SUT 1-104-48-24-05

รายงานการวิจัย

การควบคุมโดยชีววิธีแมลงวันผลไม้ด้วยพืช

Biological Control of Oriental Fruit Flies by Plants

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT 1-104-48-24-05

รายงานการวิจัย

การควบคุมโดยชีววิธีแมลงวันผลไม้ด้วยพืช

Biological Control of Oriental Fruit Flies by Plants

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์. ดร. กรกช อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ ธานี

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี ปีงบประมาณ 2548-2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2554

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาหาพืชที่เจริญแพร่หลายในพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และบริเวณใกล้เคียง เพื่อนำใช้ประโยชน์ในการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) แมลงวันทอง (Oreintal fruit fly *Bactrocera dorsalis* Handel) โดยเลือกเอาพืชที่ได้ตรวจหาความเป็นพิษเบื้องต้นแล้ว 3 ชนิดคือ สะเดา (*Azadidirachta indica* A Juss) น้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) และ แมงลักคา (*Hyptis suaveolens* L., Poit) ทั้งนี้ได้วิเคราะห์หาคุณสมบัติเบื้องต้นบางประการของพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบของพืชทั้งสาม และเมล็ดของแมงลักคา และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชชนิดเดียว และ สารผสมของสองสารสกัดที่สกัดด้วยสารทำละลายชนิดเดียวกันในการควบคุมแมลงวันทองระยะไข่ หนอน และ ตัวเต็มวัย การทดลองประกอบด้วย

1. วิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic compounds และ antioxidant property ของสารสกัดด้วยน้ำและเอธานอล
2. วิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิต cytotoxicity ของสารสกัด
3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการไล่แมลงวันทองตัวเต็มวัย
4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชชนิดเดียวต่อการดำรงชีพ (biosis) แมลงวันทองระยะไข่ (eggs) ตัวอ่อน (larvae) และ ตัวเต็มวัย (adults)
5. ศึกษาฤทธิ์ของสารผสมของ 2 พืชที่สกัดด้วยสารละลายชนิดเดียวกัน ต่อการดำรงชีพ (biosis) แมลงวันทองระยะไข่ (eggs) ตัวอ่อน (larvae) และ ตัวเต็มวัย (adults)

คุณสมบัติทางพฤกษาเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิตของสารสกัดของสะเดา น้อยหน่าและ แมงลักคา

คุณสมบัติทางพฤกษเคมีของสารสกัดด้วยน้ำและเอธานอลของใบสะเดา (NLE/w, NLE/e) น้อยหน่า (CLE/w, CLE/e) และแมงลักคา (MLE/w, MLE/e) และเมล็ดแมงลักคา (MSE/w, MSE/e) วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds, TPC) โดยวิธี Folin Ciocalteu's method พบ TPC เทียบกับ Gallic acid ในสารสกัดเรียงจากมากไปน้อยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ NLE/e > CLE/w > NLE/w > CLE/e > MSE/w > MLE/w > MLE/e > MSE/e ซึ่งมีค่า TPC เท่ากับ 338 ± 41.83, 309 ± 44.45, 297 ± 31.67, 261 ± 30.74, 254 ± 30.51, 251 ± 31.55, 245 ± 26.48 และ 179 ± 13.38 mgGAE/L ตามลำดับ

คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging – FRS) วิเคราะห์ด้วย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl radical) และแสดงผล 50% inhibition concentration (IC_{50}) พบว่า IC_{50} ของ NLE/w, NLE/e, CLE/w, CLE/e, MLE/w, และ MLE/e เท่ากับ 172.99 ± 4.53, 211.53 ± 8.61, 163.55 ± 8.99, 218.62 ± 3.64, 288.92 ± 13.91, 226.39 ± 6.22, ppm ตามลำดับ สารสกัดเมล็ดแมงลักคา MSE/w และ MSE/e กำจัดอนุมูลอิสระได้ใกล้เคียงกัน IC_{50} 156.44 ± 3.99 และ 155.48 ± 7.06 ppm ซึ่งสูงกว่าสารสกัดพืชอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ทั้งที่ปริมาณ TPC ต่างกันมาก อาจเป็นเพราะสารในสารสกัดจากเมล็ดต่างจากใบ รูปแบบของสารพฤกษเคมีในสารสกัดซึ่งแยกโดย TLC แยกด้วย 3 mobile systems คือ System A ประกอบด้วย ethyl acetate : methanol : water อัตราส่วน 81:11:8 (v/v/v) System B ประกอบด้วย n-buthanol : gracial acetic acid : water อัตราส่วน 40:10:50 (v/v/v) และ System C ประกอบด้วย chloroform : methanol : gracial acetic acid อัตราส่วน 47.5:47.5:5 (v/v/v) สามารถแยก TLC fingerprints และ R_f ของสารพฤกษเคมีในสารสกัดด้วยน้ำและเอธานอลได้ต่างๆ กัน

ความเป็นพิษของสารสกัดต่อสิ่งมีชีวิต (cytotoxicity) ของใบพืชทั้ง 3 ชนิดวิเคราะห์โดย brine shrimp lethality assay (BSLA) และแสดงฤทธิ์ด้วย LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงเรียงจากน้อยไปมาก หรือจากฤทธิ์สูงไปน้อย คือ MLE/e > MLE/w > MSE/w > NLE/e > MSE/e > CLE/e > NLE/w > CLE/w ซึ่ง LC_{50} เท่ากับ 0.14 ± 0.02, 0.86 ± 0.07, 3.65 ± 0.41, 6.33 ± 1.12, 6.37 ± 0.60, 27.78 ± 3.27, 48.37 ± 5.13 และ 115.06 ± 8.97 ppm ตามลำดับ และโดยรวมสารสกัดด้วยเอธานอลมีความเป็นพิษสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ 4 - 8 เท่า ส่วนพิษของสารสกัดผสมระหว่างสารละลายชนิดเดียวกับ พบคู่ผสมที่มีฤทธิ์สูงสุดคือ NLE/e + MLE/e LC_{50} 0.07 ± 0.01 ppm และคู่ผสมที่มีฤทธิ์น้อยที่สุดคือ NLE/w + CLE/w LC_{50} 10.95 ± 0.74 ppm และ CLE เสริมฤทธิ์ให้กับ NLE ในขณะที่ MLE และ MSE เสริมฤทธิ์ให้กับ CLE เป็นที่สังเกตได้ว่า cytotoxicity สอดคล้องกับ ปริมาณ TPC, แต่ผกผันกับ FRS ของสารสกัด อาจเป็นเพราะเป็นสารสกัดหยาบมีสารเคมีหลายชนิด การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดในสารผสมน่าจะเป็นข้อมูลในการเลือกใช้สารสกัดของพืชให้เกิดประโยชน์สูงสุดและเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการควบคุมแมลงต่อไป

การควบคุมโดยชีววิธีของไข่ ตัวอ่อน และ ตัวเต็มวัยแมลงวันทอง

สารสกัดเดียวด้วยน้ำและเอธานอลของสารสกัดสะเดา น้อยหน่า และ แมงลักคา ทั้งหมดแสดงฤทธิ์ไล่แมลงวันทองตัวเต็มวัยในภาพรวมได้ใกล้เคียงกัน สารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาด้วยเอธานอล(MLE/e และ MSE/e) ไล่แมลงได้มากที่สุด 74% และ MLE/w ไล่แมลงได้สูงกว่า 65% ฤทธิ์การไล่แมลงของสาร

สกัดเดียวเรียงลำดับจากมากไปน้อย MSE/e > MLE/e > CLE/e > NLE/e > CLE/w > MSE/w > NLE/w > MLE/w

ฤทธิ์ของสารสกัดเดียวทั้งหมดต่อยับยั้งการฟักไข่เป็นตัวอ่อน (anti-egg hatching) ของแมลงวันทองขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด (dose dependent fashion) MSE/e แสดงประสิทธิภาพสูงสุดด้วย LC_{50} 591.12 ± 30.26 ppm CLE/e มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดด้วย LC_{50} 5,815.26 ± 172.20 ppm NLE/w และ NLE/e มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน LC_{50} 3,353.35 ± 156.97 ppm และ 3,625.14 ± 162.38 ppm ส่วนสารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพดีกว่าการผสมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำ CLE/e + MLE/e มีประสิทธิภาพดีที่สุด LC_{50} 475.19 ± 31.90 ppm MLE/e เสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ของ NLE/e และ CLE/e ในขณะที่ CLE/e เพิ่มฤทธิ์ (additive effect) ให้กับ NLE/e

ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกิน (anti-feeding) ของหนอนตัวอ่อนขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด สารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ทำให้ตัวหนอนแมลงวันตายได้มากกว่าสารสกัดด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้นสูง 10,000 ppm CLE/w และ MLE/e ทำให้หนอนตายมากเท่ากันคือประมาณ 82% แต่ MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด LC_{50} 982.18 ± 45.60 ppm ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดผสมส่วนมากหักล้างกัน NLE/e ± MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด LC_{50} 1,194.63 ± 46.64 ppm

ฤทธิ์ต่อการการสัมผัสโดยตรง (direct contact) ต่อหนอนแมลงวันทองโดยการจุ่มหนอน (dipping) ในสารสกัดเดียวค่อนข้างต่ำ MSE/w มีประสิทธิภาพดีที่สุด LC_{50} 2,220.36 ± 83.79 ppm ฤทธิ์ของสารผสมระหว่างสารสกัดด้วยเอธานอล ค่อนข้างดี NLE/e + MLE/e และ CLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} 652.80 ± 13.15 ppm และ 683.25 ± 38.08 ppm ตามลำดับ MLE/e สามารถใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้แก่สารสกัดใบพืชอื่นได้ดีมาก และ CLE/e น่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่ NLE/e

ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย CLE/w มีประสิทธิภาพทำให้แมลงตายได้ปานกลาง LC_{50} 1,710.91 ± 67.07 ppm ฤทธิ์สารสกัดผสมควบคุมแมลงได้ปานกลางเช่นกัน NLE/e + CLE/e กำจัดแมลงได้สูงสุด LC_{50} 1,605.87 ± 67.93 ppm และ NLE/w + MLE/w มีค่า LC_{50} 1,785.91 ± 81.37 ppm CLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ NLE/e MLE/w เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ NLE/w และ CLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ MSE/e ซึ่งการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดผสมจึงน่าจะเป็นทางเลือกในการใช้ประโยชน์จากพืชให้ได้สูงสุด เป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อม และการศึกษาหาการเสริมฤทธิ์ของพืชอื่นๆ ในการควบคุมแมลงวันทองต่อไป

Abstract

The purpose of this research was to investigate plants which were widely grown on the Suranaree University of Technology campus and its vicinity for the benefitial use in the biological control of the oriental fruit fly (OFF), *Bactrocera dorsalis* Handel. Three-prescreened plants, neem (*Azadidirachta indica* A Juss), custard apple (*Annona squamosa* L.), and mintweed (*Hyptis suaveolens* L., Poit) were selected. Some basic properties of phytochemicals of the leaf and seed extracts were analyzed. The effects of individual and combined extracts by same solvents on OFF eggs, larvae, and adults were observed. The experiments were performed as the followings.

1. Quantifying total phenolic compounds and antioxidant activity of the water and ethanol plant extracts
2. Analyzing cytotoxcity of the extracts
3. Investigating the repellency on the OFF adults
4. Observing the efficacy of individual extracts on OFF biosis at egg, larval and adult stages
5. Observing the efficacy of combined extracts, obtained from same solvent extraction, on the OFF biosis at egg, larval and adult stages

Phytochemical and cytotoxic properties of neem, custard apple, and mintweed extracts

Phytochemical properties of water and ethanol extracts of neem (NLE/w, NLE/e), custard apple (CLE/w, CLE/e), and mintweed (MLE/w, MLE/e) leaves and mintweed (MSE/w, MSE/e) seeds were analyzed. Total phenolic compounds (TPC) were quantified by Folin Ciocalteu's method and compared to gallic acid standard. The TPCs were ranged as CLE/w $>$ NLE/w $>$ CLE/e $>$ MSE/w $>$ MLE/w $>$ MLE/e $>$ MSE/e with the amount of 338 ± 41.83, 309 ± 44.45, 297 ± 31.67, 261 ± 30.74, 254 ± 30.51, 251 ± 31.55, 245 ± 26.48 and 179 ± 13.38 mgGAE/L respectively.

Free radical scavenging (FRS) property was analyzed by DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl radical) and expressed as 50% inhibition concentration (IC_{50}). The IC_{50} of NLE/w, NLE/e, CLE/w, CLE/e, MLE/w, and MLE/e were 172.99 ± 4.53, 211.53 ± 8.61, 163.55 ± 8.99, 218.62 ± 3.64, 288.92 ± 13.91, 226.39 ± 6.22, respectively, while of MSE/w and MSE/e were 156.44 ± 3.99 and 155.48 ± 7.06 ppm which were significantly better than the others, ($P < 0.05$). The phytochemicals

were partially separated by thin layer chromatography (TLC), using three mobile phase systems. System A comprised of ethyl acetate : methanol : water at 81:11:8 (v/v/v); System B comprised of n-buthanol : gracial acetic acid : water at 40:10:50 (v/v/v); and System C comprised of chloroform : methanol : gracial acetic acid at 47.5:47.5:5 (v/v/v). TLC fingerprints and Rf of some major chemicals groups of water and ethanol extracts were appeared differently.

Cytotoxicity of the extracts was performed by brine shrimp lethality assay (BSLA) and expressed as LC_{50} at 24 hours. The toxic activity of all extracts was ranged as MLE/e > MLE/w > MSE/w > NLE/e > MSE/e > CLE/e > NLE/w > CLE/w with LC_{50} of 0.14 ± 0.02, 0.86 ± 0.07, 3.65 ± 0.41, 6.33 ± 1.12, 6.37 ± 0.60, 27.78 ± 3.27, 48.37 ± 5.13, and 115.06 ± 8.97 ppm respectively. Apparently, the cytotoxic activity of the ethanol extracts was about 4 - 8 fold of the water extracts. The combination of NLE/e + MLE/e processed highest cytotoxic effects with LC_{50} of 0.07 ± 0.01 ppm. NLE/w + CLE/w showed lowest cytotoxic effect with LC_{50} of 10.95 ± 0.74 ppm. CLE showed synergistic effect to NLE, while MLE and MSE synergistically enhanced the effect of CLE. It was noticed that the cytotoxicity was in agreement with the TPC, but not with FRS activity. It may be due to the crude extracts contained various chemicals. The synergistic effects of plant combinations would be better options in making use of plants and suiting the purposes of biological control of insect pests.

Biological Control of Egg, Larva, and Adult Oriental Fruit Flies (*Bactrocera dorsalis* Hendel)

The water and ethanolic extracts of neem, custard apple, and mintweed, apparently, processed same repellent activities against OFF adults. MLE/e and MSE/e repelled OFF 65%. The repellent efficacy was ranged as MSE/e > MLE/e > CLE/e > NLE/e > CLE/w > MSE/w > NLE/w > MLE/w.

The inhibition effects of the extracts on OFF egg hatching were dose dependent fashion. MSE/e inhibited egg hatching most with LC_{50} of 591.12 ± 30.26 ppm and CLE/e inhibited least with LC_{50} of $5{,}815.26 \pm 172.20$ ppm. NLE/w and NLE/e had the same inhibition activity on egg hatching with LC_{50} of $3{,}353.35 \pm 156.97$ ppm and $3{,}625.14 \pm 162.38$ ppm. The combination of ethanol extracts had higher inhibition effects than those of water extracts. CLE/e + MLE/e processed highest inhibition with LC_{50} of 475.19 ± 31.90 ppm. MLE/e synergistically contributed its effect to NLE/e and CLE/e. while CLE/e shown additive effect to NLE/e.

The anti-feeding activities of all extracts on OFF larvae were dose dependent. The water extracts were more potent than those of ethanol extracts. At the highest concentration of 10,000 ppm, CLE/w and MLE/w caused OFF mortality around 82%. MSE/e showed highest anti-feeding effect with LC_{50} of 982.18 $\pm$ 45.60 ppm. However, the effects of most extract combinations were reduced. NLE/e $\pm$ MSE/e processed highest anti-feeding activity of LC_{50} of 1,194.63 $\pm$ 46.64 ppm

The direct contact effects of the extracts on OFF larvae were conducted by dipping technique. The effects of individual extracts were quite low. MSE/w showed highest effect with LC_{50} of 2,220.36 $\pm$ 83.79 ppm. The combinations of the ethanol extracts were quite potent. NLE/e + MLE/e and CLE/e + MLE/e had LC_{50} of 652.80 $\pm$ 13.15 ppm and 683.25 $\pm$ 38.08 ppm respectively. It was noticed that MLE/e synergistically and potentially enhanced other leaf extracts. CLE/e showed additive effect to NLE/e.

The antifeeding activities of all individual and combined extracts on OFF adults were mild. CLE/w had LC_{50} of 1,710.91 $\pm$ 67.07 ppm. NLE/e + CLE/e showed highest antifeeding with LC_{50} of 1,605.87 $\pm$ 67.93 ppm and NLE/w + MLE/w had LC_{50} of 1,785.91 $\pm$ 81.37 ppm. It was found that CLE/e enhanced the effect of NLE/e; MLE/w enhanced the effects of NLE/w and CLE/e enhanced the effect of MSE/e, synergistically. Synergistic effects of extract combinations were possibly selective options in making highest benefit of using plants in biological control of OFF adults.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ง
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ 3
1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ 3
เอกสารอ้างอิง 4
2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
2.1 คำนำ 5
2.2 แมลงวันผลไม้ 8
2.3 แมลงวันทอง (oriental fruit fly – OFF) 9
2.3.1 วัฏจักรชีวิต (life cycle) ของแมลงวันทอง 10
2.3.2 การทำความเสียหาย 12
2.3.3 การควบคุมและการจัดการแมลงวันทอง 12
เอกสารอ้างอิง 14
3 พฤกษาเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิต (cytotoxicity) 19
3.1 คำนำ 19
3.1.1 สะเดา Neem (*Azadirachta indica* Juss) 21
3.1.2 น้อยหน่า Custard apple (*Annona. squamosa* L.) 22
3.1.3 แมงลักคา Mintweed (*Hyptis suaveolens* L., Poit) 23
3.2 วัตถุประสงค์ 24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 อุปกรณ์และวิธีการ ……	24
3.3.1 วัสดุและสารเคมี ……	24
3.3.2 แหล่งของพืชและการสกัด ……	24
3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC) ……	25
3.3.4 Antioxidant activity โดย DPPH assay ……	25
3.3.5 Thin layer chromatography (TLC) fingerprinting ……	26
3.3.6 ทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) โดย Brine shrimp lethal assay (BSLA) ……	27
3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ ……	28
3.4.1 สารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds - TPC) และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging - FRS) ของสารสกัด ……	28
3.4.2 Thin layer chromatographic (TLC) fingerprinting ……	33
3.4.3 ความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด ……	37
3.5 สรุปผลการทดลอง ……	40
เอกสารอ้างอิง ……	42
4 การควบคุมโดยชีววิธีของไข่ ตัวอ่อน และ ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ ……	47
4.1 คำนำ ……	47
4.1.1 การป้องกันและการจัดการแมลงวันทอง ……	47
4.2 วัตถุประสงค์ ……	50
4.3 อุปกรณ์และวิธีการ ……	50
4.3.1 วัสดุและสารเคมี ……	50
4.3.2 ตัวอย่างพืชและการเตรียมสารสกัดหยาบจากพืชตัวอย่าง ……	50
4.3.3 การเลี้ยงแมลงวันทอง ……	51
4.3.4 การทดสอบฤทธิ์การไล่ (repellent test) หรือ ดึงดูด (attraction) ……	52
4.3.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟักไข่ (egg hatching) แมลงวันทอง ……	52
4.3.6 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อแมลงตัวอ่อนโดยการกิน (larval feeding) ……	53
4.3.7 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อแมลงตัวอ่อนโดยการจุ่ม (larval dipping) ……	53

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.8 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อแมลงตัวเต็มวัย (adulticide) 53
4.3.9 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผสมระหว่างสารสกัด 2 พืช 53
4.3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ 53
4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 53
4.4.1 ฤทธิ์การไล่แมลงวันทองตัวเต็มวัย (repellent effects) 53
4.4.2 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟักไข่แมลงวันทอง (egg hatching) 55
4.4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมตัวอ่อนแมลงวันทอง 60
โดยการกิน (larval feeding)
4.4.4 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสัมผัสหนอนตัวอ่อนแมลงวันทอง 64
โดยการจุ่มในสารละลาย (larval dipping)
4.4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมแมลงวันทองตัวเต็มวัย 68
โดยการกิน (adult feeding)
4.5 สรุปการทดลอง 74
เอกสารอ้างอิง 76
5 สรุปผลการทดลอง 79
5.1 คุณสมบัติทางพฤกษาเคมีและความเป็นพิษต่อ 79
เซลล์มีชีวิตของสารสกัดของสะเดา น้อยหน่าและ แมงลักคา
5.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และ การกำจัดอนุมูลอิสระ 79
(total phenolic compounds and free radical scavenging)
5.1.2 Thin layer chromatographic (TLC) fingerprinting 80
5.1.3 ความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด 80
5.2 การควบคุมโดยชีววิธีของไข่ ตัวอ่อน และ ตัวเต็มวัยแมลงวันทอง 81
5.2.1 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการไล่ (repellency) แมลงวันทองตัวเต็มวัย 81
5.2.2 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟักไข่ (egg hatching) แมลงวันทอง 82
5.2.3 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมตัวอ่อนโดยการกิน (larval feeding) 82
5.2.4 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสัมผัสตัวอ่อนโดยการจุ่มในสารละลาย 83
(larval dipping)
5.2.5 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมแมลงตัวเต็มวัยโดยการกิน 83
(adult feeding)
ประวัติผู้วิจัย 85

สารบัญตาราง

ตารางที่			หน้า
3.1	Total phenolic compounds and free radical scavenging by DPPH of the water and ethanolic leaf and seed extracts of neem, custard apple and mintweed	……	28
3.2	Comparison R_f values and colour appearances of neem, custard apple, and mintweed extracts separated by thin layer chromatography using three mobile phase systems. System A contained ethyl acetate : methanol : water (81:11:8 (v/v/v)), System B contained n-buthanol : glacial acetic acid : water (40:10:50 (v/v/v)), and System C contained chloroform : methanol : glacial acetic acid (47.5:47.5:5 (v/v/v)). The band color was detected under $UV_{365\ nm}$	……	36
3.3	Cytotoxicity of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds, determined by brine shrimp lethal assay (BSLA). Data are expressed as Mean $\pm$ S.D. of LC_{50} (ppm) at 24 hours.	……	39
3.4	Summary of total phenolic compound content, free radical scavenging activity and cytotoxicity activity of the leaf extracts of neem, custard apple, and mintweed and the seed extracts of mintweed.	……	41
4.1	Repellent activities of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on adult oriental fruit flies at 24 hours. Data were expressed as % Mean $\pm$ S.E., n = 6.	……	55
4.2	Direct contact toxic effects on egg hatching of oriental fruit flies by dipping eggs in individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds at 24 hours. Data were expressed as Mean of LC_{50} $\pm$ S.E., n = 5.	……	59
4.3	Feeding toxic effects of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on oriental fruit fly larvae at 24 hours. Data were expressed as Mean of LC_{50} $\pm$ S.E., n = 5.	……	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่			หน้า
4.4	Direct contact effects of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds by larval dipping at 24 hours. Data were expressed as Mean of $LC_{50} \pm$ S.E., n = 5.	……	67
4.5	Adulticidal efficacy of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on oriental fruit flies by feeding at 24 hours. Data were expressed as Mean of $LC_{50} \pm$ S.E., n = 5.	……	71
5.1	Summary of ttotal phenolic compound content free radical scavenging activity and cytotoxicity activity of the leaf extracts of neem, custard apple, and mintweed and the seed extracts of mintweed.	……	81
5.2	Summary of the insecticidal activities of the leaf extracts of neem, custard apple and mintweed and the seed extracts of mintweed on adult repellence, egg hatching, larval feeding, larval dipping, and adult feeding. The data are expressed as % repellence and the LC_{50} values of the rest effects.	……	84

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่			หน้า
2.1	Adult female (left) and male (right) oriental fruit flies *Bactrocera dorsalis* Hendel	.....	10
2.2	The life cycle of most *Tephritidae* species is similar. The female implants its eggs in the young fruit of the host plant. The larvae or maggots develop in the flesh of untreated fruit by digging tunnels. The growth of the larvae accelerates maturation of the fruit, which detaches and falls to the ground. The larvae leave the fruit and the pupae develop in the top layer of the soil. Upon emergence, the adult soon starts looking for the nourishment it needs to reach sexual maturity, couple, and lay eggs.	.....	11
3.1	Neem: *Azadirachta indica* A. Juss	.....	21
3.2	Custard apple: *Annona squamosa* L.	.....	22
3.3	Mintweed: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.	.....	23
3.4	The two-chamber container with a perforate divider and light. The smaller chamber was for brine shrimp egg hatching. The larger chamber was for the nauplii, migrated toward the light.	.....	27
3.5	Radical scavenging of crude extracts of neem leaves (panel A), custard apple leaves (panel B), mintweed leaves (panel C), and mintweed seeds (panel D).	.....	32
3.6	Thin layer chromatographic fingerprints of neem leaf extracts and custard apple leaf extracts. A: mobile phase system composed of ethyl acetate : methanol : water at proportion of 81:11:8 (v/v/v). B: mobile phase system composed of n-buthanol : gracial acetic acid : water at proportion of 40:10:50 (v/v/v). C: mobile phase system composed of chloroform : methanol : gracial acetic acid at proportion of 47.5:47.5:5 (v/v/v)	.....	34
3.7	Thin layer chromatographic fingerprints of mintweed leaf extracts and mintweed seed extracts. A: mobile phase system composed of ethyl acetate : methanol : water at proportion of 81:11:8 (v/v/v). B: mobile phase system composed of n-buthanol : gracial acetic acid : water at proportion of 40:10:50 (v/v/v). C: mobile phase system composed of chloroform : methanol : gracial acetic acid at proportion of 47.5:47.5:5 (v/v/v)	.....	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่			หน้า
3.8	Cytotoxic effects of individual extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds monitored and screened by brine shrimp lethal assay (BSLA). The toxicity was expressed as 50% lethal concentration (LC_{50}) at 24 hours. N = neem, C = custard apple, M = mintweed, L = leaf, S = seed, w = water and e = ethanol. Bars were S.D. (n = 6).	.....	37
3.9	Cytotoxic effects of extract combinations between the same extract solvent. The toxicity was by brine shrimp lethality assay and expressed as 50% lethal concentration (LC_{50}) at 24 hours. N = neem, C = custard apple, M = mintweed, L = leaf, S = seed, w = water and e = ethanol. Bars were S.D. (n = 6).	.....	38
4.1	Life cycle of oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* Hendel	.....	48
4.2	Wire-net cage for rearing adult oriental fruit flies.	.....	51
4.3	Artificial food and a cone-shaped device made from ripe fruits or artificial food for egg laying of female adult oriental fruit flies.	.....	51
4.4	Olfactometer, setting up with two 10-mL bottles at each end of the device; one for the control and one test sample. A hole is in the middle for allowing the test insect into the device.	.....	52
4.5	Repellent effects of the leaf extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE) and the seed extracts of mintweed (MSE) on adult oriental fruit flies. A, individual extract treatments and B, combined extract treatments. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 6.	.....	54
4.6	Anti-Egg hatching effects of individual extracts of the leaf and seed extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE), Oriental fruit fly eggs were treated with extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	57
4.7	Anti-Egg hatching effects of combined extracts (1:1) of the leaf and seed extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE), Oriental fruit fly eggs were treated with extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่			หน้า
4.8	Anti-egg hatching efficacy on egg hatching of oriental fruit flies by the extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and the extracts of mintweed seeds. A, LC_{50} at 24 of individual extract treatments. B, LC_{50} at 24 h of combined extract treatments. Data were expressed as Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	59
4.9	Larvicidal feeding effects of individual extracts of leaf and seed extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE). Oriental fruit fly larvae were fed with artificial food mixed with extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	61
4.10	Larvicidal feeding effects of combined extracts (1:1) of leaf and seed extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE). Oriental fruit fly larvae were fed with artificial food mixed with extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	62
4.11	Larvicidal efficacy of the extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on larval feeding of oriental fruit flies. A, LC_{50} at 24 h of individual extract treatments. B, LC_{50} at 24 h of combined extract treatments. Data were expressed as Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	63
4.12	Direct contact effects of individual extracts of leaves and seeds of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE) on larvae by dipping, Oriental fruit fly larvae were dipped in individual extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	65
4.13	Direct contact effects of combined extracts of leaves and seeds of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE) on larvae by dipping Oriental fruit fly larvae dipped in combined extracts (1:1) as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	66
4.14	Direct contact efficacy the extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on oriental fruit fly larvae by dipping. A, LC_{50} at 24 h of individual extract treatments. B, LC_{50} at 24 h of combined extract treatments. Data were expressed as Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่			หน้า
4.15	Adulticidal effects of individual extracts of leaves and seed of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE) by feeding, Oriental fruit fly adults were fed with artificial food mixed with extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	69
4.16	Adulticidal effects of combined extracts of leaves and seed of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE), Oriental fruit fly adults were fed with artificial food mixed with extracts (1:1) as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	70
4.17	Adulticidal efficacy of extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on oriental fruit flies by feeding. A, LC_{50} at 24 h of individual extract treatments. B, LC_{50} at 24 h of combined extract treatments. Data were expressed as Mean $\pm$ S.E. and n = 5.	.....	71

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศในเอเชียเป็นหนึ่งในสามของโลกที่สำคัญในการผลิตและส่งผลไม้และผักสดเป็นปริมาณกว่า 66% ของผลผลิตทั้งโลก แต่ปัญหาที่ทำลายผลผลิตเหล่านั้นโดยตรงคือ แมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* และ *Bactrocera cucurbitae*) เป็นแมลงศัตรูพืชที่ระบาดทำลายพืชเศรษฐกิจการเกษตรในหลายพื้นที่ทั่วโลก เช่น ทวีปอเมริกา ยุโรป หมู่เกาะแปซิฟิกฮาวาย และ เอเชียเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย แมลงวันผลไม้มีพืชอาหารมากมายหลายชนิด จึงทำลายผลผลิตการเกษตรได้ในวงกว้างและหลายประเภท เช่น ผลไม้ เมล็ด และพืชผัก และทำความเสียหายต่อเศรษฐกิจการเกษตรมากกว่า 4,000 ชนิด รวมทั้ง กล้วย ส้ม ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ กะทกรก มะเขือเทศ พริกไท ขนุน ชมพู่ และ พุทรา (www.aphis.usda.gov) ความเสียหายถึง 90-100% คิดเป็นมูลค่ากว่า $2.5 พันล้าน (www.spc.int, www.extento.hawaii.edu (1), และ ipm.ait.asia) การกำจัดแมลงวันผลไม้ที่ปฏิบัติในปัจจุบันใช้หลายวิธี เช่น heat shock and quarantine cold treatment เพื่อกำจัดและกักกันไข่ (Jang, *et al*., 2001) Bait application technique (BAT), Male annihilation technique (MAT) (www.ars.usda.gov; Ali, *et al*., 2010) บางวิธีต้องการแรงงานมาก บางวิธีมีค่าใช้จ่ายสูงมาก และวิธีการส่วนมากส่งผลกระทบทางลบต่อสุขภาพเกษตรกรเอง และระบบเกษตรนิเวศ

การควบคุมแมลงวันผลไม้โดยชีววิธีด้วยสารสกัดจากพืชจะเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่จะสามารถช่วยลดจำนวนแมลงโดยไม่มีผลเสียหายต่อเกษตรกรและระบบนิเวศ วัฏจักรชีวิตของแมลงวันประกอบด้วยไข่ในผลไม้ ระยะหนอน 3 ระยะ (instars) (www.extento.hawaii.edu (2); Sengebau, F., Waqa, N., and Vueti, E.T., 2010) เจริญในผลไม้ โดยตัวเต็มวัยแทงวางไข่ในผลไม้ หนอนเจริญกินผลไม้ หนอนออกจากผลไม้เข้าดักแด้ในดินแล้วออกเป็นตัวเต็มวัย ผสมพันธุ์และเจาะวางไข่ในผลไม้ต่อไป แผลที่แมลงเจาะยังเป็นช่องทางให้เชื้อโรคพืชอื่นเข้าทำลายผลไม้ได้ด้วย จะเห็นว่ามีช่วงชีวิตของแมลงวันผลไม้บางระยะที่สามารถควบคุมได้นอกผลไม้ โดยเฉพาะระยะหนอนทีกำลังออกจากผลไม้ ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัยที่สามารถถูกควบคุมได้โดยชีววิธี นอกจากนี้การเลือกใช้วัชพืชและส่วน

ของพืชบางชนิดที่เหลือทิ้งหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตหลักแล้วมาประยุกต์ใช้ควบคุมแมลงจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชเหล่านั้นและเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรได้อีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ต้องการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืช เช่น แมงลักคา สะเดา และ น้อยหน่า ที่มีต่อแมลงวันผลไม้ที่อาจใช้ในการกำจัด หรือควบคุมแมลงวันผลไม้ในเกษตรกรรมเพาะปลูกผลไม้แทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์กำจัดแมลงซึ่งเป็นอันตรายต่อเกษตรกร สิ่งมีชีวิตอื่นๆ และยังตกค้างในสภาพแวดล้อมได้นานมากกว่าสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยศึกษาจากสารสกัด (plant extracts) ด้วยน้ำ และ ethanol จากส่วนเหนือดินของพืชคือ ใบ แยกศึกษาผลของฤทธิ์จากพืชเดียวก่อน แล้วเลือกพืช 2-3 ชนิด ที่ให้ศักยภาพสูงสุดต่อการควบคุมแมลง มาผสมเป็นสัดส่วน ศึกษาเพื่อให้ทราบ

1.1.1 พฤกษาเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิต (cytotoxicity) ของสารสกัดที่จะใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้

1.1.2 การขับไล่แมลง (repellent) หรือ การดึงดูด (attractant)

1.1.3 ฤทธิ์ฆ่าแมลงวันผลไม้ (potent insecticidal activity)

1.1.4 การต่อต้านการเจริญเติบโต (antibiosis)

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้ครอบคลุม

1.3.1 ศึกษาเปรียบเทียบพิษต่อสิ่งมีชีวิต cytotoxcity ของสารสกัด และ fingerprints ของสารสกัด ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ โดย Thin layer chromatography เพื่อเป็นการนำร่องสู่การสกัดแยกหาสารออกฤทธิ์เป็น biopesticides ที่เฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันผลไม้ และ/หรือแมลงชนิดอื่นๆ ได้ต่อไป

1.3.2 ศึกษาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากพืชเดี่ยวและพืชผสมต่อแมลงวันผลไม้ โดยเน้นเฉพาะแมลงวันทอง (*Bactrocera dorsalis* Hendel) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีลักษณะการเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติการดำรงชีวิตของแมลงมากที่สุด

1.3.3 ศึกษาฤทธิ์ต่อแมลงวันทองระยะต่างๆ ในวัฏจักรชีวิต คือ ไข่ ตัวอ่อน และ ตัวเต็มวัย

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อประกอบด้วย

1.4.1 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นบางประการ คือ ปริมาณ total phenolic compounds, antioxidant activity และ cytotoxicity ของสารสกัดพืช โดยเฉพาะการตรวจหา cytotoxicity ของสารสกัดพืชจำนวนหนึ่งในเขตมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อคัดเลือกพืช ที่เหมาะสมที่จะนำมาทดสอบการควบคุมโดยชีวภาพต่อแมลงวันทอง

1.4.2 เลือกศึกษาสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ของพืชที่คัดเลือกแล้วที่มีค่า LC_{50} เหมาะสม 3 ชนิด ทดสอบฤทธิ์ต่อการเจริญพัฒนาการระยะต่างๆ (antibiosis) ในวัฏจักรชีวิตของแมลงวันทอง

1.4.2.1 ศึกษาฤทธิ์สารสกัดของพืชชนิดเดียวในการควบคุมแมลงโดยการไล่แมลงวันตัวเต็มวัย

1.4.2.2 ศึกษาฤทธิ์สารสกัดของพืชชนิดเดียวในการควบคุมแมลงโดยการยับยั้งการเจริญเติบโต (biosis) ของแมลงวันทองระยะต่างๆ ต่อไปนี้

1) ศึกษาฤทธิ์ต่อไข่ (eggs)
2) ศึกษาฤทธิ์ต่อตัวอ่อน (larvae)
3) ศึกษาฤทธิ์ต่อตัวเต็มวัย (adults)

1.4.2.3 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดผสมพืชผสมสองชนิดต่อการดำรงชีพ (biosis) แมลงวันทองระยะต่างๆ ต่อไปนี้

1) ศึกษาฤทธิ์ต่อไข่ (eggs)
2) ศึกษาฤทธิ์ต่อตัวอ่อน (larvae)
3) ศึกษาฤทธิ์ต่อตัวเต็มวัย (adults)

1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้สารควบคุมหรือกำจัดแมลงวันผลไม้จากพืชในรูปของพืชสกัดเดี่ยวๆ หรือผสมที่สามารถเลือกใช้โดยต้นทุนต่ำและสะดวกในการใช้

1.5.2 ได้สารควบคุมแมลงวันผลไม้ในรูปของสารกัดจากพืชซึ่งอาจจะมีฤทธิ์มากกว่าและคงที่กว่า ไม่มีไม่มีพิษตกค้างในห่วงโซ่อาหารถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และไม่ทำลายสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้ ผู้บริโภคผลไม้ และระบบนิเวศ

1.5.3 เป็นการพัฒนาใช้พืชและเพิ่มมูลค่าให้แก่วัชพืชและเศษเหลือทิ้งจากการตัดแต่งต้นพืช ซึ่งจะสามารถสร้างรายได้เพิ่มให้แก่เกษตรกร ด้วยการนำพืชเหล่านั้นมาพัฒนาผลิตเป็นสารควบคุมแมลงหรือปลูกพืชขายให้กับผู้ผลิตสารควบคุม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5.4 ส่งเสริมการพัฒนาระบบนิเวศเกษตรกรรมอย่างยั่งยืน (ecological sustainable farming systems)

1.5.5 เป็นต้นแบบนำสู่การพัฒนาสารออกฤทธิ์กำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยพืช (plant-based pest control) ชนิดอื่นๆ ต่อไป

1.5.6 เป็นการนำร่องสู่การวิจัยสกัดสาร agrochemicals ในเชิงพาณิชย์ได้ต่อไปในอนาคต

1.5.7 สามารถผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาได้ อย่างน้อย 1 คน

เอกสารอ้างอิง

Ali, et al. (2010). Efficacy of different control methods against oriental fruit fly *Bactrocera zonata* (SAUNDERS). ARPN J Agric Biol Sci. 5:1-3.

Jang, et al. (2001). Effect of heat shock and quarantine cold treatment with a warm temperature spike on survival of Mediterranean fruit fly eggs and fruit quality in Hawaii-grown 'Sharwil' avocado. Postharvest Biology and Technology. 21: 311–320. Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* (Handel).

ipm.ait.asia: Asian fruit fly IPM project. Available online at http://ipm.ait.asia/?page_id=27.

Sengebau, F., Waqa, N., and Vueti, E.T. (2010). Fruit flies in Palau. PEST ADVISORY LEAFLET NO. 44, pp. 4.

www.aphis.usda.gov: Oriental Fruit Fly. Available online at http://www.aphis.usda.gov/hungrypests/orientalFruitFly.shtml

www.ars.usda.gov: Less Pesticide, Fewer Fruit Flies. *Agricultural Research* magazine /May-June 2007. Available online at http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/may07/flies0507.htm?pf=1

www.extento.hawaii.edu (1): *Bactrocera dorsalis* (Hendel). Available online at http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/bactro_d.htm.

www.extento.hawaii.edu (2): Fruit fly identification and lifecycle. Available at http://www.extento.hawaii.edu/fruitfly/brochure%20pdf/identificationand%20lifecycle.pdf

www.spc.in: Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)). available online at http://www.spc.int/pacifly/Species_profiles/B_dorsalis.htm

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คำนำ

แมลงวันผลไม้เป็นแมลงในวงศ์ เทฟริติดี้ (Tephritidae) แมลงในวงศ์นี้ประกอบด้วยแมลงวันผลไม้ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชผักและผลไม้ มากกว่า 4,000 ชนิด ซึ่งแพร่กระจัดกระจายอยู่ในเขตหนาว เขตอบอุ่นและเขตร้อนของโลก ซึ่งคาดว่ามีมากกว่า 800 ชนิดที่พบในเขตภาคพื้นทวีปเอเชีย แม้ว่าแมลงวันผลไม้ส่วนใหญ่จะทำลายในส่วนของผลก็ตาม แต่แมลงวันผลไม้ก็สามารถเข้าทำลายทุกส่วนของพืชได้ไม่ว่าจะเป็นส่วนดอก ใบ ลำต้น หรือรากก็ตาม แมลงวันผลไม้บางชนิด (เกือบ 200 ชนิด) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปุ่มปมบนพืช ซึ่งจัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญเป็นอันดับที่ 2 รองลงมาจากแมลงในกลุ่ม เซซิโดมายอิดี้ (Cecidomyiidae) แมลงวันผลไม้พวกที่ทำลายส่วนของผลไม้ที่สำคัญได้แก่ แมลงวันผลไม้ชนิด แมลงวันแตง (*Bactrocera cucurbitae*) แมลงวันทอง (*B. dorsalis*) แมลงวันเมดิเตอร์เรเนียน (*Ceratitis capitata*) แมลงวันอัฟริกัน (*Anastrepha suspense*) ซึ่งล้วนเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของโลก ในขณะที่แมลงวันผลไม้ชนิด *Dioxyna sorrocula*, *Procecidochares utilis*, *Bactrocera caudata* พบทำลายพืชอยู่ในส่วนของดอก บริเวณที่จะเจริญเติบโตเป็นเมล็ดต่อไป (มนตรี จิรสุรัตน์, 2553)

ในประเทศไทยพบมีการระบาดของแมลงวันผลไม้ (Fruit flies (Tephritidae)) ทั่วทุกภาค ทั้งในเขตป่าและในบ้าน และแมลงชนิดนี้สามารถอยู่ได้แม้ที่ระดับความสูงถึง 2,760 เมตรจากระดับน้ำทะเล และยังพบการทำลายผลไม้ต่างๆ ได้ตลอดทั้งปี (www.doae.go.th, เรณู ดอกไม้หอม web.ku.ac.th, board.dserver.org) แมลงวันผลไม้ทำลายผลผลิตพืชทั้งผลไม้และผัก โดย (1) เพศเมียใช้อวัยวะวางไข่ (ovipositor) ในผลไม้ (2) ตัวหนอนที่ฟักจากไข่อาศัยและชอนไชกัดกินเนื้อภายในผลไม้ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผลไม้เสียหายมากที่สุด ทำให้ผลไม้เน่าเสีย ร่วงหล่นลงพื้น และ/หรือผิดรูปร่างไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค (3) เป็นช่องทางให้โรคและแมลงชนิดอื่น ๆ เข้าทำลายผลไม้เพิ่มอีก หลังจากนั้นตัวหนอนจะออกมาเพื่อเข้าดักแด้ในดินแล้วจึงออกเป็นตัวเต็มวัย (Sengebau, Waqa, and Vueti, 2010; www.extento.hawaii.edu) ดังนั้นความเสียหายที่เกิดกับผลผลิตโดยตรงนี้จึงมีมูลค่ามหาศาล ก่อให้เกิดปัญหาต่อเศรษฐกิจในระดับชาติเป็นอันมาก ความเสียหายจากแมลงวันผลไม้ จึงไม่เพียงแต่เกิดขึ้นกับ

ผลไม้ก่อนเก็บเกี่ยวภายในแปลงเท่านั้น แต่มีผลต่อเนื่องจนถึงภายหลังการเก็บเกี่ยวแล้วอีกด้วย ความเสียหายเชิงเศรษฐกิจที่เกิดจากแมลงวันผลไม้ทำลายต่อผลไม้ไทย มีมูลค่าไม่ต่ำกว่าปีละประมาณ 1,000 ล้านบาท โดยคาดคะเนจากความเสียหายโดยตรงต่อผลผลิต ค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นของเกษตรกรในการป้องกันกำจัด และค่าใช้จ่ายในการดำเนินการหลังการเก็บเกี่ยวก่อนการส่งออก ดังนั้น แมลงวันผลไม้จึงจัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยที่สำคัญยิ่งอีกชนิดหนึ่ง

ประเทศไทยส่งออกผลไม้มูลค่าปีละหลายพันล้านบาท แต่การส่งออกผลไม้ได้รับผลกระทบจากการทำลายเสียหายโดยแมลงวันผลไม้อย่างมาก เกษตรกรไทยควบคุมและกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยวิธีการหลักเช่นเดียวกับต่างประเทศ กล่าวคือการใช้สารล่อดักจับเพื่อกำจัดด้วยเมทธิลยูจินอล (methyl eugenol) และยาฆ่าแมลงซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ malathion (Edwards *et al*., 2007), methyl bromide (King and Benschoter, 1991), การใช้เหยื่อพิษด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein lysate) (Vargas, R.I. and Prokopy, R., 2006), การทำหมันด้วยรังสี (Sterile Insect Technique : SIT) แล้วปล่อยแมลงที่ทำหมันแล้วออกไปผสมพันธุ์กับแมลงที่มีอยู่ในธรรมชาติ (Hendrichs *et al*., 2002; www.tint.or.th) ซึ่งปฏิบัติในพื้นที่ที่มีการระบาดกว้างขวาง ไม่ใช้กับพื้นที่ขนาดเล็ก การเก็บผลที่ถูกทำลายเผาหรือฝัง และเพิ่มวิธีการห่อผลไม้ในกรณีที่เป็นผลไม้ที่ต้องการคุณภาพสูงและราคาแพง ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงมากขึ้น และ การทำเขตกรรม นอกจากนี้ยังใช้ตัวเบียน (Bokonon-Ganta, McQuate, and Messing, 2007) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการหาทางเลือกในการควบคุมโดยการใช้สารสกัดธรรมชาติจากพืช ซึ่งโดยปกติพืชเหล่านั้นไม่พบมีแมลงรบกวน สารสกัดธรรมชาติเหล่านั้นน่าจะเป็นทางเลือกในการควบคุมแมลงวันผลไม้ได้ดี

การควบคุมแมลงวันผลไม้สามารถควบคุมได้หลายระยะในวัฏจักรชีวิตของแมลงและควบคุมพฤติกรรมความเป็นอยู่ก่อนเข้าทำลายผลไม้ก็ได้ ซึ่งได้แก่การควบคุมระยะตัวเต็มวัย ระยะหนอน และระยะดักแด้ ซึ่งทุกระยะน่าจะสามารถใช้การควบคุมโดยชีววิธีได้ การใช้สารเคมีสังเคราะห์กำจัดแมลง (synthetic insecticides) ที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบันมีต้นทุนสูง และมีความเสี่ยงสูงต่อสุขภาพของผู้ใช้ถ้าใช้โดยไม่มีความรู้เทคนิคการใช้อย่างถูกต้อง และยังทำลายระบบนิเวศโดยรวม ทางเลือกทางหนึ่งที่สามารถทดแทนการใช้สารสังเคราะห์กำจัดแมลงได้อย่างเหมาะสม คือการใช้สารกำจัดแมลงจากพืช (insecticidal plants) เพราะ พืชสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) หลายชนิดเพื่อใช้ป้องกันตัวเองจากการถูกโจมตีของศัตรูในธรรมชาติ (Bennett and Wallsgrove, 1994; Theis and Lerdau, 2003) ผลผลิตของพืชเหล่านี้เป็นที่รู้จักกันในนามสารฆ่าแมลงสวน (botanical insecticides) หรือเรียกง่ายๆ ว่า Botanicals ปกติสารธรรมชาติจากพืชให้ฤทธิ์ในวงกว้างแตกต่างกัน แต่ทำความเสียหายให้ระบบนิเวศน้อยกว่า ถูกสลายได้เร็วกว่าด้วยความร้อน แสง และ น้ำ หลังจากช่วงหนึ่งที่เกษตรกรไทยนิยมใช้สารเคมี

สังเคราะห์กำจัดศัตรูพืช แล้วต่อมาก่อให้แมลงเกิดการดื้อต่อเคมีสารสังเคราะห์เหล่านั้น แมลงทำลายระบบนิเวศ มนุษย์ และเศรษฐกิจการเกษตรทั้งทางตรงและอ้อมได้เพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันเกษตรกรไทยได้ให้ความสนใจการใช้พืชสมุนไพรจากภูมิปัญญาพื้นบ้านมากขึ้นในการใช้พืชกำจัดหรือขับไล่แมลง อย่างไรก็ตามส่วนมากเป็นการใช้พืชหมัก (macerate) ด้วยน้ำชนิดเดียว (www.thai.net; www.greenag.org) หรือใช้พืชผสมหลายพืช (chumpoo.doae.go.th) สูตรผสมแปรไปตามภูมิปัญญาท้องถิ่น และชนิดของศัตรูพืชที่ระบาด ประสิทธิภาพจึงไม่แน่นอน เช่น การหมักผสมระหว่าง สะเดา ยาสูบ หางปลาไหล หนอนตายหยาก สะระแน่ กระเพรา สาบเสือ ตะไคร้หอม และ เถาบอระเพ็ด ใช้ในการกำจัดและป้องกันศัตรูพืชประเภทหนอน แมลง ไส้เดือนฝอย และเชื้อโรคพืช อย่างไรก็ตามการใช้สารหมักภูมิปัญญามีข้อจำกัด กล่าวคือเหมาะกับพื้นที่การเพาะปลูกขนาดเล็ก ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ไทยโดยเฉพาะในส่วนงานกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (chumpoo.doae.go.th) ได้ทำการวิจัยพืชหลายชนิดเพื่อวิเคราะห์หาสารสกัดที่พืชผลิตขึ้นมาใช้ในการป้องกันตนเอง โดยมีเป้าหมายเพื่อให้เกษตรกรนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันแมลงศัตรูได้อย่างมีประสิทธิภาพ และทั้งยังรักษาระบบนิเวศโดยไม่ต้องพึ่งพาสารเคมีสังเคราะห์กำจัดแมลงจากต่างประเทศ นอกจากนี้ยังจะสามารถพัฒนาพืชและสารผลิตผลของพืชเหล่านั้นให้เป็นอุตสาหกรรม และศึกษาพัฒนาเป็นยา และ/หรือสารเสริมสุขภาพ เช่น สารป้องกันการเกิดเนื้องอกหรือมะเร็งได้ในอนาคตได้อีกด้วย

ข้อมูลการศึกษาการควบคุมแมลงวันผลไม้โดยชีววิธีด้วยการใช้สารสกัดจากพืช (plant-based biological control) จากต่างประเทศและในประเทศไทยมีน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาอย่างเป็นระบบเชิงวิทยาศาสตร์ แต่มีการศึกษาการใช้สารสกัดพืชอื่นควบคุมแมลงชนิดอื่นๆ เช่น ใช้สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุล Labiatae เช่น สะระแหน่ โหรพา - *Ocium canuam*, *O. Basilicum* และ *O. gratissimum* และ แมงลักคา – *Hyptis suaveolens* (Keita, *et al.* 2000, 2001; Boeke, Baumgart, and van Loon 2003; Regnault-Roger, *et al*. 2004) ผกากรอง – *Lantana camara* สาบเสือ – *Chromolaena odorata* และต้นขี้วัว – *Ageratum conyzoides* (Bouda, *et al*. 2001) ควบคุมแมลงบางชนิด ใช้สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายประเภทควบคุมแมลงด้วง *Callosobruchus maculatus* ในยุ้งฉางเก็บผลิตผลการเกษตร และข้อมูลจากการศึกษาของกลุ่มผู้วิจัยเอง พบว่าสารสกัดจากแมงลักคาซึ่งเป็นวัชพืชที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมแมลงหนอนเจาะสมอฝ้าย (รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม, 2544) และ ยุงลายนำเชื้อไวรัสไข้เลือดออก (Tanprasit, 2005) ในการวิจัยนี้คาดว่าจะสามารถนำพืชหาง่ายที่มีการใช้ในการกำจัดแมลงโดยภูมิปัญญาพื้นบ้านอยู่บ้างแล้ว วัชพืช และพืชที่มีการแต่งตัดกิ่ง (prune) ทิ้งหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลแล้ว นำมาใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้ได้

2.2 แมลงวันผลไม้

แมลงวันผลไม้เป็นแมลงในวงศ์ เทฟริติดี้ (Tephritidae) แมลงในวงศ์นี้ประกอบด้วยแมลงวันที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชผักและผลไม้มากกว่า 4,000 ชนิด (polyphagous species) แมลงวันผลไม้กระจัดกระจายอยู่ในเขตหนาว เขตอบอุ่นและเขตร้อนของโลก ซึ่งคาดว่ามีมากกว่า 800 ชนิดที่พบในเขตภาคพื้นทวีปเอเชีย นอกจากทำลายผลไม้แล้ว แมลงวันผลไม้สามารถเข้าทำลายทุกส่วนของพืชได้ทั้งส่วนดอก ใบ ลำต้น หรือราก แมลงวันผลไม้พวกที่ทำลายส่วนของผลไม้ที่สำคัญได้แก่ แมลงวันผลไม้ชนิด แมลงวันแตง (*Bactrocera cucurbitae*) แมลงวันทอง (*B. dorsalis*) แมลงวันเมดิเตอร์เรเนียน (*Ceratitis capitata*) แมลงวันอัฟริกัน (*Anastrepha suspense*) และ แมลงวันฝรั่ง (*B. correcta*) ซึ่งล้วนเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญในเขตอบอุ่น และเขตร้อนของโลก ในขณะที่แมลงวันผลไม้ชนิด *Dioxyna sorrocula*, *Procecidochares utilis*, *Bactrocera caudata* พบทำลายพืชในส่วนของดอก บริเวณที่จะเจริญเติบโตเป็นเมล็ดต่อไป

แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย พบทำลายผลไม้ที่มีเปลือกบางหรืออ่อนนุ่ม เช่น ฝรั่ง ชมพู่ มะม่วง พุทรา กระท้อน มะเฟือง น้อยหน่า ฯลฯ แมลงวันจึงสามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนประชากรจากพืชอาศัยชนิดต่างๆ ในแต่ละท้องถิ่นได้เกือบตลอดทั้งปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูร้อนซึ่งมีผลไม้ออกจำหน่ายอย่างต่อเนื่อง ทำให้ผลไม้เน่าเสีย เก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้ และคุณภาพผลไม้ตกต่ำขายไม่ได้ราคา เกษตรกรจึงประสบปัญหาอย่างมากในการป้องกันกำจัด และทำให้การพ่นสารฆ่าแมลงของเกษตรกรไม่ค่อยได้ผลเท่าที่ควร นอกจากนี้ยังเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นปัญหาต่อการส่งออก ในประเทศที่มีกฎหมายกักกันพืชเข้มงวด เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ผลไม้ที่จะมีการนำเข้าประเทศต้องผ่านขบวนการกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยมาตรการอย่างใดอย่างหนึ่งก่อน เช่น อบไอน้ำร้อน รมยา เป็นต้น ดังนั้นความเสียหายจากแมลงวันผลไม้ จึงไม่เพียงแต่เกิดขึ้นกับผลไม้ก่อนเก็บเกี่ยวภายในแปลงเท่านั้น แต่มีผลต่อเนื่องมาจนถึงภายหลังการเก็บเกี่ยวแล้วอีกด้วย แมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญของประเทศไทยที่มักพบเสมอๆ ได้แก่ แมลงวันทอง *Bactrocera dorsalis* Hende (Figure 2.1) แมลงวันฝรั่ง *Bactrocera correcta* Saunders แมลงวันแตง *Bactrocera curcubitae* Coquillet (www.ezathai.org)

ในการวิจัยนี้เน้นการศึกษาการควบคุมโดยชีวภาพต่อแมลงวันทอง *Bactrocera dorsalis* ซึ่งโดยสามัญมักเรียกเป็นแมลงวันผลไม้ที่ทำความเสียมากต่อผลไม้เศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะม่วง มะละกอ ชมพู่ เป็นต้น การกำจัดแมลงวันผลไม้โดยชีววิธีด้วยสารสกัดจากพืชจะเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่จะสามารถช่วยลดจำนวนแมลงโดยไม่มีผลเสียหายต่อเกษตรกรเองและระบบนิเวศ นอกจากนี้การเลือกใช้วัชพืชและส่วนของพืชบางชนิดที่เหลือทิ้งหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตหลักแล้วมาประยุกต์ใช้ควบคุมแมลงจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชเหล่านั้นและเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรได้อีกทางหนึ่งด้วย

2.3 แมลงวันทอง (Oriental fruit fly – OFF)

Scientific name: *Bactrocera dorsalis* Hendel

Synonyms: *Dacus dorsalis* Hendel, *Chaetodacus ferrugineus* var. *okinawanus* Shiraki, *Musca ferruginea* Fabricius

อนุกรมวิธานของแมลงวันทอง

Taxonomic Rank

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Hexapoda

Subclass: Pterygota

Order: Diptera

Suborder: Brachycera

Family: Tephritidae

Genus: Bactrocera

Species: Dorsalis

แมลงวันทอง (Oriental fruit fly- OFF) ตัวเต็มวัยขนาดใหญ่กว่าแมลงหวี่เล็กน้อย ขนาดยาว 8 มิลลิเมตร ตาเขียว ลำตัวสีเหลืองสด มีรูป “T” สีดำบนปล้องท้องด้านหลัง ปีกใสมีจุดดำตามขอบด้านด้านหน้าและฐานปีก ตัวเมียรูปร่างเรียว มีอวัยวะวางไข่ Oviposotor ทรงกระบอกปลายแหลมยื่นที่ก้น ไข่ทรงกระบอก ขนาดเล็ก ตัวอ่อนสีครีมขาว ยาวประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ไข่เจริญในผลไม้ ตัวเต็มวัยดูดกินน้ำหวาน อาหารเน่าเสียหรือของเหลวอื่น มีชีวิตอยู่ได้ถึง 3 วันโดยมีน้ำ และ 6 วันโดยไม่มีน้ำและอาหาร คาร์โบไอเดรท ตัวเต็มวัยบินหาอาหารได้ไกล มีศัตรูธรรมชาติคือ ด้วง และต่อแตนกินไข่และตัวอ่อน (von Ellenrieder, 2004)

Figure 2.1 Adult female (left) and male (right) oriental fruit flies *Bactrocera dorsalis* Hendel

Source: Scott Bauer, USDA and von Ellenrieder, www.cdfa.ca.gov

2.3.1 วัฏจักรชีวิต (Life cycle) ของแมลงวันทอง

แมลงวันทอง – OFF – มีวัฏจักรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) และช่วงชีวิตสั้น หนึ่งรุ่นใช้เวลาประมาณ 30 วัน ทำให้มีแมลงหลายรุ่นซ้อนกันในหนึ่งปีและการระบาดรุนแรงเป็นระยะๆ ซึ่งทำความเสียหายทางเศรษฐกิจมาก ผลผลิตอาจเสียหายมากจนถึงเสียหายทั้งหมด วัฏจักรชีวิตของแมลงวันประกอบด้วยไข่ในผลไม้ หนอน 3วัย (instars) เจริญในผลไม้ หนอนออกจากผลไม้เข้าดักแด้ (pupa) ในดินแล้วออกเป็นตัวเต็มวัย ผสมพันธุ์และเจาะวางไข่ในผลไม้ต่อไป (Figure 2.2)

จะเห็นว่ามีช่วงชีวิตของแมลงวันผลไม้บางระยะที่สามารถควบคุมได้นอกผลไม้ โดยเฉพาะระยะหนอนทีกำลังออกจากผลไม้ ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัยที่สามารถถูกควบคุมได้โดยชีววิธี

ระยะไข่ Egg:

OFF ตัวเมียวางไข่ได้ 1,200 – 1,500 ฟองตลอดชีวิต และถ้าเงื่อนไขสมบูรณ์ ออกไข่ได้ถึง 3,000 ฟอง ตัวเมียใช้ ovipositor เจาะวางไข่ใต้ผิวผลไม้ ครั้ง 3-30 ฟอง ทำให้เกิดรอยแผลบนผลไม้ ไข่สีขาวขุ่น ขนาดประมาณ 1.17 x 0.21 mm ใช้เวลาฝักออกเป็นตัวอ่อนเฉลี่ย 1.6 วัน หรืออาจถึง 20 วันในฤดูหนาว (www.sccgov.org, www.simplykitchengarden.com)

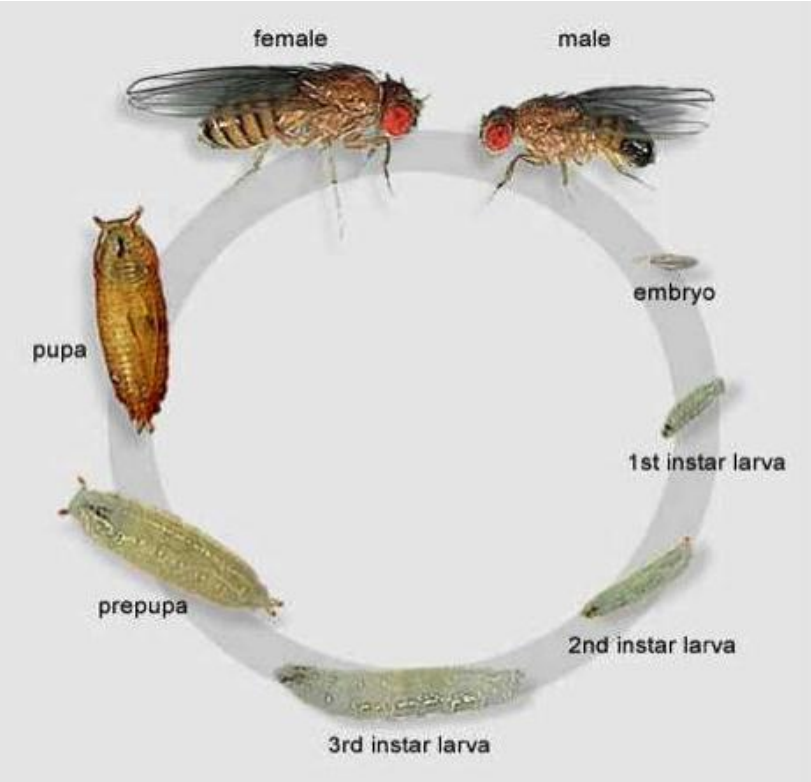

Figure 2.2 The life cycle of most *Tephritidae* species is similar. The female implants its eggs in the young fruit of the host plant. The larvae or maggots develop in the flesh of untreated fruit by digging tunnels. The growth of the larvae accelerates maturation of the fruit, which detaches and falls to the ground. The larvae leave the fruit and the pupae develop in the top layer of the soil. Upon emergence, the adult soon starts looking for the nourishment it needs to reach sexual maturity, couple, and lay eggs. Source: Toppest.typepad.com

ระยะตัวอ่อน Larva:

OFF ตัวอ่อนทรงกระบอกสีขาว ปลายด้านหน้าแคบ ปลายด้านหลังกว้าง มี 3 วัย (instar) วัยที่ 1 ขนาด 1.2 – 2.3 mm วัยที่ 2 ขนาด 2.5 – 5.7 mm วัยที่ 3 ขนาด 7.0 – 11.0 mm พัฒนาการตัวอ่อนใช้เวลาประมาณ 6 – 35 วัน โดยเฉลี่ย 7.8 วัน ตัวอ่อนจะออกจากผลไม้ลงสู่ดิน เจริญเป็นตัวอ่อนเต็มวัย หรือดักแด้ (pupa) ในดิน และพัฒนาเป็นตัวแมลงเต็มวัยในเวลา 8 – 12 วัน

ระยะดักแด้

ตัวอ่อนเต็มวัย หรือ ดักแด้ (pupa) ขนาดประมาณ 3.8 – 5.2 mm มีสีตั้งแต่น้ำตาลถึงเหลืองน้ำตาล หนอนออกจากผลไม้ ไต่ลงดินใต้ต้นไม้ พัฒนาการเป็นดักแด้ใช้เวลาประมาณ 10.3 วัน

ระยะตัวเต็มวัย:

OFF ตัวยาวประมาฯ 8.0 mm ปีกใสยาวประมาณ 7.3 mm สีแมลงอาจหลากหลาย ลักษณะเด่นคือที่หลังคาดด้วยแถบสีดำและแถบกลางลำตัวจากปล้องที่ 3 ไปถึงปลายปล้องท้องสีเหลืองถึงส้มและแถบสีดำรูป T shape ตัวเมียมี ovipositor ปลายแหลม ปล้องทรวงอกสีดำ ด้านข้างมี 2 แถบสีเหลือง ปีกใสไม่มีแถบ หลังออกจากดักแด้แล้ว ตัวเมียเต็มวัยอายุ 6-12 วันจึงวางไข่ ส่วนการผสมพันธุ์ใน 2-12 ชั่วโมง และตัวเมียผลิตไข่ได้ถึง 2 เดือน

2.3.2 การทำความเสียหาย

ตัวเมียเต็มวัยเจาะผลไม้เพื่อวางไข่ ตัวอ่อนกินผลไม้ แม้ตัวอ่อนไม่พัฒนาก็อาจทำให้ผลไม้เสียรูปทรงได้ รอยแผลที่ถูกเจาะอาจเป็นช่องทางเข้าทำลายของแบคทีเรียและเชื้อรา

2.3.3 การควบคุมและการจัดการแมลงวันทอง

การจัดการแมลงวันผลไม้เพื่อลดและป้องกันการสูญเสียผลผลิตจากศัตรูนี้มี 4 หลักการ คือ 1) การควบคุมทางกล - mechanical control 2) การควบคุมตามวิถีปฏิบัติ - cultural control 3) การควบคุมชีวภาพ - biological control 4) การกักกันหลังการเก็บเกี่ยว - post-harvest quarantine treatments และ 5) การควบคุมด้วยสารเคมี - chemical control (Ronald, Mau and Matin, 2007)

1) Mechanical control

การห่อผลไม้ด้วยถุง เก็บเกี่ยวผลผลิตเร็วขึ้น เป็นวิธีปฏิบัติทั่วไป แต่ทำได้กับพื้นเพาะปลูกขนาดเล็ก การดักจับและทำลายด้วยเหยื่อ (sampling & bait traps) เช่นใช้สาร methyl eugenol (4-allyl-1,2-dimethoxybenzene-carboxylate) ดึงดูดตัวผู้ร่วมกับยาฆ่าแมลง หรือใช้ cue-lure [4-(*p*-acetoxyphenyl)-2-butanone] (Vargas, *et al*., 2000; Weems, *et al*., 2010; Kumar, *et al*., 2011)

2) Cultural control

การทำให้สวนผลไม้สะอาดมีสุขลักษณะ (field sanitation) ตามปกติ เก็บและเผาผลไม้ที่ล่วง และการปลูกผลไม้สายพันธุ์ต้านแมลง

3) Biological control

การใช้ศัตรูธรรมชาติคือตัวห้ำ (กิน) หรือ ตัวเบียน (เป็นที่วางไข่หรืออาศัย) เช่น การใช้แมลงตัวเบียน Hymenopteran parasitoids ต่อไข่และตัวอ่อนของแมลงวัน หรือใช้เชื้อโรคทำให้ตัวเต็มวัยเป็นโรค ปีกตกบินไม่ได้ การทำหมันแมลงตัวผู้ (sterile insect technique - SIT) ด้วย gamma radiation เปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในสเปิร์มแล้วปล่อยเข้าสู่ไร่ผลไม้ให้ผสมพันธุ์กับตัวเมียปกติ แต่ไม่มีลูก ทำให้ลดประชากรแมลงในธรรมชาติ (Mcgovern, 1999; International Atomic Energy Agency, 1999; Follett, 2004) การใช้รา (Aemprapa, 2007) เกษตรกรในประเทศเขตร้อน เช่น ในทวีปอัฟริกาและอินเดียคุ้นเคยกับการใช้พืชขับไล่แมลงในยุ้งฉาง และควบคุมจำนวนประชากรแมลง โดยใช้พืชมีกลิ่นในวงศ์ Compositae (ดาวเรือง), Labiatae (แมงลักคา โหรพา กระเพรา), และ Piperaceae (พริกไท) โดยการอบด้วยน้ำมันสกัดโดยตรง หรือผสมกับดินโคลน (kaolin clay) (Bouda, *et al*., 2001) ในทวีปอเมริกาใช้สารสกัดจากพืชท้องถิ่น *Lonchocarpus* sp. มีสาร Rotenone และ Ryania sp. มีสาร Ryania กำจัดแมลงพืชผักหลายชนิด รวมทั้งแมลงปีกแข็ง (www.bbg.org) นอกจากนี้ การควบคุมโดยชีวภาพยังมีการสารสกัดจากพืชควบคุมแมลง ที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์บ้าง เช่น สารสกัดสะเดา (Singh and Singh, 1998) สารสกัดจากขิง (*Alpinia galangal*) ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscose*) (Sukhirin, Bullangpoti, and Pluempanupat, 2009) เหงือกปลาหมอ (www.sci.lru.ac.th) หูกวาง (Siderhurst and Jang, 2006) และ พริกไทยดำ (Tongon and Bullangpoti, 2009)

4) Post-harvest control

หลังการเก็บเกี่ยว อบผลไม้ในด้วยไอน้ำหรือแช่ในน้ำอุ่นหรือน้ำร้อน หรือการเก็บผลไม้ในอุณหภูมิต่ำเพื่อฆ่าแมลง (Phillps, *et al*., 1997)

5) Chemical control

การใช้สารพิษในเหยื่อล่อ และการพ่นยา ใช้สารโปรตีนร่วมกับสารฆ่าแมลง (Vargas and Prokopy, 2006) การรมด้วย methyl bromide (Benschoter and King, 1984) ใช้ Methyl eugenol ผสม Malathion (Vargas, *et al*., 2000)

เอกสารอ้างอิง

Aemprapa, S. (2007). Entomopathogenic funfi screening against fruit fly in Thailand. KMITL Sci. Tech. J. 7(S2):122-126.

Bennett, R.N. and Wallsgrove, R.M. (1994). Tansley Review No. 72: Secondary metabolites in plant defence mechanisms. Vm Phytol. 127:617-633.

Benschoter, C.A. and King, J.R. (1984). Large chamber fumigations with Methyl bromide to destroy Caribbean fruit fly in grapefruit. Proc. Fla. State Hort. Soc. 97:123-125.

Boeke, S.J., Baumgart, I.R. and van Loon, J.J.A. (2003). Toxicity and repellence of African plants traditionally used for the protection of stroed cowpea against *Callosobruchus maculatus*. J. Stored Products Res. Available online at www.sciencedirect.com

Bokonon-Ganta, A.H., McQuate, G.T., and Messing, R.H. (2007). Natural establishment of a parasitoid complex on *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Biological Control 42:365–373.

Bouda, H., *et al*. (2001). Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). J Stores Prod Res. 37:103-109.

Edwards, J.W., Lee, S-G, Heaht, L.M. nad Pisaniello, D.L. (2007). Worker exposure and a risk assessment of Malathion and Fenthion used in the control of Mediterranean fruit fly in South Australia. Envi Res. 103:38–45.

Follett, P.A. (2004). Irradiation to control insects in fruits and vegetales for export from Hawaii. Rad. Phys. and Chem. 71:161-164.

Hendrichs, J., Robinson, A.S., Cayol, J.P., and Enkerlin, W. (2002). Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: The importance of mating behavior studies. Florida Entomologist 85:1-13.

International Atomic Energy Agency. (1999). The matic plan for fruit fly control using the sterile insect technique, 121 pp.

Keita, S.M., et al. (2000). Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod Res. 36:355-364.

Keita, S.M., et al. (2001). Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. And *O. gratissimum* L. Applied as an insecticidal fumigant and power to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae] J. Stored ProdRes. 37:339-349.

King, J.R. and Benschoter, C.A. (1991). Comparative Methyl Bromide Residues in Florida Citrus: A Basis for proposing quarantine treatments against the Caribbean fruit fly. J. Agri. Food Chem.139:1307-1309.

Kumar, P., Shanmugam, V., Abubakar, AlmaLinda, A., and Ketelaar, J.W. (2011). 1-2-3 of fruit fly population monitoring (Agro-ecosystem Analysis): Guidelines for IPM Farmers and Trainers. Area-wide Integrated Pest Management of Fruit Flies in South and SE Asia Project, 17 pp. available online at http://ipm.ait.asia

Mcgovern, T. (1999). Oriental fruit fly cooperative eradication program, Environmental Assessment. USDA, Tampa, Florida, 9 pp.

Phillips, T.W., Sanxter, S.S., Armstromg, J.W., and Moy, J.H. (1997). Quarantine treatments for Hawaiian fruit flies: Recent studies with irradiation, heat and cold. In Proceedings of 1997 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. Available online at http://mbao.org/1997airc/117phillips.pdf

Regnault-Roge, C., Ribodeau, M, Hamraoui, A, Bareau, I., Blanchard, P., Gil-Munoz, M.-I., and Barberan, F.T. (2004). Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientation effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). J Stored Prod Res. 40: 395-408.

Ronald F.L. Mau, R.F.L. and Matin, J.L. (2007). *Bactrocera dorsalis* (Hendel). Available on line at http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/bactro_d.htm

Sengebau, F., Waqa, N., and Vueti, E.T. (2010). Fruit flies in Palau. Pest Advisory Leaflet No. 44, pp. 4.

Siderhurst, M.S. and Jang, E.B. (2006). Attraction of female oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, to *Terminalia catappa* fruit extracts in wind tunnel and olfactometer tests. Formosan Entomol. 26:45-55.

Singh, S. and Singh, R.P. (1998). Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). Phytoparasitica. 26(3):191-197.

Sukhirin, N., Bullangpoti, V., and Pluempanupat, W. (2009). The insecticidal studies from *Alpinia galanga* and *Cleome viscose* extract as alternative control tool to *Bactrocera dorsalis* (Hendel). KKU Sci. J. 37 (Sup) 71-76.

Theis, N. and Lerdau , M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. Int. J. Plant Sci. 164 (3 Suppl.) :S93–S102.

Tongon, N. and Bullangpoti, V. (2009). The insecticidal activity of *Piper nigrum* Linn, extract to oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* Hendel) and its effect on carboxylesterase and glutathione-S-transferase. In Proceedings of the 4th Conference on Science and Technology for Youth. 55-64.

Tanprasit, P. (2005). Biological control of Dengue fever mosquitoes (*Aedes aegypti* Linn.) using leaf extracts of chan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) and hedge flower (*Lantan camara* Linn.) Master of Science Thesis, Environmental Biology, Suranaree University of Technology. 77 pp. ISBN 974-533-548-7

Vargas, R.I., Stark, J.D., Kido, M.H., Ketter, H.M., and Whitehead. (2000). Methyl Eugenol and Cue-Lure Traps for Suppression of Male Oriental Fruit Flies and Melon Flies (Diptera: Tephritidae) in Hawaii: Effects of lure mixtures and weathering. J. Econ Entomol, 93(1): 81-87.

Vargas, R.I. and Prokopy, R. (2006). Attraction and Feeding Responses of Melon Flies and Oriental Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) to Various Protein Baits with and without Toxicants. Proc. Hawiian Entomol. Soc. 38: 49-60.

von Ellenrieder, N. (2004). Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* complex). California Department of Food and Agriculture. Available online at http://www.cdfa.ca.gov/phpps/ppd/PDF/bactrocera_dorsalis_complex.pdf

Weems, H.V., Heppner, J. B., Nation, J. L., and Fasulo, T. R. (2010). Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Insecta: Diptera: Tephritidae). Available online at http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/fruit/tropical/oriental_fruit_fly.htm

รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม 2544. ศึกษาความทนเค็ม ความแล้ง และความเป็นพิษของต้นแมงลักคา (*Hyptis suaveolens* Linn.) ต่อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*Heliothis armigera* Hubn.) วิทยานิพนธ์วิยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 123 หน้า ISBN 974-533-027-2

มนตรี จิรสุรัตน์ (2553). แมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด. สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย. Available online at http://www.ezathai.org/knowledge05.html

board.dserver.org: การทำหมันแมลง. Available online at http://board.dserver.org/w/webdoae/00001556.html

chumpoo.doae.go.th: การทำน้ำสกัดสมุนไพรกำจัดแมลง. Available online at http://chumpoo.doae.go.th/html

Toppest.typepad.com: Fruit flies. Available online at http://stoppests.typepad.com/ipminmultifamilyhousing/page/4/

www.bbg.org: Cranshaw, W. Natural Pesticides. Available online at www.bbg.org/gar2/topics/sustainable/handbooks/insectcontrol/7.html

www.doae.go.th: แมลงวันผลไม้. Available online at http://www.doae.go.th/pest/fruit/mango/masob.htm

www.tint.or.th: ทศพล แทนรินทร์ เทคนิคการใช้แมลงที่เป็นหมัน (SIT) Available online at http://www.tint.or.th/nkc/nkc5001/nkc5001w.html

www.sci.lru.ac.th: กิตติ ตันเมืองปึก Effect of sea holly (*Acanthus ilicifolius* Linn.) crude extract on mortality of oriental fruit fly (*Bactrocera correcta* Bezzi) in larval stage. Available online at www.sci.lru.ac.th/download/book2/2-7.pdf

www.simplykitchengarden.com: Oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis (Hendel) (Diptera: Tephritidae)*. Available online at http://www.simplykitchengarden.com/vegetablepests/98.html

www.sccgov.org: Oriental fruit fly fact sheet. Available online at http://www.sccgov.org/SCC/docs%2FAgriculture%2C%20Division%20of%20%28DIV%29%2Fattachments%2FOFFfactsheet.pdf

www.ezathai.org: แมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด 2010. Entomology and Zoology Association Thailand. Available online at http://www.ezathai.org/knowledge05.html

www.cdfa.ca.gov: Oriental Fruit Fly Pest Profile. Available online at http://www.cdfa.ca.gov/phpps/pdep/target_pest_disease_profiles/oriental_ff_profile.html

www.extento.hawaii.edu: *Bactrocera dorsalis* (Hendel). Available online at http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/bactro_d.htm.

www.thai.net: สมุนไพรป้องกันกำจัดศัตรูพืช. Available online at
http://www.thai.net/udagco/pesticide_herb.html
www.greenag.org: การใช้สารสกัดจากพืชควบคุมแมลงศัตรูพืช. Available online at
http://www.greenag.org/documents/100035.htm

บทที่ 3

คุณสมบัติทางพฤกษาเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิตของสารสกัดของสะเดา น้อยหน่าและ แมงลักคา

Phytochemical and Cytotoxic Properties of Neem, Custard Apple and Mintweed Extracts

3.1 คำนำ

พืชผลิตสารเคมี (phytochemicals) ทั้งชนิด primary metabolites และ secondary metabolites สาร primary metabolites หมายถึงสารที่ผลิตโดยกระบวนการ carboxylic acids ของ Krebs cycle, α-amino acids, carbohydrates, fats, proteins and nucleic acids และเป็นสารจำเป็น (essential) ต่อการดำรงชีพของพืช ซึ่งสิ่งมีชีวิตทั้งหมดมีเหมือนกัน ส่วนสาร secondary metabolites ของพืชเป็นสารเชิงซ้อนกลุ่มใหญ่หลายชนิด การผลิต secondary metabolites พืชใช้วิถีอื่นที่ไม่ใช่วิถีของ primary metabolites และ secondary metabolites เป็นวิถีเฉพาะตระกูล (family) หรือชนิดพันธุ์ (genus) ของพืชและมีความสัมพันธ์กับวิวัฒนาการของพืช ส่วนประกอบของสาร phytochemicals กลุ่มนี้จึงเฉพาะในแต่ละพืช ซึ่งสามารถใช้ secondary metabolites เป็นเครื่องมือในการจำแนกพืชด้วยพฤกษาเคมี (botanical classification หรือ chemotaxonomy) (Mann, 1987; Torssell, 1997) สาร secondary metabolites จึงเป็น non-essential metabolites ของชีวิตพืช แต่ช่วยเป็น species fitness สำหรับการดำรงชีพให้รอด เช่น ใช้เป็นสารเคมีป้องกันศัตรูพืช ป้องกันการถูกขูดขีด และ ป้องกันรังษีอุลตราไวโอเลท หรือ ใช้ช่วยในการผสมเกสร พืชสามารถผลิตสารพิษ หรือสารเลียนแบบสารที่ศัตรูพืชผลิต เช่น growth hormone หรือ pheromone สารที่ไม่เป็นทีพึงประสงค์ สารมีกลิ่นหอม สารลดการย่อยอาหารหรือการกินอาหารของศัตรูพืช สารไล่แมลง สารต้าน oxidation เป็นต้น

Phytochemicals เป็นสารเชิงซ้อนที่โมเลกุลซับซ้อนมาก มีมากกว่า 8,000 ชนิดที่จำแนกได้แล้ว เป็นผลจากการกลายพันธุ์ของพืช และแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างโมเลกุล ที่สำคัญคือสารในกลุ่ม alkaloids, Isoprenoids/Terpenes, Rubber-like Polymer/Polyisoprenes, Phenolic compounds, Rare amino acids/Tannin, Plant amines และ Glycosoides (Sensbusch, 2003)

Phytochemicals หลายชนิดเหล่านี้ทำหน้าที่ต่างๆ กัน ซึ่งอาจมีฤทธิ์เป็น (1) antioxidants ป้องกันเซลล์และลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในสิ่งมีชีวิต เช่น ally sulfides ในกระเทียม carotenoid, ในผลไม้ flavonoids ในผัก ผลไม้ และ polyphenols ในชาและองุ่น (2) hormone action, คล้าย hormone ของคน เช่น Isoflavones เป็น phytoestrogen (3) enzyme stimulants กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เช่น indoles ในถั่ว soy และ beans และ terpenes ในส้มและ berries (4) สารรบกวน DNA replication เช่น saponins ในถั่ว beans และ capsaicin ในพริก (5) anti-bacterial effect เช่น allicin ใน กระเทียม (6) physical action จับเยื่อเซลล์ป้องกันการจับติดของเชื้อโรค เช่น proanthocyanidins (www.phytochemicals.info) นอกจากนี้ phytochmicals จากพืชหลายชนิดมีศักยภาพในการควบคุมแมลง เป็นสาร antifeedants, relellents, growth feactors, growth inhibitors, attractants, chemosteriles หรือ insecticides เนื่องจากเป็นสารสลายง่ายในธรรมชาติ จึงมีศักยภาพเชิงพาณิชย์ที่จะใช้แทนสารสังเคราะห์ในการกำจัดแมลง ดังงานวิจัยนี้ได้ทดลองควบคุมแมลงวันทองด้วยสารสกัดใบสะเดา ใบน้อยหน่า และ ใบแมงลักคา

Phenolic compounds มีความสัมพันธ์กับ antioxidant activity เนื่องจากมีคุณสมบัติ reducing property เป็นสารให้ hydrogens หรือ electrons (hydrogen- or electron donating agents) ซึ่งสามารถประเมินได้จาก ศักยภาพการเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavengers) หรือเป็นต้านอ๊อกซิเดชั่น (antioxidants) Total phenolic compounds (TPC) สามารถทำหน้าที่เป็นสาร antioxidants ได้หลายวิถี ที่สำคัญคือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของ free radicals แม้มีความเข้มข้นน้อยกว่าสารที่ถูก oxidized หรือเกิด radicals บน TPC ซึ่งต้องเสถียรเพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ก้าวหน้าต่อไป (Halliwell *et al*., 1995) หรือ มีศักยภาพยับยั้งการเกิด radicals จากการเปลี่ยน metal-chelation (Rice-Evans, Miller and Paganga, 1997) ปริมาณ TPC มากอาจจะให้ radical scavenging activity สูง (Paixao *et al*., 2007)

3.1.1 สะเดา Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)

Classification: *Azadirachta indica* A. Juss.

Figure 3.1 Neem: *Azadirachta indica* A. Juss

Kingdom	*Plantae* – Plants
Subkingdom	*Tracheobionta* – Vascular plants
Superdivision	*Spermatophyta* – Seed plants
Division	*Magnoliophyta* – Flowering plants
Class	*Magnoliopsida* – Dicotyledons
Subclass	*Rosidae*
Order	*Sapindales*
Family	*Meliaceae* – Mahogany family
Genus	*Azadirachta* A. Juss. – azadirachta
Species	*Azadirachta indica* A. Juss. – neem

สะเดา (Figure 3.1) มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อรา (fungicide) (Geraldo, Arroteia, and Kemmelmeier, 2010) และหนอนตัวกลม (nematicide) (Schmutterer, 1995; Pundt, 2000) เป็นพิษต่อเห็บ (mite, *Tetramychus cinnabrinus*) (Mansour *et al*., 1997) สะเดาผลิตสารชื่อ azadirachtin มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลง ที่ยับยั้งการกิน การผลิตไข่ของ cockchafer (*Melolontha melolontha*) (Kaethner, 1991) และใช้ควบคุมหมัด (fleas) สุนัขและแมว (Guerrini and Kriticos, 1998) ด้วงเจาะรากกล้วย (Musabyimana *et al*., 2001) และอาจใช้สะเดาเป็นแหล่งธรรมชาติผลิตยา และ ผลิตสารกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Schmutterer, 1995; Agarwal, 1996; Alam, 1996; Mulla and Su, 1999; Joshi and Lockwood, 2000; Daniel, 2000; Kumar, 2002). นอกจากสาร azadirachtin ในใบและเปลือกสะเดายังพบมีสาร gallic acid, benzoic acid, *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, and *trans*-cinamic acid (Xuan *et al*., 2004)

3.1.2 น้อยหน่า Custard apple (*Annona. squamosa* L.)

Classification: *Annona squamosa* L.

Figure 3.2 Custard apple: *Annona squamosal* L.

Kingdom	*Plantae* – Plants
Subkingdom	*Tracheobionta* – Vascular plants
Superdivision	*Spermatophyta* – Seed plants
Division	*Magnoliophyta* – Flowering plants
Class	*Magnoliopsida* – Dicotyledons
Subclass	*Magnoliidae*
Order	*Magnoliales*
Family	*Annonaceae* – Custard-apple family
Genus	*Annona* L. – annona
Species	*Annona squamosa* L. – custard apple / sugar apple

น้อยหน่าเป็นพืชผลไม้ในกลุ่ม custard apple family ในประเทศไทยเพาะปลูกน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annoana squamosa* (Figure 3.2) สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย ethanol และ methanol มีฤทธิ์กำจัด ด้วง pulse (*Callosobruchus chinensis*) ได้ถึง 100% (Al-Lawati *et al*., 2002) และ กำจัดด้วง khapra (*Trogoderma granarium*) (Rao, Sharma, and Sharma, 2005) สารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่ายังสามารถควบคุมแมลงได้อีกหลายชนิด เช่น เพลี้ย หนอนฝ้าย ตั๊กแตน มด แมลงหวี่ (www.oisat.org) สารเคมีในผลน้อยหน่าประกอบด้วย diterpenoid compound kaur-16-en-18-oic acid, α-pinene, sabinene และ limonene (Andrade *et al*., 2001) ในสารสกัดใบด้วย petroleum ether ประกอบด้วย n-alkanes, n-alkanols, 16-hentriacontanone, and sterols ซึ่งพบมีฤทธิ์ต้าน gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, และ *Streptocorus viridans*) และต้าน gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas pvocyanea*, และ *Klebsiella* (Patel and Kumar, 2008)

3.1.3 แมงลักคา Mintweed (*Hyptis suaveolens* L., Poit)

Classification: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

Kingdom	*Plantae* – Plants
Subkingdom	*Tracheobionta* – Vascular plants
Superdivision	*Spermatophyta* – Seed plants
Division	*Magnoliophyta* – Flowering plants
Class	*Magnoliopsida* – Dicotyledons
Subclass	*Asteridae*
Order	*Lamiales*
Family	*Lamiaceae* – Mint family
Genus	*Hyptis* Jacq. – bushmint
Species	*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. – mintweed / chan / pignut

Figure 3.3 Mintweed: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

แมงลักคา (Figure 3.3) เป็นพืชสมุนไพร ใช้รักษาอาการติดเชื้อในข อาการผิวหนังติดเชื้อ (Wulff, 1987) แมงลักคามีฤทธิ์แรงต่อเชื้อราในโรงเก็บอาหาร (stored food commodities) (Mishra and Dubey, 1994) มีฤทธิ์ต้าน bacteria ทั้ง gram-negative และ gram-positive (Asekun *et al*.,1999; Nantitanon, Chowwanapoonpohn and Okonogi, 2007) ควบคุม เพลี้ย *Aphis gossypil* Glov. และ *Orthaga* sp. (กนก อุไรสกุล, 2540) ควบคุม American ballworms (*Heliothis armigera* Hubn.) (รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม, 2544) แมลงในโรงเก็บผลิตผล (Palsson and Jaeson, 1999) และยุง (Tanprasit, 2005) ประชาชนพื้นเมืองในหลายพื้นที่ของโลกใช้ใบแมงลักคารมไฟให้เกิดควันไล่แมลง (Aycard *et al*., 1993) ใน essential oil สกัดจากแมงลักคามีสารประกอบหลักคือ 1,8-cineole, β-pinene, sabinene, β-caryophyllene, α-pinene, 4-terpinenol, α-berganmotene, limonene, biclyclogermacrene, β-phellandrene and, α-copaene, β-elemene, and eugenol (Preezada, 1997)

3.2 วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อวิเคราะห์หา ปริมาณ total phenolic compounds (TPC) รูปแบบการแยกของสารพฤกษาเคมี (TLC fingerprints) คุณสมบัติเป็นสารต้านอ๊อกซิเดชั่น (antioxidant) และศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบและเมล็ดแมงลักคา โดยเปรียบเทียบคุณสมบัติเหล่านี้จากสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ทั้งนี้เพื่อเป็นการตรวจคุณสมบัติเบื้องต้นของพฤกษาเคมีจากพืชเหล่านี้ก่อน ศึกษาการควบคุมโดยชีวภาพต่อแมลงวันทอง

3.3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.3.1 วัสดุและสารเคมี

Folin Ciocalteu's phenol reagent, DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl radical) และ TLC sheet, pre-coated silica gel $60F_{254}$ จาก Merck, Germany เครื่องสกัด universal extraction Buchi model B811 จาก Buchi, Germany, Lyophilizer ของ LabConco, U.S.A., *Artemia salina* จาก Sandders™ Great Salt Lake, Brine shrimp company, U.S.A. และสารเคมีมาตรฐานระดับงานวิเคราะห์

3.3.2 แหล่งของพืชและการสกัด

ใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลักคา และ เมล็ดแมงลักคา เก็บในป่าบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรานารีและบริเวณใกล้เคียงรอบๆ มหาวิทยาลัยฯ ทำความสะอาดใบพืช สับละเอียด อบแห้งที่ 45°C 2 วัน ส่วนเมล็ดแมงลักคา แช่น้ำและกำจัดเมือกโดยการเอาเมล็ดถูก/ขูดกับกะซอนเหล็ก แล้วอบแห้ง บดใบพืชและเมล็ดแห้งให้เป็นผงละเอียด

นำ พืชบด 10 กรัม สกัดในน้ำหรือ 95% ethanol ในเครื่องสกัดอัตโนมัติ universal extraction ที่อุณหภูมิสูงกว่า 100° C ระเหยสารสกัดหยาบ และทำแห้งด้วย lyophilier ที่ -54°C เก็บผงสกัดที่ -20°C ระหว่างการทดลองสารสกัดที่ทำสารละลายแล้วเก็บที่ 4°C

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenoloic compounds - TPC) ของสารสกัดใบสะเดา (neem leaf extract - NLE) สารสกัดใบน้อยหน่า (custard leaf extract – CLE) สารสกัดใบแมงลักคา (mintweed leaf extract – MLE) และ สารสกัดเมล็ดแมงลักคา (mintweed seed extract – MSE) วัดโดยวิธี Folin Ciocalteu's method (Swain and Hills, 1959; Matthaus, 2002). ละลายสารสกัดและสารมาตรฐานใน methanol

นำสารละลายตัวอย่าง 100 μL ใส่ใน 2 mL ของ Sodium carbonate บ่ม 2 นาที แล้วใส่ 100 mL Folin Ciocalteu's phenol reagent ซึ่งละลายใน methanol (1:1) บ่ม 30 นาที วัด absorbance ที่ A_{750} nm ใช้ pure gallic acid เป็นสารมาตรฐานเทียบ ทำ triplicate และ แสดงปริมาณของ total phenolic compounds เป็น milligram gallic acid equivalent (GAE)/L

3.3.4 Antioxidant activity โดย DPPH assay

วิเคราะห์คุณสมบัติ antioxidation ของสารสกัดโดยวัดจาก free radical scavenging activity ต่อ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl radical) (sigma-Aldrich) ด้วยวิธีของ Brand-Williams *et al.*, (1995) และ Sanches-Moreno, Larrauri and Saura-Calixto (1999) โดยปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ใช้ gallic acid เป็น positive control และ methanol เป็น negative control เตรียมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้น 31.5, 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 ppm ใน methanol นำ 0.5 ml สารสกัดละลาย ใส่ในสารละลายซึ่งมี 0.2 mM DPPH ใน 1 ml methanol ผสมให้เข้ากันและเก็บในที่มืด 30 นาที วัดการดูดแสงที่ A_{517} nm ใช้ methanol เป็น blank และแต่ละความเข้มข้นทำ triplicate คำนวณหา percent ของ $DPPH^{\bullet}$ radicals ที่เหลือจากสูตรข้างล่าง

$$\%\ DPPH^{\bullet}_{R} = \frac{DPPH^{\bullet}_{t}}{DPPH^{\bullet}_{t=0}} \times 100$$

$DPPH^{\bullet}_{R}$ ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ ที่

$DPPH^{\bullet}_{t}$ ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ ที่เวลา t

$DPPH^{\bullet}_{t=0}$ เป็นความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ ที่เวลา 0 (zero time)

แสดงผลเป็น % $DPPH^{\bullet}$ ที่หายไป ณ เวลาที่ตรวจหา ดังนั้น % ของ $DPPH^{\bullet}$ radical scavenging activity หรือ % radical inhibition ของสารสกัดคำนวณจากสูตรข้างล่างนี้

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = 1 - \frac{A_{SAMPLE}}{A_{CONTROL}} \times 100$$

A_{SAMPLE} คือ absorbance ของสารละลายเมื่อมี extract

$A_{CONTROL}$ คือ absorbance ของสารละลาย $DPPH^{\bullet}$

Radical scavenging activity ของสารสกัดตัวอย่างแสดงเป็นความเข้มข้นของสารสกัด (ppm) ที่ลดปริมาณ $DPPH^{\bullet}$ ตั้งต้นไป 50% หรือเป็น 50% inhibitory concentration (IC_{50})

3.3.5 Thin layer chromatography (TLC) fingerprinting

Spot สารสกัด 5 µl ด้วย capillary บน TLC sheet (2.5 x 7 cm) ซึ่ง pre-coated ด้วย silica gel $60F_{254}$ หนา 0.25 mm ณ ตำแหน่งห่างจากปลายแผ่น 1 cm นำ spotted sheet วางใน 125 ml beaker บรรจุ 10 ml solvent system ซึ่งเป็น mobile phase ในการทดลองนี้ใช้ 3 solvent systems ที่เหมาะสมที่สุด คือ Ethyl acetate : methanol : water (81:11:8 v/v/v), n-buthanol : glacial acetic : water (40:10:50 v/v/v), and chloroform : methanol : glacial acetic acid (47.5:47.5:5 v/v/v) จากนั้นปิด beaker ป้องกันสารละลายระเหย ปล่อยให้ solvent วิ่งขึ้นถึงประมาณ 1 cm จึงนำ TLC sheet ออก ทำให้แห้ง และตรวจหาสารด้วยแสง UV ที่ A_{254} nm วัดระยะทางเคลื่อนที่ของสารบน TLC sheet คำนวณระยะทางเคลื่อนที่สัมพัส (R_f) และถ่ายภาพเป็นหลักฐาน

$$R_f = \frac{\text{Distance from start to center of sustance spot (cm)}}{\text{Distance from start to solvent front (cm)}}$$

3.3.6 ทดสอบความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (cytotoxicity) โดย Brine shrimp lethal assay (BSLA)

วิเคราะห์ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Brine Shrimp Lethal Assay (BSLA) (McLaughlin and Rogers, 1998) โดยเตรียมน้ำทะเลเทียม (120 g/l) ในกล่องซึ่งกันเป็น 2 ช่องไม่เท่ากัน เพาะกุ้งฝอย (brine shrimp – *Artemia salina*) โดยใส่ไข่แห้ง (cysts) 1g/500ml ในช่องเล็ก ปิดช่องนี้เพื่อกันแสงด้วยกระดาษดำ เลี้ยง brine shrimp ที่ 25°C ประมาณ 24 ชั่วโมง ได้ตัวอ่อน nauplii ส่องไฟที่ช่องใหญ่เพื่อดึงดูดตัวอ่อน nauplii ออกมาจากที่เพาะไข่ในช่องเล็ก (Figure 3.4)

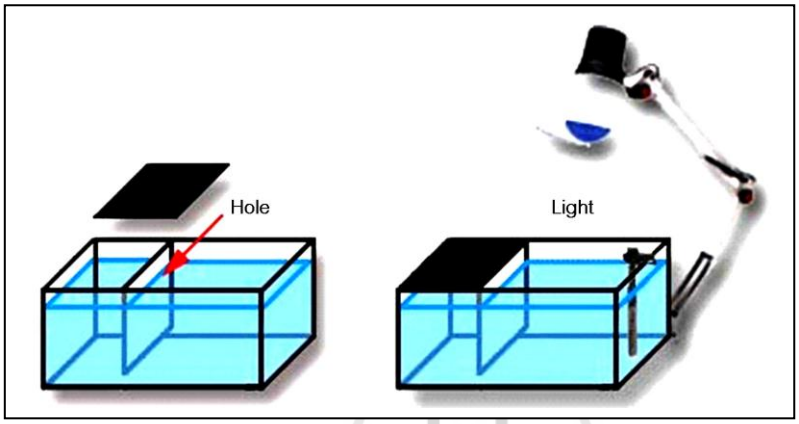

Figure 3.4 The two-chamber container with a perforate divider and light. The smaller chamber was for brine shrimp egg hatching. The larger chamber was for the nauplii, migrated toward the light.

ถ่ายย้าย 10 nauplii/10 µl ใส่ในหลุมของ 24-well plate (Solis *et al*., 1993) ซึ่งบรรจุ 4 mL น้ำทะเลเทียมที่มีสารสกัดใบสะเดา (NLE) ใบน้อยหน่า (ALE) ใบแมงลักคา (MLE และ เมล็ดแมงลักคา (MSE) ซึ่งละลายใน 0.01% DMSO ที่ 10 - 1000 ug/mL เลี้ยงต่อ และนับจำนวน nauplii ตายที่ 24 ชั่วโมง ทดลอง 6 replicates คำนวณหา % corrected mortality ด้วย Abbot's formula (Abbott, 1925)

$$\text{Corrected \%} = \left(1 - \frac{\text{n ใน T หลัง treatment}}{\text{n ใน Co หลัง treatment}}\right) * 100$$

n = Insect population , T = treated , Co = control

วิเคราะห์หา 50% lethal concentration (LC_{50}) โดย Probit Analysis (Finney, 1971)

3. 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

3.4.1 สารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds - TPC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging - FRS) ของสารสกัด

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic contents - TPC) ในสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ใบสะเดา (NLE/w, NLE/e) ใบน้อยหน่า (CLE/w, CLE/e) ใบแมงลักคา (MLE/w, MLE/e) และเมล็ดแมงลักคา (MSE/w, MSE/e) แสดงใน Table 3.1 TPC ในสารสกัดเรียงจากมากไปน้อยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ NLE/e > CLE/w > NLE/w > CLE/e > MSE/w > MLE/w > MLE/e > MSE/e ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 338 ± 41.83, 309 ± 44.45, 297 ± 31.67, 261 ± 30.74, 254 ± 30.51, 251 ± 31.55, 245 ± 26.48 และ 179 ± 13.38 mgGAE/L ตามลำดับ

Table 3.1 Total phenolic compounds and free radical scavenging by DPPH of the water and ethanolic leaf and seed extracts of neem, custard apple and mintweed.

Plant part	Extract	Total phenolic compounds (mgGAE/L) Mean ± S.D., n = 5	Radical scavenging inhibition, DPPH (IC_{50}) (ppm) Mean ± S.D, n = 5
Neem leaf	NLE/w	297 ± 31.67*	172.99 ± 4.53*
	NLE/e	338 ± 41.83*	211.53 ± 8.61*
Custard apple leaf	CLE/w	309 ± 44.45*	163.55 ± 8.99*
	CLE/e	261 ± 30.74*	218.62 ± 3.64*
Mintweed leaf	MLE/w	251 ± 31.55	288.92 ± 13.91
	MLE/e	245 ± 26.48	226.39 ± 6.22
Mintweed seed	MSE/w	254 ± 30.51*	156.44 ± 3.99
	MSE/e	179 ± 13.28*	155.48 ± 7.06

N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol
t-Test analysis of variance, n = 5 and *significant difference between same plant ($P < 0.05$)

ปริมาณ TPC ของสารสกัดใบสะเดาด้วย ethanol มากกว่าสกัดด้วยน้ำ (NLE/e > NLE/w = 1.14) เท่า TPC ของสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำมีมากกว่าสกัดด้วย ethanol (CLE/w > CLE/e = 1.18 เท่า) TPC ของใบแมงลักคาสกัดด้วยสารทะละลายทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันมาก (MLE/w ≅ MLE/e) ในขณะที่ TPC ของเมล็ดแมงลักคาสกัดด้วยน้ำมากกว่าสกัดด้วย ethanol (MSE/w > MSE/e = 1.14 เท่า) TPC ของสารสกัดจากแมงลักคามีปริมาณมากเมื่อใช้น้ำเป็นสารทำละลาย อาจเป็นเพราะสารมี polarity มากกว่า (Goli *et al*., 2005)

DPPH เป็นสารให้ hydrogen หรือรับ electron ได้เป็น radical ฤทธิ์ต้าน/กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ของสารสกัดของพืชทั้งสามชนิดสามารถวัดได้จากการใช้ $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งเป็น free radicals ที่พร้อมจะรับ electrons หรือ hydrogen radicals เพื่อทำให้ $DPPH^{\bullet}$ เป็นโมเลกุลเสถียร สารสกัดจากพืชซึ่งส่วนมากเป็น phenolic compounds จะทำปฏิกิริยากับ $DPPH^{\bullet}$ ทำให้ได้ DPPH โมเลกุลเสถียร ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งหรือกำจัด $DPPH^{\bullet}$ ได้ 50% หรือ 50% inhibition concentration (IC_{50}) แสดงใน Table 3.1 ประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดเรียงจากมากไปหาน้อย หรือโดยเรียงค่า IC_{50} จากค่าน้อยไปมากดังนี้ MSE/e > MSE/w > CLE/w > NLE/w > NLE/e > CLE/e > MLE/e > MLE/w ซึ่งมีค่า IC_{50} 155.48 ± 7.06; 156.44 ± 3.99; 163.55 ± 8.99; 172.99 ± 4.53; 211.53 ± 8.61; 218.62 ± 3.64; 226.39 ± 6.22 และ 288.92 ± 13.91 ppm (ug/mL) ตามลำดับ

ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบสะเดา NLE/w เท่ากับ 172.99 ± 4.53 ppm ค่า IC_{50} ของ NLE/e เท่ากับ 211.53 ± 8.61 ppm (Figure 3.5 A) ค่า IC_{50} ของ NLE/w < NLE/e 1.22 เท่า นั่นคือ NLE/w มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า NLE/e อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบน้อยหน่า CLE/w เท่ากับ 163.55 ± 8.99 ppm ค่า IC_{50} ของ CLE/e เท่ากับ 218.62 ± 3.64 ppm (Figure 3.5 B) CLE/w มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า CLE/e 1.34 เท่า ($P < 0.05$)

ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบแมงลักคา MLE/w เท่ากับ 288.92 ± 13.91 ppm ค่า IC_{50} ของ MLE/e เท่ากับ 226.39 ± 6.22 ppm (Figure 3.5 C) ซึ่งประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน

ค่า IC_{50} ของสารสกัดเมล็ดแมงลักคา MSE/w เท่ากับ 156.44 ± 3.99 ppm และค่า IC_{50} ของ MSE/e 155.48 ± 7.06 ppm (Figure 3.5 D) ประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน

สารสกัดเมล็ดแมงลักคา MSE แสดง free radical scavenging activity สูงกว่าสารสกัดพืชอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดใบและเมล็ด

แมงลักคา ประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระของ MSE/w > MLE/w 1.85 เท่า และ MSE/e > MSE/e 1.55 เท่า

มีหลักฐานแสดงสารสกัดสะเดาจากเปลือกและใบสะเดาจากเชิงเขาของประเทศเนปาลมีศักยภาพเป็น radical scavenger กำจัด DPPH$^{\bullet}$ ต่างๆ กันขึ้นกับชนิดสารทำละลาย แต่ปริมาณ TPC ไม่ต่างกัน สารสกัดเปลือกสะเดาด้วย hexane กำจัด DPPH$^{\bullet}$ ได้ 10 เท่า ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบสะเดาด้วยน้ำกำจัด DPPH$^{\bullet}$ ได้ 3 เท่าดีกว่าสารสกัดด้วย methanol และ ดีกว่าสารสกัดด้วยอนุพันธุ์ของสารแอลกอฮอล์อื่นๆ (Ghimeray, 2009) ซึ่งผลต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสะเดาจากหลักฐานนี้สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตามสาร azadirachtin ซึ่งเป็น active compound ของสะเดาในสารสกัดด้วย 80% methanol สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำถึงเกือบ 200 เท่า Manjula (2011) พบว่าในสะเดาอินเดียที่ใช้ในทางการแพทย์ สกัดด้วย ethanol, methanol มีปริมาณ TPC ประมาณ 1.7 เท่ามากกว่าสกัดด้วยน้ำ แต่ความสามารถเป็น radical scavenger ของสารสกัดด้วยสารละลายทั้ง 3 ชนิดนี้ (ethanol, methanol และน้ำ) ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าใบสะเดาไทยจาก 13 จังหวัดจากทุกภาคของประเทศไทย สกัดด้วยน้ำมีปริมาณ TPC แสดงความสัมพันธ์ผกผันกับ radical scavenging activity และสัมพันธ์กับพื้นที่ปลูกสะเดา (Sithisarn and Gritsanapan, 2005; Sithisarn *et al*., 2007)

ประเทศในเขตร้อน นำทุกส่วนของน้อยหน่าไปใช้ทางการแพทย์พื้นบ้าน รักษาหลายโรคเช่น โรคบ้าหมู (epilepsy), บิด (dysentery), หัวใจ (cardiac problems), หน้ามืด (fainting), พยาธิ์ (worm infestation), ท้องผูก (constipation), เลือดออก (hemorrhage), ปัสสาวะขัด (dysuria), ไข้ กระหายน้ำ เนื้องอกร้ายแรง (malignant tumors), แท้งลูก (abortifacient) และแผลในอวัยวะทางเดินอาหาร (ulcer) (Yadav *et al*., 2011) และพบว่าน้อยหน่าเป็นแหล่งสำคัญของสาร antioxidants ในธรรมชาติสำหรับรักษาโรคได้ ปริมาณ TPC ของสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำซึ่งเป็นสาร polar solvent ให้ผล free radical scavenging ด้วย DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดด้วย ethanol ซึ่งเป็นสาร non-polar solvent (Kothari and Seshadri, 2010) ผลการวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ก็พบเช่นกัน อย่างไรก็ตาม สารสกัดใบด้วย ethanol ของน้อยหน่าสายพันธุ์ *A. squamosa* กำจัด DPPH$^{\bullet}$ ได้ดี (Vanitha *et al*., 2010) แต่ยังได้น้อยกว่า *A. reticulate และ A. muricata* (Baskar, Rajeswari and Kumar, 2007)

ในการศึกษานี้ พบว่าประสิทธิภาพ free radical scavenging ของสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาด้วยน้ำดีกว่า (IC_{50} น้อยกว่า) สกัดด้วย ethanol และ IC_{50} ผกผันกับปริมาณของ TPC ดังจะเห็นได้จากสารสกัดเมล็ดแมงลัก MSE/e มี TPC น้อยที่สุด และแสดง IC_{50} ของ antioxidant activity โดย DPPH assay น้อยที่สุด นั่นคือ สารสกัดของแมงลักคาสกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพ free radical scavenging activity สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และ สูงกว่าสารสกัดพืชอื่นๆ มีหลักฐานพบสารสกัดแมงลักคาส่วนใบ

(Narayanaswamy and Balakrisnan, 2011) และ ส่วนเหนือดิน (aerial parts) (Khomdram and Singh, 2011) สกัดด้วยน้ำและ ethanol ของ *H. suaveolens* มีค่า IC_{50} ของ antioxidant activity ผกผันกับ TPC ซึ่งสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

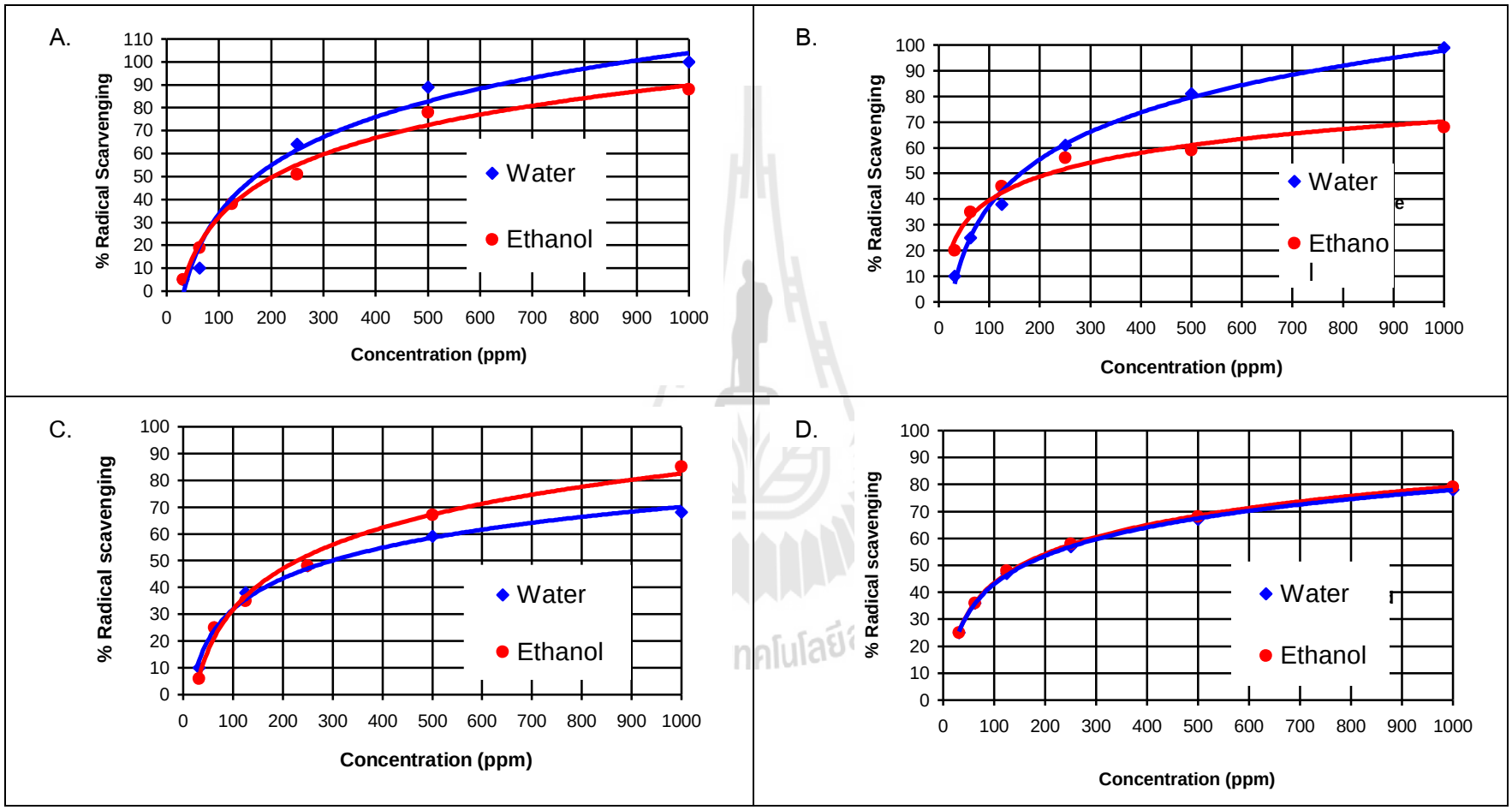

Figure 3.5 Radical scavenging of crude extracts of neem leaves (panel A), custard apple leaves (panel B), mintweed leaves (panel C), and mintweed seeds (panel D).

3.4.2 Thin layer chromatographic (TLC) fingerprinting

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้หารูปแบบการแยกของสารพฤกษาเคมี (fingerprint profile) โดยเปรียบ เทียบจากระบบ mobile phase ซึ่งเป็นสารทำละลายที่นำสารพฤกษาเคมีให้เคลื่อนที่แยกกันด้วยระยะทางต่างกันแล้วแต่คุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิด ในการศึกษานี้ได้ทดลองใช้ mobile phase systems จนได้ 3 ระบบที่เหมาะสมสามารถแยกสารสกัดได้ คือ System A ประกอบด้วย ethyl acetate : methanol : water ในอัตราส่วน 81:11:8 (v/v/v) System B ประกอบด้วย n-buthanol : gracial acetic acid : water ในอัตราส่วน 40:10:50 (v/v/v) และ System C ประกอบด้วย chloroform : methanol : gracial acetic acid ในอัตราส่วน 47.5:47.5:5 (v/v/v) จะเห็นได้ว่า mobile phase 3 systems นี้สามารถแยกสารเคมีในสารสกัดของใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลักคา และ เมล็ดแมงลักคาได้ต่างกัน และได้แถบเฉพาะของสารสกัดตาม mobile phase system นั่นคือ สารสกัดใบสะเดาแยกใน mobile system A หรือ B หรือ C แยกได้ Fingerprints ของ NLE/w คล้ายของ NLE/e (Figure 3.6) ในทำนองเดียวกัน Fingerprints ของ CLE/w คล้ายของ CLE/e (Figure 3.6) Fingerprint ของ MLE/w คล้ายของ MLE/e และ Fingerprint ของ MSE/w คล้ายของ MSE/e (Figure 3.7) การเคลื่อนที่ของสารพฤกษาเคมีของสารสกัดใน mobile phase system แยกออกจากกันเป็นแถบซึ่งมีระยะทางเคลื่อนที่สัมผัส หรือ R_f บนแผ่น TLC ต่างๆ กันดังแสดงใน Table 3.2 จะสังเกตเห็นสารที่สกัดด้วยน้ำมี polarity สูงกว่าจะ adsorbed บนแผ่น TLC แน่นกว่าสารสกัดด้วย ethanol เป็นผลให้ได้ค่า R_f ต่ำ ยกเว้น สารสกัดของใบแมงลักคาที่ค่า R_f ใกล้เคียงกัน และเมื่อตรวจดูแถบด้วยแสง UV ที่ A_{365} nm แถบของสารปรากฏสีแตกต่างกัน (Table 3.2)

Thin layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคในการตรวจหาเบื้องต้นของสารสกัดตัวอย่างพืชสมุนไพร เพื่อให้รู้ characteristic fingerprints เบื้องต้นของพืชสมุนไพรนั้นๆ ก่อนที่จะใช้เทคนิคระดับสูง เช่น high performance chromatography TLC fingerprinting จึงเป็นวิธีที่สะดวกในการหาเชิงคุณภาพ (quality) กึ่งปริมาณ (semiquantity) และใช้ตรวจหาสิ่งเจือปนในสารประกอบของพืชสมุนไพรด้วย TLC fingerprinting ยังใช้วิเคราะห์พืชสมุนไพรที่ใกล้สูญพันธุ์ (endangered medicinal plants) ในอัฟริกาใต้ ใช้หลักฐานของ TLC fingerprints วิเคราะห์หาส่วนต่างๆ ของพืช เพื่อเอาส่วนต่างๆ เหล่านั้นใช้ทดแทนกัน โดยเปรียบเทียบ R_f ของ TLC chromatogram ภายใต้แสงสว่าง (VIS) UVที่ A_{254} nm และ A_{365} nm (Zschocke *et al*., 2000) และใช้วิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของพืชสมุนไพรที่เกิดจากการเก็บ ตั้งแต่พืชสดจนถึงอายุเก็บ 5 ปี (Stafford, Jager, and van Staden, 2005) TLC fingerprint ยังใช้ร่วมกับการวิเคราะห์หา free radical scavenging activity ของสารสกัดได้ด้วย (Lavhale and Mishra, 2007) และใช้ TLC fingerprint ตรวจหาสารสำคัญในสารสกัดพืชโดยเทียบค่า R_f กับสารมาตรฐานบริสุทธิ์ (Cui *et al*., 2005; Anandjiwala *et al*., 2007)

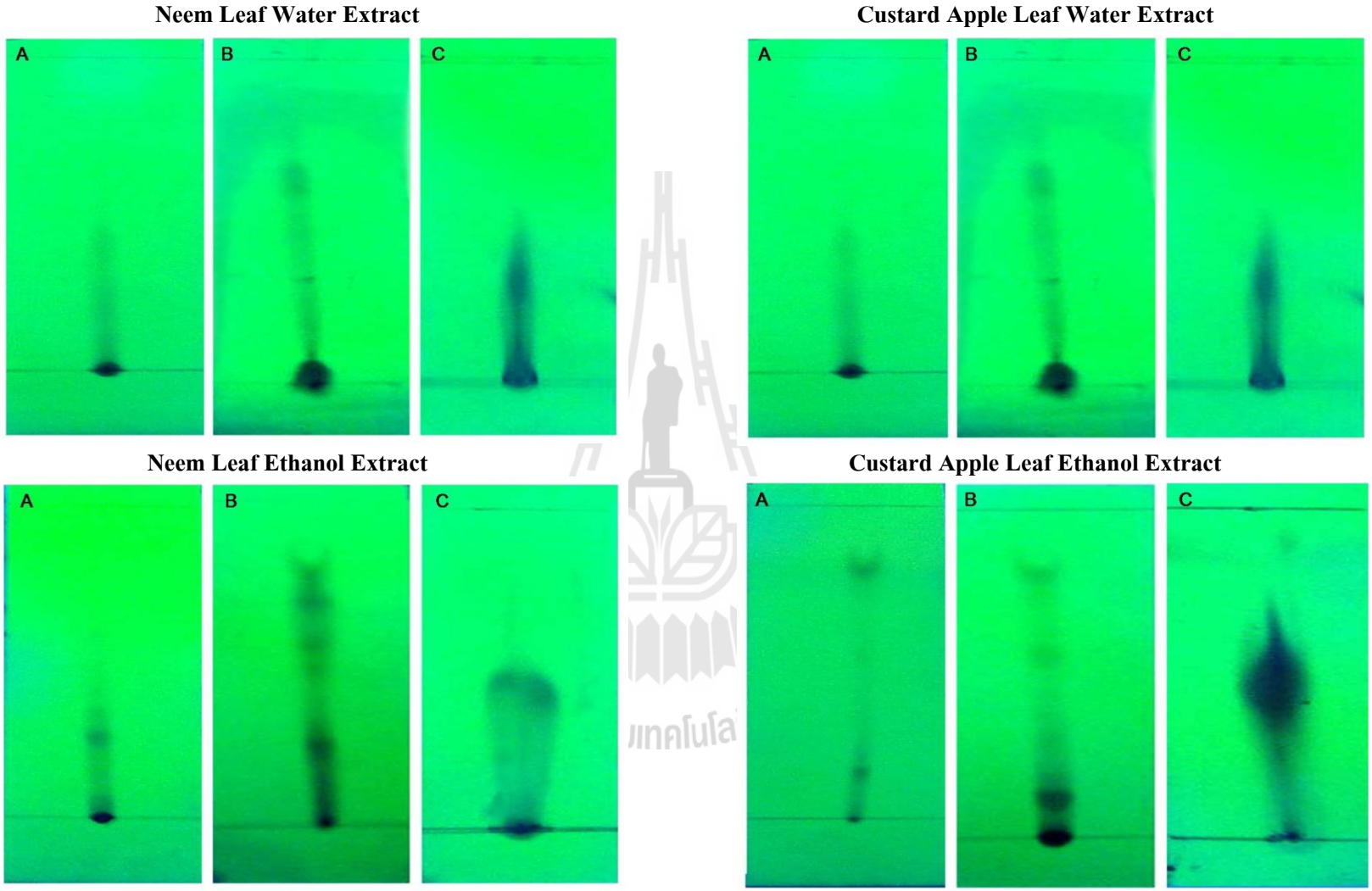

Figure 3.6 Thin layer chromatographic fingerprints of neem leaf extracts and custard apple leaf extracts.

A, mobile phase system composed of ethyl acetate : methanol : water at proportion of 81:11:8 (v/v/v)

B, mobile phase system composed of n-buthanol : gracial acetic acid : water at proportion of 40:10:50 (v/v/v)

C, mobile phase system composed of chloroform : methanol : gracial acetic acid at proportion of 47.5:47.5:5 (v/v/v)

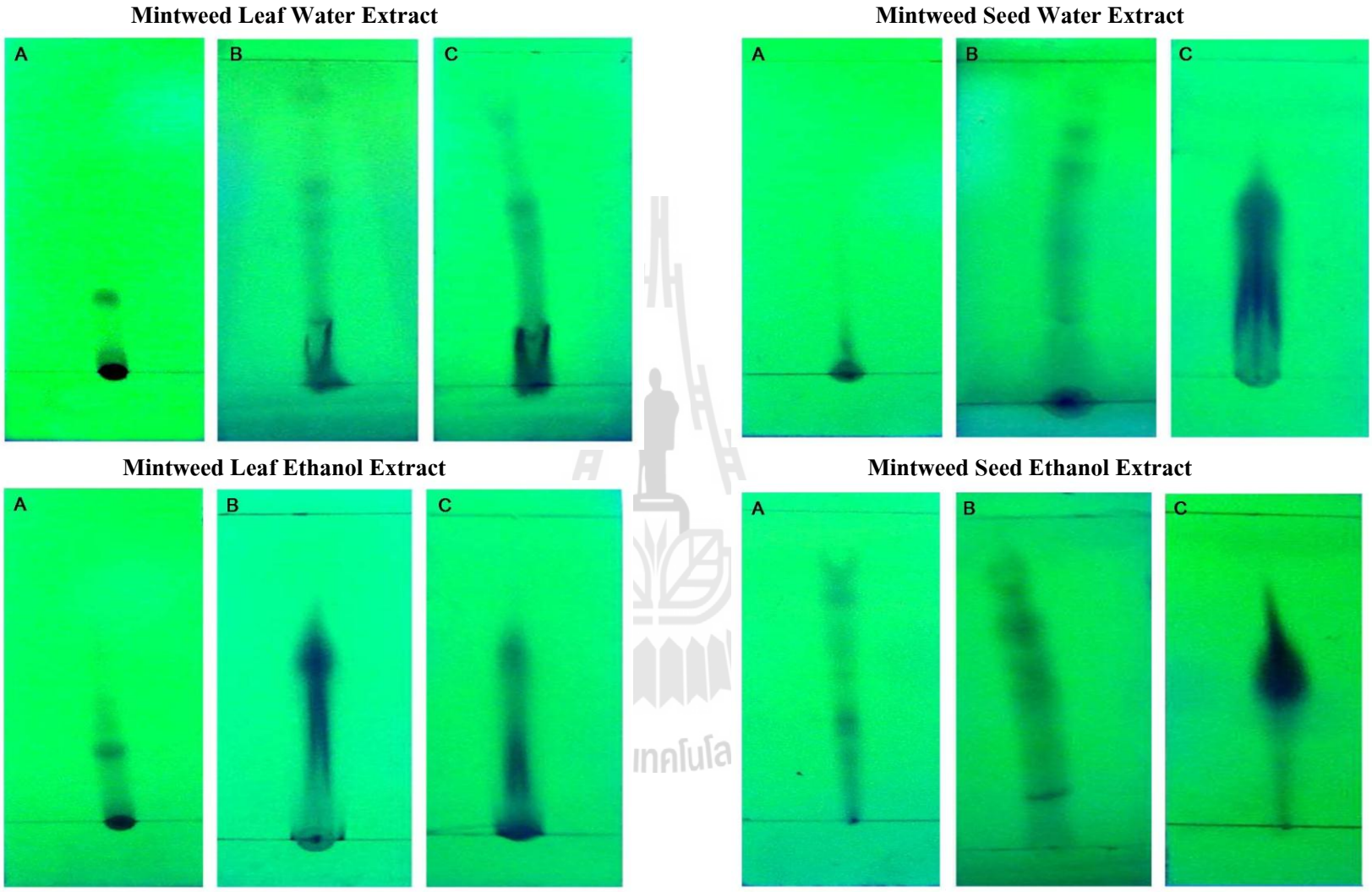

Figure 3.7 Thin layer chromatographic fingerprints of mintweed leaf extracts and mintweed seed extracts.

A, mobile phase system composed of ethyl acetate : methanol : water at proportion of 81:11:8 (v/v/v)

B, mobile phase system composed of n-buthanol : gracial acetic acid : water at proportion of 40:10:50 (v/v/v)

C, mobile phase system composed of chloroform : methanol : gracial acetic acid at proportion of 47.5:47.5:5 (v/v/v)

Table 3.2 Comparison of R_f values and color appearances of neem, custard apple, and mintweed extracts separated by thin layer chromatography using three mobile phase systems. System A contained ethyl acetate : methanol : water (81:11:8 (v/v/v)), System B contained n-buthanol : glacial acetic acid : water (40:10:50 (v/v/v)), and System C contained chloroform : methanol : glacial acetic acid (47.5:47.5:5 (v/v/v)). The band color was detected under UV A_{365} nm.

Mobile Phase System	**R_f values**							
	Neem leaf extract		**Custard apple leaf extract**		**Mintweed leaf extract**		**Mintweed seed extract**	
	NLE/w	**NLE/e**	**CLE/w**	**CLE/e**	**MLE/w**	**MLE/e**	**MSE/w**	**MSE/e**
A	0.40(DB)	0.34(DB) 0.42(LY) 0.54(LG) 0.82(DG)	0.24(DB) 0.34(LB)	0.14(B) 0.80(LG)	0.24(B)	0.24(G)	0.10(DB)	0.34(DB) 0.44(LY) 0.56(LG) 0.74(G) 0.82(DG)
B	0.11(B) 0.24(Y) 0.44(Y) 0.61(LY)	0.31(Y) 0.47(G) 0.63(Y) 0.74(LY)	0.06(B) 0.14(B) 0.40(LB) 0.47(G) 0.58(Y)	0.19(B) 0.46(Y) 0.60(LY) 0.82(G)	0.15(B) 0.28(LB) 0.46(LY) 0.60(LY) 0.80(LY)	0.19(B) 0.42(LB) 0.51(Y) 0.64(LY) 0.81(LG)	0.12(B) 0.21(LB) 0.44(Y) 0.66(LY) 0.78(LY) 0.84(DY)	0.36(LY) 0.44(LY) 0.56(LY) 0.75(G)
C	0.09(LB) 0.31(G)	0.31(LB) 0.39(G) 0.49(LG) 0.66(Y)	0.63(LB)	0.38(B) 0.49(LB)	0.35(B) 0.56(LB)	0.14(B) 0.50(LB)	0.24(B) 0.40(LB) 0.50(LG)	0.51(G) 0.65(LB)

N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e – ethanol; DB - Dark brown, LB - Light brown, B - Brown, DG - Dark green, LG - Light Green, G - Green, LY - Light yellow, and Y- Yellow.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัด

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเกือบทั้งหมดเป็นพิษ (toxic) ที่ปริมาณมาก (high dose) การตรวจหาความเป็นพิษของสารธรรมชาติจากพืชได้โดยดูจากการตายของสัตว์ขนาดเล็ก (*in vivo* lethality) การวิเคราะห์ด้วย Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA) เป็น bioassay system ที่สะดวก ค่าใช้จ่ายไม่มาก และไม่ต้องการการปลอดเชื้อและไม่ต้องใช้สัตว์ชั้นสูง เนื่องจากใช้กุ้งฝอย *Artemia salina* เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ

ในการวิเคราะห์หาความเป็นพิษของสารสกัดแต่ละพืช (single extract treatment) พบว่า สารสกัดใบพืชด้วย ethanol มีฤทธิ์ของความเป็นพิษสูงกว่าสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) ตรงข้ามกับสารสกัดเมล็ดแมงลักคาด้วยน้ำมีพิษน้อยกว่าสกัดด้วย ethanol ($P < 0.05$) (Figure 3.8 และ Table 3.4) 50% lethal concentration (LC_{50}) ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดเรียงจากน้อยไปมาก หรือจากฤทธิ์มากไปน้อย คือ MLE/e > MLE/w > MSE/w > NLE/e > MSE/e > CLE/e > NLE/w > CLE/w ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.14 ± 0.02, 0.86 ± 0.07, 3.65 ± 0.41, 6.33 ± 1.12, 6.37 ± 0.60, 27.78 ± 3.27, 48.37 ± 5.13 และ 115.06 ± 8.97 ppm ตามลำดับ และสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคามีพิษสูงกว่าสารสกัดพืชอื่น

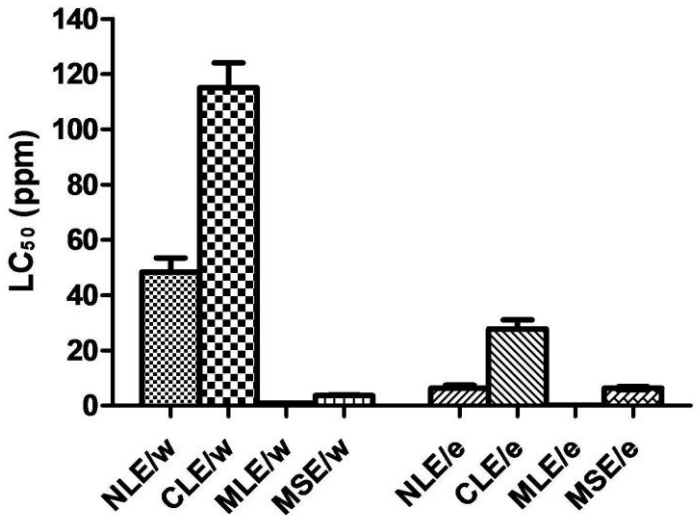

Figure 3.8 Cytotoxic effects of individual extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds monitored and screened by brine shrimp lethal assay (BSLA). The toxicity was expressed as 50% lethal concentration (LC_{50}) at 24 hours. N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol. Bars were S.D. (n = 6).

NLE/e (LC_{50} = 6.33 ppm) พิษสูงกว่า NLE/w (LC_{50} = 48.37 ppm) 7.7 เท่า
CLE/e (LC_{50} = 27.78 ppm) พิษสูงกว่า CLE/w (LC_{50} = 115.06 ppm) 4 เท่า
MLE/e (LC_{50} = 0.14 ppm) พิษสูงกว่า MLE/w (LC_{50} = 0.86 ppm) 6 เท่า
ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการแยกสารประกอบออกจากตัวอย่างพืชเหล่านี้ขึ้นกับสารทำละลายในการสกัด คือน้ำและ ethanol (Pisutthanan, 2004; Goli *et al*., 2005; Ghimeray, 2009; Manjula, 2011)

เมื่อผสม 2 สารสกัดซึ่งสกัดด้วยสารทำละลายชนิดเดียวกัน พิษของ NLE/w + CLE/w (LC_{50} 10.95 ppm) มากกว่าพิษของ NLE/w (LC_{50} 48.37 ppm) 4.4 เท่า และมากกว่าพิษของ CLE/w (LC_{50} 115.06 ppm) 10.5 เท่า (Figure 3.9, Table 3.3) แสดงว่ามีการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ให้พิษของ NLE/w และ CLE/w มากขึ้นแต่ NLE/w + MLE/w (LC_{50} 7.25 ppm) ลดพิษของ MLE/w (LC_{50} 0.86 ppm) 13 เท่า แสดงการลดพิษ (reduction effect) ของ MLE/w

การผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol ก็แสดงพิษในทำนองเดียวกัน NLE/e + CLE/e (LC_{50} = 1.52 ppm) พิษมากกว่า NLE/e (LC_{50} = 27.78 ppm) 4 เท่า และมากกว่า CLE/e (LC_{50} = 27.78 ppm) 18 เท่า

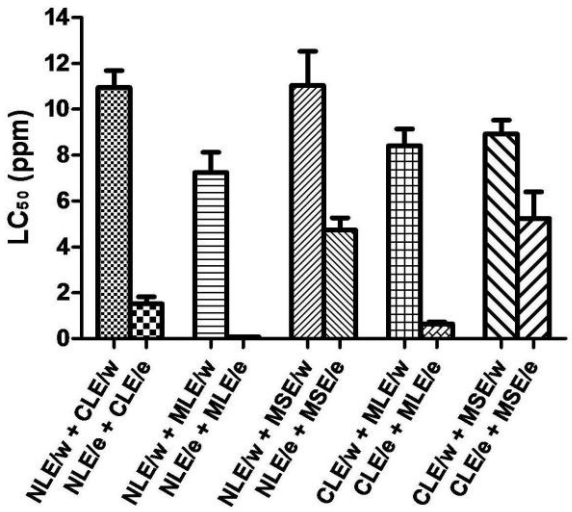

Figure 3.9 Cytotoxic effects of extract combinations between the same extract solvent. The toxicity was by brine shrimp lethality assay and expressed as 50% lethal concentration (LC_{50}) at 24 hours. N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol. Bars were S.D. (n = 6).

การผสมสารสกัดแมงลักคากับสารสกัดใบสะเดาและใบน้อยหน่า พบว่าฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดแมงลักคาเองลดลง แม้โดยรวมช่วยเสริมพิษของสารคู่ผสม NLE/w + MSE/w (LC_{50} 11.04

ppm) MSE/w ซึ่งมีค่า LC_{50} 3.65 ppm พิษลดลง 3 เท่าโดย NLE/w และ CLE/e + MSE/e (LC_{50} 5.24 ppm) เพิ่มพิษของ MSE/e (LC_{50} 6.37 ppm) เพียง 1.2 เท่า

จะเห็นได้ว่า ฤทธิ์ของสารสกัดผสมระหว่างสารสกัดใบด้วย ethanol แสดงความเป็นพิษได้มากกว่า (LC_{50} น้อยกว่า) การผสมระหว่างสารสกัดใบด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) (Table 3.4) MLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้ CLE/e และ NLE/e แต่การผสมที่มีสารสกัดเมล็ดแมงลักด้วยน้ำ (MSE/w) ทำให้พิษลดลง (LC_{50} มากกว่า) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารเดี่ยว และพิษเพิ่มขึ้น (LC_{50} มากกว่า) อย่างไม่มีนัยสำคัญ การเสริมฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดผสม จะทำให้สามารถเลือกใช้สารสกัดในปริมาณน้อยลงแต่ได้ประสิทธิภาพสูงกว่าและประหยัดค่าใช้จ่ายได้มากกว่า และค่า LC_{50} ทั้งของสารสกัดเดี่ยวหรือสารสกัดผสมจะเป็นตัวเลือกในการศึกษาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในเงื่อนไขอื่นๆ ต่อไป

Table 3.3 Cytotoxicity of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds, determined by brine shrimp lethal assay (BSLA). Data are expressed as Mean ± S.D. of LC_{50} (ppm) at 24 hours.

	LC_{50} (ppm), 24 h. Mean ± S.D. (n = 6)		
Plant extract	**Water extract**	**Ethanol extract**	**P-value**
Individual			
NLE	48.37 ± 5.13	6.33 ± 1.12	0.000**
CLE	115.06 ± 8.97	27.78 ± 3.27	0.000**
MLE	0.86 ± 0.07	0.14 ± 0.02	0.000**
MSE	3.65 ± 0.41	6.37 ± 0.60	0.004**
Combination			
NLE + CLE	10.95 ± 0.74	1.52 ± 0.31	0.000**
NLE + MLE	7.25 ± 0.88	0.07 ± 0.01	0.000**
NLE + MSE	11.04 ± 1.49	4.73 ± 0.54	0.000**
CLE + MLE	8.42 ± 0.72	0.65 ± 0.08	0.000**
CLE + MSE	8.93 ± 0.60	5.24 ± 1.16	0.002**

Note: NLE - neem, leaf extract, CLE - custard apple extract, MLE - mintweed leaf extract, and MSE- mintweed seed extract. ** significant difference at $P < 0.01$ and * significant difference at $P < 0.05$, analyzed by t-Test of variance

3.5 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของพฤกษาเคมีของสารสกัดใบสะเดา น้อยหน่า แมงลักคา และเมล็ดแมงลักซึ่งได้จากการสกัดด้วยน้ำและ 95% ethanol ในเครื่องสกัดอัตโนมัติที่อุณหภูมิสูงกว่า 100°C สรุปข้อมูลเชิงเปรียบเทียบปริมาณ total phenolic compounds (TPC), free radical scavenging (FRS) และ cytotoxicity จะเห็นได้ว่าน้ำสามารถสกัดสาร phenolics จากใบของพืชได้ปริมาณใกล้เคียงกับสกัดด้วย ethanol ยกเว้นสารสกัดเมล็ดแมงลักคาที่สกัดด้วยน้ำ (MSE/w) ได้ TPC มาก ซึ่งอาจมีสารประกอบที่มี polarity มากกว่าในใบ สารสกัดด้วยน้ำของใบสะเดา (NLE/w) และใบน้อยหน่า (CLE/w) แสดงประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging - FRS) $DPPH^{\bullet}$ ได้ดีกว่าสกัดด้วย ethanol NLE/e และ CLE/e ส่วนสารสกัดใบและเมล็ดของแมงลักคามีประสิทธิภาพ FRS ใกล้เคียงกัน

รูปแบบการแยกของสารพฤกษาเคมี (fingerprint profile) ซึ่งได้จากการแยกด้วย Thin layer chromatography (TLC) ในสาร mobile phase 3 ระบบ คือ System A ประกอบด้วย ethyl acetate : methanol : water ในอัตราส่วน 81:11:8 (v/v/v) System B ประกอบด้วย n-buthanol : gracial acetic acid : water ในอัตราส่วน 40:10:50 (v/v/v) และ System C ประกอบด้วย chloroform : methanol : gracial acetic acid ในอัตราส่วน 47.5:47.5:5 (v/v/v) สามารถแยก fingerprint และระยะเคลื่อนที่สัมผัส R_f ของสารเคมีในสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ของใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลักคา และ เมล็ดแมงลักคาได้ต่างกัน และพบว่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มีชีวิต (cytotoxicity) ของใบพืชทั้ง 3 ชนิดที่สกัดด้วย ethanol NLE/e, CLE/e และ MLE/e มีความเป็นพิษสูงกว่าสกัดด้วยน้ำ ส่วนสารสกัดเมล็ดของแมงลักคาด้วยน้ำ, MSE/w กลับมีพิษมากกว่าสกัดด้วย ethanol, MSE/e สารสกัดผสมระหว่างสารละลายชนิดเดียวกับ พบว่าทั้ง 3 พืช สามารถเสริมพิษต่อกันแบบ synergistic effects ได้สูงมาก พิษของสารสกัดคู่ผสมที่มีฤทธิ์สูงสุดคือ NLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.07 $\pm$ 0.01 ppm และคู่ผสมที่มีฤทธิ์น้อยที่สุดคือ NLE/w + CLE/w มีค่า LC_{50} เท่ากับ 10.95 $\pm$ 0.74 ppm และ พบว่า CLE เสริมฤทธิ์ให้กับ NLE ในขณะที่ MLE และ MSE เสริมฤทธิ์ให้กับ CLE เพราะความหลากหลายของพฤกษาเคมีในสารสกัดหยาบ อย่างไรก็ตาม การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดผสมจึงน่าจะเป็นทางเลือกในการใช้ประโยชน์จากพืชให้ได้สูงสุด เช่นใช้สารปริมาณน้อยลงแต่ให้ประสิทธิ์สูงกว่า และ เป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ใช้ เพราะเป็นสารจากธรรมชาติที่ไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการศึกษาหาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดพืชอื่นๆ ต่อไป อย่างไรก็ตาม สังเกตเห็นได้ว่า cytotoxicity สอดคล้องกับปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัด แต่ผกผันกับ free radical scavenging

Table 3.4 Summary of total phenolic compound content, free radical scavenging activity and cytotoxicity activity of the leaf extracts of neem, custard apple, and mintweed and the seed extracts of mintweed.

Extract	Total phenolic cpd (mgGAE/L) Mean ± S.D., n =5	Inhibition of DPPH$^{\bullet}$ (IC_{50}) (ppm) Mean ± S.D, n = 5	Cytoxicity, BSLA LC_{50} (ppm), 24 h. Mean ± S.D., n = 6
NLE/w	297 ± 31.67*	172.99 ± 4.53*	48.37 ± 5.13**
NLE/e	338 ± 41.83*	211.53 ± 8.61*	6.33 ± 1.12**
CLE/w	309 ± 44.45*	163.55 ± 8.99*	115.06 ± 8.97**
CLE/e	261 ± 30.74*	218.62 ± 3.64*	27.78 ± 3.27**
MLE/w	251 ± 31.55	288.92 ± 13.91	0.86 ± 0.07**
MLE/e	245 ± 26.48	226.39 ± 6.22	0.14 ± 0.02**
MSE/w	254 ± 30.51*	156.44 ± 3.99	3.65 ± 0.41*
MSE/e	179 ± 13.28*	155.48 ± 7.06	6.37 ± 0.60*

N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267.

Agarwal, A. (1996). What's in a neem? Down to Earth. 14 (20):27-38.

Al-Lawati, H.T., Azam, K.M., and Deadman, M.L. (2002). Insecticidal and repellent properties of subtropical plant extracts against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis*. Agri Sci. 7(1):37-45.

Alam, M. M. 1996. Bioactivity against phytonematodes. In: Randhawa, N. S., Parmar, B.S. (Eds.), New Age Internatl. 171-191.

Anandjiwala, S., Srinivasa, H., and Rajani, M. (2007). Isolation and TLC Densitometric Quantification of Gallicin, Gallic Acid, Lupeol and b-Sitosterol from *Bergia suffruticosa*, a Hitherto Unexplored Plant. Chromatographia. 66:725-734.

Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.das G.B., Maia, J.G.S., Fabricius, H., and Marx, F. (2001). Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon. J. Food Compos. Anal. 14:227-232.

Asekun, O. T., Ekundayo, O., and Adevini, B. A. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* Leaves. Fitoterapia. 70:440-442.

Aycard, J. P, Kini, F., Kam, B., Gaydou, E. M., and Faure, R. (1993). Isolation and identification of spicigera lactone: Complete H and C assignments using two- dimensional NMR experiments. J. Natl. Products. 56:1171-1173.

Baskar, R., Rajeswari, V, and Kumar, T.S. (2007). *In vitro* antioxidant studies I leaves of *Annona* specie. Indian J. Experitl. Biol. 45:480-485.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 28:25-30.

Büyükokuroglu, M. E., Gülcin, I., Oktay, M., & Kufrevioglu, O. I. (2001). In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. Pharmacological Research. 44(6):491–495.

Chui, S., Fu, B., Sen-Chun Lee, F., and Wang, X. (2005). Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprinting of licorice (*Glycyrrhiza* spp.). J Chromatography B. 828:33–40.

Daniel, J. N. (2000). Studies on EM based farming practices for small farmers in India. In: Proceedings of the International Conference on Kyusre farming, Pyongyang, Democratic People's Republic on Korea, BAIF Development Research Foundation.

Finney, D.J. (1971). Probit analysis, Cambridge,U.K.:Cambridge University Press. 55 pp.

Geraldo, M.R.F., Arroteia, C.C., and Kemmelmeier, C. (2010). The effects of neem [*Azadirachta indica* A. Juss (meliaceae)] oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. Medicagenis and *Fusarium subglutinans* and the production of fusaric acid toxin. Adv. Biosci Biotechnol. 1:1-6.

Ghimeray, A.K., Jin, C-W., Ghimire, B.K., and Cho, D.H. (2009). Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A. Juss grown in foothills of Nepal Afr. J. Biotechnol. 8 (13):3084-3091.

Goli, A.H., Barzegar, M., and Sahari, M.A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. Food Chem. 92:521-525.

Guerrini, V.H. and Kriticos, C.M. (1998) Effects of azadirachtin on *Ctenocepphalides felis* in the dog and the cat. Veternary Parasitol. 74:289-297.

Halliwell, B., Aeschbahc, R., Loliger J., and Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. Food Chem. Toxic. 33:601-617.

Joshi, P. C., Lockwood, J. A. (2000). Antifeedent effect offect of aqueous extract of neem (*Azadirdchta indica A.Juss*) Leaves on *Oxya velox* F. (Orthoptera:Aridídae). J. Agric. Urban Ento. 17 (1):21-26.

Kaethner, M. (1991). Potential of neem seed kernel products for the control of the cockchafers *Melolontha hippocastani* F. and *M. melolontha* L. (Col., Scarabaeidae). J. Appl. Entomol. 112:345-352.

Khomdram, S.D. and Singh, P.L. (2011) Polyphenolic compounds and free radical scavenging activity in eight *Lamiaceae* herbs of Manipur. Not. Sci. Biol. 3:109-115.

Kothari, V. and Seshadri, S. (2010). Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. Nutri. Food Sci. 40:403-408.

Kumar, U., (2002). Neem as a potential biopesticide and soil conditioner. Agrobios Newsletter. 1(6):8-16.

Lavhale, M.S. and Mishra, S.H. (2007). Evaluation of free radical scavenging activity of *Butea monosperma* Lam. Indian J. Exptl. Biol. 45:376-384.

Manjula, M., Anitha, S., and Shashidhara, S. (2011). Comparative evaluation of antioxidant potential and total phenolic content in selected medicinal plants. J. Pharma. Res. 4(4):1065-1066.

Mann, J. 1987. Secondary Metabolism. Clarendon Press, Oxford: In Bratt, K. (2000). Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxidative stress. Synthesis, isolation and biological evaluation. Comprehensive summaries of Uppsal Disserations from the Faculty of Science and Technlogy. 567, 51 pp.

Mansour, F.A., Ascher, K.R.S., and Abo-Moch, F. (1997). Effects of neemgard of phytophagous and predacious mites and on spider. Phytoparasitica. 25(4):333-336.

Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. J. Agri. Food Chem. 50:3444-3452.

McLaughlin, J.L. and Rogers, L.L. (1998) the use of biological assays to evaluate botanicals. Drug Info J. 32:513-524.

Mishra, A.K. and Dubey, N.K. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. Appl. Envir. Mocrobiol. 60:1101-1105.

Mulla, M. S., and Su, T., (1999). Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. J. Am. Mosquito Control Association. 15:33-152.

Musabyimana, T., Saxena, R.C., Kairu, E.W., Ogol, C.P.K. and Khan, Z.R. (2001) Effects of neem seed derivaties on behavioral and physiological responses of the *Cosmopolites sordidus* (Coleopter: Curculionidae). J. Economic Entomol. 94:449-454.

Narayanaswamy, N. and Balakrisnan, K.P. (2011). Evaluation of some medicinal plants for their antioxidant properties. Internat'l. J. Pharm. Tech. Res. 3:381-385.

Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S, and Okonogi, S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. Sci. Pharm. 75:35-46.

Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., and Camara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. Food Chem. 105:204-214.

Palsson, K., and Jaeson, T.G.T. (1999). Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa., Acta Tropica. 72:39-57.

Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D., and Dixit, S.N. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. J. Plant Dis. Prot. 89:344-349.

Patel, J.D. and Kumar, V. (2008) *Annona squamosa* L.: Phytochemical analysis and antimicrobial screening. J. Pharm. Res. 1:34-38.

Peerzada, N. (1997). Chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. Molecules. 2:165-168.

Pereda-Mianda, R., and Gascon-Figueroa, M. (1988). Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. J. Natl. Products. 51:996-998.

Pisutthanan, S., Plianbangchang, P., Pisutthanan, N., Ruanruay, S., and Muanrit, O. (2004). Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. Naresuan Univ. J. 12:13-18.

Pundt, L. (2000). Neem based insecticides. Home & Garden News. July/August, pp. 6.

Rao, N.S., Sharma, K., and Sharma, R.K. (2005). Anti-feedant and growth inhibitory effects of seed extracts of custard apple, *Annona squamosa* against Khapra beetle, *Trogoderma granarium*. J. Agri. Technol. 1(1):43-54.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Sci. 2(4):152-159.

Sanches-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Res. Intertl. 32:407-412.

Sehmutterer, H., (1995). The neem tree *Azadirachta indica* (Juss) and other meliaceous plants: sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, pp. 696.

Sengbusch, P.V. (2003). The secondary metabolism of plants: Secondary defence compounds. Available online at http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e20/20.htm

Sithisarn, P. and Gritsanapan, W. (2005). Free radical scavenging activity and total flavonoid content of Siamese neem tree leaf aqueous extract from different locations. Mahidol Univ. J. Pharm. Sci. 32:31-35.

Sithisarn, P., Carlsen, C.U., Andersen, M.K., Gritsanapan, W., and Skibsted, L.H. (2007). Antioxidative effects of leaves from *Azadirachta* species of different provenience. Food Chem. 104:1539-1549.

Stafford, G.I., Jager, A.K., and van Staden, J. (2005). Effect of storage on the chemical composition and biological activity of several popular South African medicinal plants. J. Ethnopharm. 97:107–115.

Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., and Phillipson, J.D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). Planta Medica. 59:250-252.

Swain, T., and Hills, W.E. (1959). The phenolics contents of *Prunus domestica* I.-The quantitative analysis of phenolics constituents. J Sci Food Agric, 10:63-8.

Tanprasit, P. (2005). Biological control of Dengue fever mosquitoes (*Aedes aegypti* Linn.) using leaf extracts of chan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) and hedge flower (*Lantan camara* Linn.) Master of Science Thesis, Environmental Biology, Suranaree University of Technology. 77 pp. ISBN 974-533-548-7

Torssell, K.B.G. (1997). Natural product chemistry. A mechanistic, biosynthesis and ecological approach. Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Press: In Bratt, K. 2000. Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxidative stress. Synthesis, isolation and biological evaluation. Comprehensive summaries of Uppsal Disserations from the Faculty of Science and Technlogy. 567, 51pp.

Vanitha V., Umadevi, K.J., and Vijayalakshmi, K. (2010). In vitro assessment of alcoholic leaf extracts of *Annona squamosa* and *Aegle marmekos*. Bioscan, 5:225-229.

Wulff, R. (1987). Effect of irradiance, temperature, and water status on growth and photosynthetic capacity in *Hyptis suaveolens.* Can. J. Bot. 65: pp. 2501-2506.

Xuan, T.D., Eiji, T., Hiroyuki, T., Mitsuhiro, M., Khanh, T.D., and Chung, I.-M. (2004). Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) to crop and weeds. Crop Protection. 23:335-345.

Yadav, D.K., Singh, N., Dev, K., Sharma, R., Sahai, M., Palit, G., and Maurya, R. (2011). Anti-ucler constituents of *Annona squamosa* twigs. Fitoterapia. 82:666-675.

Zschocke, S., Rabe, T., Taylor, J.L.S., Ja¨ger, A.K., and van Staden, J. (2000). Plant part substitution – a way to conserve endangered medicinal plants? J. Ethnopharm. 71:281–292.

กนก อุไรสกุล. (2540). การทดสอบสารสกัดแมงลักคากับเพลี้ยอ่อนพริก (*Aphis gossypii* Glov) และหนอนรังห่อใบมะม่วง (*Orthaga* sp.). โครงการการศึกษาองค์ประกอบและทดสอบสารสกัดแมงลักคากับเพลี้ยอ่อน (*Aphis gossypii* Glov). สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตพระนครศรีอยุธยาหันตรา : 1-15.

รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม. (2544). ศึกษาความทนเค็ม ทนแล้ง และความเป็นพิษของต้นแมงลักคา (*Hyptis suaveolens* Linn.) ต่อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*Heliothis armigera* Hubn.) ดุษฎีนิพนธ์ สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ISBN 974-533-027-2.

www.oisat.org: Custard apple. Available online at http://www.oisat.org/control_methods/plants_in_pest_control/custard_apple.html

http://www.phytochemicals.info/: What are phytochemicals?. Available online at http://www.phytochemicals.info/

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

การควบคุมโดยชีววิธีของไข่ ตัวอ่อน และ ตัวเต็มวัยแมลงวันทอง

Biological Control of Egg, Larva and Adult

Oriental Fruit Flies (*Bactrocera dorsalis* Hendel)

4.1 คำนำ

แมลงวันทอง (Oriental fruit fly (OFF), *Bactrocera dorsalis* Hendel) ทำลายพืชผลผิวบางกว่า 300 ชนิด เช่นน้อยหน่า กล้วย มะระ ส้ม กาแฟ ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ พริก และมะเขือเทศ เป็นต้น แลงวันทองแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในเอเชียเขตร้อน ได้แก่ อินเดีย พม่า เวียดนาม จีน ไทย ไต้หวัน ลาว ศรีลังกา และ กัมพูชา และในเขตแปซิฟิก แมลงวันทองจึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจการเกษตรมากและไม่สามารถประเมินได้ว่าการทำลายที่แท้จริงเท่าไร มีเขตการแพร่กระจายทั่วไปในประเทศไทย มีพืชอาศัยมากกว่า 50 ชนิดในเขตภาคกลาง คือ มะม่วง ฝรั่ง ชมพู่ ละมุด พุทรา น้อยหน่า ขนุน เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ กะท้อน สะตอ กล้วยน้ำว้า มะกอกฝรั่ง มะเฟือง มะปราง มะละกอ มะยง พริก ชำมะเลียง มะกอกน้ำ มะม่วงหิมพานต์ เชอรี่หวาน กระโดน สตาร์แอปเปิ้ล หว้า มะเดื่อหอม มะเดื่ออุทุมพร มะม่วงป่า มะมุด พิกุล ตะขบฝรั่ง มะตูม ฯลฯ แมลงวันทองทำความเสียหายต่อผลไม้โดย (1) วางไข่ในผลไม้และเนื้อเยื่ออ่อนของพืชบางชนิด (2) ตัวอ่อนกินเนื้อผลไม้ และ (3) เนื้อเยื่อพืชเน่าเสียจากเชื้อจุลินทรีย์ฉุกฉวยโอกาส การควบคุมที่มีประสิทธิภาพคือการไม่ให้แมลงแพร่ขยายพันธุ์ และลดการเข้าวางไข่ ขัดขวางพัฒนาในวัฏจักรของแมลง (Figure 4.1) จะสามารถควบคุมประชากรแมลงที่จะเข้าสู่ฤดูกาลใหม่

4.1.1 การป้องกันและการจัดการแมลงวันทอง

การควบคุมป้องกัน/กำจัดแมลงวันทอง โดยหลักการทั่วไป คือ (1) การดูแลความสะอาดสวน (Cultural control) (2) ล่อจับแมลงตัวเต็มวัยทั้งสองเพศด้วย protein hydrolysate (Bait application technique (BAT)) ก่อนการผสมพันธุ์ (3) ดักจับแมลงเต็มวัยเพศผู้ (Male annihilation technique (MAT)) ด้วย Methyl eugenol และ (4) การสำรวจเก็บข้อมูลทุกวัน (survey) เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 4 วิธี พบว่าวิธีดักจับแมลงเต็มวัยเพศผู้มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาคือวิธีล่อจับแมลงตัวเต็มวัยทั้งสองเพศด้วย

เหยื่อโปรตีน (Ali, *et al*., 2010) ในวงการเกษตรกรไทยกำจัดแมลงวันผลไม้รวมทั้งแมลงวันทอง ด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้ (มนตรี จิรสุรัตนน์, 2553)

- **รักษาแปลงปลูกให้สะอาด** มีการตัดแต่งกิ่งตามสมควร ไม่ให้เกิดร่มเงามากเกินไป เพื่อให้แมลงและสัตว์ศัตรูธรรมชาติ สามารถมีส่วนช่วยในการทำลายแมลงวันผลไม้ด้วย เช่น มด แมงมุม และสัตว์เลื้อยคลานชนิดต่างๆ เป็นต้น หมั่นเก็บผลไม้ร่วงในแปลงปลูก และผลไม้ที่ถูกทำลายบนต้นนำไปเผาทำลายหรือ ฝัง กลบ เพื่อป้องกันการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ในแปลง
- **ห่อผลด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ หรือถุงพลาสติก** เพื่อป้องกันการทำลายจากแมลงวันผลไม้เช่นการห่อผลในพืชต่างๆ
- **พ่นด้วยสารฆ่าแมลง** มาลาไทออน 57% EC ในอัตรา 30-50 มล./น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน/ครั้ง หรือ คลอไพริฟอส 40% EC ในอัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร
- **พ่นด้วยเหยื่อพิษ** ที่ประกอบด้วยโปรตีนยีสต์ในอัตรา 200 มล ผสมสารฆ่าแมลงมาลาไทออน 57 %EC จำนวน 40 มล.ในน้ำ 5 ลิตร ทุก 7 วันครั้ง โดยเริ่มพ่นเหยื่อพิษก่อนแมลงระบาด 1 เดือน

Figure 4.1 Life cycle of oriental fruit fly ของแมลงวันทอง *Bactrocera dorsalis* Hendel

Source: http://ipm.ait.asia

การศึกษาการควบคุมโดยวิธีชีวภาพแมลงวันทองส่วนมากเป็นการใช้ parasitoids จากตระกูล (family) Braconidae, Chalcidae และ Eulophidae ซึ่งสามารถลดประชากรแมลงวันทองได้ถึง 90% (www.spc.int) แต่ด้วยประเทศไทยมีความหลากหลายของพืช และมีพืชหลายชนิดที่ไม่ถูกรบกวนด้วยแมลงที่ภูมิปัญญาพื้นบ้านนำมาใช้ขับไล่แมลงในแปลงเพาะปลูกพืชอยู่บ้างแล้วในพื้นที่ไม่กว้างใหญ่ เช่น สวนผักผลไม้ อย่างไรก็ตามยังไม่ปรากฏพบข้อมูลการศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมแมลงวันผลไม้อย่างเป็นระบบเชิงวิทยาศาสตร์ ในการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาว่า สารสกัดจากพืชซึ่งปกติแล้วไม่พบว่าถูกรบกวนด้วยแมลงศัตรูพืช เพื่ออาจจะสามารถนำไปใช้ในการควบคุมกำจัดแมลงวันทองได้ ทั้งนี้การวิจัยเน้นศึกษาพืชและวัชพืชหาง่าย และเศษทิ้งจากการตัดแต่งกิ่ง (pruning) หลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลทางเกษตรแล้ว เป็นการใช้ประโยชน์สูงสุดจากการพืชเหล่านั้นเชิงการเกษตรกรรม เพื่อการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม และเพื่อสุขภาพของเกษตรกรเอง นอกจากนี้ การควบคุมโดยชีวภาพยังมีการใช้สารสกัดจากพืชในรูปแบบต่างๆ กันตามภูมิปัญญาพื้นบ้าน แต่ยังมีหลักฐานการศึกษาวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ไม่มากนัก เช่น การใช้สารสกัดสะเดา (Singh and Singh, 1998) สารสกัดขิง (*Alpinia galangal*) ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscose*) (Sukhirin, Bullangpoti, and Pluempanupat, 2009) เหงือกปลาหมอ (www.sci.lru.ac.th) หูกวาง (Siderhurst and Jang, 2006) และ พริกไทยดำ (Tongon and Bullangpoti, 2009) ทั้งนี้เพื่อวิเคราะห์หา botanical-based insectides ใช้ทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งส่วนมากเป็นพิษรุนแรงต่อสัตว์ สลายในธรรมชาติยาก ทำลายสิ่งแวดล้อม มีหลักฐานเกี่ยวกับสาร azadirachtins ซึ่งอยู่ในกลุ่ม triterpenoids จากสะเดา (*Azadirachta indica* Juss) ว่ามีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดแมลงโดยยับยั้งการกิน (antifeeding) การเจริญเติบโต (growth disruption) (Isman *et al*., 1990; Prijono and Hassan, 1993) และการสืบพันธุ์ของแมลงหลายชนิด (Pathak and Krishna, 1986; Shimizu, 1988; Riba *et al*., 2003) สารสกัดสะเดาจึงได้รับการพัฒนาเป็นสารกำจัดแมลงเชิงพาณิชย์หลายสูตร แต่ก็ยังต้องการการวิจัยเพิ่มเติมอีกเพื่อการประยุกต์ใช้อย่างเหมาะสมกับชนิดของแมลงที่จำเพาะต่อไป สารเคมีและคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของน้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) ได้รับความสนใจศึกษามากกว่า 15 ปีที่ผ่านมา ใบและเมล็ดน้อยหน่าเป็นแหล่งสารธรรมชาติที่มีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น Asian armyworm *Spodoptera litura*, cabbage loopers *Trichoplusiani*, และ diamondback moth larvae *Plutella xylostella* เป็นต้น (Isman, 2005) และพบสาร acetogenins หลายชนิดนสารสกัดแยกได้จากน้อยหน่า (Santos dos and Sant'Ana, 2001; Isman, 2005) นอกจากนี้พืชที่มีน้ำมันหอมระเหยในตระกูล Laiatae (Lamiaceae) ถูกนำมาใช้มากกับการป้องกันผลผลิตการเกษตรและการแพทย์ แมงลักคา (*Hyptis suaveolens* Poit) เป็นพืชหนึ่งในตระกูลนี้ สารสกัดแมงลักคาสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย (Chisomboon, *et*

al., 2003) ควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม, 2544) และยุงพาหะไข้เลือดออก (Tanprasit, 2005)

4.2 วัตถุประสงค์

ในการศึกษานี้ ได้เลือกศึกษาสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ของพืชที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้น (pre-screened) แล้วโดยเลือกจากพืชที่มีค่า median lethal concentration, LC_{50} ที่เหมาะสม 3 พืช โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต่อการไล่แมลงตัวเต็มวัย และ ต่อการเจริญพัฒนาการระยะต่างๆ (antibiosis) ในวัฏจักรชีวิตของแมลงวันทอง ดังนี้

4.2.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชต่อการไล่แมลงวันทองตัวเต็มวัย

4.2.2 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชชนิดเดียวต่อการดำรงชีพ (biosis) แมลงวันทองระยะไข่ (eggs) ตัวอ่อน (larvae) และ ตัวเต็มวัย (adults)

4.2.3 ศึกษาฤทธิ์ของสารผสมของ 2 สารสกัดที่สกัดด้วยสารละลายชนิดเดียวกัน ต่อการดำรงชีพ (biosis) แมลงวันทองระยะไข่ (eggs) ตัวอ่อน (larvae) และ ตัวเต็มวัย (adults)

4.3 อุปกรณ์และวิธีการ

4.3.1 วัสดุและสารเคมี

แมลงวันทองที่ระบุจำแนกชนิดพันธุ์แล้ว และ yeast hydrolysate ได้รับอนุเคราะห์จากกลุ่มรังสีแมลง โครงการวิจัยรังสีเพื่อการเกษตร สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ (Radiation Entomology Group, the irradiation for Agriculture Research Program, Office of Atoms for Peace (OAP)), Ministry of Science and Technology, Thailand ไข่กุ้งฝอยซื้อจากร้านจำหน่ายอาหารเลี้ยงปลาทั่วไป 95% ethanol, hydrochloric acid และ Sodium bezoate ซื้อจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, U.S.A.)

4.3.2 ตัวอย่างพืชและการเตรียมสารสกัดหยาบของพืชตัวอย่าง

ใบสะเดา น้อยหน่า และแมงลักคา และเมล็ดแมงลักคาเก็บในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส) และบริเวณใกล้เคียง ทำความสะอาดใบพืชตัวอย่าง หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ตากแห้งที่ 45°C เป็นเวลา 2 วัน ส่วนเมล็ดแมงลักคา แช่ในน้ำเปล่าจนเมือกหุ้มบวม กำจัดเมือกออกโดยการถูเมล็ดบนกระซอนโลหะ จากนั้นตากให้แห้ง บดใบและเมล็ดพืชให้เป็นผงละเอียด

การสกัด ใช้ ผงบด 10 กรัม ในน้ำ หรือ 95% ethanol 140 มิลลิลิตร สกัดในเครื่องสกัด Buchi model B811 (Germany) ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ระเหยสารสกัดและทำให้แห้งเป็นผงด้วยเครื่อง lyophilyzer (LabConco, U.S.A.) ที่ -54°C แล้วเก็บผงสารสกัดที่ -20°C ก่อนการทดลอง และ ในการทดลอง ละลายผงสารสกัดด้วยสารทำละลายเดิม และเก็บที่ 4°C ระหว่างการทดลอง

4.3.3 การเลี้ยงแมลงวันทอง

เพาะแมลงวันทองระยะดักแด้ในถาดขี้เลื่อยที่อบสะอาดและอยู่ในกรงเลี้ยงขนาด 50 x 50 x 50 เซนติเมตร (Figure 4.2) ภายใน 10-15 วัน ดักแด้ออกจากฝักเป็นตัวเต็มวัยซึ่งจะเข้าสู่ช่วงผสมพันธุ์ใน 7-10 วันต่อมา ให้อาหารตัวเต็มวัยด้วย yeast hydrolysate ผสมกับน้ำตาล (1:1 wt/wt) เพื่อเป็นแหล่งของน้ำตาล และแผ่นวุ้นเป็นแหล่งของน้ำ วางแผ่นวุ้นไว้บนกรงเลี้ยง ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ในอาหารเทียมซึ่งทำให้เป็นรูปกรวย (Figure 4.3) ในอาหารเทียม 500 mL ประกอบด้วย wheat germ 300 กรัม, น้ำตาล 120 กรัม, yeast hydrolysate 40 กรัม, Sodium benzoate 1 กรัม และ HCl 1 mL

Figure 4.2 Wire-net cage for rearing adult oriental fruit flies.

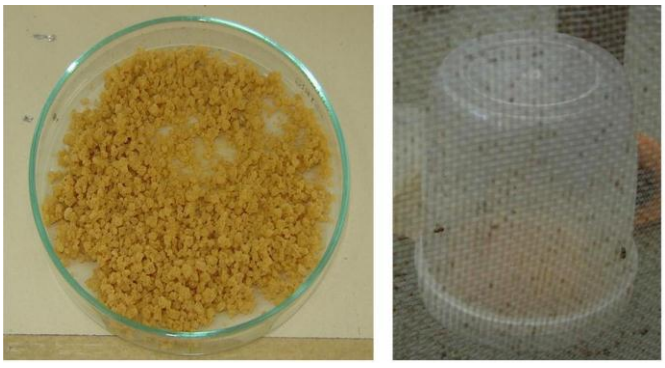

Figure 4.3 Artificial food and a cone-shaped device made from ripe fruits or artificial food for laying eggs of female adult oriental fruit flies.

หลังจากวางไข่ 24-48 ชั่วโมง ตัวอ่อน (หนอน) ฟักออกจากไข่ ย้ายตัวอ่อนให้พัฒนาในถาดขี้เลื่อยที่สะอาดผ่านการอบแห้งกึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัวอ่อนเจริญเป็นดักแด้ใน 12-24 ชั่วโมง และเจริญเป็นตัวเต็มวัยต่อไป

4.3.4 การทดสอบฤทธิ์การไล่ (Repellent test) หรือ ดึงดูด (Attraction)

ฤทธิ์การไล่ โดยทดสอบในอุปกรณ์ Olfactometer รูปกระบอกยาว (Figure 4.4) Olfactometer ทำขึ้นจากแผ่นพลาสติกดัดเป็นกล่องขนาด 75 x 10 x 10 cm (L x W x H) และมีช่องสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 10 cm อยู่กึ่งกลางความยาวของกล่อง ปลายด้านหนึ่งวางขวดบรรจุสารควบคุม ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาล 1 กรัม yeast hydrolysate 1 กรัม และ methyl eugenol 10 μL และ ปลายอีกด้านหนึ่งวางขวดบรรจุสารสกัดที่ทำการทดสอบ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล 1 กรัม yeast hydrolysate 1 กรัม และ สารสกัดพืช 1 กรัม หลังใส่สารทดสอบแล้วปิดปลายทั้งสองข้างให้สนิท ปล่อยแมลง (คละเพศ) ที่ช่องกลาง ครั้งละตัว ปิดปากช่องด้วยผ้าก็อซ (guaze) เฝ้าสังเกตพฤติกรรมของแมลงภายใน 1 ชั่วโมง บันทึกผล เปลี่ยนแมลงตัวใหม่ และทำการทดลอง 6 ซ้ำ

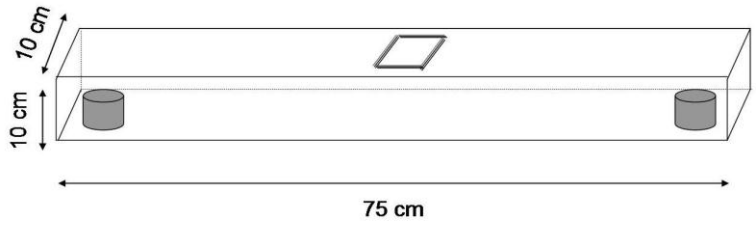

Figure 4.4 Olfactometer, setting up with two 10-mL bottles at each end of the device; one for the control and one test sample. A hole is in the middle for allowing the test insect into the device.

4.3.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟักไข่ (Egg hatching) แมลงวันทอง

นำไข่ 30 ฟองวางบริเวณกลางกระดาษดำซึ่งมีขนาด 1 x 1 x 1 cm^3 หยด 100 μL สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างบนกลุ่มของไข่ 24 ชั่วโมง นำกระดาษนี้ใส่ใน 50-mL beaker ที่มีอาหารเทียม ปิด beaker และนับไข่ที่ไม่ฟักเป็นตัวอ่อน ใช้ carbamate เป็น positive control ใช้น้ำและ ethanol เป็น normal control ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

4.3.6 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อแมลงตัวอ่อนโดยการกิน (Larval feeding)

นำหนอนตัวอ่อนระยะที่ 2 (second instar larvae) 30 ตัวหลังฟักออกจากไข่แล้ว 7 วัน ใส่ใน 50-mL beaker ที่มีอาหารเทียมผสมกับสารสกัดด้วยความเข้มข้นต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1 (wt/wt) ปิด beaker นับจำนวนตัวหนอนที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

4.3.7 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อแมลงตัวอ่อนโดยการจุ่ม (Larval dipping)

นำหนอนตัวอ่อนระยะที่ 2 (second instar larvae) 30 ตัวหลังฟักออกจากไข่แล้ว 7 วัน จุ่มในสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 3 วินาที นำตัวอ่อนนี้วางใน 50-mL beaker ปิด beaker นับจำนวนตัวหนอนที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

4.3.8 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อแมลงตัวเต็มวัย (Adulticide)

นำแมลงตัวเต็มวัยอายุ 10-15 วัน ใส่ในตู้ขนาด 20 x 20 x 20 cm^3 ที่มีน้ำและ yeast hydrolysate (1:1 wt/wt) ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ นับแมลงที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

4.3.9 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผสมระหว่างสารสกัด 2 พืช

การทดลองดำเนินการเหมือนกับการทดลองฤทธิ์ของสารเดียว โดยการผสมระหว่าง 2 สารสกัดที่สารตัวทำละลายชนิดเดียวกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ของสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ กัน

4.3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม Statistic Package for the social Science (SPSS) ค่า LC_{50} วิเคราะห์โดย Probit analysis และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสารสกัดด้วย t-Test ของ Variance การวิเคราะห์ทั้งหมดที่ 95% confident level

4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.4.1 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการไล่แมลงวันทองตัวเต็มวัย (Repellent effects)

การควบคุมแมลงวันทองโดยการไล่แมลงตัวเต็มวัย ใช้ผงสารสกัดของพืชแต่ละชนิดปริมาณ 1 กรัม เทียบกับสารควบคุม methyl eugenol ซึ่งเป็นสารดึงดูด (attactant) แมลงวันหลายชนิด พบว่าสารสกัดด้วย ethanol ไล่แมลงได้ใกล้เคียงกันและไล่ได้สูงกว่า 65% และ ไล่ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (Figure

4.5 A) สารสกัดด้วย ethanol ของใบเมล็ดแมงลักคา (MLE/e) และเมล็ดแมงลักคา (MSE/e) มีฤทธิ์ไล่แมลงได้มากที่สุด 74% สารสกัดใบแมงลักคาด้วยน้ำ (MLE/w) มีฤทธิ์น้อยที่สุดไล่ได้เพียง 33.00 ± 2.54% เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากพืชชนิดเดียวกันดังนี้ สารสกัดใบสะเดาด้วย ethanol (NLE/e) สามารถไล่ 69.23 ± 1.96% ใบสะเดาสกัดด้วยน้ำ (NLE/w) ไล่ได้ 46.41 ± 2.59% ฤทธิ์การไล่ของ NLE/e > NLE/w 1.5 เท่า สารสกัดใบสะเดาด้วย ethanol (NLE/e) สามารถไล่แมลงได้ 69.23 ± 1.96% ใบสะเดาสกัดด้วยน้ำ (NLE/w) ไล่แมลงได้ 46.41 ± 2.59% ฤทธิ์การไล่ของ NLE/e > NLE/w 1.5 เท่า ($P < 0.01$) สารสกัดใบน้อยหน่า ethanol (CLE/e) สามารถไล่แมลงได้ 70.00 ± 1.42% ได้ใกล้เคียงกับสารสกัดใบน้อยหน่าสกัดด้วยน้ำ (CLE/w) ซึ่งไล่ได้ 61.23 ± 2.10% ฤทธิ์ของ MLE/e > MLE/w 2.2 เท่า ($P < 0.01$) และ MSE/e > MSE/w 1.5 เท่า ($P < 0.01$) ฤทธิ์การไล่แมลงวันทองของสารสกัดทั้งหมด เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ MSE/e > MLE/e > CLE/e > NLE/e > CLE/w > MSE/w > NLE/w > MLE/w

ฤทธิ์การไล่แมลงวันทองของสารสกัดผสมในอัตราส่วน 1:1 ของความเข้มข้นต่างๆ พบว่า NLE/w + CLE/w (78.00 ± 2.60%); NLE/w + MSE/w (76.67 ± 2.46%) และ NLE/w + MLE/w (73.33 ± 2.25%) เป็นชุดผสมที่มีฤทธิ์สูงกว่าและใกล้เคียงกัน (Figure 4.5 B) CLE + MLE และ CLE + MSE แสดงฤทธิ์การไล่ใกล้เคียงกัน ประมาณ 50-65% (Table 4.1)

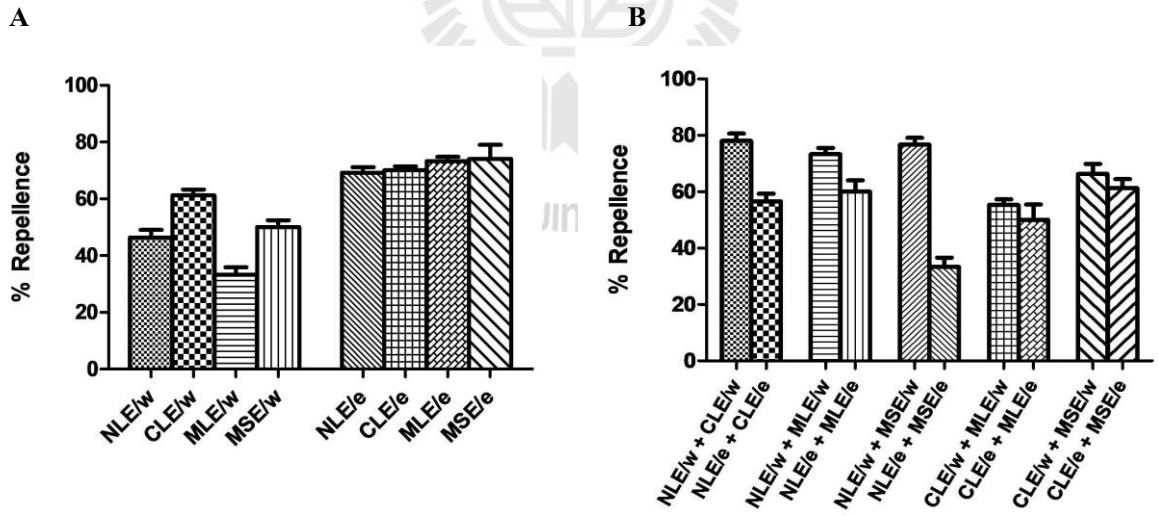

Figure 4.5 Repellent effects of the leaf extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE) and the seed extracts of mintweed (MSE) on adultn oriental fruit flies. A, individual extract treatments and B, combined extract treatments. Data were % Mean ± S.E. and n = 6.

พบว่า MLE/w และ MSE/w ช่วยเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) การไล่ ของ NLE/w แต่ลดฤทธิ์ (reduction effect) การไล่ของ CLE/w และในทำนองเดียวกัน NLE/e ลดฤทธิ์ของ MLE/e และ MSE/e อย่างมีนัยสำคัญ ฤทธิ์การไล่แมลงวันทองของสารสกัดสรุปใน Table 4.1

Table 4.1 Repellent activities of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on adult oriental fruit flies at 24 hours. Data were expressed as % Mean ± S.E., n = 6.

	% Repellence Mean ± S.E. (n = 6)		
Plant extract	**Water Extract**	**Ethanol Extract**	**P-value**
Individual			
NLE	46.41 ± 2.59	69.20 ± 1.96	0.002**
CLE	60.23 ± 2.10	70.00 ± 1.42	0.024*
MLE	33.33 ± 2.54	73.33 ± 1.45	0.000***
MSE	50.00 ± 2.43	74.00 ± 5.04	0.031*
Combination			
NLE + CLE	78.00 ± 2.60	56.66 ± 2.64	0.029*
NLE + MLE	73.33 ± 2.25	60.00 ± 4.07	0.033*
NLE + MSE	76.67 ± 2.46	33.33 ± 3.27	0.000**
CLE + MLE	55.25 ± 2.00	50.00 ± 5.43	0.937
CLE + MSE	66.25 ± 3.64	61.25 ± 3.24	0.065

Note:
NLE - neem, leaf extract, CLE - custard apple extract, MLE - mintweed leaf extract, and MSE - mintweed seed extract. ** significant difference at $P < 0.01$ and * significant difference at $P < 0.05$, analyzed by t-test of variance

4.4.2 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟักไข่ (Egg hatching) ของแมลงวันทอง

ฤทธิ์การควบคุมพัฒนาการของการฟักไข่ออกเป็นตัวอ่อน (hatching) ของสารสกัดใบสะเดาน้อยหน่า แมงลักคาและเมล็ดแมงลักคาที่ความเข้มข้นระหว่าง 2,500 – 10,000 ppm (μg/mL) (พบว่าฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด (concentration dependent) สารสกัดใบสะเดา (NLE) และเมล็ดแมงลักคา (MSE) สกัดด้วยน้ำและด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นท่ากันให้ฤทธิ์ไม่แตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญ (Figure 4.6 A, D) ส่วน CLE/w ยับยั้งการฟักไข่ได้มากกว่า CLE/e ที่ความเข้มข้นต่ำ 2,500 ppm (Figure 4.6 B) ตรงข้ามกับ MSE/e มีฤทธิ์สูงกว่า MSE/w ที่ความเข้มข้นต่ำ 2,500 ppm (Figure 4.6 D) ส่วนฤทธิ์การควบคุมพัฒนาการของจนฟักไข่ของสารสกัดผสมในอัตราส่วน 1:1 ของสารความเข้มข้นเท่ากัน พบว่าฤทธิ์ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด (concentration dependent) และ สารผสมของสารสกัดด้วย ethanol แสดงฤทธิ์การยับยั้งการฟักไข่ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นต่ำ 2,500 ppm ยกเว้นสารผสมระหว่าง NLE/w + MLE/w ที่แตกต่างกับ NLE/e + MLE/e เพียงเล็กน้อย (Figure 4.7 B)

ประสิทธิภาพของฤทธิ์ที่ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 50% หรือ LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง แสดงใน Figure 4.8 A และ B และ Table 4.2 การทดสอบด้วยสารสกัดเดี่ยวพบว่า MSE/e แสดงประสิทธิภาพสูงสุด มีค่า LC_{50} 591.12 $\pm$ 30.26 ppm ประสิทธิภาพรองลงมาคือ MSE/w มีค่า LC_{50} 1,098.66 $\pm$ 30.40 ppm สารสกัดใบสะเดา NLE/w และ NLE/e มีประสิทธิภาพต่ำและใกล้เคียงกัน มีค่า LC_{50} 3,353.35 $\pm$ 156.97 ppm และ 3,625.14 $\pm$ 162.38 ppm ตามลำดับ และ CLE/e มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด LC_{50} เท่ากับ 5,815.26 $\pm$ 172.20 ppm (Figure 4.8 A และ Table 4.2) ประสิทธิภาพของสารสกัดเดียวในการยับยั้งการฟักไข่แมลงวันทองเรียงจากมากไปน้อยดังนี้ MSE/e > MSE/w > CLE/w > MLE/e > MLE/w > NLE/w > NLE/e > CLE/e ส่วนการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผสมต่อการฟักไข่ พบว่าสารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพดีกว่าฤทธิ์การผสมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำ CLE/e + MLE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 475.19 $\pm$ 31.90 ppm และ NLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} เท่ากับ 666.76 $\pm$ 62.27 ppm (Figure 4.8 B และ Table 4.2) ชี้ให้เห็นว่า MLE/e เสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ของ NLE/e และ CLE/e ในขณะที่ CLE/e เพิ่มฤทธิ์ (additive effect) ให้กับ NLE/e การควบคุมแมลงวันทองระยะไข่จึงควรใช้สารสกัดเมล็ดแมงลักคา (MSE) อย่างเดียว หรือใช้สารสกัดใบแมงลักคา หรือใช้สารสกัดผสมระหว่างสารที่สกัดด้วย ethanol ด้วยกัน ไม่ควรใช้สารสกัดสะเดาอย่างเดียวเพื่อการควบคุมระยะฟักไข่นี้

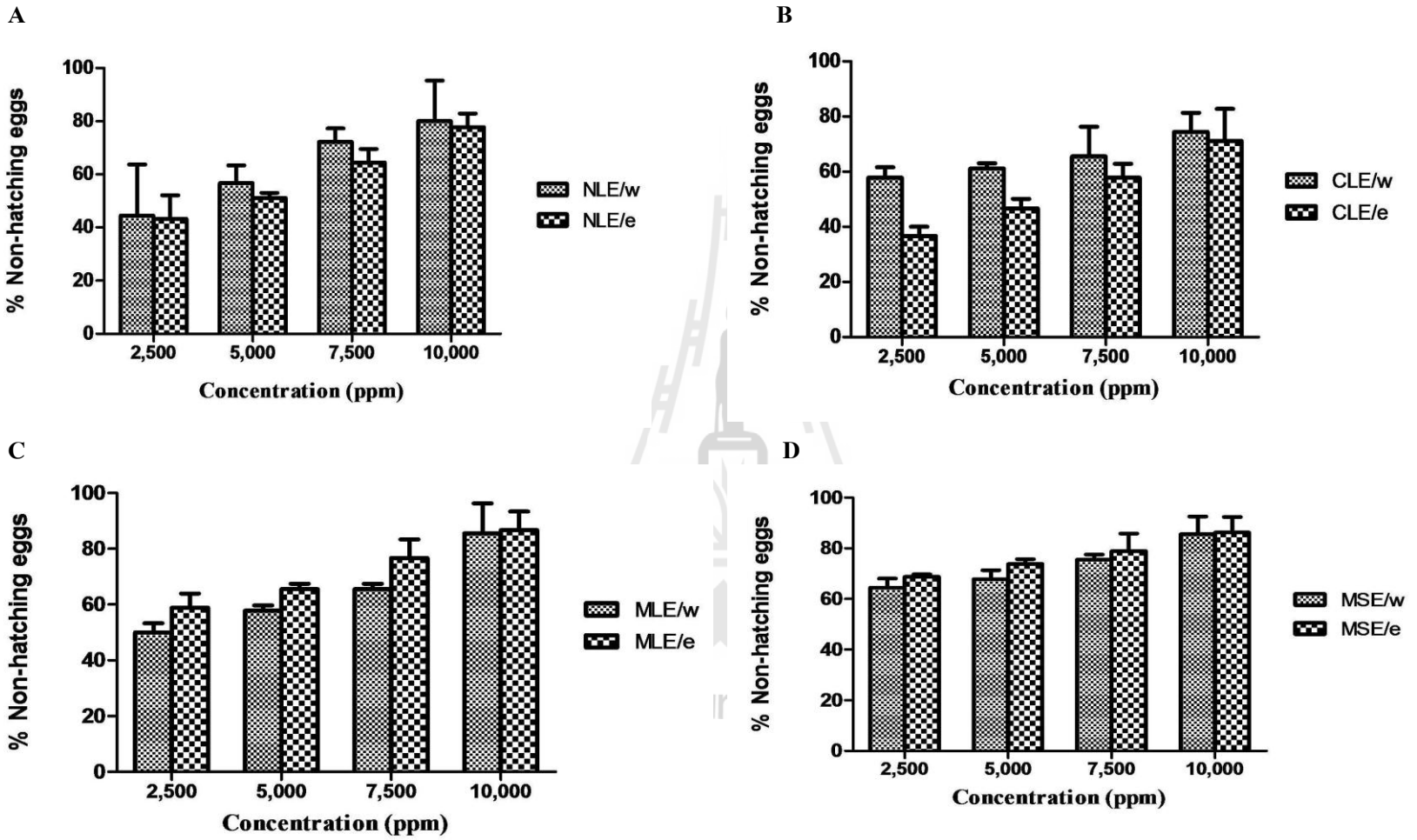

Figure 4.6 Anti-egg hatching effects of individual extracts of the leaf and seed extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE). Oriental fruit fly eggs were treated with the extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.

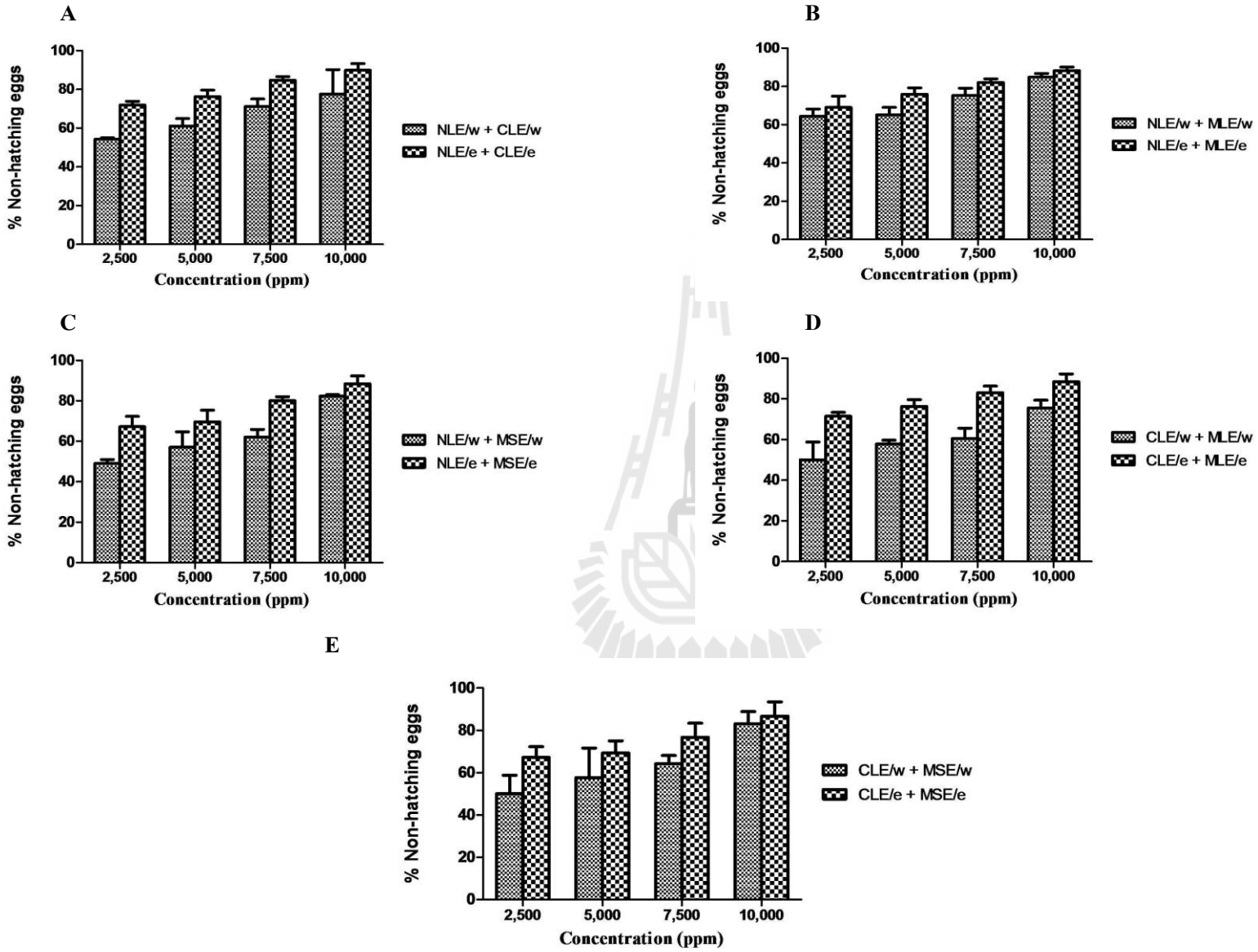

Figure 4.7 Anti-egg hatching effects of combined extracts (1:1) of the leaf and seed extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE). Oriental fruit fly eggs were treated with the extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.

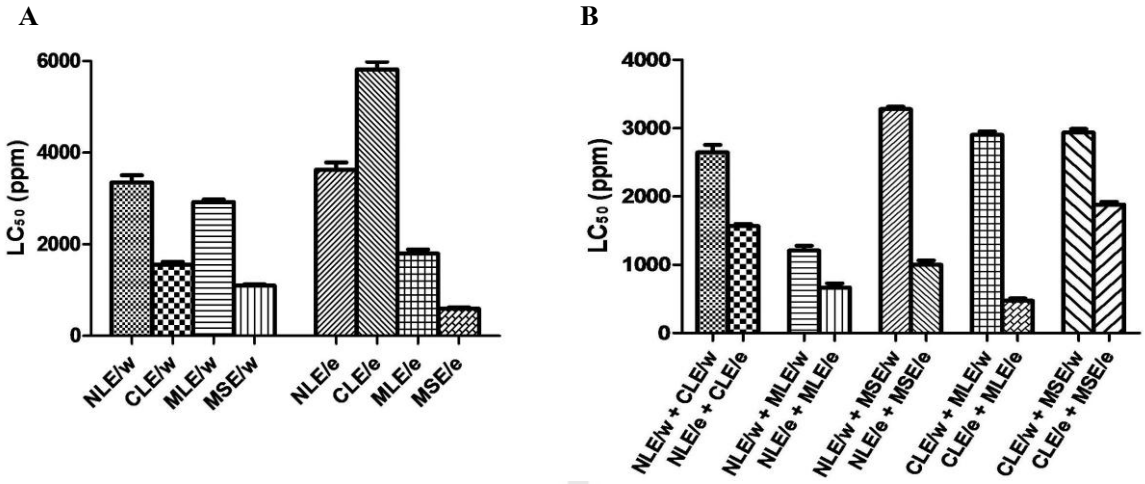

Figure 4.8 Anti-egg hatching efficacy of the extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and the extracts of mintweed seeds on egg hatching of oriental fruit flies. A, LC_{50} at 24 of individual extract treatments. B, LC_{50} at 24 h of the combined extract treatments. Data were expressed as Mean ± S.E. and n = 5.

Table 4.2 Direct contact toxic effects on egg hatching of oriental fruit flies by dipping eggs in individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds at 24 hours. Data were expressed as Mean of LC_{50} ± S.E., n = 5.

	LC_{50} (ppm), 24 h Mean ± S.E. (n = 5)		
Plant extract	**Water extract**	**Ethanol extract**	**P-value**
Individual			
NLE	3,353.35 ± 156.97	3,625.14 ± 162.38	0.087*
CLE	1,551.40 ± 67.23	5,815.26 ± 172.20	0.000**
MLE	2,920.27 ± 55.92	1,798.12 ± 87.59	0.000**
MSE	1,098.66 ± 30.40	591.12 ± 30.26	0.000**
Combination			
NLE + CLE	2,644.43 ± 109.53	1,567.75 ± 31.84	0.020**
NLE + MLE	1,207.63 ± 70.25	666.76 ± 62.27	0.003**
NLE + MSE	3,277.69 ± 37.02	1,001.48 ± 63.59	0.000**
CLE + MLE	2,902.43 ± 50.67	475.19 ± 31.90	0.000**
CLE + MSE	2,934.66 ± 54.94	1,880.97 ± 41.46	0.000**

Note:
NLE - neem, leaf extract, CLE - custard apple extract, MLE - mintweed leaf extract, and MSE- mintweed seed extract. ** significant difference at $P < 0.01$ and * significant difference at $P < 0.05$, analyzed by t-test of variance

4.4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมตัวอ่อนแมลงวันทองโดยการกิน (Larval feeding)

การตายของหนอนตัวอ่อน (larvae) แมลงวันทองโดยการกินสารสกัดของพืชชนิดเดียวที่ได้ผสมในอาหารเทียมในระดับความเข้มข้นของสารสกัดต่างๆ กัน ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าฤทธิ์การควบคุมหนอนแมลงวันขึ้นกับความเข้มข้น (concentration dependent) สารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ทำให้หนอนแมลงวันทองตายได้มากกว่าสารสกัดด้วย ethanol ยกเว้นสารสกัดใบแมงลักคาด้วย ethanol มีฤทธิ์กำจัดหนอนได้มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำเพียงเล็กน้อย ที่ความเข้มข้นต่ำ 2,500 ppm CLE/w ทำให้หนอนตายได้มากที่สุดประมาณ 64% (Figure 4.9 B) และ MSE/e ทำให้หนอนตายน้อยที่สุดประมาณ 37% (Figure 4.9 D) ซึ่งน้อยกว่า MSE/w 1.7 เท่า แต่ที่ความเข้มข้นสูง 10,000 ppm CLE/w และ MLE/e ทำให้หนอนตายเท่ากันคือประมาณ 82% (Figure 4.9 B, C)

ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดผสมต่อการตายของหนอนแมลง พบว่าสารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์กำจัดหนอนได้ดีกว่าสารผสมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำ (Figure 4.10) NLE/e + MLE/e ความเข้มข้นต่ำ 2,500 ppm กำจัดหนอนแมลงได้มากที่สุด 69% (Figure 4.10 B) และ NLE/e + CLE/e ความเข้มข้นสูง 10,000 ppm กำจัดหนอนแมลงได้มากที่สุด 86% (Figure 4.10 A) ซึ่งเท่ากับฤทธิ์ของ NLE/e + MLE/e (Figure 4.10 B)

ประสิทธิภาพของพิษต่อการกำจัดหนอนแมลงวันทองโดยการกิน พิจารณาจากค่า LC_{50} ซึ่งแสดงใน Figure 4.11 และ Table 4.3 พบว่า สารสกัดเดียว MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 982.18 $\pm$ 45.60 ppm (Figure 4.11 A และ Table 4.3) และพบว่าสารสกัดผสมฤทธิ์จะหักล้างกัน NLE/e $\pm$ MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 1,194.63 $\pm$ 46.64 ppm (Figure 4.11 C) ประสิทธิภาพของ NLE/e + MLE/e ใกล้เคียงกับ NLE/w + CLE/w ซึ่งมีค่า LC50 1,486.76 $\pm$ 36.11 ppm และ1,551.01 $\pm$ 82.27 ppm ตามลำดับ (Figure 4.10 B และ Table 4.3) จะเห็นว่า MLE/e ช่วยเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ให้แก่ NLE/e และเพิ่มฤทธิ์ (additive effect) ให้แก่ CLE/e ดังนั้นการกำจัดหนอนแมลงวันทองโดยการให้กินสารสกัดจึงควรใช้สารสกัดเดียวของใบน้อยหน่าด้วยน้ำ (CLE/w) และของสารสกัดใบแมงลักคาด้วย ethanol (MLE/e) ส่วนสารสกัดผสม ควรใช้สารผสมระหว่าง NLE/e + MSE/e และ สารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol ของพืชทั้ง 3 ชนิด

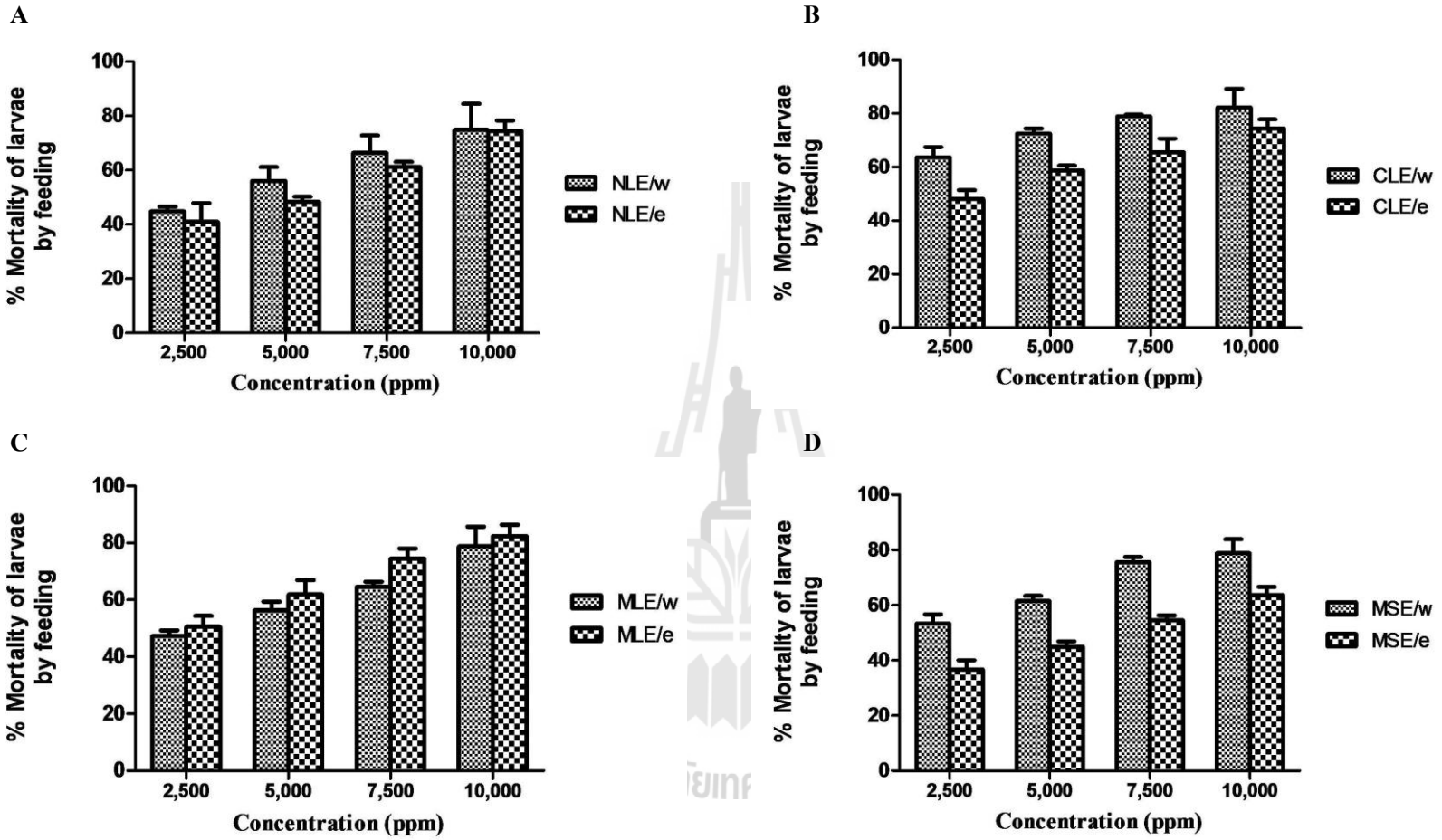

Figure 4.9 Larvicidal feeding effects of individual extracts of leaf and seed extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE). Oriental fruit fly larvae were fed with artificial food mixed with the extracts as designated concentrations.
Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.

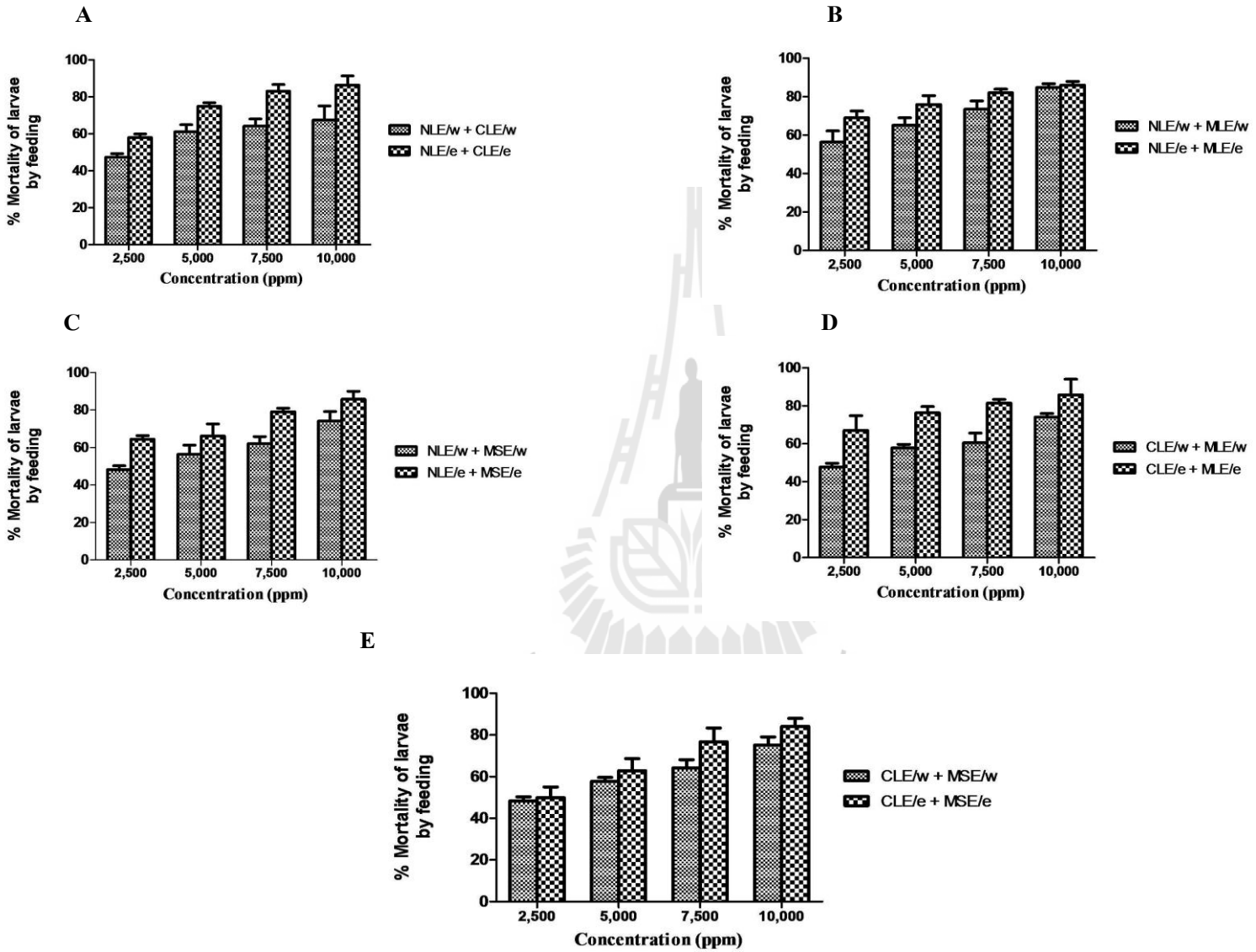

Figure 4.10 Larvicidal feeding effects of combined extracts (1:1) of leaf and seed extracts of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE). Oriental fruit fly larvae were fed with artificial food mixed with the extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.

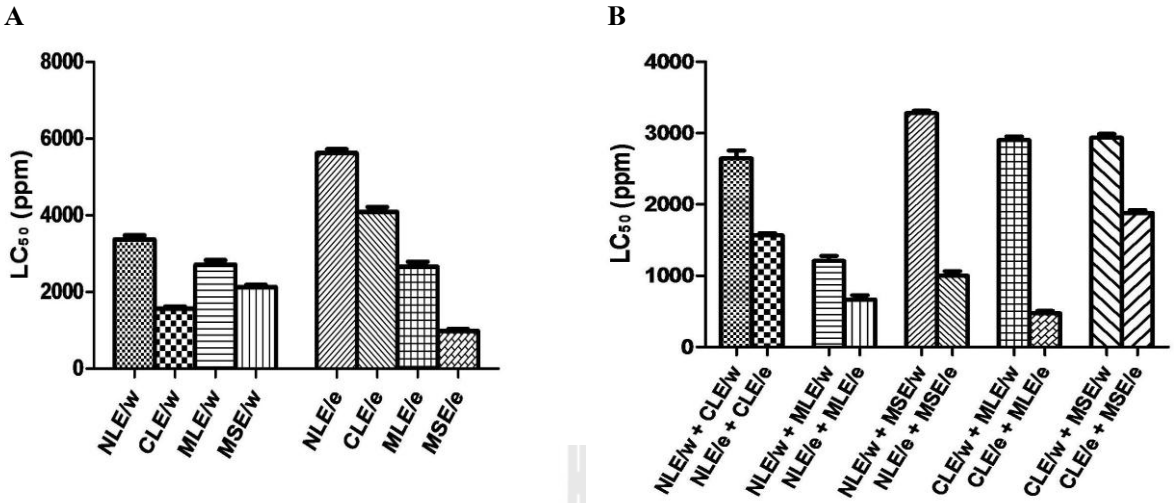

Figure 4.11 Larvicidal efficacy of the extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on larval feeding of oriental fruit flies. A, LC_{50} at 24 h of individual extract treatments. B, LC_{50} at 24 h of combined extract treatments. Data were expressed as Mean ± S.E. and n = 5.

Table 4.3 Feeding toxic effects of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on oriental fruit fly larvae at 24 hours. Data were expressed as Mean of LC_{50} ± S.E., n = 5.

	LC_{50} (ppm) at 24 h Mean ± S.E (n = 5)		
Plant extract	**Water extract**	**Ethanol extract**	**P-value**
Individual			
NLE	3,371.00 ± 108.27	5,621.70 ± 101.43	0.009**
CLE	1,568.34 ± 47.50	4,088.79 ± 125.29	0.000**
MLE	2,707.80 ± 120.38	2,658.39 ± 132.40	0.021*
MSE	2,128.22 ± 57.14	982.18 ± 45.60	0.000 **
Combination			
NLE + CLE	2,595.00 ± 95.55	1,783.29 ± 72.52	0.002**
NLE + MLE	1,551.01 ± 82.27	1,486.76 ± 36.11	0.020*
NLE + MSE	3,062.30 ± 81.81	1,194.63 ± 46.64	0.000**
CLE + MLE	2,338.58 ± 43.41	3,340.76 ± 33.79	0.000**
CLE + MSE	2,700.43 ± 65.13	2,166.98 ± 79.67	0.000**

Note:
NLE = neem, leaf extract, CLE = custard apple extract, MLE = mintweed leaf extract, and MSE= mintweed seed extract. ** significant difference at $P < 0.01$ and * significant difference at $P < 0.05$, analyzed by t-test of variance

4.4.4 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสัมผัสหนอนตัวอ่อนแมลงวันทอง โดยการจุ่มในสารละลาย (Larval dipping)

การตายของหนอนแมลงวันทองที่ 24 ชั่วโมงภายหลังการจุ่มหนอนในสารละลายของสารสกัดชนิดเดียว ลักษณะของฤทธิ์สารสกัดเดียวของสารสกัดใบสะเดา และของใบและเมล็ดแมงลักคาขึ้นกับความเข้มข้นของสารกัด (concentration dependent) แต่ฤทธิ์ของสารสกัดน้อยหน่าไม่ขึ้นกับความเข้มข้น และฤทธิ์ของสารสกัดทุกสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol แตกต่างกันไม่มาก สารสกัดน้อยหน่า CLE/w ทำให้หนอนตายได้มากทีสุดทุกความเข้มข้น ตายระหว่าง 63-81% (Figure 4.12 B) สารสกัดสะเดา NLE/w และ NLE/e ที่ความเข้มข้นต่ำ 2,500 ppm แสดงฤทธิ์ทำให้หนอนตายน้อยมากประมาณ 34% (Figure 4.12 A) ที่ความเข้มข้นสูง 10,000 ppm สารสกัดทุกชนิดแสดงฤทธิ์ใกล้เคียงกัน คือ ทำให้หนอนตายประมาณ 70-80% ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดผสม 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นเท่ากัน

ฤทธิ์ของสารสกัดใบพืชด้วย ethanol กำจัดหนอนแมลงได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ฤทธิ์ของ NLE/e + MLE/e 2,500 ppm ทำให้หนอนตายมากที่สุดประมาณ 72% และความเข้มข้น 10,000 ppm หนอนตาย 91% (Figure 4.13 B) อันดับรองลงมาคือ CLE/e + MLE/e (Figure 4.13 D) และ NLE/e + CLE/e (Figure 4.13 B)

ประสิทธิภาพของพิษต่อการฆ่าหนอนแมลงวันทองของสารสกัดเดียวค่อนข้างต่ำ นั่นคือค่า LC_{50} ของสารสกัดเกือบทั้งหมดค่อนข้างสูง (Figure 4.14 A และ Table 4.4) MSE/w มีค่า LC_{50} น้อยที่สุดซึ่งเท่ากับ 2,220.36 $\pm$ 83.79 ppm อย่างไรก็ตามสารสกัดเดียวด้วยน้ำแสดงพิษดีกว่าสารสกัดด้วย ethanol พิษของสารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol ค่อนข้างดี NLE /e+ MLE/e และ CLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} น้อยที่สุดและใกล้เคียงกัน คือ 652.80 $\pm$ 13.15 ppm และ 683.25 $\pm$ 38.08 ppm ตามลำดับ (Figure 4.14 B และ Table 4.4) จะเห็นได้ชัดเจนว่าสารสกัดใบแมงลักคา MLE/e สามารถใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ให้แก่สารสกัดใบพืชอื่นได้ดีมาก และ CLE/e น่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์ (additive effect) ให้แก่ NLE/e ดังนั้น การกำจัดระยะหนอนของแมลงวันทองด้วยการจุ่มจึงควรใช้สารสกัดผสมที่มีสารสกัดใบแมงลักคาด้วย ethanol เป็นสารหลัก การประยุกต์ใช้การทดลองนี้อาจกระทำได้โดย การฉีดพ่นหรือลาดบนพื้นดินที่โคนต้นไม้ให้ดินเปียกแฉะ เป็นต้น

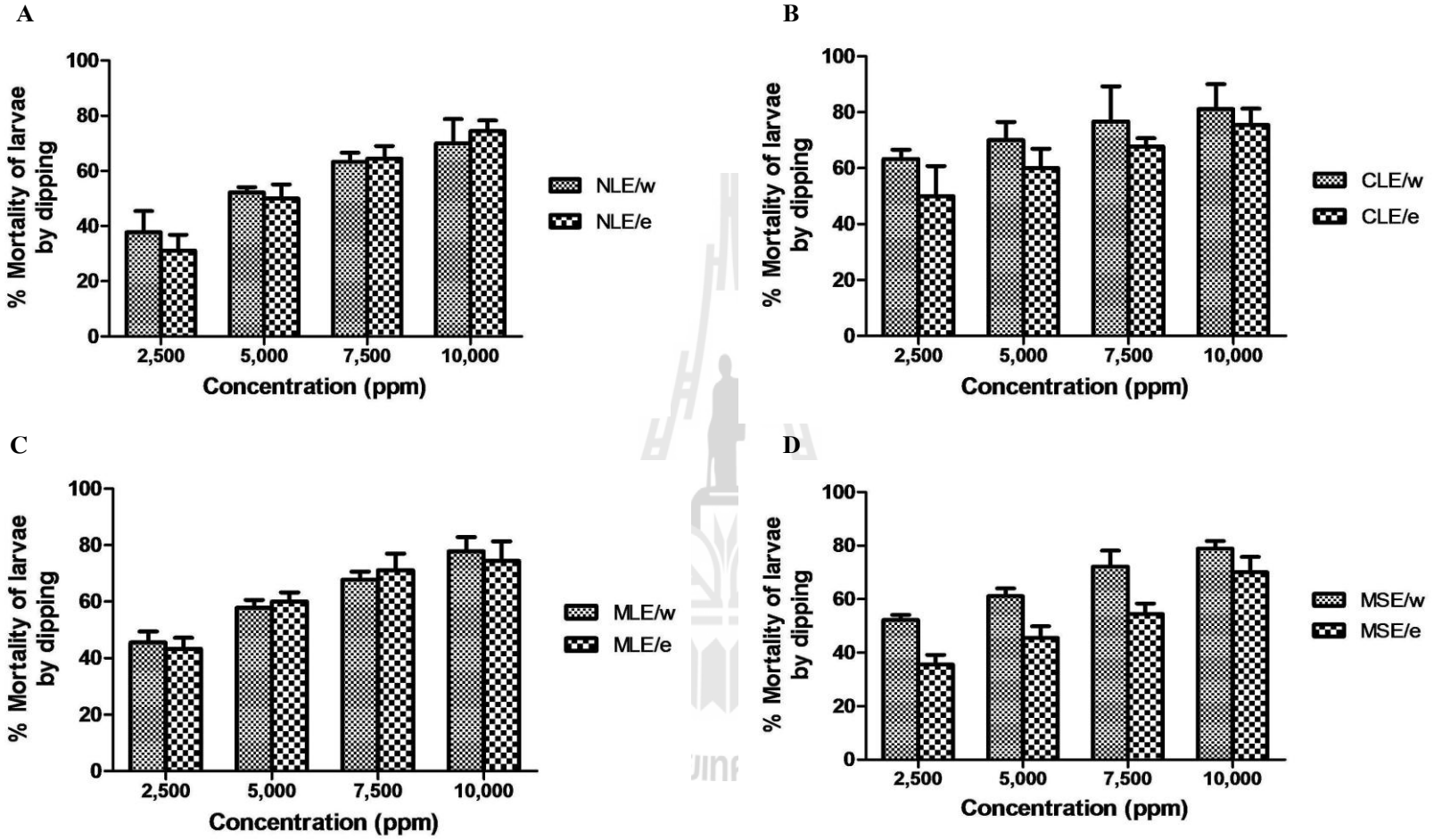

Figure 4.12 Direct contact effects of individual extracts of leaves and seeds of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE) on larvae by dipping, Oriental fruit fly larvae were dipped in individual extracts as designated concentrations. Data were % Mean ± S.E. and n = 5.

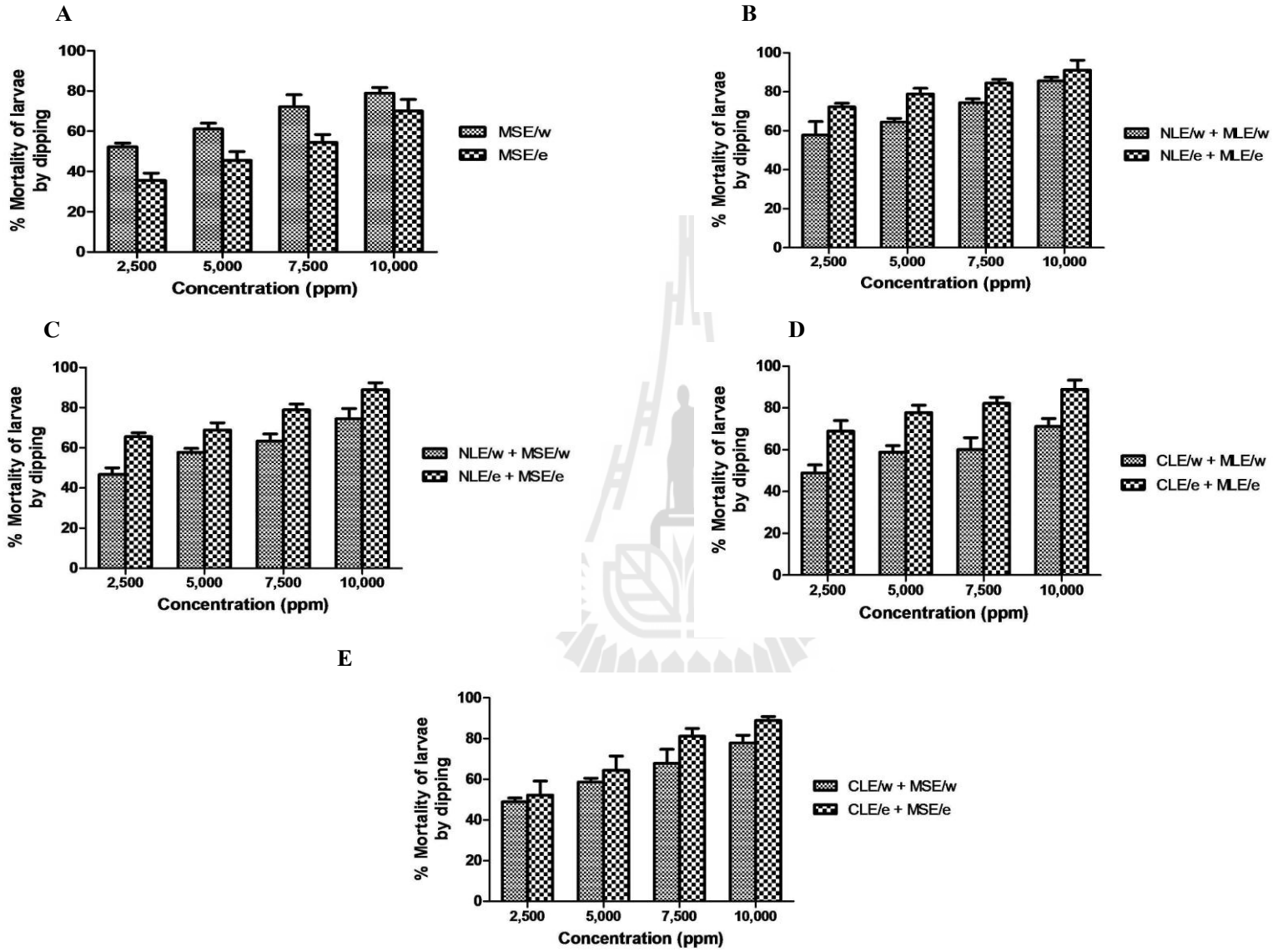

Figure 4.13 Direct contact effects of combined extracts of leaves and seeds of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE) on larvae by dipping Oriental fruit fly larvae dipped in combined extracts (1:1) as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.

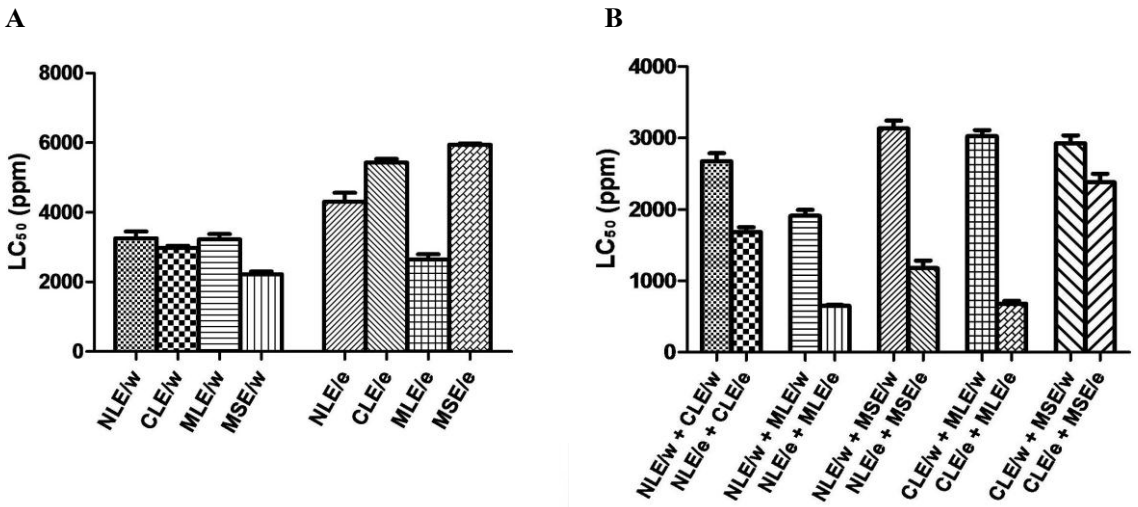

Figure 4.14 Direct contact efficacy the extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on oriental fruit fly larvae by dipping. A, LC_{50} at 24 h of individual extract treatments. B, LC_{50} at 24 h of combined extract treatments. Data were expressed as Mean ± S.E. and n = 5.

Table 4.4 Direct contact effects of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds by larval dipping at 24 hours. Data were expressed as Mean of LC_{50} ± S.E., n = 5.

	LC_{50} (ppm) at 24 h Mean ± S.E (n = 5)		
Plant extract	**Water extract**	**Ethanol extract**	**P-value**
Individual			
NLE	3,256.96 ± 190.82	4,300.95 ± 259.78	0.020*
CLE	2,977.18 ± 67.07	5,429.48 ± 110.37	0.000**
MLE	3,222.85 ± 152.44	2,650.98 ± 143.79	0.028*
MSE	2,220.36 ± 83.79	5,945.54 ± 40.00	0.000**
Combination			
NLE + CLE	2,673.76 ± 114.68	1,685.06 ± 67.93	0.002**
NLE + MLE	1,912.25 ± 81.37	652.80 ± 13.15	0.000**
NLE + MSE	3,134.99 ± 108.62	1,177.86 ± 106.46	0.000**
CLE + MLE	3,029.40 ± 83.91	683.25 ± 38.08	0.000**
CLE + MSE	2,928.19 ± 111.59	2,380.19 ± 121.02	0.081

Note:
NLE - neem, leaf extract, CLE - custard apple extract, MLE - mintweed leaf extract, and MSE - mintweed seed extract. ** significant difference at $P < 0.01$ and * significant difference at $P < 0.05$, analyzed by t-Test of variance.

4.4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมแมลงวันทองตัวเต็มวัย โดยการกิน (Adult feeding)

ฤทธิ์ของสารสกัดใบสะเดา น้อยหน่า และแมงลักคา และเมล็ดแมงลักคาผสมในอาหารเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้แมลงวันทองตัวเต็มวัยกิน สังเกตและนับจำนวนแมลงตายใน 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 2,500-10,000 ppm สารสกัดใบสะเดา NLE/w และ ใบแมงลักคา MLE/w แสดงฤทธิ์สูงกว่า NLE/e และ MLE/e เล็กน้อย แต่สารสกัด CLE/w และ MSE/w ทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์สูงระหว่าง 58-80% และสูงกว่า CLE/e และ MSE/e อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Figure 4.15 B และ D) อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของทุกสารสกัดที่ทำให้แมลงตายขึ้นความเข้มขัน (Figure 4.15 A, B, C และ D) ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดผสม พบว่าสารสผสมของสารสกัดด้วย ethanol กำจัดแมลงได้ค่อนข้างดีกว่าการผสมของสารสกัดด้วยน้ำ (Figure 4.16) NLE/e + CLE/e ทำให้แมลงตายดีที่สุดทุกระดับความเข้มข้น แมลงตาย 59-95% (Figure 4.16 A) และ CLE/e + MLE/e ทำให้แมลงตาย 52-90% (Figure 4.16 D)

ประสิทธิภาพของพิษของสารสกัดเดียวต่อการกินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย พบว่า CLE/w มีประสิทธิภาพสูงกว่าทุกสารสกัด มีค่า LC_{50} 1,710.91 ± 67.07 ppm ลำดับรองลงมาคือ MSE/w มีค่า LC_{50} 2,021.28 ± 83.79 และ MLE/w มีค่า LC_{50} 2,347.77 ± 152.44 ppm ในขณะที่ NLE/w และ NLE/e ประสิทธิภาพกำจัดแมลงไม่ดี มีค่า LC_{50} ค่อนข้างสูง 4,239.07 ± 190.82 ppm และ 4,810.68 ± 259.78 ppm ตามลำดับ (Figure 4.16 A และ Table 4.5) ประสิทธิภาพควบคุมแมลงวันทองตัวเต็มวัยเรียงตามลำดับดังนี้ ClE/w > MSE/w > CLE/e > MLE/w > MLE/w > NLE/w > NLE/e > MSE/e ในทำนองเดียวกันประสิทธิภาพของพิษสารสกัดผสมกำจัดแมลงวันทองตัวเต็มวัยด้วยการกินได้ปานกลาง NLE/e + CLE/e กำจัดแมลงได้สูงสุด มีค่า LC_{50} 1,605.87 ± 67.93 ppm และ NLE/w + MLE/w มีค่า LC_{50} 1,785.91 ± 81.37 ppm (Figure 4.17 B และ Table 4.5) จะเห็นได้ว่า CLE/e เสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ให้กับ NLE/e MLE/w เสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ให้กับ NLE/w และ CLE/e เสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ให้กับ MSE/e ดังนั้นการกำจัดแมลงวันทองตัวเต็มวัยควรใช้สารสกัดใบน้อยหน่า CLE/w หรือใช้สารสกัดผสม NLE/e + CLE/e และ NLE/w + MLE/w โดยใช้ผสมกับอาหารหรือกับเหยื่อที่ใช้ล่อจับแมลงวันทอง

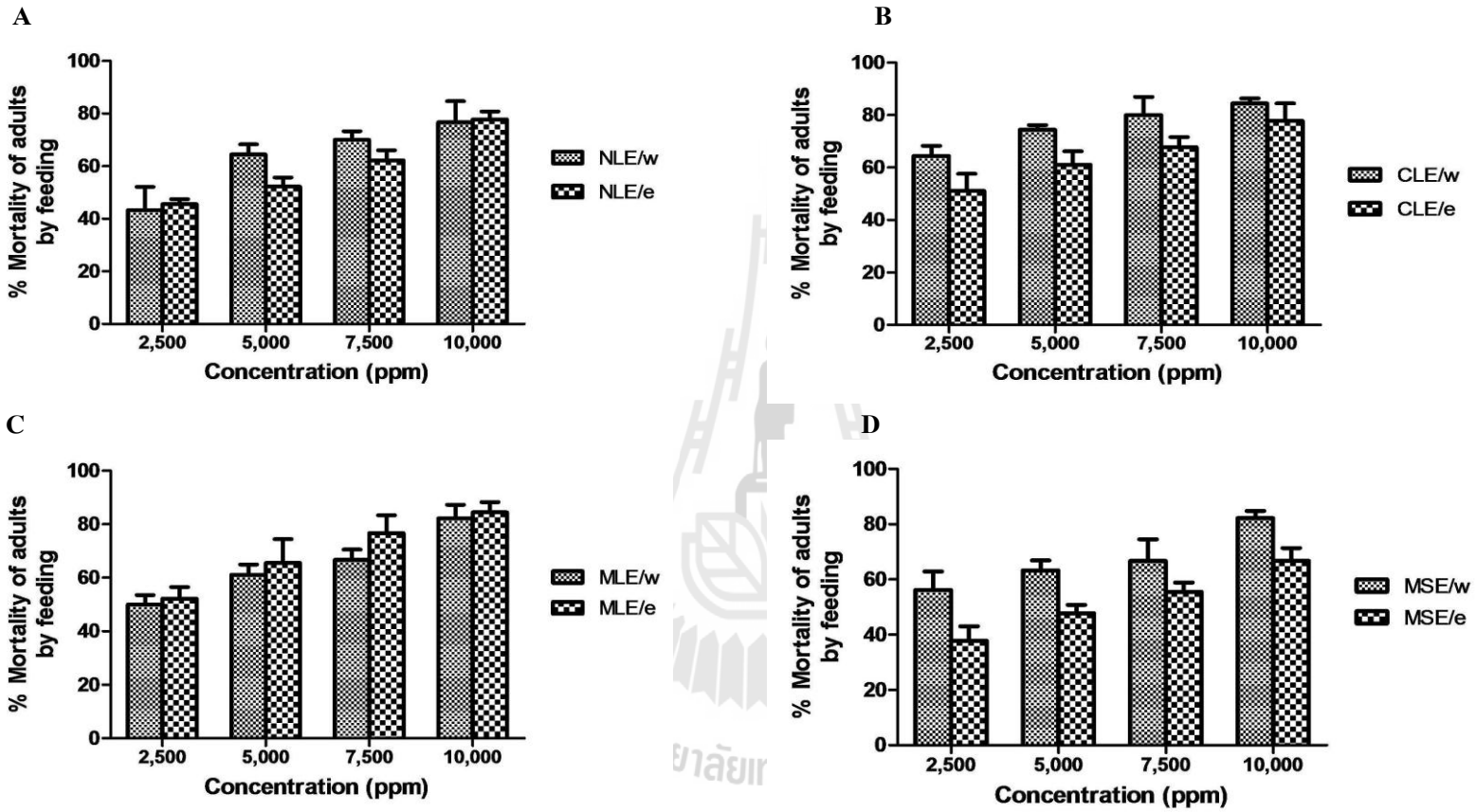

Figure 4.15 Adulticidal effects of individual extracts of leaves and seed of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE) by feeding, Oriental fruit fly adults were fed with artificial food mixed with the extracts as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.

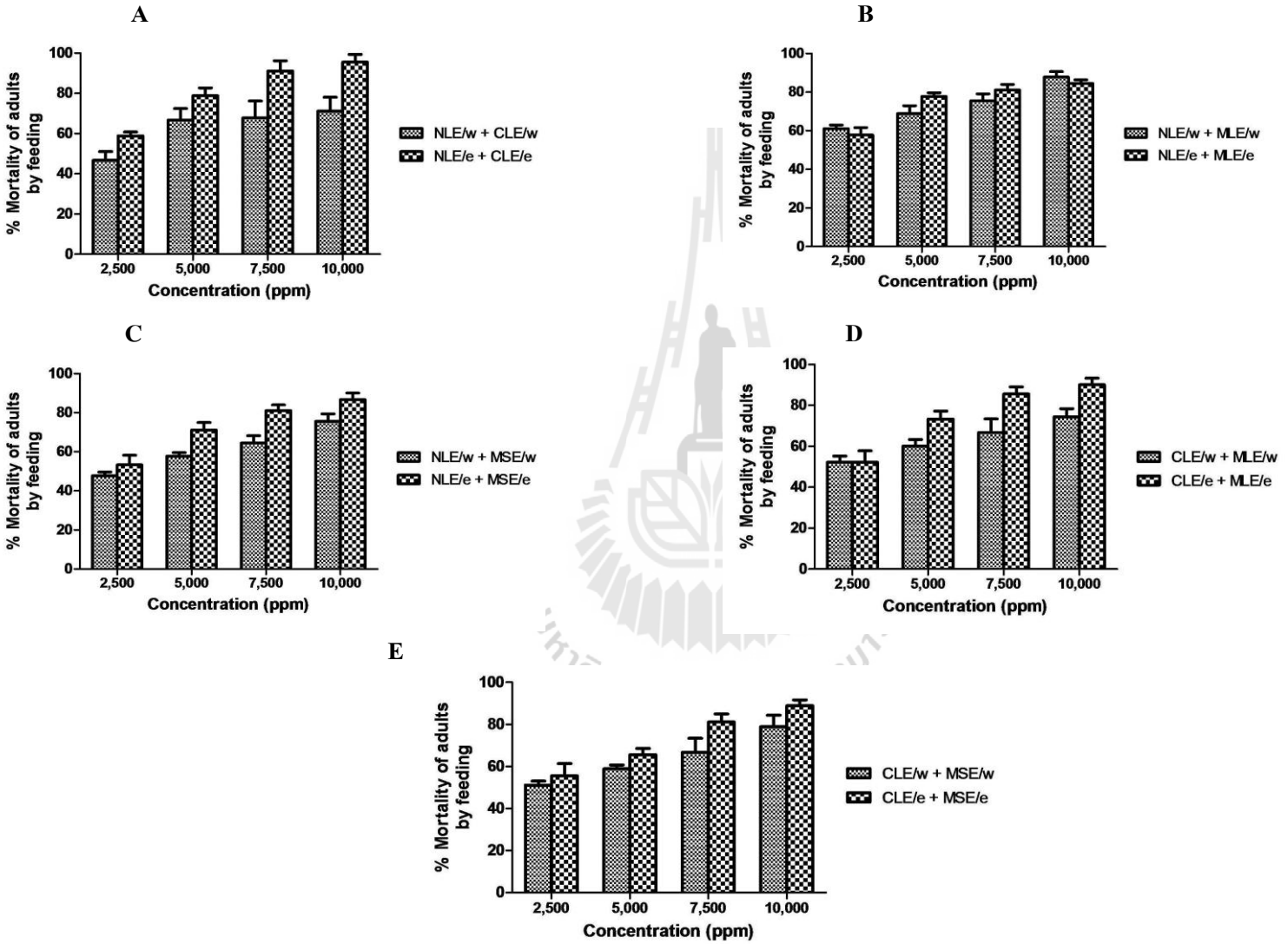

Figure 4.16 Adulticidal effects of combined extracts of leaves and seed of neem (NLE), custard apple (CLE) and mintweed (MLE / MSE), Oriental fruit fly adults were fed with artificial food mixed with the extracts (1:1) as designated concentrations. Data were % Mean $\pm$ S.E. and n = 5.

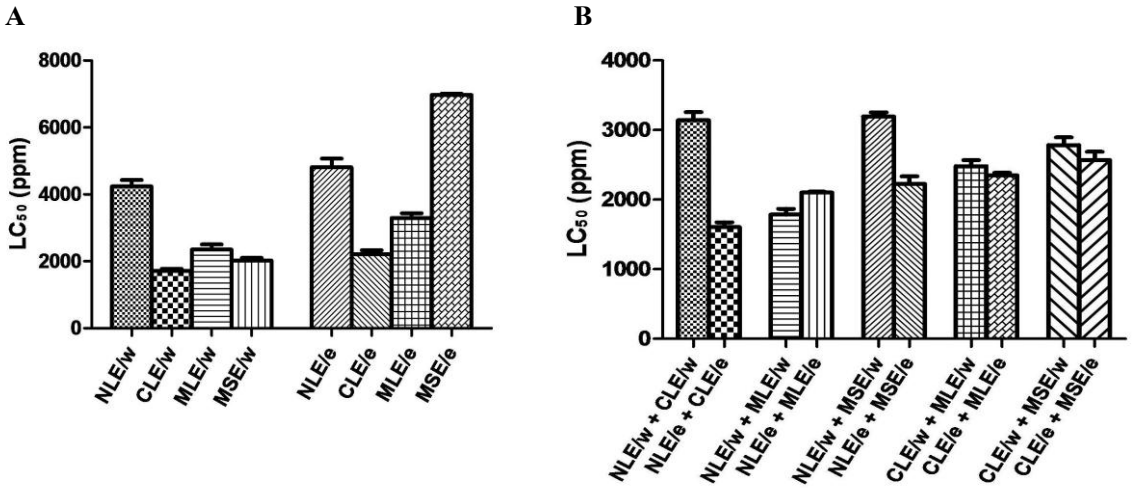

Figure 4.17 Adulticidal efficacy of extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on oriental fruit flies by feeding. A, LC_{50} at 24 h of individual extract treatments. B, LC_{50} at 24 h of combined extract treatments. Data were expressed as Mean ± S.E. and n = 5.

Table 4.5 Adulticidal efficacy of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds on oriental fruit flies by feeding at 24 hours. Data were expressed as Mean of LC_{50} ± S.E., n = 5.

	LC_{50} (ppm) at 24 h Mean ± S.E (n = 5)		
Plant extract	**Water extract**	**Ethanol extract**	**P-value**
Individual			
NLE	4,239.07 ± 190.82	4,810.68 ± 259.78	0.071
CLE	1,710.91 ± 67.07	2,217.21 ± 110.37	0.000**
MLE	2,347.77 ± 152.44	3,295.75 ± 143.79	0.062
MSE	2,021.28 ± 83.79	6,970.40 ± 40.00	0.000**
Combination			
NLE + CLE	3,142.13 ± 114.68	1,605.87 ± 67.93	0.002**
NLE + MLE	1,785.91 ± 81.37	2,102.86 ± 13.15	0.000**
NLE + MSE	3,193.85 ± 106.62	2,227.32 ± 106.46	0.000**
CLE + MLE	2,483.26 ± 83.91	2,349.39 ± 36.08	0.082
CLE + MSE	2,784.36 ± 111.59	2,568.26 ± 121.03	0.081

Note:
NLE - neem, leaf extract, CLE - custard apple extract, MLE - mintweed leaf extract, and MSE - mintweed seed extract. ** significant difference at $P < 0.01$ and * significant difference at $P < 0.05$, analyzed by t-Test of variance.

ในการศึกษาการควบคุมโดยชีวภาพแมลงวันทองด้วยสารสกัดเดียวจากใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลักคาและเมล็ดแมงลัก ด้วยน้ำหรือแอลกอฮอล์ (ethanol) โดยวิธีการไล่ และการยับยั้งพัฒนาการและการเจริญเติบโตโดยการยับยั้งการฟักไข่ การกินของตัวหนอน การจุ่มตัวหนอนในสารสกัด และการกินของตัวเต็มวัย ทั้งเป็นการทดลองโดยใช้สารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งในสารสกัดจะมีสารเคมีหลายชนิดของพืชปะปนกันอยู่ พบว่าสารสกัดเดียวจากพืชเหล่านี้สามารถควบคุมแมลงวันทองได้ในระดับปานกลางถึงดีมาก และจากการทดลองใช้สารสกัดผสม พบว่าสารสกัดจากน้อยหน่าและแมงลักคามีบทบาทเป็นสารเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากสะเดาได้ดีมาก พบลักษณะของการเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effects และแบบ additive effects ฤทธิ์หรือพิษของสารสกัดจากพืชเหล่านี้แสดงประสิทธิภาพแตกต่างกัน อาจเป็นเพราะแต่ละพืชมีสารเคมีแตกต่างกันและมีฤทธิ์ต่อแมลงระยะต่างๆ ในวัฏจักรชีวิตต่างกันหรือนัยยะหนึ่งแมลงแต่ละระยะซึ่งมีลักษณะของโครงสร้างทางเคมีของอวัยวะต่างกัน เช่น เปลือกไข่มีรูเล็กๆ ที่สารเคมีบางชนิดผ่านเข้าสู่ภายในไข่ได้ยากง่ายต่างกัน หรือเมื่อสารที่เข้าไปในไข่แล้วอาจไปยับยั้งพัฒนาการของตัวอ่อนแมลงต่างกัน สารเคมีมีปฏิกิริยาต่อเปลือก chitin ของลำตัวแมลงต่างกัน แมลงตัวเต็มวัยอาจมีระบบประสาทที่ไวต่อสารเคมีในสารสกัดต่างกันด้วย ซึ่งมีหลักฐานเชิงวิทยาศาสตร์ที่ผลการวิจัยจำนวนมากพอสมควรแต่ทั้งหมดเป็นการใช้สารสกัดชนิดเดียว ที่สอดคล้องสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบมีหลักฐานการวิจันเชิงวิทยาศาสตร์ที่วิจัยการใช้สารสกัดผสมควบคุมแมลงวันทอง ยกเว้นในภูมิปัญญาพื้นบ้านที่มีการปฏิบัติทางการเกษตร พบว่ามีหลักฐานการใช้สารสกัดพืชชนิดเดียวในการควบคุมแมลงชนิดอื่นๆ โดยชีววิธีได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

สะเดาสังเคราะห์สารสำคัญคือ azadirachtin และ nimbolide ด้วย สารเหล่านี้เป็นสารในกลุ่ม limonoids ซึ่งสังเคราะห์จากสาร tritepenes สารกลุ่ม limonoids มีศักยภาพควบคุมแมลงศัตรูพืชได้กว่า 200 ชนิด รวมทั้งแมลงวันทอง โดยไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม กลไกการควบคุมของสารการไล่ (repellence) กินตาย (antifeeding) ดักแด้ไม่ลอกคราบเป็นดัวเต็มวัย (pupate inhibitor) จะเห็นได้ว่าสารจากสะเดาที่แมลงกิน นอกจากทำลาย reproductive cycle ของแมลงแล้ว ยังเป็นสารพิษโดยตรงด้วย (Roy and Saraf, 2006) ในสะเดายังมีสารอนุพันธุ์ของ limonoid azadirachtin อีกมากมายซึ่งมี mode ของปฏิกิริยาซับซ้อนและมีมากจนยากที่จะบ่งชี้ให้ชัดเจน อาจเนื่องจากงานวิจัยทดลองกับแมลงต่างชนิดและใช้ความเข้มข้นต่างๆ กัน อย่างไรก็ตามการศึกษาและใช้สารสกัดจากสะเดาจะใช้ในวิถีต่อไปนี้ (1) Disrupting or inhibiting พัฒนาการของ eggs, larvae, หรือ pupae (2) Blocking การลอกคราบของ larvae หรือ nymphs (3) Disrupting mating และ Sexual communication (4) Repelling larvae และ adults (5) Deterring females จากการวางไข่ (6) Sterilizing adults (7) Poisoning larvae และ adults (8) Deterring feeding (9) Blocking การกลืนอาหาร ทำให้ลดการเคลื่อนที่ของทางเดินอาหาร (10) Metamorphosis ระยะต่างๆ ผิดปกติ และ

(11) Inhibition การสร้างเปลือก chitin และ โดยเฉพาะฤทธิ์ของสะเดาต่อแมลงวันทอง สารสกัดจากสะเดาจะหยุดพัฒนาการของดักแด้ เป็นพิษต่อตัวอ่อน และ ทำให้แมลงเจริญเติบโตช้า (Ruskin, 1992; Nathan, *et al*., 2006) มีการศึกษาสารสกัดสะเดาหลายหลักฐานที่ได้ผลดีเกี่ยวกับการไล่ยุง *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, *Ochierotatus triseriatus* และ *Anopheles darlingi* (Govindachari, 2000; Moor, *et al*., 2002; Barnard and Xue, 2004; Senthil-Nathan, *et al*., 2005; Sharma, *et al*., 2010) การขัดขวางการวางไข่ (oviposition deterrence) ของยุง *Aedes aegypti* (Kaur, *et al*., 2003) และไล่ด้วงฝักทอง (*Raphidopalpa foveicollis*) (Tandon and Sirohi, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติการไล่แมลงวันทองของ NLE/e และ CLE/e ในการศึกษาครั้งนี้

สารสกัดหยาบของน้อยหน่าสามารถควบคุมตัวอ่อนผีเสื้อ (Leatemia and Isman, 2004) ควบคุมแมลงวันผลไม้ ชนิด Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) ระยะฟักไข่ ไล่ รบกวนการวางไข่ และยืดเวลาพัฒนาการของตัวอ่อน (Epino and Chang, 1993) ควบคุมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของด้วงแป้งสีแดง *Tribolium castaneum* Herbst (Khalequzzaman and Sultana, 2006) จะเห็นว่าพิษของสารสกัดน้อยหน่าค่อนข้างหลากหลาย ทั้งนี้เนื่องจากน้อยหน่าผลิตสารพิษสำคัญ 2 ชนิดคือ isoquinolinic alkaloids ซึ่งเป็นพิษต่อระบบประสาท และ acetogenins / annacins เป็นสารพิษต่อ mitochondria โดยยับยั้งที่ complex I ซึ่งเป็นโปรตีนเชิงซ้อนใน electron transport chain เป็นผลยับยั้งการผลิตพลังงานของเซลล์ กลไกการทำงานของ acetogenins เหมือนกับของสาร rotenone เป็นสารพิษต่อแมลงและปลาซึ่งผลิตในพืชหางไหล (Isman, 2005) สารสกัดหยาบจาก *Annona squamosa* มีประสิทธิภาพสูงกว่า *Annona* spp อื่น น้อยหน่าจึงเป็นแหล่งสารธรรมชาติราคาต่ำอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจที่น่าใช้ในการควบคุมแมลงวันทอง และเสริมฤทธิ์ได้ดีกับแมงลักคาในการควบคุมแมลงวันทองทุกระยะตั้งแต่ไข่ถึงตัวเต็มวัย

Mintweed (bush tea, bushmint) ในไนจีเรียใช้เป็นพืชอาหาร และนิยมนำมาไล่ยุง พบว่าสารสกัดใบด้วย ethanol มีประสิทธิภาพควบคุมลูกน้ำระยะที่ 3 ของยุง *Aedes aegypti* ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อไข้เลือดออก สามารถควบคุมได้สูงกว่า 75% ใน 24 ชั่วโมง (Amusan *et al*., 2005) และกำจัดลูกน้ำยุงระยะ 2 ด้วย LC_{50} 20.24% (Tanprasit, 2005) ลดการระบาดของหนอนและตัวเต็มวัยผีเสื้อเจาะต้นข้าวโพด *Sesamia calamistis* Hampson ในภาคสนามเทียบได้กับสารฆ่าแมลง furadan (Adda, *et al*., 2011) สารสกัดเมล็ดแมงลักคาสกัดด้วย methanol สามารถควบคุมด้วงถั่วลิสง *Trogoderma granarium* Everts ในห้องเก็บ โดยลดการวางไข่ ยับยั้งการเจริญของหนอน และการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ดีกว่าสารสกัดจากใบแมงลักคา (Musa et al., 2009) ปรากฏหลักฐานวิเคราะห์น้ำมันจากใบแมงลักคาด้วย GC พบมีสารสำคัญคือ sabinene, terpinen-4-ol, β-pinene, β-caryophyllene และ limonene แสดงประสิทธิภาพต่อการควบคุมแมลงมอดในธัญพืช 4 ชนิด คือ *Callosobruchus maculates*, *Rhyzopertha dominica*,

Sitophilus oryzae และ *Tribolium castaneum* โดยการไล่ (repellency) การรม (fumigation) การทาตัว (topical application) (Tripathi and Upadhyay, 2009) ในทำนองเดียวกับ น้ำมันใบแมงลักสามารถควบคุมมอดข้าวสาลี *Sitophilus granarius* L. โดยการไล่และการทาตัวแล้วแมลงตาย และจากการวิเคราะห์ด้วย gas chromatography (GC) พบสาร monoterpene hydrocarbons และ sesquiterpene hydrocarbons ในน้ำมันใบแมงลักคาซึ่งเป็นสารระเหยซึ่งคาดว่าจะเป็นสาระสำคัญที่ทำให้มอดข้าวสาลีตายได้เมื่อถูกตัวแมลง (Conti *et al*., 2011) นอกจานี้สารสกัดใบแมงลักคาด้วย hexane, diethyl ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และน้ำ พบว่ามีประสิทธิภาพควบคุมผีเสื้อ *Helicoverpa armigera* และ *Spodoptera litura* โดยยับยั้งการกิน ฆ่าตัวหนอน ยับยั้งการฟักไข่ และป้องกันการวางไข่ ซึ่งพบว่าสารสกัดเหล่านั้นมีสารประเภท long aliphatic chain group ที่มี α, β-unsaturated keto-moiety จับติดอยู่ที่ศูนย์กลางของ phenolic nucleus ซึ่งคาดว่าสารนี้ไปเสริมฤทธิ์ของ phenolic compounds แบบ synergistic effect และ methyl และ enolic residues เพิ่มคุณสมบัติ hydrophobic ของ phenolic compounds ช่วยเสริมฤทธิ์ของสารสกัดในการกำจัดแมลงได้ทางอ้อม (Raja *et al*., 2005) ซึ่งหลักฐานข้างต้นนี้สอดคล้องและสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ที่พบว่า เมื่อใช้สารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาอย่างเดียวสามารถไล่ ยับยั้งการฟักไข่ กำจัดหนอน และ ตัวเต็มวัยแมลงวันทอง และเมื่อใช้ผสมกับสารสกัดสะเดาและน้อยหน่า สารสำคัญในสารสกัดแมงลักคาน่าจะเป็นสารฆ่าและเสริมฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพดีมากในการควบคุมแมลงวันทอง ดังนั้นสารสกัดแมงลักคาจึงควรจะได้รับการวิจัยพัฒนาเป็นตำรับในการผสมกับสารสกัดพืชอื่น (bio-pesticide formulations) เพื่อใช้กำจัดศัตรูพืช

4.5 สรุปการทดลอง

สารสกัดไล่แมลงวันทองที่มีฤทธิ์ไล่สูงที่สุดคือ สารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาด้วย ethanol (MLE/e) และ (MSE/e) โดยแสดงฤทธิ์ไล่แมลงได้มาก 74% ผลการทดลองโดยรวมของสารสกัดเดียว สารสกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ไล่แมลงวันทองได้ใกล้เคียงกับสารสกัดด้วยน้ำซึ่งสามารถไล่แมลงวันทองได้สูงกว่า 65% ฤทธิ์การไล่แมลงตัวเต็มวัยของสารสกัดเดียว เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ MSE/e > MLE/e > CLE/e > NLE/e > CLE/w > MSE/w > NLE/w > MLE/w ส่วนการทดลองผสมสารสกัดด้วยสารทำละลายชนิดเดียวกันไล่แมลงวันทอง พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของใบและเมล็ดแมงลักคา (MLE/w และ MSE/w) ช่วยเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect การไล่ของสารสกัดด้วยน้ำของใบสะเดา (NLE/w) แต่ลดฤทธิ์การไล่ของสารสกัดใบน้อยหน่า (CLE/w) ในขณะที่ สารสกัดด้วย ethanol ของใบสะเดา (NLE/e) ลดฤทธิ์การไล่ของแมงลักคา (MLE/e และ MSE/e)

ฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่เป็นตัวอ่อน (anti-egg hatching) ของแมลงวันทองโดยสารสกัดใบสะเดาน้อยหน่าและแมงลักคา และเมล็ดแมงลักคาขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด (concentration dependent fashion) MSE/e แสดงประสิทธิภาพสูงสุด มีค่า LC_{50} 591.12 $\pm$ 30.26 ppm ประสิทธิภาพรองลงมาคือ MSE/w มีค่า LC_{50} 1,098.66 $\pm$ 30.40 ppm CLE/e มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด LC_{50} เท่ากับ 5,815.26 $\pm$ 172.20 ppm NLE/w และ NLE/e มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน มีค่า LC_{50} 3,353.35 $\pm$ 156.97 ppm และ 3,625.14 $\pm$ 162.38 ppm ตามลำดับ สารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพดีกว่าฤทธิ์การผสมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำ CLE/e + MLE/e มีประสิทธิภาพดีที่สุด ค่า LC_{50} 475.19 $\pm$ 31.90 ppm และ LC_{50} ของ NLE/e + MLE/e เท่ากับ 666.76 $\pm$ 62.27 ppm MLE/e เสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ของ NLE/e และ CLE/e ในขณะที่ CLE/e เพิ่มฤทธิ์ (additive effect) ให้กับ NLE/e

ฤทธิ์การควบคุมหนอนแมลงวันทองโดยการกินของหนอนตัวอ่อน การตายของหนอนขึ้นกับความเข้มข้น (concentration dependent) สารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ทำให้ตัวหนอนแมลงวันตายได้มากกว่าสารสกัดด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นสูง 10,000 ppm CLE/w และ MLE/e ทำให้หนอนตายมากเท่ากันคือประมาณ 82% ประสิทธิภาพของพิษต่อการกำจัดหนอนแมลงวันทองโดยการกิน พิจารณาจากค่า LC_{50} พบว่า สารสกัดเดียว MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 982.18 $\pm$ 45.60 ppm และพบว่าสารสกัดผสมส่วนมากฤทธิ์จะหักล้างกัน NLE/e $\pm$ MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 1,194.63 $\pm$ 46.64 ppm

ประสิทธิภาพของพิษต่อการฆ่าหนอนแมลงวันทองโดยการจุ่มหนอนในสารสกัดเดียวค่อนข้างต่ำ หรือค่า LC_{50} ความเข้มข้นทำให้หนอนตาย 50% ของสารสกัดเกือบทั้งหมดค่อนข้างสูง MSE/w มีประสิทธิภาพดีที่สุด มีค่า LC_{50} 2,220.36 $\pm$ 83.79 ppm พิษของสารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol ค่อนข้างดี NLE/e + MLE/e และ CLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} น้อยที่สุดและใกล้เคียงกัน คือ 652.80 $\pm$ 13.15 ppm และ 683.25 $\pm$ 38.08 ppm ตามลำดับ สารสกัดใบแมงลักคา MLE/e สามารถใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้แก่สารสกัดใบพืชอื่นได้ดีมาก และ CLE/e น่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่ NLE/e

ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกินของแมลงวันทองตัวเต็มวัย CLE/w มีประสิทธิภาพทำให้แมลงตายได้มากที่สุด มีค่า LC_{50} 1,710.91 $\pm$ 67.07 ppm ลำดับรองลงมาคือ MSE/w มีค่า LC_{50} 2,021.28 $\pm$ 83.79 ppm และ MLE/w มีค่า LC_{50} 2,347.77 $\pm$ 152.44 ppm ประสิทธิภาพของพิษสารสกัดผสมกำจัดแมลงวันทองตัวเต็มวัยด้วยการกินได้ปานกลาง NLE/e + CLE/e กำจัดแมลงได้สูงสุด มีค่า LC_{50} 1,605.87 $\pm$ 67.93 ppm และ NLE/w + MLE/w มีค่า LC_{50} 1,785.91 $\pm$ 81.37 ppm และ CLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ NLE/e MLE/w เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ NLE/w และ CLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ MSE/e

เอกสารอ้างอิง

Adda, C., Atachi, P., Hell, K, and Tamo, M. (2011). Potential use of the bushmint, *Hyptis suaveolens,* for the control of infestation by the pink stalk borer, *Sesamia calamistis* on maize in southern Benin, West Africa. J Insect Sci. 11:33, available online: insectscience.org/11.33

Ali, H., Ahmad, S., Jan, S., and Safiullah. (2010). Efficacy of different control methods against oriental fruit fly *Bactrocera zonata* (SAUNDERS). ARPN J. Agric Biol Sci. 5(2):1-3.

Amusan, A.A.S., Idowu, A.B. and Arowolo, F.S. (2005). Comparative toxicity effect of bush tea leaves (*Hyptis suaveolens*) and orange peel (C*itrus sinensis*) oil extract on larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Tanzania Health Res Bull., 7:174-178.

Barnard, D.R. and Xue, R.D. (2004). Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochierotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 41:726-730.

Conti, B., Canale, A., Conti, P.L., Flamini, G., and Rifici, A. (2011). *Hyptis suaveolens* and *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oils: Qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). J. Pest Sci., 84:219-228.

Epino, P.B. and Chang, F. (1993). Insecticidal activity of *Annona squamosa* (L.) seed extracts against the mediterratnean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedenmann) (Diptera:Tephritidae). Philippine Entomologist, v. 9(2):228-238.

Govindachari,, T. R., Suresh, G., Gopalakrishnan, G. and Wesley, S. D. (2000). Insect antifeedant and growth regulating activities of neem seed oil: The role of major tetranortriterpenoids. J. Appl. Ent. 124, 287:291.

Isman, M.B., Koul, O., Luczynki, A., and Kamonski, J. (1990). Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. J. Agri. Food Chem. 38:1406-1411.

Isman, M.B. (2005). Tropical forests as sources of natural insecticides. Chapter 6 in Recent Advances in Phytochemistry, Volume 39. In Chemical Ecology and Phytochemistry of Forests and Forest Ecosystems; JT Arnason, M Abou-Zaid, JT Romeo [eds.], Elsevier. 145-161.

Kaur, J.S., Lai, Y.L., and Giger, A.D. Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. Med. Vet. Entomol.. 17:457-460.

Khalequzzaman, M and Sultana, S. (2006). Insecticidal activity of *Annona squamosa* L. seed extracts against the red flour beetle, *Tribolium castsnrum* (Herbst). J Biol-Sci., 14:107-112.

Leatemia, J.A. and Isman, M.B. (2004). Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against Lepidopteran Larvae. *Phytoparasitica* 32(1):30-37.

Moore, S.J., Lenglet, A. and Hill, N. (2002) Field evaluation of three plant-based insect repellents against malaria vectors in Vaca Diez Province, the Bolivian Amazon. J. Am. Mosq. Control Assoc., 18:107-110.

Musa, A.K., Dike, M.C., and Onu, I. (2009). Evaluation of Nitta *(Hyptis suaveolens* Poit.) Seed and Leaf Extracts and Seed Powder for the Control of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) in Stored Groundnut. American-Eurasian J. Agro., 2:176-179.

Nathan, S.S., Kalaivani, K., Sehoon, K., and Murugan, K. (2006). The toxicity and behavioural effects of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee), the rice leaffolder Chemosphere 62:1381–1387.

Pathak, P.H., and Krishna, S.S. (1986). Reproductive efficiency in *Earias fabia* Stoll (Lepidopterae: Noctuidae) affected by neem oil vapour. Appl. Entomol. Zool. 21:347–348.

Prijono, D., Hassan, E. (1993). Laboratory and field efficacy of neem (*Azadirachta indica* A: Juss) extracts against two broccoli pests. Zeitschrift für Pflantzenkrankheiten und Pflantzenschutz, 100:354–570.

Raja, N., Jeyasankar, A., Vnkatesan, S.J., and Ignacimuthu S. (2005). Efficacy of *Hyptis suaveolens* against lepidopteran pests. Current Sci., 88:220-222.

Riba, M., Marti, J., and Sans, A. (2003). Influence of azadirachtin on development and reproduction of *Nezara viridula* L. (Het., Pentatomidae). J. Appl. Entomol. 127: 37–41.

Roy, A. and Sara, S. (2006). Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. Biol Pharm. Bull., 29:191-201.

Ruskin, F.R. (1992). Effects on insects. Neem: A Tree for solving global problems. Ntional Academy Press, Washington, D.C. USA., pp 39-50.

Santos dos, A.E. and Sant′Ana, A.E.G. (2001). Molluscicdal properties of some species of Annona. Phytomedicine. 8:115-120.

Sharma, T., Qamar, A. and Khan, A.M. (2010). Evaluation of neem (*Azadirachta indica*) extracts against the eggs and adults of *Dysdercus cingulatus* (Fabicius). World Appl. Sci. J. 9:398-402.

Shimizu, T. (1988). Suppressive effects of azadirachtin on spermiogenesis of the diapausing cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, in vitro. Entomol .Exp. Appl. 46: 197–199.

Siderhurst, M.S. and Jang, E.B. (2006). Attraction of female oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, to *Terminalia catappa* fruit extracts in wind tunnel and olfactometer tests. Formosan Entomol. 26:45-55.

Singh, S. and Singh, R.P. (1998). Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). Phytoparasitica. 26(3):191-197.

Sukhirin, N., Bullangpoti, V., and Pluempanupat, W. (2009). The insecticidal studies from *Alpinia galanga* and *Cleome viscose* extract as alternative control tool to *Bactrocera dorsalis* (Hendel). KKU Sci. J. 37 (Sup) 71-76.

Tandon, P. and D+Sirohi, A. (2009). Laboratory assessment of the repellent properties of ethanolic extracts of four plants against *Raphidopalpa foveicollis* Lucas (Coleoptera: Chrysomelidar). Int. J. Ssutain. Crop Prod 4:1-5.

Tanprasit, P. (2005). Biological control of dengue fever mosquitoes (*Aedes aegypti* Linn.) using leaf extracts of chan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) and hedge flower (*Lantana camara* Linn.). **Master** Thesis, Suranaree University of Technology. ISBN 974-533-548-7.

Tripathi, A.K. and Upadhyay, S (2009) Repellency and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) leaf essential oil against four dtored-grain coleopteran pests, Internat'l. J. Tropical Insect Sci. 29:219-228.

Tongon, N. and Bullangpoti, V. (2009). The insecticidal activity of *Piper nigrum* Linn, extract to oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* Hendel) and its effect on carboxylesterase and glutathione-S-transferase. In Proceedings of the 4th Conference on Science and Technology for Youth. 55-64.

http://ipm.ait.asia: Fruit fly life cycle. Available online at http://ipm.ait.asia/?page_id=35

www.sci.lru.ac.th: กิตติ ตันเมืองปัก Effect of sea holly (*Acanthus ilicifolius* Linn.) crude extract on mortality of oriental fruit fly (*Bactrocera correcta* Bezzi) in larval stage. Available online at www.sci.lru.ac.th/download/book2/2-7.pdf

www.spc.int: Biological control against fruit flies in pacific island countries and territories. 2007. Available online at http://www.spc.int/Pacifly/Control/Biocontrol.htm

รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม. (2544). ศึกษาความทนเค็ม ทนแล้ง และความเป็นพิษของต้นแมงลักคา (*Hyptis suaveolens* Linn.) ต่อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*Heliothis armigera* Hubn.) ดุษฎีนิพนธ์ สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ISBN 974-533-027-2.

มนตรี จิรสุรัตน์ (2553). แมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด. สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย. Available online at http://www.ezathai.org/knowledge05.html

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 คุณสมบัติทางพฤกษาเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิตของสารสกัดของสะเดา น้อยหน่าและแมงลักคา

5.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และ การกำจัดอนุมูลอิสระ (Total phenolic compounds and Free radical scavenging)

การศึกษาคุณสมบัติทางพฤกษาเคมีของสารสกัดใบของสะเดา น้อยหน่าและแมงลักคา และเมล็ดแมงลักโดยวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic coumpounds – TPC) ด้วยวิธีของ Folin Ciocalteu's method พบว่าปริมาณของ TPC ไม่ขึ้นกับสารที่ใช้ ทำสกัดแต่ขึ้นกับชนิดและส่วนของพืช อาจเนื่องจากพืชแต่ละชนิดและแต่ละส่วนผลิตสารที่มี polarity มากน้อยต่างกัน ปริมาณ TPC ในสารสกัดเรียงจากมากไปน้อยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ NLE/e > CLE/w > NLE/w > CLE/e > MSE/w > MLE/w > MLE/e > MSE/e ซึ่งมีค่าเท่ากับ 338 $\pm$ 41.83; 309 $\pm$ 44.45; 297 $\pm$ 31.67; 261 $\pm$ 30.74; 254 $\pm$ 30.51; 251 $\pm$ 31.55; 245 $\pm$ 26.48 และ 179 $\pm$ 13.38 mgGAE/L ตามลำดับ ส่วนคุณสมเป็นต้านอ็อกซิเดชั่น (antioxidant activity) โดยวัดการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) โดยวิธี DPPH assay พิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่สารสกัดสามารถกำจัดอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ได้ 50% หรือ IC_{50} พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดเรียงจากมากไปหาน้อย โดยค่า IC_{50} เรียงจากค่าน้อยไปมากดังนี้ MSE/e > MSE/w > CLE/w > NLE/w > NLE/e > CLE/e > MLE/e > MLE/w ซึ่งมีค่า IC_{50} 155.48 $\pm$ 7.06; 156.44 $\pm$ 3.99; 163.55 $\pm$ 8.99; 172.99 $\pm$ 4.53; 211.53 $\pm$ 8.61; 218.62 $\pm$ 3.64; 226.39 $\pm$ 6.22 และ 288.92 $\pm$ 13.91 ppm สารสกัดเมล็ดแมงลักคา MSE แสดง free radical scavenging activity สูงกว่าสารสกัดพืชอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) พบว่า ประสิทธิภาพ free radical scavenging ของสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาด้วยน้ำดีกว่า (IC_{50} น้อยกว่า) สกัดด้วย ethanol และ IC_{50} ผกผันกับปริมาณของ TPC ดังจะเห็นได้จากสารสกัดเมล็ดแมงลัก MSE/e มี TPC น้อยที่สุด แต่มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

.

5.1.2 **Thin layer chromatographic (TLC) fingerprinting**

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองเบื้องต้น ใช้ mobile phase systems จนได้ 3 ระบบที่สามารถแยกสารสกัดได้ คือ System A ประกอบด้วย ethyl acetate : methanol : water ในอัตราส่วน 81:11:8 (v/v/v) System B ประกอบด้วย n-buthanol : gracial acetic acid : water ในอัตราส่วน 40:10:50 (v/v/v) และ System C ประกอบด้วย chloroform : methanol : gracial acetic acid ในอัตราส่วน 47.5:47.5:5 (v/v/v) จะเห็นได้ว่า mobile phase 3 systems นี้สามารถแยกสารเคมีในสารสกัดของใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลักคา และ เมล็ดแมงลักคาได้ต่างกัน และได้แถบเฉพาะหรือ TLC fingerprinting ของสารสกัดแต่ละพืชหรือส่วนของพืชคล้ายกัน TLC fingerprinting จึงใช้เป็นเครื่องมือในการบ่งชี้กลุ่มของพฤกษาเคมีของสารสกัดได้ระดับหนึ่ง

5.1.3 **ความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด**

การตรวจหาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มีชีวิตของสารสกัดด้วยวิธี brine shrimp lethality assay (BSLA) ซึ่งเป็นวิธีที่แสดงนัยของพิษต่อสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ทั้งนี้แสดงพิษด้วยความเข้มข้นของสารที่มีพิษที่เป็นผลให้กุ้งฝอยตาย 50% ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งในการวิเคราะห์พิษของสารสกัดใบสะเดา น้อยหน่าและแมงลักคา และเมล็ดแมงลักครั้งนี้ พิษของสารสกัดเรียงจากน้อยไปมาก หรือจากฤทธิ์สูงไปน้อย คือ MLE/e < MLE/w < MSE/w < NLE/e < MSE/e < CLE/e < NLE/w < CLE/w ซึ่ง LC_{50} เท่ากับ 0.14 $\pm$ 0.02, 0.86 $\pm$ 0.07, 3.65 $\pm$ 0.41, 6.33 $\pm$ 1.12, 6.37 $\pm$ 0.60, 27.78 $\pm$ 3.27, 48.37 $\pm$ 5.13 และ 115.06 $\pm$ 8.97 ppm ตามลำดับ ในการผสมสารสกัดที่สกัดด้วยสารทำละลายชนิดเดียวกันในอัตราส่วน 1:1 พบว่าฤทธิ์ของสารสกัดผสมระหว่างสารสกัดใบด้วย ethanol แสดงความเป็นพิษได้มากกว่า (LC_{50} น้อยกว่า) การผสมระหว่างสารสกัดใบด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) MLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้ CLE/e และ NLE/e การเสริมฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดผสม จะทำให้สามารถเลือกใช้สารสกัดในปริมาณน้อยลงแต่ได้ประสิทธิภาพสูงกว่าและประหยัดค่าใช้จ่ายได้ดีกว่า และสังเกตเห็นได้ว่า cytotoxicity สอดคล้องกับปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัด แต่ผกผันกับ free radical scavenging ดังสรุปใน Table 5.1 การใช้ประโยชน์จากสารสกัดพืชจึงสามารถเลือกนำไปใช้ได้ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของงาน

Table 5.1 Summary of total phenolic compound content, free radical scavenging activity and cytotoxicity activity of the leaf extracts of neem, custard apple, and mintweed and the seed extracts of mintweed.

Extract	Total phenolic cpd (mgGAE/L) Mean ± S.D., n =5	Inhibition of DPPH• (IC_{50}) (ppm) Mean ± S.D, n = 5	Cytoxicity, BSLA LC_{50} (ppm), 24 h. Mean ± S.D., n = 6
NLE/w	297 ± 31.67*	172.99 ± 4.53*	48.37 ± 5.13**
NLE/e	338 ± 41.83*	211.53 ± 8.61*	6.33 ± 1.12**
CLE/w	309 ± 44.45*	163.55 ± 8.99*	115.06 ± 8.97**
CLE/e	261 ± 30.74*	218.62 ± 3.64*	27.78 ± 3.27**
MLE/w	251 ± 31.55	288.92 ± 13.91	0.86 ± 0.07**
MLE/e	245 ± 26.48	226.39 ± 6.22	0.14 ± 0.02**
MSE/w	254 ± 30.51*	156.44 ± 3.99	3.65 ± 0.41*
MSE/e	179 ± 13.28*	155.48 ± 7.06	6.37 ± 0.60*

N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol

5.2 การควบคุมโดยชีววิธีของไข่ ตัวอ่อน และ ตัวเต็มวัยแมลงวันทอง

5.2.1 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการไล่ (Repellency(แมลงวันทองตัวเต็มวัย

ทดลองอิทธิพลของสารต่อการไล่แมลงวันทองโดยทดสอบใน Olfactometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ระบบปิด ใช้สารสกัดผง 1 กรัม เปรียบเทียบกับสารดึงดูดแมลง methyl eugenol ในน้ำตาลเป็นสารควบคุม สารสกัดด้วย ethanol ไล่แมลงได้ใกล้เคียงกันและสูงกว่า 65% และ ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ฤทธิ์การไล่แมลงวันทองของสารสกัดทั้งเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ MSE/e > MLE/e > CLE/e > NLE/e > CLE/w > MSE/w > NLE/w > MLE/w สารสกัดด้วย ethanol ของใบเมล็ดแมงลักคา (MLE/e) และเมล็ดแมงลักคา (MSE/e) มีฤทธิ์ไล่แมลงวันทองได้มากที่สุด 74% สารสกัดใบน้อยหน่า ethanol (CLE/e) สามารถไล่แมลงได้ 70.00 ± 1.42% สารสกัดใบสะเดาด้วย ethanol (NLE/e) สามารถไล่ 69.23 ± 1.96% การทดลองผสมระหว่างสารสกัดที่สกัดด้วยสารทำละลายชนิดเดียวกันในอัตราส่วน 1:1 ของสารความเข้มข้นเท่ากัน พบว่า MLE/w และ MSE/w ช่วยเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ต่อการไล่ของ NLE/w

{NLE/w + CLE/w (78.00 ± 2.60%); NLE/w + MSE/w (76.67 ± 2.46%) และ NLE/w + MLE/w (73.33 ± 2.25%)} แต่ลดฤทธิ์ต่อการไล่ของ CLE/w ลงเล็กน้อย และ NLE/e ลดฤทธิ์การไล่ของ MLE/e และ MSE/e ดังนั้น MLE/w และ MSE/w น่าจะเป็นสารสเริมฤทธิ์ที่ในการใช้ผสมกับสาสรสกัดใบด้วยน้ำในการไล่แมลงวันทอง

5.2.2 **ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟักไข่แมลงวันทอง (Egg hatching)**

นำไข่ของแมลงวันทองวางบริเวณกลางกระดาษที่หยดสารสกัดใบสะเดาน้อยหน่าและแมงลักคา และสารสกัดเมล็ดสะเดาที่ความเข้มข้นต่างๆ (2,500-10,000 ppm) ที่ 24 ชั่วโมง ฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด (concentration dependent) สารสกัดเมล็ดแมงลักคาด้วย ethanol (MSE) มีฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่ได้มากที่สุด มีค่า LC_{50} 591.12 ± 30.26 ppm ประสิทธิภาพของสารสกัดเดียวในการยับยั้งการฟักไข่แมลงวันทองเรียงจากมากไปน้อยดังนี้ MSE/e > MSE/w > CLE/w > MLE/e > MLE/w > NLE/w > NLE/e > CLE/e ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดผสมต่อการฟักไข่ พบว่าสารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพดีกว่าฤทธิ์การผสมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำ CLE/e + MLE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 475.19 ± 31.90 ppm และ NLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} เท่ากับ 666.76 ± 62.27 ppm นั่นคือ MLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้ NLE/e และ CLE/e และพบว่า CLE/e เพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้ NLE/e จึงสรุปได้ว่าการควบคุมการฟักไข่แมลงวันทองควรจะใช้สารสกัดเมล็ดแมงลัก

5.2.3 **ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมตัวอ่อนโดยการกิน (Larval feeding)**

การทดลองการกินสารสกัด (2,500-10,000 ppm) ของตัวอ่อนระยะที่ 2 (second instar larvae) ของแมลงวันทอง สารสกัดใบแมงลักคาด้วย ethanol กำจัดหนอนแมลงมากกว่าสกัดด้วยน้ำและมีประสิทธิภาพมากที่สุด MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 982.18 ± 45.60 ppm ส่วนสารสกัดอื่นๆ สารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ทำให้ตัวหนอนแมลงวันตายได้มากกว่าสารสกัดด้วย ethanol และมีประสิทธิภาพไม่มาก และพบว่าสารสกัดผสมในอัตราส่วน 1:1 ส่วนมากฤทธิ์จะหักล้างกัน NLE/e ± MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 1,194.63 ± 46.64 ppm และ MLE/e ช่วยเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้แก่ NLE/e และเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่ CLE/e การกำจัดหนอนแมลงวันทองโดยการให้กินสารสกัดจึงควรใช้สารสกัดเดี่ยวของใบน้อยหน่าด้วยน้ำ (CLE/w) และใช้การผสมระหว่าง NLE/e + MSE/e

5.2.4 **ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสัมผัสตัวอ่อนโดยการจุ่มในสารละลาย (Larval dipping)**

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อตัวอ่อนระยะที่ 2 (second instar larvae) ของแมลงวันทอง โดยการจุ่มตัวหนอนในสารละลายสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (2,500-10,000 ppm) เป็นเวลา 3 วินาที สารสกัดเดี่ยวด้วยน้ำแสดงพิษดีกว่าสารสกัดด้วย ethanol สารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำ CLE/w แสดงฤทธิ์ทำให้หนอนแมลงวันทองตายมากที่สุดทุกระดับความเข้มข้นของสาร แต่เมื่อประสิทธิภาพพิจารณาจากค่า LC_{50} ของสารสกัดทุกสารมีค่า LC_{50} ค่อนข้างสูงกว่าการควบคุมด้วยวิธีการให้ตัวอ่อนกินสารสกัด MSE/w มีค่า LC_{50} น้อยที่สุดซึ่งเท่ากับ 2,220.36 $\pm$ 83.79 ppm ส่วนฤทธิ์สารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol ค่อนข้างดี NLE /e+ MLE/e และ CLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} น้อยที่สุดและใกล้เคียงกัน คือ 652.80 $\pm$ 13.15 ppm และ 683.25 $\pm$ 38.08 ppm ตามลำดับ และพบว่า สารสกัดใบแมงลักคา MLE/e สามารถใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้แก่สารสกัดใบพืชอื่นได้ดีมาก ในขณะที่ CLE/e น่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่ NLE/e การควบคุมหนอนตัวอ่อนแมลงวันทองจึงควรใช้สารสกัดผสมที่มี MLE/e ฉีดพ่นให้ตัวหนอนเปียก

5.2.5 **ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมแมลงตัวเต็มวัยโดยการกิน (Adult feeding)**

การควบคุมตัวเต็มวัยของแมลงวันทองโดยการผสมสารสกัดความเข้มข้นหลายระดับ (2,500-10,000 ppm) ในอาหารเทียมเลี้ยงแมลง สารสกัดด้วยน้ำ CLE/w มีประสิทธิภาพสูงกว่าทุกสารสกัด มีค่า LC_{50} 1,710.91 $\pm$ 67.07 ppm ประสิทธิภาพควบคุมโดยสารสกัดเดี่ยวเรียงตามลำดับดังนี้ ClE/w > MSE/w > CLE/e > MLE/w > MLE/w > NLE/w > NLE/e > MSE/e ประสิทธิภาพของพิษสารสกัดผสมกำจัดแมลงวันทองตัวเต็มวัยด้วยการกินได้ปานกลาง NLE/e + CLE/e กำจัดแมลงได้สูงสุด มีค่า LC_{50} 1,605.87 $\pm$ 67.93 ppm และ NLE/w + MLE/w มีค่า LC_{50} 1,785.91 $\pm$ 81.37 ppm และ CLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ NLE/e MLE/w เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ NLE/w และ CLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ MSE/e ดังนั้นจึงควรใช้สารสกัดใบน้อยหน่า CLE/w NLE/e + CLE/e และ NLE/w + MLE/w ควบคุม/กำจัดแมลงวันทองตัวเต็มวัย

การศึกษาการควบคุมโดยชีววิธีแมลงวันทองด้วยสารสกัดของพืชโดยเทคนิคการไล่ การยับยั้งการฟักไข่ การให้หนอนตัวอ่อนระยะที่ 2 กินและจุ่มในสารละลายของสารสกัด และการให้ตัวเต็มวัยกินครั้งนี้ สรุปเปรียบเทียบการประสิทธิภาพการควบคุม/กำจัดแมลงได้ดัง Table 5.2

Table 5.2 Summary of the insecticidal activities of the leaf extracts of neem, custard apple and mintweed and the seed extracts of mintweed on adult repellence, egg hatching, larval feeding, larval dipping, and adult feeding. The data are expressed as % repellence and the LC_{50} values of the rest effects.

Plants Extracts	% Repellence, 24 h Mean ± S.E.	LC_{50} (ppm), 24 h Mean ± S.E.			
		Egg Hatching	Larval Feeding	Larval Dipping	Adult Feeding
Individual					
NLE/w	46.41 ± 2.59	3,353.35 ± 156.97	3,371.00 ± 108.27	3,256.96 ± 190.82	4,239.07 ± 190.82
NLE/e	69.20 ± 1.96	3,625.14 ± 162.38	5,621.70 ± 101.43	4,300.95 ± 259.78	4,810.68 ± 259.78
CLE/w	61.23 ± 2.10	1,551.40 ± 67.23	1,568.34 ± 47.50	2,977.18 ± 67.07	1,710.91 ± 67.07
CLE/e	70.00 ± 1.42	5,815.26 ± 172.20	4,088.79 ± 125.29	5,429.48 ± 110.37	2,217.21 ± 110.37
MLE/w	33.33 ± 2.54	2,920.27 ± 55.92	2,707.80 ± 120.38	3,222.85 ± 152.44	2,347.77 ± 152.44
MLE/e	73.33 ± 1.45	1,798.12 ± 87.59	2,658.39 ± 132.40	2,650.98 ± 143.79	3,295.75 ± 143.79
MSE/w	50.00 ± 2.43	1,098.66 ± 30.40	2,128.22 ± 57.14	2,220.36 ± 83.79	2,021.28 ± 83.79
MSE/e	74.00 ± 5.04	591.12 ± 30.26	982.18 ± 45.60	5,945.54 ± 40.00	6,970.40 ± 40.00

All data were analyzed by t-test of variance for paired samples. NLE - neem, leaf extract, CLE - custard apple extract, MLE - mintweed leaf extract, MSE- mintweed seed extract, w - water and e - ethanol.

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ ดร. กรกช นามสกุล อินทราพิเชฐ
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

สาขาวิชาชีววิทยา
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา
โทรศัพท์ 044-22-4296
โทรสาร 044-22-4633

4. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2515 ปริญญาตรี วท.บ. (สัตววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2520 ปริญญาโท วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2533 ปริญญาเอก Ph.D. (Molecular Biology) Lehigh University, Bethlehem, Pennsylvania, USA.

5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญ

Molecular cell Biology (cell proliferation and cell apoptosis) และ Plant-based insect pest biological control

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี