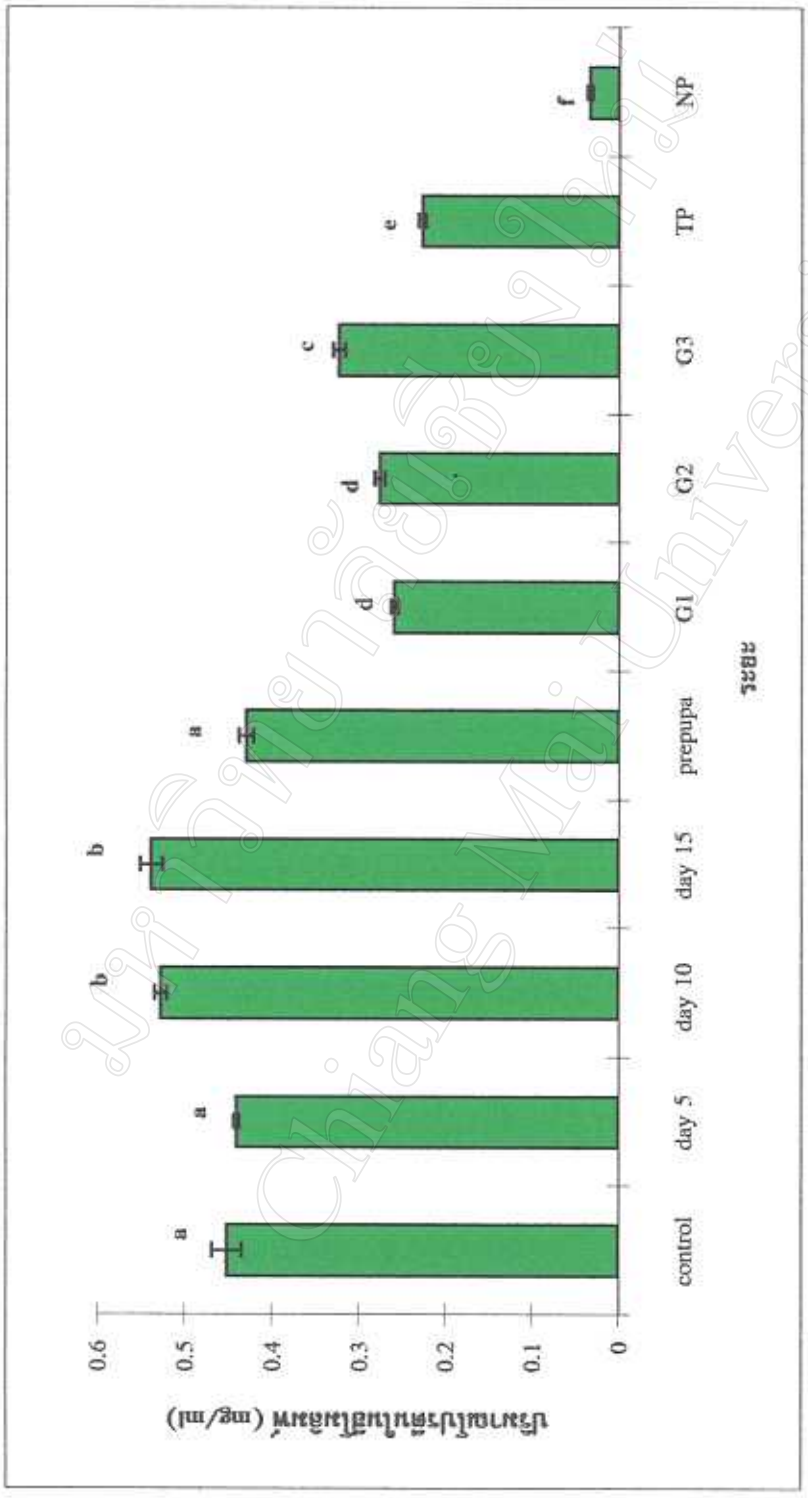
น้ำหนักโมเลกุล 72.2 กิโลดาลตัน คือ storage protein 2 (SP2) จากผลจะพบว่า ตั้งแต่ระยะไดอะพอสจนถึง day15 สามารถพบ SP1 และ SP2 ได้ทุกระยะ แต่เมื่อเข้าสู่ระยะการเปลี่ยนแปลง G ต่างๆ แถบของ SP1 เริ่มจางลงเรื่อย ๆและเกือบหายไปโดยจะเห็นเป็นแถบจาง ๆเท่านั้นเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้รวมทั้ง treated pupa และ natural pupa ในขณะที่ SP2 ยังคงตรวจพบได้ทุกระยะ (ภาพ 23ข)

เมื่อนำเฉพาะโปรตีน SP1 และ SP2 มาเปรียบเทียบปริมาณระหว่างระยะไดอะพอสกับระยะที่ถูกชักนำโดยฮอร์โมน พบว่า ในระยะไดอะพอส ปริมาณของโปรตีน SP1 และ SP2 จะเท่า ๆกัน ต่อมาใน day5 และ day10 ปริมาณของ SP2 ลดลงมาเล็กน้อยแต่กลับเท่ากันอีกครั้งใน day15 เมื่อเข้าสู่ระยะ G1 ความหนาแน่นของ SP1 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดและยังคงลดลงเมื่อผ่านเข้าสู่ระยะ G2 และ G3 เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้โดยการชักนำของ JHA ปริมาณของ SP1 ลดลงจนเกือบหมดแต่ถ้าเป็นดักแด้จากธรรมชาติปริมาณของ SP1 ยังมีเหลือเล็กน้อย ในขณะที่ปริมาณของ SP2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ภาพ 28) ในทำนองเดียวกัน หากนำปริมาณ SP1 และ SP2 ที่พบในฮีโมลิมพ์ระยะต่าง ๆ มาพล็อตกับพื้นที่กราฟ (ภาพ 29) พบว่า ในระยะไดอะพอสจะพบปริมาณ SP1 มากกว่า SP2 แต่หลังจากหยด JHA ปริมาณ SP1 มีแนวโน้มลดลงและลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเข้าสู่ระยะการเปลี่ยนแปลง G ต่าง ๆ จนกระทั่งเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ ปริมาณ SP1 ลดลงมากที่สุด ส่วนในดักแด้จากธรรมชาติ ปริมาณ SP1 มีความหนาแน่นกว่าดักแด้ที่ชักนำโดย JHA เล็กน้อยแต่มีปริมาณน้อยกว่าในระยะ G ต่าง ๆ ในขณะที่ SP2 จะพบในปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ระยะไดอะพอสจนถึงระยะ G3 แต่เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ทั้งจากการใช้ฮอร์โมนกระตุ้นหรือจากธรรมชาติ ปริมาณ SP2 จะลดลงเล็กน้อย แต่เมื่อนำค่าของ SP1 ในระยะหลังจากหยด JHA ที่มีค่าลดลง มาคิดค่าทางสถิติเทียบกัน พบว่า การลดลงนั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



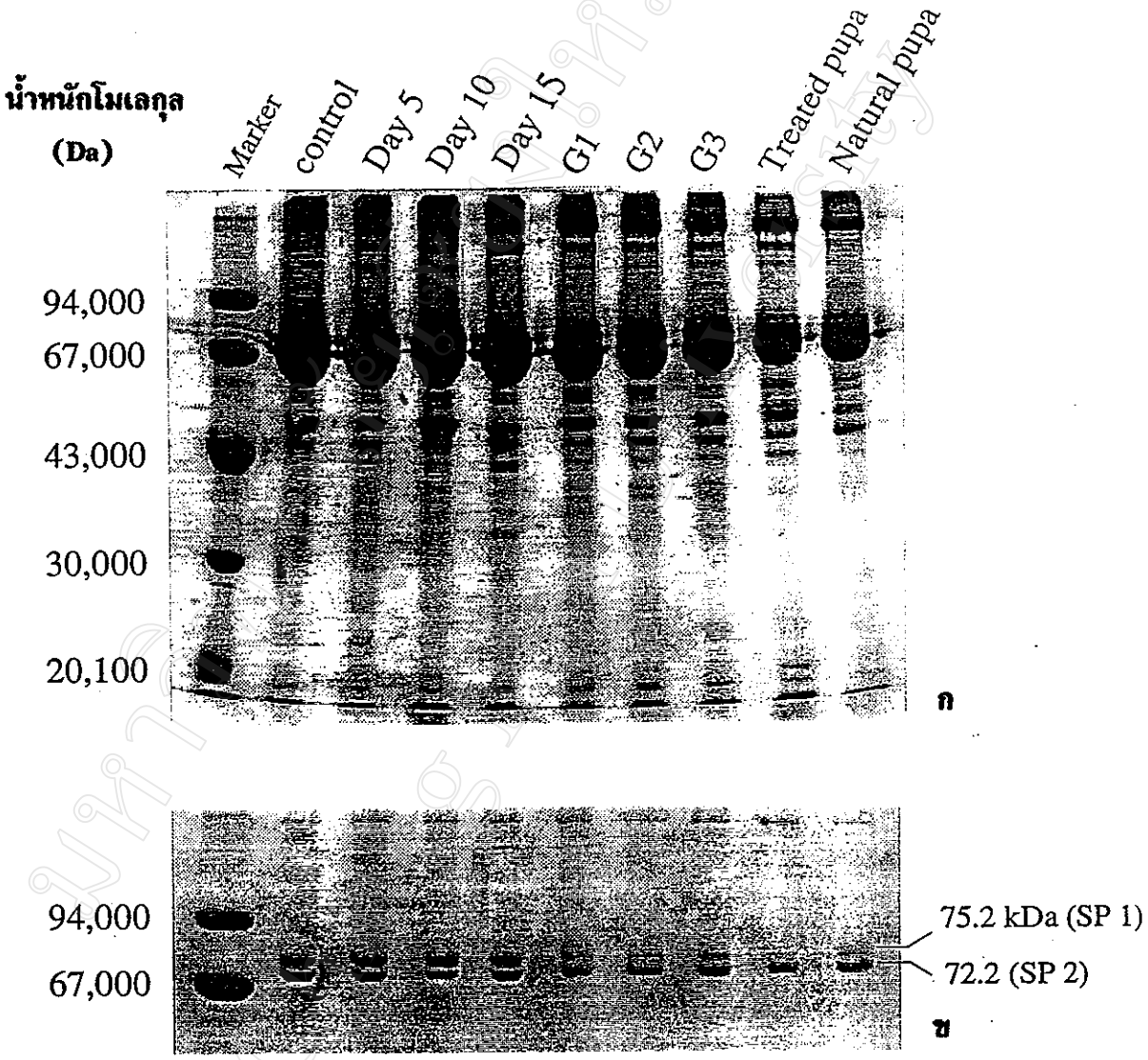
ภาพ 21 ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศผู้ระยะต่าง ๆหลังจากหยด JHA 1 ไมโครกรัม อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ P<0.01

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพ 22 ระดับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียระยะต่าง ๆหลังจากหยด JHA 1 ไมโครกรัม
ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ P<0.05

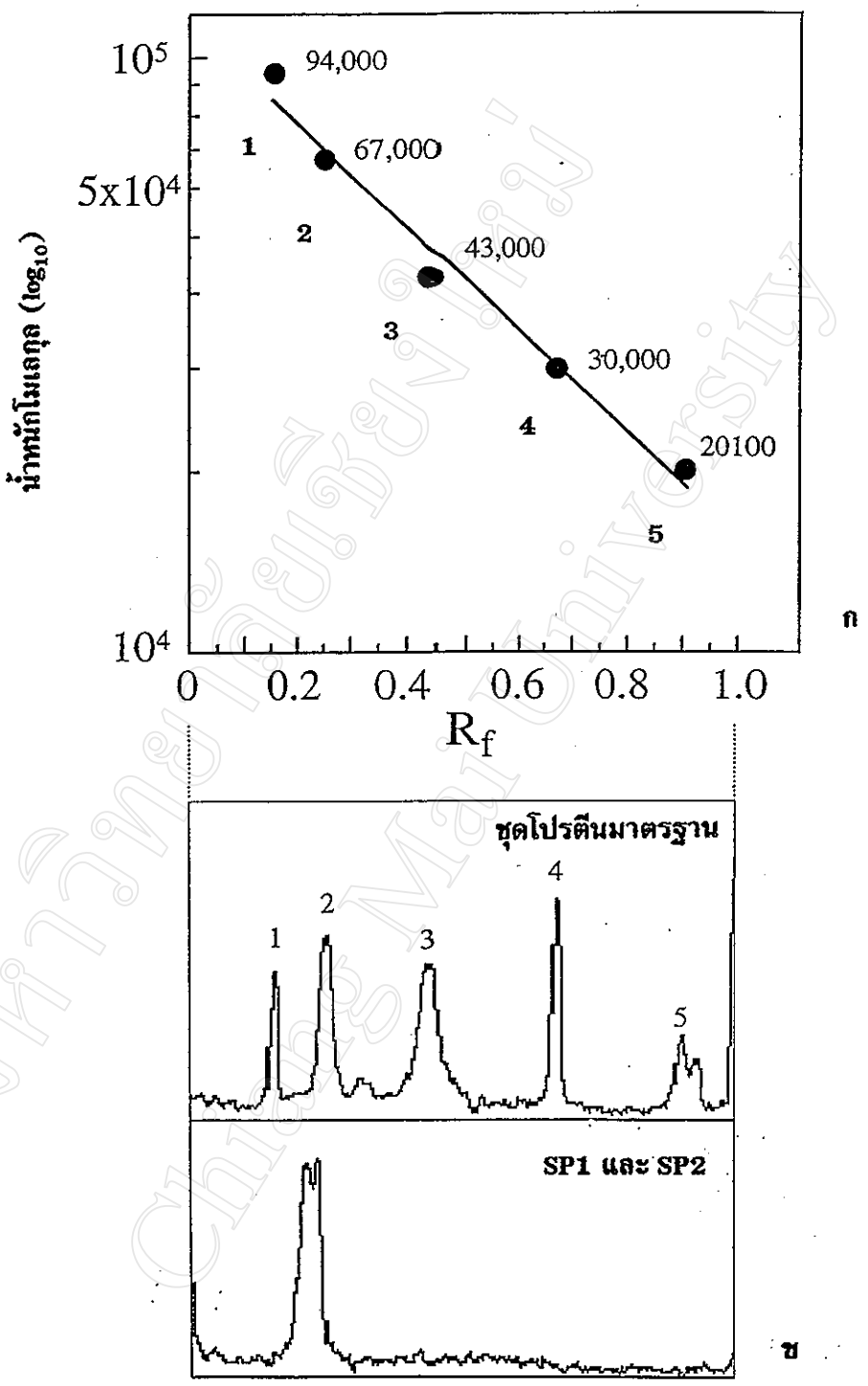
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพ 23 การเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียหลังจากหยด JHA 1 μg

ก. ปริมาณโปรตีนจากปริมาณฮีโมลิมพ์ 4 ไมโครลิตร

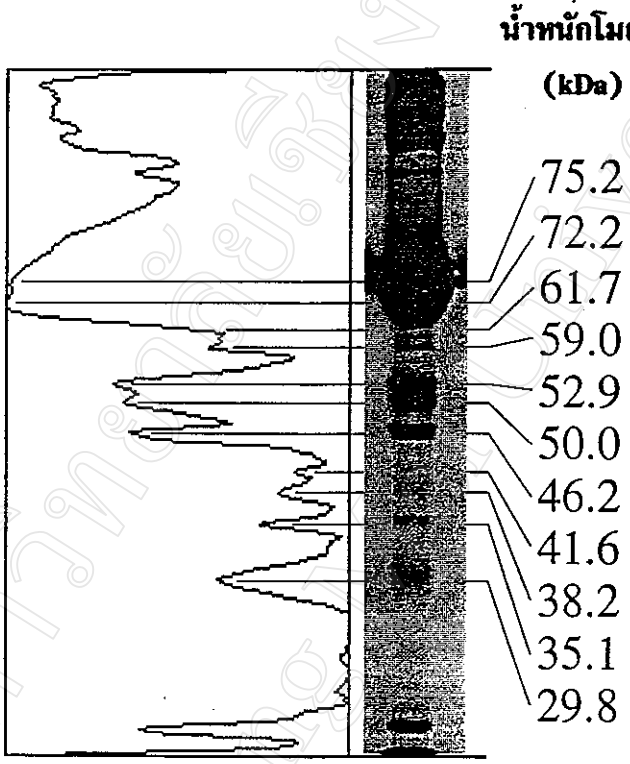
ข. ปริมาณโปรตีนจากปริมาณฮีโมลิมพ์ที่เจือจาง 20 เท่า



ภาพ 23 การเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียหลังจากหยด JHA 1 µg

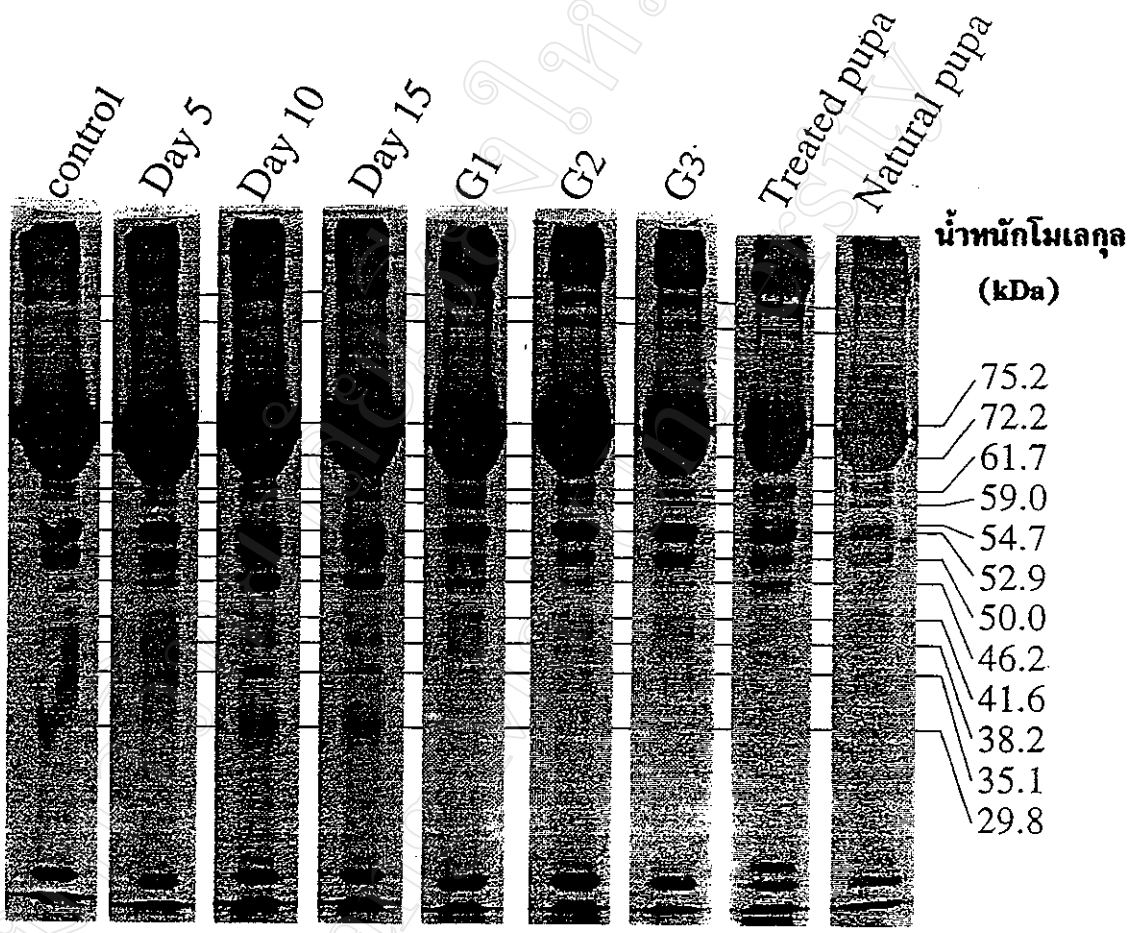
ก. ปริมาณโปรตีนจากปริมาณฮีโมลิมพ์ 4 ไมโครลิตร

ข. ปริมาณโปรตีนจากปริมาณฮีโมลิมพ์ที่เจือจาง 20 เท่า

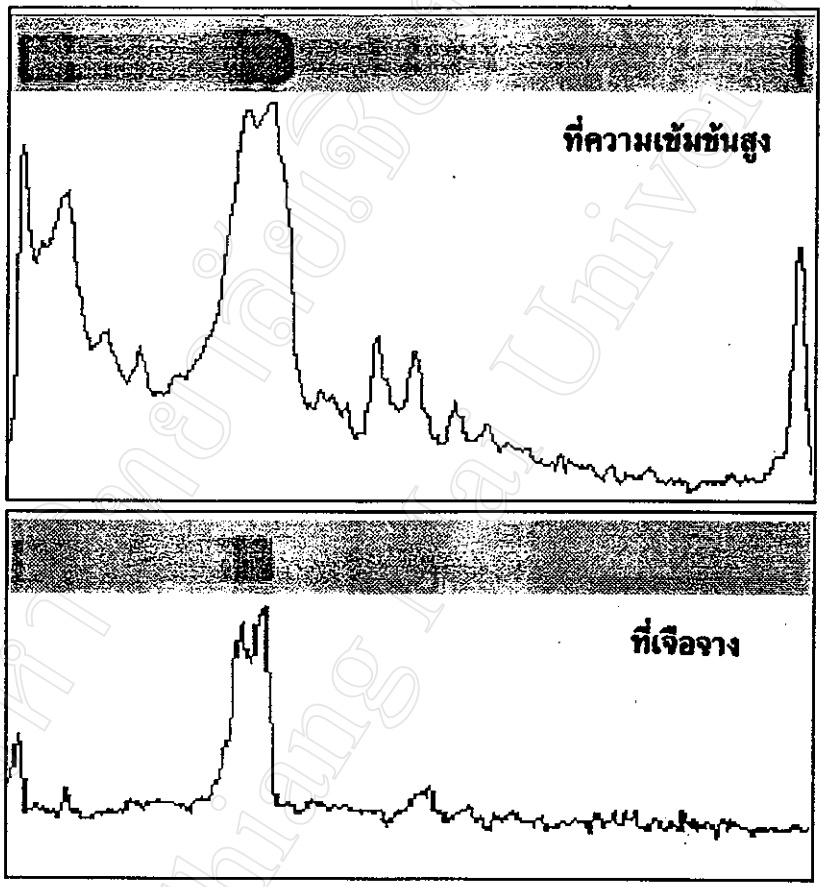


ภาพ 25 แสดงปริมาณของชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ตามลำดับน้ำหนักโมเลกุลในทนอนเยื่อไผ่เพศเมียที่ทยด JHA แล้ว 15 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

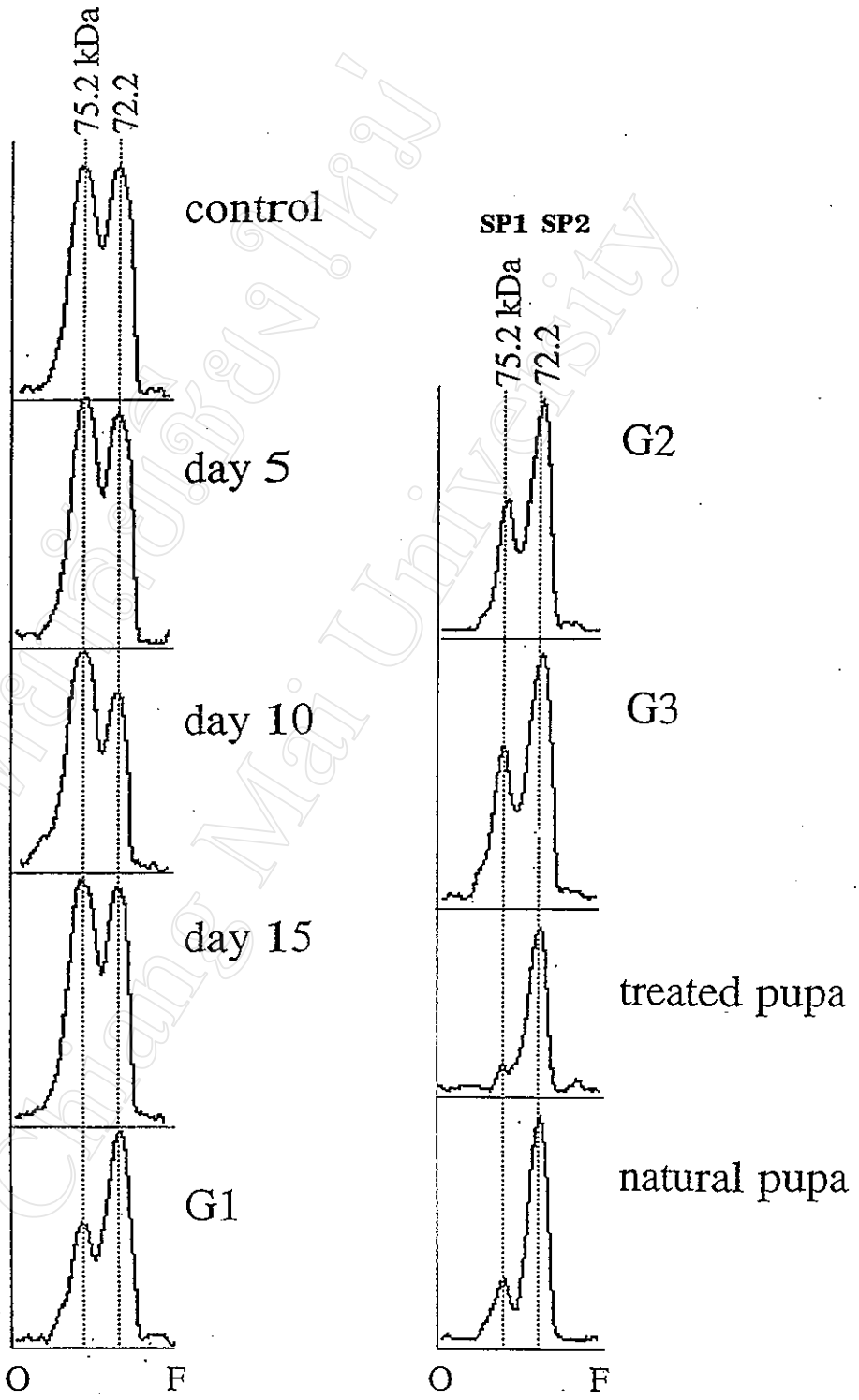


ภาพ 26 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์หนอนเยื่อไผ่เพศเมียหลังจากหยด JHA 1 μg

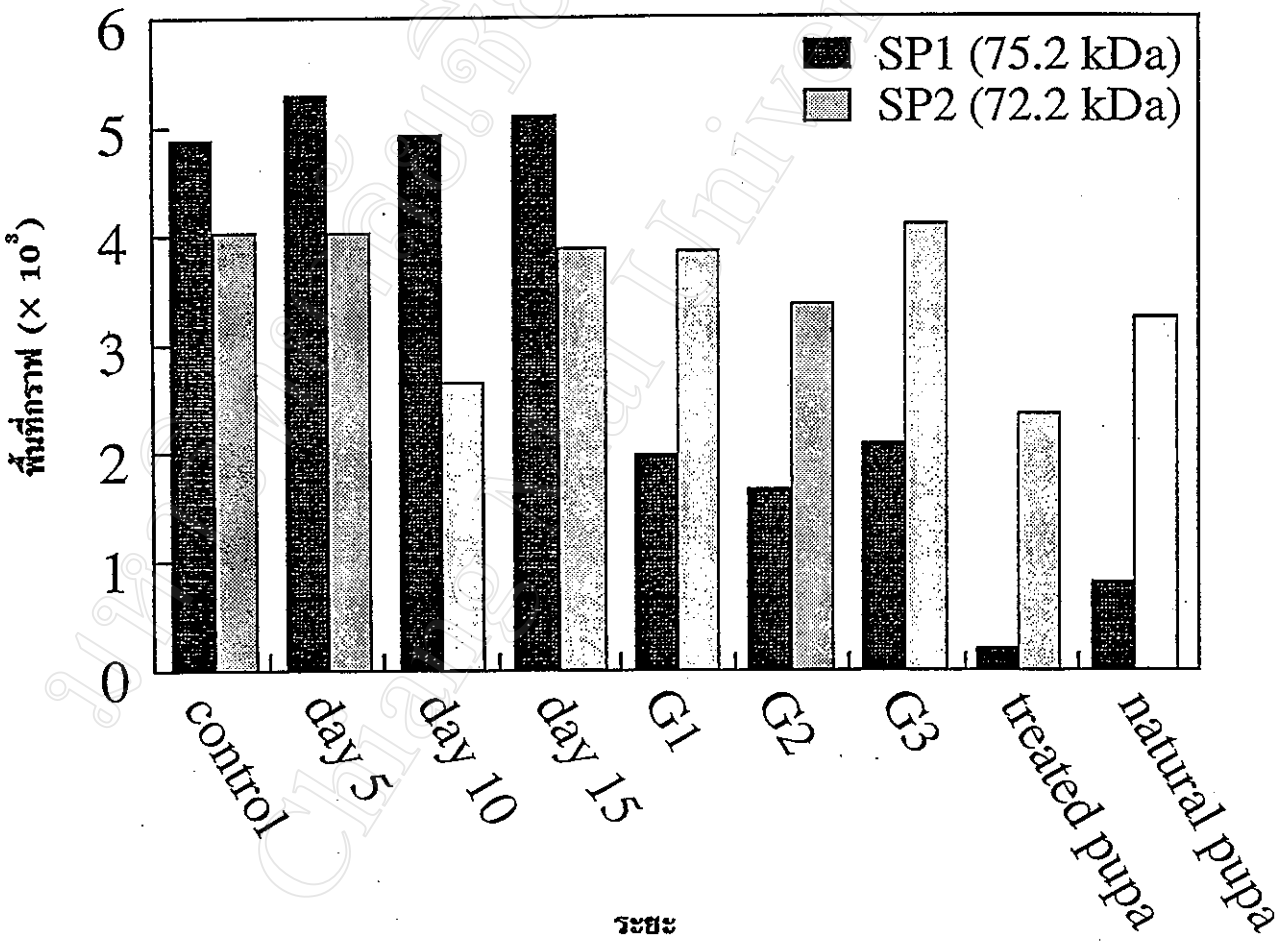


ภาพ 27 การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณของชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ระหว่างที่ความเข้มข้นสูงและที่เจือจางของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียระยะ G3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



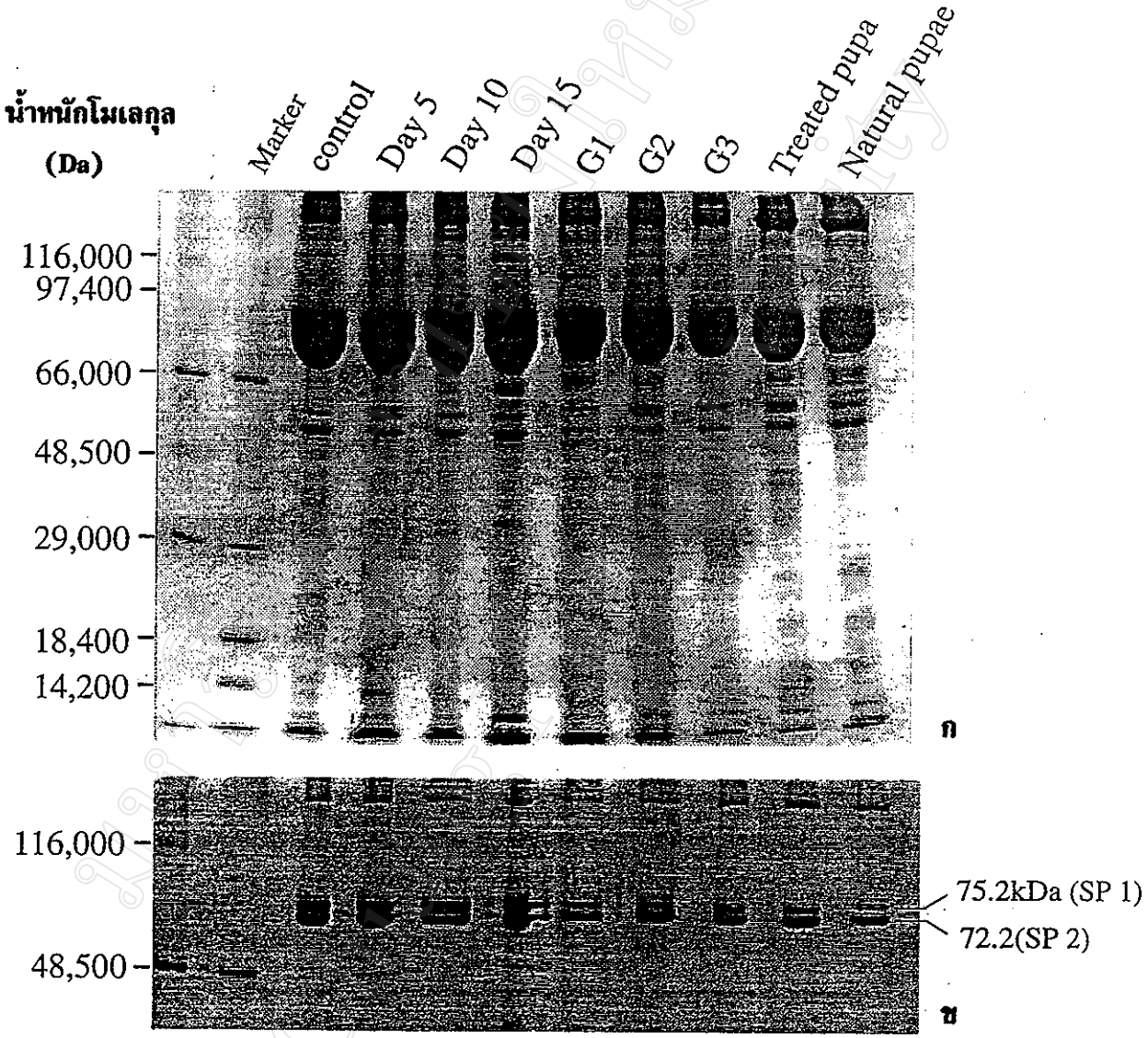
ภาพ 28 เปรียบเทียบปริมาณของ SP1 และ SP2 ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียหลังจากหยด JHA 1 µg



ภาพ 29 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ SP1 และ SP2 ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศเมียหลังจากหยด JHA 1 µg

ส่วนโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศผู้มีความคล้ายคลึงกันในแต่ละระยะและพบลักษณะของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นคล้ายกับโปรตีนที่พบในฮีโมลิมพ์ของเพศเมียเช่นเดียวกัน โดยพบโปรตีนที่มีแถบขนาดใหญ่ สีเข้มที่น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 66,000 ถึง 97,000 ดาลตัน ส่วนโปรตีนที่พบต่ำจากน้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน ลงมา แถบจะมีขนาดเล็กลง สีจางกว่า แสดงว่ามีปริมาณของโปรตีนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพ 30ก) จากการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดที่พบในแต่ละระยะ พบโปรตีนทั้งหมด 11 ชนิด โดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 75.2 ถึง 25.5 กิโลดาลตัน (ภาพ 31) เมื่อนำปริมาณฮีโมลิมพ์ มาเจือจางประมาณ 20 เท่าเพื่อวิเคราะห์หาโปรตีน SP1 และ SP2 ที่น้ำหนักโมเลกุล 75.5 และ 72.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ พบว่า ตั้งแต่ระยะไดอะพอส day5 จนถึง day15 ของการทดลอง สามารถพบ SP1 และ SP2 ได้ทุกระยะ แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ G1, G2 และ G3 แถบของ SP1 จางลงเล็กน้อยเช่นเดียวกับใน treated pupa ส่วนใน natural pupa แถบของ SP1 จางลงมากจนเกือบหายไปในขณะที่ SP2 ยังคงพบได้ทุกระยะ (ภาพ 30ข) เมื่อนำเฉพาะโปรตีน SP1 และ SP2 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณระหว่างระยะไดอะพอสกับระยะที่ถูกชักนำโดยฮอร์โมน พบว่า ระยะไดอะพอส พบปริมาณของ SP1 เท่ากับ SP2 และยังคงมีปริมาณใกล้เคียงกันตลอดระยะ 15 วันแรกหลังจากหยด JHA แต่เมื่อหนอนเข้าสู่ระยะ G1 ปริมาณของโปรตีนทั้งสองลดลงอย่างเห็นได้ชัดโดยพบปริมาณของ SP1 น้อยกว่าปริมาณของ SP2 ส่วนในระยะ G2 และ G3 ก็เช่นกัน ปริมาณของ SP1 ลดลงกว่าของ SP2 เล็กน้อย เมื่อหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ที่ได้จากการทดลอง ปริมาณของ SP1 ลดลงจากของ SP2 มากกว่าที่พบในระยะการเปลี่ยนแปลง G ต่าง ๆแต่ปริมาณของ SP1 จะลดต่ำกว่า SP2 มากที่สุดในระยะดักแด้จากธรรมชาติ (ภาพ 32) เมื่อนำปริมาณ SP1 และ SP2 จากระยะต่าง ๆมาพล็อตเป็นพื้นที่กราฟเพื่อสังเกตความแตกต่างของปริมาณในแต่ละชนิดของแต่ละระยะ พบว่า ปริมาณ SP2 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในทุกระยะของการทดลอง ในขณะที่ของ SP1 พบการเปลี่ยนแปลงได้มากกว่าโดยตั้งแต่ในระยะไดอะพอสจนถึงระยะ 15 วันหลังจากหยด JHA จะพบปริมาณ SP1 มาก มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากระยะไดอะพอส แต่เมื่อเข้าสู่ระยะการเปลี่ยนแปลง G ต่าง ๆ ปริมาณ SP1 มีแนวโน้มลดลง จนพบน้อยที่สุดที่ natural pupa แต่เมื่อนำปริมาณ SP1 ที่พบแตกต่างกันในแต่ละระยะคิดค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 33)

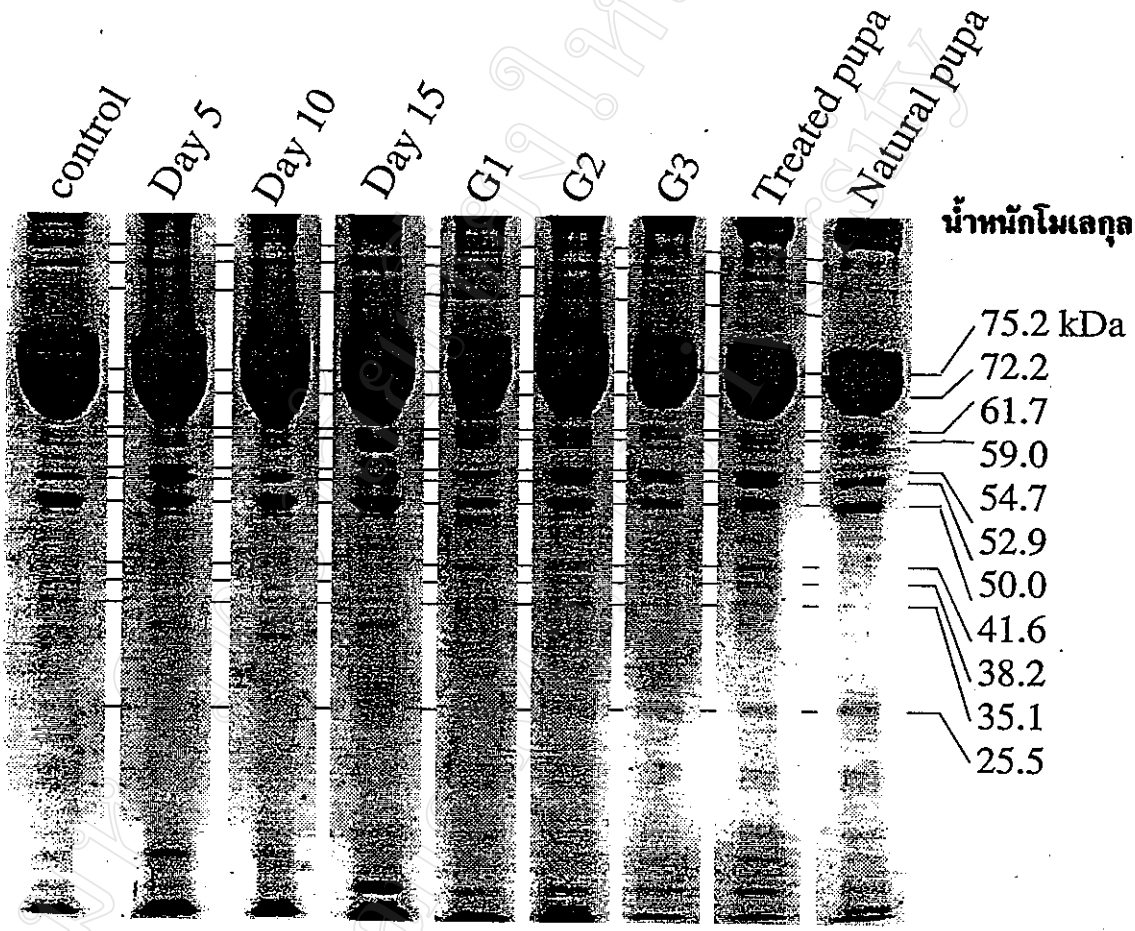
จากชนิดโปรตีนที่พบในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่ทั้งเพศผู้และเพศเมียนั้น พบว่า ในระยะไดอะพอส ระยะ day5, day10 และ day15 ของการทดลอง ปริมาณและความหนาแน่นของ SP1 และ SP2 ที่พบมีความแตกต่างกันน้อยมากแต่จะเริ่มเห็นความแตกต่างในระยะการเปลี่ยนแปลง G ต่าง ๆและความแตกต่างจะเด่นชัดมากยิ่งขึ้นเมื่อหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้



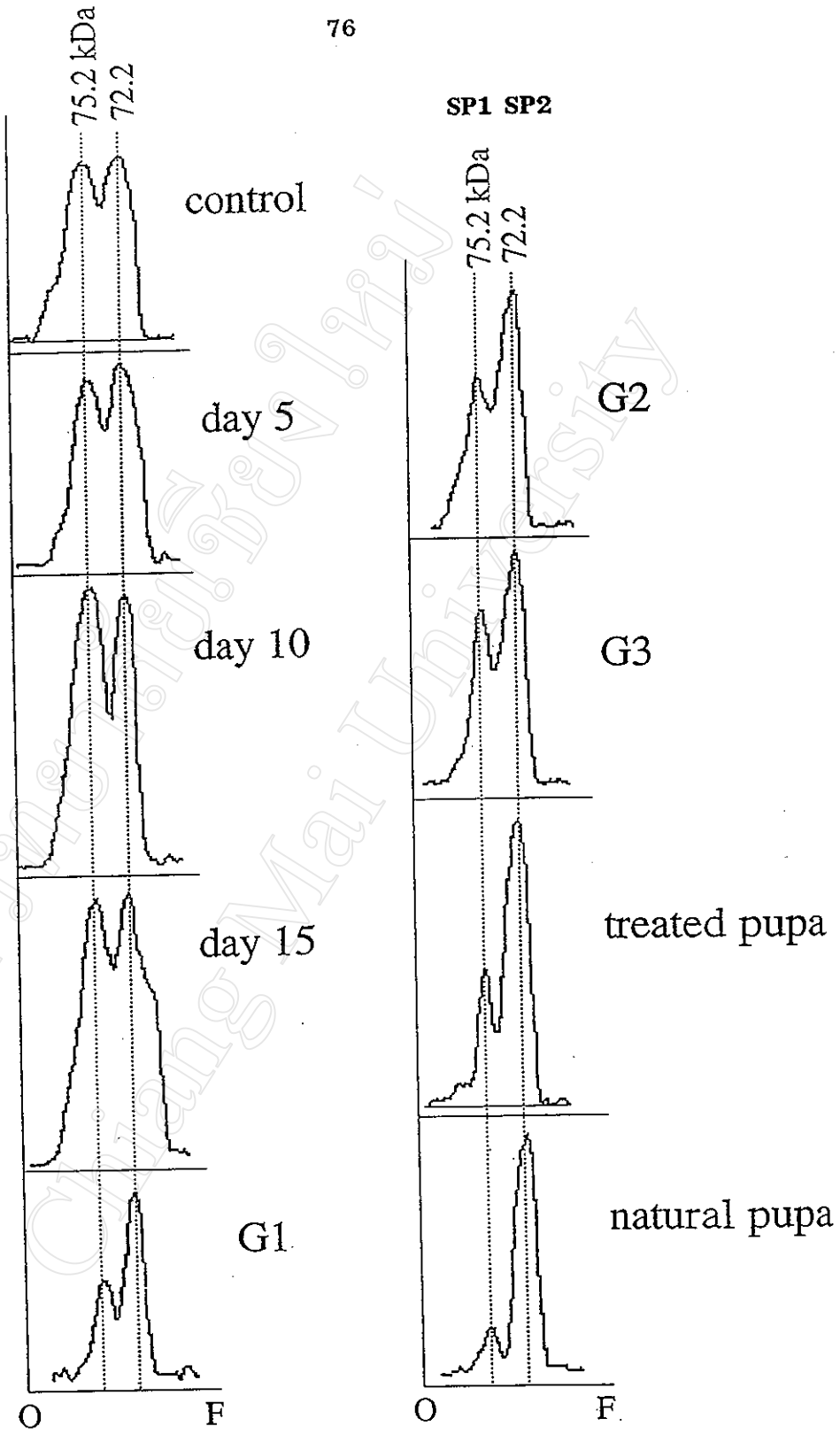
ภาพ 30 การเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ในหนอนเยื่อไผ่เพศผู้หลังจากหยด JHA 1 µg

ก. ปริมาณโปรตีนจากปริมาณฮีโมลิมพ์ 4 ไมโครลิตร

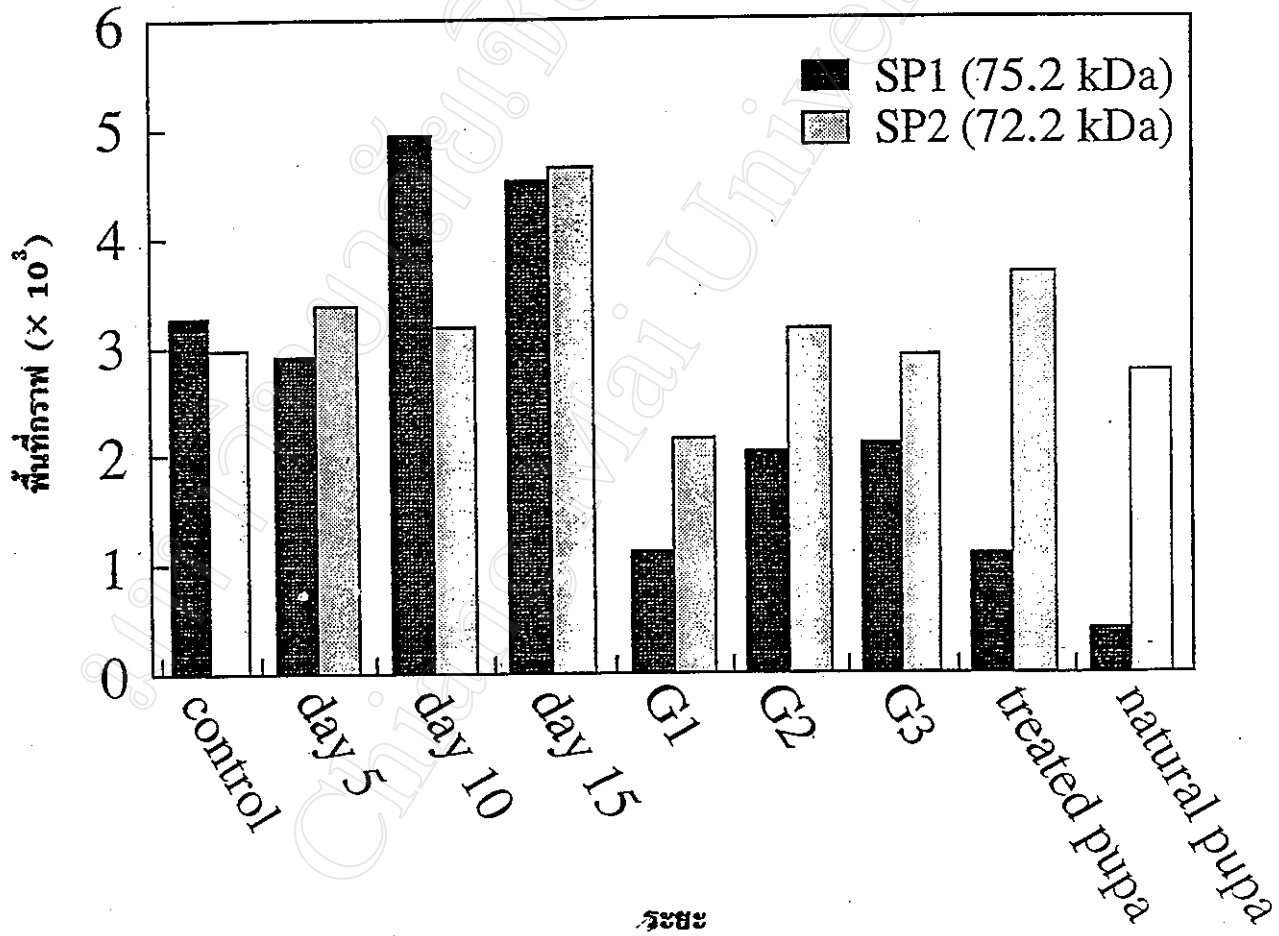
ข. ปริมาณโปรตีนจากปริมาณฮีโมลิมพ์ที่เจือจาง 20 เท่า



ภาพ 31 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศผู้หลังจากหยด JHA 1 µg



ภาพ 32 เปรียบเทียบปริมาณของ SP1 และ SP2 ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศผู้หลังจากหยด JHA 1 µg



ภาพ 33 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ SP1 และ SP2 ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่เพศผู้หลังจากหยด JHA 1 µg

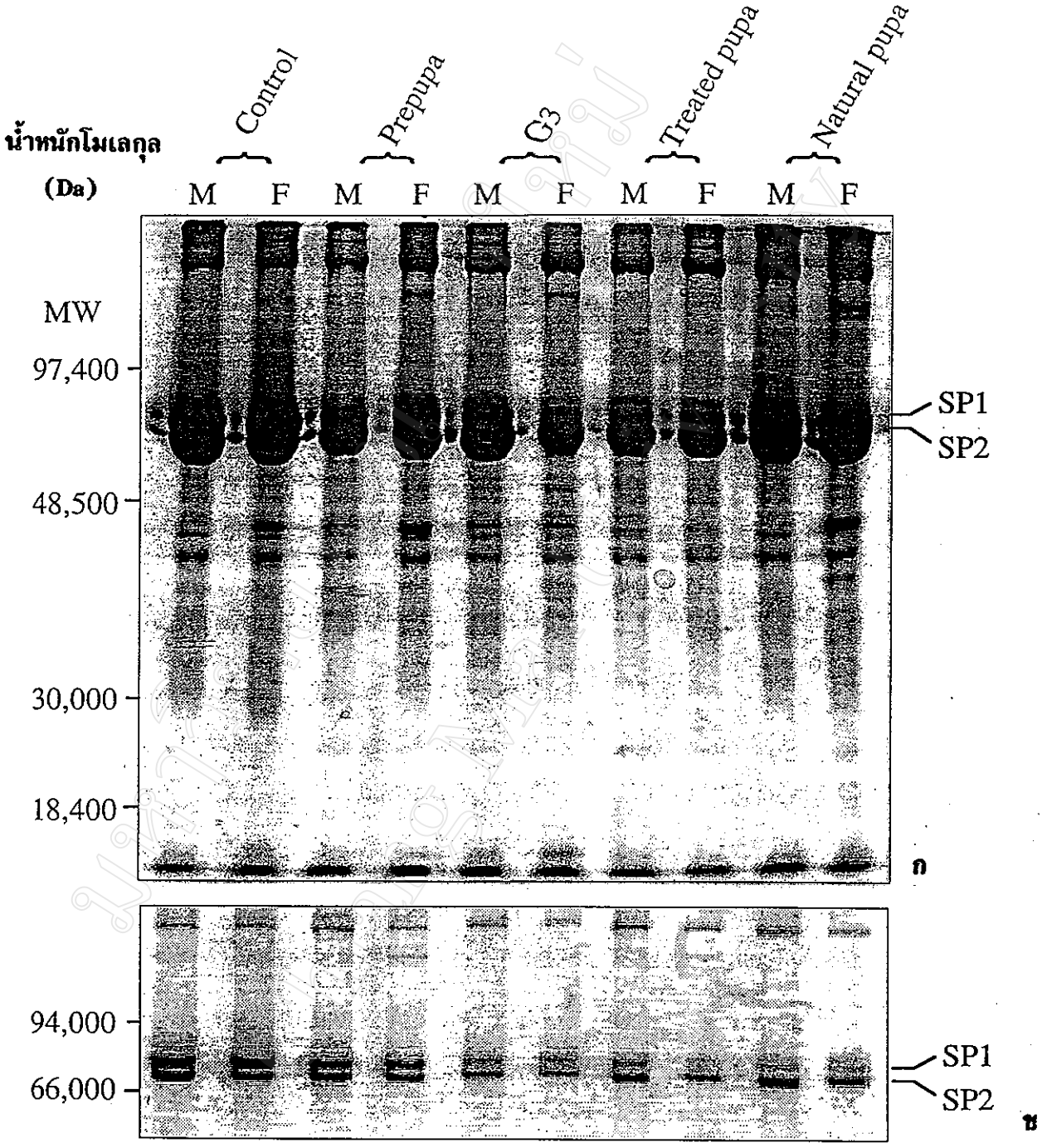
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

เพื่อแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของ SP1 และ SP2 และโปรตีนบางชนิดที่พบได้เฉพาะเพศจึงเลือกฮีโมลิมพ์ระยะที่หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะอย่างชัดเจนมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับระยะไดอะพอส ซึ่งก็ได้แก่ ระยะ prepupa เป็นระยะที่หนอนหยุดการเคลื่อนไหว ลักษณะลำตัวแข็งและระยะ G3 เป็นระยะที่หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงสีผิวลำตัวมีสีส้มอมน้ำตาลทั่วตัว เทียบได้กับการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ในธรรมชาติ ระยะ treated pupa เป็นระยะดักแด้ของหนอนที่เกิดจากการชักนำโดยการหยด JHA และระยะ natural pupa เป็นระยะดักแด้ของหนอนตามธรรมชาติ ในการแยกชนิดโปรตีนใช้ปริมาณฮีโมลิมพ์ 4 ไมโครลิตรเช่นเดียวกัน เมื่อแยกชนิดโปรตีนแล้วจะได้รูปแบบของเจลดังภาพ 34ก เมื่อนำฮีโมลิมพ์ มาเจือจางประมาณ 20 เท่าแล้วแยกชนิดโปรตีนเพื่อดูความแตกต่างของ SP1 และ SP2 พบว่า ในระยะไดอะพอสและระยะ prepupa ยังคงพบ SP1 และ SP2 ได้ทั้งสองเพศ แต่ในระยะ G3 แถบของ SP1 จางลงกว่าของ SP2 อย่างเห็นได้ชัดในทั้งสองเพศ ส่วนใน treated pupa และ natural pupa เพศเมียไม่พบแถบของ SP1 ขณะที่ในเพศผู้ยังสังเกตพบอยู่เล็กน้อย ส่วนแถบของ SP2 พบได้ในทั้งสองเพศแต่ในเพศผู้แถบมีสีเข้มกว่า (ภาพ 34ข) เมื่อนำชนิดโปรตีนที่ได้มาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่ามีโปรตีนทั้งหมด 11 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 35.1-75.2 กิโลดาลตัน (ภาพ 35) เมื่อนำเฉพาะโปรตีนในฮีโมลิมพ์ที่พบในระยะไดอะพอสของทั้งสองเพศมาวิเคราะห์เปรียบเทียบถึงชนิดโปรตีนตามปริมาณที่พบ พบว่า ส่วนมากพบโปรตีนคล้ายกัน มีปริมาณของโปรตีนเท่า ๆกัน แต่นอกเหนือจาก SP1 และ SP2 ที่พบเป็นโปรตีนหลักแล้วยังพบโปรตีนที่มีความเด่นชัดของระดับปริมาณขึ้นมาอีกเพศละ 3 ชนิด นั่นคือ แถบเส้นแรกมีปริมาณสูงขึ้นในเฉพาะเพศเมีย จึงเรียก female specific protein หรือ FSP ส่วนแถบที่สองพบปริมาณสูงขึ้นในเฉพาะเพศผู้ จึงเรียก male specific protein หรือ MSP และในแถบถัดมาพบว่าปริมาณของโปรตีนสูงขึ้นทั้งในเพศผู้และเพศเมีย จัดเป็น common protein (ภาพ 36)

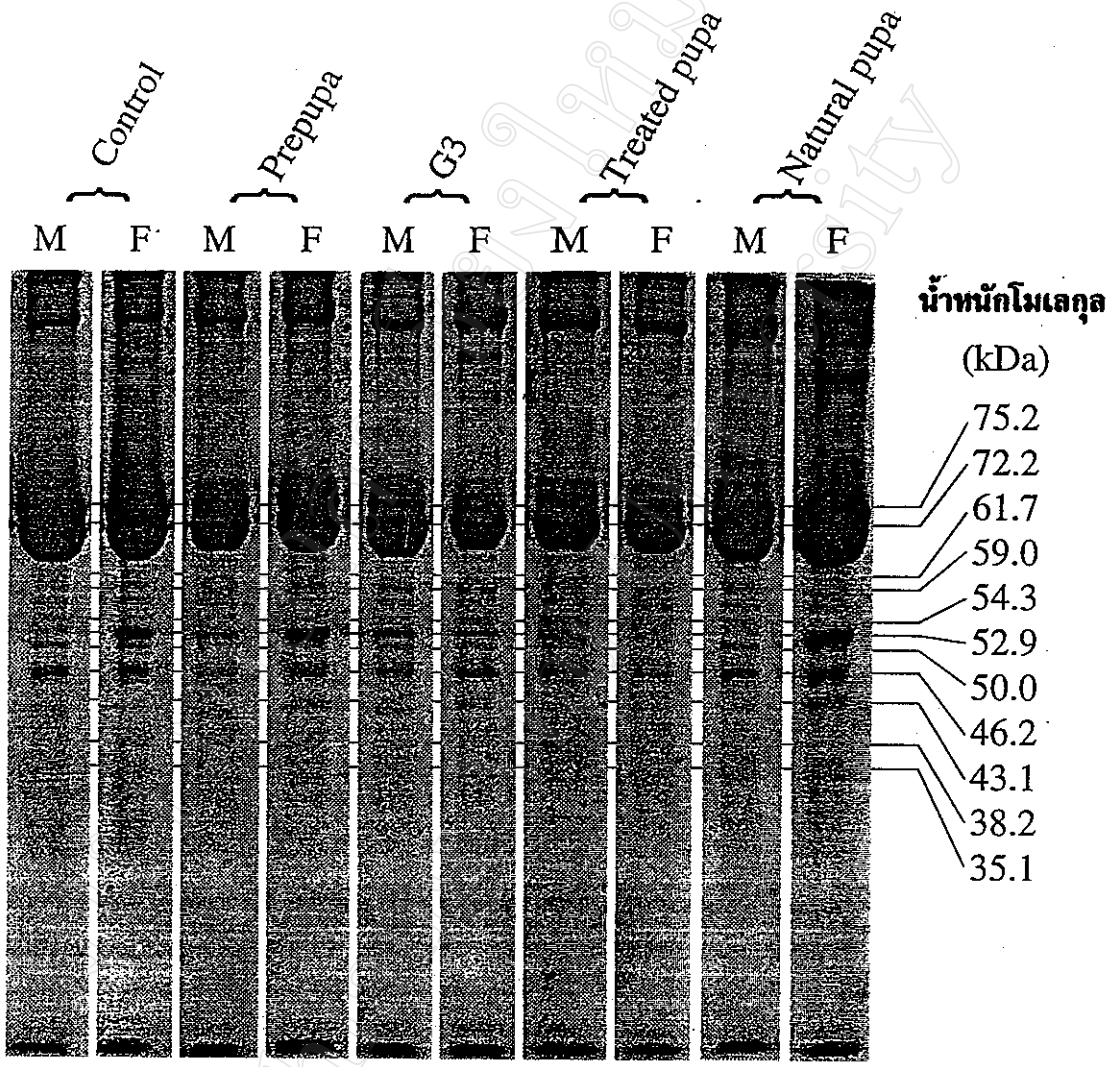
เมื่อนำโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของระยะ natural pupa เป็นตัวเปรียบเทียบกับโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของระยะไดอะพอส พบว่า MSP ในเพศผู้ระยะไดอะพอสมีน้ำหนักโมเลกุล 52.9 กิโลดาลตัน เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ ยังคงพบ MSP ได้เช่นเดิม แสดงว่าไม่มีการเพิ่มหรือลด MSP แต่อย่างใด ส่วนในเพศเมียระยะไดอะพอส FSP มีน้ำหนักโมเลกุล 54.7 กิโลดาลตัน แต่เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้กลับพบ FSP ขึ้นมาอีก 1 ชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล 46.2 กิโลดาลตัน แสดงว่าในระยะไดอะพอสพบ FSP เพียง 1 ชนิดแต่ในระยะดักแด้จะพบเพิ่มเป็น 2 ชนิด ส่น common protein สามารถพบได้ในทั้งสองเพศและทั้งสองระยะ (ภาพ 37) เมื่อนำเฉพาะโปรตีน SP1 และ SP2 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบถึงความแตกต่างของปริมาณที่มีอยู่ในแต่ละระยะ พบว่า ในเพศเมีย SP1 เริ่มลดปริมาณลงในระยะ prepupa และลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเข้าสู่ระยะ G3 จนหายไปในระยะ treated pupa แต่ใน natural pupa มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ส่วนในเพศผู้ มี

ปริมาณของ SP1 ลดลงในระยะ G3 และระยะ treated pupa และลดลงมากที่สุดในระยะ natural pupa ส่วนปริมาณของ SP2 ค่อนข้างคงที่ พบได้ในทุกระยะของทั้งสองเพศ (ภาพ 38)และในทำนองเดียวกันเมื่อนำปริมาณ SP1 และ SP2 พล็อตเป็นพื้นที่กราฟเทียบกับระยะต่าง ๆในทั้งสองเพศ พบว่า ในระยะไดอะพอสและระยะ prepupa ของทั้งสองเพศมีความแตกต่างของปริมาณ SP1 และ SP2 ไม่ชัดเจน แต่ในระยะ G3 ระยะ treated pupa และระยะ natural pupa พบความแตกต่างชัดเจนมากขึ้นโดยปริมาณของ SP1 น้อยกว่าของ SP2 อย่างเห็นได้ชัดในทั้งสองเพศ แสดงว่า ในเพศเมีย จากระยะไดอะพอส ปริมาณ SP1 มีแนวโน้มลดลงจนมีค่าต่ำที่สุดในระยะ treated pupa และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในระยะ natural pupa ส่วนในเพศผู้เช่นเดียวกัน ปริมาณ SP1 มีแนวโน้มลดลงทั้งในระยะ treated pupa และระยะ natural pupa แต่ก็ยังพบสูงกว่าในเพศเมีย ส่วน SP2 ยังคงมีปริมาณใกล้เคียงกับในระยะแรก ๆ (ภาพ 39)

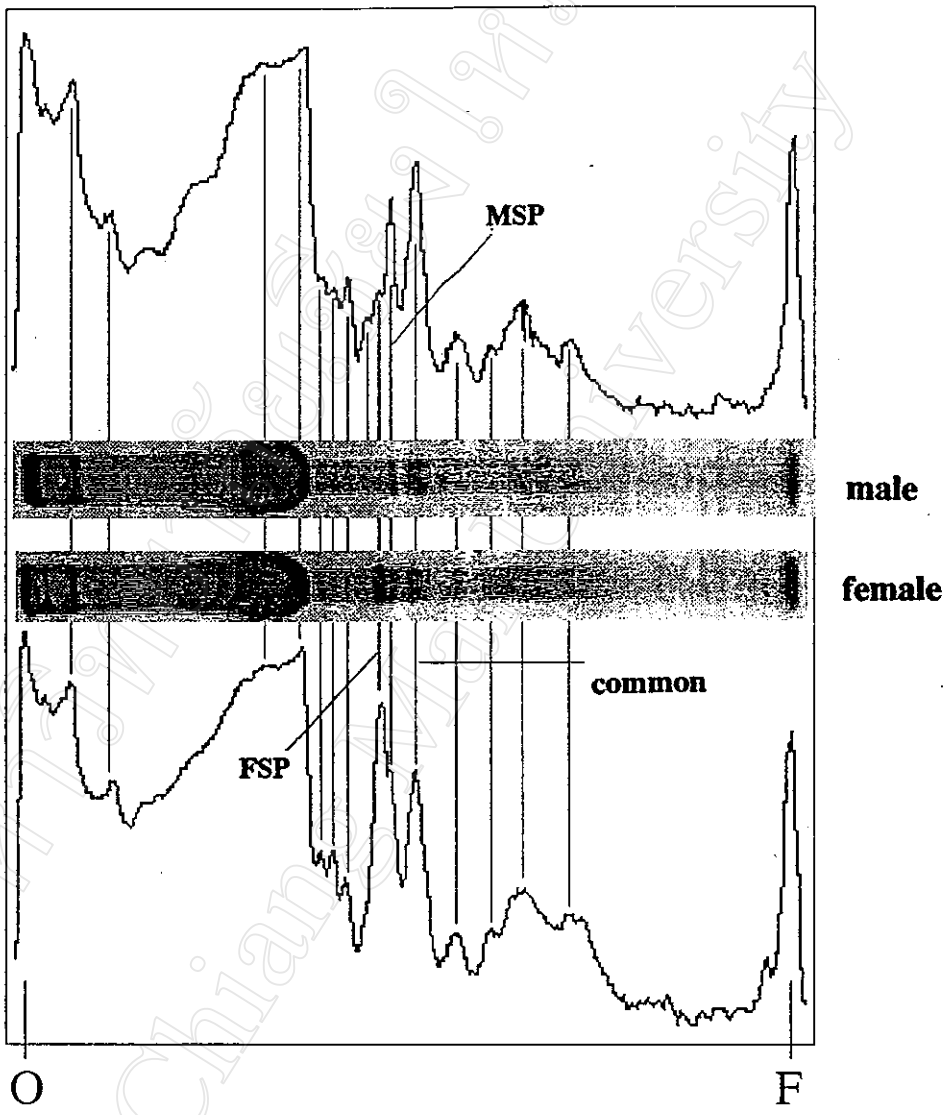
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



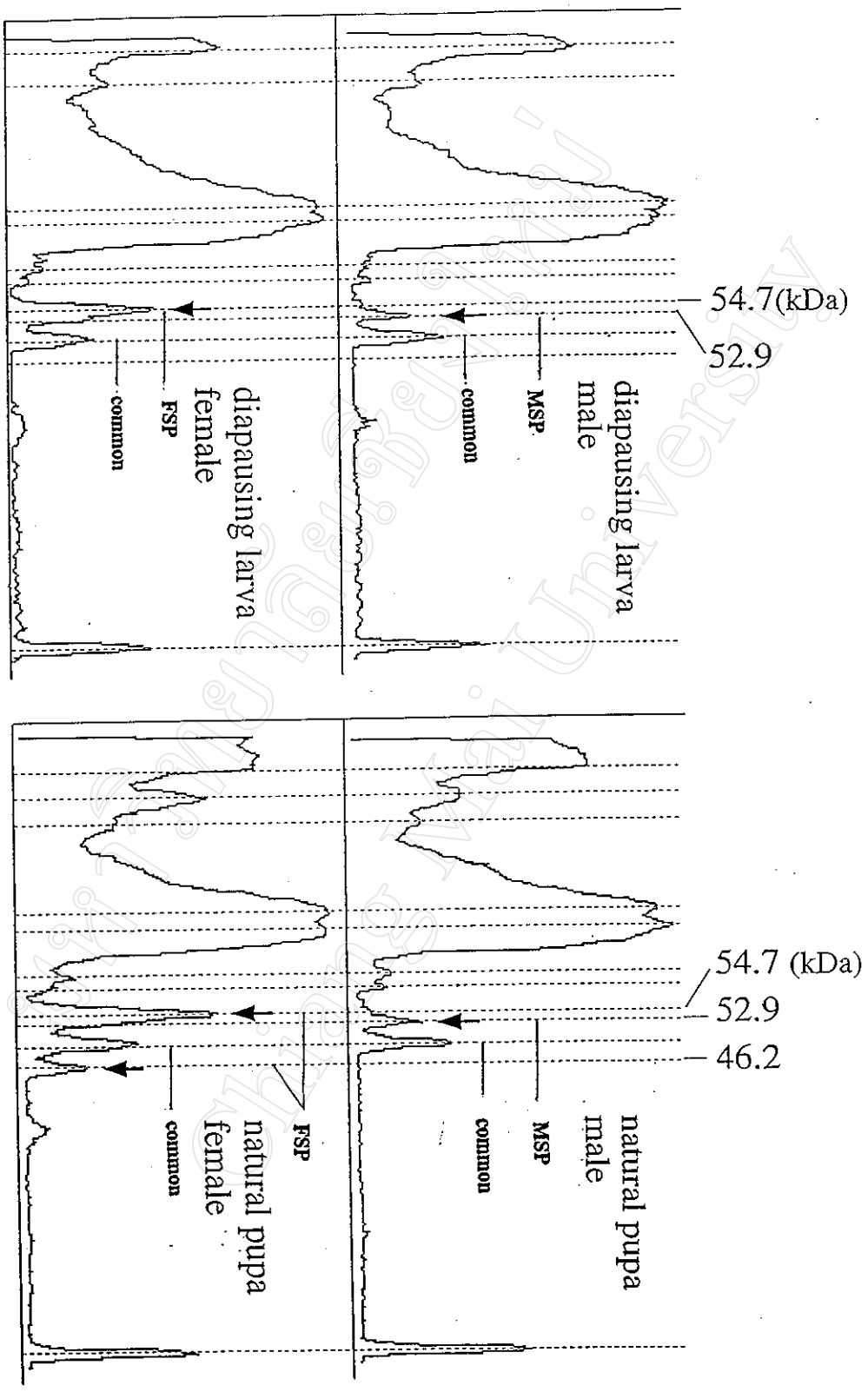
ภาพ 34 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส และกลุ่มที่หยด JHA 1 µg ทั้งเพศผู้และเพศเมีย
ก. ปริมาณโปรตีนจากปริมาณฮีโมลิมพ์ 4 ไมโครลิตร
ข. ปริมาณโปรตีนจากปริมาณฮีโมลิมพ์ที่เจือจาง 20 เท่า



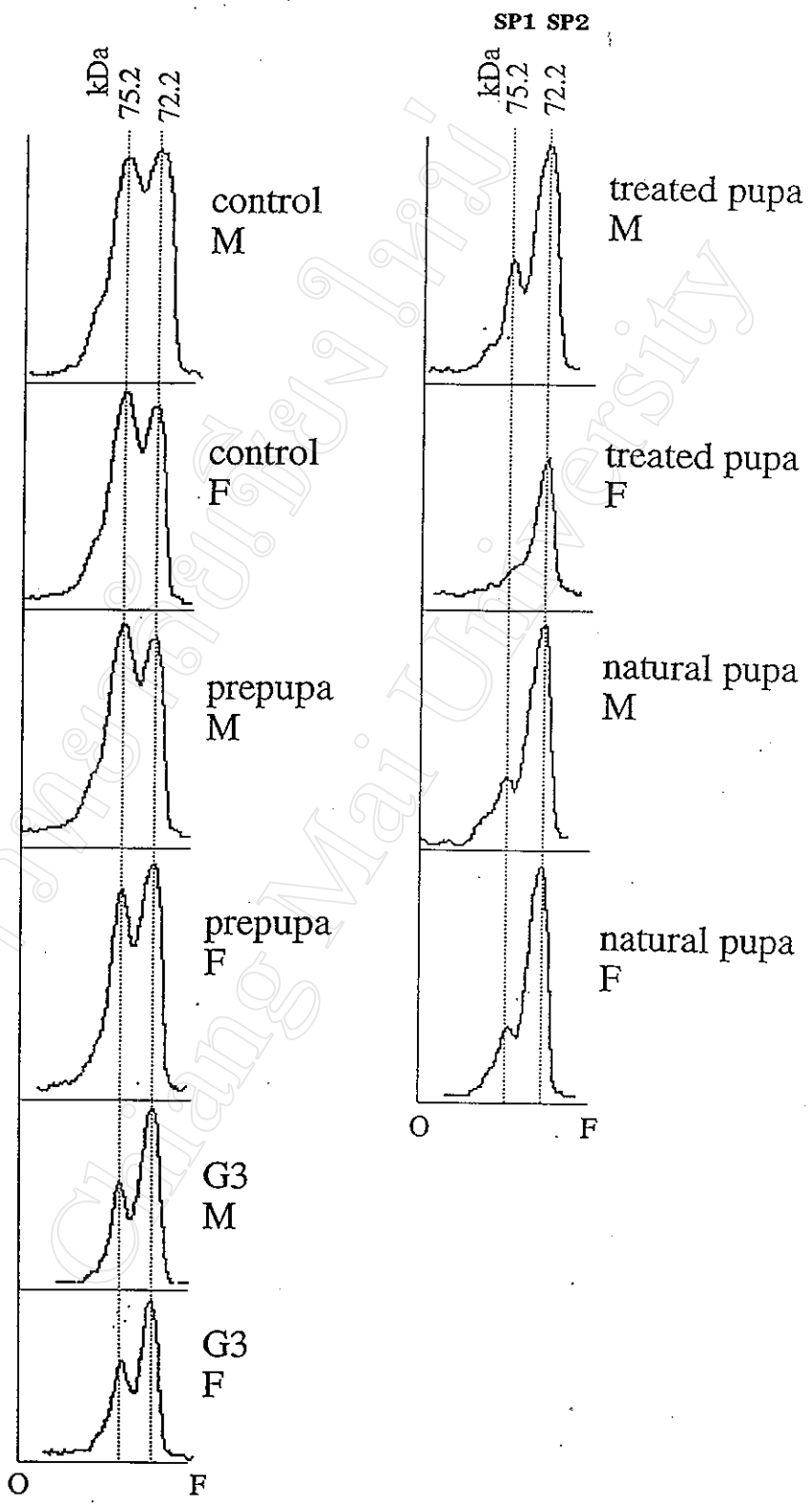
ภาพ 35 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสและกลุ่มที่หยด JHA 1 μg ทั้งเพศผู้และเพศเมีย



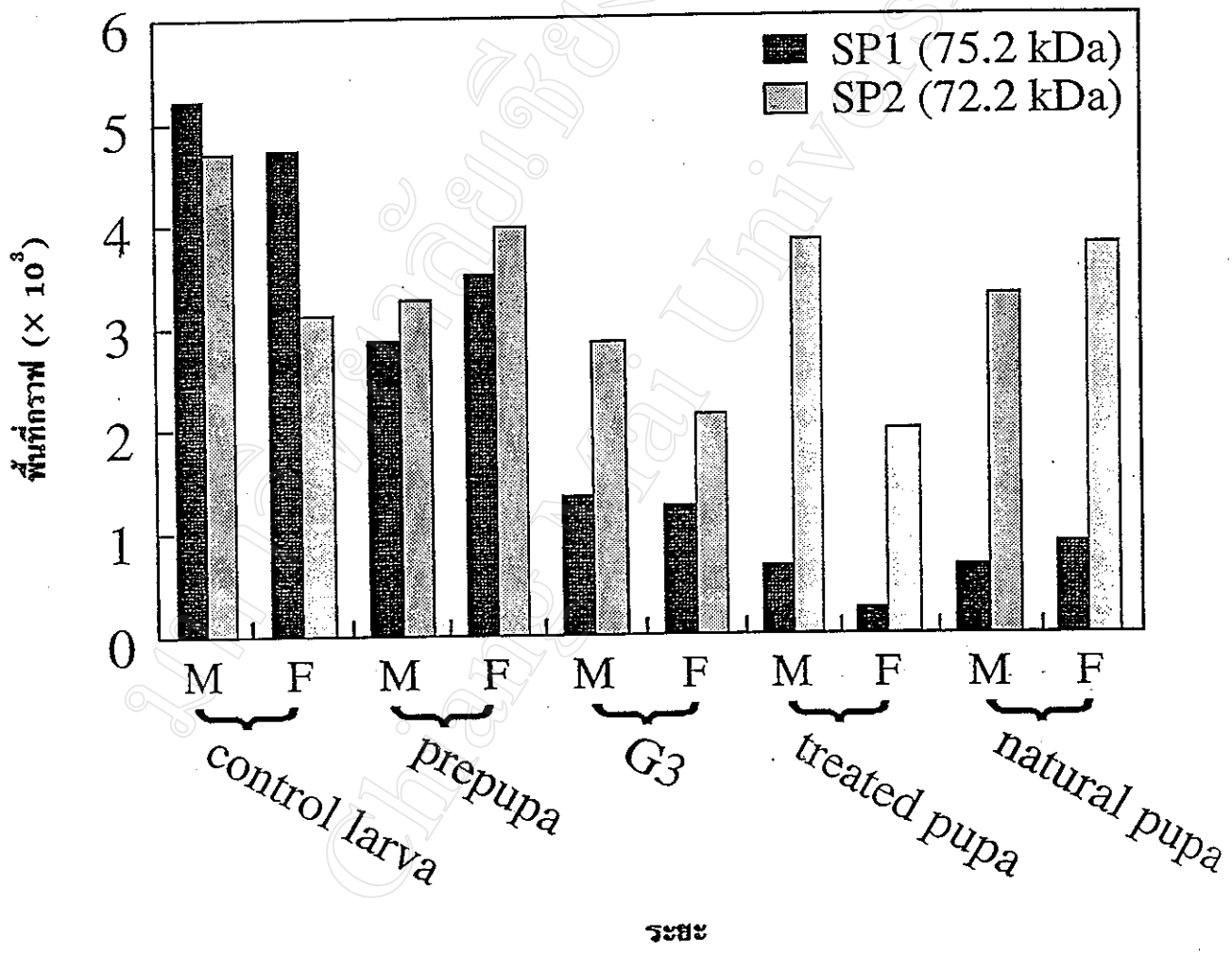
ภาพ 36 การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณของชนิดโปรตีนในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสทั้งเพศผู้และเพศเมีย



ภาพ 37 เปรียบเทียบชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ที่พบเฉพาะเพศของหนอนเชื่อไผ่ระยะไดอะพอสและดักแด้จากธรรมชาติ



ภาพ 38 เปรียบเทียบความหนาแน่นของ SP1 และ SP2 ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสและกลุ่มที่หยด JHA 1 µg ทั้งเพศผู้และเพศเมีย



ภาพ 39 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ SP1 และ SP2 ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่ ระยะไดอะพอสและกลุ่มที่ทอด JHA 1 µg ทั้งเพศผู้และเพศเมีย