



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบผลของสารสกัดจากพืชต่อเมตาบอลิซึมของน้ำตาลในมอดแบ่ง
แมลงศัตรูในโรงเก็บ

โดย ดร.นุจิรา ทาทัน

เดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบผลของสารสกัดจากพืชต่อเมตาบอลิซึมของน้ำตาลในมอดแบ่ง
แมลงศัตรูในโรงเก็บ

ผู้วิจัยดร. นุจิรา ทาตัน
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยพะเยา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก ศ.ดร.โซ ซากุไร และ รศ.ดร.บุญเกิด วัชรเสถียร นักวิจัยที่ปรึกษาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือทาง วิทยาศาสตร์และสารเคมี รวมทั้งสละเวลาอันมีค่าเป็นที่ปรึกษาโครงการโดยตลอด ทำให้การวิจัย เป็นไปด้วยความเรียบร้อยสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยพะเยา ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ซึ่งทำให้โครงการวิจัยนี้เริ่มขึ้นและสำเร็จ ลุล่วงได้

นุจิรา ทาตัน

8 กรกฎาคม 2555

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	1
Abstract	2
Executive summary	3
วัตถุประสงค์	9
วิธีการทดลอง	10
ผลการทดลอง	16
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	40
ข้อเสนอแนะ	46
Output จากโครงการวิจัย	46
เอกสารอ้างอิง	47

สารบัญรูปและตาราง

	หน้า
รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของตัวหนอนระยะสุดท้ายของมอดแป้ง หลังจากได้รับผงบดใบพืช	16
รูปที่ 2 อัตราการตายของมอดแป้งหลังจากได้รับผงบดใบพืช	17
รูปที่ 3 ระยะเวลาในการเป็นตัวหนอนและดักแด้ของมอดแป้งหลังจากได้รับผงบดใบพืช	18
รูปที่ 4 อัตราการเข้าดักแด้และอัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยของมอดแป้ง หลังจากได้รับผงบดใบพืช	19
รูปที่ 5 จำนวนประชากรรุ่น F1 ของมอดแป้งที่ได้รับผงบดใบพืช	20
รูปที่ 6 การทำงานของแอลฟาอะไมเลส <i>in vitro</i> เมื่อนำไปป้อนกับสารสกัด	21
รูปที่ 7 ความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการทำงาน (inhibitory activity) ของแอลฟาอะไมเลส <i>in vitro</i>	22
รูปที่ 8 การทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส <i>in vitro</i> เมื่อนำไปป้อนกับสารสกัดใบหม่อน	23
รูปที่ 9 ความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการทำงานของทรีฮาเลส <i>in vitro</i>	23
รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของมอดแป้ง ตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย	24
รูปที่ 11 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของมอดแป้งในระยะตัวหนอน หลังจากได้รับสารสกัด	25
รูปที่ 12 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของมอดแป้งในระยะตัวเต็มวัย หลังจากได้รับสารสกัด	25
รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของ soluble trehalase และ membrane-bound trehalase ของมอดแป้งตั้งแต่ระยะไข่ถึงตัวเต็มวัย	26
รูปที่ 14 การทำงานของเอนไซม์ soluble trehalase ของมอดแป้งในระยะตัวหนอน หลังจากได้รับสารสกัด	27
รูปที่ 15 การทำงานของเอนไซม์ soluble trehalase ของมอดแป้งในระยะตัวเต็มวัย หลังจากได้รับสารสกัด	28
รูปที่ 16 การทำงานของเอนไซม์ membrane-bound trehalase ของมอดแป้ง ในระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัด	29

รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงการความเข้มข้นของกลูโคสและทรีฮาโลสในมอดแบ่ง ตั้งแต่ระยะไข่ถึงตัวเต็มวัย	30
รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงการความเข้มข้นของกลูโคสและทรีฮาโลส ในมอดแบ่งเมื่อได้รับสารสกัด	31
รูปที่ 19 การแสดงออกของยีน <i>Tcα-amylase</i> ของมอดแบ่งตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย	34
รูปที่ 20 การแสดงออกของยีน <i>TcTrehalase-1</i> ของมอดแบ่งตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ก่อนดักแด้ ดักแด้และตัวเต็มวัย	35
รูปที่ 21 การแสดงออกของยีน <i>TcTrehalase-2</i> ของมอดแบ่งตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ก่อนดักแด้ ดักแด้และตัวเต็มวัย	36
รูปที่ 22 การแสดงออกของยีน <i>Tcα-amylase</i> ของมอดแบ่งระยะตัวหนอน และตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัด	37
รูปที่ 23 การแสดงออกของยีน <i>TcTrehalase-1</i> ของมอดแบ่งระยะตัวหนอน และตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัด	38
รูปที่ 24 การแสดงออกของยีน <i>TcTrehalase-2</i> ของมอดแบ่งระยะตัวหนอน และตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัด	39
ตารางที่ 1 ค่าความเหมือน (% identity) ของยีน <i>Tcα-amylase</i> ของมอดแบ่ง และแมลงชนิดอื่นๆ	32
ตารางที่ 2 ค่าความเหมือน (% identity) ของยีน <i>TcTrehalase-1</i> ของมอดแบ่ง และแมลงชนิดอื่นๆ	32
ตารางที่ 3 ค่าความเหมือน (% identity) ของยีน <i>TcTrehalase-2</i> ของมอดแบ่ง และแมลงชนิดอื่นๆ	33

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380199

ชื่อโครงการ: การตรวจสอบผลของสารสกัดจากพืชต่อเมตาบอลิซึมของน้ำตาลในมอดแป้ง
แมลงศัตรูในโรงเก็บ

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน ดร.นุจิรา ทาดัน มหาวิทยาลัยพะเยา

อีเมล: nujira_t@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของผลิตผลในโรงเก็บ ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจสอบหาสารสกัดจากพืชที่สร้างน้ำยาง เพื่อควบคุมมอดแป้งโดยอาศัยความสามารถในการยับยั้งการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล พืชทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ หม่อน มันสำปะหลัง ละหุ่ง และมะละกอ ถูกนำไปสกัดและทดสอบหาฤทธิ์การเป็นยาฆ่าแมลง และความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและทรีฮาเลส ผลการทดลองพบว่า ไบโหม่อนมีความเป็นพิษสูงสุดส่งผลให้เกิดการตาย 38.9% ระยะเวลาการเป็นตัวหนอนและดักแด้ยาวนานขึ้นเมื่อแมลงได้รับสารจากไบโหม่อน ละหุ่ง และมะละกอ การออกเป็นตัวเต็มวัยและการผลิตลูกรุ่น F1 ลดลงเมื่อได้รับสารจากพืชทั้ง 4 ชนิด การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสถูกยับยั้งโดยพืชทั้งหมดในแบบ *in vitro* และ *in vivo* มีเพียงไบโหม่อนเท่านั้นที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสในหลอดทดลอง การทดสอบแบบ *in vivo* พบว่าการทำงานของ soluble trehalase จะถูกยับยั้งเมื่อได้รับสารจากพืชทั้ง 4 ชนิดที่ผสมในอาหาร แต่ไม่ส่งผลต่อการทำงานของ membrane-bound trehalase ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจะลดลงเมื่อได้รับสารจากพืชทุกชนิด อย่างไรก็ตามไม่มีผลต่อระดับของน้ำตาลทรีฮาโลสของมอดแป้งที่ได้รับสารสกัด การศึกษาในระดับชีวโมเลกุลพบว่าไบโหม่อน ละหุ่ง และมะละกอลดการแสดงออกของยีน *Tc α -amylase* และ *TcTrehalase-1* แต่ไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *TcTrehalase-2* จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า พืชที่ศึกษาครั้งนี้มีสารประกอบที่ส่งผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและทรีฮาเลสทั้งในระดับชีวเคมีและชีวโมเลกุล จากนั้นจึงส่งผลต่อเนื่องให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในมอดแป้งลดลง

คำหลัก : มอดแป้ง แอลฟาอะไมเลส ทรีฮาเลส ทรีฮาโลส

Abstract

Project Code : MRG5380199

Project Title : Screening the effect of plants extract on the sugar metabolism in stored-product insect pest, red flour beetle, *Tribolium castaneum*

Investigator : Dr.Nujira Tatun, University of Phayao

E-mail Address : nujira_t@hotmail.com

Project Period : 2 years

Abstract:

The red flour beetle, *Tribolium castaneum*, is an important coleopteran pest of stored grain and cereal products. This study was aimed at screening on the extract of latex-producing plant for controlling *T. castaneum* based on their efficiency to alter the sugar metabolism by inhibiting trehalase activity and α -amylase activity. Four species of plants; *Morus alba*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis* and *Carica papaya*, have been extracted with methanol and were investigated for their bioinsecticidal effects and inhibitory activity against trehalase and α -amylase both *in vivo* and *in vitro*. Results showed that *M. esculenta* was the most toxic with 38.9% mortality after treatment. The duration of larval and pupal periods were extended by *M. esculenta*, *R. communis* and *C. papaya*. Adult emergence rate and the F1 progeny production were reduced by all plants. The methanol extract of all plants inhibited α -amylase activity both *in vitro* and *in vivo*. The trehalase activity was inhibited by *M. alba* extract *in vitro*, but all plants exhibited inhibitory activity against soluble trehalase after the extracts were incorporated into the diet whereas the membrane-bound trehalase activity was not interfered. The concentration of glucose decreased after treated with all extracts, but trehalose level was constant. At molecular level, *M. alba*, *R. communis* and *C. papaya* reduced the expression level of both *Tc* α -amylase and *TcTrehalase-1* genes, but not *TcTrehalase-2*. Taken together these results suggest that these plants contained some compounds which affected the activity of α -amylase and trehalase enzyme at biochemical and molecular levels and consequently altered the level of glucose in red flour beetle.

Keywords: *Tribolium castaneum*, alpha-amylase, trehalase, trehalose

โครงการโดยสรุป (Executive summary)

ชื่อโครงการ : การตรวจสอบผลของสารสกัดจากพืชต่อเมตาบอลิซึมของน้ำตาลในมอดแป้งแมลงศัตรูในโรงเก็บ (Screening the effect of plants extract on the sugar metabolism in stored-product insect pest, red flour beetle, *Tribolium castaneum*)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ผลิตผลการเกษตรชนิดต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเขียว ถั่วลิสง มันสำปะหลังแห้ง เนื้อมะพร้าวแห้ง ยาสูบ แป้ง รำ อาหารสำเร็จรูป ผลิตภัณฑจากสัตว์ ตลอดจนผลิตภัณฑจากไม้มักถูกแมลงเข้าทำลายก่อให้เกิดความเสียหายประมาณ 80 % ของผลิตผล หรือคิดเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่า 1,300 ล้านบาทต่อปี (สายสวาท และคณะ 2549) จะเห็นได้ว่าแมลงมีบทบาทก่อให้เกิดความเสียหายเป็นมูลค่าสูง นอกจากนั้นการปนเปื้อนของแมลงหรือชิ้นส่วนของแมลงในผลิตผลเกษตรที่จะส่งออกทำให้มีผลต่อการกำหนดราคาผลิตผลเกษตร

มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) ถือเป็นศัตรูสำคัญของข้าว เมล็ดธัญพืช แป้งชนิดต่างๆ รำข้าว รวมทั้งเครื่องเทศ ผลไม้แห้งและหนังสัตว์ และจัดอยู่ใน 5 อันดับแรกของแมลงศัตรูที่สำคัญในประเทศไทย โดยจะเข้าทำลายหลังจากที่แมลงอื่นทำลายเมล็ดพืชจนเป็นรูหรือรอยแตกแล้ว เช่น เมล็ดข้าวเปลือกที่เก็บไว้รอจำหน่ายหรือเพื่อเป็นเมล็ดพันธุ์จะพบการเข้าทำลายของมอดแป้งร่วมกับแมลงชนิดอื่น เช่นมอดข้าวเปลือก ตัวงวงข้าวและตัวงวงข้าวโพด ทำให้สูญเสียการออก สุกสุกเสียน้ำหนักและเกิดเชื้อรา นอกจากนั้นการมีประชากรของมอดแป้งจำนวนมากจะส่งผลให้แป้งที่ถูกทำลายมีกลิ่นเหม็นซึ่งทำให้มีการสูญเสียมูลค่าของผลิตผลทางการเกษตรในโรงเก็บต่างๆ และการปนเปื้อนของแมลงในผลิตภัณฑถือเป็นปัญหาที่สำคัญในการควบคุมคุณภาพสินค้าของอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยส่วนใหญ่จะอาศัยการใช้สารฆ่าแมลงประเภทสารเคมีสังเคราะห์ ยกตัวอย่างเช่นการใช้สารเคมี เพื่อป้องกันกำจัดแมลงที่เป็นศัตรูของผลิตผลในโรงเก็บ อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานนั้นส่งผลเสียด้านต่างๆ เช่น ด้านสุขภาพ การปนเปื้อนสารเคมีในสิ่งแวดล้อม สารเคมีบางชนิดมีผลทำลายชั้นโอโซนในบรรยากาศ ออกฤทธิ์กว้างส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีประโยชน์ สารเคมีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับรายได้ของเกษตรกรหรือผู้ประกอบการรายย่อย และที่สำคัญการใช้สารเคมียังกระตุ้นให้แมลงสร้างความต้านทานต่อสารเคมีขึ้น (Subramanyam and Hagstrum, 1995) ดังนั้นการควบคุม และการจัดการแมลงศัตรูพืชควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความปลอดภัยต่อสุขภาพของทั้งเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม มีราคาต่ำ สามารถหาได้ในท้องถิ่น จากปัจจัยดังกล่าวทำให้ทรงวิจัยสนใจในการใช้พืชหรือสารสกัดจากพืชเพื่อนำมาใช้เป็นสารที่กำจัดแมลงเนื่องจากการใช้สารสกัดจากพืชนั้นยังไม่มีรายงานว่ามีแมลงมีการต้านทานเกิดขึ้น

น้ำตาลทรีฮาโลส (trehalose; α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) เป็นน้ำตาลหลักที่พบในเอโมลิฟ และแหล่งพลังงานสะสมที่สำคัญของแมลงส่วนใหญ่ (Becker et al., 1996) เนื่องจากทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลที่สำคัญของแมลง ดังนั้นการนำไปใช้หรือการรักษาสมดุลของน้ำตาลทรีฮาโลสในเอโมลิฟจึงมีความสัมพันธ์กับกระบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ เช่น การบิน การสังเคราะห์โคตินในช่วงที่เกิดการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต และการสร้างพลังงานเพื่อสร้างสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสืบพันธุ์ของแมลง (Friedman, 1978) ทรีฮาโลสไม่สามารถดูดซึมผ่านเซลล์เมมเบรนได้ ดังนั้นเมื่อแมลงต้องการใช้น้ำตาลทรีฮาโลสจะต้องมีการไฮโดรไลสให้อยู่ในรูปของน้ำตาลกลูโคสก่อน โดยเอนไซม์เอนไซม์ทรีฮาเลส (trehalase; α -glucoside-1-glucosylhydrolase, EC 3.2.1.28) เอนไซม์ทรีฮาเลสของแมลงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ไอโซฟอร์มคือ soluble trehalase และ membrane-bound trehalase การทำงานของ ทรีฮาเลสสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของแมลงเช่น ทางเดินอาหาร ส่วนกลาง ก้อนไขมัน ต่อมสร้างไหม อวัยวะสืบพันธุ์ สมอง กล้ามเนื้อ ฯลฯ ทั้งนี้เพื่อให้เซลล์สามารถนำน้ำตาลกลูโคสที่สะสมไว้ในรูปของทรีฮาโลสในเอโมลิฟไปใช้ได้เมื่อมีความต้องการ (Yamashita et al., 1974) ดังนั้นในกรณีที่แมลงมีความผิดปกติในการผลิตน้ำตาลทรีฮาโลส และการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสบกพร่องเกิดขึ้น ย่อมส่งผล

กระทบต่อการบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ ของแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดเมตามอร์โฟซิสและการสืบพันธุ์ นอกจากนั้นมอดแป้งเป็นแมลงที่ดำรงชีวิตอยู่บนแหล่งอาหารที่มีอุดมไปด้วยสารประเภทคาร์โบไฮเดรต โดยอาศัยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase; α -1, 4-glucanohydrolases; EC 3.2.1.1) ในการย่อยอาหารประเภทแป้ง ดังนั้นแอลฟาอะไมเลสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยอาหาร และมีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของมอดแป้ง

จากรายงานการวิจัยพบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมหรือกำจัดแมลงศัตรูพืชเป็นจำนวนมาก โดยงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นข้อมูลพื้นฐานที่มุ่งเน้นศึกษาเฉพาะการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษต่อแมลง (Jbilou et al., 2008; Rharrahe et al., 2008) แต่งานวิจัยในแง่ของการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุลของแมลงนั้นยังพบได้น้อย การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่ไม่ส่งผลให้เกิดการตายทันที แต่จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแมลง นับว่าเป็นข้อดีที่จะทำให้แมลงมีการพัฒนาแล้วเกิดการต้านทานได้ยาก (Rice, 1993) เพราะฉะนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้สารสกัดจากพืชบางชนิดเพื่อเป็น bioinsecticide โดยเลือกสารที่ออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส หรือแอลฟาอะไมเลสในมอดแป้ง

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาผลของสารสกัดจากพืชที่ส่งผลต่อเมตาบอลิซึมของน้ำตาลในมอดแป้ง โดยประเมินจากผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลทรีฮาโลส การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และการปรับเปลี่ยนระดับการแสดงออกของยีนเมื่อการทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยปัจจัยบางอย่างในสารสกัดที่ได้จากพืช ถึงแม้ว่ามอดแป้งจะเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญที่พบได้ทั่วโลก และเป็นแมลงที่ใช้เป็นโมเดลในการศึกษาด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี พันธุศาสตร์ อนุชีววิทยา และพฤติกรรมของแมลงอย่างกว้างขวาง ในปัจจุบันมีการพัฒนาฐานข้อมูลทางจีโนมที่สมบูรณ์ (Tribolium Genome Sequencing Consortium 2008) แต่ยังไม่พบว่ามีข้อมูลรายงานเกี่ยวกับการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลทรีฮาโลส รวมถึงการควบคุมกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสและแอลฟาอะไมเลสของมอดแป้ง ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ยังเป็นการสร้างองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในมอดแป้ง และเพื่อเป็นแนวทางใหม่ที่จะนำไปสู่การป้องกันกำจัดมอดแป้งโดยการหลีกเลี่ยงหรือลดการใช้สารเคมี พืชที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดเป็นพืชที่ผลิตน้ำยาง (latex-producing plants) ได้แก่ ใบละหู่ ใบหม่อน ใบมันสำปะหลัง และใบมะละกอ ซึ่งมีรายงานการใช้พืชดังกล่าวเพื่อการป้องกันแมลงศัตรูผลิตผลในโรงเก็บ นอกจากนี้ยังเป็นพืชที่หาได้ง่ายในเขตภาคเหนือ ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยที่เอื้อต่อการทำวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการ และสามารถเพาะปลูกได้เมื่อต้องการนำไปใช้ในการควบคุมกำจัดมอดแป้งในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากใบพืชในกลุ่มที่สร้างน้ำยางต่อมอดแป้ง
- 2.2 เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการทำงานของแอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นของน้ำตาลทรีฮาโลส และการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสในมอดแป้ง
- 2.3 สามารถคัดเลือกสารสกัดจากพืชที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลทรีฮาโลส หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและทรีฮาเลสของมอดแป้ง ในระดับชีวเคมีและระดับการแสดงออกของยีน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเลี้ยงแมลง

มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) จะถูกเลี้ยงด้วยแป้งสาลีผสมยีสต์ (5% w/w) ภายในห้องปฏิบัติการซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 60-70 เปอร์เซ็นต์

3.2 การเตรียมตัวอย่างพืช

คัดเลือกใบพืช (ละหุ่ง, *Ricinus communis*; ใบหม่อน, *Morus alba*; ใบมันสำปะหลัง, *Mannihot esculenta* และใบมะละกอ, *Carica papaya*) ที่สุขภาพดีและปลอดโรค ล้างให้สะอาดแล้วสับให้เป็นชิ้น ตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในที่ร่ม จากนั้นนำใบแห้งมาบดให้ละเอียด

3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของใบพืชต่อมอดแป้ง

แบ่งมอดแป้งที่อยู่ในระยะตัวหนอนระยะสุดท้ายและตัวเต็มวัยออกเป็นกลุ่ม แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารที่ผสมกับใบพืชบดละเอียดจากข้อ 3.2 ในอัตราส่วนต่างๆ จากนั้นศึกษาน้ำหนักของแมลง อัตราการตาย ระยะเวลาของการเจริญของตัวหนอนและดักแด้ อัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย และความสามารถในการผลิตประชากรรุ่น F1 เปรียบเทียบกับแมลงในกลุ่มควบคุม สุดท้ายทำการคำนวณหา ED_{50} (50% effective dose) และ ED_{90} (90% effective dose)

3.4 การศึกษาผลของสารสกัดจากใบพืชด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ทรีฮาเลส โดยแบ่งเป็นการทดลองแบบ *in vitro* และ *in vivo*

- การทดลองแบบ *in vitro*

เพื่อหาตัวทำละลายและชนิดพืชที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดในหลอดทดลอง ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในมอดแป้ง โดยทำการสกัดใบพืชจากข้อ (3.2) ด้วยเอทานอล อะซิโตน และเฮกเซน จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกให้หมด นำ pellet ที่ได้มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำไปตรวจวัดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในหลอดทดลอง โดยนำสารสกัดไปผสมกับตัวอย่างเอนไซม์และซับสเตรต ปลอ่ยให้ทำปฏิกิริยาและวัดการทำงานของเอนไซม์เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากพืช

- การทดลองแบบ *in vivo*

จากผลการทดลองแบบ *in vitro* เมื่อทราบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดใดมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในหลอดทดลองแล้ว นำสารสกัดดังกล่าวมาผสมกับอาหารที่อัตราส่วนต่างๆ ให้แก่มอดแป้งในระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย จากนั้นเก็บตัวอย่างแมลงมาตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ทุกๆ 2 วัน ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ

3.4.1 การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ตัวอย่างเอนไซม์จากมอดแป้งในแต่ละกลุ่มการทดลองจะถูกนำมาผสมกับสารละลายแป้ง (starch solution) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลายไอโอดีน (I_2/KI) นำสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยาไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายที่เป็นตัวแทนของ reducing sugar ที่ปลดปล่อยจากปฏิกิริยา (Valencia *et al.*, 2000) หน่วยการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในรูปของปริมาณของแป้งที่ถูกย่อยภายในเวลาหนึ่งนาทีต่อตัวอย่างโปรตีนหนึ่งไมโครกรัม ($\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g protein}$)

3.4.2 การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส (soluble และ membrane-bound trehalase)

ตัวอย่างเอนไซม์เอนไซม์ทรีฮาเลสในรูปของ soluble และ membrane-bound จะถูกนำมาผสมกับสารละลายทรีฮาโลสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาแล้วปลดปล่อยกลูโคสออกมา จากนั้นทำการหาปริมาณกลูโคสในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการ stoichiometrical ตามวิธีการของ Bergmeyer และคณะ (1974) หน่วยการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในรูปของปริมาณของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยจากปฏิกิริยาในเวลาหนึ่งนาทีต่อตัวอย่างโปรตีนหนึ่งไมโครกรัม ($\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g protein}$)

3.5 การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลส

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสเมื่อมอดแบ่งได้รับสารสกัดจากพืช และการเปลี่ยนแปลงที่ตอบสนองต่อการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส หรือเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ลดลงเมื่อถูกยับยั้งด้วยปัจจัยบางอย่างในสารสกัด โดยนำตัวอย่างแมลงในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด มาบดให้ละเอียดแล้วผสมกับน้ำกลั่นนำไปต้มในน้ำเดือด จากนั้นสกัดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์และเอทิลเซนตามลำดับ นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาปริมาณทรีฮาโลส โดยอาศัยหลักการทำงานของทรีฮาเลสในสารละลายทรีฮาโลสมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น จากนั้นวัดปริมาณกลูโคสที่ปลดปล่อยจากปฏิกิริยา เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส (3.4.2)

3.6 การศึกษาการแสดงออกของยีน *α-amylase*, *trehalase-1* และ *trehalase-2* ของมอดแบ่ง

เพื่อตอบคำถามว่าการแสดงออกของยีน *α-amylase*, *trehalase-1* และ *trehalase-2* ในมอดแบ่งมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร เมื่อการทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยสารบางอย่างที่ได้รับจากอาหาร โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR ดังขั้นตอนต่อไปนี้

3.6.1 ออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูลของมอดแบ่ง Tribolium Genome Project จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยวิธี RT-PCR แล้วทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส

3.6.2 การแสดงออกของยีน *α-amylase*, *trehalase-1* และ *trehalase-2* ของมอดแบ่ง
ตัวอย่างมอดแบ่งในระยะต่างๆ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบพืชจะถูกนำมาสกัด RNA จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้ยีน ribosomal protein 49 (*rp49*) เป็นยีนควบคุม

4. แผนการดำเนินงาน

ปีที่	เดือน	แผนการดำเนินงาน
1	1-6	1. เก็บตัวอย่างพืชและเตรียมสารสกัด 2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต่อมอดแบ่ง 3. ศึกษาผลของสารสกัดต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และทรีฮาเลส
1	7-12	4. วัดปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลสในมอดแบ่งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 5. วิเคราะห์ข้อมูล 6. เขียนผลงานตีพิมพ์ลำดับแรก 7. การโคลนยีนหาลำดับเบสของยีน <i>α-amylase</i>
2	13-18	8. การโคลนยีนและหาลำดับเบสของยีน <i>Trehalase-1</i> และ <i>Trehalase-2</i> 9. การวิเคราะห์ลำดับเบส และ submit ข้อมูลใน GenBank 10. การให้สารสกัดจากพืชแก่มอดแบ่ง เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน 11. การเก็บตัวอย่าง RNA 12. การเตรียมตัวอย่าง cDNA
2	19-24	13. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>α-amylase</i> , <i>Trehalase-1</i> และ <i>Trehalase-2</i> ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR 14. วิเคราะห์ข้อมูล 15. เขียนผลงานเพื่อตีพิมพ์ลำดับที่สอง 16. การเขียนรายงานเปิดโครงการ

5. ผลงานหัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- ปีที่ 1 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ "Effects of extracts of latex-producing plants on the changes in carbohydrate-metabolizing enzymes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*."
- ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Journal of Stored Products Research (impact factor = 0.879)
- ปีที่ 2 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ "Possible involvement of the changes in digestive α -amylase and trehalase activity in the regulation of trehalose concentration in *Tribolium castaneum*."
- ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Journal of Insect Physiology (impact factor = 2.155)

6. งบประมาณโครงการ

ตารางงบประมาณโครงการ

	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			240,000
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	
2. หมวดค่าวัสดุ			213,000
- กล่องและขวดพลาสติกขนาดต่างๆ สำหรับเลี้ยงมอดแป้ง	3,000	-	
- อาหารเลี้ยงแมลง	2,000	2,000	
- หลอด microcentrifuge tube	4,000	4,000	
- หลอด PCR	2,500	4,000	
- ปิเปตทิป	5,000	5,000	
- คิวเวตพลาสติก (disposable plastic cuvette)	2,500	-	
- ชุดตรวจน้ำตาลทรีฮาโลส	10,000	-	
- ชุดตรวจน้ำตาลกลูโคส	30,000	-	
- สารเคมีสำหรับการวัดการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส	4,500		
- ชุดวัดปริมาณโปรตีน	3,000	-	
- สารเคมีสำหรับสกัด RNA	10,000	20,000	
- สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์ cDNA	4,800	20,000	
- สารสำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA	12,500	30,000	
- ชุดทำความสะอาด DNA	5,000	5,000	
- ไพรมเมอร์ (primer)	2,200	6,600	
- อะกาโรส (agarose)	4,000	2,000	
- ชุดสำหรับการโคลนนิ่ง (DNA cloning kit)	5,000	-	
- ตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารจากพืช	3,500	900	
3. หมวดค่าใช้สอย			27,000
- ค่าวิเคราะห์หาลำดับเบส	5,500	19,500	
- เก็บใบพืชสด	1,000	1,000	
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

รายละเอียดโครงการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) :...การตรวจสอบผลของสารสกัดจากพืชต่อเมตาบอลิซึมของน้ำตาลในมอดแป้ง.....
แมลงศัตรูในโรงเก็บ.....
 (ภาษาอังกฤษ) :...Screening the effect of plants extract on the sugar metabolism in.....
stored-product insect pest, red flour beetle, *Tribolium castaneum*.....

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) :...นางสาวนุจิรา ทาตัน.....
 (ภาษาอังกฤษ) :...Miss Nujira Tatun.....

ระยะเวลาดำเนินงาน :.....2.....ปี

ระยะเวลาทำงานวิจัยในโครงการประมาณสัปดาห์ละ.....18.....ชั่วโมง

สถานที่ติดต่อ :

ที่ทำงาน.....สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย.....
นครสวรรค์ พะเยา ต. แม่กา อ. เมือง จ. พะเยา 56000.....
 โทรศัพท์.....054-466-666 ต่อ 1725....โทรศัพท์มือถือ.....089-759-5334.....
 โทรสาร.....054-466664.....
 e-mail.....nujira_t@hotmail.com.....

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา (1) (ภาษาไทย) :.....ดร. โช ซากุไร.....
 (ภาษาอังกฤษ) :.....Dr. Sho Sakurai.....
 (ตำแหน่งวิชาการ) :.....ศาสตราจารย์.....

สถานที่ติดต่อ :

ที่ทำงาน.....Division of Life Science, Graduate School of Natural Science and Technology,.....
Kanazawa University, Kakuma machi, Kanazawa 920-1192 JAPAN.....
 โทรศัพท์+81 (76) 264 6250.....
 โทรสาร+81 (76) 264 6255.....
 e-mailssakurai@kenroku.kanazawa-u.ac.jp.....

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา (2) (ภาษาไทย) :.....ดร.บุญเกิด วัชรเสถียร.....
 (ภาษาอังกฤษ) :.....Dr. Boongeeua Vajarasathira.....
 (ตำแหน่งวิชาการ) :.....รองศาสตราจารย์.....

สถานที่ติดต่อ :

ที่ทำงาน ...ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900.....
 โทรศัพท์.... 02 5625444, 025625555 ต่อ 3234.....
 โทรสาร02 5625444, 025625555 ต่อ 3202.....
 e-mail fscibov@ku.ac.th.....

ชื่ออธิการบดี หรือผู้รับมอบอำนาจให้ลงนามแทนอธิการบดี

.....ดร. วีรชัย ณ นคร (ผู้อำนวยการมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ พะเยา).....

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากใบพืชในกลุ่มที่สร้างน้ำยางต่อมอดแบ่ง
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการทำงานของแอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นของน้ำตาลทรีฮาโลส และการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสในมอดแบ่ง
3. สามารถคัดเลือกสารสกัดจากพืชที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลทรีฮาโลส หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและทรีฮาเลสของมอดแบ่ง ในระดับชีวเคมีและระดับการแสดงออกของยีน

วิธีการทดลอง

1. การเลี้ยงแมลง

ตัวอย่างมอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มอดแป้งจะถูกเลี้ยงด้วยแป้งสาลีผสมยีสต์ (5% w/w) ภายในห้องปฏิบัติการซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 28-30 °C และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 60-70 เปอร์เซ็นต์

2. การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการคัดเลือกใบพืช (ละหุ่ง, *Ricinus communis*; ใบหม่อน, *Morus alba*; ใบมันสำปะหลัง, *Mannihot esculenta* และใบมะละกอ, *Carica papaya*) ที่สด สุขภาพดีและปลอดโรค ล้างให้สะอาด แล้วสับให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก ตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในที่ร่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์เพื่อป้องกันการระเหยของสารประกอบต่างๆ จากนั้นนำใบแห้งมาบดให้ละเอียด

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของใบพืชต่อมอดแป้ง

แบ่งมอดแป้งที่อยู่ในระยะตัวหนอนระยะสุดท้ายและตัวเต็มวัยออกเป็นกลุ่มกลุ่มละ 30 ตัว แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารที่ผสมกับใบพืชบดละเอียดจากข้อ ในอัตราส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ 10%, 5%, 2.5% และ 1.25% w/w

จากนั้นศึกษาน้ำหนักของแมลง อัตราการตาย ระยะเวลาของการเจริญของตัวหนอนและดักแด้ อัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย และความสามารถในการผลิตประชากรรุ่น F1 เปรียบเทียบกับแมลงในกลุ่มควบคุม สุดท้ายทำการคำนวณหา ED₅₀ (50% effective dose) และ ED₉₀ (90% effective dose) ของพารามิเตอร์ข้างต้นเนื่องจากมีความสำคัญในการตัดสินใจเกี่ยวกับระยะเวลาที่จะให้สารสกัดแก่มอดแป้งแล้วเพื่อให้ได้ผลการยับยั้งที่สูงที่สุด

4. การศึกษาผลของสารสกัดจากใบพืชด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์ทรีฮาเลส โดยแบ่งเป็นการทดลองแบบ *in vitro* และ *in vivo*

- การทดลองแบบ *in vitro*

เพื่อหาตัวทำละลายและชนิดพืชที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดในหลอดทดลอง ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในมอดแป้ง โดยทำการสกัดใบพืชจากข้อ (2) ด้วย เมทานอล อะซิโตน และเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเก็บตัวอย่างในอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยกระดาษกรอง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกให้หมด นำ pellet ที่ได้มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (20mM PB) แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ จากนั้นนำไปตรวจวัดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในหลอดทดลอง โดยนำสารสกัดปริมาตร 137.5 µl ไปผสมกับตัวอย่างเอนไซม์ ปริมาตร 50 µl และทรีฮาโลสความเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 62.5 µl ปล่อยให้ทำ

ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที และวัดการทำงานของเอนไซม์เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากพืช

- การทดลองแบบ *in vivo*

จากผลการทดลองแบบ *in vitro* เมื่อทราบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดใดมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในหลอดทดลองแล้ว นำสารสกัดดังกล่าวมาผสมกับอาหารที่อัตราส่วนต่างๆ ให้แก่มอดแบ่งในระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย จากนั้นเก็บตัวอย่างแมลงมาตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ทุกๆ 2 วัน ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ

4.1 การเตรียมตัวอย่างของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

นำตัวอย่างของมอดแบ่งในระยะตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม มาทำให้สลบบนน้ำแข็ง จากนั้นล้างตัวอย่างแมลงในน้ำกลั่น 3 ครั้งซับตัวแมลงให้แห้งด้วยกระดาษกรองแล้วนำมาบดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 500 μ l จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเก็บสารละลายใสส่วนบนไว้ที่ -20 °C เพื่อนำไปตรวจสอบการทำงานของแอลฟาอะไมเลส

4.2 การเตรียมตัวอย่างของเอนไซม์ทรีฮาเลส

นำตัวอย่างของมอดแบ่งในระยะ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม มาทำให้สลบบนน้ำแข็ง จากนั้นล้างตัวอย่างแมลงในน้ำกลั่น 3 ครั้งซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองแล้วนำมาบดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 500 μ l ต่อแมลงจำนวน 5 ตัว ทำการบดโดยใช้ plastic homogenizer ในหลอดขนาด 1.5 ml นำไปปั่นที่ความเร็วรอบสูง (105,00 xg 4 °C 30 นาที) ด้วยเครื่อง ultracentrifuge จากนั้นแยกเก็บสารละลายใสส่วนบนและตะกอนเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ทรีฮาเลสในรูปของ soluble และ membrane-bound ตามลำดับ เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 °C เพื่อนำไปตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองฟอรั่ม ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะถูกตรวจวัดโดยอาศัยหลักการ protein-dye binding method (Bio-Rad, USA)

4.3 การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ตัวอย่างเอนไซม์จากข้อ (4.1) ปริมาตร 5 μ l จะถูกนำมาผสมกับสารละลายแป้งที่ละลายใน 20mM PB ความเข้มข้น 0.2% (0.2%starch solution) ปริมาตร 100 μ l แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยการเติม HCl ความเข้มข้น 1M ปริมาตร 20 μ l แล้วเติมสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 5mM (5mM I₂/KI) นำสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยาไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 580 nm โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Valencia *et al.*, 2000) หน่วยการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในรูปของปริมาณของแป้งที่ถูกย่อยภายในเวลาหนึ่งนาทีต่อตัวอย่างโปรตีนหนึ่งไมโครกรัม (μ g/min/ μ g protein)

4.4 การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส (soluble และ membrane-bound trehalase)

ตัวอย่างเอนไซม์จากข้อ (4.2) ปริมาตร 50 μl จะถูกนำมาผสมกับสารละลายทรีฮาโลสความเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 62.5 μl ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 137.5 μl ในหลอดขนาด 1.5 ml โดยปริมาตรรวมของสารทั้งหมดคือ 250 μl แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เซลเซียสเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดทดลองไปต้มเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำการหยุดปฏิกิริยา นำสารที่ได้ไปปั่นที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เวลา 10 นาทีเพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้นนำ supernatant ไปทำการหาปริมาณกลูโคสในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการ stoichiometrical ตามวิธีการของ Bergmeyer และคณะ (1974) หน่วยการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสจะอยู่ในรูปของปริมาณของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยจากปฏิกิริยาในเวลาหนึ่งนาทีต่อตัวอย่างโปรตีนหนึ่งไมโครกรัม ($\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g protein}$) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้ เติมสารละลายต่อไปนี้ 630 mM TEA 500 μl , 2.0 mM NADP 250 μl และ 2.8 mM ATP 250 μl ลงใน micro cuvette ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติมสารละลายจากตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณกลูโคสลงไปปริมาตร 100 μl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm ด้วยเครื่อง ultraviolet-visible spectrophotometer เติมเอนไซม์ G6PDH/HK ปริมาตร 20 μl นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm ด้วยเครื่อง ultraviolet-visible spectrophotometer อีกครั้ง บันทึกค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (glucose standard curve) เพื่อคำนวณหาปริมาณกลูโคส

5. การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลส

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสเมื่อหมอดแบ่งได้รับสารสกัดจากพืช และการเปลี่ยนแปลงที่ตอบสนองต่อการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส หรือเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ลดลง เมื่อถูกยับยั้งด้วยปัจจัยบางอย่างในสารสกัด โดยนำตัวอย่างแมลงในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด ชั่งน้ำหนักและบดให้ละเอียดแล้วผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มในน้ำเดือดทิ้งให้เย็นลงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอน ดูดสารละลายใสที่อยู่ด้านบนลงในหลอดใหม่จากนั้นสกัดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์และเอทิลตามลำดับ นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งเพื่อกำจัดตัวทำละลายออก จากนั้นละลายตะกอนที่เหลือในหลอดด้วย 20 mM PB นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาปริมาณทรีฮาโลส โดยอาศัยหลักการทำงานของทรีฮาเลสในสารละลายทรีฮาโลสมาตรฐาน (Sigma, USA) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จากนั้นวัดปริมาณกลูโคสที่ปลดปล่อยจากปฏิกิริยา โดยอาศัยหลักการและวิธีการตามข้อ (4.4) เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส

6. การวัดปริมาณโปรตีน

เตรียม Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.2-0.9 mg/ml เพื่อทำ standard curve ละลาย Dye reagent concentrate (Biorad) ด้วย deionized water ในอัตราส่วน 1:4 จากนั้นดูดโปรตีนมาตรฐาน และตัวอย่างเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ (4.3) และ (4.4) ปริมาตร 20 μ l ผสมกับ dye reagent ปริมาตร 1 ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับ standard curve

7. การศึกษาการแสดงออกของยีน α -amylase, trehalase-1 และ trehalase-2 ของมอดแป้ง

เพื่อตอบคำถามว่าการแสดงออกของยีน α -amylase, trehalase-1 และ trehalase-2 ในมอดแป้งมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร เมื่อการทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยสารบางอย่างที่ได้รับจากอาหาร จึงต้องทำการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของ α -amylase, trehalase-1 และ trehalase-2 mRNAs โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR ดังขั้นตอนต่อไปนี้

7.1 ออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูลของมอดแป้ง Tribolium Genome Project (Beetlebase) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ ยีน α -amylase, trehalase-1 และ trehalase-2 โดยวิธี RT-PCR

7.1.1 การโคลนยีน α -amylase

ทำการสกัด RNA จากตัวอย่างหนอนในอินสตาร์สุดท้าย จำนวน 15 ตัว โดยวิธี acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987) นำตัวอย่าง total RNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับ DNaseI เพื่อทำลาย DNA ที่ปนเปื้อนมาระหว่างการสกัด จากนั้นนำตัวอย่าง total RNA ไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เครื่อง ultraviolet-visible spectrophotometer ใช้ RNA ปริมาณ 1 μ g เพื่อสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้ oligo (dT)₁₂₋₁₈ ไพรเมอร์ และ cDNA synthesis kit (Takara, Japan) นำ cDNA ที่ได้จากวิธีข้างต้นไปตรวจสอบคุณภาพโดยใช้เป็น template ใน PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ทำการออกแบบจากฐานข้อมูล BeetleBase (<http://beetlebase.org/>) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน α -amylase ของมอดแป้งคือ TcAmF: 5'-CGAGCTTCGCCTTTGATAAC และ TcAmR: 5'-AATGGTGAAGGCGACAAATC มีโปรแกรม PCR คือ 95 °C 2 นาทีและ 35 รอบของ 94 °C 15 วินาที, 58 °C 30 วินาที, และ 72 °C นาน 2 นาที ตรวจวิเคราะห์หา DNA เป้าหมาย (250 bp.) โดย 1.2% agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 0.5 X TAE จากนั้นทำการตัดแถบแบนเพื่อนำไปโคลนและหาลำดับเบสต่อไป

7.1.2 การโคลนยีน Trehalase-1, Trehalase-2

ใช้ตัวอย่าง cDNA ที่ได้จากข้อ 7.1.1 ในการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน TcTrehalase-1 และ TcTrehalase-2 โดยใช้ไพรเมอร์ TcTre1F: 5'-GTGTATTGCCAAGGCAACCT, TcTre1R: 5'-CATGCCTTTAACCGTCTGGT และ TcTre2F: 5'-ACTGGAACGCGTTCTCTTA, TcTre2R: 5'-CGTCGTACTTTTCAAACA ตามลำดับ โดยมีโปรแกรมอุณหภูมิในการทำ PCR สำหรับยีน TcTrehalase-1 คือ 95 °C 2 นาทีและ 35 รอบของ 94 °C 15 วินาที, 52 °C 30 วินาที, และ 72 °C นาน 5 นาที และโปรแกรม PCR สำหรับยีน TcTrehalase-2 คือ 95 °C 2 นาทีและ 35 รอบของ 94 °C 15 วินาที, 55 °C 30 วินาที, และ 72 °C นาน 5 นาที ตรวจวิเคราะห์หา DNA เป้าหมาย (492 และ 500 bp) โดย 1.2% agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 0.5 X TAE จากนั้นทำการตัดแถบแบนเพื่อนำไปโคลนและหาลำดับเบสต่อไป

7.2 ทำการโคลนชิ้นส่วนของยีนเข้าไปในพลาสมิดเวกเตอร์ (pZErO-2) และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* (JM109) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส

7.3 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส

ใช้โปรแกรม FASTA และ ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/services/>) ในการวิเคราะห์ค่าความเหมือนของลำดับเบสและโปรตีนของยีนที่โคลนได้ เมื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีนทั้งหมด (α -amylase, Trehalase-1, และ Trehalase-2) แล้วจึง submit ข้อมูลเข้าไปในฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>)

7.4 การแสดงออกของยีน α -amylase, trehalase-1 และ trehalase-2 ของมอดแบ่งตัวอย่างมอดแบ่งในระยะต่างๆ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบพืช จะถูกนำมาสกัด RNA โดยวิธี acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987) จากนั้นใช้ตัวอย่าง RNA ปริมาณ 200 ng เพื่อทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยมีโปรแกรม PCR สำหรับแต่ละยีนดังนี้

TcTrehalase-1 คือ 95 °C 2 นาทีและ 28 รอบของ 94 °C 15 วินาที, 52 °C 30 วินาที, และ 72 °C นาน 2 นาที

TcTrehalase-2 คือ 95 °C 2 นาทีและ 28 รอบของ 94 °C 15 วินาที, 55 °C 30 วินาที, และ 72 °C นาน 2 นาที

Tc α -amylase คือ 95 °C 2 นาทีและ 25 รอบของ 94 °C 15 วินาที, 58 °C 30 วินาที, และ 72 °C นาน 2 นาที

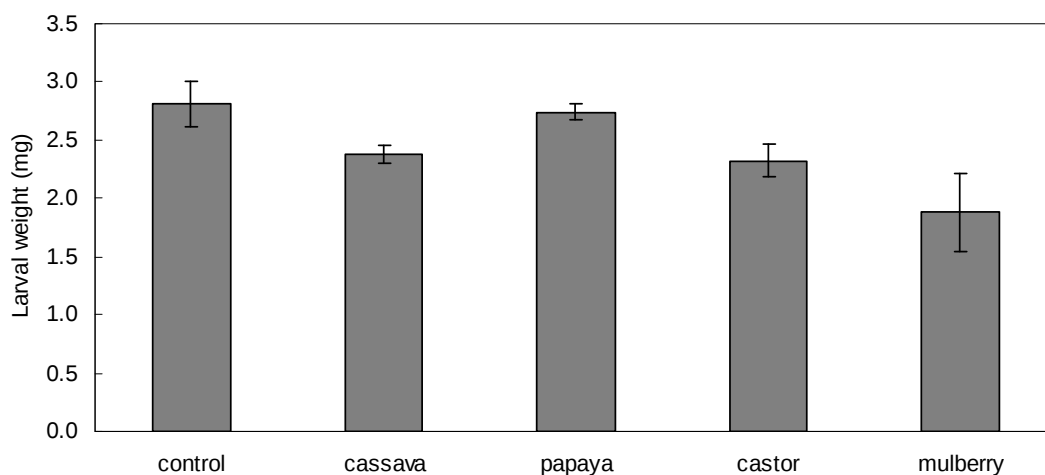
นำ PCR product ที่ได้ไปแยกโดย 1.2% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 0.5 X TAE นำไปย้อมใน ethidium bromide และถ่ายภาพแบนที่ได้ คำนวณค่าความเข้มของแบนโดยใช้โปรแกรม ScionImage (NIH) และนอกจากนี้ในการทำ Semi-quantitative RT-PCR จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม house keeping genes โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ยีน ribosomal protein 49 (*rp49*) เป็นยีนควบคุม (Minakuchi *et al.*, 2008)

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้ one-way-ANOVA ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างระยะเวลาของตัวหนอนและดักแด้ อัตราการตาย อัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและทรีฮาเลส และการแสดงออกของยีน *Tc α -amylase*, *TcTrehalase-1* และ *TcTrehalase-2*

ผลการทดลอง

1. ฤทธิ์ทางชีวภาพของใบพืชต่อมอดแป้ง

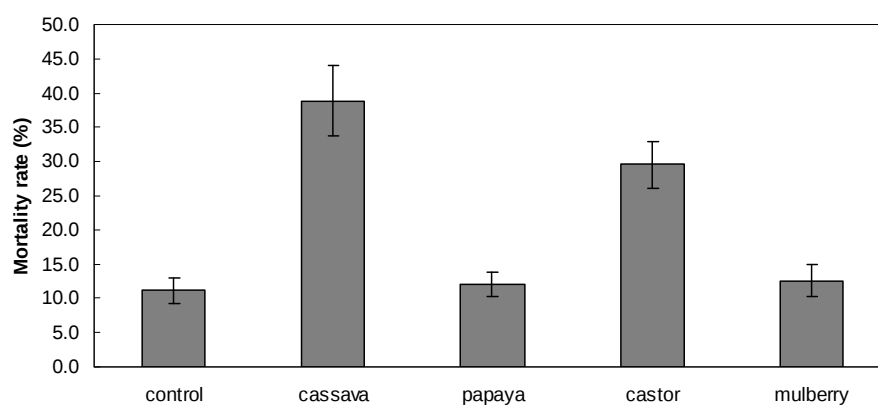
1.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของตัวหนอนหลังจากได้รับผงบดใบพืช 4 ชนิด (ใบหม่อน ละหุ่ง มั่นสำปะหลัง และมะละกอ) ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองผสมผงบดใบพืชแต่ละชนิดในอัตราส่วน 10%, 5%, 2.5% และ 1.25% จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วน 10% ให้ผลชัดเจนกว่าอัตราส่วนอื่นๆ (รูปที่ 1) กลุ่มที่ได้รับผงบดใบพืชมีน้ำหนักไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมโดยหนอนมีน้ำหนักเฉลี่ย 2.81 ± 0.19 mg ถึงแม้ว่ากลุ่มที่ได้รับผงบดใบหม่อนมีแนวโน้มน้ำหนักต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของตัวหนอนระยะสุดท้ายของมอดแป้งหลังจากได้รับผงบดใบพืชในอัตราส่วน 10% w/w เป็นเวลา 5 วัน control; ตัวหนอนได้รับแป้งสาลีผสมยีสต์, cassava; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมันสำปะหลัง, papaya; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมะละกอ, castor; ตัวหนอนได้รับผงบดใบละหุ่ง, mulberry; ตัวหนอนได้รับผงบดใบหม่อน

1.2 อัตราการตายของแมลงเมื่อได้รับผงบดใบพืช

จากการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับผงบดใบมันสำปะหลังและใบละหุ่งมีอัตราการตายเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมคือ 38.9%, 29.6% และ 10.5% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับใบมะละกอและใบหม่อนมีอัตราการตายใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2)

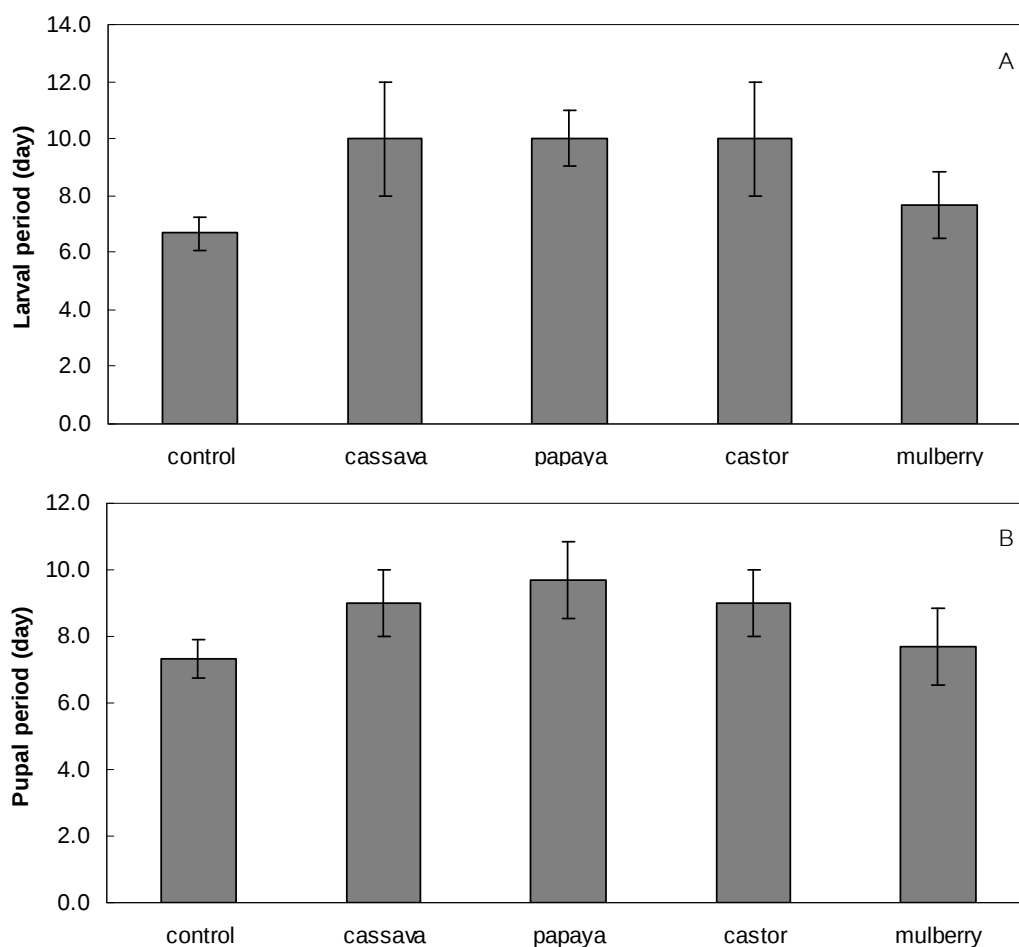


รูปที่ 2 อัตราการตายของมอดแบ่งหลังจากได้รับผงบดใบพืชในอัตราส่วน 10% w/w

control; ตัวหนอนได้รับแป้งสาลีผสมยีสต์, cassava; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมันสำปะหลัง, papaya; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมะละกอ, castor; ตัวหนอนได้รับผงบดใบละหุ่ง, mulberry; ตัวหนอนได้รับผงบดใบหม่อน

1.3 ระยะเวลาการเป็นตัวหนอนและดักแด้เมื่อได้รับผงบดใบพืช

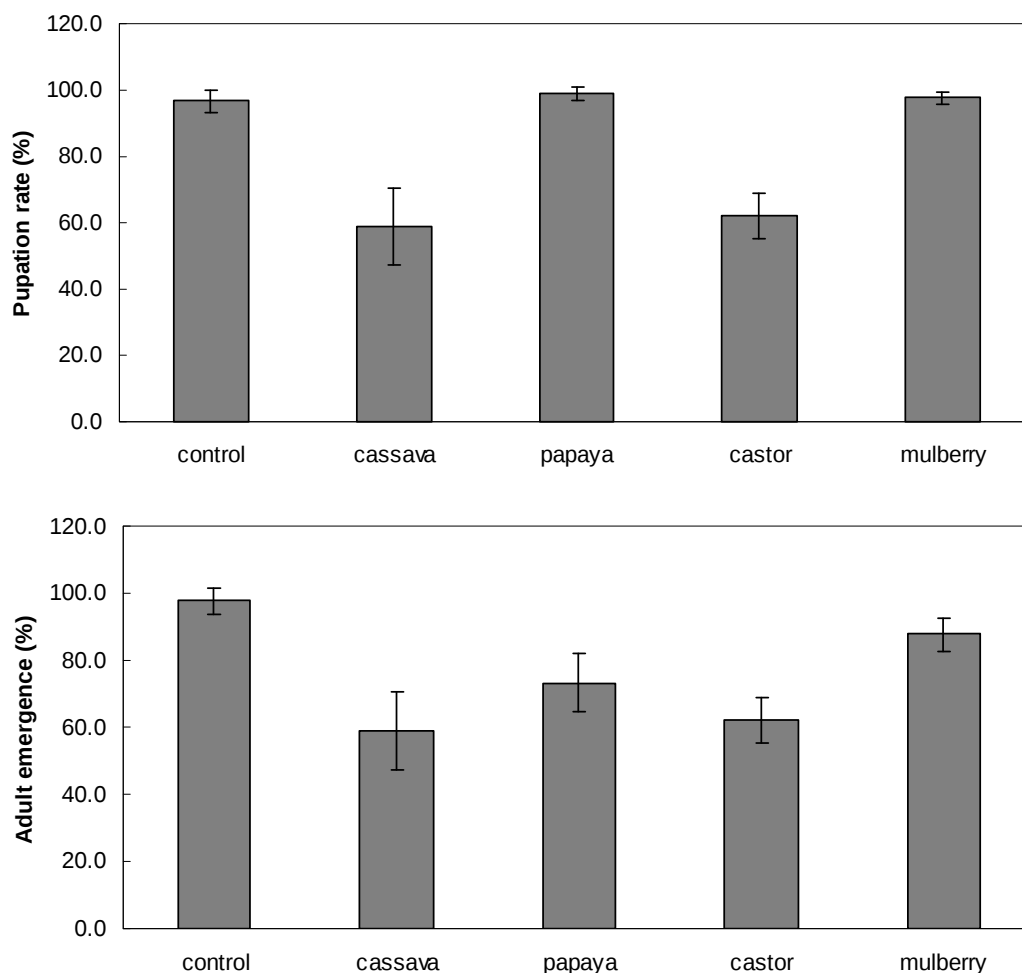
เมื่อทำการให้ผงบดใบพืชแก่ตัวหนอนพบว่าใบพืชทั้ง 3 ชนิดคือ ใบมันสำปะหลัง ใบมะละกอ และใบละหุ่ง ส่งผลให้ระยะตัวหนอนยาวนานมากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ โดยมีระยะเวลาเฉลี่ย 9 วัน ส่วนในกลุ่มใบหม่อนมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมโดยมีระยะเวลาเฉลี่ย 7.33 และ 7.6 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 3A) จากนั้นทำการสังเกตต่อเนื่องจนกระทั่งหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ พบว่าระยะเวลาในการเป็นดักแด้ของกลุ่มที่ได้รับใบมันสำปะหลัง มะละกอ และใบละหุ่งมีเวลายาวนานกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 3B)



รูปที่ 3 ระยะเวลาในการเป็นตัวหนอนและดักแด้ของมอดแบ่งหลังจากได้รับผงบดใบพืชในอัตราส่วน 10% w/w control; ตัวหนอนได้รับแป้งสาลิสมยีสต์, cassava; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมันสำปะหลัง, papaya; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมะละกอ, castor; ตัวหนอนได้รับผงบดใบละหุ่ง, mulberry; ตัวหนอนได้รับผงบดใบหม่อน

1.4 อัตราการเข้าดักแด้และการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย

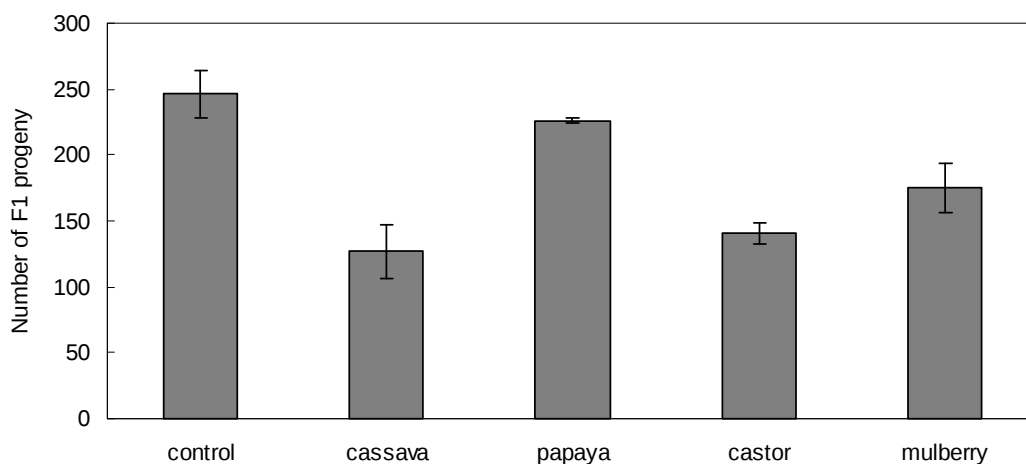
เมื่อทำการทดลองให้ผงบดใบพืชแก่มอดแบ่งในระยะเวลาตัวหนอนแล้วทำการติดตามการเข้าดักแด้พบว่ากลุ่มที่ได้รับใบมันสำปะหลังและใบละหุ่งมีอัตราการเข้าดักแด้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 4A) หลังจากนั้นติดตามจนกระทั่งแมลงเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย พบว่าอัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยของแมลงในกลุ่มที่ได้รับผงบดใบพืชทุกชนิดมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4B)



รูปที่ 4 อัตราการเข้าดักแด้และอัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยของมอดแบ่งหลังจากได้รับผงบดใบพืชในอัตราส่วน 10% w/w control; ตัวหนอนได้รับแบ่งสาลิผสมยีสต์, cassava; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมันสำปะหลัง, papaya; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมะละกอ, castor; ตัวหนอนได้รับผงบดใบละหุ่ง, mulberry; ตัวหนอนได้รับผงบดใบหม่อน

1.5 ความสามารถในการผลิตประชากรรุ่น F1

เมื่อทำการทดลองให้ผงบดใบพืชแถมอดแป้งในระยะตัวเต็มวัยเป็นเวลา 7 วัน และศึกษาการ
ผลิตประชากรรุ่น F1 พบว่า กลุ่มที่ได้รับใบมันสำปะหลัง ใบละหุ่งและใบหม่อนสามารถให้ลูกรุ่น F1 ได้
เฉลี่ย 127.3, 141.0 และ 175.3 ตัว ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ได้รับใบมะละกอมีจำนวนเฉลี่ยใกล้เคียงกับ
กลุ่มควบคุมคือ 226.0 และ 246.33 ตัว ตามลำดับ (รูปที่ 5)

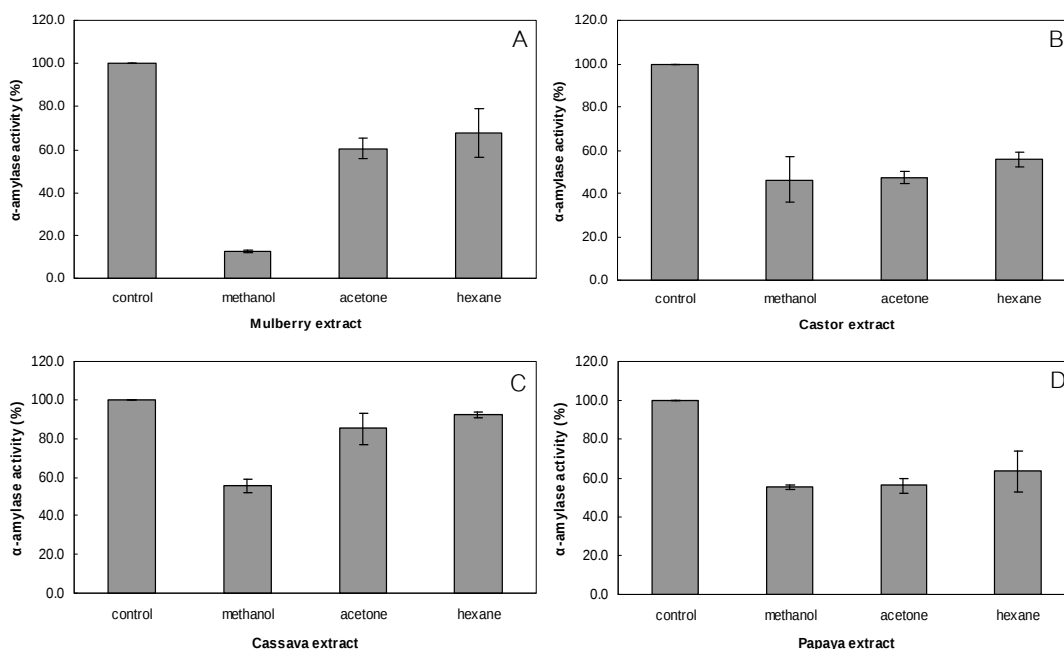


รูปที่ 5 จำนวนประชากรรุ่น F1 ของมอดแป้งที่ได้รับผงบดใบพืชในอัตราส่วน 10% w/w
control; ตัวหนอนได้รับแป้งสาลีผสมยีสต์, cassava; ตัวหนอนได้รับผงบดใบมันสำปะหลัง, papaya;
ตัวหนอนได้รับผงบดใบมะละกอ, castor; ตัวหนอนได้รับผงบดใบละหุ่ง, mulberry; ตัวหนอนได้รับผง
บดใบหม่อน

2. ผลของสารสกัดจากใบพืชด้วยตัวทำละลายต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์ทรีฮาเลส *in vitro* และ *in vivo*

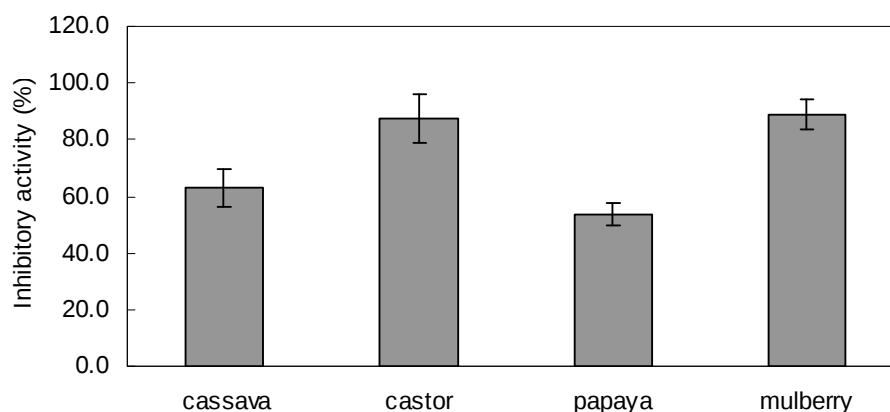
2.1 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส *in vitro*

จากการทดลองสกัดใบพืชด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด คือ methanol, acetone และ hexane แล้วนำสารสกัดไปทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลสในหลอดทดลอง โดยทำการบ่มสารสกัดกับตัวอย่างเอนไซม์เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม substrate ลงไปปล่อยให้ทำปฏิกิริยา แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์ โดยให้หลอดควบคุมคือการทำงานของเอนไซม์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยคิดเป็นอัตราการทำงาน 100% จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบพืชทั้ง 4 ชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลสในหลอดทดลองได้ (รูปที่ 6) โดยมีการทำงานเฉลี่ย 50-80% เมื่อเทียบกลับกลุ่มควบคุม และพบว่าสารสกัด methanol แสดงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลสของมอดแบ่งได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะสารจากใบหม่อนที่สกัดด้วย methanol พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถทำงานได้เพียง 12.3% เท่านั้น (รูปที่ 6A) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลสมากกว่าสารจากใบละหุ่ง มันสำปะหลัง และใบมะละกอ โดยมีการทำงานของเอนไซม์เฉลี่ย 46.4%, 55.4% และ 55.5% ตามลำดับ



รูปที่ 6 การทำงานของแอลฟาอะไมเลส *in vitro* เมื่อนำไปบ่มกับสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ methanol, acetone และ hexane, control คือการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากใบพืช

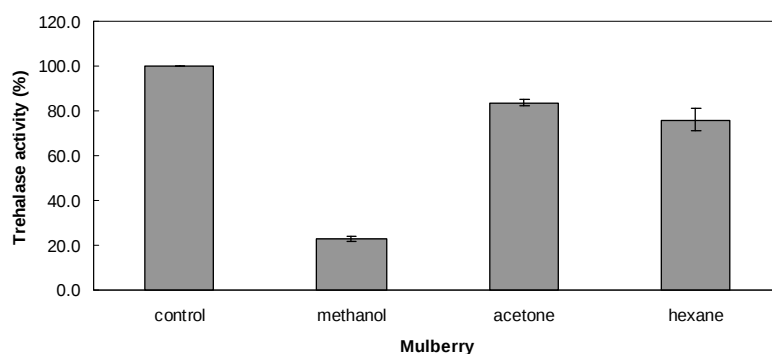
เมื่อทำการเจือจางสารสกัด methanol ที่ได้จากพืชแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลส พบว่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะถูกรายงานเป็น % inhibitory activity จากผลการทดลองดังรูปที่ 7 แสดงความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลสในหลอดทดลอง โดยสารสกัดใบหม่อน ใบละหุ่ง ใบมันสำปะหลัง และใบมะละกามีค่า inhibitory activity เฉลี่ย 88.84%, 86.55%, 63.09% และ 53.65% ตามลำดับ



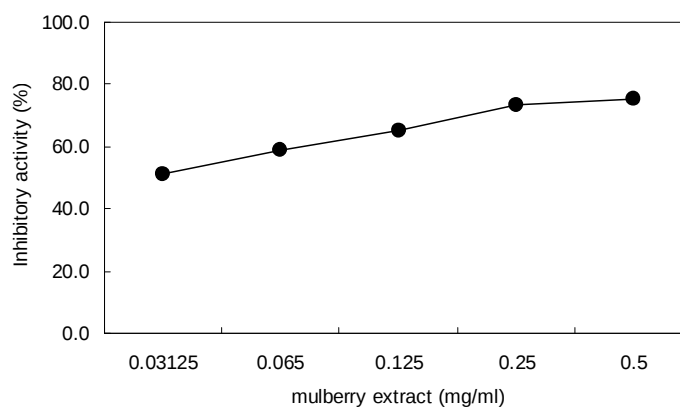
รูปที่ 7 ความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการทำงาน (inhibitory activity) ของแอลฟาอะไมเลส *in vitro* เมื่อนำไปบ่มกับสารสกัด methanol ที่ได้จากใบมันสำปะหลัง ใบละหุ่ง ใบมะละกอ และใบหม่อน

2.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส *in vitro*

เมื่อนำสารสกัดจากใบพืชทั้ง 4 ชนิดไปทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสในหลอดทดลองโดยทำการบ่มสารสกัดกับเอนไซม์เป็นเวลา 20 นาทีหลังจากนั้นเติม substrate ลงไปปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาแล้วตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์โดยการวัดปริมาณกลูโคสที่ปลดปล่อยออกมา พบว่ามีเพียงสารสกัดจากใบหม่อนเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของทรีฮาเลสของมอดแบ่งได้ (รูปที่ 8) โดยสารสกัด methanol ส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์เฉลี่ย 22.9% เมื่อเทียบกับการทำงานของทรีฮาเลสในหลอดควบคุม ส่วนสารที่สกัดด้วย acetone และ hexane นั้นพบว่ามีแนวโน้มลดการทำงานของเอนไซม์ได้แต่มีค่าน้อยกว่าสารที่สกัดด้วย methanol นอกจากนี้ยังได้ทดลองเจือจางสารสกัดจากใบหม่อนให้มีความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทรีฮาเลส (inhibitory activity) และพบว่า inhibitory activity สูงสุดของใบหม่อนคือ 75.2 % ดังแสดงในรูปที่ 9



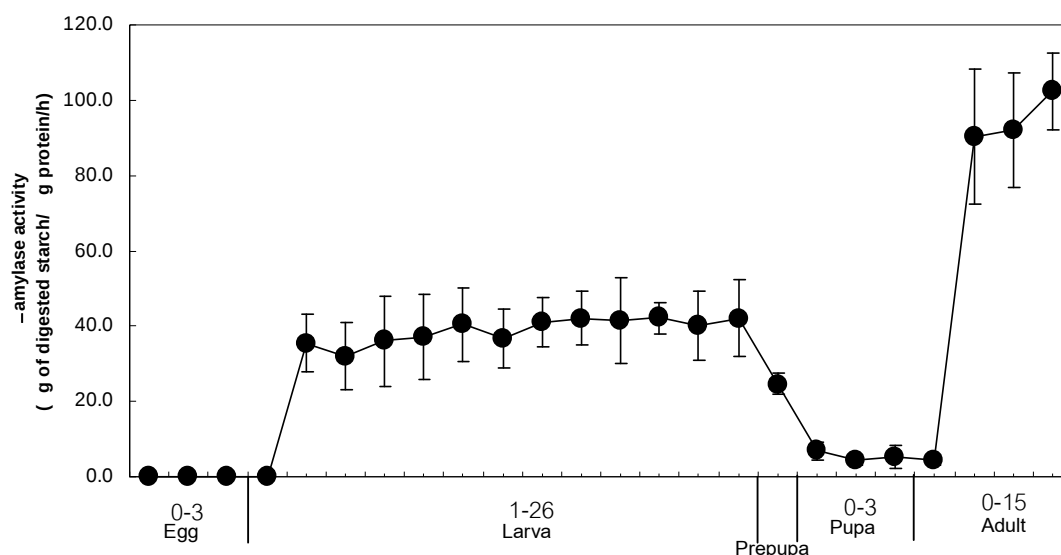
รูปที่ 8 การทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส *in vitro* เมื่อนำไปบ่มกับสารสกัดใบหม่อนที่ได้จากตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ methanol, acetone และ hexane, control คือการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากใบพืช



รูปที่ 9 ความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการทำงานของ (inhibitory activity) ของทรีฮาเลส *in vitro* เมื่อนำไปบ่มกับสารสกัด methanol ที่ได้จากใบหม่อนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส *in vivo*

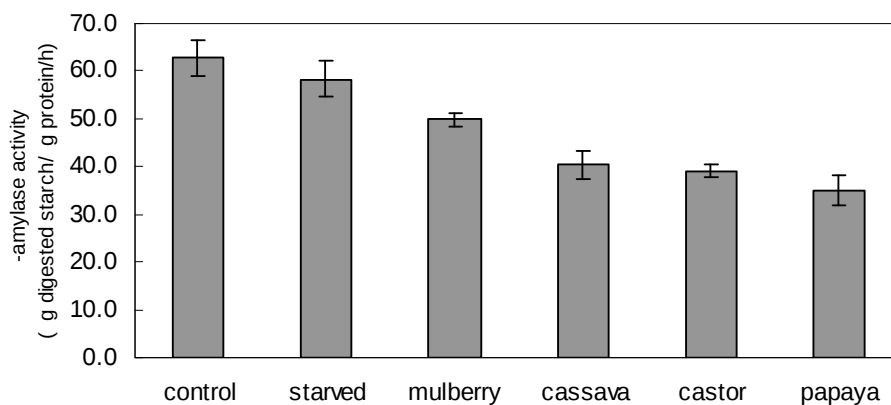
การติดตามการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในแต่ละระยะการเจริญของมอดแบ่งพบว่า ไม่สามารถตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ในระยะไข่และตัวหนอนที่ฟักออกจากไข่ในวันแรก หลังจากนั้นพบการทำงานของเอนไซม์สูงต่อเนื่องตั้งแต่ตัวหนอนอายุ 2 วันจนถึงตัวหนอนระยะสุดท้าย การทำงานของเอนไซม์จะลดลงเล็กน้อยเมื่อหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้ (prepupa) และมีค่าต่ำในระยะดักแด้ เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยที่เพ็งลอกคราบการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในระดับต่ำและจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อตัวเต็มวัยมีอายุ 5-15 วัน ซึ่งถือว่ามีความการทำงานของแอลฟาอะไมเลสสูงที่สุด (รูปที่ 10)



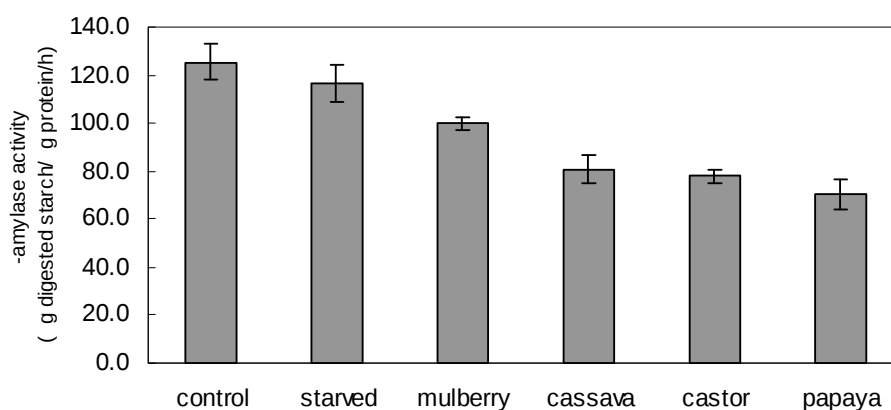
รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของมอดแบ่งตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย การทำงานของเอนไซม์รายงานในหน่วยของปริมาณแป้งที่ถูกย่อยต่อปริมาณ โปรตีนในเวลา 1 ชั่วโมง

จากผลการทดสอบแบบ *in vitro* พบว่าสารสกัด methanol ให้ผลการยับยั้งที่มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนนี้ผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัด methanol ของพืชทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบต่อเพื่อหาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแบบ *in vivo* โดยการทดลองผสมสารสกัด methanol จากพืชทั้ง 4 ชนิดเข้ากับแป้งสาลีให้มอดแบ่งในระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยกิน เนื่องจากพบว่าเป็นระยะที่มีการทำงานของเอนไซม์สูง จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงการทำงานของแอลฟาอะไมเลส หลังจากที่ได้รับสารสกัดเข้าสู่ร่างกายเป็นเวลา 4 วัน นอกจากนี้ยังได้ทำการวัดการทำงานของแอลฟาอะไมเลสในแมลงที่ถูกอดอาหาร เพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากแมลงได้รับสารสกัดเข้าไป หรือเป็นการ

เปลี่ยนแปลงเนื่องจากแมลงไม่ยอมกินอาหารที่อาจมีสีหรือกลิ่นที่เปลี่ยนไปเมื่อมีการผสมสารสกัดจากใบพืช ผลการทดลองในระยะตัวหนอนเมื่อได้รับสารสกัดพบว่า สารในพืชทั้ง 4 ชนิดส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม โดยสารสกัดจากใบมันสำปะหลัง ใบละหุ่ง และใบมะละกอก็มีการยับยั้งได้สูงสุด และรองลงมาคือสารจากใบหม่อน ส่วนกลุ่มที่ได้รับการอดอาหารนั้นส่งผลให้แอลฟาอะไมเลสมีการทำงานลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 11) สำหรับผลการทดลองในตัวเต็มวัยให้ผลในการทำงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระยะตัวหนอน (รูปที่ 12)



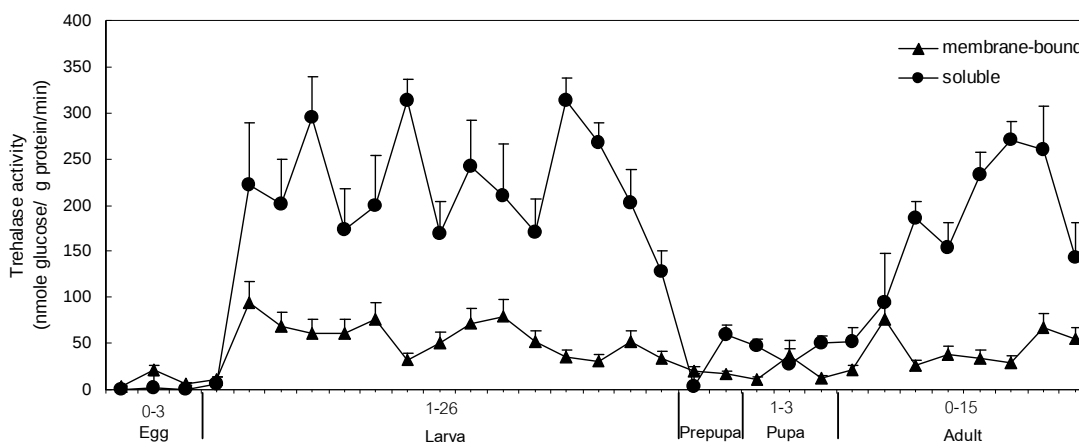
รูปที่ 11 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของมอดแบ่งในระยะตัวหนอนหลังจากได้รับสารสกัดจากพืชโดยการผสมกับอาหารที่มีความเข้มข้น 0.5% จากนั้นทำการวัดการทำงานของเอนไซม์เมื่อแมลงได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 12 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของมอดแบ่งในระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากพืชโดยการผสมกับอาหารให้มีความเข้มข้น 0.5% จากนั้นทำการวัดการทำงานของเอนไซม์เมื่อแมลงได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 วัน

2.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส *in vivo*

ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสทั้ง 2 รูปแบบ (soluble และ membrane-bound) ในแต่ละระยะการเจริญของมอดแบ่งพบว่า ไม่สามารถตรวจพบการทำงานของ soluble trehalase ในระยะไข่และตัวหนอนที่ฟักออกจากไข่ในวันแรกได้ หลังจากนั้นการทำงานของเอนไซม์สูงต่อเนื่องตั้งแต่ตัวหนอนอายุ 2 วันจนถึงตัวหนอนระยะสุดท้าย (อายุ 26 วัน) การทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะก่อนดักแด้ (prepupa) และมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระยะดักแด้ เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยที่เพิ่งลอกคราบการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในระดับต่ำและจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อตัวเต็มวัยมีอายุ 5-15 วัน (รูปที่ 13) ในทางตรงกันข้ามการทำงานของ membrane-bound trehalase ในระยะไข่ สามารถตรวจวัดได้มากกว่าเมื่อ soluble trehalase และเมื่อเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะตัวหนอนการทำงานของ membrane-bound trehalase จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่จนกระทั่งมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้และตัวเต็มวัย เมื่อเปรียบเทียบในระยะตัวอ่อนการทำงานของ soluble trehalase จะสูงกว่า membrane-bound trehalase เฉลี่ยประมาณ 4 เท่า และระยะตัวเต็มวัยการทำงานของ soluble trehalase จะสูงกว่า membrane-bound trehalase เฉลี่ยประมาณ 5 เท่า

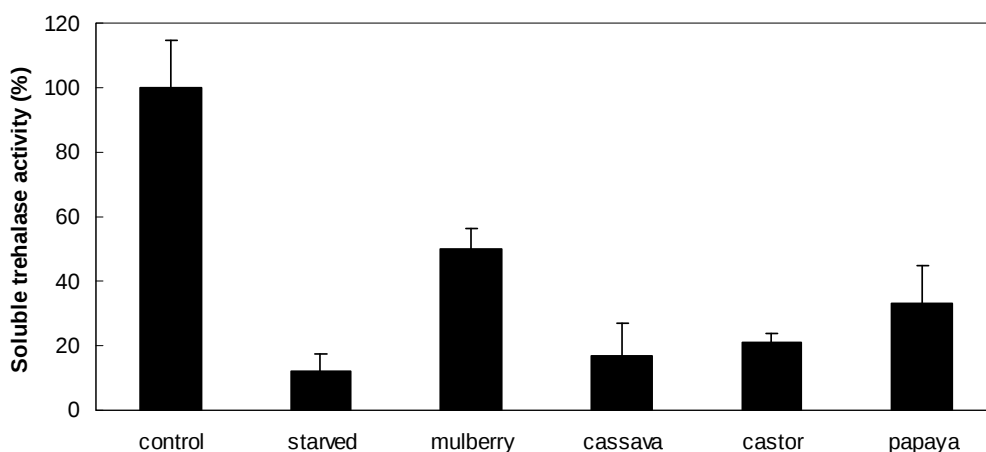


รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส (soluble trehalase และ membrane-bound trehalase) ของมอดแบ่งตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ก่อนเข้าดักแด้ ดักแด้ และตัวเต็มวัย (Egg, Larva, Prepupa, Pupa, Adult) การทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสรายงานในหน่วยของปริมาณกลูโคสที่ปลดปล่อยจากปฏิกิริยาต่อปริมาณโปรตีนในเวลาหนึ่งนาที

2.4.1 การยับยั้งการทำงานของ soluble trehalase

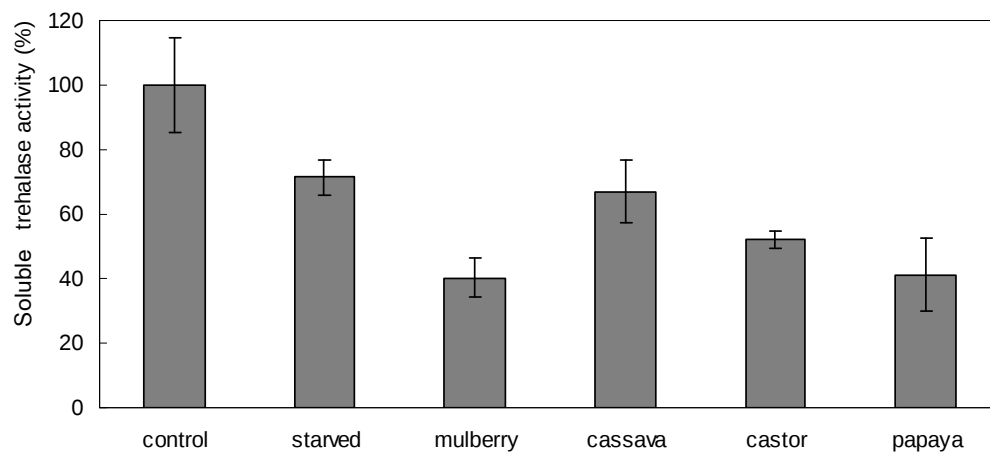
ในการทดลองขั้นตอนนี้ผู้วิจัยเลือกสารสกัด methanol มาทดสอบต่อเพื่อหาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสแบบ *in vivo* โดยการทดลองผสมสารสกัดจากใบพืชทั้ง 4 ชนิดเข้ากับแป้งสาลิให้มอดแป้งในระยะตัวหนอนอินสตาร์สุดท้ายและตัวเต็มวัยกิน เนื่องจากพบว่า เป็นระยะที่มีการทำงานของเอนไซม์สูง จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงการทำงานของทรีฮาเลสทั้ง 2 ฟอรั่ม หลังจากที่ได้รับสารสกัดเข้าสู่ร่างกายเป็นเวลา 4 วัน นอกจากนี้ยังได้ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสในแมลงที่ถูกอดอาหาร ทั้งนี้เพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากแมลงได้รับสารสกัดเข้าไป หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากแมลงไม่ยอมกินอาหารที่อาจมีสีและกลิ่นที่เปลี่ยนไปเมื่อมีการผสมสารสกัดจากใบหม่อน

จากรูปที่ 14 หลังจากตัวหนอนได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 วันการทำงานของเอนไซม์ soluble trehalase ลดลงโดยมีค่าประมาณ 17-50% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีค่าการทำงานของเอนไซม์เป็น 100% ในขณะเดียวกันการอดอาหารก็ส่งผลให้ soluble trehalase มีการทำงานลดลง (12.22%) และต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด



รูปที่ 14 การทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส (soluble trehalase) ของมอดแป้งในระยะตัวหนอนหลังจากได้รับสารสกัดจากพืชโดยการผสมกับอาหารที่ความเข้มข้น 0.5% จากนั้นทำการวัดการทำงานของเอนไซม์เมื่อแมลงได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 วัน

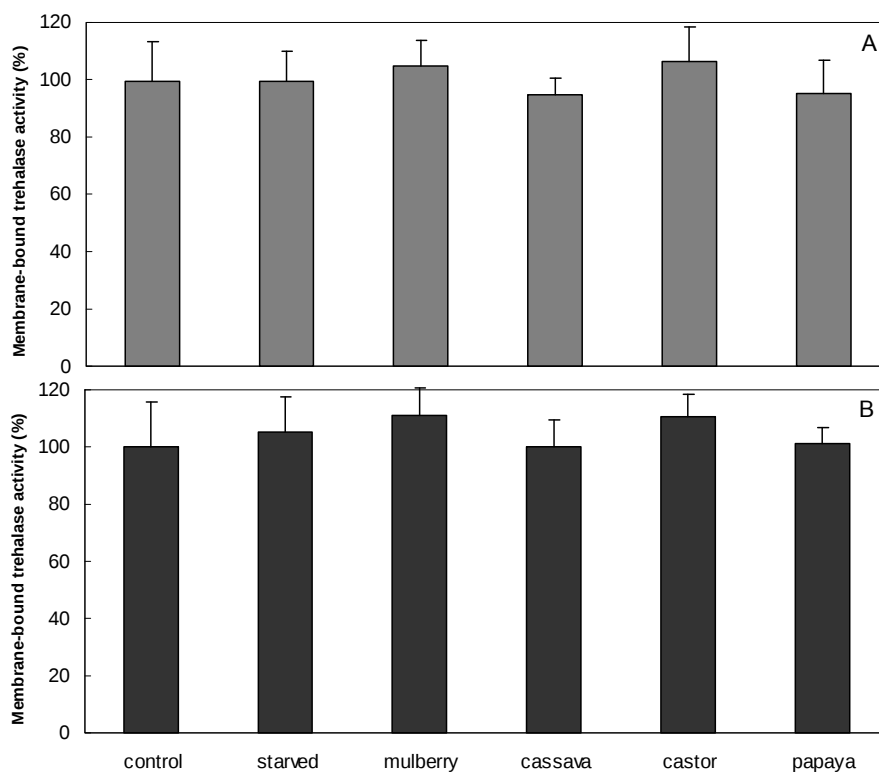
เมื่อทำการทดลองกับตัวเต็มวัย พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด มีผลยับยั้งการทำงานของ soluble trehalase คือเอนไซม์มีการทำงานอยู่ในช่วง 40-67% เมื่อเทียบกับแมลงที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ได้ผสมสารสกัด ส่วนแมลงที่ได้รับการอดอาหารนั้น soluble trehalase มีการทำงานลดลงเล็กน้อย



รูปที่ 15 การทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส (soluble trehalase) ของมอดแบ่งในระยะตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากพืชโดยการผสมกับอาหารที่มีความเข้มข้น 0.5% จากนั้นทำการวัดการทำงานของเอนไซม์เมื่อแมลงได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 วัน

2.4.2 การยับยั้งการทำงานของ membrane-bound trehalase

เมื่อทดลองให้สารสกัดทั้ง 4 ชนิด แก่มอดแบ่งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยโดยการผสมลงในอาหารเป็นเวลา 4 วัน แล้วตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ membrane-bound trehalase พบว่าการทำงานของ membrane-bound trehalase ทั้งในระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยที่วัดได้มีค่าไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 16)

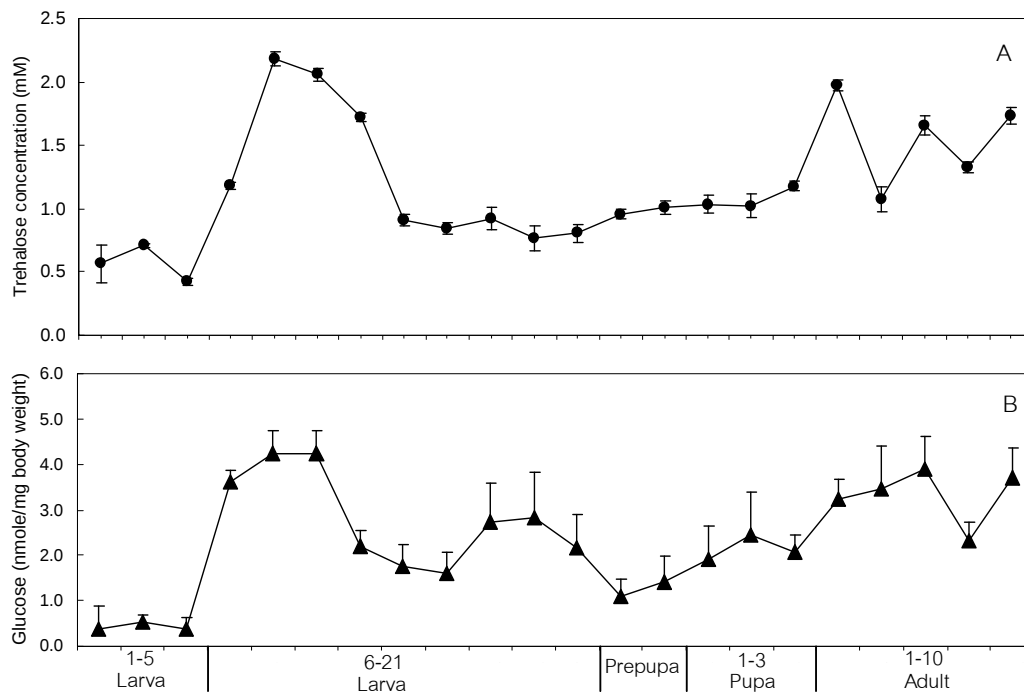


รูปที่ 16 การทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส (membrane-bound trehalase) ของมอดแบ่งในระยะตัวหนอน (A) และตัวเต็มวัย (B) หลังจากได้รับสารสกัดจากพืชโดยการผสมกับอาหารที่ความเข้มข้น 0.5% จากนั้นทำการวัดการทำงานของเอนไซม์เมื่อแมลงได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 วัน

2.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสและทรีฮาโลสในมอดแบ่งเมื่อได้รับสารสกัด

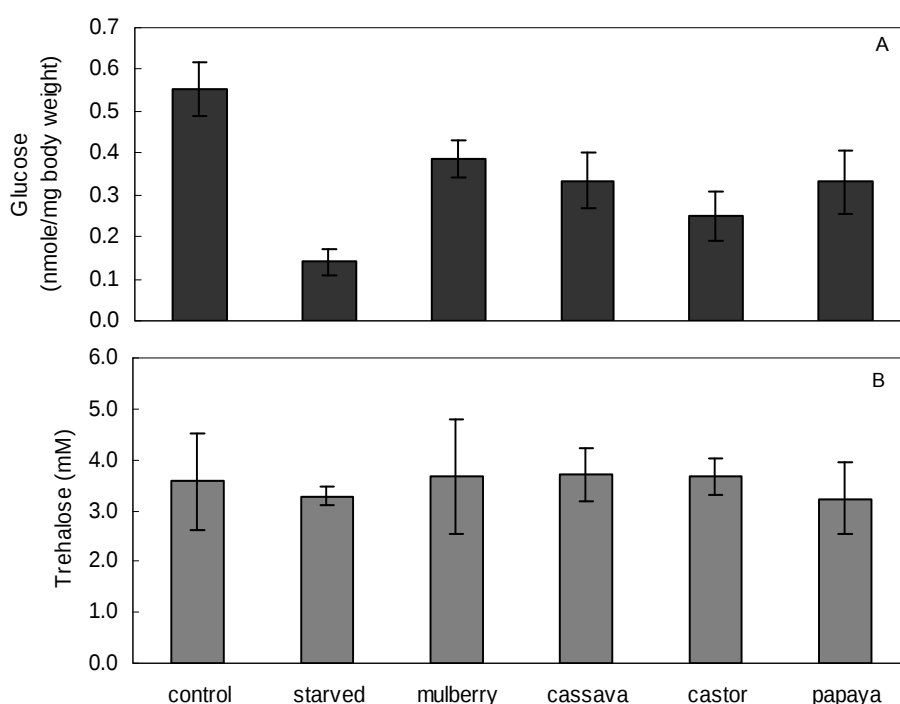
จากผลการตรวจวัดปริมาณทรีฮาโลสตั้งแต่ระยะตัวอ่อนอายุ 1 วัน จนถึงตัวเต็มวัย (รูปที่ 17A) พบว่าตัวหนอนอายุ 1-5 วันมีทรีฮาโลสในระดับต่ำเฉลี่ย 0.5 mM จากนั้นทรีฮาโลสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 7-8 โดยมีความเข้มข้นเฉลี่ย 2.0 mM จากนั้นค่อยๆ ลดลงและคงที่จนกระทั่งเข้าสู่ระยะดักแด้ ความเข้มข้นของทรีฮาโลสจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปลี่ยนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย

นอกจากนี้ยังทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกลูโคสในมอดแบ่งตั้งแต่ตัวอ่อนอายุ 1 วันจนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย (รูปที่ 17B) ในระยะ 1-5 วันตัวอ่อนของมอดแบ่งมีกลูโคสอยู่ในระดับต่ำเฉลี่ย 0.3 nmole/mg body weight จากนั้นกลูโคสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 7-9 วัน (4 nmole/ mg body weight) และค่อยๆ ลดลงเมื่ออยู่ในช่วงกลางของระยะตัวหนอน ระดับของกลูโคสจะเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ช่วงปลายของระยะตัวหนอน (ตัวหนอนอายุ 22-25 วัน) เมื่อหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ prepupal ระดับน้ำตาลจะลดลงเล็กน้อยและเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้และตัวเต็มวัย



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงการความเข้มข้นของกลูโคสและทรีฮาโลสในมอดแบ่งตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ก่อนดักแด้ ดักแด้ และตัวเต็มวัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ นอกจากทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์แอล-ฟอะไมเลส และเอนไซม์ทรีฮาเลสแล้ว ในขณะเดียวกันยังได้ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและทรีฮาโลสเพื่อตอบคำถามว่าเมื่อการทำงานของเอนไซม์ถูกรบกวนแล้วจะส่งผลถึงปริมาณน้ำตาลกลูโคสและทรีฮาโลส ซึ่งถือว่าเป็นน้ำตาลที่มีความสำคัญมากต่อมอดแบ่งรวมถึงแมลงชนิดอื่นๆ จากผลการทดลองพบว่าหลังจากที่แมลงได้รับสารสกัดแล้วมีผลทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสลดลงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนแมลงที่ได้รับการอดอาหารมีระดับกลูโคสต่ำที่สุด (รูปที่ 18A) แต่จากการตรวจวัดความเข้มข้นของน้ำตาลทรีฮาโลสพบว่า เมื่อได้รับสารสกัดแล้วระดับ ทรีฮาโลสไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 18B)



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงการความเข้มข้นของกลูโคสและทรีฮาโลสในมอดแบ่งเมื่อได้รับสารสกัดจากพืช 4 ชนิด คือใบหม่อน ใบมันสำปะหลัง ใบละหุ่ง และใบมะละกอ เทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่อดอาหาร

2.6 การโคลนยีน α -amylase, Trehalase-1 และ Trehalase-2 ของมอดแป้ง

2.6.1 ยีน *Tribolium castaneum* α -amylase

ยีน α -amylase ของมอดแป้งที่โคลนได้มีลำดับเบส 251 nucleotides และสามารถแปลเป็น deduced amino acid 82 ตัว จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้โดยโปรแกรม FASTA และ BLAST (www.ebi.ac.uk) พบว่ามีความเหมือนกับแมลงชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 1 หลังจากทำการวิเคราะห์และยืนยันว่าเป็นยีน α -amylase แล้วจึง submit ข้อมูลเข้าไปใน Genbank โดยมีเลข Genbank accession no. คือ JX099779

ตารางที่ 1 ค่าความเหมือน (% identity) ของยีน α -amylase ของมอดแป้งและแมลงชนิดอื่นๆ

Accession no.	Speicies	Identity (%)
AF208002	<i>Diabrotica virgifera</i>	69.9
AB110483	<i>Callosobruchus chinensis</i>	64.6
Y17902	<i>Phaedon cochleariae</i>	61.2
AF527876	<i>Anthonomus grandis</i>	60.2
AF255722	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	59.5
HQ158012	<i>Sitophilus oryzae</i>	56.6
NM_001195462	<i>Bombyx mori</i>	56.6

2.6.2 ยีน *Tribolium castaneum* Trehalase-1

ยีน Trehalase-1 ที่โคลนได้มีลำดับเบส 249 nucleotides และสามารถแปลเป็น deduced amino acid ได้ 164 ตัว จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้โดยโปรแกรม FASTA และ BLAST พบว่ามีความเหมือนกับแมลงชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 2 หลังจากทำการวิเคราะห์และยืนยันว่าเป็นยีน *TcTrehalase-1* (*TcTreh-1*) แล้วจึง submit ข้อมูลเข้าไปใน Genbank โดยมีเลข Genbank accession no. คือ JX099777

ตารางที่ 2 ค่าความเหมือน (% identity) ของยีน Trehalase-1 ของมอดแป้งและแมลงชนิดอื่นๆ

Accession no.	Speicies	Identity (%)
D11338	<i>Tenebrio molitor</i>	69.5
EF426724	<i>Omphisa fuscidentalis</i>	53.7
GU211891	<i>Spodoptera litura</i>	51.2
HM056038	<i>Harmonia axyridis</i>	48.8

2.6.3 ยีน *Trehalase-2*

ยีน *Trehalase-2* ที่โคลนได้มีลำดับเบส 500 nucleotides สามารถแปลเป็น deduced amino acid ได้ 166 amino acid จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้โดยโปรแกรม FASTA และ BLAST พบว่ามีความเหมือนกับแมลงชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 3 หลังจากทำการวิเคราะห์และยืนยันว่าเป็นยีน *Trehalase-2* (*TcTreh-2*) แล้วจึง submit ข้อมูลเข้าไปใน Genbank โดยมีเลข Genbank accession no. คือ JX099778

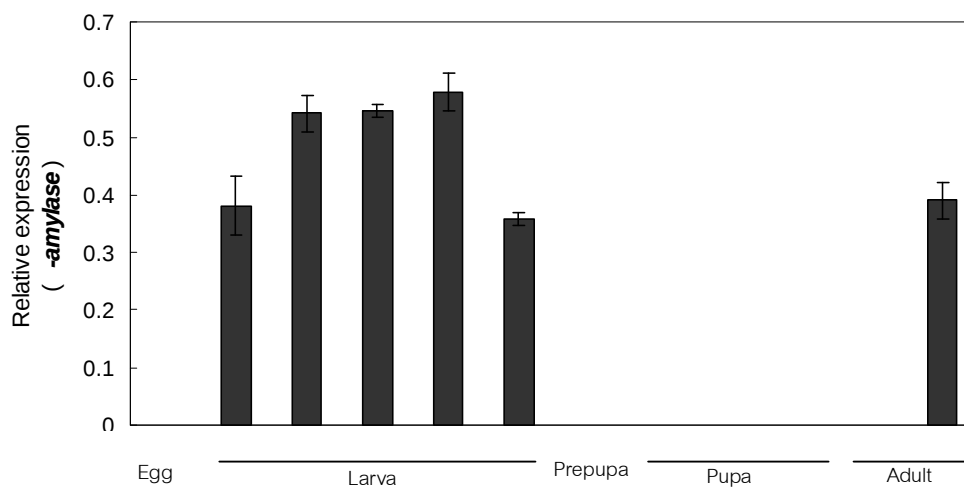
ตารางที่ 3 ค่าความเหมือน (% identity) ของยีน *TcTrehalase-2* ของมอดแป้งและแมลงชนิดอื่นๆ

Accession no.	Speicies	Identity (%)
D11338	<i>Tenebrio molitor</i>	62.6
GU211890	<i>Spodoptera litura</i>	72.5
NM_001043445	<i>Bombyx mori</i>	71.9
FJ501961	<i>Harmonia axyridis</i>	60.8

2.7 การแสดงออกของยีน α -amylase, Trehalase-1 และ Trehalase-2 ของมอดแป้ง

2.7.1 การแสดงออกของยีน $Tc\alpha$ -amyl ของมอดแป้งในระยะต่างๆ

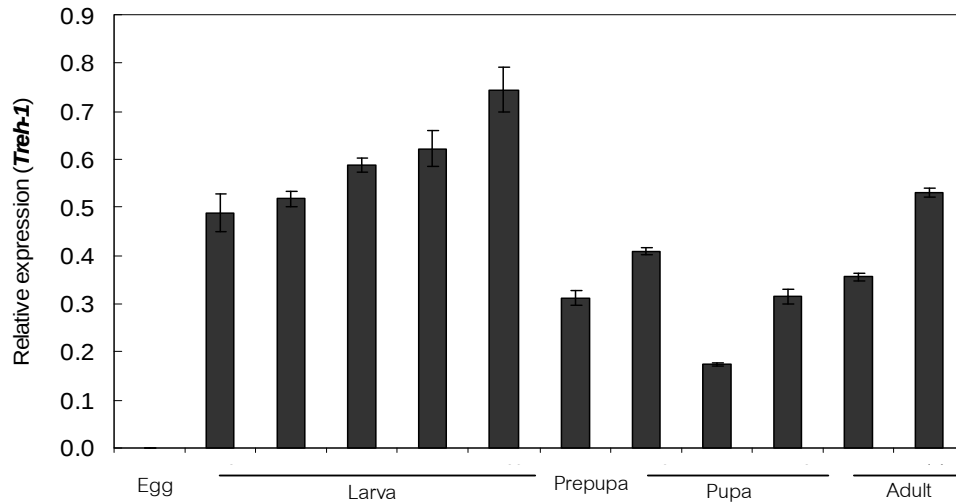
การทดสอบการแสดงออกของ $Tc\alpha$ -amylase โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีนพบมากในระยะตัวหนอนและระยะตัวเต็มวัย ส่วนในระยะไข่ prepupa ดักแด้ จนถึงระยะตัวเต็มวัยที่เพิ่งลอกคราบนั้น ไม่พบการแสดงออกของยีน $Tc\alpha$ -amylase (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 การแสดงออกของยีน α -amylase ของมอดแป้งตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย

2.7.2 การแสดงออกของยีน *TcTreh-1* ของมอดแบ่งในระยต่าง

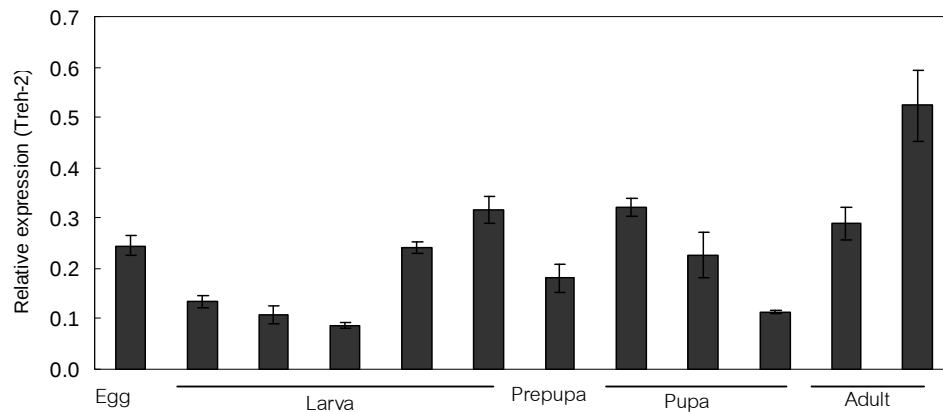
ในระยไข่ไม่พบการแสดงออกของยีน *TcTreh-1* เมื่อเข้าสู่ระยตัวหนอนพบว่าการแสดงออกของยีน *TcTreh-1* เพิ่มขึ้นมากและสูงสุดในช่วงท้ายของระยตัวหนอน จากนั้นการแสดงออกของ *TcTreh-1* จะลดลงประมาณ 50% เมื่อเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระย prepupa และต่ำสุดในระยดักแด และเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยตัวเต็มวัย (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 การแสดงออกของยีน *TcTreh-1* ของมอดแบ่งตั้งแต่ระยไข่ ตัวหนอน ก่อนดักแด ดักแดและตัวเต็มวัย

2.7.3 การแสดงออกของยีน *TcTreh-2* ของมอดแบ่งในระยต่าง

การแสดงออกของยีน *TcTreh-2* ของมอดแบ่งนั้นสามารถตรวจวัดได้ทุกระยะการเจริญ โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *TcTreh-2* สูงในระยะไข่จากนั้นลดลงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ระยะตัวอ่อน ตอนต้นและเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่ช่วงท้ายของระยะตัวอ่อน การแสดงออกของยีนลดลงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ และเมื่อแมลงเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยพบว่าการแสดงออกของยีน *TcTreh-2* เพิ่มสูงมากที่สุด (รูปที่ 21)

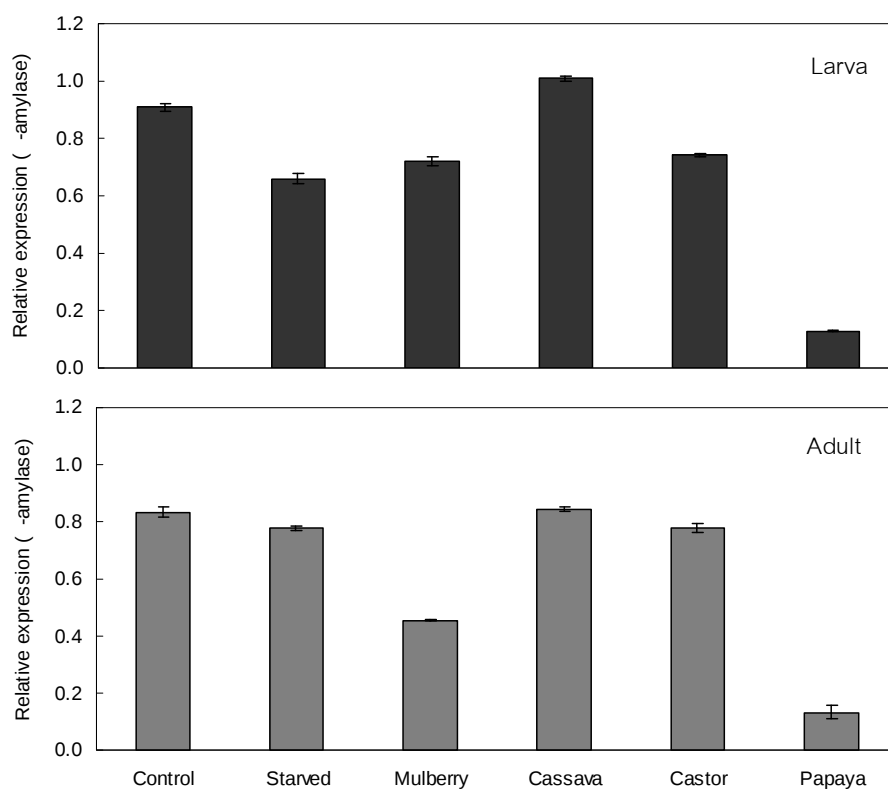


รูปที่ 21 การแสดงออกของยีน *TcTreh-2* ของมอดแบ่งตั้งแต่ระยะไข่ ตัวหนอน ก่อนดักแด้ ดักแด้และตัวเต็มวัย

2.7.4 การแสดงออกของยีน *Tc α -amylase* ของมอดแบ่งเมื่อได้รับสารสกัด

เมื่อทดลองให้สารสกัดแก่ตัวหนอนระยะสุดท้ายพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบหม่อน ใบละหู่ และใบมะละกามีการแสดงออกของยีน *Tc α -amylase* ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมโดยมีค่า relative expression เฉลี่ย 0.721, 0.741 และ 0.129 ตามลำดับ (รูปที่ 22)

การทดสอบการแสดงออกของยีน *Tc α -amylase* เมื่อตัวเต็มวัยได้รับสารสกัดพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบหม่อนและใบมะละกามีการแสดงออกของยีนลดลงกว่ากลุ่มอื่นๆ ส่วนกลุ่มที่ได้รับการอดอาหาร กลุ่มที่ได้รับใบมะละกอ และใบละหู่มีค่าการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 22)

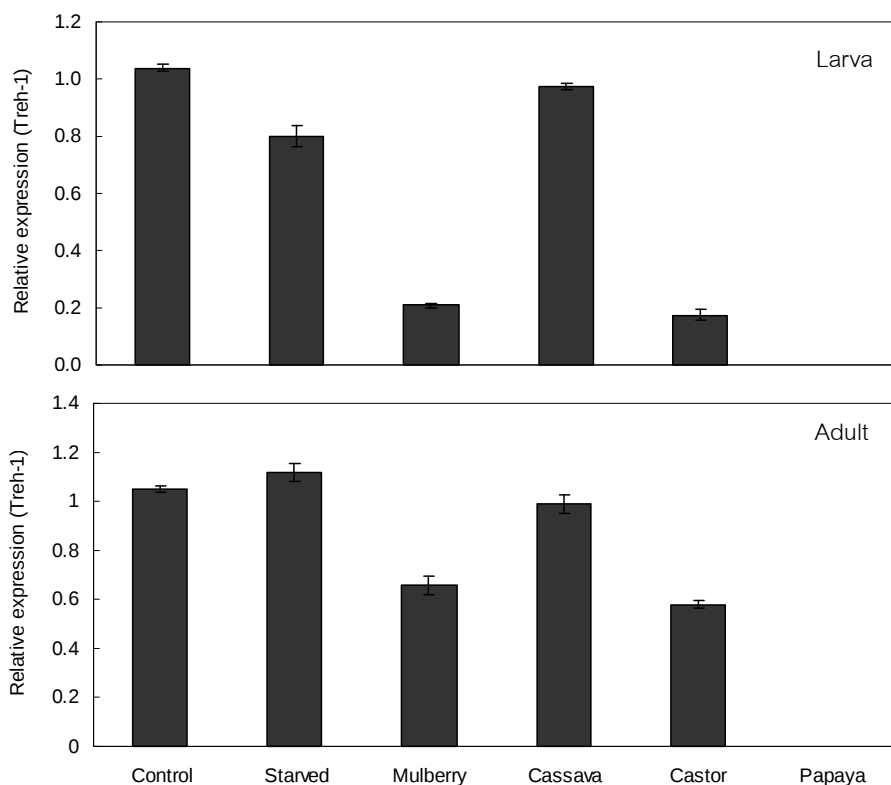


รูปที่ 22 การแสดงออกของยีน *Tc α -amylase* ของมอดแบ่งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากใบพืช 4 ชนิด และเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการอดอาหาร

2.7.5 การแสดงออกของยีน *TcTrehalase-1* ของมอดแบ่งเมื่อได้รับสารสกัด

เมื่อทดลองให้สารสกัดแก่ตัวหนอนระยะสุดท้ายพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบหม่อนและใบละหู่ มีการแสดงออกของยีน *TcTrehalase-1* ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการอดอาหาร โดยมีค่า relative expression เฉลี่ย 0.209, 0.176, 1.083 และ 0.800 ตามลำดับ (รูปที่ 23) และที่น่าสนใจคือกลุ่มที่ได้รับสารจากใบมะละกอไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกของยีน *TcTrehalase-1* ได้

การทดสอบการแสดงออกของยีน *TcTrehalase-1* เมื่อตัวเต็มวัยได้รับสารสกัดพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบหม่อนและใบละหู่มีการแสดงออกของยีนลดลงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการอดอาหาร โดยมีค่า relative expression เฉลี่ย 0.657, 0.578, 1.05 และ 1.118 ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดจากใบมะละกอส่งผลให้ไม่สามารถตรวจวัดการทำงานของยีน *TcTrehalase-1* ได้ ส่วนกลุ่มที่ได้รับใบมันสำปะหลังมีค่าการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 23)

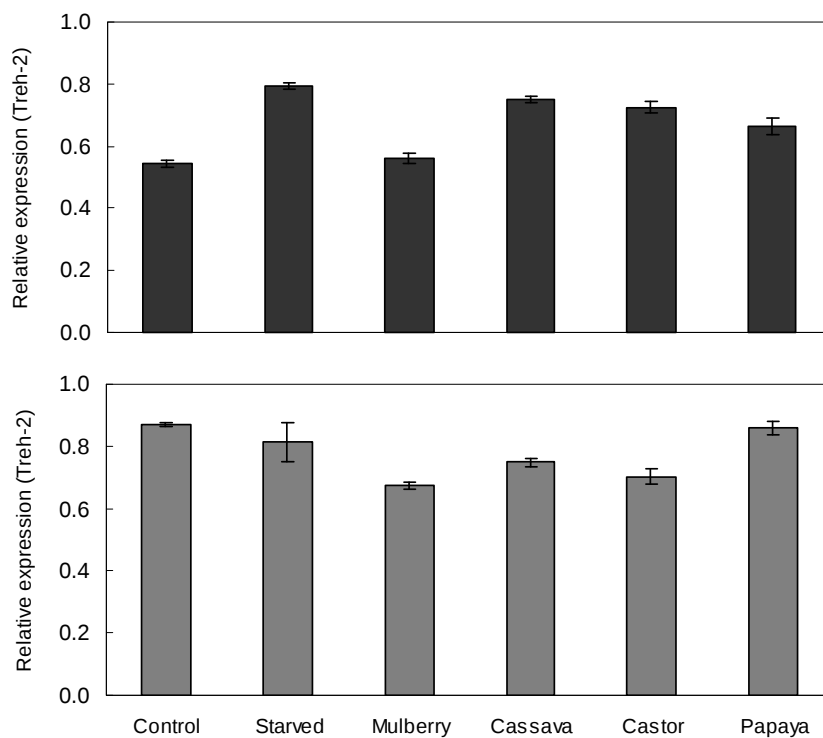


รูปที่ 23 การแสดงออกของยีน *Trehalase-1* ของมอดแบ่งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากใบพืช 4 ชนิด และเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการอดอาหาร

2.7.6 การแสดงออกของยีน *TcTrehalase-2* ของมอดแบ่งเมื่อได้รับสารสกัด

จากการทดลองให้สารสกัดแก่ตัวหนอนและตัวเต็มวัยแล้วติดตามการแสดงออกของยีน

TcTrehalase-2 พบว่าสารสกัดชนิดต่างๆ มีส่งผลต่อการแสดงออกของยีน โดยมีค่า relative expression เฉลี่ย 0.67-0.87 ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 การแสดงออกของยีน *TcTrehalase-2* ของมอดแบ่งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยหลังจากได้รับสารสกัดจากใบพืช 4 ชนิด และเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการอดอาหาร

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากใบพืชต่อมอดแป้ง

สารจากใบพืชทั้ง 4 ชนิดไม่ส่งผลต่อน้ำหนักตัวของมอดแป้ง แต่พบว่าใบมันสำปะหลังและใบละหุ่งส่งผลต่ออัตราการตายของมอดแป้งโดยส่งผลให้มีอัตราการตายมากถึง 35% ซึ่งถือว่าในใบละหุ่งและมันสำปะหลังมีสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลง จากรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบละหุ่งมีผลให้เกิดการตายของตัวอ่อนยุงชนิด *Anopheles arabiensis* และ *Culex quinquefasciatus* และยังส่งผลยับยั้งการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย (adult emergence inhibition) และรบกวนอัตราการวางไข่ของยุงทั้งสองชนิด (Elimam et al., 2009) การทดลองในด้วงถั่ว *Callosobruchus chinensis* พบว่าสารสกัดจากใบละหุ่งมีผลทำให้เกิดการตายของตัวอ่อน ยับยั้งการฟักออกจากไข่ และรบกวนการวางไข่ (Upasani et al., 2003)

การศึกษาระยะเวลาในการเจริญพัฒนาของมอดแป้ง พบว่าทั้งใบมันสำปะหลัง ใบหม่อน ใบละหุ่งและใบมะละกอมีสสารที่ออกฤทธิ์รบกวนต่อการเจริญของมอดแป้งโดยพบวาระยะเวลาในการเป็นตัวหนอนและระยะเวลาในการเป็นดักแด้มีเวลายาวนานกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งมีรายงานในพืชหลายชนิดที่พบว่าส่งผลต่อระยะเวลาในการเจริญพัฒนาของแมลงเช่น ในปี 2006 Senthil ทำการศึกษาและรายงานว่สารสกัดจากต้น *Adhatoda vasica* ทำให้ระยะเวลาในการเป็นดักแด้ของ *Spodoptera littoralis* ยาวนานขึ้นมากกว่าปกติ และนอกจากนี้การให้สารสกัดจากต้น *Pelagonium citrosa* มีผลทำให้ตัวอ่อนของยุงชนิด *Anopheles stephensis* ใช้เวลาในการเจริญนานขึ้น (Jeyabalam et al., 2003) การทดลองในมอดแป้งโดย Jbilou et al., 2008 พบวาระยะเวลาในการเป็นตัวหนอนจะยาวนานขึ้นมากกว่าปกติเมื่อตัวหนอนได้รับสารสกัดจากพืชชนิด *Peganum harmala*, *Ajuga iva*, *Raphanus raphanistrum* และ *Launaea arborescens* นอกจากจะส่งผลต่อระยะเวลาของการเป็นตัวหนอนและระยะเวลาการเป็นดักแด้แล้วใบพืชทั้ง 4 ชนิดยังมีผลทำให้อัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีรายงานที่ให้ผลในรูปแบบใกล้เคียงกันคือ สารสกัดจากพืช *Pteridium aquilinum* และ *Centaurium erythraea* ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศโมร็อกโก ส่งผลให้มอดแป้งมีอัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยลดลงกว่ากลุ่มควบคุม (Jbilou et al., 2008)

มอดแป้งที่ได้รับสารสกัดจากใบมันสำปะหลัง ใบละหุ่ง และใบหม่อนมีผลทำให้การผลิตประชากรรุ่น F1 ลดต่ำลงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้จากใบพืชทั้ง 3 ชนิดอาจมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ vitellogenin การสร้างไข่ รบกวนการวางไข่ และมีผลฆ่าตัวอ่อนที่ฟักจากไข่ที่อยู่ในอาหารที่ผสมกับใบพืชบดละเอียด ซึ่งสอดคล้องกับผลการรายงานว่สารสกัดจากใบละหุ่งมีผลยับยั้งการฟักออกจากไข่และทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนของด้วงถั่วเหลือง (Upasani et al., 2003) รายงานการวิจัยในมอดแป้งโดยใช้มอดใบพืชชนิด *P. harmala* พบว่ามีผลยับยั้งอัตราการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยของมอดแป้งได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตประชากรรุ่น F1 จะถูกยับยั้งด้วย

nutmeg oil และสารจาก *Elettaria cardamomum* ที่ถูกผสมกับอาหาร (Huang et al., 1997, 2000) และในปี 2005 Athanassiou et al. รายงานว่าสาร azadirachtin มีผลลดอัตราการผลิตประชากรรุ่นลูก ในมอดแป้ง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำมันใบหม่อนมีผลยับยั้งการเจริญของตัวอ่อน หนอนไหมอิตาลี (*Samia ricini*) และ หนอนคืบกะหล่ำ (*Mamestra brassicae*) (Konno et al., 2005)

2. ผลของสารสกัดจากใบพืชต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

จากผลการทดลองแบบ in vitro พบว่า methanol extract ของใบพืชทั้ง 4 ชนิดคือ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหลอดทดลองได้ โดยมีผลยับยั้งตั้งแต่ 45-88% การติดตามการเปลี่ยนแปลงการทำงานของแอลฟาอะไมเลสในมอดแป้งพบว่า ระยะตัวเต็มวัยเป็นระยะที่มีการทำงานสูงสุดรองลงมาก็คือระยะตัวหนอน ส่วนในระยะดักแด้นั้นพบการทำงานในระดับต่ำ ซึ่งมีความสอดคล้องกับศึกษาในมอดแป้งชนิด *Tribolium confusum* ที่พบว่าการทำงานของแอลฟาอะไมเลสมีค่าสูงมากตั้งแต่ตัวหนอนอินสตาร์ที่ 1 จนถึงอินสตาร์สุดท้าย (Bandani and Balvasi, 2006) เช่นเดียวกับการรายงานในแมลงชนิด *Eurygaster integriceps* ที่พบว่ามีการทำงานของแอลฟาอะไมเลสตั้งแต่ตัวหนอนอินสตาร์ที่ 1 และสูงสุดในอินสตาร์ที่ 5 (Hosseinkhani et al., 2005) ทั้งนี้เนื่องจากแอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์หลักที่จำเป็นต่อการไฮโดรไลซ์อาหารประเภทแป้งเพื่อให้ได้เป็นพลังงานต่อการเจริญและพัฒนา จึงทำให้ตัวหนอนของมอดแป้งเริ่มมีแอลฟาอะไมเลสในระดับสูงตั้งแต่ในระยะต้น และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ (prepupa) ตัวหนอนจะลดการเคลื่อนไหวและงดกินอาหาร จากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ ซึ่งในขณะเดียวกันการทำงานของแอลฟาอะไมเลสก็ลดต่ำลงเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไม่มีความจำเป็นต้องใช้แอลฟาอะไมเลสเพื่อไฮโดรไลซ์อาหาร และพบว่ามอดแป้งจะเริ่มใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ในระดับสูงอีกครั้งเมื่อมีการลอกคราบออกเป็นตัวเต็มวัย และตัวเต็มวัยดังกล่าวเริ่มมีพฤติกรรมการกินอาหาร การทดลองให้สาร methanol extract จากพืชทั้ง 4 ชนิด พบว่าใบหม่อน ใบมันสำปะหลัง ใบละหุ่ง และใบมะละกามีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของมอดแป้งทั้งในระยะตัวหนอนและระยะตัวเต็มวัย จากรายงานการวิจัยในปี 2007 พบว่าในยางของใบหม่อน (*Morus* sp.) มีสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อหนอนไหมอิตาลี (*Samia ricini*) และ หนอนคืบกะหล่ำ (*M. brassicae*) โดยพบว่าสารดังกล่าวมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolase ได้แก่ sucrase, maltase และ trehalase (Hirayama et al., 2007) การลดลงของการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยสารสกัดที่ได้จากพืชนั้นอาจเนื่องมาจากพืชผลิตสารดังกล่าวไว้เพื่อป้องกันตัวเองซึ่งรวมถึงสารที่มีฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ hydrolase ในทางเดินอาหารของแมลงยกตัวอย่างเช่นแอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์โปรตีนเนส (Franco et al., 2002) โมเลกุลที่พบในพืชหลายชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในหลอดทดลองได้ (Chen et al., 1992) เช่นเดียวกับสามารถ

ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารประเภทอื่นๆ ในทางเดินอาหารของแมลง (Jing et al., 2005) นอกจากนี้การวิจัยในด้วงเจาะเมล็ดกาแฟ (*Hypothenemus hampei*) พบว่าในถั่ว common bean (*Phaseolus vulgaris*) และพืชสกุล *Amaranthus* มีตัวยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลส (α -amylase inhibitor) และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของด้วงเจาะเมล็ดกาแฟได้สูงสุดประมาณ 80% นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งแอลฟาอะไมเลสของด้วงชนิด *Callosobruchus chinensis* (Valencia et al., 2000) และในปี 2007 มีรายงานการวิจัยพบว่าในเมล็ดมะละกอ (*C. papaya*) มีสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลส (α -amylase inhibitor) ของด้วงชนิด *C. maculatus* และส่งผลให้เกิดการตายของตัวอ่อนประมาณ 50% นอกจากนี้ยังทำให้ด้วงชนิดดังกล่าวลดอายุขัยของตัวเต็มวัยและความสามารถในการวางไข่ (Farias et al., 2007) การลดลงของการทำงานของเอนไซม์อาจเกิดเนื่องมาจากความเป็นพิษของสารสกัดที่มีต่อ epithelial cell ของทางเดินอาหารของแมลงที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งมีรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดจากพืชชนิด *P. harmala* มีผลต่อการจัดเรียงตัวที่ผิดปกติของ epithelial cell ในทางเดินอาหารของมอดแป้งหลังจากที่แมลงกินสารสกัดดังกล่าว

3. ผลของสารสกัดจากใบพืชต่อการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส

การติดตามการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสทั้ง soluble trehalase และ membrane-bound trehalase พบว่าในระยะไข่อายุ 1-3 วันไม่มีการทำงานของ soluble trehalase แต่สามารถตรวจพบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ membrane-bound trehalase ในระยะไข่ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะตัวหนอนมีการทำงานของทั้ง 2 ฟอรั่ม โดย soluble trehalase มีการทำงานสูงกว่า membrane-bound trehalase ประมาณ 4 เท่าอย่างต่อเนื่องตลอดระยะตัวหนอน จากนั้นการทำงานของทั้ง 2 ฟอรั่มจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเข้าสู่ระยะ prepupa และระยะดักแด้ เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย soluble trehalase เพิ่มขึ้นสูงกว่า membrane-bound trehalase ประมาณ 5 เท่า รูปแบบการเปลี่ยนแปลงการทำงานของทรีฮาเลสในมอดแป้งมีความสอดคล้องกับรูปแบบที่พบในแมลงชนิดอื่นๆ ที่ได้มีการศึกษาวิจัยมาก่อนหน้านี้ เช่น ในหนอนไหม (*B. mori*) พบการทำงานของ membrane-bound trehalase เท่านั้นในระยะไข่ และ soluble trehalase เป็นเอนไซม์ที่พบได้มากตลอดระยะการเจริญของหนอนไหม นอกจากนี้การศึกษาในหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis*) การเปลี่ยนแปลงการทำงานของทรีฮาเลสมีรูปแบบคล้ายคลึงกับผลของมอดแป้งในการวิจัยครั้งนี้ (Mitsumasu et al., 2005; Tatum et al., 2008) ซึ่งในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากตัวหนอนเป็นดักแด้หรือจากดักแด้เป็นตัวเต็มวัยนั้นมีความเป็นไปได้ว่า soluble trehalase เป็นเอนไซม์ที่เข้ามามีบทบาทสำคัญ แต่ในขณะที่มีการพัฒนาของเอมบริโอในระยะไข่นั้นเอนไซม์ membrane-bound trehalase เป็นเอนไซม์

ที่น่าจะมีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทรีฮาโลสให้เป็นกลูโคสเพื่อใช้เป็นพลังงานและการสร้างสารประเภท macromolecule เพื่อการพัฒนาของแมลง (Becker et al., 1996)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของทรีฮาเลสในหลอดทดลองพบว่ามีเพียงสารสกัดจากใบหม่อน (methanol extract) เท่านั้นที่มีผลลดการทำงานของเอนไซม์ได้ประมาณ 75.2% เมื่อทำการทดลองให้สารสกัดทั้ง 4 ชนิดแก่มอดแบ่งในระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย พบว่าการทำงานของเอนไซม์ soluble trehalase ลดลงเมื่อแมลงกินสารสกัด (methanol extract) จากใบหม่อน ใบมันสำปะหลัง ใบละหุ่ง และใบมะละกอ โดยพบว่าการทำงานของเอนไซม์ในระยะตัวหนอนถูกรบกวนจากสารสกัดให้มีการทำงานลดลงมากกว่าในระยะตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ในระยะตัวหนอนมีความไวต่อการถูกยับยั้งมากกว่ามอดแบ่งระยะตัวเต็มวัย ส่วนการทำงานของ membrane-bound trehalase ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลดลงเมื่อได้รับสารสกัด จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากใบหม่อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของทรีฮาเลสทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* เนื่องจากมีรายงานว่ามีสารจากใบหม่อน (*Morus* spp.) มีสารประเภท sugar-mimic alkaloids เช่น 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-AB1) และ 1-deoxynojirimycin (DNJ) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสที่สกัดจากกล้ามเนื้อ ต่อมสร้างใหม่ เนื้อเยื่อไขมัน และทางเดินอาหารในหนอนไหมอริ (*S. ricini*) และทางเดินอาหารของหนอนเยื่อไผ่ (*O. fuscidentalis*) (Hirayama et al., 2007; Tatum et al., 2009) และยังพบว่า sugar mimic alkaloids ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ sucrase ในทางเดินอาหารของหนอนไหมอริได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสาร sugar mimic alkaloids ในพืชชนิด *Omphalea diandra* และส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม disaccharidase ในหนอนกระทุง *Spodoptera littoralis* (Kite et al., 1997)

4. ผลของสารสกัดจากใบพืชต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลในมอดแบ่ง

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลทรีฮาโลสในมอดแบ่งเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.5-2.0 mM โดยในช่วงกลางของระยะตัวหนอนจะมีระดับน้ำตาลทรีฮาโลสสูงที่สุด แล้วลดต่ำลงเมื่ออยู่ในช่วงก่อนเข้าดักแด้ (prepupa) และระยะดักแด้ จากนั้นระดับทรีฮาโลสเพิ่มขึ้นสูงเมื่ออยู่ในระยะตัวเต็มวัย การรายงานในหนอนไหม (*B. mori*) ความเข้มข้นของทรีฮาโลสมีค่าสูงเฉลี่ย 10.6 mM ในระยะตัวหนอนอินสตาร์ที่ 5 แล้วลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ wandering stage แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้และตัวเต็มวัยตามลำดับ การลดลงของทรีฮาโลสในระยะ wandering stage นั้นอาจเป็นเพราะเอนไซม์ trehalose synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์ทรีฮาโลสมีการทำงานลดลงเมื่อหนอนไหมเข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้ (Oda et al., 2000) และต่อมามีการศึกษาเพิ่มเติมในแมลงชนิดต่างๆ พบว่าการลดลงของน้ำตาลทรีฮาโลสนั้นมีสาเหตุจากการที่เอนไซม์ทรีฮาเลสมีการทำงานเพิ่มสูงขึ้นเมื่อแมลงมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ ทั้งนี้การเพิ่มขึ้น

ของการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอคไดโซน (20-hydroxyecdysone; 20E) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทต่อแมลงในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Tatun et al., 2008) การลดลงของระดับน้ำตาลทรีฮาโลสนั้น อาจเนื่องมาจากการไฮโดรไลซิสให้เป็นกลูโคสเพื่อเป็นพลังงานในการลอกคราบและการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยในช่วงต้นของระยะตัวหนอนของมอดแบ่งมีน้ำตาลกลูโคสในร่างกายสูงจากนั้นลดลงในช่วงกลางแล้วเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งในตอนท้ายของระยะตัวหนอน จากนั้นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย (รูปที่ 16B)

เมื่อให้สารสกัดจากใบพืชพบว่าน้ำตาลกลูโคสของมอดแบ่งลดลงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ลดลงเนื่องจากถูกยับยั้งหรือรบกวนโดยตัวยับยั้งที่อยู่ในสารสกัดที่ได้จากใบพืชทั้ง 4 ชนิด ในแมลงที่มีแหล่งอาหารหลักเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น แบ่ง นั้นพบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็น digestive enzyme ที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างพลังงาน แต่จากการวัดความเข้มข้นของทรีฮาโลสนั้นพบว่าระดับของน้ำตาลไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับสารสกัดถึงแม้ว่าเอนไซม์ทรีฮาเลสจะถูกยับยั้งการทำงานก็ตาม ซึ่งตรงกันข้ามกับรายงานในหนอนไหม และหนอนไหมอิตาลีที่มีระดับทรีฮาโลสเพิ่มขึ้นประมาณ 2-3 เท่า เมื่อได้รับสารประเภท sugar-mimic alkaloid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส (Hirayama et al., 2007) และการให้สาร validoxylamine A ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อเอนไซม์ทรีฮาเลส (specific trehalase inhibitor) มีผลเพิ่มปริมาณทรีฮาโลสในฮีโมลิฟของตั๊กแตน (*Locusta migratoria*) แมลงวัน (*Musca domestica*) แมลงสาบ (*Periplaneta americana*) ให้สูงขึ้นถึง 100-200% (Kono et al., 1994) ทั้งนี้ความเข้มข้นของทรีฮาโลสของมอดแบ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับสารสกัดจากพืชอาจเนื่องมาจากแมลงมีการพร่องน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทรีฮาโลส (Becker et al., 1996)

5. ผลของสารสกัดจากใบพืชต่อการทำงานของยีน *Tc α -amylase* และ *TcTrehalases*

รูปแบบการแสดงออกของยีน α -amylase ในแต่ละระยะการเจริญของมอดแบ่งพบว่าตัวหนอนมีการแสดงออกของยีน (relative expression) สูงต่อเนื่องตลอดระยะการเป็นตัวหนอนซึ่งมีความสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สูงอย่างต่อเนื่องในระยะตัวหนอน และไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนในระยะ prepupa ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัยที่เพิ่งฟักออกจากไข่วันแรก แต่การแสดงออกของยีนจะเพิ่มขึ้นสูงเท่ากับระยะตัวอ่อนเมื่อตัวเต็มวัยอายุ 5 วัน เมื่อได้รับสารสกัดจากพืชพบว่าสารจากใบหม่อนและใบมะละกอนั้นที่ส่งผลลดการแสดงออกของยีน α -amylase ทั้งในระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในมอดแบ่งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบหม่อนและมะละกอนั้นเกิดจากการถูกยับยั้งในระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์

การทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้าง soluble trehalase ในมอดแบ่งคือ *TcTrehalase-1* มีการแสดงออกสูงในตอนต้นของระยะตัวหนอนและเพิ่มสูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะตัวหนอนอินสตาร์สุดท้าย แล้วลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะ prepupa ระยะดักแด้ และเพิ่มขึ้นสูงเมื่อเปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีน *TcTrehalase-1* มีความสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ soluble trehalase ในระยะการเจริญต่างๆ ของมอดแบ่งอย่างชัดเจน นอกจากนี้ไม่พบว่ามีแสดงออกของยีน *TcTrehalase-1* ในระยะไข่ซึ่งเป็นระยะที่ไม่สามารถตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ soluble trehalase แต่เป็นที่น่าสนใจว่าในระยะนี้มีการแสดงออกของยีน *TcTrehalase-2* สูงมากและลดลงเล็กน้อยในระยะตัวหนอนตอนต้น และเพิ่มสูงเมื่อเปลี่ยนเป็นตัวหนอนอินสตาร์สุดท้าย จากนั้นลดลงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ระยะ prepupa เพิ่มเล็กน้อยเมื่อเป็นดักแด้อายุน้อยและลดลงเมื่อดักแด้มีอายุมากขึ้น การแสดงออกของ *TcTrehalase-2* จะเพิ่มมากขึ้นอีกครั้งเมื่อเปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งการแสดงออกของยีนมีความสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ membrane-bound trehalase จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ membrane-bound trehalase มีความสำคัญต่อการพัฒนาของมอดแบ่งในระยะไข่เนื่องจากสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนและการทำงานของเอนไซม์ใน ขณะที่ผลการวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบการทำงานของ soluble trehalase ได้ในระยะไข่ ซึ่งมีรายงานการทดลองในหนอนไหมว่าในระยะไข่ไม่มีการแสดงออกของ soluble trehalase แต่มีการแสดงออกของ membrane-bound trehalase สูงกว่าประมาณ 1,000 เท่า แสดงว่าการทำงานของเอนไซม์ที่รหัสในรูป membrane-bound trehalase มีความสำคัญต่อการพัฒนาของไข่ในหนอนไหมโดยการไฮโดรไลซ์ทรีฮาโลสให้เปลี่ยนเป็นกลโคส (Kamei et al., 2010) เมื่อให้สารสกัดจากพืชแก้มอดแบ่งพบว่าสารจากใบโบทม่อนและใบละหุ่งส่งผลให้ *TcTrehalase-1* มีการแสดงออกลดลงกว่ากลุ่มควบคุม และที่สำคัญไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ *TcTrehalase-1* ในแมลงที่ได้รับสารสกัดใบมะละกอซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ soluble trehalase ที่ถูกยับยั้งโดยสารจากพืชทั้ง 3 ชนิดคือ โบทม่อน ละหุ่ง และมะละกอ แสดงให้เห็นว่าสารในใบพืชดังกล่าวสามารถยับยั้งหรือรบกวนการทำงานของทรีฮาเลสได้ตั้งแต่ระดับยีนจนถึงระดับโปรตีน แต่ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าการแสดงออกของ *TcTrehalase-2* ไม่ถูกรบกวนเมื่อได้รับสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมีผลการทดลองในทำนองเดียวกันนี้เกิดขึ้นในหนอนเยื่อไม้ที่ได้รับฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (juvenile hormone analogue; JHA) และเอคไดโชน (20-hydroxyecdysone; 20E) นั้นไม่มีผลเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีน *OfTreh-2* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ membrane-bound trehalase (Tatun et al., 2008) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ถือเป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากพืชที่สร้างน้ำยางที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในมอดแบ่ง

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. การศึกษาผลของสารสกัดจากพืชต่อการทำงานของ digestive enzyme อื่นๆ ในทางเดินอาหาร เช่น protease และ sucrase เป็นต้น
2. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชต่อ epithelial cell ของทางเดินอาหารในมอดแป้ง
3. หาวิธีการในการยับยั้งการแสดงออกของยีน α -amylase และ Trehalase เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมมอดแป้ง โดยใช้ร่วมกับ bioinsectide อื่นๆ เพื่อแก้ปัญหาการต้านทานของมอดแป้ง
4. แยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase และ Trehalase

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนวิจัยจาก สกว.

1. การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Tatun Nujira, Tungjitwitayakul Jatuporn and Vajarasathira Boongeau. 2011. Effects of latex-producing plants extracts on the changes in carbohydrate metabolizing enzymes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. The International Conference on Biopesticides VI. Imperial Mae-Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand, 11-16 December, 2011.

เอกสารอ้างอิง

- Athanassiou, C.G., Kontodimas, D.C., Kavallieratos, N.G. and Veroniki, M.A. 2005. Insecticidal effect of NeenAzal against three stored-product beetle species on rye and oats. *Journal of Economic Entomology* 98, 1733-1738.
- Bandani, A.R. and Balvasi, A. 2006. Comparison of alpha-amylase activity in larval stages of flour beetles, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 71, 537-541.
- Becker, A., Schloder, P., Steele, J.E. and Wegener, G. 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52, 433-439.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. and Stork, H. 1974. D-glucose determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 1196-1201.
- Candy, D.J. and Kilby, B.A. 1962. Studies on chitin synthesis in the desert locust. *Journal of Experimental Biology* 39, 129-140.
- Clegg, J.S. and Evans, D.R. 1961. The physiology of blood trehalose and its function during flight in the blowfly. *Journal of Experimental Biology* 38, 771-792.
- Chen, M.S., Feng, G., Zen, K.C., Richardson, M., Valdes-Rodriguez, S., Reeck, G.R. and Kramer, K.J. 1992. α -amylases from three species of stored grain coleopteran and their inhibition by wheat and corn proteinaceous inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22, 261-268.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- Cristofaletti, P.T., Ribeiro, A.F. and Terra, W.R. 2001. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology* 47, 143-155.

- Farias, L.R., Costa, F.T., Souza, L.A., Pelegrini, P.B., Grossi-deSa, M.F., Neto, S.M., Franco, O.L. 2007. Isolation of a novel *Carica papaya* α -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87, 255-260.
- Feng, G.H., Richardson, M., Chen, M.S., Kramer, K.J., Morgan, T.D. and Reeck, G.R. 1996. α -amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 419–426.
- Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R. and Grossi-de-Sa, M.F. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylase, Structure, function and potential for crop protection. *European Journal Biochemistry* 269, 397–412.
- Friedman, S., 1975. Multiple forms of trehalase in *Phormia regina*. Partial purification, tissue specificities, and some kinetic properties of adult enzymes. *Insect Biochemistry* 5, 151–164.
- Haq, T., Usamani, N.F. and Abbas, T. 2005. Screening of plant leaves as grain protectants against *Tribolium castaneum* during storage. *Pakistan Journal of Botany* 37, 149-153.
- Hirashima, A., Ishaaya, I., Ueno, R., Oyama, K. and Eto, M. 1989. Effect of salithion enantiomers on the trehalase system and on the digestive protease, amylase and invertase of *Tribolium castaneum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 34, 205-210.
- Hirayama, C., Konno, K., Wasano, N. and Nakamura, M. 2007. Differential effects of sugar-mimic alkaloids in mulberry latex on sugar metabolism and disaccharidase of Eri and domesticated silkworms: Enzymatic adaptation of *Bombyx mori* to mulberry defense. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37(12), 1348-1358.
- Jbilou, R., Amri, H., Bouayad, N., Ghailani, N., Ennabili, A. and Sayah, F. 2008. Insecticidal effects of extracts of seven plants species on larval development, alpha-amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). *Bioresource and Techonlogy* 99(5), 959-564.

- Jeyabalan, D., Arul, N. and Thangamathi, P. 2003. Studies on effects of *Pelargonium citrosa* leaf extract on malarial vector, *Anopheles stephensi*. Bioresource Technology 89, 185-189.
- Jing, L., Fang, Y., Ying, X., Wenxing, H., Meng, X., Syed, M., Syed, N. and Fang, C., 2005. Toxic impact of ingested Jatropherol-I on selected enzymatic activities and the ultrastructure of midgut cells in silkworm, *Bombyx mori* L. Journal of Applied Entomology 129, 98–104.
- Kite, G.C., Scofield, A.M., Lees, D.C., Hughes, M. and Smith, N.G., 1997. Alkaloidal glycosidase inhibitors and digestive glycosidase inhibition in specialist and generalist herbivores of *Omphalea diandra*. Journal of Chemical Ecology 23, 119–135.
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y. and Hattori, M. 2004. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine protease in latex. The plant Journal 37, 370-378.
- Kono, Y., Takahashi, M., Matsushita, K., Nishina, M., Kameda, Y. and Hori, E. 1994. Inhibition of flight in *Periplaneta americana*(Linn) by a trehalase inhibitor, Validoxylamine A. Journal of Insect Physiology 40, 455–461.
- Mitsumasu, K., Azuma, M., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. 2005. Membrane penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori* molecular cloning and localization in larval midgut. Insect Molecular Biology 14, 501–508.
- Mulungu, L.S., Lupenza, G., Reuben, S.O.W.M. and Misangu, RN. 2007. Evaluation of botanical products as stored product grain protectant against Maize weevil, *Sitophilus zeamays* (L.) on maize. Journal of Entomology 4, 258-262.
- Oda, Y., Iwami, M., Osani, M. and Sakurai, S. 1997. Dynamics of haemolymph sorbitol-6-phosphate and its control by ecdysteroid in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 27, 461–468.
- Pytelkova, J., Hubert, J., Lepsik, M., Sobotnik, J., Sindelka, R., Kirizkova, I., Horn, M. and Mares, M. 2009. Digestive α -amylase of the flour moth *Ephestia kuehniella*-adaptation to alkaline environment and plant inhibitors. FEBS 276, 3531-3546.

- Rharrabe, K., Amri, H., Bouyad, N. and Sayah, F. 2008. Effects of azadirachtin on post development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Products Research 44, 290-294.
- Rice, M.J. 1993 Built in resistance protection (BIRP). Pest control and sustainable agriculture. CSIRO, Australia, pp. 161-163.
- Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Phytopathology 28, 425-449.
- Senthil, N.S. 2006. Effect of Melia azedarach on nutritional physiology and enzyme activity of the rice leaf folder *Cnaphalocrosis medinalis* (Guenee) (Lepidoptera: Pyralidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 84, 98-108.
- Shakoori, A.R., Fayyaz, M. and Saleem, M.A. 1988. Biochemical changes induced by fenpropathrin in the sixth instar larvae of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Stored Product Research 24, 215-220.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi-de-Saá, M.F., Lopes, A.R. and Pontes, E.G. 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29, 355-366.
- Subramanyam, B. and Hagstrum, D.W. 1995. Resistance measurement and management. In: Subramanyam, B, Hagstrum, D.W. (Eds.), Integrated management of insects in stored products. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 331-339.
- Taguchi, M., Niimi, T., Su, Z.H. and Yaginuma, T. 1992. Trehalase from male accessory gland of an insect, *Tenebrio molitor*. cDNA sequencing and developmental profile of the gene expression. The Biochemical Journal 288, 19-22.
- Tang, B., Chen, X., Liu, Y., Tian, H., Liu, J., Hu, J., Xu, W. and Zhang, W. 2008. Characterization and expression patterns of membrane-bound trehalase of *Spodoptera exigua*. BMC Molecular Biology. 9:51
<http://www.biomedcentral.com/1471-2199/9/51>
- Tatun, N., Singtripop, T., Tungjitwitayakul, J. and Sakurai, S. 2008. Regulation of soluble and membrane-bound trehalase activity and expression of the enzyme in the larval midgut of the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 38, 788-795

- Tatun, N., Singtripop, T., Nachiangmai, S., Osugi, S., Iwami, M. and Sakurai, S. 2009. Possible involvement of proteinaceous and non-proteinaceous trehalase inhibitors in regulation of hemolymph trehalose concentration in *Bombyx mori*. *Journal of Applied Entomology and Zoology*, 44(1), 85-94.
- Terra, W.R. and Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109B, 1-62.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Jordão, B.P. and Dillon, R.J. 1996. Digestive enzymes. In: Lehane, M.J., Billingsley, P.F. (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, London, pp. 153-194.
- Thompson, S.N. 2003. Trehalose-the insect 'blood' sugar. *Advanced Insect Physiol.* 31, 203-285.
- Tribolium Genome Sequencing Consortium. 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452, 949-955.
- Upasani, S.M., Kotkar, H.M., Mendki, P.S. and Maheshwari, V.L. 2003. Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L. foliage flavonoids. *Pest Management Science* 59, 1349-1354.
- Valencia, A., Bustillo, A.E., Ossa, G.E. and Chrispeels, M. 2000. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 207-213.
- Watanabe, M., Kikawada, T. and Okuda, T. 2003. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. *Journal of Experimental Biology* 206, 2281-2286
- Wyatt, G.R. 1967. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. In: Beament, J.W.L., Trehence, J.E., Wigglesworth, V.B. (Eds.), *Advances in Insect Physiology*, vol. 4. Academic Press, London, pp. 287-360.
- Yaginuma, T. and Happ, G.M. 1989. 20-Hydroxyecdysone acts in the male pupa to commit accessory glands toward trehalase production in the adult mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *General and Comparative Endocrinology* 73, 173-185.