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.)

ยุวะธิดา กิ่งทอง และ ภาคภูมิ พระประเสริฐ*

Yuwatida Kingthong and Phakpoom Phraprasert*

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 มาตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดพบว่ามีปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุม 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 ปรากฏอย่างกว้างขวาง ภายหลังจากมีการสังเกตว่าต้นแบลควอลนัท (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 (*Aglaia odorata* Lour.) (Chatiyanon, 2001) ต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa*) (Jala & Wongsarasin, 2013) ข่า (*Alpinia galangal* L.) (Khamriang *et al*., 2014) และผักเสี้ยนดอกม่วง (*Cleome rutidosperma* DC.) (Lertmongkol, 2014) เป็นต้น

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

การศึกษาผลของการยับยั้งการงอก 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) สารสกัดจากใบยูคาลิปตัส (*Eucalyptus citriodora*) มีผลทำให้อัตราการหายใจของพืชปลูกและวัชพืชทดสอบลดลง (Batish *et al*., 2004) และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดกาแฟ (*Coffea arabica*) มีผลให้ดัชนีการแบ่งเซลล์ของต้นกล้าผักกาดหอม ผักกาดขาว *(Brassica chinensis* var. *Parachinensis (Sinskaja))* และ หญ้าก้นจ้ำขาว (*Bidens pilosa* L.) ลดลง (Silva *et al*., 2013) ซึ่งกระบวนการที่สำคัญในการงอก ได้แก่ การดูดน้ำของเมล็ด การย่อยสลายสารอาหารสะสม และการนำสารอาหารที่ได้ไปใช้ในการเจริญเติบโตระหว่างการงอก (Bewley, 2001; Techapinyawat, 2005) สำหรับการดูดน้ำของเมล็ดนั้นมีปัจจัยที่สำคัญ คือ osmotic potential (Ψ_S) ของสารละลาย ซึ่งสารสกัดมีสารต่าง ๆ ถูกสกัดละลายออกมาในสารละลายที่ใช้ทดสอบการงอกของเมล็ด ดังนั้นการที่สารละลายมีค่า Ψ_S ต่ำ อาจเป็นสาเหตุให้เมล็ดไม่งอก ซึ่งอาจไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการงอกของสารสกัดโดยตรง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้มีการหาค่า Ψ_S ของสารสกัด และทดสอบถึงผลของ Ψ_S ต่อการงอกของเมล็ด

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

การศึกษาถึงผลของสารสกัดจากใบผักแครด (*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.) เก็บจากอำเภอคลองหาด 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 เติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางและกระดาษกรอง (Whatman No.4) จะได้สารสกัดตั้งต้น (Stock) จากนั้นชั่งน้ำหนักจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษเพาะเมล็ดรองพื้น ปิเปตสารสกัด 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานแล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน ในตู้ดูดควัน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกจนหมด หลังจากนั้นนำไปใส่ในเดซิเคเตอร์ที่มีซิลิกาเจลเพื่อดูดความชื้นเป็นเวลา 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 จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารสกัดที่ความเข้มข้น 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) โดยแต่ละทรีทเมนต์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักแครดที่สามารถยับยั้งการงอกของข้าวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยการวิเคราะห์แบบโพรบิท (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 ของสารละลายซูโครส สารละลายโซเดียมคลอไรด์ และสารละลายโพแทสเซียมไนเตรตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Freezing point depression สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับ ค่า Ψ_S ของสารละลาย จากนั้นเตรียมสารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ให้มีค่า Ψ_S เท่ากับสารสกัด โดยมีความเข้มข้นเป็น 30.8, 2.3 และ 4.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

4.2 นำสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} สารละลายซูโครส โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมไนเตรต ที่มีค่า Ψ_S เท่ากับสารสกัด ไปทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม บันทึกผลการทดลอง และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3

5. การดูดน้ำของเมล็ด

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

$$\text{การดูดน้ำของเมล็ด} = \frac{(W_2 - W_1)}{W_1} \quad g\ H_2O/g\ seed \qquad (1)$$

6. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugars)

หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยนำเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 3 เมล็ด ไปชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในโกร่งบดสารที่วางอยู่บนน้ำแข็ง เติม 80 % เอทานอล 1.5 มิลลิลิตร บดเมล็ดพืชด้วยโกร่งจนละเอียด 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 โดยดูด 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) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 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

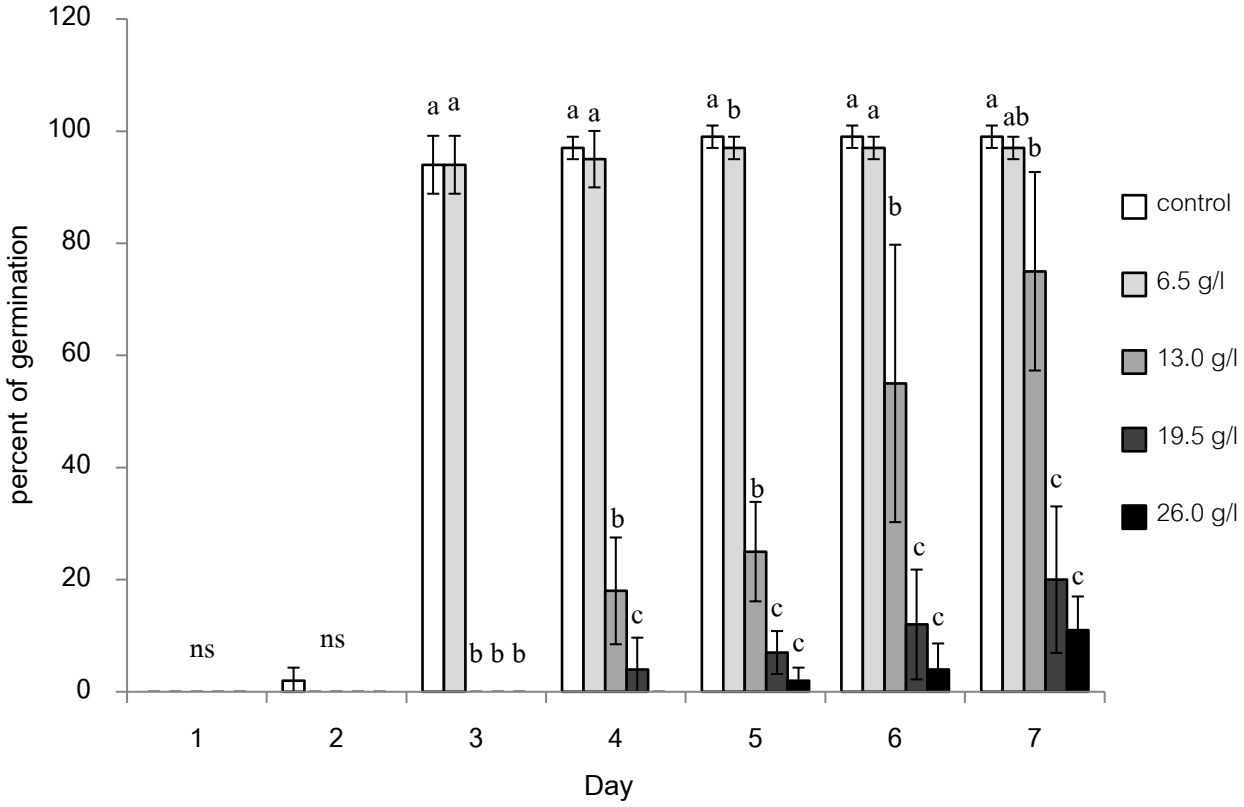
หากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ตามวิธีของ Kato-Noguchi & Macías (2005) โดยเพาะเมล็ดข้าวเช่นเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาล จากนั้นทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase โดยนำเมล็ดข้าวที่เพาะ เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 3 เมล็ด ไปชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงโกร่งบดแล้วเติม Tris-HCl buffer pH 7.5 (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 5 mM, $NaHSO_3$ 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 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลเช่นเดียวกับการทดลองข้อที่ 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)

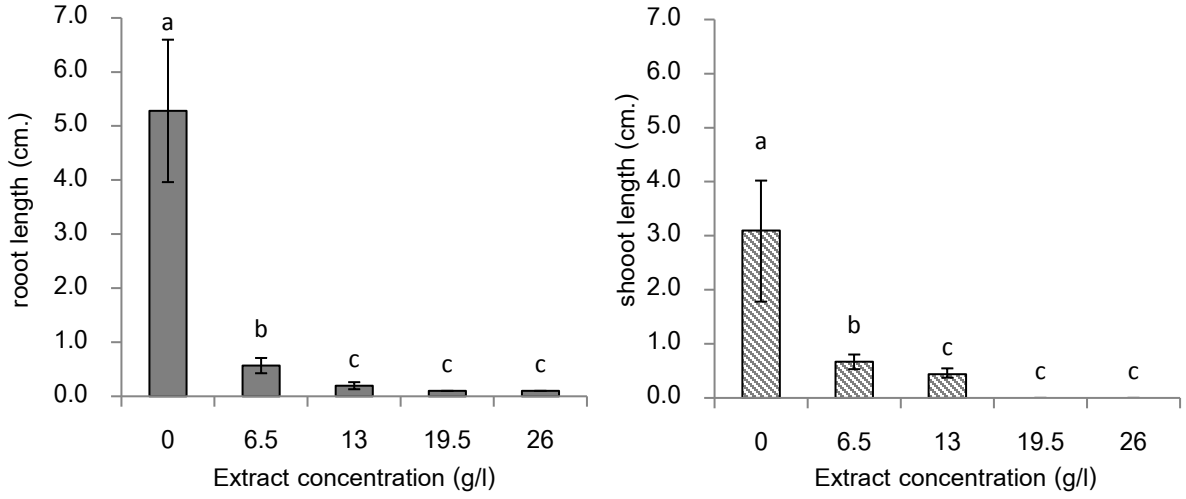


ภาพที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลแต่ละช่วงเวลาที่วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

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

ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า

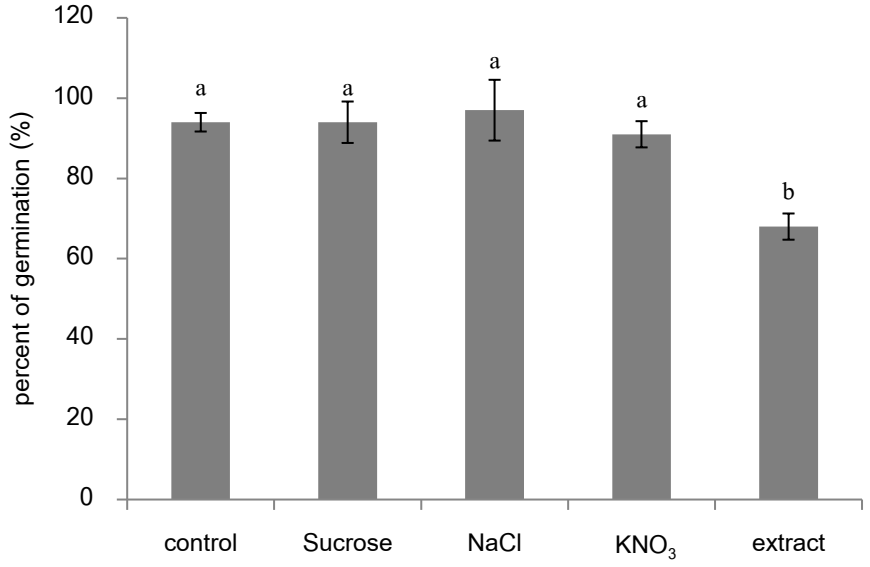
เมื่อนำเมล็ดข้าวที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน มาวัดความยาวรากและความยาวยอด พบว่า เมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบผักแครดมีความยาวรากและความยาวยอดแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบว่าความยาวราก และความยาวยอดลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น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



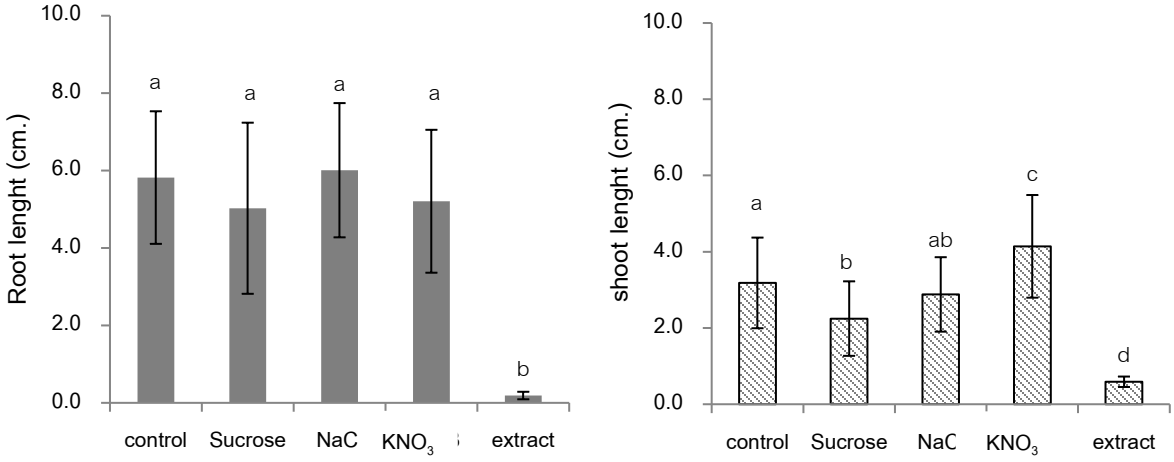
ภาพที่ 2 ความยาวรากและความยาวยอดของต้นกล้าที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 6.5, 13.0, 19.5 และ 26.0 กรัม/ลิตร (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

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 มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพืชหรือไม่ พบว่า เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำกว่าชุดควบคุม และสารละลายอื่นที่มีค่า Ψ_S เท่ากับสารสกัด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 3) เมื่อนำเมล็ดข้าวที่งอกมาวัดความยาวรากและความยาวยอด พบว่าเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีความยาวรากและความยาวยอดแตกต่างจากชุดควบคุมและสารละลายอื่นที่มีค่า Ψ_S เท่ากับสารสกัด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีความยาวรากและความยาวยอดต่ำกว่าชุดควบคุมและสารละลายอื่นอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} และสารละลายที่มีค่า Ψ_S เท่ากับสารสกัด (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

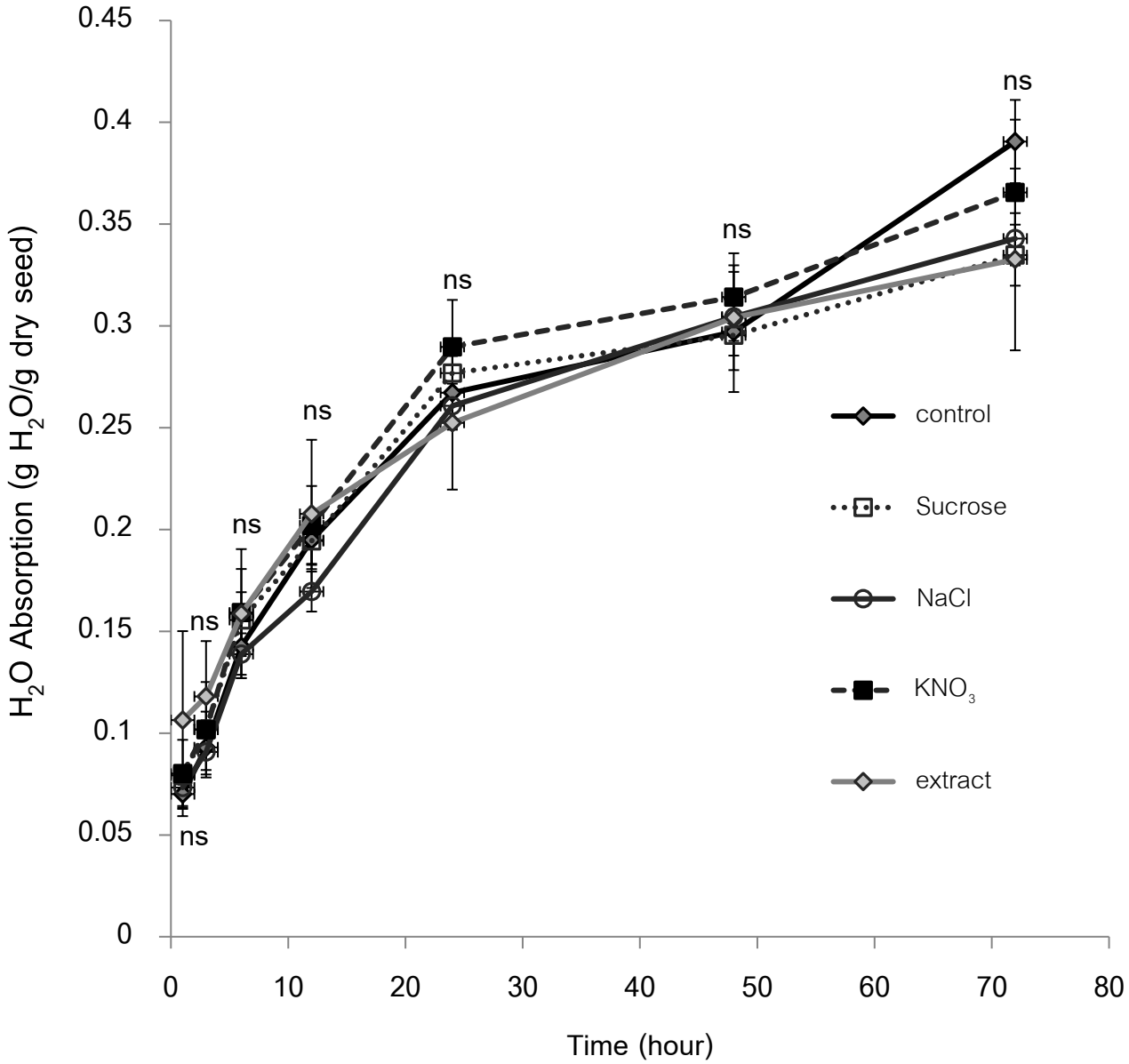


ภาพที่ 4 ความยาวรากและความยาวยอดของข้าวที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน ในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} และสารละลายที่มีค่า Ψ_S เท่ากับสารสกัด (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Tukeys-Kramer Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

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 ±SE; อักษรย่อ ns แสดงข้อมูลไม่มีแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ด้วย One-Way ANOVA)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

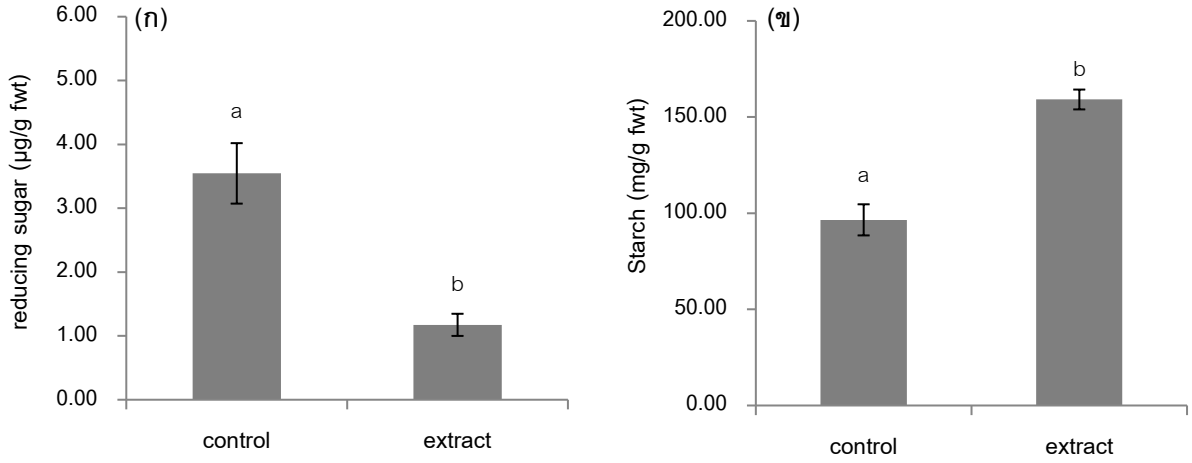
จากการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดใบผักแครด มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 1.17 µg /g fwt ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.55 µg /g fwt โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน (ภาพที่ 6)

ปริมาณแป้ง (starch)

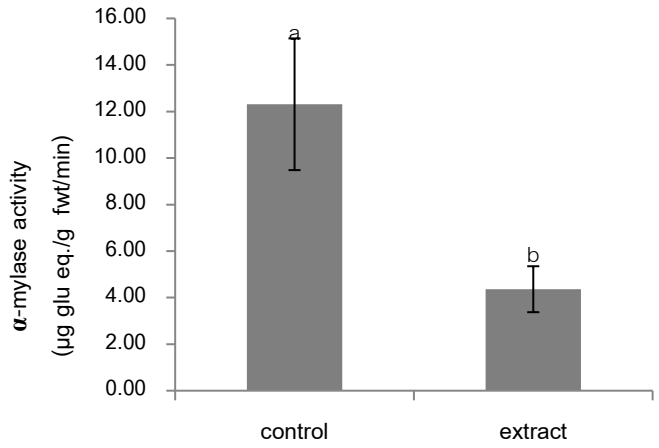
จากการหาปริมาณแป้งในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} เป็นเวลา 7 วัน โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดใบผักแครดมีปริมาณแป้ง เท่ากับ 159.13 mg /g fwt ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณแป้งเท่ากับ 96.54 mg /g fwt โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณแป้งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน (ภาพที่ 7)

กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} 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 ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ก) ปริมาณแป้ง (ข) ในเมล็ดข้าวที่เพาะในสารสกัดจากใบผักแครดที่ IC_{50} เป็นเวลา 7 วัน (แถบความคลาดเคลื่นแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร ab แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Independent Samples Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



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

วิจารณ์ผล

ผลของสารสกัดจากใบผักแครดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของข้าว

จากการศึกษาผลของสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครดต่อการงอกของข้าว 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) อาจเป็นผลจากสารสกัดไปยับยั้งการแบ่งเซลล์และการยืดตัวของเซลล์ (Scrivanti, 2010) Babula *et al.* (2014) รายงานว่า สารอัลลีโลพาธี naphthoquinone juglone สามารถยับยั้งความยาวรากของผักกาด (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L. cv) ได้ การยับยั้งจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และยังพบว่าความยาวรากที่ลดลงนี้มีความสัมพันธ์กับการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส (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 โดยนำสารสารสกัดจากใบผักแครดที่ 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 ของสารสกัดที่นำมาทดสอบไม่ใช่สาเหตุหลักที่ทำให้เมล็ดไม่งอก และยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้า ดังนั้นผลการยับยั้งน่าจะเกิดจากสารอัลลีโลพาธีจากใบผักแครด 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)*) และหญ้าก้นจ้ำขาว (*Bidens pilosa* L.)

การดูดน้ำ

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

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแป้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase

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

เปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล 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) ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (*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., Fraternale, 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, seeding growth and cell division of bioassay plants. *King Mongkuts 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, NA., Biware, MV., & Dhumal, KN. (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 pucida* L., *Amaranthus gracilis* Desf. and *Cleoma viscos*a 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 Agriculutre 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 activityes 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). *Allelophathic 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* (2 nd 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 precistion of six coloricmetric 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* (4 th 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)