

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ประวัติไหมไทยโดยทั่วไป (General history)

การค้นพบประโยชน์ของไหม สันนิษฐานว่าจีนเป็นชาติแรกที่ค้นพบการสาวเส้นไหม ออกจากรังเมื่อประมาณ 4,700 ปีมาแล้ว (Yufu. et al., 1989) มีนักวิทยาศาสตร์โบราณคดีตั้งข้อสังเกตและสรุปว่าไหมพันธุ์พื้นเมืองของไทย ได้รับสายพันธุ์มาจากจีนตอนใต้ซึ่งมีลักษณะเหมือนกัน โดยเฉพาะการฟักไข่ตามธรรมชาติสามารถฟักออกเป็นตัวได้ปีละหลายๆ ครั้งรังมีรูปร่างเรียวยาว สีเหลือง มีปู่มาก (จิราภรณ์ อริณชนาก, 2534)

จากหลักฐานต่างๆทำให้เราทราบว่า ตั้งแต่ยุคโบราณจนถึงปัจจุบัน ประเทศไทยมีการเลี้ยงไหม สาวไหมและทอผ้าเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน มีการฟื้นฟู พัฒนา ส่งเสริมจนเป็นอุตสาหกรรมของประเทศที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ (กรมวิชาการเกษตร, 2523b)

จะเห็นได้ว่าไหมไทยมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเศรษฐกิจของประชากรและเศรษฐกิจของประเทศมานานนับหลายร้อยปี และยังคงเป็นเอกลักษณ์ของความเป็นไทยที่ควรอนุรักษ์และพัฒนาปรับปรุงให้มีผลผลิตที่ดียิ่งขึ้นต่อไป จึงเห็นความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาการเลี้ยงไหมให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยหันมาศึกษากันแบบวิทยาศาสตร์อย่างเป็นระบบคือวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ได้แก่ จุลกายวิภาคศาสตร์ ที่จะเป็รรากฐานสำหรับหาความรู้ด้านอื่นๆ แล้ว จะเป็นพื้นฐานการหาความรู้ระดับประยุกต์ คือระดับการเลี้ยงไหมให้ได้ผลผลิตสูงต่อไป

วงจรชีวิต (Life cycle)

หนอนไหมเป็นแมลงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ (Complete metamorphic insect) มีการเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 4 ระยะได้แก่ ระยะไข่ (eggs) ระยะตัวหนอน (larva) ระยะดักแด้ (pupa) และระยะผีเสื้อ หรือระยะตัวเต็มวัย (moth, imago) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเสร็จสิ้นสมบูรณใน 1 ชั่วโมง (กรมวิชาการเกษตร, 2535a) ในระยะตัวหนอนเท่านั้นที่กินอาหาร มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสะสมอาหารไว้ใช้ในระยะผีเสื้อ แต่รูปก่อกของ

อวัยวะต่างๆ (imaginal anlagen) ในระยะนี้ยังคงสงบนิ่งอยู่ภายในจนกระทั่งตัวหนอน (Larva) มีการเจริญเปลี่ยนรูป (metamorphosis) ไปเป็นดักแด้ (pupa) รูปก่อของอวัยวะต่าง ๆ นั้นจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและเจริญเปลี่ยนแปลง (differentiation) กลายเป็นอวัยวะของตัวเต็มวัย (moth) ซึ่งไม่สามารถย่อยอาหารได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นระยะตัวหนอนจึงเป็นระยะที่สำคัญมาก สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนเส้นไหมและการสร้างไข่ ส่วนระยะดักแด้เป็นระบบปิด แต่มีการเผาผลาญอาหารสูงมาก เพื่อใช้ในการสลายและสร้างเนื้อเยื่อ ในขบวนการเจริญเปลี่ยนรูป (Sakaguchi, 1978)

ในการดำรงชีวิตของหนอนไหมนั้น หนอนไหมสามารถปรับตัวเองให้เข้ากับความเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ 2 คุณลักษณะ คุณลักษณะแรกได้แก่ จำนวนรุ่นของการวางไข่ต่อปีตามธรรมชาติ (voltinism หรือ diapause) ผีเสื้อหนอนไหมที่วางไข่ได้ 1 รุ่นต่อปี (one generation) เรียกว่า monovoltine หรือ univoltine ผีเสื้อหนอนไหมที่วางไข่ได้ 2 รุ่นต่อปี (two generations) เรียกว่า bivoltine และผีเสื้อหนอนไหมที่วางไข่ได้มากกว่า 2 รุ่นต่อปี (more than two generations) เรียกว่า polyvoltine หรือ multivoltine

สำหรับคุณลักษณะอีกอย่างหนึ่งคือ จำนวนครั้งของการลอกคราบ (moulting หรือ exuviation) สายพันธุ์ไหมที่นิยมเลี้ยงเพื่อการค้าโดยส่วนใหญ่จะเป็นหนอนไหมสายพันธุ์ที่ลอกคราบ 4 ครั้ง แต่มีบางสายพันธุ์ที่ลอกคราบได้ 3 ครั้ง และ 5 ครั้ง ทั้งจำนวนรุ่นของการวางไข่ต่อปีและจำนวนครั้งของการลอกคราบขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยหลัก อย่างไรก็ตามคุณลักษณะดังกล่าวยังสามารถเปลี่ยนแปลงได้ ตามความเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น ถ้าเลี้ยงหนอนไหมไว้ในที่มีคสนิทและอุณหภูมิต่ำตั้งแต่ระยะตัวหนอนลอกคราบครั้งแรกถึงลอกคราบครั้งที่ 3 แล้วเปลี่ยนไปเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงและแสงสว่างจ้า จนกระทั่งไหมสุกจะมีผลทำให้จำนวนรุ่นของการวางไข่ต่อปีเพิ่มขึ้น (Chuan และ Chuang, 1988)

ในช่วงระยะที่เป็นตัวหนอนตั้งแต่หนอนไหมวัยแรกเกิด (newly hatched larva) ถึงลอกคราบครั้งแรกเรียกว่า ตัวหนอนวัย 1 ในวัยต่อไปจะเริ่มต้นจากหนอนไหมเสร็จสิ้นการลอกคราบแต่ละครั้ง ดังนั้นตัวหนอนวัย 2 จึงตามหลังจากลอกคราบครั้งที่ 1 ตัวหนอนวัย 3 จะตามหลังการลอกคราบครั้งที่ 2 เป็นเช่นนี้เรื่อย ๆ ไปจนกระทั่งสิ้นสุดวัยที่ 5 หนอนไหมจะแก่จัด (mature) หรือที่เรียกว่าไหมสุก ช่วงระยะเวลาจากตัวหนอนวัย 1 ถึงวัย 3 เรียกว่า ตัวหนอนวัยอ่อน (young larva) ช่วงระยะเวลาจากตัวหนอนวัย 4 ถึงวัย 5 เรียกว่า ตัวหนอนวัยแก่ (grown larva) (Chuan และ Chuang, 1988)

จากเอกสารวิชาการเล่ม 2 กรมวิชาการเกษตร, 2532a แบ่งวงจรชีวิตหนอนไหมออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1. ระยะที่เป็นไข่(eggs)

ไข่หนอนไหมมีขนาดเล็ก ไข่ 2,000 ฟองหนักประมาณ 1 กรัม แต่ละฟองกว้าง 0.9-1.2 มิลลิเมตรยาว 1-1.3 มิลลิเมตร (Krishnaswami, 1973) ไข่หนอนไหมพันธุ์ต่างประเทศ เช่น พันธุ์ไค่หวัน หลังผีเสื้อหนอนไหมวางไข่ใหม่ๆ ไข่จะมีสีเหลือง หลังจากฟัก 1-2 วัน จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หลังจากนั้นอีก 2-3 วันจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงและเข้มขึ้น จนประมาณวันที่ 10 จะฟักออกเป็นตัวหนอนวัย 1 สำหรับหนอนไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 หลังจากผีเสื้อหนอนไหมวางไข่ใหม่ๆ ไข่จะมีสีเหลืองเข้มกว่าพันธุ์ไค่หวัน หลังจากฟัก 4-5 วัน ไข่จะเปลี่ยนเป็นสีดำและสีจะคงที่อย่างนี้จนกระทั่งประมาณวันที่ 8 จะฟักออกเป็นตัวหนอนวัย 1

ในระยะที่เป็นไข่นี้ใช้เวลานานน้อยแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์กล่าวคือ ถ้าเป็นหนอนไหมพวกที่วางไข่ได้มากกว่า 2 รุ่นต่อปี (polyvoltine) ช่วงเวลาจากผีเสื้อตัวไหมวางไข่จนถึงตัวหนอนฟักออกจากไข่จะใช้เวลา 9-12 วัน แต่ถ้าเป็นหนอนไหมที่วางไข่ได้ 1-2 รุ่นต่อปี (univoltine และ bivoltine) และอยู่ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติเดิมของหนอนไหมจะใช้เวลาในช่วงดังกล่าวนี้ 4-10 เดือน

2. ระยะที่เป็นตัวหนอน(larva)

ระยะนี้เป็นระยะที่ใช้เวลานานที่สุดในวงจรชีวิตหนอนไหม มีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางขนาดและน้ำหนักมากที่สุด กล่าวคือหนอนไหมที่โตเต็มที่จะมีน้ำหนักเป็น 1,000 เท่าของหนอนไหมที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ (กรมวิชาการเกษตร, 2523) หนอนไหมมีการเจริญเติบโตรวดเร็วมากเมื่อเจริญเติบโตไปไครยะหนึ่ง ผิวหนังซึ่งมีขีดจำกัดในการขยายตัวเนื่องจากประกอบด้วยสาร chitin ก็จะไม่สามารถที่จะขยายตัวออกอีกต่อไป หนอนไหมจึงต้องการมีการลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาดลำตัวขึ้นไปอีก

2.1 หนอนไหมที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ (new-born larva)

หนอนไหมที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ จะมีลำตัวเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลไหม้ หัวจะมีขนาดใหญ่ ลำตัวมีขน (bristle) ปกคลุมอยู่อย่างหนาแน่น จึงมีลักษณะคล้ายตัวบุ้งที่มีขนปกคลุมทั้งตัวมี tubercle อยู่ 4 คู่ subdorsal, supraspiracular, infraspircular และ basal tubercle ซึ่งแต่ละ tubercle จะมีขนแข็ง (setae) 3-6 อัน (Krishnaswami et al., 1973) ตัวหนอนที่เพิ่งฟักจากไข่จะมีความยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร ประมาณ 2 วันหลังจากฟักออกจากไข่ setae บนพื้นผิวลำตัวจะค่อยๆ บางลงเนื่องจากผิวหนังมีการขยายตัว หลังจากนั้น 1 วันตัวหนอนยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร

และผิวหนังจะเป็นมันขึ้น (Sakaguchi, 1978) หลังจากที่ย่อจากไข่และกินอาหารเต็มที่ประมาณ 3-4 วัน ก็จะหยุดกินอาหารเตรียมตัวลอกคราบ

2.2 การลอกคราบ (moulting)

การเจริญเติบโตของหนอนไหมได้อิทธิพลจากฮอร์โมนซึ่งได้จาก corpora allata และเมื่อการเจริญถึงจุดหนึ่งที่ผิวหนังไม่สามารถขยายตัวได้อีกต่อไปอีกฮอร์โมนจาก corpora allata ก็จะหยุดทำงานและในจังหวะเดียวกันนี้ฮอร์โมนจาก prothoracic gland จะเริ่มมีบทบาทกำหนดให้หนอนไหมทำการลอกคราบ ในระหว่างการเจริญจากวัย 1 ถึงวัย 5 นี้ ตัวหนอนสร้าง cuticle อันใหม่และสลัดอันเก่าทิ้งไป ปรากฏการณ์สลัด cuticle อันเก่าทิ้งไปนี้เรียกว่าลอกคราบ (moulting) ด้วยเหตุที่การลอกคราบซ้ำ ๆ กันถึง 4 ครั้ง ในช่วงระยะเวลาที่เป็นตัวหนอนจึงมีช่วงเวลาที่กินอาหาร 5 ระยะเรียกว่า วัย (instars) การลอกคราบในสายพันธุ์ต่างๆจะมีระยะเวลาใกล้เคียงกัน และช่วงเวลาของแต่ละวัยจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ (Sakaguchi, 1978) ในการลอกคราบนั่นคือ exuvial ซึ่งอยู่บริเวณโคนขาส่วนนอก จะผลิตของเหลวออกมาช่วยให้การลอกคราบเป็นไปได้ง่าย นอกจากนี้ก่อนจะมีการลอกคราบ Malpighian tube จะสร้างสารลักษณะคล้ายแป้งออกมาแทรกอยู่ระหว่างผิวหนังอันเก่าและอันใหม่อีกด้วย

2.3 ไหมสุก (mature larva)

ในวัย 5 นั้นตัวหนอนมีความยาวมากที่สุดประมาณ 70 มิลลิเมตร และกินอาหารเป็นจำนวนมาก (Sakaguchi, 1978) เมื่อตัวหนอนเจริญเต็มที่ในระยะปลายของวัย 5 จะหยุดกินอาหาร ลำตัวจะมีลักษณะค่อนข้างโปร่งแสง และคลานหาสถานที่ที่เหมาะสมต่อการทำรัง ผู้เลี้ยงจะจับตัวหนอนใส่ในในที่ที่จะให้สร้างใย ช่วงเวลาจากระยะพักออกจากไข่จนถึงระยะไหมสุกนี้ใช้เวลา 20-25 วัน เมื่อได้ที่เหมาะสมแล้วตัวหนอนจะเริ่มทำรัง โดยในตอนแรกโปรตีนเส้นไหมที่พันออกมาทำรังจะเป็นตัวยึดอยู่กับสิ่งต่าง ๆ และในตอนนี้ตัวหนอนจะทำการถ่ายมูลครั้งสุดท้ายโดยไม่เปรอะเปื้อนรัง ส่วนนอกของมันเลหลังจากนั้นตัวหนอนก็จะเริ่มทำรังส่วนในซึ่งถือว่าเป็นรังแท้ ตัวหนอน จะทำรังเสร็จภายใน 2-3 วัน หลังจากนั้นจะหยุดชักใย แล้วตัวหนอนจะลอกคราบเป็นดักแด้ (larva-pupal ecdysis) อยู่ภายในรัง การลอกคราบใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง เรียกว่า pharate pupa อันเป็นการสิ้นสุดสภาพของการเป็นตัวหนอน

3. ระยะที่เป็นดักแด้(pupa)

หลังจากที่ตัวหนอนลอกคราบกลายเป็นดักแด้อยู่ภายในรังแล้ว ดักแด้จะนอนอยู่เฉยๆหลังจากลอกคราบใหม่ๆ cuticle ของดักแด้มีลักษณะอ่อนนุ่ม สีเหลืองอ่อน หลังจากนั้น 2-3 ชั่วโมง cuticle จะกลายเป็นสีน้ำตาลมีลักษณะแข็ง ดักแด้เพศผู้และเพศเมียสามารถแยกจากกันได้โดยง่ายโดยลักษณะทางกายวิภาค ลักษณะของดักแด้แตกต่างจากตัวหนอน และตัวเต็มวัยมีการสลายเนื้อเยื่ออวัยวะของระยะตัวหนอน และมีการสร้างเนื้อเยื่อของอวัยวะใหม่อย่างรวดเร็ว หลังจากเป็นดักแด้ได้ประมาณ 8 วัน จะกลายเป็นผีเสื้อตัวใหม่ ขบวนการลอกคราบจากดักแด้เป็นผีเสื้อตัวใหม่ (pupal-adult ecdysis) จนเสร็จสิ้นมักเป็นเวลาเช้าของวันใหม่ (Sakaguchi, 1978)

4. ระยะที่เป็นผีเสื้อตัวใหม่ (moth)

เมื่อดักแด้ลอกคราบกลายเป็นผีเสื้อตัวใหม่อยู่ภายในรังแล้ว ผีเสื้อจะพ่นน้ำลายซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างเพื่อละลายรังไหมแล้วคืบตัวตัวเองออกสู่ภายนอก หลังจากที่ได้ออกมาจากรังแล้วจะพักอยู่ครู่หนึ่งจนตัวผีเสื้อแห้ง ปีกจะกางพร้อมที่จะทำการผสมพันธุ์และวางไข่ต่อไป หลังจากเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นผีเสื้อตัวใหม่ออกสู่ภายนอกแล้ว ประมาณ 7-8 วัน ผีเสื้อเหล่านี้จะตาย

มหากายวิภาคศาสตร์ของหนอนไหม (Gross anatomy of silkworm)

หนอนไหมจัดอยู่ใน phylum arthropoda, class hexapoda หรือ insecta, order lepidoptera มีลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนหัว (head), ส่วนอก (thorax) และส่วนท้อง (abdomen) ลำตัวมีลักษณะเป็นปล้องตั้งแต่ส่วนหัวถึงส่วนท้องมี 20 ปล้อง มีปีก 1-2 คู่ หรืออาจไม่มีปีกก็ได้

order lepidoptera มีแมลงที่รู้จักกันดีคือ ตัวชีปะขาว (moth) และผีเสื้อ (butterflies) รวมทั้งผีเสื้อหนอนไหม (silkworm moth) ด้วย ตัวหนอนไหมจัดอยู่ใน family bombycidae มีลักษณะพิเศษประจำคือ ตัวหนอน (larva) จะพ่นเส้นใยเพื่อใช้ในการทำรังห่อหุ้มตัวมันเอง แล้วลอกคราบกลายเป็นดักแด้ (pupa) อยู่ภายในรังนั้น (กรมวิชาการเกษตร, 2523a)

Krishnaswami (1973) ได้กล่าวถึงลักษณะภายนอกของหนอนไหมไว้ดังนี้

ตัวหนอน (larva) : ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วนคือ ส่วนหัว, ส่วนอก และส่วนท้อง ลำตัวมีลักษณะเป็นปล้อง ส่วนหัวมี 6 ปล้อง ส่วนอกมี 3 ปล้องและส่วนท้องมี 11 ปล้อง ปล้องส่วนหัวเชื่อมเข้าด้วยกันกับ cranium ปล้องที่ 2,4,5,6 มีระยางค์ซึ่งถูกดัดแปลงเป็นหนวด (antennae), ขากรรไกรล่าง (mandible), ขากรรไกรบน (maxillae), ริมฝีปาก (labium) ตามลำดับ

ส่วนหัวของด้วหนอนมีปุ่มนูนเรียก ocelli 6 คู่ อยู่ด้านหลังและเหนือคอฐานของหนวด (antennae) เล็กน้อย หนวดประกอบด้วยปล้องสั้นๆ 3 ปล้อง (Sakaguchi, 1978) ทำหน้าที่เป็นอวัยวะรับความรู้สึก (sensory organ) ส่วนที่เรียกว่า labium อยู่ ventral สุด มี mentum ขนาดใหญ่ ซึ่งมี chitin อยู่เล็กน้อย prementum ประกอบด้วย chitin และเป็นสีดำ ที่ส่วนปลายของ prementum มีส่วนยื่นออกไปตรงกลาง เรียกว่า ท่อคายเส้นไหม (spinneret) ซึ่งเป็นบริเวณที่โปรตีนเส้นไหม ซึ่งถูกขับออกมาจากต่อมสร้างเส้นไหม (silk gland) ผ่านออกมาและจะถูกทำให้เป็นเส้นใยไหม (thread) คอไป

ส่วนอกประกอบด้วย 3 ปล้อง เรียกว่า prothorax, mesothorax และ metathorax แต่ละปล้องมีขาแท้ (true legs) อยู่ปล้องละ 1 คู่ ดังนั้นขาส่วนอกมีขาแท้อยู่ 3 คู่ ขามีลักษณะเป็นรูปกระสวยแบ่งออกเป็น 3 ข้อ ส่วนปลายของขาแท้มี claws ลักษณะแหลมใช้สำหรับจับใบหม่อนในขณะกินอาหาร หนอนไหมทั้งหมดจะมีเครื่องหมายอยู่บนลำตัวทางด้าน dorsal ของ mesothorax เรียกว่า eye spot

ส่วนท้องประกอบด้วย 11 ปล้องแต่แยกจากกันได้ชัดเจน 9 ปล้องเนื่องจาก 3 ปล้องสุดท้ายเชื่อมเข้าด้วยกันเกิดเป็นปล้องที่ 9, anal plate, และขาส่วนหลัง (caudal legs) ส่วนปลายของขามีลักษณะคล้ายถ้วย ตามขอบด้านในมีลักษณะคล้ายตะขอ จัดเรียงตัวในลักษณะครึ่งวงกลม มีประโยชน์ในการเกาะยึดกับพื้น (กรมวิชาการเกษตร, 2523) ทางด้าน dorsal ของปล้องที่ 8 ด้วหนอนจะมีขาส่วนหาง (caudal legs) ปล้องส่วนท้องมีเครื่องหมายแสดงเพศ ซึ่งเจริญเห็นได้ชัดเจนในวัย 4 และวัย 5 (4th and 5th instars) ในปล้องที่ 8 และ 9 ทางด้าน ventral ในเพศเมียเครื่องหมายแสดงเพศนั้นเป็นจุดขาวคล้ายสีน้ำมัน ในปล้องที่ 8 และ 9 ปล้องละคู่ จุดสีขาว 1 คู่อยู่ปล้องที่ 8 เรียกว่า Ishiwata's fore glands และอีก 1 คู่ บริเวณปล้องที่ 9 เรียกว่า Ishiwata's hind glands ในเพศผู้มีจุดขาวคล้ายสีน้ำมันมีขนาดเล็กเรียกว่า Herold's gland พบที่ตรงกลางทางด้าน ventral ระหว่างปล้องที่ 8 และ 9

มีรูหายใจ (spiracles) 9 คู่ อยู่ทางด้าน lateral ในแต่ละข้างของลำตัว มีที่ปล้องส่วนอก ปล้องแรกและ 8 ปล้องแรกในส่วนท้อง ซึ่งเป็นรูสำหรับการหายใจ

ผิวหนังของด้วหนอนประกอบด้วยองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนเรียกว่า chitin และถูกคลุมด้วยชั้นไขมันบางๆ ทั้งหมดรวมอยู่ในชั้นที่เรียกว่า cuticle จะพบปุ่ม (nodules) ใต้ตลอดผิวลำตัวของด้วหนอน การกระจายของ nodules แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของหนอนไหม มีจำนวนน้อยในสายพันธุ์ที่มีผิวลำตัวเป็นมันซึ่งได้แก่หนอนไหมพันธุ์จีนที่ฟักออกจากไข่ปีละ 2 ครั้งและปีละหลายครั้ง nodules พบเป็นจำนวนมากตามบริเวณ eye spot ซึ่ง eye spot ในหนอนไหมนี้เกิดจาก skin pigment

ชั้น hypodermis อยู่ถัดจากชั้น cuticle ลงไป ประกอบด้วยเซลล์ซึ่งมีค่อมเล็ก ๆ ประกอบด้วยกรดยูริก และ pterin สารทั้งสองนี้จะทำให้เกิดลักษณะคล้ายกับผิวหนังแตกซึ่งมีประโยชน์ในการลอกคราบของหนอนไหม ในหนอนไหมพวกที่มีผิวหนังเป็นมันจะมีค่อมเหล่านี้ อยู่เป็นจำนวนมากค่อมเหล่านี้จะสลายไปเมื่อถึงระยะไหมสุก (matured larva) สาร chitin ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผิวหนังนั้นพบว่า มีการกระจายอยู่ในผิวหนังทุกส่วนของหนอนไหม (กรมวิชาการเกษตร, 2523a)

ดักแด้ (pupa) : ระยะดักแด้โดยทั่วไปเป็นระยะพักไม่กินอาหารและมองดูสงบนิ่งอยู่ภายในแต่ความจริงไม่เป็นเช่นนั้น เพราะระยะดักแด้เป็นช่วงเวลาในการเจริญเปลี่ยนรูปร่างอยู่ในที่จำกัด ในช่วงเวลานี้ biological activity ของร่างกายหนอนไหมและอวัยวะภายในมีการเจริญและเปลี่ยนรูปร่างสมบูรณ์ จนในที่สุดได้รูปร่างใหม่เป็นตัวเต็มวัยคือ ผีเสื้อตัวไหม ไหมสุกจะผ่านระยะก่อนเป็นดักแด้ (pre-pupa stage) ระยะนี้อวัยวะของตัวหนอนเริ่มสลาย และติดตามมาด้วยการสร้างอวัยวะของดักแด้ ในระยะ pupa stage หลังจากผ่านระยะ pupa stage ดักแด้จะมีสีขาวและอ่อนนุ่ม ค่อมกลายเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลไหม้ และผิวหนังแข็งขึ้น

ผีเสื้อตัวไหม (moth, imago) : หนอนไหมตัวเต็มวัยซึ่งเปลี่ยนแปลงจากดักแด้ไม่สามารถบินได้ เป็นผลมาจากการถูกนำมาเลี้ยงในบ้าน เป็นเวลามากกว่า 4,000 ปีมาแล้ว มันไม่กินอาหารตลอดช่วงชีวิตที่เป็นผีเสื้อตัวไหมซึ่งมีระยะเวลาอันสั้น ลำตัวของผีเสื้อตัวไหมคล้ายกับระยะตัวหนอนคือประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วนได้แก่ส่วนหัว ส่วนอกและส่วนท้อง ลักษณะที่สำคัญอื่น ๆ เหมือนกับตัวชีปะขาวและผีเสื้อทั่ว ๆ ไป

ต่อมสร้างเส้นไหม (Silk gland)

ต่อมสร้างเส้นไหม (ภาพที่ 1 และ 2) เป็นอวัยวะที่ใหญ่เป็นอันดับ 2 ของอวัยวะในร่างกายหนอนไหม (Sakaguchi, 1978) มีจำนวน 1 คู่ อยู่ในตำแหน่ง ventro-lateral ต่อท้องทางเดินอาหารส่วนกลาง ต่อมสร้างเส้นไหมแต่ละข้างแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ต่อมสร้างเส้นไหมส่วนหน้า (anterior part) ต่อมสร้างเส้นไหมส่วนกลาง (middle part) และต่อมสร้างเส้นไหมส่วนท้าย (posterior part) ท่อจากต่อมสร้างเส้นไหมทั้งคู่มารวมกันเป็นท่อเดียวทางด้าน anterior แล้วเปิดเข้าสู่ท่อคายเส้นไหม (spinneret) ส่วนปลายทางด้าน posterior ของต่อมสร้างเส้นไหมเป็นปลายตัน

ต่อมสร้างเส้นไหมมีลักษณะเป็น cylindrical และ tubular ผนังท่อนด้วย epithelium เซลล์ของต่อมสร้างเส้นไหมสร้างจาก polypoid cells จำนวนมาก มีการแตกแขนงของนิวเคลียสซึ่งภายในเต็มไปด้วย nucleoli เป็นจำนวนมาก การเจริญของนิวเคลียสที่แตกแขนงนี้จะควบคู่กับ

การเจริญเติบโตของตัวหนอนและมีขนาดที่เด่นชัดในวัย 4 และ 5 นอกจากนี้มีท่อหายใจแตกแขนงกระจายตามแนวยาวของคอมสร้างเส้นไหมส่วนกลางและส่วนท้าย (Akai, 1983) โดยปกติในระยะแรกหนอนไหมมีการเจริญแบ่งเซลล์แบบ mitosis และจะหยุดการเจริญแบบนี้ในช่วงท้ายของระยะ embryo แต่ nucleoli ของคอมสร้างเส้นไหมจะมีการเจริญต่อไปตลอดชั่วอายุขัยด้วยวิธี endomitosis แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ (cell division) ในสายพันธุ์ *Bombyx mori* มีการเจริญของคอมสร้างเส้นไหมส่วนหน้า ส่วนกลาง และส่วนท้าย ตามวิธีดังกล่าวเป็นจำนวน 13, 19 และ 18 รอบตามลำดับ (Henderson, 1991)

Filippi's glands หรือ Lyonnet's glands เป็นคอมอีกคู่หนึ่งที่อยู่บริเวณรอยต่อระหว่างคอมสร้างเส้นไหมส่วนหน้าทั้งสองข้าง ทำหน้าที่หลั่งสารเหลวที่มีลักษณะเหนียวการทำงานที่แท้จริงของคอมนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด

ผนังของคอมสร้างเส้นไหมมี 3 ชั้นคือ ชั้น tunica propria อยู่บริเวณนอกสุดถัดมาเป็นชั้น gland cells ชั้นในสุดคือ tunica intima เป็นชั้นที่บุ lumen ของคอมและ tunica intima นี้จะสร้าง chitin หนาคลุมคอมสร้างเส้นไหมทั้งสามส่วน สำหรับคอมสร้างเส้นไหมส่วนหน้าจะมีการสร้างไหมในแต่ละครั้งของการลอกคราบ

คอมสร้างเส้นไหมแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนหน้า ส่วนกลาง ส่วนท้าย

1. คอมสร้างเส้นไหมส่วนท้าย (posterior part)

คอมส่วนนี้เป็นส่วนที่ต่อจากคอมสร้างเส้นไหมส่วนกลาง มีลักษณะเป็นท่อที่ขดไปมา (Akai, 1983) จากการศึกษาของ Sasaki และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาคอมสร้างเส้นไหมส่วนท้ายของ *Bombyx mori* พบว่า เซลล์ของคอมสร้างเส้นไหมส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่และสามารถมองเห็นได้ชัด Tamura และคณะ (1992) และ Akai (1983) ได้ทำการศึกษาทาง ultrastructure ของคอมสร้างเส้นไหมส่วนท้ายในหนอนไหมพันธุ์ *Antheraea yamamai* และ non-mulberry silkworm ได้อธิบายว่า เซลล์ของคอมส่วนนี้มีขนาดใหญ่และหนา มีการเจริญอย่างรวดเร็วในวัยสุดท้าย มีหน้าที่สังเคราะห์และเก็บโปรตีนเส้นไหมที่เรียกว่า fibroin ไว้ เซลล์มีนิวเคลียสที่มีลักษณะแตกแขนงมี nucleoli มีองค์ประกอบภายในเซลล์เช่น Golgi complexes และ rough endoplasmic reticulum จำนวนมาก มีเส้นใย fibroin อยู่ใน Golgi complexes ในบริเวณใกล้ lumen ของคอมมี microvilli และ granules ที่ได้จากการคัดหลั่งเป็นจำนวนมาก และมีโปรตีนเส้นไหม fibroin รวมตัวกันอยู่ใน lumen และจากการศึกษาของ Akai (1983) ซึ่งศึกษาในหนอนไหม *Bombyx mori* พบว่าระหว่างวันที่ 3 และ 4 ของวัย 5 nucleoli จะเจริญอย่างรวดเร็ว มีการสังเคราะห์ RNA ส่วนการสังเคราะห์ DNA จะเป็นไปอย่างคั่งเนื่องตั้งแต่วันที่ 4 และสูงสุดในตอนต้นของวัย 5 จากนั้นจะค่อยๆ ลดจำนวนลงทีละน้อยจนกระทั่งวันที่ 6 ของวัย 5 ไม่

สามารถตรวจพบจำนวนของ DNA เลย และนอกจากนี้ยังพบ organelle อื่นๆอีกอยู่ภายใน cytoplasm ได้แก่ free ribosome , Golgi complex , fibroin globules , mitochondria , microvilli, bundles of microfilaments และ microtubules ระยะครึ่งแรกของวัย 5 จะมี rough endoplasmic reticulum เจริญอย่างรวดเร็ว พร้อมทั้งมีการเพิ่มจำนวนของ free ribosome แสดงให้เห็นว่า มีการสังเคราะห์โปรตีนเส้นไหมเป็นจำนวนมากในคอมสร้างเส้นไหมส่วนนี้

Golgi complexes ประกอบด้วย Golgi vacuole จำนวนมารวมกันอยู่เป็นกลุ่มในบริเวณที่มี rough endoplasmic reticulum vacuoles เหล่านี้ถูกขับจาก rough endoplasmic reticulum ด้วยวิธี budding ในระยะแรกๆ ของหนอนไหมไม่พบสิ่งใดอยู่ภายใน Golgi vacuole แต่เมื่อหนอนไหมโตขึ้นจะพบว่า มีเส้นใย fibroin อยู่ภายใน Golgi vacuole นี้ และมีการเพิ่มปริมาณตามการเจริญเติบโตของหนอนไหม

fibroin fiber จะสามารถมองเห็นได้ในกำลังขยายสูงๆมีลักษณะขดงอและหนาประมาณ $130 \text{ \AA}$ ต่อมารวมตัวเป็น fibroin globule อยู่บริเวณ primary silk layer ซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ระหว่าง cell membrane กับ extracellular membrane fibroin globule จะเคลื่อนตัวไปยังด้านบนของ cytoplasm และผ่านเข้าไปใน lumen ของคอมสร้างเส้นไหม โดยผ่านเยื่อหุ้มที่หุ้มอย่างไม่ต่อเนื่อง เพราะมีช่องว่างเป็นแห่งๆ จากการศึกษาของ Akai (1983) ทาง scanning electron microscope และ transmission electron microscope พบว่า เยื่อหุ้มดังกล่าวประกอบด้วยเส้นใยบางๆซึ่งเกิดจากการเสื่อมสภาพของ cuticle intima ที่เกิดขึ้นในแต่ละครั้งของการลอกคราบ เมื่อ fibroin globule ผ่านเยื่อหุ้มนี้ไปจะให้สารคัดหลั่งที่มีลักษณะเป็น spherical masses แล้วรวมตัวกันเป็น columnar fibroin ในวัย 4 มี columnar fibroin ประมาณ 200 ก้อนแต่ละก้อนมีขนาด $1 \text{ }\mu\text{m}$ แต่จะลดขนาดลงเมื่อถูกส่งเข้าไปใน lumen และเคลื่อนไปสู่คอมส่วนกลางเนื่องจากบริเวณคอมสร้างเส้นไหมส่วนกลางมีการดูดน้ำกลับ (dehydration) และพบว่ามี microtubule ขนาดใหญ่ซึ่งมีอยู่อย่างกระจายใน cytoplasm เชื่อว่าทำหน้าที่เป็นตัวช่วยส่ง fibroin globule หลังจากนั้น fibroin globule จะค่อยๆเคลื่อนไปเก็บไว้ในคอมสร้างเส้นไหมส่วนกลางในรูปของ liquid fibroin และจากการศึกษาของ Sehna และคณะ (1982) ศึกษาถึงโครงสร้างและหน้าที่ทาง ultrastructure ของคอมสร้างเส้นไหมส่วนท้ายของ Bombyx mori พบว่า บริเวณ apex ของเซลล์ยังประกอบด้วย microvilli ด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่า มีแขนงของท่อหายใจ (tracheal branches) จำนวนมากกระจายไปสู่คอมสร้างเส้นไหมส่วนท้าย ซึ่งสามารถตรวจพบได้บริเวณ base ของเซลล์

2. คอมสร้างเส้นไหมส่วนกลาง (middle part)

จากการศึกษาของ Akai (1983) อธิบายว่าเป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในจำนวนคอมสร้างเส้นไหมทั้งสามส่วน คอมส่วนนี้ประกอบด้วย 3 ส่วนย่อยคือ

- ส่วนหน้า (anterior region)
- ส่วนกลาง (middle region)
 - ; proximal part
 - ; distal part
- ส่วนหลัง (posterior region)

ในส่วนหน้าจะมีลักษณะแคบแล้วกว้างขึ้นทันทีในส่วนกลางซึ่งเป็นส่วนกว้างที่สุดและในส่วนท้ายมีลักษณะแคบลงและโค้งอยู่ระหว่าง dermo-visceral muscles และ tracheae ลักษณะทาง ultrastructure คล้ายกันกับคอมสร้างเส้นไหมส่วนหลัง แต่เซลล์มีขนาดเล็กกว่าและต่างกันที่สารคัดหลั่งด้วย ในคอมส่วนกลางนี้จะสังเคราะห์โปรตีนเส้นไหมที่เรียกว่า sericin การสังเคราะห์คล้ายกับการสังเคราะห์ fibroin ในคอมส่วนท้าย ในวัยสุดท้ายของหนอนไหมพบนิวเคลียสแตกแขนง nuclei เพิ่มขึ้นมากขึ้น rough endoplasmic reticulum มีปริมาณสูง มี Golgi complex และ sericin globules ซึ่งทั้งหมดจะกระจายอยู่ใน cytoplasm เช่นเดียวกัน sericin globules จะเป็นรูปร่างรีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200-300 nm ภายในมี sericin fiber ซึ่งมีความหนา 100-120 Å sericin เหล่านี้จะผ่านเข้าไปยังชั้นของเส้นไหม โดยผ่านทางผนังเซลล์ที่มีช่องไปสู่ lumen กลายเป็น liquid sericin หุ้ม fibroin อีกชั้นหนึ่ง

Shibukawa (1959) พบว่า sericin แบ่งออกเป็นสามชั้นคือ

1. inner layer sericin สร้างจาก posterior region ของคอมส่วนกลางประกอบด้วย arginine, lipid และ polysaccharides
2. middle layer sericin สร้างจาก distal part ของ middle region ของคอมส่วนกลางประกอบด้วย xanthoprotein
3. outer layer sericin สร้างจาก proximal part ของ middle region และส่วน anterior region ของคอมส่วนกลางมองเห็นได้ไม่ชัดเจน พบว่า ประกอบด้วย lipid และ polysaccharides sericin ทั้งสามชั้นจะหุ้ม fibroin ไว้อีกทีหนึ่ง เมื่อถึงวัยสุดท้ายโปรตีนเส้นไหมจะถูกปล่อยส่งไปทางคอมส่วนหน้าเพื่อขับออกเป็นเส้นไหม

3. ต่อมสร้างเส้นไหมส่วนหน้า (anterior part)

SrungBoonmee และคณะ (1991) พบว่า ต่อมสร้างเส้นไหมส่วนหน้าเป็นต่อมชนิด simple tubular gland และเซลล์ของต่อมมีลักษณะเป็นเซลล์ทรงสูง และได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Akai (1983) และ Tazima (1978) คือต่อมสร้างเส้นไหมส่วนหน้าเป็นท่อตรงมีลักษณะ thick cuticular intima ซึ่งเป็นเซลล์หนา 1 ชั้นอยู่ล้อมรอบ lumen ของต่อม (SrungBoonmee et al., 1992) ท่อของต่อมเปิดออกทางด้านหน้า ซึ่งแต่ละข้างจะมารวมกันเป็นท่อเดียวเปิดสู่ท่อคายเส้นไหม (spinneret) ทางด้านหลังติดต่อกับต่อมสร้างเส้นไหมส่วนกลาง ภายใน lumen ประกอบด้วยสารที่มีลักษณะคล้าย colloid ใน thyroid follicle ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีเส้นประสาทจาก ganglion ไปสู่ต่อมสร้างเส้นไหมด้วย (SrungBoonmee et al., 1991)

Akai (1983) และ Tazima (1978) ระบุว่า ต่อมส่วนนี้ไม่มีหน้าที่ในการสร้างโปรตีนเส้นไหมเป็นเพียงทางผ่านของโปรตีนที่จะกลายเป็นเส้นไหมต่อไปแต่จากการศึกษาของ SrungBoonmee และคณะ (1992) ได้ศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมสร้างเส้นไหมส่วนหน้า จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า มี ribosome, rough endoplasmic reticulum และ mitochondria อยู่เป็นจำนวนมาก จึงเชื่อว่าต่อมสร้างเส้นไหมส่วนหน้าจะมีหน้าที่ในการสร้างเส้นไหมด้วย

กรมวิชาการเกษตร (2523a) อ้างถึง Locus และคณะ 1958 และจากการศึกษาของ Sprague (1974) พบว่าโปรตีนเส้นไหมมี 2 ชนิดคือ

1. fibroin เป็น fibrous protein สร้างขึ้นจากเส้นใย filaments ประกอบด้วย polypeptide chain ที่มีขนาดใหญ่ 2 สาย
2. sericin เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย polypeptide chain ขนาดใหญ่ 3 สายเช่นเดียวกันจะอยู่รอบนอก fibroin

ในวัยสุดท้ายของหนอนไหม โปรตีนทั้งสองจะรวมกันอยู่ในต่อมสร้างเส้นไหมส่วนกลาง และพบว่าโปรตีนเส้นไหมนี้ได้จาก 60% ของไนโตรเจนที่อยู่ในใบหม่อนซึ่งเป็นอาหารของหนอนไหม แต่โปรตีนเส้นไหมถือได้ว่ามิใช่โปรตีนที่มาจากใบหม่อนโดยตรง แต่เป็นโปรตีนที่มีการสังเคราะห์โดยระบบในร่างกายของหนอนไหมเอง ซึ่งการสังเคราะห์โปรตีนเส้นไหมเป็นผลจาก juvenile hormone ที่หลังจากต่อมไคสมองของหนอนไหมด้วยขนาดสูงสุดที่ทำให้หยุดการเจริญของต่อมได้คือปริมาณ 30 μg และขนาดต่ำสุดที่ยังทำให้มีการเพิ่มขนาดและน้ำหนักของต่อมคือ 0.03 μg (Akai, 1983) มีการศึกษาในหนอนไหมพันธุ์ต่างประเทศพบว่า หนอนไหม 1 ตัวผลิตโปรตีนเส้นไหมได้ประมาณ 0.6 g ประกอบด้วย fibroin 80% และ 20 % เป็น sericin ได้ความยาวของเส้นใยประมาณ 1000-1500 เมตร (Tazima, 1978)

กรมวิชาการเกษตร, 2523 อ้างถึง Locus และคณะ (1958) ว่าได้จำแนกส่วนประกอบของกรดอะมิโนโปรตีนเส้นไหมที่ได้จากรังไหมไว้ดังตารางที่ 1

คอมสร้างเส้นไหมจะส่งสารที่อยู่ในรูปของเหลวไปยังท่อคายเส้นไหม (spinneret) จากนั้นหนอนไหมก็จะเริ่มคายเส้นไหมออกเพื่อทำรังต่อไป ซึ่งในระยะนี้ของเหลวที่ถูกส่งออกมาจากคอมสร้างเส้นไหมจะแข็งตัวกลายเป็นเส้นใยและสร้างเป็นรูปร่างในที่สุด จากการที่ตัวหนอนสร้างรังขึ้นมานี้ ทางนิเวศน์วิทยาถือว่าเป็นการป้องกันตนในระยะที่เป็นดักแด้ซึ่งเคลื่อนไหวไปมาไม่ได้

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนเส้นไหมที่ได้จากรังไหม

กรดอะมิโน	fibroin	sericin
glycine	44.5	14.7
alanine	29.3	4.3
serine	12.1	37.3
tyrosine	5.2	2.5
valine	2.2	3.5
aspartic acid	1.3	14.8
glutamic acid	1.0	3.4
treoline	0.91	8.6
isoleucine	0.66	0.76
leucine	0.53	1.4
phenylalanine	0.63	0.38
proline	0.36	0.76
cystine	-	0.51
lysine	0.32	2.4
histidine	0.41	2.1
arginine	0.47	3.5

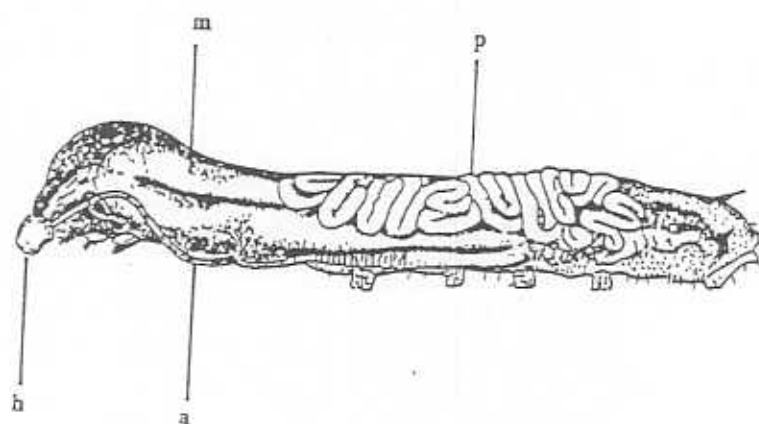
ที่มา : Tazima, 1978 The silkworm an important laboratory tool. Tokyo : Kodansha

ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งต่อมสร้างส่นใหม่ภายในตัวหนอนไหม

a = anterior

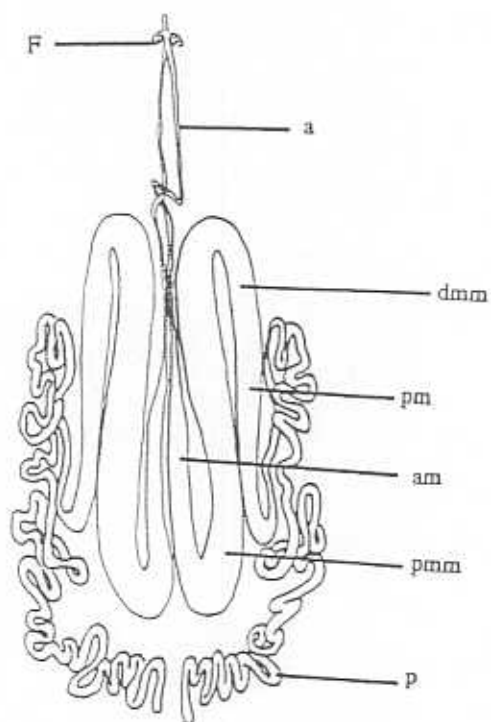
m = middle

p = posterior



ภาพที่ 2 แสดงส่วนต่างๆ ของต่อมสร้างส่นไทม

a	=	anterior
am	=	anterior piece of middle division
dmm	=	distal part of middle piece of middle division
F	=	Filippi's gland
p	=	posterior
pm	=	posteripr piece of middle division
pmm	=	proximal part of middle piece of middle division



การดองตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Tissue Fixation)

การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนแรกที่สำคัญ คือ การดองตัวอย่าง (Fixation) โดยใช้ยาดองตัวอย่าง (Fixative) วัตถุประสงค์ของการดองตัวอย่างคือ

1. เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ให้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสภาพที่มีชีวิตอยู่
2. ป้องกันการเน่าเสียหรือสลายตัวของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ
3. ช่วยให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อมีความทนทานต่อกระบวนการการเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนต่อไป

จากการศึกษาของ Leong และคณะ (1984) ได้ทดลองใช้คลื่น microwave ในขั้นตอนของการ fixation เนื้อเยื่อของหนู กลุ่มหนึ่งนำเนื้อเยื่อแช่ในน้ำเกลือธรรมดา (0.9% normal saline) นำเข้า microwave ให้อุณหภูมิ 58°C อีกกลุ่มหนึ่งนำเนื้อเยื่อแช่ในน้ำยา 10% formalin ซึ่งเป็นน้ำยาที่ใช้อยู่ทั่วไป ศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาพบว่า ผลของเนื้อเยื่อที่ได้ทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน เนื้อเยื่อที่ได้จาก microwave ยังมีการหดตัวของเนื้อเยื่อน้อยกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำยา formalin อีกด้วย การใช้เวลาสำหรับคลื่น microwave ในขั้นตอนการ fixation จะไม่มากกว่า 150 วินาที ขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อเยื่อแต่ละชนิด และการใช้ความร้อนในการ fixation นี้ไม่มีผลกระทบต่อการใช้ย้อมสีพิเศษแต่อย่างใด นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดลองใช้ความร้อนที่ได้จากคลื่น microwave ในขั้นตอนการ fixation เพื่อศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยนำเนื้อเยื่อแช่ลงในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde แล้วใช้คลื่น microwave เป็นเวลา 90 วินาที จะได้อุณหภูมิ 50°C พบว่า ลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคปรากฏผลอย่างชัดเจน ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับ การทดลองของ Login และ Dvorak (1985) ซึ่งได้ทดลองใช้คลื่น microwave ในขั้นตอนการ fixation เพื่อศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของยาดองตัวอย่าง

ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde)

ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นก๊าซที่ไม่มีสีติดไฟง่ายและมีกลิ่นรุนแรง มีขายในท้องตลาดใช้สำหรับ คองซันเนื้อในรูป saturated solution โดยละลายในน้ำให้เข้มข้นประมาณ 37-40% โดยน้ำหนัก เรียกว่า ฟอร์มาลิน (formalin) โดยปกติแล้วทางบริษัทผู้ผลิตจะเติมเมทริลอัลกอฮอล์ (methanol) ลงไปประมาณ 10-15 % เพื่อป้องกัน Polymerization 37-40 % ก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำนี้ในทางปฏิบัติถือว่าเป็น 100 % formalin (ฟอร์มาลินเข้มข้น) และเมื่อต้องการจะเตรียมเป็น 10 % formalin ก็ใช้ฟอร์มาลินเข้มข้น 1 ส่วนกับน้ำ 9 ส่วน แต่เนื่องจากว่าฟอร์มาลินสามารถจะถูกออกซิไดซ์ (oxidize) โดยออกซิเจนในอากาศได้เป็น formic acid ถ้า pH ต่ำกว่า 5.8 ดังนั้นฟอร์มาลินที่จะใช้คองตัวอย่างควรจะต้องเตรียมในรูปบัฟเฟอร์ (buffer) ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ sodium phosphate monobasic และ dibasic

ฟอร์มาลินเป็น noncoagulant fixative ดังนั้นจึงไม่เหมาะสำหรับคอง DNA และ RNA, คาร์โบไฮเดรต แต่เหมาะสำหรับการคองโปรตีนและ complex lipids กลไกในการคองขึ้นเนื้อของฟอร์มาลินเชื่อว่า ทำให้เกิด cross-link ของโปรตีน โดยการจับยึดกันด้วย form methylene linkage ระหว่าง polypeptide chain ของโปรตีน

น้ำยาคองตัวอย่างสูตรต่างๆก็ถูกคิดค้นนำมาใช้งานและหนึ่งในจำนวนนั้นก็คือ zinc formalin ซึ่งมีคุณสมบัติดีกว่า neutral buffered formalin ทั้งในด้านการรักษาโครงสร้างของเซลล์ (morphology) และคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของเซลล์ (antigen preservation)

น้ำยาคองตัวอย่างฟอร์มาลินได้แก่

- 10% Formalin solution
- Formalin saline solution
- Neutral buffered formalin
- Formalin with sodium acetate
- Formalin ammonium bromide solution
- Alcoholic formalin
- Zinc formalin

กรดพิคริก (Picric acid)

picric acid [$C_6H_2(NO_2)_3OH$] เป็น coagulative fixative เหมาะสำหรับโปรตีนและ glycogen ปกติจะใช้ในรูป saturated solution (ประมาณ 0.9- 1.2 % ในน้ำ หรือ 9 % ในอัลกอฮอล์) กรดพิคริกมีอัตราในการแทรกซึมช้ามากและทำให้เนื้อเยื่อหดตัว (shrinkage) ได้

มากถึง 50% ของปริมาตรเดิมได้เมื่อเตรียมตัวอย่างไปถึงขั้นตอนเข้าฝังใน paraffin block ดังนั้นในการนำมาใช้ในการคงตัวอย่างจึงมักจะเติม acetic acid ร่วมด้วย เพื่อให้การหดตัวของชิ้นเนื้อน้อยลงชิ้นเนื้อที่ผ่านการคงในกรดฟลิกจะมีสีเหลือง แต่ไม่จำเป็นต้องล้างออกเพราะว่า ในกระบวนการเตรียมตัวอย่างก็จะมีกระบวนการล้างสีออกโดยแอลกอฮอล์

น้ำยาคงตัวอย่างกรดฟลิกได้แก่

- Bouin's solution
- Bouin's fat fixative
- Rossman's fluid

แอลกอฮอล์ (Alcohol)

แอลกอฮอล์ไม่สามารถใช้เป็นน้ำยาคงสำหรับไขมัน เพราะสามารถละลายไขมันได้ ปกติแอลกอฮอล์เป็น coagulative fixative โดยเฉพาะ cytoplasm แต่ไม่ fix chromatin ดังนั้นจึงไม่เหมาะสำหรับใช้คงชิ้นเนื้อที่จะศึกษาทางด้าน nucleic acid

ethyl alcohol (C_2H_5OH) ทำให้ชิ้นเนื้อแข็งและหดตัวมาก ส่วน methyl alcohol (CH_3OH) เหมาะสำหรับเนื้อเยื่อที่มีเลือด หรือ blood smear น้ำยาคงตัวอย่างแอลกอฮอล์ได้แก่

- Carnoy's solution
- Methacarn's solution

Carnoy's solution

เป็นน้ำยาคงที่มีอัตราแทรกซึมเร็วมากและเหมาะสำหรับคง RNA, glycogen และ Nissl substance และยังเป็น dehydrant ในตัว ดังนั้นหลังจากการคงชิ้นเนื้อ สามารถผ่าน absolute alcohol, clear ใน xylene และ infiltrate ใน paraffin ค่อยไปได้เลย Carnoy's fluid ทำให้เกิดการหดตัวของชิ้นเนื้อมาก ดังนั้นจึงไม่ควรคงนานเกิน 3-4 ชั่วโมงแต่สามารถคงในอุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงได้ น้ำยาคองนี้ไม่เหมาะสำหรับคงเม็ดเลือดแดงเพราะ acetic acid ทำลายเม็ดเลือดแดง

Methacarn's solution

มีข้อดีมากกว่า Carnoy's fluid ตรงที่ชิ้นเนื้อมีความแข็งน้อยกว่า แต่ข้อสำคัญจะต้องไม่ล้างชิ้นเนื้อในน้ำหรือน้ำเกลือก่อนนำมาดอง เพราะจะทำให้ชิ้นเนื้อหดตัวมากจนผิดรูปร่าง ระยะเวลาในการดอง 2-3 ชั่วโมงแล้ว process ต่อใน methyl alcohol, methyl-benzoate, xylene และ paraffin

กรดอะซิติก (Acetic acid)

กรดอะซิติก (CH_3COOH) ในทางเนื้อเยื่อวิทยาและพยาธิวิทยา กรดอะซิติกเพียงอย่างเดียวนำมาใช้ในการดองน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย เนื่องจากทำให้เกิดการบวมของเซลล์ และเมื่อผ่านกระบวนการ dehydration จะทำให้ชิ้นเนื้อหดตัวลงมาก ดังนั้นจึงมักใช้ร่วมกับน้ำยาดองตัวอื่น กรดอะซิติกเป็น noncoagulant fixative ไม่ fix ไขมัน และไม่เหมาะสำหรับเนื้อเยื่อที่ต้องการจะศึกษาเม็ดเลือดแดง Golgi apparatus และ mitochondria