

ผลของสารสกัดจากสะเดาต่อระดับเอ็นไซม์ขจัดพิษของด้วงถั่ว

Callosobruchus maculatus F.



นางประพิศ วองเทียม

ศูนย์วิทยพัชร์พยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

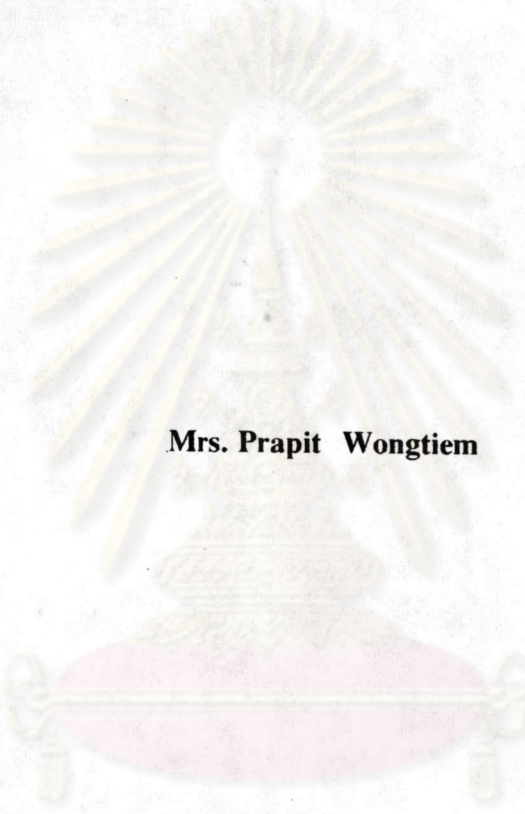
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-256-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17434890

**EFFECTS OF NEEM EXTRACT ON DETOXIFICATION ENZYMES LEVELS
IN SEED BEETLE *Callosobruchus maculatus* F.**



Mrs. Prapit Wongtiem

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-634-256-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดสะเดาต่อระดับเอ็นไซม์ขจัดพิษของด้วงถั่ว
Callosobruchus maculatus F.

โดย

นางประพิศ วองเทียม

ภาควิชา

ชีววิทยา

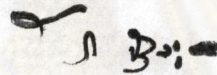
อาจารย์ที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ตั้งคณะสิงห์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

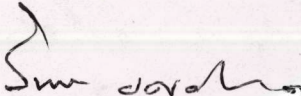
ดร. สุรพล วิเศษสรรค์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

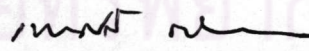


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ อุงสุวรรณ)

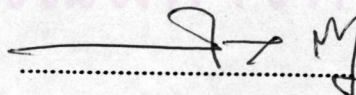
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



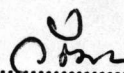
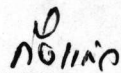
.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด)



.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญศรี ตั้งคณะสิงห์)



.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.สุรพล วิเศษสรรค์)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิ่งแก้ว เสริมวัฒนกิจ)



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ประพิศ วงเทียม : ผลของสารสกัดจากสะเดาต่อระดับเอนไซม์ขจัดพิษของด้วงถั่ว

Callosobruchus maculatus F. (EFFECTS OF NEEM EXTRACT ON DETOXIFICATION ENZYMES LEVELS IN SEED BEETLE Callosobruchus maculatus F.)

อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร. เพ็ญศรี ตั้งคณะสิงห์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. สุรพล วิเศษสรรค์,
118 หน้า ISBN 974-634-256-8

ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดสะเดาต่อระดับเอนไซม์ขจัดพิษของด้วงถั่ว Callosobruchus maculatus F. โดยการเลี้ยงด้วงถั่วด้วยถั่วเขียวคลุกสารสกัดสะเดา และถั่วเขียวคลุกสารสกัดสะเดาผสมกับ synergists ปริมาณ 10% ของสารสกัดสะเดา สาร synergists ที่ใช้มี 3 ชนิด คือ triphenyl phosphats (TPP), diethyl maleate (DEM) และ piperonyl butoxide (PB) ระดับความเข้มข้นของสารสกัดสะเดาที่ใช้มี 3 ระดับ 10 ppm, 30 ppm และ 50 ppm Azadirachtin หลังจากเลี้ยงจนกระทั่งด้วงถั่วผสมพันธุ์และออกลูกรุ่นที่ 1 (F1) จึงนำลูกที่โตเต็มวัย รุ่นที่ 1 มาสกัดและทำการวัดเอนไซม์ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ 3 ชนิด คือ esterase, glutathione S-transferase และ monooxygenase

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดสะเดาทำให้ระดับเอนไซม์ esterase และ monooxygenase ลดลงประมาณ 20-50% ตั้งแต่ความเข้มข้น 30 ppm ขึ้นไป และไม่มีผลทำให้เอนไซม์ glutathione S-transferase เปลี่ยนแปลง สำหรับผลการทดลองของสาร synergists ไม่มีผลต่อการฆ่าแมลงโดยตรง แต่จะมีผลต่อระดับเอนไซม์ก็ต่อเมื่อผสมกับสารสกัดจากสะเดา โดยสาร TPP จะไปเสริมการทำงานของสารสกัดสะเดา คือ ไปลดการทำงานของเอนไซม์ esterase ประมาณ 50% ที่ความเข้มข้น 30 ppm ขึ้นไป สาร DEM มีผลในการลดระดับเอนไซม์ glutathione S-transferase ประมาณ 50% ที่ความเข้มข้น 30 ppm ขึ้นไป สาร PB มีแนวโน้มลดการทำงานของเอนไซม์ monooxygenase ตั้งแต่ความเข้มข้น 10 ppm ขึ้นไป

จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า การใช้สารสกัดสะเดา จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ esterase และ monooxygenase ในกรณีที่ด้วงถั่วแสดงความต้านทานต่อสารสกัดสะเดา สาร TPP หรือ PB เป็นสารที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการเติมในสารสกัดสะเดาเพื่อเป็นการช่วยในกระบวนการทำลายพิษของด้วงถั่ว

ภาควิชา ภาควิชาชีววิทยา
สาขาวิชา สัตววิทยา
ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C627304 : MAJOR ZOOLOGY

KEY WORD: Callosobruchus maculatus F. /NEEM EXTRACT /DETOXIFICATION ENZYMES/ ESTERASE/GLUTATHIONE S-TRANSFERASE/MONOXYGENASE

PRAPIT WONGTIEM : EFFECT OF NEEM EXTRACT ON DETOXIFICATION ENZYMES LEVELS IN SEED BEETLE Callosobruchus maculatus F. THESIS ADVISOR: DR. PENSRI TANGKANASING, THESIS CO-ADVISOR : DR. SURAPHON VISETSON. 118 PP. ISBN 974-634-256-8

Effect of neem extracts on detoxification enzymes in the seed beetle Callosobruchus maculatus had been trialed using neem extracts with or without synergists. Three synergists; triphenyl phosphate (TPP), diethyl maleate (DEM) and piperonyl butoxide (PB) were mixed in the various concentrations of neem extracts to clarify the machanisms. All case of synergists studied, 10% of synergists were mixed to three levels of neem extracts (10 ppm, 30 ppm, 50 ppm Azadirachtin). Three major detoxification enzymes namely; esterases, glutathione S-transferase and monooxygenase were assayed. A series of mung bean in the bottle jars were mixed with various concentrations of neem extracts with or without synergists. Then the beetles were added into the bottles. The first generation of the beetles were assayed for activity of the three major detoxification enzymes.

The results showed that esterases and monooxygenase were inhibited ca. 20-50% at a minimum of 30 ppm Azadirachtin the extracts. The extracts were not likely to interfere the glutathione S-transferase. The synergists studies showed no response to insects if they were used alone. On the other hand, neem extracts of 30 ppm azadirachtin mixing with TPP showed reduction of esterase activity up to ca. 50%. Futhermore, DEM with neem extracts of 30 ppm azadirachtin inhibited glutathione S-transferase up to ca. 50%. In addition, PB with neem extracts, at 10 ppm and above, seem likely to reduce the monooxygenase activity.

Detoxification enzymes, esterase and monooxygenase seem to be responsible to detoxify neem extracts. The long trem use of neem extracts may create some degree of resistance in this beetle. The evidence of resistance may overcome by the addition of TPP or PB in the neem extracts to deplete their resistance machanisms in the insects.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ภาควิชาชีววิทยา.....

สาขาวิชา..... สัตววิทยา.....

ปีการศึกษา..... 2538.....

ลายมือชื่อนิสิต..... *San San*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *myat ohn*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *Sergin Kuter*.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญศรี ตั้งคณะสิงห์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียั้งตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สุรพล วิเศษสรรค์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม กองวัดภูมิพิษ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ความเข้าใจ ข้อแนะนำในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียั้งตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิงแก้ว วัฒนเสริมกิจ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ข้าราชการ และเจ้าหน้าที่ กองวัดภูมิพิษ และศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อช่วยเหลือในด้านสถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย นอกจากนี้วัสดุอุปกรณ์บางส่วนได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณ ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณทุก ๆ ท่าน ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ พี่น้องทุกคน และคุณอาคม วงเทียม ที่ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 บทสืบสวนเอกสาร.....	5
3 วิธีการทดลอง.....	30
4 ผลการทดลอง.....	41
5 วิจัยรณผลการทดลอง.....	63
6 สรุปลผลการทดลองและขอเสนอแนะ.....	69
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก.....	86
ภาคผนวก ก.....	87
ภาคผนวก ข.....	115
ประวัติผู้เขียน.....	118

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4-1	แสดงระดับเอ็นไซม์ esterase ในดวงแก้วที่เลี้ยงด้วย สารสกัดจากสะเดาเทียบกับกลุ่มควบคุม.....43
4-2	แสดงระดับเอ็นไซม์ glutathion-S-transferase ในดวง แก้วที่เลี้ยงด้วยสารสกัดจากสะเดาปลูกในเมล็ดถั่วเขียว.....44
4-3	แสดงระดับเอ็นไซม์ monooxygenase ในดวงแก้วที่ เลี้ยงด้วยสารสกัดจากสะเดาที่ปลูกในเมล็ดถั่ว.....45
4-4	แสดงระดับเอ็นไซม์ esterase ในดวงแก้วที่เลี้ยงด้วยสาร สกัดจากสะเดาผสมกับ triphenyl phosphate ปลูกเมล็ด ถั่วเขียว.....50
4-5	แสดงระดับเอ็นไซม์ glutathione S-transferase ในดวงแก้ว ที่เลี้ยงด้วยเมล็ดถั่วเขียวปลูกสารสกัดจากสะเดา ผสมกับ triphenyl phosphate.....51
4-6	แสดงระดับเอ็นไซม์ monooxygenase ในดวงแก้วที่เลี้ยงด้วย ถั่วเขียวปลูกด้วยสารสกัดสะเดาความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ triphenyl phosphate.....52
4-7	แสดงระดับเอ็นไซม์ esterase ในดวงแก้วที่เลี้ยงด้วยถั่วเขียว ปลูกสารสกัดสะเดาผสมกับ diethyl maleate.....55
4-8	แสดงระดับเอ็นไซม์ glutathione-S-transferase ในดวง แก้วที่เลี้ยงด้วยถั่วเขียวที่ปลูกสารสกัดสะเดาผสมกับ diethyl maleate.....56
4-9	แสดงระดับเอ็นไซม์ monooxygenase ในดวงแก้วที่เลี้ยงด้วย ถั่วเขียวปลูกด้วยสารสกัดสะเดาผสมกับ diethyl maleate.....57
4-10	แสดงระดับเอ็นไซม์ esterase ในดวงแก้วที่เลี้ยงด้วยถั่วเขียว ปลูกสารสกัดสะเดาผสมกับ piperonyl butoxide.....60

ตารางที่	หน้า
4-11	แสดงระดับเอนไซม์ glutathion-S-transferase ในคิ่ง ถั่วที่เลี้ยงด้วยถั่วเขียวคลุกสารสกัดจากสะเดาผสมกับ piperonyl butoxide.....61
4-12	แสดงระดับเอนไซม์ monooxygenase ในคิ่งถั่ว ที่เลี้ยงด้วยถั่วเขียวคลุกด้วยสารสกัดสะเดาผสมกับ piperonyl butoxide.....62
ก-1	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ esterase ของ neem extracts.....87
ก-2	Analysis of Variance And Duncan's Multiple Range Test87
ก-3	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ glutathione S-transferase ของ neem extracts.....89
ก-4	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ monooxygenase ของ neem extracts.....90
ก-5	Analysis of Variance And Duncan's Multiple Range Test.....90
ก-6	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ esteras ของ neem extracts+triphenyl phosphate.....92
ก-7	Analysis of Variance and Duncan's Multiple Range Test.....92
ก-8	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ glutathione S-transferase ของ neem extracts+triphenyl phosphate.....94
ก-9	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ monooxygenase ของ neem extracts + triphenyl phosphate.....95
ก-10	Analysis of Variance And Duncan's Multiple Range Test.....95
ก-11	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ esterase ของ neem extracts+diethyl maleate.....97

ตารางที่	หน้า
ก-13	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ glutathione S-transferase ของ neem extracts+diethyl maleate.....99
ก-14	Analysis of Variance And Duncan's Multiple Range Test.....99
ก-15	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ monooxygenase ของ neem extracts+diethyl maleate.....101
ก-16	Analysis of Variance And Duncan's Multiple Range Test.....101
ก-17	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ esterase ของ neem extracts+ piperonyl butoxide.....103
ก-18	Analysis of Variance and Duncan's Multiple Range Test.....103
ก-19	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ glutathione S-transferase ของ neem extracts+ piperonyl butoxide.....105
ก-20	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ monooxygenase ของ neem extracts+ piperonyl butoxide.....106
ก-21	Analysis of Variance And Duncan's Multiple Range Test.....106
ก-22	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ esterase ของ neem extracts, neem extracts+triphenyl phosphate , neem extracts+ diethyl maleate และ neem extracts+ piperonyl butoxide.....108
ก- 23	Analysis of Variance And Duncan's Multiple Range Test ปริมาณเอนไซม์ esterase ของ neem extracts, neem extracts + triphenyl phosphate , neem extracts + diethyl maleate และ neem extracts+ piperonyl butoxide.....109
ก-24	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ transferase ของ neem extracts , neem extracts+triphenyl phosphate , neem extracts + diethyl maleate และ neem extracts + piperonyl butoxide.....111

ตารางที่

หน้า

ก-25	Analysis of Variance ปริมาณเอนไซม์ monooxygenase ของ neem extracts, neem extracts + triphenyl phosphate , neem extracts + diethyl maleate และ neem extracts + piperonyl butoxide.....	112
ก-26	Analysis of Variance And Duncan's Multiple Range Test ของ neem extracts, neem extracts + triphenyl phosphate , neem extracts + diethyl maleate และ neem extracts + piperonyl butoxide.....	113

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของสารประกอบ limonoids ชนิดต่าง ๆ ที่พบในสะเดา.....	3
2	ลักษณะตัวเต็มวัยของด้วงถั่ว <i>Callosobruchus maculatus</i> F.	7
3	วงจรชีวิตของด้วงถั่ว <i>Callosobruchus maculatus</i> F.	8
4	ลักษณะการทำลายของด้วงถั่ว <i>Callosobruchus maculatus</i> F.	9
5	ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษภายในเซลล์.....	19
6	แสดงระบบการทำงานของเอนไซม์ microsomal mix function oxidase	21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

GST	glutathione S-transferase
TPP	triphenyl phosphate
DEM	diethyl maleate
PB	piperonyl butoxide
g	gram
l	litre
μ l	microlitre
mg	milligram
ml	millilitre
mM	millimolar
n moles	nanomoles
T	treatment

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย