

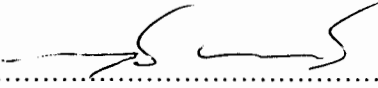
ผลของสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) ต่อสรีรวิทยาการงอก
ของเมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) และกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl
var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee)

ยูวะธิดา กิ่งทอง

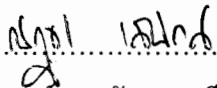
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤศจิกายน 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

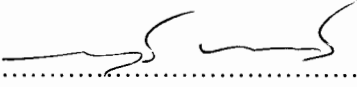
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ยุวธิดา กิ่งทอง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

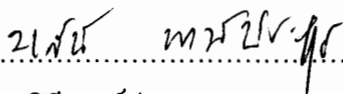
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

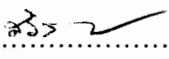

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

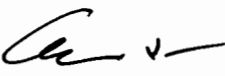

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐภา เสณีวาส)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ)


.....กรรมการ
(ดร.วาสนี พงษ์ประยูร)


.....กรรมการ
(ดร.สกล ชันโรจน์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา


.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 20...เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ณัฐา เสนีवास ที่ได้เสียสละเวลาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ ดร.วาสนี พงษ์ประยูร และ ดร.สลิขันธ์ โรจน์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร.วิสาครี คงเจริญสุนทร คณะกรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานข้อบกพร่อง จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาและให้ความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ ผู้บริหาร คณะครู ตลอดจนนักเรียน โรงเรียนวังน้ำเย็นวิทยาคม จังหวัดสระแก้ว ที่ได้สนับสนุนการทำวิจัยตลอดมา

เนื่องจากการวิจัยนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อต๋อง คุณแม่ปราณี กิ่งทอง และทุกคนในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูคุณเวทิตาแด่ บุปผารีย์ บุรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

ยุวะธิดา กิ่งทอง

55990034: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)

คำสำคัญ: อัลลีโลพาธี/ ผักแครด/ สรรีวิทยาการงอก

ยูวะธิดา กิ่งทอง: ผลของสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.)

Gaertn.) ต่อสรรีวิทยาการงอกของเมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) และกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl

var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) (EFFECT OF ALLELOPATHIC FROM *Synedrella*

nodiflora (L.) Gaertn. ON SEED GERMINATION PHYSIOLOGY OF *Oryza sativa* L. AND

Brassica chinensis Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) คณะกรรมการควบคุม

วิทยานิพนธ์: ภาควิชา วิทยาศาสตร์, Ph.D. 119 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

ศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) ด้วย

เอทานอล 95% ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว (*Oryza sativa* L.) และกวางตุ้ง (*Brassica*

chinensis Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) พบว่า สารสกัดจากใบผักแครดสามารถ

ยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและกวางตุ้งได้ โดยการยับยั้งมากขึ้นเมื่อความ

เข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ด

ข้าวและกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มีค่า 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำ

สารสกัดที่ IC_{50} ไปหาค่า osmotic potential (Ψ_s) พบว่ามีค่าเท่ากับ -0.19 และ -0.08 MPa ตามลำดับ

จากนั้นทำการศึกษาผลของ Ψ_s ของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวและกวางตุ้ง

โดยเปรียบเทียบกับสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับ

สารสกัด พบว่าที่ Ψ_s ดังกล่าวของสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด

ไม่มีผลยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้ง ในขณะที่เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีการงอกและการ

เจริญเติบโตลดลง จึงสรุปได้ว่า Ψ_s ของสารสกัดไม่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้ง

เมื่อทดสอบการดูดน้ำของเมล็ด พบว่า สารสกัดไม่มีผลยับยั้งการดูดน้ำของเมล็ด และเมื่อนำเมล็ด

ข้าวและกวางตุ้งที่แช่ในสารสกัดเป็นเวลา 7 วัน มาตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ แป้ง และ โปรตีน

ในเมล็ด พบว่า ในเมล็ดข้าวมีปริมาณน้ำตาล และ โปรตีนต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่ปริมาณแป้งสูง

กว่าชุดควบคุม ส่วนในเมล็ดกวางตุ้ง มีปริมาณน้ำตาลต่ำกว่าชุดควบคุม ปริมาณแป้ง และ โปรตีนสูง

กว่าชุดควบคุม และจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดข้าวและกวางตุ้ง พบว่า

เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดมีกิจกรรมต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่เมล็ดกวางตุ้งมีกิจกรรมไม่แตกต่าง

จากชุดควบคุม

55990034: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M. Sc. (BIOLOGY EDUCATION)

KEYWORDS: ALLELOPATHY/ *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn / SEED GERMINATION
PHYSIOLOGY

YUWATIDA KINGTHONG: EFFECT OF ALLELOPATHIC FROM *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. ON SEED GERMINATION PHYSIOLOGY OF *Oryza sativa* L. AND *Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee. ADVISORY COMMITTEE: PHAKPOOM PHRAPRASERT, Ph.D. 119 P. 2017.

The effect of 95% ethanolic leaf-extract from *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. on germination and growth of rice and pak-choi plants were examined. The results demonstrated the inhibition effect of extract to the germination of plants. The higher extract concentration showed the higher seed-germination inhibition. The inhibition concentration at 50% seed germination (IC_{50}) was determined and IC_{50} were 15.16 and 2.96 mg/ml, respectively. The extract at the IC_{50} was used to determine the osmotic potential which were -0.19 and -0.08 MPa, respectively. After that the effect of osmotic potential on the germination and growth of plants was determined by comparing to the sucrose, sodium chloride and potassium nitrate at the same Ψ_s as the extract. The result showed that sucrose, sodium chloride and potassium nitrate did not inhibit seeds germination while the extract showed the inhibition effect. This revealed that the osmotic potential at -0.19 and -0.08 MPa did not effect on rice and pak-choi seed germination. Water absorption of seeds was also determined and showed that extract did not inhibit water absorption. The reducing sugar, starch and protein content in 7 days treated rice and pak-choi seeds were examined. Extract treated rice seeds showed lower reducing sugar and protein, higher starch than in control. Extract treated pak-choi seeds showed lower reducing sugar, higher starch and protein than in control. The activity of α -amylase in treated rice seeds showed lower activity than in control. Extract treated pak-choi seeds showed α -amylase activity non-significant difference in control.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ปรากฏการณ์อัลลีโลพาธี (allelopathy).....	5
การงอกของเมล็ด (seed germination).....	6
ผลของสารอัลลีโลพาธีต่อพืช.....	8
การปลดปล่อยสารอัลลีโลพาธีจากพืช.....	10
การประยุกต์ใช้สารอัลลีโลพาธีในระบบการจัดการวัชพืช.....	10
พลังงานอิสระของน้ำ (water potential, Ψ).....	11
พืชที่ใช้ในการสกัดสาร.....	12
การสกัดสาร และสารสกัดที่ได้.....	13
พืชที่ใช้ทดสอบ.....	14
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
พืชทดลอง.....	16
เมล็ดพืชที่ใช้ทดสอบ.....	16

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	18
วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
ตอนที่ 1 ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการงอก และการเจริญเติบโตของพืช.....	18
ตอนที่ 2 ผลของ osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัดต่อการงอก และการเจริญเติบโตของพืช.....	21
ตอนที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ด....	23
การดูดน้ำของเมล็ด(water absorption).....	23
การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar).....	23
การหาปริมาณแป้ง (starch content).....	25
การหาปริมาณ โปรตีน (protein content).....	25
กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase.....	26
4 ผลการวิจัย.....	28
ตอนที่ 1 ผลของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช.....	28
ตอนที่ 2 ผลของ osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัดต่อการงอก และการเจริญเติบโตของพืช.....	33
ตอนที่ 3 ผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ด.....	36
การดูดน้ำของเมล็ด (water absorption).....	36
การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar).....	38
การหาปริมาณแป้ง (starch content).....	40
การหาปริมาณ โปรตีน (protein content).....	42
กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase.....	43
5 อภิปรายและสรุปผล.....	46
อภิปรายผล.....	46
สรุปผลการวิจัย.....	51
ข้อเสนอแนะ.....	52
บรรณานุกรม.....	53

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	60
ภาคผนวก ก.....	61
ภาคผนวก ข.....	89
ภาคผนวก ค.....	92
ภาคผนวก ง.....	96
ภาคผนวก จ.....	101
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	119

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ก-1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของข้าว (<i>Oryza sativa</i> L.) ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน.....	62
ก-2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของกวางตุ้ง (<i>Brassica chinensis</i> Jusl var <i>parachinensis</i> (Bailey) Tsen & Lee) ที่ได้รับสารสกัดจากใบ ผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน.....	66
ก-3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความยาวรากและความยาวยอดของข้าวที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน.....	71
ก-4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความยาวรากและความยาวยอดของกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน.....	71
ก-5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของข้าวที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน	74
ก-6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน.....	75
ก-7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม.....	76
ก-8	เปอร์เซ็นต์การงอกของกวางตุ้งที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม.....	77

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
<p>ก-9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความยาวรากและความยาวยอดของข้าวและกวางตุ้ง ที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) และสารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม.....</p>	78
<p>ก-10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการคุดน้ำของเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่.....</p>	81
<p>ก-11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการคุดน้ำของเมล็ดกวางตุ้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 24 สารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 24.....</p>	83
<p>ก-12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แป้ง โปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ในเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....</p>	86
<p>ก-13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แป้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ในเมล็ดกวางตุ้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....</p>	87
<p>ก-14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบปริมาณ โปรตีนในเมล็ดกวางตุ้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเมล็ดแห้ง เป็นเวลา 7 วัน โดยมีเมล็ดที่แช่ในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม</p>	88

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ผักแครด (<i>Synedrella nodiflora</i> (L.) Gaertn.).....	13
3-1 การจัดอุปกรณ์เพื่อหาค่า osmotic potential ของสารละลาย.....	22
3-2 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเมื่อได้รับอุณหภูมิทำงานเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็ง แสดงให้เห็นการลดลงของอุณหภูมิของสารละลายจนถึงอุณหภูมิต่ำสุด (degree of supercooling) ก่อนที่สารละลายจะคายพลังงานออกพร้อมกับมีอุณหภูมิสูงขึ้นและคงที่ (apparent freezing point) และเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็ง.....	22
4-1 เปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.....	29
4-2 เปอร์เซ็นต์การงอกของกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5 และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.....	30
4-3 ความยาวรากและความยาวยอดของข้าวที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5, และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน.....	31
4-4 ความยาวรากและความยาวยอดของกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5, และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็นเวลา 7 วัน.....	32
4-5 น้ำหนักแห้งของเมล็ดข้าว และ กวางตุ้ง ที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....	33
4-6 เปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด.....	34
4-7 เปอร์เซ็นต์การงอกของกวางตุ้งที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด.....	34
4-8 ความยาวรากและความยาวยอดของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด.....	35
4-9 ความยาวรากและความยาวยอดของกวางตุ้งที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด.....	35

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.10 การดูดน้ำของเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด.....	37
4.11 การดูดน้ำของเมล็ดควางตุ้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด.....	38
4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....	39
4.13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดควางตุ้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....	40
4.14 ปริมาณแป้งในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....	41
4.15 ปริมาณแป้งในเมล็ดควางตุ้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....	41
4.16 ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....	42
4.17 ปริมาณโปรตีนในเมล็ดควางตุ้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน และในเมล็ดแห้ง.....	43
4.18 กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....	44
4.19 กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดควางตุ้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน.....	45
ค-1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (sucrose) กับ Ψ_s ของสารละลาย.....	93
ค-2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) กับ Ψ_s ของสารละลาย.....	93
ค-3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไนเตรด (KNO ₃) กับ Ψ_s ของสารละลาย.....	94

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ค-4 กราฟมาตรฐานกลูโคส.....	94
ค-5 กราฟมาตรฐานแป้ง.....	95
ค-6 กราฟมาตรฐานโปรตีน.....	95
ง-1 เมล็ดข้าว (<i>Oryza sativa</i> L.) ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน.....	97
ง-2 เมล็ดกวางตุ้ง (<i>Brassica chinensis</i> Jusl var <i>parachinensis</i> (Bailey) ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน.....	98
ง-3 เมล็ดข้าว (<i>Oryza sativa</i> L.) เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.19 MPa) โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม.....	99
ง-4 เมล็ดกวางตุ้ง (<i>Brassica chinensis</i> Jusl var <i>parachinensis</i> (Bailey) ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC ₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.08 MPa) โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม.....	100

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อัลลีโลพาธี (allelopathy) เป็นปรากฏการณ์ที่พืชหรือจุลินทรีย์ปลดปล่อยสารชีวเคมี ออกสู่สิ่งแวดล้อม และสารดังกล่าวไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอื่น (Rice, 1984) ปรากฏการณ์นี้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ภายหลังจากการสังเกตว่าบริเวณที่ต้นแบลควอลนัท (black walnut; *Juglans nigra*) ปกคลุมนั้นจะไม่พบการเจริญของพืชอื่น ซึ่งเป็นผลมาจากสาร Juglone ที่สะสมอยู่ในใบของแบลควอลนัท เมื่อใบร่วงหล่นแล้วถูกย่อยสลายจะทำให้สารดังกล่าว สะสมในดิน และไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชอื่น (Rietveld, 1983) ต่อมามีการศึกษา ปรากฏการณ์อัลลีโลพาธีในพืชชนิดอื่น และพบว่าพืชหลากหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการงอก และการเจริญเติบโตของพืชอื่นได้ เช่น สาบหมา (*Eupatorium adenophorum* Spreng.) (ศิริพร ชิงสนธิพร และช่อม เปรมชัยเกียรติ, 2537) ประยงค์ (*Aglaia odorata* Lour.) (บุญรอด ชาตียนนท์, 2544) ดาวเรือง (*Tagetes minuta*) (Kil, Shim, & Lee, 2002) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus citriodora*) (Batish, Setia, Singh, & Kohli, 2004) บอระเพ็ด (*Tinospora tuberculata*) (Aslani et al., 2016) และพืชสกุล *Acacia* (*Acacia cyclops*, *A. mollissima* และ *A. cyanophylla*) (Jelassi et al., 2016) เป็นต้น ซึ่งนำไปสู่การศึกษาพัฒนาสารกำจัดวัชพืชจากธรรมชาติทดแทน การใช้สารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากสารเคมีสังเคราะห์จะสะสมในดินส่งผลให้ดินเสื่อมสภาพ ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม รวมทั้งอาจปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตร และส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Tesio, Weston, & Ferrero, 2011; Aslani et al., 2016)

สารอัลลีโลพาธี (allelopathic substance) มีผลกระทบต่อพืชโดยไปรบกวนกระบวนการ ทางสรีรวิทยาของพืช เช่น สารสกัดจากใบช่อ (*Gmelina arborea*) มีผลให้ปริมาณโปรตีนในเมล็ด ถั่วดำ (*Vigna mungo*) และถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ลดลง (Shankar, Girish, Karthik, Rajendran, & Mahendran, 2009) สาร 6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA) ซึ่งเป็นสารอัลลีโลพาธีที่พบใน รัญพืช (Yenish, 1995) สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) โดยไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase (Kato-Noguchi & Macias, 2005) สารสกัดจากใบยูคาลิปตัส (*Eucalyptus citriodora*) มีผลทำให้อัตราการหายใจของพืชปลูกและ วัชพืชทดสอบลดลง (Batish et al., 2004) และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดกาแฟ (*Coffea arabica*) มีผล ให้ดัชนีการแบ่งเซลล์ของต้นกล้าผักกาดหอม (*L. sativa* L. cv. Grand Rapids) ผักกาดขาว (*Brassica*

chinensis var. *Parachinensis* (Sinskaja) และ หญ้าก้นจ้ำขาว (*Bidens pilosa* L.) ลดลง (Silva, Brigatti, Santos, Mecina, & Silva, 2013) เป็นต้น

การศึกษาเกี่ยวกับปรากฏการณ์อัลลีโลพาธี มักศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการงอกของเมล็ด (Djurdjevic et al., 2004; Ladhari et al., 2013; Taban & Saharkhiz, 2015) เนื่องจากการงอกและการเจริญของต้นกล้าในระยะแรกเป็นช่วงเวลาที่สำคัญที่สามารถบ่งชี้ว่าพืชจะเจริญเติบโตไปเป็นต้นพืชที่ปกติได้ (Murtaza & Asghar, 2012) ซึ่งกระบวนการที่สำคัญในการงอกของเมล็ด ได้แก่ การดูดน้ำของเมล็ด การสังเคราะห์โปรตีน การย่อยสลายอาหารสะสม และการนำสารอาหารที่ได้ไปใช้ในการเจริญเติบโตระหว่างการงอก (สมบุญ เตะชะกัญญาวัฒน์, 2548; Bewley, 2001) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ด คือ osmotic potential (Ψ_s) ซึ่งสารสกัดมีสารต่าง ๆ ถูกสกัดละลายออกมาในสารละลายจึงทำให้ Ψ_s ของสารสกัดลดลง และอาจมีผลให้เมล็ดไม่งอก ดังนั้นจึงมีการทดสอบผลของ Ψ_s ต่อการงอกของเมล็ด เพื่อยืนยันว่าการที่เมล็ดได้รับสารสกัดแล้วไม่งอกนั้นเป็นผลมาจาก Ψ_s หรือสารอัลลีโลพาธี

เมื่อเมล็ดพืชได้รับน้ำ จะไปกระตุ้นเอนไซม์เพื่อย่อยสลายอาหารสะสมในเมล็ด เพื่อให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ อาหารสะสมที่พบในเมล็ดพืช ได้แก่ แป้ง โปรตีน และไขมัน ซึ่งจะพบในปริมาณที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช แป้งเป็นอาหารสะสมที่พบในพืชทั่วไป และเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งในระหว่างการงอกของเมล็ด คือ เอนไซม์ α -amylase ซึ่งจะเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (Bewley, 2001; Kato-Noguchi & Macias, 2005; Murtaza & Asghar, 2012)

มีรายงานการศึกษาถึงผลของสารสกัดจากใบผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้อัตราการงอกและการเจริญเติบโตของพืชลดลง (ภาคภูมิ พระประเสริฐ และวรัญญา นามนาเมือง, 2548) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชที่ได้รับสารสกัดดังกล่าว งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงผลของสารสกัดจากใบผักแครดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อการงอก การเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาการงอกของเมล็ด ได้แก่ การดูดน้ำของเมล็ด ปริมาณแป้ง น้ำตาล และโปรตีน รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยอาหารสะสมจำพวกแป้งในเมล็ด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมกำจัดวัชพืชจากธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในทางการเกษตรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครดต่อเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญเติบโตของพืช
2. เพื่อศึกษาผลของสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครดต่อสรีรวิทยาการงอกบางประการของเมล็ด

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักแครดมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญเติบโตของพืช
2. สารสกัดจากใบผักแครดมีผลทำให้สรีรวิทยาการงอกบางประการ ได้แก่ การดูดน้ำของเมล็ด ปริมาณแป้ง น้ำตาล โปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ระหว่างการงอกเปลี่ยนแปลงไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทำให้ทราบถึงผลของสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครดต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมกำจัดวัชพืชจากธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในทางการเกษตร

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแครดที่เก็บจากอำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

1. ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการงอก ความยาวยอด ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของข้าว (*Oryza sativa* L.) และกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee)
2. ศึกษาค่า osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช
3. ศึกษาผลของสารสกัดต่อสรีรวิทยาบางประการ ได้แก่ การดูดน้ำของเมล็ด ปริมาณแป้ง น้ำตาล โปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ระหว่างการงอกของเมล็ด

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. การงอกของเมล็ด หมายถึง เมล็ดที่มีรากเจริญออกมาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร
2. IC_{50} หมายถึง ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของพืชทดสอบได้ 50 เปอร์เซ็นต์
3. การเจริญเติบโตของพืช หมายถึง การเพิ่มความยาวยอด และความยาวรากของพืช

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปรากฏการณ์อัลลีโลพาธี (allelopathy)

อัลลีโลพาธี (allelopathy) เป็นปรากฏการณ์ที่พืชรวมทั้งจุลินทรีย์มีการปลดปล่อยสารชีวเคมีออกสู่สิ่งแวดล้อม และสารนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งอาจส่งผลในด้านการกระตุ้นหรือในด้านการยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งผลกระทบดังกล่าวอาจมีความรุนแรงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารชีวเคมีที่ถูกปลดปล่อยออกมา สารดังกล่าวเรียกว่า สารอัลลีโลพาธี (allelopathic substance) (Rice, 1984; Putnam, 1998)

มีการศึกษาเกี่ยวกับปรากฏการณ์อัลลีโลพาธีกันอย่างแพร่หลาย เพื่อหาสารกำจัดวัชพืชธรรมชาติจากพืชทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในทางการเกษตร โดยมีรายงานว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น สารสกัดจากใบกระถิน (*Prosopis juliflora*) สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าแพรก (*Cynodon dactylon*) (Al-Humaid & Warrag, 1998) สารสกัดจากกระเทียมป่า (wild garlic; *Allium ursinum* L.) สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.), ผักโขม (*Amaranthus caudatus*) และ ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) (Djurdjevic et al., 2004) สารสกัดจากพืชปลูกบางชนิด ได้แก่ ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) และข้าว (*Oryza sativa* L.) มีผลให้เปอร์เซ็นต์การงอก และความยาวรากของ Parthenium weed (*Parthenium hysterophorus* L.) ลดลง (Javaid, Shafique, Bajwa, & Shafique, 2006) สารสกัดจาก *Cleome arabica* L. ซึ่งเป็นพืชที่พบบ่อยในทวีปแอฟริกาเหนือ สามารถยับยั้งการงอกของผักกาดหอม (*L. sativa*) ผักกาดหัว (*Raphanus sativus*) Peganum (*Peganum harmala*) และ Milk Thistle (*Silybum marianum*) โดยการงอกของเมล็ดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (Ladhari et al., 2013) สารสกัดจากใบกัญชา (*Cannabis sativa* L.) สามารถยับยั้งการงอกของข้าวไรน์ (*Secale cereale* L.) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* L.) ได้ โดยการงอกของเมล็ดจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (Pudelko, Majchrzak, & Narozna, 2014) สารสกัดจากพืชสกุล *Satureja* (*Satureja khuzestanica*, *S. rechingeri* และ *S. bachtiarica*) สามารถยับยั้งการงอกของเทียนแดง (*Lepidium sativum* L.) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* M.) และข้าวไรน์ (*S. cereale* L.) ได้ โดยการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (Taban & Saharkhiz, 2015) สารสกัดจากอ้อเล็ก (*Phragmites australis*) สามารถยับยั้งการงอก ความยาวยอด และความยาวรากของผักกาดหอม (*L. sativa*) *Melaleuca ericifolia* และ

Poa labillardierei ใต้ (Uddin, Robinson, Buultjens, Al Harun, & Shampa, 2017) รวมทั้งในประเทศไทยได้ศึกษาปรากฏการณ์อัลลีโลพาธีในพืชหลายชนิด เช่น สารสกัดด้วยน้ำจากใบมะฮอกกานี (*Swietenia macrophylla* King) สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ 8 ชนิด คือ ผักกาดขาว (*Raphanus sativus* var.) กวางตุ้ง (*Brassica campestris* var. *chinensis*) ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (*Oryza sativa* L.) ข้าวฟ่าง (*S. bicolor* L.) ค้อยคิ่ง (*Ruellia tuberosa* L.) หญ้ารังนก (*Chloris barbata* Sw.) และหญ้าจรจบดอกเหลือง (*Pennisetum setosum* L.) ใต้ (ปฏิมา หวานแก้ว, 2545) สารสกัดด้วยน้ำจากดาวเรืองสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl var. *parachinensis* (Bailey) และหญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) ใต้ (ภัทริน วิจิตรตระการ, มณฑินี ธีรารักษ์, พชณี เจริญยิ่ง และจัญญู เล้าสินวัฒนา, 2555) และสารสกัดจากผักเสี้ยนดอกม่วง (*Cleome rutidosperma* DC.) ที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* Beauv.) และผักโขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) ใต้ (สุขุมลย์ เลิศมงคล, 2558)

การศึกษาเกี่ยวกับปรากฏการณ์ อัลลีโลพาธี มักศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการงอกของเมล็ด โดยพบว่า สารสกัดจากพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการงอกของเมล็ดพืชต่างกัน โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ต่างกัน สารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำ จะมีความสามารถในการยับยั้งการงอกสูง และฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืชทดสอบด้วย (Marinov-Serafimov, 2010; Palacios et al., 2010; Golubina & Ilieva, 2014)

2.2 การงอกของเมล็ด (seed germination)

การงอกของเมล็ด (seed germination) หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของพืช โดยเริ่มจากการที่รากอ่อน (radicle) เจริญพ่นเปลือกหุ้มเมล็ดออกมาในสภาพที่เมล็ดได้รับความชื้นที่พอเหมาะ พร้อมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางเคมีเกิดขึ้น ดังนี้

1. การดูดน้ำ (water absorption) เป็นขั้นตอนแรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการงอกของเมล็ด เมื่อเมล็ดดูดน้ำจะทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนตัวลง เมล็ดจะพองตัวขยายขนาด และมีน้ำหนักเพิ่ม มีผลทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดแตก ซึ่งจะให้น้ำและออกซิเจนผ่านเข้าไปในเมล็ด ได้มากขึ้น กระตุ้นปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ ภายในเมล็ด ทำให้อัตราการหายใจเพิ่มสูงขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ด คือ osmotic potential (Ψ_s) ของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้นจะทำให้ Ψ_s ของสารละลายลดลง และมีผลให้การดูดน้ำของเมล็ดลดลง นอกจากนี้การดูดน้ำ

ของเมล็ดยังขึ้นอยู่กับความหนาของเปลือก สารที่เคลือบอยู่ที่ผิวเปลือก อุณหภูมิ และการสุกแก่ของเมล็ดที่ต่างกัน การดูดน้ำของเมล็ดแบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ดูดซับน้ำด้วยวิธี imbibition ซึ่งเป็นกระบวนการดูดน้ำของวัตถุแห้ง เมล็ดแก่จะมีน้ำอยู่น้อย โดยมีความชื้นประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ ระยะแรกโมเลกุลของน้ำจะเข้าสู่เมล็ดโดยแรงดึงดูดน้ำของเมล็ด ที่เรียกว่า imbibition force ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นได้ทั้งในเมล็ดที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต การดูดน้ำของเมล็ดจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

ระยะที่ 2 ระยะเริ่มงอก เป็นระยะซึ่งมีกิจกรรมเมแทบอลิซึมต่างๆ เกิดขึ้นภายในเมล็ดที่มีชีวิต ใช้เวลาค่อนข้างนานกว่าระยะที่ 1

ระยะที่ 3 เป็นระยะการเจริญเติบโตหลังงอก สิ่งที่พบครั้งแรกคือ รากแรกเกิดและแกนเอ็มบริโอจะมีการแบ่งเซลล์และขยายขนาดเซลล์ มีการเจริญเติบโตเห็นได้ชัดเจน รากแรกเกิดแทงทะลุผ่านเปลือกหุ้มเมล็ดออกมา มีผลทำให้การดูดน้ำของเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

(Bewley, 2001)

2. การกระตุ้นเอนไซม์ (enzymes activation) เอนไซม์จะได้มาจาก 2 แหล่ง คือ เอนไซม์ที่สะสมในเมล็ด ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอ ซึ่งจะถูกระตุ้นให้ทำงาน ภายหลังจากเมล็ดได้รับน้ำ เช่น amylopectinase และ glucocidase เอนไซม์ 2 ชนิดนี้จะปรากฏขึ้นทันทีหลังจากเมล็ดได้รับน้ำ เอนไซม์อีกส่วนหนึ่งได้จากการสังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดยผ่านการควบคุมของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ที่เรียกว่า de novo synthesis โดยพบในเซลล์อะลิวโรน (aleulone) เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ amylase, ribonuclease, protease และ lipase เป็นต้น

3. กระบวนการย่อยอาหารสะสมภายในเมล็ด (seed reserve mobilization) อาหารสะสมสำคัญที่พบในเมล็ดพืช ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งจะมีปริมาณที่แตกต่างกันไป ตามชนิดของพืช อาหารสะสมดังกล่าวจะถูกย่อยให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก เพื่อเคลื่อนย้ายไปยังจุดเจริญ แป้งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์ α -amylases โปรตีนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนโดย เอนไซม์ protease ส่วนไขมันจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมัน โดยเอนไซม์ lipases ซึ่งสารที่ได้จากการย่อยดังกล่าวจะไปเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหายใจเพื่อสร้างพลังงาน ATP ไปในกระบวนการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด

4. การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ ภายหลังจากการสังเคราะห์เอนไซม์ ฮอร์โมน และการย่อยสลายสารต่าง ๆ ซึ่งจะถูกลำเลียงไปในส่วนของเอ็มบริโอแล้ว เอนไซม์ nuclease และ proteases จะกระตุ้นการสร้างฮอร์โมน cytokinin และ auxin ที่เอนโดสเปิร์ม ฮอร์โมนเหล่านี้จะเคลื่อนที่ไปยังเอ็มบริโอ เร่งการแบ่งเซลล์และการขยายตัวของเซลล์ได้ เอ็มบริโอจะมีการแบ่งเซลล์และขยายขนาดจนกระทั่งรากอ่อนเจริญทะลุเปลือกหุ้มเมล็ดออกมา และเมื่อส่วนยอดโผล่พ้นดินแล้ว ต้นกล้า

จะมีการเจริญสร้างใบแท้ ซึ่งมีสีเขียว ต้นอ่อนจะมีการสังเคราะห์แสงและเจริญเป็นต้นพืชปกติต่อไป ในขณะที่ใบเลี้ยง และเอนโดสเปิร์มจะมีขนาดเล็กและอาจหลุดร่วงไปในที่สุด (สมบุญ เศษะภิญญาวัฒน์, 2548 ; ลิลลี่ กาวีตะ และคณะ, 2556; Bewley, 2001)

2.3 ผลของสารอัลลีโลพาธีต่อพืช

สารอัลลีโลพาธีมีผลกระทบต่อพืชโดยที่โมเลกุลของสาร ไปรบกวนกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช ดังนี้

1. การคุดน้ำของเมล็ด เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นในการงอกของเมล็ด น้ำจะไปกระตุ้นปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ ภายในเมล็ด การที่เมล็ดคุดน้ำลดลงจึงส่งผลให้กิจกรรมในกระบวนการงอก เช่น การย่อยสลายสารอาหารสะสม การหายใจ และการแบ่งเซลล์ของเมล็ดลดลง จนส่งผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช การคุดน้ำของเมล็ดจะขึ้นกับ osmotic potential (Ψ_s) ของสารละลาย ซึ่ง Ψ_s จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และมีผลให้เมล็ดคุดน้ำได้ลดลงด้วย เช่น การทดลองของ จันทณี สนธิ (2554) พบว่า สารสกัดจากพุทธรักษาแก่นแดง (*Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob.) มีผลให้อัตราการคุดน้ำของเมล็ดผักโขมสวนและหญ้าข้าวกลลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Turk and Tawaha (2003) รายงานว่า สารสกัดจากผักกาดดำ (*Brassica nigra* L.) มีผลให้อัตราการคุดน้ำของเมล็ดข้าวโอตป่า (*Avena fatua* L.) ลดลง ตามความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น รวมทั้งการรายงานของ Han et al. (2008) ว่าสารสกัดจากขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) มีผลให้อัตราการคุดน้ำของเมล็ดถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.) และกุยช่าย (*Allium schoenoprasum* L.) ลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และการรายงานของ Ashrafi et al. (2009) ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากข้าวบาร์เลย์ (*Barley; Hordeum vulgare*) เพิ่มขึ้นจะมีผลให้การคุดน้ำของหญ้า quack (*Agropyrum repens*) ลดลง และอาจทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ protease ลดลง ซึ่ง protease มีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนที่สะสมในเมล็ดขณะงอก จึงส่งผลให้การงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบลดลง

2. การสังเคราะห์โปรตีน เช่น Shankar et al. (2009) รายงานว่า สารสกัดจากใบชื้อ (*Gmelina arborea*) มีผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ (soluble proteins) ในเมล็ดถั่วดำ (*Vigna mungo*) และถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ลดลง ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในเมล็ดขณะงอกจะประกอบไปด้วยเอนไซม์ เช่นเดียวกับการรายงานของ Abu-Romman, Shatnawi, and Shibli (2010) ที่รายงานว่า สารสกัดจาก *Euphorbia hierosolymitana* ทำให้ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวสาลีลดลง (*Triticum*

durum) รวมทั้ง การรายงานของ Hussain, Singh, Singh, and Singh (2017) ว่า สารสกัดจากใบงา (*Sesamum indicum*) มีผลให้ปริมาณ โปรตีนในเมล็ดหญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) ลดลง

3. กระบวนการย่อยสลายอาหารสะสมในเมล็ด เป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการงอกของเมล็ด อาหารสะสมในเมล็ดจะถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่เซลล์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการงอกและการเจริญเติบโต อาหารสะสมที่สำคัญในเมล็ดพืช ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งจะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน ไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Bewley, 2001) โดยสารอัลลีลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ที่มีบทบาทสำคัญในย่อยสลายอาหารสะสมในเมล็ด เช่น proteases, lipases และ α -amylase เป็นต้น Kato-Noguchi and Macias (2005) รายงานว่า สาร 6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA) ซึ่งเป็นสารอัลลีลโพลาร์ที่พบในธัญพืช สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดหอม (*L. sativa* L. cv. Grand Rapids) โดยมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งซึ่งเป็นอาหารสะสมในเมล็ดให้เป็นน้ำตาล ซึ่งน้ำตาลเป็นสารสำคัญที่ใช้ในกระบวนการหายใจ เพื่อสร้างพลังงานในกระบวนการงอกของเมล็ด (Kato-Noguchi & Macias, 2005) สารสกัดด้วยน้ำจากขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.) และกุยช่าย (*Allium schoenoprasum* L.) โดยมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ lipase ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไขมันซึ่งเป็นอาหารสะสมในเมล็ดลดลง (Han et al., 2008) และสารสกัดจาก *Artemisia monosperma* สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) ได้ โดยมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase และ Protease ในเมล็ดลดลง (Al-Watban & Salama, 2012)

4. การหายใจ โมเลกุลของสารอัลลีลโพลาร์ไปขัดขวางกระบวนการ glycolysis หรือ Krebs's cycle เช่น สาร α -pinene ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยของพืช มีผลต่อกระบวนการหายใจที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรียของเมล็ดข้าวโพดขณะงอกอย่างน้อยสองขั้นตอนคือ เกิด uncoupling ทำให้ oxidative phosphorylation เกิดขึ้นน้อยลง และยับยั้งกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transfer) (Abraham, Francischini, Pergo, Kelmer-Brach, & Ishii-Iwamoto, 2003) และ Batish et al. (2004) พบว่า สารสกัดจากใบยูคาลิปตัสมีผลทำให้อัตราการหายใจของพืชปลูกและวัชพืช คือ ข้าวสาลี ข้าวโพด ผักกาดหัว หญ้าข้าวนกและผักโขม ลดลง Kaur, Singh, Mittal, Batish, and Kohli (2010) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *Artemisia scoparia* มีผลให้อัตราการหายใจของหญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera*) ขี้เหล็กฝี (*Cassia occidentalis*) Parthenium Weed (*Parthenium hysterophorus*) หญ้าปล้องละมาน (*Echinochloa crus-galli*) และสาบแรังสาบกา (*Ageratum conyzoides*) ลดลง

5. การแบ่งเซลล์ เช่น สารสกัดด้วยน้ำจากยอดชะอมแห้ง มีผลต่อการแบ่งเซลล์ปลายรากหอมหัวใหญ่ คือ มีค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index) ลดลง และพบเซลล์ที่เข้าสู่ระยะเมทาเฟส

แอนาเฟส และเทโลเฟส ลดลง (กนกพร ช้างเสวก และคณะ, 2553) สารสกัดจากเปลือกเมล็ดกาแฟ (*Coffea arabica*) มีผลให้ดัชนีการแบ่งเซลล์ของต้นกล้าผักกาดหอม (*L. sativa* L. cv. Grand Rapids) ผักกาดขาว (*Brassica chinensis* var. *Parachinensis* (Sinskaja)) และ หญ้าก้นจ้ำขาว (*Bidens pilosa* L.) ลดลง (Silva et al., 2013) รวมทั้ง Santos et al. (2015) ได้ศึกษาสารสกัดจาก ดาวเรือง 2 ชนิด คือ *Tagetes erecta* L. และ *T. patula* L. พบว่า สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดหอม (*L. sativa* L. cv. Grand Rapids) ได้ และมีผลให้ดัชนีการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น

2.4 การปลดปล่อยสารอัลลีโลพาธีจากพืช

การปลดปล่อยสารอัลลีโลพาธีจากพืชเกิดขึ้นได้หลายวิธีด้วยกัน ซึ่ง Rice (1984) แบ่งไว้ดังนี้

1. การชะล้าง (leaching) ใบและส่วนต่าง ๆ ของพืชจะถูกชะล้างด้วยน้ำ เช่น น้ำฝน น้ำค้าง หรือหมอก ทำให้สารที่ละลายน้ำได้ถูกชะจากต้นและสะสมอยู่ในดินบริเวณใต้ทรงพุ่มหรือบริเวณใกล้เคียงต้นพืช
2. การระเหย (volatilization) เป็นการปลดปล่อยสารแอลลีโลพาธีออกสู่บรรยากาศรอบ ๆ ต้นพืช แล้วไปมีผลกระทบต่อต้นพืชอื่น สำหรับสารที่ระเหยในพืชส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์
3. การปลดปล่อยทางราก (exudation from root) พืชสามารถปลดปล่อยสารอัลลีโลพาธีออกทางราก สารที่ถูกปลดปล่อยออกมานั้น อาจไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอื่น
4. การย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในดิน (decomposition of residue) เกิดจากส่วนต่าง ๆ ของพืชร่วงหล่นบนพื้นดินแล้วถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ และปลดปล่อยสารอัลลีโลพาธีออกมา

2.5 การประยุกต์ใช้สารอัลลีโลพาธีในระบบการจัดการวัชพืช

การประยุกต์ใช้สารอัลลีโลพาธีในระบบการจัดการวัชพืช มีแนวทางดังนี้

1. การหาสารออกฤทธิ์ และวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นสารกำจัดวัชพืช เช่น สาร benzoxazinones และ quinolinic acid จำหน่ายเป็นการค้า โดยบริษัท BASF ในประเทศเยอรมนี (Dayan et al., 1999)
2. การดัดแปลงสูตร โครงสร้างของสารอัลลีโลพาธีจากธรรมชาติ ให้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารกำจัดวัชพืชที่สูงขึ้น เช่น ดัดแปลงสูตร โครงสร้างสาร 1,8-cineole ซึ่งเป็นสารที่

พบมากในใบยูคาลิปตัส ให้เป็นสาร cinmethylen ที่มีประสิทธิภาพสูงมากขึ้นในการควบคุมวัชพืช (Bhowmik, 1988)

3. พัฒนารูปการนำพืชมาปรับใช้ในระบบการปลูกพืชโดยตรง เช่น การปลูกพืชแซม พืชหมุนเวียน การไถกลบพืช หรือการใช้พืชอัลติโลพาธิผสมในดิน เช่น Khanh et al. (2006) ใช้ลำต้นของถั่วสไตโล (*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.) ที่แห้งและบดละเอียด ในอัตรา 1 ตัน/เฮกตาร์ ผสมดินในนาข้าว พบว่าสามารถควบคุมวัชพืชได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้น 80 เปอร์เซ็นต์

2.6 พลังงานอิสระของน้ำ (water potential, Ψ)

water potential (Ψ) เป็นค่าที่บอกถึงระดับความสามารถในการทำงานของน้ำ โดยน้ำที่มีระดับพลังงานสูงสุดคือ น้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ มีค่า Ψ เป็น 0 และเมื่อมีสารหรืออนุภาคใดก็ตามที่อยู่ในน้ำ ทำให้น้ำมีค่าพลังงานอิสระหรือความสามารถในการทำงานลดลง (มีค่าติดลบ) โดยน้ำจะเคลื่อนที่จากบริเวณที่มีค่า Ψ สูงไปยังบริเวณที่มีค่า Ψ ต่ำเสมอ

osmotic potential (Ψ_s) เป็นสัญลักษณ์แทนค่าพลังงานอิสระของน้ำที่ลดลงเมื่อมีตัวถูกละลายอยู่ในน้ำค่านี้มีค่าเป็นลบเสมอ สามารถคำนวณได้จากสมการ van't Hoff (ภาคภูมิ พระประเสริฐ, 2550)

$$\Psi_s = -RTC_s$$

$$\Psi_s = \text{osmotic potential (MPa)}$$

$$R = \text{ค่าคงที่ของก๊าซ (MPa/mol K)}$$

$$T = \text{ค่าอุณหภูมิสัมบูรณ์ (K)}$$

$$C_s = \text{จำนวนโมลของสารที่ละลายอยู่ในสารละลายต่อน้ำ 1 ลิตร (mole/L)}$$

ค่า Ψ_s จะมีความสัมพันธ์กับการดูดน้ำของเมล็ด โดย Ψ_s ของสารสกัดจะลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น และส่งผลให้อัตราการดูดน้ำของเมล็ดลดลง (Turk & Tawaha, 2003; Han et al., 2008; Silva et al., 2013)

2.7 พืชที่ใช้ในการสกัดสาร

ผักแครด

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.

วงศ์: Asteraceae

ชื่อสามัญ: American weed

ชื่อท้องถิ่น: สับกา (ภาคกลาง), หญ้าขี้หมา (นครศรีธรรมราช)

ลักษณะพฤกษศาสตร์: (ภาพที่ 2-1)

ต้น: ไม้ล้มลุก อายุฤดูเดียว ความสูงของต้นประมาณ 10-80 เซนติเมตร ลำต้นและใบมีขนสีขาวยาวตั้งตรงค่อนข้างหยาบ

ใบ: ใบเดี่ยว การเกาะติดของใบบนกิ่งแบบตรงข้ามสลับจาก ใบมีรูปไข่หรือรูปรี กว้าง 2.5-5 เซนติเมตร ยาว 3.5-8.0 เซนติเมตร ปลายใบและโคนใบแหลม ขอบใบเป็นจักฟันเลื่อย ก้านใบสั้น

ดอก: ช่อดอกแบบช่อกระจุกที่ซอกใบ กลีบดอกวงนอกสีเหลือง 3-8 กลีบ

ผล: ผลขนาดเล็ก เมล็ดสีดำหรือน้ำตาลเข้ม ขนาดเล็ก เป็นรูปทรงกระบอก ที่ปลายมีขนเป็นหนามแหลมยาวหลายอัน (เต็ม สมิตินันท์, 2544)

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์: เป็นพืชพื้นเมืองในเขตร้อนของทวีปอเมริกา และมีการกระจายพันธุ์ไปยังภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย แอฟริกาตะวันตก เป็นต้น (Adjibode et al., 2015)

จากการศึกษาของภาคภูมิ พระประเสริฐ และวรัญญา นามนาเมือง (2548) พบว่า สารสกัดจากใบผักแครดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้การงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ 6 ชนิด ลดลง คือ ถั่วฝัก (Phaseolus lathyroides L.f.) หญ้าเจ้าชู้ (Chrysopogon aciculatus Retz.) ต้อยติ่ง (Ruellia sp.) คะน้า (Brassica alboglabra Bail.) และข้าว (Oryza sativa L.) เช่นเดียวกับการรายงานของ Ghayal, Biware, and Dhumal (2014) ว่าสารสกัดจากใบผักแครดด้วยน้ำสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียว (Vigna radiata var. Vaibhav) ได้



ภาพที่ 2-1 ผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.)

2.8 การสกัดสาร และสารสกัดที่ได้

ในการสกัดสารอัลลิโลพาธิ์จากพืช นิยมใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ มีความสามารถละลายสารได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารอัลลิโลพาธิ์ที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืช ภาคภูมิ พระประเสริฐ และวรัญญา นามนาเมือง (2548) ได้ศึกษาถึงผลของสารสกัดจากใบผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช พบว่า สารสกัดจากผักแครดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อการงอกของเมล็ดพืชทดสอบมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเฮกเซน ตามลำดับ

องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบผักแครด

Adjibode et al. (2015) ได้รายงานถึงองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบผักแครดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ดังนี้

- สารสกัดใบผักแครดด้วยเมทานอล พบสารกลุ่ม flavonoids, alkaloids, glycosides, steroids, tannins, saponins และ phytosterols
- สารสกัดใบผักแครดด้วยเอทานอล พบสารกลุ่ม alkaloids, steroids, gums, reducing sugars และ tannins
- สารสกัดใบผักแครดด้วยน้ำ พบสารกลุ่ม alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, steroids และ triterpenoids

- สารสกัดใบผักแครดด้วยเฮกเซน (hexane) พบสารกลุ่ม flavonoids, steroids, triterpenoids, saponins, alkaloids และ phytosterols
- สารสกัดใบผักแครดด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) พบสารกลุ่ม flavonoids, steroids, saponins, alkaloids และ phytosterols
- สารสกัดใบผักแครดด้วยอะซิติก อะซิเตด (acetyl acetate) พบสารกลุ่ม flavonoids, saponins, alkaloids, triterpenoids และ phytosterols
- สารสกัดใบผักแครดด้วยบิวทานอล (butanol) พบสารกลุ่ม flavonoids, steroids, saponins, tannins, alkaloids, glycosides และ phytosterols

สารกลุ่ม alkaloids, flavonoids, tannins และ steroids เป็นสารอัลลิพาธิกที่พบในพืช ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการงอกของเมล็ดและลดการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Rice, 1984; Patnam, 1985)

2.5 พืชที่ใช้ทดสอบ

ข้าว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Oryza sativa* L.

วงศ์: Poaceae

ชื่อสามัญ: Rice

ลักษณะพฤกษศาสตร์: รากเป็นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน มีรากพิเศษที่ขึ้นที่ข้อซึ่งอยู่เหนือพื้นดิน ต้นข้าว ไม่มีรากแก้ว มีรากฝอยแตกแขนงกระจายอยู่ใต้ผิวดิน ลำต้นกลางมีข้อและปล้องชัดเจน จำนวนปล้องประมาณ 20-25 ปล้อง ต้นสูงประมาณ 1-1.5 เมตร มีกาบใบหุ้มลำต้น และแผ่นใบ (laminar) ผิวน้ำทั้งสองด้านและขอบใบมีขนสั้นๆ ช่อดอก เรียก รวง รวงข้าวซึ่งเกิดที่ข้ออันสุดท้ายของต้นข้าว ผลหรือเมล็ดเป็น caryopsis รูปไข่ปลายแหลม เมล็ดอ่อนสีเขียว เมล็ดแก่สุกเต็มที่สีเหลืองทอง มีเมล็ดขาว เป็นส่วนของเอนโดสเปิร์มเป็นแป้งที่บริโภคน้ำ (เต็ม สมิตินันท์, 2544)

การศึกษาถึงผลของสารสกัดต่อการงอกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มักใช้เมล็ดข้าวเป็นเมล็ดพืชทดสอบ (ชมลวรรณ เทพคุณ และสุพรรณิกา อินต๊ะนนท์, 2559; Javaid et al., 2006; Debnath, Debnath, & Paul, 2016; Rajendiran, Amudhavalli, & Vijayalakshmi, 2014) ในเมล็ดข้าวมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 7.3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2549)

กวางตุ้ง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee

วงศ์: Brassicaceae

ชื่อสามัญ: Pak-choi, Chinese mustard , Celey mustard

ลักษณะพฤกษศาสตร์: รากเป็นระบบรากแก้ว ลำต้นมีลักษณะตั้งตรง มีใบเลี้ยง 2 ใบ สีเขียว ปลายใบ ตรงกลางจะเว้าเข้า ส่วนใบจริงจะแตกเป็นกระจุกที่บริเวณโคนต้น เป็นใบเดี่ยว ใบเรียบ ไม่ห่อหุ้ม สีเขียว ขอบใบค่อนข้างเรียบ ก้านใบมีสีเขียวอ่อนเป็นร่องและเรียวกลมขึ้นไปหาแผ่นใบ มีลักษณะช่อดอกเป็นแบบ raceme ช่อดอกยาว 50-90 เซนติเมตร ดอกเป็นแบบดอกสมบูรณ์เพศ ส่วนผลนั้นจะมีลักษณะเป็นฝัก รูปร่างเรียวยาว เมล็ดมีลักษณะค่อนข้างกลม สีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลแดง (ไฉน ยอดเพชร, 2542)

การศึกษาถึงผลของสารสกัดต่อการงอกของพืชใบเลี้ยงคู่ มักใช้เมล็ดพืชวงศ์ *Brassicaceae* รวมถึงเมล็ดผักกวางตุ้งเป็นเมล็ดพืชทดสอบ (ปฎิมา หวานแก้ว, 2545; ภัทริน วิจิตรตระการ และคณะ, 2556)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชทดลอง

ผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) เก็บจากอำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว

3.2 เมล็ดพืชที่ใช้ทดสอบ

1. พืชใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* L.) จากอำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว
2. พืชใบเลี้ยงคู่ คือ กวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) ตราบีเกอ

3.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์
 - 1.1 กระดาษกรอง whatman เบอร์ 4
 - 1.2 กระดาษเพาะเมล็ด
 - 1.3 กระบอกตวง
 - 1.4 ขวดสีชา
 - 1.5 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
 - 1.6 เครื่องบดละเอียดไฟฟ้า
 - 1.7 เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (auto pipet)
 - 1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge 5498 R, eppendorf)
 - 1.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Libra S11, Biochrom)
 - 1.10 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
 - 1.11 ตู้อบความร้อน (hot air oven)
 - 1.12 เทอร์โมมิเตอร์
 - 1.13 บีกเกอร์
 - 1.14 ปากคีบ (forceps)
 - 1.15 บีเปต (pipet)

- 1.16 ผ้าขาวบาง
 - 1.17 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (SS-245, Tomy)
 - 1.18 จานเพาะเชื้อ (peti dish)
 - 1.19 หลอดทดลอง
 - 1.20 เครื่องวัดอุณหภูมิอัตโนมัติ (temperature bench meter, Mi 151)
 - 1.21 แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
-
2. สารเคมี
 - 2.1 น้ำกลั่น
 - 2.2 α -amylase จาก *Aspergillus oryzae*
 - 2.3 amyloglucosidase จาก *Aspergillus oryzae*
 - 2.4 acetic acid
 - 2.5 bovine serum albumin (BSA)
 - 2.6 calcium chloride
 - 2.7 D-glucose
 - 2.8 dinitrosalicylic acid (DNS)
 - 2.9 dithiothreitol (DTT)
 - 2.10 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
 - 2.11 95 % Ethanol
 - 2.12 80 % Ethanol
 - 2.13 magnesium chloride
 - 2.14 potassium nitrate
 - 2.15 sodium acetate
 - 2.16 sodium chloride
 - 2.17 sodium hydrogen sulfite
 - 2.18 sodium hydroxide
 - 2.19 starch soluble
 - 2.20 sucrose
 - 2.21 sulfuric acid
 - 2.22 Tris-HCl buffer pH 7.5

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช

1. วางแผนการทดลอง

1.1 ทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีสารสกัดจากใบผักแครดที่อัตราส่วนความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

(ชุดควบคุม)

กลุ่มที่ 2 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 6.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 19.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 5 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

1.2 ทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของกวางตุ้ง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีสารสกัดจากใบผักแครดที่อัตราส่วนความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

(ชุดควบคุม)

กลุ่มที่ 2 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 1.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 2.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 6.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 5 สารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นร้อยละ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. เตรียมสารสกัดจากใบผักแครด

นำใบผักแครดมาล้างทำความสะอาดแล้วใส่ไว้ในตะกร้าตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า เตรียมสารสกัดโดยการชั่งใบผักแครด 20 กรัม ลงในขวดสีชา เดิมเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางและกระดาษกรอง (Whatman No.4) จะได้สารสกัดตั้งต้น (stock) จากนั้นชั่งน้ำหนักงานเพาะเชื้อที่มีกระดาษเพาะเมล็ดรองพื้น ปิเปตสารสกัด 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานแล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา

3 วัน ในตู้ดูดควัน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกจนหมด หลังจากนั้นนำไปใส่ในเคซิเคเตอร์ที่มี ซิลิกาเจลเพื่อลดความชื้นเป็นเวลา 1 วัน นำไปชั่งเพื่อหาปริมาณสารสกัดที่ได้ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ พบว่า สารสกัดตั้งต้นมีความเข้มข้น 26.0 ± 0.82 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัด ให้มีความเข้มข้น 6.5, 13.0 และ 19.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบการงอกและการ เจริญเติบโตของข้าว และความเข้มข้นร้อยละ 1.3, 2.6, 6.5, และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำไป ทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของกวางตุ้ง ต่อไป

3. ทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ

ตัดกระดาษเพาะเมล็ดใส่ลงในจานเพาะเชื้อจำนวน 2 ชั้น ปิดฝาแล้วใส่ในถุงพลาสติก นำไปนั่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ แล้ววางไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออก จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาเมล็ดพืชทดสอบ ได้แก่ ข้าว และกวางตุ้ง ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จำนวน 25 เมล็ดต่อจาน ปิดฝาจานเพาะเชื้อและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกต และบันทึกการงอกของเมล็ดทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยกำหนดให้เมล็ดงอก หมายถึง เมล็ดที่มีราก เจริญออกมาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ การงอกของเมล็ดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Chung et al., 2003) วัดความยาวรากและความยาว ยอดของต้นกล้าหลังจากเพาะเมล็ดได้ 7 วัน รวบรวมต้นกล้าทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันแล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4. วิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้อภิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukeys- Kramer Method (Tukey's HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

5. วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าว และกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักแครดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าว และกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เพื่อนำไปทดสอบผลของ osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัดจากใบผักแครดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งทดสอบผลของ

สารสกัดต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ด เนื่องจากระดับความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาการงอกของเมล็ด ทำให้สามารถเห็นผลของสารสกัดต่อสรีรวิทยาในระหว่างการงอกของเมล็ด (Mahmoodzadeh & Mahmoodzadeh, 2013; Aslani et al., 2016,) วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ IC_{50} ด้วยการวิเคราะห์แบบ โพรบิท (probit analysis) ตามวิธีของ Finney (1971) โดยนำข้อมูลการงอกของเมล็ดที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาคำนวณโดยสมการ ดังนี้

กำหนดให้

X = ค่า log ความเข้มข้นของสารสกัด

G = จำนวนเมล็ดที่งอก

U = จำนวนเมล็ดที่ไม่งอก

P = อัตราส่วนของเมล็ดที่ไม่งอก

C = อัตราส่วนของเมล็ดที่ไม่งอกเนื่องจากได้รับสารสกัด

จากนั้นคำนวณหาค่า

$$P = U/(U+G)$$

$$C = (P - P_{\text{control}})/(1 - P_{\text{control}})$$

$$\text{โลจิท (logit value)} = \ln [C/(1-P)]$$

$$\text{โพรบิท (probit value)} = 5 + \text{NORM.S.INV}(C)$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าโพรบิทกับค่า log ความเข้มข้นของสารสกัดและคำนวณหาระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของพืชทดสอบได้ 50 เปอร์เซ็นต์จากสมการ ดังนี้

$$Y = aX + b$$

โดยที่

Y = ค่าโพรบิท (probit value)

a = ความชัน (slope of the line)

b = จุดตัดแกน (intercept)

X = ค่า log ความเข้มข้นของสารสกัด

เพราะฉะนั้น ค่า antilog X ที่คำนวณได้จากสมการ คือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของพืชทดสอบได้ 50 เปอร์เซ็นต์

ตอนที่ 2 ผลของ osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช

เนื่องจากค่า Ψ_s ของสารละลายมีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ดพืช ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อ การงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบได้ จึงจำเป็นต้องทดสอบว่า Ψ_s ของสารสกัด มีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายชูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัดจาก ใบผักแครด

1. การหาค่า osmotic potential (Ψ_s) ของสารละลายด้วยวิธี Freezing point depression

หาค่า Ψ_s โดยเตรียมอุปกรณ์ ดังภาพที่ 3-1 จากนั้นใส่สารละลายที่ต้องการหาค่า Ψ_s ได้แก่ น้ำกลั่น สารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ใส่หลอดทดลองลงในหลอดทดลองขนาดใหญ่ เพื่อไม่ให้ หลอดทดลองสัมผัสกับบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็งและเกลือ โดยตรง ควบคุมให้มีอุณหภูมิของน้ำแข็ง ระหว่าง -5 ถึง -10 องศาเซลเซียส คนสารให้สม่ำเสมอ วัดอุณหภูมิของสารในหลอดทดลองด้วย เครื่องวัดอุณหภูมิอัตโนมัติ เมื่ออุณหภูมิลดลงเหลือ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นบันทึกอุณหภูมิต่ำสุดทุก 5 วินาที จนอุณหภูมิต่ำสุด (degree of supercooling) หลังจากนั้น อุณหภูมิจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จดบันทึกอุณหภูมิจนกระทั่งอุณหภูมิกงที่ (ภาพที่ 3-2) ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ นำอุณหภูมิต่ำสุดที่บันทึกไปคำนวณหาค่า Ψ_s ของสารละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังสมการ และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับ Ψ_s ของสารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และสารละลายโพแทสเซียมไนเตรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ (William & William, 1931)

$$\Psi_s = 1.22 \times \Delta f \times (K/273 K)$$

$$\Psi_s = \text{ออสโมติกโพเทนเชียล (MPa)}$$

$$\Delta f = \text{จุดเยือกแข็งจริง (°C)}$$

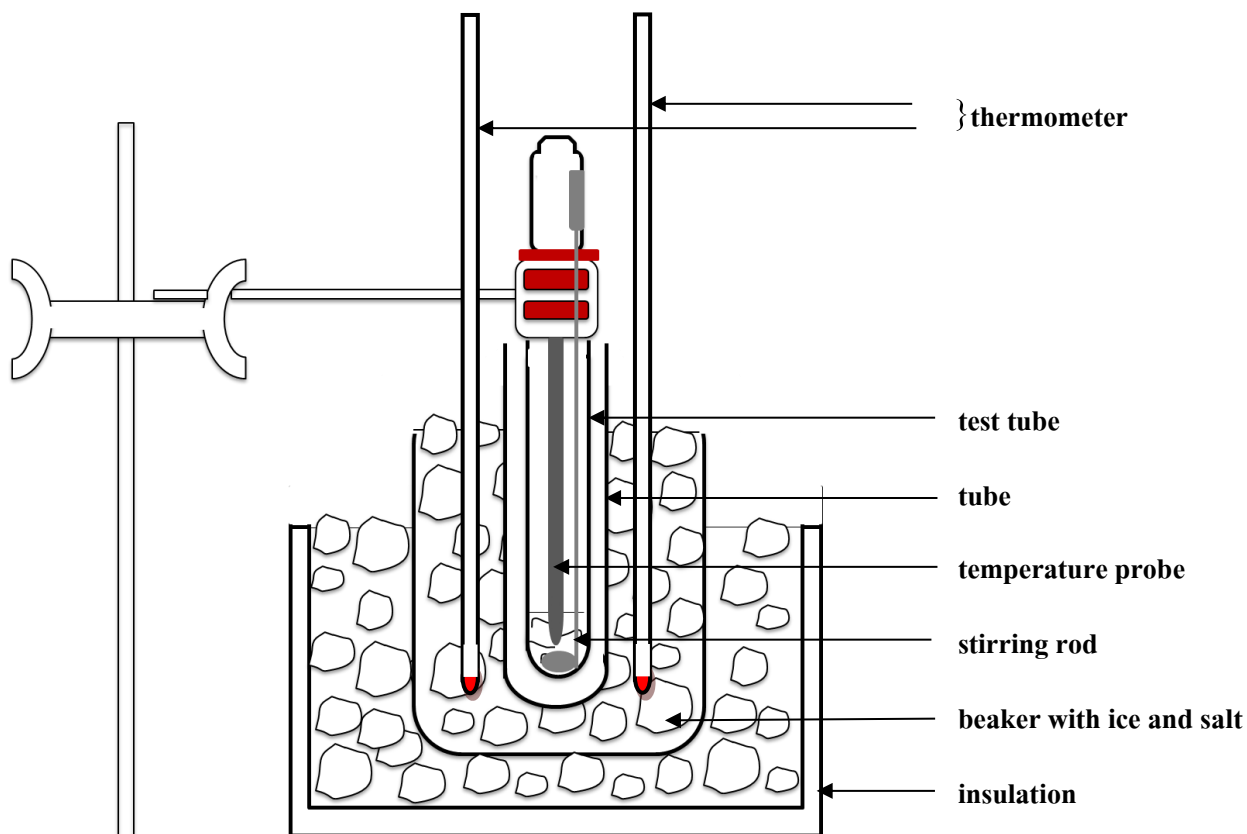
$$K = \text{อุณหภูมิสัมบูรณ์ (K)}$$

$$\Delta f = B - (0.0125 \times A)$$

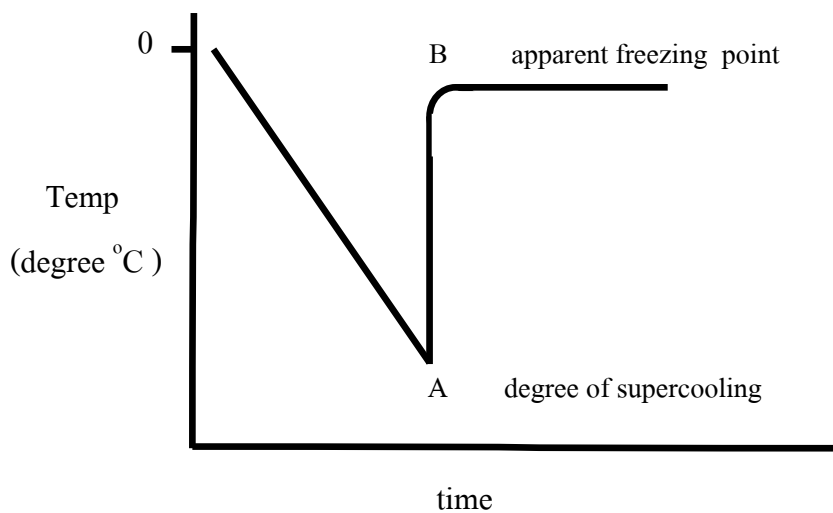
$$\Delta f = \text{จุดเยือกแข็งจริง}$$

$$A = \text{degree of supercooling (°C)}$$

$$B = \text{apparent freezing point (°C)}$$



ภาพที่ 3-1 การจัดอุปกรณ์เพื่อหาค่า osmotic potential ของสารละลาย



ภาพที่ 3-2 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำจนเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็ง แสดงให้เห็นการลดลงของอุณหภูมิของสารละลายจนถึงอุณหภูมิต่ำสุด (degree of supercooling) ก่อนที่สารละลายจะคายพลังงานออกพร้อมกับมีอุณหภูมิตั้งขึ้นและคงที่ (apparent freezing point) และเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็ง

2. การเตรียมสารเพื่อทดสอบการงอกของเมล็ด

2.1 เตรียมสารสกัดจากใบผักแครด เช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1 จากนั้นเจือจางสารสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.2 หา Ψ_s ของสารสกัด โดยใส่สารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้ววางไว้เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) นำสารละลายที่ได้ไปหา Ψ_s ของสารสกัดด้วยวิธี Freezing point depression

2.3 เตรียมสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ให้มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยหาความเข้มข้นของสารละลายจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับ Ψ_s แล้วแทนค่าในสมการเส้นตรง $Y = mX + b$ โดยกำหนดให้ค่า $Y = \Psi_s$ ของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่า X ที่คำนวณได้ คือความเข้มข้นของสารละลายที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด

3. ทดสอบการงอกของเมล็ด

นำสารสกัดจากใบผักแครดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรดที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด ไปทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวและกวางตุ้ง โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม บันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล เช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ด

การดูดน้ำของเมล็ด (water absorption)

1. เตรียมสารสกัดจากใบผักแครดที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเติมสารสกัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในจานทดลองแล้ววางไว้เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในจานทดลอง แล้วผสมสารสกัดให้ละลายในน้ำกลั่นให้มากที่สุด

2. เตรียมเตรียมสารละลายซูโครส สารละลายโซเดียมคลอไรด์ และสารละลายโพแทสเซียมไนเตรด ให้มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด เช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 2 เติมสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร ในจานทดลองสำหรับข้าว และกวางตุ้ง ตามลำดับ

3. เตรียมเมล็ดพืชทดสอบ โดยชั่งเมล็ดข้าวและกวางตุ้ง ประมาณ 1 กรัม บันทึกน้ำหนักเมล็ดเริ่มต้น (w_1) จากนั้นนำเมล็ดไปแช่ในจานทดลองที่มีสารสกัดจากใบผักแครด สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมี น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม บันทึกน้ำหนักของเมล็ดข้าวและกวางตุ้ง (w_2) เมื่อเวลาผ่านไป 1, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และ 1, 2, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ นำเมล็ดพืชทดสอบ มาชั่งน้ำให้แห้งด้วยกระดาษ แล้วนำไปชั่งน้ำหนักทันที เมื่อชั่งน้ำหนักเมล็ดเสร็จ นำไปแช่ใน สารละลายเดิมทันที (Turk & Tawaha, 2003) และนำข้อมูลไปคำนวณหาการดูดน้ำของเมล็ดพืช ทดสอบ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA และเปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukeys- Kramer Method (Tukey's HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

$$\text{การดูดน้ำของเมล็ด} = \frac{(W_2 - W_1)}{W_1}$$

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยนำเมล็ดข้าว จำนวน 3 เมล็ด และกวางตุ้ง จำนวน 10 เมล็ด เพาะในสารสกัดความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าว และกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 7 วัน นำเมล็ด ไปชั่ง น้ำหนักแล้วใส่ลงในที่วางอยู่บนน้ำแข็ง เติม 80% เอทานอล 1.5 มิลลิลิตร บดเมล็ดพืชด้วยโกร่ง จนละเอียด คูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปต้มที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย 80 % เอทานอล ผสมให้สารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คูดส่วนใส 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 1,300 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งไว้ ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยมีเมล็ดที่เพาะใน น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Kato-Noguchi & Macias, 2005)

ทำกราฟมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) โดยเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางให้สารละลายมีความเข้มข้นเป็น 3.13, 6.25, 12.50, 25.0 และ 50.0 mM ตามลำดับ คูดสารละลายกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 1,300 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid

500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งไว้ให้สารละลาย มีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เพื่อทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

การหาปริมาณแป้ง (starch content)

นำส่วนที่เหลือจากการหาปริมาณน้ำตาลมาล้างด้วย 80% เอทานอล จำนวน 3 ครั้ง โดยดูด 80% เอทานอล ใส่ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย acetate buffer pH 4.6 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้ สารละลายมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วเติมเอนไซม์ α -amylase 10 ไมโครลิตร (10 ยูนิต) และเติมเอนไซม์ amyloglucosidase ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (10 ยูนิต) นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดทดลอง แล้วปรับ ปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย 80% เอทานอล จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาล เพื่อนำไปวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแป้ง โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Rose et al., 1991)

ทำกราฟมาตรฐานแป้ง โดยชั่งแป้ง (soluble starch) 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย acetate buffer pH 4.6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เจือจาง สารละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 0.78, 1.56, 3.13, 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปต้มที่ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลง แล้วเติมเอนไซม์ α -amylase 10 ไมโครลิตร และเอนไซม์ amyloglucosidase 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตรด้วย 80 % เอทานอล จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาล เพื่อทำกราฟมาตรฐานแป้ง

การหาปริมาณโปรตีน (protein content)

หาปริมาณโปรตีนโดยนำเมล็ดข้าว จำนวน 3 เมล็ด และกวางตุ้ง จำนวน 10 เมล็ด เพาะในสารสกัดความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ความเข้มข้นที่ สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 7 วัน นำเมล็ดไปชั่งน้ำหนัก แล้วใส่ลงในโถงบดสารที่วางอยู่บนน้ำแข็ง เติม Tris - HCl buffer pH 7.5 (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, NaHSO₃ 10 mM) 1 มิลลิลิตร บดเมล็ดพืชด้วยโถงจนละเอียด ดูดสารละลายทั้งหมด ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ 15 นาที

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คูด่วนใส 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายทดสอบโปรตีน (Bradford reagent) ปริมาตร 1,450 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Bradford, 1976)

ทำกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยชั่ง Bovine serum albumin 1 มิลลิกรัม เติม Tris - HCl buffer pH 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เจือจางให้สารละลายมีความเข้มข้นเป็น 0.13, 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คูดสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายทดสอบโปรตีน (Bradford reagent) ปริมาตร 1,450 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อทำกราฟมาตรฐานโปรตีน (Bradford, 1976)

กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase

หากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ตามวิธีของ Kato-Noguchi and Macias (2005) โดยนำเมล็ดข้าว จำนวน 3 เมล็ด และรวงตุง จำนวน 3 เมล็ด เพาะในสารสกัดความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าว และรวงตุงได้ 50 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 7 วัน นำเมล็ดไปชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในหลอดสาร เติม Tris-HCl buffer pH 7.5 (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, NaHSO₃ 10 mM, BSA 5 mg/ml) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดด้วยโกร่งที่วางอยู่บนน้ำแข็งจนละเอียด คูดสารละลายทั้งหมด ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นคูด่วนใส ใส่ในหลอดทดลอง เติมแคลเซียมคลอไรด์ 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คูดสารละลายใส่หลอดทดลอง 2 หลอด ปริมาตรหลอดละ 300 ไมโครลิตร ในหลอดที่ 1 เติม Na-acetate 500 ไมโครลิตร เติม starch soluble 500 ไมโครลิตร หลอดที่ 2 เติม Na-acetate 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร นำหลอดทั้งสอง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้ง โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (Kato-Noguchi & Macías, 2005)

ทำกราฟมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) โดยเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางให้สารละลายมีความเข้มข้นเป็น 3.13, 6.25, 12.50, 25.00

และ 50.00 mM ตามลำดับ คูณสารละลายกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 1,300 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เพื่อทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

วิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 ผลของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช

1.1 ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการงอกของเมล็ด

ข้าว

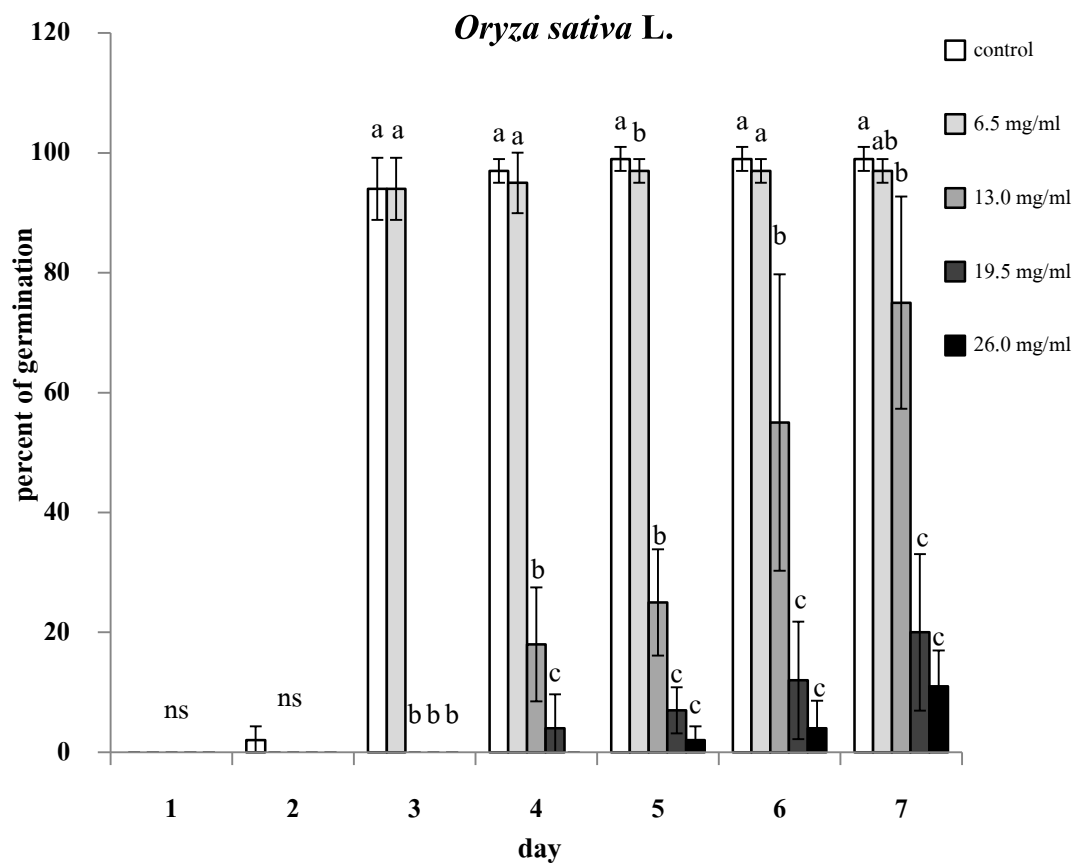
จากการนำเมล็ดข้าวแช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ในชุดควบคุมเมล็ดเริ่มงอกในวันที่ 2 ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 6.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมล็ดเริ่มงอกในวันที่ 3 และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 13.0, 19.5 และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมล็ดเริ่มงอกในวันที่ 4 ซึ่งเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดในชุดควบคุมเริ่มงอกในวันที่ 5 และยังพบว่าเมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครด ความเข้มข้น 13.0, 19.5 และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และพบว่าเมล็ดที่แช่ในสารสกัดความเข้มข้น 13.0, 19.5 และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงจากชุดควบคุม 24, 79 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-1)

กวางตุ้ง

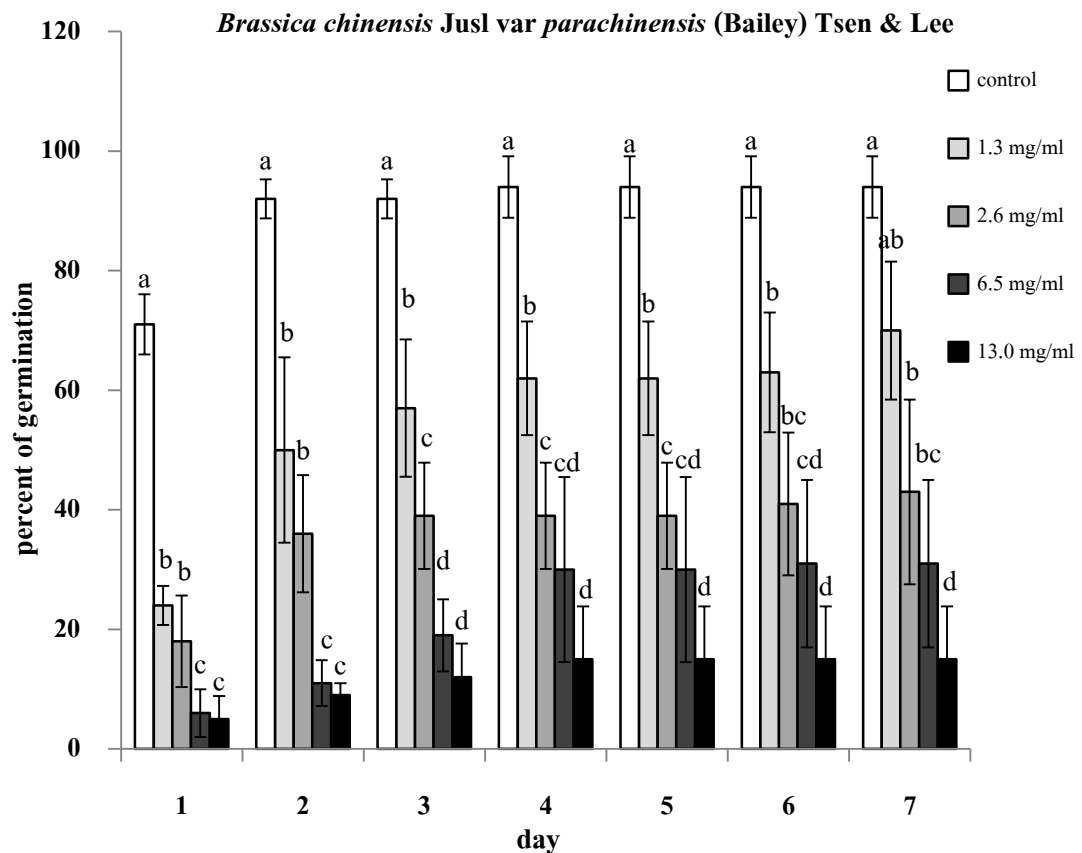
จากการนำเมล็ดกวางตุ้งแช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5 และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมล็ดเริ่มงอกในวันที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดในชุดควบคุมเริ่มงอกในวันที่ 4 และยังพบว่าเมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครด 1.3, 2.6, 6.5 และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และพบว่าเมล็ดที่แช่ในสารสกัดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5 และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงจากชุดควบคุม 24, 51, 63 และ 79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-2)

1.2 ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

เมื่อนำข้อมูลการงอกของเมล็ดในวันที่ 7 มาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยการวิเคราะห์แบบโพรบิท (probit analysis) ตามวิธีของ Finney (1971) พบว่า มีค่าเท่ากับ 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; อักษรย่อ ns แสดงความไม่แตกต่างกันของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4-2 เปรอร์เซ็นต์การงอกของกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5 และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร abcd แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปรอร์เซ็นต์)

1.3 ผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า

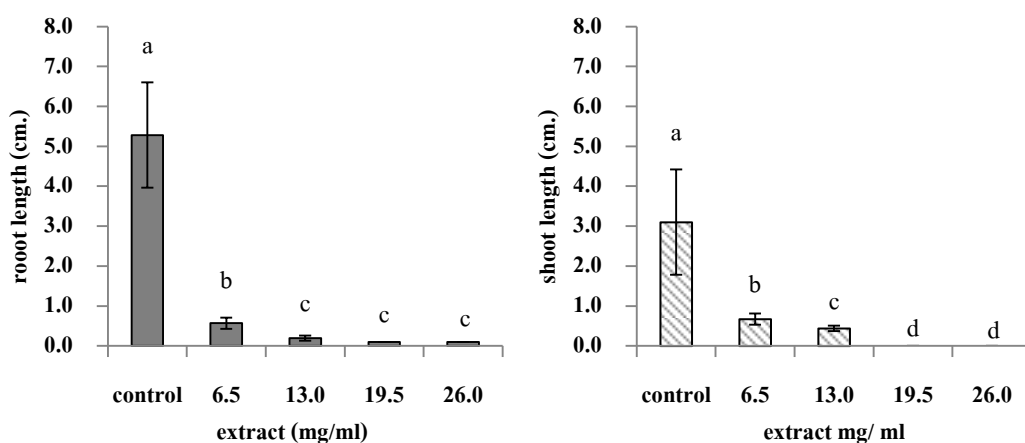
ข้าว

เมื่อนำเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน มาวัดความยาวราก และความยาวยอด พบว่า เมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดมีความยาวราก และความยาวยอด แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีความยาวรากและความยาวยอดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น โดยเมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความยาวรากเป็น 10.76, 3.72, 1.89 และ 1.89 เปรอร์เซ็นต์

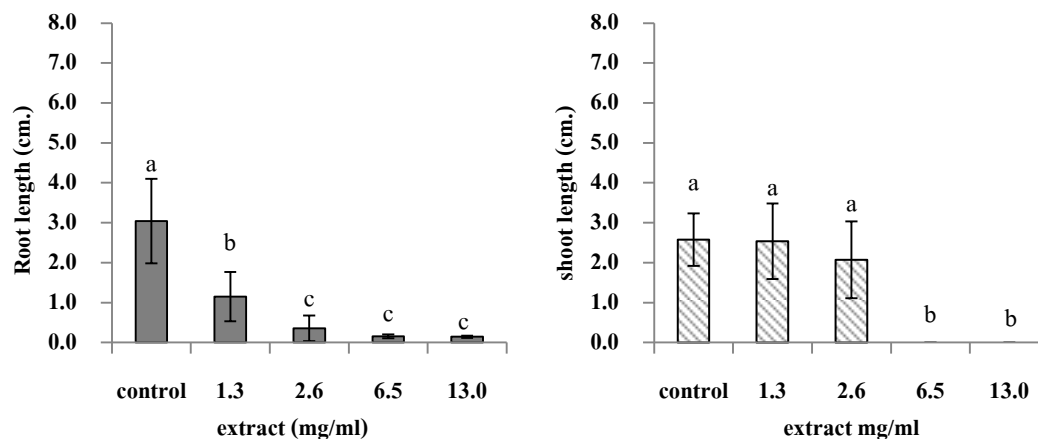
ของชุดควบคุม ตามลำดับ และมีความยาวยอดเป็น 21.71, 14.21 และ 0 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุมตามลำดับ (ภาพที่ 4-3)

กวางคู้ง

เมื่อนำเมล็ดกวางคู้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5, และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน มาวัดความยาวรากและความยาวยอด พบว่า เมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดมีความยาวรากและความยาวยอดแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีความยาวรากและความยาวยอดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น โดยเมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5, และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความยาวรากเป็น 37.80, 11.77, 5.04 และ 4.71 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ตามลำดับ และมีความยาวยอดเป็น 98.37, 80.38 และ 0 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุมตามลำดับ (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-3 ความยาวรากและความยาวยอดของข้าวที่ได้รับความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5, และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร abcd แสดงความแตกต่างของข้อมูลทีวิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4.4 ความยาวรากและความยาวยอดของกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5, และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลทีวิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

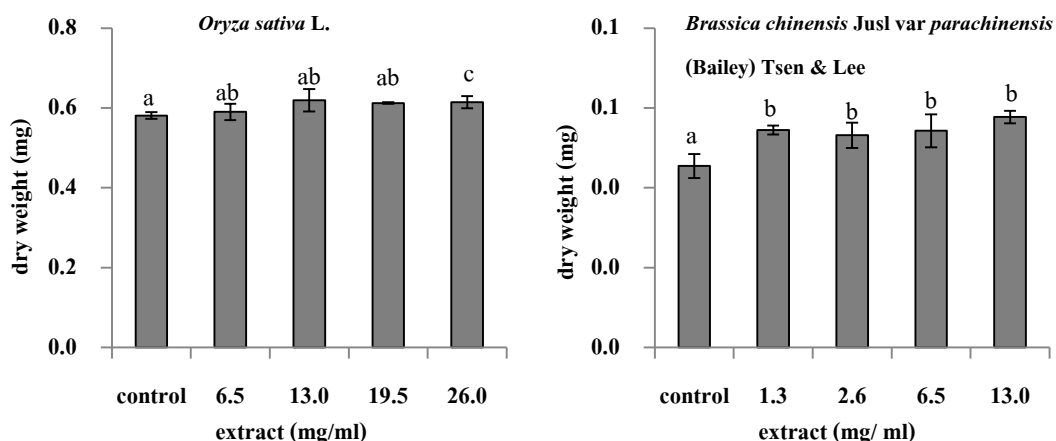
1.3 ผลของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้งของเมล็ด

ข้าว

จากการหาน้ำหนักแห้งของข้าวที่แช่ในสารสกัดใบผักแครดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5, และ 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 26.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีน้ำหนักแห้งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดจะมีน้ำหนักแห้งสูงกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 4-5)

กวางตุ้ง

จากการหาน้ำหนักแห้งของกวางตุ้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 1.3, 2.6, 6.5, และ 13.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีน้ำหนักแห้งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดจะมีน้ำหนักแห้งสูงกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 4-5)



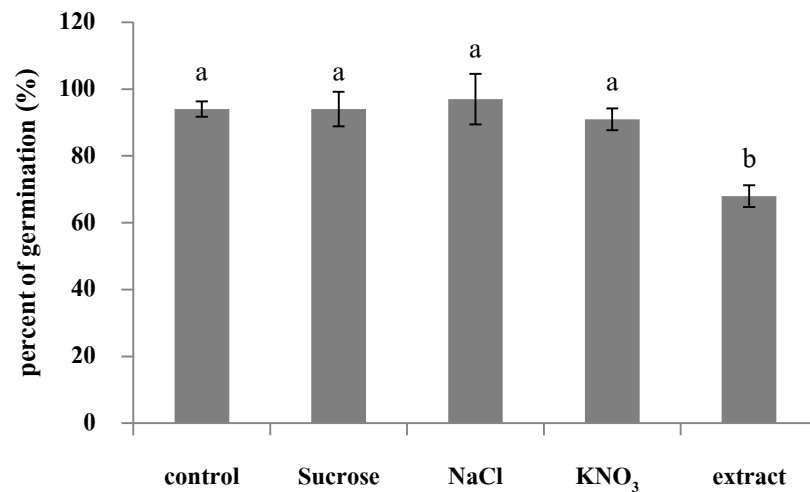
ภาพที่ 4-5 น้ำหนักแห้งของเมล็ดข้าวและกวางตุ้ง ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลทีวิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ตอนที่ 2 ผลของ osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช

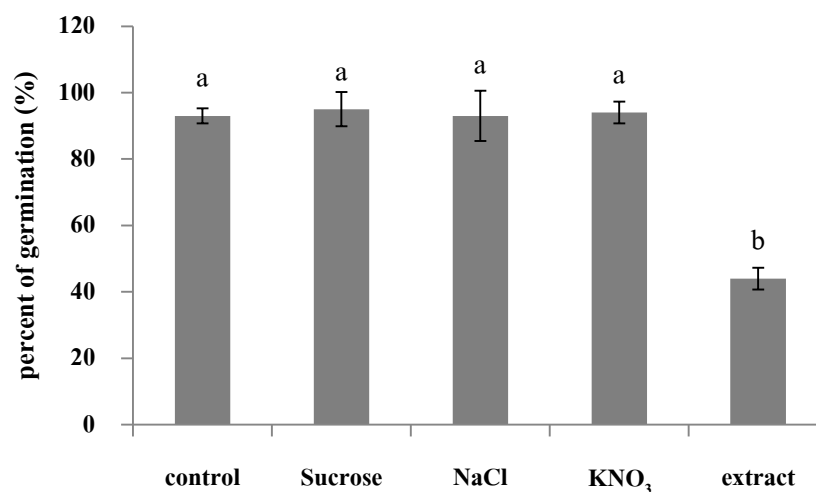
การทดลองนี้ได้ทำการหา Ψ_s ของสารสกัดจากใบผักแครดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้ง ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) (ความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ด้วยวิธี Freezing point depression พบว่า มีค่าเท่ากับ -0.19 และ -0.08 MPa ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดจากใบผักแครดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด ไปทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวและกวางตุ้ง โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม เพื่อทดสอบว่า Ψ_s ของสารสกัดใบผักแครดมีผลกระทบต่ออาการงอกของเมล็ดพืชหรือไม่ พบว่า ทั้งเมล็ดข้าวและกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดมีเปอร์เซ็นต์การงอก เท่ากับ 68 และ 44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าชุดควบคุมและสารละลายอื่นที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 4- 6, 4-7)

เมื่อนำเมล็ดข้าวและกวางตุ้งที่งอกเป็นเวลา 7 วัน มาวัดความยาวรากและความยาวยอด พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีความยาวรากและความยาวยอดต่ำกว่าชุดควบคุมและสารละลายอื่นที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดมีความยาวรากและความยาวยอด

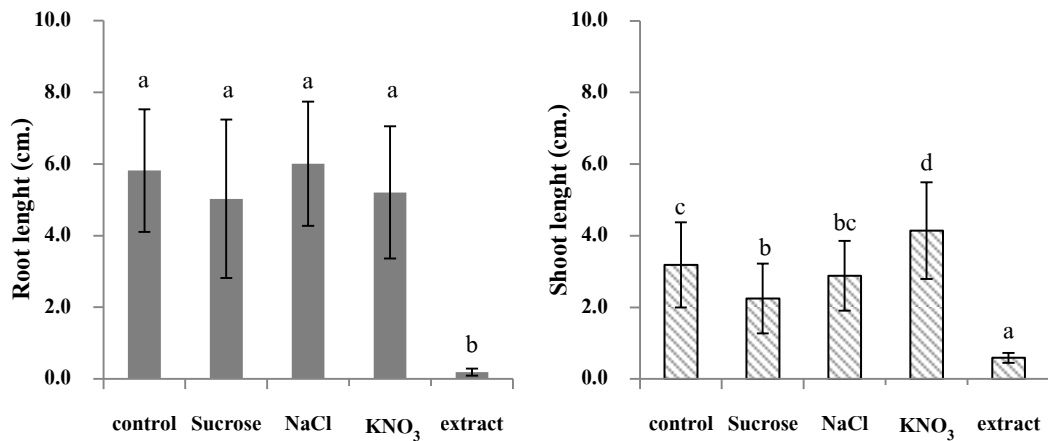
เป็น 3.25 และ 18.51 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ส่วนเมล็ดกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดมีความยาวราก และความยาวยอดเป็น 4.22 และ 45.26 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ตามลำดับ (ภาพที่ 4-8, 4-9)



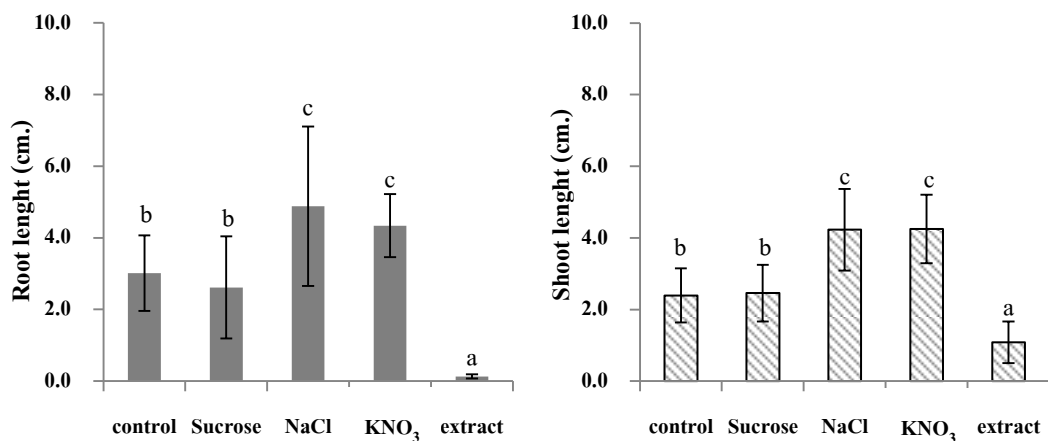
ภาพที่ 4-6 เปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.19 MPa) (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลทีวิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4-7 เปอร์เซ็นต์การงอกของกวางตุ้งที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.08 MPa) (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลทีวิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4-8 ความยาวรากและความยาวยอดของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.19 MPa) (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm SE$; ตัวอักษร abcd แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4-9 ความยาวรากและความยาวยอดของรวงตุงที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.08 MPa) (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm SE$; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ตอนที่ 3 ผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ด

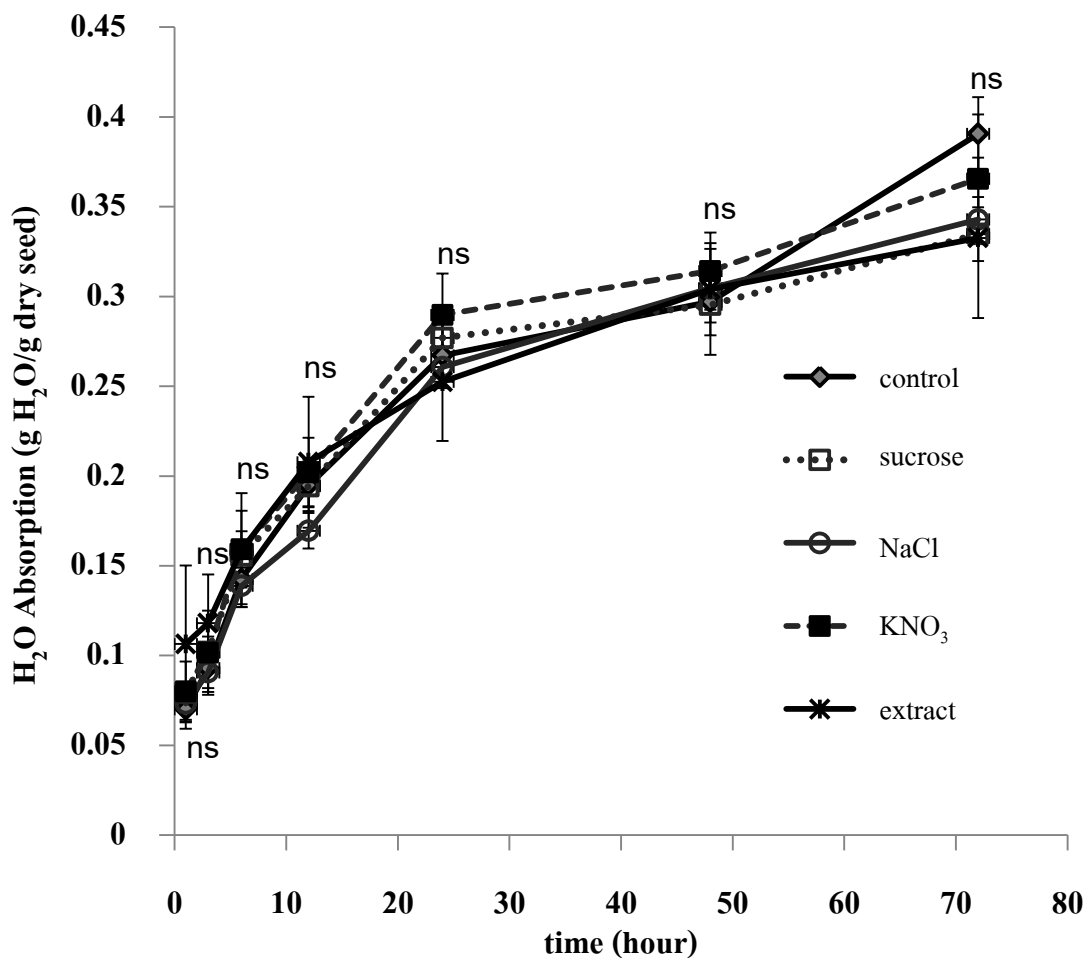
3.1 การดูดน้ำของเมล็ด (water absorption)

ข้าว

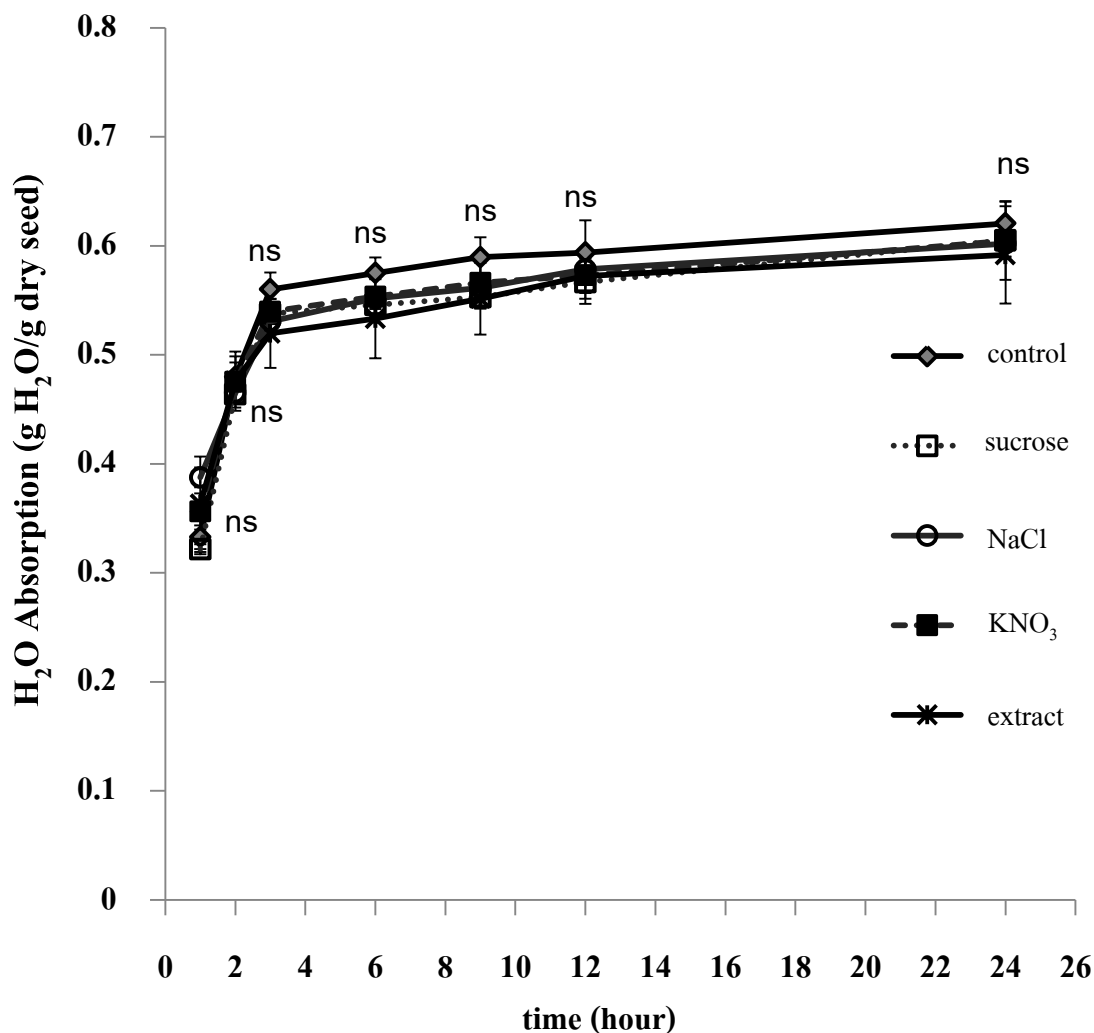
เมื่อนำเมล็ดข้าวแช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สารละลายซูโครส สารละลายโซเดียมคลอไรด์ และสารละลายโพแทสเซียมไนเตรด ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.19 MPa) โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า การดูดน้ำของเมล็ดจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น โดยการดูดน้ำของเมล็ดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรก (เริ่มแช่-ชั่วโมงที่ 24) หลังจากนั้นการดูดน้ำของเมล็ดเกิดช้ากว่าระยะแรกจนถึงชั่วโมงที่ 48 และหลังจากนั้นการดูดน้ำจะเกิดเร็วขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งอัตราการดูดน้ำของเมล็ดที่ได้รับสารสกัดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 72 ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด (ภาพที่ 4-10)

ถั่ว

เมื่อนำเมล็ดถั่วแช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.08 MPa) โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า การดูดน้ำของเมล็ดจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น โดยการดูดน้ำของเมล็ดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรก (เริ่มแช่-ชั่วโมงที่ 3) หลังจากนั้นการดูดน้ำของเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 24 ซึ่งการดูดน้ำของเมล็ดที่ได้รับสารสกัดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 24 ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด (ภาพที่ 4-11)



ภาพที่ 4-10 การดูดน้ำของเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.19 MPa) (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; อักษรย่อ ns แสดงข้อมูลไม่มีแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ด้วย One-Way ANOVA)



ภาพที่ 4-11 การดูดน้ำของเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.08 MPa) (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm SE$; อักษรย่อ ns แสดงข้อมูลไม่มีแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ด้วย One-Way ANOVA)

3.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

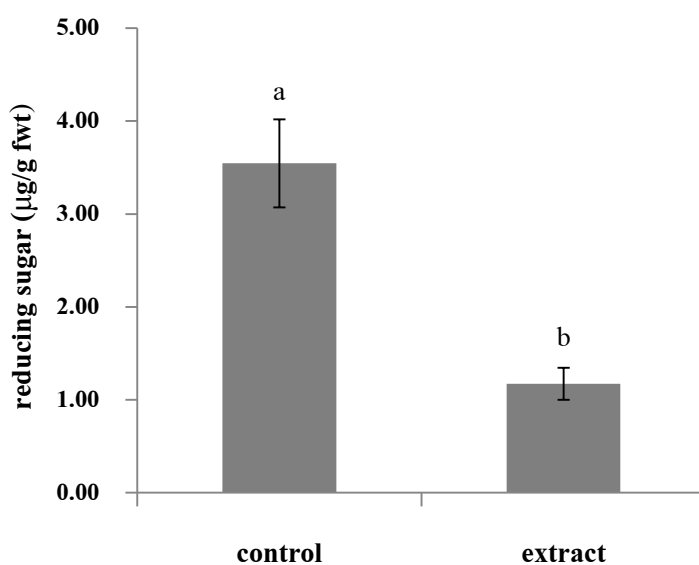
ข้าว

จากการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่าเมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดใบผักแครด มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.17 $\mu g/g$ fwt ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ

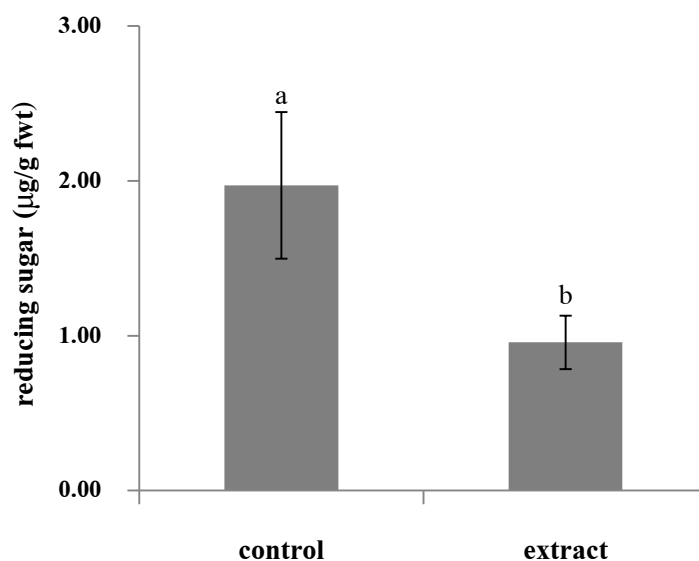
3.55 $\mu\text{g/g}$ fwt โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าชุดควบคุม 66.92 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4-12)

กวางคั้ง

จากการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดกวางคั้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดกวางคั้งที่ได้รับสารสกัดใบผักแครด มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.96 $\mu\text{g/g}$ fwt ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.97 $\mu\text{g/g}$ fwt โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าชุดควบคุม 51.42 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4-13)



ภาพที่ 4-12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm\text{SE}$; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4-13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดควางคั่งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ด้วยวิธี Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

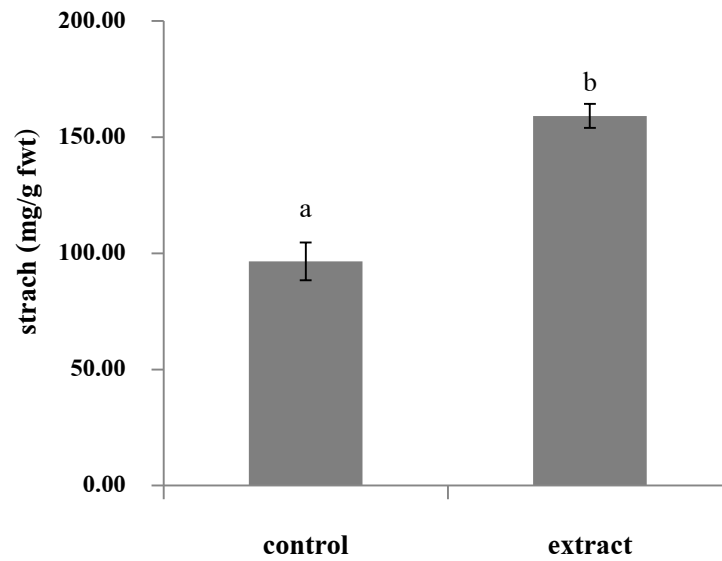
3.3 ปริมาณแป้ง (starch content)

ข้าว

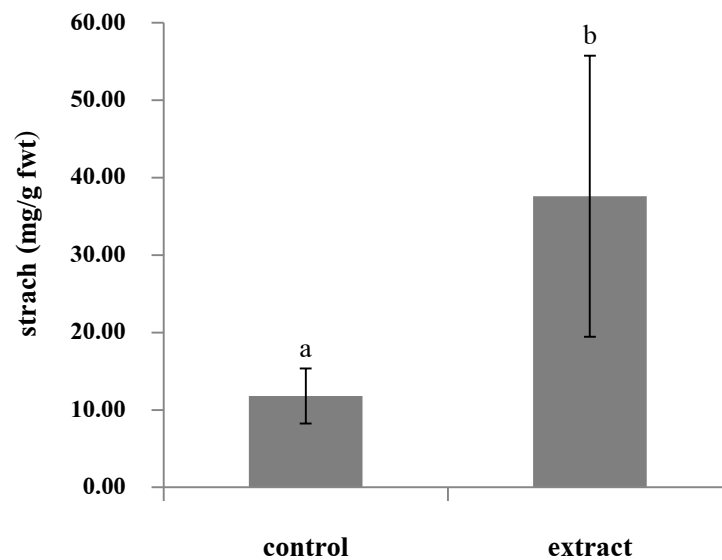
จากการหาปริมาณแป้งในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดมีปริมาณแป้ง เท่ากับ 159.13 mg /g fwt ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณแป้งเท่ากับ 96.54 mg /g fwt โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณแป้งสูงกว่าชุดควบคุม 66.84 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4-14)

ควางคั่ง

จากการหาปริมาณแป้งในเมล็ดควางคั่งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดมีปริมาณแป้ง เท่ากับ 37.59 mg /g fwt ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณแป้งเท่ากับ 11.80 mg /g fwt โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณแป้งสูงกว่าชุดควบคุม 218.62 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4-15)



ภาพที่ 4-14 ปริมาณแป้งในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm SE$; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

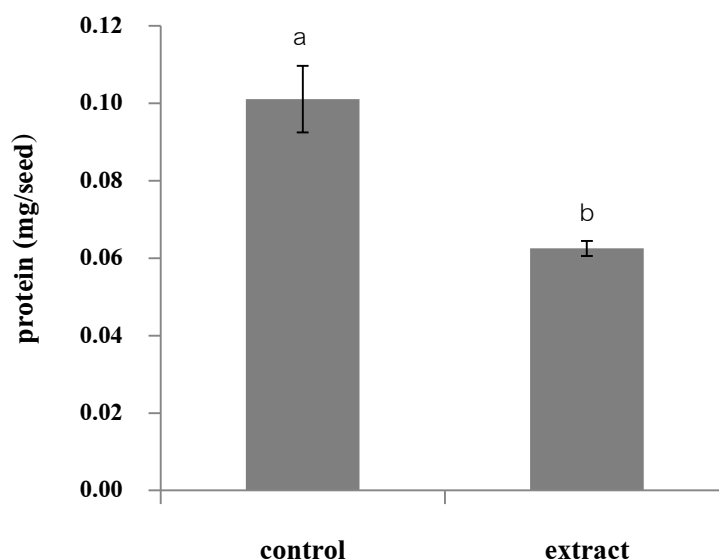


ภาพที่ 4-15 ปริมาณแป้งในเมล็ดควางตุ้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm SE$ ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

3.4 ปริมาณโปรตีน (protein content)

ข้าว

จากการหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดมีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.06 mg /seed ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.10 mg /seed โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าชุดควบคุม 38.15 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4-16)

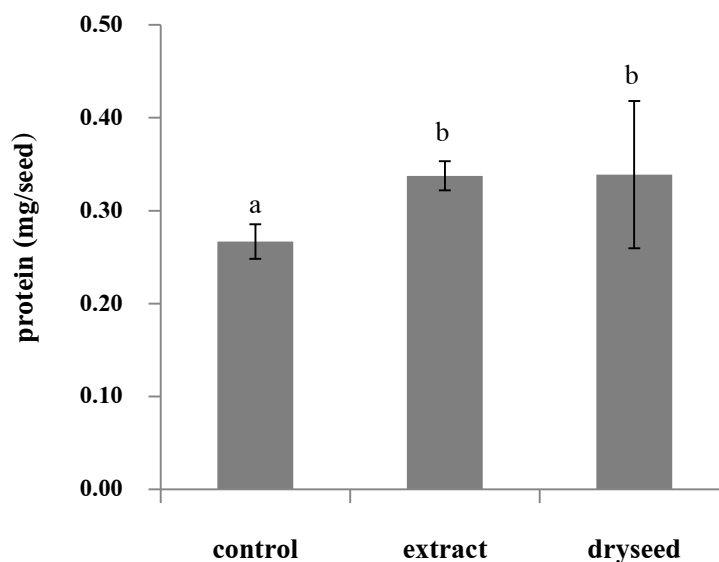


ภาพที่ 4-16 ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm SE$; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

กวางตุ้ง

จากการหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดกวางตุ้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครด มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.34 mg /seed ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.27 mg /seed โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าชุดควบคุม 26.57 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อหาปริมาณ

โปรตีนในเมล็ดแห้ง พบว่า มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.34 mg/seed ซึ่งไม่แตกต่างจากปริมาณโปรตีนในเมล็ดที่ได้รับสารสกัด (ภาพที่ 4-17)



ภาพที่ 4-17 ปริมาณโปรตีนในเมล็ดกวาดุ้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน และในเมล็ดแห้ง (แถบความคลาดเคลื่อน แสดงค่า $\pm SE$; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

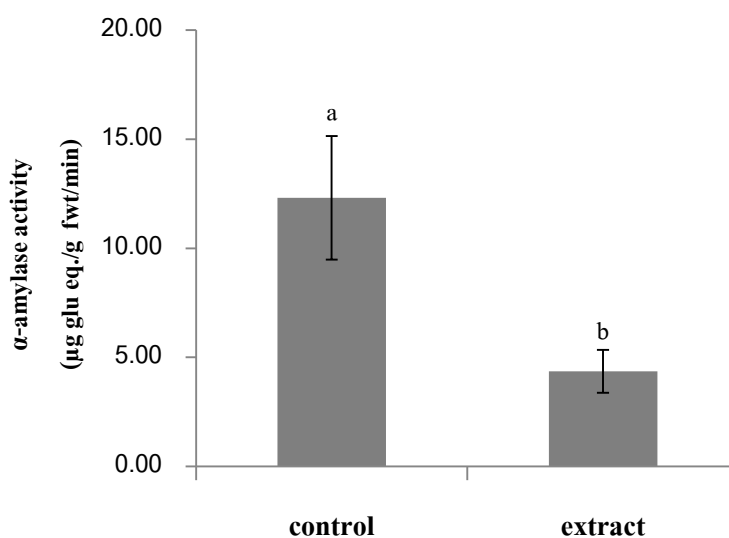
3.5 กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase

ข้าว

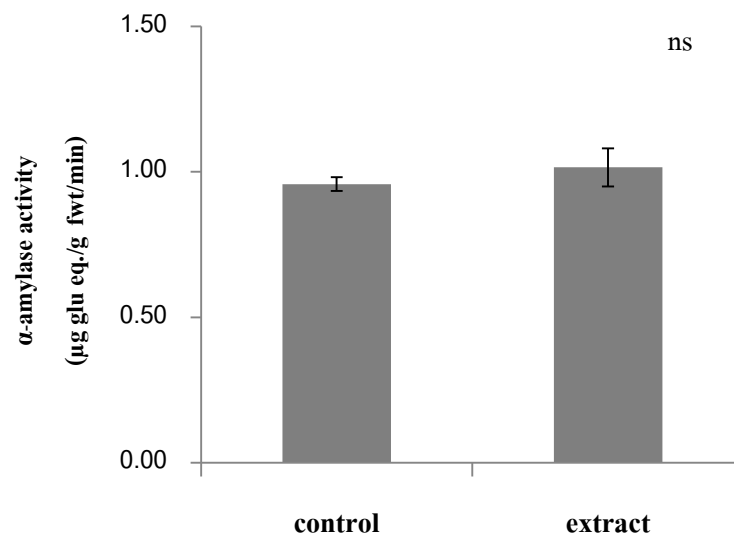
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่าในเมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดมีกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase เท่ากับ 4.36 $\mu\text{g glu eq./g fwt /min}$ ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีกิจกรรมเท่ากับ 12.31 $\mu\text{g glu eq./g fwt/min}$ โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ต่ำกว่าชุดควบคุม 64.57 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4-18)

กวางคั้ง

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดกวางคั้งที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดกวางคั้งที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครด มีกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase เท่ากับ 1.02 $\mu\text{g/g}$ fwt ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase เท่ากับ 0.96 $\mu\text{g/g}$ fwt (ภาพที่ 4-19)



ภาพที่ 4-18 กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4-19 กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดคางคังที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร ns บนกราฟแสดงว่าไม่แตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Independent samples t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

ตอนที่ 1 ผลของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช

จากการศึกษาผลของสกัดใบผักแครดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อการงอกของข้าว และกวางตุ้ง พบว่า สารสกัดจากใบผักแครดสามารถยับยั้งการงอกของข้าวและกวางตุ้งได้ และมีผลให้การงอกของเมล็ดช้าลง และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-1, 4-2) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ภาคภูมิ พระประเสริฐ และวรัญญา นามนาเมือง (2548) ที่พบว่าสารสกัดจากใบผักแครดสามารถยับยั้งการงอกของพืชปลูกและวัชพืชบางชนิดได้ และยังพบว่าสารสกัดใบผักแครดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดพืชทดสอบได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบผักแครดด้วยตัวทำละลายอื่น รวมทั้ง Ghayal, Biware, and Dhupal (2014) รายงานว่าสารสกัดจากใบผักแครดด้วยน้ำสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียว (*Vigna radiata* var. *Vaibhav*) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของสารสกัดจากพืชอื่นต่อการงอกของเมล็ด Poonpaiboonpipat et al. (2013) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ด และมีผลให้การงอกของเมล็ดหญ้างูปล้องละมาน (*Echinochloa crus-galli*) เกิดช้าลง ซึ่งเกิดจากสารสกัดไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยอาหารสะสมในเมล็ดจำพวกแป้ง ดังนั้นในการทดลองตอนที่ 3 จึงศึกษาถึงผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดข้าวและกวางตุ้ง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักแครดที่สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว และกวางตุ้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการงอกในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสารสกัดสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดกวางตุ้งมากกว่าข้าว ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Debnath et al. (2016) ว่าสารสกัดจากใบ *Solanum sisymbriifolium* Lamk. มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดเขียว (*Brassica campestris* L.) มากกว่าข้าว เช่นเดียวกับการรายงานของ ชมลวรรณ เทพคุณ และสุพรรณิกา อินตะนันท์ (2559) ว่าสารสกัดสาบม่วง (*Praxelis clematidea*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียว (*Brassica juncea* L.) มากกว่าข้าว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากขนาดของเมล็ด ชีววิทยาของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ และชนิดของพืช

สารสกัดจากใบผักแคร์ดยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า โดยทำให้ความยาวยอดและความยาวรากของข้าวและกวางตุ้งลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-3, 4-4) อาจเป็นผลจากสารสกัดไปยับยั้งการแบ่งเซลล์และการยึดตัวของเซลล์ (Scrivanti, 2010) Babula et al. (2014) รายงานว่า สารอัลลีโลพาธี naphthoquinone juglone สามารถยับยั้งความยาวรากของผักกาด (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L. cv. Merkurion) ได้ การยับยั้งจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และยังพบว่าความยาวรากที่ลดลงนี้มีความสัมพันธ์กับการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) โดยเมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น พบว่า ค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index) ลดลง และการแบ่งเซลล์ในระยะ โพรเฟส (prophase) เพิ่มขึ้น ส่วนการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟส (metaphase) แอนาเฟส (anaphase) และเทโลเฟส (telophase) ลดลง เช่นเดียวกับการรายงานของ กนกพร ช้างเสวก และคณะ (2553) ที่พบว่าดัชนีการแบ่งเซลล์ของปลายรากหอมใหญ่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากยอดชะอมแห้ง (*Acacia pennata* L.) เพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ในระยะ โพรเฟสเพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์ที่เข้าสู่ระยะเมทาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟสลดลง

จากการศึกษาน้ำหนักแห้งของเมล็ดข้าว และกวางตุ้ง พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีน้ำหนักแห้งมากกว่าชุดควบคุม อาจเป็นผลจากสารสกัดไปยับยั้งกระบวนการสลายอาหารสะสมในเมล็ดทำให้เมล็ดมีการหายใจระดับเซลล์ลดลง เป็นผลให้มีการสูญเสีย CO_2 ลดลง จึงทำให้น้ำหนักแห้งของเมล็ดที่ได้รับสารสกัดสูงกว่าชุดควบคุม (Bewley, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ภาคภูมิ พระประเสริฐ และวรัญญา นามนาเมือง (2548) ที่พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแคร์ดมีน้ำหนักแห้งมากกว่าชุดควบคุม

ตอนที่ 2 ผลของค่า osmotic potential (Ψ_s) ของสารละลายต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช

จากการทดสอบผลของ osmotic potential (Ψ_s) ของสารละลายต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวและกวางตุ้ง โดยนำสารสกัดจากใบผักแคร์ดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) สารละลายซูโครส สารละลายโซเดียมคลอไรด์ และสารละลายโพแทสเซียมไนเตรด ที่มี Ψ_s เท่ากับ -0.19 และ -0.08 MPa ตามลำดับ ไปทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว และกวางตุ้ง โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด (ภาพที่ 4-5, 4-6) ความยาวราก และความยาวยอด (ภาพที่ 4-7, 4-8) ต่ำกว่าชุดควบคุม สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด แสดงให้เห็นว่า Ψ_s ของสารสกัดที่นำมาทดสอบไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้เมล็ดไม่งอกและยับยั้งการเจริญเติบโต

ของต้นกล้า ดังนั้นผลการยับยั้งน่าจะเกิดจากสารอัลลีโลพาธิจากใบผักแครด ซึ่ง Adjibode et al. (2015) ได้รายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบผักแครดที่สกัดด้วยเอทานอล ประกอบไปด้วยสารในกลุ่ม alkaloids, steroids, gums, reducing sugars และ tannins ซึ่ง alkaloids, steroids และ tannins เป็นกลุ่มสารอัลลีโลพาธิกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Rice, 1984; Patnam, 1985) ทั้งนี้ได้มีรายงานวิจัยถึงผล Ψ_s ของสารสกัดจากพืชอื่นต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด โดย สุรเชษฐ พัทฒใส (2554) ได้ทดสอบผลของ Ψ_s ของสารสกัดจากใบหญ้าสาบ (*Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M. King & H. Rob) โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีค่าความนำไฟฟ้าครอบคลุมค่าความนำไฟฟ้าของสารสกัดจากใบหญ้าสาบที่นำมาทดสอบ พบว่า สารละลายทุกความเข้มข้นไม่มีผลยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืชทดสอบ แสดงว่า Ψ_s ในระดับที่เทียบเท่ากับสารสกัดไม่มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้า ดังนั้นผลการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าของสารสกัดจากใบหญ้าสาบน่าจะเกิดจากสารบางชนิดที่มีอยู่ในใบพืช เช่นเดียวกับ Silva et al. (2013) ที่รายงานว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดกาแฟ (*Coffea arabica*) ที่มี Ψ_s สูงกว่า -0.2 MPa ไม่มีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids), ผักกาดขาว (*Brassica chinensis* var. *Parachinensis* (Sinskaja)) และหญ้าก้นจ้ำขาว (*Bidens pilosa* L.)

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อสรีรวิทยาการงอกบางประการ

ของเมล็ด

การดูดน้ำ

การศึกษาการดูดน้ำของเมล็ดข้าว และกวางตุ้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มี Ψ_s เท่ากับ -0.19 และ -0.08 MPa ตามลำดับ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า การดูดน้ำของเมล็ดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรก ซึ่งเกิดจากการดูดซับน้ำของเมล็ดแห้งด้วยวิธี imbibition หลังจากนั้นการดูดน้ำของเมล็ดเกิดขึ้นช้าลง ซึ่งเป็นระยะที่มีกิจกรรมเมแทบอลิซึมต่าง ๆ เกิดขึ้นภายในเมล็ดและใช้เวลานานกว่าระยะแรก และหลังจากนั้นการดูดน้ำของเมล็ดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นระยะการเจริญเติบโตหลังงอก (Bewley, 2001) อีกทั้งยังพบว่าการดูดน้ำของเมล็ดข้าวและกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมและสารละลายอื่นที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 4-9, 4-10) แสดงให้เห็นว่า Ψ_s ของสารสกัดที่นำมาทดสอบไม่มีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ดขณะงอก ดังนั้นเมล็ดที่ได้รับสารสกัด ยังคงสามารถดูดน้ำได้ตามปกติ ทั้งนี้การดูดน้ำของเมล็ดขึ้นกับ Ψ_s โดยถ้าสารละลายมีตัวถูกละลายอยู่มากมีผลทำให้ Ψ_s

มีค่าติดลบมากขึ้น และมีผลให้เมล็ดคุดน้ำไค้่น้อยลงจนอาจเป็นสาเหตุให้เมล็ดไม่งอก ซึ่งในการทดลองนี้พบว่า Ψ_s ของสารสกัดมีค่าเท่ากับ -0.08 และ -0.19 MPa สอดคล้องกับการทดลองของ Silva et al. (2013) ที่รายงานว่า ค่า Ψ_s สูงกว่า -0.2 MPa ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด ทั้งนี้การคุดน้ำของเมล็ดเป็นขั้นตอนแรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการงอกของเมล็ด น้ำจะทำให้เมล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้นและอ่อนนุ่มซึ่งจะทำให้ห่ออกซิเจนแพร่เข้าสู่เมล็ด ทำให้เมล็ดมีการหายใจ รวมทั้งน้ำจะไปละลายโปรโตพลาสซึมและกระตุ้นปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ ในกระบวนการงอกของเมล็ด รวมถึงกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยอาหารสะสมในเมล็ดที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็กเพื่อนำไปใช้ในการเจริญต่อไป (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2548; Bewley, 2001)

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แป้ง โปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase

ข้าว

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และแป้งของเมล็ดข้าวที่แชในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่มีปริมาณแป้งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4-11, 4-13, 4-15) โดยปกติปริมาณน้ำตาลสะสมในเมล็ดมักมีปริมาณจำกัด น้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในเมล็ดพืชขณะงอกนั้น ได้จากการย่อยแป้งซึ่งเป็นอาหารสะสมในเมล็ดพืช (Perata, Guglielminetti, & Alpi, 1997) ในเมล็ดข้าวมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 7.3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง (นิธิยา รัตนานนท์, 2549) ดังนั้นกระบวนการย่อยอาหารสะสมของเมล็ดข้าวจึงเป็นการย่อยแป้งเป็นส่วนใหญ่ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดไปยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งเอนไซม์ α -amylase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการดังกล่าว (Kato-Noguchi & Macias, 2005)

การศึกษาปริมาณโปรตีนของเมล็ดข้าวที่แชในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าชุดควบคุม อาจเป็นผลจากสารสกัดไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเมล็ดซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมีในเมล็ดขณะงอก เช่น การย่อยสลายอาหารสะสม และการหายใจ เป็นต้น (Bewley, 2001; Shankar et al., 2009) ซึ่งมีรายงานว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่นสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด และทำให้ปริมาณโปรตีนในเมล็ดพืชทดสอบลดลง เช่น สารสกัดจากใบช้อ (*Gmelina arborea*) (Shankar et al., 2009) สารสกัดจาก *Euphorbia hierosolymitana* (Abu-Romman et al., 2010) และสารสกัดจากใบงา (*Sesamum indicum*) (Hussain et al., 2017) เป็นต้น

การศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับความเสียหายจากกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ลดลง (ภาพที่ 4-17) ทำให้พบน้ำตาลในเมล็ดที่ได้รับความเสียหายน้อยลง เนื่องจากเอนไซม์ α -amylase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งที่สะสมในเมล็ดให้เป็นน้ำตาล (Kato-Noguchi & Macias, 2005) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ที่ลดลงนี้สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ดที่ลดลง เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน (Shankar et al., 2009) ทั้งนี้มีรายงานวิจัยถึงผลของสารสกัดจากพืชอื่นต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ด โดยมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ลดลง เช่น น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าปล้องละมาน (*Echinochloa crus-galli*) โดยไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase (Poonpaiboonpipat et al., 2013) เช่นเดียวกับ Madany and Saleh (2015) พบว่า สารสกัดจากต้นน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia helioscopia* L.) มีผลให้อัตราการงอกและกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ของเมล็ดข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) และถั่วลันเตา (*Pisum sativum* L.) ลดลง และยังพบว่า อัตราการงอกของเมล็ดมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase คือ เมื่อกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ลดลงจะส่งผลให้อัตราการงอกของเมล็ดลดลงด้วย เนื่องจากเมล็ดขณะงอกจะมีอัตราการหายใจสูงเพื่อสร้างพลังงานไปใช้ในกระบวนการงอกของเมล็ด และสารตั้งต้นที่สำคัญของปฏิกิริยาการหายใจ เช่น น้ำตาล ซึ่งจะได้จากการย่อยแป้งที่เป็นอาหารสะสมในเมล็ด และเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลคือ α -amylase (Kato-Noguchi & Macias, 2005; Uddin et al., 2017) ดังนั้นเมล็ดที่ได้รับความเสียหายความเข้มข้นต่ำในการทดลองที่ 1 อาจมีผลให้เมล็ดย่อยแป้งได้ช้าลง จึงทำให้เมล็ดงอกช้าลง ซึ่งทำให้เห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase มีส่วนสำคัญอย่างมากต่อการงอกของเมล็ด

กวางตุ้ง

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แป้ง และ โปรตีน ของเมล็ดกวางตุ้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมล็ดกวางตุ้งที่ได้รับความเสียหายมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่แป้งมีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 4-12, 4-14) ส่วนโปรตีนในเมล็ดที่ได้รับความเสียหายมีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุม และเมื่อหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดแห้ง พบว่า มีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างจากเมล็ดที่ได้รับความเสียหาย (ภาพที่ 4-16) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดไปยับยั้งกระบวนการย่อยสลายอาหารสะสมในเมล็ดคือแป้งและโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ghayal et al. (2014) ว่าเมล็ดถั่วเขียวที่ได้รับความเสียหายจากความเข้มข้นสูงจะมีปริมาณแป้งและโปรตีนในเมล็ดสูงกว่าเมล็ดที่ได้รับความเสียหายความเข้มข้นต่ำ และชุดควบคุม ตามลำดับ และจากการศึกษาผลของสารสกัด

จากใบผักแคร์ดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่ากระบวนการย่อยสลายโปรตีนสะสมในเมล็ดกวางตุ้งถูกรบกวน โดยอาจเป็นผลจากสารอัลลีโลพาธิ์ไปยับยั้งโดยตรงหรือโดยอ้อม และเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนระหว่างการงอกของเมล็ด คือ เอนไซม์ protease (Han et al., 2008; Safari et al., 2009; Turk & Tawaha, 2003) ในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์ protease แต่อย่างไรก็ตาม Al-Watban and Salama (2012) ได้รายงานถึงผลของสารสกัดจาก *Artemisia monosperma* ว่าสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) ได้ โดยพบว่าเมล็ดที่ได้รับสารสกัดจะมีปริมาณน้ำตาลในเมล็ดต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่มีปริมาณแป้งและโปรตีนในเมล็ดสูงกว่า และยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase และ Protease ในเมล็ดจะลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจาก *Artemisia monosperma* ไปยับยั้งกระบวนการย่อยอาหารสะสมในเมล็ดถั่ว โดยมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase และ Protease ในเมล็ดลดลง

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากใบผักแคร์ดมีสารอัลลีโลพาธิ์ที่สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวและกวางตุ้งได้ โดยความสามารถในการยับยั้งจะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และสารสกัดสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดกวางตุ้งมากกว่าข้าว

osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัดไม่มีผลยับยั้งการงอก แต่มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวและกวางตุ้ง และไม่มีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ด

สารสกัดจากใบผักแคร์ดมีผลต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ดข้าวและกวางตุ้ง ซึ่งในเมล็ดข้าวสารสกัดมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยทำให้เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณโปรตีนในเมล็ดต่ำกว่าชุดควบคุม และมีผลต่อกระบวนการย่อยสลายอาหารสะสมในเมล็ด ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดที่ได้รับสารสกัดต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่ปริมาณแป้งสูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งเป็นผลจากสารสกัดไปมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดลดลง ส่วนในเมล็ดกวางตุ้งสารสกัดมีผลยับยั้งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นอาหารสะสมในเมล็ด จึงทำให้เมล็ดกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าชุดควบคุม และไม่แตกต่างจากเมล็ดแห้ง

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแคร์ดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ protease และหาปริมาณกรดอะมิโนด้วย
2. ควรศึกษาผลของสารสกัดในเมล็ดพืชที่มีไขมันเป็นอาหารสะสมหลักด้วย

บรรณานุกรม

- กนกพร ช้างเสวก, จำรูญ เล้าสินวัฒนา และมณฑินี ชีรารักษ์. (2553). ศักยภาพของสารสกัดจากชะอมในการยับยั้งการงอก การเจริญเติบโต และการแบ่งเซลล์ของพืชทดสอบ. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 28, 65-73.
- จันทน์ สนธิ. (2554). *การศึกษากลไกการทำลายวัชพืชของสารธรรมชาติกำจัดวัชพืชจากพืชชาค้ำแกง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชสวน, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ไฉน ยอดเพชร. (2542). *พืชผักในตระกูลครุฑชิฟอร*. กรุงเทพฯ ฯ: ไร่เขียว
- เต็ม สมิตินันท์. (2544). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย*. กรุงเทพฯ ฯ; สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, สำนักวิชาการป่าไม้, กรมป่าไม้.
- ชมลวรรณ เทพคุณ และสุพรรณิกา อินต๊ะนนท์. (2559). อัลลีโลพาตีของสารสกัดสาบม่วงที่ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวและข้าว. ใน *การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 14* (หน้า 171-176). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- นิธิยา รัตนานนท์. (2549) *เคมีอาหาร*. กรุงเทพฯ ฯ: โอเดียนสโตร์.
- บุญรอด ชาตียนนท์. (2544). *ผลของสารสกัดจากใบประยงค์ต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชสวน, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ปฎิมา หวานแก้ว. (2545). *ผลของสารสกัดจากใบมะฮอกกานีต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชสวน, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ภัทริน วิจิตรตระการ, มณฑินี ชีรารักษ์, พัทณี เจริญยิ่ง และจำรูญ เล้าสินวัฒนา. (2555). ผลในการยับยั้งการงอกของสารสกัดน้ำจากดาวเรืองและการแยกกลุ่มสารออกฤทธิ์. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 30 (3), 87-94.
- ภาคภูมิ พระประเสริฐ. (2550). *สรีรวิทยาของพืช*. กรุงเทพฯ ฯ: โอเดียนสโตร์.
- ภาคภูมิ พระประเสริฐ และวรัญญา นามนาเมือง. (2548). ผลของสารสกัดจากผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 10 (1-2), 68-75.
- ลิลลี่ กาวีตะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์, สุริยา ดันติวิวัฒน์ และณรงค์ วงศ์กันทรากร. (2556). *สรีรวิทยาของพืช* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ ฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ศิริพร ชิ่งสนธิพร และช่อม เปรมย์เลื้อย. (2537). ผลของสารสกัดจากวัชพืชสาบหมาต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชปลูกและวัชพืชบางชนิด. *วารสารวิชาการเกษตร*, 12(1), 37-41.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2548). *สรีรวิทยาของพืช* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุพุมลย์ เลิศมงคล. (2557). ผลทางอัลลีโลพาธิกของผักเสี้ยนดอกม่วงต้นสดและต้นแห้งต่อการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนกและผักโขมหนาม. *วารสารวิจัย*, 8 (1), 1-6.
- สุรเชษฐ พัฒนาไส. (2554). *อัลลีโลพาธิกของหญ้าสาบหมาต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชปลูกบางชนิด*. ปรินฤณานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- Abraham, D., Francischini, A. C., Pergo, E. M., Kelmer-Brach, A. M., & Ishii-Iwamoto, E. L. (2003). Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 985–991.
- Abu-Romman, S., Shatnawi, M., & Shibli, R. (2010). Allelopathic Effects of Spurge (*Euphorbia hirsolutana*) on Wheat (*Triticum durum*). *Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 7 (3), 298-302.
- Adjibode, A. G., Tougan, U. P., Youssao, A. K., Mensah, G. A., Hanzen, Ch., & Koutinhoun, G. B. (2015). *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn: a review on its phytochemical screening and uses in animal husbandry and medicine. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 5(3), 436-443.
- Al-Humaid, A., & Warrag, M. O. A. (1998). Allelopathic effects of mesquite (*Prosopis juliflora*) foliage on seed germination and seedling growth of bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Journal of Arid Environments*, 38(1998), 237-243.
- Al-Watban, A., & Salama, H. M. H. (2012). Physiological effects of allelopathic Activity of *Artemisia monosperma* on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Research Journal of Plant Science*, 3(8), 2141-5447.
- Ashrafi, Z. Y., Sadeghi, S., & Mashhadi, H. (2009). Inhibitive effects of barley (*Hordeum vulgare*) on germination and growth of seedling quack grass (*Agropyrum repens*). *Agricultural Sciences*, 22, 37-43.

- Aslani, F., Juraimi, A. S., Ahmad-Hamdani, M. S., Hashemi, F. S. G., Alam, M. A., Hakim, M. A., & Uddin, M. K. (2016). Effects of *Tinospora tuberculata* leaf methanol extract on seedling growth of rice and associated weed species in hydroponic culture. *Journal of Integrative Agriculture*, *15*(7), 1521-1531.
- Babula, P., Vaverkova, V., Poborilova, Z., Ballova, L., Masarik, M., & Provaznik, I. (2014). Phytotoxic action of naphthoquinone juglone demonstrated on lettuce seedling roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, *84*, 78-86.
- Batish, D. R., Setia, N., Singh, H. P., & Kohli, R. K. (2004). Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. *Crop Protection*, *23*(12), 1209-1214.
- Bewley, J. D. (2001). Seed Germination and Reserve Mobilization. *Reviews in the Life Sciences*, 1-7.
- Bhowmik, P.C. (1988). Cinmethylin for weed control in soybean, *Glycine max*. *Weed Science*, *36*, 678-682.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.
- Chung, I. M., Kim, K. H., Ahn, J. K., Lee, S. B., Kim S. H., Hahn., & Hahn, S. J. (2003). Comparison of allelopathic potential of rice leaves, straw and hull extract on barnyardgrass. *Agronomy Journal*, *95*, 1063-1070.
- Dayan, F.E., Romagni, J.G., Tellez, M., Rimando, A., & Duke, S. (1999). Managing weeds with bio-synthesized products. *Pesticide Outlook*, *10*, 185-188.
- Debnath, B., Debnath, A., & Paul, C. (2016). Allelopathic Effects of invasive weed (*Solanum Sisymbriifolium* Lamk.) on germination and seedling growth of four widely cultivated Indian crops. *International Journal of Science and Nature*, *7*(1), 194-198.
- Djurdjevic, L., Dinic, A., Pavlovic, P., Mitrovic, M., Karadzic, B., & Tesevic, V. (2004). Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, *32*(6), 533-544.
- Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Ghayal, N.A., Biware, M.V., & Dhumal, K.N. (2014). Effect of leachates of alien weeds on seed germination, seedling growth and physiology in mungbean. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 3(4), 141-148.
- Golubinova, I., & Ilieva, A. (2014). Allelopathic effects of water extracts of *Sorghum halepense* (L.) pers., *Convolvulus arvensis* L. and *Cirsium arvense* Scop. on early seedling growth of some leguminous crops. *Pesticidi I Fitomedicina*, 29(1), 35-43.
- Han, C. M., Pan, K. W., Wu, N., Wang, J. C., & Li, W. (2008). Allelopathic effect of ginger on seed germination and seedling growth of soybean and chive. *Scientia Horticulturae*, 116(3), 330-336.
- Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., & Singh, H. (2017). Allelopathic potential of sesame plant leachate against *Cyperus rotundus* L. *Annals of Agrarian Science*, 15, 141-147.
- Javaid, A., Shafique, S., Bajwa, R., & Shafique, S. (2006). Effect of aqueous extracts of allelopathic crops on germination and growth of *Parthenium hysterophorus* L. *South African Journal of Botany*, 72(4), 609-612.
- Jelassi, A., Ayeub-Zakhama, A. El, Nejma, A. Ben, Chaari, A., Harzallah-Skhiri, F., & Jannet, H. Ben. (2016). Phytochemical composition and allelopathic potential of three Tunisian *Acacia* species. *Industrial Crops and Products*, 83, 339-345.
- Kato-Noguchi, H., & Macías, F. A. (2005). Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the germination and α -amylase activity in lettuce seeds. *Journal of Plant Physiology*, 162(12), 1304-1307.
- Kaur, S., Singh, H. P., Mittal, S., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2010). Phytotoxic effects of volatile oil from *Artemisia scoparia* against weeds and its possible use as a bioherbicide. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 54-61.
- Khanh, T. D., Hong, N. H., Nhan, O. Q., Kim, S. L., Chung I. M., & Xuan, T. D. (2006). Herbicidal activity of *Stylosanthes guianensis* and its phytotoxic components. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 192(6), 427-433.
- Kil, J. H., Shim, K. C., & Lee, K. J. (2002). Allelopathy of *Tagetes minuta* L. aqueous extracts on seed germination and root hair growth. *Korean Journal Ecology Science*, 1, 171-174.

- Ladhari, A., Omezzine, F., DellaGreca, M., Zarrelli, A., Zuppolini, S., & Haouala, R. (2013). Phytotoxic activity of *Cleome arabica* L. and its principal discovered active compounds. *South African Journal of Botany*, 88, 341-351.
- Madany, M. M. Y., & Saleh, A. M. (2015). Phytotoxicity of *Euphorbia helioscopia* L. on *Triticum aestivum* L. and *Pisum sativum* L. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1), 141-151.
- Mahmoodzadeh, H., & Mahmoodzadeh, M. (2013). Allelopathic potential of soybean (*Glycine max* L.) on the germination and root growth of weed species. *Life Science Journal*, 10 (5), 63-69.
- Marinov-Serafimov, P. (2010). Determination of allelopathic effect of some invasive weed species on germination and initial development of grain legume crops. *Pesticidi I Fitomedicina*, 25(3), 251-259.
- Murataza, G., & Asghara, A. R. (2012). α -Amylase activities during seed development and germination in pea (*Pisum sativum* L.) treated with salicylic acid. *Pakistan Journal of Botany*, 44(6), 1823-1829.
- Palacios, S. M., Corral del, S., Carpinella, M. C., & Ruiz, G. (2010). Screening for natural inhibitors of germination and seedling growth in native plants from Central Argentina. *Industrial Crops and Products*, 32, 674-677.
- Perata, P., Guglielminetti, L., & Alpi, A. (1997). Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Annals of Botany*, 79, 49-56.
- Poonpaiboonpipat, T., Pangnakorn, U., Suvunnamek, U., Teerarak, M., Charoenying, P., & Laosinwattana, C. (2013). Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Industrial Crops and Products*, 41, 403-407.
- Pudelko, K., Majchrzak, L., & Narozna, D. (2014). Allelopathic effect of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) on monocot and dicot plant species. *Industrial Crops and Products*, 56, 191-199.
- Putnam, A. R. (1988). Allelochemical from plants as Herbicides. *Weed Technology*, 2, 510-518.
- Rajendiran, K., Amudhavalli, R., & Vijayalakshmi, R. (2014). Allelopathy and cytotoxicity of aqueous extracts of *Lantana camara* L. on *Oryza sativa* L. var. ADT-37, 4(1), 172-178.

- Rice, E. L. (1984). *Allelopathy* (2nd ed.). Orlando, Florida: Academic Press.
- Rietveld, W. J. (1983). Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *Journal of Chemical Ecology*, 9(2), 295-308.
- Rose, R., Rose, C. L., Omi, S. K., Foory, K.R., Durall, D. M., & Bigg, W. L. (1991). Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluation the accuracy and precision of six colorimetric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 2-11.
- Santos, P. C., Santos, V. H. M., Mecina, G. F., Andrade, A. R., Fegueiredo, P. A., Moraes, V. M.O., Silva, L. P., & Silva, R. M. G. (2015). Phytotoxicity of *Tagetes erecta* L. and *Tagetes patula* L. on plant germination and growth. *South African Journal of Botany*, 100, 114-121.
- Scrivanti, L. R. (2010). Allelopathic potential of *Bothriochloa laguroides* var. *laguroides* (DC.) Herter (Poaceae: Andropogoneae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(5), 302-305.
- Shankar Madhan, S.R., Girish, R., Karthik, N., Rajendran, R., & Mahendran, V.S. (2009). Allelopathic effects of phenolics and terpenoids extracted from *Gmelina arborea* on germination of Black gram (*Vigna mungo*) and Green gram (*Vigna radiata*). *Allelopathy Journal*, 23 (2), 323-332.
- Silva, R. M. G., Brigatti, J. G. F., Santos, V. H. M., Mecina, G. F., & Silva, L. P. (2013). Allelopathic effect of the peel of coffee fruit. *Scientia Horticulturae*, 158, 39-44.
- Taban, A., & Saharkhiz, M. J. (2015). Natural phytotoxic activity of water extracts and dried leaf powders of three *Satureja* species. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 594-602.
- Tesio, F., Weston, L. A., & Ferrero, A. (2011). Allelochemicals identified from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) residues and their potential inhibitory activity in the field and laboratory. *Scientia Horticulturae*, 129(3), 361-368.
- Turk, M. A., & Tawaha, A. M. (2003). Allelopathic effect of black mustard (*Brassica nigra* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.). *Crop Protection*, 22, 673-677.
- Uddin, M., Robinson, R., Buultjens, A., Al Harun, M., & Shampa, S. (2017). Role of allelopathy of *Phragmites australis* in its invasion processes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 486, 237-244.

William, C. S., & William F.S. (1931). A method for the determination of the freezing point depression of aqueous solutions particularly those containing protein. *Journal of Biological Chemistry*, 91, 217-226.

Yenish, J. P., Worsham, A. D., & Chilton, W. S. (1995). Disappearance of DIBOA-glucoside, DIBOA, and BOA from rye (*Secale cereal* L.) cover crop residue. *Weed Science*, 43, 18-20.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ผลการทดสอบทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของข้าว
(*Oryza sativa* L.) ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

วันที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	4	.000	.000	1.000
Within Groups	.000	15	.000		
Total	.000	19			

วันที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.800	4	3.200	3.000	.053
Within Groups	16.000	15	1.067		
Total	28.800	19			

วันที่ 3

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37036.800	4	9259.200	19.639	.000
Within Groups	7072.000	15	471.467		
Total	44108.800	19			

ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
19.5	4	.0000	
26.0	4	.0000	
13.0	4	24.0000	
control	4		94.0000
6.5	4		94.0000
Sig.		.541	1.000

วันที่ 4

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	38459.200	4	9614.800	316.276	.000
Within Groups	456.000	15	30.400		
Total	38915.200	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
26.0	4	.0000		
19.5	4	4.0000		
13.0	4		18.0000	
6.5	4			95.0000
control	4			97.0000
Sig.		.840	1.000	.985

ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

วันที่ 5

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37232.000	4	9308.000	436.313	.000
Within Groups	320.000	15	21.333		
Total	37552.000	19			

Tukey HSD

CONC	N	Subset for alpha = .05		
(mg/ml)		1	2	3
26.0	4	2.0000		
19.5	4	7.0000		
13.0	4		25.0000	
6.5	4			97.0000
control	4			99.0000
Sig.		.560	1.000	.971

วันที่ 6

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32548.800	4	8137.200	55.180	.000
Within Groups	2212.000	15	147.467		
Total	34760.800	19			

ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
26.0	4	4.0000		
19.5	4	12.0000		
13.0	4		55.0000	
6.5	4			97.0000
control	4			99.0000
Sig.		.880	1.000	.999

วันที่ 7

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28460.800	4	7115.200	67.379	.000
Within Groups	1584.000	15	105.600		
Total	30044.800	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
26.0	4	11.0000		
19.5	4	20.0000		
13.0	4		75.0000	
6.5	4		97.0000	97.0000
control	4			99.0000
Sig.		.730	.056	.999

ตารางภาคผนวก ก-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของกวางตุ้ง
(*Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) ที่ได้รับ
สารสกัดจากใบผักแคร์ทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

วันที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11707.200	4	2926.800	116.761	.000
Within Groups	376.000	15	25.067		
Total	12083.200	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
13.0	4	5.0000		
6.5	4	6.0000		
2.6	4		18.0000	
1.3	4		24.0000	
control	4			71.0000
Sig.		.998	.466	1.000

ตารางภาคผนวก ก-2 (ต่อ)

วันที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18484.800	4	4621.200	63.246	.000
Within Groups	1096.000	15	73.067		
Total	19580.800	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
13.0	4	9.0000		
6.5	4	11.0000		
2.6	4		36.0000	
1.3	4		50.0000	
control	4			92.0000
Sig.		.997	.193	1.000

วันที่ 3

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16587.200	4	4146.800	71.661	.000
Within Groups	868.000	15	57.867		
Total	17455.200	19			

ตารางภาคผนวก ก-2 (ต่อ)

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
13.0	4	12.0000			
6.5	4	19.0000			
2.6	4		39.0000		
1.3	4			57.0000	
control	4				92.0000
Sig.		.694	1.000	1.000	1.000

วันที่ 4

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15224.000	4	3806.000	36.975	.000
Within Groups	1544.000	15	102.933		
Total	16768.000	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
13.0	4	15.0000			
6.5	4	30.0000	30.0000		
2.6	4		39.0000		
1.3	4			62.0000	
control	4				94.0000
Sig.		.274	.721	1.000	1.000

ตารางภาคผนวก ก-2 (ต่อ)

วันที่ 5

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15224.000	4	3806.000	36.975	.000
Within Groups	1544.000	15	102.933		
Total	16768.000	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
13.0	4	15.0000			
6.5	4	30.0000	30.0000		
2.6	4		39.0000		
1.3	4			62.0000	
control	4				94.0000
Sig.		.274	.721	1.000	1.000

วันที่ 6

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15059.200	4	3764.800	34.603	.000
Within Groups	1632.000	15	108.800		
Total	16691.200	19			

ตารางภาคผนวก ก-2 (ต่อ)

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
13.0	4	15.0000			
6.5	4	31.0000	31.0000		
2.6	4		41.0000	41.0000	
1.3	4			63.0000	
control	4				94.0000
Sig.		.243	.663	.061	1.000

วันที่ 7

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15876.800	4	3969.200	29.474	.000
Within Groups	2020.000	15	134.667		
Total	17896.800	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
13.0	4	15.0000		
6.5	4	31.0000	31.0000	
2.6	4		43.0000	
1.3	4			70.0000
control	4			94.0000
Sig.		.335	.600	.068

ตารางภาคผนวก ก-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความยาวรากและความยาวยอด
ของข้าว ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความยาวราก ข้าว	Between Groups	81.865	4	20.466	973.982	.000
	Within Groups	.315	15	.021		
	Total	82.180	19			
ความยาวยอด ข้าว	Between Groups	26.853	4	6.713	1514.850	.000
	Within Groups	.066	15	.004		
	Total	26.919	19			

ความยาวรากข้าว

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
19.5	4	.1000		
26.0	4	.1000		
13.0	4	.1962		
6.5	4		.5640	
control	4			5.2799
Sig.		.877	1.000	1.000

ตารางภาคผนวก ก-3 (ต่อ)

ความยาวยอดข้าว

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
19.5	4	.0000			
26.0	4	.0000			
13.0	4		.4272		
6.5	4			.6750	
control	4				3.0993
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางภาคผนวก ก-4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความยาวรากและความยาวยอดของกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความยาวราก กวางตุ้ง	Between Groups	22.628	4	5.657	62.956	.000
	Within Groups	1.348	15	.090		
	Total	23.976	19			
ความยาวยอด กวางตุ้ง	Between Groups	28.387	4	7.097	42.861	.000
	Within Groups	2.484	15	.166		
	Total	30.871	19			

ตารางภาคผนวก ก-4 (ต่อ)

ความยาวรากวางตั้ง

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
13.0	4	.1433		
6.5	4	.1533		
2.6	4	.3579		
1.3	4		1.1494	
control	4			2.9453
Sig.		.846	1.000	1.000

ความยาวยอด

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
6.5	4	.0000	
13.0	4	.0000	
2.6	4		2.0713
1.3	4		2.5621
control	4		2.5767
Sig.		1.000	.432

ตารางภาคผนวก ก-5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของข้าวที่ได้รับ
สารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	4	.001	3.744	.026
Within Groups	.005	15	.000		
Total	.009	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
control	4	.5811	
6.5	4	.5901	.5901
19.5	4	.6123	.6123
26.0	4	.6145	.6145
13.0	4		.6194
Sig.		.098	.174

ตารางภาคผนวก ก-6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของกวางตุ้งที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	4	.000	10.433	.000
Within Groups	.000	15	.000		
Total	.000	19			

Tukey HSD

CONC (mg/ml)	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
control	4	.0455	
2.6	4		.0532
6.5	4		.0543
1.3	4		.0545
13.0	4		.0577
Sig.		1.000	.205

ตารางภาคผนวก ก-7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของข้าว
ที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น
15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์
และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็น
ชุดควบคุม

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	139.700	4	34.925	24.366	.000
Within Groups	21.500	15	1.433		
Total	161.200	19			

Tukey HSD

SAMPLE	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
extract	4	17.0000	
KNO ₃	4		22.7500
control	4		23.5000
sucrose	4		23.5000
NaCl	4		24.2500
Sig.		1.000	.424

ตารางภาคผนวก ก-8 เปรูเซ็นต์การงอกของกวางตุ้งที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจาก
ใบผักแคร์ดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลาย
ซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และ โพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับ
สารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	495.700	4	123.925	107.761	.000
Within Groups	17.250	15	1.150		
Total	512.950	19			

Tukey HSD

SAMPLE	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
extract	4	11.0000	
control	4		23.2500
NaCl	4		23.2500
KNO ₃	4		23.5000
sucrose	4		23.7500
Sig.		1.000	.962

ตารางภาคผนวก ก-9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความยาวรากและความยาวยอด
ของข้าว และกวางตุ้ง ที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครด
ที่ IC₅₀ (ความเข้มข้น 15.16 และ 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) และ
สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s
เท่ากับสารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความยาวราก ข้าว	Between Groups	93.478	4	23.370	43.521	.000
	Within Groups	8.055	15	.537		
	Total	101.533	19			
ความยาวยอด ข้าว	Between Groups	27.850	4	6.963	71.437	.000
	Within Groups	1.462	15	.097		
	Total	29.312	19			
ความยาวราก กวางตุ้ง	Between Groups	55.002	4	13.750	61.749	.000
	Within Groups	3.340	15	.223		
	Total	58.342	19			
ความยาวยอด กวางตุ้ง	Between Groups	43.154	4	10.788	73.261	.000
	Within Groups	2.209	15	.147		
	Total	45.363	19			

ตารางภาคผนวก ก-9 (ต่อ)

ความยาวรากข้าว

Tukey HSD

Sample	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
extract	4	.1890	
sucrose	4		5.0270
KNO ₃	4		5.2072
control	4		5.8193
NaCl	4		6.0095
Sig.		1.000	.360

ความยาวยอดข้าว

Tukey HSD

Sample	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
extract	4	.5892			
sucrose	4		2.2467		
NaCl	4		2.8806	2.8806	
control	4			3.1822	
KNO ₃	4				4.1417
Sig.		1.000	.074	.657	1.000

ตารางภาคผนวก ก-9 (ต่อ)

ความยาวรากกว้างตั้ง

Tukey HSD

Sample	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
extract	4	.1271		
sucrose	4		2.6137	
control	4		3.0093	
KNO ₃	4			4.3399
NaCl	4			4.8848
Sig.		1.000	.759	.500

ความยาวยอดคกว้างตั้ง

Tukey HSD

Sample	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
extract	4	.2708		
control	4		2.3934	
sucrose	4		2.4571	
NaCl	4			4.2270
KNO ₃	4			4.2507
Sig.		1.000	.999	1.000

ตารางภาคผนวก ก-10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการดูดน้ำของเมล็ดข้าวที่แช่ใน สารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 72

ชั่วโมงที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	4	.001	1.724	.197
Within Groups	.007	15	.000		
Total	.011	19			

ชั่วโมงที่ 3

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	4	.000	1.424	.274
Within Groups	.005	15	.000		
Total	.007	19			

ชั่วโมงที่ 6

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	.918	.479
Within Groups	.006	15	.000		
Total	.007	19			

ตารางภาคผนวก ก-10 (ต่อ)

ชั่วโมงที่ 12

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	4	.001	2.003	.146
Within Groups	.006	15	.000		
Total	.010	19			

ชั่วโมงที่ 24

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	4	.001	1.926	.158
Within Groups	.007	15	.000		
Total	.010	19			

ชั่วโมงที่ 48

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	.505	.733
Within Groups	.007	15	.000		
Total	.007	19			

ตารางภาคผนวก ก-10 (ต่อ)

ชั่วโมงที่ 72

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.010	4	.002	2.967	.054
Within Groups	.012	15	.001		
Total	.022	19			

ตารางภาคผนวก ก-11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบการดูดน้ำของเมล็ดคางคังที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรด ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 24

ชั่วโมงที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	4	.000	.651	.635
Within Groups	.010	15	.001		
Total	.012	19			

ชั่วโมงที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	.335	.850
Within Groups	.009	15	.001		
Total	.010	19			

ตารางภาคผนวก ก-11 (ต่อ)

ชั่วโมงที่ 3

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	.335	.850
Within Groups	.009	15	.001		
Total	.010	19			

ชั่วโมงที่ 6

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	.335	.850
Within Groups	.009	15	.001		
Total	.010	19			

ชั่วโมงที่ 9

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	4	.001	1.400	.281
Within Groups	.010	15	.001		
Total	.014	19			

ตารางภาคผนวก ก-11 (ต่อ)

ชั่วโมงที่ 12

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	4	.000	.997	.439
Within Groups	.006	15	.000		
Total	.008	19			

ชั่วโมงที่ 24

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	4	.000	.651	.635
Within Groups	.010	15	.001		
Total	.012	19			

ตารางภาคผนวก ก-12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แป้ง
โปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัด
จากใบผักแคร์ดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา
7 วัน

Independent samples t-test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Reducing sugar	Equal variances assumed	1.789	.229	9.409	6	.000	2.3725	.25214	1.75556	2.98950
	Equal variances not assumed			9.409	3.789	.001	2.3725	.25214	1.65684	3.08822
Starch	Equal variances assumed	.494	.508	-1.348	6	.000	-62.5975	4.79735	74.33620	50.85880
	Equal variances not assumed			-1.348	5.095	.000	-62.5975	4.79735	74.86064	50.33436
Protein	Equal variances assumed	4.210	.086	8.726	6	.000	.0386	.00442	.02774	.04937
	Equal variances not assumed			8.726	3.314	.002	.0386	.00442	.02522	.05189
α -amylase activity	Equal variances assumed	1.910	.216	5.305	6	.002	7.9490	1.49840	4.28252	11.61544
	Equal variances not assumed			5.305	3.720	.007	7.9490	1.49840	3.66232	12.23564

ตารางภาคผนวก ก-13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แป้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดคางคังที่แช่ในสารสกัด จากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน

Independent samples t-test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Reducing sugar	Equal variances assumed	5.080	.065	12.781	6	.000	1.0132	.07927	.81920	1.20715
	Equal variances not assumed			12.781	3.247	.001	1.0132	.07927	.77139	1.25495
Starch	Equal variances assumed	6.905	.039	-2.788	6	.032	-25.7875	9.25091	48.42367	3.15133
	Equal variances not assumed			-2.788	3.229	.063	-25.7875	9.25091	54.08203	2.50703
α -amylase activity	Equal variances assumed	2.278	.182	-1.657	6	.149	-.0574	.03467	-.14228	.02739
	Equal variances not assumed			-1.657	3.788	.177	-.0574	.03467	-.15587	.04098

ตารางภาคผนวก ก-14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบปริมาณ โปรตีนในเมล็ด
 กวางตุ้งที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 2.96
 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเมล็ดแห้ง เป็นเวลา 7 วัน โดยมีเมล็ดที่แช่ใน
 น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower		Upper
Control extract	Equal variances assumed	.064	.809	- 5.840	6	.001	-.0709	.01214	- .10058	- .04118
	Equal variances not assumed			- 5.840	5.819	.001	-.0709	.01214	- .10080	- .04096
Extract Dry seed	Equal variances assumed	5.164	.063	-.031	6	.976	-.0012	.04037	- .10004	.09755
	Equal variances not assumed			-.031	3.232	.977	-.0012	.04037	- .12468	.12219

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ในเมล็ด

1.1 Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

40 mM Dinitrosalicylic acid	1.82 กรัม
400 mM Sodium hydroxide	3.20 กรัม
1 M Potassium sodium tartrate	56.44 กรัม

2. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (starch content) ในเมล็ด

2.1 acetate buffer

สารละลาย A: ผสมสารละลาย acetic acid 2.4 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 197.6 มิลลิลิตร

สารละลาย B: ละลาย sodium acetate 5.444 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

สารละลาย C: นำสารละลาย A 51 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 49 มิลลิลิตร

ได้สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปปรับ pH เป็น 4.6 ด้วย HCl

2.2 เอนไซม์ α -amylase

α -amylase 25 มิลลิกรัมต่อสารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร

2.3 เอนไซม์ Amyloglucosidase

Amyloglucosidase 55 มิลลิกรัมต่อสารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร

3. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ α -amylase

3.1 Tris-HCl buffer pH 7.5

100 mM Tris	1.82 กรัม
1 mM Ethylene diamine tetraacetic acid	0.05 กรัม
5 mM Magnesium chloride	0.15 กรัม
5 mM Dithiothreitol	0.12 กรัม
10 mM Sodium hydrogen sulfite	0.16 กรัม
Bovine serum albumin (BSA)	0.75 กรัม

ละลายในกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 7.5

3.2 3 mM Calcium chloride 0.66 กรัม

3.3 Sodium acetate

100 mM Na-acetate	2.04 กรัม
10 mM Calcium chloride	0.22 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.0

3.4 น้ำแป้ง

แป้ง

2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น

100 มิลลิลิตร

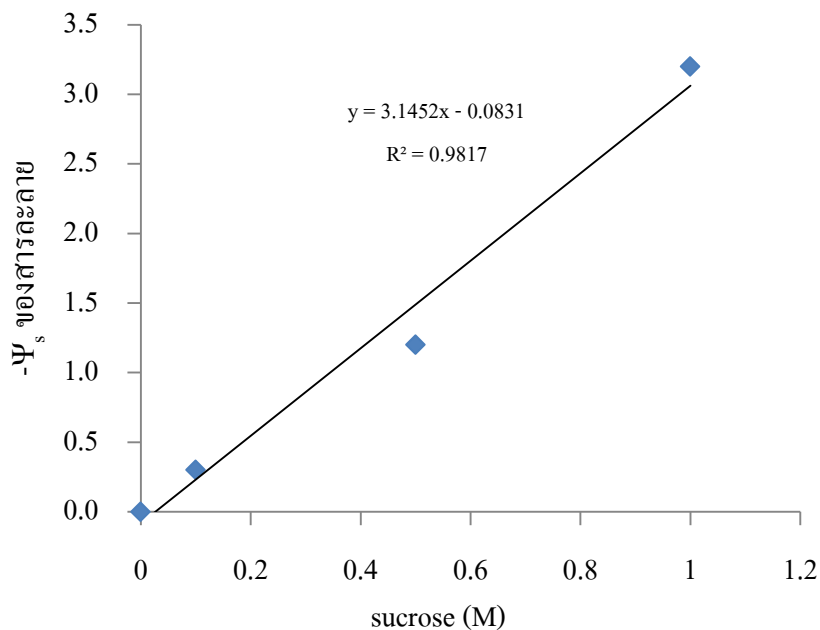
นำไปต้มจนแป้งสุก

4. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนในเมล็ด

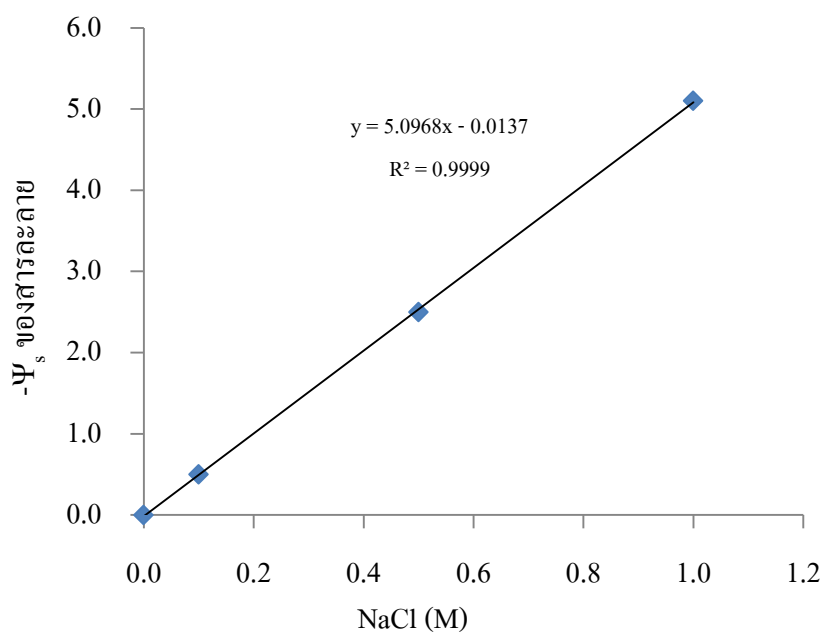
4.1 Tris-HCl buffer pH 7.5 (เช่นเดียวกับการวิเคราะห์เอนไซม์ α -amylase แต่ไม่ได้

Bovine serum albumin

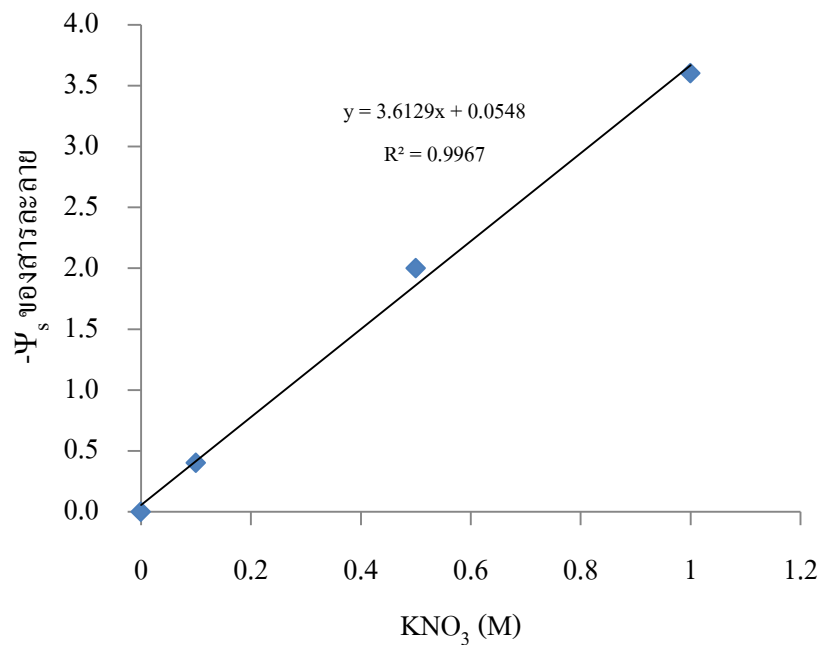
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน



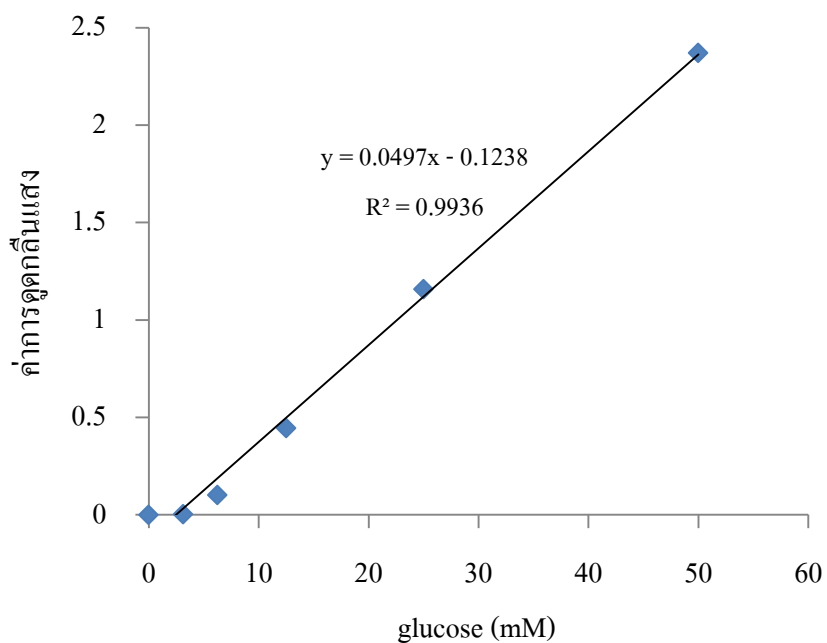
ภาพภาคผนวก ค-1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (sucrose) กับ Ψ_s ของสารละลาย



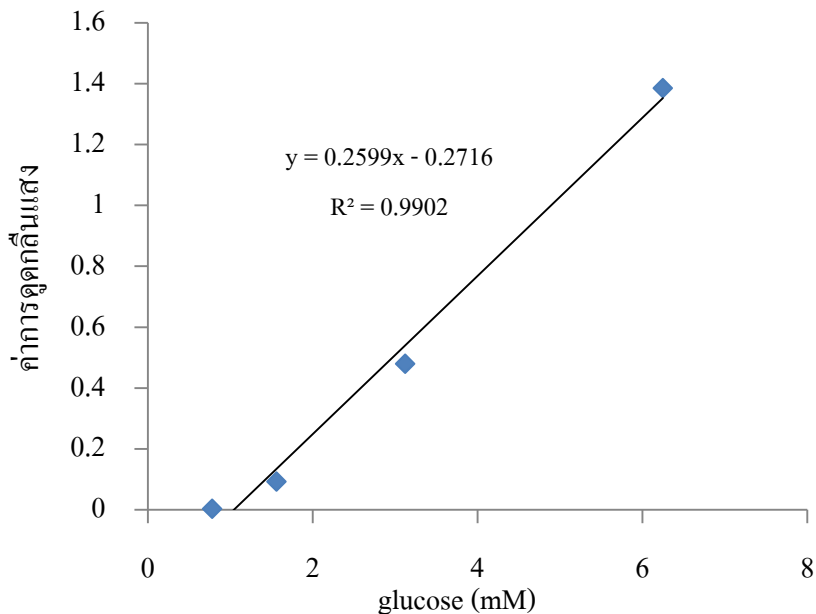
ภาพภาคผนวก ค-2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) กับ Ψ_s ของสารละลาย



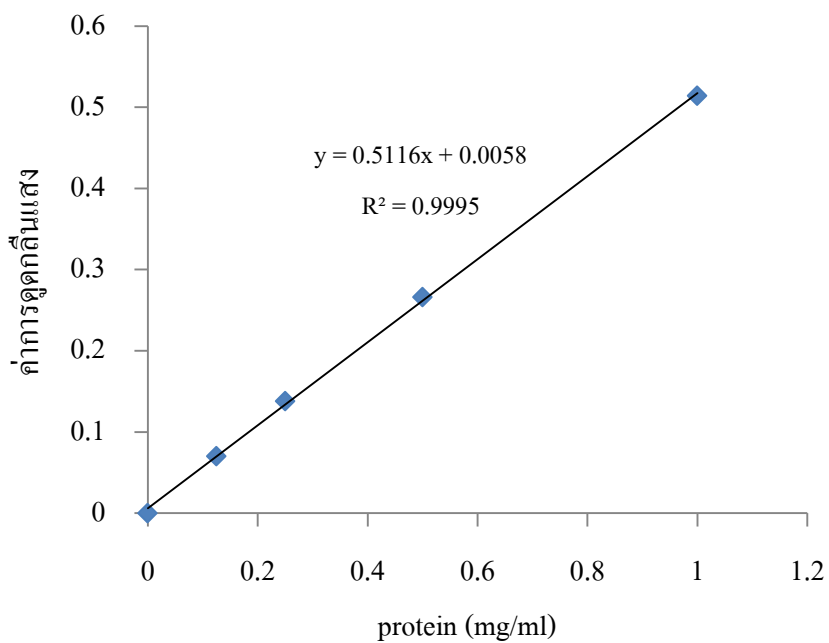
ภาพภาคผนวก ค-3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) กับ Ψ_s ของสารละลาย



ภาพภาคผนวก ค-4 กราฟมาตรฐานกลูโคส

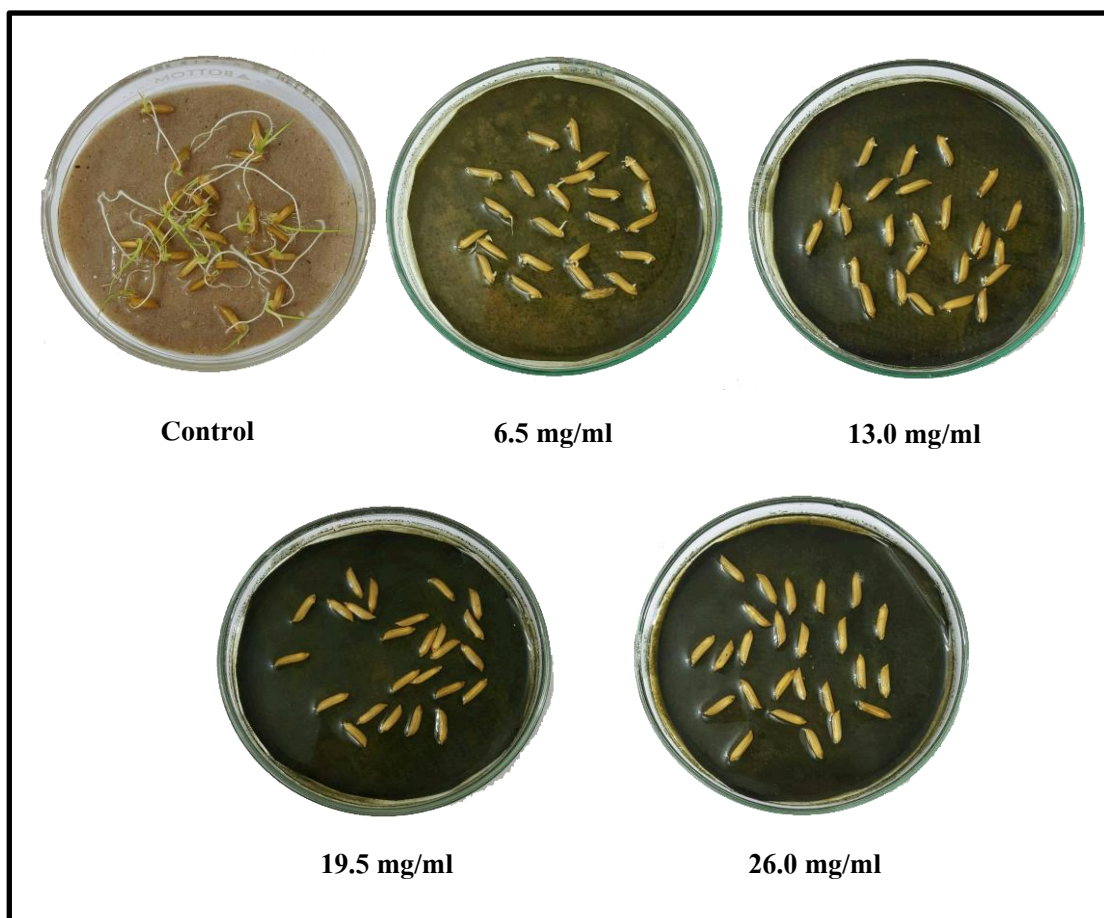


ภาพภาคผนวก ค-5 กราฟมาตรฐานแป้ง

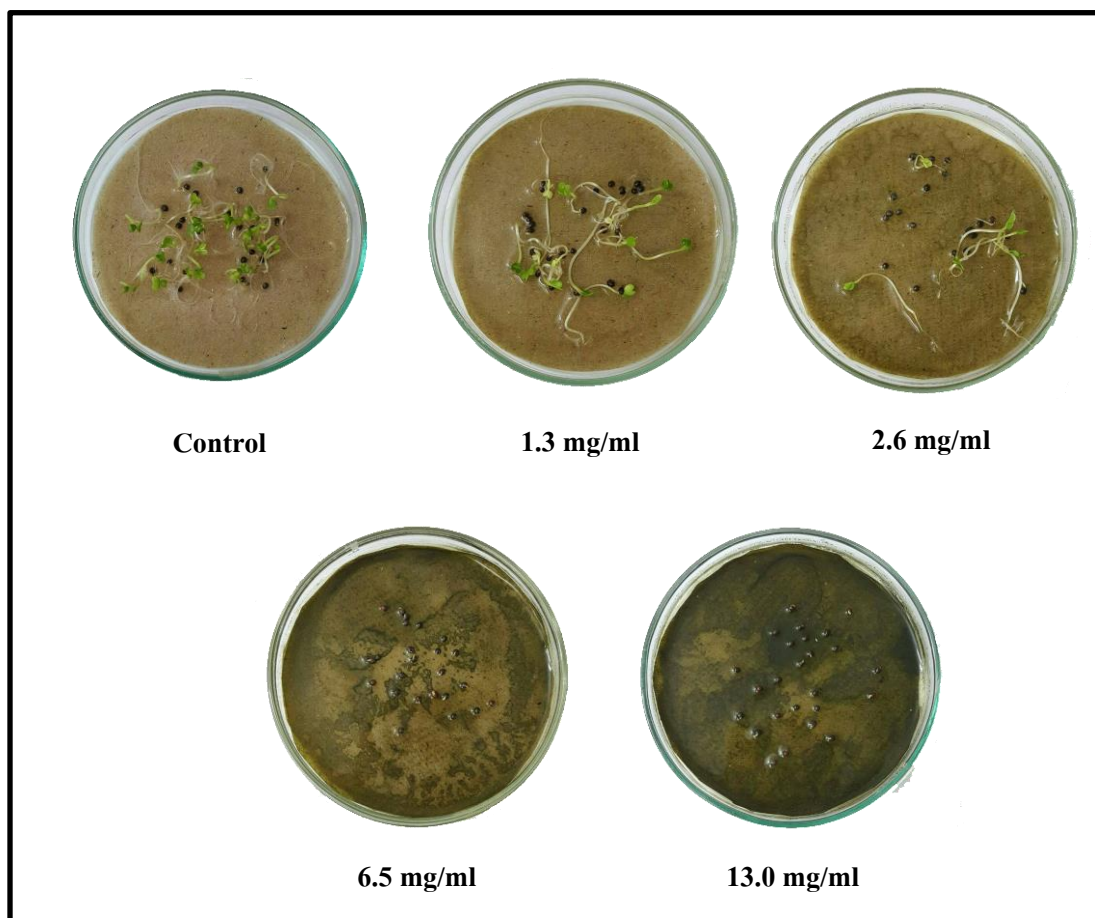


ภาพภาคผนวก ค-6 กราฟมาตรฐานโปรตีน

ภาคผนวก ง
ภาพการทดลอง

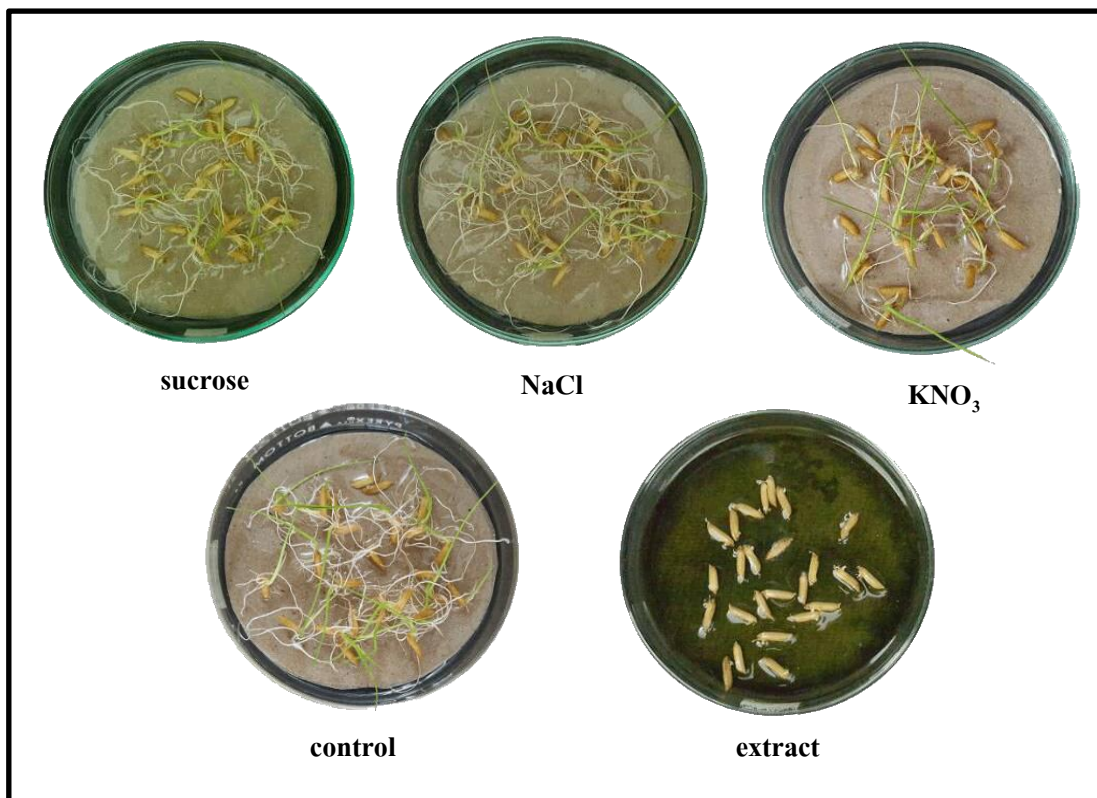


ภาพภาคผนวก ง-1 เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

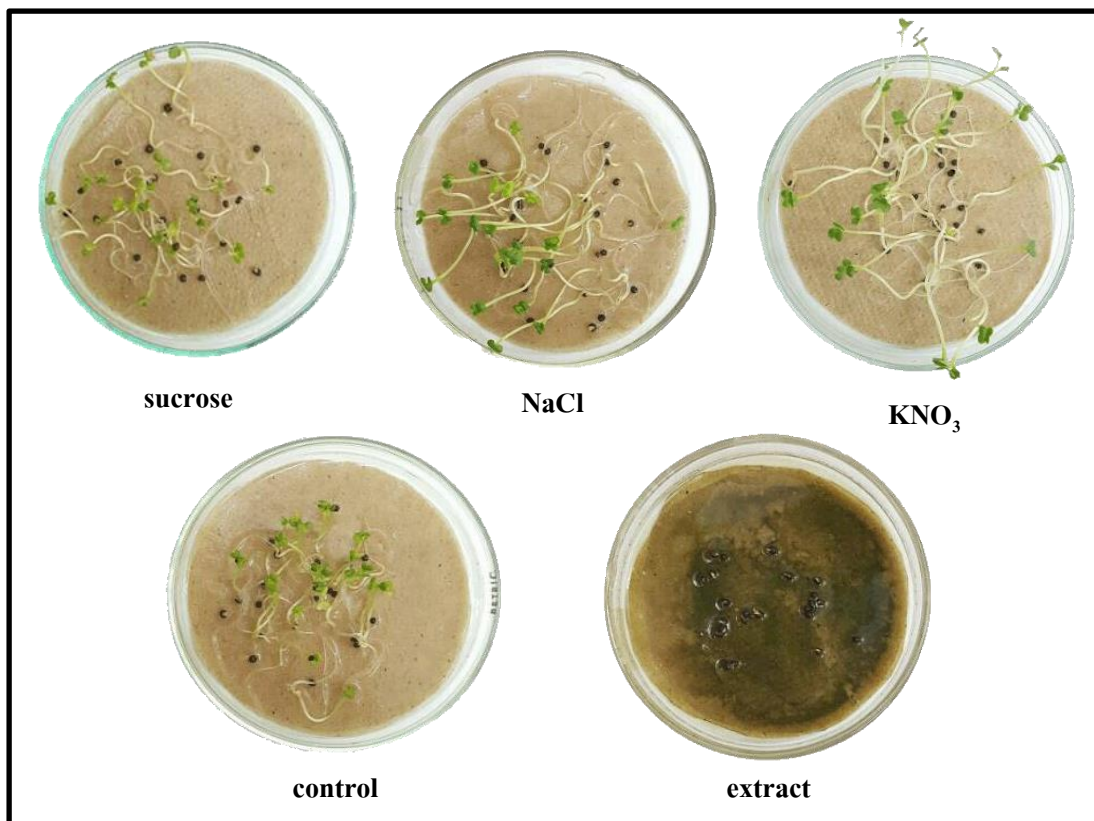


ภาพภาคผนวก ง-2 เมล็ดกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey)

Tsen & Lee) ที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแคร์ดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา
7 วัน



ภาพภาคผนวก ง-3 เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC_{50} (ความเข้มข้น 15.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และ โพแทสเซียมไนเตรด ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.19 MPa) โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม



ภาพภาคผนวก ง-4 เมล็ดกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) ที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน (ความเข้มข้น 2.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในสารสกัดจากใบผักแครด ที่ IC_{50} และสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มี Ψ_s เท่ากับสารสกัด (-0.08 MPa) โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

ภาคผนวก จ
ผลงานตีพิมพ์

ผลของสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.)
ต่อการงอก การเจริญเติบโต และสรีรวิทยาของข้าว (*Oryza sativa* L.)
Effect of Allelopathic from *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. Leaves on Seed
Germination, Growth, and Physiology of Rice (*Oryza sativa* L.)

ยุวธิดา กิ่งทอง และ ภาคภูมิ พระประเสริฐ*

Yuwatida Kingthong and Phakpoom Phrprasert

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 4 May 2017

Accepted : 30 July 2017

Published online : 15 September 2017

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) ด้วยเอทานอล 95% ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว (*Oryza sativa* L.) พบว่า สารสกัดจากใบผักแครดสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวได้ โดยการยับยั้งมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และพบว่าสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มีความเข้มข้น 15.16 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ IC_{50} ไปหาค่า osmotic potential (Ψ_s) พบว่ามีค่าเท่ากับ -0.19 MPa จากนั้นทำการศึกษาผลของ osmotic potential ของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว โดยเปรียบเทียบกับสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรดที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด พบว่าที่ Ψ_s ดังกล่าวของสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรดไม่มีผลยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของรากของต้นกล้าข้าว ในขณะที่เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีการงอกและการเจริญเติบโตลดลง จึงสรุปได้ว่า Ψ_s ของสารสกัดไม่มีผลต่อการยับยั้งการงอกและเจริญของรากข้าว เมื่อทดสอบการดูดน้ำของเมล็ด พบว่า สารสกัดไม่มีผลยับยั้งการดูดน้ำของเมล็ด และเมื่อนำเมล็ดที่แช่ในสารสกัดเป็นเวลา 7 วัน มาตรวจสออบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดพบว่าปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่มีปริมาณแป้งสูงกว่าชุดควบคุม และจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีกิจกรรมต่ำกว่าชุดควบคุม

คำสำคัญ : อัลลีโลพาธี ผักแครด สรีรวิทยาการงอก ข้าว α -amylase

*Corresponding author. E-mail : phakpoompp@yahoo.com

Abstract

The effect of 95% ethanolic leaf-extract from *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. on germination and growth of rice plants were examined. The results demonstrated the inhibition effect of extract to the germination of rice. The higher extract concentration showed the higher seed-germination inhibition. The inhibition concentration at 50% seed germination (IC_{50}) was determined and IC_{50} was 15.16 g/L. The extract at the IC_{50} was used to determine the osmotic potential which was -0.19 MPa. After that the effect of osmotic potential on the germination and growth of rice was determined by comparing to sucrose, sodium chloride and potassium nitrate at the same Ψ_s as the extract. The result showed that sucrose, sodium chloride and potassium nitrate did not inhibit seed germination and root growth while the extract showed the inhibition effect. This revealed that the osmotic potential at -0.19 MPa did not effect on rice seed germination and root growth. Water absorption of seeds was also determined and showed that extract did not inhibit water absorption. The reducing sugar and starch content in 7 days treated seeds were examined. Extract treated seeds showed lower reducing sugar and higher starch than in control. The activity of α -amylase was studied and showed lower activity in extract treatment than in control.

Keywords : allelopathy, *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn., germination physiology, *Oryza sativa* L., α -amylase

บทนำ

อัลลีโลพาธี (allelopathy) เป็นปรากฏการณ์ที่พืชมีการปลดปล่อยสารและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชข้างเคียงได้ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจในการศึกษาเพื่อนำสารเหล่านั้นมาใช้ในการยับยั้งวัชพืชในแปลงเกษตร เพื่อลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์และลดการสะสมของสารเหล่านั้นในดินจนเป็นเหตุให้ดินเสื่อมสภาพ ซึ่งการใช้สารสกัดจากพืชในการกำจัดวัชพืชเหมาะสำหรับการทำเกษตรอินทรีย์ ซึ่งจะเป็นผลดีต่อทั้งเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (Phraprasert & Namnamung, 2005, Dayan *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2012) การศึกษาปรากฏการณ์อัลลีโลพาธี ปรากฏอย่างกว้างขวางภายหลังจากมีการสังเกตว่าต้นแบลควอลนัท (black walnut; *Juglans nigra*) ซึ่งมีสาร Juglone สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชชนิดต่าง ๆ ได้ (Rietveld, 1983) ต่อมามีการศึกษาปรากฏการณ์นี้ในพืชชนิดอื่น เช่น ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) (Morris & Parrish, 1992) ดาวเรือง (*Tagetes minuta*) (Kil *et al.*, 2002) กระเทียมป่า (wild garlic; *Allium ursinum* L.) (Djurdjevic *et al.*, 2004) หญ้า bluestem (*Bothriochloa laguroides* var. *laguroides* (DC.)) (Scrivanti, 2010) แหน (*Lemna minor* L.) จอก (*Pistia stratiotes* L.) (Bich & Kato-Noguchi, 2012) ผกากรอง (*Lantana camara* L.) (El-Kenany & El-Kenany, 2013) บอระเพ็ด (*Tinospora tuberculata*) (Aslani *et al.*, 2016) และพืชสกุล *Acacia* (*Acacia cyclops*, *Acacia mollissima* และ *Acacia cyanophylla*) (Jelassi *et al.*, 2016) รวมทั้งในประเทศไทยได้มีรายงานสารสกัดจากพืชหลากหลายชนิด เช่น สาบหมา (*Eupatorium adenophorum* Spreng.) (Zungsontiporn & Premasthira, 1994) ประยงค์ (*Aglaiya odorata* Lour.) (Chatyanon, 2001) ต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa*) (Jala & Wongsarasin, 2013) ข่า (*Alpinia galangal* L.) (Khamriang *et al.*, 2014) และผักเสี้ยนดอกม่วง (*Cleome rutidosperma* DC.) (Lertmongkol, 2014) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวถึงผลของสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ มักศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งการงอกของเมล็ด (Bisio *et al.*, 2010; Rawat *et al.*, 2013) โดยพบว่า สารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่างกัน Palacios *et al.* (2010) ได้ศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งการงอกของสารสกัดจากพืช 71 ชนิด ในประเทศอาร์เจนตินา ต่อการงอกของข้าวโอต (*Avena sativa*) และผักกาดหัว (*Raphanus sativus*) พบว่าสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการงอกของเมล็ดพืชต่างกัน โดยมีค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์) ต่างกัน สารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำ จะมีความสามารถในการยับยั้งการงอกสูง

การศึกษามูลของการยับยั้งการงอก โดย Turk and Tawaha (2003) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากผักกาดดำ (*Brassica nigra* L.) เพิ่มขึ้นจะทำให้การดูดน้ำของเมล็ดข้าวโอตป่า (*Avena fatua* L.) ลดลง สาร 6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA) ซึ่งพบในธัญพืช (Yenish *et al.*, 1995) สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L. cv. *Grand Rapids*) โดยไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase (Kato-Noguchi & Macías, 2005) สารสกัดจากไผ่ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus citriodora*) มีผลทำให้อัตราการหายใจของพืชปลูกและวัชพืชทดสอบลดลง (Batish *et al.*, 2004) และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดกาแฟ (*Coffea arabica*) มีผลให้ดัชนีการแบ่งเซลล์ของต้นกล้าผักกาดหอม ผักกาดขาว (*Brassica chinensis* var. *Parachinensis* (Sinskaja)) และ หนุ่ก้าน้ำชา (*Bidens pilosa* L.) ลดลง (Silva *et al.*, 2013) ซึ่งกระบวนการที่สำคัญในการงอก ได้แก่ การดูดน้ำของเมล็ด การย่อยสลายสารอาหารสะสม และการนำสารอาหารที่ได้ไปใช้ในการเจริญเติบโตระหว่างการงอก (Bewley, 2001; Techapinyawat, 2005) สำหรับการดูดน้ำของเมล็ดนั้นไม่มีปัจจัยที่สำคัญ คือ osmotic potential (Ψ_s) ของสารละลาย ซึ่งสารสกัดมีสารต่าง ๆ ถูกสกัดละลายออกมาในสารละลายที่ใช้ทดสอบการงอกของเมล็ด ดังนั้นการที่สารละลายมีค่า Ψ_s ต่ำ อาจเป็นสาเหตุให้เมล็ดไม่งอก ซึ่งอาจไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการงอกของสารสกัดโดยตรง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้มีการหาค่า Ψ_s ของสารสกัด และทดสอบถึงผลของ Ψ_s ต่อการงอกของเมล็ด

การย่อยสลายสารอาหารสะสมของเมล็ดเป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่สำคัญต่อการงอกของเมล็ด โดยสารสะสมจะถูกเปลี่ยนแปลงและเคลื่อนย้ายไปยังเซลล์ที่กำลังมีการเจริญเติบโตของเมล็ด (Bewley, 2001) เช่น แป้ง (starch) เป็นอาหารสะสมหลักในเมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) (Rattanapanone, 2006) เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งคือ เอนไซม์ α -amylase เพื่อให้ได้น้ำตาลสำหรับนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เพื่อสร้างพลังงาน ATP สำหรับใช้ในกระบวนการงอกและการเจริญเติบโตของพืช (Kato-Noguchi & Macías, 2005)

การศึกษาดังกล่าวถึงผลของสารสกัดจากใบผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้อัตราการงอกและการเจริญเติบโตของพืชลดลงมากที่สุด (Phraprasert & Namnamung, 2005) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชที่ได้รับสารสกัดดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงศึกษาถึงผลของสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครดต่อการงอก การเจริญเติบโต และสรีรวิทยาบางประการของเมล็ดขณะงอก ทั้งนี้ในการทดลองนี้ใช้เมล็ดข้าวเป็นพืชทดสอบเนื่องจากมีเมล็ดขนาดใหญ่ สามารถศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาได้ง่าย และมีข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมากซึ่งทำให้สามารถวิจัยในเชิงลึกได้ต่อไป อย่างไรก็ตามการวิจัยในเบื้องต้นนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมกำจัดวัชพืชจากธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในทางการเกษตรต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พืชที่ใช้ทดลอง

ผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.) เก็บจากอำเภอลองหาด จังหวัดสระแก้ว และข้าว (*Oryza sativa* L.) จากอำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว (น้ำหนัก 100 เมล็ด เท่ากับ 2.3 กรัม ความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์)

2. เตรียมสารสกัดจากใบผักแครด

นำใบผักแครดมาล้างทำความสะอาดแล้วใส่ไว้ในตะกร้าตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จนน้ำหนักแห้งคงที่ แล้วนำไปบดให้ละเอียด เตรียมสารสกัดโดยการชั่งใบผักแครด 20 กรัม ลงในขวดสีชา เติมน้ำมันดอก 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางและกระดาษกรอง (Whatman No.4) จะได้สารสกัดตั้งต้น (Stock) จากนั้นชั่งน้ำหนักงานเพาะเชื้อที่มีกระดาษเพาะเมล็ดรองพื้น ปิดเปิดสารสกัด 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานแล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน ในตู้ดูดควัน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกจนหมด หลังจากนั้นนำไปใส่ในเคซิเคเตอร์ที่มีซิลิกาเจลเพื่อดูดความชื้นเป็นเวลา 1 วัน นำไปชั่งเพื่อหาปริมาณสารสกัดที่ได้ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ พบว่า สารสกัดตั้งต้นมีความเข้มข้น 26.0 ± 0.82 กรัม/ลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้น 6.5, 13.0 และ 19.5 กรัม/ลิตร เพื่อนำไปทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวต่อไป

3. ทดสอบผลของสารสกัดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้า

ตัดกระดาษเพาะเมล็ดใส่ลงในจานเพาะเชื้อจำนวน 2 ชั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใช้ปิดดูดสารสกัดที่ความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ แล้ววางไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออก จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำเมล็ดข้าวใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จำนวน 25 เมล็ดต่อจาน ปิดฝาจานเพาะเชื้อและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) สังเกตและบันทึกการงอกของเมล็ดทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยกำหนดให้เมล็ดงอก หมายถึง เมล็ดที่มีรากงอกจากเมล็ด แทงออกมาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม วัดความยาวรากและความยาวยอดของต้นกล้าหลังจากเพาะเมล็ดได้ 7 วัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete randomized design) โดยแต่ละที่รีทเมนต์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักแครดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยการวิเคราะห์แบบโพรบิต (probit analysis) ตามวิธีของ Finney (1971)

4. การหาค่า osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัด

4.1 หาค่า osmotic potential (Ψ_s) ของสารละลายด้วยวิธี Freezing point depression

หาค่า osmotic potential ของสารสกัด โดยใส่สารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้ววางไว้เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) สารละลายที่ได้ไปหาค่า Ψ_s ของสารสกัดด้วยวิธี Freezing point depression (William & William, 1931)

หาค่า Ψ_s ของสารละลายชูโครส สารละลายโซเดียมคลอไรด์ และสารละลายโพแทสเซียมไนเตรตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Freezing point depression สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับ ค่า Ψ_s ของสารละลาย จากนั้นเตรียมสารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ให้มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีความเข้มข้นเป็น 30.8, 2.3 และ 4.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

4.2 นำสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} สารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด ไปทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม บันทึกผลการทดลอง และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3

5. การดูน้ำของเมล็ด

เตรียมเมล็ดพืชทดสอบ โดยชั่งเมล็ดข้าว ประมาณ 1 กรัม บันทึกน้ำหนักเมล็ดเริ่มต้น (w_1) จากนั้นนำเมล็ดไปแช่ในจานทดลองที่มีสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} สารละลายชูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม บันทึกน้ำหนักของเมล็ด (w_2) เมื่อเวลาผ่านไป 1, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำเมล็ดพืชทดสอบมาชั่งน้ำให้แห้งด้วยกระดาษ แล้วนำไปชั่งน้ำหนักทันที เมื่อชั่งน้ำหนักเมล็ดเสร็จ นำไปแช่ในสารละลายเดิมทันที (Turk & Tawaha, 2003) และนำข้อมูลไปคำนวณหาการดูน้ำของเมล็ด ดังสมการ

$$\text{การดูน้ำของเมล็ด} = \frac{(W_2 - W_1)}{W_1} \text{ g H}_2\text{O/g seed} \quad (1)$$

6. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugars)

หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยนำเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 3 เมล็ด ไปชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในโถงบดสารที่วางอยู่บนน้ำแข็ง เดิม 80 % เอทานอล 1.5 มิลลิลิตร บดเมล็ดพืชด้วยโถงจนละเอียด ดูดสารละลายทั้งหมด ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย 80 % เอทานอล ผสมให้สารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใส 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 1,300 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Kato-Noguchi & Macías, 2005)

7. การหาปริมาณแป้ง

นำตะกอนส่วนที่เหลือจากการหาปริมาณน้ำตาลมาล้างด้วย 80% เอทานอล จำนวน 3 ครั้ง โดยดู 80% เอทานอล ใส่ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย acetate buffer pH 4.6 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วเติมเอนไซม์ α -amylase 10 ไมโครลิตร (10 ยูนิต) และเอนไซม์ Amyloglucosidase ปริมาตร

10 ไมโครลิตร (10 ยูนิต) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดทดลอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย 80% เอทานอล จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลเช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 6 เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแป้ง โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Rose *et al*, 1991)

8. กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase

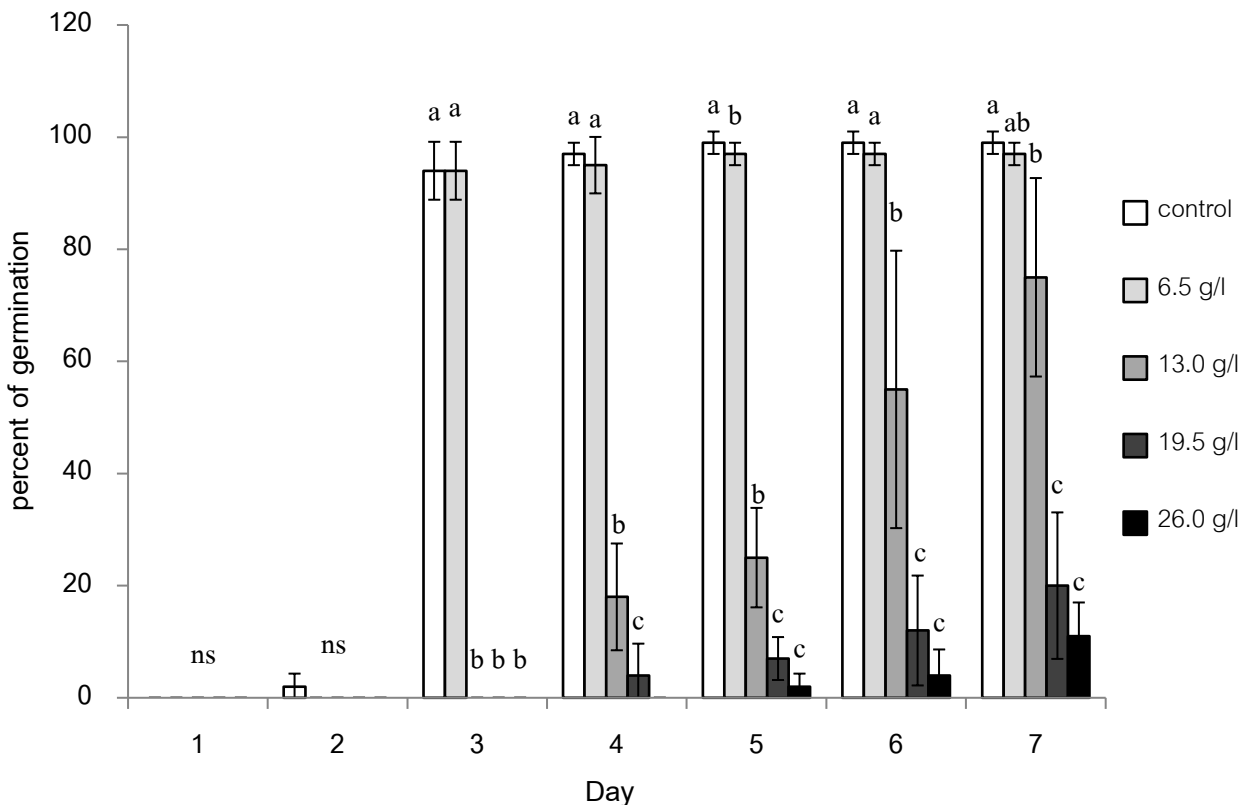
หากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ตามวิธีของ Kato-Noguchi & Macías (2005) โดยเพาะเมล็ดข้าวเช่นเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาล จากนั้นทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase โดยนำเมล็ดข้าวที่เพาะ เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 3 เมล็ด ไปล้างน้ำหนักแล้วใส่ลงโถงบดแล้วเติม Tris-HCl buffer pH 7.5 (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, NaHSO₃ 10 mM, BSA 5 mg/ ml) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็งบดจนละเอียดแล้วดูดสารละลายทั้งหมด ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นดูดส่วนใสใส่ในหลอดทดลอง เติมแคลเซียมคลอไรด์ 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดทดลอง 2 หลอด ปริมาตรหลอดละ 300 ไมโครลิตร ในหลอดที่ 1 เติม Na-acetate 500 ไมโครลิตร เติม Starch soluble 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลทันที หลอดที่ 2 เติม Na-acetate 500 ไมโครลิตร เติม Starch soluble 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลเช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส แล้วนำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Kato-Noguchi & Macías, 2005)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการวิจัย

ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการงอกของเมล็ด

จากการนำเมล็ดข้าวแช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครด ความเข้มข้น 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 1)

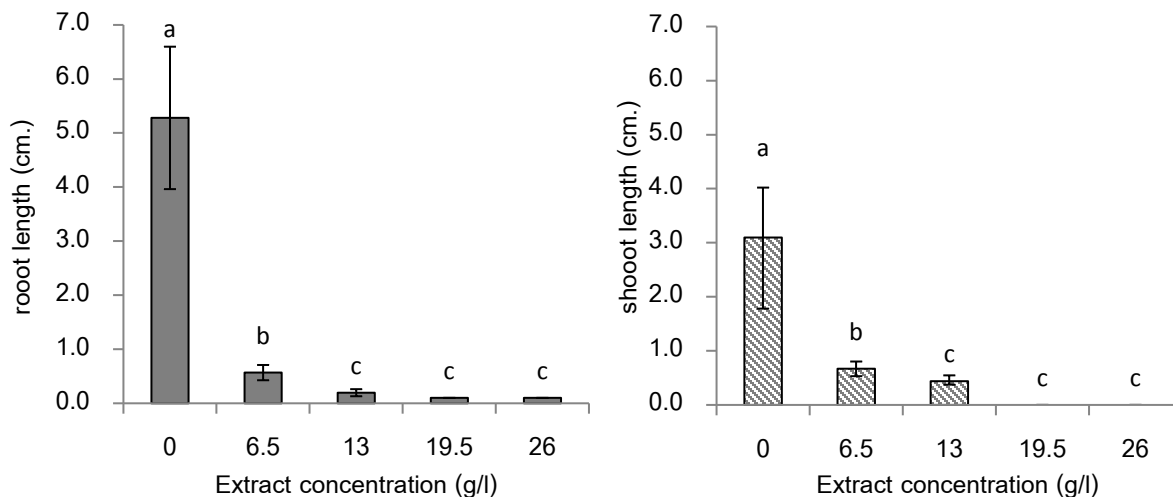


ภาพที่ 1 เปอร์เซนต์การงอกของข้าวที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลแต่ละช่วงเวลาที่ใช้วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์)

เมื่อนำข้อมูลการงอกของเมล็ดในวันที่ 7 มาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวได้ 50 เปอร์เซนต์ (IC_{50}) ด้วยการใช้วิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท (probit analysis) ตามวิธีของ Finney (1971) พบว่ามีค่าเท่ากับ 15.16 กรัม/ลิตร

ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า

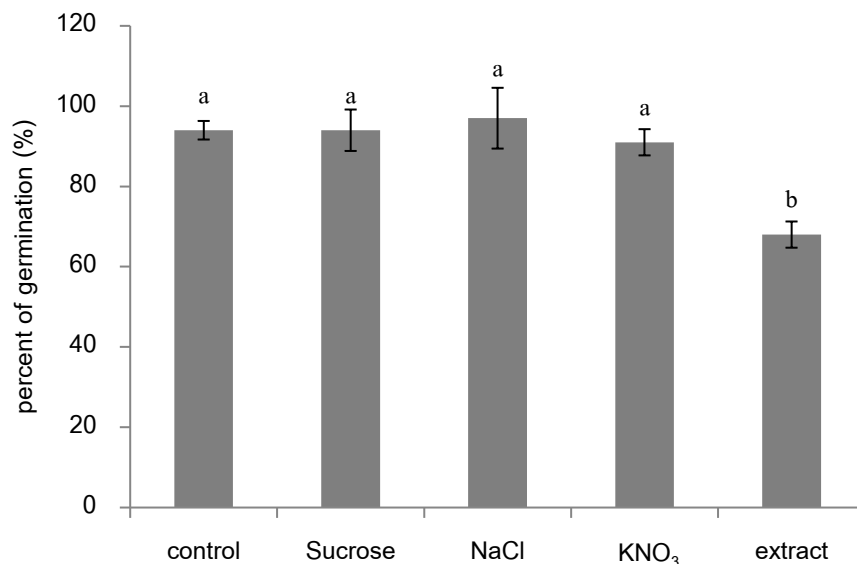
เมื่อนำเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน มาวัดความยาวรากและความยาวยอด พบว่า เมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดมีความยาวรากและความยาวยอดแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบว่าความยาวราก และความยาวยอดลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2)



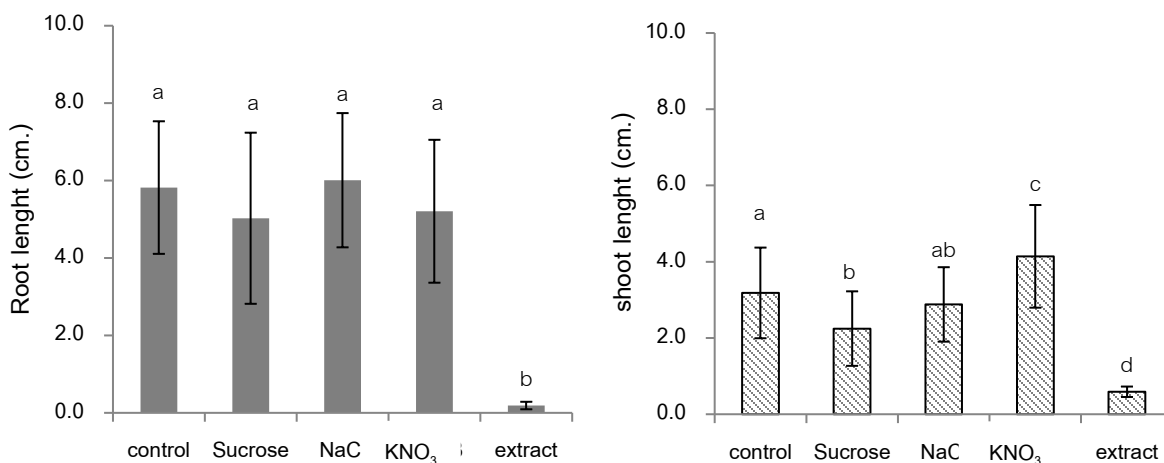
ภาพที่ 2 ความยาวรากและความยาวยอดของต้นกล้าที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ผลของค่า osmotic potential ของสารละลายต่อการงอกของข้าว

การวัดค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} ด้วยวิธี Freezing point depression พบว่า มีค่า Ψ_s ของสารสกัดมีค่าเท่ากับ -0.19 MPa และเมื่อนำสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด ไปทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม เพื่อทดสอบว่าค่า Ψ_s มีผลกระทบต่ออาการของเมล็ดพืชหรือไม่ พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำกว่าชุดควบคุม และสารละลายอื่นที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 3) เมื่อนำเมล็ดข้าวที่ออกมาวัดความยาวรากและความยาวยอด พบว่าเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีความยาวรากและความยาวยอดแตกต่างจากชุดควบคุมและสารละลายอื่นที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีความยาวรากและความยาวยอดต่ำกว่าชุดควบคุมและสารละลายอื่นอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ และสารละลายที่มีค่า Ψ_s เท่ากับ สารสกัด (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลทีวิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

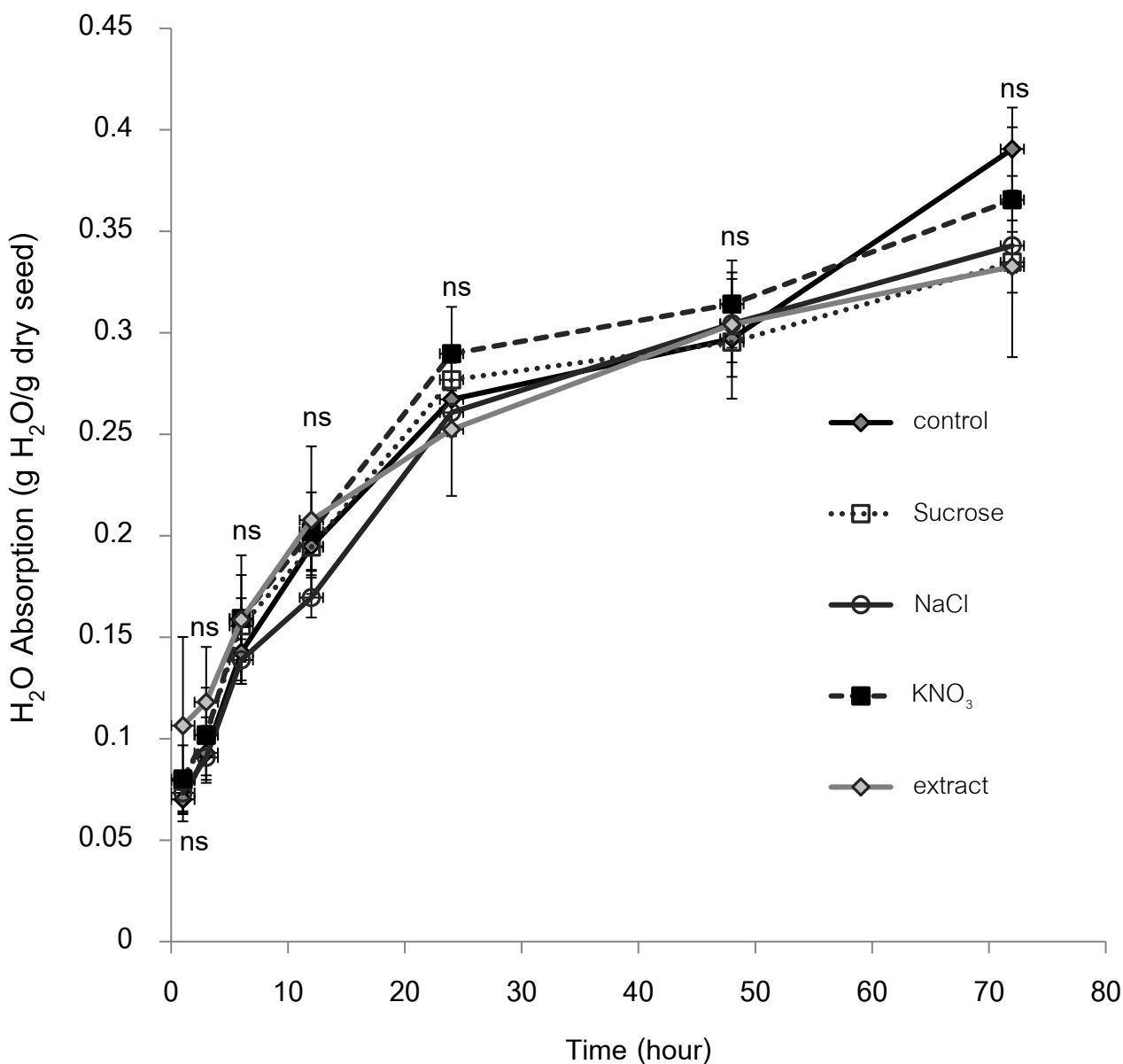


ภาพที่ 4 ความยาวรากและความยาวยอดของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ และสารละลายที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า \pm SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลทีวิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อสรีรวิทยาการงอกบางประการของเมล็ด

การดูดน้ำของเมล็ด

เมื่อนำเมล็ดข้าวแช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่าการดูดน้ำของเมล็ดที่ได้รับสารสกัดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึง 72 ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 อัตราการดูดน้ำของเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} และสารละลายที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm SE$; อักษรย่อ ns แสดงข้อมูลไม่มีแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ด้วย One-Way ANOVA)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

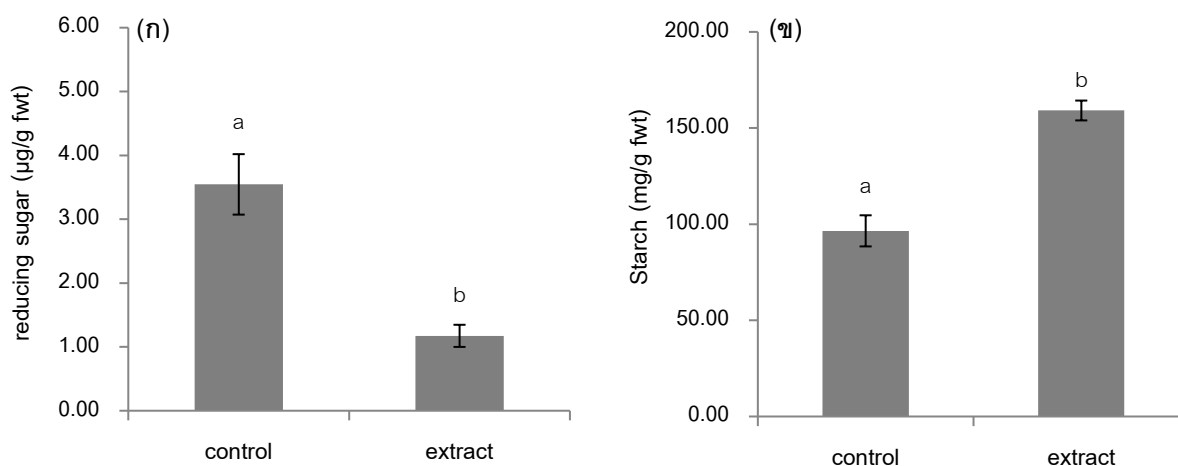
จากการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดใบผักแครด มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 1.17 µg /g fwt ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.55 µg /g fwt โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน (ภาพที่ 6)

ปริมาณแป้ง (starch)

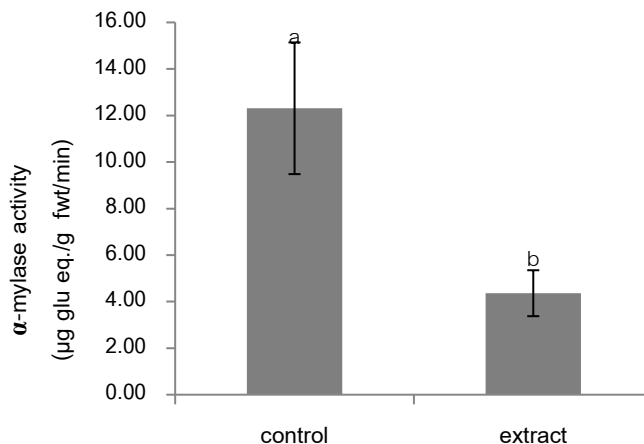
จากการหาปริมาณแป้งในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดใบผักแครดมีปริมาณแป้ง เท่ากับ 159.13 mg/g fwt ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) ที่มีปริมาณแป้งเท่ากับ 96.54 mg /g fwt โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณแป้งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน (ภาพที่ 7)

กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า สารสกัดจากใบผักแครดมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase โดยพบว่าในเมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครดมีกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase เท่ากับ 4.36 µg glu eq./g fwt /min ในขณะที่ชุดควบคุมมีกิจกรรมเท่ากับ 12.31 µg glu eq./g fwt/min เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ก) ปริมาณแป้ง (ข) ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC₅₀ เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Independent Samples Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า $\pm SE$; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ด้วย Independent Samples Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

วิจารณ์ผล

ผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว

จากการศึกษาผลของสารอัลลิโลพาธิ์จากใบผักแครดต่อการงอกของข้าว พบว่า สารสกัดจากใบผักแครดสามารถยับยั้งการงอกของข้าวได้ และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 1) โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 15.16 กรัม/ลิตร และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวในการศึกษาผลของสารสกัดต่อกลไกการงอกของเมล็ดต่อไป ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Phraprasert & Namnamung (2005) ที่พบว่าสารสกัดผักแครดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการงอกของข้าวและวัชพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ถั่วผี (*Phaseolus lathyroides* Lf.) หญ้าเจ้าชู้ (*Chrysopogon acciculatus* Retz.) ต้อยติ่ง (*Ruellia* sp.) ได้ รวมทั้ง Ghayal *et al.* (2014) รายงานว่าสารสกัดจากใบผักแครดสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียวได้ และมีรายงานการวิจัยอื่น ๆ ที่พบว่าสารสกัดจากพืชสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดได้ (Bisio *et al.*, 2010; Rawat *et al.*, 2013; Uddin *et al.*, 2017)

สารสกัดจากใบผักแครดยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว โดยทำให้ความยาวยอดและความยาวรากลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2) อาจเป็นผลจากสารสกัดไปยับยั้งการแบ่งเซลล์และการยึดตัวของเซลล์ (Scrivanti, 2010) Babula *et al.* (2014) รายงานว่า สารอัลลิโลพาธิ์ naphthoquinone juglone สามารถยับยั้งความยาวรากของผักกาด (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L. cv) ได้ การยับยั้งจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และยังพบว่าความยาวรากที่ลดลงนี้มีความสัมพันธ์กับการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) โดยเมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น พบว่า ค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index) ลดลง และพบเซลล์ในระยะโพรเฟส (Prophase) เพิ่มขึ้น ส่วนจำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟส (metaphase) แอนาเฟส (anaphase) และเทโลเฟส (telophase) ลดลง เช่นเดียวกับการรายงานของ Changsawake *et al.* (2010) ที่พบว่าดัชนีการแบ่งเซลล์ของปลายรากหอมใหญ่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากยอด

ชะอมแห้ง (*Acacia pennata* L.) เพิ่มขึ้น และพบเซลล์ในระยะโพรเฟสเพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์ที่เข้าสู่ระยะเมทาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟสลดลง

จากการทดสอบผลของค่า osmotic potential (Ψ_s) ของสารละลายต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว โดยนำ สารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} สารละลายซูโครส สารละลายโซเดียมคลอไรด์ และสารละลายโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับ -0.19 MPa ไปทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ความยาวราก และความยาวยอด ต่ำกว่าชุดควบคุม สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่าค่า Ψ_s ของสารสกัดที่นำมาทดสอบไม่ใช่สาเหตุหลักที่ทำให้เมล็ดไม่ออก และยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้า ดังนั้นผลการยับยั้งน่าจะเกิดจากสารอัลลีโลพาธิกจากใบผักแครด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Patsai (2011) ได้ทดสอบผลของค่า Ψ_s ของสารสกัดจากใบหญ้าสาบ (*Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M. King & H. Rob) โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีค่าความนำไฟฟ้าครอบคลุมค่าความนำไฟฟ้าของสารสกัดจากใบหญ้าสาบที่นำมาทดสอบ พบว่า สารละลายทุกความเข้มข้นไม่มีผลยับยั้งการงอก และการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืชทดสอบ แสดงว่า ค่า Ψ_s ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้า ดังนั้นผลการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าของสารสกัดจากใบหญ้าสาบน่าจะเกิดจากสารบางชนิดที่มีอยู่ในใบพืช เช่นเดียวกับ Silva *et al.* (2013) ที่รายงานว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดกาแฟ (*Coffea arabica*) ที่มีค่า Ψ_s มากกว่า -0.2 MPa ไม่มีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L. cv. *Grand Rapids*), ผักกาดขาว (*Brassica chinensis* var. *Parachinensis* (Sinskaja)) และหญ้าก้านจาว (*Bidens pilosa* L.)

การดูดน้ำ

การศึกษาการดูดน้ำของเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_s เท่ากับสารสกัด โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า การดูดน้ำของเมล็ดที่ได้รับสารสกัด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 72 ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมและสารละลายอื่นที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่าค่า Ψ_s ของสารสกัดที่นำมาทดสอบไม่มีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ดข้าวขณะงอก ดังนั้นเมล็ดที่ได้รับสารสกัด ยังคงสามารถดูดน้ำได้ตามปกติ ทั้งนี้การดูดน้ำของเมล็ดขึ้นกับค่า Ψ_s โดยถ้าสารละลายมีตัวถูกละลายอยู่มากมีผลทำให้ค่า Ψ_s มีค่าติดลบมากขึ้น และมีผลให้เมล็ดดูดน้ำได้น้อยลงจนอาจเป็นสาเหตุให้เมล็ดไม่ออก แต่ในการทดลองนี้พบว่า Ψ_s ของสารสกัดมีค่าเท่ากับ -0.19 MPa สอดคล้องกับการทดลองของ Silva *et al.* (2013) ที่รายงานว่า ค่า Ψ_s มากกว่า -0.2 MPa ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด ทั้งนี้การดูดน้ำของเมล็ดเป็นขั้นตอนแรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการงอกของเมล็ด น้ำจะทำให้เมล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้นและอ่อนนุ่มซึ่งจะทำให้แก๊สออกซิเจนแพร่เข้าสู่เมล็ด ทำให้เมล็ดมีการหายใจ รวมทั้งน้ำจะไปละลายโปรตีนไขมันและกระตุ้นปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ ในกระบวนการงอกของเมล็ด มีการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยอาหารสะสมในเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก เพื่อนำไปใช้ในการเจริญต่อไป (Bewley, 2001; Techapinyawat, 2005)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแป้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และแป้งของเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน ในขณะที่แป้งมีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 6) โดยปกติปริมาณน้ำตาลสะสมในเมล็ดมักมีปริมาณจำกัด น้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในเมล็ดพืชขณะงอกนั้นได้จากการย่อยแป้งซึ่งเป็นอาหารสะสมในเมล็ดพืช (Perata *et al.*, 1997) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดไปมีผลลดกระบวนการ

เปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาล โดยมีเอนไซม์ α -amylase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ (Kato-Noguchi & Macías, 2005) และจากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดจากผักแครดมีกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ลดลง (ภาพที่ 7) ทำให้พบน้ำตาลในเมล็ดที่ได้รับสารสกัดลดลงประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นผลให้การงอกของเมล็ดลดลง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหายใจเพื่อสร้างพลังงานและสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในกระบวนการงอกของเมล็ด (Kato-Noguchi & Macías, 2005; Murataza & Asghara, 2012) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Poonpaiboonpipat *et al.* (2013) ที่พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าปล้องละมาน (*Echinochloa crus-galli*) โดยไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase เช่นเดียวกับ Madany and Saleh (2015) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากต้นน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia helioscopia* L.) ต่อการงอกของข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) และถั่วลันเตา (*Pisum sativum* L.) พบว่า สารสกัดมีผลให้อัตราการงอกของเมล็ดและกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ลดลง โดยอัตราการงอกของเมล็ดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากใบผักแครดมีสารอัลลีโลพาธีที่สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบได้ โดยความสามารถในการยับยั้งจะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ค่า osmotic potential (Ψ_s) ของสารสกัดไม่มีผลยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของรากข้าว และไม่มีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ด แต่มีผลต่อกระบวนการสลายอาหารสะสมในเมล็ด ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดที่ได้รับสารสกัดต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่ปริมาณแป้งสูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งเป็นผลจากสารสกัดไปมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในเมล็ดลดลง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้อนุเคราะห์อุดหนุนทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2559 และขอขอบคุณคณะผู้บริหารและคณะครูโรงเรียนวังน้ำเย็นวิทยาคม จังหวัดสระแก้ว ที่ได้สนับสนุนการทำวิจัยตลอดมา

เอกสารอ้างอิง

- Aslani, F., Juraimi, A. S., Ahmad-Hamdani, M. S., Hashemi, F. S. G., Alam, M. A., Hakim, M. A., & Uddin, M. K. (2016). Effects of *Tinospora tuberculata* leaf methanol extract on seedling growth of rice and associated weed species in hydroponic culture. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(7), 1521-1531.
- Babula, P., Vaverkova, V., Poborilova, Z., Ballova, L., Masarik, M., & Provaznik, I. (2014). Phytotoxic action of naphthoquinone juglone demonstrated on lettuce seedling roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 78-86.
- Batish, D. R., Setia, N., Singh, H. P., & Kohli, R. K. (2004). Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. *Crop Protection*, 23(12), 1209-1214.

- Bewley, J. D. (2001). Seed germination and reserve mobilization. *Reviews in the Life Sciences*, 1-7.
- Bich, T.T.N. & Kato-Noguchi, H. (2012). Allelopathic potential of two aquatic plants, duckweed (*Lemna minor* L.) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), on terrestrial plant species. *Aquatic Botany*, 103, 30-36.
- Bisio, A., Fraternali, D., Giacomini, M., Giacomelli, E., Pivetti, S., Russo, Caviglioli, G., Romussi, G., Ricci, D., & De Tommasi, N. (2010). Phytotoxicity of *Salvia* spp. exudates. *Crop Protection*, 29(12), 1434-1446.
- Changsawake, K., Laosinwattana, C., & Teerarak, M. (2010). Inhibitory potential of crude extract from *Acacia pennata* (L.) Willd. subsp. *insuavis* Nielsen on germination, seedling growth and cell division of bioassay plants. *King Mongkut's Agricultural Journal*, 28(2), 65-73. (in Thai)
- Chatiyanon, B. (2001). *Inhibitory effect of Aglaia odorata Lour. leaf extract on germination and growth of some plants*. Master's thesis, Horticulture, Faculty of Agricultural, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. (in Thai)
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- Djurdjevic, L., Dinic, A., Pavlovic, P., Mitrovic, M., Karadzic, B., & Tesevic, V. (2004). Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(6), 533-544.
- Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ghayal, N.A., Biware, M.V., & Dhupal, K.N. (2014). Effect of leachates of alien weeds on seed germination, seedling growth and physiology in mungbean. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 3(4), 141-148.
- Jala, A., & Wongsarasin, A. (2013). Effect of allelopathy from *Ruellia tuberosa* on germination rate of weed seeds (*Mimosa pudica* L., *Amaranthus gracilis* Desf. and *Cleome viscosa* L.). *Journal of Science and Technology is a publication of Thammasat University*, 21(6), 558-564. (in Thai)
- Jelassi, A., Ayeb-Zakhama, A. El, Nejma, A. Ben, Chaari, A., Harzallah-Skhiri, F., & Jannet, H. Ben. (2016). Phytochemical composition and allelopathic potential of three Tunisian *Acacia* species. *Industrial Crops and Products*, 83, 339-345.
- Kato-Noguchi, H., & Macías, F. A. (2005). Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the germination and α -amylase activity in lettuce seeds. *Journal of Plant Physiology*, 162(12), 1304-1307.
- Khamriang, S., Sinsiri, W., Sinsiri, N., & Kaewduangta, W. (2014). Efficacy of crude extract of *Alpinia galangal* (Linn.) Swartz on germination and growth of some crops and weeds. *Khon Kaen Agricultural Journal*, 42(1), 57-62. (in Thai)
- Kil, J. H., Shim, K. C., Lee, K. J., (2002). Allelopathy of *Tagetes minuta* L. aqueous extracts on seed germination and root hair growth. *Korean Journal Ecology Science*, 1, 171-174.

- Lertmongkol, S. (2014). Allelopathic effect of fresh and dry *Cleome rutidosperma* DC. extracts on seed germination and growth of *Echinochloa crus-galli* Beauv. and *Amaranthus spinosus* L. *Thai Agricultural Research Journal*, 32(1), 68-76. (in Thai)
- Ma, J., Xing, G., Yang, W., Ma, L., Gao, M., Wang, Y., & Han, Y. (2012). Inhibitory effects of leachate from *Eupatorium adenophorum* on germination and growth of *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium glaucum*. *Acta Ecologica Sinica*, 32(1), 50-56.
- Madany, M. M. Y., & Saleh, A. M. (2015). Phytotoxicity of *Euphorbia helioscopia* L. on *Triticum aestivum* L. and *Pisum sativum* L. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1), 141-151.
- Murataza, G., Asghara, A. R. (2012). α -Amylase activities during seed development and germination in pea (*Pisum sativum* L.) treated with salicylic acid. *Pakistan Journal of Botany*, 44(6), 1823-1829.
- Morris, P. J., & Parrish, D. J. (1992). Effects of sunflower residues and tillage on winter wheat. *Field Crops Research*, 29(4), 317-327.
- Palacios, S. M., Corral del, S., Carpinella, M. C., & Ruiz, G. (2010). Screening for natural inhibitors of germination and seedling growth in native plants from Central Argentina. *Industrial Crops and Products*, 32, 674-677.
- Patsai, S. (2011). *Allelopathic effect of Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M. King & H. Rob on germination and growth of some crops. Master of Education Degree in Biology, Srinakharinwirot University. (in Thai)
- Perata, P., Guglielminetti, L., & Alpi, A. (1997). Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Annals of Botany*, 79, 49-56.
- Phraprasert, P., & Namnamung, W. (2005). Effect of crude extracts from *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. By various solvents on seed germination and growth of some plants. *Burapha Science Journal*, 10(1-2), 68-75. (in Thai)
- Poonpaiboonpipat, T., Pangnakorn, U., Suvunnamek, U., Teerarak, M., Charoenying, P., & Laosinwattana, C. (2013). Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Industrial Crops and Products*, 41, 403-407.
- Rattanapanone, N. (2006). *Food chemistry* (2nd ed.). Bangkok: Odeon Store. (in Thai)
- Rawat, L. S., Maikhuri, R. K., & Negi, V. S. (2013). Inhibitory effect of leachate from *Helianthus annuus* on germination and growth of *Kharif* crops and weeds. *Acta Ecologica Sinica*, 33(5), 245-252.
- Rietveld, W. J. (1983). Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *Journal of Chemical Ecology*, 9(2), 295-308.
- Rose, R., Rose, C. L., Omi, S. K., Foory, K.R., Durall, D. M. & Bigg, W. L. (1991). Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluation the accuracy and precision of six colorimetric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 2-11.

- Scrivanti, L. R. (2010). Allelopathic potential of *Bothriochloa laguroides* var. *laguroides* (DC.) Herter (Poaceae: Andropogoneae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(5), 302-305.
- Silva, R. M. G., Brigatti, J. G. F., Santos, V. H. M., Mecina, G. F., & Silva, L. P. (2013). Allelopathic effect of the peel of coffee fruit. *Scientia Horticulturae*, 158, 39-44.
- Techapinyawat, S. (2005). *Plant physiology* (4th ed.). Bangkok: Kasetsart University Press. (in Thai)
- Turk, M. A., & Tawaha, A. M., (2003). Allelopathic effect of black mustard (*Brassica nigra* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.). *Crop Protection*, 22, 673-677.
- Uddin, M., Robinson, R., Buultjens, A., Al Harun, M., & Shampa, S. (2017). Role of allelopathy of *Phragmites australis* in its invasion processes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 486, 237-244.
- William, C. S. & F. William S. (1931). A method for the determination of the freezing point depression of aqueous solutions particularly those containing protein. *Journal of Biological Chemistry*, 91, 217-226.
- Yenish, J. P., Worsham, A. D., & Chilton, W. S. (1995). Disappearance of DIBOA-glucoside, DIBOA, and BOA from rye (*Secale cereal* L.) cover crop residue. *Weed Science*, 43, 18-20.
- Zungsontiporn, S., & Premasthira, C. (1994). Effect of crude extract of *Eupatorium adenophorum* Spreng. on germination and growth of some crops and weeds. *Thai Agricultural Research Journal*, 12(1), 37-41. (in Thai)