รหัสโครงการ SUT 3-302-41-12-03

รายงานการวิจัย

การควบคุมแมลงสาบอเมริกัน *Periplaneta americana* โดยใช้สารสกัดจากกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*

(Control of American cockroach, *Periplaneta americana* by Using *Pueraria mirifica* Extract)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.จุฑารัตน์ อรรถจารุสิทธิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตพืช

สำนักเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ยุทธนา สมิตะสิริ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2541

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2545

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณเหิรพักตร สุจิรา คุณกรวรรณภรณ์ แจงเชือ คุณฤชุอร วรรณะ และคุณวัชระวงศ์วิริยะ ที่ช่วยเหลืองานวิจัยนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนงบประมาณงานวิจัย และสถานวิจัยสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ที่ดูแลบัญชีรายจ่ายของโครงการ

บทคัดย่อ

นำหัวกวาวเครือขาว (*P. mirifica*) มาสกัดโดย 2 วิธีการคือ ใช้เอทธิลอัลกอฮอล์ (PmEtOH) และใช้น้ำกลั่น (PmHOH) นำสารสกัดที่ได้จากทั้ง 2 วิธีการไปทดสอบกับแมลงสาบอเมริกัน (*P. americana*) ใน 2 การทดลองดังนี้คือ การทดลองที่ 1 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ 7 กรรมวิธี คือ 1) อาหารไก่ไข่ (Slf) + น้ำปกติ (H_2O) เป็นกลุ่มควบคุม 2) Slf. PmEtOH + H_2O 3) Slf. + H_2O. PmEtOH 4) Slf. PmHOH + H_2O 5) Slf. + H_2O. PmHOH 6) Slf. Estrogen + H_2O และ 7) Slf. + H_2O. Estrogen โดยใช้สารสกัดที่ได้จากทั้ง 2 วิธีการที่ความเข้มข้น 10% w/w และใช้ estrogen จากท้องตลาด (Premarin) ขนาดแนะนำสำหรับคนปกติคือ 12 x 10^{-5} mg w/w ผสมกับอาหารไก่ไข่ (Slf) และน้ำ (H_2O) โดยมีอาหารไก่ไข่และน้ำปกติเป็นกรรมวิธีควบคุม ให้แมลงสาบทดลองกินต่อเนื่อง 45 วัน แล้วให้กินอาหารปกติต่ออีก 15 วัน การทดลองที่ 2 เหมือนการทดลองที่ 1 แต่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มเป็น 20 % w/w ใช้ estrogen (Premarin) เพิ่มเป็น 6 เท่าคือ 72 x 10^{-5} mg w/w และเพิ่มกรรมวิธีที่ 8 คือ ผงกวาวเครือขาวบดละเอียด (Pm powder) ผสมอาหารและน้ำ ให้แมลงสาบกินต่อเนื่อง 30 วัน และให้กินอาหารปกติต่ออีก 15 วัน ผลการทดลองพบว่า การทดลองที่ 1 แสดงผลทางบวกคือกวาวเครือขาวสามารถเพิ่มจำนวนไข่รวม, จำนวนช่องไข่/ฝักไข่ และ % การฟักไข่ สูงขึ้นแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม โดยมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ 5% และเทียบเท่ากับการให้กิน estrogen (Premarin) ขนาดปกติในคน และเมื่อให้กินอาหารและน้ำ ปกติต่อเนื่องอีก 15 วัน กลุ่ม Slf.Pm EtOH และโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม H_2O . Pm HOH จะให้ตัวเลขที่สูงอย่างเด่นชัด การทดลองที่ 2 แสดงว่า Slf. Pm EtOH และ Slf.Pm HOH ที่ความเข้มข้น 20% w/w ทำให้เกิดผลทางลบคือ จำนวนฝักไข่รวม และ % การฟักไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ 1% และ 5% ตามลำดับ และลดลงต่ำกว่าการให้ Premarin ที่สูงขนาด 72 x 10^{-5} mg w/wและหลังจากการให้กินอาหาร และน้ำปกติต่อเนื่องอีก 15 วัน ยังคงแสดงผลของ % ของการฟักไข่ต่ำอย่างต่อเนื่องและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ส่วน Slf. powder ให้ผลในทางบวกทั้งขณะให้กิน 30 วัน และหลังกิน 15 วัน

ผลการทดลองเรื่องความผิดปกติของร่างกายพบว่าเหมือนกันในทั้ง 2 การทดลอง คือ ผิวลำตัวที่เป็นมันมากผิดจากทั่วไป กล้ามเนื้อที่ผนังลำตัวหนามากขึ้น และในการทดลองที่ 2 พบความผิดปกติเพิ่มขึ้นคือมีก้อนกลมขนาดต่าง ๆ กันอยู่ในช่องว่างลำตัวทั้ง 2 เพศ ในเพศผู้พบท่ออสุจิและต่อม accessory gland ผิดปกติ ในเพศเมียพบก้อนเนื้องอกที่รังไข่

ผลการทดลองนี้แสดงว่า สารสกัดจากกวาวเครือขาวมีฤทธิ์เป็นฮอร์โมน estrogen คือที่ความเข้มข้นต่ำที่เหมาะสมจะกระตุ้นระบบสืบพันธุ์และลักษณะเพศ ที่ความเข้มข้นสูงจะระงับลักษณะดังกล่าวและสามารถใช้ควบคุมประชากรของแมลงสาบได้ที่ความเข้มข้นสูง 20% w/w และสารสกัดได้จากเอทธิลอัลกอฮอล์ และน้ำมีฤทธิ์ estrogen สูงกว่ากวาวเครือผงบดแห้ง

Abstract

Pueraria mirigica (Pm) bulbs extracted by 99% ethanol (PmEtOH) and distilled water (PmHOH) were treated on American cockroaches, *Periplaneta americana* by mixing them with standard layer feeds (Slf) and water (H_2O). In Experiment I, there were 4 replications 7 treatments viz ; 1) Slf + H_2O (Control) 2) Slf. PmEtOH + H_2O 3) Slf. + H_2O. PmEtOH 4) Slf. PmHOH + H_2O 5) Slf. + H_2O. PmHOH 6) Slf. Estrogen + H_2O and 7) Slf. + H_2O. Estrogen. Both PmEtOH and PmHOH used were at 10% w/w and 12 x 10^{-5} mg w/w commercial estrogen (Premarin) was treated for 45 d and left for 15 d for residual effect observation while Experiment II was with additional treatment of dried Pm powder and was treated with high concentrations of 20% w/w of Pm extracts and 72 x 10^{-5} mg w/w commercial Premarin estrogen for 30 d and left 15 d untreated. Experiment I gave 5% statistical significance for the positive reactions on important reproduction biology by increasing number of total eggs, number of eggs/ootheca and hatch percentages in all Pm treated groups especially and comparatively equal to 12 x 10^{-5} mg w/w commercial estrogen Premarin. Most treatments in Slf.Pm EtOH gave significantly higher number than in the control when left 15 d untreated and were expecially remarkable in H_2O. PmHOH. In experiment II, the Slf.PmEtOH and Slf.PmHOH indicated 1% and 5% significant depression of total egg hatched and hatch percentages when compared with control and both were retained after untreated for 15 d. The depression in the treated groups was statistically less than 72 x 10^{-5} mg w/w commercial estrogen (Premarin) which also prolonged the 15 d residual effects on low hatch percentages and were in contrast with Pm in powder form (Slf.Pm powder) which showed highest positive reactions and retained the positive effects after untreated for 15 days. Morphological abnormalities observed were body shining, body wall and muscle thickening, in Experiment I. Additional abnormalities such as irregular granular formations in haemocoel in both sexes, malformations of ejaculatory ducts and accessory glands in males and tumor ovaries in females were observed in Experiment II.

The result showed phytoestrogenic hormonal behaviors of both PmEtOH and PmHOH tha at a low and appropriate concentration, it encouraged the reproductive characters and system bu showed the suppression of such characters when the concentration was considerably high. The result showed successful control of the cockroach at 20% w/w concentration of both extracts whicl was with higher efficiency than the dried powder form.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก
บทคัดย่อภาษาไทย ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง จ
สารบัญภาพ ฉ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาการวิจัย และการตรวจเอกสาร 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 4
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ 4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล
บทที่ 4 บทสรุป
บรรณานุกรม
ใช้ผลงานวิชาการภาคบรรยายที่เสนอในที่ประชุมนานาชาติคือ 8
Attajarusit, J. 2001. Effects of Phytoestrogen from *Pueraria mirifica* Extracts on Reproduction Biology of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. Proceedings of 20th ASEAN/2nd APEC Seminar on Postharvest Technology. 11-14 Sept. 2001. Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai (in printing)
ประวัติผู้วิจัย 28

สารบัญตาราง

		หน้า
Table 1	Mean[u] numbers of reproduction biological characteristics of American cockroach, *Periplaneta americana* after treated by 10% crude extracts of *Pueraria mirifica* for 45 days at 25° ± 2° C, 70 ± 5% RH	16
Table 2	Mean[u] numbers of reproduction biological characteristics of American cockroach, *Periplaneta americana* after previously Treated by 10% *Pueraria mirifica* crude extracts for 45 days, Then left 15 days untreated in normal feeds for residue Observations at 25° ± 2° C, 70 ± 5% RH	17
Table 3	Mean[u] numbers of reproduction biological characteristics of American cockroach, *Periplaneta americana* after treated by 20% crude extracts of *Pueraria mirifica* for 30 days at 25° ± 2° C, 70 ± 5% RH	18
Table 4	Mean[u] numbers of reproduction biological characteristics of American cockroach, *Periplaneta americana* after treated by 20% crude extracts of *Pueraria mirifica* for 30 days at 25° ± 2° C, 70 ± 5% RH	19
Table 5	Comparison of means of major reproduction biological characteristics of American cockroach, *Periplaneta americana* treated by 10% and 20% *Pueraria mirifica* crude extracts.	20

สารบัญภาพ

หน้า

Fig. 1	*Pueraria mirifica* vine with leaves and flowers.	21
Fig. 2	*Pueraria mirifica* pods and seeds.	22
Fig. 3	*Pueraria mirifica* tuber	23
Fig. 4	Tumor formation and thickened bodywall muscle (after treated)	24
Fig. 5	Unhatched eggs and abnormal ootheca (after treated)	25
Fig. 6	Normal ootheca (upper, untreated) and abnormal ootheca (lower, untreated)	26
Fig. 7	Normal (control) and burnt accessory (mushroom) glands of the males	27

บทที่ 1
บทนำ

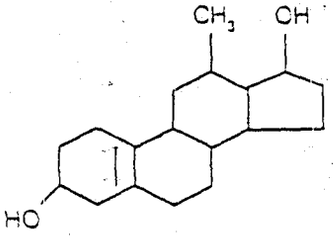
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาการวิจัยและการตรวจเอกสาร

กวาวเครือขาว (Kwao Kreu Kao, *Peuraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu, F. Leguminosae, Sub – F. Papilionoidae) เป็นพืชป่าเจริญในภาคตะวันออก, ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือที่ระดับ 300-800 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล (Medical Plant Research Institute, 2001) ลำต้นเป็นเถา ใบกว้าง ดอกสีม่วงมีลักษณะเหมือนพืชตระกูลถั่วทั่วไป ฝักมีลักษณะกลม มีเปลือกสีน้ำตาล (รูปที่ 1, 2 และ 3) กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรที่มีชื่อเสียงมานาน โบราณใช้เป็นยาอายุวัฒนะ ยากระตุ้นลักษณะสตรีเพศ และเครื่องสำอาง (หลวงอนุสารสุนทร, 2477, เสงี่ยม พงษ์บุญรอด 2522 และหมอเมือง, 2541)

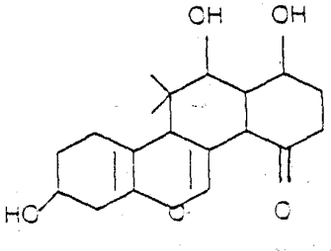
สารเคมีในกวาวเครือขาว

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกวาวเครือพบว่ามีสารประกอบที่สำคัญ 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ คือ Chromene, Isoflavone และ Coumestans glycosides กลุ่ม Chromene ประกอบด้วย Deoxymisoestrol, Miroestrol กลุ่ม Isoflavone ประกอบด้วย Daidzein, Daidzin, Genistein, Genistin Mirificin, Puerarin, Kawakhurin, Kawakhurin hydrate, Puerarin-6-monoacetate กลุ่ม Coumestans glycosides มี Coumestrol, Mirificourmestan mirificoumestanglycol, Mirificoumestanhydrate, (สายสุรีย์ เหลียวเรืองรัตน์ และคณะ 2530, Kashemsanta et al, 1963, Nilanidhi et al, 1963, Ingham et al, 1986 และ Medical Plant Research Institute, 2001)

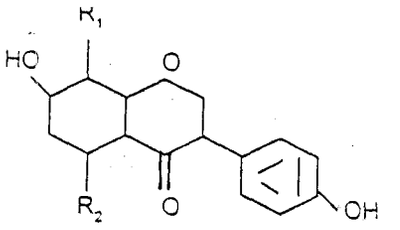
สารเคมีที่กวาวเครือขาว มีแตกต่างจากพืชตระกูลถั่วชนิดอื่นคือ Deoxymiroestrol ซึ่งเมื่อถูก oxidise จะได้ miroestrol ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีเหมือน estradiol ซึ่งเป็นฮอร์โมนมากที่สุด และปัจจุบันนี้ คิดว่าสารประกอบที่สำคัญที่สุดในกวาวเครือขาวคือสาร 2 ชนิดนี้ (Medical Plant Research Institute, 2001)



estradiol (estrogen ทั่วไป)

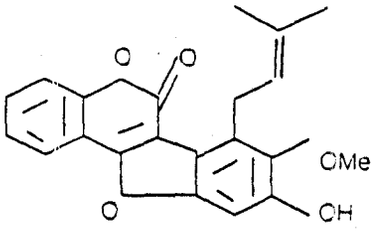


deoxymircestrol

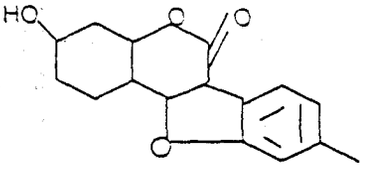


Daidzein : R_1 = H, R_2 = H

Genistein : R_1 = H, R_2 = OH



mirificaumestan



coumestrol

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในกวาวเครือขาว

ปัจจุบันนี้งานวิจัยส่วนใหญ่ของต่างประเทศเกี่ยวกับกวาวเครือขาว มุ่งไปในแง่ของการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ใช้เป็นสารต้านมะเร็งเต้านม (Anti-breast cancer) ต่อมลูกหมาก (Anti – prostate cancer) และลำไส้ใหญ่ (Anti colon cancer) ลด cholesterol และลดอาการป่วยในสตรีวัยหมดประจำเดือน (Menopausal syndrome)

ในประเทศไทย มีการทดลองใช้ผงบดจากหัวกวาวเครือขาวผสมกับอาหารให้สุกรเพศเมียกิน พบว่า ทำให้หัวนมยาวเต่งตึง กระตุ้นต่อมน้ำนม เต้านม ช่องคลอดใหญ่ขึ้นและกระตุ้นการเจริญของมดลูก (ยุทธนา สมิตะสิริ และสุภชัย โชติพันธุ์วิทยากุล. 2540) และได้ผลการทดลองอย่างเดียวกันเมื่อทดสอบในแพะ (ยุทธนา สมิตะสิริ และคณะ, 2535) ในขณะเดียวกัน กวาวเครือขาวอาจให้ผลตรงข้ามคือใช้ในการคุมกำเนิดได้โดยพบว่า สามารถคุมกำเนิดสัตว์ทดลองเช่น หนูถีบจักร (ยุทธนา สมิตะสิริ และคณะ, 2535) สุนัขและนกพิราบได้ (ยุทธนา สมิตะสิริ และคณะ, 2531) (ยุทธนา สมิตะสิริ และสันติ ศักดารัตน์, 2538) จึงเห็นว่า กวาวเครือขาวมีสารเคมีทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนในสัตว์เพศเมีย ที่อาจสามารถใช้กระตุ้นและระงับการเจริญของระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ได้

เนื่องจากแมลงสาบเป็นแมลงกลุ่มที่มีอายุยืนยาว 1-3 หรือ 5 ปี (ขึ้นอยู่กับชนิด) ได้อาศัยอยู่ร่วมกับมนุษย์ตั้งแต่ดึงดำบรรพ์ มีความสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคและสารเคมีที่พิเศษเหนือกว่าแมลงชนิดอื่น ๆ และปรับสภาพภูมิคุ้มกันได้รวดเร็ว ทำให้มีอายุยืนและแตกต่างจากแมลงชนิดอื่น ๆ (Olivenstein, 1992) และเนื่องจากแมลงสาบเป็นแมลงที่สำคัญของโรงเก็บผลิตผลทางการเกษตร การเก็บแป้งธัญญพืช ฯลฯ เพื่ออุตสาหกรรมอาหาร หรือส่งออก ทำให้ผลิตภัณฑ์ทั้งวัตถุดิบและที่ปรุงแล้วมีทั้งกลิ่น สี และความสกปรก เป็นที่ไม่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนั้นในทางการแพทย์และสาธารณสุขแมลงสาบนับเป็นพาหะของโรคไวรัส, แบคทีเรีย รวมทั้งเป็น intermediate host ของ nematode และกลุ่ม Acanthocephalid ในคนและสัตว์ (Ragge, 1973)

แมลงสาบอเมริกัน *Periplaneta american* เป็นแมลงสาบชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ใน 1 ใน 6 ของชนิดที่สำคัญที่สุดของโลก และควรจะหามาตรการควบคุม โดยไม่มีผลกระทบถึงผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม การทำให้แมลงสาบเป็นหมันโดยใช้สารธรรมชาติเป็นวิธีการควบคุมปริมาณประชากรอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ

จากการที่พบว่า สารสกัดจากหัวกวาวเครือขาวซึ่งมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนจะมีผลต่อแมลงสาบอเมริกันทำให้จำนวนฝักไข่ (ootheca) ลดลงด้วย (อุทัยวรรณและยุทธนา, 2535) โดยที่ข้อมูลต่าง ๆ ยังไม่ได้ศึกษาให้ละเอียด รวมทั้งผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนจากกวาวเครือขาวโดยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน และหากได้ศึกษาถึงผลของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาวเปรียบเทียบกับฮอร์โมนเอสโตรเจนในท้องตลาดต่อระบบสืบพันธุ์ของแมลงสาบ ก็จะทำให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดขึ้น รวมทั้งผลต่อการสืบพันธุ์ว่าจะสามารถใช้ควบคุมแมลงสาบได้โดยปลอดภัยและปราศจากมลภาวะได้หรือไม่

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาวที่สกัดโดยเอทธานอลเปรียบเทียบกับสกัดโดยน้ำ

1.2.2 เพื่อพิสูจน์ว่า สารสกัดจากหัวกวาวเครือขาวเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนจากพืช (phytoestrogen) ที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ ซึ่งใช้แมลงสาบเป็นตัวอย่างการศึกษา

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของสารจากหัวกวาวเครือขาวที่สกัดด้วยเอทธานอล สกัดด้วยน้ำในอัตราความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเอสโตรเจนต่อระบบสืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ของแมลงสาบอเมริกัน โดยตรวจดูผลต่อจำนวนฝักไข่ (ootheca), น้ำหนักไข่, ความกว้างไข่, ความยาวไข่, จำนวนรังไข่ย่อย (egg), เปอร์เซ็นต์ ไข่ที่ฟักรวมทั้งความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบสืบพันธุ์และร่าง กายของเพศผู้และเพศเมีย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 กวาวเครือขาว : ใช้สมุนไพรกวาวเครือขาว *P. mirifica* จากแหล่งใน จ. นครราชสีมา และจ. เชียงราย

1.3.2 อาหารสัตว์ : ใช้อาหารไก่ไข่มาตรฐาน สำหรับไก่ไข่อายุ 20-30 สัปดาห์ ประกอบด้วย โปรตีนไม่น้อยกว่า 17% ไขมันไม่น้อยกว่า 2% กากไม่มากกว่า 6% และความชื้นไม่มากกว่า 13%

1.3.3 แมลงสาบอเมริกัน : ใช้ culture บริสุทธิ์ของแมลงสาบอเมริกัน *Periplarneta americana* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

1.3.4 เอสโตรเจนในท้องตลาดเพื่อการทดลอง : 0.625 mg Premarin conjugated estrogen ชนิดเม็ดใช้กับคน (น้ำหนักคนเฉลี่ย 50 กก/คน)

1.3.5 สถานที่ปฏิบัติงานวิจัย : ห้องปฏิบัติการวิจัยอาคารศูนย์เครื่องมือ 1 ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช อาคารศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา

1.4 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ

1.4.1 การเตรียมสารสกัดจากกวาวเครือขาว

นำหัวกวาวเครือขาว (Pm) จากแหล่งใน จ. นครราชสีมา และ จ. เชียงราย มาล้างให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และอบแห้งที่อุณหภูมิ 40-45 °C 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งครั้งละ 200 กรัม ใส่ในเครื่องสกัด soxhlet extractor โดยใช้ตัวสกัด 2 ชนิด แยกจากกัน คือ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 400 cc. (เรียกสารสกัดที่ได้ว่า PmHOH) และเอทธิลอัลกอฮอลล์ 99% 400 cc. (เรียกสารสกัดที่ได้ว่า PmEtOH) แยกสกัดโดยใช้เวลาสกัดครั้งละ 8 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงสู่เครื่อง rotary evaporator เพื่อลดปริมาตรให้ได้ 200 cc. ทำซ้ำจนได้สารสกัด PmHOH และ PmEtOH. อย่างละ 1,000 cc. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C เพื่อใช้ในการทดลอง

1.4.2 การเลี้ยง pure culture ของแมลงสาบอเมริกัน

การเลี้ยง culture สายพันธุ์บริสุทธิ์ทำโดยจับแมลงสาบจากบริเวณ อ. เมือง จ. นครราชสีมา มาจำแนกชนิด คัดเอาเฉพาะ *P. americana* มาเลี้ยงโดยใช้อาหารไก่และน้ำจนได้ pure culture ที่แข็งแรง แยกตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่ในวันเดียวกันออกเลี้ยง เพื่อให้ได้แมลงสาบอายุเท่ากัน จนกระทั่งมีจำนวนแมลงสาบแต่ละรุ่นมากพอที่จะทดลองได้

1.4.3 การทดลอง

การทดลองที่ 1

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ซึ่งใช้ PmHOH และ PmEtoH ที่ความเข้มข้นต่ำคือ 10% โดยน้ำหนัก ผสมกับอาหารและน้ำ และใช้ estrogen สำหรับคนในท้องตลาด (ในที่นี้คือ

Premarin ที่ใช้อัตราเดียวกับคนคือ 0.625 mg/น้ำหนักคน 50 kg. หรือเท่ากับ $12x10^{-5}$ mg โดยน้ำหนัก) ผสมกับอาหารไก่ไข่ (Slf) และผสมน้ำ (H_2O) ให้กินต่อเนื่องเป็นเวลา 45 วัน แล้วหยุดกิน แล้วให้กินอาหารและน้ำปกติต่ออีก 15 วัน เพื่อทดสอบผลต่อเนื่อง กรรมวิธีการทดลอง ทำในห้องปฏิบัติการที่ 25° ± 2 °c และ 70°± 5% RH มีดังนี้

1. อาหารไก่ Slf. + น้ำ H_2O (กลุ่มควบคุม)
2. Slf. PmEtOH + H_2O
3. Slf. + H_2O.PmEtOH
4. Slf.PmHOH + H_2O
5. Slf. + H_2O.PmHOH
6. Slf.estrogen + H_2O
7. Slf. + H_2O.estrogen

ใช้แมลงสาบอายุรุ่นเดียวกัน (2.5 เดือน) 10 คู่/กรรมวิธี รวมเป็นใช้แมลงสาบทั้งสิ้น 280 คู่

การทดลองที่ 2

เหมือนการทดลองที่ 1 แต่เพิ่มกรรมวิธีที่ 8 คือ ผงบดแห้งจากกวาวเครือ (Pm powder) และเพิ่มความเข้มข้นของสาร Pm EtoH และ Pm HOH เป็น 20% โดยน้ำหนัก และใช้ estrogen (Premarin) จากท้องตลาด เพิ่มเป็น 6 เท่า คือ เท่ากับ $72x10^{-5}$ mg โดยน้ำหนัก ผสมกับอาหารไก่ (Slf.) และน้ำ (H_2O) ให้กินเป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้กิน แล้วให้อาหารและน้ำปกติต่อเนื่องเป็นเวลา 15 วัน

บันทึกผลการทดลอง

ทั้ง 2 การทดลองมีการบันทึกผลตลอดเวลาการทดลองดังนี้

1. จำนวนฝักไข่ (ootheca)/กรรมวิธี/วัน , จำนวนฝักไข่รวม
2. น้ำหนัก (mg) , ความกว้าง (ซม.) และความยาวของฝักไข่ (ootheca)
3. จำนวนไข่รวม (total egg)
4. จำนวนไข่ (egg)/ฝักไข่ (ootheca)
5. จำนวนตัวอ่อนที่ฟักจากไข่, % การฟักของฝักไข่
6. ความผิดปกติที่เกิดขึ้นภายนอก, ภายในลำตัว และอวัยวะสืบพันธุ์ทั้ง 2 เพศ โดยผ่าตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ stereomicroscopy

เนื่องจากผลงานวิจัย (ฉบับสมบูรณ์) ทั้งหมดนี้ ได้นำเสนอในที่ประชุมนานาชาติ 2 ครั้งคือ

1. ภาคโปสเตอร์ :

Attajarusit, J. and Smitasiri, Y. 1999. Effects of Phytoestrogens from *Pueraria mirifica* extracts on Reproduction Biology of the American cockroach, *Periplaneta americana*. Proceedings of Program-Abstract of the 4th Princess Chulabhorn International Science Congress: Chemicals in 21st Century, 28 Nov. – 3 Dec. 1999. Bangkok, Thailand. Poster session No. 30. p. 167.

2. ภาคบรรยาย :

Attajarusit, J. 2001. Effects of Phytoestrogen from *Pueraria mirifica* Extracts on Reproduction Biology of American Cockroach, *Periplaneta americana* L. Proceedings of 20th ASEAN/2rd APEC Seminar on Postharvest Technology. 11-14 Sept. 2001. Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai (in printing)

จึงขอนำผลงานวิชาการภาคบรรยายในข้อ 2 มาแนบเพื่อเป็นเนื้อเรื่องโดยสมบูรณ์ โดยมีเนื้อหาคือ Abstract, Introduction, Materials Methods, Result, Discussion, Summary และ Reference พร้อม Tables และ Figures.

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.5.1 ได้ข้อมูลแสดงว่า สารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว เป็นเอสโตรเจนจากพืช (phytoestrogen) ที่มีคุณสมบัติเป็นฮอร์โมน เปรียบเทียบกับเอสโตรเจนใช้กับคนที่มีขายตามท้องตลาดได้ ซึ่งอาจพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทดแทนเอสโตรเจนได้

1.5.2 ได้ทราบถึงผลของเอสโตรเจนจากหัวกวาวเครือขาวต่อระบบการสืบพันธุ์ของสัตว์ โดยใช้แมลงสาบเป็นตัวแทนสัตว์ทดลองผ่าตัดตรวจดูส่วนต่าง ๆ ของระบบแล้วส่องด้วยกล้อง

1.5.3 จะได้ใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากกวาวเครือขาวในการควบคุมการสืบพันธุ์ของแมลงสาบ ซึ่งเป็นศัตรูในบ้านเรือนของมนุษย์ และโรงเก็บผลิตผลการเกษตร ซึ่งควรจะหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช ที่มีขายตามท้องตลาดทั่วไป เพราะเป็นอันตรายกับผู้อยู่อาศัย และผู้บริโภคผลผลิตเกษตรกร

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

บทที่ 4
บทสรุป

บรรณานุกรม

ใช้ผลงานวิชาการภาคบรรยายที่เสนอในที่ประชุมนานาชาติ คือ

Attajarusit, J. 2001. Effects of Phytoestrogen from *Pueraria mirifica* Extracts on Reproduction Biology of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. Proceedings of 20th ASEAN/2nd APEC Seminar on Postharvest Technology. 11-14 Sept. 2001. Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai (in printing).

EFFECTS OF PHYTOESTROGEN FROM *PUERARIA MIRIFICA* EXTRACTS ON REPRODUCTION BIOLOGY OF THE AMERICAN COCKROACH, *PERIPLANETA AMERICANA* L.

Jutharat Attajarusit[1/] and Yuthana Smitasiri[2/]

[1/] Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. E-mail: Jutharat@ccs.sut.ac.th
[2/] Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57000, Thailand

Abstract

Pueraria mirifica (Pm) bulbs extracted by 99% ethanol (PmEtOH) and distilled water (PmHOH) were treated on American cockroaches, *Periplaneta americana* by mixing them with standard layer (Slf) and water feeds. In Experiment I, there were 4 replications x 7 treatments of different 10% w/w Pm extracts mixes and 12 x 10^{-5} % w/w commercial Premarin estrogen treated for 45 d and left for 15 d for residual effect observation while Experiment II was treated with high concentrations of 20% w/w of Pm extracts and 72x10^{-5} % w/w commercial Premarin estrogen for 30 d and left for 15 d untreated. Experiment I gave 5% statistical significance for the positive reactions on important reproduction biology by increasing number of total eggs, number of eggs/ootheca and hatch percentages in all Pm treated groups especially and comparatively equal to 12 x 10^{-5} % w/w commercial Premarin estrogen. Most treatments in Slf.PmEtOH gave significantly higher numbers than in the control when left 15 d untreated and were especially remarkable in H_2O.PmHOH. In Experiment II, the Slf.PmEtOH and Slf.PmHOH indicated 1% and 5% significant depression of total egg hatched and hatch percentages when compared to control and both were retained after untreated for 15 d. The depression in the treated groups was statistically less than 72 x 10^{-5} % w/w commercial Premarin which also prolonged the 15 d residual effects on low hatch percentages and were in contrast with Pm in powder form (Slf.Pm powder) which showed highest positive reactions and ratained the positive effects after untreated for 15 days. Morphological abnormalities observed were body shining, body wall and muscle thickening, in Experiment I. Additional abnormalities such as irregular granular formations in haemocoel in both sexes, malformations of ejaculatory ducts and accessory glands in males and tumored ovaries in females were observed in Experiment II.

EFFECTS OF PHYTOESTROGEN FROM *PUERARIA MIRIFICA* EXTRACTS ON REPRODUCTION BIOLOGY OF THE AMERICAN COCKROACH, *PERIPLANETA AMERICANA* L.

Jutharat Attajarusit[1/] and Yuthana Smitasiri[2/]

[1/] Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. E-mail: Jutharat@ccs.sut.ac.th
[2/] Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57000, Thailand

Introduction

In Thailand, American cockroach, *Periplaneta americana* is one of the important post harvest pests destroying stored product quality abruptly especially in rice, corn, flour mills, flour export and bakery industries. It becomes domestic and is one of the 6 important cockroach vectors of human diseases, such as pathogenic viruses, bacteria, helminths and also acts as a principal intermediate host for gullet worm, *Gongylonema pulchum* Molin and Acanthocephalid, *Moniliformis moniliformis* (Burgess, 1990 and Ragge, 1973). Besides, the American cockroach is famous for most toxicant resistance or immune response which is found greater in females than in the males. (Oliwenstein, 1992.)

Pueraria mirifica Airy Shaw and Suvatabandhu (F.Papilionaceae) (Fig. 1, 2 and 3) has been famous and long well known in Thailand as a "vital herb". *P. mirifica* (Pm) has been used as a principal active ingredient in many native medical herb recipes especially as anti-aging remedies and was verbally and literally remarked by both Thai and Burmese ancestors on the enhance of sex appearance in both human males and females (Anusarnsoonthorn, 1931 and Pongboonrod, 1979) meanwhile scientific reasons remained untouched.

Pm tuber chemical analyse reported mammal estrogen constituents such as miroesterol (Kashemsanta *et al*,1963) puerarin and mirificin (Nilanidhi *et al*, 1963) daidzin, daidzein, coumestrol and genistein (Ingham *et al*, 1986). Recently, genistein and puerarin were obtained at 86 mg/100 gm of Pm powder. (Y. Smitasiri per.com).

Bioassays of Pm powder were carried out on various kinds of mammals and a rodent and concluded that Pm acted as estrogen which induced vaginal development, lactation, enlarged size of udders and number of teats in immature female pig (Smitasiri and Chotepunwitayakul, 1977) and goat (Smitasiri *et al*, 1992). Contrarily, it could also depress the ovarial development of white rat (Smitasiri *et al*, 1986) and was used as the birth control food mix for pigeon (*Columba* sp.) and dog (Smitasiri and Mon-Ing, 1989). Ethanolic and distilled water extracts at the concentrations of 120, 240, 200 and 400 mg/gm of feeds (both solid food and water feeds) yielded significant depression of ootheca size (length and width), ovary and hatched ootheca of *P. americana* (Radomsook and Smitasiri, 1994.)

The reviewed literatures lead to suspicion of the behaviors of Pm extracts whether they act as to enhance or to depress the animal reproduction biology. At present, Pm products become popular and expensive as they are used for cosmetic purposes such as facial and breast creams while their effects on animals have not yet been clearly verified. This experiment objectives were to apply Pm extracts at different concentrations as food and water mixes for *P. americana* feeds and observed the changes on reproduction biology as the residual effects on the treated groups when left untreated.

Materials and Methods

Pm full grown bulbs obtained from Nakhon Ratchasima and Chiang Rai forests were washed, shredded and oven-dried at 40°- 45°C for 24 hrs. The extraction procedure followed Smitasiri and Sakdarat (1955) i.e., extracted by distilled water (**PmHOH**) and 99% ethanol (**PmEtOH**) by means of soxhlet extractor then evaporated by rotary evaporator. Pm extraction in powder form was needed to be mixed with standard layer feed (**Slf**) and water, hence the PmHOH and PmEtOH extracts were gradually dried in seperator open pans in a controlled dessicator at 30% RH, 27°± 2°C. The obtained dried flakes were kept at 10°C and finely ground as **Pm powder** when use.

Mean while, the stock culture of the adults at the same age of American cockroach, *Periplaneta americana* L., was maintained in large plastic boxes in laboratory at 25° ± 2°C and 70 ± 5%RH. Standard layer feed (Slf) with tap water dabbed in cotton wool were put in the culture box for food. Changes of food and cleaning of the boxes were done at every 3-5 days intervals. There were 2 experiments set up as followed :

Experiment I : Normal Dose Trial

Normal dose Trial meant the trial with the treatment of the prescribed human daily intake dosage of commercial estrogen (i.e.,0.625 mg conjugated estrogen (Premarin) /tablet/day/ 50 kg human body weight or 10×10^{-5} % w/w estrogen). Hence, the mixture of Premarin estrogen with Slf or water was designed as at 12×10^{-5} % w/w or the dried Pm extracts at 10% w/w mixed with the feeds. The experiment design was CRD with 4 replications of 7 treatments (different Slf and water feeds) as followed :

1. Slf + water (Control)
2. Slf• Pm EtOH + water
3. Slf + water• Pm EtOH
4. Slf• Pm HOH + water
5. Slf + water• Pm HOH
6. Slf• Estrogen + water
7. Slf + water• Estrogen

There were 10 couples of the adults used in each treatment, and the total of 540 adult individuals used in this experiment.

Experiment II : High Dose Trial

High dose trial meant the trial with the treatment of the commercial estrogen as high as 6 times of of normal human daily intake dosage i.e., 3.75 mg Premarin estrogen or 72×10^{-5}% w/w and PmEtOH or PmHOH at 20% w/w mixed in the feeds. The experiment design was the same as Experiment I but with an additional treatment 8, the finely ground Pm powder (Pm powder) from dried Pm bulb was mixed with Slf at 20% w/w. There were the total of 640 American cockroach adult individuals used for this experiment.

In Experiment I and II, the cockroaches were continuously fed for 45 and 30 days respectively then all feeds were removed and replaced by normal standard layer feed (Slf) and normal tap water feed for additional 15 days. This was to observe the residual effects of both Pm HOH and Pm EtOH on the treated cockroaches. The data collected were on biology characters such as weight (μg), width and length of each ootheca (cm) and the fertility of the reproductive system such as number of oothecae / treatment / day, number of total oothecae, number of total eggs, number of individual eggs / ootheca, number of hatched offsprings / ootheca and hatchability (%), and abnormalities. Biological abnormalities were observed by dissection and stereomicroscopic inspection of the body and especially emphasized on the reproductive systems of both sexes.

Result

Experiment I : Normal Dose Trial

All result analyses of the reproduction biological characters of treated cockroaches by 10% *P. mirifica* crude extracts for 45 days were shown in Table 1 and in Table 2 for when they were further treated with normal feeds for 15 days for residual effect observations. From Table 1, 5% statistical significant different F-values were found in total eggs, number of eggs/ootheca and egg hatch percentages. The highest number of total eggs (1005.5) was of the Slf.Pm EtOH and was statistically different from the control (831.5). The number of eggs per ootheca was also highest (29.54) in the Slf.Pm EtOH treatment followed by all the Pm treatments except the Slf.Pm HOH that possessed only slightly higher figure (25.60) than that of the control (25.24).

The hatchability was at 5% statistical significant difference and found highest in water. Pm EtOH (60.50%) and lowest in the Slf.Pm EtOH (45.25%) while the control was 51%.

The other biological characters such as total ootheca produced, number of ootheca per day, width and length of ootheca were not statistically significant different but were with highest figure in Slf.Pm EtOH as 65.75, 1.49, 0.457 cm and 0.774 cm respectively.

For residual impacts shown in Table 2, for the water. Pm HOH treatment possessed all the 5% statistically significant highest values of means of total eggs (286.5), total ootheca (18.75), number of ootheca per day (1.25), eggs/ootheca (27.01) total egg hatch (152.75), hachability (53%) width of ootheca (0.417 cm)and length of ootheca (0.728 cm) when compared with the control. The 1% statistical significant lowest value that lowered than the control was total egg hatch in water. **Estrogen** treatment (40.30%). The control values were statistical lowest for total ootheca, number of ootheca/day, and length of ootheca Morphological abnormalities of the treated cockroaches were found shining of the body, thickening of the body wall and muscles especially in the thorax and abdomen (Fig 4).

Experiment II : High Dose Trial

Among all high dose treatments in Table 3, the Slf.Pm powder possessed the highest figures in all 5 productive parameters i.e., total egg hatch (319.8), hatch percentage (54.9%), eggs/ootheca (12.69), ootheca width (0.386 cm) and ootheca length (0.696 cm). The high values of the rest parameters i.e., total ootheca and ootheca per day belonged to Slf.Pm.HOH. The Slf.Pm EtOH indicated the lowest total egg hatch (153.8) while water. Pm HOH showed the lowest hatch percentage (31.5%) (Fig 5).

The residual impacts of 20% w/w Pm in Table 4 indicated the 5% statistical significant difference in only one reproduction character, i.e., the total egg, where the cockroach previously treated by Slf.Pm (powder) gave the highest total eggs of 290 while that treated previously by water. Pm EtOH yielded the lowest total eggs of 182. The comparison between these 2 values indicated the difference at 1% statistical significance by a greater t-value. Moreover, the Slf.Pm (powder) treated cockroaches also showed the highest figure for number of egg/ootheca (12.92), total egg hatch (97.25), weight (76.9 µg) and length (0.672 cm) of ootheca. However, the cockroach previously treated by water. Pm EtOH offered the highest potentials for hatchability (46.44%) and width of ootheca (0.387 cm). For comparison between Experiment I and II, the cross section of the major reproduction biological characters that possessed the statistical significant differences were summarized in Table 5.

The morphological abnormalities of treated cockroaches in Experiment II were found the same as mentioned in Experiment I but more pronounced and with additional abnormalities ;

1. increased in number of granular formations in haemocoel (Fig 4).
2. abnormal ootheca and unhatched eggs (Fig 5 and 6)
3. burnt tubules of male accessory glands (or mushroom glands) in dark brown color of the males or sometimes, lignified especially in the Slf + Pm HOH treatment (Fig 7).
4. tumor formations in ovaries especially in most Pm treatments and especially in Slf.Estrogen.

Discussion

In Experiment I, Table 1, the commercial Premarin conjugated estrogen at 12×10^{-5}% w/w mixed with standard chicken feed and water gave the similar positive result with those treated with 10% Pm HOH. There were 6 important biological characters of the reproduction out of the total of 9 characters observed such as total eggs, number of eggs/ootheca, total ootheca, number of ootheca/day, width and length of ootheca were with highest values when treated by standard chicken feed mixed with 10% Pm EtOH. The 10% water. Pm EtOH gave the highest egg hatch up to 60.50%. This seemed to suggest that in Pm EtOH there were the higher phytoestrogen constituents than in the Pm HOH. All the treated cockroach in Experiment I possessed all higher figures in all observed parameters than the control. The important reproduction characters such as total number of eggs, number of eggs/ootheca and hatch percentages were significantly enhanced when compared with all lowest figures of the control.

In Experiment I, Table 2 (left untreated 15d), the cockroaches showed the dramatically low figures in all reproduction characters when compared with those in Experiment I even in control. This may be due to the continuous disturbance of the reproductive system by Pm extracts within the previous consecutive 45 days and the system showed the slower down activities after the pronoun stimulation. The cockroaches previously treated by water. Pm HOH possessed 8 highest figures out of the total of 9 observed characters, including the hatch percentage. This seemed to suggest that the Pm HOH had a milder phytoestrogenic reactions which had a less depression residual effects on the reproduction biology than the PmEtOH and Estrogen (Premarin) treatments. The residue of commercial Estrogen yielded the highest weight of ootheca but lowest in the hatch percentages. The phenomena indicated that the 10% ,PmEtOH and Pm HOH crude extracts as well as the 12×10^{-5}% w/w Estrogen encouraged or enhanced the efficiency of the cockroach reproduction and returned to almost normal after left untreated for 15 days.

In Table 3, the high concentration of 20%w/w Pm EtOH extracts and 72×10^{-5}%w/w commercial Premarin estrogen acted similarily to depress most reproduction biological characters to lower than those of the control at 5% statistical significant values. In contrast, the Pm in crude powder form at the same concentration of 20% w/w mixed with standard layer feed enhanced the reproduction characters when treated for 30 days and even when later left untreated for 15 days (Table 4). This may be due to the impurities within the crude powder that diluted the concentration to a mild level which acted as reproduction stimulants. The phenomena was confirmed by the Slf.Pm powder treatment inTable 4. In Table 4, most cockroaches previously treated with Pm crude extracts become similar to control except higher in PmEtOH for total egg hatch and hatch percentage. The phenomena expressed the negative reactions of the high concentration of the Pm crude extracts on the reproductive system and returned to almost normal for water. Pm HOH when untreated. The Slf.PmHOH depressed the hatch pronoucely as well as the Slf.Pm EtOH. These showed that the crude extracts mixed with solid feeds at

high concentrations gave longer residual effects than when mixed with aqueous feeds.

Morphological abnormalities of reproductive system of both male and female cockroaches were detected in all treated groups and pronounced in the high Pm concentrations. The abnormal observed characters were thickening of body walls and muscle, irregular granule formation in haemocoel, tumors in ovaries, burnt and lignified accessory gland tubules and lignified ejaculatory ducts. This was due to phytoestrogenic hormonal behaviors of both Pm extracts.

Summary

American cockroaches, *Periplaneta americana* is a serious agricultural storage pest as it transmitted dangerous human diseases and is chemically resistant. High dosages of chemical treatments are harzardous so, the possible alternative control such as using phytoestrogen to suppress the repreduction is chalenging.

Pueraria mirifica (Pm) bulbs extracted by 99% ethanol (PmEtOH) and distilled water (PmHOH) were treated on the cockroach by mixing them with standard layer (Slf) and water feeds. In Experiment 1, there were 4 replications x 7 treatments of different 10% w/w Pm extracts mixes and $12x10^{-5}$ % w/w commercial Premarin estrogen treated for 45 d and left for 15 d for residual effect observation while Experiment II was treated with high concentrations of 20% w/w of Pm extracts and $72x10^{-5}$ % w/w commercial Premarin estrogen for 30 d and left 15 d untreated. Experiment I gave 5% statistical significance for the positive reactions on important reproductive biology by increasing number of total eggs, number of eggs/ootheca and hatch percentages in all Pm treated groups especially and comparatively equal to $12x10^{-5}$ % w/w commercial Premarin estrogen. Most treatments in Slf.Pm ETOH gave significantly higher numbers than in the control when left 15 d untreated and were especially remarkable in water. PmHOH. In Experiment II, the Slf.PmEtOH and Slf.PmHOH indicated 1% and 5% significant depression of total egg hatched and hatch percentages when compared to control and both were retained after untreated for 15 d. The depression in the treated groups was statistically less than $72x\ 10^{-5}$ % w/w commercial Premarin which also prolonged the 15 d residual effects on low hatch percentages and were in contrast with Pm in powder form (Slf.Pm powder) which showed highest positive reactions and retained the positive effects after untreated for 15 days. Morphological abnormalities observed were body shining, body wall and muscle thickening, in Experiment I. Additional abnormalities such as irregular granular formations in haemocoel in both sexes, malformations of ejaculatory ducts and accessory glands in males and tumored ovaries in females were observed in Experiment II.

Acknowledgement

The authors would like to express their sincere thanks to Ms. H. Sujira, Ms. K. Jangcheor, Ms. R. Wanna and Mr. W. Wongviriya for their assistance to this project and also to the National Research Committee of Thailand incorporation with the Research Institute of Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand for funding of the project.

References

Anusarnsoonthorn, L. 1931. Medical text of *Pueraria mirifica* (Thai Title : Tamra Ya Hua Kwaw Krua Kao). Oopatipong Pub. Co., Chieng Mai, Thailand, 32 pp. (Original in Thai)

Burgess, N.R.H. 1990. Public Health Pests ; A guide to identification, biology and Control. Chapman and Hall, London. 162 pp.

Ingham, J. L., S. Tahara, and S.Z. Dziedzic. 1986. A Chemical Investigation of *Pueraria mirifica* root. Z. Naturforsch. 41 : 403-408.

Kashemsanta, M.C.L., K. Suvatabandhu, S. Bartlett, and G.S. Pope. 1963. The estrogenic substance (miroestrol) from the tuborous root of *Pueraria mirifica*. **Proc. 9th Pacific Sci. Congr.** 1957. 5 : 37-40.

Medical Plant Research Institute, Dept. of Medical Science , Min. of Public Health Thailand. 2001. **Available : http// www.puerariathai.com/chemical-composition_by_medic.html**

Nilanidhi, T., B. Kamthong, K. Isarasena, and D. Shiengthong. 1963. Constituents of the tuberous roots of *Pueraria mirifica.* Proc. 9 Pacific Sci. Congr. 1957. 5: 41-47.. Oliwenstein, L. 1992. The bug that can say no. **Discover** April 1992.

Pongboonrod, S. 1979. Mai Tes Muang Tai, Sapakun kong Ya Tes Lae Ya Tai (Foreign and Thai herbs and their biology properties). Kasem Banakich Book Store, Bangkok. 596 pp. (Original in Thai).

Radomsook, U., and Y. Smitasiri. 1994. Effects of some *Pueraria mirifica* Extracts on the Reproduction of American cockroaches (*Periplaneta americana*). **Suranaree J. Sci. Technol.**1: 89-95.

Ragge, D.R. 1973. Dictyoptera. In Insects and other Arthopods of Medical Importance. K.G.V. Smith Edit., the Trustee of British Museum. London. p. 399-403.

Smitasiri, Y., and S. Chotepunwitayakul. 1997. Effects of *Pueraria mirifica* on Teat and Reproductive Organs of Immature Female Pigs. Suranaree University of Technology Research Report 1977. 40 pp.

Smitasiri, Y. and S. Sakdarat. 1995. Improvement and Development of Means of Application of *Pueraria mirifica* for Pigeon (*Columba sp.*) Brith control. **Suranaree J. Sci Technol.** 2: 89-96.

Smitasiri, Y., B. Fongkaew, S. Supasai, K. Suasaard, S. Hongnark, and B. Chewaisarakul.1992. Phase 3 Project on Resarch and Development of *Pueraria mirifica* . Final Research Report 1992. Chiangmai University. 91 pp.

Table 1. **Mean[1/] numbers of reproduction biological characteristics of American cockroach, *Periplaneta americana* after treated by 10% crude extracts of *Pueraria mirifica* for 45 days at 25° ± 2°C, 70 ± 5%RH.**

Treatment	min-max ootheca/ day	total ootheca	ootheca/ day	eggs/ ootheca	total eggs	total egg hatch	hatch (%)	weight µg/ ootheca	width cm/ ootheca	length cm/ ootheca
1. Slf + water (control)	0-3.5	54.75	1.24	25.24 bc	831.5* a	428.8	51.0 abc	72.6	0.429	0.729
2. Slf .PmEtOH + water	0-5.0	*65.75*	*1.49*	*29.54 ab*	*1005.5* b*	454.0	45.25 bc	77.4	*0.457*	*0.774*
3. Slf + water. PmEtOH	0-5.0	62.00	1.41	29.44 ab	936.5 ab	571.0	*60.50 ab*	74.2	0.437	0.740
4. Slf .PmHOH + water	0-4.8	62.25	1.41	25.60 bc	942.0 ab	*598.3*	53.25 abc	76.7	0.454	0.765
5. Slf + water. PmHOH	0-5.0	63.00	1.43	28.25 abc	973.5 ab	525.0	54.50 abc	*77.6*	0.453	0.766
6. Slf.Estrogen + water	0-4.0	57.00	1.30	26.70 abc	862.5 ab	457.0	56.25 abc	72.0	0.428	0.736
7. Slf + water. Estrogen	0-4.5	60.25	1.34	28.46 abc	919.0 ab	546.5	59.0 ab	73.3	0.436	0.747
F-value		> 1.00	> 1.00	**0.178***	**0.3904***	0.3953	**0.1501***	> 1.00	> 1.000	>1.000

[1/] data from 4 replications t-value at 5% = 2.080 * and ** = 5% and 1% statistically significant differences respectively.
Slf = standard layer feed. Pm HOH = *P. mirifica* extracted by distilled water. Pm EtOH = *P. mirifica* extracted by 99% Ethanol.

Table 2. Mean[1/] numbers of reproduction biological characteristics of American cockroach *Periplaneta americana*, after previously treated by 10% *Pueraria mirifica* crude extracts for 45 days, then left 15 days untreated in normal feeds for residue observations at 25° ± 2°C, 70 ± 5%RH.

Treatment	min-max ootheca/ day	total ootheca	ootheca/ day	eggs/ ootheca	total eggs	total egg hatch	hatch (%)	weight µg/ ootheca	width cm/ ootheca	length cm/ ootheca
1. Slf + water (control)	0-3.25	14.25 b	0.950*	24.54	241.0 b	98.75 b*	46.0	59.45	0.355	0.606 c*
2. Slf .PmEtOH + water	0-3.25	15.75 ab	1.05	25.14	242.0 ab	117.5 abc	48.8	66.18	0.390	0.672 abc
3. Slf + water PmEtOH	0-3.75	17.50 ab	1.17	27.27	261.0 ab	108.25 abc	42.0	65.78	0.380	0.636 abc
4. Slf .PmHOH + water	0-3.50	18.00 ab	1.20	26.80	246.5 ab	125.0 abc	51.5	67.83	0.395	0.665 abc
5. Slf + water. PmHOH	0-3.25	***18.75 a***	***1.25***	***27.01***	***286.5 a***	***152.75 a***	***53.0***	70.90	***0.417***	***0.728 a***
6. Slf.Estrogen + water	0-2.75	16.00 ab	1.07	22.53	229.5 ab	113.50 abc	50.3	68.18	0.395	0.673 abc
7. Slf + water. Estrogen	0-4.0	16.25 ab	1.02	22.79	216.5 ab	87.25 c**	40.3	*72.43*	0.388	0.625 abc*
F-value		**0.3268***	**0.3306***	0.04082	**0.3185***	0.1578	> 1.000	>1.000	> 1.000	**0.2694***

[1/] data from 4 replications t-value at 5% = 2.080 * and ** = 5% and 1% statistically significant differences respectively.
Slf = standard layer feed. Pm EtOH = *P. mirifica* extracted by 99% Ethanol. PmHOH = *P. mirifica* extracted by distilled water.

Table 3. **Mean of numbers reproduction biological characteristics of American cockroach, *Periplaneta americana* after treated by different 20% crude extracts of *Pueraria mirifica* for 30 days at 25° ± 2°C, 70 ± 5%RH.**

Treatment	min-max ootheca/ day	total ootheca	ootheca/ day	eggs/ ootheca	total eggs	total egg hatch	hatch (%)	weight µg/ ootheca	width cm/ ootheca	length cm/ ootheca
1. Slf + water (control)	0-3.0	38.50	1.20	11.39	553.0	221.0 ab	38.3 b*	69.1	0.371	0.635
2. Slf .PmEtOH + water	0-3.0	30.75	0.96	10.73	455.0	153.b**	33.1 bc*	61.5	0.331	0.588
3. Slf + water. PmEtOH	0-3.75	34.00	1.06	11.29	513.5	226.3 ab	44.6 abc	66.9	0.351	0.614
4. Slf .PmHOH + water	0-3.0	***39.25***	***1.23***	11.28	590.5	191.0 b*	31.5 b**	66.4	0.355	0.619
5. Slf + water. PmHOH	0-3.0	37.00	1.13	12.05	557.5	252.0 ab	46.7 ac	68.8	0.376	0.637
6. Slf.Estrogen + water	0-3.25	35.50	1.11	11.22	530.0	202.8 b*	40.3 abc	66.3	0.369	0.616
7. Slf + water. Estrogen	0-3.25	34.00	1.06	11.49	501.0	197.8 b*	39.2 bc	64.6	0.358	0.626
8. Slf.Pm(powder)+water	0-2.75	36.25	1.13	***12.69***	590.5	***319.8 a***	***54.9 a***	***77.3***	***0.386***	***0.696***
F-value		> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	**0.1058***	**0.0704***	> 1.000	> 1.000	>1.000

t-value = 2.640 at 5% and 2.797 at 1% statistical significant levels
* and ** = 5% and 1% statistically significant differences
Slf = standard layer feed.

Pm EtOH = *P. mirifica* extracted by 99% Ethanol.
PmHOH = *P. mirifica* extracted by distilled water.

Table 4. **Mean of numbers of reproduction biological characteristics of American cockroach *Periplaneta americana*, after previously treated by different 10% *Pueraria mirifica* crude extracts for 30 days, then left 15 days untreated in normal feeds for residue observations at 25° ± 2°C, 70 ± 5%RH.**

Treatment	min-max ootheca/ day	total ootheca	ootheca/ day	eggs/ ootheca	total eggs	total egg hatch	hatch (%)	weight µg/ ootheca	width cm/ ootheca	length cm/ ootheca
1. Slf + water (control)	0-3.00	16.00	1.07	11.82	234.0 ab	81.50	35.07	62.3	0.376	0.645
2. Slf .PmEtOH + water	0-3.00	14.14	0.94	10.52	205.5 ab	64.25	32.18	67.9	0.330	0.566
3. Slf + water. PmEtOH	0-3.75	14.50	0.97	10.21	182.0 b**	80.25	*46.44*	65.0	0.347	0.569
4. Slf .PmHOH + water	0-3.25	16.75	1.12	10.31	240.8 ab	58.00	30.53	53.2	0.341	0.577
5. Slf + water. PmHOH	0-3.00	*18.25*	*1.22*	11.61	260.8 ab	84.25	33.09	71.0	*0.387*	0.638
6. Slf.Estrogen + water	0-2.75	18.00	1.20	11.01	242.5 ab	93.00	37.14	61.5	0.356	0.608
7. Slf + water. Estrogen	0-3.25	14.1	0.94	10.23	203.8 ab	58.00	28.11	54.4	0.319	0.565
8. Slf.Pm(powder)+water	0.275	17.75	1.18	*12.92*	*290.0 a*	*97.75*	34.37	*76.9*	0.369	*0.672*
F-value		> 1.000	> 1.000	> 1.000	0.4473*	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	>1.000

t-value = 2.640 at 5% and 2.797 at 1% statistical significant levels * and ** = 5% and 1% statistically significant differences respectively
Slf = standard layer feed. Pm EtOH = *P. mirifica* extracted by 99% Ethanol. PmHOH = *P. mirifica* extracted by distilled water.

Table 5. Comparison of means of major reproduction biological characteristics of American cockroach, *Periplaneta americana* treated by 10% and 20% *Pueraria mirifica* crude extracts.

Treatment	Mean of eggs/ootheca		Total eggs		Total egg hatch		Hatch (%)	
	10%	20%	10%	20%	10%	20%	10%	20%
1. Slf + water (control)	25.2 bc	11.39	831.5 a*	553.0	428.8	221.0 ab	51.0 abc	38.3 bc*
2. Slf .PmEtOH + water	29.5 ab	10.73	1005.5 b*	455.0	454.0	153.8 b**	45.3 bc	33.1 bc*
3. Slf + water. PmEtOH	29.4 ab	11.29	936.5 ab	513.5	571.0	226.3 ab	60.5 ab	44.6 abc
4. Slf .PmHOH + water	25.6 bc	11.28	942.0 ab	590.5	497.5	191.0 b*	53.3 abc	31.5 b**
5. Slf + water. PmHOH	28.2 abc	12.05	973.5 ab	557.5	525.0	252.0 ab	54.5 abc	46.7 ac
6. Slf.Estrogen + water	26.7 abc	11.22	862.5 ab	530.0	482.0	202.8 b*	56.3 abc	40.3 abc
7. Slf + water. Estrogen	28.5 abc	11.49	919.0 ab	501.0	546.5	197.8 b*	59.0 ab	39.2 bc
8. Slf.Pm(powder)+water	-	12.69	-	590.5	-	319.8 a*	-	54.9 a*
F-value	0.178*	> 1.000	0.3904*	> 1.000	0.395	0.1058*	0.1501*	0.0704*

t-value (10% crude extract) at 5% = 2.080 t-value (20% crude extract) at 5% = 2.640 , at 1% = 2.797

* and ** = at 5% and 1% statistically significant differences respectively. Slf = standard layer feed.

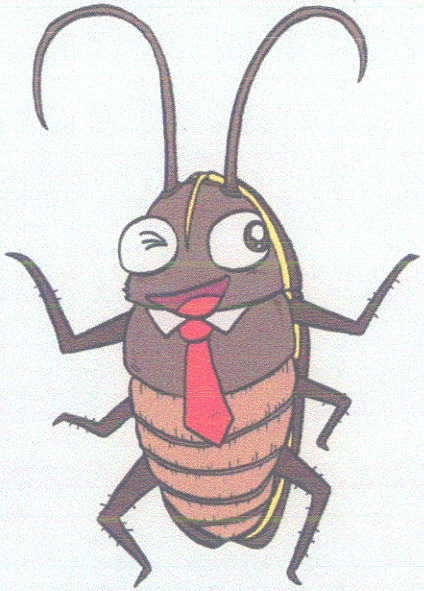
Pm EtOH = *P. mirifica* extracted by 99% Ethanol. PmHOH = *P. mirifica* extracted by distilled water.

Fig 1. *Peuraria mirifica* vine with leaves and flowers.

Fig 2. *Peuraria mirifica* pods and seeds.

หัว

Fig 3. *Peuraria mirifica* tuber.



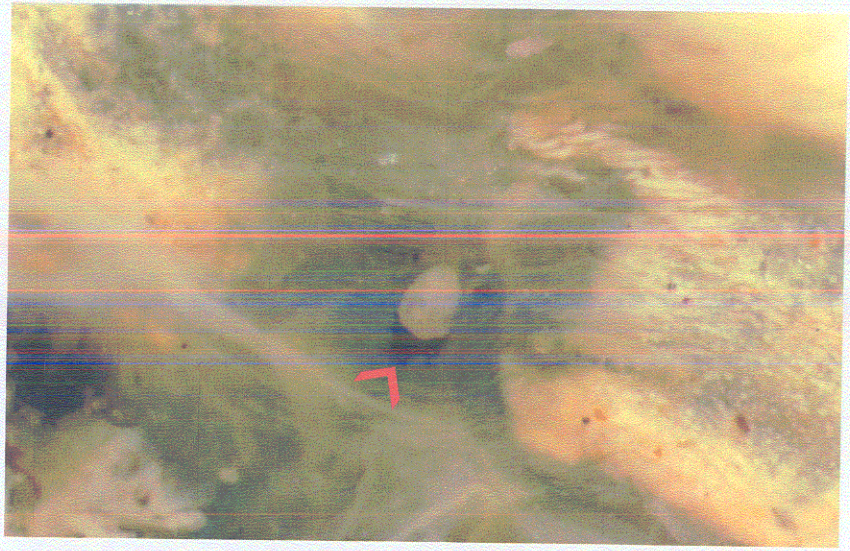
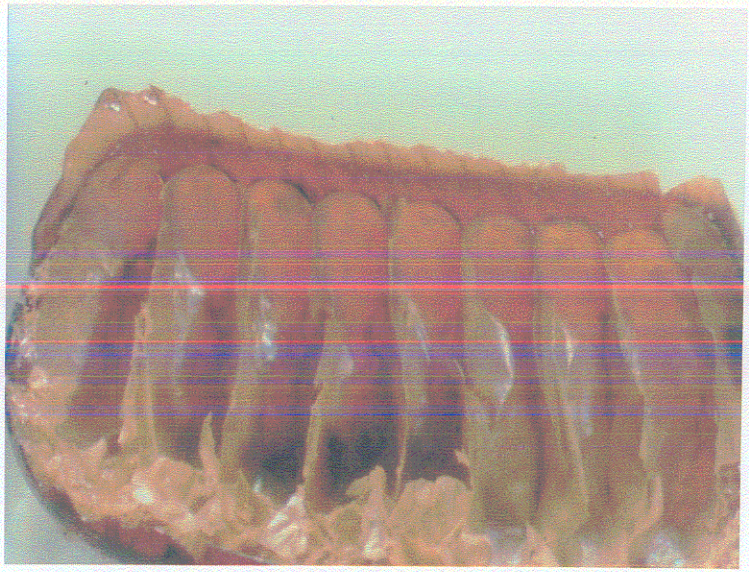


Fig 4. Tumor formation and thickened bodywall muscle (after treated)



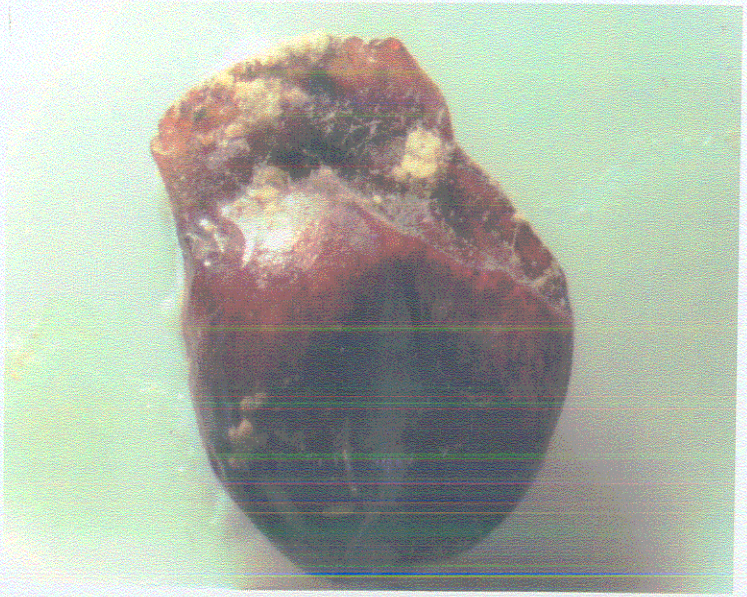
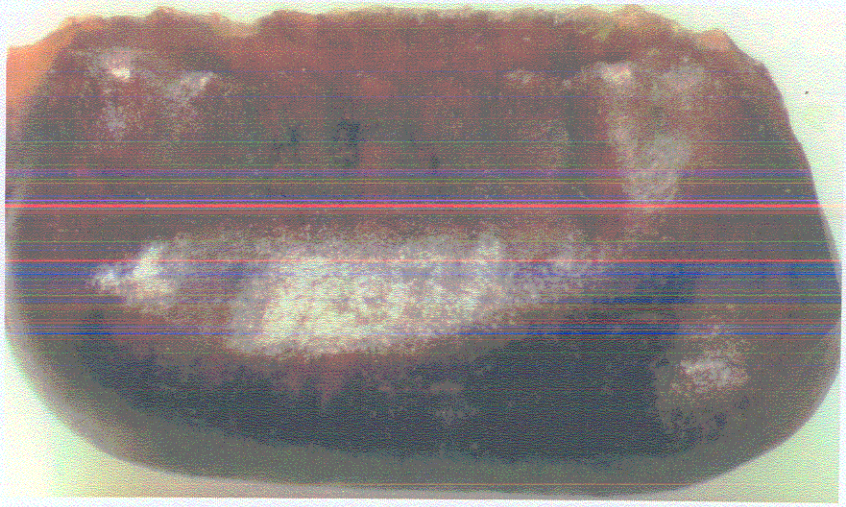
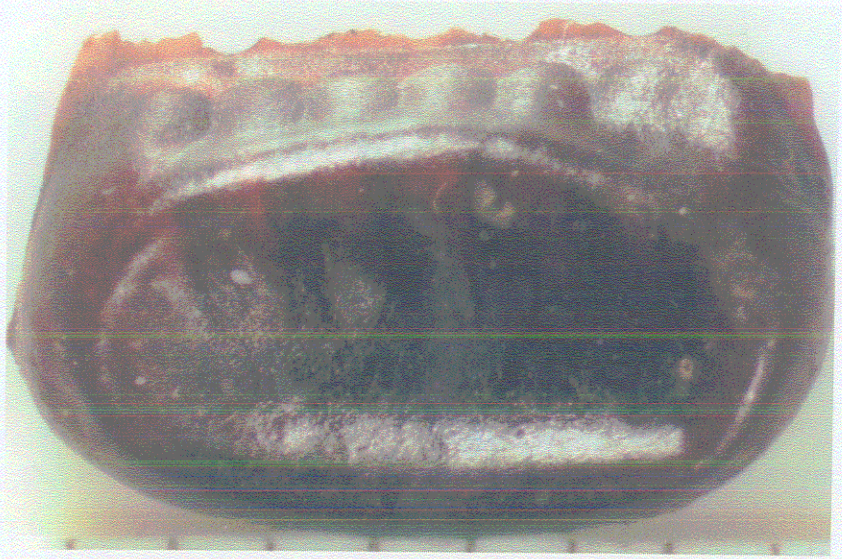


Fig 5. Unhatched eggs and abnormal ootheca (after treated)





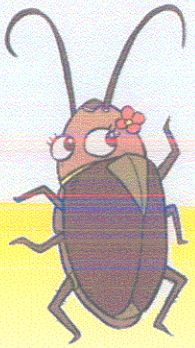


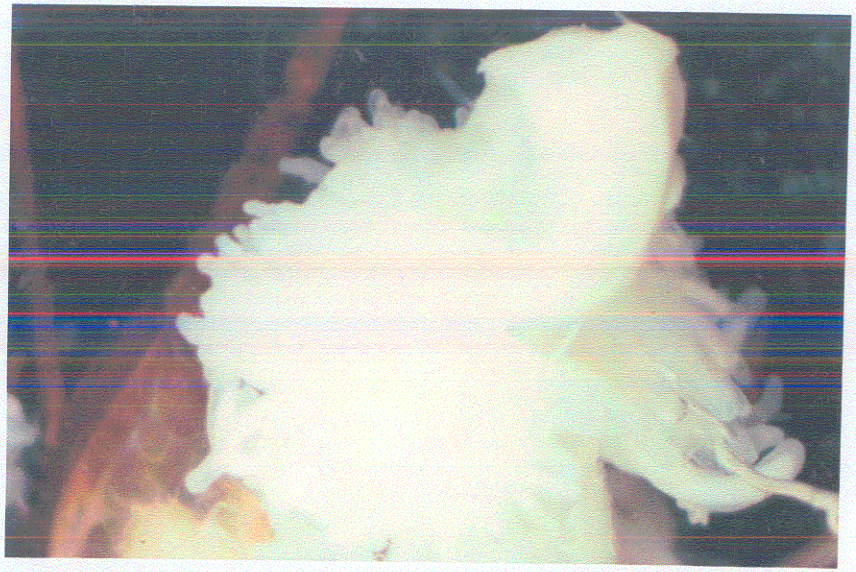
Fig 6.

Normal ootheca

(upper, untreated)

and abnormal ootheca

(lower, treated)



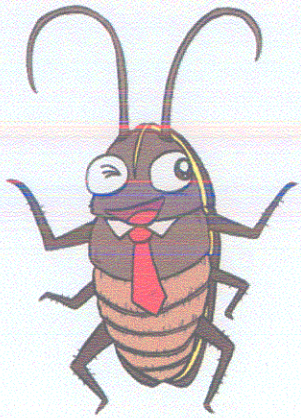


Fig 7. Normal (control) and burnt accessory (mushroom) glands of the males (after treated).

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ นางจุฑารัตน์ นามสกุล อรรถจารุสิทธิ์
   Jutharat Attajarusit

2. รหัสประจำตัว (นักวิทยาศาสตร์สภาวิจัยแห่งชาติ) 38-40-1072

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
   สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. ประวัติปัจจุบัน

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2512	ตรี	วท.บ	กีฏวิทยา-โรคพืช	ม.เกษตรศาสตร์	ไทย
2513	ประกาศนียบัตร	English Proficiency	English	U. of Victoria	N.Z
2516	โท	M.Agric.Sci (Hons.)	กีฏวิทยา	U.of of Canterbury	N.Z
2533	เอก	Ph.D.	กีฏวิทยา	Kyushu Univ.	Japan

5. สาขาวิชาที่ชำนาญ

การควบคุมแมลงศัตรูทางเศรษฐกิจ, การใช้พันธุ์ต้านทาน ชีววิธี และ การบริหารศัตรูพืช

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

6.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว และตีพิมพ์แล้ว

รศ.ดร. จุฑารัตน์ อรรถจารุสิทธิ์ มีงานวิจัยตีพิมพ์เป็นภาษาไทย 57 ฉบับ เป็นภาษาอังกฤษ 21 ฉบับ รวมเป็น 78 ฉบับ เช่น

1. Attajarusit, J. and M. Rumakom. 1987. Policy and Planning on Control of Leucaena Psyllid. Paper resented in "Workshop of Leucaena : Psyllid problems and Solution" Bangkok, 26-27 March, 1987. WINROCK INTERNATIONAL F/FRED and Faculty of Forestry, Kasetsart University, Div. of Silviculture, Dept. of Royal Forest, Bangkok 17 pp.
2. Attajarusit, J. and P. Nanta. 1989. Life Cycle and Predatory Efficiency Test of *Curinus coeruleus* on Leucaena Psyllid, *Heteropsylla cubana*. In Abstract of the First Asia-Pacific Conference on Entomology (APCE). Nov. 8-13, 1989. Chiengmai, Thailand. p. 21.
3. Attajarusit, J. and P. Nata. 1990. Life Cycle and Predatory Efficiency Test of *Curinus coeruleus* on leucaena Phyllid, *Heteropsylla cubana* Crawford. Thai J. agric. Sci. 23: 273-278.

4. Attajarusit, J. 1993. Resistance Mechanisims of Sugarcane Tillers to the Infestation of the Early Short Borer, *Chilo infuscatellus* Snellen. Proceedings of 1st National Sugarcane and Sugar Technological Conference. The Office of the Committee for Sugar and Sugarcane Technology, Ministry of Industry. Sept. 14-16, 1993, Maruay Garden Hotel. Bangkok 18 pp.

5. Attajarusit, J. 1998. Evaluation of Leucaena psyllid population monitoring methodologies : phase I - within plant. IUFRO Workshop on Pest Management in Tropical forest plantation. May 25-28 ,1998, Chantaburi , Thailand. RFD / UFIRO/ FORSPA/JICA. (in printing)

6. Attajarusit , J. 1998. Management for control of leucaena psyllid by utilization of *Curinus coeruleus* and resistant varieties. IUFRO Workshop on Pest Management in Tropical forest plantation. May 25-28, 1998, Chantaburi , Thailand. RFD / UFIRO/ FORSPA/JICA. (in printing)

7. Attajarusit , J. , V. Somsook and P. Nanta. 1998. Life Cycle , Behaviors and Control of Bamboo Shoot Borer, *Cytochelus dichrous* by Entomopathogenic Nematode. *Steinernema carpocapsae.* IUFRO Workshop on Pest Management in Tropical forest plantation. Poster Session .May 25-28, 1998, Chantaburi , Thailand. RFD / UFIRO/ FORSPA/JICA.

8. Moriya, S., J. Attajarusit and S. Suwanabutr. 1998. Preliminary Study on Distribution of Sweet potato weevil, *Cylas formicarius*, by using Pheromone Traps in Thailand. Abstracts of the 5th Annual Meeting of the Entomological Society of Japan. Oct. 2-4, 1988. Shiga Prefecture University, Hikone. Japan. p 92.

9. Attajarusit, J. 1999. Sweet Potato Pests in Thailand and Sustainable Cultivation. Proceedings of the 2nd Asia-Pacific Conference on Sustainable Agriculture. American Societies of Science / American Assoc. Advancement of Science / Institute for Food and Development, USA / Science. Soc. of Thailand / NU Univ. Oct. 18-20, 1999, Phitsanulok, Thailand. p 75-84

10. Attajarasit, J. 1999. Effects of Phystoestrogens from *Pueraria mirifica* extracts on reproduction biology of the American cockroach, *Periplanata americana.* 4th Princess Chulabhorn International Science Congress: Chemicals in 21st Century. 28 Nov.-2 Dec., 1999. Bangkok, Thailand. Program-Abstract. p 167.

11. Attajarusit, A. 2001. Sweet Potato Pests in Thailand and Sustainable Cultivation. Proceedings of the 2nd Asia- Pacific Conference on Sustainable Agriculture. 18-20 Oct.1999. Phisanulok, Thailand. Amer.Assoc. Adv. Sci./ Sci. Soc. Thailand. P 85-96.

12. จุฑารัตน์ อรรถจารุสิทธิ์. 2543. พฤติกรรมของหนอนกออ้อยลายจุด *Chilo infuscatellus* Snellen. ต่อพันธุ์อ้อยต้านทาน. การประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งชาติ ครั้งที่ 4 วันที่ 15-17 สิงหาคม 2543 โรงแรมสีมาธานี จ. นครราชสีมา.

13. กรวรรณภรณ์ แจงเชื้อ และ จุฑารัตน์ อรรถจารุสิทธิ์. 2544. วงจรชีวิตและลักษณะทางชีววิทยาของมวนพิฆาต *Eocanthecona furcellata* (Wolf) เพื่อเลี้ยงขยายพันธุ์โดยใช้หนอนไหมแช่แข็งและการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *Heliothis armigera* Hubner ในไร่ทานตะวัน Life Cycle and Biology of the Precaceous Stink bug , *Eocanthecona furcellata* Wolf. reared by alived larvae of American Boll Worm, *Heliothis armigera* Hubner and larvae of Silk Worm *Bombyx mori* Linn. and the Optimum Rrelease Rate of the Predaceous Sting Bugs for Control of the American Boll Worm in Sunflower Field . Proceeding 1: ภาคบรรยายการประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 วันที่ 21 – 23 พ.ย. 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ริเวอร์แคว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี หน้า 21 – 28.

14. จุฑารัตน์ อรรถจารุสิทธิ์. 2544. การเปรียบเทียบผลผลิตของมันเทศโดยใช้วิธีการบริหารศัตรูพืชกับวิธีการใช้สารเคมี. Comparison of Sweet Potato Yield by Using Pest Management Program vs Pesticide Application. Proceedings 1: ภาคบรรยาย การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 5 วันที่ 21 – 23 พ.ย. 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ริเวอร์แคว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี หน้า 171 – 177.

15. จุฑารัตน์ อรรถจารุสิทธิ์. 2544. การแพร่กระจายตามฤดูกาลของด้วงงวงมันเทศ *Cylas formicarius* F. ในเขตที่ดอนของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและที่ลุ่มของภาคกลาง Seasonal Distribution of Sweet Potato Weevil, Cylas formicarius F. in North East Upland and Central Land Thailand. Proceeding 1: ภาคบรรยาย การประประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 5 วันที่ 21 – 23 พ.ย. 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ริเวอร์แคว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี หน้า 157 – 170.

16. Jutharat Attajarusit. 2001. Effect of Phytoestrogen from *Peraria mirifica* Extracts on reproduction biology of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. Abstracts of 20th ASEAN/2nd APEC Seminar on Postharvest Technology. 11 – 14 Sept. 2001, Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai. P.41. (Proceedings in printing)

13. ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเยี่ยม รางวัล "ผลงานคิดค้นหรือสิ่งประดิษฐ์ ซึ่งเป็นประโยชน์แก่ประเทศชาติ ปี 2527" โดยคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติปี 2527 เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์อ้อยเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ

14. เป็นหัวหน้าโครงการงานวิจัยและผลิตผลงานวิจัยขององค์การนานาชาติ เช่น

10.1 หัวหน้าโครงการวิจัยทางกีฏวิทยา โครงการย่อยในโครงการวิจัยเรื่อง Nam Pong Environmental

Management Research Project. ในความร่วมมือของ Mekong Secretariate Committee ทุน ESCAP/FORD

10.2 หัวหน้าโครงการกีฏวิทยาฝ่ายไทยในความร่วมมือระหว่างไทย - ญี่ปุ่น ในเรื่อง Ecological Studies on Shifting Cultivation and Its Transformation Process to Sustains Upland Farming. (ทุน JSPS /NRCT)

10.3 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง Biological Control of Insect Pests / Leucaena Phyllid (ทุน USAID/ATT)

10.4 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง Evaluation of Leucaen Psyllid Population Monitoring Methodologies. (ทุน USAID/NBCRC)

10.5 หัวหน้าโครงการวิจัยและผลิต Technical Bulletin เรื่อง คู่มือแมลงศัตรูอ้อยและการป้องกันกำจัด (ทุน ACNARP/ KKU)