ผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* A. Juss. ต่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียของปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn.

นางสาวจิรารัช ศรีจันทร์งาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-398-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19002966

SUBCHRONIC EFFECTS OF NEEM *Azadirachta indica* A. Juss. SEED EXTRACT ON FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* Linn.

Miss Jirarach Srijunngam

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology
Department of Biology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-332-398-8

Thesis Title	SUBCHRONIC EFFECTS OF NEEM *Azadirachta indica* A. Juss. SEED EXTRACT ON FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* Linn.
By	Miss Jirarach Srijunngam
Department	Biology
Thesis Advisor	Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITTEE

Chairman
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

Thesis Advisor
(Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.)

Member
(Professor Pensri Tangkanasing, Ph.D.)

Member
(Assistant Professor Patchanee Singh-asa, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จิรารัช ศรีจันทร์งาม : ผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* A. Juss. ต่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียของปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn. (SUBCHRONIC EFFECTS OF NEEM *Azadirachta indica* A. Juss. SEED EXTRACT ON FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* Linn.) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ ; 125 หน้า. ISBN 974-332-398-8.

สารสกัดจากสะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* A. Juss. ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในพื้นที่เกษตรกรรมในประเทศไทย เคยมีรายงานว่าผลิตภัณฑ์จากสะเดาสามารถยับยั้งการเจริญพันธุ์ของแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้ จากการที่ยาฆ่าแมลงจากสะเดาสามารถออกฤทธิ์ได้กว้างและมีผลต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งที่เป็นกลุ่มเป้าหมายและสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย จึงควรมีการพิจารณาถึงผลของสารสกัดจากสะเดาต่อระบบสืบพันธุ์ของปลาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกึ่งเรื้อรังของ Neemix® ซึ่งเป็นสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียที่มีต่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียของปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn.

ทำการศึกษาโดยใช้ปลานิลอายุ 1 เดือนที่เลี้ยงด้วยระบบ static renewal system ตลอดระยะเวลาการศึกษา หาค่ามัธยฐานความเป็นพิษเฉียบพลันที่ 96 ชั่วโมง โดยวิธี acute static toxicity ได้ค่าความเข้มข้นที่ 36.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากค่าดังกล่าวนำมาคำนวนหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดในการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังได้เท่ากับ 25.07 มิลลิกรัมต่อลิตร นำปลานิลมาเลี้ยงในสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 7 เดือน สุ่มจับปลาเพศเมียจำนวน 20 ตัว ทุกเดือน ตั้งแต่เดือนที่ 4 ถึงเดือนที่ 7 ของการทดลอง เก็บตัวอย่างรังไข่ ชั่งน้ำหนักและนำไปเก็บรักษาสภาพเพื่อนับจำนวนเซลล์ไข่และใช้ในการศึกษามิญชวิทยาของเนื้อเยื่อรังไข่

จากผลการศึกษาสามารถจำแนกเซลล์ไข่ปลานิลได้เป็น 3 ขนาด และ 5 ระยะการเจริญ คือ ขนาดเล็ก ได้แก่ chromatin nucleolar stage และ perinucleolar stage, ขนาดกลางได้แก่ yolk vesicle (cortical alveolar) stage และ vitellogenic stage และขนาดใหญ่ ได้แก่ ripe stage ลักษณะของฟอลลิเคิลภายหลังการตกไข่ (corpora lutea) สังเกตพบได้ตั้งแต่เดือนที่ 5 เป็นต้นไป การศึกษาภาวะการเจริญพันธุ์ของปลานิล (fecundity) จากค่า GSI และจำนวนเซลล์ไข่ในทุกเดือนของการทดลอง พบว่าค่า GSI มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในปลากลุ่มทดลองเดือนที่ 6 จำนวนเซลล์ไข่ต่อรังไข่ 1 ข้าง ของปลานิลกลุ่มทดลองต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในเดือนที่ 4 และ 7 จากการเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์ไข่ขนาดใหญ่ (ripe oocyte) พบว่าปลากลุ่มทดลองมีจำนวนเซลล์ไข่ชนิดนี้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในทุกเดือนที่ศึกษา นอกจากนี้การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อรังไข่ในปลากลุ่มทดลองยังแสดงให้เห็นว่ามีการลดจำนวนลงของ mature oocyte การลดการสะสมไข่แดงทั้งในและนอกเซลล์ไข่ รวมทั้งการลดการสะสมของเนื้อเยื่อไขมัน หลักฐานทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลากลุ่มทดลองจากการศึกษาเซลล์ไข่ในรังไข่ พบเซลล์ไข่ติดสีเบสมากผิดปกติร่วมกับการหดย่นของขอบไซโตพลาสซึมและการเลื่อมสภาพของเซลล์ฟอลลิเคิล ลักษณะดังกล่าวพบทั้งในระยะ chromatin nucleolar stage, perinucleolar stage และ yolk vesicle stage นอกจากนี้ลักษณะเซลล์ไข่ในปลากลุ่มทดลองทุกระยะยังมีรูปร่างผิดปกติ พบช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่างฟอลลิเคิล และแสดงอาการอักเสบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่แทรกระหว่างฟอลลิเคิลและผนังรังไข่ จากหลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสะเดามีผลกระทบต่อกระบวนการเจริญของรังไข่และการวางไข่ของปลานิลอย่างชัดเจน

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จิรารัช ศรีจันทร์งาม

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Kingkaew Wattanasirmkit

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

3970302723 : MAJOR ZOOLOGY
KEY WORD: *Azadirachta indica* / *Oreochromis niloticus* / SUBCHRONIC EFFECTS / FECUNDITY / HISTOLOGICAL CHANGES

JIRARACH SRIJUNNGAM : SUBCHRONIC EFFECTS OF NEEM *Azadirachta indica* A. Juss. SEED EXTRACT ON FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* Linn. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KINGKAEW WATTANASIRMKIT, Ph.D. 125 pp. ISBN 974-332-398-8.

Biopesticides deriving from neem, *Azadirachta indica* A. Juss., have been widely used in various agricultural areas in Thailand. Neem products have been reported to have antifertility properties in insects and mammals. Due to its wide-range in mode of action on many target and non-target species, the adverse effects on reproductive system of economic fish species were considered. Objective of this study was to investigate subchronic effects of Neemix®, a neem seed extract on female reproductive system of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn.

Nile tilapias at the age of 1 month were kept in a static renewal system throughout the study. The acute static toxicity bioassay was carried out to determine the LC_{50} of the extract after 96 hours. It was determined at 36.25 mg/l and from this value, a sublethal concentration of subchronic toxicity test was calculated at 25.07 mg/l. The tilapias were treated with this concentration for 7 months. The female were randomly selected (n=20) in every month from the 4th to 7th month of the experiment. The fish were sacrificed, ovaries were weighted, fixed and taken for oocyte counting and for conventional histological method.

The oocytes in ovary of the tilapia were classified into 3 size groups and 5 stages of development including the small size, *chromatin nucleolar stage* and *perinucleolar stage*; the medium size, *yolk vesicle* (*cortical alveolar*) *stage* and *vitellogenic stage*; and the large size, *ripe stage*. Postovulatory follicle, *corpora lutea* was also detected after the 5th month. Effects on fecundity were indicated by the lower GSI and oocyte number in the treated fish from every months of experiment. Significant difference ($p \leq 0.05$) of GSI was detected on the 6th month. The total number of oocytes in the ovary of the treated fish were significantly different ($p \leq 0.05$) from the controls on the 4th and 7th month. Reproductive failure in the fish exposed to the neem seed extract was obviously seen when the number of ripe oocyte were compared. There were significant differences ($p \leq 0.05$) in all experimental period. Histological changes in ovarian tissue of the treated fish were observed including the decrease in number of mature oocyte, yolk deposition both intraoocytic and extraoocytic area and adipose tissues. Histopathological events observed on oocyte in ovary of the treated fish were hyperbasophilic of the oocyte with shrunken cytoplasmic borders and degeneration of follicular cells in the chromatin nucleolar, perinucleolar stage and yolk vesicle stage. Oocytes in all stages of the treated fish were seen abnormal in shape. Large, empty interfollicular spaces were presented and inflammation in interstitial tissues and ovarian capsule were also noted as histopathological lesions. These events indicate that the disturbance in the process of ovarian development and spawning of the neem treated fish is occurred.

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต Jirarach Srijunngam

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Kingkaew Wattanasirmkit

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Acknowledgements

I wish to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Kingkeaw Wattanasirmkit for her precious suggestions, guidances, patiences and encouragements throughout the study.

I wish to express my grateful thank to Professor Dr. Siriwat Wongsiri, chairman of thesis committee for his valuable advice. I also would like to express my appreciation to Professor Dr. Pensri Tangkanasing and Assistant Professor Dr. Patchanee Singh-asa, thesis committee members for their invaluable suggestions and guidances.

I am grateful to Assistant Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt, for his kind suggestions and encouragements.

I am very much indebted to Ajarn Noppadon Kitana for his kind guidances and valuable helping in many ways. I also would like to thank Ajarn Wichase Khonsue and Ajarn Jirawan Apiraksakorn for their encouragements.

I truly thank many helping hands throughout my study including Miss Siriraks Arrathrakorn, Miss Bangon Tangtong, Mr. Thongchai Ngamprasirtwong, Miss Chantima Piyapong, Miss Duangjai Ngamsom, Mr. Adul Choungnoi, Miss Pimphan Saiphet, Mr. Pramong Begthaisong and other students in the Department of Biology, Chulalongkorn University. Special thanks are due to Miss Supapan Tearpiriyakij, my friend, for her helping hands and encouragements from a distance.

I wish to thank the Department of Biology, Chulalongkorn University for facilities. I also would like to acknowledge a scholarship awarded by the University Development Committee (UDC), Ministry of University Affairs.

Finally, I would like to delicate all the best of my thesis to my father, my mother, my teachers and everyone in my family for their love, patiences and understanding during my study.

Contents

	Page
Thai abstract	iv
English Abstract	v
Acknowledgement	vi
Contents	vii
List of Tables	viii
List of Figures	ix
Chapter 1: Introduction	1
Chapter 2: Literature Review	5
Chapter 3: Materials and Methods	19
Chapter 4: Results and Discussion	28
Chapter 5: Conclusions and Recommendations	53
References	56
Appendix I : Chemical reagents and instruments	67
Appendix II : Acute toxicity test data	70
Appendix III : GSI and egg counts data	79
Biography	125

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

Page

Table 3-1 Percent of mean mortality of *O. niloticus* at various neem seed extract concentrations in range-finding test..... 21

Table 3-2 Percent of mean mortality of *O. niloticus* at various neem seed extract concentrations in definitive test..... 22

Table 3-3 Neem seed extract median lethal concentration (LC_{50}) and 95% confidence intervals (in ppm) for *O. nilloticus*..... 23

Table 4-1 Mean body weight, ovaries weight and GSI for female *O.niloticus* of control and neem treated group in different experimental period. All values are shown in mean±SE..... 29

Table 4-2 Mean number of large, intermediate and small oocytes of Nile tilapia of control and treated group in different experimental periods. All values are shown in mean±SE..... 35

Table 4-3 Histological events in Nile tilapia ovarian tissues of each experimental group indicated as different levels of severity..... 42

Table 4-4 Histological alterations of Nile tilapia oocyte in the ovary of each experimental group indicated as different levels of severity..... 44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

		Page
Figure 2-1	The neem tree, *Azadirachta indica* A. Juss.....	6
Figure 2-2	Structural formula of azadirachtin, an active constituent of neem seed extract	7
Figure 3-1	Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn. at the age of 1 month and 6 months.....	19
Figure 3-2	Neemix®, an alcoholic *A. indica* seed extract from commercial source.....	20
Figure 4-1	Percentage of mortality of Nile tilapia *O. niloticus* after different exposure time of acute toxicity test.....	28
Figure 4-2	Mean (±SE) body weight of control and treated Nile tilapia after subchronic exposure to neem seed extract.....	30
Figure 4-3	Mean (±SE) gonadosomatic indices (GSI) of control and treated tilapia after subchronic exposure to neem seed extract.....	31
Figure 4-4	Mean (±2SE) horizontal diameter of Nile tilapia oocytes in each size group.....	32
Figure 4-5	A. Macroscopic appearance of the oocytes during counting process. B. Stereomicroscopic appearances of the large, intermediate and small oocyte.....	33
Figure 4-6	Mean (±SE) total number of oocytes in control and treated tilapia of each experimental period.....	34
Figure 4-7	Mean (±SE) number of the large oocytes in control and treated tilapia of each experimental period.....	34
Figure 4-8	Photomicrograph of *O. niloticus* ovaries of control group showing oocytes in different stages of development.....	46
Figure 4-9	Photomicrograph of *O. niloticus* ovaries showing postovulatory structure and ovarian interstitial tissues.....	47

List of Figures (cont.)

Page

Figure 4-10 Photomicrograph of *O. niloticus* ovaries at 4 months of experimental period..... 48

Figure 4-11 Photomicrograph of *O. niloticus* ovaries at 4 months of experimental period showing inflammation of the ovaries..... 49

Figure 4-12 Photomicrograph of *O. niloticus* ovaries at 5 months of experimental period..... 50

Figure 4-13 Photomicrograph of *O. niloticus* ovaries at 6 months of experimental period..... 51

Figure 4-14 Photomicrograph of *O. niloticus* ovaries at 7 months of experimental period..... 52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย