RSA4480003 รศ.ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการบทบาทของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

Roles of juvenile hormone on the development of the larval diapause of the bamboo borer, *Omphisa sp.*

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

าควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

30 พฤศจิกายน 2546

สัญญาเลขที่ RSA/03/2544

ห้องสมุด
สกว.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการบทบาทของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

Roles of juvenile hormone on the development of the larval diapause of the bamboo borer, *Omphisa sp.*

รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลงได้โดยได้รับทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย จากแห่งประเทศไทย เป็นระยะเวลา 3 ปี(พศ. 2544-2546) ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้บริหารและเจ้าหน้าที่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยทุกท่านที่เล็งเห็นความสำคัญของงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานโดยให้การสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาของงานวิจัย

ขอขอบคุณกองทุนฮิตาชิ ประเทศญี่ปุ่นที่ให้สนับสนุนด้านเครื่องมือต่างๆ และขอขอบพระคุณ Prof. Sho Sakurai แห่งมหาวิทยาลัยคานาซาวาสำหรับการให้คำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับประชาชนทั่วไปที่สนใจ และจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญทางด้านต่อมไร้ท่อวิทยาของแมลงในประเทศไทยและจะทำให้เกิดการพัฒนางานวิจัยในสาขาวิชานี้ต่อไปในอนาคต

รศ.ดร.ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	RSA/03/2544
โครงการ	บทบาทของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส
ชื่อนักวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ
	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
E-mail Address :	scboi020@chiangmai.ac.th
ระยะเวลาโครงการ	1 ธันวาคม 2543-30 พฤศจิกายน 2546

ในช่วงระยะไดอะพอสของหนอนเยื่อไผ่พบว่า มีปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์น้อยมาก แสดงว่าต่อมโปรทอแรกซิกมีกิจกรรมการหลั่งฮอร์โมน (secretory activity) ต่ำ งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าการให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (JHA) แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส สามารถชักนำให้เกิดการเข้าดักแด้ได้โดยเกิดการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกและไม่เกี่ยวข้องกับสมอง โดยหลังจากการให้ JHA พบว่ากิจกรรมการหลั่งฮอร์โมนของต่อมเพิ่มขึ้น จนเป็นผลให้ปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนเพิ่มขึ้นภายใน 2 สัปดาห์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า JHA อาจไม่ได้กระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกให้สังเคราะห์ฮอร์โมนเอคไดโซนได้โดยตรง ดังนั้นเพื่ออธิบายกลไกของ JHA ในการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิก จึงได้ทำการศึกษาถึงปริมาณ JHA ที่น้อยที่สุดที่สามารถกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกได้ โดยการให้ JHA ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตรในอะซิโตน แล้วทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก (transplantation) ของ donor larvae ให้กับหนอนที่ไม่ได้รับฮอร์โมน (recepient larvae) ในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากการให้ฮอร์โมน แล้วสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของ recepient larvae จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาการกระตุ้นของ JHA สำหรับการชักนำการเข้าดักแด้ ใช้เวลาอย่างน้อย 1 วัน และปริมาณ JHA ที่ให้ผลดีที่สุด คือ 1 ไมโครกรัม นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของต่อมโปรทอแรกซิก จะเพิ่มขึ้นในวันที่ 16 หลังจากการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก เป็นผลให้ปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า JHA กระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกของ donor larvae และปริมาณฮอร์โมนจากต่อมของ donor larvae มีผลไปกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกของ recepient larvae (recepient PG) ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ ดังนั้น recepient PG ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอคไดโซนที่หลั่งออกมา โดยผ่านกลไก positive feedback activation เมื่อปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนเหนือระดับ threshold หรือถึงระดับ suprathreshold ในการศึกษาการแสดงออกของ EcR mRNA ของหนอนเยื่อไผ่ และการทำ cloning *EcR* พบว่า *Omphisa EcR* มีขนาด 973 คู่เบส (กรดอะมิโน 324 ตัว) และมีความเหมือน (homology) ของnucleotide สูงเมื่อเทียบกับ *EcR* ของ common buckeye, *Junonia coenia* และ tobacco hornworm, *Manduca sexta* คือมีค่า 81.1% และ 80.9% ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบการแสดงออกของ EcR mRNA ของต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับและไม่ได้รับ JHA พบว่า มีการเพิ่มการแสดงออกของ *Omphisa* EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับการกระตุ้นด้วย JHA สูงกว่าหนอนในกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน

จากผลการทดลองดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่า JHA เกี่ยวข้องกับการสิ้นสุดของระยะลาร์วัลไดอะพอส ในหนอนเยื่อไผ่ โดยการเพิ่มระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์และเพิ่มการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิก

นอกจากนั้นการวิจัยครั้งนี้ยังศึกษาการตอบสนองต่อฮอร์โมนจูวีไนล์ของหนอนเยื่อไผ่ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 13, 20, 25 และ 30°C ซึ่งกลไกการทำงานของฮอร์โมนจูวีไนล์ที่ชักนำให้หนอนเข้าสู่ดักแด้ได้นั้นเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของต่อมโปรโทแรกซิกในการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนหลังจาก gut purge เพื่อกระตุ้นให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ดักแด้ ผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองนี้คือที่อุณหภูมิ 25°C และ 20°C ตามลำดับ แต่การตอบสนองต่อฮอร์โมนไม่ได้ผลดีที่อุณหภูมิที่ต่ำที่ 13°C หรือสูงเกินไปที่ 30°C ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิอาจเกี่ยวข้องกับการสิ้นสุดระยะลาร์วัลไดอะพอสของหนอนเยื่อไผ่และอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปสามารถยับยั้งการสิ้นสุดของระยะไดอะพอส

คำหลัก : bamboo borer, diapause, juvenile hormone, ecdysteroid, prothoracic gland

Abstract

Project Code: RSA/03/2544

Project Title: Roles of juvenile hormone on the development of the larval diapause of the bamboo borer, *Omphisa sp.*

Investigator : Associated Dr. Tippawan Singtripop

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

Project Period: 1 December 2000 - 30 November 2003

Bamboo borer is a moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson (Lepidoptera, Pyralidae) found in northern Thailand, Laos and Myanmar which have annual life cycle. Larval diapause period of the bamboo borer is the longest stage of the life cycle. During the diapause of the bamboo borer larvae, the ecdysteroid titer is very low and prothoracic glands (PG) exhibit low secretory activity.(Singtripop *et al* . 1999) An application of JH analogue (JHA) induce pupation with an activation of the PG. Previous result shows that the brain is not involve in the PG activation by JHA. After JHA treatment, the PG activity increases several days and hemolymph ecdysteroid increases in two weeks, indicating that JHA may not act directly simulate the PG.(Singtripop *et al.* 2000) To elucidate the hormonal mechanisms of the PG stimulation by JHA, we first examined the minimum JHA-stimulation to activate the diapause PG. PG of JHA-treated (donor) larvae were transplanted to non-treated (recepient) larvae on successive day after JHA treatment, and the recepients were observed. Results showed that one-day stimulation was enough to induce pupation. The PG's activity of the recepients increased transiently 16 days after the transplantation after which hemolymph ecdysteroid increased gradually. These results indicate that JHA stimulates the donor PG, and the minute amount of ecdysteroid produce by the slightly activated by PG may in turn stimulates the recepient PG which results the increase in hemolymph ecdysteroid. Thus the recepient PG is activated by ecdysone itself through a positive feedback. Since both the PG activity and hemolymph ecdysteroid are low but detectable, and enough for positive-feedback activation of PG with low activity, we suggest that the diapause of the bamboo borer is maintained by suppressing the PG not to be activated by the positive-feedback mechanisms and JHA release the glands from such suppression.

On the other hand, we examined the effect of juvenile hormone analogue(JHA) at different temperatures (13, 20, 25 and 30 °C). JHA has been known to stimulate larval prothoracic glands after gut purge as well as pupa one. In the bamboo borer, JHA also break the diapause due to activation of larval prothoracic glands. JHA application was low effective

at 13 °C and 30° C, while it was effective at 25 °C and 20 °C. This indicates that the temperature might be involved in the break of larval diapause but highest and lowest temperature may suppress the break.

Kedwords : bamboo borer, diapause, juvenile hormone, ecdysteroid, prothoracic gland

เอกสารสรุปผลงานตอนที่ 1

กลไกของฮอร์โมนฌูวีไนล์ต่อการชักนำการเข้าดักแด้ของหนอนเยื่อไผ่

เอกสารสรุปผลงาน

1. ชื่อโครงการ บทบาทของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส
(Roles of juvenile hormone on the development of the larval diapause of bamboo borer, *Omphisa sp.*)

2. ผู้ดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หนอนเยื่อไผ่เป็นระยะตัวหนอน (larva) ของผีเสื้อกลางคืน (moth) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Omphisa fuscidentalis* Hampson ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Pyralidae อันดับ Lepidoptera มีการแพร่กระจายมากที่สุดบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย และพบได้ในประเทศใกล้เคียง ได้แก่ ประเทศพม่า ประเทศลาว ประเทศจีน และประเทศมาเลเซีย จากการที่พบหนอนเยื่อไผ่ได้ในหลายพื้นที่ จึงมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น คนพื้นเมืองในภาคเหนือส่วนมากเรียก แน้หรือแมะ บางกลุ่มเรียก แค้หรือค้วงไม้ไผ่ อีก้อเรียก ฮาโบลัว กะเหรี่ยงเรียก คลีเคล้ะ พม่าเรียก วาโป่ว ส่วนจีนฮ่อ เรียก จูซุง (ไพฑูรย์, 2538)

หนอนเยื่อไผ่จัดอยู่ในกลุ่ม holometabolous ที่มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) กล่าวคือ มีระยะตัวเต็มวัย ไข่ ตัวหนอน และดักแด้ จากการศึกษาระยะการเจริญของหนอนพบว่าระยะการเจริญของหนอนมี 2 ระยะ คือระยะการเจริญขั้นต้น และระยะลาร์วัลไดอะพอส (larval diapause) ระยะการเจริญขั้นต้นมี 5 อินสตาร์(instar) (Singtripop *et al.*, 1999) พบในเดือนสิงหาคมหลังจากแม่ผีเสื้อวางไข่ 4-6 วัน หนอนมีขนาดลำตัวและความกว้างของกะโหลกหัว (head capsule) เล็กมาก ส่วนระยะไดอะพอส พบตั้งแต่เดือนกันยายนถึงพฤษภาคม ในระยะนี้ไม่มีความแตกต่างของขนาดลำตัวและความกว้างของ head capsule ไม่มีการกินอาหารและกระบวนการเมตาบอลิซึมต่ำ จากการศึกษาการดำรงชีวิตและลักษณะวงชีวิตพบว่าแม่ผีเสื้อจะวางไข่ที่โคนกาบหน่อไผ่ในช่วงประมาณเดือนสิงหาคม เมื่อฟักออกมาเป็นตัวหนอนแล้วจะเคลื่อนย้ายและเจาะรูเข้าไปอาศัยอยู่ในลำต้นของหน่อไผ่ และกัดกินเยื่อไผ่อ่อนซึ่งบุอยู่ภายในเป็นอาหารแล้วเจาะทะลุผ่านข้อปล้องไม้ไผ่ขึ้นไปเรื่อยๆ จนเกือบถึงยอด ในช่วงนี้ตัวหนอนจะมีการเจริญเติบโตมากขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะกลับลงมาอยู่รวมกันที่ปล้องที่ 1 หรือ 2 ถัดจากปล้องล่างที่เคยเจาะรูเอาไว้ในตอนแรก ระยะที่อาศัยอยู่ในลำต้นไผ่เป็นตัวหนอนอยู่ในช่วงเดือนกันยายนถึงพฤษภาคม ประมาณ 280-304 วัน จากนั้นเข้าดักแด้ภายในกระบอกไม้ไผ่ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคมประมาณ 30-40 วัน และออกเป็นตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางคืนประมาณเดือนสิงหาคม มีอายุประมาณ 15-20 วัน ตัวเต็มวัยของผีเสื้อกลางคืนมีลักษณะคือ ตัวเมียมีสีน้ำตาลส้ม ปีกคู่หน้ามีรอยหยักพาดขวางสีดำเข้ม หนวดเป็นแบบเส้นด้าย (filiform) ตัวเมียมีขนาด

ใหญ่กว่าตัวผู้ (เดชา, 2535 และ ไพฑูรย์, 2538) จะเห็นได้ว่าหนอนเยื่อไผ่มีวงชีวิตยาวนานถึง 1 ปี ซึ่งแตกต่างจากแมลงในกลุ่มเดียวกันเป็นอย่างมาก และระยะที่ใช้เวลานานที่สุด คือ ระยะตัวหนอนในช่วงเดือนกันยายนถึงพฤษภาคมของปีถัดไป เรียกระยะนี้ว่า ระยะไดอะพอส (diapause stage)

ไดอะพอส เป็นระยะพักการเจริญเติบโตของแมลง ที่เกิดในแมลงบางชนิดและสามารถพบได้ในช่วงใดช่วงหนึ่งของวงชีวิต เช่น เกิดในระยะไข่ เรียกว่า egg diapause เกิดในระยะตัวหนอนเรียกว่า larval diapause เกิดในระยะดักแด้ เรียกว่า pupal diapause และ เกิดในระยะตัวเต็มวัย เรียกว่า adult diapause สำหรับในหนอนเยื่อไผ่นั้นเกิดระยะไดอะพอสในระยะตัวหนอนจึงเรียกว่าเป็นลาร์วัลไดอะพอส (larval diapause)

โดยทั่วไปเมื่อแมลงเข้าสู่ระยะไดอะพอสจะมีผลทำให้อัตราเมตาบอลิซึมในร่างกายลดต่ำลง ไม่เคลื่อนไหว มีพฤติกรรมการหยุดกินอาหารและหยุดการเจริญของร่างกาย (Tauber *et al.*, 1986) โดยปัจจัยที่มีผลทำให้เกิดไดอะพอสนั้นเนื่องมาจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและการควบคุมกลไกการทำงานต่างๆของระบบประสาทและฮอร์โมนภายในร่างกาย แต่สำหรับหนอนเยื่อไผ่นั้นสามารถเกิดไดอะพอสได้ทุกรุ่นและเกิดในระยะเวลาเดียวกันใกล้เคียงกันทุกปี ดังนั้นปัจจัยที่สำคัญที่นำไปสู่การเกิดไดอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ อาจจะเป็นการควบคุมโดยระบบประสาทและฮอร์โมน โดยทั่วไปแล้วแมลงจะมีกระบวนการเจริญเติบโตโดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของร่างกายตั้งแต่ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย เรียกว่า การเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระหว่างการเจริญเติบโต หรือ เมตามอร์ฟอซิส (metamorphosis) ซึ่งฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเมตามอร์ฟอซิสได้แก่ฮอร์โมนจูวีไนล์ (juvenile hormone) ที่ผลิตจากต่อมคอร์ปัสอัลเลตัม (corpus allatum) และฮอร์โมนเอคไดโซน (ecdysone) ที่ผลิตจากต่อมโปรทอแรกซิก (prothoracic gland) โดยกลไกที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของระยะตัวหนอนเข้าสู่ดักแด้ในแมลง โดยทั่วไปเริ่มจากการถูกกระตุ้นของสมองทำให้สมองหลั่งโปรทอแรกซิโคโทรปิคฮอร์โมน (prothoracicotropic hormone : PTTH) ไปกระตุ้นการทำงานของต่อมโปรทอแรกซิก ทำให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซน ซึ่งฮอร์โมนนี้มีผลต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีลำตัวและการสร้างผนังลำตัวหรือคิวติเคิลใหม่(new cuticle) ของตัวหนอนทำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ ส่วนฮอร์โมนจูวีไนล์นั้นมีบทบาทในทางตรงกันข้ามกับฮอร์โมนเอคไดโซน กล่าวคือฮอร์โมนจูวีไนล์มีหน้าที่ในการรักษารูปร่างลักษณะของระยะตัวหนอนไม่ให้เจริญเป็นตัวเต็มวัย (เสาวภา, 2525 และ Slama, 1995) การเกิดไดอะพอสในระยะต่างๆกันของวงชีวิตของแมลง สืบเนื่องมาจากการควบคุมโดยระบบฮอร์โมนเช่นเดียวกัน โดย egg diapause เกิดเนื่องจากการหลั่งของไดอะพอสฮอร์โมน (diapause hormone)ในระยะต้นๆของดักแด้เพศเมีย มีผลต่อตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ ทำให้หยุดการเจริญ (Kitazawa *et al.*, 1963) ส่วนการเกิด pupal diapause เกิดเนื่องจากการขาด PTTH จากสมองและเกิดเนื่องจากความสามารถในการตอบสนองของต่อมโปรทอแรกซิกต่อ PTTH ลดต่ำลง (Bradfield *et al.*, 1980 and Bowen *et al.*, 1984) แต่ adult diapause เกิดเนื่องจากการขาดของฮอร์โมนจูวีไนล์ (เสาวภา, 2536 และ de Kort *et*

al., 1982) สำหรับ larval diapause สามารถเกิดได้ในอินสตาร์ต่างๆ แต่โดยทั่วไปจะพบในอินสตาร์สุดท้ายเนื่องมาจากการมีฮอร์โมนจูวีไนล์ในร่างกายสูง ซึ่งการมีฮอร์โมนจูวีไนล์ในร่างกายสูงนั้นเอง มีบทบาทไปกดหรือยับยั้ง (suppress) การทำงานของต่อมโปรทอแรกซิก และ การหลั่งของ PTTH จากสมองผ่านทางปมประสาทใต้อีโซฟากัส(sub-esophageal ganglion)(Barrett, 2000)

จากการศึกษาหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสพบว่ามีความเข้มข้นของฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ต่ำ (Singtripop *et al.*, 1999) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงระยะไดอะพอสนี้ ต่อมโปรทอ-แรกซิกถูกยับยั้งไม่ให้มีการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซน หนอนจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ดักแด้ นอกจากนี้ Singtripop *et al.*,(2000) ได้พบว่าการให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (juvenile hormone analogue : JHA, methoprene) แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส มีผลทำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ แสดงให้เห็นว่า JHA ที่ให้ไป มีผลต่อการทำให้ระยะลาร์วัลไดอะพอสสิ้นสุดลง และจากผลการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าสมองและต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับ JHA มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาได้ใกล้เคียงกับในระยะดักแด้ จึงเป็นไปได้ว่าอวัยวะเป้าหมายของ JHA อาจเป็นสมองและต่อมโปรทอแรกซิก แต่จากการศึกษาของ Singtripop *et al.* (2000) พบว่าหนอนในระยะไดอะพอสที่ทำการผ่าตัดเอาสมองออกแล้วให้ JHA สามารถเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้เช่นเดียวกัน แสดงว่า JHA อาจจะมีผลโดยตรงต่อต่อมโปรทอแรกซิกทำให้ต่อมโปรทอแรกซิกมีกิจกรรมในการหลั่งฮอร์โมน (secretory activity) เพิ่มขึ้น ต่อมจึงผลิตฮอร์โมนเอคไดโซนมากขึ้น และชักนำให้หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ จากสมมติฐานนี้จึงได้วางแผนการทดลองโดยทำการปลูกถ่าย (transplantation) ต่อมโปรทอแรกซิกจากหนอนระยะไดอะพอสที่ได้รับ JHA แล้วนำไปใส่ในหนอนระยะไดอะพอสอีกตัวหนึ่งซึ่งไม่ได้รับ JHA จากนั้นสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของหนอนหลังจากได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก หากว่าหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ แสดงว่าต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับ JHA ได้รับการกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนออกสู่ฮีโมลิมพ์ได้จนทำให้ระยะลาร์วัลไดอะ-พอสสิ้นสุดลง นอกจากนี้ยังได้ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในระหว่างระยะไดอะพอสของหนอนแต่ละเดือน เพื่อศึกษาการตอบสนองของต่อมโปรทอแรกซิกที่มีต่อฮอร์โมนจูวีไนล์ ตลอดจนทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์และกิจกรรมการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนของต่อมโปรทอแรกซิก ในหนอนที่ได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอคไดโซนเนื่องมาจากการกระตุ้นโดยฮอร์โมนจูวีไนล์ดังที่ได้กล่าวไปแล้วอาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเอคไดโซนรีเซบเตอร์ยีน (Ecdysone receptor gene : *EcR*) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของ *EcR* ในต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับและไม่ได้รับ JHA อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานถึงลำดับเบสและกรดอะมิโนใน *EcR* ของหนอนเยื่อไผ่มาก่อน จึงต้องทำการ clone *EcR* ของหนอนเยื่อไผ่ เพื่อหาลำดับเบสและกรดอะมิโน จาก

นั้นจะใช้ partial sequence ของลำดับเบสที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (primer) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ความแตกต่างของ EcR mRNA expression ต่อไป

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า ในปัจจุบันงานวิจัยทางด้านหนอนเยื่อไผ่ได้มีความก้าวหน้าไปจนถึงระดับโมเลกุล ในการอธิบายถึงกลไกที่มีบทบาทต่อการสิ้นสุดของระยะไดอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ การทราบถึง partial sequence ของลำดับเบสของ *EcR* ในหนอนเยื่อไผ่จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญนำไปสู่การหาลำดับเบสของ *EcR* เช่นเดียวกับที่พบในแมลงชนิดอื่น และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในแมลงกลุ่มเดียวกันได้ นอกจากนี้ยังทำให้สามารถตรวจสอบถึง localization ของ *EcR* ว่าปรากฏอยู่ในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนใดบ้างในการเกิดเมตามอร์ฟอซิส ซึ่งถือว่าเป็นองค์ความรู้ใหม่ในระดับโมเลกุลเพื่อใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานของระบบฮอร์โมน อีกทั้งยังจะนำไปสู่การวิจัยและการค้นคว้าในระดับสูงเพื่อการพัฒนาความรู้ในงานวิจัยสาขาต่อมไร้ท่อวิทยาต่อไป

ความสำคัญของฮอร์โมนต่อการควบคุม larval diapause

Chippendale and Yin (1976) ได้ทำการศึกษาถึงกลไกของฮอร์โมนที่มีต่อการรักษาสภาพการเป็นไดอะพอส ในระยะตัวหนอนและศึกษาเมตามอร์ฟอซิสใน *D. grandiosella* โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮีโมลิมพ์ (JH titer) พบว่าใน penultimate nondiapause มีปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮีโมลิมพ์สูงสุด คิดเป็น 3,000 *Galleria* unit (GU)/ml ในขณะที่ปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ลดลงเป็น 140 GU/ml ภายใน 6 ชั่วโมง หลังการเกิดการลอกคราบ และมีปริมาณต่ำอย่างคงที่ นอกจากนี้ยังพบว่าต่อมคอร์ปัสอัลเลตัมในตัวหนอนระยะสุดท้ายที่ไม่พักตัว (last-stage nondiapause) นั้นอยู่ในสภาพไม่ทำงาน และพบว่าในตัวหนอนที่เข้าสู่ระยะไดอะพอสใหม่ๆ มีปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮีโมลิมพ์เป็น 1,500 GU/ml และเมื่อให้ JH-mimic แก่ตัวหนอนที่เข้าสู่ระยะสุดท้ายที่ไม่พักตัว จะทำให้ตัวหนอนระยะดังกล่าวมีสภาพเป็น immaculate larval morph อีกทั้งยังพบว่า JH-mimic ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของต่อมคอร์-ปัสอัลเลตัม แต่มีผลเพียงแค่เพิ่มปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮีโมลิมพ์เท่านั้น

ต่อมาในปี 1979 Chippendale and Yin ได้ทำการศึกษาถึงกลไกของฮอร์โมนต่อการควบคุมlarval diapause ใน European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนจูวีไนล์เช่นเดียวกัน และพบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมระยะ larval diapause โดยเมื่อทำการตรวจวัดฮีโมลิมพ์ของตัวหนอนในระยะที่ 4 ซึ่งเป็นระยะก่อนเข้าสู่ระยะไดอะพอส พบว่ามีปริมาณของฮอร์โมนจูวีไนล์สูงถึง 1,450 GU/ml แต่ในตัวหนอนที่ไม่ได้เข้าสู่ระยะไดอะพอสพบว่ามีระดับฮอร์โมนจูวีไนล์เพียง 340 GU/ml เมื่อตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ในตัวหนอนระยะที่ 5 ก่อนการเข้าสู่ระยะไดอะพอส พบว่าปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์มีค่า 320 GU/ml และลดลงในตัวหนอนที่เข้าสู่ระยะไดอะพอสใหม่ๆ เป็น 90 GU/ml เมื่อทำการสกัดตัวหนอนที่เข้าสู่ระยะไดอะพอสใหม่ๆทั้งตัวพบ

ว่ามีระดับของฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮีโมลิมพ์ในปริมาณที่ต่ำมาก และพบว่าการให้ JH-mimic หรือ 20-hydroxyecdysone หรือให้ฮอร์โมนผสมทั้งสองดังกล่าวในตัวหนอนที่เข้าสู่ระยะไดอะพอส ไม่สามารถทำให้ปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮีโม-ลิมพ์เพิ่มขึ้น แต่การให้ JH-mimic แก่ตัวหนอนระยะที่ 5 ก่อนเข้าสู่ระยะไดอะพอสใหม่ๆ ไม่ทำให้เกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้ แต่ทำให้เกิด supernumery larvae ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนจูวีไนล์มีบทบาทต่อการควบคุมระยะไดอะพอส แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพการเป็นไดอะพอสเอาไว้ ซึ่งขัดแย้งกับข้อเสนอของ Yagi and Fukaya (1974) ที่ได้ทำการศึกษาในตัวหนอนระยะไดอะพอสของแมลงหนอนเจาะต้นข้าว (rice stem borer, *Chilo suppressalis*) แล้วพบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์มีบทบาทในการชักนำและทำให้เกิดการรักษาสภาพการเป็นไดอะพอส โดยการชักนำให้ตัวหนอนเข้าสู่ระยะไดอะพอสได้ เนื่องจากการมีฮอร์โมนจูวีไนล์ในปริมาณสูง เช่นเดียวกับการศึกษาใน *O. nubilalis* ที่พบว่า ฮอร์โมนจูวีไนล์มีผลต่อการชักนำและสิ้นสุดของ larval diapause (Yagi and Akaike, 1976) และการศึกษาใน Mediterranean corn borer (*Sesamia nonagrioides*) ที่พบว่าการรักษาสภาพการ larval diapause นั้น เกิดเนื่องจากการมีฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮีโมลิมพ์สูง (Eizaguirre *et al.*, 1998)

Larval diapause ในหนอนเยื่อไผ่

Singtripop *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาการเจริญและระยะไดอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ พบว่าหนอนเยื่อไผ่ มีระยะ larval diapause นานประมาณ 9 เดือน โดยระยะไดอะพอสเกิดขึ้นได้ทุกรุ่นและเกิดในระยะเวลาใกล้เคียงกันทุกปี โดยหนอนจะเริ่มเข้าสู่ระยะดังกล่าวในช่วงสุดท้ายของ ระยะการกินอาหาร (feeding period) ในตัวหนอนขั้นสุดท้าย (อินสตาร์ที่ 5) ภายหลังที่จากที่ตัวหนอนมีการกินอาหารปกติ หนอนจะเริ่มเข้าสู่ระยะ wandering ซึ่งเป็นระยะที่เกิดขึ้นสั้นๆ พบอยู่ระหว่างการกินอาหารปกติกับระยะก่อนเข้าดักแด้ (prepupa) ในระยะนี้เองเป็นระยะที่เซลล์อิพิเดอร์มิสของหนอนมีความพร้อมที่จะยอมรับการตอบสนองของฮอร์โมนเพื่อเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ที่เรียกว่า pupal commitment จากนั้นเมื่อหนอนเข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้มันจะหยุดการกินอาหาร หยุดการเคลื่อนไหว เตรียมพร้อมร่างกายเพื่อการลอกคราบเข้าสู่ระยะดักแด้ แต่หนอนเยื่อไผ่ได้ผ่านระยะการกินอาหารตามปกติแล้ว เพียงแต่ไม่มีการหยุดการเคลื่อนไหว จึงถือว่าหนอนเยื่อไผ่ในระยะไดอะพอสยังไม่เข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้ (อัญชลี, 2542)

นอกจากนี้ Singtripop *et al.* (1999) ยังได้ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส ในเดือนกันยายนถึงเดือนพฤษภาคมของปีถัดไปก่อนที่หนอนจะเข้าสู่ระยะดักแด้ พบว่ามีปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนต่ำมาก คือ อยู่ในช่วงระหว่าง 3-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน สามารถวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนได้เพียง 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนเพิ่มสูงที่สุดเป็น 22 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อหนอนเข้าสู่เดือนธันวาคม หลังจากนั้นจะพบว่าปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนลดลงอย่างต่อเนื่อง แล้วเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในเดือนเมษายนตามด้วยการลดลงในเดือนพฤษภาคม ซึ่งเป็นเดือนก่อนที่หนอนจะเข้าสู่ระยะดักแด้ และเมื่อตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ พบว่าปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนเพิ่มสูงเป็น 1,700 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเดือนมิถุนายน และลดลงเหลือ 770 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเดือนกรกฎาคม ก่อนที่ดักแด้จะเข้าเป็นตัวเต็มวัย

ต่อมา Singtripop *et al.* (2000) ได้ศึกษาถึงการสิ้นสุดของระยะไดอะพอสในหนอนเยื่อไผ่และพบว่าการให้ JHA มีผลทำให้ตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ ขึ้นกับความเข้มข้นที่ให้ไป และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีผลชักนำให้หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ คือ 0.05 ไมโครกรัมต่อตัว โดยหนอนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สีผิวลำตัวเป็นระดับสีต่างๆ เมื่อทำการผ่าตัดเพื่อดูลักษณะโครงสร้างภายใน พบว่า เกิดลักษณะของดักแด้ขึ้นภายในลำตัวและขาเทียมของระยะตัวหนอนหายไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผ่าตัดเอาสมองของหนอนเยื่อไผ่ออกแล้วให้ JHA แก่หนอนเยื่อไผ่ก็สามารถทำให้หนอนเยื่อไผ่เข้าสู่ระยะดักแด้ได้ นอกจากนี้ Singtripop *et al.* (2000) ยังได้รายงานเพิ่มเติมถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนภายหลังการให้ JHA โดยพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกจนทำให้ปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้น เกิดขึ้นภายใน 2 สัปดาห์หลังการได้รับ JHA

Riddiford (1993) กล่าวว่าการควบคุมการลอกคราบและการเกิดเมตามอร์ฟอซิสมีความเกี่ยวข้องกันในระดับโมเลกุล อันเนื่องมาจาก EcR (ecdysone receptor) และ JHR (juvenile hormone receptor) โดยอธิบายจากการศึกษาที่พบใน *M. sexta* และ *B. mori* เป็นหลัก โดยความเข้มข้นของฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์นำไปสู่การลอกคราบได้เนื่องจาก การจับกันของฮอร์โมนเอคไดโซนกับ EcR และ partner protein คือ Ultraspiracle (USP) และ immunophilin (Song *et al.*, 1997) เกิดเป็น ecdysone receptor complex ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ regulatory gene นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระยะต่อไป ในช่วงที่ความเข้มข้นของฮอร์โมนเอคได-โซนในฮีโมลิมพ์ลดลงนั้น พบว่าเกิดไอโซฟอร์มของ EcR ตลอดจน ecdysteroid-induced regulatory factors ต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ในที่สุด

EcR เป็นรีเซบเตอร์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม nuclear hormone receptor superfamily ประกอบด้วยส่วนต่างๆ 5 ส่วน คือ A/B, C, D, E และ F region พบเป็นครั้งแรกใน แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) มี 3 isoform คือ EcR-A, EcR-B1 และ EcR-B2 โดยแต่ละ isoform มีความแตกต่างกันบริเวณ A/B region (Kamimura *et al.*, 1997) แต่ในแมลงชนิดอื่นพบว่ามี 2 isoform คือ EcR-A และ EcR-B1 เช่น ใน *M.sexta* (Jindra *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1995), *G. mellonella* (Jindra and Riddiford, 1996), *B. mori* (Kamimura *et al.*, 1996) และ *C. suppressalis* (Minakuchi *et al.*, 2002)

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงการแสดงออกของ EcR mRNA (EcR mRNA expression) ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของแมลง เพื่อนำมาใช้อธิบายถึงกลไกควบคุมการทำงานในระดับโมเลกุล โดยการศึกษาใน *M. sexta*

ห้องสมุด

แสดงให้เห็นว่า *EcR* ของ *M. sexta* ที่มี homolog กับ *EcR* ของ *D. melanogaster* มี การแสดงออกในปุ่มปีก และต่อมโปรทอแรกซิกของตัวหนอน รวมถึงเนื้อเยื่อปีกของดักแด้ นอกจากนี้ยังพบว่า มีการแสดงออกของ EcR mRNA มากที่สุดในปุ่มอีกในช่วงตัวหนอนอินสตาร์สุดท้าย 1 วัน หลังจากการเข้าสู่ระยะการเคลื่อนไหว ในขณะที่การแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของระยะการเคลื่อนไหว และพบว่ามีปริมาณสูงหลังจากช่วงเวลาดังกล่าว นอกจากนี้ในช่วงก่อนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย มีขีดสูงสุดของการแสดงออก (peak) ของ EcR mRNA ปรากฏในเนื้อเยื่อปีกหลังจากที่ตัวหนอนเกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้ ซึ่งขีดสูงสุดทั้งสองดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซน และ 20-hydroxyecdysone แสดงให้เห็นว่าปริมาณของฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์มีผลต่อการแสดงออกของ EcR mRNA (Fujiwara *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ Gilbert *et al.* (1997) ยังกล่าวว่า 20-hydroxyecdysone มีผลกระตุ้นการทำงานของต่อมโปรทอแรกซิกโดยเพิ่มการแสดงออกของ USP mRNA รวมไปถึงเพิ่มกระบวนการ phosphorylation ของ USP ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ EcR ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมนเอคไดโซนและส่วนประกอบของ ecdysone receptor complex ของต่อมโปรทอแรกซิกมีผลต่อขีดแห่งความสามารถ (potential) ของต่อมในการสร้างฮอร์โมนเอคไดโซนและการควบคุมแบบ feedback inhibition อีกด้วย จึงเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนมีผลต่อการแสดงออกของ EcR mRNA เช่นเดียวกับที่มีการศึกษาถึงการแสดงออกของ EcR mRNA ใน spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) ที่พบว่าการแสดงออกของ EcR mRNA จะเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อปรากฏว่ามีขีดสูงสุดของฮอร์โมนเอคไดโซนในช่วงที่เกิดการลอกคราบ และมีการแสดงออกของ EcR mRNA ลดลงในช่วงระหว่างการลอกคราบ (intermolt) และยังพบว่าในตัวหนอนอินสตาร์ที่ 6 มีการแสดงออกของ EcR mRNA เกิดขึ้นที่อิพิเดอร์มิส ก้อนไขมันและส่วนทางเดินอาหาร และพบการแสดงออกของ EcR mRNA สูงที่สุดที่เนื้อเยื่อต่างๆ ดังกล่าว เมื่อเข้าสู่ระยะ ก่อนเข้าดักแด้ซึ่งเป็นระยะที่มีขีดสูงสุดของฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์สูง (Kothapalli *et al.*, 1995)

3.วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษากลไกการทำงานของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการสิ้นสุดระยะ larval diapause

4.ระเบียบวิธีวิจัย

<u>การทดลองที่ 1</u> การศึกษาผลของ JHA ต่อการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

ทำได้โดยแบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็นสองกลุ่ม หนอนในกลุ่มที่ 1 เป็นหนอนที่ได้รับ JHA และเป็นตัวให้ต่อมโปรทอแรกซิก (donor larvae) กลุ่มที่ 2 เป็นหนอนที่ไม่ได้รับ JHA และได้รับการปลูกถ่าย

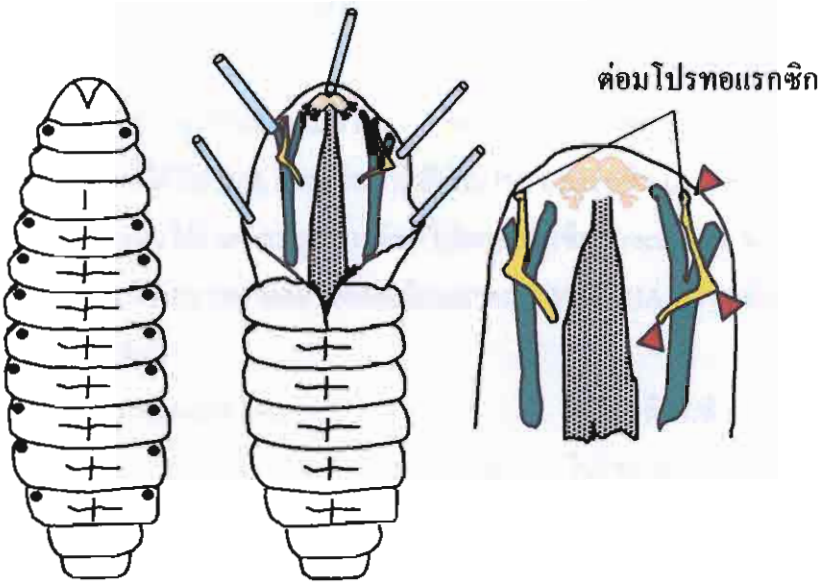
ต่อมโปรทอแรกซิก (recepient larvae) จากนั้นแบ่ง donor larvae ออกเป็น 5 กลุ่ม ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาดเล็ก หยด JHA ความเข้มข้นต่างๆที่ละลายในอะซิโตนแก่ donor larvae ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หยดอะซิโตน	5	ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 2 หยด JHA	0.1	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 3 หยด JHA	0.25	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 4 หยด JHA	0.5	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 5 หยด JHA	1.0	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว

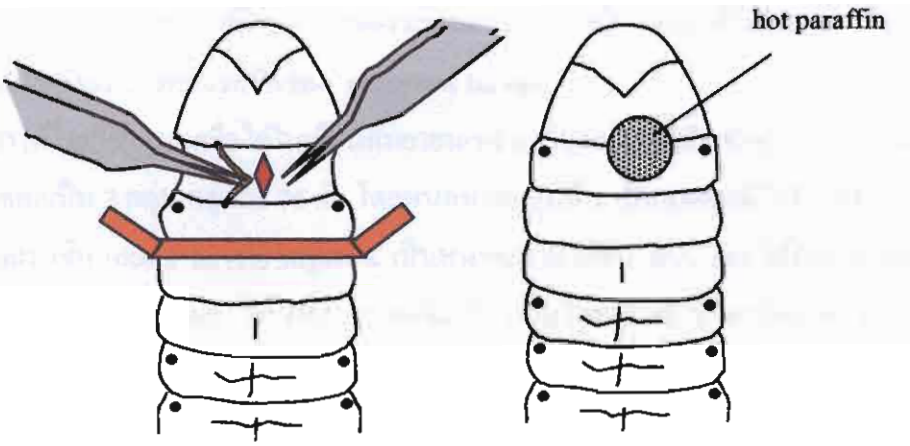
ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae (ภาพ 1) ในวันที่ 1, 2 และ 3 ภายหลังการให้ JHA ไปยัง recepient larvae (ภาพ 2) สำหรับกลุ่มควบคุม ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในวันที่ 3 หลังจากการให้อะซีโตน การหยดฮอร์โมนจะหยดฮอร์โมนลงด้านบน (dorsal) ของตัวหนอน โดยเริ่มหยดจากประมาณกึ่งกลางลำตัวเรื่อยไปยังด้านท้ายของลำตัว

<u>การสังเกตและบันทึกผล</u> สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จะเกิดขึ้นใน recepient larvae โดยบันทึกผลทุกวัน เป็นเวลา 42 วัน ตามระดับการเปลี่ยนสี 5 ระดับ ดังนี้

G 0	หมายถึง	ตัวหนอนหยุดการเคลื่อนไหว
G 1	หมายถึง	เริ่มเห็นจุดสีส้ม กระจายตามผิวลำตัว
G 2	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นสีส้มทั่วลำตัว
G 3	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นคิวติเคิลสีน้ำตาลของระยะดักแด้
G 4	หมายถึง	คิวติเคิลของดักแด้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม
G 5	หมายถึง	คิวติเคิลเปลี่ยนเป็นสีดำ



ภาพ 1 แสดงการผ่าตัดต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae



ภาพ 2 แสดงการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกไปยัง recepient larvae

<u>การทดลองที่ 2</u> การศึกษาการตอบสนองของต่อมโปรทอแรกซิกต่อ JHA ในระหว่างระยะไดอะพอส ของหนอนแต่ละเดือน

เริ่มจากเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน โดยแบ่งหนอนในแต่ละเดือนออกเป็นสองกลุ่ม หนอนในกลุ่มที่ 1 เป็นหนอนที่ได้รับ JHA และเป็นตัวให้ต่อมโปรทอแรกซิก (donor larvae) กลุ่มที่ 2 เป็นหนอนที่ไม่ได้รับ JHA และได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก (recepient larvae) จากนั้นแบ่ง donor larvae ออกเป็น 6 กลุ่ม ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาดเล็ก หยด JHA ความเข้มข้นต่างๆที่ละลายในอะซิโตนแก่ donor larvae ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หยดอะซิโตน	5	ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 2 หยด JHA	0.01	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 3 หยด JHA	0.04	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 4 หยด JHA	0.1	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 5 หยด JHA	0.4	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 6 หยด JHA	1.0	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว

ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ในวันที่ 1 2 และ 3 ภายหลังการให้ JHA ไปยัง recepient larvae สำหรับกลุ่มควบคุม ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในวันที่ 3 หลังจากการให้อะซีโตน สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นใน recepient larvae เป็นเวลา 42 วันโดยอาศัยการเปลี่ยนสีผิวลำตัวทั้ง 5 ระดับ

<u>การทดลองที่ 3</u> การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์และกิจกรรม การหลั่งฮอร์โมนของต่อมโปรทอแรกซิกของ recepient larvae

ทำได้โดยใช้หนอนเยื่อไผ่ในเดือนกันยายนเพราะเป็นหนอนที่เริ่มเข้าสู่ระยะไดอะพอส จากนั้นแบ่งหนอนออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 75 ตัว โดยหนอนในกลุ่มที่ 1 เป็นหนอนที่ได้รับ JHA และเป็นตัวให้ต่อมโปรทอแรกซิก (donor larvae) กลุ่มที่ 2 เป็นหนอนที่ไม่ได้รับ JHA และได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก (recepient larvae) ให้ JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว แก่ donor larvae แล้วทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ไปยัง recepient larvae ภายหลังการให้ฮอร์โมน 3 วัน จากนั้นทำการเก็บฮีโมลิมพ์ของ recepient larvae ทุกๆ 2 วัน วันละ 5 ตัว เป็นเวลา 15 วัน เพื่อตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซน แล้วผ่าตัดเอาต่อมโปรทอแรกซิกของ recepient larvae มาทำการเพาะเลี้ยงใน Grace's medium ที่อุณหภูมิ 25 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนใน Grace's medium นั้น

การทดลองที่ 4 การ clone เอคไดโซนรีเซบเตอร์ยีน (Ecdysone receptor gene : *EcR*) เพื่อศึกษาผลของ JHA ต่อการแสดงออกของ EcR mRNA ในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

ทำได้โดยหยด JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว แก่หนอนในระยะไดอะ-พอส จากนั้นเมื่อหนอนเข้าสู่ระยะ G0 ทำการผ่าตัดเอาผิวหนังของหนอนใส่ลงในสารละลาย TRI zol แล้วทำการสกัด RNAจากผิวหนังออกมา เมื่อได้ RNA แล้ว ทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อใช้เป็น template ในการทำ PCR (polymerase chain reaction) ต่อไป สำหรับไพร-เมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เป็น degenerated primer ที่ออกแบบโดยอาศัย conserved region ของ *EcR* ใน *M. sexta* แถบ band ที่เกิดจาก PCR นำมาทำ gene clean แล้วจึงนำไป insert ใน plasmid DNA โดยการทำ ligation จากนั้นนำ plasmid DNA ดังกล่าวไปทำการ transformation ใน *E. coli* ทำการตรวจหา plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการ เมื่อตรวจพบแล้วทำการสกัด plasmid DNA เพื่อนำไปทำการหาลำดับเบสของ *EcR* จากนั้นจะทำการศึกษาการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับและไม่ได้รับ JHA

ผลที่ได้รับจากโครงการวิจัย

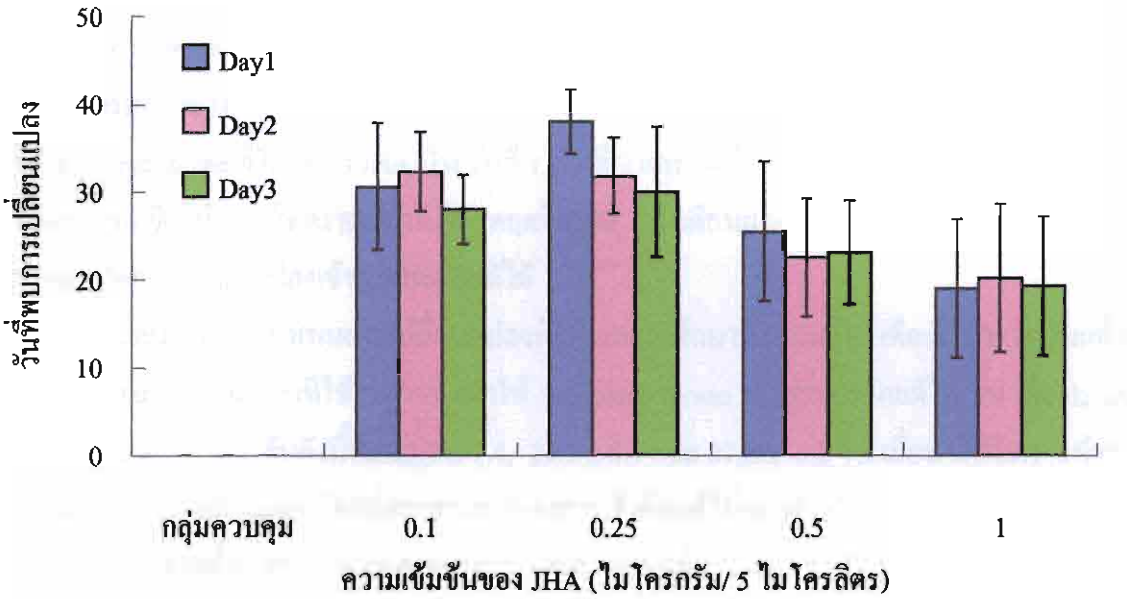
1. ผลของ JHA ต่อการกระตุ้นของต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

การปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับการกระตุ้นโดย JHA ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (donor larvae) ไปยัง recepient larvae มีผลทำให้ recepient larvae เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ภายใน 6 สัปดาห์ แต่ไม่พบการเข้าสู่ดักแด้ในกลุ่มควบคุม โดยพบว่า recepient larvae ที่ได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ที่ได้รับ JHA ที่ความเข้มข้นต่ำ จะมีผลทำให้ได้ดักแด้ที่สมบูรณ์ (ภาพ 10) แต่ถ้า donor larvae ได้รับ JHA ที่ความเข้มข้นสูง จะมีผลทำให้ได้ดักแด้ที่ไม่สมบูรณ์ (ภาพ 11) นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกคือ อย่างน้อย 1 วัน และความเข้มข้นของ JHA ที่ให้กับ donor larvae มีผลต่อการชักนำให้ recepient larvae เข้าสู่ดักแด้ได้โดยใช้เวลาที่ต่างกัน กล่าวคือ recepient larvae ที่ได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ที่ได้รับ JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม จะเข้าดักแด้ได้เร็วที่สุด คือ ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 19.4±8.1 วัน รองลงมาได้แก่ recepient larvae ที่ได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ที่ได้รับ JHA ความเข้มข้น 0.5, 0.1 และ 0.25 ไมโครกรัม โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 23.7± 6.83 วัน, 30.3±1.1 วัน และ 33.3±5.1 วัน ตามลำดับ (ภาพ 12) เมื่อนำระยะเวลาที่หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ดักแด้ของ recepient larvae ที่ได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกที่ได้ JHA ความเข้มข้นต่างๆกันทั้ง 4 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม มาหาค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่าง

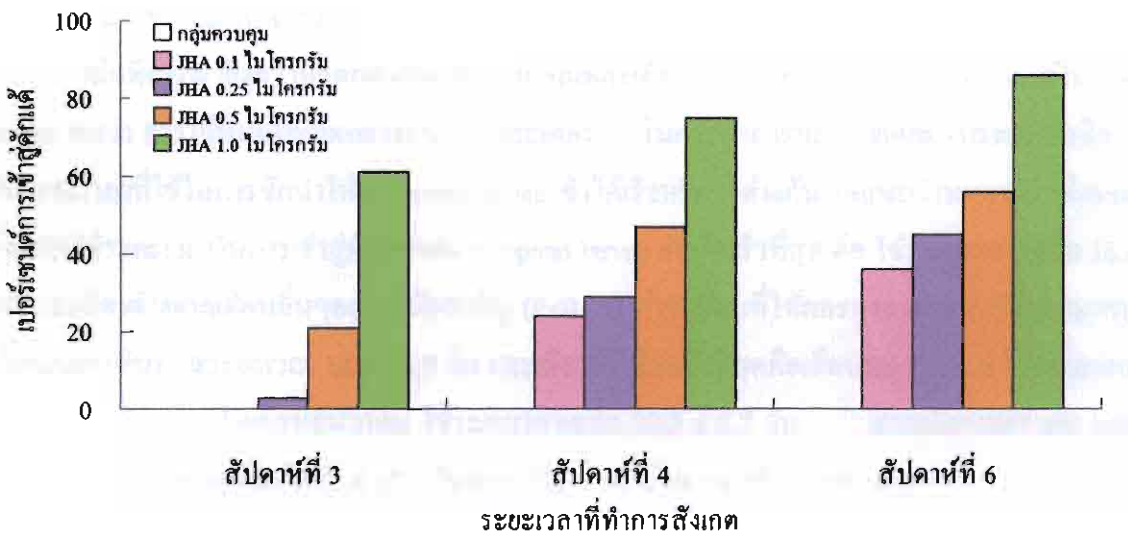
อย่างมีนัยสำคัญของทั้ง 4 กลุ่มความเข้มข้น ($P < 0.05$) และพบว่าการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในวันที่ 1 วันที่ 2 และ วันที่ 3 ภายหลังการให้ JHA ไม่มีผลทำให้ระยะเวลาในการเข้าดักแด้ต่างกัน (ภาพ 12) เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การเข้าดักแด้ที่เกิดภายใน 3, 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่าหนอนสามารถเข้าดักแด้ได้เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ JHA เพิ่มขึ้น โดยภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมไม่พบว่าหนอนเข้าดักแด้ แต่เมื่อความเข้มข้นของ JHA เพิ่มขึ้นเป็น 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม พบว่าหนอนเข้าดักแด้ได้ คิดเป็น 3%, 21% และ 61% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การเข้าดักแด้ในช่วง 4 และ 6 สัปดาห์ก็เห็นผลได้เช่นเดียวกัน คือเปอร์เซนต์การเข้าดักแด้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ JHA คือ ภายใน 4 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม เปอร์เซนต์การเข้าดักแด้เพิ่มจาก 24% เป็น 29%, 47% และ 75% ตามลำดับ และ ภายใน 6 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม เปอร์เซนต์การเข้าดักแด้เพิ่มจาก 36% เป็น 45%, 56% และ 86% (ภาพ 1)

ภาพ 5 แสดงการเกิดดักแด้ที่สมบูรณ์ของ recepient larvae

ภาพ 6 แสดงการเกิดดักแด้ที่ไม่สมบูรณ์ของ recepient larvae



าพ 7 แสดงวันที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ภายหลังการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในเดือนตุลาคม



ภาพ 8 แสดงเปอร์เซนต์การเข้าสู่ระยะดักแด้ของหนอนที่ได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในเดือนตุลาคม

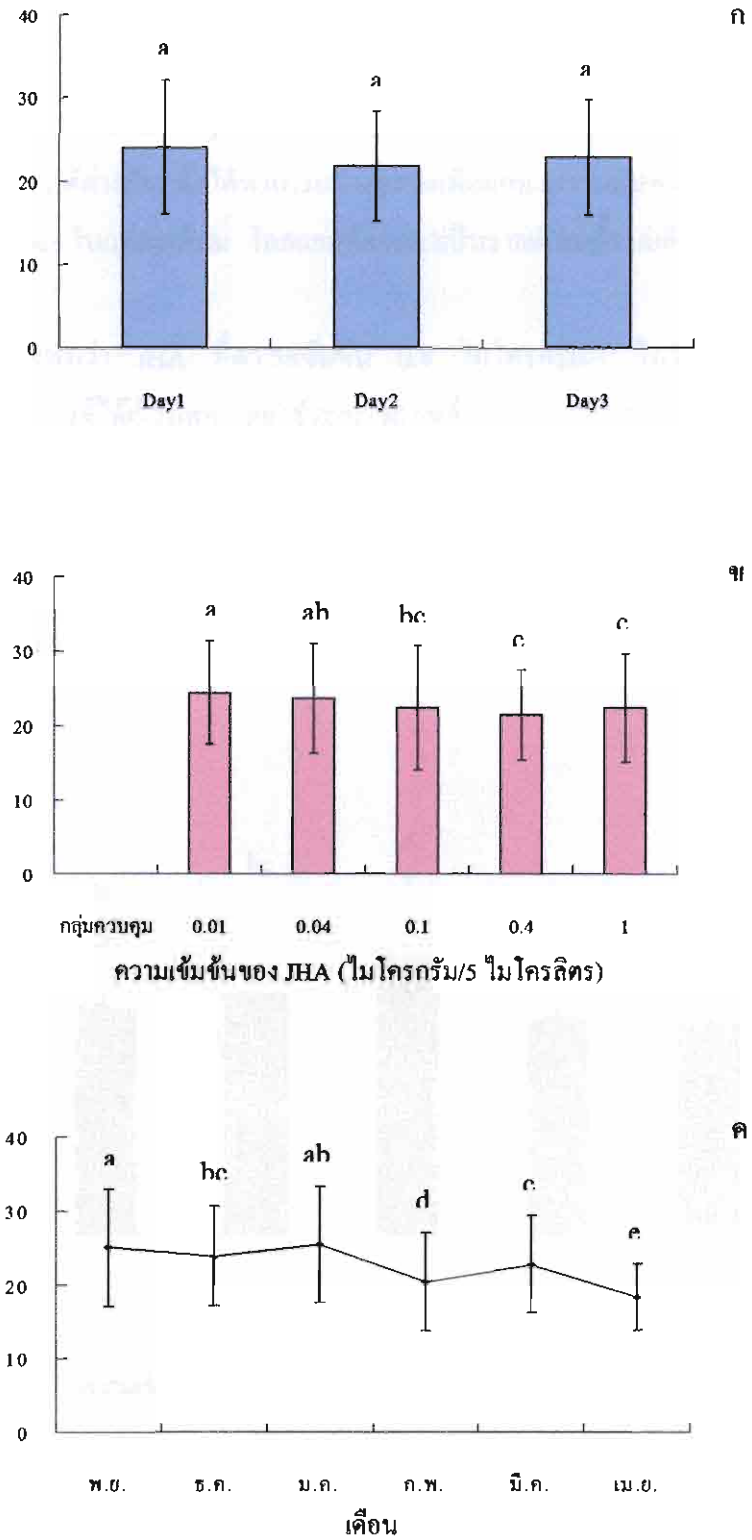
2. การตอบสนองของต่อมโปรทอแรกซิกในระหว่างระยะไดอะพอสของหนอนเยื่อไผ่แต่ละเดือน

การทดลองนี้ได้ให้ JHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันของ JHA เริ่มตั้งแต่ 0.001, 0.004, 0.1, 0.4 และ 1.0 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ให้แก่ donor larvae แล้วทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ไปยัง recepient larvae ที่ไม่ได้รับ JHA ใน วันที่ 1, วันที่ 2 และวันที่ 3 ภายหลังการให้ JHA โดยทำการทดลองนี้ในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสในเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนเมษายน ผลการทดลองพบว่า recepient larvae เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้

เมื่อนำข้อมูลวันที่พบการเปลี่ยนแปลงที่ได้จากการศึกษาทั้งหมด 6 เดือน มารวมกันแล้ววิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ได้ ใน Day1, Day2 และ Day3 มีค่าเฉลี่ยตามลำดับดังนี้คือ 22.7 ± 7.4, 21.1 ± 6.1 และ 21.8 ± 6.2 วัน เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า Day1, Day2 และ Day3 มีผลต่อระยะเวลาของการเข้าดักแด้ไม่แตกต่างกัน (ภาพ 14ก)

นอกจากนี้หากพิจารณาถึงผลของปริมาณความเข้มข้น JHA ที่ให้ไปกับ donor larvae แล้วพบว่าสามารถชักนำให้ recepient larvae เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยพบว่า ระยะเวลาที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยกลุ่มที่ใช้ระยะเวลาน้อยที่สุดได้แก่ JHA 0.4 ไมโครกรัม โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 20.8 ± 5.4 วัน ตามด้วยกลุ่มที่ให้ JHA 1.0 ไมโครกรัมใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 21.4 ± 6.2วัน แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ สำหรับกลุ่มที่ให้ JHA ความเข้มข้นต่ำๆ ก็พบว่าสามารถชักนำให้ recepient larvae เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยมีระยะเวลาที่ใช้ตามลำดับดังนี้คือ JHA 0.01 ไมโครกรัม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 23.1±6.5 วัน, JHA 0.04 ไมโครกรัม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 22.6 ± 6.8 วัน และความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 21.6 ± 7.8 วัน (ภาพ 14ข)

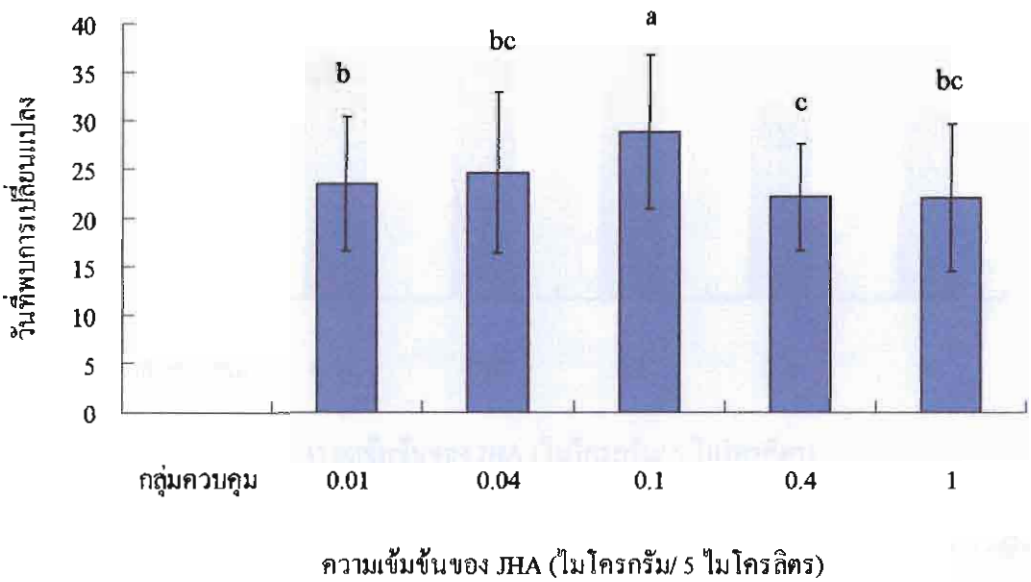
เมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างของหนอนในแต่ละเดือนที่มีผลต่อการชักนำการเข้าดักแด้ใน recepient larvae พบว่า การใช้หนอนที่แตกต่างกันในแต่ละเดือน ในการทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก มีผลทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้ recepient larvae เข้าได้เร็วหรือช้าต่างกัน โดยพบว่าหนอนในเดือนเมษายนมีผลทำให้ระยะเวลาในการเข้าสู่ดักแด้ของ recepient larvae เกิดได้เร็วที่สุด คือ ใช้ระยะเวลา เฉลี่ย 18.1 ±4.3 วัน และมีค่าต่างจากเดือนอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนเดือนที่ให้ผลรองลงมาจากเดือนเมษายนได้แก่ เดือนกุมภาพันธ์ ใช้ระยะเวลา 19.6 ±5.9 วัน และเดือนที่ให้ผลช้าที่สุดคือเดือนพฤศจิกายน ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 24.5 ± 7.8 วัน ส่วนในเดือนธันวาคม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 22.5 ± 5.7 วัน ส่วนเดือนมกราคม และเดือนมีนาคมใช้ระยะเวลาเฉลี่ย คือ 23.4 ±7.3 วันและ 22.1 ±6.1 วันตามลำดับ (ภาพ 14ค)



ภาพ 9 แสดงวันที่พบการเปลี่ยนแปลงของ recepient larvae หลังการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก เมื่อ ก) แสดงผลเนื่องจากวันที่ทำการปลูกถ่ายต่างกัน ข) แสดงผลเมื่อใช้ JHA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0.01, 0.04, 0.1, 0.4 และ 1.0 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร และ ค) แสดงผลเมื่อใช้หนอนเยื่อไผ่ในระหว่างเดือนที่แตกต่างกัน เริ่มจากเดือนพฤศจิกายน ถึง เดือนเมษายน

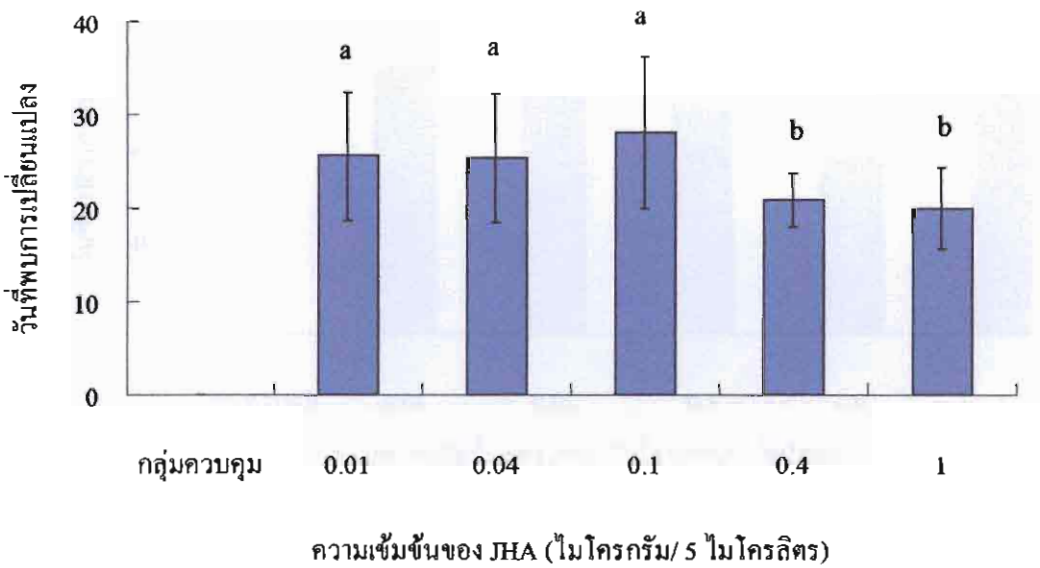
ตามที่ได้กล่าวมาแล้วว่า เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์พบว่า Day1, Day2 และ Day3 ไม่มีผลทำให้ระยะเวลาของการเข้าสู่ดักแด้ต่างกัน จึงได้ทำการสร้างกราฟเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการเข้าดักแด้ของ recepient larvae ในแต่ละเดือน โดยแยกพิจารณาเป็นรายเดือนตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายนให้ผลดังนี้

ในเดือนพฤศจิกายนพบว่า JHA ที่ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร มีผลชักนำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ได้เร็วที่สุด โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 22.0 ± 5.9 วัน รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 22.4 ± 6.1 วัน และความเข้มข้นของ JHA ที่มีผลทำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ได้ช้า ที่สุดคือ JHA ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 28.8 ± 8.8 วัน สำหรับ JHA ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.4 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 25.5 ± 8.0 วัน และ 22.9 ± 7.6 วัน ตามลำดับ (ภาพ 15)



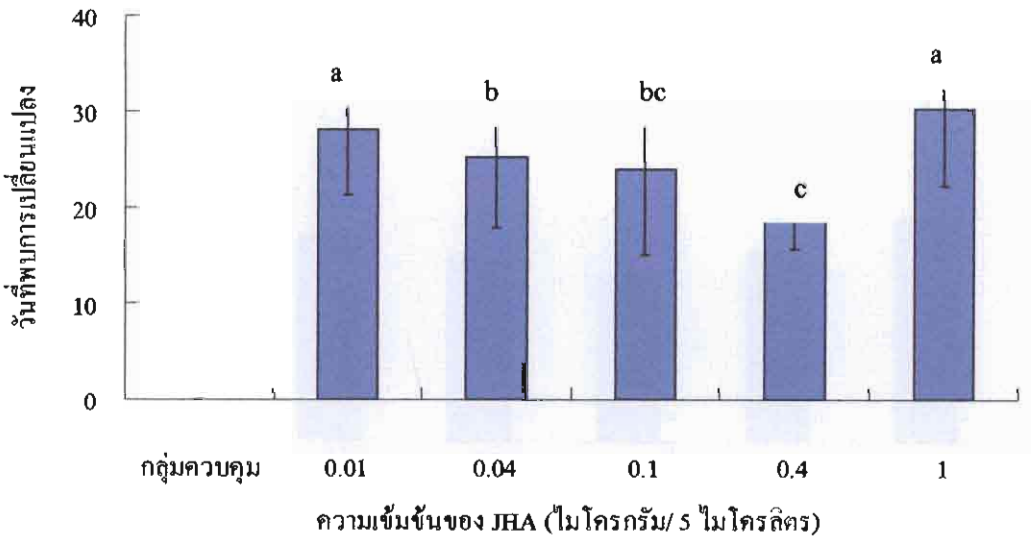
ภาพ 10 แสดงวันที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ภายหลังการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในเดือนพฤศจิกายน

ในเดือนธันวาคม พบว่า JHA ที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร มีผลชักนำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ได้เร็วที่สุด โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 19.5 ± 3.2 วัน แต่ให้ผลทางสถิติไม่ต่างจาก JHA ที่ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ที่ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 20.3 ±2.8 วัน สำหรับ JHA ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.04 และ 0.1 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ทำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยใช้ระยะเวลาไม่ต่างกัน คือ JHA ที่ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 24.2 ±6.2 วัน และ JHA ที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.1 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 24.0 ±5.8 วัน และ 25.4 ± 7.1 วัน ตามลำดับ (ภาพ 16)



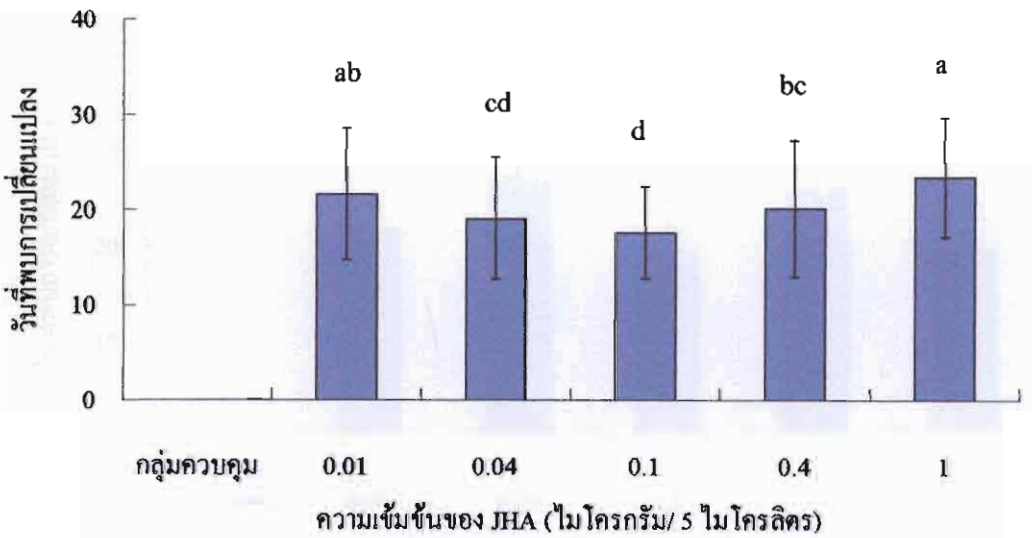
ภาพ 11 แสดงวันที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ภายหลังการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในเดือนธันวาคม

ในเดือนมกราคม พบว่า JHA ที่ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร มีผลชักนำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ได้เร็วที่สุด โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 19.4 ± 3.5 วัน แต่ JHA ที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาน้อยที่สุด โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 27.3 ± 8.4 วัน ส่วนความเข้มข้นของ 0.01, 0.04 และ 0.1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาใกล้เคียงกันโดยระยะเวลาที่ใช้ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น คือ JHA ที่ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 27.1 ± 6.6 วัน , JHA ที่ความเข้มข้น 0.04 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 22.8 ± 6.6 วัน และ JHA ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 21.3 ± 7.7 วัน ตามลำดับ (ภาพ 17)



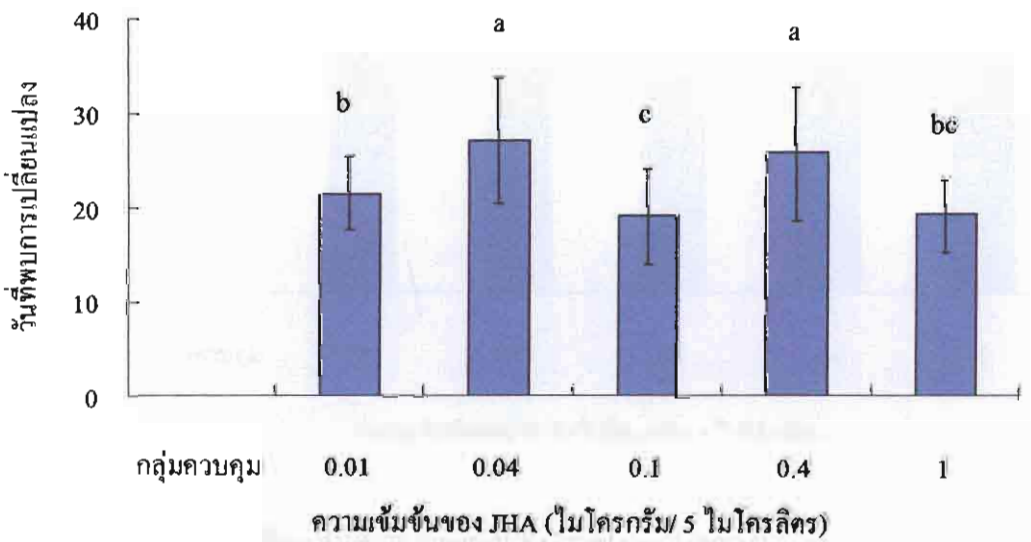
ภาพ 12 แสดงวันที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ภายหลังการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในเดือนมกราคม

ในเดือนกุมภาพันธ์ พบว่า JHA ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร มีผลชักนำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ได้เร็วที่สุด โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 16.9 ± 4.1 วัน และแตกต่างจากทุกกลุ่มความเข้มข้นของ JHA อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ใช้ระยะเวลานานที่สุดที่ JHA ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 22.6 ± 5.8 วัน ส่วน JHA ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.04 และ 0.4 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาใกล้เคียงกันแต่ก็มีความแตกต่างทางสถิติ โดย JHA ที่ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 20.7 ± 5.8 วัน , JHA ที่ความเข้มข้น 0.04 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 18.2 ± 5.6 วัน และ JHA ที่ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 22.6 ± 5.8 วัน ตามลำดับ (ภาพ 18)



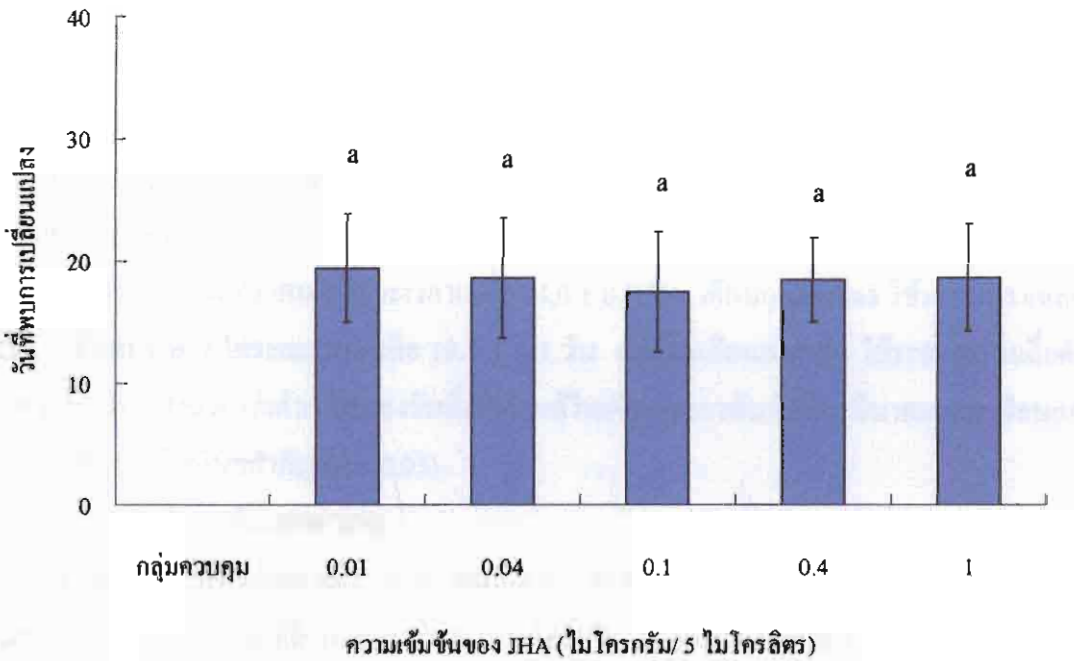
ภาพ 13 แสดงวันที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ภายหลังการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในเดือนกุมภาพันธ์

ในเดือนมีนาคม พบว่า JHA ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร มีผลชักนำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ได้เร็วที่สุด โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 18.1 ± 4.0 วัน และแตกต่างจากทุกกลุ่มความเข้มข้นของ JHA อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ยกเว้นไม่ต่างจาก JHA ที่ความเข้มข้น 1.0ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 19.3 ±3.4 วัน ส่วน JHA ที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.4 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาใกล้เคียงกัน คือใช้ระยะเวลานานและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย JHA ที่ความเข้มข้น0.04 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 26.8 ±5.9 วัน , JHA ที่ความเข้มข้น 0.4 ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 25.7 ± 7.0 วัน และ JHA ที่ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 20.9 ± 3.6 วัน ตามลำดับ (ภาพ 19)



ภาพ 14 แสดงวันที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ภายหลังการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในเดือนมีนาคม

ในเดือนเมษายน พบว่า JHA ที่ทุกความเข้มข้นมีผลชักนำให้ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้โดยใช้เวลาไม่ต่างกัน โดย JHA ที่ความเข้มข้น 0.01ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 18.7 ± 4.2 วัน, JHA ที่ความเข้มข้น 0.04ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 18.5 ± 5.3 วัน, JHA ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 17.3 ± 4.6 วัน, JHA ที่ความเข้มข้น 0.4ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 18.2 ± 3.2 วัน และ JHA ที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 17.8 ± 4.3 วัน (ภาพ 20)



ภาพ 15 แสดงวันที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ภายหลังการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในเดือนเมษายน

จาก ภาพ 15-20 จะเห็นได้ว่า ผลของความเข้มข้นของ JHA ที่มีต่อการเข้าดักแด้ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเหมือนการทดลองทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในเดือนตุลาคม ดังนั้นจึงสร้างกราฟเพื่อแสดงความสัมพันธ์ของระยะที่เข้าดักแด้ในแต่ละเดือน โดยแยกพิจารณาตามความเข้มข้นของ JHA ที่ donor larvae ได้รับ คือ 0.01, 0.04, 0.1, 0.4 และ 1.0 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ให้ผลดังนี้

JHA 0.01 ไมโครกรัม (ภาพ 21ก)

ในเดือนพฤศจิกายนและเดือนธันวาคม recepient larvae ใช้ระยะเวลาเฉลี่ยในการเข้าสู่ดักแด้ คิดเป็น 23.6 ± 6.9 วัน และ 25.6 ± 6.9 วัน ตามลำดับ และพบว่าในเดือนมกราคมใช้ระยะเวลาเฉลี่ย เพิ่มเป็น 28.1 ± 6.8 วัน แล้วระยะเวลาเฉลี่ยจะมีค่าลดลงในเดือนกุมภาพันธ์เป็น 21.6 ± 6.9 วัน เมื่อเข้าสู่เดือนมีนาคม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 21.5 ± 3.9 วัน และในเดือนเมษายนใช้ระยะเวลาเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 19.4 ± 4.4 วัน โดยพบว่า

เดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือน เมษายนมีค่าเฉลี่ยวันที่เข้าดักแด้ต่างจากเดือนพฤศจิกายน ธันวาคม และ เดือนมกราคม อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

JHA 0.04 ไมโครกรัม (ภาพ 21ข)

ในเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม พบว่า ระยะเวลาเฉลี่ยที่ recepient larvae ในการเข้าสู่ดักแด้มีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ โดยในเดือนพฤศจิกายน ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 24.7 ± 8.3 วัน เดือนธันวาคม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 25.4 ± 7.3 วัน จากนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการเข้าดักแด้จะลดลงในเดือนกุมภาพันธ์เป็น 19.1 ± 6.4 วัน แล้วระยะเวลาเฉลี่ยจะมีค่าเพิ่มขึ้นอีกครั้งในเดือนมีนาคม เป็น 27.1 ± 6.7 วัน ก่อนที่จะลดลงมีค่าต่ำที่สุดในเดือนเมษายน เป็น 18.6 ± 4.4 วัน และพบว่าค่าเฉลี่ยของวันที่เข้าดักแด้ในเดือนกุมภาพันธ์และเดือนเมษายน ต่างจากเดือนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

JHA 0.1 ไมโครกรัม (ภาพ 21ค)

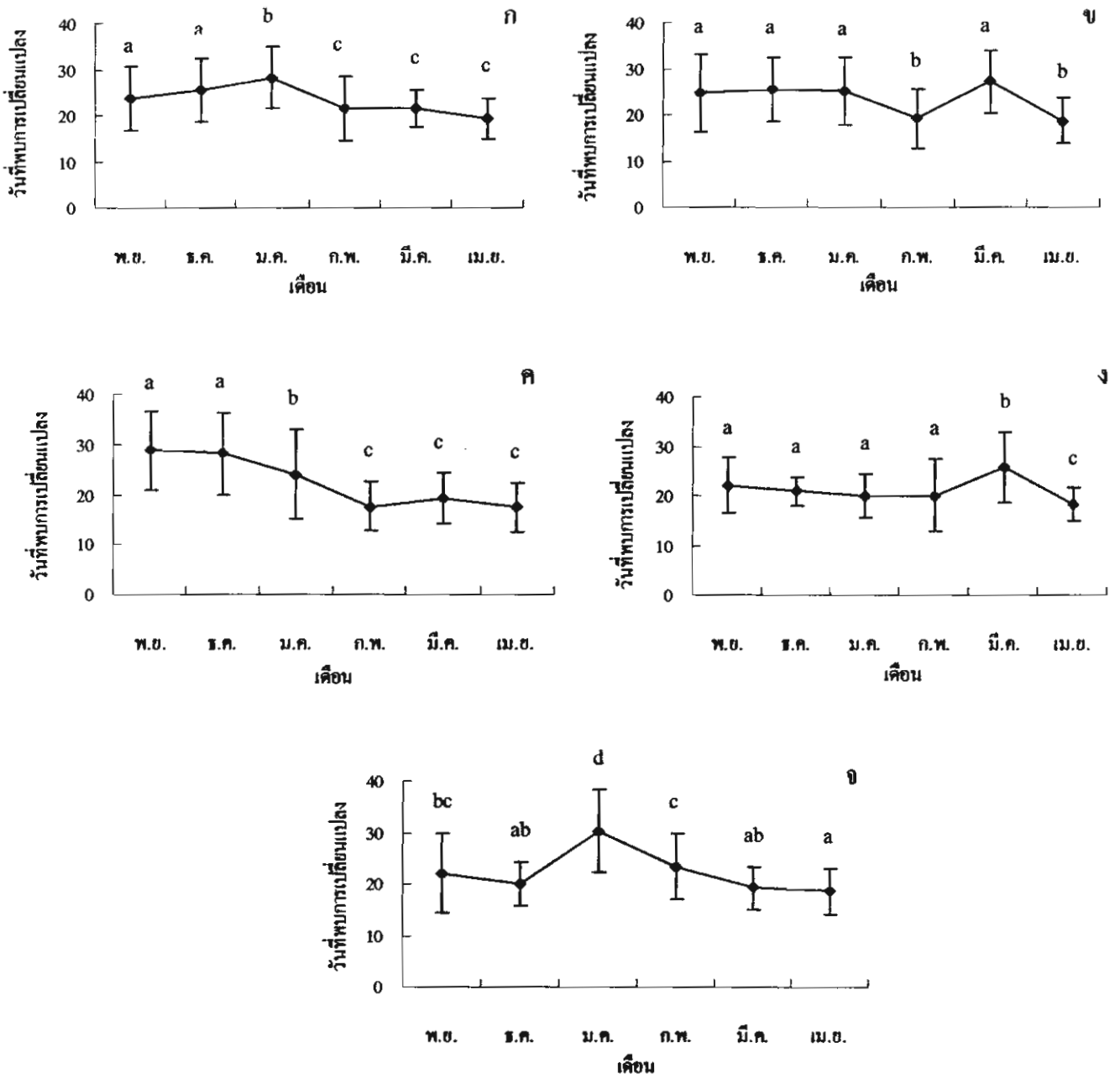
ในเดือนพฤศจิกายน recepient larvae ใช้ระยะเวลาเฉลี่ยในการเข้าสู่ดักแด้ คิดเป็น 28.9 ± 7.9 วัน และมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเข้าสู่เดือนเมษายน มีลำดับเป็นดังนี้คือ เดือนธันวาคม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 28.1± 8.1วัน เดือนมกราคมใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 24.0 ± 8.9 วัน เดือนกุมภาพันธ์ ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 17.6 ± 4.8 วัน เดือนมีนาคม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 19.1 ± 5.1 วัน และในเดือนเมษายน ใช้ระยะเวลาเฉลี่ยต่ำที่สุดเป็น 17.4 ± 4.9 วัน และพบว่าค่าเฉลี่ยของวันที่เข้าดักแด้ในเดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม และเดือนเมษายน ต่างจากเดือนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

JHA 0.4 ไมโครกรัม (ภาพ 21ง)

ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ พบว่า ระยะเวลาที่ recepient larvae ใช้ในการเข้าสู่ระยะดักแด้ มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าตามลำดับดังนี้ คือ ในเดือนพฤศจิกายน ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 22.2 ± 5.5 วัน เดือนธันวาคม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 20.9 ± 2.9วัน เดือนมกราคมใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 20.1 ± 4.4 วัน และเดือนกุมภาพันธ์ ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 20.1 ± 7.2 วัน ต่อมาในเดือนมีนาคม ระยะเวลาเฉลี่ยที่ใช้มีค่าแตกต่างจากเดือนพฤศจิกายน ถึง เดือนกุมภาพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 25.8 ± 7.2 วัน และในเดือนเมษายน ใช้ระยะเวลาเฉลี่ยต่ำที่สุด เป็น 18.4 ± 3.4 วัน และต่างจากเดือนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

JHA 1.0 ไมโครลิตร (ภาพ 21จ)

ในเดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม พบว่า ระยะเวลาเฉลี่ยที่ recepient larvae ใช้ในการเข้าสู่ดักแด้ มีค่าลดลงจาก 22.1 ± 7.6 วัน เป็น 20.0 ± 4.4 วัน จากนั้นระยะเวลาเฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นในเดือนมกราคม เป็น 30.3 ± 8.1 วันแล้วลดลงจนมีค่าเฉลี่ยต่ำที่สุดในเดือนเมษายน เป็น 18.6 ± 4.4 วัน สำหรับในเดือนกุมภาพันธ์ และมีนาคม ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 23.4 ± 6.3 วัน และ 19.2 ± 4.0 วัน ตามลำดับ



ภาพ 16 แสดงวันที่ recepient larvae เข้าสู่ระยะดักแด้ เปรียบเทียบในเดือนต่างๆ ภายหลังได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ที่ได้รับ JHA ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.01(ก), 0.04 (ข), 0.1(ค), 0.4 (ง) และ 1.0(จ) ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร

3. การเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์และกิจกรรมการหลั่งของฮอร์โมนเอคไดโซนในหนอนที่ได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก (recepient larvae)

จากผลการทดลองที่ 1 นั้น พบว่าการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกของ donor larvae ไปยัง recepient larvae ทำให้ recepient larvae เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ ดังนั้นน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนใน recepient larvae จึงทำการตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ของ recepient larvae และเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรกซิกของ recepient larvae ใน Grace's medium แล้วทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนโดยวิธี RIA ทุกๆ 2 วัน เพื่อตรวจหาระดับฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโม-ลิมพ์ และตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนใน medium ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรกซิก ได้แต่ละค่า เป็นตัวแทนของหนอนหนึ่งตัว (individual value) จากนั้นนำค่า individual ที่ได้ มาสร้างกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนที่ตรวจพบใน medium และในฮีโมลิมพ์ของ recepient larvae เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังแสดงในภาพ 22

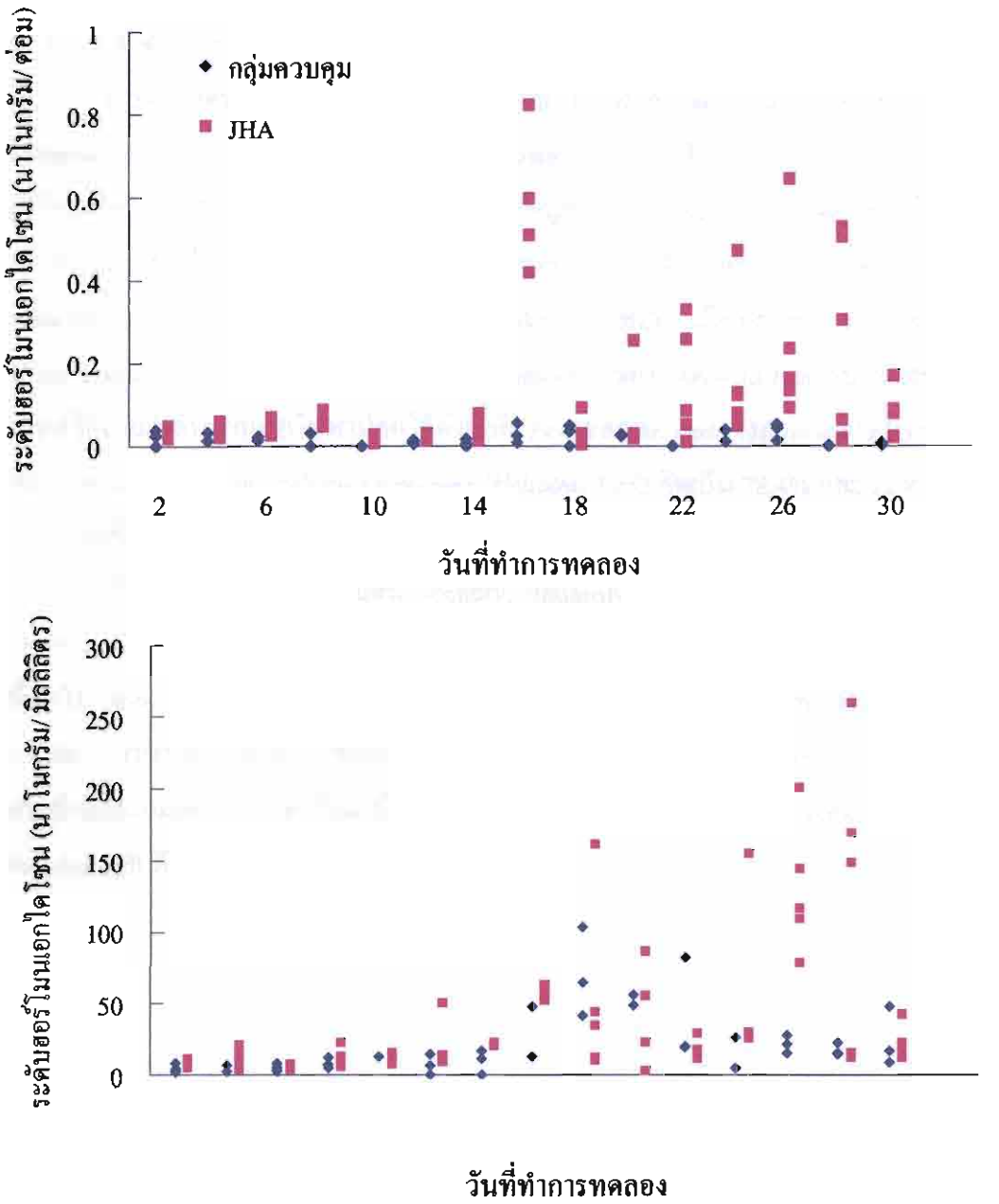
ภาพ22 ก เป็นกราฟที่แสดงถึงปริมาณของฮอร์โมนเอคไดโซนที่ตรวจพบใน Grace's medium โดยพบว่า ในกลุ่มควบคุม และกลุ่ม JHA มีระดับฮอร์โมนต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เมื่อนำค่า individual ที่ได้ไปคำนวณทางสถิติพบว่า ระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม JHA มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ระดับฮอร์โมนในกลุ่มควบคุมจากวันที่ 2 ถึงวันที่ 30 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กลุ่ม JHA มีระดับฮอร์โมนจากวันที่ 2 ถึงวันที่ 30 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กล่าวคือ ระดับฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้ใน medium เพิ่มสูงที่สุดในวันที่ 16 หลังจากการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ต่อมาระดับฮอร์โมนลดลง แล้วค่อยๆเพิ่มขึ้นในวันที่ 18 จนมีระดับสูงอีกครั้งในวันที่ 26 จากนั้นระดับฮอร์โมนจึงค่อยๆลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการทำการทดลอง

เมื่อนำค่า individual ของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนที่วัดได้จาก medium มาหาค่าเฉลี่ย พบว่าในกลุ่มควบคุมมีระดับฮอร์โมนเอคไดโซนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0 ถึง 0.0367 ± 0.0209 นาโนกรัมต่อต่อม สำหรับในกลุ่ม JHA พบว่าระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนในวันที่ 2 ค่อยๆ เพิ่มขึ้น และมีค่าเฉลี่ยจาก 0.0036 ± 0.0129 นาโน-กรัมต่อต่อม เป็น 0.0415± 0.0268 นาโนกรัมต่อต่อมในวันที่ 14 แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในวันที่ 16 ของการทำการทดลองพบว่า ระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนมีค่าเฉลี่ยเพิ่มสูงถึง 0.5877±0.1731 นาโน-กรัมต่อต่อม และแตกต่างจากระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนในวันอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากนั้นระดับฮอร์โมนเอคไดโซนจะลดลงในวันที่ 18 จนมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.0299 ± 0.0368 นาโนกรัมต่อต่อม แล้วระดับฮอร์โมนเอคไดโซนจะมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอีกครั้งจนสูงที่สุดในวันที่ 26 คิดเป็น 0.2543±0.2242 นาโนกรัมต่อต่อม ซึ่งค่าเฉลี่ยของระดับฮอร์โมนในวันที่ 22 ถึงวันที่ 28 มีค่าแตกต่างจากวันอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ภาพ 22ข เป็นภาพแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ โดยพบว่าในกลุ่มควบคุม และกลุ่ม JHA มีระดับฮอร์โมนต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเช่นเดียวกัน และพบว่าระดับฮอร์โมนจากวันที่ 2 ถึงวันที่ 30 ภายในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม JHA มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดย

จะเห็นได้ว่าในกลุ่มควบคุมระดับฮอร์โมนจะค่อนข้างคงที่ใน 14 วันแรก หลังจากการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรก-ซิก และเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 18 จากนั้นจะลดลงจนมีระดับใกล้เคียงกับในช่วงแรกของการทดลองสำหรับกลุ่ม JHA จะเห็นว่าระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 18 ของการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก

เมื่อนำค่า individual ของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนที่วัดได้จากฮีโมลิมพ์ (ตาราง 4, ภาคผนวก) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่ม JHA มาหาค่าเฉลี่ย (ตาราง 6. ภาคผนวก) พบว่าในกลุ่มควบคุมมีระดับฮอร์โมนเอคไดโซนเฉลี่ยในวันที่ 2 เป็น 3.88 ± 2.92 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเป็น 69.63 ± 31.32 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 18 เมื่อนำไปคำนวณทางสถิติพบว่า ในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 16 และในช่วงวันที่ 22 ถึงวันที่ 30 ระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับในกลุ่ม JHA พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นจากวันที่ 18 ที่ค่าเฉลี่ย 51.92 ± 62.31 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จนมีค่าสูงสุดในช่วงวันที่ 26 และ วันที่ 28 เป็น 129.38 ± 46.39 และ 120.66 ± 106.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำคำนวณทางสถิติพบว่า ระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนในวันที่ 2 ถึงวันที่ 18 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าในวันที่ 26 ถึงวันที่ 28 ระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนในวันอื่น



ภาพ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอกไดโซนใน recepient larvae โดย ก) แสดงถึงปริมาณของฮอร์โมนเอกไดโซนที่ตรวจพบใน Grace's medium และ ข) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์

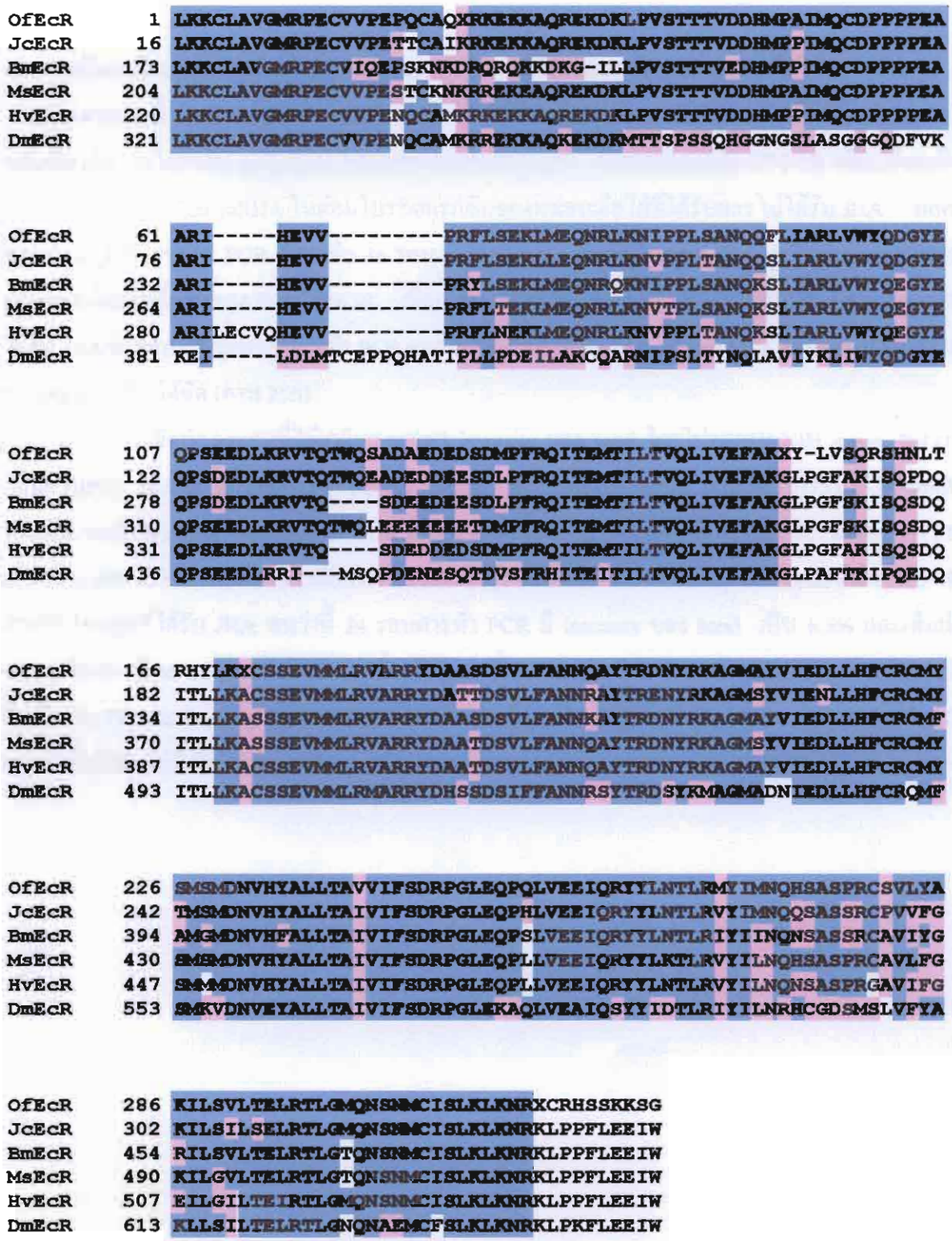
4. การหาลำดับเบสของ Ecdysone receptor gene (*EcR*) ในหนอนเยื่อไผ่

การหาลำดับเบสของ *EcR* โดย RT-PCR ทำให้ได้ partial sequence ของ *EcR* ในหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa EcR*) ขนาด 973 คู่เบส หรือ คิดเป็นกรดอะมิโน 324 ตัว (ภาพ 31) เมื่อนำ partial sequence ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ *EcR* ในแมลงชนิดอื่นๆ ที่มีข้อมูลใน GenBank database แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่ามี homology ของ nucleotide สูงที่สุด ใน *EcR* ของ common buckeye, *Junonia coenia* (*Junonia EcR*) คิดเป็น 81.1% และมี homology ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับ EcR ของ *D. melanogaster* (*Drosophila EcR*) ที่คิดเป็น 61.3% สำหรับ homology ของ *Omphisa EcR* กับแมลงชนิดอื่นๆ คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ตามลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ *EcR* ของ *M. sexta* (*Manduca* EcR) คิดเป็น 80.9% EcR ของ tobacco budworm, *Heliothis virescens* (*Heliothis EcR*) คิดเป็น 78.4% และ *EcR* ของ *B. mori* (*Bombyx EcR*) คิดเป็น 78.3%

เมื่อเปรียบเทียบความเหมือน (identity, similarity) ของกรดอะมิโนใน *Omphisa EcR* กับ กรดอะมิโนใน *EcR* ของแมลงชนิดอื่นๆ โดยโปรแกรม DNASIS พบว่ามีเปอร์เซนต์ความเหมือนของกรดอะมิโนสูงที่สุดใน *Manduca EcR* คิดเป็น 84.7% และมีเปอร์เซนต์ความเหมือนต่ำที่สุดใน *Drosophila EcR* คิดเป็น 55.4% สำหรับความเหมือนของกรดอะมิโนของ *Omphisa EcR* กับแมลงชนิดอื่นๆ คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ตามลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ *Junonia EcR* คิดเป็น 84.4% *Heliothis EcR* คิดเป็น 83.1% และ *Bombyx* EcR คิดเป็น 79.3% (ภาพ 24)

```
1   CTG AAG AAG TGT CTA GCG GTG GGC ATG AGG CCG GAG TGT GTT GTA CCA GAA CCC CAG TGT   60
      L   K   K   C   L   A   V   G   M   R   P   E   C   V   V   P   E   P   Q   C

61  GCG CAA AAW AGG AAA GAA AAG AAA GCC CAG AGA GAA AAA GAC AAA CTA CCA GTG AGC ACA  120
      A   Q   X   R   K   E   K   K   A   Q   R   E   K   D   K   L   P   V   S   T

121 ACG ACA GTA GAC GAC CAC ATG CCG GCA ATC ATG CAA TGT GAT CCA CCA CCC CCG GAG GCA  180
      T   T   V   D   D   H   M   P   A   I   M   Q   C   D   P   P   P   P   E   A

181 GCG AGG ATT CAT GAA GTG GTC CCG CGG TTC CTC TCG GAG AAG CTG ATG GAG CAG AAC CGG  240
      A   R   I   H   E   V   V   P   R   F   L   S   E   K   L   M   E   Q   N   R

241 CTG AAG AAC ATA CCC CCC CTC TCG GCT AAC CAG CAG TTC CTT ATC GCA AGG CTG GTG TGG  300
      L   K   N   I   P   P   L   S   A   N   Q   Q   F   L   I   A   R   L   V   W

301 TAC CAG GAC GGG TAC GAG CAG CCA TCG GAA GAG GAT CTC AAG AGA GTA ACA CAA ACT TGG  360
      Y   Q   D   G   Y   E   Q   P   S   E   E   D   L   K   R   V   T   Q   T   W

361 CAA TCG GCG GAT GCA GAA GAC GAA GAC TCC GAT ATG CCG TTC CGC CAG ATC ACA GAA ATG  420
      Q   S   A   D   A   E   D   E   D   S   D   M   P   F   R   Q   I   T   E   M

421 ACT ATC CTC ACA GTA CAG CTA ATA GTA GAG TTT GCC AAA GSC TAC CTG GTT TCT CAA AGA  480
      T   I   L   T   V   Q   L   I   V   E   F   A   K   X   Y   L   V   S   Q   R

481 TCT CAC AAC CTG ACC AGA TAA CAT TAT TTA AAG GMA TGC TCA AGC GAG GTG ATG ATG CTA  540
      S   H   N   L   T   R   *   H   Y   L   K   X   C   S   S   E   V   M   M   L

541 CGA GTA GCG AGG CGG TAC GAC GCC GCT TCG GAC AGC GTT CTG TTC GCC AAC AAC CAG GCG  600
      R   V   A   R   R   Y   D   A   A   S   D   S   V   L   F   A   N   N   Q   A

601 TAT ACT CGC GAC AAT TAC CGT AAG GCG GGC ATG GCG TAC GTC ATC GAG GAC CTG CTG CAC  660
      Y   T   R   D   N   Y   R   K   A   G   M   A   Y   V   I   E   D   L   L   H

661 TTC TGC CGC TGC ATG TAC TCC ATG TCG ATG GAC AAC GTG CAT TAG GCG CTC CTC ACT GCC  720
      F   C   R   C   M   Y   S   M   S   M   D   N   V   H   Y   A   L   L   T   A

721 GTC GTC ATA TTC TCA GAT CGG CCG GGT CTA GAA CAG CCG CAA CTC GTC GAG GAG ATC CAG  780
V   V   I   F   S   D   R   P   G   L   E   Q   P   Q   L   V   E   E   I   Q

781 AGA TAT TAC CTG AAC ACC CTC CGA ATG TAC ATA ATG AAC CAG CAC AGC GCG TCA CCT CGC  840
      R   Y   Y   L   N   T   L   R   M   Y   I   M   N   Q   H   S   A   S   P   R

841 TGC TCC GTC CTC TAC GCG AAG ATC CTG TCC GTA CTG ACC GAG CTG CGG ACC CTC GGA ATG  900
      C   S   V   L   Y   A   K   I   L   S   V   L   T   E   L   R   T   L   G   M

901 CAG AAC TCG AAC ATG TGA ATC TCG CTC AAG CTA AAG AAC AGG AAS TGC CGC CAT TCC TCG  960
      Q   N   S   N   M   C   I   S   L   K   L   K   N   R   X   C   R   H   S   S

961 AAG AAA TCT GGG A                                                             973
      K   K   S   G
```

ภาพ 18 แสดงลำดับเบส (DNA sequence) และลำดับกรดอะมิโน (partial amino acid sequence) ของ EcR ในหนอนเยื่อไผ่

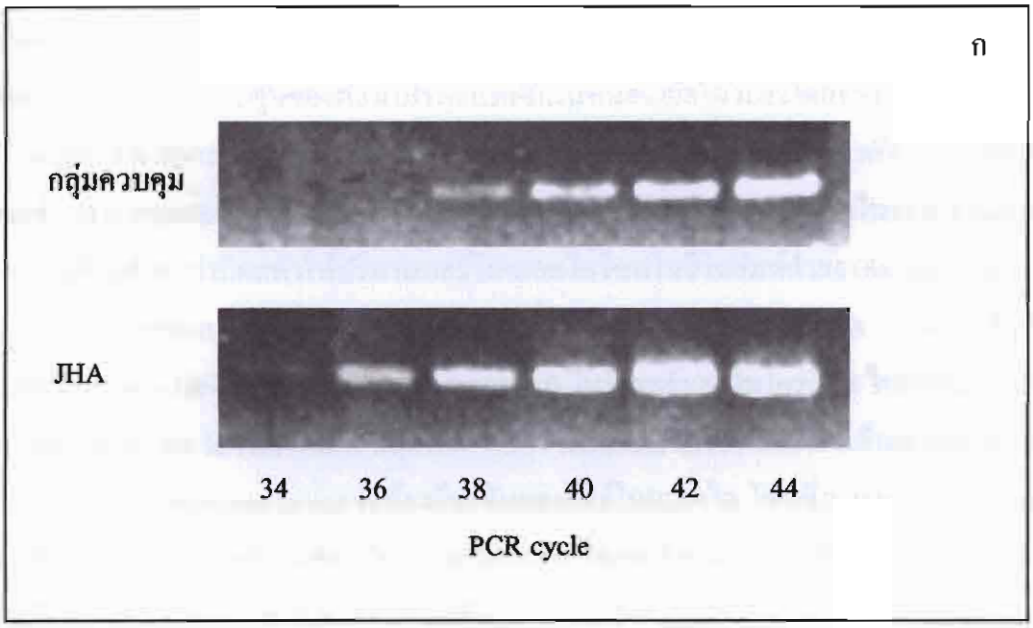


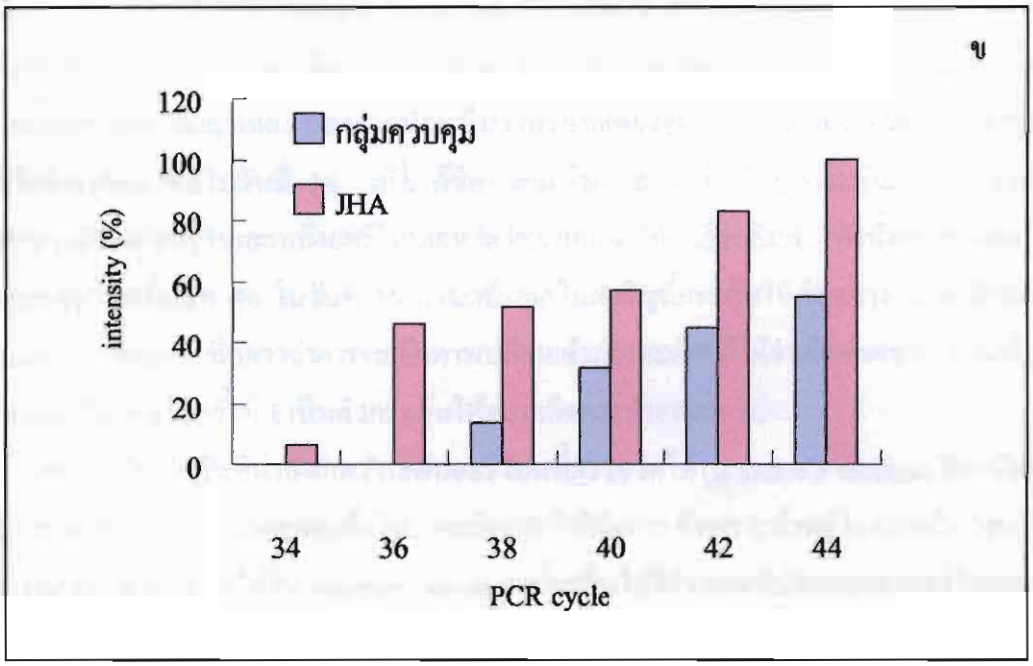
ภาพ 19 แสดง alignment ของ partial amino acid sequence ของ *EcR* ในหนอนเยื่อไผ่ (*Of EcR*) เปรียบเทียบกับใน common buckeye (*Jc EcR*), หนอนไหม (*Bm EcR*), หนอนใบยาสูบ (*Ms EcR*), tobacco budworm (*Hv EcR*) และ แมลงหวี่ (*Dm EcR*) เมื่อ ■ แทน identity และ ■ แทน similarity

5. การเปรียบเทียบการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนเยื่อไผ่

จากการที่ partial sequence ของ *Omphisa* EcR มี homology ของ nuleotide สูง เมื่อเทียบกับแมลงในกลุ่มเดียวกัน จึงใช้ลำดับ nucleotide ในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการทำ RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับและไม่ได้รับ JHA ผลการทดลองพบว่าที่รอบของ PCR ต่ำสุดคือ 34 รอบ มี band จางๆ เกิดขึ้นในกลุ่ม JHA แต่ไม่พบ band ในกลุ่มควบคุมแต่จะพบที่รอบของ PCR เป็น 38 เมื่อเปรียบเทียบ intensity ของ band ในกลุ่มควบคุมและ กลุ่มที่ได้รับ JHA ตามจำนวนรอบของการทำ PCR จะเห็นว่ากลุ่มที่ได้รับ JHA ให้ band ที่มี intensity มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด (ภาพ 25ก)

จากนั้นเมื่อนำ band ที่ได้มาวิเคราะห์หา intensity ของ band โดยโปรแกรม NIH image พบว่าในกลุ่มควบคุมที่ 34 และ 36 รอบการทำ PCR มี intensity ของ band เป็นศูนย์ แต่เมื่อเข้าสู่รอบที่ 38 ของการทำ PCR พบว่า intensity ของ band มีค่าเป็น 13.7% และเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่รอบที่ 40 และ 42 ของการทำ PCR เป็น 32% และ 44.9% ตามลำดับ เมื่อการทำ PCR เข้าสู่รอบที่ 44 พบว่า intensity ของ band มีค่าเป็น 54.9% สำหรับในกลุ่มที่ได้รับ JHA พบว่าที่ 34 รอบการทำ PCR มี intensity ของ band เป็น 6.5% และเพิ่มเป็น 46.2% ในรอบที่ 36 ของการทำ PCR เมื่อเข้าสู่รอบที่ 38 ของการทำ PCR พบว่า intensity ของ band เพิ่มขึ้นเป็น 51.7% และ intensity ของ band เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อเข้าสู่รอบที่ 40, 42 และ 44 ของการทำ PCR ตามลำดับดังต่อไปนี้ คือ 57.3%, 82.8% และ 100% ตามลำดับ (ภาพ 25ข)





ภาพ 20 แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนเยื่อไผ่ที่ไม่ได้รับและได้รับ JHA เมื่อ ก) แสดงการเปรียบเทียบจากภาพที่ถ่ายได้จากการทำอิเลกโทรฟอเรซิส และ ข) แสดงการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซนต์ความเข้มของแถบ band โดยใช้โปรแกรม NIH image ในการวิเคราะห์

อภิปรายผล

1. ผลของ JHA ต่อการกระตุ้นของต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

การทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (transplantation) ได้มีขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเรื่องบทบาทของฮอร์โมนมานานแล้ว เช่น การทดลองใน *M. sexta* โดยทำการผ่าตัดเอาต่อมโปรทอแรกซิกในระยะดักแด้ออกในวันที่เกิดการเข้าสู่ดักแด้ พบว่ามีผลทำให้ปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ต่ำลง (Sakurai *et al.*, 1991)

จากการทดลองปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย JHA ที่ความเข้มข้นต่างๆในหนอนเยื่อไผ่ (donor larvae) คือ 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ไปยังหนอนอีกตัวที่ไม่ได้รับฮอร์โมน (recepient larvae) ในเดือนตุลาคม พบว่า recepient larvae สามารถเข้าสู่ดักแด้ได้ แสดงว่าฮีโมลิมพ์ในร่างกายของ recepient larvae จะต้องมีระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนที่สูงมากขึ้น เพราะฮอร์โมนเอคไดโซนเป็นฮอร์โมนสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการลอกคราบโดยจะมีฤทธิ์ไปกระตุ้นเซลล์อิพิเดอร์มิสให้เกิดการแบ่งตัวเพื่อสร้างชั้นคิวติเคิลใหม่และสลัดคิวติเคิลเก่าทิ้งไป (Schneiderman and Gilbert, 1964) การที่พบว่าแมลงมีระดับฮอร์โมนเอคไดโซนที่เพิ่มสูงมากขึ้นแสดงว่าแมลงกำลังมีการเปลี่ยนแปลงหรือขยายขนาดรูปร่างเกิดขึ้น จากการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนใน Grace's insect culture medium ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอ-แรกซิกของ recepient larvae และในฮีโมลิมพ์ของ recepient larvae พบว่าปริมาณฮีโมลิมพ์ที่ตรวจพบใน Grace's medium เพิ่มสูงขึ้นครั้งแรก ในวันที่ 16 หลังจากการทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอ-แรกซิก จากนั้นแล้วปริมาณจะลดลง นอกจากนี้จะเห็นว่าปริมาณของฮอร์โมนเอคไดโซนที่ตรวจได้ในฮีโมลิมพ์มีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 18 เห็นได้ชัดว่าต่อมโปรทอแรกซิกนั้นถูกกระตุ้นแล้ว จึงทำให้ต่อมมีความสามารถในการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนออกมาได้ในฮีโมลิมพ์ ดังนั้นการที่ต่อมโปรทอแรกซิกถูกกระตุ้นในครั้งแรก คือ ในวันที่ 16 น่าจะเป็นกลไกสำคัญที่กระตุ้นให้ต่อมทำงานได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Riddiford (1982) ที่กล่าวว่าการจะเกิดการเปลี่ยนเข้าสู่ระยะดักแด้ได้จำเป็นต้องอาศัยการเพิ่มระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนในครั้งที่ 1 เป็นตัวกระตุ้นให้ต่อมเกิดการทำงานต่อไป

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าระดับฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้ใน Grace's medium มีค่าน้อยคือ สูงสุดมีค่าประมาณ 0.8 นาโนกรัมต่อต่อมจึงไม่น่าจะมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ออกมาได้สูงเท่าที่ตรวจวัดได้ใน recepient larvae ดังนั้นเป็นไปได้ว่าการที่ปริมาณของฮอร์โมนเอคไดโซนที่ตรวจวัดได้ในฮีโมลิมพ์ของ recepient larvae มีสูง น่าจะเกิดเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างต่อมโปรทอแรกซิกของ donor larvae ที่ถูกกระตุ้นโดยตรงโดย JHA กับต่อมโปรทอแรกซิกของ recepient larvae เอง เพราะ Singtripop *et al.* (2000) รายงานว่าต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับการกระตุ้นโดย JHA โดยตรงจะสามารถสร้างและหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนได้ในวันที่ 4 หลังจากการได้รับ JHA ดังนั้นการที่ต่อมโปรทอแรกซิกของ recepient larvae ถูกกระตุ้นให้ทำงานได้มากขึ้น น่าจะเป็นเพราะต่อมถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอคไดโซนที่ผลิตได้จากต่อมโปรทอแรกซิกของ donor larvae และเมื่อระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนถึงระดับ suprathreshold ก็จะเกิด feedback activation กระตุ้นการทำงานของต่อมเอง แล้วทำให้ต่อมโปรทอแรกซิกมีความสามารถในการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนได้อย่างต่อเนื่องต่อไป

นอกจากนี้ยังจะเห็นได้ว่าปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนที่วัดได้ใน Grace's medium จะค่อยๆลดลงจนลดลงมากที่สุดในวันที่ 30 ของการทดลอง ในขณะที่ปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโม-ลิมพ์มีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า เกิดการควบคุมการทำงานของระบบฮอร์โมนที่เรียกว่า feedback inhibition กล่าวคือ เมื่อระดับฮอร์โมนในร่างกายเพิ่มขึ้นสูง จะเป็นสัญญาณไปยังอวัยวะที่เป็นแหล่งสร้างเพื่อให้ลดการสังเคราะห์หรือหลั่งออกมาในร่างกายมาก โดย Sakurai *et al.*(1989) ได้ทำการศึกษาการทำงานของต่อมโปรทอแรกซิกใน *M. sexta* พบว่าต่อมโปรทอแรกซิกสามารถถูกกระตุ้นให้หลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนออกมาได้มากเมื่อมีการให้ฮอร์โมนเอคไดโซน หรือ 20-hydroxyecdysone โดยระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนที่เพิ่มขึ้นจะเป็นกลไกการกระตุ้นย้อนกลับไปยังต่อมโปรทอแรกซิกให้หลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนได้สูงขึ้นอีก จากนั้นถ้ามีระดับของฮอร์โมนเอคไดโซนที่สูงมากจะกลับไปเป็นกลไกการยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนของต่อมโปรทอแรกซิกเอง ทำให้ต่อมโปรทอแรกซิกลดการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซน

สำหรับระยะเวลาที่ JHA ใช้ในการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกถูกทดสอบโดยการทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเดือนตุลาคม ในวันที่แตกต่างกัน คือวันที่ 1, 2 และ 3 ภายหลังการได้รับ JHA ซึ่งผลการทดลองพบว่า การปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกของ donor larvae ในวันที่ 1 หลังจากที่ donor larvae ได้รับ JHA มีผลทำให้ recepient larvae เปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ต้องการในการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกคืออย่างน้อยหนึ่งวัน และพบว่าการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกของ donor larvae ในวันที่ 2 และ 3 ให้ผลไม่ต่างกันจากการทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในวันแรก แสดงว่าต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสน่าจะมีความสามารถในการตอบสนองต่อฮอร์โมนตั้งแต่ในวันที่ 1 ที่ได้รับ JHA และพบว่าการตอบสนองของต่อมโปรทอแรกซิกต่อ JHA ขึ้นกับความเข้มข้นของ JHA ที่ให้ไป โดยถ้าความเข้มข้นของ JHA มากจะทำให้ระยะเวลาที่ทำให้เกิดการเข้าดักแด้ของ recepient larvae เกิดได้เร็วขึ้น และถ้าความเข้มข้นของ JHA ต่ำจะทำให้ระยะเวลาที่ทำให้เกิดการเข้าดักแด้ของrecepient larvae ช้ากว่า แต่ได้ดักแด้ที่มีลักษณะสมบูรณ์มากกว่า แสดงให้เห็นว่าการให้ JHA ในปริมาณที่เหมาะสม ไม่มากหรือน้อยเกินไปแก่ donor larvae มีส่วนสำคัญต่อการเกิดลักษณะดักแด้ใน recepient larvae

เมื่อทำการศึกษาต่อไป โดยการทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในระหว่างระยะไดอะ-พอสแต่ละเดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือน เริ่มจากเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน โดยลดความเข้มข้นของJHA ให้มีความเข้มข้นจาก 0.01, 0.04, 0.1, 0.4 และ 1.0 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร พบว่า recepient larvae เกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้ได้เช่นเดียวกับ recepient larvae ที่ทำการทดลองปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในเดือนตุลาคม แต่ความเข้มข้นของ JHA ในการทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอ-แรกซิกจากเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายนไม่ทำให้เห็นผลชัดเจนในแง่การชักนำการเข้าดักแด้ให้เร็วขึ้น เพราะพบว่าบางครั้ง JHA ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าจะสามารถชักนำให้หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้โดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่า แต่การที่นำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์โดยดูผลเปรียบเทียบการเข้าดักแด้ในแต่ละเดือน พบว่า recepient larvae เกิดการสู่ดักแด้ได้เร็วที่สุดเกิดในเดือนเมษายนที่ทุกความเข้มข้นและเกิดได้ช้าที่สุดที่เดือนพฤศจิกายนทั้งนี้เพราะว่า responsiveness

และ sensitivity ของหนอนในแต่ละเดือนไม่เหมือนกัน โดย Singtripop *et al.* (2002) ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า responsiveness ในที่นี้ว่าเป็นการตอบสนองของหนอนต่อฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone ทำให้หนอนเกิดการเข้าสู่ดักแด้ และสามารถคำนวณค่า responsiveness ของหนอนเป็นค่าเปอร์เซนต์ที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ ส่วนคำว่า sensitivity คำนวณได้จากระยะเวลาที่หนอนใช้ในการเปลี่ยนแปลงเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ภายหลังจากการได้รับ 20-hydroxyecdysone โดยพบว่าหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสในเดือนกันยายนและเดือนพฤศจิกายน เป็นระยะที่ตัวหนอนมี responsiveness ต่อฮอร์โมนเอคไดโซนต่ำ เพราะเป็นหนอนในระยะ early diapause เพิ่งเกิดการเข้าสู่ระยะไดอะพอสใหม่ๆ แต่ responsiveness และ sensitivity ของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ทำให้หนอนมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนได้สูงขึ้น เมื่อใกล้ระยะเวลาการเข้าสู่ดักแด้ ซึ่งอยู่ในช่วงเดือนเมษายน ดังนั้นการทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอ-แรกซิกในเดือนที่แตกต่างกันจึงมีผลทำให้ระยะเวลาที่ชักนำให้หนอนเกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้เกิดได้ต่างกัน

2. ผลของ JHA ต่อการแสดงออกของ EcR mRNA ในหนอนเยื่อไผ่

สาเหตุที่ทำการศึกษาการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิก ของหนอนเยื่อไผ่ เนื่องจากพบว่า *EcR* มี localization อยู่บริเวณนิวเคลียสของต่อมโปรทอแรกซิก (Song *et al.*, 1997) ตลอดจนเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกายแมลง และพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮอร์โมนเอคได-โซนในฮีโมลิมพ์มีผลต่อการแสดงออกของ EcR mRNA ดังนั้นเพื่อจะศึกษาการแสดงออกของ EcR mRNAในต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสที่ได้รับฮอร์โมน จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคในระดับโมเลกุลมาช่วยในการศึกษา เพราะการจะศึกษาการแสดงออกของ EcR mRNA จำเป็นที่จะต้องทราบถึงลำดับเบสของ *EcR* ในหนอนเยื่อไผ่ แต่เนื่องจากยังไม่มีการรายงานเรื่องลำดับเบสของ *EcR* มาก่อนจึงจำเป็นต้องทำการ clone EcR โดยการออกแบบ degenerated primer ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากส่วนของลำดับกรดอะมิโนที่มีใน *EcR* ของแมลงอื่นๆ ในบริเวณที่มีความเหมือนกันสูง แล้วนำมาทำ PCR หลายๆ ครั้งเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนของ *EcR* ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากที่สุด จากนั้นจะนำมา sequence เพื่อหาลำดับหาลำดับเบส จากการหาลำดับเบสทำให้ได้ EcR ขนาดประมาณ 973 คู่เบส หรือคิดเป็น กรดอะมิโนประมาณ 324 ตัว และพบว่ามีลำดับเบสที่แปลเป็นกรดอะมิโนไม่ได้เกิดขึ้นบ้างในช่วงลำดับเบสที่ sequence ได้ ดังนั้นการหาลำดับเบสในครั้งนี้จึงเหมือนเป็นข้อมูลเบื้องต้นต่อการนำไปใช้ต่อไปได้ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโน จะพบว่า *EcR* มีเปอร์เซนต์ความเหมือนใน *D. melanogaster* ต่ำที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากเป็นแมลงที่อยู่ต่างกลุ่มกันเพราะจัดว่าเป็นแมลงในกลุ่ม Diptera แต่พบว่า *EcR* ของหนอนเยื่อไผ่มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนสูงในแมลงอันดับเดียวกัน ได้แก่ *J. coenia*, *M. sexta*, *H. virescens* และ *B. mori* ซึ่งเป็น Lepidoptera เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าในอนาคต หากเราสามารถทราบลำดับเบสและกรดอะมิโนทั้งหมดของ *EcR* ในหนอนเยื่อไผ่ จะทำให้เรารู้ถึงสายวิวัฒนาการของแมลงในกลุ่มเดียวกันได้ อีกทั้งยังจะทำให้สามารถอธิบายถึงกลไกการควบคุมการเปลี่ยนแปลงและรักษารูปร่างของแมลงในกลุ่มเดียวกันในระดับโมเลกุลได้

จากการทดลองเพื่อศึกษาเปรียบเทียบการการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอ-แรกซิกที่ได้รับ JHA แล้วพบว่ามีการแสดงออกของ EcR mRNA มากขึ้น เนื่องมาจากการให้ JHA มีผลให้ปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีรายงานพบว่าการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์ มีผลทำให้การแสดงออกของ EcR mRNA เพิ่มขึ้น โดยพบได้ ในแมลงหลายชนิด เช่น ใน *C. fumiferana* (Kothapalli, 1995) และ *C. suppressalis* (Minakuchi *et al.*, 2002) ดังนั้นเมื่อทราบถึงการแสดงออกของ EcR mRNA ในเบื้องต้น จะสามารถติดตามหา localization ของ EcR mRNA ในเนื้อเยื่ออื่นๆของหนอนเยื่อไผ่ได้ เพื่อใช้ในการอธิบายถึงกลไกของฮอร์โมนและ partner protein อื่นๆ ตลอดจนปัจจัยที่มีผลต่อการสิ้นสุดของระยะไดอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ได้ในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการรักษาสภาพการเป็น larval diapause ในหนอนเยื่อไผ่ เกิดเนื่องจากกลไก positive feedback activation ถูกยับยั้งไว้ไม่ให้แสดงออก แต่ larval diapause ในหนอนเยื่อไผ่ถูกชักนำให้สิ้นสุดได้โดยการให้ JHA โดย JHA มีผลทำให้เกิดการสิ้นสุดของระยะไดอะพอสได้ โดย JHA กระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกให้มีการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนออกมา และระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นต่อมโปรทอ-แรกซิก เกิดขึ้นภายใน 1 วัน นอกจากนี้พบว่าการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกในเดือนตุลาคม JHA ที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ทำให้ recepient larvae เข้าสู่ดักแด้ได้เร็ว แต่เมื่อใช้หนอนระยะไดอะพอสในเดือนต่างๆ จากเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายนมาทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก พบว่า หนอนในเดือนที่แตกต่างกัน มีผลทำให้ระยะเวลาในการเข้าดักแด้แตกต่างกัน โดยในเดือนเมษายนเกิดได้เร็วที่สุด เนื่องจากเป็นช่วงที่หนอนมี sensitivity และ responsiveness ต่อฮอร์โมนเอคไดโซน การตอบสนองต่อฮอร์โมนเอคไดโซนจึงเกิดได้เร็วกว่าหนอนในเดือนอื่นๆ นอกจากนี้ผลการตรวจวัดระดับฮอร์โมนเอค-ไดโซนในฮีโมลิมพ์ของ recepient larvae และ การทำงานของต่อมโปรทอแรกซิกพบว่าต่อมถูกกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซนออกมาในวันที่ 16 หลังการปลูกถ่าย ทำให้ปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโม-ลิมพ์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าฮอร์โมนเอคไดโซนภายในฮีโมลิมพ์กระตุ้นให้เกิดการเข้าดักแด้โดยตรง หรือ เพราะฮอร์โมนเอคไดโซนมีผลต่อกลไก positive feedback ทำให้ต่อมสามารถทำงานได้

นอกจากนี้ ผลการวิจัยในระดับโมเลกุลทำให้พบว่าการแสดงออก EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรก-ซิกที่ได้รับ JHA มีมากกว่าต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ไม่ได้รับฮอร์โมน แสดงให้เห็นว่า JHA มีผลในระดับโมเลกุลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ EcR mRNAในต่อมโปรทอแรกซิก และการหาลำดับเบสของ *EcR* ในหนอนเยื่อไผ่ทำให้ได้ partial amino acid sequence ของ *EcR* ในหนอนเยื่อไผ่ ที่มีขนาดประมาณ 973 คู่เบส ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประมาณ 324 ชนิดที่มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนสูงเมื่อเทียบกับแมลงในอันดับ Lepidoptera ด้วยกัน และผลจากการศึกษาการแสดงออกของ EcR mRNA ของต่อมโปรทอแรกซิกที่ได้รับ JHA แสดงให้เห็นว่า JHA มีผลต่อการสิ้นสุดระยะไดอะพอส

ในหนอนเยื่อไผ่ โดยการเพิ่มปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์และเพิ่มการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอ-แรกซิก

การศึกษาในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า การสิ้นสุดของระยะ larval diapause ในหนอนเยื่อไผ่ สามารถชักนำโดยฮอร์โมนจูวีไนล์โดยเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนซึ่งไปมีผลต่อกลไกการทำงานของฮอร์โมนและการเพิ่มกิจกรรมการหลั่งฮอร์โมนของต่อมโปรทอแรกซิก รวมไปถึงการแสดงออกของรีเซบเตอร์ยีนที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของฮอร์โมนเอคไดโซนด้วย อย่างไรก็ตาม านวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับกลไกของฮอร์โมนต่อการสิ้นสุดของลาร์วัลได-อะพอสในหนอนเยื่อไผ่ ยังต้องมีการค้นคว้าและทำวิจัยในระดับสูงต่อไป เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงบทบาทของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของหนอนเยื่อไผ่ และเพื่อเป็นองค์ความรู้ใหม่ทางด้านต่อมไร้ท่อวิทยาในแมลงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เดชา วิวัฒน์วิทยา. 2535. ชีววิทยาของหนอนกินเยื่อไม้ไผ่.Biology of Bamboo : Caterpillar เอกสารเสนอต่อที่ประชุมการป่าไม้. กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ.

ไพฑูรย์ เล็กสวัสดิ์. 2538. ชีวประวัติและศัตรูธรรมชาติของหนอนเยื่อไผ่ (Omphisa sp., Pyralidae: Lepidopter). การอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 2 เล่มที่ 1 สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย ฯลฯ. หน้า 96-102.

เสาวภา สนธิไชย. 2525. กีฏวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เสาวภา สนธิไชย. 2536. ชีววิทยาของแมลง เล่มที่ 2. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Barrett F.M. 2000. Zoology 252y – lecture notes [Online]. Available: http://www.zoo.toronto.ca/zoo3445/2001Group6/Larval

de Kort C.A.D., Bergot B.J. and Schooley D.A. 1982. The nature and titer of juvenile hormone in the Corolado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. J. Insect Physiol., 28, 471-474.

Denlinger D.L. 1985. Hormonal control of diapause. In Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.), Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology, Oxford, Pergamon Press, pp. 353-413.

Fujiwara H., Jindra M., Newitt R., Palli S.R. and Riddiford L.M. 1995. Cloning of ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its mRNA in wings. Insect. Biochem. Mol. Biol., 25, 845-856.

Gilbert L.I., Song Q. and Rybczynski. 1997. Control of ecdysteroidogenesis: Activation and inhibition of prothoracic gland activity. Invert. Neurosci., 3, 205-16.

Jindra M. and Riddiford L.M. 1996. Expression of ecdysteroid-regulated transcripts in the silk gland of the wax moth, *Galleria mellonella*. Dev. Genes Evol., 206, 305-314.

Jindra M., Malone F., Hiruma K. and Riddiford L.M. 1996. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs of two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Dev. Biol., 180, 258-272.

Kamimura M., Tomita S., Kiuchi M. and Fujiwara H. 1996. Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disc development. Comp. Biochem. Physiol., 113, 341-347.

Kamimura M., Tomita S., Kiuchi M. and Fujiwara H. 1997. Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms ecdysteroid-dependent

transcription in cultured anterior silk glands. Eur. J. Biochem., 248, 786-793.

Kitazawa T., Kanda T. and Takami T. 1963. Changes of mitotic activity in the silkwom egg in the relation to diapause. Bull. Seric. Exp. Sta., 18, 283-295.

Kothapalli R., Palli S.R., Ladd T.R., Sohi S.S., Cress D., Dhadialla T.S., Tzertzinis G. and Retnakaran A. 1995. Cloning and developmental expression of the ecdysone receptor gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. Dev. Genet.,17, 319-30.

Minakuchi C., Nakagawa Y., Kiuchi M., Tomita S. and Kamimura M. 2002. Molecular cloning, expression analysis and functional confirmation of two ecdysone receptor isoforms from the rice stem borer *Chilo suppressalis*. Insect. Biochem. Mol. Biol. 32, 999-1008.

Nijhout H.F. and Wheeler D.E. 1982. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. Quart. Rev. Biol., 57, 109-133.

regulator. In Rocstein M. (Ed.), Biochemistry of insect, New York, Academic Press, pp. 347-350.

Riddiford L.M. 1985. Hormone action at the cellular level. In Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.), Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology, Oxford, Pergamon Press, pp. 37-84.

Riddiford L.M. 1993. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. Receptor, 3, 203-209.

Sakurai S. 1983. Temporal organization of endocrine events underlying larval-larval ecdysis in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 29, 919-932.

Sakurai S., Okuda M., and Ohtaki T. 1989. Juvenile hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotropic hormone in prothoracic glands of *Bombyx mori*. Gen. Comp. Endocrinol., 75, 222-230.

Sakurai S. and William C.M. 1989. Short-loop negative and positive feedback on ecdysone secretion by prothoracic gland in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.
Gen. Comp. Endocrinol., 75, 204-216.

Sakurai S., Warren J.T. and Gilbert L.I. 1991. Ecdysteroid synthesis and molting by the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, in the absence of prothoracic glands. Arch. Insect Biochem. Physiol., 18, 13-36.

Schneiderman H.A. and Gilbert L.I. 1964. Control of growth and development in insects. Science, 143, 325-333.

Singtripop T., Wanichacheewa S., Tsuzuki S. and Sakurai, S. 2000. Larval growth and diapause

in tropical moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson. Zool. Sci., 16, 725-733.

Singtripop T., Wanichacheewa S. and Sakurai, S. 2000. Juvenile hormone –mediated termination of larval diapause in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. Insect. Biochem. Mol. Biol., 30, 847-854.

Singtripop T., Tungjitwitayakul J. and Sakurai S. 2002. Intensity of larval diapause in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. Zool. Sci., 19, 577-582

Slama K. 1995. The present status of the mode of action of insect juvenile hormone. J. Zool., 45, 71-78.

Song Q., Alnemri E.S., Litwack G. and Gilbert LI. 1997. An immunophilin is a component of the insect ecdysone receptor (EcR) complex. Insect. Biochem. Mol. Biol., 27(11), 973-82.

Tauber M.J., Tauber C.A. and Masaki S. 1986. Seasonal adaptation of insects. Oxford, Oxford University Press, pp. 67-110.

Yagi S. and Fukaya M. 1974. Juvenile hormone as a key factor regulating larval diapause of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera : Pyralidae). Appl. Ent. Zool., 9, 247-255.

Yagi S. and Akaike N. 1976. Regulation of larval diapause by juvenile hormone in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. J. Insect Physiol., 22, 389-392.