

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของตัวหนอนในอันดับ Lepidoptera

Borror (1989) รายงานว่า ตัวหนอนในอันดับ Lepidoptera แบ่งเป็นตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืน (butterflies) และผีเสื้อกลางคืน (moths) โดยหนอนผีเสื้อดังกล่าว เรียกว่า caterpillars เป็นตัวหนอนแบบ cruciform โดยมีส่วนหัวเจริญดีและลำตัวเป็นทรงกระบอก มีปล้อง 13 ปล้อง แบ่งเป็นส่วนนอก 3 ปล้องและส่วนท้อง 10 ปล้อง มีหนวด (antennae) ตั้มนาก 1 คู่ ปล้องแต่ละปล้องมีขา 1 คู่ โดยขาจริง (true legs) อยู่ที่ปล้องอกปล้องแรก (prothorax) ส่วนปล้องที่ 3, 4, 5, 6 และ 10 มีขาเทียม (prolegs) ปล้องละ 1 คู่ ขาเทียมต่างจากขาจริงคือ มีกล้ามเนื้อมากกว่าและตรงปลายมีตะขอเล็กๆ เรียงเป็นวง เรียกว่า crochets โดยการเรียงตัวของ crochets บนขาเทียมของ caterpillars ในพวก Pyralidae เป็นแบบ triordinal คือมีความสูงต่างกัน 3 ระดับและมี spiracles บนปล้องท้องปล้องที่ 1-8 (ไพฑูรย์, 2524) หนอนผีเสื้อบางชนิดมีขาเทียมน้อยกว่า 5 คู่ บางชนิดมีมากกว่า 5 คู่ ยกตัวอย่างเช่น sawfly larva มีขาเทียมมากกว่า 5 คู่และบนขาเทียมไม่มี crochets โดยทั่วไป sawfly larva มีขนาดตัวยาวประมาณ 25 มิลลิเมตร หนอนผีเสื้อส่วนมากกินส่วนต่างๆ ของพืชเป็นอาหาร เช่น ใบ ลำต้น ราก ตา หรือผล หนอนผีเสื้อมีต่อมใยไหม (silk glands) ที่ดัดแปลงมาจากต่อมน้ำลาย โดยผลิตเส้นใยแล้วปล่อยทาง labium หนอนบางชนิดใช้เส้นใยดังกล่าวห่อหุ้มตัวเป็นรังไหม (cocoon) บางชนิดทำที่อยู่อาศัยโดยใช้ใบไม้ม้วนเข้าหากันหรือพับซ้อนกันแล้วใช้เส้นใยยึดไว้ ดักแด้ของผีเสื้อกลางคืนส่วนใหญ่เป็นแบบ obtect ซึ่งระยะต่างๆ ชิดติดลำตัว มีสีน้ำตาลและผิวเรียบ บางชนิดอาจมี cremaster เป็นใยไหมยึดดักแด้ให้ห้อยหัวลงติดกับส่วนของพืช แต่บางชนิดใช้ใยไหมคล้องตัวให้ติดกับส่วนต่างๆ ของพืช

Lepidoptera ส่วนใหญ่มีวงจรชีวิตประมาณ 1 ปี บางชนิดมีวงจรชีวิต 4-6 เดือน และบางชนิดต้องใช้เวลา 2-3 ปี จึงจะมีวงจรชีวิตครบสมบูรณ์ (Borror, 1989)

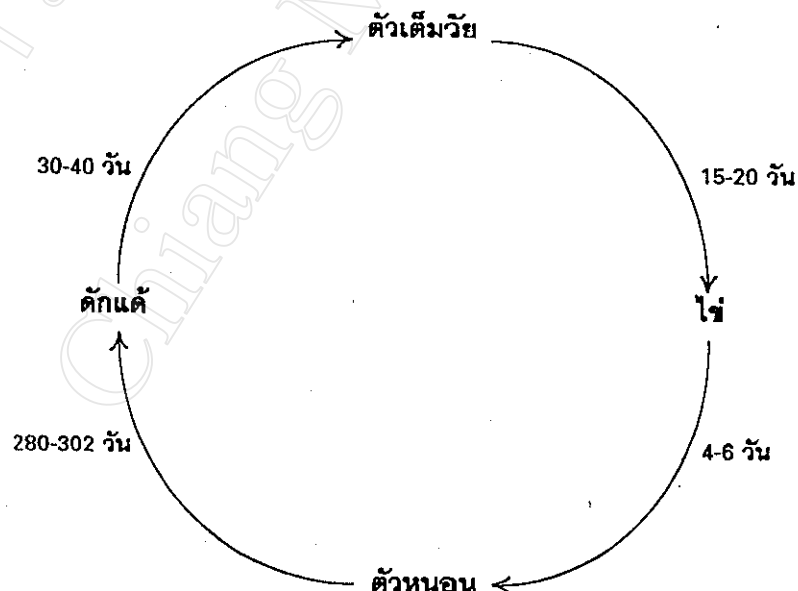
ลักษณะทั่วไปและวงจรชีวิตของหนอนเยื่อไผ่

หนอนเยื่อไผ่เป็นระยะตัวหนอน (larvae) ของผีเสื้อกลางคืน จัดอยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Pyralidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Omphisa fuscidentalis* Hampson (Robinson and others, 1994) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนเยื่อไผ่โดยวนิดา (2539) พบว่า หนอนเยื่อไผ่เป็น ตัวหนอนแบบ cruciform มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก มีทั้งหมด 13 ปล้อง แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วน หัวเจริญดี มีปากแบบกัด (chewing type) ส่วนอกมีขาจริง 3 คู่ ส่วนท้องมีขาเทียม 5 คู่ ทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นท่อตรงยาวตลอดตัว แบ่งเป็นทางเดินอาหารส่วนต้น (for gut) ส่วนกลาง (mid gut) และส่วนท้อง (hind gut) มีช่องขับถ่าย (anus) เป็ดออกสู่ภายนอกที่ส่วนท้ายสุดของลำตัว ระบบหายใจประกอบด้วย ท่อลม (trachea) และรูหายใจ (spiracle) และพบว่ามี dorsal blood vessel อยู่ทาง กึ่งกลางด้านบน ส่วนระบบประสาทมีสมองอยู่ทางด้านหน้าและมีเส้นประสาทอยู่กึ่งกลางด้านล่าง ตลอดความยาวของลำตัว

เฉชา (2535) กล่าวว่า หนอนเยื่อไผ่พบได้มากตามป่าไผ่บนภูเขาในเขตภาคเหนือตอนบน ของประเทศไทย เป็นศัตรูไม้ไผ่ชนิดหนึ่ง หนอนเยื่อไผ่มีวงจรชีวิตประมาณ 1 ปี โดยหนอนเยื่อไผ่ที่ กินเยื่อไผ่ขาคอย *Dendrocalamas membranaceus* มีระยะไข่ 4-6 วัน ระยะตัวหนอน 270-300 วัน คักแค่ 35-40 วัน และผีเสื้อมีอายุ 15-20 วัน

สำหรับวงจรชีวิตของหนอนเยื่อไผ่ (ไพฑูรย์, 2528) พบว่าแม่ผีเสื้อจะวางไข่ไว้ที่บริเวณโคน หน่อไผ่ที่โผล่พ้นดินแล้วประมาณ 10-15 วัน ซึ่งสามารถพบได้ในช่วงต้นเดือนสิงหาคม ไข่มีสีขาว ระยะที่เป็นไข่ใช้เวลาประมาณ 4-6 วัน จากนั้นจะฟักเป็นตัวหนอนแล้วพวกมันจะเจาะทะลุหน่อไผ่เป็นรู เพื่อเข้าไปอาศัยอยู่ภายใน ลักษณะไม้ไผ่ที่ถูกหนอนกัดกินจากภายนอกอาจสังเกตได้จากปลายยอด หัก ด้านข้างของปล้องมีรูเล็กๆ รูปร่างรีเพื่อให้อากาศถ่ายเทและเป็นทางออกของตัวเต็มวัย ตัวหนอน ใช้เวลาเจริญเติบโตภายในกระบอกไม้ไผ่เป็นกลุ่มโดยการกัดกินเยื่อของไม้ไผ่ที่บุอยู่ภายในเป็น อาหาร ในระหว่างที่หนอนเจริญเติบโตต้นไผ่ก็เจริญสูงขึ้น หนอนจะพากันเจาะทะลุระหว่างปล้อง แล้วเคลื่อนย้ายกัดกินเยื่อไผ่ขึ้นไปเรื่อยๆ ส่วนใหญ่หนอนจะกัดกินบริเวณโคนปล้องก่อนเรื่อยไป จนถึงกลางปล้อง หลังจากตัวหนอนย้ายขึ้นไปอยู่ปล้องอื่นแล้วจะพบสิ่งขับถ่ายลักษณะเหมือน ฟองน้ำ สีน้ำตาล ติดอยู่ตามผนังของปล้อง นอกจากนั้นสีผิวไม้ภายในปล้องจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เข้มออกดำซึ่งแตกต่างจากลักษณะภายในปล้องที่ไม่มีหนอนอาศัยอยู่อย่างชัดเจน ในไผ่ลำหนึ่งจะ พบหนอนอาศัยอยู่ประมาณ 100-250 ตัว ตัวหนอนไม่ชอบแสงสว่าง สังเกตได้จากเวลามานำหนอน ออกจากกระบอกไม้ไผ่แล้วหนอนจะพากันเคลื่อนย้ายเข้าใต้ที่กำบัง ระยะตัวหนอนนี้ใช้เวลานานถึง ประมาณ 280-340 วัน โดยพบในช่วงเดือนกันยายนถึงปลายพฤษภาคม เมื่อหนอนเจริญเติบโตเต็มที่

แล้วจึงเคลื่อนย้ายลงมารูหะระหว่างปล้องที่เคยเจาะไว้ตอนต้น โดยเคลื่อนย้ายลงมารวมกัน ใกล้ปล้องด้านล่างที่เจาะรูเข้ามาในตอนแรกและรอเข้าดักแด้ภายในปล้องนั้น ระหว่างที่รอเข้าดักแด้นั้น หนอนจะพากันสร้างเยื่อหนาสีน้ำตาลกั้นระหว่างบริเวณที่รวมกันอยู่เพื่อป้องกันการรบกวนจากศัตรูธรรมชาติ เช่น มด ส่วนรูหะระหว่างปล้องก็จะถูกปิดไว้เพื่อป้องกันศัตรูเช่นกัน ในช่วงปลายเดือนพฤษภาคมก่อนที่ดักแด้จะออกเป็นตัวเต็มวัยนั้น เยื่อหนาสีน้ำตาลดังกล่าวจะฉีกขาดและจะทำการสร้างใยสีขาวเล็กๆจำนวนมากพาดขวางตามปล้องขึ้นมาแทน ตัวหนอนจะเริ่มห้อยหัวลงแล้วทยอยลอกคราบติดที่โคนเส้นใยที่ตัวหนอนเกาะยึดอยู่แล้วกลายเป็นดักแด้ ดักแด้จะมีสีน้ำตาลอ่อนในระยะแรกและค่อยๆเข้มขึ้นในเวลาต่อมา ระยะดักแด้ใช้เวลาประมาณ 30-40 วัน โดยจะพบในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม การแขวนตัวของดักแด้มีประโยชน์ในการออกเป็นตัวเต็มวัยโดยอาศัยแรงดึงดูดของโลกช่วยในการออกจากดักแด้และกางปีก แล้วคลานออกจากรูที่เตรียมไว้สู่ภายนอก เราจะพบตัวเต็มวัยในช่วงต้นเดือนสิงหาคมซึ่งจะพอดีกับช่วงที่หน่อไม้ไผ่อ่อนกำลังแทงยอด ตัวเต็มวัยจึงทยอยวางไข่ได้ต่อไป ตัวเต็มวัยของหนอนเยื่อไผ่เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กมีสีน้ำตาลเข้มทั้งตัว ลักษณะเด่นคือ ปลายปีกคู่หน้ามีรอยหยักเป็นเส้นโค้งสีดำสามารถเห็นได้อย่างชัดเจน ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ระยะผีเสื้อใช้เวลาเพียง 15-20 วันเท่านั้น



ภาพ 1 วงชีวิตของหนอนเยื่อไผ่

งานวิจัยเกี่ยวกับหนอนเยื่อไผ่

ระยะตัวหนอนของหนอนเยื่อไผ่เริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคมถึงพฤษภาคม ส่วนในเดือนมิถุนายนและกรกฎาคมจะพบระยะดักแด้ และเมื่อถึงช่วงดักแด้ก็จะลอกคราบกลายเป็นตัวเต็มวัยในเดือนสิงหาคม และจากการที่พบทั้งระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ทำให้สรุปได้ว่า การเจริญเติบโตของหนอนเยื่อไผ่เป็นแบบ complete metamorphosis และยังพบอีกว่าในเดือนสิงหาคมนั้นจะพบหนอนที่มีขนาดเล็กแตกต่างไปจากเดือนกันยายนถึงพฤษภาคม ซึ่งเป็นระยะเริ่มแรกที่เพิ่งฟักออกจากไข่ โดยสัดส่วนของหัวต่อลำตัวมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนอนที่พบในเดือนอื่นๆ และส่วนของลำตัวจะใสกว่าจนแทบเห็นอวัยวะภายใน เช่น ทางเดินอาหาร เป็นต้น และจากการศึกษาน้ำหนักของหนอนตลอดทั้งปี พบว่าในเดือนตุลาคมจะมีน้ำหนักมากที่สุดและในเดือนพฤษภาคมมีน้ำหนักน้อยที่สุด ส่วนความยาวของลำตัวพบว่าในเดือนสิงหาคมหนอนมีความยาวของลำตัวน้อยที่สุดและจะมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ โดยเห็นได้จากการที่มีความยาวของลำตัวเพิ่มขึ้นในเดือนถัดมาและพบว่าความยาวเริ่มลดลงในระยะที่หนอนเริ่มเข้าดักแด้ ซึ่งหนอนจะเริ่มเคลื่อนที่ช้าลงและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ดังนั้นจึงพบว่าในเดือนพฤษภาคมเป็นช่วงที่หนอนมีความยาวน้อยที่สุด จากการศึกษาความกว้างของลำตัว, ความยาวและความกว้างของหัวกะโหลก (head capsule) พบว่ามีค่าน้อยที่สุดในเดือนสิงหาคม ส่วนในเดือนอื่นๆ จะมีค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (วนิดา, 2539)

Singtripop *et al.* (1999) วิเคราะห์ชนิดของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้จากไม้ไผ่ต่างกัน 5 ชนิด โดยทำการวิเคราะห์ nucleotide sequence ของ mitochondria cytochrome C oxidase subunit 1 gene (COI) โดยเก็บตัวอย่างหนอนจากป่าสูง 500 เมตรจากระดับน้ำทะเล (19° N) ในจังหวัดเชียงใหม่ ทำการศึกษานิวคลีโอไทด์ของหนอนเยื่อไผ่จากต้นไผ่ 5 ชนิดคือ *D. membranaceus*, *D. hamitoni*, *B. nutan*, *B. Blumeana* และ *G. albociliata* โดยคาดว่าไผ่ต่างชนิดกันจะมีชนิดของหนอนต่างกัน แต่จาก nucleotide sequence และ amino acid sequences ยืนยันได้อย่างแน่นอนว่าหนอนเยื่อไผ่ที่ได้จากไผ่ทั้ง 5 ชนิดเป็นหนอนชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังทำการวัดน้ำหนักตัว, ปริมาณโปรตีนและไขมัน และปริมาณ ecdysteroid จากตัวหนอนที่เจริญเติบโตเต็มที่ในแต่ละเดือน พบว่าน้ำหนักตัวของตัวหนอนค่อยๆ ลดลงในระหว่าง 9 เดือน ในขณะที่ปริมาณไขมันจะเพิ่มขึ้นและลดลงไม่คงที่ ส่วนระดับโปรตีนค่อนข้างคงที่จนถึงเดือนมีนาคม แสดงให้เห็นว่าหนอนเยื่อไผ่ระยะตัวหนอนเข้าสู่ระยะการวัฏโคจรของสหัสจากหมด feeding period ของตัวหนอนระยะที่ 5 และการวัฏโคจรของสหัสสิ้นสุดในเดือนมิถุนายน

จารุวรรณ (2544) ศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนของหนอนเชื้อไฟในระยะไคอะพอส หลังจากการให้ JHA และ 20-hydroxyecdysone ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร แก่หนอนเชื้อไฟในเดือนกันยายน, ตุลาคม และพฤศจิกายน แล้ววัดอัตราการใช้ออกซิเจนของหนอนทุกๆ 30 นาทีเป็นเวลา 120 นาที พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของหนอนกลุ่มควบคุมเดือนกันยายนและพฤศจิกายน ไม่แตกต่างกันแต่เพิ่มสูงขึ้นในเดือนตุลาคมและแตกต่างจากเดือนกันยายนและพฤศจิกายน ส่วนหนอนกลุ่มที่ให้ JHA และ 20-hydroxyecdysone มีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นพร้อมๆ กับการเปลี่ยนแปลงของหนอนที่กำลังเข้าสู่ระยะดักแด้

การเจริญขึ้นคืบของหนอนเชื้อไฟในช่วงก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ไคอะพอส ศึกษาได้โดยทำการเก็บตัวอย่าง head capsule จากไหมไฟในช่วงเดือนกันยายนและตุลาคม เพื่อทำการวัดขนาดความกว้างของ head capsule พบว่าอัตราการเพิ่มขนาดของ head capsule จะสัมพันธ์กับขึ้นการเจริญ และชี้ให้เห็นว่าหนอนเชื้อไฟมีขึ้นตัวหนอน 5th instar นอกจากนั้นขนาดของ head capsule ยังสามารถบอกเพศได้ตั้งแต่ระยะ 3rd instar โดยหนอนที่มีความกว้างของ head capsule มากกว่าจะเป็นหนอนเพศเมีย นอกจากนี้ยังศึกษาปัจจัยและสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการสิ้นสุดของระยะไคอะพอสในธรรมชาติ โดยทดลองให้ JHA แก่หนอนแล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 13, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า JHA ทำให้เกิดการสิ้นสุดระยะไคอะพอสได้โดยการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิก (prothoracic gland) และพบว่าที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส JHA ไม่สามารถชักนำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ แต่สามารถชักนำได้ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 30 องศาเซลเซียสให้ผลบ้างเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อบทบาทของ JHA ในการสิ้นสุดระยะไคอะพอสและในทางตรงกันข้ามอุณหภูมิอาจมีผลยับยั้งบทบาทของฮอร์โมนดังกล่าว (มนพร, 2542)

ประพาสและคณะ (2532) ได้ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารในหนอนเชื้อไฟ โดยสุ่มซื้อจากตลาดในจังหวัดเชียงราย ตาก หรือแถบชายแดนติดประเทศพม่า ซึ่งเป็นหนอนที่คั่วและทอดกรอบแล้วพร้อมที่จะรับประทานได้เลย พบว่าในหนอนเชื้อไฟ 100 กรัม มีพลังงาน 643.7 กิโลแคลอรี, โปรตีน 25.5 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 11.0 กรัม, ไขมัน 55.3 กรัม, เถ้า 3.7 กรัม, แคลเซียม 41.1 กรัม, ฟอสฟอรัส 356.0 มิลลิกรัม, เหล็ก 2.7 กรัม, โซเดียม 609.2 มิลลิกรัม, โพแทสเซียม 674.4 มิลลิกรัม และความชื้น 4.5 กรัม ส่วนปริมาณกรดอะมิโนนั้นพบว่า กรดอะมิโนที่จำเป็นที่มีมากที่สุด ได้แก่ leucine รองลงมา ได้แก่ tyrosine และ lysine ตามลำดับ กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นที่มีมากที่สุด ได้แก่ glutamine และ aspartic acids

จากการตรวจหาปริมาณโปรตีนในหนอนเชื้อไผ่เป็นเวลา 9 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคม และกันยายนถึงธันวาคม (วนิดา, 2539) โดยยกเว้นช่วงที่หนอนเชื้อไผ่เริ่มเข้าดักแด้ และเจริญเป็นตัวเต็มวัยในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม และเจริญเป็นตัวหนอนขนาดเล็กในเดือนสิงหาคม พบว่าในเดือนพฤษภาคมมีเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนต่อน้ำหนักตัวมากที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 18.21% ส่วนในเดือนกันยายนมีเปอร์เซ็นต์โปรตีนต่อน้ำหนักตัวน้อยที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 11.73% และพบว่าบางเดือนก็มีค่าเท่ากัน บางเดือนก็มีค่าต่างกัน

ระดับโปรตีนในฮีโมกลินพ์ของหนอนเชื้อไผ่ระยะต่างๆของวงจรชีวิตมีความแตกต่างกัน จตุพร (2542) รายงานว่าได้ทำการตรวจระดับโปรตีนเป็นเวลา 1 ปี พบว่าปริมาณโปรตีนในฮีโมกลินพ์ของแต่ละเดือนมีความแตกต่างกัน โดยตรวจพบปริมาณโปรตีนมากที่สุดในเดือนกรกฎาคม คือ 183.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นระยะดักแด้ และน้อยที่สุดในเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ คือ 75.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังทำการตรวจหาระดับโปรตีนในฮีโมกลินพ์หลังจากฉีดฮอร์โมนเอคไดโซน 2 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร เป็นเวลา 6 วัน พบว่าหลังจากฉีดฮอร์โมนระดับโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น โดยพบปริมาณโปรตีนสูงสุดในวันที่ 6 หลังจากฉีดฮอร์โมน

อัญชลี (2542) ทำการหยดฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (Juvenile hormone analogue, JHA) ให้แก่หนอนเชื้อไผ่ แล้วตรวจหาระดับโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนในฮีโมกลินพ์โดยใช้ SDS-PAGE พบว่า JHA ทำให้ระดับโปรตีนในฮีโมกลินพ์เพิ่มสูงขึ้นในช่วงการเจริญของระยะตัวหนอนและกระตุ้นการดึงโปรตีนไปเก็บสะสมที่ fat body ในช่วงการเปลี่ยนแปลงเป็นดักแด้ ส่วนผลต่อชนิดของโปรตีน พบว่า JHA ทำให้ปริมาณ SP1 ลดลงในช่วงการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ในทั้งเพศผู้และเพศเมียแต่จะเห็นเด่นชัดกว่าในเพศเมีย แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนจูวีไนล์กระตุ้นให้มีการนำกลับ SP1 บางส่วนกลับเข้าไปเก็บสะสมใน fat body ของดักแด้

อัญชลี (2542) และ Singtripop *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองให้ JHA แก่หนอนเชื้อไผ่ พบว่า สามารถชักนำให้หนอนเชื้อไผ่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยการตอบสนองต่อฮอร์โมนขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาในการชักนำนั้นขึ้นกับความเข้มข้นของฮอร์โมน โดยความเข้มข้นสูงชักนำให้หนอนเข้าดักแด้ได้เร็วกว่าความเข้มข้นต่ำ นอกจากนี้ JHA (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร) มีผลทำให้ฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมกลินพ์ในช่วงก่อนระยะการเปลี่ยนแปลงเข้าดักแด้ (prepupal) เพิ่มสูงขึ้นจึงส่งผลให้หนอนเกิดการเข้าดักแด้ โดย JHA จะกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกโดยตรงให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนเอคไดโซน และพบว่า JHA มีผลทำให้สมองเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคล้ายสมองในระยะดักแด้ ส่วนผลต่อต่อมโปรทอแรกซิกพบว่ากระตุ้นการสร้างและสะสม secretory substance เพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในหนอนเชื้อไผ่เพศผู้และเพศเมีย พบว่าในระยะตัวหนอน พบ FSP (Female specific

protein) เพียง 1 ชนิด แต่เมื่อตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้กลับพบ FSP เพิ่มขึ้นอีก 1 ชนิด ในขณะที่พบ MSP (Male-Specific Protein) เพียง 1 ชนิดในเพศผู้ทั้งในระยะตัวหนอนและดักแด้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า SP1 ที่ลดลงมากในระยะดักแด้ของเพศเมียบางส่วนได้ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ FSP ขึ้นมาใหม่ ซึ่ง FSP ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้อาจเป็น vitellogenin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ในการสร้างไข่แดง

โปรตีนสะสม (storage protein)

Levenbook (1985) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนสะสมของแมลงจากผลการวิจัยที่ผ่านมา โดยรายงานว่าโปรตีนสะสมถูกพบครั้งแรกในฮีโมลิมพ์ของหนอนไหม *Bombyx mori* โดย Lauffer ในปี ค.ศ. 1943 ต่อมามีการพัฒนาใช้ Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ในการหาขนาดของโปรตีนในแมลงหลายชนิด ซึ่งโปรตีนจากแมลงทั้งหมดจะเคลื่อนที่ช้าจึงคาดว่ามีความขนาดใหญ่และพบเป็นแถบโปรตีนหลักซึ่งโปรตีนในฮีโมลิมพ์ที่มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลสูงนี้ถูกกำหนดให้เป็น larval storage proteins ต่อมา Roberts and Brock (1981) ได้ให้คำจำกัดความของโปรตีนสะสมของแมลงไว้ว่า โปรตีนสะสมจะถูกสังเคราะห์โดย fat body ของตัวหนอน โปรตีนชนิดนี้มีจำนวนชนิดน้อยและสะสมเฉพาะในฮีโมลิมพ์ของตัวหนอนเท่านั้น จากนั้นความเข้มข้นของโปรตีนสะสมจะเพิ่มขึ้นมากในตัวหนอนระยะหลัง โดยเฉพาะตัวหนอนระยะสุดท้าย โปรตีนสะสมจะคงอยู่จนถึงช่วงต้นของตัวเต็มวัยแต่จะหายไปหลังจากเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเต็มวัยภายใน 2-3 วัน ลักษณะโดยทั่วไปของโปรตีนสะสม คือ มี native molecular weight ประมาณ 500 kDa และประกอบด้วย 6 หน่วยย่อย นอกจากนี้ยังมี aromatic เป็นส่วนประกอบในปริมาณมาก และมี tyrosine และ phenylalanine residues เป็นส่วนประกอบในอัตราส่วนที่สูงมาก

ในการตั้งชื่อโปรตีนสะสมแต่ละชนิดนั้นส่วนใหญ่ตั้งจากชื่อ genus ของแมลง เช่น calliphora จาก *Calliphora*, manducin จาก *Manduca sexta*, ใน *Calliphora vicina* มีโปรตีนหลัก (major protein) ชื่อ calliphorin และมีโปรตีนรอง (minor protein) คือ protein II (Munn and Greville, 1969), ใน *Calliphora stygia* (Australian species ขนาดใหญ่) มีชื่อเรียกว่า โปรตีน C และ B, ใน flies *Lucilia* และ *Phormia* เรียกว่า lucilin และ phormin ตามลำดับ, sarcophagin ใน *Sarcophagine*, dipeptide β -alanyl-tyrosine จาก *Sarcophaga* และ bombyxin จาก silkworm *B. mori* นอกจากนี้ยังมีการตั้งชื่ออื่นๆ อีกเช่น larval serum protein, storage protein I, II และ larval haemolymph proteins (LHP) I, II เป็นต้น

Storage protein families

ในการแบ่งชนิดของโปรตีนสะสมจะดูจากกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบที่ได้จากการหาลำดับกรดอะมิโน โดย hexamerins เกือบทุกชนิดมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ hemocyanins ของพวก arthropods และโปรตีนทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันทางวิวัฒนาการ (Willot and others, 1989) การเปรียบเทียบ homology ของโปรตีนสะสมทำได้โดยนำลำดับกรดอะมิโนมาจัดด้วย ClustalW multiple alignment program (Hauenerland, 1996) ในการหา homology ระหว่างโปรตีนแต่ละชนิดจะทำการจับคู่ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนแต่ละชนิดด้วย ALIGN algorithm และแบ่งชนิดของโปรตีนสะสมได้ดังนี้

1. Arylphorins

Diptera

โปรตีนถูกสังเคราะห์ใน fat body ของตัวหนอนในช่วงก่อนระยะสุดท้ายและระยะสุดท้าย จากนั้นจะถูกหลั่งออกสู่ฮีโมลิมฟ์แล้วสะสมที่ความเข้มข้นสูง เมื่อแมลงเริ่มเข้าสู่ระยะ wandering จะหยุดการสังเคราะห์แล้วโปรตีนจะค่อยๆ ถูกนำกลับเข้าไปใน fat body ของดักแด้ ซึ่งจะถูกเก็บในรูปของโปรตีนกรานูล (protein granules) โดย storage protein granules สะสมอยู่มากบริเวณ posterior ของ fat body ในระหว่างการเจริญของตัวเต็มวัย arylphorin จำนวนมากจะถูกทำลายด้วย protease และสามารถพบกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบดังกล่าวในคิวติเคิลที่สร้างใหม่ ลำดับกรดอะมิโนของ *Calliphora vicina* (Naumann and Scheller, 1991) คล้ายกับ hexameric storage protein ทุกชนิด

Lepidoptera

arylphorin ของ Lepidopteran มีเปอร์เซ็นต์ของ aromatic amino acids ใกล้เคียงกับของ Diptera แต่จะมี methionine ในปริมาณต่ำกว่า โปรตีนถูกสังเคราะห์ด้วยอัตราสูงใน fat body ของตัวหนอนระยะสุดท้ายแล้วถูกหลั่งออกสู่ฮีโมลิมฟ์ โดยปริมาณของโปรตีนจะต่ำตลอดระยะที่เป็นตัวหนอน (Ray and others, 1987; Webb and Riddiford, 1988) จากนั้นความเข้มข้นของฮีโมลิมฟ์จะสูงเฉพาะช่วงตัวหนอนระยะสุดท้ายและถูกนำกลับเข้าไปใน fat body ในช่วงเริ่มต้นก่อนการเข้าดักแด้ ซึ่ง arylphorin จะถูกนำออกจากฮีโมลิมฟ์อย่างไม่สมบูรณ์ เนื่องจากความเข้มข้นที่เคยมีอยู่สูงมาก (Hauenerland and others, 1990) สามารถพบ arylphorin ในรูปของคริสตัล (crystal) ภายในโปรตีนกรานูลใน fat body และพบว่ากรานูลนี้จะถูกทำให้แตกสลายในระหว่างที่เป็นดักแด้แต่ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบกรานูลจำนวนมากใน fat body ของตัวเต็มวัย arylphorin เป็นแหล่งสำหรับกรดอะมิโนที่จำเป็นในการสร้างไข่แดง (Wang and Hauenerland, 1991) นอกจากนี้ยังพบ arylphorin ใน Coleoptera เช่น ใน mealworm, *Tenebrio molitor* (Delobel and others, 1992) และ Colorado potato

beetle, *Leptinotarsa decemlineata* และพบใน Dictyoptera เช่น *Periplaneta americana* (Duhamel and Kunkel, 1983)

2. Larval storage protein-2 (LSP-2) จาก Diptera

เป็นโปรตีนสะสมชนิดที่ 2 ที่รู้จักใน Diptera มีปริมาณน้อยกว่า arylphorin โปรตีนชนิดนี้ถูกนำกลับเข้าไปใน fat body เช่นเดียวกับโปรตีนชนิดอื่น มีบทบาทสำคัญในตัวเต็มวัยของแมลง โดยจะแสดงออกหลังจากการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย (Benes and others, 1990)

3. Methionine-rich storage proteins จาก Lepidoptera

Methionine-rich storage proteins มี methionine เป็นส่วนประกอบมากกว่า 4% พบโปรตีนชนิดนี้ใน lepidopteran species หลายชนิด การสังเคราะห์โปรตีนชนิดนี้จะเกิดใน fat body ชั่วคราว การสังเคราะห์ arylphorins การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นถึงช่วงท้ายของตัวหนอนระยะสุดท้าย จากนั้นจะหายไปจากฮีโมลิฟ โดยถูกนำกลับเข้าไปใน fat body ของดักแด้ Pan and Telfer (1992) รายงานว่าความเข้มข้นของโปรตีนใน fat body ไม่ลดลงในระหว่างระยะดักแด้ ซึ่งตรงข้ามกับโปรตีนสะสมและ hexamerins ชนิดอื่น โดยปริมาณ methionine-rich proteins ของ *M. sexta* ในตัวหนอนเพศเมียมีมากกว่าตัวหนอนเพศผู้ (Ryan and others, 1985)

4. Juvenile hormone-suppressible proteins

การแสดงออกของโปรตีนสะสมทั้งหมดจะเกิดในตัวหนอนระยะสุดท้ายซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ต่ำและพบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์เป็นตัวป้องกันการผลิตของโปรตีนสะสม โดยทั่วไปแล้วฮอร์โมนจูวีไนล์จะกวดการแสดงออกของโปรตีนสะสมบางชนิดแต่ไม่ทั้งหมด

5. Riboflavin-binding proteins

มีโครงสร้างคล้ายกับ hexameric storage proteins อื่นๆ พบใน *H. cecropia* (Magee and others, 1994) และ *G. mellonella* (Silhacek and others, 1994) โปรตีนชนิดนี้มี histidine และ arginine เป็นส่วนประกอบในปริมาณมาก แม้ว่าโปรตีนชนิดนี้จะแสดงออกมากเฉพาะในตัวหนอนระยะสุดท้ายแต่ก็ไม่ถูกนำกลับโดย fat body ในช่วงก่อนการเข้าดักแด้และไม่มีการเก็บสะสมใน fat body ของตัวหนอน ความเข้มข้นของโปรตีนชนิดนี้ในฮีโมลิฟจะลดลงทันทีในระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากดักแด้ไปเป็นตัวเต็มวัยแต่ไม่เป็นที่ทราบแน่นอนว่าโปรตีนชนิดนี้ถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) หรือถูกนำกลับโดย fat body, รังไข่หรือเนื้อเยื่ออื่น

6. Very high density lipoprotein (VHDL)

เป็น non-hexameric storage proteins พบใน corn earworm, *Helicoverpa zea* (Hauerland and Bower, 1986) และแมลงหนอนกระทู้ (noctuid) ชนิดอื่นๆ (Greenstone and others, 1991) VHDL เป็น non-hexameric larval serum protein เพียงชนิดเดียวที่ทราบแน่นอนว่าเป็นโปรตีน

สะสม โปรตีนชนิดนี้เป็น dimeric หรือ tetrameric complex ของหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 150 kDa VHDL มีไขมันเป็นส่วนประกอบประมาณ 10% ถูกสังเคราะห์ใน peripheral fat body ของตัวหนอนระยะสุดท้ายและเก็บสะสมเป็นปริมาณมากในฮีโมลิมฟ์ ก่อนที่จะถูกนำกลับโดย perivisceral fat body ในช่วงก่อนการเข้าดักแด้ สามารถพบโปรตีนกรานูลได้ภายใน fat body แต่ภายหลังจากนั้นเพียงไม่กี่วันกรานูลดังกล่าวจะถูกย่อยด้วย protease พบว่ากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบในโปรตีนชนิดนี้ไม่แตกต่างจากโปรตีนสะสมทั่วไป โปรตีนชนิดนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับ hexameric storage proteins อื่นๆ

7. Tyrosine-rich protein

พบ tyrotaurins และ tyrosine-rich storage proteins ใน fat body ของ Coleoptera ซึ่งประกอบด้วย tyrosine มากกว่า 70% (Delobel and others, 1992) การสังเคราะห์และการเก็บสะสมเกิดใน fat body ของตัวหนอนเพียงช่วงสั้นๆก่อนการเข้าดักแด้แล้วจะถูกเก็บในโปรตีนกรานูลใน fat body ของดักแด้ หลังจากนั้นกรานูลบางส่วนจะถูกทำให้แตกสลาย tyrosine residues ของ tyrotaurins ถูกใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของคิวติเคิลของ pharate adult หน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ใกล้เคียงกับโปรตีนสะสมชนิดอื่นๆ แต่แตกต่างคือ tyrotaurins มีขนาดเล็กกว่าและมีขนาดแตกต่างกันมาก (30-65 kDa) และหลังจากที่ถูกสังเคราะห์ออกมาแล้วโปรตีนชนิดนี้ไม่ถูกห่อหุ้มด้วยฮีโมลิมฟ์แต่จะถูกรวมเข้าไปเก็บในรูปของโปรตีนกรานูลทันที

น้ำหนักโมเลกุลและหน่วยย่อยของโปรตีนสะสม

โปรตีนสะสมโดยทั่วไปมี native molecular weight ประมาณ 500 kDa และประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 80 kDa สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนสะสม LHP-I ใน *C. vicina* ได้โดย Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), gel filtration, ultracentrifugation techniques (Munn and others, 1971) และ LHP-I ใน *D. melanogaster* โดย sucrose density gradient centrifugation (Wolfe and others, 1977)

ในการทำโปรตีนสะสมให้อยู่ในรูป monomers (หรือ protomers) นั้นทำได้โดยใช้ guanidine hydrochloride (GuHCl) ที่ทำให้เกิดการสลายของ hydrogen bond (Munn and others, 1971) หรือใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS) (Kinnear and Thomson, 1975) เป็นตัวแยก oligomers ให้เป็น monomers

องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนสะสม

ก่อนปี ค.ศ. 1985 มีโปรตีนสะสม 12 ชนิดที่ทราบชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบ และสามารถแบ่งกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนสะสมได้เป็น 2 กลุ่ม คือ aspartic acid กับ cyst(e)in และ glutamic acid, phenylalanine หรือ tyrosine ใน LHP-I ของ *B. mori* มี methionine เป็นส่วนประกอบเป็นจำนวนมาก โปรตีนสะสมของแมลงเกือบทุกชนิดจะมี phenylalanine และ tyrosine residues เป็นส่วนประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากกรดอะมิโนแล้ว ในโปรตีนสะสมของ *C. vicina*, *C. stygia*, *M. sexta* และ *L. migratoria* มีคาร์โบไฮเดรตและไขมัน เป็นส่วนประกอบแต่ไม่พบไขมันในโปรตีนสะสมของ *D. melanogaster* (Roberts and Brock, 1981) โปรตีนสะสมส่วนใหญ่ไม่ละลายในน้ำกลั่นแต่ละลายในสารละลายเกลือ เช่น NaCl, KCl, NaHCO_3 , phosphate และ tris buffers หากเก็บรักษาโปรตีนใน 70% แอมโมเนียมซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะสามารถรักษาสภาพของโปรตีนได้มากกว่าหนึ่งปี (Levenbook and Bauer, 1980)

การแยกบริสุทธิ์ (Purification)

ก่อนที่จะทำการศึกษาโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งนั้นจำเป็นต้องแยกโปรตีนให้อยู่ในรูปที่บริสุทธิ์ก่อน เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินความบริสุทธิ์ของโปรตีนมีดังนี้

1. ปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวบน PAGE ใน non-dissociating solvents และอาจปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบได้ภายใต้ dissociating condition
2. elution peak ที่ได้อาจเป็น peak เดียวบน column chromatography
3. แสดง arc เดียวบน immunodiffusion และ/หรือ immunoelectrophoresis เมื่อใช้ polyvalent antiserum ที่ได้รับการสกัดแมลงทั้งตัวหรือจากฮีโมลิมพ์ของแมลง (Levenbook, 1985)

Munn *et al.* (1971) ทำการแยกบริสุทธิ์ LHP-I ของ *C. vicina* เป็นครั้งแรกจากตัวหนอนและดักแด้ เริ่มขั้นตอนการแยกด้วยการทำ ultracentrifugation เพื่อตกตะกอนอนุภาคของ LHP แล้วทำ sucrose density gradient centrifugation การทดลองนี้ใช้เวลาในการทดลองมากและปริมาณ LHP-I ที่ได้รับการแยกมีน้อยมาก ต่อมาจึงมีการพัฒนาวิธีการแยกบริสุทธิ์โดยทำ ammonium sulfate fractionation แต่ในบางกรณีก็ทำให้โปรตีนเสียสภาพด้วยความร้อนและการใช้ column chromatography ในการแยก LHPs ให้อยู่ในรูปที่บริสุทธิ์ ในการแยกขั้นต้นส่วนใหญ่จะแยกโดยการตกตะกอน โดยลดค่าการละลายของโปรตีนด้วยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายเกลือหรือเปลี่ยนแปลง pH โดยถ้าใช้ความเข้มข้นของเกลือต่ำๆ หรือสูงๆ ค่าความสามารถในการ

ละลายของโปรตีนจะลดลง โดยเกลือที่ให้ผลดีในการตกตะกอนโปรตีนมักใช้ multiple charge anion เช่น ซัลเฟตไอออนและฟอสเฟตไอออน ส่วน cation มักใช้ monovalent cation เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต, โพแทสเซียม และโซเดียม (Oxender and Fox, 1988)

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

ในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal ใช้ reagent คือ 1-fluoro-2,4-dinitro benzene (FDNB) ซึ่งสารนี้จะทำปฏิกิริยาที่ N-terminal แล้วอยู่ในรูป derivative ของ 2,4-dinitrophenyl (DNP) แล้วใช้ acid hydrolysis จะได้ N-terminal amino acid ในรูปของ amino acid-2,4-DNP + amino acid อื่นๆ ซึ่งสามารถแยกออกจากกรดอะมิโนตัวอื่นๆ ได้ โดยทั่วไปความยาวของ N-terminal sequence ที่สามารถหาได้มักอยู่ในช่วง 10-20 residues ขึ้นกับปริมาณของสารตั้งต้นและธรรมชาติของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ต้องการหา โดยทั่วไปปริมาณโปรตีนที่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้อยู่ในช่วง 1-20 พิโคโมล สำหรับการศึกษาลำดับกรดอะมิโนนั้นทำได้โดยตัดเปปไทด์ออกให้สั้น (fragmentation) ประมาณ 10-15 residue โดยใช้เอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจง ส่วนการหาลำดับของกรดอะมิโนนั้นใช้หลักการ Edman degradation คือใช้ reagent ไปสร้าง derivative ที่ N-terminal ทำการตัดกรดอะมิโนออกมาทีละตัวแล้วเข้าไปสร้าง derivative อีก กรดอะมิโนที่ได้จะถูกย้ายออกมาโดย reagent ที่ใช้คือ phenylthiocyanate (PITC) ตัวที่ทำหน้าที่ย้ายกรดอะมิโนคือ co-dilute acid แล้วเปลี่ยน phenylisothiocyanate เป็น phenylthiohydantoin (PTH) (Findlay and Geisow, 1989)

หน้าที่ของโปรตีนสะสม

Roberts and Brock (1981) รายงานเกี่ยวกับหน้าที่ของโปรตีนสะสมไว้ว่า การสังเคราะห์และการลดลงของโปรตีนสะสมจะมีบทบาทในระหว่างที่มีการเจริญของตัวเต็มวัย ซึ่งอาจถูกรวมเป็น protein fabric ของโครงสร้างของตัวเต็มวัยที่กำลังเจริญเติบโต สามารถพบในเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างใหม่ๆ เช่น ผนังของดักแด้, ไข่ของตัวเต็มวัย และกล้ามเนื้อ โดยโปรตีนสะสมที่แท้จริงจะถูกเก็บสะสมในอวัยวะบางส่วน ในช่วงที่มีการรับประทานอาหารเข้าสู่ร่างกายจำนวนมากและจะถูกเก็บสะสมในระหว่างที่มีการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อระยะการหาอาหารมีช่วงสั้น โปรตีนชนิดนี้สัมพันธ์กับ vitellogenin ที่จำเป็นสำหรับการเกิด embryogenesis

การสังเคราะห์และการกระจายตัวของโปรตีนสะสม

Thomson (1975) รายงานว่าหลังจากที่ *C. stygia* ฟีกออกจากไข่แล้ว ในตัวหนอนจะมีเซลล์ fat body ประมาณ 11,500 เซลล์เรียงอยู่เป็นคู่ในส่วน anterior และ dorsolateral lobes เมื่อตัวหนอนเจริญเติบโตขนาดของเซลล์ fat body จะเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ การสังเคราะห์ของโปรตีนสะสมจะเกิดในครึ่งหลังของการเจริญของตัวหนอนขึ้นที่ 2 และอัตราการสังเคราะห์สูงสุดในตัวหนอนที่เจริญเติบโตเต็มที่และช่วงที่หนอนหยุดกินอาหาร อัตราการสังเคราะห์โปรตีนสูงสุดจาก fat body ของ *C. stygia* คือ 0.4 ไมโครกรัมต่อวัน ซึ่ง 80% ของโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาเป็น LHP-I เมื่อถึงช่วงที่หยุดกินอาหารและเข้าสู่ระยะ wandering ซึ่งเป็นระยะสั้นๆ ก่อนการเข้าดักแด้ *Calliphora* จะหยุดการสังเคราะห์ LHP-I ทันที การหยุดการสังเคราะห์นี้ไม่ได้เกิดจากการควบคุมย้อนกลับ การสิ้นสุดการสังเคราะห์ LHP-I สอดคล้องกับการเกิด cytological transformation ของเซลล์ fat body ซึ่งในช่วงนี้จะมีการสูญเสีย endoplasmic reticulum, ribosomes, mitochondria และ เกิดการสะสมเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ของโปรตีนกรานูล ส่วนการสังเคราะห์ LHP-II ใน *C. stygia* จะเกิดต่อเนื่องอีกหลายวันหลังจากหยุดการสังเคราะห์ LHP-I

fat body เป็นแหล่งเริ่มต้นสังเคราะห์โปรตีนสะสม ในระหว่างการเจริญของตัวหนอนและช่วงที่กินอาหารจะมีการสังเคราะห์โปรตีนแล้วหลั่งออกมาสู่ฮีโมลิมฟ์เป็นจำนวนมาก แต่เมื่อตัวหนอนหยุดกินอาหารหน้าที่ของ fat body จะเปลี่ยนแปลงไป โดย fat body จะนำโปรตีนสะสมจากฮีโมลิมฟ์เข้าไปเก็บในเซลล์ fat body ในรูปของคริสตัลหรือกรานูล เรียกว่า protein storage granules (Thomson, 1975) หลังจากนั้นแหล่งเก็บสะสมจะเปลี่ยนจากฮีโมลิมฟ์มาเป็น fat body โดยเฉพาะใน lepidoptera การกระจายตัวของโปรตีนสะสมภายในตัวหนอนของแมลงส่วนใหญ่จะถูกจำกัดเฉพาะในฮีโมลิมฟ์และ fat body แต่สามารถตรวจพบ LHP-I และ II ได้ในผนังลำตัวของตัวหนอนของ *C. stygia* และสามารถพบ LHP-I ของ *C. vicina* ได้ใน hemocytes ในทางเดินอาหารและผนังลำตัวของตัวหนอนช่วงก่อนเข้าดักแด้ สำหรับ *H. cecropia* (Tojo and others, 1978) พบว่า 2/3 ของโปรตีนสะสมทั้งหมดถูกเก็บสะสมใน fat body โดยเพศผู้จะเก็บสะสมน้อยกว่าเพศเมีย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเพศเมียยังต้องใช้ประโยชน์จากโปรตีนสะสมต่อไปเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ vitellogenin

โปรตีนสะสมในฮีโมลิมฟ์ ของ *C. vicina* (Levenbook and Bauer, 1980) ถูกนำกลับเข้าไปใน fat body ในระหว่าง wandering stages และช่วงต้นของการเข้าดักแด้ โดย 2/3 ของ LHP-I และ II ในฮีโมลิมฟ์ของตัวหนอนถูกนำกลับเข้าไปใน fat body ในระหว่างที่หยุดกินอาหารและการเข้าดักแด้

Scheller *et al.* (1980) ฉีด [125 I]-labeled LHP-I ของ *C. vicina* ให้แก่ตัวหนอนที่เจริญเต็มที่ และติดตาม 125 I ในอวัยวะของตัวหนอนจนกระทั่งถึงช่วงเริ่มต้นเข้าดักแด้ พบว่า radioactivity ในผนังลำตัวเพิ่มขึ้น แต่จะลดลงในฮีโมกลิมพ์และทางเดินอาหารส่วนกลาง และพบว่ามีโปรตีนบางส่วนถูกรวมเข้าไปใน fat body และ malpighian tubules ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า LHP-I ในฮีโมกลิมพ์ที่ลดลงในช่วงของการเข้าดักแด้ถูกเปลี่ยนแปลงหรือรวมเข้าไปใน insoluble structure ของคิวติเคิล นอกจากนี้จากการทำ section ของ white puparia, young pupae และตัวเต็มวัย แล้วย้อมด้วย anti-LHP-I antibodies แล้วตรวจด้วย fluorescence พบ fluorescence ใน endocuticle แต่ไม่พบใน exocuticle ของทั้งสามระยะรวมทั้งระยะตัวหนอนและ early pupal รวมทั้งไม่พบใน imaginal disc และ fat body นอกจากนี้พบว่า LHP-I ถูกย่อยสลายก่อนจะถูกรวมเข้าไปในคิวติเคิล และ 90% ของ acid precipitable radioactivity กระจายในเนื้อเยื่อมากกว่าในฮีโมกลิมพ์ แสดงให้เห็นว่าในระหว่างที่มี metamorphosis โปรตีนสะสมถูกไฮโดรไลสเป็นกรดอะมิโนอิสระก่อนที่จะบางส่วนจะถูกย่อยสลาย และโปรตีนส่วนใหญ่ถูกนำกลับเข้าไปเป็นโปรตีนในตัวเต็มวัย

Tojo *et al.* (1980) ทำการศึกษา SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์และ fat body ของตัวหนอนระยะสุดท้ายของ *B. mori* พบว่าในระหว่างที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนเป็นดักแด้ SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์มีความเข้มข้นลดลงแต่กลับเพิ่มมากขึ้นใน fat body ของดักแด้ และจากการศึกษาลักษณะของ fat body โดย electronmicroscopy พบว่าเกิดการสร้างโปรตีนกรานูลใน fat body ซึ่งเกิดในขณะเดียวกันกับการสลายของ mitochondria และ endoplasmic reticulum ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนกรานูลใน cytoplasm ของ fat body ของตัวเมียมียิ่งมากกว่าตัวผู้และกรานูลของตัวเมียมียิ่งมีลักษณะเป็นคริสตัล (crystal) ซึ่งแตกต่างจากในตัวผู้ คือตัวผู้มีกรานูลที่ไม่มีคริสตัลมากกว่า การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเซลล์ fat body ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนเป็นดักแด้ พบได้เช่นเดียวกันใน *H. cecropia* (Tojo and others, 1978) ที่ fat body มีการเปลี่ยนแปลงหน้าที่จากการสังเคราะห์โปรตีนมาทำหน้าที่ในการเก็บสะสมโปรตีนสำหรับการเจริญเป็นตัวเต็มวัย และใน vacuoles มีการสลายของ mitochondria และ endoplasmic reticulum เช่นเดียวกัน

การเก็บโปรตีนสะสมใน fat body

โปรตีนสะสมมี specific recognition และจะถูกนำกลับเข้าไปสะสมใน fat body ซึ่งการนำกลับจะเกิดในช่วงเวลาสั้นๆก่อนและหลังการเข้าดักแด้และเป็น endocytotic process การนำโปรตีนออกจากฮีโมกลิมพ์และเก็บสะสมใน fat body จะเกิดแบบคัดเลือก (selective) คือเป็นกระบวนการที่อาศัยรีเซปเตอร์เป็นตัวกลาง (receptor-mediated process) และในการนำกลับจะมีตัวกลางเป็น

specific endocytotic receptors ซึ่งพบรีเซพเตอร์ของโปรตีนสะสมได้ใน dipteran และ lepidopteran species (Pan and Telfer, 1992)

มีผู้ศึกษารีเซพเตอร์ของโปรตีนสะสมของพวก Lepidopteran ใน corn earworm, *H. zea* (Wang and Haunerland, 1993, 1994) พบรีเซพเตอร์ 2 ชนิดที่แตกต่างกันตามชนิดของ fat body คือ arylphorin และ VHDL โดยทั้งสองชนิดจะสะสมเฉพาะใน perivisceral (pupal) fat body แต่ไม่พบใน peripheral (larval) fat body (Haunerland and others, 1990) โปรตีนทั้งสองชนิดอาศัยรีเซพเตอร์ในการนำกลับตัวเดียวกัน ซึ่งการจับกับโปรตีนทั้งสองชนิดจะเกิดระหว่าง pH 6.5 และ 7.5 และอาศัย 4mM Ca^{2+}

มีผู้ทำการแยกรีเซพเตอร์ของ VHDL โดยสกัด membrane protein จาก perivisceral fat body พบว่า VHDL เป็น glycosylated protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80 kDa สามารถพบรีเซพเตอร์ได้เฉพาะใน perivisceral fat body ในตัวหนอนระยะสุดท้าย โดย VHDL รีเซพเตอร์ทั้งหมดจะเรียงเป็นแถวอยู่บน plasma membrane ของ fat body แต่สามารถพบในโปรตีนกรานูลได้ด้วยเช่นกัน (Wang and Haunerland, 1992) รีเซพเตอร์นี้เป็น endocytotic receptors ซึ่งจะพบเพียงช่วงเวลาสั้นๆ แต่มีความเข้มข้นสูงมาก และจากการตรวจสอบสารสกัดจาก fat body membrane โดยการตรวจด้วยแอนติบอดี พบรีเซพเตอร์เฉพาะระหว่างวันที่ 4 และวันที่ 8 ของตัวหนอนระยะสุดท้าย (Wang and Haunerland, 1993) ในช่วงนี้รีเซพเตอร์จะเป็น membrane protein หลัก แสดงให้เห็นว่า lepidopteran storage protein receptor ตรงข้ามกับ endocytotic receptors อื่นๆ คือ lepidopteran storage protein receptor ไม่ถูก recycle แต่จะถูกรวมเข้าไปใน protein granules สิ่งที่น่าสนใจความคิดนี้ คือ การคงอยู่ของรีเซพเตอร์ใน protein granules

รีเซพเตอร์ของโปรตีนสะสมเป็น membrane protein ที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม ถูกสังเคราะห์ใกล้ช่วงท้ายของตัวหนอนระยะสุดท้ายและอยู่ที่ plasma membrane โดยหันส่วนที่จับกับโปรตีนสะสมออกสู่โอมิโทม ส่วนที่จับกับ clathrin (clathrin binding site) จะหันเข้าสู่ไซโตพลาสซึมเมื่อโปรตีนสะสมจับกับรีเซพเตอร์แล้วจะถูกรวมเข้าสู่ intracellular clathrin เกิดเป็น coated pit ขนาดของส่วนโค้งของถุงจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเวสซิเคิล (vesicle) ที่เต็มไปด้วย receptor-bound storage proteins รวมเข้าไปใน plasma membrane จากนั้น clathrin coat จะหลุดออกไปจาก coated vesicles แล้ว vesicles ดังกล่าวจะเชื่อมกับ vesicle อื่นๆ เพื่อเกิดเป็น multivesicular bodies ที่มี receptor-bound VHDL และ arylphorin ต่อมา multivesicular bodies จะเชื่อมกับ primary lysosomes ซึ่งเอนไซม์ภายใน lysosome จะย่อย membrane components และรีเซพเตอร์ทำให้เกิด electron dense protein granules กรานูลนี้จะคงอยู่ 2-3 วัน เพื่อให้เกิดการย่อย VHDL อย่างสมบูรณ์ เหลือไว้เพียง arylphorin ที่มีลักษณะเป็นคริสตัล (crystallize) ที่สามารถป้องกันการย่อยจาก

protease ในระหว่างการเจริญของตัวเต็มวัย โดย protease จะ hydrolyzed arylphorin granules บางส่วน ทำให้ได้กรดอะมิโนที่จำเป็น arylphorin จะหลงเหลืออยู่ใน digested granules ในปริมาณมาก จนกระทั่งเข้าสู่ตัวเต็มวัย ในตอนนี้ arylphorin จะถูกเก็บเป็นแหล่งของกรดอะมิโนสำหรับการสร้างโปรตีนในไขแดง

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนสะสมในระหว่างการเจริญของแมลง

โปรตีนสะสมเริ่มเกิดขึ้นในช่วง pre-imaginal stages ของแมลง โปรตีนชนิดนี้ถูกใช้ประโยชน์ก่อนการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ตัวเต็มวัย ทำให้ปริมาณโปรตีนระหว่างตัวหนอนและตัวเต็มวัยแตกต่างกันมาก ซึ่งปริมาณโปรตีนสะสมจะสัมพันธ์กับการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง ความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้เรียกว่า developmental profiles โดยทั่วไปแล้วโปรตีนสะสมของ holometabolic insects ทั้งหมดจะมีรูปแบบของ developmental profiles คล้ายกัน แต่จะแตกต่างกันในรายละเอียด โปรตีนสะสมสามารถพบได้ครั้งแรกในระหว่างการเจริญของตัวหนอนที่ระยะต่างๆ กันขึ้นกับชนิดของแมลง แต่ปริมาณของโปรตีนสะสมจะเพิ่มขึ้นมากในตัวหนอนระยะสุดท้ายในแมลงทุกชนิด แล้วจะลดลงทันทีในระหว่างการเจริญของตัวเต็มวัยช่วงทำไข่

ใน *D. melanogaster* สามารถตรวจพบโปรตีนสะสมได้เป็นครั้งแรกในช่วงสั้นๆ หลังจากการลอกคราบครั้งที่สองของตัวหนอน (Robert and others, 1977) ซึ่งคล้ายกับของ *C. vicina* (Levenbook and Bauer, 1980) ส่วนโปรตีนสะสมของ *C. stygia* นั้นเริ่มสังเคราะห์ในช่วงครึ่งหลังของตัวหนอนระยะที่ 2 LHP-I และ LHP-II ของ *H. cecropia* ปรากฏเป็นครั้งแรกในตัวหนอนระยะที่ 5 ก่อนการลอกคราบ 3 วัน ในขณะที่โปรตีนสะสมของ *M. sexta* ปรากฏในตัวหนอนระยะที่ 2 (Kramer and others, 1980) developmental profiles ของ LSP-I ใน *D. melanogaster* และโปรตีนสะสมของ *C. vicina* มีลักษณะคล้ายกัน คือ LSP-I มีมากที่สุดในช่วงที่หนอนกินอาหาร และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงที่เข้าดักแด้ จากนั้นปริมาณโปรตีนจะคงที่จนกระทั่งเข้าสู่ $\frac{3}{4}$ ของระยะตัวเต็มวัย แล้วลดลงทันที ส่วน LHP-II ของ *D. melanogaster* มี developmental profiles แตกต่างจาก profile ของ LSP-I คือการสังเคราะห์ของโปรตีนชนิดนี้เกิดต่อเนื่องจนถึงระยะดักแด้และค่อยๆ ลดลงเป็นรูปประจักษ์ว่า

ในธรรมชาติโฮลิมฟ์ของหนอนไหม *B. mori* ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีนที่มีขนาด 200 kDa ซึ่งเป็น heavy subunit ของ lipophorin มีระดับคงที่ตลอดช่วงชีวิตของหนอนไหม, SP-1 และ SP-2 ที่มีขนาด 80 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนสะสมที่เพิ่มขึ้นในช่วง intermolt period และลดลงในช่วง molting period ส่วนโปรตีนชนิดที่ 4 คือ BmLSP (*Bombyx mori* larval

serum protein) ซึ่ง Fujiwara and Yamashita (1990) ศึกษา BmLSP พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ BmLSP ในฮีโมกลิมพ์ของหนอนไหมในแต่ละระยะการเจริญ พบว่าเป็นโปรตีนหลักที่พบในตัวหนอนตั้งแต่วันที่ 1 ของตัวหนอนระยะที่ 1 จะมีปริมาณคงที่จนกระทั่งถึงวันที่ 1 ของตัวหนอนระยะสุดท้าย จากนั้นจะลดลงในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนเป็นดักแด้ พบ BmLSP ได้ทั้งในตัวหนอนเพศผู้และเพศเมีย และไม่มี sexual dimorphism นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีการสะสมของ BmLSP ในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆ นอกจากฮีโมกลิมพ์

โปรตีนสะสมของ mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 4 ชนิด ได้แก่ MLSP-1, 2, 3 และ 4 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 81 และ 87 kDa โปรตีนดังกล่าวถูกสังเคราะห์ใน fat body ในระหว่างการเจริญของตัวหนอนขึ้นสุดท้ายและถูกเก็บสะสมไว้ในฮีโมกลิมพ์ (Mintzas and Rina, 1986) MLSP-1, 2 และ 3 มีรูปแบบความสัมพันธ์กันทางอิมมูโนวิทยา แต่ MLSP-4 แตกต่างออกไป (Mintzas and others, 1983) และการสังเคราะห์ของ MLSP-4 เกิดขึ้นช้ากว่า MLSP-1, 2 และ 3 ประมาณ 1 วัน ใน native conditions MLSP-4 เป็น homohexameric protein มี aromatic amino acid เป็นส่วนประกอบจำนวนมากและมีคุณสมบัติคล้ายกับ LSP-2 ของ *D. melanogaster* ส่วน MLSP-1, 2 และ 3 นั้นเหมือนกับ LSP-1 ของ *D. melanogaster* primary structure ของ MLSP-1, 2 และ 3 มีความเหมือนกันอย่างมาก ซึ่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดแตกต่างจาก MLSP-4

Rehn and Rolim (1990) ทำการแยกและศึกษาคุณสมบัติของ hexameric storage protein (SPR) จากฮีโมกลิมพ์ของระยะตัวหนอนของ *Rhodnius prolixus* พบว่า SPR มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 78 kDa โดยใน undenatured state มีน้ำหนักโมเลกุล 470 kDa ระดับของ SPR มีค่าคงที่ในระหว่างการเจริญและพัฒนารูปร่างของตัวหนอนและมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักในระหว่างการลอกคราบระหว่างตัวหนอน แต่ระดับของ SPR จะลดลงเฉพาะช่วงที่ตัวหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ สัดส่วนของ SPR ในฮีโมกลิมพ์จะลดลงครึ่งหนึ่งระหว่างการลอกคราบ และสามารถพบ SPR ปริมาณมากในตัวเต็มวัยภายหลังจากการลอกคราบ นอกจากนี้เมื่อนำตัวเต็มวัยมาอดอาหาร พบว่า SPR หายไปจากฮีโมกลิมพ์ทันทีแสดงให้เห็นว่าสารอาหารจำเป็นสำหรับการสร้าง SPR

จากการศึกษาการกระจายตัวของ hexamerin-1 (Hex-1) และ hexamerin-2 (Hex-2) ในเนื้อเยื่อของตัวหนอนและดักแด้ของยุง *Aedes aegypti* และ *Anopheles gambiae* ด้วย immunohistochemical analysis พบว่าทั้งฮีโมกลิมพ์และ fat body เป็นแหล่งสะสมเริ่มต้นของ hexamerins ทั้งสองชนิด *Aedes* มีการเก็บสะสม Hex-1 และ Hex-2 ใน fat body และยังพบโปรตีนทั้งสองชนิดใน extra-haemolymph tissue ในช่วงก่อนการลอกคราบไปเป็นตัวเต็มวัย โดย Hex-1 มี

ระดับสูงกว่า Hex-2 ก่อนหน้านี้นี้มีการทำการทดลองในยุงตัวเมียที่เพิ่งลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย (Behan and Hagedorn, 1978) พบว่าใน fat body มี protein granules จำนวนมาก ซึ่งเป็นส่วนที่เก็บ hexamerins ที่เหลือเอาไว้ ต่อมา heterogenous protein granules เหล่านี้จะหายไปหลังจากเป็นตัวเต็มวัย ภายใน 3 วัน (Raikhel and Lea, 1983)

ในหมวดและอีโมลิฟของ honeybee, *Apis melliphora* ประกอบด้วย hexamerins จำนวนมากในระหว่างการเจริญของ honeybee โดย Danty *et al.* (1998) ทำการศึกษาในเพศและวรรณะที่ต่างกัน คือ ผีเสื้อตัวผู้, ผีเสื้อนางพญา และผึ้งงาน พบโปรตีนที่น่าสนใจ 3 ชนิดในผีเสื้อตัวผู้และผึ้งงานระยะดักแด้ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 65-70 kDa จาก N-terminal sequence พบว่าโปรตีนทั้งหมดจัดอยู่ใน hexameric storage protein family หรือ hexamerins จึงกำหนดให้เป็น Hex 70a, b และ c นอกจากนี้ยังพบ Hex 80 และ Hex 110 จากการศึกษา developmental profiles ในอีโมลิฟของโปรตีนทั้งสามชนิดพบว่าโปรตีนทั้งสามชนิดมีความเข้มข้นสูงมากในช่วงเริ่มต้นของการเข้าดักแด้ จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ ปริมาณของ Hex 70b และ Hex 70c ในอีโมลิฟมีค่าคงที่จากตัวหนอนระยะสุดท้ายจนถึงระยะดักแด้ก่อนการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเต็มวัย 6 วัน จากนั้นจะค่อยๆ ลดลง แล้วหายไปในวันที่เปลี่ยนจากดักแด้เป็นตัวเต็มวัย แต่ Hex 70a ยังคงพบได้ในตัวเต็มวัยของทุกระยะ ส่วน Hex 80 และ Hex 110 นั้นพบว่ามีปริมาณค่อยๆ ลดลง และหายไปในช่วงก่อนการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเต็มวัย สำหรับหน้าที่ของ hexamerins ในหมวด พบว่า hexamerins ถูกใช้ในการสร้าง antennal cuticular tissue โดยมีความสอดคล้องกันระหว่างการเริ่มต้นเกิด sclerotization ของคิวติเคิลของหมวดและมีการลดลงของ hexamerins จากหมวดของผึ้งที่เติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์

นอกจากนี้ในอีโมลิฟของตัวหนอนของ honeybee ยังมี arylphorin ซึ่งมีความเข้มข้นสูงในตัวหนอนระยะสุดท้าย Ryan *et al.* (1984) ทำการหา native molecular weight โดยใช้ gel electrophoresis และ Bio-Gel A 1.5 gel permeation chromatography พบว่ามี native molecular weight ประมาณ 470 kDa ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยนั้นหาได้จาก regression line ของ log molecular weight ที่ได้จากระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บน SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 74 kDa แสดงว่ามีโครงสร้างเป็น hexameric subunit structure มี aromatic amino acids เป็นส่วนประกอบในปริมาณมาก จึงสรุปได้ว่าเป็น arylphorin จริง นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นของ arylphorin ในอีโมลิฟมีระดับต่ำในระหว่างการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวเต็มวัย โปรตีนใน fat body จะถูกสลายเป็นกรดอะมิโนที่ใช้สำหรับการสร้างเนื้อเยื่อและโครงสร้างส่วนแข็งของตัวเต็มวัย ซึ่งต้องการ aromatic amino acid ปริมาณมากในการเกิด sclerotization

Kramer *et al.* (1980) ทำการแยกบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของ manducin ในอีโมลิฟของ tobacco hornworm, *M. sexta* พบว่า manducin ในอีโมลิฟมีมากถึง 80% ในขั้นแรกทำการแยกโดยใช้ Sepharose chromatography และ SDS-PAGE จาก Sepharose 6B พบว่า manducin มีน้ำหนักโมเลกุล 450 kDa และบน SDS-PAGE พบว่า manducin ประกอบด้วยแถบสองแถบที่มีความเข้มของแถบเท่ากัน ซึ่งมีขนาด 87 kDa และ 92 kDa ผู้ทดลองพยายามหาความเหมือนของ N-terminal sequence ของทั้งสองแถบโดยการนำ carboxamidomethylated manducin มาหาด้วย Automated Edman degradation แต่ไม่สามารถหาได้คือในการทดลองไม่ได้รับ phenylthiohydantoin derivatives แสดงให้เห็นว่าเกิดการ block N-terminal amino acid residue พบ manducin ในอีโมลิฟของตัวหนอนระยะที่ 4, 5 และดักแด้ แต่ไม่พบในอีโมลิฟของตัวเต็มวัยทั้งเพศเมียและเพศผู้ นอกจากนี้ปริมาณ manducin ในอีโมลิฟที่ได้จากตัวหนอนและดักแด้ในแต่ละขั้นตอนการเจริญมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก ความเข้มข้นของ manducin เพิ่มขึ้นภายใน 4 วันแรกของตัวหนอนระยะที่ 5 และเริ่มลดลงในช่วง wandering ของตัวหนอนระยะที่ 5 (หลังจากวันที่ 5) และค่อยๆลดลงเรื่อยๆในช่วงที่เป็นดักแด้ การลดลงของ manducin นี้เกิดจากโปรตีนจากอีโมลิฟถูกนำกลับเข้าไปใน fat body เพื่อใช้ในกระบวนการสร้าง aromatic amino acids และพบว่า manducin จาก fat body ของดักแด้เหมือนกับ manducin ที่พบในอีโมลิฟของตัวหนอน จึงสรุปได้ว่า manducin จากอีโมลิฟถูกนำกลับเข้าไปใน fat body จริง

โปรตีนสะสมในเนื้อเยื่อของ greater wax moth, *G. mellonella* ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 74, 76, 81 และ 82 kDa หรือน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ calibrated BioGel A-1.5 column พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 235 kDa แสดงให้เห็นว่าโปรตีนสะสมทั้ง 4 ชนิดมีโครงสร้างเป็น trimer Miller and Silhacek (1982) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในอีโมลิฟและ fat body ในแต่ละขั้นตอนของการเจริญ พบว่าปริมาณโปรตีนมีความแตกต่างกันในแต่ละขั้นตอนของการเจริญ โดยเริ่มตรวจพบโปรตีนขนาด 81 และ 82 kDa ได้ตั้งแต่ตัวหนอนระยะที่ 7 และ 74 และ 76 kDa polypeptides พบได้เป็นปริมาณมากในตัวหนอนระยะที่ 6 แต่หลังจากนั้น 15 วัน จะหายไปจากอีโมลิฟของตัวหนอน (ช่วงก่อนการเข้าดักแด้) ส่วนโปรตีนขนาด 80 และ 82 kDa ยังอยู่ในอีโมลิฟจนกระทั่งมีปริมาณเหลืออยู่น้อยในช่วงต้นของระยะดักแด้ โปรตีนทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในอีโมลิฟและ fat body ของตัวเต็มวัย ซึ่งโปรตีนดังกล่าวถูกนำออกจาก fat body หรือถูกสลายแล้วนำไปใช้ในระหว่างการพัฒนาของดักแด้และตัวเต็มวัย ระดับของโปรตีนทั้ง 4 ชนิดจะแตกต่างกันในแต่ละระยะของการเจริญและตำแหน่งของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศในการสังเคราะห์โปรตีนสะสมทั้ง 4 ชนิด สำหรับการนำกลับของโปรตีนสะสมทั้ง 4 ชนิด พบว่าการนำกลับของโปรตีนขนาด 74 และ 76 kDa เริ่มก่อนการลอกไหม ในขณะที่โปรตีน

ขนาด 81 และ 82 kDa จะถูกเก็บสะสมในช่วงท้ายๆของการักไข่ใหม่ หลังจากการนำกลับเข้าสู่ fat body แล้วจะเกิดการสะสมโปรตีนสะสมทั้งก่อนและในระหว่างการเข้าดักแด้ ผู้ทดลองทำการตัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ *Staphylococcus aureus* protease V8 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ตัด polypeptides ตรง carboxy side ของ aspartate และ glutamate residues หลังจากตัดแล้วพบว่า 82 และ 81 kDa polypeptides ให้รูปแบบของ peptide เหมือนกันแต่ความเข้มของแถบต่างกัน ส่วน 76 และ 74 kDa ให้รูปแบบของ peptide แตกต่างจากรูปแบบของ 81 และ 82 kDa อย่างสิ้นเชิง

การสังเคราะห์ arylphorin และ FSP (female specific protein) ในระหว่างการเจริญของตัวหนอน Tobacco hornworm, *M. sexta* ต่างกันในระหว่างการเจริญ โดยตรวจพบ Manducal arylphorin ในฮีโมกลิมพ์ของตัวหนอนทุกระยะรวมทั้งระยะดักแด้ แต่จะพบปริมาณเล็กน้อยในตัวเต็มวัย (Kramer and others, 1980) จากการทดลอง พบว่า arylphorin ถูกใช้ในระหว่างการลอกคราบของตัวหนอนเพื่อใช้ในการสร้างคิวติเคิลใหม่ การสังเคราะห์โปรตีนจะหยุดในระหว่างที่มีการลอกคราบ ซึ่งเกิดในขณะเดียวกับการขาดแคลนสารอาหารและการเพิ่มขึ้นของ ecdysteroid จากนั้นการสังเคราะห์ arylphorin จะเกิดขึ้นอีกครั้งหลังจากการลอกคราบประมาณ 18 ชั่วโมง จนกระทั่งถึงตัวหนอนระยะสุดท้ายและหยุดการสังเคราะห์อีกครั้งหนึ่งในระยะ wandering แม้ว่า arylphorin บางส่วนจะถูกนำกลับเข้าไปโดย fat body ในช่วงก่อนการเข้าดักแด้ แต่ arylphorin ส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดยังคงหลงเหลืออยู่ในฮีโมกลิมพ์ ในทางตรงกันข้าม FSP ถูกสังเคราะห์เฉพาะในตัวหนอนระยะสุดท้าย โดยการสังเคราะห์ของ FSP ในเพศเมียจะเกิดก่อนเพศผู้ ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีการสังเคราะห์ในระดับต่ำแล้วคงที่ในช่วงก่อนเข้าดักแด้ ซึ่งคล้ายกับว่า fat body ของระยะตัวหนอนทำหน้าที่ในการเก็บสะสม FSP ส่วนในช่วงก่อนเข้าดักแด้ FSP ทั้งหมดถูกนำกลับจากฮีโมกลิมพ์เข้าไปเก็บใน fat body ซึ่งการนำกลับนี้เกิดขึ้นเนื่องจากมี 20-hydroxyecdysone ปริมาณสูงในช่วงก่อนเข้าดักแด้

Grun and Peter (1984) พบ arylphorin-immunoreactive material ในคิวติเคิลของดักแด้ของ *M. sexta* แสดงให้เห็นว่า arylphorin ถูกย่อยสลายอย่างไม่สมบูรณ์ก่อนจะถูกรวมเข้าไปในคิวติเคิล iodine ที่ถูก label ทั้งหมดถูกพบใน insoluble portion ของคิวติเคิล ดังนั้น arylphorin จึงมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างโครงสร้าง arylphorin เคยถูกพบใน tanned puparial และคิวติเคิลของตัวเต็มวัยของ *Calliphora* (Levenbook and Bauer, 1984) และ *Ceratitis capitata* (Kaliafas and others, 1984) และถูกรวมเข้าไปใน fat body โดยตรงโดยไม่ผ่านการย่อยสลายก่อน (Konig and others, 1986)

การควบคุมโดยฮอร์โมน

ฮอร์โมนสองชนิดที่มีบทบาทในการควบคุมการผลิตและนำกลับโปรตีนสะสมในระหว่างวงจรชีวิตของแมลง คือ ฮอร์โมนจูวีไนล์ (JH, juvenile hormone) และ ฮอร์โมนเอกไดโซน หรือ molting hormone (20-hydroxyecdysone)

Pau *et al.* (1979) ศึกษาผลของ 20-hydroxyecdysone ต่อการสังเคราะห์ LHP-I ของ *C. vicina* โดยศึกษา fat body ของตัวหนอนใน organ culture พบว่า 20-hydroxyecdysone ยับยั้งการสังเคราะห์ LHP-I ซึ่งระดับของ ecdysteroid ที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงต้นของตัวหนอนระยะที่ 3 เป็นสัญญาณให้หยุดการสังเคราะห์ LHP-I ภายหลังจากนั้น 2 วัน ใน lepidoptera ทั่วไป 20-hydroxyecdysone มีผลกระตุ้นการนำกลับโดย fat body และเก็บสะสมใน protein storage granules เช่น *Calpodex ethlius* (Dean, 1978), *Ephestia kuhniella*, *Pieris brassicae* (Sass and Kovacs, 1980) และ *B. mori* (Tojo and others, 1981) นอกจากนี้ 20-hydroxyecdysone ยังมีผลต่อการสะสมของโปรตีนกราโนลใน fat body ของ *D. melanogaster* โดยจำนวนของ insoluble granules มีมากที่สุด 8-9 ชั่วโมง ก่อนการเข้าดักแด้ และการสร้าง insoluble granules นี้เกิดจากการสลายของโปรตีนที่ถูกสร้างในอีโมลิฟก่อนหน้านั้น (Thomasson and Michell, 1972) 20-hydroxyecdysone ชักนำให้มีการสร้าง granules เร็วขึ้นใน *in vivo* และปรากฏในเซลล์ fat body เร็วขึ้นใน *in vitro* นอกจากนี้ในช่วงต้นของตัวหนอนระยะที่ 3 (Berreur and others, 1979) และ *Calliphora vicina* (Koolman, 1980) จะมีการหลั่ง 20-hydroxyecdysone ออกมาเล็กน้อยซึ่งชักนำให้หยุดการสังเคราะห์โปรตีนสะสมจาก fat body และพบว่า 20-hydroxyecdysone ชักนำให้เกิด autophagocytosis ใน fat body ทางอ้อม

มีการศึกษาฮอร์โมนที่ควบคุมการนำกลับของ FSP โดย fat body ใน Diptera และ Lepidoptera ซึ่งการนำกลับนี้ถูกชักนำโดย 20-hydroxyecdysone ปริมาณที่เพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการเข้าดักแด้ (Tojo and others, 1985) ใน *Manduca* การขนย้าย FSP จากอีโมลิฟถูกชักนำโดย 20-hydroxyecdysone (Ryan and others, 1985) แม้ว่า arylphorin บางส่วนจะถูกนำกลับเข้าไปใน fat body แต่ arylphorin จำนวนมากยังคงเหลืออยู่ในระบบหมุนเวียนโลหิตแล้วลดลงจนกระทั่งเกิดการลอกคราบของดักแด้ (Kramer and others, 1980)

Tojo *et al.* (1981) ศึกษาฮอร์โมนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนสะสมและการนำกลับโดย fat body ในหนอนไหม โดยฉีดฮอร์โมนจูวีไนล์และฮอร์โมนเอกไดโซนแก่ตัวหนอนเพศเมีย และนำต่อม corpora allata ออกจากสมองของตัวหนอน (allatectomy) ก่อนระยะสุดท้าย พบว่าการตัดต่อม corpora allata ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนสะสมในช่วงที่หนอนมีการกินอาหาร และ

การนำกลับโดย fat body เกิดเร็วขึ้นในระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนเป็นดักแด้ จากการศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์พบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนสะสมดังกล่าว และฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้น 2 นาโนกรัม มีผลยับยั้งการสร้างคิวติเคิลของดักแด้ สามารถกล่าวได้ว่าฮอร์โมนจูวีไนล์มีผลโดยตรงในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนสะสมใน fat body ซึ่งในสภาพธรรมชาติในตัวหนอนระยะที่ 4 ระดับของฮอร์โมนจูวีไนล์จะลดลงจนถึงระดับ threshold ก่อนการลอกคราบ ในช่วงนี้ความเข้มข้นของโปรตีนสะสมในฮีโมลิμφจะค่อยๆเพิ่มขึ้น และลดลงเมื่อเข้าสู่ตัวหนอนระยะที่ 5 สำหรับฮอร์โมนเอกไดโซนนั้นไม่มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนสะสมใน hormone-free isolated abdomens นอกจากนี้พบว่าการอดอาหารมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนสะสมด้วยเช่นกัน สำหรับผลต่อการนำกลับโปรตีนสะสม พบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์มีผลยับยั้งการนำโปรตีนสะสมกลับเข้าไปใน fat body ซึ่งความสามารถในการยับยั้งขึ้นกับความเข้มข้นของฮอร์โมน พบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์ 1 ไมโครกรัม ขัดขวางการนำโปรตีนกลับและชักนำให้เกิดการลอกคราบเร็วขึ้น ส่วนฮอร์โมนเอกไดโซนนั้นมีผลกระตุ้นการนำกลับของโปรตีนสะสม ดังนั้นจากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงใน fat body เกิดจากฮอร์โมนเอกไดโซนที่เกิดขึ้นในขณะที่ขาดฮอร์โมนจูวีไนล์ในช่วงก่อนการดักแด้ใหม่

De Kort and Koopmanschap (1991) ศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (pyriproxyfen) ที่มีต่อรูปแบบของโปรตีนในฮีโมลิμφของ *L. migratoria* ในตัวหนอนระยะสุดท้าย พบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ larval-storage protein I แต่กลับกระตุ้นการสังเคราะห์ high-molecular weight protein ชนิดอื่น การกระตุ้นขึ้นกับความเข้มข้นของฮอร์โมน ซึ่งโปรตีนดังกล่าวมี native molecular weight ประมาณ 500 ± 13 kDa ประกอบด้วย 5 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 110, 101, 91, 62 และ 56 kDa ทั้ง 5 หน่วยย่อย ถูกชักนำโดยฮอร์โมนจูวีไนล์ ในที่นี้ยังไม่ทราบว่า high-molecular weight protein ดังกล่าวเป็นโปรตีนชนิดใด ซึ่งต่อมากายหลังทราบว่าโปรตีนดังกล่าว คือ vitellogenin (Ancsin and Wyatt, 1996)

ฮอร์โมนจูวีไนล์และ 20-hydroxyecdysone มีผลต่อการควบคุมการสังเคราะห์ Major haemolymph protein (MHP) ในระยะตัวหนอนของ *B. mori* MHP อยู่ใน family เดียวกับ *Bombyx* fat body protein ที่เรียกว่า “30 K” (Bosquet and others, 1989), (Sakai and others, 1988) ซึ่ง MHP ชนิดนี้จะต่างจาก MHP ของแมลงชนิดอื่น คือไม่ถูกนำกลับจากฮีโมลิμφโดย fat body ในช่วงสุดท้ายของตัวหนอนที่กินอาหารหรือในระหว่างการเตรียมการเกิดเมตามอร์โฟซิส และพบ MHP เป็นปริมาณมากใน oocyte, ผิวหนังชั้นเอพิเดอร์มิส, กล้ามเนื้อ, fat body และลำไส้ ในระหว่างที่เป็นดักแด้ (Zhu and others, 1986) Izumi *et al.* (1984) ทดลองนำ corpora allata ออกจากตัวหนอน และ

Akai *et al.* (1984) ให้ SSP11 (anti-juvenile hormone compound) ในช่วงเริ่มต้นของตัวหนอนระยะก่อนสุดท้าย พบว่าการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนี้เพิ่มขึ้นในวันต่อมา

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University